

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
der Universität Würzburg

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. N. Roewer

Der Einfluss einer kontinuierlichen Betablockade
auf die Anästhetika-induzierte
Postkonditionierung

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Ulrike Kolar-Michaelis

aus Stephanskirchen

Stephanskirchen, Oktober 2016

Referent: Prof. Dr. Markus Lange
Koreferent: Prof. Dr. Kai Schuh
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Oktober 2017

Die Promovendin ist Ärztin.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

GRÖßENVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

TABELLENVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG.....	1
1.1.	KARDIOPROTEKTION	1
1.1.1.	Der Ischämie-Reperfusionsschaden	2
1.1.2.	Kardioprotektion durch Konditionierung.....	6
1.1.3.	Präkonditionierung.....	7
1.1.3.1.	Ischämische Präkonditionierung	7
1.1.3.2.	Anästhetika-induzierte Präkonditionierung.....	9
1.1.4.	Postkonditionierung.....	11
1.1.4.1.	Ischämische Postkonditionierung	11
1.1.4.2.	Anästhetika-induzierte Postkonditionierung.....	12
1.1.4.3.	Klinische Anwendung der Anästhetika-induzierten Postkonditionierung.....	13
1.2.	DAS SYMPATHIKO-ADRENERGE SYSTEM AM HERZEN	15
1.2.1.	Der ADRB1-abhängige Signaltransduktionsweg	16
1.2.2.	Pharmakologische Blockade der β -adrenergen-Rezeptoren im Menschen	18
1.2.3.	Der ADRB1-Antagonist und Kardioprotektion.....	20
1.3.	FRAGESTELLUNG	21
2.	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1.	TIERVERSUCHE	22
2.1.1.	Tierversuchsgenehmigung und Tierhaltung	22
2.1.2.	Langzeitapplikation.....	22
2.1.2.1	Nicht-invasive-Blutdruckmessung.....	22
2.1.2.2.	Implantation osmotischer Pumpen	24
2.1.2.4.	Protokoll Langzeitapplikation	26
2.1.3.	<i>In vivo</i> Herzinfarktmodell der Maus	27

2.1.3.1. Narkose und Instrumentierung	27
2.1.3.2. Präparation des Herzens	29
2.1.3.3. Protokoll <i>In vivo</i> Herzinfarktmodell	29
2.1.3.4. Induktion der Ischämie und Reperfusion	31
2.1.3.5. Postkonditionierung	31
2.1.4. Organentnahme	31
2.1.4.1. Organentnahme für molekularbiologische Untersuchung	31
2.1.4.2. Organentnahme und Infarktgrößenbestimmung	32
2.1.5. Experimentelles Protokoll	34
2.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	35
2.2.1. Western Blot	35
2.2.1.1. Herstellung der Lysate	35
2.2.1.2. Proteinkonzentrationsbestimmung	35
2.2.1.3. Elektrophorese und Western Blot	37
2.2.1.4. Antikörper und Entwicklung	39
2.2.2. Real-Time-PCR	41
2.2.2.1. Herstellung der Lysate	41
2.2.2.2. RNA-Isolierung und Quantifizierung	41
2.2.2.3. cDNA-Synthese	43
2.2.2.4. Real-Time-PCR	44
2.3. STATISTIK	46
3. ERGEBNISSE	47
3.1. ERGEBNISSE LANGZEITAPPLIKATION	47
3.2. ERGEBNISSE DER INFARKTGRÖßENBESTIMMUNG	50
3.2.1. Hämodynamische Parameter während Ischämie und Reperfusion	50
3.2.2. Herzinfarktgrößen	51
3.3. ERGEBNISSE DER MOLEKULARBIOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN	52
3.3.1. ADRB1-Konzentration nach Ischämie-Reperfusion	53
3.3.2. mRNA-Gehalt von ADRB1, von Arrb1 und Gnas nach Ischämie/Reperfusion	54
4. DISKUSSION	55
4.1. DIE β -LANGZEITBLOCKADE SENKT DIE HERZFREQUENZ	56
4.2. AUFHEBUNG DER DESFLURAN-INDUZIERTEN POSTKONDITIONIERUNG DURCH β - LANGZEITBLOCKADE	57
4.3. DISKUSSION DES MODELLS	60
4.4. BEEINFLUSSUNG DER MOLEKULARBIOLOGIE DURCH β -LANGZEITBLOCKADE UND INTERAKTION DURCH DESFLURAN-INDUZIERTE POSTKONDITIONIERUNG	61

4.5. ÜBERTRAGBARKEIT AUF DIE KLINISCHE SITUATION67

5. ZUSAMMENFASSUNG71

LITERATURVERZEICHNIS73

DANKSAGUNG

Abkürzungsverzeichnis

AAR	<i>engl. area at risk, Risikoareal</i>
AC	Adenylatcyclase
ADRB	β -adrenerger-Rezeptor
ADRB1	β 1-adrenerger-Rezeptor
ADRB2	β 2-adrenerger Rezeptor
AMI	akuter Myokardinfarkt
ANOVA	<i>engl. analysis of variance, Varianzanalyse</i>
APC	<i>engl. anesthetic preconditioning, Anästhetika-induzierte Präkonditionierung</i>
APost	<i>engl. anesthetic postconditioning, Anästhetika-induzierte Postkonditionierung</i>
Arrb1	β 1-Arrestin
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
CABG	<i>engl. coronary artery bypass graft</i>
CaMKII	Calcium-Calmodulin-Kinase II
cAMP	cyclisches Adenosin-Monophosphat
cDNA	<i>engl. complementary DNA</i>
DNA	<i>engl. desoxyribonucleinacid</i>
ECL	Elektrochemilumineszenz
EGFR	<i>engl. epidermal-growth-factor-recceptor</i>
EKG	Elektrokardiogramm
EPAC	<i>engl. exchange protein cAMP-activated</i>
ERK _{1/2}	extrazellulär-regulierte Kinase _{1/2}

Fc	<i>engl. fragment crystallizable</i> , konstanter Abschnitt des Immunglobulins
GAPDH	Glycerin-Aldehyd-3-Dehydrogenase
Gnas	α -Untereinheit des G-stimulierenden Proteins
GRK	G-Protein-Rezeptorkinase
GSK-3 β	Glykogensynthasekinase-3 β
IgG	Immunglobulin G
IPC	Ischämische Präkonditionierung
IPost	Ischämische Postkonditionierung
IRI	<i>engl. ischemia-reperfusion injury</i> , Ischämie-Reperfusions-Schaden
IS	<i>engl. infarct size</i> , Herzinfarktgröße
JAK	Janus-Kinase
K ⁺ _{ATP}	ATP-abhängige Kaliumkanäle
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
LAD	<i>engl. left anterior descending</i> , prominenter Ast der linken Koronararterie
MAC	<i>engl. minimum alveolar concentration</i> , minimale alveoläre Konzentration
MAP	<i>engl. mean arterial pressure</i> , mittlerer arterieller Druck
MAPK	<i>engl. mitogen-activated-Proteinkinasen</i>
mPTP	<i>engl. mitochondrial permeability transition pore</i> , mitochondriale Permeabilitätspore
mRNA	<i>engl. messenger RNA</i>
NaCl	Natrium-Chlorid
NOS	NO-Synthase
PCR	<i>engl. polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion

PE	Polyethylen
PI3K/Akt	Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLN	Phospholamban
PTCA	<i>engl. percutaneous transluminal coronary angioplasty</i> , perkutane transluminale Koronarangioplastie
RISK	<i>engl. reperfusion-injury-survival-kinases</i>
RNA	<i>engl. ribonucleinacid</i>
ROS	<i>engl. reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
SAFE	<i>engl. survivor-activating-factor-enhancement</i>
SDS-PAGE	<i>engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
STAT 3	<i>engl. signal transducer and activator of transcription 3</i>
STEMI	<i>engl. ST-elevating myocardial infarction</i> , ST-Hebungsinfarkt
SWOP	<i>engl. second window of protection</i>
TIVA	total-intravenöse Anästhesie
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
VPR	<i>engl. volume pressure recording</i> , Volumen-Druck-Sensor
z.B.	zum Beispiel

Größenverzeichnis

<u>Messgröße</u>	<u>Einheit</u>	<u>Einheitsbezeichnung</u>
Atomare Masseneinheit	kDa	Kilo-Dalton
Elektrische Spannung	V	Volt
Internationale Einheit	IE	Internationale Einheit
Länge	mm	Millimeter
	cm	Zentimeter
Masse	mg	Milligramm
	g	Gramm
	kg	Kilogramm
Mittlere Erdbeschleunigung	m s^{-2}	Meter pro Sekunde ²
g (9,81 m s^{-2})		
Rotationsgeschwindigkeit	rpm	<i>engl. revolutions per minute,</i> Umdrehung pro Minute
Stoffmenge	mol	Mol
	mmol	Millimol
Temperatur	°C	Grad Celcius
Volumen	μl	Mikroliter
	ml	Milliliter
	l	Liter
Zeit	s	Sekunden
	min	Minuten
	h	Stunden
	d	Tag

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die vier Entitäten des Ischämie-Reperfusionsschadens.....	2
Abb. 2: Möglichkeiten der Konditionierung am Herzen	7
Abb. 3: Schematische Darstellung des ADRB1-abhängigen Signaltransduktionswegs	18
Abb. 4: Versuchsanordnung zur nicht-invasiven Blutdruckmessung	23
Abb. 5: Schematische Darstellung der Druck-Volumen-Kurve zur Bestimmung der Blutdruckwerte	24
Abb. 6: Schematische Darstellung einer osmotischen Pumpe	25
Abb. 7: Zeitpunkte der nicht-invasiven Blutdruckmessungen	27
Abb. 8: Protokoll zur Postkonditionierung	30
Abb. 9: Experimentelles Protokoll zur Untersuchung des Einflusses einer β 1- adrenergen Langzeitblockade auf die Desfluran-induzierte Postkonditionierung	34
Abb. 10: Herzfrequenzreduktion durch Langzeitapplikation von Metoprolol ...	48
Abb. 11: Darstellung der Herzinfarktgröße als Anteil des Infarktgebietes an der Area at risk.....	51
Abb. 12: Proteinkonzentration des ADRB1 nach Reperfusion/Ischämie	53
Abb. 13: mRNA-Gehalt von ADRB1, von Arrb1 und Gnas nach Ischämie/Reperfusion	54
Abb. 14: „Der biased -Ligand“, Schematische Darstellung	67

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Einfluss der Langzeitapplikation von Metoprolol auf Herzfrequenz und mittleren arteriellen Druck.....	49
Tab. 2: Hämodynamische Parameter während Ischämie und Reperfusion.....	50

1. Einleitung

1.1. Kardioprotektion

Weltweit werden bis 2020 die Ischämischen Herzerkrankungen führende Ursache der durch Krankheit beeinträchtigten Restlebenszeit sein.[1] In der Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes von 1998 bis 2010 für Männer und Frauen in Deutschland, führen die Chronische Ischämische Herzkrankheit, der akute Myokardinfarkt (AMI) und die Herzinsuffizienz die Liste der häufigsten Todesursachen an.[2] Bei den jährlichen Krankheitskosten pro Einwohner belegen die Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Deutschland Platz eins.[3]

Beim AMI als Entität der Koronaren Herzkrankheit (KHK) spielt die Herzinfarktgröße (IS, *engl. infarct size*) als wichtiger Faktor für die kurz- und langfristige Prognose eine herausragende Rolle.[4] Die leitliniengerechte Therapie sieht die schnellstmögliche Reperfusion durch interventionelle Verfahren wie PTCA (*engl. percutaneous transluminal coronary angioplasty*), Lyse oder Bypass-Operation (CABG, *engl. coronary artery bypass graft*) vor.[5, 6]

Dabei entstehen die Schäden am Herz zum einen durch Verschluss einer Koronararterie mit nachfolgender Ischämie, aber auch durch die Reperfusion im Rahmen der Wiedereröffnung des Gefäßes. Diese beiden pathophysiologischen Prozesse werden als Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI, *engl. infusion-reperfusion-injury*) bezeichnet. Somit muss der schädigende Aspekt der Reperfusion in Kauf genommen werden, um die Prognose des Patienten mit KHK zu verbessern. Gleichzeitig stellt dieser jedoch einen möglichen Angriffspunkt für therapeutische kardioprotektive Strategien dar.[7]

Der Einsatz von Medikamenten wie Statinen, β -Blockern und Thrombozytenaggregationshemmern haben in der Prävention des AMI einen hohen Stellenwert. [8]

Kardioprotektion bedeutet Schutz des Herzens vor Nekrose und Apoptose der Myokardzellen, sowie den Erhalt der Funktionsfähigkeit des Herzens. Dieser Schutz kann durch Konditionierung mit ischämischen[9], pharmakologischen[10], thermischen[11] und mechanischen[12] Stimuli hervorgerufen werden.

Das perioperative Management kardiovaskulärer Ereignisse liegt im Verantwortungsbereich der anästhesiologischen Ärzte.

1.1.1. Der Ischämie-Reperfusions-Schaden

Der IRI wurde erstmals von Jennings 1960 am Hund beschrieben.[13] Der IRI kann in vier Unterformen eingeteilt werden (siehe Abb. 1).[14]

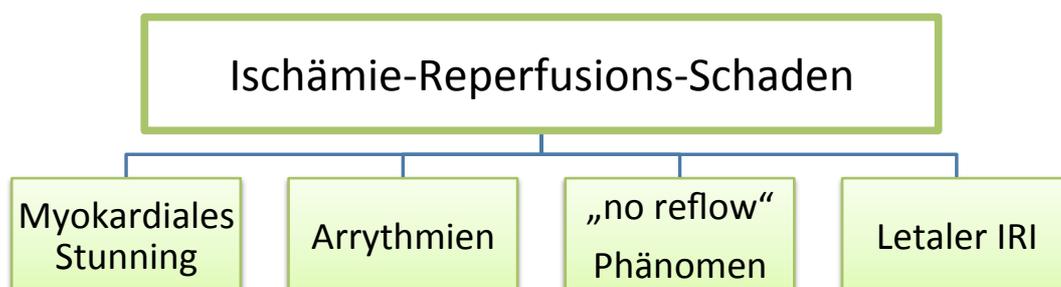


Abb. 1: Die vier Entitäten des Ischämie-Reperfusions-Schadens
modifiziert nach Yellon et al., 2007

Myokardiales Stunning bezeichnet die temporäre funktionelle Einschränkung des Herzens, z.B. durch eine verminderte Ejektionsfraktion und

Wandbewegungsstörungen, welche trotz vollständiger Wiederherstellung des Blutflusses und ohne irreversiblen strukturellen Myokardschaden bestehen.[15] Das „no-reflow-Phänomen“ beschreibt die Unfähigkeit ischämisches Gewebe gleichmäßig zu reperfundieren. Ursächlich hierfür ist ein im Myokard entstehender Widerstand, der unter anderem durch Zellschwellung, Schädigung der kleinen Kapillaren sowie mitochondrialen Veränderungen hervorgerufen wird.[16, 17]

Arrhythmien stellen ein häufiges Problem in der Behandlung von Patienten mit AMI in der Akutsituation dar.[18] Ebenso kann es langfristig durch Narbenbildung im Infarktareal zur gestörten Reizleitung im Myokard mit erhöhter Arrhythmierate kommen, welche bis zum plötzlichen Herztod führen können.[19]

Der letale IRI stellt den irreversiblen Zelltod durch Apoptose und Nekrose dar.[20] Apoptose beschreibt den geordneten Zelltod durch Caspasen und weiteren proteolytischen Enzymen bei intakter Zellmembran mit nachfolgender Degradierung der Zelle in Vakuolen und deren Phagozytose.[21] Für Nekrose konnte ebenfalls eine Aktivierung von Caspasen gezeigt werden. Hier erfolgt die Aktivierung der Caspasen intrinsisch über die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätspore (mPTP, *engl. mitochondrial permeability transition pore*) als Proteinkomplex der inneren Mitochondrienmembran mit nachfolgender Entkopplung der ATP-Synthese. Die Zellhomöostase kann dadurch nicht mehr aufrecht erhalten werden und führt somit zum Zelltod.[22]

Bei einem AMI führt die Unterbrechung des koronaren Blutflusses zu einer Minderversorgung des Myokards mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie zu einem reduzierten Abtransport von Stoffwechselmetaboliten und Ionen. Unter hypoxischen Bedingungen erfolgt die Umstellung auf den anaeroben

Zellstoffwechsel. Es kommt zur Depletion der ATP-(Adenosin-5'-Triphosphat)-Speicher. Die Zellhomöostase kann ohne Energie nicht aufrecht erhalten werden. Zudem bilden sich freie Sauerstoffradikale (ROS, engl. *reactive oxygen species*). Calciumionen akkumulieren in der Zelle. Diese Faktoren führen auf zellulärer Ebene zu Apoptose und Nekrose. Das Mitochondrium als Ort der ATP-Synthese ist ein wichtiger Ort im Pathomechanismus des myokardialen Zelluntergangs unter Hypoxie. Die mPTP als Proteinkomplex der inneren Mitochondrienmembran spielt in der Pathophysiologie des IRI die zentrale Rolle.[23, 24]

Die innere Mitochondrienmembran ist impermeabel für Moleküle und Ionen, um einen elektrochemischen Gradienten für die ATP-Synthese im Rahmen der Atmungskette aufrechtzuerhalten. Die Öffnung der mPTP wird durch Faktoren wie pH-Wert, ROS-Überschuss[25] und Calciumionen beeinflusst[26].

Die Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit der mPTP führt zur vermehrten Durchlässigkeit der inneren Mitochondrienmembran für Ionen und Protonen. Daraus resultiert ein Abfall des elektrochemischen Gradienten zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmatrix. Durch diesen Entkopplungsprozess ist keine ATP-Synthese möglich und die zellulären Energiespeicher leeren sich. Eine Hemmung der mPTP-Öffnung z.B. durch Cyclosporin A ist kardioprotektiv.[27]

Unter anaeroben Bedingungen steigt der Calciumionenspiegel im Zytosol. Dies führt auch zum Calcium- und Wassereinstrom ins Mitochondrium mit konsekutiver Schwellung und Zerstörung der mitochondrialen Membran mit Entkopplung der Atmungskette. Cytochrom C und weitere proapoptotische Moleküle, welche sich normalerweise im Intermembranraum befinden, gelangen somit ins Zytosol. Hieraus resultiert eine Aktivierung proapoptotischer zytosolischer Signalkaskaden, vermittelt über Caspasen und weitere proteolytische Enzymen.[22, 26]

Die Veränderung der mitochondrialen Permeabilität durch erhöhte Calcium-Spiegel perimitochondrial und oxidativen Stress wurde bereits 1987 von Crompton beschrieben.[28]

Neben der Ischämie, ist die Reperfusion im Rahmen der therapeutischen Maßnahmen ein weiteres schadensetzendes Ereignis. Durch die Wiedereröffnung des Gefäßes kommt es zum vermehrten Sauerstoffverbrauch mit verstärkter ROS-Bildung und Oszillation des Calciumspiegels im Zytosol.[29]

Das Zytoskelett und die Myofilamente reagieren auf hohe Calciumkonzentrationen und -oszillationen mit Hyperkontraktionen und konsekutiver Ruptur der sarkolemmalen Membran. Es kommt zum Untergang kardialer Zellen.[30] Dies führt über eine Beeinträchtigung der elektromechanischen Kopplung zur kontraktile Dysfunktion des Arbeitsmyokards und andererseits über Zelluntergang im Reizleitungssystem des Herzens sowie Narbenbildung zu Arrhythmien.

In den letzten Jahren wurden immer mehr Signalwege und Rezeptoren identifiziert, die über das Mitochondrium Apoptose und Nekrose beeinflussen können, z.B. Calcium-Calmodulin-Kinase II (CaMKII)[31], Proteinkinase C (PKC)[32], Proteinkinase A (PKA) [33] und β -adrenerge Rezeptoren (ADRB) [34]. Die Bildung von ROS, die zytosolischen Calcium-Oszillationen und die Öffnung der mPTP sind wichtige schädigende Ereignisse im Rahmen der Ischämie und Reperfusion, deren Zusammenspiel und ihre Bedeutung für das Ausmaß des IRI im Einzelnen noch nicht endgültig geklärt sind.

1.1.2. Kardioprotektion durch Konditionierung

Der Begriff der Konditionierung beschreibt die Veränderung des Stoffwechsels bzw. der Proteine einer Zelle durch einen Stimulus, sodass die Veränderung auch ohne dessen Anwesenheit weiterhin besteht und eine Wirkung beobachtet werden kann. Bezogen auf die Kardioprotektion bedeutet Präkonditionierung, dass Interventionen vor Eintritt der Ischämie und Postkonditionierung vor Beginn der Reperfusion zu Stoffwechseleränderungen im Herzen führen. Die Trigger können pharmakologische, ischämische oder mechanische Interventionen am Herzen bedeuten, um die Toleranz des Herzens auf einen nachfolgenden IRI zu erhöhen (siehe Abb. 2).

Bei der Ischämischen Präkonditionierung (IPC, engl. *ischemic preconditioning*) wird durch eine oder mehrere kurze Ischämiephasen mit nachfolgender Reperfusion konditioniert. In der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung (APC, engl. *anesthetic preconditioning*) erfolgt die Konditionierung mit einem volatilen Anästhetikum. Weitere pharmakologische Präkonditionierungen können z.B. mit Opioiden[10, 35], Katecholaminen[36] oder Adenosin[37] durchgeführt werden. Mittels IPC ist auch eine Organprotektion der Niere[38], des Zentralen Nervensystems[39] oder der Leber[40] möglich.

1996 wurde der Begriff der Postkonditionierung von Na et al. geprägt, indem er bei Katzen zeigte, dass intermittierende Reperfusionen nach 20-minütiger Okklusion der Koronararterie vergleichbar effektiv das Auftreten von Kammerflimmern reduziert wie die IPC.[41]

Findet der präkonditionierende Stimulus nicht am Herzen statt, dient aber zu dessen Schutz, nennt man dies Fern-Präkonditionierung (engl. *remote-conditioning*).[42] 2005 beschrieb Kerendi et al., dass nach einer fünfminütigen

Nierenarterienokklusion vor AMI in der Ratte eine 50%ige IS-Reduktion möglich ist.[43] Andreka *et al.* setzte den konditionierenden Reiz durch passagere Ischämie der unteren Extremität am Schwein.[42] Dies ermöglicht eine neue therapeutische kardioprotektive Strategie in der Prähospitalphase des AMI-Patienten im Sinne einer Postkonditionierung.[44] In einer Metaanalyse konnte eine Interaktion sowohl mit β -Blockern als auch mit volatilen Anästhetika gezeigt werden, die diese Effekte dämpfen.[45]

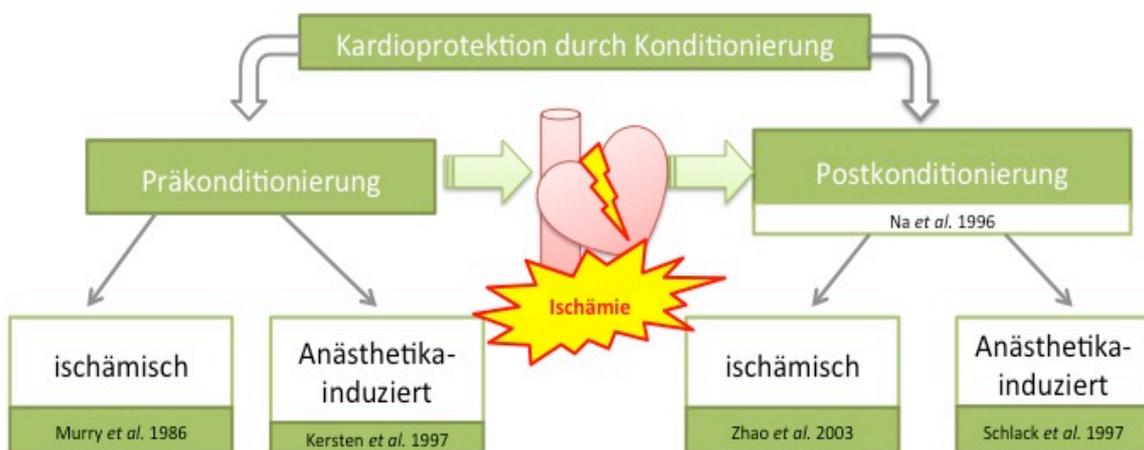


Abb. 2: Möglichkeiten der Konditionierung am Herzen

1.1.3. Präkonditionierung

1.1.3.1. Ischämische Präkonditionierung

Die IPC ist ein Phänomen, welches erstmals 1986 von Murry *et al.* an Hunden beschrieben wurde. Dabei führten vier Zyklen mit je einer fünfminütigen Koronarokklusion gefolgt von einer fünfminütigen Reperfusion vor einer 40-minütigen Ischämie zu einer IS-Reduktion um bis zu 25% im Vergleich zu Hunden der Kontrollgruppe, die keine derartige Intervention vor Ischämie erhielten. Fand die IPC vor einer dreistündigen Okklusion statt, war keine IS-

Reduktion nachweisbar. Murry beschrieb die Konditionierung als eine „Verzögerung des Zelltods durch Toleranzerhöhung“ und nicht eine komplette Verhinderung des Zelltods.[9]

1993 konnte Kuzuya *et al.* eine erneute kardioprotektive Wirkung der IPC zu einem späterem Zeitpunkt zeigen. Eine IS-Reduktion konnte sowohl eine Stunde (h) als auch 24h nach IPC beobachtet werden, wobei es keine Veränderung der IS nach 3 bzw. 12h gab.[46] Man weiß heute, dass das erste Fenster der Kardioprotektion 1min (Minute) bis 180min nach der IPC andauert und dass das zweite Fenster (SWOP, *engl. second window of protection*) der Kardioprotektion zwischen 24-72h nach der IPC existiert. Dazwischen gibt es eine Phase ohne IS-reduzierende Wirkung.[47] Das SWOP der IPC wird auch „delayed“ oder „late preconditioning“ genannt.

