

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Norbert Roewer

**Die Rolle kardialer β_1 - und β_2 -adrenerger Rezeptoren bei der
Desfluran-induzierten Postkonditionierung**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Anja Frank

aus Wertheim

Würzburg, Juli 2011

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

Koreferent: Prof. Dr. med. Rainer G. Leyh

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juli 2012

Die Promovendin ist Ärztin

Für meine Eltern und Christian

„In der Medizin wird der Mensch Gegenstand einer vorwiegend naturwissenschaftlichen Disziplin. Die Fortschritte der technisierten Medizin sind vor aller Augen. Man darf aber nicht vergessen, daß der Mensch, rein naturwissenschaftlich betrachtet, ein so kompliziertes System ist, daß eine strenge Erkenntnis des Wirkungszusammenhangs in diesem Körper nach dem Muster der Atomphysik oder der Molekulargenetik für alle uns heute vorstellbare Naturwissenschaft ausgeschlossen ist. Die siebziger Jahre könnten – so mag man optimistisch meinen – die Vollendung der Physik und die Enthüllung vieler biologischer Strukturen bringen; den Menschen, auch soweit er mit Recht naturwissenschaftlich analysiert wird, werden sie nicht enträtseln. Hier ist der Weg noch weit.“

(Die Einheit der Natur; Carl Friedrich von Weizsäcker, 1974)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungs- und Größenverzeichnis	iii
Abbildungsverzeichnis	vii
Tabellenverzeichnis	viii
1 Einleitung	1
1.1 Kardioprotektion	1
1.2 Kardioprotektion durch Präkonditionierung	2
1.2.1 Ischämische Präkonditionierung	2
1.2.2 Anästhetika induzierte Präkonditionierung	3
1.3 Kardioprotektion durch Postkonditionierung	6
1.3.1 Mechanismen der Ischämischen Postkonditionierung	6
1.3.2 Anästhetika induzierte Postkonditionierung	7
1.4 Myokardiale Ischämie – Reperfusionsschaden	9
1.4.1 Der Myokardiale Reperfusionsschaden	9
2 Funktion der kardialen β-adrenergen Rezeptoren und des Calciums	11
2.1 β -adrenerge Rezeptoren	11
2.1.1 Bedeutung der β -adrenergen Rezeptoren	11
2.1.2 Signaltransduktionswege β_1 - und β_2 -adrenerger Rezeptoren	11
2.2 Calcium	13
2.2.1 Bedeutung des Calciums	13
2.2.2 Funktion des Calciums und der CaMK II	13
3 Fragestellung	16
4 Material und Methoden	17
4.1 Versuchsgenehmigung	17
4.2 Durchführung der Untersuchung	17
4.2.1 Versuchstiere	17
4.2.2 Narkose und Beatmung	17
4.2.3 Präparation	19
4.2.4 Induktion der myokardialen Ischämie	20
4.2.5 Infarktgrößenbestimmung	21
4.2.6 Experimentelles Protokoll	22

4.2.7 Organentnahme	23
4.2.8 Protokoll zur Organentnahme	23
4.3 Molekularbiologische Auswertung	25
4.3.1 Herstellung der Lysate	25
4.3.2 Protein-Bestimmung nach Bradford	26
4.3.3 Auftrennung der Proteine	27
4.3.4 Western Immunoblotting	28
4.3.5 Antikörper-Inkubationen	29
4.3.6 Entwicklung	30
4.4 Statistische Analyse	31
5 Ergebnisse	33
5.1 Ergebnisse des Versuchsprotokolls	33
5.1.1 Systemisch hämodynamische Parameter	33
5.1.2 Arterielle Blutgasanalyse	37
5.1.3 Herzinfarktgröße	38
5.2 Ergebnisse der molekularbiologischen Auswertung mit Western Immunoblotting	41
5.2.1 CaMK II, Phosphorylierung von Phospholamban in der frühen Reperfusionphase	41
5.2.2 CaMK II, Phosphorylierung von Phospholamban in der späten Reperfusionphase	45
5.2.3 PKB/Akt	45
6 Diskussion	47
7 Zusammenfassung	57
Literaturverzeichnis	59

Abkürzungs- und Größenverzeichnis

Abkürzungen

AAR	area at risk; ischämisches Myokardareal
Abb.	Abbildung
AC	Adenylylzyklase
AIPost	anesthetic-induced postconditioning; Anästhetika induzierte Postkonditionierung
APC	anesthetic-induced preconditioning; Anästhetika induzierte Präkonditionierung
ATP	Adenosintriphosphat
β -AR	β -adrenerger Rezeptor
Ca^{2+}	Calciumionen
CaMK II	Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase II; Ca^{2+} /Calmodulin Kinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CcO	Cytochrom-C-Oxidase
CON	Kontrollgruppe
DES	Desfluran
DNA	Desoxyribonucleinacid; Desoxyribonukleinsäure
DOC	2-Desoxyglucose
$+\text{dP}/\text{dt} _{\text{max}}$	maximaler Anstieg des linksventrikulären Druckes (P) pro Zeit (t)
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	endotheliale NO-Synthetase
ERK 1/2	Extracellular signal-regulated kinase
ESMO	Esmolol, selektiver β_1 -adrenerger Rezeptorblocker
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
G_i -Proteine	inhibitorisches G-Protein
G_s -Proteine	stimulierendes G-Protein
GSK3 β	Glykogen-Synthase Kinase 3 β
H^+	Wasserstoffionen

HCO ₃ ⁻	Bikarbonat
HR	heart rate; Herzfrequenz
H-89	spezifischer PKA-Inhibitor
ICI 118,551	selektiver β ₂ -adrenerger Rezeptorblocker
IPC	Ischemic-induced preconditioning; Ischämisch induzierte Präkonditionierung
IPost	Ischemic-induced postconditioning; Ischämisch induzierte Postkonditionierung
I/R-Schaden	Ischämie/Reperfusionsschaden
K ⁺	Kaliumionen
KG	Körpergewicht
KN-93	Selektiver Blocker der CaMK II
LV	Linker Ventrikel
LVEDP	left ventricular enddiastolic pressure; linksventrikulärer enddiastolischer Druck
MAC	minimal alveolar concentration; minimale alveoläre Konzentration
MAP	mean arterial pressure; Mittlerer arterieller Blutdruck
mKATP	mitochondrialer ATP-sensitiver Kalium-Kanal
mPTP	mitochondrial permability transition pore mitochondriale Permeabilitätspore
Na ⁺	Natriumionen
NaCl 0,9 %	Physiologische Natriumchlorid-Lösung
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
p-Akt	Phospho-Akt
PI3 K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKC _e	Proteinkinase C _e
PKG	Proteinkinase G
PLB	Phospholamban

p-PLB	phosphoryliertes Phospholamban
RISK-Pathway	Reperfusion Injury Salvage Kinase-Pathway
ROS	Reactive oxygen species; reaktive Sauerstoffspezies
RyR	Ryanodinrezeptor
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase des SR
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
Ser	Serin
Tab.	Tabelle
Thr	Threonin
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid

Messgröße	Einheit	Einheitenbezeichnung
Druck	mmHg	Höhe Quecksilbersäule in Millimeter
elektrische Spannung	V	Volt
elektrische Stromstärke	A	Ampere
Herzfrequenz (HR)	min ⁻¹	pro Minute
Länge	m	Meter
	cm	Zentimeter
	mm	Millimeter
	nm	Nanometer
Masse	kg	Kilogramm
	g	Gramm
	mg	Milligramm
	μg	Mykrogramm
mittlere Erdbeschleunigung g ($9,81 \text{ m s}^{-2}$)	m s^{-2}	Meter pro Sekunde ²
Stoffmenge	mol	Mol
	mmol	Millimol
Temperatur	°C	Grad Celcius
Volumen	l	Liter
	ml	Milliliter
	μl	Mykroliter
Zeit	h	Stunde
	min	Minute
	s	Sekunde

Abbildungsverzeichnis

1	Schematische Darstellung des experimentellen Protokolls und des Protokolls zur Organentnahme	24
2	Darstellung der Herzinfarktgröße als Anteil der AAR des linken Ventrikels in Prozent, β_1 - und β_2 -Rezeptoren	39
3	Darstellung der Herzinfarktgröße als Anteil der AAR des linken Ventrikels in Prozent, PKA und CaMK II	40
4	Analyse der Westernblots der Proteinexpression der myokardialen CaMK II $_{\delta}$	41
5	Analyse der Westernblots der Proteinexpression des myokardialen PLB	42
6	Phosphorylierung von Phospholamban an den Positionen Serin-16 und Threonin-17, originale Immunoblots	43
7	Phosphorylierung von Phospholamban an den Positionen Serin-16 und Threonin-17, Mittelwerte	44
8	Analyse der Westernblots der Proteinexpression der myokardialen PKB/Akt und der Phosphorylierung der PKB/Akt	46

Tabellenverzeichnis

1	Systemisch hämodynamischer Parameter Herzfrequenz (HR)	34
2	Systemisch hämodynamischer Parameter mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)	35
3	Systemisch hämodynamischer Parameter maximaler Anstieg des linksventrikulären Druckes ($+dP/dt _{\max}$)	36
4	Systemisch hämodynamischer Parameter linksventrikulärer enddiastolischer Blutdruck (LVEDP)	37
5	Größe der AAR als Prozentwert der Größe des linken Ventrikels . .	38

1 Einleitung

1.1 Kardioprotektion

Myokardiale Ischämien und Myokardinfarkte stellen die wichtigsten Risikofaktoren für kardiale Morbidität und Mortalität in der perioperativen Phase dar [1]. Mangano et al. definieren die perioperative kardiale Morbidität als das Auftreten von Myokardinfarkt, instabiler Angina pectoris, Herzinsuffizienz, gefährlicher Arrhythmien und plötzlichem Herztod in engem zeitlichen Abstand zu einem operativen Eingriff [2]. Die myokardiale Ischämie und der Myokardinfarkt stellen dabei die wichtigsten Komplikationen dar [3]. Strategien, die das Herz vor den Folgen ischämischer Phasen schützen, sind daher von großer Bedeutung für den anästhesiologisch tätigen Arzt.

Für die Ischämisch induzierte Präkonditionierung (IPC) und die Anästhetika induzierte Präkonditionierung (APC) konnte bereits in zahlreichen experimentellen [4–6] und klinischen [7–9] Studien nachgewiesen werden, dass sie kardioprotektiv wirken [10, 11] und auch das Ausmaß eines nach einer längeren Ischämie entstehenden Reperfusionsschadens verringern können [12, 13]. Die klinische Anwendung der IPC und APC ist jedoch limitiert, da mit Ausnahme bestimmter klinischer Interventionen, wie zum Beispiel bei der Versorgung mit einem Aortokoronaren Bypass unter Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine, wobei es während der Phase der Abklemmung der Aorta zu einer zeitlich definierten Ischämie kommt, das zeitliche Auftreten einer myokardialen Ischämie oder eines Infarktes nicht vorhersehbar ist. Die kardioprotektive Wirkung der Ischämisch induzierten Postkonditionierung (IPost), d.h. durch Reokklusion des Gefäßes induzierte Zyklen kurzzeitiger Ischämien nach einem Infarktereignis, konnte ebenfalls schon in experimentellen [14, 15] und klinischen [16–18] Studien gezeigt werden. Auch volatile Anästhetika weisen eine bedeutende protektive Wirkung gegen myokardiale Reperfusionsschäden auf, wenn sie in der frühen Phase der Reperfusion verabreicht werden [11, 19]. Im Gegensatz zur Präkonditionierung bietet die Postkonditionierung die Möglichkeit einer zeitnah zu einem myokardialen Ereignis stehenden klinischen Anwendung. Die Anästhetika induzierte Postkonditionierung (AIPost) könnte somit eine neue Behandlungsmöglichkeit für die Therapie von Patienten mit perioperativen myokardialen Ischämien und Patienten mit Infarktereignis sein.

1.2 Kardioprotektion durch Präkonditionierung

Der Begriff der Präkonditionierung beschreibt einen Prozess, bei dem ein vorangehendes Ereignis als Trigger eine Veränderung des Phänotyps einer Zelle induziert, so dass die Toleranz dieser Zelle gegenüber einer ischämischen Phase und der auf die Ischämie folgenden Phase der Reperfusion entscheidend verbessert wird. Als Trigger können dabei kurzzeitige Ischämien oder bestimmte pharmakologische Substanzen dienen. Daher wird bei dem Prozess der Präkonditionierung zwischen einer ischämisch induzierten Präkonditionierung und einer pharmakologisch induzierten Präkonditionierung, zu der auch die APC zählt, unterschieden.

Neben den volatilen Anästhetika können auch einige andere Pharmaka wie Adenosin [20], Opioide [21] oder Nitroglycerin [22] eine Kardioprotektion induzieren und das Myokard vor den Folgen einer längerdauernden Ischämie schützen.

1.2.1 Ischämische Präkonditionierung

Das Phänomen der Ischämischen Präkonditionierung wurde erstmals 1986 von Murry et al. beschrieben. In Tierexperimenten an Hunden konnten sie zeigen, dass durch vier je fünfminütige Ischämiephasen, denen jeweils vier Phasen einer fünfminütigen Reperfusion folgten, und einer anschließenden 40 Minuten dauernden Koronarokklusion die Herzinfarktgröße um etwa 75 % reduziert werden kann [23]. Die IPC gilt als der am wirkungsvollsten bisher identifizierte endogene Protektionsmechanismus im Myokard zur Reduzierung der Herzinfarktgröße. Er konnte tierexperimentell an mehreren Spezies [24] und am Menschen [25, 26] nachgewiesen werden. Der klinische Einsatz der IPC ist ebenfalls schon erfolgreich untersucht worden [7, 8, 27].

Es wird zwischen einer frühen Phase der IPC, dem sog. ersten Fenster, das über eine Zeit von ein bis zwei Stunden anhält [28], und einer späten Phase der IPC, dem sog. zweiten Fenster der Kardioprotektion mit einer erneuten Phase der gesteigerten Widerstandsfähigkeit des Myokards gegenüber längeren Ischämiephasen, 24 Stunden nach dem IPC-Reiz, unterschieden. Dieser Effekt der verzögerten Präkonditionierung (delayed preconditioning) hält für etwa 48-72 Stunden an [29, 30].

Dem protektiven Effekt der IPC liegen komplexe Mechanismen zugrunde, welche die kaskadenartige Aktivierung und das Zusammenspiel verschiedener intra- und extrazellulärer Mediatoren umfassen. Nach dem heutigen wissenschaftlichen

Kenntnisstand, der auf tierexperimentellen Untersuchungen beruht, nimmt man an, dass der IPC-Stimulus in der frühen Phase die Bildung endogener Liganden wie Adenosine, Bradykinine und Opioide induziert, die Signaltransduktionswege initiieren, die das IPC-Signal von der Zelloberfläche zu den Mitochondrien leiten. Diese Signaltransduktionswege umfassen G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Adenosin- [31, 32], Opioid- und α_1 - und β -adrenerge Rezeptoren, epidermale Wachstumsfaktoren, die Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3 K), Akt, die endotheliale NO-Synthetase (eNOS), NO, Guanylatzyklase, zyklisches Guanosin-Monophosphat (cGMP), die Proteinkinase G (PKG), die Proteinkinase C ϵ (PKC ϵ), reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) und ERK1/2 (42 und 44-kD extracellular signal-regulated kinase) [32]. Der Calciumeinstrom während der Ischämie wird gehemmt. Die wichtigste subzelluläre Struktur, über die die kardioprotektive Wirkung der IPC vermittelt wird, ist vermutlich der im Verlauf des IPC-induzierten Signaltransduktionsweges aktivierte ATP-sensitive mitochondriale Kalium-Kanal (mK_{ATP}) der inneren Mitochondrienmembran. Durch die Aktivierung des mK_{ATP} kommt es zu einer Hemmung der Öffnung der mitochondrial permeability transition pore (mPTP). Die Öffnung der mPTP gilt als wichtigster Mediator des myokardialen Zelltodes in der Reperfusionsphase nach der Ischämie [32]. Die kardioprotektive Wirkung der IPC auf die Myokardzelle ist demnach nicht nur auf die Zeit des gesetzten IPC-Stimulus vor dem ischämischen Ereignis beschränkt, sondern reicht bis in die Phase der Reperfusion nach der Ischämie. Die IPC kann wie die IPost den sogenannten Reperfusion Injury Salvage Kinase- (RISK-) pathway aktivieren [32]. Der RISK-pathway wird zum Zeitpunkt der myokardialen Reperfusion aktiviert und initiiert kardioprotektive Mechanismen in der Zelle. Er umfasst auch die Elemente des beschriebenen IPC-Signalweges. IPC induziert vermutlich über den RISK-Pathway auch den Effekt des delayed preconditioning [32].

1.2.2 Anästhetika induzierte Präkonditionierung

Der Mechanismus der Anästhetika induzierten Präkonditionierung beschreibt einen Vorgang, über den durch die Applikation von volatilen Anästhetika vor einer durch Koronarokklusion induzierten Ischämiephase eine kardioprotektive Wirkung und Reduzierung der Herzinfarktgröße erreicht werden kann. Während der Phase der Ischämie ist dabei kein volatiles Anästhetikum nachweisbar.

Volatile Anästhetika haben eine negativ inotrope und chronotrope Wirkung und vermindern dadurch den myokardialen Sauerstoffverbrauch. Die kardioprotekti-

ve Wirkung der Inhalationsanästhetika wurde deshalb zunächst damit begründet, dass sie das Verhältnis zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf günstig beeinflussen. Kardioprotektive Effekte konnten für Halothan allerdings auch dann nachgewiesen werden, wenn es während einer Kardioplegie oder erst in der Reperfusionphase appliziert wurde [33, 34]. Die günstige Beeinflussung der Sauerstoffbilanz konnte somit nicht der einzige Mechanismus sein, auf dem die kardioprotektive Wirkung volatiler Anästhetika beruht. Kurz nach der Erstbeschreibung der IPC von Murry et al., konnten Warltier et al. nachweisen, dass volatile Anästhetika einen positiven Effekt auf myokardiales Stunning haben, da unter volatilen Anästhetika eine bessere Erholung der myokardialen Funktion nach Koronarokklusion erreicht wurde [35].

Die APC ist nach bisherigen Untersuchungen an Kanninchen in ihrer Wirkung genauso effektiv wie die IPC und vermindert im Experiment die Herzinfarktgröße gleichermaßen um 50 bis 70 % [6, 36]. Für Desfluran und Isofluran konnte gezeigt werden, dass sie ähnlich der IPC ein zweites Fenster der Kardioprotektion induzieren [37, 38]. Die Präkonditionierung des Myokards durch Isofluran ist nicht dosisabhängig. Kehl et al. konnten zeigen, dass Isofluran bereits in einer Konzentration von 0,25 MAC das Myokard präkonditionieren kann. Eine Konzentrationserhöhung des volatilen Anästhetikums führte zu keiner weiteren Verminderung der Herzinfarktgröße [4, 39].

Es konnte bislang für alle klinische relevanten volatilen Anästhetika, d.h. Halothan [36, 40], Enfluran [36], Isofluran [36, 40], Sevofluran [40] und Desfluran [40], im Tiermodell eine präkonditionierende Wirkung nachgewiesen werden. In einer direkt vergleichenden Untersuchung am Kaninchen konnten erstmals Unterschiede in der präkonditionierenden Wirksamkeit der volatilen Anästhetika gezeigt werden [40].

Die genauen Mechanismen der APC sind in ihrer Komplexität nicht vollständig aufgeklärt. Es ist aber bekannt, dass die IPC und die APC über ähnliche Signaltransduktionswege eine Kardioprotektion vermitteln.

Die gemeinsame Beteiligung von Guanin-regulierten Proteinen, G-Protein gekoppelten Rezeptoren wie Adenosin (A_1)- [41], Opioid δ_1 - [42], α_1 - [43] und β_1 - [44] adrenerge Rezeptoren, Proteinkinase C [45] sowie mitochondriale und sarkolemale K_{ATP} -Kanäle [46, 47] spielen eine wichtige Rolle im Präkonditionierungspro-

zess. Viele endogene Mediatoren der IPC wirken über $G_{i/o}$ -Proteine, die PKC und ROS und bewirken vermutlich die Aktivierung von mK_{ATP} -Kanälen [48, 49]. Die Vermittlung der APC durch die PKC konnte bereits tierexperimentell nachgewiesen werden. Wie die IPC führt auch die APC zu einer Translokation der Isoenzyme δ und ϵ der PKC in mitochondriale und sarkolemmale Membranen. Die Beteiligung des mitochondrialen K_{ATP} -Kanals ist nachgewiesen, die Bedeutung des sarkolemmalen K_{ATP} -Kanals umstritten [50]. Auch zur Funktion und Lokalisation der einzelnen Isoenzyme der PKC bei der Signaltransduktion der APC liegen widersprüchliche Ergebnisse vor, vermutlich wird die kardioprotektive Wirkung aber über die PKC ϵ vermittelt [51, 52]. Auch die Beteiligung von ROS konnte für die Vermittlung der kardioprotektiven Wirkung der APC nachgewiesen werden [53]. ROS bewirken eine Aktivierung der mK_{ATP} -Kanäle [54]. Auch für NO [49] und die Cyclooxygenase 2 [55] konnte gezeigt werden, dass sie eine Rolle bei der APC spielen und die Aktivität von mK_{ATP} -Kanälen beeinflussen. Volatile Anästhetika vermitteln ihre Wirkung somit wahrscheinlich durch eine direkte oder indirekte Öffnung von mK_{ATP} -Kanälen [48, 49]. Der entscheidende kardioprotektive Effekt, der durch die Öffnung der mK_{ATP} -Kanäle erzielt wird, ist vermutlich die Verminderung der Calciumakkumulation im Zytosol und in den Mitochondrien während der Ischämie und in der Phase der Reperfusion [13, 56]. Dies wird vermutlich über eine Verminderung der ATP-Synthese und eine Optimierung der oxidativen Phosphorylierung bewirkt, die zu einer Stabilisierung der mitochondrialen Matrix führen und dadurch den Ca^{2+} -Influx hemmen [57]. Die Optimierung des Energiestoffwechsels wirkt der Apoptose und Nekrose entgegen [58].

Piriou et al. konnten zeigen, dass die mPTP auch im Mechanismus der APC eine Rolle spielt. Die Desfluran-induzierte Präkonditionierung konnte die Öffnung der mPTP hemmen [59]. Raphael et al. wiesen nach Isofluran-induzierter Präkonditionierung eine Reduzierung des Ischämie / Reperfusionsschadens sowie eine Beteiligung von PI3 K-Akt nach [12]. Somit könnte auch die APC zu einer Aktivierung des RISK-Pathway während der Phase der Reperfusion führen. Die Kardioprotektion durch APC ist nicht nur anhand tierexperimenteller Daten belegt. Mittlerweile gibt es bereits in einigen klinischen Studien Hinweise dafür, dass eine kardioprotektive Wirkung durch APC auch beim Menschen existiert [60–62].

1.3 Kardioprotektion durch Postkonditionierung

Im Jahr 2003 konnte die Arbeitsgruppe um Zhao et al. zeigen, dass eine kardioprotektive Wirkung und Reduzierung der Infarktgröße nicht nur durch den Mechanismus der IPC erreicht werden kann, sondern auch durch repetitive kurzzeitige myokardiale Ischämien, die erst in der Phase der Reperfusion im Anschluss an eine länger dauernde Ischämie des Myokards erfolgen [63].

In Versuchen an Hunden wurden nach einer 45-minütigen Koronarokklusion in der frühen Reperfusionsphase drei Zyklen einer 30 Sekunden dauernden Reperfusion und einer 30 Sekunden dauernden Reokklusion der linken Koronararterie gesetzt. Die Infarktgröße konnte hierdurch von 47 auf 11 % reduziert werden und ist somit mit der Infarktgrößenreduktion, die durch die IPC erreicht werden kann, vergleichbar.

Dieses Phänomen wurde daher mit dem Begriff der Ischämischen Postkonditionierung benannt. Die IPost schwächte zudem den nach einer längeren Zeit der Ischämie am Myokard entstehenden Reperfusionsschaden ab. Die Ödembildung im Gewebe, inflammatorische Prozesse durch Akkumulation von Neutrophilen, endotheliale Dysfunktion und die Bildung von Sauerstoffradikalen konnte vermindert werden [63].

1.3.1 Mechanismen der Ischämischen Postkonditionierung

Der Mechanismus der IPost ist definiert als ein Aufeinanderfolgen von Phasen der Reperfusion, die von kurzen durch Reokklusionen induzierten Ischämiephasen unterbrochen werden. Die IPost wird mit Beginn der frühen Reperfusionsphase nach Ischämie eingesetzt.

Eine Beteiligung endogener Adenosine konnte als Trigger der IPost nachgewiesen werden. Die kardioprotektive Wirkung wird über die Adenosinrezeptortypen A_2 und A_3 , nicht aber über den Typ A_1 erreicht [15]. Adenosine können dabei anti-inflammatorische Effekte durch Hemmung von Neutrophilen vermitteln [64]. Auch endogene Opioide und Bradykinin haben vermutlich eine Triggerfunktion bei der IPost. Opioide, Bradykinin und auch Adenosine vermitteln eine Signaltransduktion über G-Protein gekoppelte Rezeptoren [65].

Für die IPost ist auf subzellulärer Ebene die Aktivierung von mK_{ATP} -Kanälen der

inneren Mitochondrienmembran nachgewiesen. Die IPost induziert die Aktivierung des mK_{ATP} -Kanals, dadurch wird eine Inhibition der Öffnung der mPTP erzielt [14, 66]. Die Öffnung der mPTP ist letztendlich der entscheidende Faktor, der den letalen Reperfusionsschaden einleitet [67, 68].

Die kardioprotektive Wirkung der IPost wird über Signaltransduktionswege, in denen die PI3 K und Phospho-Akt (p-Akt) [69] sowie die ERK 1/2, eNOS, NO, PKG und PKC [70] eine wichtige Rolle spielen, vermittelt. Diese molekularen Komponenten sind auch Elemente des Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-Pathway. Dieser RISK-Pathway beschreibt eine Signalkaskade, in deren Ablauf eine Aktivierung antiapoptotischer Kinasen erfolgt, die nach Einleitung der Reperfusion in einem Gebiet ischämischen Myokardgewebes zu einer Reduzierung des hier entstehenden Reperfusionsschadens und der Infarktgröße führen.

Die kardioprotektive Wirkung der IPost unterliegt zusätzlich einem zeitlichen Aspekt. Eine Reduzierung der Herzinfarktgröße wird nur erreicht, wenn die IPost direkt mit Einleitung der Reperfusion erfolgt [71]. Vermutlich ist auch die Dauer des Reperfusion-Reokklusions-Zyklus für die kardioprotektive Wirkung entscheidender als die Anzahl der Zyklen [72]. Die kardioprotektive Wirkung der IPost und die Reduktion der Infarktgröße konnte bereits in mehreren klinischen Studien nachgewiesen werden [16–18].

1.3.2 Anästhetika induzierte Postkonditionierung

Die kardioprotektive Wirkung volatiler Anästhetika im Rahmen der Anästhetika induzierte Präkonditionierung konnte bereits in experimentellen [4, 6, 47] und klinischen Studien [9, 60] nachgewiesen werden.

