

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie  
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Norbert Roewer

**Desfluran induziert ein erstes und ein zweites Fenster  
der Präkonditionierung gegen Myokardinfarkt *in vivo***

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
**Jan Stumpner**  
aus Herford

Würzburg, Dezember 2007

Referent: Prof. Dr. med. F. Kehl  
Koreferent: Prof. Dr. med. H. Klinker  
Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 21.04.2008

Der Promovend ist Arzt.

*Meinen Eltern gewidmet.*

# **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Kardioprotektion durch Präkonditionierung</b>	<b>1</b>
1.1.1	Ischämische Präkonditionierung	2
1.1.2	Anästhetika-induzierte Präkonditionierung	3
1.1.3	Mechanismen der Präkonditionierung	5
<b>1.3</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>8</b>
<b>2.1</b>	<b>Versuchsgenehmigung</b>	<b>8</b>
<b>2.2</b>	<b>Durchführung der Untersuchung</b>	<b>8</b>
2.2.1	Versuchstiere	8
2.2.2	Narkose und Beatmung	8
2.2.3	Präparation	9
2.2.4	Induktion der myokardialen Ischämie	10
2.2.5	Beendigung des Experiments	10
2.2.6	Auswertung des Experiments	11
<b>2.3</b>	<b>Experimentelles Protokoll</b>	<b>12</b>
<b>2.4</b>	<b>Auswertung und Statistik</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>15</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>22</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>30</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>31</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AAR	Area at risk; ischämisches Myokardareal
APC	Anesthetic-induced preconditioning; Anästhetika-induzierte Präkonditionierung
ATP	Adenosintriphosphat
CO	Cardiac output; entspricht dem Herzzeitvolumen
EKG	Elektrokardiogramm
GMP	Guanosinmonophosphat
HF	Herzfrequenz
HZV	Herzzeitvolumen
IPC	Ischemic preconditioning; ischämische Präkonditionierung
K <sub>ATP</sub> -Kanäle	ATP-regulierte Kalium-Kanäle
KHK	Koronare Herzkrankheit
LNA	L- $\omega$ -Nitro-Arginin
LVEDP	Left ventricular enddiastolic pressure; linksventrikulärer enddiastolischer Druck
MAC	Minimal alveolar concentration; minimale alveoläre Konzentration
MAP	Mean arterial pressure; mittlerer arterieller Blutdruck
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NZ	Normal zone; nicht-ischämisches Myokardareal
PKC	Proteinkinase C
ROS	Reactive oxygen species; reaktive Sauerstoff-Metabolite
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid

# 1 Einleitung

Die perioperative kardiale Morbidität ist trotz moderner Narkoseführung und optimaler perioperativer Patientenbetreuung die häufigste Ursache der perioperativen Mortalität. Mangano et al. definieren die perioperative kardiale Morbidität als das Auftreten von Myokardinfarkt, instabiler Angina pectoris, Herzinsuffizienz, gefährlichen Arrhythmien und plötzlichem Herztod in engem zeitlichen Abstand zu einem operativen Eingriff.<sup>1</sup> Postoperative myokardiale Ischämien sind etwa doppelt so häufig wie prä- oder intraoperative Ischämien und bezüglich Dauer und Intensität am gefährlichsten.<sup>1</sup> Die Erforschung und Etablierung perioperativer Strategien zur Kardioprotektion sind von großer Bedeutung für den perioperativ tätigen Arzt. Die Anästhetika-induzierte Präkonditionierung (APC) verspricht dabei einen großen Anteil zur Verbesserung der perioperativen Patientenversorgung beizutragen.<sup>2;3</sup>

## 1.1 Kardioprotektion durch Präkonditionierung

Unter dem Begriff der Präkonditionierung versteht man die Veränderung des Phänotyps einer Zelle mit dem Resultat einer gesteigerten Toleranz dieser Zelle gegenüber ischämischen Phasen. Die Veränderung des zellulären Phänotyps wird durch einen Trigger induziert. Dabei nehmen z.B. eine kurzzeitige Ischämie oder bestimmte pharmakologische Substanzen, wie z.B. volatile Anästhetika, die Rolle des Triggers ein. Der Oberbegriff der Präkonditionierung umfasst zum einen die ischämische Präkonditionierung (IPC), zum anderen die pharmakologisch-induzierte Präkonditionierung, zu der die Anästhetika-induzierte Präkonditionierung (APC) gerechnet wird. Verschiedene andere Pharmaka wie z.B. Opioide<sup>4</sup> oder Adenosin<sup>5</sup> können das Myokard ebenfalls vor den Auswirkungen einer länger dauernden Ischämie schützen.