Das erste Fenster der IPC beruht vor allem auf der Modifikation bereits vorhandener Proteine und Aktivitätsänderungen von Enzymen. Das zweite Fenster ist zusätzlich durch eine veränderte Genexpression und verstärkte Proteinbiosynthese neuer Proteine charakterisiert.[48]

Die IPC sorgt bereits nach einem Zyklus von Okklusion und Reperfusion für eine signifikante IS-Reduktion.[49,50] Durch Veränderung der Körpertemperatur wird der Schwellenwert der IPC beeinflusst. Bei einer Senkung der Körpertemperatur muss auf vier Zyklen Okklusion und Reperfusion erhöht werden, um eine vergleichbare kardioprotektive Wirkung durch IPC zu erreichen.[51]

Liu *et al.* zeigte bereits 1991, dass die IPC Adenosin-vermittelt wird.[52] Bradykinin und Endorphine wurden als weitere endogene Autokine identifiziert, welche als Trigger präischämisch kardioprotektive Signaltransduktionewege anschalten, welche postischämisch die Wirkung vermitteln, zu diesen gehören: extrazellulär-regulierte Kinase_{1/2} (ERK_{1/2}),

Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt (PI3K/Akt), PKC[50, 53], Proteinkinase G (PKG), Glykogensynthasekinase-3 β (GSK-3 β), endotheliale NO-Synthase (NOS)[54-56].

In der Folge wurden immer mehr G-Protein-gekoppelte Rezeptoren gefunden, die IPC-vergleichbare Effekte auslösen: Adrenerge Rezeptoren[57], Endothelin-1-Rezeptor[58], Angiotensin II-Rezeptor[59]. Ein wichtiger Endeffektor stellt hier die mPTP dar, deren Öffnung über mitochondriale ATP-abhängige Kaliumkanäle (K⁺_{ATP}) [60] [61] und GSK-3 β [62]reguliert wird.

Die Rolle der ADRB für die IPC ist unklar, zum einen beschrieben Lange *et al.*, dass die Beteiligung der ADRB wichtig für die APC, aber nicht für die IPC ist[63], jedoch wurde gezeigt, dass durch Langzeitapplikation eines ADRB-Antagonisten die IPC verhindert wird[64, 65].

1.1.3.2. Anästhetika-induzierte Präkonditionierung

Die APC mit Isofluran wurde erstmals 1997 von Kersten *et al.* beschrieben. Die IS-Reduktion durch IPC oder APC durch Isofluran war vergleichbar groß. Die kardioprotektive Wirkung der volatilen Anästhetika war auch nach einer Auswaschperiode von 30min vorhanden, sodass eine Konditionierung des Herzens stattgefunden hatte. Man spricht hier von der Memory-Phase.[66] Einen Zusammenhang zwischen Verbesserung des myokardialen Stunnings durch Isofluran- und Halothan-Inhalation konnte bereits 1988 von Warltier *et al.* gezeigt werden.[67]

Die kardioprotektiven Eigenschaften sind für Halothan, Isofluran, Desfluran und Sevofluran bereits nachgewiesen. Die Potenz der einzelnen Anästhetika variiert. Desfluran hat eine stärkere Potenz als Sevofluran. Isofluran zeigt die schwächste Potenz bezüglich Kardioprotektion.[49]

Bei der APC gibt es einen Schwellenwert. Mit Desfluran wurde demonstriert, dass durch repetitive Applikation des volatilen Anästhetikums, dessen Schwellenkonzentration gesenkt werden konnte, aber eine Erhöhung der minimalen alveolären Konzentration (MAC, engl. *minimum alveolar concentration*) darüber hinaus keinen weiteren Vorteil für die IS-Reduktion bringt.[68, 69]

Vergleichbar der IPC induziert Desfluran ein erstes und zweites Fenster der Kardioprotektion, zwischen 30min und 2h, sowie zwischen 24-72h. Dazwischen konnte keine IS-Reduktion gezeigt werden.[70] Dabei wird das erste Fenster unter anderem über endotheliale NOS und das zweite Fenster über induzierbare NOS vermittelt.[71]

2002 konnte durch zwei Arbeitsgruppen belegt werden, dass die Gabe volatiler Anästhetika mit einer ROS-Erhöhung einhergeht.[72-74] Wie für die IPC konnte für die APC die Verminderung der zytosolischen Calciumionen gezeigt werden.[75, 76] Für PKC[77, 78], Proteintyrosinkinase [79] , ERK_{1/2} als Mitogen-activated-Proteinkinasen (MAPK)[80] konnte eine Beteiligung am APC-Wirkmechanismus demonstriert werden. Diese intrazellulären Signaltransduktionswege[81] scheinen mit ATP-abhängigen Kalium-Kanälen(K⁺_{ATP}) zu interagieren. Bei der APC spielt sowohl der sarkolemmale[82] als auch der mitochondriale K⁺_{ATP} [78, 83] eine entscheidende Rolle. Auch eine Beteiligung PKA-gesteuerter spannungs-abhängiger Calcium-aktivierte Kaliumkanäle an der APC konnte gezeigt werden.[84]

Für die APC konnte die Aktivierung verschiedener G-Protein-gekoppelter Rezeptoren nachgewiesen werden, wie z.B. Adenosin-[85], α -adrenerger Rezeptoren und ADRB[83].

Lange *et al.* belegten, dass sowohl der β 1-(ADRB1) [63] als auch der β 2-adrenerge Rezeptor (ADRB2)[68] bei der APC eine wichtige Rolle spielen,

sowie eine Beteiligung nachgeschalteter Signaltransduktionswege wie PKA [84] und CaMKII[86].

1.1.4. Postkonditionierung

1.1.4.1. Ischämische Postkonditionierung

2003 konnte Zhao *et al.* durch Ischämische Postkonditionierung eine IS-Reduktion im Hund vergleichbar der IPC zeigen, indem er drei Zyklen aus Okklusion und Reperfusion nach prolongierter Koronarokklusion und vor vollständiger Reperfusion des Infarktgebietes durchführte.[87]

Die endogene Produktion von Autokinen wie Adenosin[88], Endorphinen[89] und Bradykinin[90] scheinen die Postkonditionierung am Herzen auszulösen.

Wichtige Mediatoren stellen ROS[90], der intrazelluläre Calciumüberschuss und die Lipidoxidation dar.[29] Auch hier konnte die Beteiligung ähnlicher Signaltransduktionswege wie bei der IPC nachgewiesen werden.

Die Aktivierung überlebenswichtiger Kinasen im Rahmen eines eigenen Signaltransduktionsweges[91] wurde RISK-(*engl. reperfusion-injury-survival-kinases*)-Pathway genannt[92]. Am Signalweg beteiligte Kinasen sind ERK_{1/2} als Vertreter der MAPK[91], PI3K/Akt[93], welche GSK3 β inhibieren und somit die Öffnung der mPTP verhindern[62] und den IRI reduzieren.[94]

Eine weitere wichtige Signalkaskade ist der SAFE-Signaltransduktionsweg (*engl. survivor-activating-factor-enhancement*) mit Aktivierung des Tumornekrose-faktor α (TNF α), der Janus-Kinase (JAK)[95] und STAT 3 (*engl. signal transducer and activator of transcription 3*)[96]. Hier werden extrazelluläre Signale z.B. durch Interleukine und deren Rezeptoren nach innen transduziert und amplifiziert, um dann im Zellkern die Gentranskription für

überlebenswichtige Proteine der Zelle zu regulieren. Sowohl der RISK- als auch der SAFE-Signalweg interagieren mit dem Mitochondrium durch Veränderung der Permeabilität.

1.1.4.2. Anästhetika-induzierte Postkonditionierung

Die Gabe volatiler Anästhetika zu Beginn der Reperfusion ist kardioprotektiv und kann die IS signifikant reduzieren. Man bezeichnet dies als Anästhetika-induzierte Postkonditionierung (APost, engl. *anesthetic postconditioning*).[97] Die IS-Reduktion ist vergleichbar der APC.[98] Die Kombination aus APC und APost bringt keinen Vorteil gegenüber einer alleinigen Intervention mit APC oder APost. Gibt man Desfluran zum Zeitpunkt des Indexinfarktes hat dies keinen Einfluss auf die IS.[99]

Die Unterschiede der einzelnen volatilen Anästhetika untereinander bezüglich der kardioprotektiven Potenz variieren abhängig von der Spezies. In Mäusen waren Iso-, Des- und Sevofluran vergleichbar protektiv.[49] Im Kaninchen konnte eine signifikante Herzinfarktreaktion nur für Sevo- und Desfluran gezeigt werden, Enfluran hatte nur einen marginalen Effekt und Isofluran keinen.[100]

Ein wichtiger Endeffektor der APost scheint auch hier die mitochondrialen K^+_{ATP} und die mPTP zu sein.[101] Die Beteiligung von mitochondrialen spannungsabhängigen Calcium-aktivierten Kaliumkanälen ist ebenso belegt, kann aber auch unabhängig von der mPTP-Öffnung kardioprotektiv sein.[102] Sowohl der ADRB1 und ADRB2 als auch die nachgeschalteten Signaltransduktionswege mit PKA und CaMKII spielen bei der Desfluran-induzierten Postkonditionierung eine wichtige Rolle.[103]

Eine wesentliche Rolle hat der RISK-Pathway, welcher über GSK3 β die Öffnung der mPTP verhindert.[104] Für die am RISK-Pathway beteiligten Kinasen ERK_{1/2}[105] und PI3K/Akt[106, 107] konnte die Vermittlung der APost gezeigt werden.

1.1.4.3. Klinische Anwendung der Anästhetika-induzierten Postkonditionierung

Die CABG ist eine Intervention, bei der eine myokardiale Ischämie regelmäßig beim Einsatz der Herz-Lungen-Maschine auftritt. Diese bietet die Möglichkeit die kardioprotektiven Eigenschaften volatiler Anästhetika im Menschen zu untersuchen.[108, 109] In wenigen klinischen Studien wird auch der Einsatz kardioprotektiver Maßnahmen im Rahmen der PTCA beschrieben. Hier werden jedoch häufig IPC und IPost-Protokolle durch intrakoronare Balloninterventionen und deren Einfluss auf Troponin I und Kreatininkinasefreisetzung untersucht.[110] Die interventionelle Kardiologie bietet jedoch ein Setting im Menschen, in dem vor allem die Postkonditionierung von Bedeutung ist und untersucht werden kann. Bei der PTCA gibt es nur sehr wenige Daten bezüglich APost. Bis jetzt gibt es keine standardisierten Protokolle und keine eindeutige Definition der myokardialen Ischämie im Menschen. Die durchgeführten klinischen Studien sind durch ihre Heterogenität bezüglich Setting, Einschlusskriterien, Einsatz anderer Pharmaka und Patientenkollektiv gekennzeichnet. Insgesamt ist das Patientenkollektiv zu klein, um einen signifikanten Unterschied bezüglich Mortalität und Auftreten eines AMI zu zeigen.[111-114]

2006 wurden von Yu *et al.* 32 Studien mit insgesamt 2841 Patienten analysiert. Er verglich die Gabe der einzelnen volatilen Anästhetika mit einer totalen

intravenösen Anästhesie (TIVA). Es gab keine Mortalitätssenkung und kein signifikant vermindertes Auftreten von AMI in der volatilen Anästhetika-Gruppe insgesamt. Die Power der Analyse reichte auf Grund der Diversität der Studien nicht aus, um die Mortalität und das AMI-Auftreten endgültig zu beurteilen. Für Sevo- und Desfluran konnte eine signifikante Reduktion der Troponin I-Freisetzung gezeigt werden, für Isofluran jedoch nicht. Die Komedikation mit Sulfonylharnstoffen und Theophyllin als die Konditionierung beeinflussende Medikamente wurden nicht immer dokumentiert. Bemerkenswert ist, dass in der TIVA-Gruppe der Gebrauch von ADRB1-Blockern 28% höher war als in der Gruppe der volatilen Anästhetika.[115] Eine Beeinflussung der Endpunkte wie Tod und AMI durch ADRB1-Blocker in der TIVA-Gruppe ist nicht eindeutig auszuschließen.

Symons *et al.* analysierte im selben Jahr 27 Studien mit 2979 Patienten. Er untersuchte die Gabe volatiler Anästhetika zu einem bestimmten Zeitpunkt oder die Gabe während der ganzen Operation verglichen mit der TIVA. Hier zeigte sich kein Unterschied unabhängig von der Dauer der Applikation des Narkosegases bezüglich des Auftretens eines perioperativen AMI, einer myokardialen Ischämie oder der Mortalität verglichen mit der TIVA. Signifikante Unterschiede durch Gabe volatiler Anästhetika zeigten sich in niedrigeren Troponin I-Leveln, einem geringeren Einsatz inotroper Substanzen und einer Verkürzung des Krankenhausaufenthaltes um einen Tag.[108]

In beiden Studien erhielten die Kontrollgruppen Substanzen, die selbst kardioprotektive Eigenschaften haben. Sowohl für Propofol[116] als auch für Opiode[117] konnte im Tiermodell kardioprotektive Wirkungen gezeigt werden.

In der Gesamtschau ist die Studienlage im Menschen unbefriedigend. Die guten Studienergebnisse aus den Tierversuchen bezüglich IS-Reduktion und

Mortalitätssenkung wurden bislang nicht bestätigt. Die Suche nach beeinflussenden Faktoren ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

Die ESC-Leitlinie empfiehlt die perioperative Fortführung einer bereits bestehenden β -Blocker-Therapie auch für nicht kardiochirurgische Operationen.[118] Die Interaktion der ADRB-Antagonisten-Langzeittherapie auf die APost *in vivo* wurde bisher nicht untersucht.

1.2. Das sympathiko-adrenerge System am Herzen

Das vegetative Nervensystem des Menschen zur Steuerung von Vitalfunktionen besteht aus dem Parasympathikus, dem enterischen Nervensystem und dem Sympathikus. Alle Steuerungsvorgänge geschehen autonom, d.h. unbewusst ohne Großhirnbeteiligung.

Die beteiligten sympathischen Rezeptoren sind die adrenergen Rezeptoren, die man in α - und β -adrenerge Rezeptoren unterteilt. Es sind zwei α - und drei β -Rezeptoren beschrieben, alle sind G-Protein-gekoppelt.[119] Noradrenalin und Adrenalin greifen agonistisch mit unterschiedlicher Affinität an den adrenergen Rezeptoren an.

Am Herzen finden sich mehr ADRB1 als ADRB2.[120] Der ADRB1 ist ein stimulierender G-Protein-gekoppelter Rezeptor mit sieben helikalen transmembranären Domänen, wovon sich drei intra- und drei extrazelluläre Schleifen konformieren.

1.2.1. Der ADRB1-abhängige Signaltransduktionsweg

Durch Bindung von Noradrenalin oder Adrenalin kommt es zur Aktivierung der ADRB1. Dadurch dissoziiert die α -Untereinheit des Gs-gekoppelten Proteins (Gnas) vom Rezeptor und aktiviert die Adenylatcyclase (AC). Diese bildet aus ATP cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und amplifiziert somit das Signal. cAMP aktiviert die PKA. Die PKA phosphoryliert Phospholamban (PLN) an Serin16, L-Typ-Ca²⁺-Kanäle und Myofilamente (siehe Abb. 3). Dies führt über die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration zur verbesserten Kontraktilität der Myofilamente und einer schnelleren Depolarisation und somit letztendlich zur Herzfrequenzsteigerung und Erhöhung der Schlagkraft des Herzens. Diese Effekte nennt man positive Chrono- und Inotropie.

Die Deaktivierung des Rezeptors geschieht durch die Phosphorylierung des ADRB1 durch die G-Protein-Rezeptorkinase (GRK/ β ARK), welche von der PKA aktiviert wird, indem diese die Interaktion des stimulierenden G-Proteins und AC verhindert oder zum anderen durch Internalisierung des Rezeptors.[121]

β 1-Arrestin (Arrb1) bindet als kleines Adapter-Protein nach der Phosphorylierung durch GRK an den ADRB1 und blockt somit den weiteren G-Protein-abhängigen Signalweg und führt zur Internalisierung des Rezeptors durch Interaktion mit dem Zytoskelett.[122] Es konnte gezeigt werden, dass Arrb1 auch PKA-unabhängig einen CaMKII-vermittelten Signaltransduktionsweg anschaltet[123], welcher zur Phosphorylierung des PLN an Threonin17 (siehe Abb. 3) und zur Aktivierung proapoptotischer Signaltransduktionswege führt. Die proapoptotische Wirkung des ADRB1 wird über die PKA-unabhängige Aktivierung der CaMKII im Herzen vermittelt.[124] Die zytoplasmatische Calciumerhöhung als einer der zu Grunde liegenden Pathomechanismen ist unabhängig von PKA und intrazellulären

Calciumspiegeln[125], vermutlich spielt EPAC (*engl. exchange protein cAMP-activated*) hier eine entscheidende Vermittlerrolle[123]. Mit der Entdeckung der CaMKII als nachgeschalteten Signalweg des ADRB1 durch Baltas *et al.*[126] rückte eine neue Zielstruktur in den Mittelpunkt der Forschung.[127]

Zusätzlich kann es nach ADRB1-Stimulation Arrb1-vermittelt zur Interaktion und Aktivierung des EGFR (*engl. epidermal-growth-factor-receptors*) kommen.[128]

Dies führt PKA-unabhängig zur Aktivierung des ERK_{1/2}-Signaltransduktionsweges.[129](siehe Abb. 3) Arrb1 stellt somit einen interessanten Schnittpunkt zwischen der Aktivierung des ADRB1, als Signaltransduktionsweg der APost, der am RISK-Pathway beteiligten ERK_{1/2} und der CaMKII vermittelten proapoptotischen Signalkaskade dar. Man nennt die Arrb1-Aktivierung und die gleichzeitige Blockade des G-Protein-abhängigen Signaltransduktionsweges auch biased ligand. Für die ADRB-Blocker Aprenolol und Carvedilol konnte eine Aktivierung bei gleichzeitiger Blockade des Gns- vermittelten Signaltransduktion als sogenannte biased Liganden gezeigt werden, für Metoprolol als ADRB1-selektiver Blocker hingegen nicht.[130]

Die dauerhafte Aktivierung von ADRB1 ist proapoptotisch[131], wohingegen die langanhaltende Aktivierung des ADRB2 antiapoptotisch ist[132].

White *et al.* demonstrierte, dass der Erhalt des ADRB-Signalweges nach AMI die Entwicklung einer Herzinsuffizienz verzögert.[133] Die Aktivierung beider ADRB mit Isoproterenol führt sogar zur Reduktion des IRI vergleichbar der IPC und wird β -Präkonditionierung genannt.[134] Ebenso spielt sowohl der ADRB1 als auch der ADRB2 eine wichtige Rolle bei der IPC[64], der APC[63, 68] und APost[103].

Auf der anderen Seite führt die Aktivierung des ADRB über die ROS-Entstehung zur Apoptose[34] und stellt somit Teil des IRI-verursachenden

Pathomechanismus dar[135]. Welchen Stellenwert der PKA-abhängige bzw. unabhängige Signaltransduktionsweg daran hat, ist nicht abschließend geklärt.

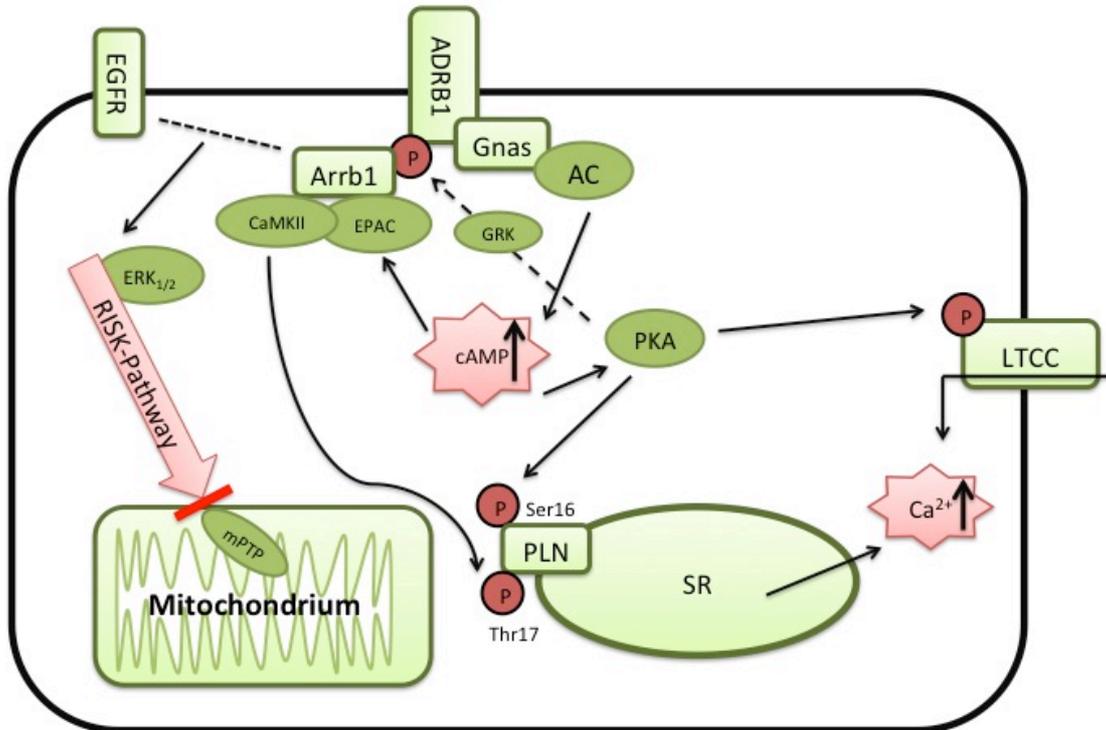


Abb. 3: Schematische Darstellung des ADRB1-abhängigen Signaltransduktionswegs

1.2.2. Pharmakologische Blockade der β -adrenergen-Rezeptoren im Menschen

ADRB-Antagonisten gehören zur Gruppe der Antihypertensiva und Antiarrhythmika und blockieren die ADRB des Herzens, sodass die Aktivierung der ADRB durch die Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin verhindert wird.

Man unterscheidet nicht-selektive von selektiven ADRB-Antagonisten, wobei es keine 100%ige Selektivität gibt. Die Selektiven blockieren vor allem die am

Herzen lokalisierten ADRB1 und nur zu einem sehr geringen Anteil die ADRB2, die sich vorwiegend auf den glatten Muskeln der Gefäße befinden.

Antagonisten am ADRB1 senken Blutdruck und Herzfrequenz und sind Mittel der ersten Wahl in der Therapie der Hypertension. Bluthochdruck ist mit einem erhöhten Risiko für Myokardinfarkt und kardiovaskulären Komplikationen assoziiert. Vor allem bei Komorbiditäten wie KHK[136], Herzinsuffizienz[137] und Zustand nach AMI[138] ist ein ADRB-Antagonist indiziert.

Dies hat auch Eingang in die Nationalen Versorgungsleitlinien zur Hypertonie[139], KHK[140] und Herzinsuffizienz[141] gefunden.