Die Arbeitsgruppe um Schlack und Preckel et al. untersuchte die Wirkung der volatilen Anästhetika Halothan, Enfluran, Isofluran, Sevofluran und Desfluran auf den myokardialen Reperfusionsschaden nach einer Ischämie am Kaninchenherzen *in vitro* und *vivo* [11, 19, 33]. Dieses Phänomen wird als Anästhetika induzierte Postkonditionierung bezeichnet. Es konnte in diesen experimentellen Untersuchungen nachgewiesen werden, dass die volatilen Anästhetika eine schützende Wirkung gegen den Reperfusionsschaden aufweisen, wenn sie in der frühen Phase der Reperfusion appliziert werden. In einer Studie am *in vivo*-Modell am Kaninchen konnte gezeigt werden, dass die Anwendung von Halothan während der ersten 15 Minuten der Reperfusion zu einer signifikanten Abnahme der Größe des

resultierenden Herzinfarktes führte [33]. In einer Folgestudie im gleichen Tiermodell wurden Isofluran, Enfluran, Desfluran und Sevofluran verglichen [11]. Die volatilen Anästhetika wurden jeweils für die ersten 15 Minuten während der Reperfusionphase bei einer Konzentration von 1,0 MAC gegeben. Hierbei zeigten sich unterschiedlich ausgeprägte Effekte der Kardioprotektion für die verschiedenen volatilen Anästhetika. Isofluran führte zu keiner Veränderung der Infarktgröße gegenüber Kontrolltieren, während Enfluran, Sevofluran und Desfluran die Infarktgröße verminderten [11]. Unter Desfluran zeigte sich die Infarktgrößenreduktion dabei am deutlichsten ausgeprägt. Neben einer Reduzierung der Herzinfarktgröße, konnte auch eine Verbesserung der ventrikulären kontraktiven Funktionen erreicht werden. Wie die APC weist somit auch die AIPost eine positive Wirkung gegen myokardiales Stunning auf. Die protektiven Effekte der volatilen Anästhetika wurden in dieser experimentellen Untersuchung zunächst auf deren negativ inotrope und chronotrope Wirkung zurückgeführt. Von der gleichen Arbeitsgruppe konnte bei Ratten im in vivo-Modell eine Kardioprotektion während der Reperfusion für Sevofluran nachgewiesen werden, wobei schon eine kurzzeitige Applikation von nur zwei Minuten ausreichend war, die Infarktgröße signifikant zu senken [10, 73].

In mehreren experimentellen Studien konnte eine direkte Beteiligung volatiler Anästhetika bei der Initiierung des RISK-Pathways nachgewiesen werden [74–76]. Krolkowski et al. zeigten, dass die Isofluran-induzierte Postkonditionierung wie die IPost die mPTP inhibiert und dass diese Inhibition von der Aktivierung des mK_{ATP} -Kanals abhängig ist [77]. Für Isofluran [74, 76] und Sevofluran [78] konnte zudem nachgewiesen werden, dass sie den PI3 K-Akt-Signaltransduktionsweg aktivieren und hierüber eine Reduktion der Infarktgröße vermitteln, wenn sie in der frühen Reperfusionphase verabreicht werden [74, 78].

In tierexperimentellen Untersuchungen zur Desfluran-induzierten Postkonditionierung konnte gezeigt werden, dass diese wie der Mechanismus der IPost einem zeitlichen Aspekt unterliegt. Eine kardioprotektive Wirkung konnte nur dann erreicht werden, wenn Desfluran zu Beginn der Reperfusionphase appliziert wurde, nicht aber, wenn Desfluran bereits in der Phase der Ischämie verabreicht wurde. In der gleichen Studie konnte für die Desfluran-induzierte Postkonditionierung nachgewiesen werden, dass diese wie die IPC, die APC und die IPost unter der Beteiligung von NO vermittelt wird [79].

1.4 Myokardiale Ischämie – Reperfusionsschaden

1.4.1 Der Myokardiale Reperfusionsschaden

Nach einem akuten Myokardinfarkt ist die frühzeitige Wiederherstellung des koronaren Blutflusses durch eine Thrombolyse oder eine Perkutane Coronare Intervention (PCI) die einzige erfolgreiche Therapiemaßnahme, um das Ausmaß der Herzinfarktgröße zu verringern und das klinische Outcome zu verbessern. Die Wiederherstellung des Blutflusses selbst kann jedoch zu einer weiteren Schädigung des zuvor ischämischen myokardialen Atrials führen und somit die gewollten positiven Effekte der wiedererlangten Blutversorgung unterbinden. Dieses Phänomen wird als Myokardialer Reperfusionsschaden oder Ischämie/Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) bezeichnet.

Der Begriff des Myokardialen Reperfusionsschadens wurde zuerst von Jennings et al. geprägt [80]. Ischämisches und anschließend reperfundiertes Myokardgewebe von Hunden wurde histologisch untersucht. Der entstandene Reperfusionsschaden stellte sich histologisch in Form einer Zellschwellung, Kontraktur der Myofibrillen, Ruptur des Sarkolemm und Austreten von Calciumphosphatpartikeln aus den Mitochondrien in das Zytosol dar.

Der myokardiale Gewebeschaden verursacht eine kardiale Dysfunktion, die sich in den vier Formen Arrhythmie [81], myokardiales Stunning [82], no-reflow Phänomen [83] sowie letalen Reperfusionsschaden mit Infarzierung des Gewebes äußert. Das myokardiale Stunning beschreibt eine mechanische Dysfunktion des Myokards, die auch nach Wiederherstellung des koronaren Blutflusses und ohne dabei erkennbar irreversiblen Gewebeschaden bestehen bleibt. Ein no-reflow Phänomen hingegen bedeutet, dass trotz Wiedereröffnung und Durchblutung der Koronararterie durch eine Okklusion der mikrovaskulären Gefäße die Durchblutung des Myokardgewebes nur unzureichend bleibt. Arrhythmien [84], myokardiales Stunning [85], no-reflow [83] sowie die Infarktgröße sind wichtige Prognosefaktoren des klinischen Outcomes.

Der letale Reperfusionsschaden, der nach Wiederherstellung des koronaren Blutflusses auftritt, kann nach einer Phase der Ischämie im betroffenen Myokardgewebe zu einem Absterben von Myokardzellen führen, die vor Einleitung der Reperfusion potentiell lebensfähig sind [86]. Die weitgehende Verhinderung des Reperfusionsschadens stellt somit eine Option zur Verbesserung der Therapiemaßnahmen nach

Infarktereignissen dar.

Während der myokardialen Reperfusion werden im akut ischämischen Myokard eine Reihe biochemischer und metabolischer Veränderungen als Reaktion der Zellen auf die vorherige Phase der Ischämie ausgelöst. Diese Veränderungen beinhalten die Energieversorgung durch die Mitochondrien, oxidativen Stress und Bildung von ROS, Anstieg des intrazellulären Calciums, die schnelle Wiederherstellung des physiologischen pH-Wertes und inflammatorische Prozesse. Diese Veränderungen bedingen eine Öffnung der mPTP sowie eine Hyperkontraktur der Kardiomyozyten und führen damit zum myokardialen Zelltod [87].

Die IPost wirkt nachweislich der Entstehung des letalen Reperfusionsschadens entgegen [88, 89]. Ischämische Postkonditionierung inhibiert zudem die Öffnung der mPTP [68] und aktiviert den RISK-Pathway [90]. Klinische Untersuchungen konnten bereits zeigen, dass durch eine gezielte therapeutisch angewandte Ischämische Postkonditionierung der myokardiale Reperfusionsschaden reduziert werden kann [16, 17].

Nach Entdeckung des RISK-Signaltransduktionsweges und der mPTP, stellen diese molekularen und subzellulären Elemente eine weitere Möglichkeit einer gezielten Pharmakologischen Intervention zur Verminderung des I/R-Schadens dar. So konnten Hausenloy et al. mit einer Studie an isolierten Rattenherzen zeigen, dass die Hemmung der Öffnung der mPTP mittels des Immunosuppressors Sanglifehrin-A während der frühen Reperusionsphase die Herzinfarktgröße reduziert [67]. Die Hemmung der mPTP mit Cyclosporin-A konnte tierexperimentell den myokardialen Zelltod verhindern [91] und in einer klinischen Studie die Größe des Myokardinfarktes reduzieren [92].

Pharmakologische Substanzen wie Adenosin [93], Opiode [94], Insulin [95] und Erythropoetin [96] können direkt den RISK-Pathway initiieren. Auch für die volatilen Anästhetika gibt es tierexperimentelle Nachweise, dass sie im Rahmen der Anästhetika induzierten Postkonditionierung die Herzinfarktgrößen reduzieren [11, 19] direkt den RISK-Pathway aktivieren [74] und die Öffnung der mPTP hemmen [77], wenn sie in der frühen Phase der Reperfusion verabreicht werden, und so das Ausmaß des entstehenden Reperfusionsschadens vermindern können.

2 Funktion der kardialen β -adrenergen Rezeptoren und des Calciums

Die genauen Mechanismen, die der kardioprotektiven Wirkung der AIPost zugrunde liegen, sind noch nicht hinreichend bekannt. Es gibt aber grundlegende Hinweise darauf, dass die AIPost und die APC über ähnliche Signaltransduktionswege ablaufen und durch ähnliche Mechanismen kardioprotektiv wirken. Die Signaltransduktionswege über kardiale β -adrenerge Rezeptoren und die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase scheinen hierbei wichtige Ziele bei der Vermittlung der Kardioprotektion zu sein.

2.1 β -adrenerge Rezeptoren

2.1.1 Bedeutung der β -adrenergen Rezeptoren

Genetisch und pharmakologisch werden drei Subtypen von β -adrenergen Rezeptoren (β -AR) unterschieden, β_1 -AR, β_2 -AR und β_3 -AR. Die β_1 -AR und β_2 -AR sind die im Myokard der meisten Spezies, einschließlich des Menschen, dominierenden Subtypen. Im Ventrikel des Menschen sind davon ca. 80 % β_1 -AR und 20 % β_2 -AR [97]. Die β_1 -AR und β_2 -AR sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren und Ziel der endogenen Katecholamine Noradrenalin und in geringerem Maße auch Adrenalin. Noradrenalin und Adrenalin sind Transmitter des sympathischen Nervensystems [98]. Tierexperimentell wurde gezeigt, dass die Konzentration von Katecholaminen während der myokardialen Ischämie ansteigt [99].

Neben weiteren an G-Proteine gekoppelte Rezeptoren spielen die β_1 -adrenergen Rezeptoren eine bedeutende Rolle bei der Anästhetika induzierten Präkonditionierung [44]. Eine Beteiligung β_1 -AR und β_2 -AR konnte auch in der IPC gezeigt werden [100, 101]. Welche Bedeutung der β -adrenerge Signaltransduktionsweg für die Anästhetika induzierte Postkonditionierung hat, ist jedoch noch unbekannt.

2.1.2 Signaltransduktionswege β_1 - und β_2 -adrenerger Rezeptoren

Die β_1 -AR und β_2 -AR sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Über beide Rezeptorsubtypen kann der klassische G_s (stimulatorisches G-Protein)- AC(Adenylylzyklase)-cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat)- PKA(Proteinkinase A) Signaltransduktionsweg induziert werden. Der Signalweg über G_s -AC-cAMP-PKA führt zu einer

2. Funktion der kardialen β -adrenergen Rezeptoren und des Calciums

Phosphorylierung sarkolemmaler L-Typ Calciumkanäle, der Ca^{2+} -ATPase des Sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA), des Phospholambans (PLB) und von Myofilamenten und vermittelt dadurch positiv inotrope, chronotrope und lusitrope Effekte. Während β_1 -AR eine Signaltransduktion nur über G_s -Proteine vermitteln, können β_2 -AR auch an inhibitorische G-Proteine (G_i -Proteine) gekoppelt eine Signaltransduktion über G_i -PI3 K-PKB (PKB, Proteinkinase B, Akt) leiten. Diese Umkopplung der β_2 -AR von G_s -Proteine auf G_i -Proteine ist zeitabhängig und erfolgt nach lange andauernder Stimulierung des Rezeptors mit einem β_2 -adrenergen Agonisten [102]. Vermutlich wird PKA-abhängig der Rezeptor phosphoryliert und dadurch an das G_i -Protein gekoppelt. Die aktivierte PI3-Kinase führt zusätzlich zu einer Hemmung der über G_s -AC-cAMP-PKA vermittelten Phosphorylierung der Calcium regulierenden Proteine. Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass β_2 -adrenerge Rezeptoren nach langanhaltender Stimulierung über G_i -Proteine kardioprotektiv wirken, da sie das Myokard vor einer Katecholamin-, Hypoxie- und ROS-induzierten Apoptose schützen können [103]. Wahrscheinlich spielen hier auch ERK1/2, die wie PI3 K und Akt, Teil des RISK-Pathway sind, eine Rolle [102, 103].

Wang et al. konnten nachweisen, dass anhaltende Stimulierung β_1 -AR zu einer PKA-unabhängigen Aktivierung der CaMK II führt. Die CaMK II-Aktivierung ist gleichzeitig mit einer Abnahme der über den cAMP-PKA-Weg vermittelten Signaltransduktion verbunden [104]. Die β_1 -adrenerge PKA-unabhängige CaMK II-Aktivierung induziert einen Anstieg des intrazellulären Calciums, Hypertrophie und Apoptose der Kardiomyozyten [105]. Die β_1 -AR und β_2 -AR vermitteln somit nach langanhaltender Aktivierung vermutlich gegenteilige Effekt, eine apoptotische Wirkung über β_1 -AR und eine antiapoptotische Wirkung über β_2 -AR [106, 107]. Spear et al. konnten die unterschiedlichen Funktionen β_1 -AR für die IPC und den I/R-Schaden zeigen. Während der IPC war der β_1 -AR an der Vermittlung der kardioprotektiven Wirkung beteiligt, Blockade des β_1 -AR hob den IPC-Effekt auf. Während der Okklusion und der Reperfusion hat der β_1 -AR wahrscheinlich Anteil am entstehenden I/R-Schaden, da in beiden Phasen eine Kardioprotektion durch Blockade der β_1 -AR erreicht wurde [101]. Die gleiche Arbeitsgruppe wies nach, dass Blockade der PKA in der Reperfusionphase den I/R-Schaden reduziert [108]. Frances et al konnten durch eine Isoproterenol-induzierte Präkonditionierung dosisabhängig eine mit der IPC vergleichbare Kardioprotektion über Stimulierung β_1 -AR und β_2 -AR zeigen [109]. In einem in vivo-Versuch am Herzin-

farktmodell des Kaninchens konnte unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass die Desfluran- und die Sevofluran-induzierte Präkonditionierung über den β_1 -adrenergen Signaltransduktionsweg vermittelt wird. Blockade des β_1 -AR hob die APC auf und schwächte die Kardioprotektion in der IPC ab. Blockade der PKA hob die APC ebenfalls auf, hatte aber keinen Einfluss auf die IPC [44]. Die Signaltransduktionswege über β_1 -AR und β_2 -AR scheinen komplexen und zeitabhängigen Mechanismen zu unterliegen. Die β_1 -AR spielen eine Rolle bei der Entstehung chronischer Herzerkrankungen [97]. Ständige Stimulierung β_1 -AR kann Remodellingprozesse, dilatative Kardiomyopathie, Herzversagen und Apoptose der Kardiomyozyten auslösen [103, 106]. Langanhaltende Aktivierung β_2 -AR ist dagegen vermutlich kardioprotektiv [103].

2.2 Calcium

2.2.1 Bedeutung des Calciums

Es gibt wichtige Hinweise sowohl für die AIPost als auch für die APC geltende Hinweise dafür, dass die Verhinderung einer intrazellulären Ca^{2+} -Akkumulation ein entscheidendes Ziel der volatilen Anästhetika in der Prävention der Folgen des myokardialen Reperfusionsschadens ist [110, 111]. Die Anhäufung von Calcium sowie die gestörte Calciumhomöostase im Zytosol in der Phase der Ischämie und der Reperfusion ist eine wesentliche Ursache für die kontraktile Dysfunktion des Myokards und den Zelltod der Kardiomyozyten nach der Ischämie/Reperfusion [112, 113].

2.2.2 Funktion des Calciums und der CaMK II

Intrazelluläres Calcium ist der wichtigste second messenger bei der Umwandlung elektrischer Signale in eine mechanische Aktivität des Herzmuskels. Dieser Exzitations-Kontraktions Mechanismus ist ein sehr genau auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration abgestimmter Prozess. Störungen der Ca^{2+} -Homöostase können kontraktile Dysfunktionen und Arrhythmien verursachen. Daher werden der zelluläre Efflux und Influx von Ca^{2+} sowie die Umverteilung des Ca^{2+} in zelluläre Kompartimente in den Phasen der Systole und der Diastole durch einige Ca^{2+} -abhängige Proteine reguliert. Die wichtigsten dieser Proteine sind Calmodulin (CaM) und die Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II). Von der CaMK II existieren vier Isoformen α , β , γ und δ , die CaMK II $_{\delta}$ ist die vorherrschende Isoform im Myokard [114].

2. Funktion der kardialen β -adrenergen Rezeptoren und des Calciums

Während des Aktionspotentials strömt Calcium über L-Typ Ca^{2+} -Kanäle und die reverse Funktion des Na^+ - Ca^{2+} -Austauschers in die Zelle ein und triggert über den Ryanodinrezeptor (RyR) die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Ca^{2+} bindet an Troponin C und aktiviert die Myofilamente zur Kontraktion in der Systole. In der Diastole wird Ca^{2+} über die Ca^{2+} -ATPase des SR (SERCA) wieder ins SR aufgenommen bzw. über den Na^+ / Ca^{2+} -Austauscher aus der Zelle transportiert, nur ein geringer Teil wird über sarkolemmale Ca^{2+} -Pumpen und mitochondriale Ca^{2+} -Kanäle aus dem Zytosol entfernt. Phospholamban (PLB) inhibiert in dephosphoryliertem Zustand SERCA. Steigt die intrazelluläre $[\text{Ca}^{2+}]_i$, dann bindet CaM vier Ca^{2+} -Ionen. Dieser Ca^{2+} /CaM-Komplex bindet an die CaMK II und aktiviert diese, die Affinität der Ca^{2+} /CaM steigt bei hohen $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Nach dieser Aktivierung durch den Ca^{2+} /CaM-Komplex ist die CaMK II in der Lage, sich durch Autophosphorylierung selbst zu aktivieren. Die Funktion der Selbstaktivierung bleibt auch nach Dissoziation des Ca^{2+} /CaM-Komplexes und sinkenden $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erhalten. Die CaMK II moduliert den Exzitations-Kontraktionszyklus durch Phosphorylierung der wichtigsten Ca^{2+} -regulierenden Proteine, den L-Typ Ca^{2+} -Kanal, RyR und PLB. Durch Phosphorylierung des L-Typ Ca^{2+} -Kanals bzw des RyR wird der Ca^{2+} -Influx bzw die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR verstärkt. CaMK II phosphoryliert PLB an der Stelle Threonin-17, die PKA phosphoryliert PLB an Serin-16. In phosphoryliertem Zustand verstärkt PLB die Aktivität der SERCA und die Ca^{2+} -Aufnahme ins SR, dadurch kann frequenzabhängig die Relaxation des Myokards beschleunigt werden [115]. Die CaMK II ist somit wichtig für die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase und die Modulation des Exzitations-Kontraktions Mechanismus. Es konnte gezeigt werden, dass eine CaMK II-abhängige Phosphorylierung von PLB die Erholung der kontraktile Funktion des Myokards nach ischämiebedingter Azidose, während der es zu einem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} kommt, verbessert [116, 117]. Die CaMK II scheint auch eine wichtige Rolle für die IPC zu spielen. Eine Arbeit von Benter et al. konnte nachweisen, dass die Blockade von CaMK II mit KN-93 die mit IPC erreichte Verbesserung der linksventrikulären Funktion aufhebt [118]. In einer Studie unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die CaMK II auch eine Funktion in der APC hat. Eine Blockade der CaMK II mit KN-93 hob die Desfluran-induzierte Präkonditionierung auf [119].

Allerdings gibt es auch Hinweise darauf, dass die CaMK II während einer Azidose zwar die intrazelluläre Ca^{2+} -Situation und Kontraktionsfähigkeit des Myo-

2. Funktion der kardialen β -adrenergen Rezeptoren und des Calciums

kards durch Aktivitätssteigerung der SERCA verbessert, andererseits aber selbst eine Ca^{2+} -Überladung in der Zelle und dem Sarkoplasmatischen Retikulum induziert, wenn der physiologische pH-Wert wieder erreicht wird [86, 117].

Es konnte tierexperimentell gezeigt werden, dass eine dauernde Stimulierung von β_1 -adrenergen Rezeptoren, wie zum Beispiel unter den Bedingungen der Chronischen Herzerkrankungen oder des myokardialen Infarktes, anstelle der regulären Signalkaskade über die PKA, zu einer Aktivierung der CaMK II führt [103, 104, 120]. Die CaMK II kann im Ischämie / Reperfusionsschaden die Apoptose von Kardiomyozyten auslösen [121]. Eine Beteiligung der CaMK II bei der Entstehung Chronischer Herzerkrankungen wurde beschrieben [103]. Hemmung der CaMK II konnte tierexperimentell Remodellingprozesse [122] und Apoptose [121] nach Myokardinfarkt verhindern. Die Isoform CaMK II $_{\delta}$ ist auch im menschlichen Myokard nachgewiesen, ebenso die Überexpression im erkrankten Myokardgewebe [114].

3 Fragestellung

Ziel der vorliegenden experimentellen Arbeit war es, Erkenntnis über die bisher nicht untersuchte Funktion des β -adrenergen Signaltransduktionsweges für die Desfluran-induzierte Postkonditionierung sowie über die Bedeutung der intrazellulären Komponenten des β -adrenergen Signaltransduktionsweges, der PKA und der CaMK II, für die Desfluran-induzierte Postkonditionierung zu erlangen.

Dazu setzten wir Kaninchen in einem etablierten *in vivo*-Modell einer Myokardischämie aus. Zudem charakterisierten wir die Rolle des β -adrenergen Signaltransduktionsweges durch spezifische pharmakologische Blockade der β_1 -AR und β_2 -AR sowie der PKA und der CaMK II durch die jeweilige spezifische pharmakologische Blockade dieser beiden Kinasen.

Die resultierenden Herzinfarktgrößen charakterisierten wir in Abhängigkeit von der jeweiligen pharmakologischen Intervention bzw. der Dauer der Blockade von β_1 -AR. Folgende Hypothesen wurden in dieser Untersuchung getestet:

1. Die Desfluran-induzierte Postkonditionierung wird über die kardialen β_1 -AR und β_2 -AR vermittelt.
2. Die Desfluran-induzierte Postkonditionierung wird über die intrazellulären Komponenten des β -adrenergen Signaltransduktionsweges, die PKA sowie die CaMK II vermittelt.
3. Eine langanhaltende Blockade von β_1 -AR über die gesamte Dauer der Reperfusionphase reduziert nach experimenteller Ischämie die Infarktgröße.

4 Material und Methoden

4.1 Versuchsgenehmigung

Gemäß dem Tierschutzgesetz über Versuche an lebenden Tieren wurde der Tierversuchsantrag von der zuständigen Behörde der Regierung von Unterfranken in Würzburg genehmigt. Alle experimentellen Vorgänge wurden gemäß den *Guiding Principles in the Care and Use of Animals der American Physiological Society* angepasst und entsprechen dem *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* [123].

4.2 Durchführung der Untersuchung

4.2.1 Versuchstiere

Die Durchführung der experimentellen Untersuchungen erfolgte an männlichen weißen Neuseelandkaninchen. Die Tiere hatten ein Alter von neun bis zwölf Wochen, ihr Gewicht betrug zwischen 2000 und 2500 g.

Vor ihrer Verwendung für die experimentellen Untersuchungen wurden die Tiere noch 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.

4.2.2 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 Applikation von Natrium-Pentobarbital (30 mg kg^{-1}) als Bolus.

Das Natrium-Pentobarbital wurde durch eine Mischung von 1 mg Pentobarbital (Konzentration 160 mg ml^{-1}) mit 15 mg 0,9%-iger Natriumchloridlösung hergestellt, so dass ein Konzentrationsverhältnis von 10 mg Pentobarbital auf 1 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung vorlag. Natriumpentobarbital wurde gewählt, da es einen vernachlässigbaren präkonditionierenden Effekt aufweist [124].

Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mittels kontinuierlicher intravenöser

Infusion von 20 - 30 mg kg⁻¹ h⁻¹ Natrium-Pentobarbital über einen Perfusor, der durch einen Dreiwegehahn mit der zuvor gelegten Venenverweilkanüle verbunden wurde.

Die Anästhesietiefe wurde regelmäßig über den gesamten Verlauf der experimentellen Untersuchung überprüft. Als Parameter zur Einschätzung der Narkosetiefe diente die Reaktion der Tiere bei Testung des Palpebral-Reflexes nach Berührung der Wimpern und des Fußwegzieh-Reflexes nach Druck auf die Zehenzwischenräume an der Hinterpfote. Die Tiere erhielten bei Bedarf zusätzliche Gaben von Natrium-Pentobarbital (10 mg ml⁻¹) intravenös als Bolus.

Um eine kontinuierliche und kontrollierte Beatmung der Tiere über den gesamten Versuchsablauf gewährleisten zu können, wurden die Tiere tracheotomiert. Die Tracheotomie erfolgte in Rückenlage. Nach Mittellinien-Inzision wurde die Trachea freipräpariert, so dass sie über eine Länge von etwa 2 cm dargestellt werden konnte. Am kranialen und kaudalen Ende des dargestellten Bereiches wurden zwei Seidenfäden um die Trachea geschlungen. Zwischen diesen beiden Fäden erfolgte die Tracheotomie. Die dann eingeführte Trachealkanüle wurde mit beiden Fäden sicher platziert und der Beatmungsschlauch konnektiert. Die Kaninchen wurden während des gesamten Experimentes kontinuierlich unter Verwendung eines Luft-Sauerstoff-Gemisches (FiO₂ = 0,3; Air = 0,7; entsprechend 0,5 l min⁻¹ O₂ und 1 l min⁻¹ Air) mit positivem Beatmungsdruck druckkontrolliert beatmet (Cicero®, Dräger, Lübeck, Deutschland). Als Grundlage zur Modifikation der beiden Beatmungsparameter Tidalvolumen und Atemfrequenz diente der endexpiratorische CO₂-Partialdruck, der über eine Messsonde (Dräger, Lübeck, Deutschland) kontinuierlich überwacht wurde. Die Grundeinstellung der Beatmung mit einem Tidalvolumen von 22 l min⁻¹ und einer Atemfrequenz von 22 min⁻¹ wurde dementsprechend optimiert, um einen endexpiratorischen CO₂-Partialdruck von 30 bis 40 mmHg zu gewährleisten.

Zudem wurden über den gesamten Zeitraum des Versuches in regelmäßigen Abständen arterielle Blutgasanalysen mittels eines in der Ohrarterie liegenden Katheters durchgeführt unter Verwendung eines ABL 505 Blutgasanalysegerätes (Radiometer, Kopenhagen, Dänemark). Die Blutgasanalysen wurden jeweils am Ende der einzelnen Versuchsperioden (Baseline, Okklusion, Intervention) durchgeführt, in der Reperfusionphase stündlich sowie am Ende des Versuchsprotokolls. Tidalvolumen und Atemfrequenz wurden entsprechend angepasst, um die Blutgase stabil

in einem Bereich normalhoher physiologischer Werte zu halten.

Innerhalb derjenigen Versuchsgruppen, in denen das volatile Anästhetikum Desfluran verwendet wurde, erhielten die Tiere je 1,0 MAC (Minimale Alveoläre Konzentration) Desfluran (Baxter Deutschland GmbH, Heidelberg, Deutschland). Die Konzentration von 1,0 MAC entspricht beim Kaninchen einer endtidalen Konzentration von 8,9 Vol-% [125]. Die Messung der endtidalen Konzentration von Desfluran erfolgte kontinuierlich mit einem kalibrierten Infrarot-Analysegerät (Dräger, Lübeck, Deutschland).

4.2.3 Präparation

In Rückenlage wurde zunächst die rechte Arteria carotis communis über eine Länge von 2 cm freipräpariert und das kaudale und kraniale Ende des dargestellten Abschnittes der Arteria carotis communis jeweils mit einem Seidenfaden umschlungen. Mit dem Faden am kaudalen Ende wurde die Blutzufuhr kurzzeitig bis zum Einführen des Katheters in die Arterie unterbunden. Nach einer kleinen Inzision in die Arteria carotis communis wurde ein mit 0,9%-iger NaCl-Lösung gefüllter PE 50 Polyethylen-Katheter in die Arterie eingeführt und retrograd über den linken Vorhof und die Aortenklappen in den linken Ventrikel (LV) vorgeschoben. Mit Hilfe der zwei Seidenfäden wurde der Katheter sicher in seiner Position platziert. Über diesen Katheter konnte der linksventrikuläre Druck 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 über 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). Sicherung in seiner Position erfolgte auch bei diesem Katheter mit einem um die Arteria femoralis gelegten Seidenfaden.