In der POISE-Studie zeigte sich, dass Patienten, die perioperativ Metoprolol erhielten, innerhalb von 30 Tagen postoperativ weniger Herzinfarkte hatten, aber die Anzahl der Todesfälle und Schlaganfälle höher war, als in der Kontrollgruppe.[142] Die perioperative Gabe von ADRB1-Antagonisten außerhalb herzchirurgischer Operationen hat Eingang in die Leitlinien der American Heart Association gefunden. Die Gabe wird für Patienten empfohlen, die vor OP schon ADRB-Antagonisten eingenommen haben (Evidenz Klasse I) und für Patienten mit Angina pectoris, KHK und individuellen Risikofaktoren die sich einer Hochrisiko-OP für kardiovaskuläre Ereignisse unterziehen (Evidenz Klasse IIa).[143,144] Ein Benefit durch ADRB1-Blockade bei nicht-herzchirurgischen Operationen konnte von Angeli *et al.* nur für Hochrisikopatienten gefunden werden, hatte aber keinen Einfluss auf die Mortalität.[145, 146]

Der perioperative Einsatz von ADRB-Antagonisten bedarf somit einer differenzierten Betrachtung unter Berücksichtigung des Patientenprofils.

1.2.3. Der ADRB1-Antagonist und Kardioprotektion

1980 konnte Warltier *et al.* zeigen, dass die Gabe von Propranolol und Bevantolol eine Reduktion des Infarktgebietes bis zu 50% bewirkt.[147] Die Blockade des ADRB1 während Okklusion und Reperfusion ist kardioprotektiv, aber eine ADRB1-Blockade nach IPC hat keinen Einfluss auf die IS.[135] Eine ADRB1-Blockade mit Metoprololdosen von 1.75 und 2.5mg/kg KG (Körpergewicht) reduziert signifikant die IS, hebt jedoch die APC durch Desfluran auf.[86] Eine alleinige ADRB2-Blockade hat keinen Einfluss auf die IS, hebt aber die APC auf.[68]

Eine kurzfristige Gabe von Esmolol, einem kurzwirksamen ADRB1-Antagonisten, zu Beginn der Reperfusion, ist nicht kardioprotektiv, hebt aber die APost auf. Wenn Esmolol über die komplette Zeit der Reperfusion gegeben wird, reduziert dieser allein die IS signifikant, vergleichbar der APost mit Desfluran. Eine zusätzliche Postkonditionierung mit Anästhetika bringt keinen additiven Effekt.[103]

Der Einfluss einer Langzeit-Blockade des ADRB1, wie man sie bei leitliniengerecht-behandelten KHK-, Herzinsuffizienz- und Hypertonie-Patienten findet, auf die APost wurde bisher noch nicht untersucht.

1.3. Fragestellung

Die Studienlage zur APost im Menschen ist unbefriedigend. Die Untersuchung zu interagierenden Kofaktoren bei KHK-Patienten mangelhaft.

Ziel dieser Arbeit war es, die ambivalente Rolle des ADRB1 durch Langzeitblockade in der Desfluran-induzierten Postkonditionierung im *in vivo*-Mausmodell und auf Veränderungen der Translation und Transkription des ADRB1 und der nachgeschalteten Signaltransduktionswege zu untersuchen.

Wir testeten folgende Hypothesen:

1. Die Langzeitapplikation von Metoprolol führt zu hämodynamischen Veränderung in der Maus.
2. Die Langzeitapplikation von Metoprolol führt zu transkriptionalen und translationalen Veränderungen der Expression von ADRB1 und der im Signaltransduktionsweg nachgeschalteten Proteine Arrb und Gnas.
3. Die Langzeit-Blockade β_1 -adrenerger Rezeptoren hebt die Herzinfarktgrößenreduktion durch Desfluran-induzierte Postkonditionierung auf.

2. Material und Methoden

2.1. Tierversuche

2.1.1. Tierversuchsgenehmigung und Tierhaltung

Der von uns durchgeführte Tierversuch wurde gemäß Tierversuchsantrag (Aktenzeichen 55.2-2531.01-11/10) durch die zuständige Behörde der Regierung Unterfrankens genehmigt.

Die „Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendete Tiere“ wurde stets geachtet und eingehalten.

Für unsere Tierversuche verwendeten wir männliche C57/BL6-Mäuse (Harlan Laboratories, Rossdorf, Deutschland) im Alter von acht bis zwölf Wochen. Die Tiere hatten Zugang zu Futter und Wasser, und wurden in einem Tag-Nacht-Rhythmus von je zwölf Stunden gehalten

2.1.2. Langzeitapplikation

2.1.2.1 Nicht-invasive-Blutdruckmessung

Die hämodynamischen Parameter Herzfrequenz und Blutdruck wurden nicht-invasiv mit der Tail-Cuff-Methode (Coda, Non-invasive blood pressure system standard, Kent Scientific, Torrington, Connecticut, USA)[148] gemessen, die auf der volumetrischen Bestimmung von diastolischem, systolischem und mittlerem Blutdruck, sowie Herzfrequenz am Schwanz der Mäuse beruht.

Zunächst wurde die Maus in eine durchsichtige aus Kunststoff bestehende Nasenkonushalterung gesetzt, welche auf eine Wärmeplatte zum konstant

Halten der Körpertemperatur bei 37°C gelegt wurde. Am Schwanz der Maus, der frei außerhalb der Halterung lag, wurde ein Verschluss-Cuff an der Schwanzwurzel und ein Volumen-Druck-Sensor (VPR-Cuff) am Schwanzschaft angebracht (siehe Abb. 4). Zur Akklimation und Beruhigung der Maus wurden nach 5min Liegezeit die Messungen gestartet.

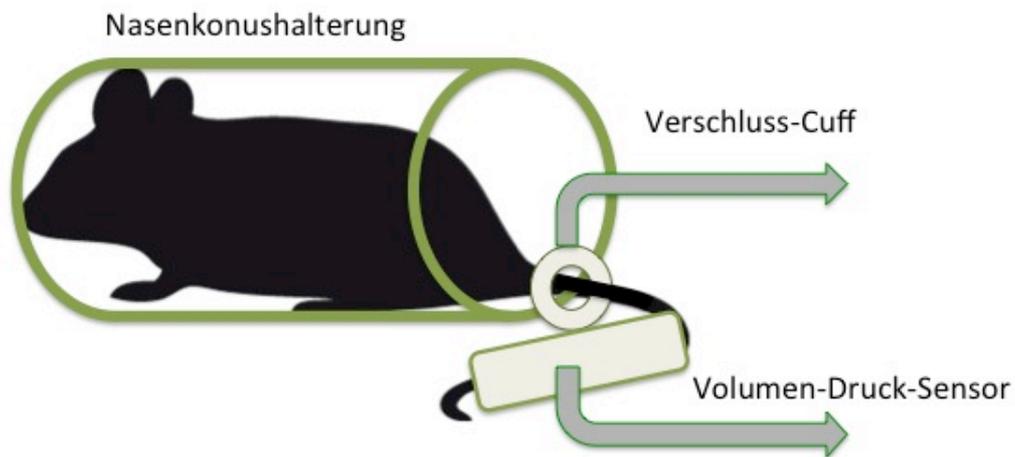


Abb. 4: Versuchsanordnung zur nicht-invasiven Blutdruckmessung
modifiziert nach Kent Scientific Corporation

Zu Beginn wurde der VPR-Cuff aufgepumpt, um das Blutvolumen aus dem Schwanz der Mäuse herauszupressen. Danach wurde zusätzlich der Verschlusscuff an der Schwanzwurzel aufgepumpt, der VPR-Cuff lag weiterhin am Schwanzschaft an. Durch stufenweise Deflation des Verschlusscuffs, konnte die Volumenkurve in Abhängigkeit des Verschlussdrucks dargestellt werden. Der Parameter Herzfrequenz wurde direkt gemessen, diastolischer und systolischer konnten direkt aus dem sigmoidalen Kurvenverlauf durch das System abgelesen werden (siehe Abb. 5). Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP, engl. mean arterial pressure) wurde berechnet.

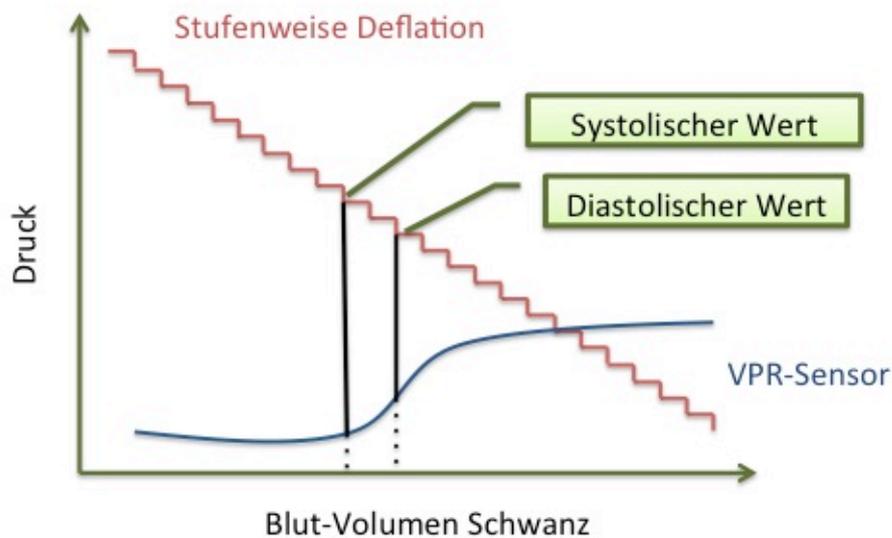


Abb. 5: Schematische der Darstellung der Druck-Volumen-Kurve zur Bestimmung der Blutdruckwerte
 modifiziert nach Kent Scientific Corporation

Ein Messzyklus beinhaltete 30 nacheinander durchgeführte Messungen, wovon die ersten zehn Messungen als Akklimatisationsmessungen verworfen wurden.

Mit dem Programm Coda Software (Kent Scientific, Torrington, Connecticut, USA) konnten die hämodynamischen Parameter bei 20 Messungen erhoben werden. Dieses Untersuchungsprotokoll wurde in Vorversuchen entwickelt, sodass auch bei Fehlmessungen ein verlässlicher Mittelwert gebildet werden konnte.

Nach der Messung wurden die Tiere wieder zurück in ihren Käfig gesetzt.

2.1.2.2. Implantation osmotischer Pumpen

Zur kontinuierlichen Applikation einer 0,9%igen Natriumchlorid (NaCl)-Lösung (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) oder des β -Blockers

Metoprololtartrat (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, USA in 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst) wurden osmotische Pumpen (Alzet 1004, Alzet, Cupertino, California, USA) implantiert.[149]

Das Funktionsprinzip dieser Pumpen beruht auf dem osmotischen Gradienten zwischen Pumpe und Gewebe. Die Pumpe besteht aus einer äußeren semipermeablen Hülle und einem inneren, mit dem zu applizierenden Medikament befüllten, impermeablen Gehäuse. Durch Osmose diffundiert Flüssigkeit aus dem Gewebe in die Pumpe zwischen innere und äußere Membran. Der Druck innerhalb der Pumpe steigt und sorgt für eine kontinuierliche Freisetzung des Medikaments aus dem Medikamentenreservoir über einen am oberen Pol befindlichen Fluss-Moderator (siehe Abb. 6). Nach Herstellerangaben verwendeten wir Pumpen mit einer kontinuierlichen Freisetzungsrate von $0,11\mu\text{l/h}$ und mindestens vier Wochen Funktionsfähigkeit.

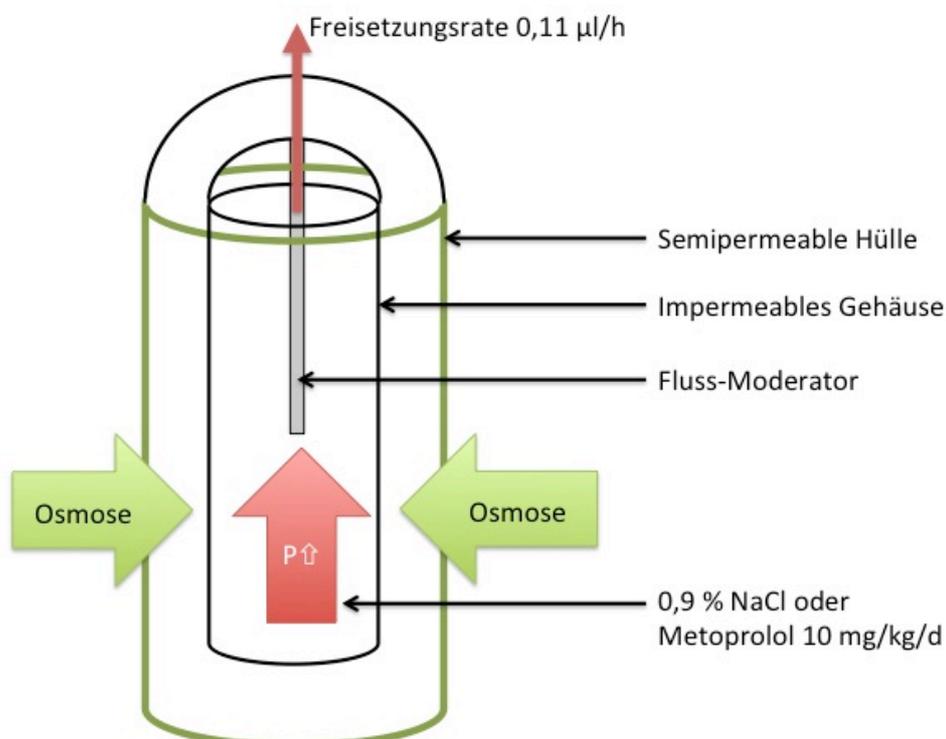


Abb. 6: Schematische Darstellung einer osmotischen Pumpe
modifiziert nach Alzet® osmotic pumps

Die Mäuse wurden gewogen (R180D-D1, Sartorius GmbH, Göttingen). Die Befüllung der Pumpen mit Metoprolol erfolgte gewichtsadaptiert, sodass die Substanz bei o.g. kontinuierlicher Laufrate mit einer Dosierung von 10mg/kg/d Metoprololtartrat in 0,9% NaCl-Lösung gelöst oder ein vergleichbares Volumen 0,9% NaCl-Lösung appliziert wurde.

Die Zuordnung zur Kontroll- oder Metoprolol-Gruppe erfolgte randomisiert. In Isofluran-Narkose mit einem MAC von 1,0 (entspricht 1,3 Volumenprozent Isofluran expiratorisch)[150] erhielten die Mäuse rechts dorsal paramedian mittels Schere (FST 14088-10, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland) einen Hautschnitt. Mit einer Klemme (FST 13008-12, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland) wurde im subkutanen Fettgewebe stumpf eine Tasche präpariert. Die osmotischen Pumpen wurden mit dem Moderator voran nach kranial vorgeschoben und unter Adaptation der Wundränder mit einem monofilen nicht-resorbierbaren Faden (Prolene 6.0, Ethicon inc., Somerville, New Jersey, USA) mittels Einzelknopfnähten verschlossen.

2.1.2.4. Protokoll Langzeitapplikation

Entsprechend unserem Versuchsprotokoll erhielten die Mäuse zehn nicht-invasive Blutdruck- und Herzfrequenzmesszyklen, davon zwei Messreihen vor und acht nach Pumpenimplantation (siehe Abb. 7).

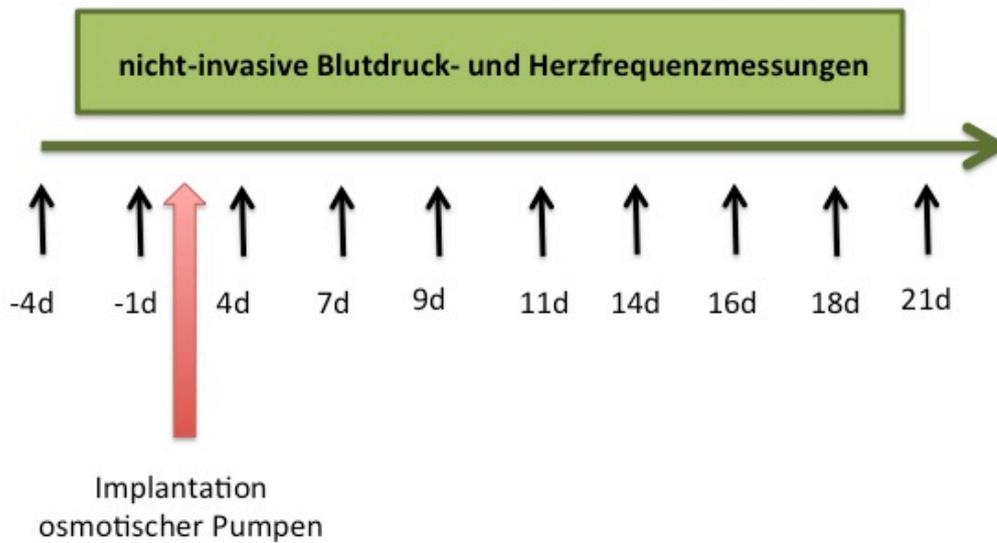


Abb. 7: Zeitpunkte der nicht-invasiven Blutdruckmessungen

2.1.3. In vivo Herzinfarktmodell der Maus

2.1.3.1. Narkose und Instrumentierung

Die Einleitung der Narkose erfolgte mit einer intraperitonealen Injektion von Pentobarbital mit der Dosierung 0,06mg/g KG (1,9ml Pentobarbital, Merial, Hallbergmoos, Deutschland in 50ml NaCl). Während des kompletten Eingriffs wurde mittels des Pfoten-Wegzieh-Reflexes die Narkosetiefe überwacht und bei Bedarf 0,015mg/g KG Pentobarbital intraperitoneal nachgegeben.

Die narkotisierte Maus wurde in Rückenlage auf eine Wärmeplatte (TKM-0902, Fohr Medical Instruments GmbH, Seeheim, Deutschland) gelegt und zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur von 37°C wurde ein Messfühler anal platziert (rückgekoppelte Regelung: Fohr Medical Instruments GmbH, Seeheim, Deutschland). Mit einer gebogenen Peanklemme (BD312R, Aesculap, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wurde der Ober- und

Unterkiefer auseinander gehalten und die Maus mit einem 22-G-Venenverweil-Katheter (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) intubiert und druckkontrolliert bei 32-34mm Wassersäule mit 50% Raumluft und 50% Sauerstoff beatmet (SAR-830/p-Ventilator, CWE, Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, Deutschland). An allen Extremitäten wurden Elektrokardiogramm(EKG)-Elektroden (Föhr Medical, Seeheim, Deutschland, Verstärker: Föhr Medical Instruments, Seeheim, Deutschland) angebracht und die Herzstromkurve abgeleitet.

Alle weiteren operativen Maßnahmen wurden unter mikroskopischer Sicht (OPMI-9-FC, Carl-Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt.

Zur Ableitung der arteriellen Drücke wurde in die Arteria carotis ein Polyethylen(PE)-Katheter (0,58-0,96mm PE-Schlauch, Hartenstein, Würzburg, Deutschland, Druckwandler: Combitrans, B. Braun, Melsungen, Deutschland) gelegt. Zum Anschluss eines Perfusors (PHD 2000 Infusion, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) zur Volumensubstitution (20µl/g KG/h) mit balancierter Elektrolytlösung (Sterofundin, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wurde die Vena jugularis der gleichen Seite mit einem PE-Katheter versehen. Zur Präparation dieser Gefäße wurde zunächst ein Hautschnitt vom Os hyoideum zum Manubrium sterni gesetzt und unter Schonung der Speicheldrüsen und des im Gefäß-Nerven-Strang befindlichen Nervus Vagus die Gefäße freigelegt. Zwischen einer kranialen und kaudalen Ligatur wurde die A. carotis mit einer Federschere (FD242R, Aesculap, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) punktiert und der PE-Katheter unter die kaudale Ligatur geschoben. Analog wurde mit der V. jugularis verfahren. Die Hautwunde wurde mit einem nicht resorbierbaren monofilen Faden (5.0 Prolene, Ethicon inc., Somerville, New Jersey, USA) mittels Einzelknopfnähten verschlossen.

2.1.3.2. Präparation des Herzens

Zur Darstellung des Herzens wurde ein Hautschnitt mit einer Schere (FST 14088-10, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland) von der Axilla zum Xiphoid gesetzt. Mittels eines Elektrokauters (FST 18000-00, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland) wurde der Musculus pectoralis maior sternal abpräpariert und unter eine Hauttasche geschoben. Die Brusthöhle wurde mit einer gebogenen Pinzette im vierten Interkostalraum stumpf eröffnet und die vierte Rippe mittels Elektrokauter vom Sternum gelöst. Das Pericard wurde eröffnet und der prominente Ast der linken Koronararterie (LAD, *engl. left anterior descending*) konnte dargestellt werden, welcher dem Ramus interventricularis anterior entspricht. Die Handseide (6.0 Perma-Handseide, Ethicon inc., Somerville, New Jersey, USA) wurde hinter den LAD gelegt und beide Enden gemeinsam mit einem Okkluder (2mm langer Silikonschlauch) versehen. Um die Flüssigkeitsverluste aus dem OP-Gebiet während des Versuches zu minimieren, wurde das OP-Gebiet mit einer Membran abgedeckt.

2.1.3.3. Protokoll In vivo Herzinfarktmodell

Nach einer 30-minütigen Baseline-Phase unter Kontrolle aller hämodynamischen Parameter und der Narkosetiefe, wurde der LAD für 45min mit den Okkludern reversibel verschlossen. Danach schloss sich eine 180-minütige Reperfusionphase an (*siehe Abb. 8*).

Tiere der Postkonditionierungsgruppe erhielten, beginnend 3min vor Reperfusion, über 18min Desfluran mit einem MAC von 1,0. Kontrolltiere erhielten keine weitere Intervention.

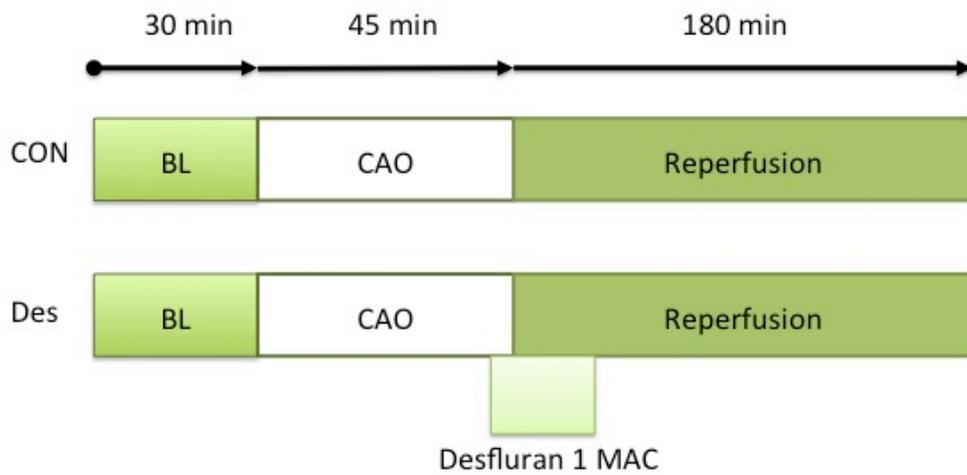


Abb. 8: Protokoll zur Postkonditionierung

CON: Kontrollgruppe, Des: Postkonditionierungsgruppe mit Desfluran MAC 1,0, BL: Baseline, CAO: Phase der Koronarokklusion

2.1.3.4. Induktion der Ischämie und Reperfusion

Der Okkluder verschloss, durch statischen Zug zweier hängender Gewichte an der Handseide, reversibel den LAD. Dabei war eine Abblassung des vom LAD abhängigen Myokards sowie ST-Hebungen im EKG zu beobachten.

Durch Lösen der hängenden Gewichte konnte der LAD wieder perfundiert werden. Im Reperfusionsgebiet konnte eine Hyperämie beobachtet werden. Die ST-Strecke war isoelektrisch bzw. zum Teil senkend.

2.1.3.5. Postkonditionierung

Tiere, die nach Protokoll postkonditioniert wurden, erhielten über einen Vapor (Devapor Type M32600, Dräger Medical GmbH, Lübeck, Deutschland) Desfluran (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) mit einem MAC von 1,0 (entspricht 7,5 Volumenprozent Desfluran expiratorisch)[151] . Kontrolltiere erhielten weiterhin ein Gemisch aus 50% Raumluft und 50% Sauerstoff. Die Zuordnung zur Kontroll- oder Interventionsgruppe erfolgte randomisiert.

2.1.4. Organentnahme

2.1.4.1. Organentnahme für molekularbiologische Untersuchung

Der LAD wurde erneut proximal fest mit Handseide verschlossen. Über den arteriellen Zugang wurden 0,7ml Heparin mit 500IE/ml (25 000 IE, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) und 0,5ml Evans-blue (0.1g/ml Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, USA) appliziert.

Mit einer letalen Dosis Pentobarbital intraperitoneal wurde die Maus euthanasiert.