In Rechtsseitenlage wurde anschließend eine Thorakotomie im vierten Interkostalraum links durchgeführt. Nach Darstellung des Herzens musste das Perikard vorsichtig stumpf eröffnet werden. Ein prominenter Ast der linken Koronararterie (LAD) wurde aufgesucht und dieser etwa in der Mitte seines Verlaufs von der Herzbasis bis zur Herzspitze mittels eines chirurgischen Nahtmaterials (2/0 Ethicon Perma - Hand® Seide, Fa. Johann + Johann Intl.) umschlungen. Beide Enden des Fadens wurden durch einen etwa 1,5 cm langen Kunststoffschlauch geführt,

um eine Schlinge entstehen zu lassen. Über diese Schlinge konnte die Koronarokklusion durchgeführt werden.

Bei allen Versuchstieren wurde außerdem ein 3-Kanal-Elektrokardiogramm (EKG) angelegt, um Herzfrequenz und Rhythmus kontinuierlich sowie ischämiebedingte Zeichen während der Phase der Okklusion zu überwachen.

Eine Temperatursonde wurde rektal platziert, so dass die Körpertemperatur der Kaninchen überwacht und über einen Regelkreis mittels eines beheizbaren OP-Tisches (Föhr, Medical Instrumente, Seeheim, Deutschland) konstant auf $38,5 \pm 0,5$ °C gehalten werden konnte [126]. Zur Aufrechterhaltung der intraoperativen Flüssigkeitshomöostase wurde kontinuierlich physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %, 40 ml h^{-1}) über den venösen Zugang an der Ohrvene infundiert.

Alle hämodynamischen Parameter (LVEDP, LVP, MAP), Körpertemperatur und EKG wurden kontinuierlich mit einer speziellen Software (Notocord-hem 3.5, Notocord Systems, Croissy-sur-Seine, Frankreich) auf einem Personal Computer (Hewlett Packard, Palo Alto, CA) aufgezeichnet.

4.2.4 Induktion der myokardialen Ischämie

Um die myokardiale Ischämie auszulösen, wurde der mit dem chirurgischen Nahtmaterial umschlungene prominente Ast der linken Koronararterie okkludiert.

Die Okklusion wurde erreicht, indem der über die beiden Fäden geführte Kunststoffschlauch weiter in Richtung auf das Herz zu verschoben wurde, so dass sich die Schlinge um die Koronararterie zuziehen ließ. War die Schlinge geschlossen und der Blutfluss somit unterbunden, wurden die Fäden oberhalb des Kunststoffschlauches mit einer Péan-Klemme in ihrer Position fixiert. Durch Lockern der Schlinge wurde die Reperfusion ermöglicht. Allen Tieren wurde fünf Minuten vor der Okklusion der Koronararterie $300 \text{ Einheiten kg}^{-1}$ Heparin zur Antikoagulation intravenös appliziert.

Die myokardiale Ischämie wurde anhand der ST-Strecken Veränderung im EKG, der regionalen Zyanose des Myokards und regionaler Dyskinesien innerhalb der Ischämiezone verifiziert. Die adäquate Reperfusion wurde durch Hyperämie des Myokards und Rückgang der EKG-Veränderungen festgestellt.

4.2.5 Infarktgrößenbestimmung

Nach Abschluss der Reperfusionzeit wurde die umschlungene Koronararterie erneut okkludiert. Direkt anschließend wurde den Tieren 2 ml Patentblau ($0,1 \text{ g ml}^{-1}$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) intravenös injiziert. Der noch normal durchblutete, nichtischämische Anteil des Myokards konnte durch die Applikation des Farbstoffes von dem ischämischen Bereich des Myokards (area at risk, AAR) separiert werden. Der nichtischämische Anteil entsprach dabei dem blau gefärbten Gewebeanteil. Die ischämische Zone der AAR hingegen stellte sich als nicht gefärbtes rotes Myokard dar.

Die Kaninchen wurden dann mit einer letalen Dosis Natrium-Pentobarbital euthanasiert. Das Herz wurde nach Abtrennung von der Aorta sowie der Vena cava inferior et superior entnommen. Nach der Entnahme wurden zunächst rechter und linker Vorhof sowie der rechte Ventrikel und linke Ventrikel voneinander separiert. Dann erfolgte die Präparation des linken Ventrikels. Der linke Ventrikel wurde von der Basis bis zur Herzspitze in fünf Scheiben geschnitten. Anschließend wurden mit einem Skalpell sorgfältig die blauen (das heißt die regelhaft perfundierten Areale) von den rot erscheinenden (entspricht den ischämischen Arealen) Anteilen getrennt.

Nach der Trennung wurden die nichtischämischen blauen und die ischämischen roten Gewebeanteile für 20 Minuten jeweils 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 0,1 molarem Phosphatpuffer auf einen pH-Wert von 7,4 adjustiert wurde, gegeben. Abschließend wurde das Gewebe 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 lebendes Herzmuskelgewebe rötlich, wohingegen sich abgestorbenes Gewebe grauweiß darstellt.

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 AAR sorgfältig in rot – d.h. vitales Myokard – und grauweiß erscheinende – d.h. irreversibel infarziertes Myokard – Komponenten separiert und getrennt voneinander aufbewahrt. Es erfolgte anschließend mittels einer digitalen Messwaage (Sartorius R 180 D, Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland) die gravimetrische Bestimmung des Infarktareals, des ischämischen Areals, der AAR (entspricht der Summe aus vitalem und irreversibel durch Infarkt geschädigtem Myokard), des nicht ischämischen Anteils des linken Ventrikels sowie der Gesamtmasse des linken Ventrikels gemäß standartisiertem Vorgehen [127]. Die Herzinfarktgröße wurde als Prozentwert der AAR ausgedrückt. Zusätzlich 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. Ebenso wurden Tiere, die während des Versuches Kammerflimmern oder ein Pumpversagen des linken Ventrikels erlitten hatten, von der Versuchsauswertung ausgeschlossen. Die gravimetrische Auswertung wurde von einer geblindeten Person vorgenommen.

4.2.6 Experimentelles Protokoll

Die Kaninchen wurden randomisiert zwölf Versuchsgruppen zugeordnet. Unabhängig von der jeweiligen Versuchsgruppe gab es ein grundlegendes Protokoll, das sich über einen Zeitraum von insgesamt 240 Minuten erstreckte. Das Protokoll begann nach Beendigung der Präparation der Tiere.

Erste Phase des Protokolls war die als Baseline bezeichnete Äquilibrierungsphase, in der die Ausgangswerte der hämodynamischen Parameter über eine Zeit von 30 Minuten aufgezeichnet wurden. Dann folgte in jeder Gruppe die Phase der Koronarokklusion mit einer Dauer von 30 Minuten. Im Anschluss an die Phase der Okklusion folgte dann als letzter Abschnitt im Protokoll die Reperfusionphase über eine Zeitspanne von drei Stunden.

Alle Versuchstiere erhielten Natrium-Pentobarbital ($20 - 30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) als Hintergrundnarkose. In der Kontrollgruppe erfolgte außer der kontinuierlichen intravenösen Gabe von 0,9 %-iger Natriumchlorid-Lösung keine weitere Intervention. Mit Einsetzen der Reperfusion erhielten die Kaninchen der weiteren Versuchsgruppen entweder 1,0 MAC Desfluran über 30 Minuten oder Esmolol ($30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) als selektiven Blocker kardialer β_1 -adrenerger Rezeptoren kontinuierlich über die

ersten 30 Minuten der Reperfusion (Esmolol 30 min) oder über die gesamte Reperfusionsdauer von 180 Minuten (Esmolol 180 min). In zwei weiteren Gruppen wurde Esmolol sowohl wenn es über die Zeit von 30 Minuten als auch wenn es über die Zeit von 180 Minuten appliziert wurde, in Kombination mit 1,0 MAC Desfluran für 30 Minuten verabreicht. Der selektive β_2 -adrenerge Rezeptorblocker ICI 118,551 ($0,2 \text{ mg kg}^{-1}$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), der spezifische PKA-Inhibitor H-89 ($250 \mu\text{g kg}^{-1}$, Sigma-Adrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) und der spezifische CaMK II-Inhibitor KN-93 ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) wurden mit Einsetzen der Reperfusion als Bolus direkt in den linken Ventrikel appliziert. In drei weiteren Gruppen wurde ICI 118,551, H-89 und KN-93 in Kombination mit 1,0 MAC Desfluran verwendet (S. 24, Abb. 1).

4.2.7 Organentnahme

Für einen weiteren Teil des Experimentes wurde das ursprüngliche Protokoll des Versuches in den jeweiligen Gruppen abgeändert. Dieser spezielle Teil des Experimentes diente dazu, Organentnahmen des Herzens vorzunehmen und das Myokard anschließend für die molekularbiologischen Untersuchungen zu präparieren.

Narkoseinduktion, Narkoseaufrechterhaltung, Präparation, Monitoring, Überwachung und Modulation von Narkosetiefe, Herzkreislaufparameter und Atmung sowie die Induktion der myokardialen Ischämie erfolgten wie bei der Durchführung des Experimentes zur Infarktgrößenbestimmung. Die Abänderungen des Versuchsaufbaues für die Organentnahmen gegenüber dem Ablauf des ursprünglichen Versuchsprotokolls waren eine auf 35 Minuten verkürzte Reperusionszeit sowie keine erneute Okklusion der Koronararterie nach der Induktion der Ischämie mit anschließender Färbung des Herzens durch intravenöse Injektion von 2 ml Patentblau ($0,1 \text{ g ml}^{-1}$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) zur Bestimmung der AAR.

4.2.8 Protokoll zur Organentnahme

In diesem Teil des Experimentes wurden die Tiere randomisiert zwölf Versuchsgruppen mit je fünf Tieren entsprechend den Gruppen des ursprünglichen Protokolls zugeteilt.

Dabei erhielten die Tiere 0,9 %-ige NaCl-Lösung in der Kontrollgruppe, 1,0 MAC

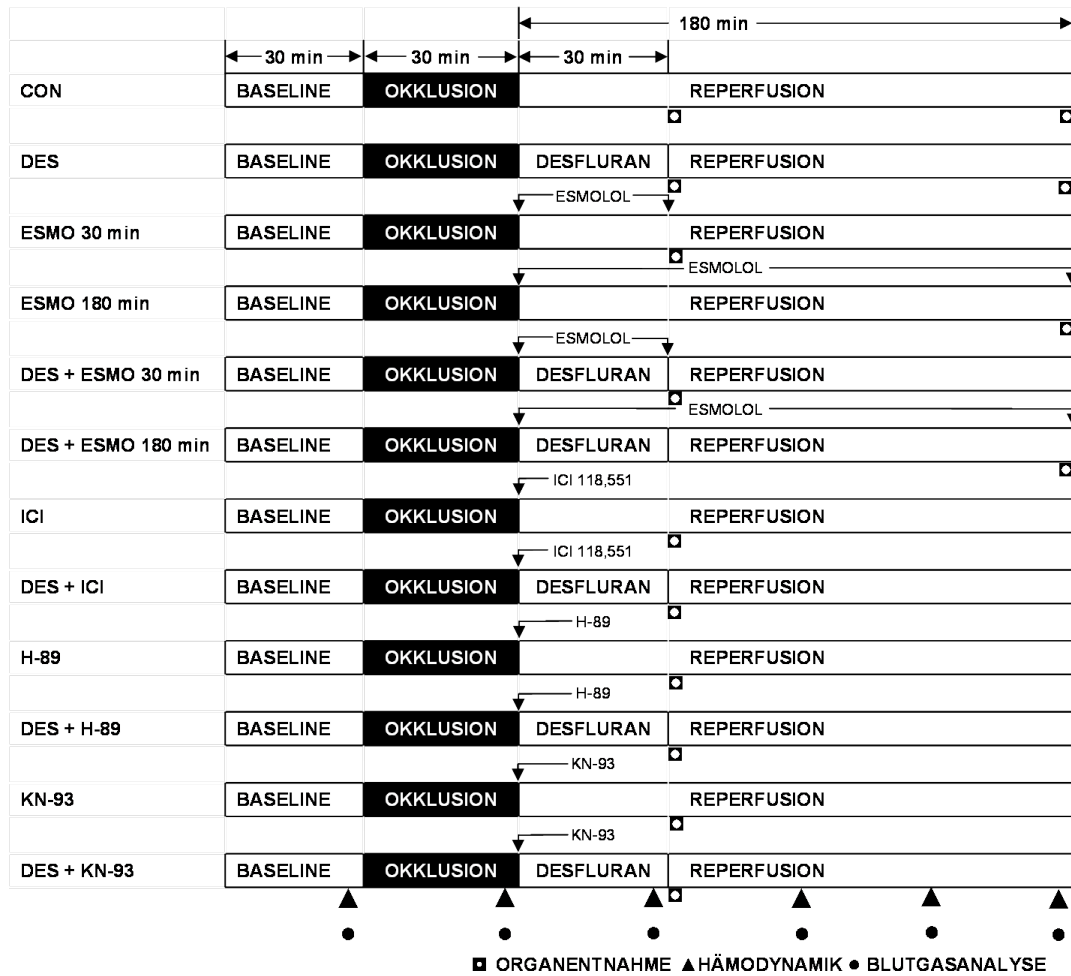


Abbildung 1: Schematische Darstellung des experimentellen Protokolls und des Protokolls zur Organentnahme. Baseline = Äquilibrationsphase; Okklusion = Phase der Koronarokklusion; Reperfusion = Reperfusionsphase; Interventionsphase jeweils mit Beginn der Reperfusionsphase. CON = Kontrollgruppe; DES: Desfluran (1.0 MAC); ESMO 30 min = Esmolol ($30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) über 30 min ; ESMO 180 min = Esmolol ($30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) über 180 min; ICI = ICI 118,551 als Bolus ($0,2 \text{ mg kg}^{-1}$), H-89 = H-89 als Bolus ($250 \mu\text{g kg}^{-1}$); KN-93 = KN-93 als Bolus ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$). DES+ESMO 30 min = Desfluran+Esmolol ($30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) über 30 min; DES+ESMO 180 min = Desfluran+Esmolol über 180 min; DES+ICI = Desfluran+ICI 118,551; DES+H-89 = Desfluran+H-89; DES+KN-93 = Desfluran+KN-93.

Desfluran oder Esmolol als ultrakurzwirksamen selektiven Blocker des kardialen β_1 -Rezeptors in einer Konzentration von $30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ per infusionem über 30 Minuten alleine oder in Kombination mit 1,0 MAC Desfluran für 30 Minuten der Reperfusionszeit. In drei weiteren Gruppen wurde den Tieren ICI 118,551 ($0,2 \mu\text{g kg}^{-1}$) als selektiver Blocker des kardialen β_2 -Rezeptors, H-89 (250 mg kg^{-1})

als spezifischer Inhibitor der PKA bzw. KN-93 ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$) als spezifischer Inhibitor der CaMK II jeweils als Bolus in den linken Ventrikel appliziert. ICI 118,551, H-89 und KN-93 wurden in drei zusätzlichen Gruppen in Kombination mit 1,0 MAC Desfluran über 30 Minuten der Reperfusionsdauer verabreicht. Alle dargestellten Interventionen erfolgten mit Beginn der Reperfusionphase. Die Reperusionszeit bis zur Organentnahme betrug in allen Gruppen 35 Minuten. Die Organentnahme für die molekularbiologische Auswertung dieser Versuchsgruppen diente der Bestimmung der Proteinexpression der CaMK II $_{\delta}$, des Phospholambans, des phosphorilierten Phospholambans, der PKB/Akt und der phosphorilierten PKB/Akt zum Zeitpunkt der frühen Reperfusionphase.

Um die Expression der genannten Proteine auch zum Zeitpunkt der späten Reperfusionphase zu bestimmen, erfolgte in vier zusätzlichen Versuchsgruppen (n=5 pro Gruppe) bei Tieren aus der Kontrollgruppe und aus den Gruppen, die Desfluran (1,0 MAC), Esmolol ($30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) über 180 Minuten und Desfluran in Kombination mit Esmolol über 180 Minuten erhielten, eine Organentnahme nach 180 Minuten Reperfusion.

Am Ende der Reperfusionphase wurden die Herzen zügig entnommen. Nach der Entnahme wurden die Herzen zunächst in einer Schale mit gekülter 0,9%-iger NaCl-Lösung gewaschen. Die Schale selbst befand sich dabei in einer mit Eis gefüllten Styropor-Box um die Kühlung der Natriumchlorid-Lösung zu erzielen. Anschließend wurden die Vorhöfe sowie der rechte Ventrikel vom linken Ventrikel separiert. Vorhöfe und rechter Ventrikel wurden verworfen. Der linke Ventrikel wurde in ein Eppendorfgesäß gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung des Myokardgewebes erfolgte bis zur molekularbiologischen Untersuchung in einem Stickstoffkühlschrank bei einer Temperatur von $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3 Molekularbiologische Auswertung

4.3.1 Herstellung der Lysate

Zur Herstellung der Lysate für die Proteinbestimmung und die anschließende Auswertung mit Western-Immunoblotting, wurde von dem nach den Organentnahmen gewonnenen Myokard Gewebeprobe von etwa 300 mg entnommen.

Diese Gewebeprobe wurden in $0,5 \mu\text{l}$ RIPA-Puffer mit Proteasen-Inhibitoren (Complete, mini, Roche diagnostics Mannheim) in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppen-

dorf, Hamburg) inkubiert. Für die Auswertung phosphorylierter Proteine wurden 20 mmol NaF (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und 1 mmol Na₃VO₄ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) hinzugefügt. Diese Proben wurden anschließend mit einem Homogenisator (IKA® RW14 basic, IKA® Werke, Staufen) mit Glaskolben in den dazugehörigen Homogenisatorzylindern auf Eis zweimal für je 30 Sekunden bei zirka 1500 min⁻¹ homogenisiert. Das so gewonnene Homogenisat wurde für 30 Minuten bei 4 °C und 12000-g zentrifugiert (Sepatech Megafuge 1,0R, Heraeus). Der hierbei gewonnene Überstand wurde in frische, gekühlte Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

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-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
 - 930 ml H₂O (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg)

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

4.3.2 Protein-Bestimmung nach Bradford

Um Messgenauigkeit zu erreichen, erfolgte vor Beginn der Proteinbestimmung ein Abgleich über eine proteinfreie Küvette, die nur 0,8 µl destilliertes H₂O und 1 µl RIPA-Puffer enthielt. Je 1 µl Lysat wurde in Kunststoffküvetten (Sarstedt, Nürnberg) pipettiert, mit 800 µl H₂O und 200 µl Bradford-Reagenz (BioRad Laboratories GmbH, München) versetzt und mittels einer Pipette gut durchmischt. Dann wurde die Absorption des Proteinlysates bei Licht der Wellenlänge von 595 nm spektrophotometrisch mittels HP620 (Hewlett Packard) gemessen. Die Proteinkonzentrationen wurden mithilfe der Standardkurve bestimmt. Dabei gilt für die

Konzentration: $\text{Konzentration} = 22,927\,00\,\mu\text{g}\,\mu\text{l}^{-1} \times \text{Absorptionsgrad}$. Nun wurde diejenige Menge Lysat, die genau $60\,\mu\text{g}$ Protein (bzw. $10\,\mu\text{g}$ Protein bei PLB) enthielt, in ein frisches Reaktionsgefäß pipettiert und mit dem jeweiligen Lösungspuffer auf ein Gesamtvolumen von $20\,\mu\text{l}$ aufgefüllt. Zu dieser Proteinlösung wurden weitere $20\,\mu\text{l}$ Laemmli Puffer (BioRad, Hercules, CA, USA) mit 0,5 % beta-Mercapto-Ethanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) gegeben. Das Proteingemisch wurde anschließend durch Erwärmung in einem Wärmeblock (Techne, Dri-Block® DB-2A, Cambridge, UK) bei einer konstanten Temperatur von $95\text{ }^\circ\text{C}$ über 5 Minuten denaturiert und dann kurz bei $10\,000\text{ min}^{-1}$ (Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert.

4.3.3 Auftrennung der Proteine

Zur Auftrennung der Proteine nach deren Molekülgröße diente eine Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter Verwendung des Mini-PROTEAN 3 (BioRad Laboratories GmbH, München) Komplettsystems. 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 noch ein 1 cm breiter Film destilliertes H_2O gegeben.

Nachdem das Trenngel polymerisiert hatte wurde das H_2O vollständig entfernt und das Sammelgel vorbereitet. Das Sammelgel wurde auf das Trenngel aufgebracht und 1,5 mm breite 10-well Kämmen luftblasenfrei eingesetzt. Die Kämmen wurden nach der Polymerisierung des Gels entfernt und die so entstandenen Probenaschen mit destilliertem H_2O gespült, um Gelreste zu entfernen. Diese Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingesetzt und befestigt. Nun wurden die vorbereiteten Probengemische mithilfe von Gelloader-Pipettenspitzen komplett in die Taschen pipettiert. Zur Größenbestimmung wurde in eine der Taschen $5\,\mu\text{l}$ eines Proteinmarkers (peqGOLD Protein-Marker V (Prestained), PeQLab Biotechnology GmbH, Erlangen bzw. Kaleidoscope Polypeptide Standards, BioRad Laboratories GmbH, München) gegeben, um die Proteinmolekulargewichte der gesuchten Proteine mit denen der bekannter Proteine vergleichen zu können. Anschließend wurde die Kammer vollständig mit Elektrophorese-Puffer gefüllt und mit dem Deckel verschlossen, wobei auf die richtige Polung zu achten war. Die Elektrophoresekammer wurde an eine Spannungsquelle (PowerPac™ HC High-Current Power Supply, BioRad Laboratories GmbH, München) angeschlossen und die elektrische

Spannung zunächst auf 80 V eingestellt. Sobald die Lauffront das Sammelgel passiert hatte wurde die Spannung auf 95 - 110 V erhöht. Die Auftrennung der Proteine war beendet, sobald alle Proteine das Trenngel vollständig durchlaufen hatten.

- Zusammensetzung des Trenngels (15 %)
 - 2,35 ml H₂O
 - 2,5 ml 1,5 mol Tris pH 8,8 (Tris ultrapure AppliChem GmbH, Darmstadt)
 - 100 μ l 10 % SDS
 - 5 ml Acrylamide / Bis (30:2) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)
 - 50 μ l APS
 - 5 μ l TEMED (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

- Zusammensetzung des Sammelgels (5 %)
 - 2,85 ml H₂O
 - 1,25 ml 0,5 mol Tris pH 6,8 (Tris ultrapure AppliChem GmbH, Darmstadt)
 - 50 μ l 10 % SDS
 - 850 μ l Acrylamide / Bis (30:2) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)
 - 25 μ l 10 % APS
 - 5 μ l 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 H₂O

4.3.4 Western Immunoblotting

Die aufgetrennten Proteine wurden mittels Wetblot-Verfahren auf Nitrocellulose-Membranen einer Porengröße von 0,2 μ l transferiert und dadurch immobilisiert. Um den Proteintransfer durchführen zu können, wurde zunächst eine in Transfer-

Puffer getränkte Fasermatte in die Blotting-Kassette gelegt und darauf ein ebenfalls mit Transfer-Puffer getränktes Blotting-Papier (330 g m^{-2}). Die beiden Glasp-latten, zwischen denen die Auftrennung der Proteine erfolgte, wurden mit einem Skalpell voneinander getrennt. Das Sammelgel mit den Proben-taschen wurde mit einem Skalpell vom Trenngel abgetrennt und verworfen. Das Trenngel wurde anschließend ohne es zu beschädigen auf das Whatman-Papier gelegt. Auf das Gel wurde die in Puffer getränkte Nitrocellulosemembran (Protran, Whatman Schleicher & Schuell, Dassel) in der Größe des Gels blasenfrei aufgelegt. Auf die Nitrocellulosemembran wurde dann nochmals ein getränktes Blotting-Papier und zum Schluss noch einmal eine getränkte Fasermatte aufgebracht. Die Kassette wurde verschlossen und senkrecht in die Transferkammer gestellt, die Kammer dann komplett mit Transfer-Puffer aufgefüllt und an eine Stromquelle mit 250 mA angeschlossen. Der Transfer wurde bei 4°C über Nacht durchgeführt.

- Transfer-Puffer
 - 200 ml Elektrophorese-Puffer (5-fach)
 - 200 ml Methanol (Merck KGaA, Darmstadt)
 - 600 ml H_2O

Nach Ablauf des Transfers wurde die Membran aus der Blotting-Apparatur zum Trocknen herausgenommen, um die Proteine auf der Membran zu fixieren.

Anhand des Größenmarkers, der auf der Membran zu sehen war, konnte die Größe des gesuchten Proteins abgeschätzt werden. Der gewünschte Bereich wurde aus der Nitrocellulosemembran mit dem Skalpell ausgeschnitten. Zusätzlich wurde aus jeder Membran im Bereich der Molekülgröße von GAPDH bzw. Crystallin ein Streifen ausgeschnitten, 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 über mindestens eine Stunde unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Für den Nachweis von p-Akt wurde statt des Milchpulvers 5 % Albumin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) in PBS/Tween verwendet.

4.3.5 Antikörper-Inkubationen

Die blockierten Membranen wurden aus der Milch bzw. dem Albumin herausgenommen und jeweils separat in Folie eingeschweißt (Folienschweißgerät Severin).

In diese Folien wurden jeweils die gewünschten Konzentrationen des spezifischen Antikörpers in 5 % Milch in PBS/T (PBS/T: 200 ml PBS (5-fach), 800 ml H₂O, 500 μ l Tween 20) pipettiert und die Nitrocellulosemembran für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (Heidolph Duomax 1030) inkubiert:

- Maus-anti-Phospholamban 1:3000 (Affinity BioReagents™, Golden, CO, USA)
- Ziege-anti-Akt1 (C-20) 1:200 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)
- Maus-anti-glyceralaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase(GAPDH) 1:3000 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)
- Kaninchen-anti- α B-Crystallin 1:3000 (Assay Designs, Ann Arbor, MI)

Die folgenden Antikörper wurden in 5 % Milch bzw. in 5 % Albumin (p-Akt) in PBS/T über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert:

- Kaninchen-anti-p-Phospholamban (Ser-16) 1:1000
- Kaninchen-anti-p-Phospholamban (Thr-17) 1:1000 (beide Badrilla, Leeds, UK)
- Ziege-anti-CaMK II₅ (A-17) 1:200 (Santa Cruz Biotechnology)
- Maus-anti-p-Akt1 (Ser-473) 1:100 (Abcam, Cambridge, United Kingdom)

Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Tütchen geöffnet und die Membranen mindestens fünfmal in einem Zeitabstand von 10 Minuten mit PBS/T unter leichtem Schütteln gespült. Als Zweitantikörper wurden an Peroxidase (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.

4.3.6 Entwicklung

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mittels ECL Detektionsreagenz (GE Healthcare) und Darstellung auf Röntgenfilmen. Dazu wurden die beiden Reaktionslösungen im Verhältnis 1:1 gemischt und für genau 60 Sekunden auf den Membranen belassen. 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).

Die Banden wurden eingescannt (Epson Perfection Scanner) und die Signalintensität der jeweiligen Banden densitometrisch gemessen (ScanPack3.0, Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen Image J, NIH), die Proteinbanden stellen sich in Abhängigkeit von der Menge des vorhandenen Proteins entsprechend schwarz dar. Es wurde ein Quotient aus Intensität der Proteinbande und Intensität der Ladekontrolle gebildet und den Gruppen zugeordnet. Die Ergebnisse wurden als Ratio zwischen Zielprotein und dessen interner Ladekontrolle dargestellt.