Nach Absetzen der großen Gefäße, wurde das Herz aus der Brusthöhle entnommen und zum Reinigen von Blut in Eiswasser gegeben. Die Atrien wurden abpräpariert und das Herz am Septum in linken und rechten Ventrikel geteilt. Der linke Ventrikel wurde in ein Mikroreagenzgefäß (Safe-Seal-Gefäß 1,5ml, Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht, Deutschland) gegeben und sofort in Stickstoff gefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.1.4.2. Organentnahme und Infarktgrößenbestimmung

Zur Bestimmung der Infarktgrößen wurden die linken Ventrikel in einem Mikroreagenzgefäß für 25min bei -25°C (Philipp Kirsch GmbH, Offenburg, Deutschland) gefroren. Danach wurde dieser mit Rasierklingen (Klingen mit Griffschutz, Hartenstein, Würzburg, Deutschland) in 1mm dicke Scheiben geschnitten.

Das nicht mehr perfundierte Areal der LAD stellte sich blass dar, wohingegen sich das perfundierte Myokard durch Evans-Blue blau färbt. Um bei der Auswertung noch vitales Risikoareal von Infarkt zu unterscheiden, wurden die Gewebescheiben in farblosem Triphenyltetrazolimchlorid (TTC) (100mg TTC/l in Phosphatpuffer, pH 7,4; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St.Louis, Missouri, USA) für 25min inkubiert und in 3,5%iger Formaldehydlösung (Otto Fischer GmbH Co. KG, Saarbrücken, Deutschland) über 12h fixiert.

Vitales Myokard mit Enzymaktivität reduzierte das farblose TTC zu rotem Formazan. In nekrotischem Myokard ohne metabolische Aktivität findet dieser Redoxvorgang bzw. Farbumschlag nicht statt. Die Area at risk (AAR) bezeichnet

die Gesamtheit des noch vitalen Risikoareals und des bereits nekrotischen Gewebes.

Für die gravito-planimetrische Auswertung, wurde jede Gewebescheibe fotografiert (Finepix S3 Pro, Fujifilm, Tokyo, Japan; Blitz: Sigma Ringblitz EM 140 DG NA-ITTL) und gewogen.

Am Computer (Adobe Photoshop CS 8.0.1 Elements, Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) wurde die AAR und die IS ausgemessen und der prozentuale Anteil des IS am AAR berechnet.

2.1.5. Experimentelles Protokoll

Nachfolgend sind unser experimentelles Protokoll über 25 Tage sowie die Subgruppen zusammenfassend dargestellt.

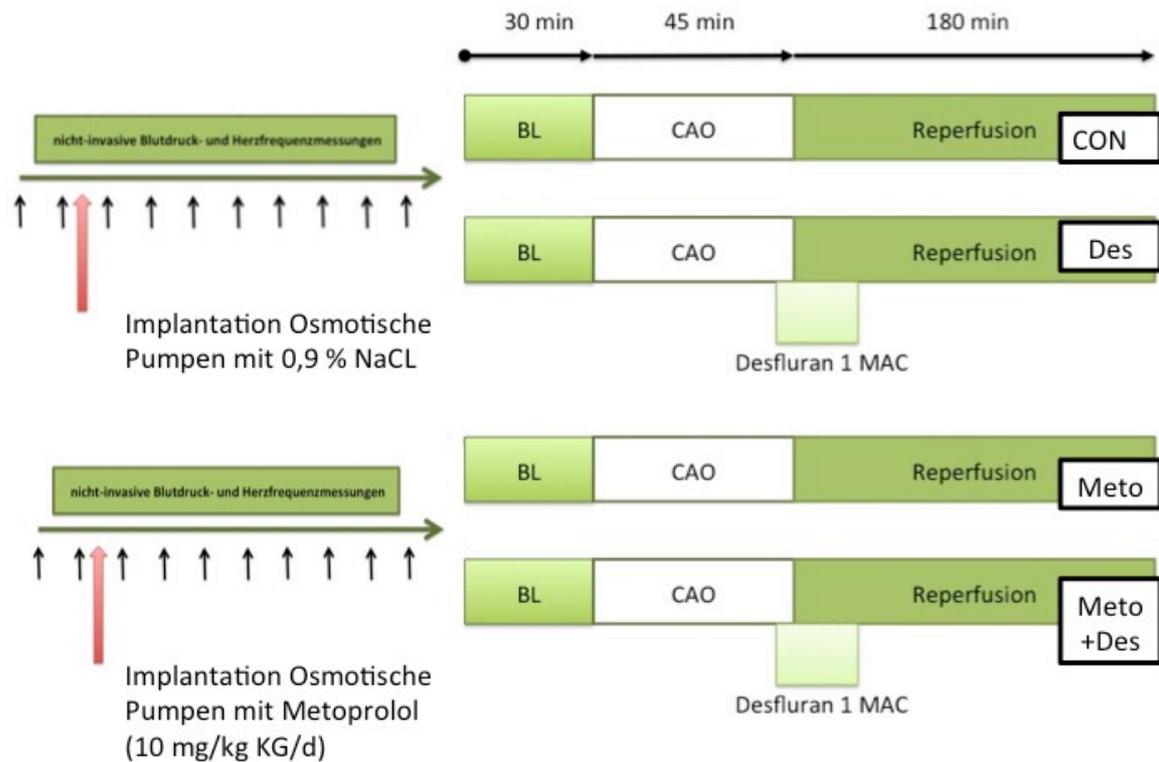


Abb. 9: Experimentelles Protokoll zur Untersuchung des Einflusses einer β_1 -adrenergen Langzeitblockade auf die Desfluran-induzierte Postkonditionierung

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Western Blot

2.2.1.1. Herstellung der Lysate

Zur Durchführung der Western Blots wurden die linken Ventrikel durch Lyse weiter aufgearbeitet. Unter Eiskühlung wurden diese mit 500µl RIPA-Puffer und Proteaseinhibitor versetzt und im Douncer bei 1000rpm (RW14 basic, IKA, Staufen, Deutschland) homogenisiert. Nach einmaligem Zentrifugieren (Zentrifuge 5418R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 4°C und 12 000g für 5min, wurde der Überstand, das Ganzzelllysat, in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und bei -80°C aufbewahrt.

RIPA-Puffer

0,5ml	1% Igepal CA 630 (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, USA)
0,25g	0,5% Sodium deoxycholate (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, USA)
0,05g	0,1% SDS (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, USA)
49,5ml	PBS (PBS Dulbecco, Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

zu 10ml RIPA-Puffer eine Tablette Proteaseinhibitor (Complete, mini Protease-Inhibitor Cocktail, Roche, Mannheim, Deutschland)

2.2.1.2. Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde das BCA Protein Assay Kit (BCA Protein Assay, Pierce, Thermo Scientific Inc., Rockford, USA) verwendet. Vor Beginn wurde eine Verdünnungsreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) angefertigt, welche als Standardkurve für die

Proteinkonzentrationsbestimmung diente. In eine Mikrottestplatte (96-well, F-Form, Hartenstein, Würzburg, Deutschland) wurden die Ganzzelllysate mit RIPA-Puffer im Verhältnis 1:10 gegeben und mit 200µl Reaktionsreagenz, welches aus Reagenz A und B im Verhältnis 1:50 gemischt wurde, versetzt. Nach 3min auf dem Kreisschüttler (Vibrax VXR, KA, Staufen, Deutschland), wurden die Proben für 30min bei 37°C inkubiert (Forma- Scientific Steri-Cult 200, Thermo-Scientific Inc., Rockford, USA). Danach wurde der Microplate Adsorbance Reader (Sunrise, Tecan, Männedorf, Schweiz) bestückt und mit dem Programm Magellan (Magellan, Tecan, Männedorf, Schweiz) die Messung durchgeführt und ausgewertet. Die Untersuchung beruht auf der Konzentrations-abhängigen Absorption des Lichts der Wellenlänge 562nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen. Zur Aufbewahrung und Konservierung der Proben wurde Lämmli-Puffer im Verhältnis 1:3 hinzugegeben.

Die Proben wurden bei -80°C aufbewahrt.

Lämmli-Puffer

4g	SDS (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, USA)
20ml	40% Glycerol (Serva, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein, Deutschland)
0,002g	0,004% Bromophenol blue (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, USA)
12,5ml	1 M Tris HCl pH 6,8 (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
vor Gebrauch dazugeben	6% β-Mercapto-Ethanol (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, USA)

2.2.1.3. Elektrophorese und Western Blot

Zu Beginn wurden die Glasplatten (MiniPROTEAN 3 System Glass plates 1,5mm, BIORAD Laboratories Inc., Hercules, California, USA) mit Ethanol von Protein- und Gelresten gereinigt. Es wurde das 10% SDS-PAGE (*engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) -Trenngel mit 1,5mm Dicke gegossen und 1cm hoch mit Wasser überschichtet. Nach Auspolymerisation des Trenngels wurde das Wasser vollständig entfernt und durch ein Sammelgel ersetzt, in welches vor Auspolymerisation ein 15er-Kamm (MiniPROTEAN Comb 15 well 1,5mm, BIORAD Laboratories Inc., Hercules, California, USA) gesteckt wurde. Nach Auspolymerisation des Sammelgels wurde dieser entfernt und hinterließ geformte Geltaschen. Die Elektrophoresekammer (Mini-Protean 3, BIORAD Laboratories, Hercules, California, USA) wurde zusammengesetzt, mit Elektrophorese-Puffer befüllt und die Geltaschen vorsichtig mit einer Pipette (Eppendorf Reference, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gespült, um Gelreste zu entfernen.

Nachdem die Proben auf Eis aufgetaut waren, wurden die verschiedenen Volumina der Proben mit jeweils 20µg Protein mit einer Pipette in ein neues Mikroreagenzgefäß überführt und bei 95°C für 5min (Dri-Block DB2A, Techne, Staffordshire, UK) denaturiert, anschließend für 3min bei 10000 rpm (Zentrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) auf den Boden des Gefäßes zentrifugiert. Die Proben sowie 3µl Proteinmarker (PeqGold Proteinmarker V, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) wurden vorsichtig mit einer Pipette nebeneinander in die Geltaschen eingefüllt.

Die Proben liefen im SDS-Page-Gel bei einer angelegten Spannung von 90V 20min aus dem Sammelgel und bei 125V 75min bis an das untere Ende des Trenngels.

Die aufgetrennten Proteine im Gel wurden bei 15V für 90min auf eine Nitrozellulosemembran (PROTRAN Nitrocellulose Transfer-Membran, Whatman, Maidstone, UK) geblottet (Biometra fastblot B44, Biometra, Göttingen, Deutschland). Die Membran wurde zuvor in Transferpuffer eingeweicht. Zum Blockieren der freien Proteinbindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran, wurde diese für 1h in einer TBS-Lösung aus 2,5% BSA (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, USA) und 2,5% Milchpulver (non-fat dry Milk, Biorad Laboratories Inc, Hercules, California, USA) geblockt.

Trenngel 10%

4ml	H ₂ O (Aqua, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
2,5ml	1,5M Tris pH 8,8 (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
100µl	10% SDS (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, USA)
3,33ml	Acrylamid (Rotiphorese Gel 30, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
100µl	10% APS
10µl	TEMED (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, USA)

Sammelgel

2,85ml	H ₂ O (Aqua, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
1,25ml	0,5M Tris pH 6,8 (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
50µl	10% SDS (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, USA)
850µl	Acrylamid (Rotiphorese Gel 30, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
50µl	10% APS
5µl	TEMED (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, USA)

Elektrophoresepuffer

60,4g	Tris (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
-------	---

288g Glycine (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)

20g SDS (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, USA)

auf zwei Liter mit destilliertem Wasser (Aqua, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) auffüllen

Transferpuffer

117g Glycine (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)

211g Tris (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)

auf vier Liter mit destilliertem Wasser auffüllen

TBS

84,798g Tris (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)

63,62g NaCl (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, USA)

auf vier Liter mit destilliertem Wasser auffüllen

mit HCl (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) auf pH 7,6 titrieren

2.2.1.4. Antikörper und Entwicklung

Der Primärantikörper gegen die Ladekontrolle Glycerin-Aldehyd-3-Dehydrogenase (GAPDH) mit einer Molekularmasse von 38kDa (Anti-GAPDH mouse IgG clone 6C5, Milipore, Billerica, Massachusetts, USA) wurde im Verhältnis 1:2000 und gegen den ADRB1 mit 65kDa (beta1-AR rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA) im Verhältnis 1:1000 in 0,5% BSA-Lösung gegeben und über Nacht mit der Nitrozellulosemembran bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Primärantikörper ausgewaschen. Hierfür wurde die Membran in TBS-Lösung 5min auf dem Schüttler gespült, dieser Vorgang wurde mit Austausch gegen neue TBS-Lösung noch zweimal wiederholt.

Danach wurden die Sekundärantikörper anti-mouse (horseradish ECL-anti-mouse IgG from sheep, GE Healthcare UK, Hertfordshire, UK) und anti-rabbit (horseradish ECL-anti-rabbit IgG from donkey, GE Healthcare UK, Hertfordshire, UK) im Verhältnis 1:5000 in 0,5% BSA-TBS-Lösung für eine Stunde mit der Membran inkubiert. Dann erfolgte ein erneuter Waschschrift mit TBS-Lösung für 15min. Die Sekundärantikörper sind gegen den Fc (*engl. fragment crystallizable*, konstanter Abschnitt des Immunglobulins)-Teil der Primärantikörper gerichtet und am eigenen Fc-Teil mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, welcher die Elektro-Chemilumineszenz (ECL)-Reaktion vermittelt.

Die hierfür notwendige ECL-1 und 2 Lösung wurde im Verhältnis 1:1 gemischt und für 1min zur Membran gegeben. Im Imaging System (Fluor Chem FC2, Alpha Innotech, Santa Clara, California, USA) konnte die Chemilumineszenz, welche durch Oxidation von Luminol entsteht, gemessen und mit dem Programm FluorChem SP bearbeitet werden.

Die Auswertung erfolgte über eine densitometrische Quantifizierung der Banden mit dem Programm ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

ECL-1 Lösung

1ml Luminol

440µl p-Coumaric-Acid (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

5ml 1M Tris HCl pH 8,5 (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)

auf 50ml mit destilliertem Wasser auffüllen, lichtgeschützt lagern

ECL-2 Lösung

5ml 1M Tris HCl pH 8,5 (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)

32µl H₂O₂ (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, USA)

auf 50ml mit destilliertem Wasser auffüllen, lichtgeschützt lagern

2.2.2. Real-Time-PCR

2.2.2.1. Herstellung der Lysate

Zur Quantifizierung des mRNA-(*engl. messenger RNA*) Gehalts für ADRB1, Arrb1 und Gnas wurden rechte Ventrikel der Maus untersucht. Für die Lyse und die RNA-Isolierung wurde das Nucleospin RNAII Kit von Macherey Nagel (740955.250, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) verwendet.

Nach Zugabe von 350µl RA1-Lyse-Puffer wurde das Probenmaterial im Homogenisator (RW 14 basic, IKA, Staufen, Deutschland) bei 1000rpm unter Eiskühlung homogenisiert, in beschriftete Mikroreagenzgefäße überführt und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2.2. RNA-Isolierung und Quantifizierung

Die Lysate wurden auf Eis aufgetaut. Danach wurde bei Raumtemperatur die RNA-Isolierung durchgeführt. Unter dem Abzug wurde zu jeder Probe 3,5µl β-Mercapto-Ethanol (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, USA) gegeben und in ein neues Cap mit Filter überführt. Bei 11 000g wurden diese 1min zentrifugiert (Zentrifuge 5418R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Das Lysat oberhalb des Filters sammelte sich durch die Zentrifugalkräfte am Boden des Caps. Der Filter mit den darin zurückgebliebenen Gewebebestandteilen wurde verworfen.

Zur filtrierten Suspension wurde 350µl 70% Ethanol zugegeben und durchmischt. Das Gemisch wurde in ein neues Cap mit RNA-adsorbierendem Filter überführt und erneut bei 11000g für 1min zentrifugiert, dadurch band die

RNA (*engl. ribonucleinacid*) an die Filtersäule und das Eluat konnte verworfen werden.

Zum Entsalzen werden 350µl MDB-Puffer auf die Säule pipettiert und wieder unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Zum DNA-Verdau wurde 95µl DNase-Mix direkt auf die Filtersäule gegeben und 15min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nachdem DNA (*engl. desoxyribunucleinacid*)-Verdau erfolgten drei Waschschrirte. Zur Inaktivierung von rDNase wurde zuerst 200µl RA2-Puffer auf die Säule gegeben und bei 11000g für 30s zentrifugiert, danach wurde der Filter in ein neues Cap gesteckt und nach Zugabe von 600µl RA3-Puffer erneut für 30s bei 11000g zentrifugiert. Das am Boden befindliche Filtrat wurde verworfen und auf die Säule erneut 250µl RA3-Puffer gegeben und für 2min bei 11000g zentrifugiert.

Um die gewaschene RNA aus der Filtersäule zu lösen, wurde diese in ein steriles Mikroreaktionsgefäß gesetzt und mit 30µl nukleasefreiem Wasser versetzt, 1min inkubiert und dann bei 11000g 1min zentrifugiert. Unter Beibehaltung des Volumens wurde erneut 20µl nukleasefreies Wasser zugegeben, inkubiert und zentrifugiert.

Die RNA-Konzentration der sich am Boden des Mikroreagenzgefäßes befindlichen RNA-Lösung wurde Hilfe des Spektrophotometers NANO-DROP (NANO-DROP 2000, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) bestimmt. Als Nullwert wurde nukleasefreies Wasser untersucht. Die Konzentrationsbestimmung beruht auf der Extinktionsmessung bei 260nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren.

2.2.2.3. cDNA-Synthese

Die cDNA (*engl. complementary desoxyribunucleinacid*)-Herstellung wurde mit dem High Capacity cDNA Reverse Transkriptase Kit von Applied Biosystems (4368814, Applied Biosystems, Forster City, Kalifornien, USA) durchgeführt.

Zur cDNA- Synthese waren 130ng RNA nötig. An Hand der Konzentration wurde die entsprechende Menge pipettiert und auf 10µl Gesamtvolumen mit nukleasefreiem Wasser aufgefüllt.

Zu jeder Probe wurde 10µl Master-Mix zugegeben, der aus folgenden Reagenzien bestand:

2µl	10fach RT-Puffer
0,8µl	25fach dNTP-Mix
2µl	10fach RT Random Primers
1µl	Reverse Transcriptase
1µl	RNAse-Inhibitor
3,2µl	H ₂ O nukleasefrei

Mit dem 20µl Ansatz aus Master-Mix und Probe wurde im PCR-Cycler (2720 ThermoCycler, Applied Biosystems, Forster City, Kalifornien, USA) cDNA hergestellt. Dabei wurden folgende Schritte einmal durchlaufen: 1. 10min bei 25°C, 2. 120min bei 37°C, 3. 5min bei 85°C und 4. auf 4°C herabgekühlt. Zum Schluss wurde 45µl nukleasefreies Wasser zugegeben und die cDNA-Lösung bei -25°C eingefroren.

2.2.2.4. Real-Time-PCR

Für die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) wurde das Kit von Thermo Scientific AB 1138 (Thermo Scientific Inc., Rockford, USA) verwendet.

Es wurden 2 Master-Mixes hergestellt, für jede Probe jeweils 20µl :

Master-Mix 1

12,5µl	Absolute qPCR-Rox-Mix (Thermo Scientific Inc., Rockford, USA)
6µl	H ₂ O nukleasefrei (Ambion, Applied Biosystems, Forster City, Kalifornien, USA)
1,5µl	Sonde 18s – FAM (4352930E, Human Euk 18s rRNA, Applied Biosystems Life Technologies Corporation, Warrington, UK)

Master-Mix 2

12,5µl	Absolute qPCR-Rox-Mix (Thermo Scientific Inc., Rockford, USA)
6µl	H ₂ O nukleasefrei
1,5µl	Sonde (Applied Biosystems Life Technologies Corporation, Forster City, Kalifornien, USA)
	ADRB1: Mm00431701_S1
	Gnas: Mm01242435_M1
	Arrb1: Mm00617540_M1

In eine PCR-Platte (0,2ml Semi-Skirted, 96-well PCR-Plate, Thermo Scientific Inc., Rockford, USA) wurde zuerst 20µl Mastermix und dann 5µl cDNA-Probe gegeben und mit einer Pipette mit Filterspitzen (Biosphere-Filter Tips, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) durchmischt.

Jede Probe wurde sechsmal aufgetragen, ein Triplet mit jeweils 20µl Master-Mix 1 versetzt, um als Kontrolle mit der 18s-Sonde die Konstanz der RNA-

Menge zu kontrollieren und ein zweites Triplet mit 20µl Master-Mix 2, welcher die entsprechende Sonde für die zu untersuchende mRNA enthielt. Aus den drei Werten wurde für jede Probe ein Mittelwert berechnet. Als Negativkontrolle wurde nukleasefreies Wasser statt cDNA zum Mastermix gegeben und gemessen.

Die PCR-Platte wurde mit einer Folie (Adhesive, Sealing Sheet, Thermo Scientific Inc., Rockford, USA) dicht verschlossen und in der Plattenzentrifuge (Perfect Spin, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) 10s zentrifugiert. Die qRT-PCR wurde im Thermo-Cycler (7300 Real-Time-PCR - System, Applied Biosystems Biotechnologies Corporation, Forster City, Kalifornien, USA) durchgeführt und mit dem Programm Sequence Detection Software Version 1.4 ausgewertet.

Hier wurden folgende Stufen durchlaufen: 1. 15min bei 95°C, 2. 15s bei 95°C, 3. 1min bei 60°C und 4. auf 4°C abkühlen. Die Schritte zwei und drei wurden in 50 Zyklen nacheinander durchlaufen.

Die Bestimmung des mRNA-Gehaltes beruht auf der Messung des Fluoreszenzsignals am Ende der Elongation jedes Zyklus. Das Signal entsteht durch die räumliche Trennung des fluoreszierenden Rezeptorfarbstoffes der Sonde von seinem unterdrückendem Quencherfarbstoff, welches durch die 5'Exonukleaseaktivität der Polymerase am Ende der Elongation vermittelt wird. Mit Hilfe der Standardkurve konnte die relativ quantitative Bestimmung des mRNA-Gehaltes erfolgen. Die Standardkurve stellte die Probe eines unbehandelten Tieres dar, welche den Referenzwert eins erhielt.

2.3. Statistik

Die Power-Analyse zur Anzeige eines signifikanten Unterschiedes bei vorausgesetztem Signifikanzniveau und erwarteter Standardabweichung ergab für die Bestimmung der Herzinfarktgröße eine Gruppengröße von $n=6$ und für die molekularbiologischen Untersuchungen von $n=4$.

Die Aufzeichnung des MAP, der Herzfrequenz und der Körpertemperatur während der Operation erfolgte kontinuierlich mittels eines Personalcomputers und einer kommerziellen Software (Notocord hem 3.5, Notocord Systems, Croissy sur, Seine, Frankreich). Die aufgezeichneten Daten wurden mit Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA) ausgewertet. In gleicher Weise wurde mit den Daten der nichtinvasiven Blutdruckmessungen verfahren.

Die Analyse der durch Messwiederholung erhobenen Daten zur Langzeit-Betablockade erfolgte mittels Greenhouse-Geisser-Test. Bei Messwiederholungen erfolgte die Bonferroni-Korrektur des Signifikanzniveaus. Unterschiede wurden als statistisch signifikant bewertet, wenn sich $p < 0,05$ darstellte.

Zeigte sich ein signifikanter Unterschied, so wurde mittels Innersubjektkontraste innerhalb der Gruppen und Zeitpunkte nach Unterschieden zum Ausgangswert gesucht.

Die Auswertung der IS, der Ergebnisse des Western Blottings und der PCR erfolgte mittels Univarianter Varianzanalyse (ANOVA, *engl. analysis of variance*). Zeigte sich im ANOVA ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), so wurde mittels post-hoc-Duncan's-Test analysiert, zwischen welchen Gruppen ein signifikanter Unterschied bestand.

Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse Langzeitapplikation

Bei 50 Versuchstieren wurden über einen Zeitraum von vier Wochen die hämodynamischen Werte nicht invasiv gemessen. Die aus Vorversuchen ermittelte Herzfrequenzsenkung um mindestens 7% zum Ausgangswert war Einschlusskriterium für die weitere Instrumentierung zum *in vivo* Herzinfarktmodell. Hier mussten 16 Tiere ausgeschlossen werden, die dieses Kriterium nicht erfüllten und weitere 4 Tiere der Kontrollgruppe, weil sie vor Instrumentierung verstarben.