4.4 Statistische Analyse

Mit einer Poweranalyse wurde eine Gruppengröße von $n = 8$ Tieren statistisch ausgewertet, so dass Unterschiede mit einem Median von 15 % in den Herzinfarktgrößen innerhalb jeder einzelnen Versuchsgruppe herausgefiltert wurden. Die Power des Testes betrug 0,8 bei einem α -Wert von 0,05.

Die hämodynamischen Parameter, die Körpertemperatur sowie das Elektrokardiogramm wurden kontinuierlich aufgezeichnet. Hierfür wurde ein analog-digital Konverter (Data Translation™, Marlboro, USA) sowie ein Personal Computer verwendet. Die Daten wurden mittels einer kommerziell erhältlichen Software (Notocord-hem 3.5, Notocord Systems, Croissy-sur-Seine, Frankreich) aufgezeichnet und mittels Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA) analysiert. Die statistische Analyse der hämodynamischen Parameter erfolgte mittels einer two-way analysis of variance mit wiederholten Messungen (ANOVA). Mit dieser Auswertung werden in allen Gruppen die hämodynamischen Parameter aus der Äquilibrationsphase in der Baseline zunächst innerhalb jeder einzelnen Gruppe jeweils mit den Hämodynamikwerten der übrigen Versuchsphasen des Protokolls verglichen und auf Unterschiede untersucht. Anschließend werden durch Vergleich aller Gruppen miteinander die Hämodynamikwerte auf statistisch signifikante Unterschiede in den hämodynamischen Parametern zu den sich jeweils entsprechenden Messzeitpunkten untersucht.

Hieraus ergibt sich eine 12×6 -Matrix: (Kontrolle vs. Desfluran vs. Esmolol 30 min

vs. Esmolol 180 min vs. Desfluran + Esmolol 30 min vs. Desfluran + Esmolol 180 min vs. ICI 118,551 vs. Desfluran + ICI 118,551 vs. H-89 vs. Desfluran + H-89 vs. KN-93 vs. Desfluran + KN-93) × (Baseline vs. Okklusion vs. Reperfusion 0,5 h vs. Reperfusion 1 h vs. Reperfusion 2 h vs. Reperfusion 3 h). Konnten in der ANOVA signifikante Unterschiede festgestellt werden, wurde im Anschluss eine post hoc one-way ANOVA mit einem Duncan post hoc Test für jede einzelne Gruppe und jeden einzelnen Messzeitpunkt durchgeführt, um herauszufinden in welcher Gruppe und zu welchem Zeitpunkt im Protokoll ein Unterschied im Vergleich zu allen übrigen Versuchsgruppen bestand (S. 34 ff., Tab. 1 bis 3).

Die statistische Analyse für das Körpergewicht, die Masse des LV und der AAR sowie des Verhältnisses AAR/LV, die Infarktgröße relativ zur AAR und die Ergebnisse der Densitometrie erfolgte jeweils unter Verwendung einer one-way ANOVA (Kontrolle vs. Desfluran vs. Esmolol 30 min vs. Esmolol 180 min vs. Desfluran+Esmolol 30 min vs. Desfluran + Esmolol 180 min vs. ICI 118,551 vs. Desfluran + ICI 118,551 vs. H-89 vs. Desfluran + H-89 vs. KN-93 vs. Desfluran + KN-93) und einem post hoc Duncan Test. Die statistische Analyse wurde mit einem personal Computer unter Verwendung der SPSS 15.0 Software durchgeführt (The Apache Software Foundation, Forest Hill, MD, USA). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben (S. 38, Tab. 5).

5 Ergebnisse

5.1 Ergebnisse des Versuchsprotokolls

Es wurden 104 Versuchstiere instrumentiert, um 88 erfolgreiche Experimente in den Versuchsgruppen zu erhalten, in denen die Herzinfarktgrößen bestimmt wurden. Sechs Kaninchen wurden von der Studie ausgeschlossen aufgrund therapierefraktärem Kammerflimmern während der Koronararterienokklusion oder der Reperfusionphase (1 Kontrollgruppe, 1 Desfluran, 1 Esmolol 180 min, 1 ICI 118,551, 1 H-89 und 1 Desfluran + KN-93). Sechs Tiere wurden wegen linksventrikulärem Pumpversagen (2 Desfluran, 1 Desfluran + Esmolol 30 min, 2 Desfluran + Esmolol 180 min und 1 KN-93) von der Untersuchung ausgeschlossen. Vier Tiere wurden aus der Auswertung genommen, da die LV AAR weniger als 15 % der Masse des LV betrug (1 Kontrollgruppe, 1 Desfluran + ICI 118,551, 1 H-89 und 1 Desfluran + H-89). 75 Versuchstiere wurden in der Molekularbiologischen Auswertung mit Western Blots untersucht.

5.1.1 Systemisch hämodynamische Parameter

Es gab keine signifikanten Unterschiede in den hämodynamischen Parametern zwischen den Gruppen unter Baseline-Bedingungen (S. 34 ff., Tab. 1 bis 3). Applikation von Esmolol über 180 min, H-89 und KN-93 senkte die Herzfrequenz während der gesamten Reperfusionphase. Bei Anwendung von Esmolol über die initialen 30 Minuten der Reperfusionphase wurde der reduzierende Effekt auf die Herzfrequenz nach Auswaschen von Esmolol durch den Blutfluss beendet. Der mittlere arterielle Blutdruck wurde durch Esmolol und Desfluran gesenkt. Der mittlere arterielle Blutdruck erreichte aber nach Beendigung der Applikation von Desfluran und Esmolol nach den ersten 30 Minuten der Reperfusion wieder die Werte unter Baseline-Bedingungen. Wurde Esmolol über die gesamte der Zeit Reperfusion von 180 Minuten verabreicht, war der mittlere arterielle Blutdruck über die gesamte Reperfusionzeit reduziert. Der Anstieg des enddiastolischen Druckes während der Koronararterienokklusion erreichte keine statistisch signifikanten Werte in einer der Gruppen.

HR (min ⁻¹)	Base	CAO	Reperfusion (h)					
			0,5	1	2	3		
CON	272 ± 11	269 ± 10	270 ± 10	265 ± 9	245 ± 8	245 ± 8		
DES	258 ± 7	260 ± 7	258 ± 10	256 ± 9	244 ± 8	231 ± 9 *		
ESMO 30 min	263 ± 7	258 ± 7	221 ± 6 *†	250 ± 5	237 ± 4	229 ± 7 *		
DES+ESMO 30 min	265 ± 10	257 ± 9	228 ± 9 *†	255 ± 6	237 ± 9	227 ± 8 *		
ESMO 180 min	250 ± 8	241 ± 7	200 ± 6 *†	198 ± 5 *†	193 ± 6 *†	192 ± 6 *†		
DES+ESMO 180 min	251 ± 7	243 ± 6	201 ± 6 *†	203 ± 4 *†	2010 ± 4 *†	208 ± 4 *†		
ICI 118,551	257 ± 8	242 ± 8	228 ± 10 *†	221 ± 9 *†	214 ± 10 *†	211 ± 9 *†		
DES+ICI 118,551	255 ± 9	238 ± 10	224 ± 10 *†	225 ± 10 *	218 ± 10 *†	224 ± 10 *		
H-89	278 ± 9	268 ± 11	244 ± 10 *	238 ± 9 *†	223 ± 9 *†	214 ± 9 *†		
DES+H-89	265 ± 10	255 ± 7	227 ± 12 *†	236 ± 11 *†	230 ± 10 *	230 ± 10 *		
KN-93	282 ± 8	261 ± 8	255 ± 6 *	249 ± 5 *	252 ± 8 *	244 ± 7 *		
DES+KN-93	277 ± 13	260 ± 10	236 ± 11 *†	235 ± 8 *†	226 ± 10 *	224 ± 9 *		

Tabelle 1: Systemisch hämodynamischer Parameter Herzfrequenz (HR). Base = Baseline; CAO = Koronararterienokklusion; CON = Kontrolle; DES = Desfluran (1,0 MAC); ESMO 30 min = Esmolol (30 mg kg⁻¹ h⁻¹) über 30 min; ESMO 180 min = Esmolol (30 mg kg⁻¹ h⁻¹) über 180 min; DES+ESMO 30 min = Desfluran+Esmolol; DES+ESMO 180 min = Desfluran + Esmolol (n = 8 pro Gruppe); H-89 = H-89 (250 µg kg⁻¹); DES+H-89 = Desfluran+H-89; ICI = ICI 118,551 (0,2 mg kg⁻¹); DES+ICI 118,551 = Desfluran+ICI 118,551; KN-93 = KN-93 (300 µg kg⁻¹); DES+KN-93 = Desfluran+KN-93 (n = 6 pro Gruppe). Alle Angaben als Mittelwert ± SEM, * = Signifikant (p < 0,05) verschieden von Baseline, † = Signifikant (p < 0,05) verschieden von dem jeweiligen Wert in der Kontrollgruppe.

MAP (mmHg)	Base	CAO	Reperfusion (h)			
			0,5	1	2	3
CON	84 ± 5	77 ± 5	75 ± 5	75 ± 5	66 ± 6	70 ± 3
DES	86 ± 5	82 ± 5	55 ± 4 *†	75 ± 6	73 ± 5	69 ± 6
ESMO 30 min	84 ± 5	72 ± 5	58 ± 6 *†	68 ± 6	68 ± 7	61 ± 6
DES+ESMO 30 min	75 ± 3	71 ± 3	36 ± 2 *†	65 ± 2	58 ± 4	58 ± 3
ESMO 180 min	81 ± 3	71 ± 3	49 ± 2 *†	48 ± 2 *†	48 ± 2 *†	47 ± 2 *†
DES+ESMO 180 min	76 ± 4	77 ± 3	38 ± 3 *†	41 ± 4 *†	51 ± 3 *†	51 ± 4 *†
ICI 118,551	78 ± 5	68 ± 3	73 ± 2	68 ± 3	64 ± 2	60 ± 2 *
DES+ICI 118,551	77 ± 3	66 ± 3	54 ± 4 *†	73 ± 2	70 ± 2	60 ± 5 *
H-89	81 ± 4	77 ± 6	72 ± 9	73 ± 5	75 ± 4	74 ± 3
DES+H-89	80 ± 2	77 ± 3	49 ± 3 *†	68 ± 5	63 ± 7	63 ± 9
KN-93	70 ± 8	67 ± 8	65 ± 8	66 ± 8	61 ± 7	68 ± 6
DES+KN-93	79 ± 4	73 ± 3	46 ± 2 *†	67 ± 4	63 ± 4	61 ± 3

Tabelle 2: Systemisch hämodynamischer Parameter mittlerer arterieller Blutdruck (MAP). Base = Baseline; CAO = Koronararterienokklusion; CON = Kontrolle; DES = Desfluran (1,0 MAC); ESMO 30 min = Esmolol (30 mg kg⁻¹ h⁻¹) über 30 min; ESMO 180 min = Esmolol (30 mg kg⁻¹ h⁻¹) über 180 min; DES+ESMO 30 min = Desfluran+Esmolol; DES+ESMO 180 min = Desfluran + Esmolol (n = 8 pro Gruppe); H-89 = H-89 (250 µg kg⁻¹); DES+H-89 = Desfluran+H-89; ICI = ICI 118,551 (0,2 mg kg⁻¹); DES+ICI 118,551 = Desfluran+ICI 118,551; KN-93 = KN-93 (300 µg kg⁻¹); DES+KN-93 = Desfluran+KN-93 (n = 6 pro Gruppe). Alle Angaben als Mittelwert ± SEM, * = Signifikant (p < 0,05) verschieden von Baseline, † = Signifikant (p < 0,05) verschieden von dem jeweiligen Wert in der Kontrollgruppe.

+dP/dt _{max} (mmHg s ⁻¹)	Reperfusion (h)						
	Base	CAO	0,5	1	2	3	
CON	4013 ± 560	3445 ± 500	3317 ± 550	3178 ± 500	2541 ± 400	2421 ± 300	
DES	3435 ± 460	2915 ± 430	2011 ± 370 *†	2807 ± 480	2402 ± 420	2020 ± 400 *	
ESMO 30 min	3779 ± 490	3391 ± 210	2289 ± 290 *†	2551 ± 350 *	2445 ± 380 *	2395 ± 350 *	
DES+ESMO 30 min	3315 ± 570	3051 ± 790	2552 ± 260 *	3302 ± 590	2779 ± 360	2094 ± 290 *	
ESMO 180 min	3502 ± 470	3050 ± 440	21487 ± 210 *†	2141 ± 200 *	2025 ± 180 *	1882 ± 230 *	
DES+ESMO 180 min	3849 ± 730	3700 ± 650	1803 ± 260 *†	1856 ± 240 *†	1863 ± 230 *	2496 ± 400 *	
ICI 118,551	3355 ± 570	2891 ± 510	2780 ± 460	2681 ± 420	2455 ± 380	2005 ± 310 *	
DES+ICI 118,551	3527 ± 750	3055 ± 560	2004 ± 560 *†	2853 ± 520	2707 ± 510	2642 ± 550	
H-89	3050 ± 890	2763 ± 820	2766 ± 510	2570 ± 740	2480 ± 450	2485 ± 440	
DES+H-89	3799 ± 590	3464 ± 720	1872 ± 140 *†	3162 ± 240	2640 ± 260	2511 ± 200	
KN-93	3517 ± 660	3523 ± 630	3007 ± 580	2782 ± 550	2472 ± 760	2598 ± 560	
DES+KN-93	3627 ± 490	3390 ± 480	2669 ± 270	2351 ± 320	2378 ± 310	2190 ± 470	

Tabelle 3: Systemisch hämodynamischer Parameter maximaler Anstieg des linksventrikulären Druckes (+dP/dt_{max}). Base = Baseline; CAO = Koronararterienokklusion; CON = Kontrolle; DES = Desfluran (1,0 MAC); ESMO 30 min = Esmolol (30 mg kg⁻¹ h⁻¹) über 30 min; ESMO 180 min = Esmolol (30 mg kg⁻¹ h⁻¹) über 180 min; DES+ESMO 30 min = Desfluran+Esmolol; DES+ESMO 180 min = Desfluran + Esmolol (n = 8 pro Gruppe); H-89 = H-89 (250 µg kg⁻¹); DES+H-89 = Desfluran+H-89; ICI = ICI 118,551 (0,2 mg kg⁻¹); DES+ICI 118,551 = Desfluran+ICI 118,551; KN-93 = KN-93 (300 µg kg⁻¹); DES+KN-93 = Desfluran+KN-93 (n = 6 pro Gruppe). Alle Angaben als Mittelwert ± SEM, * = Signifikant (p < 0,05) verschieden von Baseline, † = Signifikant (p < 0,05) verschieden von dem jeweiligen Wert in der Kontrollgruppe.

LVEDP (mmHg)	Base	CAO	Reperfusion (h)			
			0,5	1	2	3
CON	3 ± 1	7 ± 2	4 ± 1	4 ± 1	4 ± 1	6 ± 1
DES	2 ± 2	6 ± 2	4 ± 1	3 ± 1	5 ± 1	7 ± 1
ESMO 30 min	4 ± 1	7 ± 2	5 ± 1	6 ± 1	6 ± 1	8 ± 2
DES+ESMO 30 min	2 ± 2	8 ± 3	5 ± 1	6 ± 2	7 ± 2	6 ± 1
ESMO 180 min	4 ± 1	8 ± 1	6 ± 1	6 ± 1	6 ± 1	6 ± 1
DES+ESMO 180 min	3 ± 1	8 ± 2	5 ± 1	5 ± 1	4 ± 1	6 ± 1
ICI 118,551	3 ± 1	7 ± 2	5 ± 2	5 ± 2	6 ± 2	7 ± 2
DES+ICI 118,551	4 ± 1	6 ± 1	5 ± 1	6 ± 1	7 ± 1	6 ± 1
H-89	4 ± 2	7 ± 1	4 ± 2	7 ± 2	6 ± 2	7 ± 2
DES+H-89	3 ± 1	8 ± 3	4 ± 1	3 ± 2	4 ± 1	3 ± 1
KN-93	4 ± 2	7 ± 2	4 ± 1	5 ± 1	6 ± 1	6 ± 1
DES+KN-93	3 ± 2	8 ± 3	6 ± 2	5 ± 2	5 ± 2	7 ± 2

Tabelle 4: Systemisch hämodynamischer Parameter linksventrikulärer enddiastolischer Blutdruck (LVEDP). Base = Baseline; CAO = Koronararterienokklusion; CON = Kontrolle; DES = Desfluran (1,0 MAC); ESMO 30 min = Esmolol ($30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) über 30 min; ESMO 180 min = Esmolol ($30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) über 180 min; DES+ESMO 30 min = Desfluran+Esmolol; DES+ESMO 180 min = Desfluran + Esmolol (n = 8 pro Gruppe); H-89 = H-89 ($250 \mu\text{g kg}^{-1}$); DES+H-89 = Desfluran+H-89; ICI = ICI 118,551 ($0,2 \text{ mg kg}^{-1}$); DES+ICI 118,551 = Desfluran+ICI 118,551; KN-93 = KN-93 ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$); DES+KN-93 = Desfluran+KN-93 (n = 6 pro Gruppe). Alle Angaben als Mittelwert \pm SEM, * = Signifikant ($p < 0,05$) verschieden von Baseline, † = Signifikant ($p < 0,05$) verschieden von dem jeweiligen Wert in der Kontrollgruppe.

5.1.2 Arterielle Blutgasanalyse

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede des pH-Wertes, der CO_2 - bzw. O_2 -Partialdrücke, der Sauerstoffsättigung (SaO_2), des Basenüberschusses (BE), der Bikarbonatkonzentration (HCO_3^-) sowie der Kalium (K^+)-Spiegel im Blut zwischen den Versuchsgruppen zu Baseline-Bedingungen. Die O_2 -Partialdrücke sowie die SaO_2 wurden während der gesamten Dauer des Experimentes konstant gehalten.

5.1.3 Herzinfarktgröße

Zwischen den Versuchsgruppen gab es keine Unterschiede in Bezug auf das Körpergewicht, das Gewicht des LV oder der AAR (S. 38, Tab. 5). Die Herzinfarktgröße (Infarktgröße / AAR) betrug $57 \pm 5\%$ in der Kontrollgruppe. Das volatile Anästhetikum Desfluran reduzierte die myokardiale Infarktgröße auf $36 \pm 5\%$.

Der selektive β_1 -adrenerge Rezeptorblocker Esmolol hatte keinen Effekt auf die

	KG (kg)	LV (g)	AAR(g)	AAR/LV(%)
CON	2,43 \pm 0,15	3,12 \pm 0,09	1,33 \pm 0,15	42 \pm 4
DES	2,34 \pm 0,12	3,29 \pm 0,09	1,26 \pm 0,19	38 \pm 5
ESMO 30min	2,60 \pm 0,07	3,28 \pm 0,25	1,23 \pm 0,14	38 \pm 3
DES+ESMO 30min	2,53 \pm 0,06	3,46 \pm 0,17	1,07 \pm 0,12	31 \pm 3
ESMO 180min	2,41 \pm 0,05	3,52 \pm 0,18	1,07 \pm 0,13	38 \pm 4
DES+ESMO 180min	2,39 \pm 0,05	3,50 \pm 0,07	1,04 \pm 0,08	38 \pm 3
ICI 118,551	2,26 \pm 0,15	2,93 \pm 0,16	1,05 \pm 0,12	36 \pm 4
DES+ICI 118,551	2,39 \pm 0,06	2,93 \pm 0,16	1,07 \pm 0,11	37 \pm 4
H-89	2,25 \pm 0,12	2,99 \pm 0,17	1,24 \pm 0,21	42 \pm 5
DES+H-89	2,51 \pm 0,06	3,22 \pm 0,25	1,04 \pm 0,16	32 \pm 4
KN-93	2,62 \pm 0,05	3,39 \pm 0,26	1,18 \pm 0,14	33 \pm 4
DES+KN-93	2,73 \pm 0,05	3,60 \pm 0,24	1,43 \pm 0,18	40 \pm 5

Tabelle 5: Größe der AAR als Prozentwert der Größe des linken Ventrikels (LV), bezogen auf Körpergewicht und Gewicht des LV. Körpergewicht (KG) in kg; Gewicht des LV in g; Gewicht der area at risk (AAR) in g; CON = Kontrollgruppe; DES = Desfluran (1,0 MAC); ESMO 30 min = Esmolol ($30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) über 30 min; DES+ESMO 30 min = Desfluran+Esmolol ($30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) über 30 min; ESMO 180 min = Esmolol ($30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) über 180 min; DES+ESMO 180 min = Desfluran+Esmolol ($30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) über 180 min (n = 8 pro Gruppe). ICI 118,551 = ICI 118,551 ($0,2 \text{ mg kg}^{-1}$); DES+ICI 118,551 = Desfluran+ICI 118,551; H-89 = H-89 ($250 \mu\text{g kg}^{-1}$); DES+H-89 = Desfluran+H-89; KN-93 = KN-93 ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$); DES+KN-93 = Desfluran+KN-93 (n = 6 pro Gruppe).

resultierende Infarktgröße, wenn er über die ersten 30 Minuten der Reperfusion angewendet wurde ($54 \pm 4\%$), hob aber die Desfluran-induzierte Postkonditionierung auf ($58 \pm 5\%$). Im Gegensatz dazu wurde durch Applikation von Esmolol über die gesamte Reperfuionszeit von 180 Minuten die Herzinfarktgröße auf $42 \pm 5\%$ reduziert. Die gleichzeitige Gabe von Desfluran für die ersten 30 Minuten

der Reperfusionzeit in Kombination mit Esmolol über die gesamte Reperfusionphase hatte keinen zusätzlichen Effekt auf die Reduktion der Größe des Infarktes und verminderte den myokardialen Infarkt auf eine Größe von $41 \pm 7\%$.

Der selektive β_2 -adrenerge Rezeptorblocker ICI 118,551 hatte keinen Einfluss auf die Infarktgröße ($62 \pm 4\%$) hob aber die Desfluran-induzierte Postkonditionierung vollständig auf, so dass die Herzinfarktgröße hier $57 \pm 5\%$ betrug. In jeder der Versuchsgruppen waren $n = 8$ Tiere eingeschlossen (S. 24, Abb. 1).

Spezifische Hemmung der PKA mit H-89 während der frühen Reperfusionphase

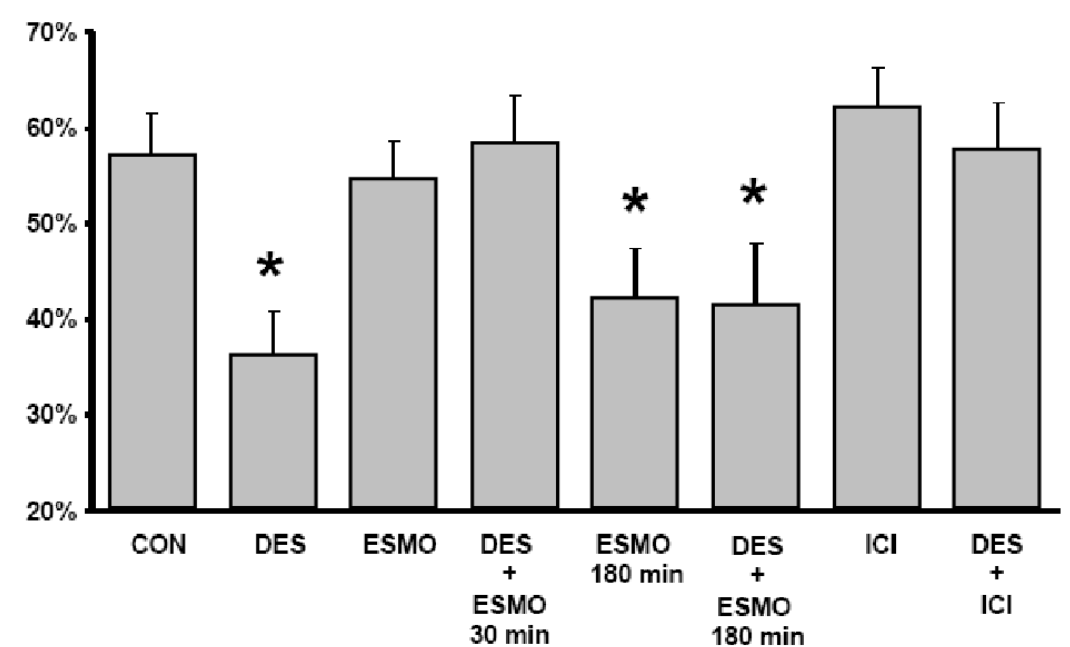


Abbildung 2: Darstellung der Herzinfarktgröße als Anteil der AAR des linken Ventrikels in Prozent. CON = Kontrollgruppe, DES = Desfluran (1,0 MAC), ESMO 30 min = Esmolol ($30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) über 30 min; DES+ESMO 30 min = Desfluran (1,0 MAC)+Esmolol ($30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) über 30 min; ESMO 180 min = Esmolol ($30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) über 180 min; DES+ESMO 180 min = Desfluran (1.0 MAC)+Esmolol ($30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) über 180 min; ICI = ICI 118,551 ($0,2 \text{ mg kg}^{-1}$); DES+ICI = Desfluran (1,0 MAC)+ICI 118,551 ($0,2 \text{ mg kg}^{-1}$); $n = 8$ pro Gruppe. * = Signifikant ($p < 0,05$) verschieden zur Kontrollgruppe.

verminderte die Größe des Herzinfarktes sowohl in Abwesenheit von Desfluran ($36 \pm 5\%$) als auch in Anwesenheit des volatilen Anästhetikums ($33 \pm 5\%$).

Der spezifische Inhibitor der CaMK II, KN-93 hatte keinen Effekt auf die Infarktgröße, die in dieser Gruppe $62 \pm 6\%$ betrug. Jedoch wurde die Desfluran-induzierte

Postkonditionierung durch KN-93 vollständig blockiert ($64 \pm 3\%$) ($n = 6$ in jeder Gruppe) (S. 39, Abb. 2).

Nach einer Untersuchung von Ytrehus et al. [128] stellt die Größe des myokardia-

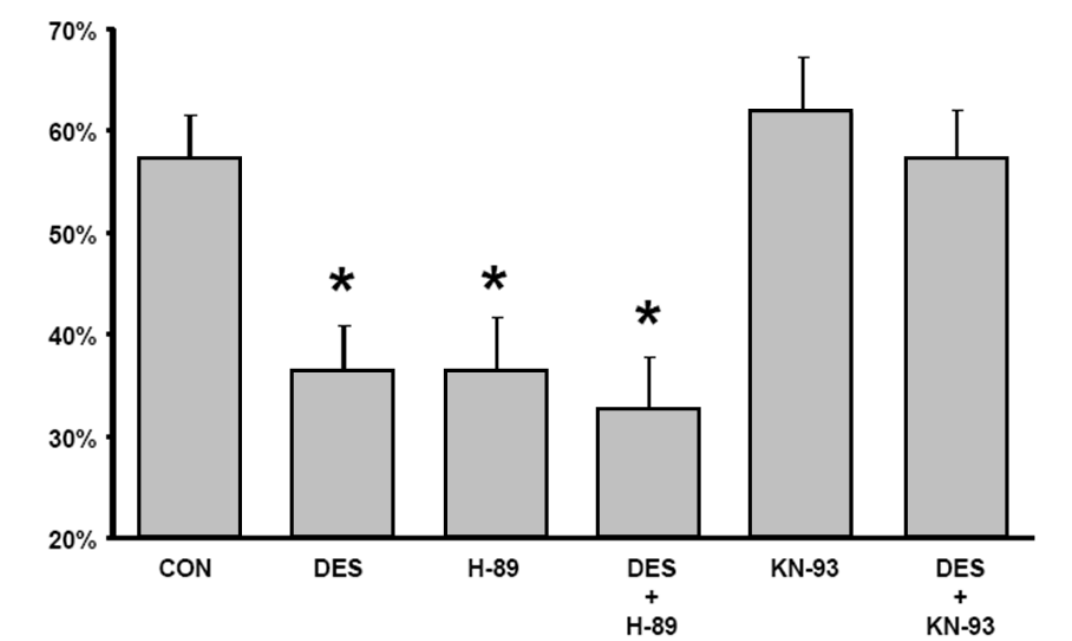


Abbildung 3: Darstellung der Herzinfarktgröße als Anteil der AAR des linken Ventrikels in Prozent. CON = Kontrollgruppe; DES = Desfluran (1,0 MAC); H-89 = H-89 ($250 \mu\text{g kg}^{-1}$); DES+H-89 = Desfluran (1,0 MAC)+H-89 ($250 \mu\text{g kg}^{-1}$); KN-93 = KN-93 ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$); DES+KN-93 = Desfluran (1,0 MAC)+KN-93 ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$); $n = 6$ pro Gruppe. Die hier gezeigten Daten der Kontrollgruppe und der Gruppe, die Desfluran erhielt, sind identisch mit den Daten der jeweiligen Gruppe in Abb. 2. * = Signifikant ($p < 0,05$) verschieden zur Kontrollgruppe.

len ischämischen Arealen einen wesentlichen Prädiktor der resultierenden Infarktgröße dar. Je größer die AAR, desto größer ist auch die Infarktgröße. Demzufolge bewirkt eine kleine AAR eine kleinere Infarktgröße. Um die Wahrscheinlichkeit zu vermindern, dass die Größe der AAR allein die Ergebnisse beeinflussen könnte, war in unserer Untersuchung eine Größe der AAR von mindestens 15 % der linksventrikulären Masse erforderlich. Die Abbildungen 2 (S. 39) und 3 (S. 40) zeigen die Größe des Herzinfarktes als Prozentwert der Größe der AAR. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Größe der AAR zwischen den verschiedenen Experimentgruppen. Somit konnten wir folgern, dass die Reduktion der myokardialen Infarktgröße keine Folge einer unterschiedlich großen AAR war.

5.2 Ergebnisse der molekularbiologischen Auswertung mit Western Immunoblotting

5.2.1 CaMK II, Phosphorylierung von Phospholamban in der frühen Reperfusionphase

Die Proteinexpression der CaMK II (S. 41, Abb. 4) und von Phospholamban (S. 42, Abb. 5) wurden nicht durch eine der angewendeten pharmakologischen Substanzen in der frühen Reperfusionphase beeinflusst.

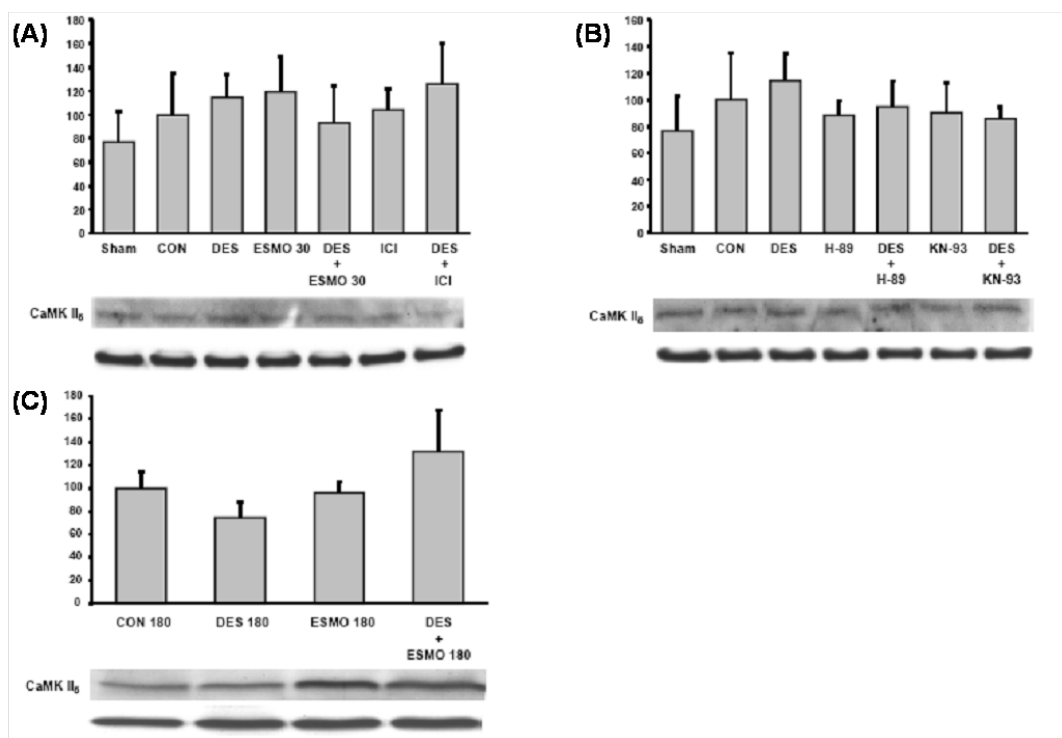


Abbildung 4: Westernblotanalyse der Proteinexpression der myokardialen CaMK II δ . Während der frühen Reperfusion nach Blockade der β -adrenergen Rezeptoren (A) und bei Inhibition der im Signaltransduktionsweg nachfolgenden Kinasen PKA und CaMK II δ (B). In der späten Reperfusionphase nach kontinuierlicher Blockade der β -adrenergen Rezeptoren (C). CON = Kontrollgruppe; DES = Desfluran; ESMO 30 = Esmolol über 30 min; ESMO 180 = Esmolol über 30 min; ICI = ICI 118,551; ESMO 30, ESMO 180, ICI, H-89, KN-93 jeweils bei alleiniger Gabe oder in Kombination mit Desfluran. Repräsentative Darstellung der Ergebnisse in Form der Immunoblots. Auf der Ordinate ist der Mittelwert der Ergebnisse nach densitometrischer Auswertung der Immunoblots als Prozentanteil der Kontrollgruppe (n = 5 pro Gruppe) dargestellt. Die Daten von Sham, CON und DES in (B) sind identisch mit denen in (A). Alle Angaben als Mittelwert \pm SEM. Die untere Proteinbande der Immunoblots zeigt jeweils die Ladekontrolle mit GAPDH.

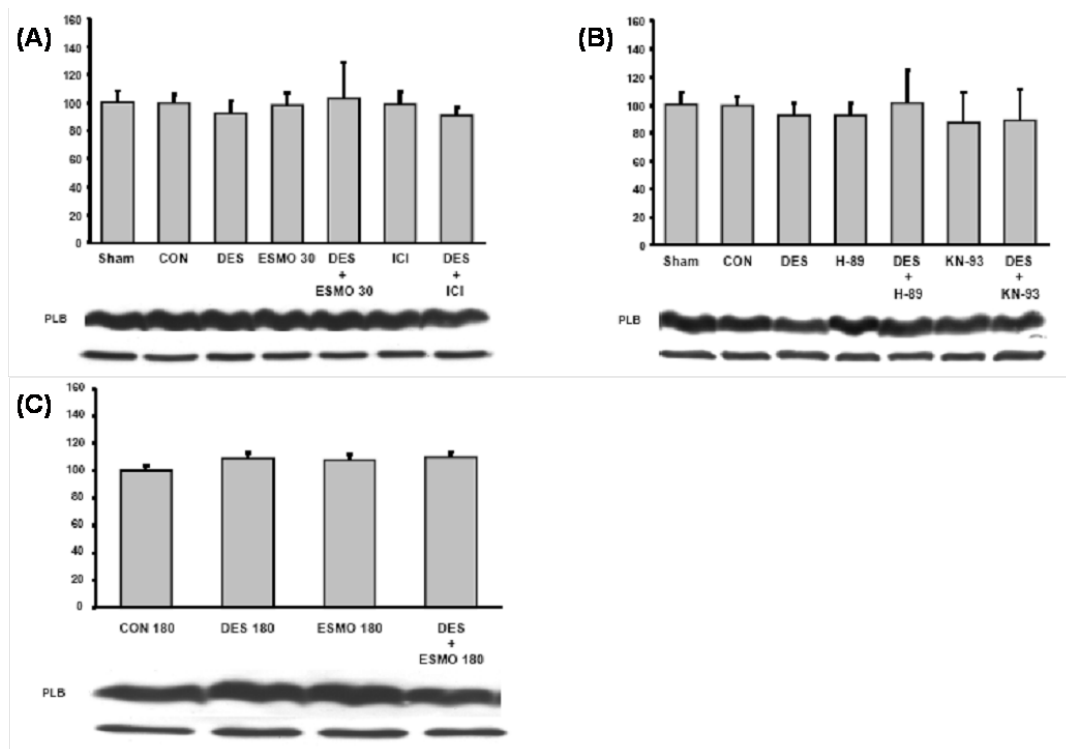


Abbildung 5: Westernblotanalyse der Proteinexpression des myokardialen PLB. Während der frühen Reperfusion nach Blockade der β -adrenergen Rezeptoren (A) und bei Inhibition der im Signaltransduktionsweg nachfolgenden Kinasen PKA und CaMK II $_{\delta}$ (B). In der späten Reperusionsphase nach kontinuierlicher Blockade der β -adrenergen Rezeptoren (C). CON = Kontrollgruppe; DES = Desfluran; ESMO 30 = Esmolol über 30 min; ESMO 180 = Esmolol über 180 min; ICI = ICI 118,551; ESMO 30, ESMO 180, ICI, H-89, KN-93 jeweils bei alleiniger Gabe oder in Kombination mit Desfluran. Repräsentative Darstellung der Ergebnisse in Form der Immunoblots. Auf der Ordinate ist der Mittelwert der Ergebnisse nach densitometrischer Auswertung der Immunoblots als Prozentanteil der Kontrollgruppe (n = 5 pro Gruppe) dargestellt. Die Daten von Sham, CON und DES in (B) sind identisch mit denen in (A). Alle Angaben als Mittelwert \pm SEM. Die untere Proteinbande der Immunoblots zeigt jeweils die Ladekontrolle mit GAPDH.

Bei alleiniger Gabe von Desfluran war die Phosphorylierung von Phospholamban an den Positionen Serin-16 und Threonin-17 nicht betroffen (S. 43, Abb. 6 u. S. 44, Abb. 7). Die PKA-abhängige Phosphorylierung von Phospholamban an Position Serin-16 wurde unter Einfluss von Esmolol, ICI118,551 und H-89 verhindert (S. 43, Abb. 6 u. S. 44, Abb. 7). Die hemmende Wirkung von H-89 auf die Phosphorylierung des Phospholambans an der Stelle Serin-16 wurde allerdings bei gleichzeitiger Anwendung von Desfluran aufgehoben. KN-93 hatte keine Auswirkung auf die Phosphorylierung von Phospholamban an der Stelle Serin-16. Die

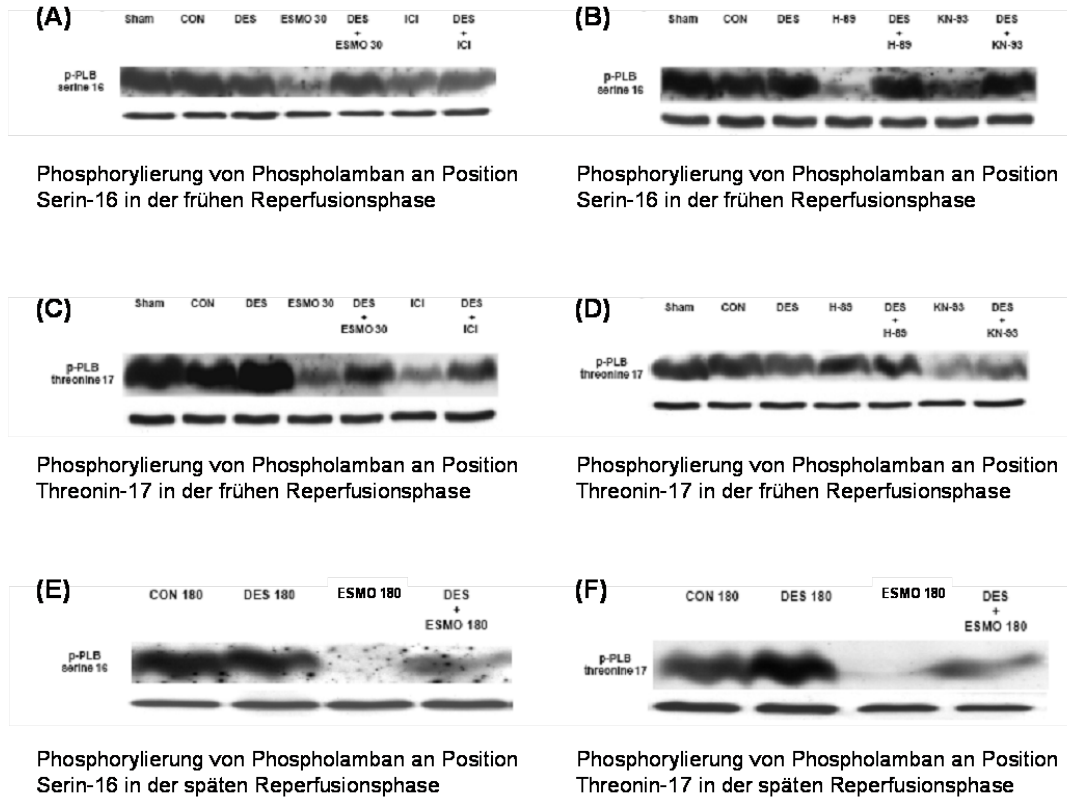


Abbildung 6: Phosphorylierung von Phospholamban an den Positionen Serin-16 und Threonin-17. Während der frühen Reperfusion nach Blockade der β_1 - und der β_2 -adrenergen Rezeptoren (A), (C) und der im Signaltransduktionsweg nachfolgenden Kinasen PKA und CaMK II $_{\delta}$ (B), (D). In der späten Reperfusionphase nach kontinuierlicher Blockade der β -adrenergen Rezeptoren (E), (F). CON = Kontrollgruppe; DES = Desfluran; ESMO 30 = Esmolol über 30 min; ESMO 180 = Esmolol über 180 min; ICI = ICI 118,551; ESMO 30, ESMO 180, ICI, H-89, KN-93 jeweils bei alleiniger Gabe oder in Kombination mit Desfluran. Die Teilabbildungen (A) bis (F) zeigen eine repräsentative Darstellung der Ergebnisse in Form der originalen Immunoblots. Da nach diesem Versuchsteil bei der densitometrischen Auswertung der Immunoblots keine stetige Korrelation der Dichte einzelner Proteinbanden mit der Darstellung des entsprechenden Mittelwertes im Säulendiagramm erkennbar war, erfolgt die Abbildung der statistischen Auswertung an dieser Stelle getrennt von den jeweiligen Immunoblots (siehe Abb. 7). Die Daten von Sham, CON und DES in (B) und (D) sind identisch mit denen in (A) und (C). Die untere Proteinbande der Immunoblots zeigt jeweils die Ladekontrolle mit GAPDH.

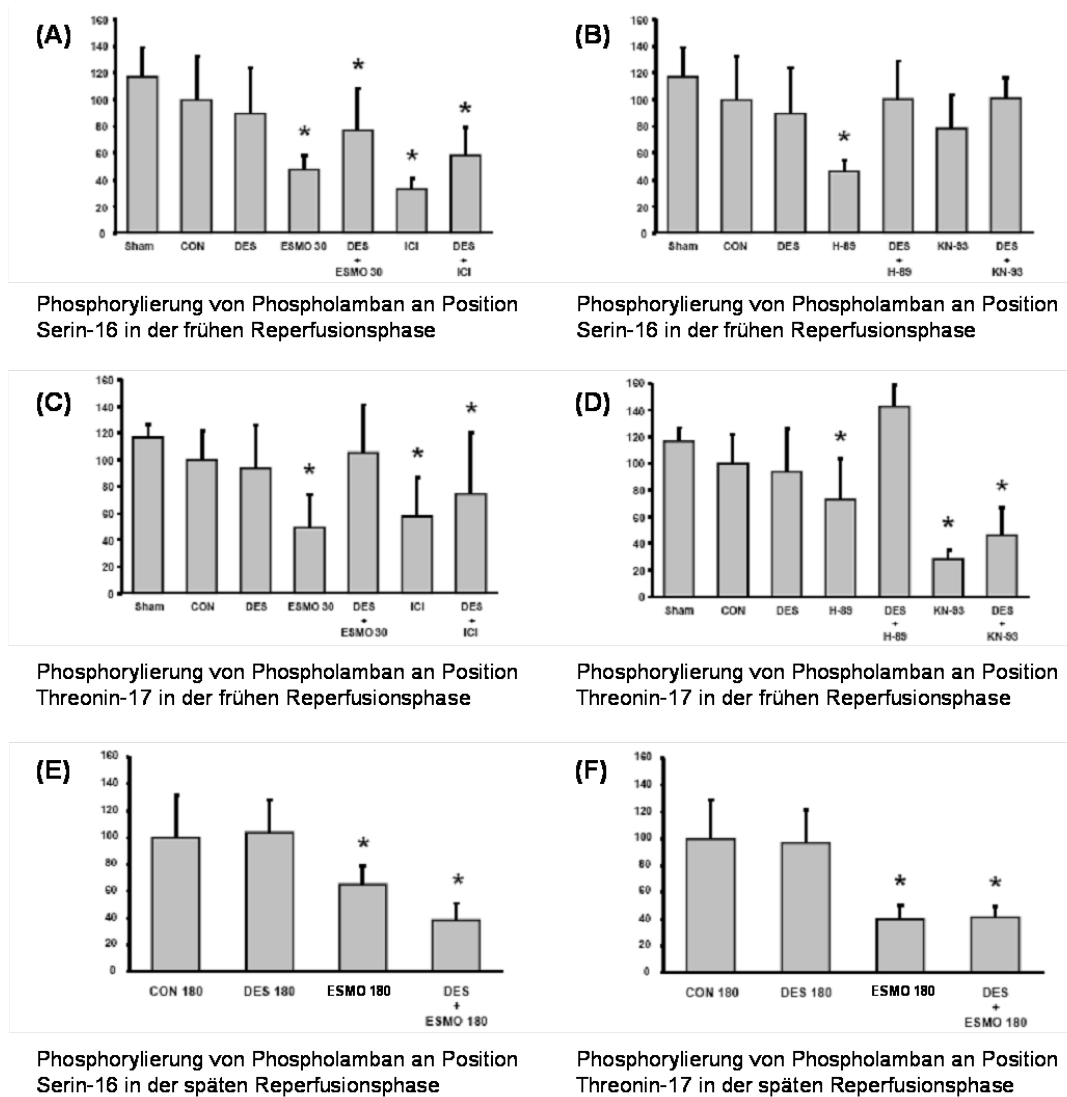


Abbildung 7: Phosphorylierung von Phospholamban an den Positionen Serin-16 und Threonin-17. Während der frühen Reperfusion nach Blockade der β_1 - und der β_2 -adrenergen Rezeptoren (A), (C) und der im Signaltransduktionsweg nachfolgenden Kinasen PKA und CaMK II $_{\delta}$ (B), (D). In der späten Reperfusionphase nach kontinuierlicher Blockade der β -adrenergen Rezeptoren (E), (F). CON = Kontrollgruppe; DES = Desfluran; ESMO 30 = Esmolol über 30 min; ESMO 180 = Esmolol über 180 min; ICI = ICI 118,551; ESMO 30, ESMO 180, ICI, H-89, KN-93 jeweils bei alleiniger Gabe oder in Kombination mit Desfluran. In den Teilabbildungen (A) bis (F) ist auf der Ordinate der Mittelwert nach densitometrischer Auswertung der Immunoblots (siehe Abb. 7) mit Angabe des Prozentanteils der Kontrollgruppe (n = 5 pro Gruppe) dargestellt. Die Daten von Sham, CON und DES in (B) und (D) sind identisch mit denen in (A) und (C). * = Signifikant (p < 0,05) verschieden von der Kontrollgruppe. Alle Angaben als Mittelwert \pm SEM.

Phosphorylierung von Phospholamban an Position Threonin-17 wurde durch Esmolol, ICI118,551, H-89 sowie durch den spezifischen CaMK II-Inhibitor KN-93 blockiert (S. 43, Abb. 6 u. S. 44, Abb. 7). Unter dem Einfluss von Desfluran jedoch wurde die inhibitorische Wirkung von Esmolol und H-89 auf die Phosphorylierung von Phospholamban an der Position Threonin-17 aufgehoben (S. 43, Abb. 6 u. S. 44, Abb. 7).

5.2.2 CaMK II, Phosphorylierung von Phospholamban in der späten Reperfusionphase

In der späten Reperfusionphase hatten die jeweilige alleinige Applikation von Desfluran oder Esmolol keine Auswirkung auf die Proteinexpression der CaMK II. Die Proteinexpression der CaMK II stieg jedoch bei gleichzeitiger Anwendung von Desfluran kombiniert mit Esmolol an, wenn dieses über die gesamte Reperfusionzeit verabreicht wurde (S. 41, Abb. 4).

Die Proteinexpression von Phospholamban wurde weder von Desfluran noch von Esmolol beeinflusst (S. 42, Abb. 5). Die Phosphorylierung von Phospholamban an den Positionen Serin-16 und Threonin-17 wurde durch Esmolol (Esmolol 180 min) alleine und in Kombination mit einer Anwendung von Desfluran verhindert (S. 43, Abb. 6 u. S. 44, Abb. 7).

5.2.3 PKB/Akt

In der frühen Reperfusionphase wurde die Proteinexpression der totalen Menge an PKB/Akt unter Einfluss des selektiven β_2 -adrenergen Rezeptorblockers ICI 118,551 und des spezifischen PKA-Inhibitors H-89 sowohl unter gleichzeitiger Anwendung mit Desfluran als auch ohne Einfluss von Desfluran vermindert.

Die Phosphorylierung von PKB/Akt wurde von ICI 118,551 in Anwesenheit und in Abwesenheit von Desfluran inhibiert. Alle anderen verwendeten Substanzen hatten dagegen keinen Einfluss auf die PKB/Akt-Phosphorylierung (S. 46, Abb. 8).

Desfluran und Esmolol (Esmolol 180 min) hatten in der späten Phase der Reperfusion weder eine Auswirkung auf die Proteinexpression noch auf die Phosphorylierung von PKB/Akt (S. 46, Abb. 8).

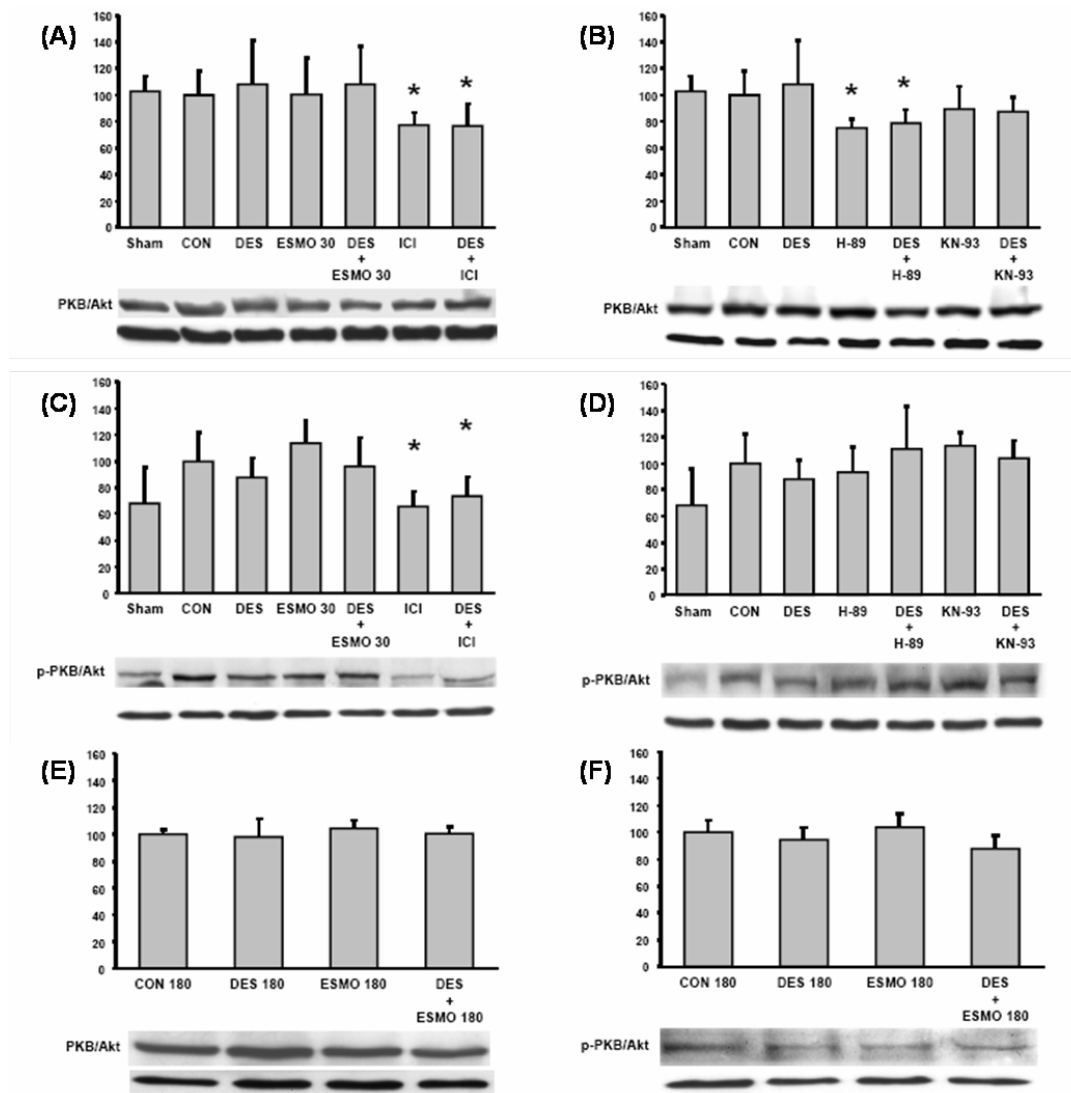


Abbildung 8: Westernblotanalyse der Proteinexpression der myokardialen PKB/Akt und der Phosphorylierung der PKB/Akt. Während der frühen Reperfusion nach Blockade der β_1 - und der β_2 -adrenergen Rezeptoren (A), (C) und der im Signaltransduktionsweg nachfolgenden Kinasen PKA und CaMK II $_{\delta}$ (B), (D). In der späten Reperfusionphase nach kontinuierlicher Blockade der β -adrenergen Rezeptoren (E), (F). CON = Kontrollgruppe; DES = Desfluran; ESMO 30 = Esmolol über 30 min; ESMO 180 = Esmolol über 180 min; ICI = ICI 118,551; ESMO 30, ESMO 180, ICI, H-89, KN-93 jeweils bei alleiniger Gabe oder in Kombination mit Desfluran. Repräsentative Darstellung der Ergebnisse in Form der Immunoblots. Auf der Ordinate ist der Mittelwert der Ergebnisse nach densitometrischer Auswertung der Immunoblots als Prozentanteil der Kontrollgruppe (n = 5 pro Gruppe) dargestellt. Die Daten von Sham, CON und DES in (B) und (D) sind identisch mit denen in (A) und (C). * = Signifikant (p < 0,05) verschieden von der Kontrollgruppe. Alle Angaben als Mittelwert \pm SEM. Die untere Proteinbande der Immunoblots zeigt jeweils die Ladekontrolle mit GAPDH.

6 Diskussion

Der myokardiale Ischämie-Reperfusionsschaden, der nach Wiederherstellung des koronaren Blutflusses nach einer unmittelbar vorausgehenden Phase der Ischämie entsteht, äußert sich in Form inflammatorischer Prozesse, kontraktiler Dysfunktion und zellulärer Apoptose und Nekrose des Myokards. Der Begriff der ischämischen Postkonditionierung ist definiert als eine Periode von kurzzeitigen aufeinander folgenden Phasen von Reperfusionen, die von Phasen einer durch Reokklusion induzierten Ischämie unterbrochen werden.