Innerhalb der Metoprolol-Gruppe (n=13) zeigte sich bereits ab der ersten postoperativen Messung (4d) eine permanente Reduktion der Herzfrequenz (#p<0,0056) im Vergleich zu Messungen vor Pumpenimplantation. Ein signifikanter Unterschied (*p<0,05) zeigte sich auch im Vergleich zur Kontrollgruppe (CON) (n=17), welche 0,9-%ige NaCl-Lösung erhielt.

Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen Metoprolol und CON vor Pumpenimplantation (*siehe Abb. 10*).

Die Langzeitapplikation von Metoprolol hatte keinen signifikanten Einfluss auf den MAP (*siehe Tab. 1*).

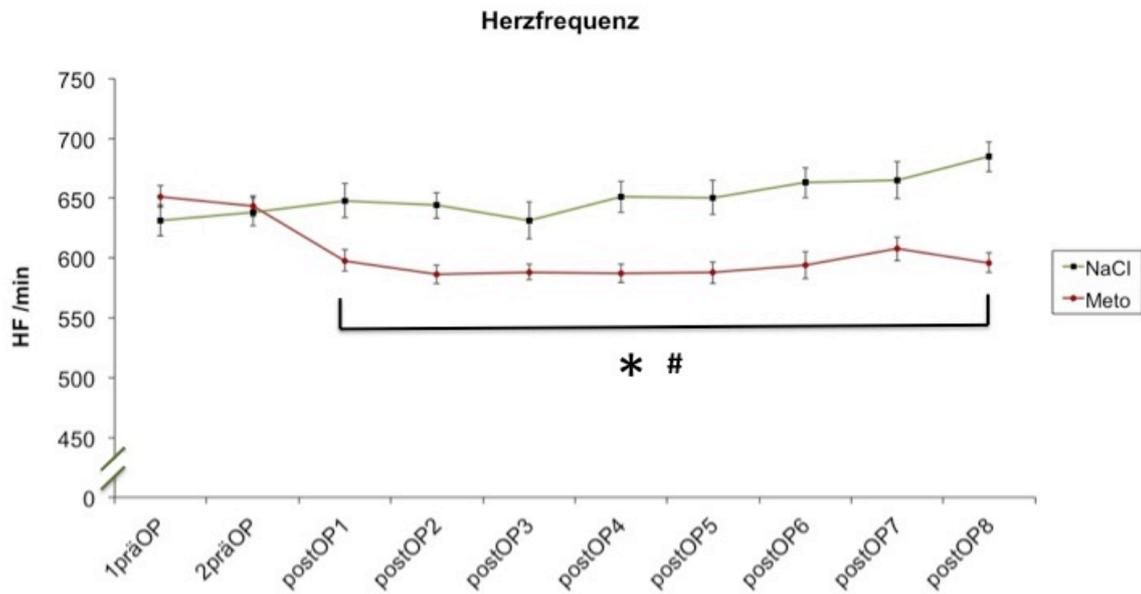


Abb. 10: Herzfrequenzreduktion durch Langzeitapplikation von Metoprolol

CON: Kontrollgruppe mit 0,9% NaCl (n=17), Meto: Gruppe mit Metoprolol 10mg/kg/d (n=13); #p<0,05 vs. NaCl, *p <0,0056 vs. Prä-Pumpenimplantation (präOP)

HF	1preOp	2preOP	postOP1	postOP2	postOP3
NaCl CON	649 ± 25	621 ± 17	643 ± 16	631 ± 17	642 ± 18
NaCl POST	613 ± 16	655 ± 26	633 ± 35	656 ± 17	622 ± 32
Meto CON	663 ± 13	663 ± 26	598 ± 24*	590 ± 16*#	598 ± 10*
Meto POST	661 ± 22	638 ± 26	584 ± 17*	548 ± 16*#	566 ± 13*
MAP					
NaCl CON	80 ± 3	90 ± 5	96 ± 7	88 ± 5	86 ± 3
NaCl POST	82 ± 4	89 ± 4	88 ± 2	93 ± 4	93 ± 4
Meto CON	85 ± 7	85 ± 4	90 ± 3	81 ± 5	80 ± 5
Meto POST	71 ± 5	81 ± 3	84 ± 4	73 ± 2	80 ± 3

HF	postOP4	postOP5	postOP6	postOP7	postOP8
NaCl CON	641 ± 22	656 ± 21	660 ± 19	627 ± 29	677 ± 21
NaCl POST	660 ± 30	671 ± 26	656 ± 30	705 ± 16	689 ± 24
Meto CON	587 ± 17*#	579 ± 13*#	544 ± 19*#	588 ± 13*#	576 ± 18*#
Meto POST	567 ± 18*#	549 ± 10*#	562 ± 16*#	574 ± 17*#	565 ± 16*#
MAP					
NaCl CON	86 ± 1	84 ± 2	96 ± 2	85 ± 3	88 ± 5
NaCl POST	89 ± 4	86 ± 6	85 ± 4	84 ± 6	89 ± 4
Meto CON	85 ± 6	85 ± 8	84 ± 6	87 ± 5	83 ± 6
Meto POST	85 ± 4	84 ± 5	82 ± 3	87 ± 7	83 ± 1

Tab. 1: Einfluss der Langzeitapplikation von Metoprolol auf Herzfrequenz und mittleren arteriellen Druck
#p<0,05 vs. NaCl, *p <0,0056 vs. Prä-Pumpenimplantation;
Mittelwerte+SEM

3.2. Ergebnisse der Infarktgrößenbestimmung

Es wurden 45 Versuchstiere instrumentiert, um 27 erfolgreiche Versuche abzuschließen.

18 Tiere wurden ausgeschlossen, weil die Größe der AAR außerhalb der Einschlusskriterien lag.

3.2.1. Hämodynamische Parameter während Ischämie und Reperfusion

Es gab keinen Unterschied zwischen den Gruppen hinsichtlich Herzfrequenz und MAP zu Baseline-Bedingungen. Während der Postkonditionierung kam es zu einem signifikanten Abfall der Herzfrequenz innerhalb der Meto+Des-Gruppe (* $p < 0,05$). Dahingegen zeigte sich im Vergleich zu allen anderen drei Gruppen keine Veränderung des MAP während des gesamten Versuchs. Hier konnte eine signifikante Reduktion des MAP (# $p < 0,05$) zum Zeitpunkt der Koronarokklusion (CAO), nach 60min, nach 120min und nach 180min im Vergleich zur Baseline beobachtet werden (siehe Tab. 2).

HF	Base	CAO	Post	60'	120'	180'
CON	473 ± 16	457 ± 8	458 ± 10	436 ± 7	446 ± 9	443 ± 9
Des	497 ± 12	459 ± 11	467 ± 11	443 ± 6	460 ± 16	487 ± 16
Meto	484 ± 14	442 ± 10	445 ± 12	454 ± 15	445 ± 11	453 ± 12
Meto+Des	457 ± 7	437 ± 8	419 ± 12*	464 ± 9	468 ± 16	478 ± 18
MAP						
CON	70 ± 3	55 ± 4#	62 ± 5	60 ± 3#	60 ± 3#	61 ± 4#
Des	66 ± 4	49 ± 5#	64 ± 6	45 ± 1#	55 ± 4	51 ± 4#
Meto	64 ± 4	47 ± 4#	57 ± 4	49 ± 2#	47 ± 4#	49 ± 2#
Meto+Des	51 ± 6	43 ± 3	51 ± 6	52 ± 5	45 ± 4	46 ± 4

Tab. 2: Hämodynamische Parameter während Ischämie und Reperfusion
* $p < 0,05$ vs. Baseline, # $p < 0,05$ vs. Baseline, Mittelwerte+SEM

3.2.2. Herzinfarktgrößen

Tiere der Kontrollgruppe hatten ein IS relativ zur AAR von $48 \pm 3\%$ ($n=8$). Die Desfluran-induzierte Postkonditionierung reduzierte die IS signifikant ($*p < 0,05$ vs. CON) auf $32,2 \pm 2\%$ ($n=7$). Metoprolol allein hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Infarktgröße ($41 \pm 3\%$, $n=6$), hob aber die kardioprotektiven Effekte von Desfluran auf ($43 \pm 3\%$, $n=6$).

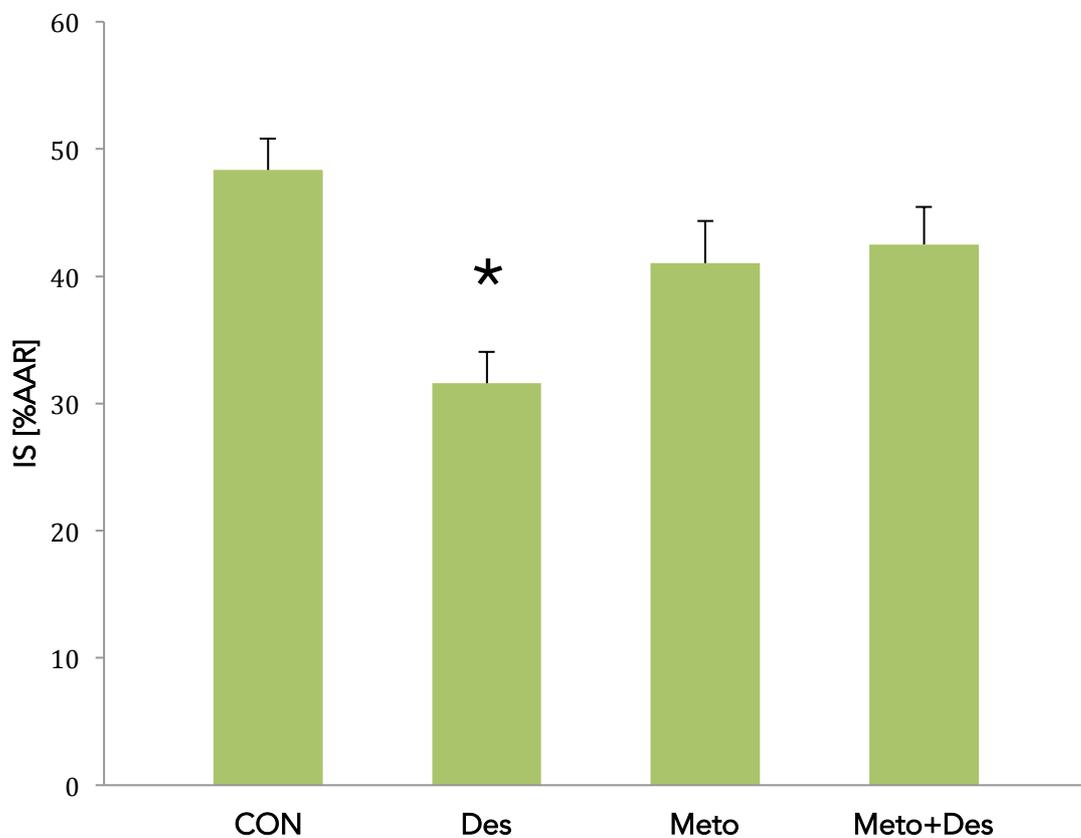


Abb. 11: Darstellung der Herzinfarktgröße als Anteil des Infarktgebietes an der Area at risk

CON: Kontrollgruppe mit NaCl 0,9% ($n=8$), Des: Gruppe mit NaCl 0,9% und 1MAC Desfluran zur Postkonditionierung ($n=7$); Meto: Gruppe mit Langzeitbetablockade ($n=6$); Meto + Des : Gruppe mit Langzeitbetablockade und 1MAC Desfluran zur Postkonditionierung ($n=6$), $*p < 0,05$ vs. CON; angegeben Mittelwert + SEM

3.3. Ergebnisse der Molekularbiologischen Untersuchungen

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung des ADRB1 wurden die linken Ventrikel der Tiere entsprechend dem Protokoll für die Langzeitapplikation und des *in vivo* Herzinfarktmodells weiter untersucht. 17 der 27 Tiere konnten für die Western-Blot-Untersuchung eingeschlossen werden. 10 mussten ausgeschlossen werden, weil 2 Tiere vorzeitig verstarben und 8 das Einschlusskriterium der Herzfrequenzreduktion nicht erfüllten.

Für die molekularbiologischen Untersuchungen mittels PCR wurden die rechten Ventrikel der Tiere aus dem vorangegangenen Experiment zur Infarktgrößenbestimmung herangezogen.

3.3.1. ADRB1-Konzentration nach Ischämie-Reperfusion

Es zeigte sich keine Beeinflussung des ADRB1 auf Proteinebene nach Ischämie/Reperfusion (siehe Abb. 12).

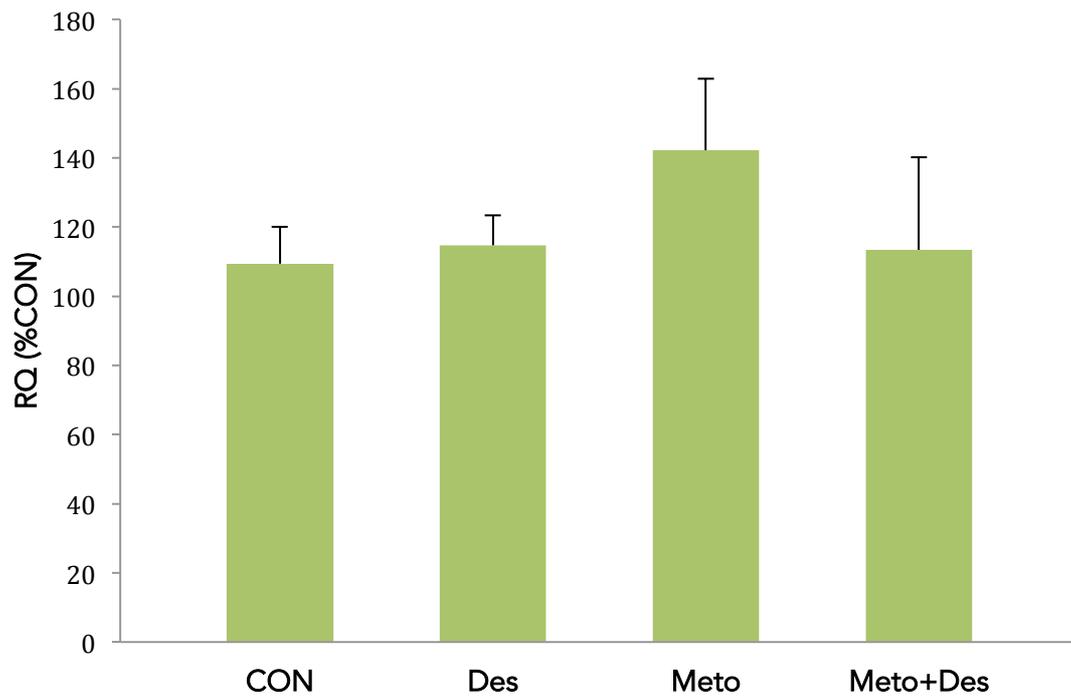


Abb. 12: Proteinkonzentration des ADRB1 nach Reperfusion/Ischämie
CON (n=5), Des (n=4), Meto (n=4), Meto + Des (n=4);
Mittelwert + SEM

3.3.2. mRNA-Gehalt von ADRB1, von Arrb1 und Gnas nach Ischämie/Reperfusion

Auf transkriptionaler Ebene kommt es zum signifikanten Anstieg ($*p < 0,05$ vs. CON) des mRNA-Gehaltes von ADRB1, Arrb1, Gnas in der Metoprololgruppe. Eine Postkonditionierung mit Desfluran beeinflusst die transkriptionalen Veränderungen und hebt diese wieder auf (siehe Abb. 13).

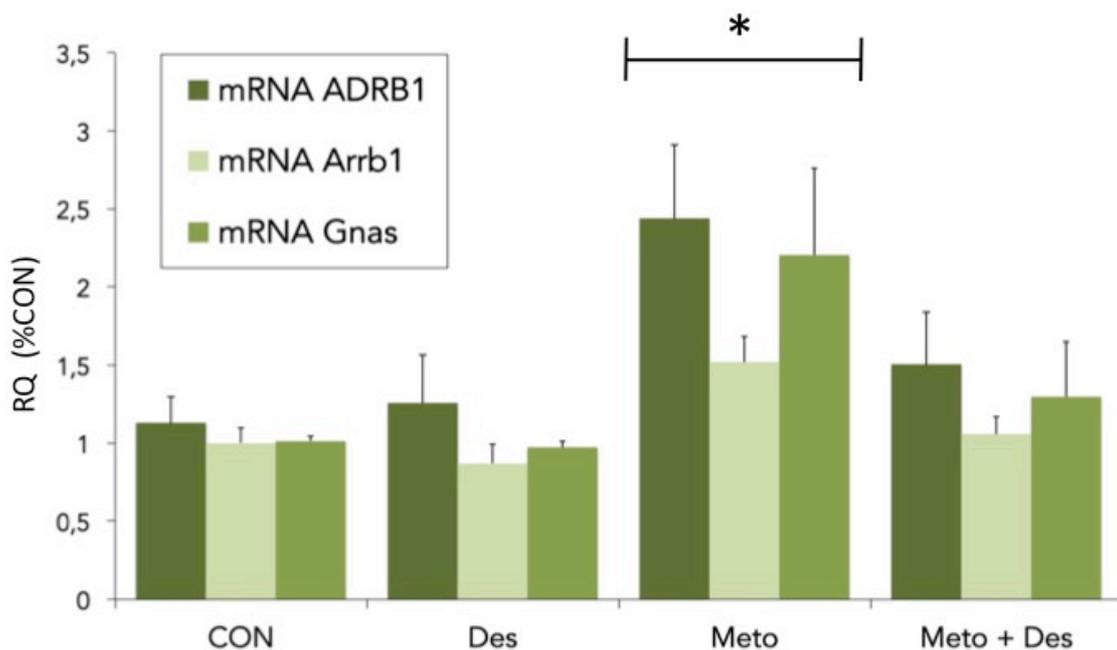


Abb. 13: mRNA-Gehalt von ADRB1, von Arrb1 und Gnas nach Ischämie/Reperfusion
CON (n=9), Des (n=8), Meto (n=6), Meto+Des (n=6),
 $*p < 0,05$ vs. CON; Mittelwert +SEM

4. Diskussion

Herz-Kreislaufkrankungen sind die führende Todesursache in Deutschland.[2] Themenschwerpunkte der aktuellen Forschungsbemühungen sind die Entwicklung kardioprotektiver Strategien, um die Wahrscheinlichkeit des Eintretens eines AMI zu verhindern, die Therapie des kardiovaskulären Ereignisses sowie das Management von Komplikationen zu verbessern. In klinischen Studien gibt es Hinweise, dass der Einsatz volatiler Anästhetika während der CABG zur verminderten Freisetzung kardialer Marker, einer besseren postoperativen linksventrikulären Funktion und zu einem verkürzten Aufenthalt auf Intensivstation führt.[109] Ein direkter Einfluss volatiler Anästhetika in Hinblick auf Mortalität und Infarktgröße im Menschen konnte nicht nachgewiesen werden.[108, 115] Hingegen zeigt die APost mit volatilen Anästhetika im *in vivo* Tiermodell z.B. im Kaninchen eine signifikante IS-Reduktion.[97] Die Beteiligung der ADRB am Signaltransduktionsweg der APost konnte bereits belegt werden.[103] Auch die kurzfristige Applikation eines ADRB-Blockers als kardioprotektive Strategie wurde im Tierversuch gezeigt[147], jedoch hebt dieser gleichzeitig die kardioprotektive Wirkung volatiler Anästhetika auf.[86]

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss einer Langzeitapplikation des ADRB1-Blockers Metoprolol auf die APost mit Desfluran im *in vivo*-Mausmodell untersucht. Mit den Daten konnte ein möglicher Erklärungsansatz der diskrepanten Ergebnisse im Menschen durch Komedikation aufgezeigt werden. Im Folgenden werden Einschränkungen der Studie und Ansatzpunkte für zukünftige Untersuchungen dargelegt.

4.1. Die β -Langzeitblockade senkt die Herzfrequenz

Für die vorliegende Arbeit konnten wir ein Modell zur Langzeitapplikation von ADRB-Blockern mittels osmotischer Pumpen etablieren. Dieses Applikationsverfahren wurde bereits in über 4000 Veröffentlichungen z.B. zur Applikation von Steroiden und Katecholaminen angewandt.[149] Bisher wurde in unserem Forschungsgebiet dieser kontinuierliche Applikationsweg für eine β -Langzeitblockade noch nicht genutzt.

Eine von der American Heart Association anerkannte Methode zur experimentellen Messung hämodynamischer Parameter in Mäusen, die Tail-Cuff-Methode mit Volumen-Druck-Aufzeichnung[148], nutzten wir zur Überwachung von Herzfrequenz und Blutdruck während der β -Langzeitblockade. Mit diesen zwei neu etablierten Verfahren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Wirkung von Metoprolol in der Maus zu einer signifikanten Herzfrequenzreduktion, die über den gesamten Applikationszeitraum anhält, nicht jedoch zur Beeinflussung des MAP (vgl. Abb. 10 und Tab. 1) führt. Die Ergebnisse zeigen eine signifikante und anhaltende Reduktion der Herzfrequenz am vierten Tag nach Pumpenimplantation (Messung postOP1)(siehe Abb. 10).

Janssen *et al.* konnte 2000 in der ruhenden Maus unter kontinuierlicher Ableitung der Hämodynamik, ebenfalls belegen, dass eine intravenöse Applikation von 2,5mg/kg KG Metoprolol zur signifikanten Herzfrequenzreduktion von durchschnittlich 612/min auf 487/min führt, jedoch keinen Einfluss auf den MAP hatte.[152]

Auch in der Ratte beeinflusste die kurzfristige Gabe von Esmolol die Hämodynamik mit einer Herzfrequenzreduktion ohne die Blutdruckwerte zu verändern.[153] Die Langzeitapplikation im Schwein mit Bisoprolol führte zur

Senkung der Herzfrequenz und einem verminderten Ansprechen auf Isoproterenol im Vergleich zur Kontrollgruppe.[154]

Das invasive Monitoring in einem Herzinsuffizienzmodell der Maus zeigte ebenfalls eine Herzfrequenzreduktion nach drei-wöchiger oraler Applikation von Metoprolol. Hier konnten mit Hilfe eines Micro-Conductance-Katheter invasiv die systolischen Blutdruckwerte gemessen werden. Hier wurde im Gegensatz zu unserem Ergebnis der Blutdruck beeinflusst. In der Metoprolol-Gruppe war ein Anstieg der systolischen Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe, aber auch ein signifikanter Abfall im Vergleich zur nicht behandelten Herzinsuffizienzgruppe zu sehen.[155]

Weitere invasive Messtechniken sind notwendig, um unsere Ergebnisse zu verifizieren. Weiterhin ist zu klären, ab welcher Applikationsdauer und/oder Dosierung es auf Proteinebene und Transkriptionsebene unter Dauerapplikation des Metoprolols zu Veränderungen kommt. Diese Fragen sollten Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

4.2. Aufhebung der Desfluran-induzierten Postkonditionierung durch β -Langzeitblockade

Das *in vivo*-Herzinfarktmodell der Maus, welches weltweit zur Untersuchung kardioprotektiver Maßnahmen verwendet wird und etablierte Methodik in unserer Arbeitsgruppe ist, nutzten wir, um den Einfluss einer β -Langzeitblockade auf die Desfluran-induzierte Postkonditionierung zu untersuchen.

Wie bereits in vielen Studien an Mäusen und Kaninchen gezeigt, ist Desfluran kardioprotektiv und reduziert das Infarktareal signifikant zur Kontrollgruppe ohne postkonditionierende Intervention.[49, 99, 100, 102, 103, 156]

Die vorliegenden Daten bestätigen dieses Ergebnis. Eine Langzeitapplikation von Metoprolol allein hat keinen signifikanten Einfluss auf die IS, hebt aber die kardioprotektive Wirkung von Desfluran auf (*siehe Abb. 11*).