Die IPost stellt einen wirksamen Mechanismus in der Prävention des myokardialen Reperfusionsschadens dar. Neben der IPost können auch die volatilen Anästhetika das Myokard vor dem I/R-Schaden schützen, wenn sie in der frühen Phase der Reperfusion verabreicht werden. Dies wird als Anästhetika induzierte Postkonditionierung (AIPost) bezeichnet.

Das in vivo-Herzinfarktmodell des Kaninchens [129, 130] ist neben den in vivo-Modellen der Ratte [131, 132] und des Hundes [63, 133] ein weit verbreitetes und anerkanntes Modell bei der experimentellen Erforschung der Phänomene der Präkonditionierung und der Postkonditionierung. Wir nutzten dieses Modell, um zu untersuchen, welche Bedeutung die Signaltransduktion der kardialen β_1 -AR und β_2 -AR für die Desfluran-induzierte Postkonditionierung hat.

Eine myokardiale Ischämie ist verbunden mit einer vermehrten Freisetzung der Katecholamine Adrenalin und vor allem Noradrenalin. Zudem kommt es zu einer Akkumulation dieser beiden Katecholamine im ischämischen Gewebe. Die Konzentrationen der Katecholamine sind abhängig von der Dauer der Ischämie und nehmen mit Einsetzen der Reperfusion ab [99].

Als Antwort auf die Freisetzung von Noradrenalin und Adrenalin kommt es zu einer Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren und nachfolgend zu einer Aktivierung des klassischen Signaltransduktionsweges über G_s -Proteine. Das heißt, es folgt zunächst eine Aktivierung der Adenylatzyklase, dann die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat und schließlich die Aktivierung der Proteinkinase A [54, 99].

Es konnte bereits gezeigt werden, dass beide Subtypen der β -adrenergen Rezeptoren, β_1 -AR und β_2 -AR, komplexe und jeweils unterschiedliche Rollen in der Phase

der Ischämie, der darauf folgenden Reperfusionphase und damit entstehenden Ischämie/Reperfusionsschäden, haben. Die β_1 -AR und β_2 -AR erfüllen gleichzeitig unterschiedliche Funktionen im Mechanismus der Kardioprotektion.

Die verstärkte Stimulierung β_1 -AR und die vermehrte Aktivierung der PKA während einer Ischämie hat nachweislich Anteil am entstehenden Ischämie/Reperfusionsschaden. Die aktivierte PKA phosphoryliert Enzymkomplexe der mitochondrialen Atmungskette, hauptsächlich Komplex IV, die Cytochrom-C-Oxidase (CcO). Die CcO stellt eine Art mitochondrialen Sensor für den intrazellulären O_2 -Gehalt dar und reduziert $>90\%$ des zellulären O_2 zu H_2O . Die CcO ist zudem wichtig für den zellulären Metabolismus und die Generierung von ATP. Sie trägt somit wesentlich zum Überleben der Zelle bei. Nach Hemmung der CcO durch Phosphorylierung über die PKA kommt es zu einer verminderten Bildung von ATP und einer vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), beide Vorgänge gelten neben weiteren Faktoren als Ursache des ischämischen Zellschadens. Die Blockade β_1 -AR verhindert eine Hemmung der CcO [101]. Folglich hat eine pharmakologische Blockade von β_1 -AR bei akutem Myokardinfarkt eine kardioprotektive Wirkung. In klinischen Studien am Menschen [134] sowie im Tierversuch [135] konnte eine Reduzierung der Infarktgröße unter sofortiger Anwendung von β -Blockern bei akutem Myokardinfarkt nachgewiesen werden.

Bei der Aktivierung von β_2 -AR kommt es zwar ebenfalls zu einer Aktivierung der PKA aber nicht zu einer Phosphorylierung mitochondrialer Atmungskettenenzyme durch die PKA. β_2 -AR scheinen durch ihre bei verstärkter Rezeptorstimulierung vornehmlich über G_i -Proteine ablaufende Signalkaskade einen antiapoptotischen Effekt vermitteln zu können [101, 108].

Andererseits konnten Frances et. al [109] zeigen, dass eine kurzzeitige direkte Aktivierung von β_1 -AR vor einem ischämischen Ereignis einen präkonditionierenden Effekt aufweist. Desweiteren gilt sowohl für die IPC [110] als auch für die APC [44], dass sie selbst auch unter Beteiligung des β_1 -adrenergen Signaltransduktionsweges ablaufen. So konnten Spear et al. zeigen, dass eine Blockade β_1 -AR durch verminderte Hemmung der CcO wie oben erläutert kardioprotektiv wirkt. Fällt diese Blockade aber zeitgleich mit einer ischämischen Präkonditionierung zusammen, kann mit der Blockade keine kardioprotektive Wirkung erreicht werden. Findet die Blockade hingegen zu einem Zeitpunkt nach der Präkonditionierung statt, wird eine kardioprotektive Wirkung erreicht [101].

Unsere Arbeitsgruppe konnte am Herzinfarktmodell des Kaninchens in-vivo nachweisen, dass an der APC β_1 -AR beteiligt sind, da sowohl die Desfluran-induzierte wie auch die Sevofluran-induzierte Präkonditionierung durch Applikation des β_1 -selektiven Blockers Esmolol aufgehoben wurde [44]. Die Ischämisch induzierte Präkonditionierung wurde nach Gabe von Esmolol deutlich vermindert [44].

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass sowohl die durch volatile Anästhetika induzierte Präkonditionierung und als auch die durch volatile Anästhetika induzierte Postkonditionierung teilweise über ähnliche Signaltransduktionswege ihre Wirkung erzielen, ist es wahrscheinlich, dass auch die Desfluran-induzierte Postkonditionierung von intrazellulären Vorgängen abhängig ist, die über β -Adrenozeptoren vermittelt werden. Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal ein Nachweis erbracht werden, dass die Desfluran-induzierte Postkonditionierung über den β -adrenergen Signaltransduktionsweg vermittelt wird, da die jeweilige selektive Blockade von β_1 -AR (Esmolol über 30 min) und β_2 -AR die durch Desfluran erzielte kardioprotektive Wirkung in der frühen Reperfusionphase aufhob (S. 39, Abb. 2).

Auch wenn mit den Ergebnissen dieser Studie ein direkter Einfluss von Desfluran auf β -Adrenozeptoren und die PKA nicht nachgewiesen werden kann, zeigen die molekularbiologischen Auswertungen der Western-Blots dennoch, dass die hemmende Wirkung der β -adrenergen Rezeptor-Blocker Esmolol (β_1 -AR) und ICI 118,551 (β_2 -AR) sowie des PKA-Antagonisten H-89 auf die PKA-abhängige Phosphorylierung von Phospholamban unter Einfluss von Desfluran abgeschwächt wird. Phospholamban wird bei Kombination von Desfluran mit Esmolol (30 min), ICI 118,551 oder H-89 sowohl an der Position Serin-16 PKA-abhängig, als auch an der Position Threonin-17 CaMK II-abhängig phosphoryliert (S. 43, Abb. 6 u. S. 44, Abb. 7). Dieses Ergebnis stellt somit einen indirekten Hinweis auf eine sympathomimetische Wirkung von Desfluran dar [136].

Es muss aber auch beachtet werden, dass eine über die gesamte Reperfusionphase anhaltende Blockade β_1 -AR durch den β_1 -spezifischen Rezeptorblocker Esmolol zu einer Reduktion der Herzinfarktgröße führt, die dasselbe Ausmaß zeigt, wie diejenige, die durch die Desfluran-induzierte Postkonditionierung erreicht wird (S. 39, Abb. 2).

Für die Wirkung von β -Blockern werden weitere protektive Mechanismen wie

verminderte Akkumulation von Fettsäuren [137], Stabilisierung der Zellmembran [138] oder Hemmung der Phospholipase A [139] angenommen. Jedoch stellen die durch die Blockade von β -adrenergen Rezeptoren bedingten Energie sparenden Effekte, vor allem durch Senkung der Herzfrequenz, wahrscheinlich die Hauptursache für eine Reduktion der Herzinfarktgröße unter Anwendung von Esmolol dar. Die Ergebnisse aus den Tierversuchen lassen deutlich erkennen, dass die Applikation von Esmolol nur für die ersten 30 Minuten der Reperfusionphase und der damit während dieser Zeit erreichten Verminderung des Energieverbrauches für das Myokard nicht ausreicht, um eine kardioprotektive Wirkung hervorzurufen. Eine über die Gesamtdauer der Reperfusion bestehende Senkung der Herzfrequenz und damit des Energieverbrauches mittels Esmolol ist dagegen womöglich ausreichend, die Infarktgröße zu reduzieren.

Die gewünschten Effekte der anhaltenden Senkung der Herzfrequenz durch Esmolol während der Reperfusion könnten, bei gleichzeitiger Anwendung von Desfluran, gegenüber einer eigentlich innerhalb dieses Zeitraumes durch die Blockade der β_1 -adrenergen Rezeptoren bedingten, parallel ablaufenden Hemmung der Desfluran-induzierten Postkonditionierung, einer Aufhebung der AIPost überwiegen. Dies würde auch erklären, dass Esmolol sowohl in Anwesenheit wie auch in Abwesenheit von Desfluran eine kardioprotektive Wirkung erreicht, wenn es über die gesamte Reperfusionphase gegeben wird.

Das bedeutet, dass zum einen ein ungestörter, intakter über β_1 -AR ablaufender Signaltransduktionsweg vor allem zu Beginn der Reperfusionphase notwendig ist, um die kardioprotektiven Effekte der Desfluran-induzierten Postkonditionierung zu vermitteln. Gleichzeitig aber erzielt die alleinige langanhaltende Blockade β_1 -AR über die gesamte Reperfusionphase selbst eine deutliche Kardioprotektion. Aus diesen Ergebnissen lässt sich somit ableiten, dass die verschiedenen Rollen der über β -adrenerge Rezeptoren vermittelten Signalkaskaden, die bereits für die IPC [44, 101] und die APC [44] gezeigt wurden, in ähnlicher Weise auch bei der AIPost gefunden werden können.

Die spezifische Blockade der β_2 -AR durch ICI 118,551 hebt nach unseren Ergebnissen die Desfluran-induzierte Postkonditionierung auf (S. 39, Abb. 2). Stimulation von β_2 -AR aktiviert über G_i -Proteine den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3 K)-Signalweg [103]. Die aktivierte PI3 K wiederum aktiviert die Proteinkinase B (PKB/Akt) mit nachfolgender Hemmung der Öffnung der mPTP in der auf die

Ischämie folgenden Reperfusionphase.

Neben anderen Faktoren wie niedriger intrazellulärer ATP-Gehalt, niedriger pH-Wert und oxidativer Stress [140], ist der Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration [141] eine wesentliche Ursache, die eine Öffnung der mPTP induzieren kann. Eine auslösende Situation, in der es zu einer Öffnung der mitochondrialen Poren und einer vermehrten Durchlässigkeit mitochondrialer Membranen kommt, ist die Phase zu Beginn der Reperfusion nach myokardialer Ischämie [142]. Griffiths et al. [142] belegten dies mit Messungen der Aufnahme von 2-Desoxyglucose (DOG) in myokardiale Mitochondrien während einer induzierten Ischämie und in der Reperfusion am isolierten Rattenherzen. DOG gelangt nur in die Mitochondrien, wenn die mPTP geöffnet sind. Eine mitochondriale Aufnahme von DOG ließ sich nur während der Reperfusion, nicht aber in der Ischämiephase messen. Die Öffnung der mPTP konnte durch Ca^{2+} induziert werden.

In Abhängigkeit vom Ausmaß und einer möglichen Reversibilität der Öffnung der mPTP hat die Durchlässigkeit der mitochondrialen Membranen einen apoptotischen oder nekrotischen Zelltod zur Folge. Die Öffnung der mPTP führt zu einem Anschwellen der Mitochondrien und Ruptur der mitochondrialen Membranen. Der mitochondriale Elektronentransport wird unterbrochen, es kommt zur Freisetzung von Cytochrom C und Aktivierung der proapoptotischen Caspasen 3 und 9. Kann die Zelle in diesem Prozess noch eine gewisse ATP-Produktion aufrechterhalten, wird die Apoptose, die einen ATP-abhängigen Prozess darstellt, eingeleitet. Ist die ATP-Bildung dagegen unzureichend resultiert die Nekrose der Zelle [140]. Die Isofluran-induzierte Postkonditionierung aktiviert die PI3 K sowie PKB/Akt und verstärkt die Phosphorylierung von Akt [74]. Krolkowski et al. [77] zeigten darüber hinaus, dass die Isofluran-induzierte Postkonditionierung die Öffnung der mPTP hemmen kann. Für die Desfluran-induzierte Präkonditionierung gibt es Nachweise, dass sie die Widerstandsfähigkeit der Mitochondrien gegenüber einer Ca^{2+} -induzierten Öffnung der mPTP verstärkt [59]. Der PI3 K-PKB/Akt-Signalweg stellt damit einen sehr wichtigen Abschnitt in der durch Anästhetika induzierten Postkonditionierung dar.

Die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung mit Western Blots zeigen, dass die selektive Blockade β_2 -AR die Phosphorylierung von PKB/Akt hemmt (S. 46, Abb. 8). Diese Ergebnisse lassen die Annahme zu, dass die Stimulierung von β_2 -AR, nachfolgend die Aktivierung der PI3 K und von PKB/Akt und schließlich

die Hemmung der Öffnung der mPTP eine Folge der mit Desfluran induzierten kardioprotektiven Wirkung während der frühen Reperfusionphase ist.

Die Proteinkinase A ist ein auf Stimulation von β -Adrenozeptoren intrazellulär nachfolgender Mediator. Eine Hemmung der PKA während der frühen Reperfusionphase durch den spezifischen PKA-Inhibitor H-89 ist kardioprotektiv und reduziert die Infarktgröße (S. 40, Abb. 3). Die Infarktgrößenreduzierende Wirkung ist dabei unabhängig von der gleichzeitigen Anwesenheit oder Abwesenheit von Desfluran (S. 40, Abb. 3). Zu dieser Beobachtung finden sich auch Übereinstimmungen mit Studien an isolierten Rattenherzen, die belegen, dass die Verabreichung von H-89 als PKA-Inhibitor ohne eine gleichzeitig stattfindende ischämische Präkonditionierung die Infarktgröße reduziert [143].

Andererseits ist die PKA auch an der Vermittlung der IPC [144] und der APC [44] beteiligt. Nach Blockade der PKA mit H-89 wurde die IPC [144] bzw die Sevofluran- und Desfluran-induzierte Präkonditionierung [44] aufgehoben. Die präkonditionierenden Effekte beruhen hierbei vermutlich auf einer durch die PKA vermittelten Aktivierung mitochondrialer Calcium aktivierter K^+ -Kanäle mit großer Leitfähigkeit [145]. Es ist unwahrscheinlich, dass diese Diskrepanz einer Beteiligung der PKA an der APC und der IPC und einer wiederum kardioprotektiven Wirkung durch Blockade der PKA im Rahmen der IPC und der IPost, auf Unterschiede innerhalb der Signaltransduktionswege von Prä- und Postkonditionierung beruht. Die Blockade der PKA durch H-89 hat vielmehr eine der Blockade β_1 -AR mit Esmolol über die gesamte Reperfusionzeit vergleichbaren Effekt. Die Dauer der Wirkung von H-89 im myokardialen Gewebe beim in-vivo-Versuch am Kaninchen ist dabei nicht bekannt. Die Tatsache jedoch, dass die Applikation von H-89 mit Einleiten der Reperfusion eine Senkung der Herzfrequenz über die gesamte Reperfusionphase zufolge hat, lässt darauf schließen, dass die Blockade der PKA auch über den gesamten Zeitraum der Reperfusion anhält. Eine langanhaltende Hemmung der PKA könnte somit die gleichen kardioprotektiven Effekte haben wie eine andauernde spezifische Blockade β_1 -AR. Vermutlich führt die langanhaltende Hemmung der PKA ähnlich wie die Blockade von β -Adrenozeptoren zu einer Reduktion des myokardialen Sauerstoffverbrauchs.

Die anhaltende Stimulation β_1 -AR hat Auswirkungen auf den Ablauf des intrazellulären Signaltransduktionsweges. Die eigentliche klassische Abfolge ausgehend vom G_s -Protein über die Adenylylzyklase, nachfolgend Bildung von cAMP und Ak-

tivierung der PKA verschiebt sich hinzu einer vorrangigen Aktivierung der CaMK II [122]. Dabei gibt es immer mehr Nachweise dafür, dass die nachteiligen Effekte einer ständigen β -adrenergen Stimulation wie Induktion von Hypertrophie und Apoptose der Myozyten und unzureichende Remodellingprozesse des Myokards eher in Zusammenhang mit der Aktivierung der CaMK II als mit der Aktivierung der PKA stehen [104, 121]. Die anhaltende Aktivierung der CaMK II durch langanhaltende Stimulierung der β_1 -AR bedingt eine Desensitisierung des Signalweges über cAMP/PKA. Phospholamban wird folglich überwiegend an der von CaMK II abhängigen Stelle Threonin-17 phosphoryliert und in nur noch geringem Ausmaß an der PKA-abhängigen Position Serin-16 [104].

Hoch et al. [114] wiesen die vermehrte Expression und Aktivität der δ_3 -CaMK II, einer Isoform der CaMK II, in menschlichem Myokardgewebe von Patienten mit Dilatativer Kardiomyopathie nach. Die Überexpression könnte einen Kompensationsmechanismus darstellen, um einem vollständigen Verlust der Kontraktionsfähigkeit des Myokards entgegenzuwirken. Die spezifische Hemmung der CaMK II wäre somit ein neuartiger möglicher Ansatz in der Prävention des Herzversagens, einer der Langzeitfolgen nach Myokardinfarkt. Zu beachten ist aber, dass in der Akutphase des Myokardinfarktes die Aktivierung der CaMK II an der Aufrechterhaltung einer ausreichenden myokardialen Kontraktionsfähigkeit beteiligt ist [116, 117].

Neben der positiven Wirkung der CaMK II auf die Entwicklung der Kontraktionsfähigkeit nach Myokardinfarkt gibt es zudem experimentelle Nachweise, dass die CaMK II auch eine wichtige Funktion bei der IPC [118] und der Desfluran-induzierten Präkonditionierung [119] vermittelt. Hemmung der CaMK II mit KN-93 vor einer experimentellen Ischämie am Modell des isolierten Rattenherzens verhindert den positiven Effekt der Ischämischen Präkonditionierung und die Verbesserung der kontraktilen Funktion des LV [118]. Ebenso wird die Reduktion der Infarktgröße, die mit der Desfluran-induzierten Präkonditionierung im in-vivo-Versuch am Kaninchenherzen erreicht wird, durch die Blockade der CaMK II mit KN-93 aufgehoben [119]. Somit könnte eine kurzzeitige Aktivierung der CaMK II Teil der Signalkaskade sein, die der IPC zugrunde liegt. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie geben zum ersten Mal einen Nachweis dafür, dass die Blockade der CaMK II die Desfluran-induzierte Postkonditionierung aufhebt (S. 40, Abb. 3).

Die Analysen der Western Blots belegen die effektive Blockade der CaMK II durch

den spezifischen CaMK II-Inhibitor KN-93 (S. 41, Abb. 4), da die von der CaMK II abhängige Phosphorylierung von Phospholamban an Position Threonin-17 blockiert wird (S. 43, Abb. 6 u. S. 44, Abb. 7). Die PKA-abhängige Phosphorylierung von Phospholamban an Position Serin-16 ist dagegen nicht betroffen (S. 43, Abb. 6 u. S. 44, Abb. 7).

Über welche Mechanismen die CaMK II in die durch Anästhetika vermittelte kardioprotektive Wirkung im Rahmen der Postkonditionierung eingreift, ist nicht hinreichend bekannt. Allerdings hat die CaMK II eine sehr wichtige Funktion bei der Regulierung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels und das Ereignis eines entstehenden Ischämie / Reperfusionsschadens hat für die Zelle eine kritische Anhäufung von Ca^{2+} im Zytosol zur Folge [87]. Für die Anästhetika induzierte Präkonditionierung konnte gezeigt werden, dass diese die Dichte sowie den Phosphorylierungsgrad und damit die Funktion der für die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase wichtigen Proteine – die ATPase der Ca^{2+} -Pumpe am sarkoplasmatischen Retikulum (SERCA) und den Ryanodinrezeptor – aufrecht erhalten kann. Damit ist die APC in der Lage, den übermäßigen intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt nach einem Ischämie / Reperfusionsschaden zu reduzieren und die Ventrikelfunktion zu verbessern [110, 146]. Wahrscheinlich kann unter dem Einfluss der Desfluran-induzierten Postkonditionierung auf die Aktivität der CaMK II eine Verbesserung der Regulierung der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase nach Ischämie / Reperfusionsschaden erreicht werden.

Bei der Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Studie müssen einige wichtige Einschränkungen berücksichtigt werden. Wegen Pumpversagen mussten sechs der Tiere von der Studie ausgeschlossen werden, wobei fünf dieser Tiere Desfluran erhielten. Dies lässt vermuten, dass die Verabreichung von 1,0 MAC Desfluran zu Beginn der Reperfusion nach der experimentell eingeleiteten Ischämie das Risiko für ein linksventrikuläres Versagen erhöht. Desfluran wurde dabei immer in Verbindung mit Natrium-Pentobarbital als Hintergrundnarkose verwendet. Die Kombination der negativ inotropen Wirkung beider Anästhetika könnte während der vulnerablen Phase der frühen Reperfusion für diesen unerwünschten Effekt verantwortlich sein.

Obwohl Esmolol ein selektiver Inhibitor an β_1 -AR ist, kann eine mögliche Blockade von β_2 -AR nicht ausgeschlossen werden. Neben seiner Wirkung auf β -Adrenozep-toren hat Esmolol auch nicht über Rezeptoren vermittelte Effekte. Esmolol führt

zu einer Verkürzung der Dauer des Aktionspotentials und zu einem verminderten Spannungsplateau im Verlauf des Aktionspotentials. Esmolol wirkt zudem an den Myokardzellen direkt negativ inotrop [147]. Mit den in der vorliegenden Studie verwendeten Methoden kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass mögliche Wirkungen von Esmolol an β_2 -AR und nicht über Rezeptoren vermittelte Effekte von Esmolol Einfluss auf die Infarktgröße haben.

H-89 gilt als selektiver Inhibitor der PKA. Dennoch hemmt H-89 die Aktivität einiger weiterer Proteinkinasen, hierunter MSK1, SGK1 und ROCK II, in gleichem Ausmaß wie die PKA [148]. Die Proteinkinase G wird durch H-89 zwar geblockt, die Selektivität für die PKA ist jedoch höher [149]. H-89 hemmt zudem dosisabhängig und PKA-unabhängig direkt K_{ATP} -Kanäle an den glatten Muskelzellen der Koronararterien des Kaninchenherzens. ATP-sensitive Kaliumkanäle spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus, da aktivierte K_{ATP} -Kanäle eine Vasodilatation und Abnahme des Gefäßwiderstandes vermitteln [150]. In unserem Versuchsprotokoll wurde H-89 zu Beginn der Reperfusion direkt in den linken Ventrikel appliziert. Wie oben angemerkt ist die Wirkdauer von H-89 zwar nicht bekannt, hält aber vermutlich über die gesamte Reperusionszeit an. Ein Einfluss auf den koronaren Blutfluss durch Anwendung von H-89 kann somit nicht ausgeschlossen werden.

In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Ischämie / Reperfusionsschaden eine Umverteilung der CaMK II in Zellkompartimente während einer vorübergehenden Ischämiephase bewirkt und anschließend während der Phase der Reperfusion zu einer erneuten Freigabe der CaMK II in das Zytosol führt [151]. Die Translokation der CaMK II wurde im Rahmen dieser Untersuchung nicht überprüft. Es ist jedoch möglich, dass die Translokation in Bezug auf Ca^{2+} -abhängige Signalwege eine Rolle bei der Desfluran-induzierten Postkonditionierung spielt. KN-93 ist ein selektiver Inhibitor, der kompetitiv die Bindung von Calmodulin an die CaMK II sowie die Autophosphorylierung der CaMK II hemmt. KN-93 hat keine weiteren Effekte auf andere Proteinkinasen [152]. Allerdings werden L-Typ Ca^{2+} -Kanäle sowie K^+ -Ströme direkt von KN-93 gehemmt [153].

Wir konnten in unserer tierexperimentellen Untersuchung zeigen, dass die Desfluran-induzierte Postkonditionierung über kardiale β_1 -AR und β_2 -AR vermittelt wird. Desfluran hat eine bedeutende kardioprotektive Wirkung und kann die Herzinfarktgröße signifikant reduzieren, wenn es in der frühen Reperusionsphase ap-

pliziert wird. Da viele Patienten mit chronischen Herzerkrankungen oder nach Myokardinfarkt mit Betablockern (spezifische β_1 -adrenerge Rezeptorblocker) behandelt werden, die Desfluran-induzierte Postkonditionierung aber auch unter ständiger Blockade β_1 -AR mit Esmolol nicht aufgehoben wurde, könnte dies bedeuten, dass eine Dauertherapie mit Betablockern keine Kontraindikation oder einen Nachteil für eine klinische Anwendung der Desfluran-induzierten Postkonditionierung darstellen würde. Sollten die Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sein, könnte die klinische Anwendung volatiler Anästhetika im Rahmen der AIPost entscheidend zur Versorgung von Patienten mit koronaren Herzerkrankungen oder Myokardinfarkt beitragen.

7 Zusammenfassung

Nach einem akuten myokardialen Infarkt ist die frühe und erfolgreiche Reperfusion des Myokards die wichtigste Maßnahme, um die Größe des entstehenden Infarktes zu limitieren. Der Vorgang der Reperfusion kann dabei selbst eine weitere Schädigung des reperfundierten Gewebes verursachen. Das Phänomen der ischämischen Postkonditionierung beschreibt einen Mechanismus mit dem durch Zyklen kurzer Episoden von Reperfusionen, die von einer Ischämie unterbrochen werden, das Ausmaß des Reperfusionsschadens und die Infarktgröße bedeutend reduziert werden können. Auch volatile Anästhetika sind in der Lage, diesen Mechanismus zu aktivieren und durch Postkonditionierung im betroffenen Gewebe eine kardioprotektive Wirkung zu erreichen. Da auch die ischämische und die anästhetika induzierte Präkonditionierung vor einem I/R-Schaden schützen können und da sowohl die IPC und die APC wie auch die IPost über ähnliche Signaltransduktionswege ablaufen, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Rolle der für die in der IPC und der APC bereits nachgewiesenen Beteiligung des Signaltransduktionsweges über kardiale β_1 -AR und β_2 -AR, für die Anästhetika induzierte Postkonditionierung zu untersuchen.

Wir führten unsere Untersuchungen in einem in vivo-Herzinfarktmodell an Kaninchen durch. Mit den Ergebnissen der vorliegenden experimentellen Studie konnten wir zeigen, über welche unterschiedlichen Funktionsweisen die Signaltransduktion über β -adrenerge Rezeptoren an einer Kardioprotektion während der Phase der Reperfusion beteiligt ist. Wir konnten nachweisen, dass die Blockade der beiden β -Adrenozeptorsubtypen β_1 -AR und β_2 -AR oder die Blockade der im Verlauf des Signaltransduktionsweges über die β -adrenergen Rezeptoren folgenden CaMK II, die Desfluran-induzierte Postkonditionierung aufhebt. Somit spielen wie in der APC die kardialen β_1 -AR und β_2 -AR auch eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der AIPost. Andererseits konnten wir aber zeigen, dass auch durch die langanhaltende selektive Blockade der β_1 -AR über die gesamte Dauer der Reperusionsphase oder durch Blockade der PKA eine beachtliche kardioprotektive Wirkung erreicht werden kann. Weiterhin konnten wir nachweisen, dass die kardioprotektiven Effekte und die Reduktion der Infarktgröße in diesem Fall nicht von der gleichzeitigen Anwesenheit oder Abwesenheit des volatilen Anästhetikums Desfluran abhängig sind.

Ein unphysiologisch hoher Anstieg der Calciumkonzentration im Zytosol und den

Mitochondrien trägt nachweislich zum Entstehen des Reperfusionsschadens und der Apoptose der Kardiomyozyten bei. Die Optimierung der Ca^{2+} -Homöostase durch die Erhaltung der die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration regulierenden Proteine, könnte somit eine bedeutende Rolle für die durch volatile Anästhetika induzierte Kardioprotektion spielen. Sie könnte ebenso erklären, welche Funktion die β -adrenerge Signaltransduktion innerhalb der von volatilen Anästhetika vermittelten kardioprotektiven Wirkung hat. Da unter Desfluran und gleichzeitiger Blockade des β_1 -AR die Proteinexpression der CaMK II zwar nicht beeinflusst wurde, aber dennoch die Phosphorylierung von Phospholamban gehemmt wurde, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass durch die erhaltene Aktivität der CaMK II zum einen die Aufnahme und Verteilung des intrazellulären Calciums verbessert wird, zum anderen aber auch durch eine Verhinderung einer zu hohen Anreicherung des Ca^{2+} im sarkoplasmatische Retikulum, eine Hyperkontraktur und Ca^{2+} -Akku-mulation verhindert werden kann.

Da wir in unserer molekularbiologischen Auswertung auch nachweisen konnten, dass unter Anwendung von Desfluran alleine sowie unter Blockade des β_1 -AR weder in der frühen noch in der späten Reperfusionsphase die Proteinexpression und die Phosphorylierung der PKB/Akt vermindert wurde, dies jedoch bei gleichzeitiger Blockade der β_2 -AR der Fall war, könnte dies ein mögliches Indiz sein, dass Desfluran über β_2 -AR eine Aktivierung des RISK-Pathway über PKB/Akt initiieren kann.

Mit unseren Ergebnissen konnten wir zeigen, dass Desfluran im Rahmen der Anästhetika induzierten Postkonditionierung kardioprotektiv wirkt. Dies hat insofern eine klinische Bedeutung, da die IPost eine mögliche therapeutische Intervention bei der Behandlung von Patienten mit myokardialen Ischämien und Infarkt bei Wiedereröffnung der Koronargefäße darstellt. Darüber hinaus hat die IPost gegenüber der IPC und der APC den Vorteil, dass sie um eine kardioprotektive Wirkung zu erreichen, nicht der zeitlichen Voraussage des ischämischen Ereignisses unterliegt.

Literatur

- [1] MANGANO, D. T. ; LAYUG, E. L. ; WALLACE, A. ; TATEO, I.: Effect of atenolol on mortality and cardiovascular morbidity after noncardiac surgery. Multi-center Study of Perioperative Ischemia Research Group. In: *N Engl J Med* 335 (1996), Dec, Nr. 23, S. 1713–1720
- [2] MANGANO, D. T. ; HOLLENBERG, M. ; FEGERT, G. ; MEYER, M. L. ; LONDON, M. J. ; TUBAU, J. F. ; KRUPSKI, W. C.: Perioperative myocardial ischemia in patients undergoing noncardiac surgery–I: Incidence and severity during the 4 day perioperative period. The Study of Perioperative Ischemia (SPI) Research Group. In: *J Am Coll Cardiol* 17 (1991), Mar, Nr. 4, S. 843–850
- [3] MANGANO, D. T.: Perioperative cardiac morbidity. In: *Anesthesiology* 72 (1990), Jan, Nr. 1, S. 153–184
- [4] KEHL, Franz ; KROLIKOWSKI, John G. ; MRAOVIC, Boris ; PAGEL, Paul S. ; WARLTIER, David C. ; KERSTEN, Judy R.: Is isoflurane-induced preconditioning dose related? In: *Anesthesiology* 96 (2002), Mar, Nr. 3, S. 675–680
- [5] KERSTEN, J. R. ; SCHMELING, T. J. ; HETTRICK, D. A. ; PAGEL, P. S. ; GROSS, G. J. ; WARLTIER, D. C.: Mechanism of myocardial protection by isoflurane. Role of adenosine triphosphate-regulated potassium (KATP) channels. In: *Anesthesiology* 85 (1996), Oct, Nr. 4, S. 794–807; discussion 27A
- [6] CASON, B. A. ; GAMPERL, A. K. ; SLOCUM, R. E. ; HICKEY, R. F.: Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits. In: *Anesthesiology* 87 (1997), Nov, Nr. 5, S. 1182–1190
- [7] JENKINS, D. P. ; PUGSLEY, W. B. ; ALKHULAIFI, A. M. ; KEMP, M. ; HOOPER, J. ; YELLON, D. M.: Ischaemic preconditioning reduces troponin T release in patients undergoing coronary artery bypass surgery. In: *Heart* 77 (1997), Apr, Nr. 4, S. 314–318
- [8] LASKEY, Warren K. ; BEACH, Dana: Frequency and clinical significance of ischemic preconditioning during percutaneous coronary intervention. In: *J Am Coll Cardiol* 42 (2003), Sep, Nr. 6, S. 998–1003

- [9] HERT, Stefan G D. ; LINDEN, Philippe J V. ; CROMHEECKE, Stefanie ; MEEUS, Roel ; BROECKE, Pieter W. ; BLIER, Ivo G D. ; STOCKMAN, Bernard A. ; RODRIGUS, Inez E.: Choice of primary anesthetic regimen can influence intensive care unit length of stay after coronary surgery with cardiopulmonary bypass. In: *Anesthesiology* 101 (2004), Jul, Nr. 1, S. 9–20
- [10] OBAL, D. ; PRECKEL, B. ; SCHARBATKE, H. ; MÜLLENHEIM, J. ; HÖTERKES, F. ; THÄMER, V. ; SCHLACK, W.: One MAC of sevoflurane provides protection against reperfusion injury in the rat heart in vivo. In: *Br J Anaesth* 87 (2001), Dec, Nr. 6, S. 905–911
- [11] PRECKEL, B. ; SCHLACK, W. ; COMFÈRE, T. ; OBAL, D. ; BARTHEL, H. ; THÄMER, V.: Effects of enflurane, isoflurane, sevoflurane and desflurane on reperfusion injury after regional myocardial ischaemia in the rabbit heart in vivo. In: *Br J Anaesth* 81 (1998), Dec, Nr. 6, S. 905–912
- [12] RAPHAEL, Jacob ; ABEDAT, Suzan ; RIVO, Julia ; MEIR, Karen ; BEERI, Ronen ; PUGATSCH, Thea ; ZUO, Zhiyi ; GOZAL, Yaacov: Volatile anesthetic preconditioning attenuates myocardial apoptosis in rabbits after regional ischemia and reperfusion via Akt signaling and modulation of Bcl-2 family proteins. In: *J Pharmacol Exp Ther* 318 (2006), Jul, Nr. 1, S. 186–194
- [13] RIESS, Matthias L. ; CAMARA, Amadou K S. ; NOVALIJA, Enis ; CHEN, Qun ; RHODES, Samhita S. ; STOWE, David F.: Anesthetic preconditioning attenuates mitochondrial Ca²⁺ overload during ischemia in Guinea pig intact hearts: reversal by 5-hydroxydecanoic acid. In: *Anesth Analg* 95 (2002), Dec, Nr. 6, S. 1540–6, table of contents
- [14] ARGAUD, Laurent ; GATEAU-ROESCH, Odile ; RAISKY, Olivier ; LOUFOUAT, Joseph ; ROBERT, Dominique ; OVIZE, Michel: Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. In: *Circulation* 111 (2005), Jan, Nr. 2, S. 194–197
- [15] KIN, Hajime ; ZATTA, Amanda J. ; LOFYE, Mark T. ; AMERSON, Bradley S. ; HALKOS, Michael E. ; KERENDI, Faraz ; ZHAO, Zhi-Qing ; GUYTON, Robert A. ; HEADRICK, John P. ; VINTEN-JOHANSEN, Jakob: Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine. In: *Cardiovasc Res* 67 (2005), Jul, Nr. 1, S. 124–133

- [16] STAAT, Patrick ; RIOUFOL, Gilles ; PIOT, Christophe ; COTTIN, Yves ; CUNG, Thien T. ; L'HUILLIER, Isabelle ; AUPETIT, Jean-François ; BONNEFOY, Eric ; FINET, Gérard ; ANDRÉ-FOUËT, Xavier ; OVIZE, Michel: Postconditioning the human heart. In: *Circulation* 112 (2005), Oct, Nr. 14, S. 2143–2148
- [17] LASKEY, Warren K.: Brief repetitive balloon occlusions enhance reperfusion during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a pilot study. In: *Catheter Cardiovasc Interv* 65 (2005), Jul, Nr. 3, S. 361–367
- [18] YANG, Xin-Chun ; LIU, Yu ; WANG, Le-Feng ; CUI, Liang ; WANG, Tie ; GE, Yong-Gui ; WANG, Hong-Shi ; LI, Wei-Ming ; XU, Li ; NI, Zhu-Hua ; LIU, Sheng-Hui ; ZHANG, Lin ; JIA, Hui-Min ; VINTEN-JOHANSEN, Jakob ; ZHAO, Zhi-Qing: Reduction in myocardial infarct size by postconditioning in patients after percutaneous coronary intervention. In: *J Invasive Cardiol* 19 (2007), Oct, Nr. 10, S. 424–430
- [19] SCHLACK, W. ; PRECKEL, B. ; STUNNECK, D. ; THÄMER, V.: Effects of halothane, enflurane, isoflurane, sevoflurane and desflurane on myocardial reperfusion injury in the isolated rat heart. In: *Br J Anaesth* 81 (1998), Dec, Nr. 6, S. 913–919
- [20] LIU, G. S. ; THORNTON, J. ; WINKLE, D. M. V. ; STANLEY, A. W. ; OLSSON, R. A. ; DOWNEY, J. M.: Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. In: *Circulation* 84 (1991), Jul, Nr. 1, S. 350–356
- [21] 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. In: *Circ Res* 78 (1996), Jun, Nr. 6, S. 1100–1104
- [22] BOLLI, R.: The late phase of preconditioning. In: *Circ Res* 87 (2000), Nov, Nr. 11, S. 972–983
- [23] MURRY, C. E. ; JENNINGS, R. B. ; REIMER, K. A.: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. In: *Circulation* 74 (1986), Nov, Nr. 5, S. 1124–1136
- [24] KLONER, R. A. ; JENNINGS, R. B.: Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. In: *Circulation* 104 (2001), Dec, Nr. 24, S. 2981–2989

- [25] KLONER, R. A. ; SHOOK, T. ; PRZYKLENK, K. ; DAVIS, V. G. ; JUNIO, L. ; MATTHEWS, R. V. ; BURSTEIN, S. ; GIBSON, M. ; POOLE, W. K. ; CANNON, C. P.: Previous angina alters in-hospital outcome in TIMI 4. A clinical correlate to preconditioning? In: *Circulation* 91 (1995), Jan, Nr. 1, S. 37–45
- [26] SHOOK, T. L. ; SUN, G. W. ; BURSTEIN, S. ; EISENHAUER, A. C. ; MATTHEWS, R. V.: Comparison of percutaneous transluminal coronary angioplasty outcome and hospital costs for low-volume and high-volume operators. In: *Am J Cardiol* 77 (1996), Feb, Nr. 5, S. 331–336
- [27] YELLON, D. M. ; ALKHULAIFI, A. M. ; PUGSLEY, W. B.: Preconditioning the human myocardium. In: *Lancet* 342 (1993), Jul, Nr. 8866, S. 276–277
- [28] HAUSENLOY, Derek J. ; YELLON, Derek M.: The second window of preconditioning (SWOP) where are we now? In: *Cardiovasc Drugs Ther* 24 (2010), Jun, Nr. 3, S. 235–254
- [29] MARBER, M. S. ; YELLON, D. M.: Myocardial adaptation, stress proteins, and the second window of protection. In: *Ann N Y Acad Sci* 793 (1996), Sep, S. 123–141
- [30] 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. In: *Basic Res Cardiol* 92 (1997), Jun, Nr. 3, S. 159–167
- [31] ECKLE, Tobias ; KRAHN, Thomas ; GRENZ, Almut ; KÖHLER, David ; MITTELBRONN, Michel ; LEDENT, Catherine ; JACOBSON, Marlene A. ; OSSWALD, Hartmut ; THOMPSON, Linda F. ; UNERTL, Klaus ; ELTZSCHIG, Holger K.: Cardioprotection by ecto-5'-nucleotidase (CD73) and A2B adenosine receptors. In: *Circulation* 115 (2007), Mar, Nr. 12, S. 1581–1590
- [32] YELLON, Derek M. ; DOWNEY, James M.: Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. In: *Physiol Rev* 83 (2003), Oct, Nr. 4, S. 1113–1151
- [33] SCHLACK, W. ; PRECKEL, B. ; BARTHEL, H. ; OBAL, D. ; THÄMER, V.: Halothane reduces reperfusion injury after regional ischaemia in the rabbit heart in vivo. In: *Br J Anaesth* 79 (1997), Jul, Nr. 1, S. 88–96

- [34] LOCHNER, A. ; HARPER, I. S. ; SALIE, R. ; GENADE, S. ; COETZEE, A. R.: Halothane protects the isolated rat myocardium against excessive total intracellular calcium and structural damage during ischemia and reperfusion. In: *Anesth Analg* 79 (1994), Aug, Nr. 2, S. 226–233
- [35] WARLTIER, D. C. ; 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. In: *Anesthesiology* 69 (1988), Oct, Nr. 4, S. 552–565
- [36] COPE, D. K. ; IMPASTATO, W. K. ; COHEN, M. V. ; DOWNEY, J. M.: Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction. In: *Anesthesiology* 86 (1997), Mar, Nr. 3, S. 699–709
- [37] SMUL, Thorsten M. ; REDEL, Andreas ; STUMPNER, Jan ; LANGE, Markus ; LOTZ, Christopher ; ROEWER, Norbert ; KEHL, Franz: Time course of desflurane-induced preconditioning in rabbits. In: *J Cardiothorac Vasc Anesth* 24 (2010), Feb, Nr. 1, S. 91–98
- [38] TANAKA, Katsuya ; LUDWIG, Lynda M. ; KROLIKOWSKI, John G. ; ALCINDOR, Dunbar ; PRATT, Phillip F. ; KERSTEN, Judy R. ; PAGEL, Paul S. ; WARLTIER, David C.: Isoflurane produces delayed preconditioning against myocardial ischemia and reperfusion injury: role of cyclooxygenase-2. In: *Anesthesiology* 100 (2004), Mar, Nr. 3, S. 525–531
- [39] LANGE, Markus ; REDEL, Andreas ; SMUL, Thorsten M. ; LOTZ, Christopher ; NEFZGER, Tobias ; STUMPNER, Jan ; BLOMEYER, Christoph ; GAO, Feng ; ROEWER, Norbert ; KEHL, Franz: Desflurane-induced preconditioning has a threshold that is lowered by repetitive application and is mediated by beta 2-adrenergic receptors. In: *J Cardiothorac Vasc Anesth* 23 (2009), Oct, Nr. 5, S. 607–613
- [40] PIRIOU, V. ; CHIARI, P. ; LHUILLIER, F. ; BASTIEN, O. ; LOUFOUA, J. ; RAISKY, O. ; DAVID, J. S. ; OVIZE, M. ; LEHOT, J. J.: Pharmacological preconditioning: comparison of desflurane, sevoflurane, isoflurane and halothane in rabbit myocardium. In: *Br J Anaesth* 89 (2002), Sep, Nr. 3, S. 486–491
- [41] KERSTEN, J. R. ; ORTH, K. G. ; PAGEL, P. S. ; MEI, D. A. ; GROSS, G. J. ; WARLTIER, D. C.: Role of adenosine in isoflurane-induced cardioprotection. In: *Anesthesiology* 86 (1997), May, Nr. 5, S. 1128–1139

- [42] OKUBO, Shinji ; TANABE, Yujirou ; TAKEDA, Kenji ; KITAYAMA, Michihiko ; KANEMITSU, Seiyu ; KUKREJA, Rakesh C. ; TAKEKOSHI, Noboru: Ischemic preconditioning and morphine attenuate myocardial apoptosis and infarction after ischemia-reperfusion in rabbits: role of delta-opioid receptor. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287 (2004), Oct, Nr. 4, S. H1786–H1791
- [43] RORABAUGH, Boyd R. ; ROSS, Sean A. ; GAIVIN, Robert J. ; PAPAY, Robert S. ; MCCUNE, Dan F. ; SIMPSON, Paul C. ; PEREZ, Dianne M.: alpha1A-but not alpha1B-adrenergic receptors precondition the ischemic heart by a staurosporine-sensitive, chelerythrine-insensitive mechanism. In: *Cardiovasc Res* 65 (2005), Feb, Nr. 2, S. 436–445
- [44] LANGE, Markus ; SMUL, Thorsten M. ; BLOMEYER, Christoph A. ; REDEL, Andreas ; KLOTZ, Karl-Norbert ; ROEWER, Norbert ; KEHL, Franz: Role of the beta1-adrenergic pathway in anesthetic and ischemic preconditioning against myocardial infarction in the rabbit heart in vivo. In: *Anesthesiology* 105 (2006), Sep, Nr. 3, S. 503–510
- [45] LUDWIG, Lynda M. ; WEIHRAUCH, Dorothee ; KERSTEN, Judy R. ; PAGEL, Paul S. ; WARLTIER, David 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. In: *Anesthesiology* 100 (2004), Mar, Nr. 3, S. 532–539
- [46] TOLLER, W. G. ; GROSS, E. R. ; KERSTEN, J. R. ; PAGEL, P. S. ; GROSS, G. J. ; WARLTIER, D. C.: Sarcolemmal and mitochondrial adenosine triphosphate-dependent potassium channels: mechanism of desflurane-induced cardioprotection. In: *Anesthesiology* 92 (2000), Jun, Nr. 6, S. 1731–1739
- [47] 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. In: *Anesthesiology* 87 (1997), Aug, Nr. 2, S. 361–370
- [48] ZAUGG, M. ; LUCCHINETTI, E. ; UECKER, M. ; PASCH, T. ; SCHAUB, M. C.: Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part I. Signalling and cytoprotective mechanisms. In: *Br J Anaesth* 91 (2003), Oct, Nr. 4, S. 551–565

- [49] ZAUGG, Michael ; LUCCHINETTI, Eliana ; SPAHN, Donat R. ; PASCH, Thomas ; SCHAUB, Marcus C.: Volatile anesthetics mimic cardiac preconditioning by priming the activation of mitochondrial K(ATP) channels via multiple signaling pathways. In: *Anesthesiology* 97 (2002), Jul, Nr. 1, S. 4–14
- [50] BUCHINGER, H. ; GRUNDMANN, U. ; ZIEGELER, S.: [Myocardial preconditioning with volatile anesthetics. General anesthesia as protective intervention?]. In: *Anaesthetist* 54 (2005), Sep, Nr. 9, S. 861–870
- [51] TOMA, Octavian ; WEBER, Nina C. ; WOLTER, Jessica I. ; OBAL, Detlef ; PRECKEL, Benedikt ; SCHLACK, Wolfgang: Desflurane preconditioning induces time-dependent activation of protein kinase C epsilon and extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 in the rat heart in vivo. In: *Anesthesiology* 101 (2004), Dec, Nr. 6, S. 1372–1380
- [52] OBAL, D. ; WEBER, N. C. ; ZACHAROWSKI, K. ; TOMA, O. ; DETTWILER, S. ; WOLTER, J. I. ; KRATZ, M. ; MÜLLENHEIM, J. ; PRECKEL, B. ; SCHLACK, W.: Role of protein kinase C-epsilon (PKCepsilon) in isoflurane-induced cardioprotection. In: *Br J Anaesth* 94 (2005), Feb, Nr. 2, S. 166–173
- [53] TANAKA, Katsuya ; WEIHRAUCH, Dorothee ; KEHL, Franz ; LUDWIG, Lynda M. ; LADISA, John F. ; KERSTEN, Judy R. ; PAGEL, Paul S. ; WARLTIER, David C.: Mechanism of preconditioning by isoflurane in rabbits: a direct role for reactive oxygen species. In: *Anesthesiology* 97 (2002), Dec, Nr. 6, S. 1485–1490
- [54] THANDROYEN, F. T. ; MUNTZ, K. H. ; BUJA, L. M. ; WILLERSON, J. T.: Alterations in beta-adrenergic receptors, adenylate cyclase, and cyclic AMP concentrations during acute myocardial ischemia and reperfusion. In: *Circulation* 82 (1990), Sep, Nr. 3 Suppl, S. II30–II37
- [55] ALCINDOR, Dunbar ; KROLIKOWSKI, John G. ; PAGEL, Paul S. ; WARLTIER, David C. ; KERSTEN, Judy R.: Cyclooxygenase-2 mediates ischemic, anesthetic, and pharmacologic preconditioning in vivo. In: *Anesthesiology* 100 (2004), Mar, Nr. 3, S. 547–554
- [56] AN, J. ; VARADARAJAN, S. G. ; NOVALIJA, E. ; STOWE, D. F.: Ischemic and anesthetic preconditioning reduces cytosolic [Ca²⁺] and improves Ca(2+) responses in intact hearts. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281 (2001), Oct, Nr. 4, S. H1508–H1523

- [57] KOWALTOWSKI, A. J. ; SEETHARAMAN, S. ; PAUCEK, P. ; GARLID, K. D.: Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K(+) channel of heart mitochondria. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280 (2001), Feb, Nr. 2, S. H649–H657
- [58] O'ROURKE, Brian: Evidence for mitochondrial K⁺ channels and their role in cardioprotection. In: *Circ Res* 94 (2004), Mar, Nr. 4, S. 420–432
- [59] PIRIOU, Vincent ; CHIARI, Pascal ; GATEAU-ROESCH, Odile ; ARGAUD, Laurent ; MUNTEAN, Danina ; SALLES, Delphine ; LOUFOUAT, Joseph ; GUEUGNIAUD, Pierre-Yves ; LEHOT, Jean-Jacques ; OVIZE, Michel: Desflurane-induced preconditioning alters calcium-induced mitochondrial permeability transition. In: *Anesthesiology* 100 (2004), Mar, Nr. 3, S. 581–588
- [60] HERT, Stefan G D. ; CROMHEECKE, Stefanie ; BROECKE, Pieter W. ; MERTENS, Els ; BLIER, Ivo G D. ; STOCKMAN, Bernard A. ; RODRIGUS, Inez E. ; LINDEN, Philippe J V.: Effects of propofol, desflurane, and sevoflurane on recovery of myocardial function after coronary surgery in elderly high-risk patients. In: *Anesthesiology* 99 (2003), Aug, Nr. 2, S. 314–323
- [61] GARCIA, C. ; JULIER, K. ; BESTMANN, L. ; ZOLLINGER, A. ; SEGESSER, L. K. ; PASCH, T. ; SPAHN, D. R. ; ZAUGG, M.: Preconditioning with sevoflurane decreases PECAM-1 expression and improves one-year cardiovascular outcome in coronary artery bypass graft surgery. In: *Br J Anaesth* 94 (2005), Feb, Nr. 2, S. 159–165
- [62] HERT, Stefan G D. ; LINDEN, Philippe J V. ; CROMHEECKE, Stefanie ; MEEUS, Roel ; NELIS, Anne ; REETH, Veronique V. ; BROECKE, Pieter W. ; BLIER, Ivo G D. ; STOCKMAN, Bernard A. ; RODRIGUS, Inez E.: Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration. In: *Anesthesiology* 101 (2004), Aug, Nr. 2, S. 299–310
- [63] ZHAO, Zhi-Qing ; CORVERA, Joel S. ; HALKOS, Michael E. ; KERENDI, Faraz ; WANG, Ning-Ping ; GUYTON, Robert A. ; VINTEN-JOHANSEN, Jakob: Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285 (2003), Aug, Nr. 2, S. H579–H588

- [64] BUDDE, Jason M. ; MORRIS, Cullen D. ; VELEZ, Daniel A. ; MURAKI, Satoshi ; WANG, Ning-Ping ; GUYTON, Robert A. ; ZHAO, Zhi-Qing: Reduction of infarct size and preservation of endothelial function by multidose intravenous adenosine during extended reperfusion. In: *J Surg Res* 116 (2004), Jan, Nr. 1, S. 104–115
- [65] HAUSENLOY, Derek J. ; ONG, Sang-Bing ; YELLON, Derek M.: The mitochondrial permeability transition pore as a target for preconditioning and postconditioning. In: *Basic Res Cardiol* 104 (2009), Mar, Nr. 2, S. 189–202
- [66] COSTA, Alexandre D T. ; GARLID, Keith D.: Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKCepsilon, ROS, and MPT. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295 (2008), Aug, Nr. 2, S. H874–H882
- [67] HAUSENLOY, Derek J. ; DUCHEN, Michael R. ; YELLON, Derek M.: Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury. In: *Cardiovasc Res* 60 (2003), Dec, Nr. 3, S. 617–625
- [68] HAUSENLOY, Derek J. ; YELLON, Derek M.: The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. In: *J Mol Cell Cardiol* 35 (2003), Apr, Nr. 4, S. 339–341
- [69] TSANG, Andrew ; HAUSENLOY, Derek J. ; MOCANU, Mihaela M. ; YELLON, Derek M.: Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. In: *Circ Res* 95 (2004), Aug, Nr. 3, S. 230–232
- [70] HAUSENLOY, Derek J. ; YELLON, Derek M.: Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. In: *Cardiovasc Res* 70 (2006), May, Nr. 2, S. 240–253
- [71] KIN, Hajime ; ZHAO, Zhi-Qing ; SUN, He-Ying ; WANG, Ning-Ping ; CORVERA, Joel S. ; HALKOS, Michael E. ; KERENDI, Faraz ; GUYTON, Robert A. ; VINTEN-JOHANSEN, Jakob: Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. In: *Cardiovasc Res* 62 (2004), Apr, Nr. 1, S. 74–85

- [72] VINTEN-JOHANSEN, J. ; ZHAO, Z-Q. ; ZATTA, A. J. ; KIN, H. ; HALKOS, M. E. ; KERENDI, F.: Postconditioning—A new link in nature’s armor against myocardial ischemia-reperfusion injury. In: *Basic Res Cardiol* 100 (2005), Jul, Nr. 4, S. 295–310
- [73] OBAL, Detlef ; SCHARBATKE, Horst ; BARTHEL, Holger ; PRECKEL, Benedikt ; MÜLLENHEIM, Jost ; SCHLACK, Wolfgang: Cardioprotection against reperfusion injury is maximal with only two minutes of sevoflurane administration in rats. In: *Can J Anaesth* 50 (2003), Nov, Nr. 9, S. 940–945
- [74] CHIARI, Pascal C. ; BIENENGRABER, Martin W. ; PAGEL, Paul S. ; KROLIKOWSKI, John G. ; KERSTEN, Judy R. ; WARLTIER, David C.: Isoflurane protects against myocardial infarction during early reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction: evidence for anesthetic-induced postconditioning in rabbits. In: *Anesthesiology* 102 (2005), Jan, Nr. 1, S. 102–109
- [75] FENG, Jianhua ; LUCCHINETTI, Eliana ; AHUJA, Preeti ; PASCH, Thomas ; PERRIARD, Jean-Claude ; ZAUGG, Michael: Isoflurane postconditioning prevents opening of the mitochondrial permeability transition pore through inhibition of glycogen synthase kinase 3beta. In: *Anesthesiology* 103 (2005), Nov, Nr. 5, S. 987–995
- [76] FENG, Jianhua ; FISCHER, Gregor ; LUCCHINETTI, Eliana ; ZHU, Min ; BESTMANN, Lukas ; JEGGER, David ; ARRAS, Margarete ; PASCH, Thomas ; PERRIARD, Jean-Claude ; SCHAUB, Marcus C. ; ZAUGG, Michael: Infarct-remodeled myocardium is receptive to protection by isoflurane postconditioning: role of protein kinase B/Akt signaling. In: *Anesthesiology* 104 (2006), May, Nr. 5, S. 1004–1014
- [77] KROLIKOWSKI, John G. ; BIENENGRABER, Martin ; WEIHRAUCH, Dorothee ; WARLTIER, David C. ; KERSTEN, Judy R. ; PAGEL, Paul S.: Inhibition of mitochondrial permeability transition enhances isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion: the role of mitochondrial KATP channels. In: *Anesth Analg* 101 (2005), Dec, Nr. 6, S. 1590–1596
- [78] FANG, Neng-Xin ; YAO, Yun-Tai ; SHI, Chun-Xia ; LI, Li-Huan: Attenuation of ischemia-reperfusion injury by sevoflurane postconditioning involves