Hierbei spielen die Dauer und der Zeitpunkt der Metoprolol-Applikation eine wichtige Rolle. Kurze Applikationen von ADRB-Blockern sind nicht IS-reduzierend, heben aber ebenfalls die APost auf. ADRB-Blocker während der kompletten Reperfusion gegeben, sind kardioprotektiv. Auch bei gleichzeitiger Desfluran-Gabe war diese Wirkung noch nachweisbar. Lange *et al.* belegten dies durch eine 30-minütige Applikation des kurzwirksamen ADRB1-Blockers Esmolol 30min vor Koronarokklusion. Die kardioprotektive Wirkung von Desfluran, Sevofluran und IPC wurde aufgehoben. Esmolol allein reduzierte die IS nicht. Esmolol über die ganze Reperusionszeit verabreicht ist kardioprotektiv.[103]

Suematsu *et al.* zeigte ebenfalls für Nipradilol, dass die Langzeitapplikation die IPC aufhebt. Ratten wurden vier Wochen mit der Nahrung Propranolol oder Nipradilol gegeben. Es konnte gezeigt werden, dass die vierwöchige orale Applikation des nicht-selektiven ADRB-Blockers Propranolol allein keinen IS-reduzierenden Effekt hat, Nipradilol als NO-freisetzender ADRB-Blocker hingegen schon. In Kombination mit IPC wurde dieser Effekt jedoch aufgehoben und die Kombination mit Propranolol und IPC zeigte sogar noch einen Anstieg der IS im Vergleich zur IPC allein. Im Gegensatz zur vorliegenden Studie erfolgte allerdings keine Kontrolle der suffizienten ADRB-Blockade durch weitere Untersuchungen.[65]

Salie *et al.* konnte ebenfalls für die alleinige Gabe eines ADRB1-Blockers vor Ischämie keinen IS-reduzierenden Effekt belegen. Die Gabe von Isoproterenol als ADRB1- und ADRB2-Agonist reduzierte die IS, ebenso eine alleinige Stimulation der ADRB2. Interessanterweise wurde die durch ADRB2-Blockade gezeigte Kardioprotektion durch eine ADRB1-Blockade aufgehoben. Bei dieser, als β -Präkonditionierung beschriebene Kardioprotektion, spielen auch PI3K und PKA als nachgeschaltete Signaltransduktionswege eine wichtige Rolle.[36]

Im Gegensatz dazu veröffentlichte Huang *et al.* 2011 eine Studie im *in vivo*-AMI-Modell der Ratte und einen *ex vivo* Zellkulturversuch. Hier reduzierte intravenös appliziertes Esmolol 5min vor bis 5min nach Beginn der Reperfusion die IS. Dieser Effekt wurde durch die Gabe eines ADRB2-Antagonisten aufgehoben. Im nachgeschalteten Signaltransduktionsweg zeigten sich signifikant erhöhte Aktivitäten der PKA und der phosphorylierten Akt1/2-Kinase.[153] Die phosphorylierte Akt1/2-Kinase wird ebenfalls in der APost aktiviert.[98] Weiterhin konnte in der Zellkultur bestätigt werden, dass Esmolol die Apoptose-Rate reduziert. Es bleibt in weiteren Untersuchungen zu klären, ob die kardioprotektiven Eigenschaften der ADRB1-selektiven-Blocker unter Umständen auf eine vermehrte Aktivierung der ADRB2 zurückzuführen sind. ADRB2 aktiviert über das inhibitorische G-Protein den antiapoptotischen Weg vermittelt durch PI3K und Akt-Kinase .[132]

4.3. Diskussion des Modells

Die Experimente der vorliegenden Studie wurden *in vivo* an jungen männlichen C57BL6 Mäusen durchgeführt. Ein Teil der aufgeführten Studien nutzte zur Untersuchung männliche Wistar-Ratten zur Entnahme des Herzens für das *ex vivo* perfundierte Langendorff-Herz. Diesbezüglich ist bekannt, dass in blutperfundierten Kaninchen-Herzen verglichen mit dem Krebs-Henseleit-Puffer perfundierten Herzen im Langendorff-Modell, die funktionelle Erholung und der Eigenschutz bei Ischämie stärker ausgeprägt sind.[157]

Die speziesbedingten Eigenschaften im Vergleich zur Ratte, zum Hund und zum Kaninchen bestehen bei der Maus v.a. in der Herzfrequenzrate, die im Schnitt zwischen 550/min und 700/min liegt. Eine Applikation von Metoprolol führt vor allem zur Senkung der Herzfrequenz, sodass die gezeigten kardioprotektiven Eigenschaften in den Studien durchaus einen Frequenzeffekt darstellen können und weniger auf metabolischen Veränderungen beruhen könnten. Es ist in vielen Studien im Menschen gezeigt worden, dass die Herzfrequenz ein unabhängiger Faktor für Mortalität darstellt. Für die KHK ist dieser Zusammenhang aber auch mit dem Einfluss der Herzfrequenz auf den Blutdruck gezeigt worden.[158-160]

Darüber hinaus nutzten wir zur Durchführung des Experiments ausschließlich männliche Mäuse. Geschlechtsbedingte Unterschiede bezüglich Herzinfarktgröße, Konditionierbarkeit, NOS-Regulation und Calciumüberladung sind bekannt. Unter anderem scheint der Estrogenrezeptor in prämenopausalen Frauen eine positive Wirkung zu haben.[161] Hierbei soll aber auch auf die Unterschiede im Alter der Maus hingewiesen werden. Im Alter ist eine IS-Reduktion durch Postkonditionierung bei vergleichbaren Bedingungen nicht mehr möglich. Unter anderem hängt dies mit der

Aktivitätsminderung der ERK_{1/2} als Protein des RISK-Signalweges durch verminderte Phosphorylierung zusammen.[162] Gleiche Einschränkungen gelten für die Präkonditionierung.[163, 164]

4.4. Beeinflussung der Molekularbiologie durch β -Langzeitblockade und Interaktion durch Desfluran-induzierte Postkonditionierung

In der vorliegenden Untersuchung hatte die Langzeitblockade von ADRB1 zu keinem Einfluss auf die Proteinkonzentrationen der ADRB1 geführt (vgl. Abb. 12).

Es wurde bereits beschrieben, dass die Applikation von Desfluran kurz- und mittelfristig zu Veränderungen der Proteinexpression führt, u.a. von Proteinen der Atmungskette, der Proteinsynthese, -faltung und des Zytoskeletts. Ob Desfluran einen Einfluss auf die ADRB1-Konzentration hat, wurde nicht untersucht.[165]

Ob innerhalb der vierwöchigen Applikationszeit eine weitere Regulation unter ADRB1-Blockade bestand, muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Es ist darüber hinaus notwendig, die Proteinkonzentration des ADRB1 vor Ischämie-Reperfusion zu bestimmen, um kurzfristige Ab- bzw. Umbauprozesse beurteilen zu können.

Dass eine Regulation des Gnas als nachgeschalteter Signaltransduktor des ADRB1 v.a. über den mRNA-Gehalt reguliert wird, weniger über den Proteingehalt, konnte bereits 1995 Gaudin zeigen.[166]

Die vorliegende Arbeit untersuchte darüber hinaus den Einfluss der β -Langzeitblockade auf die transkriptionalen Veränderungen des ADRB1, Arrb1 und Gnas. Die Metoprololapplikation führte zur Verdopplung des mRNA-Gehaltes aller untersuchten Zielproteine (siehe Abb. 13). Desfluran-induzierte Postkonditionierung allein hat keinen Einfluss, scheint aber Umsatz beziehungsweise Abbau von ADRB1, Arrb1, Gnas zu fördern, da die Kombination aus Metoprololapplikation und Postkonditionierung keinen messbaren Anstieg der mRNA der Zielproteine zur Folge hatte. Inwiefern es sich hier um einen vermehrten Abbauprozess oder erhöhten Umsatz handelt, muss zukünftig untersucht werden.

Zhang *et al.* zeigte 2013 ebenfalls, dass die vierwöchige Blockade des ADRB1 zu hämodynamischen Veränderungen und zu Veränderungen auf Transkriptionsebene der nachgeschalteten Signaltransduktionswege und des ADRB1 selbst führt. Hier wird sowohl der PKA-abhängige Weg über Gnas als auch der über Arrb1 initiierte PKA-unabhängige Weg hochreguliert.[167] Interessanterweise belegen die Ergebnisse ebenfalls, dass beide Signaltransduktionswege beeinflusst werden. Es ist bekannt, dass die Aktivierung der PKA ein wichtiger Punkt bei der Entstehung von Herzinsuffizienz und Apoptose ist.[167]

Die dauerhafte Stimulation des ADRB1 führt zur Aktivierung proapoptotischer Signaltransduktionswege über CaMKII, hier konnte eine Vermittlerrolle des Arrb1 zwischen dem ADRB1 und CaMKII gezeigt werden.[123, 167] Jedoch konnte sowohl für EPAC als auch für Arrb1[129] eine Aktivierung des antiapoptotischen Signaltransduktionsweges, über ERK1/2 vermittelt, nachgewiesen werden (siehe Abb. 3). Darüberhinaus bewirkt EPAC nachgeschaltet von Arrb1 CaMKII-vermittelt die Leerung sarkoplasmatischer

Calciumspeicher mit Erhöhung des zytosolischen Calciumpeaks und daraus resultierender Zellschädigung.[123]

In der vorliegenden Untersuchung wurde ADRB1 dauerhaft blockiert. Hiernach konnte für Desfluran keine IS-reduzierende Wirkung mehr gezeigt werden (siehe Abb. 11). Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit ist, dass die Gegenregulation des Myokards nach β -Langzeitblockade auf transkriptionaler Ebene stattfindet. Sowohl der Rezeptor selbst, als auch die Gnas sowie Arrb1 werden hochreguliert. Zwei Signaltransduktionswege, die sowohl pro- als auch antiapoptotische Funktionen haben.

Studien in transgenen Mäusen mit Überexpression des Gnas haben gezeigt, dass eine Hochregulation des Gnas zur Sensitivierung des ADRB1 für Katecholamine führt. ADRB-Blocker bewahren im transgenen Mausmodell vor einer Gnas-vermittelten proapoptotischen Signalkaskade mit konsekutiver Kardiomyopathie.[168] In der vorliegenden Untersuchung ist die Gnas-Regulation als Folge der β -Langzeitblockade anzusehen, da hier kein transgenes Mausmodell verwendet wurde. Im Gegensatz dazu konnte Ping et al. belegen, dass im Schwein eine dreiwöchige Bisoprololapplikation zum verminderten Gehalt an Gnas mRNA- und Proteingehalt im linken Ventrikel führt.[154] Die gleiche Arbeitsgruppe zeigte am Schweineherz, dass die Regulation der Gnas- und ADRB1-mRNA und Proteinkonzentration abhängig von physiologischen und anatomischen Bedingungen ist. Im rechten Herzen ist insgesamt ein verminderter Gehalt an Gnas im Gegensatz zum linken Herzen zu finden.[169] Einschränkend ist hier zu sagen, dass die vorliegende Untersuchung zur mRNA-Quantifizierung am isolierten rechten Ventrikel vorgenommen wurde und die Diskrepanz der Ergebnisse auf Grund der anatomischen Verteilung bedingt sein kann.

Arrb1 aktiviert den G-Protein-unabhängigen Signaltransduktionsweg des ADRB1, welcher kardioprotektiv vermittelt durch EGFR und ERK_{1/2} ist.[128] 2013 entwickelte die Arbeitsgruppe um Zhang *et al.* ein transgenes Mausmodell, in dem die PKA dauerhaft inhibiert wurde. Die Isoproterenol-Stimulation konnte nicht mehr zu einer Calcium-Akkumulation, Phosphorylierung von PLN an Serin16 und Threonin17 sowie zur Autophosphorylierung der CaMKII führen. Trotz der Inhibition der PKA wurde EPAC aktiviert, konsekutiv folgte die Aktivierung des an der Kardioprotektion beteiligten ERK1/2 Signaltransduktionsweges (*siehe Abb. 3*). In der Interaktion mit einer vierwöchigen Metoprolol-Gabe konnte gezeigt werden, dass Metoprolol die Phosphorylierung des PLN an Serin16 verhindert, zusätzlich waren kardioprotektive Wirkungen auf Grund signifikant niedriger Apoptosewerte in der Zellkultur zu beobachten. In Kombination mit einer PKA-Inhibition milderte Metoprolol die kardioprotektiven Eigenschaften dieser ab. In dieser Studie wurde Arrb1 als mögliches vermittelndes Protein nicht untersucht.[167] Lange *et al.* konnte im Rahmen der APC durch Desfluran zeigen, dass kurzfristige Metoprololgaben allein und in Kombination mit Desfluran zur Reduktion des an Serin16 und Threonin17 phosphorylierten PLN führten und darüberhinaus die IS im Vergleich zur Kontrollgruppe reduzierten.[86]

Aus vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass die Blockade der PKA allein kardioprotektiv ist und keinen Einfluss auf die APost hat. Dahingegen ist die CaMKII-Inhibition durch Kn-93 allein nicht kardioprotektiv, scheint aber bei der Vermittlung der APost durch Desfluran eine Rolle zu spielen.[103]

An Hand der Phosphorylierungsstellen des PLN an Serin16 (PKA-vermittelt) und Threonin17(cAMKII-vermittelt)[167], besteht die Möglichkeit in zukünftigen

Untersuchungen die Bedeutung des G-Protein-abhängigen bzw.-unabhängigen Signalweges und deren Bedeutung des Arrb1 für die APost zu untersuchen (siehe Abb. 3).

Für Carvedilol und Alprenolol konnte die Aktivierung von Arrb1 als biased ligand gezeigt werden.[130] Dies bedeutet, dass es durch Blockade des Rezeptors zu einer Hemmung des G-Protein gekoppelten Signaltransduktionsweges bei gleichzeitiger Aktivierung des Arrb1 vermittelten G-Protein-unabhängigen Signaltransduktionsweges kommt. Diese Eigenschaft konnte bislang für Metoprolol nicht bestätigt werden (siehe Abb. 14). In dieser Arbeit konnte für Metoprolol ein Einfluss auf die mRNA des G-Protein-abhängigen Gnas als auch für den G-Proteinunabhängigen Arrb1 gezeigt werden.

Die posttranskriptionale mRNA-Regulation und die posttranslationale Proteinregulation durch micro-RNAs stellen einen interessanten Angriffspunkt für die Entwicklung kardioprotektiver Strategien dar.[170, 171] 2014 konnte Kim *et al.* für Metoprolol keinen Einfluss auf die Expression von micro-RNA nachweisen, welche posttranskriptionale Modifikationen vermitteln.[172] Ob die in der vorliegenden Arbeit gezeigten transkriptionalen Veränderungen und die diskrepanten Ergebnisse auf Proteinebene mirco-RNA vermittelt sind, haben wir nicht untersucht, ist aber ein möglicher Ansatz für zukünftige Untersuchungen.

Die Langzeitapplikation von Metoprolol führte zur Erhöhung des mRNA-Gehaltes für Arrb1, die Applikation von Desfluran hatte keinen Einfluss darauf. Es ist anzunehmen, dass die kardioprotektiven Effekte von Desfluran im Rahmen der APost über den RISK-Pathway[105] vermittelt werden. Desfluran beeinflusst hingegen die mRNA-Konzentration von Arrb1 im Rahmen der β -

Langzeitblockade, sodass es nicht mehr zu einem signifikanten Anstieg dieser kommt. Für Carvedilol und Alprenolol konnte eine geringfügige Aktivierung des G α s-Signaltransduktionsweges gezeigt werden, obwohl nur für Alprenolol eine intrinsische sympathomimetische Aktivität bekannt ist.[130] Es sind weitere Untersuchungen notwendig, ob Metoprolol als schwacher Partialagonist am ADRB1 die tran

skriptionalen Veränderungen hervorruft. Für Arrb1 konnte im Vergleich zu Arrb2 eine proapoptische Wirkung gezeigt werden.[173] Ob die Aktivierung der G α s und Arrb1 auch Einfluss auf die IS hat bleibt unklar. Es bleibt eine Vermutung, dass Arrb1 als Schlüssel zum G-Protein-unabhängigen Signalweg keine entscheidende Rolle für die Vermittlung der Kardioprotektion durch Desfluran spielt.

Es ist zu diskutieren, ob sich der Ansatzpunkt der ADRB1-Blockade zu weit oben in der Signalkaskade befindet, sodass durch die Blockade sowohl proapoptische als auch antiapoptische Signalwege aktiviert werden und hierdurch diese widersprüchlichen Ergebnisse zur ADRB1-Blockade entstehen. Gleiche Einschränkungen gelten für die Beteiligung der ADRB1 und ADRB2 an der APost. Es sind weitere Untersuchung mit isolierter Blockade des Arrb1-Signalweges, als Schlüsselprotein des G-Protein-unabhängigen Signaltransduktionsweges, notwendig, um dessen Bedeutung für die APost genauer charakterisieren zu können.

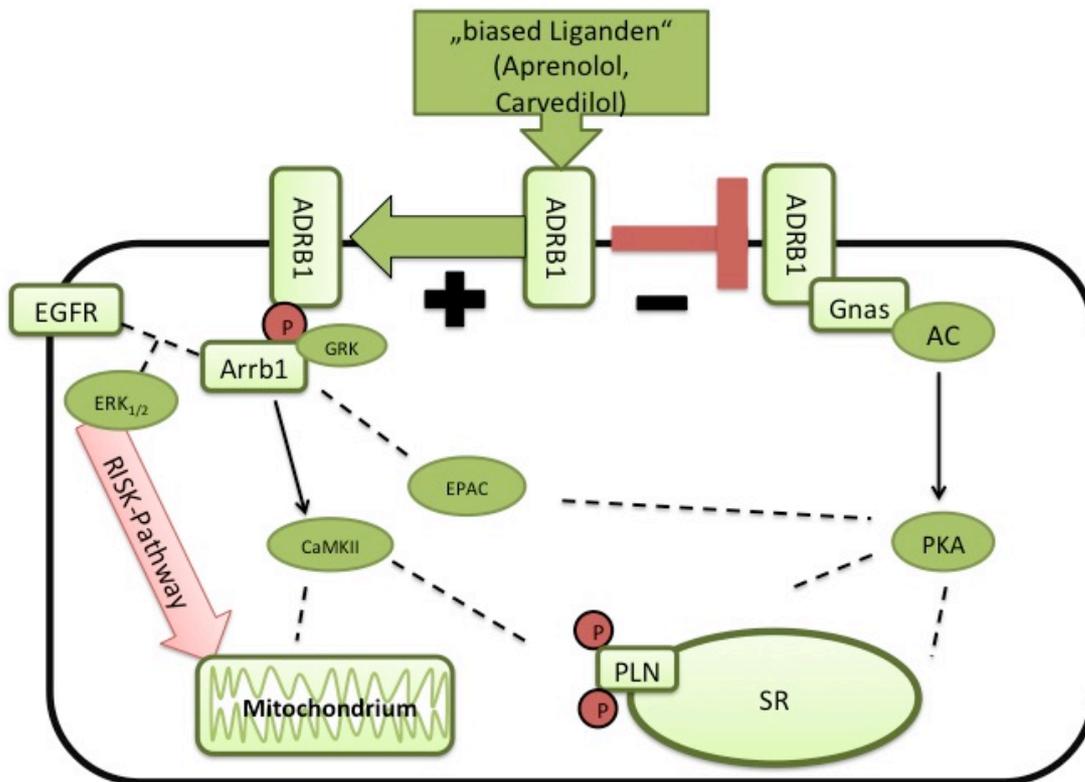


Abb. 14: „Der biased -Ligand“, Schematische Darstellung

ADRB1 (beta1-adrenerger Rezeptor), Gnas (α -Untereinheit des Gs-Proteins), AC (Adenylatcyclase), PKA (Proteinkinase A), Arrb1 (beta-Arrestin 1), EGFR (engl. epidermal growth factor receptor), GRK (G-Proteinrezeptorkinase), CaMKII (Calcium-Calmodulin-Kinase), EPAC (engl. exchange protein cAMP-activated), SR (Sarkoplasmatisches Retikulum), PLN (Phospholamban), P (Phosphorylierung)

4.5. Übertragbarkeit auf die klinische Situation

Die translationalen Forschungsergebnisse der Konditionierung durch Anästhetika im Menschen sind unzureichend. Die Studienprotokolle sind von Heterogenität bezüglich Einschlusskriterien, Endpunkte und Komedikation geprägt.[110, 174] Der fehlende Wirkungsnachweis bzw. die geringere Effektivität der Postkonditionierung fordern von der Grundlagenforschung die Untersuchung möglicher Interaktionen.

Für hyperglykämie Stoffwechsellagen[175] und Diabetes[176] konnte gezeigt werden, dass eine Kardioprotektion durch volatile Anästhetika nicht möglich ist. Vergleichbare Interaktionen konnten für Pravastatin[177], welches prophylaktisch und therapeutisch bei KHK-Patienten eingesetzt wird[8], nachgewiesen werden. Man findet immer wieder Forderungen nach experimentellen Tiermodellen, die Komorbiditäten und Komedikationen abbilden und untersuchen können.[114, 178] Unter dem Gesichtspunkt mehr klinischer Relevanz wurde in der vorliegenden Studie die Interaktion einer β -Langzeitblockade durch Metoprolol und der APost durch Desfluran untersucht. Die ADRB1-Blockade durch Metoprolol reduziert nicht die IS, hebt aber die APost durch Desfluran auf.

Der Einsatz von ADRB1-Blockern perioperativ und während kardiologischer Interventionen wird aktuell diskutiert. Bei einem AMI mit ST-Hebungen (STEMI) konnte die intravenöse Bolusapplikation von 2-4mg Metoprolol vor PTCA zeigen, dass eine Reduktion des IS um bis zu 20% möglich ist. Ein Einschlusskriterium war, dass keine Patienten mit ADRB1-Blockern vorbehandelt waren und im weiteren Verlauf sowohl Kontroll- als auch Interventionsgruppe leitlinienkonform eine Sekundärprophylaxe mit diesem erhielten.[179] In der METOCARD-CNIC Studie konnte in der Kernspintomographie sechs Monate nach STEMI kein signifikanter Unterschied in der Infarktgröße nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich eine bessere Ejektionsfraktion in der Metoprololgruppe, welche sich in einer signifikant niedrigeren Schrittmacherindikation widerspiegelte.[180] In der TEAHAT-Studie waren vergleichbar gute Ergebnisse für Metoprolol vor Thrombolyse zu sehen.[181] In der COMMIT-Studie zeigten sich deutlich reduzierte Reinfarktraten und vermindertes Auftreten von Kammerflimmern, wenn die Patienten intravenös Metoprolol vor Thrombolyse erhielten. Es konnte kein

Effekt auf die IS belegt werden, jedoch bestand gleichzeitig eine erhöhtes kardiogenes Schockrisiko. In dieser Studie wurden alle Killip-Klassifikationen und Patienten mit Begleitmedikation, wie z.B. ADRB-Blocker, eingeschlossen[182], sodass dies ein möglicher Aspekt der divergierenden Ergebnisse zu sein scheint.

Im perioperativen Setting nicht-kardiochirurgischer Operationen, konnten in der POISE-Studie 30 Tage postoperativ weniger Herzinfarkte beobachtet werden, jedoch nahm auch die Anzahl an Schlaganfällen und Todesfällen zu, wenn die Patienten perioperativ Metoprolol erhielten.[142] Ein Jahr später veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Polderman *et al.* Gegenteiliges in der stark diskutierten DECREASE-Studie.[183] In der aktuellen Leitlinie zum perioperativen Management kardiovaskulärer Risikopatienten gibt es auf Grund der Divergenz der Studienergebnisse nur für die perioperative Fortführung einer bestehenden ADRB-Blockade eine Klasse I-Empfehlung. Für den präoperativen Beginn einer ADRB-Blockade kann selbst in Risikogruppen keine klare Empfehlung gegeben werden.[118]

Es sind Studien im Menschen bezüglich des Einflusses einer β -Langzeitblockade, nicht nur auf Endpunkte wie Mortalität und Reinfarktquoten notwendig, sondern auch dessen Einfluss auf das akute Infarktgeschehen, sodass eine Grundlage für die Diskussion des Einsatzes von ADRB-Blockern in der Primärprävention des AMI geschaffen wird.

Neben Komorbiditäten und Komedikation sind auch Interventionen am Herzen selbst eine wichtiger Ansatzpunkt für Interaktionen. Das Setting der CABG durch operationsbedingte Okklusion der Koronarien kann selbst kardioprotektiv sein[184], sodass ein endgültiger Einfluss durch volatile Anästhetika nicht untersucht werden kann. Zudem konnte für das Narkotikum

Propofol gezeigt werden, dass es die APC verhindert.[185] Opiode als Teil der Vollnarkose sind selbst kardioprotektiv. [10, 35, 186] Während der PTCA haben Präinfarktangina[187, 188] und Mikroembolisationen[189] kardioprotektives Potential.

Letztlich ist eine Translation der vorliegenden Ergebnisse auf den Menschen nur bedingt zulässig. Die angeführten Probleme können lediglich Anstoß weiterer Forschungsbestrebungen und Überarbeitung von APost-Protokollen und Störfaktoren sein. Für die Zukunft sollte auch die Untersuchung genetischer Variationen, der an der Kardioprotektion beteiligten Proteine[190] in den Blickpunkt rücken, sodass auch diese, Berücksichtigung in der Therapieplanung im Menschen finden, denn die Individualität des Menschen ist das, was uns ausmacht und uns mitunter vor große Herausforderung in der Forschung stellt.

„Ohne Spekulation gibt es keine neue Beobachtung“

Charles Darwin

5. Zusammenfassung

Die Ischämischen Herzerkrankungen sind die führende Todesursache in Deutschland. Die Entwicklung kardioprotektiver Strategien zur Minimierung des Reperfusionsschadens nach Wiedereröffnung des Gefäßes stellt eine therapeutische Ergänzung dar. Für volatile Anästhetika konnte diese Wirkung bereits in vielen Studien im Tiermodell gezeigt werden. In der Vermittlung dieser Effekte spielen ADRB1 eine ambivalente Rolle. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss einer ADRB1-Blockade auf die Desfluran-induzierte Postkonditionierung unter Berücksichtigung nachgeschalteter Signaltransduktionswege zu untersuchen.

In der vorliegenden Studie wurde hierfür ein Modell zur Langzeitapplikation von Metoprolol mittels osmotischer Pumpen und einer nicht-invasiven Blutdruckmessung durch Volumen-Druck-Aufzeichnung zur Interventionsüberwachung etabliert. Die planimetrische Infarktgrößenbestimmung erfolgte im *in vivo*-Herzinfarktmodell der Maus. Mittels Western-Blot wurde die Proteinkonzentration des ADRB1 und durch Real-Time PCR der mRNA-Gehalt von ADRB1, Arrb1 und Gnas bestimmt.

Die Ergebnisse bestätigen die kardioprotektiven Wirkeigenschaften Desflurans, zeigen aber auch, dass Metoprolol allein in diesem Modell nicht kardioprotektiv ist und darüber hinaus die APost durch Desfluran aufhebt. Die Langzeitblockade von ADRB1 hat keinen Einfluss auf dessen Proteinkonzentration. Auf transkriptioneller Ebene wurde gezeigt, dass unter β -Langzeitblockade der ADRB1, Arrb1 und Gnas-mRNA-Gehalt signifikant hochreguliert werden. Desfluran scheint nach Ischämie-Reperfusion diesen Effekt wieder aufzuheben. Daraus resultiert, dass Metoprolol in der Lage ist, auf mRNA-Ebene sowohl den G-Protein-abhängigen Signaltransduktionsweg

über Gnas, als auch den G-Protein-unabhängigen Signaltransduktionsweg über Arrb1 hochzuregulieren.

Literaturverzeichnis

1. Murray CJ, Lopez AD: **Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study.** *Lancet* 1997, **349**(9064):1498-1504.
2. **Todesursachenstatistik Deutschland 1998-2010 insgesamt** [http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbeto/xs_start_neu/&p_aid=i&p_aid=17585016&nummer=516&p_sprache=D&p_indsp=4065&p_aid=42635682 - SOURCES]
3. **Krankheitskosten je Einwohner 2002-2008** [http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/XWD_PROC?XWD_112/3/XWD_CU BE.DRILL/XWD_140/D.416/53763]
4. Geltman EM: **Infarct size as a determinant of acute and long-term prognosis.** *Cardiology clinics* 1984, **2**(1):95-103.
5. Maroko PR, Libby P, Ginks WR, Bloor CM, Shell WE, Sobel BE, Ross J, Jr.: **Coronary artery reperfusion. I. Early effects on local myocardial function and the extent of myocardial necrosis.** *The Journal of clinical investigation* 1972, **51**(10):2710-2716.
6. Ginks WR, Sybers HD, Maroko PR, Covell JW, Sobel BE, Ross J, Jr.: **Coronary artery reperfusion. II. Reduction of myocardial infarct size at 1 week after the coronary occlusion.** *The Journal of clinical investigation* 1972, **51**(10):2717-2723.
7. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Reiter RJ: **Cardioprotection and pharmacological therapies in acute myocardial infarction: Challenges in the current era.** *World journal of cardiology* 2014, **6**(3):100-106.
8. Task Force M, Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S, Andreotti F, Arden C, Budaj A, Bugiardini R, Crea F, Cuisset T *et al*: **2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology.** *European heart journal* 2013, **34**(38):2949-3003.
9. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA: **Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium.** *Circulation* 1986, **74**(5):1124-1136.
10. Schultz JE, Hsu AK, Gross GJ: **Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart.** *Circulation research* 1996, **78**(6):1100-1104.
11. Yamashita N, Hoshida S, Taniguchi N, Kuzuya T, Hori M: **Whole-body hyperthermia provides biphasic cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in the rat.** *Circulation* 1998, **98**(14):1414-1421.
12. Hearse DJ, Ferrari R, Sutherland FJ: **Cardioprotection: intermittent ventricular fibrillation and rapid pacing can induce preconditioning in**

- the blood-perfused rat heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* 1999, **31**(11):1961-1973.
13. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H: **Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog.** *Archives of pathology* 1960, **70**:68-78.
 14. Yellon DM, Hausenloy DJ: **Myocardial reperfusion injury.** *The New England journal of medicine* 2007, **357**(11):1121-1135.
 15. Sone T, Ishida A, Sassa H, Okumura Y, Yasuda E, Endo T: **[Reversible ischemic myocardial damage: clinical observation using two-dimensional echocardiography].** *Journal of cardiology* 1986, **16**(3):571-583.
 16. Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB: **The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog.** *The Journal of clinical investigation* 1974, **54**(6):1496-1508.
 17. Kloner RA, Ganote CE, Whalen DA, Jr., Jennings RB: **Effect of a transient period of ischemia on myocardial cells. II. Fine structure during the first few minutes of reflow.** *The American journal of pathology* 1974, **74**(3):399-422.
 18. Fluck DC, Olsen E, Pentecost BL, Thomas M, Fillmore SJ, Shillingford JP, Mounsey JP: **Natural history and clinical significance of arrhythmias after acute cardiac infarction.** *British heart journal* 1967, **29**(2):170-189.
 19. Bloch Thomsen PE, Jons C, Raatikainen MJ, Moerch Joergensen R, Hartikainen J, Virtanen V, Boland J, Anttonen O, Gang UJ, Hoest N *et al*: **Long-term recording of cardiac arrhythmias with an implantable cardiac monitor in patients with reduced ejection fraction after acute myocardial infarction: the Cardiac Arrhythmias and Risk Stratification After Acute Myocardial Infarction (CARISMA) study.** *Circulation* 2010, **122**(13):1258-1264.
 20. Kajstura J, Liu Y, Baldini A, Li B, Olivetti G, Leri A, Anversa P: **Coronary artery constriction in rats: necrotic and apoptotic myocyte death.** *The American journal of cardiology* 1998, **82**(5A):30K-41K.
 21. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.** *British journal of cancer* 1972, **26**(4):239-257.
 22. Dorn GW, 2nd: **Molecular mechanisms that differentiate apoptosis from programmed necrosis.** *Toxicologic pathology* 2013, **41**(2):227-234.
 23. Weiss JN, Korge P, Honda HM, Ping P: **Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease.** *Circulation research* 2003, **93**(4):292-301.
 24. Di Lisa F, Menabo 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.** *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(4):2571-2575.
 25. Kim JS, Jin Y, Lemasters JJ: **Reactive oxygen species, but not Ca²⁺ overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion.**

- American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2006, **290**(5):H2024-2034.
26. Halestrap AP: **Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die.** *Biochemical Society transactions* 2006, **34**(Pt 2):232-237.
 27. Griffiths EJ, Halestrap AP: **Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts.** *Journal of molecular and cellular cardiology* 1993, **25**(12):1461-1469.
 28. Crompton M, Costi A, Hayat L: **Evidence for the presence of a reversible Ca²⁺-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria.** *The Biochemical journal* 1987, **245**(3):915-918.
 29. Sun HY, Wang NP, Kerendi F, Halkos M, Kin H, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ: **Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺ overload.** *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2005, **288**(4):H1900-1908.
 30. Piper HM, Abdallah Y, Schafer C: **The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection.** *Cardiovascular research* 2004, **61**(3):365-371.
 31. Vila-Petroff M, Salas MA, Said M, Valverde CA, Sapia L, Portiansky E, Hajjar RJ, Kranias EG, Mundina-Weilenmann C, Mattiazzi A: **CaMKII inhibition protects against necrosis and apoptosis in irreversible ischemia-reperfusion injury.** *Cardiovascular research* 2007, **73**(4):689-698.
 32. Baines CP, Song CX, Zheng YT, Wang GW, Zhang J, Wang OL, Guo Y, Bolli R, Cardwell EM, Ping P: **Protein kinase Cepsilon interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria.** *Circulation research* 2003, **92**(8):873-880.
 33. Prabu SK, Anandatheerthavarada HK, Raza H, Srinivasan S, Spear JF, Avadhani NG: **Protein kinase A-mediated phosphorylation modulates cytochrome c oxidase function and augments hypoxia and myocardial ischemia-related injury.** *The Journal of biological chemistry* 2006, **281**(4):2061-2070.
 34. Remondino A, Kwon SH, Communal C, Pimentel DR, Sawyer DB, Singh K, Colucci WS: **Beta-adrenergic receptor-stimulated apoptosis in cardiac myocytes is mediated by reactive oxygen species/c-Jun NH2-terminal kinase-dependent activation of the mitochondrial pathway.** *Circulation research* 2003, **92**(2):136-138.
 35. Schultz JE, Rose E, Yao Z, Gross GJ: **Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts.** *The American journal of physiology* 1995, **268**(5 Pt 2):H2157-2161.
 36. Salie R, Moolman JA, Lochner A: **The role of beta-adrenergic receptors in the cardioprotective effects of beta-preconditioning (betaPC).** *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 2011, **25**(1):31-46.
 37. Thornton JD, Liu GS, Olsson RA, Downey JM: **Intravenous pretreatment with A1-selective adenosine analogues protects the heart against infarction.** *Circulation* 1992, **85**(2):659-665.

38. Toosy N, McMorris EL, Grace PA, Mathie RT: **Ischaemic preconditioning protects the rat kidney from reperfusion injury.** *BJU international* 1999, **84**(4):489-494.
39. Matsuyama K, Chiba Y, Ihaya A, Kimura T, Tanigawa N, Muraoka R: **Effect of spinal cord preconditioning on paraplegia during cross-clamping of the thoracic aorta.** *The Annals of thoracic surgery* 1997, **63**(5):1315-1320.
40. Peralta C, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J: **Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat.** *Hepatology* 1999, **30**(6):1481-1489.
41. Na HS, Kim YI, Yoon YW, Han HC, Nahm SH, Hong SK: **Ventricular premature beat-driven intermittent restoration of coronary blood flow reduces the incidence of reperfusion-induced ventricular fibrillation in a cat model of regional ischemia.** *American heart journal* 1996, **132**(1 Pt 1):78-83.
42. Andreka G, Vertesaljai M, Szantho G, Font G, Piroth Z, Fontos G, Juhasz ED, Szekely L, Szelid Z, Turner MS *et al*: **Remote ischaemic postconditioning protects the heart during acute myocardial infarction in pigs.** *Heart* 2007, **93**(6):749-752.
43. Kerendi F, Kin H, Halkos ME, Jiang R, Zatta AJ, Zhao ZQ, Guyton RA, Vinten-Johansen J: **Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors.** *Basic research in cardiology* 2005, **100**(5):404-412.
44. Botker HE, Kharbanda R, Schmidt MR, Bottcher M, Kaltoft AK, Terkelsen CJ, Munk K, Andersen NH, Hansen TM, Trautner S *et al*: **Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial.** *Lancet* 2010, **375**(9716):727-734.
45. Zhou C, Liu Y, Yao Y, Zhou S, Fang N, Wang W, Li L: **beta-blockers and volatile anesthetics may attenuate cardioprotection by remote preconditioning in adult cardiac surgery: a meta-analysis of 15 randomized trials.** *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia* 2013, **27**(2):305-311.
46. 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.** *Circulation research* 1993, **72**(6):1293-1299.
47. Baxter GF, Goma FM, Yellon DM: **Characterisation of the infarct-limiting effect of delayed preconditioning: timecourse and dose-dependency studies in rabbit myocardium.** *Basic research in cardiology* 1997, **92**(3):159-167.
48. Rizvi A, Tang XL, Qiu Y, Xuan YT, Takano H, Jadoon AK, Bolli R: **Increased protein synthesis is necessary for the development of late preconditioning against myocardial stunning.** *The American journal of physiology* 1999, **277**(3 Pt 2):H874-884.

49. Redel A, Stumpner J, Tischer-Zeitz T, Lange M, Smul TM, Lotz C, Roewer N, Kehl F: **Comparison of isoflurane-, sevoflurane-, and desflurane-induced pre- and postconditioning against myocardial infarction in mice in vivo.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2009, **234**(10):1186-1191.
50. Fryer RM, Schultz JE, Hsu AK, Gross GJ: **Importance of PKC and tyrosine kinase in single or multiple cycles of preconditioning in rat hearts.** *The American journal of physiology* 1999, **276**(4 Pt 2):H1229-1235.
51. Dote K, Wolff RA, Van Winkle DM: **Hypothermia increases the threshold for ischemic preconditioning.** *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 1998, **116**(2):319-326.
52. Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA, Downey JM: **Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart.** *Circulation* 1991, **84**(1):350-356.
53. Ytrehus K, Liu Y, Downey JM: **Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation.** *The American journal of physiology* 1994, **266**(3 Pt 2):H1145-1152.
54. Yang X, Cohen MV, Downey JM: **Mechanism of cardioprotection by early ischemic preconditioning.** *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 2010, **24**(3):225-234.
55. Minamino T: **Cardioprotection from ischemia/reperfusion injury.** *Circ J* 2012, **76**(5):1074-1082.
56. Tanaka K, Kersten JR, Riess ML: **Opioid-induced cardioprotection.** *Current pharmaceutical design* 2014, **20**(36):5696-5705.
57. Banerjee A, Locke-Winter C, Rogers KB, Mitchell MB, Brew EC, Cairns CB, Bensard DD, Harken AH: **Preconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion by an alpha 1-adrenergic mechanism.** *Circulation research* 1993, **73**(4):656-670.
58. Wang P, Gallagher KP, Downey JM, Cohen MV: **Pretreatment with endothelin-1 mimics ischemic preconditioning against infarction in isolated rabbit heart.** *Journal of molecular and cellular cardiology* 1996, **28**(3):579-588.
59. Liu Y, Tsuchida A, Cohen MV, Downey JM: **Pretreatment with angiotensin II activates protein kinase C and limits myocardial infarction in isolated rabbit hearts.** *Journal of molecular and cellular cardiology* 1995, **27**(3):883-892.
60. Fantinelli JC, Perez Nunez IA, Gonzalez Arbelaez LF, Schinella GR, Mosca SM: **Participation of mitochondrial permeability transition pore in the effects of ischemic preconditioning in hypertrophied hearts: Role of NO and mitoK(ATP).** *International journal of cardiology* 2011.
61. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, Grover GJ: **Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K+ channels. Possible mechanism of cardioprotection.** *Circulation research* 1997, **81**(6):1072-1082.

62. Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, Ziman BD, Wang S, Ytrehus K, Antos CL *et al*: **Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore.** *The Journal of clinical investigation* 2004, **113**(11):1535-1549.
63. Lange M, Smul TM, Blomeyer CA, Redel A, Klotz KN, Roewer N, Kehl F: **Role of the beta1-adrenergic pathway in anesthetic and ischemic preconditioning against myocardial infarction in the rabbit heart in vivo.** *Anesthesiology* 2006, **105**(3):503-510.
64. Lochner A, Genade S, Tromp E, Podzuweit T, Moolman JA: **Ischemic preconditioning and the beta-adrenergic signal transduction pathway.** *Circulation* 1999, **100**(9):958-966.
65. Suematsu Y, Anttila V, Takamoto S, del Nido P: **Cardioprotection afforded by ischemic preconditioning interferes with chronic beta-blocker treatment.** *Scandinavian cardiovascular journal : SCJ* 2004, **38**(5):293-299.
66. Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC: **Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase.** *Anesthesiology* 1997, **87**(2):361-370.
67. Warltier DC, al-Wathiqui MH, Kampine JP, Schmeling WT: **Recovery of contractile function of stunned myocardium in chronically instrumented dogs is enhanced by halothane or isoflurane.** *Anesthesiology* 1988, **69**(4):552-565.
68. Lange M, Redel A, Smul TM, Lotz C, Nefzger T, Stumpner J, Blomeyer C, Gao F, Roewer N, Kehl F: **Desflurane-induced preconditioning has a threshold that is lowered by repetitive application and is mediated by beta 2-adrenergic receptors.** *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia* 2009, **23**(5):607-613.
69. Kehl F, Krolikowski JG, Mraovic B, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR: **Is isoflurane-induced preconditioning dose related?** *Anesthesiology* 2002, **96**(3):675-680.
70. Smul TM, Redel A, Stumpner J, Lange M, Lotz C, Roewer N, Kehl F: **Time course of desflurane-induced preconditioning in rabbits.** *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia* 2010, **24**(1):91-98.
71. Redel A, Stumpner J, Smul TM, Lange M, Jazbutyte V, Ridyard DG, Roewer N, Kehl F: **Endothelial Nitric Oxide Synthase Mediates the First and Inducible Nitric Oxide Synthase Mediates the Second Window of Desflurane-Induced Preconditioning.** *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia* 2012.
72. Mullenheim J, Ebel D, Frassdorf J, Preckel B, Thamer V, Schlack W: **Isoflurane preconditions myocardium against infarction via release of free radicals.** *Anesthesiology* 2002, **96**(4):934-940.
73. Novalija E, Varadarajan SG, Camara AK, An J, Chen Q, Riess ML, Hogg N, Stowe DF: **Anesthetic preconditioning: triggering role of reactive oxygen and nitrogen species in isolated hearts.** *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2002, **283**(1):H44-52.

74. Tanaka K, Weihrauch D, Kehl F, Ludwig LM, LaDisa JF, Jr., Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC: **Mechanism of preconditioning by isoflurane in rabbits: a direct role for reactive oxygen species.** *Anesthesiology* 2002, **97**(6):1485-1490.
75. An J, Varadarajan SG, Novalija E, Stowe DF: **Ischemic and anesthetic preconditioning reduces cytosolic [Ca²⁺] and improves Ca(2+) responses in intact hearts.** *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2001, **281**(4):H1508-1523.
76. Varadarajan SG, An J, Novalija E, Stowe DF: **Sevoflurane before or after ischemia improves contractile and metabolic function while reducing myoplasmic Ca(2+) loading in intact hearts.** *Anesthesiology* 2002, **96**(1):125-133.
77. Toller WG, Montgomery MW, Pagel PS, Hettrick DA, Warltier DC, Kersten JR: **Isoflurane-enhanced recovery of canine stunned myocardium: role for protein kinase C?** *Anesthesiology* 1999, **91**(3):713-722.
78. Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn DR, Pasch T, Schaub MC: **Volatile anesthetics mimic cardiac preconditioning by priming the activation of mitochondrial K(ATP) channels via multiple signaling pathways.** *Anesthesiology* 2002, **97**(1):4-14.
79. Stadnicka A, Kwok WM, Warltier DC, Bosnjak ZJ: **Protein tyrosine kinase-dependent modulation of isoflurane effects on cardiac sarcolemmal K(ATP) channel.** *Anesthesiology* 2002, **97**(5):1198-1208.
80. Wang C, Weihrauch D, Schwabe DA, Bienengraeber M, Warltier DC, Kersten JR, Pratt PF, Jr., Pagel PS: **Extracellular signal-regulated kinases trigger isoflurane preconditioning concomitant with upregulation of hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor expression in rats.** *Anesthesia and analgesia* 2006, **103**(2):281-288, table of contents.
81. Ludwig LM, Weihrauch D, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC: **Protein kinase C translocation and Src protein tyrosine kinase activation mediate isoflurane-induced preconditioning in vivo: potential downstream targets of mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels and reactive oxygen species.** *Anesthesiology* 2004, **100**(3):532-539.
82. Kwok WM, Martinelli AT, Fujimoto K, Suzuki A, Stadnicka A, Bosnjak ZJ: **Differential modulation of the cardiac adenosine triphosphate-sensitive potassium channel by isoflurane and halothane.** *Anesthesiology* 2002, **97**(1):50-56.
83. Hanouz JL, Yvon A, Massetti M, Lepage O, Babatasi G, Khayat A, Bricard H, Gerard JL: **Mechanisms of desflurane-induced preconditioning in isolated human right atria in vitro.** *Anesthesiology* 2002, **97**(1):33-41.
84. Redel A, Lange M, Jazbutyte V, Lotz C, Smul TM, Roewer N, Kehl F: **Activation of mitochondrial large-conductance calcium-activated K+ channels via protein kinase A mediates desflurane-induced preconditioning.** *Anesthesia and analgesia* 2008, **106**(2):384-391, table of contents.

85. Kersten JR, Orth KG, Pagel PS, Mei DA, Gross GJ, Warltier DC: **Role of adenosine in isoflurane-induced cardioprotection.** *Anesthesiology* 1997, **86**(5):1128-1139.
86. Lange M, Smul TM, Redel A, Lotz C, Jazbutyte V, Schnupp V, Roewer N, Kehl F: **Differential role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in desflurane-induced preconditioning and cardioprotection by metoprolol: metoprolol blocks desflurane-induced preconditioning.** *Anesthesiology* 2008, **109**(1):72-80.
87. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J: **Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning.** *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2003, **285**(2):H579-588.
88. Xi J, McIntosh R, Shen X, Lee S, Chanoit G, Criswell H, Zvara DA, Xu Z: **Adenosine A2A and A2B receptors work in concert to induce a strong protection against reperfusion injury in rat hearts.** *Journal of molecular and cellular cardiology* 2009, **47**(5):684-690.
89. Zatta AJ, Kin H, Yoshishige D, Jiang R, Wang N, Reeves JG, Mykytenko J, Guyton RA, Zhao ZQ, Caffrey JL *et al*: **Evidence that cardioprotection by postconditioning involves preservation of myocardial opioid content and selective opioid receptor activation.** *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2008, **294**(3):H1444-1451.
90. Penna C, Mancardi D, Rastaldo R, Losano G, Pagliaro P: **Intermittent activation of bradykinin B2 receptors and mitochondrial KATP channels trigger cardiac postconditioning through redox signaling.** *Cardiovascular research* 2007, **75**(1):168-177.
91. Schulman D, Latchman DS, Yellon DM: **Urocortin protects the heart from reperfusion injury via upregulation of p42/p44 MAPK signaling pathway.** *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2002, **283**(4):H1481-1488.
92. Hausenloy DJ, Yellon DM: **New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway.** *Cardiovascular research* 2004, **61**(3):448-460.
93. Zhu M, Feng J, Lucchinetti E, Fischer G, Xu L, Pedrazzini T, Schaub MC, Zaugg M: **Ischemic postconditioning protects remodeled myocardium via the PI3K-PKB/Akt reperfusion injury salvage kinase pathway.** *Cardiovascular research* 2006, **72**(1):152-162.
94. Hausenloy DJ, Yellon DM: **Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection.** *Heart failure reviews* 2007, **12**(3-4):217-234.
95. Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H, Heusch G, Schulz R: **The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure.** *Pharmacology & therapeutics* 2008, **120**(2):172-185.
96. Lacerda L, Somers S, Opie LH, Lecour S: **Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway.** *Cardiovascular research* 2009, **84**(2):201-208.