- protein kinase B and glycogen synthase kinase 3 β activation in isolated rat hearts. In: *Mol Biol Rep* 37 (2010), Dec, Nr. 8, S. 3763–3769
- [79] SMUL, Thorsten M. ; LANGE, Markus ; REDEL, Andreas ; STUMPNER, Jan ; LOTZ, Christopher A. ; ROEWER, Norbert ; KEHL, Franz: Desflurane-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury depends on timing. In: *J Cardiothorac Vasc Anesth* 23 (2009), Oct, Nr. 5, S. 600–606
- [80] R. B. JENNINGS, R. B. ; SOMMERS, H. M. ; SMYTH, G. A. ; FLACK, H. A. ; LINN, H.: Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. In: *Arch Pathol* 70 (1960), Jul, S. 68–78
- [81] MANNING, A. S. ; HEARSE, D. J.: Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention. In: *J Mol Cell Cardiol* 16 (1984), Jun, Nr. 6, S. 497–518
- [82] BOLLI, R. ; MARBÁN, E.: Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. In: *Physiol Rev* 79 (1999), Apr, Nr. 2, S. 609–634
- [83] ITO, Hiroshi: No-reflow phenomenon and prognosis in patients with acute myocardial infarction. In: *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3 (2006), Sep, Nr. 9, S. 499–506
- [84] MEHTA, Rajendra H. ; STARR, Aijing Z. ; LOPES, Renato D. ; HOCHMAN, Judith S. ; WIDIMSKY, Petr ; PIEPER, Karen S. ; ARMSTRONG, Paul W. ; GRANGER, Christopher B. ; INVESTIGATORS, A. P. E. X. A.: Incidence of and outcomes associated with ventricular tachycardia or fibrillation in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention. In: *JAMA* 301 (2009), May, Nr. 17, S. 1779–1789
- [85] RAMOS, Mark ; DEPASQUALE, Eugene ; COPLAN, Neil L.: Assessment of myocardial viability: review of the clinical significance. In: *Rev Cardiovasc Med* 9 (2008), Nr. 4, S. 225–231
- [86] PIPER, H. M. ; GARCÍA-DORADO, D. ; OVIZE, M.: A fresh look at reperfusion injury. In: *Cardiovasc Res* 38 (1998), May, Nr. 2, S. 291–300
- [87] YELLON, Derek M. ; HAUSENLOY, Derek J.: Myocardial reperfusion injury. In: *N Engl J Med* 357 (2007), Sep, Nr. 11, S. 1121–1135

- [88] ZHAO, Zhi-Qing ; VINTEN-JOHANSEN, Jakob: Postconditioning: reduction of reperfusion-induced injury. In: *Cardiovasc Res* 70 (2006), May, Nr. 2, S. 200–211
- [89] COHEN, Michael V. ; YANG, Xi-Ming ; DOWNEY, James M.: The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis. In: *Circulation* 115 (2007), Apr, Nr. 14, S. 1895–1903
- [90] HAUSENLOY, Derek J. ; YELLON, Derek M.: New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. In: *Cardiovasc Res* 61 (2004), Feb, Nr. 3, S. 448–460
- [91] NAZARETH, W. ; YAFEI, N. ; CROMPTON, M.: Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin A. In: *J Mol Cell Cardiol* 23 (1991), Dec, Nr. 12, S. 1351–1354
- [92] PIOT, Christophe ; CROISILLE, Pierre ; STAAT, Patrick ; THIBAUT, Hélène ; RIOUFOL, Gilles ; MEWTON, Nathan ; ELBELGHITI, Rachid ; CUNG, Thien T. ; BONNEFOY, Eric ; ANGOULVANT, Denis ; MACIA, Christophe ; RACZKA, Franck ; SPORTOUCH, Catherine ; GAHIDE, Gerald ; FINET, Gérard ; ANDRÉ-FOUËT, Xavier ; REVEL, Didier ; KIRKORIAN, Gilbert ; MONASSIER, Jean-Pierre ; DERUMEAUX, Geneviève ; OVIZE, Michel: Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. In: *N Engl J Med* 359 (2008), Jul, Nr. 5, S. 473–481
- [93] YANG, Xi-Ming ; KRIEG, Thomas ; CUI, Lin ; DOWNEY, James M. ; COHEN, Michael V.: NECA and bradykinin at reperfusion reduce infarction in rabbit hearts by signaling through PI3K, ERK, and NO. In: *J Mol Cell Cardiol* 36 (2004), Mar, Nr. 3, S. 411–421
- [94] GROSS, Eric R. ; HSU, Anna K. ; GROSS, Garrett J.: Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase beta inhibition during reperfusion in intact rat hearts. In: *Circ Res* 94 (2004), Apr, Nr. 7, S. 960–966
- [95] GAO, Feng ; GAO, Erhe ; YUE, Tian-Li ; OHLSTEIN, Eliot H. ; LOPEZ, Bernard L. ; CHRISTOPHER, Theodore A. ; MA, Xin-Liang: Nitric oxide mediates

- the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. In: *Circulation* 105 (2002), Mar, Nr. 12, S. 1497–1502
- [96] HANLON, Paul R. ; FU, Ping ; WRIGHT, Gary L. ; STEENBERGEN, Charles ; ARCASOY, Murat O. ; MURPHY, Elizabeth: Mechanisms of erythropoietin-mediated cardioprotection during ischemia-reperfusion injury: role of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. In: *FASEB J* 19 (2005), Aug, Nr. 10, S. 1323–1325
- [97] BRODDE, O. E.: Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. In: *Pharmacol Rev* 43 (1991), Jun, Nr. 2, S. 203–242
- [98] BRODDE, Otto-Erich ; BRUCK, Heike ; LEINEWEBER, Kirsten: Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance. In: *J Pharmacol Sci* 100 (2006), Nr. 5, S. 323–337
- [99] LAMERIS, T. W. ; ZEEUW, S. de ; ALBERTS, G. ; BOOMSMA, F. ; DUNCKER, D. J. ; VERDOUW, P. D. ; VELD, A. J. ; DEN MEIRACKER, A. H.: Time course and mechanism of myocardial catecholamine release during transient ischemia in vivo. In: *Circulation* 101 (2000), Jun, Nr. 22, S. 2645–2650
- [100] LOCHNER, A. ; GENADE, S. ; TROMP, E. ; PODZUWEIT, T. ; MOOLMAN, J. A.: Ischemic preconditioning and the beta-adrenergic signal transduction pathway. In: *Circulation* 100 (1999), Aug, Nr. 9, S. 958–966
- [101] SPEAR, Joseph F. ; PRABU, Subbuswamy K. ; GALATI, Domenico ; RAZA, Haider ; ANANDATHEERTHAVARADA, Hindupur K. ; AVADHANI, Narayan G.: beta1-Adrenoreceptor activation contributes to ischemia-reperfusion damage as well as playing a role in ischemic preconditioning. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292 (2007), May, Nr. 5, S. H2459–H2466
- [102] XIAO, Rui-Ping ; ZHU, Weizhong ; ZHENG, Ming ; CAO, Chunmei ; ZHANG, Youyi ; LAKATTA, Edward G. ; HAN, Qide: Subtype-specific alpha1- and beta-adrenoceptor signaling in the heart. In: *Trends Pharmacol Sci* 27 (2006), Jun, Nr. 6, S. 330–337
- [103] XIAO, Rui-Ping ; ZHU, Weizhong ; ZHENG, Ming ; CHAKIR, Khalid ; BOND, Richard ; LAKATTA, Edward G. ; CHENG, Heping: Subtype-specific beta-

- adrenoceptor signaling pathways in the heart and their potential clinical implications. In: *Trends Pharmacol Sci* 25 (2004), Jul, Nr. 7, S. 358–365
- [104] WANG, Wang ; ZHU, Weizhong ; WANG, Shiqiang ; YANG, Dongmei ; CROW, Michael T. ; XIAO, Rui-Ping ; CHENG, Heping: Sustained beta1-adrenergic stimulation modulates cardiac contractility by Ca²⁺/calmodulin kinase signaling pathway. In: *Circ Res* 95 (2004), Oct, Nr. 8, S. 798–806
- [105] ZHU, Wei-Zhong ; WANG, Shi-Qiang ; CHAKIR, Khalid ; YANG, Dongmei ; ZHANG, Tong ; BROWN, Joan H. ; DEVIC, Eric ; KOBILKA, Brian K. ; CHENG, Heping ; XIAO, Rui-Ping: Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca²⁺/calmodulin kinase II. In: *J Clin Invest* 111 (2003), Mar, Nr. 5, S. 617–625
- [106] COMMUNAL, C. ; COLUCCI, W. S.: The control of cardiomyocyte apoptosis via the beta-adrenergic signaling pathways. In: *Arch Mal Coeur Vaiss* 98 (2005), Mar, Nr. 3, S. 236–241
- [107] ZAUGG, M. ; XU, W. ; LUCCHINETTI, E. ; SHAFIQ, S. A. ; JAMALI, N. Z. ; SIDDIQUI, M. A.: Beta-adrenergic receptor subtypes differentially affect apoptosis in adult rat ventricular myocytes. In: *Circulation* 102 (2000), Jul, Nr. 3, S. 344–350
- [108] PRABU, Subbuswamy K. ; ANANDATHEERTHAVARADA, Hindupur K. ; RAZA, Haider ; SRINIVASAN, Satish ; SPEAR, Joseph F. ; AVADHANI, Narayan G.: Protein kinase A-mediated phosphorylation modulates cytochrome c oxidase function and augments hypoxia and myocardial ischemia-related injury. In: *J Biol Chem* 281 (2006), Jan, Nr. 4, S. 2061–2070
- [109] FRANCES, Carole ; NAZEYROLLAS, Pierre ; PREVOST, Alain ; MOREAU, Françoise ; PISANI, Jean ; DAVANI, Siamak ; KANTELIP, Jean-Pierre ; MILLART, Hervé: Role of beta 1- and beta 2-adrenoceptor subtypes in preconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion. In: *J Cardiovasc Pharmacol* 41 (2003), Mar, Nr. 3, S. 396–405
- [110] AN, Jianzhong ; RHODES, Samhita S. ; JIANG, Ming T. ; BOSNJAK, Zeljko J. ; TIAN, Ming ; STOWE, David F.: Anesthetic preconditioning enhances Ca²⁺ handling and mechanical and metabolic function elicited by Na⁺-Ca²⁺

- exchange inhibition in isolated hearts. In: *Anesthesiology* 105 (2006), Sep, Nr. 3, S. 541–549
- [111] DEYHIMY, David I. ; FLEMING, Neal W. ; BRODKIN, Ian G. ; LIU, Hong: Anesthetic preconditioning combined with postconditioning offers no additional benefit over preconditioning or postconditioning alone. In: *Anesth Analg* 105 (2007), Aug, Nr. 2, S. 316–324
- [112] STEENBERGEN, C. ; FRALIX, T. A. ; MURPHY, E.: Role of increased cytosolic free calcium concentration in myocardial ischemic injury. In: *Basic Res Cardiol* 88 (1993), Nr. 5, S. 456–470
- [113] PIERCE, G. N. ; CZUBRYT, M. P.: The contribution of ionic imbalance to ischemia/reperfusion-induced injury. In: *J Mol Cell Cardiol* 27 (1995), Jan, Nr. 1, S. 53–63
- [114] HOCH, B. ; MEYER, R. ; HETZER, R. ; KRAUSE, E. G. ; KARCZEWSKI, P.: Identification and expression of delta-isoforms of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. In: *Circ Res* 84 (1999), Apr, Nr. 6, S. 713–721
- [115] MAIER, Lars S. ; BERS, Donald M.: Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. In: *Cardiovasc Res* 73 (2007), Mar, Nr. 4, S. 631–640
- [116] MATTIAZZI, Alicia ; VITTONI, Leticia ; MUNDIÑA-WEILENMANN, Cecilia: Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase: a key component in the contractile recovery from acidosis. In: *Cardiovasc Res* 73 (2007), Mar, Nr. 4, S. 648–656
- [117] NOMURA, Noriyuki ; SATOH, Hiroshi ; TERADA, Hajime ; MATSUNAGA, Masaki ; WATANABE, Hiroshi ; HAYASHI, Hideharu: CaMKII-dependent reactivation of SR Ca(2+) uptake and contractile recovery during intracellular acidosis. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283 (2002), Jul, Nr. 1, S. H193–H203
- [118] BENTER, Ibrahim F. ; JUGGI, Jasbir S. ; KHAN, Islam ; YOUSIF, Mariam H M. ; CANATAN, Halit ; AKHTAR, Saghir: Signal transduction mechanisms involved in cardiac preconditioning: role of Ras-GTPase, Ca²⁺/calmodulin-

- dependent protein kinase II and epidermal growth factor receptor. In: *Mol Cell Biochem* 268 (2005), Jan, Nr. 1-2, S. 175–183
- [119] LANGE, Markus ; SMUL, Thorsten M. ; REDEL, Andreas ; LOTZ, Christopher ; JAZBUTYTE, Virginija ; SCHNUPP, Verena ; ROEWER, Norbert ; KEHL, Franz: Differential role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in desflurane-induced preconditioning and cardioprotection by metoprolol: metoprolol blocks desflurane-induced preconditioning. In: *Anesthesiology* 109 (2008), Jul, Nr. 1, S. 72–80
- [120] ZHENG, Ming ; ZHU, Weizhong ; HAN, Qide ; XIAO, Rui-Ping: Emerging concepts and therapeutic implications of beta-adrenergic receptor subtype signaling. In: *Pharmacol Ther* 108 (2005), Dec, Nr. 3, S. 257–268
- [121] YANG, Yingbo ; ZHU, Wei-Zhong ; JOINER, Mei ling ; ZHANG, Rong ; ODDIS, Carmine V. ; HOU, Yue ; YANG, Jinying ; PRICE, Edward E. ; GLEAVES, Linda ; EREN, Mesut ; NI, Gemin ; VAUGHAN, Douglas E. ; XIAO, Rui-Ping ; ANDERSON, Mark E.: Calmodulin kinase II inhibition protects against myocardial cell apoptosis in vivo. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291 (2006), Dec, Nr. 6, S. H3065–H3075
- [122] ZHANG, Rong ; KHOO, Michelle S C. ; WU, Yuejin ; YANG, Yingbo ; GRUETER, Chad E. ; NI, Gemin ; PRICE, Edward E. ; THIEL, William ; GUATIMOSIM, Silvia ; SONG, Long-Sheng ; MADU, Ernest C. ; SHAH, Anisha N. ; VISHNIVETSKAYA, Tatiana A. ; ATKINSON, James B. ; GUREVICH, Vsevolod V. ; SALAMA, Guy ; LEDERER, W. J. ; COLBRAN, Roger J. ; ANDERSON, Mark E.: Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. In: *Nat Med* 11 (2005), Apr, Nr. 4, S. 409–417
- [123] BAYNE, K.: Revised Guide for the Care and Use of Laboratory Animals available. American Physiological Society. In: *Physiologist* 39 (1996), Aug, Nr. 4, S. 199, 208–199, 211
- [124] BORKOWSKI, G. L. ; DANNEMAN, P. J. ; RUSSELL, G. B. ; LANG, C. M.: An evaluation of three intravenous anesthetic regimens in New Zealand rabbits. In: *Lab Anim Sci* 40 (1990), May, Nr. 3, S. 270–276
- [125] DOORLEY, B. M. ; WATERS, S. J. ; TERRELL, R. C. ; ROBINSON, J. L.: MAC of I-653 in beagle dogs and New Zealand white rabbits. In: *Anesthesiology* 69 (1988), Jul, Nr. 1, S. 89–91

- [126] IRIKI, M. ; RIEDEL, W. ; SIMON, E.: Regional differentiation of sympathetic activity during hypothalamic heating and cooling in anesthetized rabbits. In: *Pflugers Arch* 328 (1971), Nr. 4, S. 320–331
- [127] WARLTIER, D. C. ; ZYVOLOSKI, M. G. ; GROSS, G. J. ; HARDMAN, H. F. ; BROOKS, H. L.: Determination of experimental myocardial infarct size. In: *J Pharmacol Methods* 6 (1981), Nov, Nr. 3, S. 199–210
- [128] YTREHUS, K. ; LIU, Y. ; TSUCHIDA, A. ; MIURA, T. ; LIU, G. S. ; YANG, X. M. ; HERBERT, D. ; COHEN, M. V. ; DOWNEY, J. M.: Rat and rabbit heart infarction: effects of anesthesia, perfusate, risk zone, and method of infarct sizing. In: *Am J Physiol* 267 (1994), Dec, Nr. 6 Pt 2, S. H2383–H2390
- [129] 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. In: *Circulation* 88 (1993), Sep, Nr. 3, S. 1264–1272
- [130] YANG, Xi-Ming ; PROCTOR, J. B. ; CUI, Lin ; KRIEG, Thomas ; DOWNEY, James M. ; COHEN, Michael V.: Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. In: *J Am Coll Cardiol* 44 (2004), Sep, Nr. 5, S. 1103–1110
- [131] YAMASHITA, N. ; HOSHIDA, S. ; TANIGUCHI, N. ; KUZUYA, T. ; HORI, M.: A second window of protection occurs 24 h after ischemic preconditioning in the rat heart. In: *J Mol Cell Cardiol* 30 (1998), Jun, Nr. 6, S. 1181–1189
- [132] YIN, Zhong ; GAO, Haokao ; WANG, Haichang ; LI, Lansun ; DI, Chunxia ; LUAN, Ronghua ; TAO, Ling: Ischaemic post-conditioning protects both adult and aged Sprague-Dawley rat heart from ischaemia-reperfusion injury through the phosphatidylinositol 3-kinase-AKT and glycogen synthase kinase-3beta pathways. In: *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36 (2009), Aug, Nr. 8, S. 756–763
- [133] KUZUYA, T. ; HOSHIDA, S. ; YAMASHITA, N. ; FUJI, H. ; OE, H. ; HORI, M. ; KAMADA, T. ; TADA, M.: Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. In: *Circ Res* 72 (1993), Jun, Nr. 6, S. 1293–1299

- [134] GALCERÁ-TOMÁS, J. ; CASTILLO-SORIA, F. J. ; VILLEGAS-GARCÍA, M. M. ; FLORENCIANO-SÁNCHEZ, R. ; SÁNCHEZ-VILLANUEVA, J. G. ; LA ROSA, J. A. ; MARTÍNEZ-CABALLERO, A. ; VALENTÍ-ALDEGUER, J. A. ; JARA-PÉREZ, P. ; PÁRRAGA-RAMÍREZ, M. ; LÓPEZ-MARTÍNEZ, I. ; IÑIGO-GARCÍA, L. ; PICÓ-ARACIL, F.: Effects of early use of atenolol or captopril on infarct size and ventricular volume: A double-blind comparison in patients with anterior acute myocardial infarction. In: *Circulation* 103 (2001), Feb, Nr. 6, S. 813–819
- [135] FEUERSTEIN, G. ; LIU, G. L. ; YUE, T. L. ; CHENG, H. Y. ; HIEBLE, J. P. ; ARCH, J. R. ; RUFFOLO, R. R. ; MA, X. L.: Comparison of metoprolol and carvedilol pharmacology and cardioprotection in rabbit ischemia and reperfusion model. In: *Eur J Pharmacol* 351 (1998), Jun, Nr. 3, S. 341–350
- [136] EBERT, T. J. ; MUZI, M.: Sympathetic hyperactivity during desflurane anesthesia in healthy volunteers. A comparison with isoflurane. In: *Anesthesiology* 79 (1993), Sep, Nr. 3, S. 444–453
- [137] IGARASHI, Norio ; NOZAWA, Takashi ; FUJII, Nozomu ; SUZUKI, Takayuki ; MATSUKI, Akira ; NAKADATE, Teruo ; IGAWA, Akihiko ; INOUE, Hiroshi: Influence of beta-adrenoceptor blockade on the myocardial accumulation of fatty acid tracer and its intracellular metabolism in the heart after ischemia-reperfusion injury. In: *Circ J* 70 (2006), Nov, Nr. 11, S. 1509–1514
- [138] 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. In: *J Pharmacol Exp Ther* 254 (1990), Sep, Nr. 3, S. 847–856
- [139] TROTZ, M. ; JELLISON, E. J. ; HOSTETLER, K. Y.: Propranolol inhibition of the neutral phospholipases A of rat heart mitochondria, sarcoplasmic reticulum and cytosol. In: *Biochem Pharmacol* 36 (1987), Dec, Nr. 24, S. 4251–4256
- [140] HALESTRAP, A. P.: Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. In: *Biochem Soc Trans* 34 (2006), Apr, Nr. Pt 2, S. 232–237
- [141] LISA, F. D. ; MENABÒ, R. ; CANTON, M. ; BARILE, M. ; BERNARDI, P.: Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD⁺ and is a causative event in the death

- of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. In: *J Biol Chem* 276 (2001), Jan, Nr. 4, S. 2571–2575
- [142] GRIFFITHS, E. J. ; HALESTRAP, A. P.: Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. In: *Biochem J* 307 (Pt 1) (1995), Apr, S. 93–98
- [143] MAKAULA, Siyanda ; LOCHNER, Amanda ; GENADE, Sonia ; SACK, Michael N. ; AWAN, Moneeb M. ; OPIE, Lionel H.: H-89, a non-specific inhibitor of protein kinase A, promotes post-ischemic cardiac contractile recovery and reduces infarct size. In: *J Cardiovasc Pharmacol* 45 (2005), Apr, Nr. 4, S. 341–347
- [144] SANADA, Shoji ; ASANUMA, Hiroshi ; TSUKAMOTO, Osamu ; MINAMINO, Tet-suo ; NODE, Koichi ; TAKASHIMA, Seiji ; FUKUSHIMA, Tomi ; OGAI, Akiko ; SHINOZAKI, Yoshiro ; FUJITA, Masashi ; HIRATA, Akio ; OKUDA, Hiroko ; SHIMOKAWA, Hiroaki ; TOMOIKE, Hitonobu ; HORI, Masatsugu ; KITAKAZE, Masafumi: Protein kinase A as another mediator of ischemic preconditioning independent of protein kinase C. In: *Circulation* 110 (2004), Jul, Nr. 1, S. 51–57
- [145] REDEL, Andreas ; LANGE, Markus ; JAZBUTYTE, Virginija ; LOTZ, Christopher ; SMUL, Thorsten M. ; ROEWER, Norbert ; KEHL, Franz: Activation of mitochondrial large-conductance calcium-activated K⁺ channels via protein kinase A mediates desflurane-induced preconditioning. In: *Anesth Analg* 106 (2008), Feb, Nr. 2, S. 384–91, table of contents
- [146] AN, Jianzhong ; BOSNJAK, Zeljko J. ; JIANG, Ming T.: Myocardial protection by isoflurane preconditioning preserves Ca²⁺ cycling proteins independent of sarcolemmal and mitochondrial KATP channels. In: *Anesth Analg* 105 (2007), Nov, Nr. 5, S. 1207–13, table of contents
- [147] ARLOCK, P. ; WOHLFART, B. ; SJÖBERG, T. ; STEEN, S.: The negative inotropic effect of esmolol on isolated cardiac muscle. In: *Scand Cardiovasc J* 39 (2005), Sep, Nr. 4, S. 250–254
- [148] DAVIES, S. P. ; REDDY, H. ; CAIVANO, M. ; COHEN, P.: Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. In: *Biochem J* 351 (2000), Oct, Nr. Pt 1, S. 95–105

- [149] CHIJIWA, T. ; MISHIMA, A. ; HAGIWARA, M. ; SANO, M. ; HAYASHI, K. ; INOUE, T. ; NAITO, K. ; TOSHIOKA, T. ; HIDAHA, H.: Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. In: *J Biol Chem* 265 (1990), Mar, Nr. 9, S. 5267–5272
- [150] PARK, Won S. ; SON, Youn K. ; KIM, Nari ; YOUM, Jae B. ; JOO, Hyun ; WARDA, Mohamad ; KO, Jae-Hong ; EARM, Yung E. ; HAN, Jin: The protein kinase A inhibitor, H-89, directly inhibits KATP and Kir channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells. In: *Biochem Biophys Res Commun* 340 (2006), Feb, Nr. 4, S. 1104–1110
- [151] UEMURA, Arata ; NAITO, Yasuhito ; MATSUBARA, Tatsuaki: Dynamics of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II following acute myocardial ischemia-translocation and autophosphorylation. In: *Biochem Biophys Res Commun* 297 (2002), Oct, Nr. 4, S. 997–1002
- [152] SUMI, M. ; KIUCHI, K. ; ISHIKAWA, T. ; ISHII, A. ; HAGIWARA, M. ; NAGATSU, T. ; HIDAHA, H.: The newly synthesized selective Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II inhibitor KN-93 reduces dopamine contents in PC12h cells. In: *Biochem Biophys Res Commun* 181 (1991), Dec, Nr. 3, S. 968–975
- [153] ANDERSON, M. E. ; BRAUN, A. P. ; WU, Y. ; LU, T. ; WU, Y. ; SCHULMAN, H. ; SUNG, R. J.: KN-93, an inhibitor of multifunctional Ca⁺⁺/calmodulin-dependent protein kinase, decreases early afterdepolarizations in rabbit heart. In: *J Pharmacol Exp Ther* 287 (1998), Dec, Nr. 3, S. 996–1006

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Norbert Roewer, für die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Klinik anfertigen zu können, bedanken.

Mein herzlicher Dank für die Überlassung des Themas und die Durchführung der wissenschaftlichen Arbeit gebührt auch Herrn Prof. Dr. Franz Kehl, der bis zu seinem Weggang nach Karlsruhe im Jahr 2008 die Arbeitsgruppe leitete.

Vor allem aber bedanke ich mich sehr herzlich bei meinem Betreuer, Herrn Priv.-Doz. Dr. Markus Lange. Sein Engagement, seine konstruktive Kritik und seine außerordentliche Unterstützung ermöglichten es mir, wissenschaftliches Arbeiten und Denken zu erlernen und waren Voraussetzung für ein gutes Vorankommen bei meiner Dissertation.

Ausdrücklich bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe unter der Leitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. Markus Lange für die schöne Zusammenarbeit, die Diskussionsbereitschaft bei wissenschaftlichen Fragestellungen und die stets bereitwillige Hilfe bei der Bearbeitung von theoretischen und praktischen Problemen.

Danke sagen möchte ich auch Andreas Redel für die zahlreichen motivierenden und bereichernden Gespräche, die mir bei vielen Entscheidungen wegweisende Antworten waren.

Der größte Dank aber gilt meiner Familie, die mich auf meinem Weg immer begleitete, meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglichten, und meinem Bruder Christian für seine zuverlässige Unterstützung im Prozess des Schreibens.

Curriculum Vitae

Angaben zur Person

Name	Anja Frank
Geburtsdatum	01. August 1983
Geburtsort	Würzburg

Schulbildung

September 1990 bis Juli 1991	Grundschule Elisabethenheim Würzburg
September 1991 bis Juli 1994	Grundschule Reicholzheim
September 1994 bis Juni 2003	Dietrich Bonhoeffer Gymnasium Wertheim
Juni 2003	Abitur

Studium

Oktober 2003 bis Februar 2004	Studium der Physik an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
April 2004 bis November 2010	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
März 2006	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
November 2010	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Approbation als Ärztin

Beruflicher Werdegang

Seit Januar 2011	Wissenschaftliche Angestellte an der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie der Universität Würzburg; Direktor Prof. Dr. med. Norbert Roewer
------------------	--

Anja Frank

Würzburg, den 11. Juli 2011