97. Schlack W, Preckel B, Barthel H, Obal D, Thamer V: **Halothane reduces reperfusion injury after regional ischaemia in the rabbit heart in vivo.** *British journal of anaesthesia* 1997, **79**(1):88-96.
98. Chiari PC, Bienengraeber MW, Pagel PS, Krolikowski JG, Kersten JR, Warltier DC: **Isoflurane protects against myocardial infarction during early reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction: evidence for anesthetic-induced postconditioning in rabbits.** *Anesthesiology* 2005, **102**(1):102-109.
99. Smul TM, Lange M, Redel A, Stumpner J, Lotz CA, Roewer N, Kehl F: **Desflurane-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury depends on timing.** *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia* 2009, **23**(5):600-606.
100. Preckel B, Schlack W, Comfere T, Obal D, Barthel H, Thamer V: **Effects of enflurane, isoflurane, sevoflurane and desflurane on reperfusion injury after regional myocardial ischaemia in the rabbit heart in vivo.** *British journal of anaesthesia* 1998, **81**(6):905-912.
101. Krolikowski JG, Bienengraeber M, Weihrauch D, Warltier DC, Kersten JR, Pagel PS: **Inhibition of mitochondrial permeability transition enhances isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion: the role of mitochondrial KATP channels.** *Anesthesia and analgesia* 2005, **101**(6):1590-1596.
102. Stumpner J, Lange M, Beck A, Smul TM, Lotz CA, Kehl F, Roewer N, Redel A: **Desflurane-induced post-conditioning against myocardial infarction is mediated by calcium-activated potassium channels: role of the mitochondrial permeability transition pore.** *British journal of anaesthesia* 2012, **108**(4):594-601.
103. Lange M, Redel A, Lotz C, Smul TM, Blomeyer C, Frank A, Stumpner J, Roewer N, Kehl F: **Desflurane-induced postconditioning is mediated by beta-adrenergic signaling: role of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors, protein kinase A, and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II.** *Anesthesiology* 2009, **110**(3):516-528.
104. Feng J, Lucchinetti E, Ahuja P, Pasch T, Perriard JC, Zaugg M: **Isoflurane postconditioning prevents opening of the mitochondrial permeability transition pore through inhibition of glycogen synthase kinase 3beta.** *Anesthesiology* 2005, **103**(5):987-995.
105. Chen HT, Yang CX, Li H, Zhang CJ, Wen XJ, Zhou J, Fan YL, Huang T, Zeng YM: **Cardioprotection of sevoflurane postconditioning by activating extracellular signal-regulated kinase 1/2 in isolated rat hearts.** *Acta pharmacologica Sinica* 2008, **29**(8):931-941.
106. Li H, Wang JK, Zeng YM, Yang CX, Chen HT, Wen XJ, Shui CL, Liang H: **Sevoflurane post-conditioning protects against myocardial reperfusion injury by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction.** *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 2008, **35**(9):1043-1051.
107. Yu LN, Yu J, Zhang FJ, Yang MJ, Ding TT, Wang JK, He W, Fang T, Chen G, Yan M: **Sevoflurane postconditioning reduces myocardial reperfusion injury in rat isolated hearts via activation of PI3K/Akt signaling and**

- modulation of Bcl-2 family proteins.** *Journal of Zhejiang University Science B* 2010, **11**(9):661-672.
108. Symons JA, Myles PS: **Myocardial protection with volatile anaesthetic agents during coronary artery bypass surgery: a meta-analysis.** *British journal of anaesthesia* 2006, **97**(2):127-136.
 109. Tritapepe L, Landoni G, Guarracino F, Pompei F, Crivellari M, Maselli D, De Luca M, Fochi O, D'Avolio S, Bignami E *et al*: **Cardiac protection by volatile anaesthetics: a multicentre randomized controlled study in patients undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass.** *European journal of anaesthesiology* 2007, **24**(4):323-331.
 110. Heusch G: **Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic.** *Lancet* 2013, **381**(9861):166-175.
 111. Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, Heusch G, Vinten-Johansen J, Yellon DM, Schulz R *et al*: **Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology.** *Cardiovascular research* 2010, **87**(3):406-423.
 112. Mewton N, Ivanes F, Cour M, Ovize M: **Postconditioning: from experimental proof to clinical concept.** *Disease models & mechanisms* 2010, **3**(1-2):39-44.
 113. Miura T, Miki T: **Limitation of myocardial infarct size in the clinical setting: current status and challenges in translating animal experiments into clinical therapy.** *Basic research in cardiology* 2008, **103**(6):501-513.
 114. Frohlich GM, Meier P, White SK, Yellon DM, Hausenloy DJ: **Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI.** *European heart journal* 2013, **34**(23):1714-1722.
 115. Yu CH, Beattie WS: **The effects of volatile anesthetics on cardiac ischemic complications and mortality in CABG: a meta-analysis.** *Canadian journal of anaesthesia = Journal canadien d'anesthesie* 2006, **53**(9):906-918.
 116. Javadov SA, Lim KH, Kerr PM, Suleiman MS, Angelini GD, Halestrap AP: **Protection of hearts from reperfusion injury by propofol is associated with inhibition of the mitochondrial permeability transition.** *Cardiovascular research* 2000, **45**(2):360-369.
 117. McPherson BC, Yao Z: **Signal transduction of opioid-induced cardioprotection in ischemia-reperfusion.** *Anesthesiology* 2001, **94**(6):1082-1088.
 118. Kristensen SD, Knuuti J, Saraste A, Anker S, Botker HE, Hert SD, Ford I, Gonzalez-Juanatey JR, Gorenek B, Heyndrickx GR *et al*: **2014 ESC/ESA Guidelines on non-cardiac surgery: cardiovascular assessment and management: The Joint Task Force on non-cardiac surgery: cardiovascular assessment and management of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Anaesthesiology (ESA).** *European heart journal* 2014, **35**(35):2383-2431.

119. Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR, Jr., Trendelenburg U: **International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors**. *Pharmacological reviews* 1994, **46**(2):121-136.
120. McDevitt DG: **In vivo studies on the function of cardiac beta-adrenoceptors in man**. *European heart journal* 1989, **10 Suppl B**:22-28.
121. Kallal L, Gagnon AW, Penn RB, Benovic JL: **Visualization of agonist-induced sequestration and down-regulation of a green fluorescent protein-tagged beta2-adrenergic receptor**. *The Journal of biological chemistry* 1998, **273**(1):322-328.
122. Goodman OB, Jr., Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, Keen JH, Benovic JL: **Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor**. *Nature* 1996, **383**(6599):447-450.
123. Mangmool S, Shukla AK, Rockman HA: **beta-Arrestin-dependent activation of Ca(2+)/calmodulin kinase II after beta(1)-adrenergic receptor stimulation**. *The Journal of cell biology* 2010, **189**(3):573-587.
124. Zhu WZ, Wang SQ, Chakir K, Yang D, Zhang T, Brown JH, Devic E, Kobilka BK, Cheng H, Xiao RP: **Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca2+/calmodulin kinase II**. *The Journal of clinical investigation* 2003, **111**(5):617-625.
125. Curran J, Hinton MJ, Rios E, Bers DM, Shannon TR: **Beta-adrenergic enhancement of sarcoplasmic reticulum calcium leak in cardiac myocytes is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase**. *Circulation research* 2007, **100**(3):391-398.
126. Baltas LG, Karczewski P, Bartel S, Krause EG: **The endogenous cardiac sarcoplasmic reticulum Ca2+/calmodulin-dependent kinase is activated in response to beta-adrenergic stimulation and becomes Ca2+-independent in intact beating hearts**. *FEBS letters* 1997, **409**(2):131-136.
127. Grimm M, Brown JH: **Beta-adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII**. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2010, **48**(2):322-330.
128. Noma T, Lemaire A, Naga Prasad SV, Barki-Harrington L, Tilley DG, Chen J, Le Corvoisier P, Violin JD, Wei H, Lefkowitz RJ *et al*: **Beta-arrestin-mediated beta1-adrenergic receptor transactivation of the EGFR confers cardioprotection**. *The Journal of clinical investigation* 2007, **117**(9):2445-2458.
129. Tilley DG, Kim IM, Patel PA, Violin JD, Rockman HA: **beta-Arrestin mediates beta1-adrenergic receptor-epidermal growth factor receptor interaction and downstream signaling**. *The Journal of biological chemistry* 2009, **284**(30):20375-20386.
130. Kim IM, Tilley DG, Chen J, Salazar NC, Whalen EJ, Violin JD, Rockman HA: **Beta-blockers alprenolol and carvedilol stimulate beta-arrestin-mediated EGFR transactivation**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, **105**(38):14555-14560.

131. Zaugg M, Xu W, Lucchinetti E, Shafiq SA, Jamali NZ, Siddiqui MA: **Beta-adrenergic receptor subtypes differentially affect apoptosis in adult rat ventricular myocytes.** *Circulation* 2000, **102**(3):344-350.
132. Zhu WZ, Zheng M, Koch WJ, Lefkowitz RJ, Kobilka BK, Xiao RP: **Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(4):1607-1612.
133. White DC, Hata JA, Shah AS, Glower DD, Lefkowitz RJ, Koch WJ: **Preservation of myocardial beta-adrenergic receptor signaling delays the development of heart failure after myocardial infarction.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, **97**(10):5428-5433.
134. Frances C, Nazeyrollas P, Prevost A, Moreau F, Pisani J, Davani S, Kantelip JP, Millart H: **Role of beta 1- and beta 2-adrenoceptor subtypes in preconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion.** *Journal of cardiovascular pharmacology* 2003, **41**(3):396-405.
135. Spear JF, Prabu SK, Galati D, Raza H, Anandatheerthavarada HK, Avadhani NG: **beta1-Adrenoreceptor activation contributes to ischemia-reperfusion damage as well as playing a role in ischemic preconditioning.** *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2007, **292**(5):H2459-2466.
136. Heidenreich PA, McDonald KM, Hastie T, Fadel B, Hagan V, Lee BK, Hlatky MA: **Meta-analysis of trials comparing beta-blockers, calcium antagonists, and nitrates for stable angina.** *JAMA : the journal of the American Medical Association* 1999, **281**(20):1927-1936.
137. Shekelle PG, Rich MW, Morton SC, Atkinson CS, Tu W, Maglione M, Rhodes S, Barrett M, Fonarow GC, Greenberg B *et al*: **Efficacy of angiotensin-converting enzyme inhibitors and beta-blockers in the management of left ventricular systolic dysfunction according to race, gender, and diabetic status: a meta-analysis of major clinical trials.** *Journal of the American College of Cardiology* 2003, **41**(9):1529-1538.
138. Freemantle N, Cleland J, Young P, Mason J, Harrison J: **beta Blockade after myocardial infarction: systematic review and meta regression analysis.** *BMJ* 1999, **318**(7200):1730-1737.
139. **LEITLINIEN ZUR BEHANDLUNG DER ARTERIELLEN HYPERTONIE(cited: 29.10.2012)** [http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/046-001_S2_Behandlung_der_arteriellen_Hypertonie_06-2008_06-2013.pdf]
140. **Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische KHK – Langfassung. Version 1.X. 2006 [cited: 29.10.2012]. Available from: <http://www.khk-versorgungsleitlinien.de>; DOI: 10.6101/AZQ/000041**
141. **Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische Herzinsuffizienz – Langfassung. Version 1.X. 2009 [cited: 29.10.2012]. Available from: <http://www.versorgungsleitlinien.de/themen/herzinsuffizienz> ©**
142. Devereaux PJ, Yang H, Yusuf S, Guyatt G, Leslie K, Villar JC, Xavier D, Chrolavicius S, Greenspan L, Pogue J *et al*: **Effects of extended-release metoprolol succinate in patients undergoing non-cardiac surgery**

- (POISE trial): a randomised controlled trial.** *Lancet* 2008, **371**(9627):1839-1847.
143. Fleisher LA, Beckman JA, Brown KA, Calkins H, Chaikof EL, Fleischmann KE, Freeman WK, Froehlich JB, Kasper EK, Kersten JR *et al*: **ACC/AHA 2006 guideline update on perioperative cardiovascular evaluation for noncardiac surgery: focused update on perioperative beta-blocker therapy--a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2002 Guidelines on Perioperative Cardiovascular Evaluation for Noncardiac Surgery).** *Anesthesia and analgesia* 2007, **104**(1):15-26.
 144. Fleisher LA, Beckman JA, Brown KA, Calkins H, Chaikof EL, Fleischmann KE, Freeman WK, Froehlich JB, Kasper EK, Kersten JR *et al*: **2009 ACCF/AHA focused update on perioperative beta blockade incorporated into the ACC/AHA 2007 guidelines on perioperative cardiovascular evaluation and care for noncardiac surgery.** *Journal of the American College of Cardiology* 2009, **54**(22):e13-e118.
 145. Angeli F, Verdecchia P, Karthikeyan G, Mazzotta G, Gentile G, Reboldi G: **ss-Blockers reduce mortality in patients undergoing high-risk non-cardiac surgery.** *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions* 2010, **10**(4):247-259.
 146. Angeli F, Verdecchia P, Karthikeyan G, Mazzotta G, Repaci S, del Pinto M, Gentile G, Cavallini C, Reboldi G: **Beta-blockers and risk of all-cause mortality in non-cardiac surgery.** *Therapeutic advances in cardiovascular disease* 2010, **4**(2):109-118.
 147. Warltier DC, Gross GJ, Jesmok GJ, Brooks HL, Hardman HF: **Protection of ischemic myocardium: comparison of effects of propranolol, bevantolol and N-dimethyl propranolol on infarct size following coronary artery occlusion in anesthetized dogs.** *Cardiology* 1980, **66**(3):133-146.
 148. Feng M, Whitesall S, Zhang Y, Beibel M, D'Alecy L, DiPetrillo K: **Validation of volume-pressure recording tail-cuff blood pressure measurements.** *American journal of hypertension* 2008, **21**(12):1288-1291.
 149. Davila D: **[Therapeutic systems and drug delivery. 4. The osmotic minipump].** *Lijecnicki vjesnik* 1992, **114**(1-4):62-67.
 150. Mazze RI, Rice SA, Baden JM: **Halothane, isoflurane, and enflurane MAC in pregnant and nonpregnant female and male mice and rats.** *Anesthesiology* 1985, **62**(3):339-341.
 151. Sonner JM, Gong D, Eger EI, 2nd: **Naturally occurring variability in anesthetic potency among inbred mouse strains.** *Anesthesia and analgesia* 2000, **91**(3):720-726.
 152. Janssen BJ, Leenders PJ, Smits JF: **Short-term and long-term blood pressure and heart rate variability in the mouse.** *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2000, **278**(1):R215-225.
 153. Huang MH, Wu Y, Nguyen V, Rastogi S, McConnell BK, Wijaya C, Uretsky BF, Poh KK, Tan HC, Fujise K: **Heart protection by combination therapy with**

- esmolol and milrinone at late-ischemia and early reperfusion.**
Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy 2011, **25**(3):223-232.
154. Ping P, Gelzer-Bell R, Roth DA, Kiel D, Insel PA, Hammond HK: **Reduced beta-adrenergic receptor activation decreases G-protein expression and beta-adrenergic receptor kinase activity in porcine heart.** *The Journal of clinical investigation* 1995, **95**(3):1271-1280.
 155. Becher PM, Lindner D, Miteva K, Savvatis K, Zietsch C, Schmack B, Van Linthout S, Westermann D, Schultheiss HP, Tschope C: **Role of heart rate reduction in the prevention of experimental heart failure: comparison between If-channel blockade and beta-receptor blockade.** *Hypertension* 2012, **59**(5):949-957.
 156. Stumpner J, Smul TM, Redel A, Hilz T, Tischer-Zeitz T, Eisenbarth H, Schick MA, Kehl F, Roewer N, Lange M: **Desflurane-induced and ischaemic postconditioning against myocardial infarction are mediated by Pim-1 kinase.** *Acta anaesthesiologica Scandinavica* 2012, **56**(7):904-913.
 157. Qiu Y, Hearse DJ: **Comparison of ischemic vulnerability and responsiveness to cardioplegic protection in crystalloid-perfused versus blood-perfused hearts.** *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 1992, **103**(5):960-968.
 158. Reunanen A, Karjalainen J, Ristola P, Heliovaara M, Knekt P, Aromaa A: **Heart rate and mortality.** *Journal of internal medicine* 2000, **247**(2):231-239.
 159. Kannel WB, Kannel C, Paffenbarger RS, Jr., Cupples LA: **Heart rate and cardiovascular mortality: the Framingham Study.** *American heart journal* 1987, **113**(6):1489-1494.
 160. Lanza GA, Fox K, Crea F: **Heart rate: a risk factor for cardiac diseases and outcomes? Pathophysiology of cardiac diseases and the potential role of heart rate slowing.** *Advances in cardiology* 2006, **43**:1-16.
 161. Murphy E, Steenbergen C: **Gender-based differences in mechanisms of protection in myocardial ischemia-reperfusion injury.** *Cardiovascular research* 2007, **75**(3):478-486.
 162. Przyklenk K, Maynard M, Darling CE, Whittaker P: **Aging mouse hearts are refractory to infarct size reduction with post-conditioning.** *Journal of the American College of Cardiology* 2008, **51**(14):1393-1398.
 163. Abete P, Ferrara N, Cioppa A, Ferrara P, Bianco S, Calabrese C, Cacciatore F, Longobardi G, Rengo F: **Preconditioning does not prevent postischemic dysfunction in aging heart.** *Journal of the American College of Cardiology* 1996, **27**(7):1777-1786.
 164. Fenton RA, Dickson EW, Meyer TE, Dobson JG, Jr.: **Aging reduces the cardioprotective effect of ischemic preconditioning in the rat heart.** *Journal of molecular and cellular cardiology* 2000, **32**(7):1371-1375.
 165. Kalenka A, Maurer MH, Feldmann RE, Kuschinsky W, Waschke KF: **Volatile anesthetics evoke prolonged changes in the proteome of the left ventricle myocardium: defining a molecular basis of cardioprotection?** *Acta anaesthesiologica Scandinavica* 2006, **50**(4):414-427.

166. Gaudin C, Ishikawa Y, Wight DC, Mahdavi V, Nadal-Ginard B, Wagner TE, Vatner DE, Homcy CJ: **Overexpression of Gs alpha protein in the hearts of transgenic mice.** *The Journal of clinical investigation* 1995, **95**(4):1676-1683.
167. Zhang X, Szeto C, Gao E, Tang M, Jin J, Fu Q, Makarewich C, Ai X, Li Y, Tang A *et al*: **Cardiotoxic and cardioprotective features of chronic beta-adrenergic signaling.** *Circulation research* 2013, **112**(3):498-509.
168. Asai K, Yang GP, Geng YJ, Takagi G, Bishop S, Ishikawa Y, Shannon RP, Wagner TE, Vatner DE, Homcy CJ *et al*: **Beta-adrenergic receptor blockade arrests myocyte damage and preserves cardiac function in the transgenic G(salpha) mouse.** *The Journal of clinical investigation* 1999, **104**(5):551-558.
169. Ping P, Hammond HK: **Diverse G protein and beta-adrenergic receptor mRNA expression in normal and failing porcine hearts.** *The American journal of physiology* 1994, **267**(5 Pt 2):H2079-2085.
170. Kukreja RC, Yin C, Salloum FN: **MicroRNAs: new players in cardiac injury and protection.** *Molecular pharmacology* 2011, **80**(4):558-564.
171. Bauersachs J, Thum T: **Biogenesis and regulation of cardiovascular microRNAs.** *Circulation research* 2011, **109**(3):334-347.
172. Kim IM, Wang Y, Park KM, Tang Y, Teoh JP, Vinson J, Traynham CJ, Pironti G, Mao L, Su H *et al*: **beta-arrestin1-biased beta1-adrenergic receptor signaling regulates microRNA processing.** *Circulation research* 2014, **114**(5):833-844.
173. Lymperopoulos A, Negussie S: **betaArrestins in cardiac G protein-coupled receptor signaling and function: partners in crime or "good cop, bad cop"?** *International journal of molecular sciences* 2013, **14**(12):24726-24741.
174. Hausenloy DJ, Erik Botker H, Condorelli G, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Heusch G, Lecour S, van Laake LW, Madonna R, Ruiz-Meana M *et al*: **Translating cardioprotection for patient benefit: position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology.** *Cardiovascular research* 2013, **98**(1):7-27.
175. Huhn R, Heinen A, Weber NC, Hollmann MW, Schlack W, Preckel B: **Hyperglycaemia blocks sevoflurane-induced postconditioning in the rat heart in vivo: cardioprotection can be restored by blocking the mitochondrial permeability transition pore.** *British journal of anaesthesia* 2008, **100**(4):465-471.
176. Tanaka K, Kehl F, Gu W, Krolkowski JG, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR: **Isoflurane-induced preconditioning is attenuated by diabetes.** *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2002, **282**(6):H2018-2023.
177. Ueda Y, Kitakaze M, Komamura K, Minamino T, Asanuma H, Sato H, Kuzuya T, Takeda H, Hori M: **Pravastatin restored the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning blunted by hypercholesterolemia in the rabbit model of myocardial infarction.** *Journal of the American College of Cardiology* 1999, **34**(7):2120-2125.

178. Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF: **Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning.** *Pharmacological reviews* 2007, **59**(4):418-458.
179. Ibanez B, Macaya C, Sanchez-Brunete V, Pizarro G, Fernandez-Friera L, Mateos A, Fernandez-Ortiz A, Garcia-Ruiz JM, Garcia-Alvarez A, Iniguez A *et al*: **Effect of early metoprolol on infarct size in ST-segment-elevation myocardial infarction patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: the Effect of Metoprolol in Cardioprotection During an Acute Myocardial Infarction (METOCARD-CNIC) trial.** *Circulation* 2013, **128**(14):1495-1503.
180. Pizarro G, Fernandez-Friera L, Fuster V, Fernandez-Jimenez R, Garcia-Ruiz JM, Garcia-Alvarez A, Mateos A, Barreiro MV, Escalera N, Rodriguez MD *et al*: **Long-term benefit of early pre-reperfusion metoprolol administration in patients with acute myocardial infarction: results from the METOCARD-CNIC trial (Effect of Metoprolol in Cardioprotection During an Acute Myocardial Infarction).** *Journal of the American College of Cardiology* 2014, **63**(22):2356-2362.
181. Risenfors M, Herlitz J, Berg CH, Dellborg M, Gustavsson G, Gottfridsson C, Lomsky M, Swedberg K, Hjalmarsson A: **Early treatment with thrombolysis and beta-blockade in suspected acute myocardial infarction: results from the TEAHAT Study.** *Journal of internal medicine Supplement* 1991, **734**:35-42.
182. Chen ZM, Pan HC, Chen YP, Peto R, Collins R, Jiang LX, Xie JX, Liu LS, group Cc: **Early intravenous then oral metoprolol in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial.** *Lancet* 2005, **366**(9497):1622-1632.
183. Dunkelgrun M, Boersma E, Schouten O, Koopman-van Gemert AW, van Poorten F, Bax JJ, Thomson IR, Poldermans D, Dutch Echocardiographic Cardiac Risk Evaluation Applying Stress Echocardiography Study G: **Bisoprolol and fluvastatin for the reduction of perioperative cardiac mortality and myocardial infarction in intermediate-risk patients undergoing noncardiovascular surgery: a randomized controlled trial (DECREASE-IV).** *Annals of surgery* 2009, **249**(6):921-926.
184. Burns PG, Krukenkamp IB, Caldarone CA, Gaudette GR, Bukhari EA, Levitsky S: **Does cardiopulmonary bypass alone elicit myoprotective preconditioning?** *Circulation* 1995, **92**(9 Suppl):II447-451.
185. Smul TM, Stumpner J, Blomeyer C, Lotz C, Redel A, Lange M, Roewer N, Kehl F: **Propofol inhibits desflurane-induced preconditioning in rabbits.** *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia* 2011, **25**(2):276-281.
186. Schultz JJ, Hsu AK, Gross GJ: **Ischemic preconditioning and morphine-induced cardioprotection involve the delta (delta)-opioid receptor in the intact rat heart.** *Journal of molecular and cellular cardiology* 1997, **29**(8):2187-2195.
187. Napoli C, Liguori A, Chiariello M, Di Ieso N, Condorelli M, Ambrosio G: **New-onset angina preceding acute myocardial infarction is associated with improved contractile recovery after thrombolysis.** *European heart journal* 1998, **19**(3):411-419.

188. Nakagawa Y, Ito H, Kitakaze M, Kusuoka H, Hori M, Kuzuya T, Higashino Y, Fujii K, Minamino T: **Effect of angina pectoris on myocardial protection in patients with reperfused anterior wall myocardial infarction: retrospective clinical evidence of "preconditioning"**. *Journal of the American College of Cardiology* 1995, **25**(5):1076-1083.
189. Skyschally A, Walter B, Heusch G: **Coronary microembolization during early reperfusion: infarct extension, but protection by ischaemic postconditioning**. *European heart journal* 2013, **34**(42):3314-3321.
190. Frey UH, Muehlschlegel JD, Ochterbeck C, Fox AA, Shernan SK, Collard CD, Lichtner P, Peters J, Body S: **GNAS gene variants affect beta-blocker-related survival after coronary artery bypass grafting**. *Anesthesiology* 2014, **120**(5):1109-1117.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Chefarzt Univ.- Prof. Dr. med. Dr. h.c. Norbert Roewer für die Möglichkeit an seiner Klinik forschen und meine Dissertation anfertigen zu dürfen.

Ich möchte mich bei meinem Arbeitsgruppenleiter Prof. Dr. Markus Lange für die Überlassung des Themas meiner Promotion bedanken.

Danken möchte ich meinem Betreuer Tobias Tischer-Zeitz für die Begleitung und Betreuung während der Anfertigung meiner Doktorarbeit. Er förderte und forderte meine wissenschaftliche und persönliche Weiterentwicklung in besonderem Maße.

Weiterhin möchte ich mich bei Andreas Neuwirth für die methodische Einarbeitung, bei Tobias Hecht und Christina Hille als Leidensgenossen im Labor und bei der Anfertigung der Dissertation für den konstruktiven Austausch und die Hilfestellungen bedanken.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium und die Promotion ermöglicht haben und mir alle Freiheiten in der Gestaltung meiner Ausbildung ließen sowie meinem Mann, der mir während dieser Zeit immer zur Seite stand, den Rücken freihielt und Verständnis für alle emotionalen Höhen und Tiefen hatte.

Vielen Dank!