### 1.1.1 Ischämische Präkonditionierung

Das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung (IPC) wurde 1986 von Murry et al.<sup>6</sup> erstmals beschrieben. In dieser bahnbrechenden Untersuchung wurde gezeigt, dass vier Episoden einer je fünfminütigen koronaren Okklusion und Reperfusion vor einer 40-minütigen Koronararterienokklusion die Herzinfarktgröße um ca. 75 % verringern konnten.

IPC wird als der wirkungsvollste bisher identifizierte kardiale Protektionsmechanismus angesehen. Die IPC wurde in mehreren Tierspezies nachgewiesen.<sup>7</sup> Dem protektiven Effekt der IPC liegen komplexe Mechanismen zugrunde, welche die kaskadenartige Aktivierung und das Zusammenspiel verschiedener intra- und extrazellulärer Mediatoren umfassen. Zu diesen Mediatoren zählen u.a. inhibitorische G-Proteine, die Proteinkinase  $C_e$  und Stickstoffmonoxid (NO). Inhibitorische G-Proteine führen zu einer Aktivitätssteigerung der Proteinkinase  $C_e$ . Alle diese verschiedenen Signaltransduktionswege münden nach bisherigem Erkenntnisstand in einer gemeinsamen Endstrecke, der Öffnung mitochondrialer ATP-regulierter  $K^+$ -Kanäle.

Eine frühe Phase der ischämischen Präkonditionierung hält bei Kaninchen ca. 2 Stunden an.<sup>6</sup> Diese frühe Phase wird auch als erstes Fenster der IPC bezeichnet. Nach 24 Stunden tritt eine erneute Phase der gesteigerten Widerstandsfähigkeit des Myokards gegenüber längeren ischämischen Zuständen auf. Diese späte Phase der Präkonditionierung oder das sog. zweite Fenster hält für weitere 48-72 Stunden an.<sup>8-10</sup> In der Zeitspanne von 2-3 bis 24 Stunden nach der triggernden kurzen Ischämie ist keine Kardioprotektion nachweisbar, d.h. die Kardioprotektion durch IPC beschreibt ein biphasisches Verlaufsmuster mit einer zwischengeschalteten Phase ohne präkonditionierenden Effekt (Abb. 1).

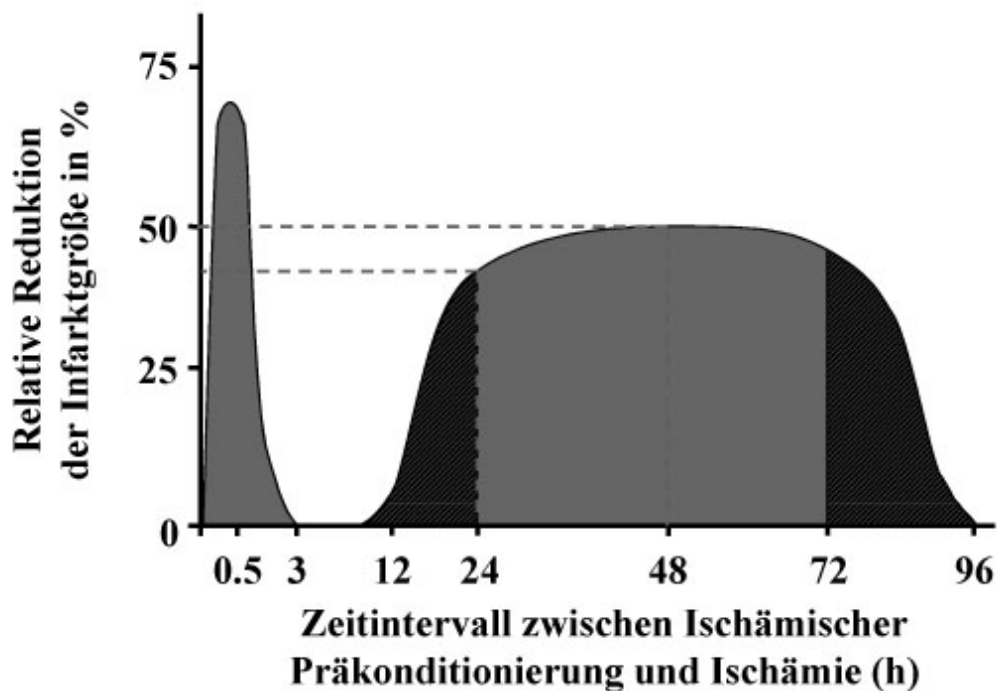


Abb. 1: Biphasisches Verlaufsmuster der ischämischen Präkonditionierung. Dargestellt ist die relative Reduktion der Herzinfarktgröße in % gegenüber unbehandelten Tieren in Abhängigkeit von dem Zeitintervall zwischen IPC und Ischämie. Modifiziert nach [10]

### 1.1.2 Anästhetika-induzierte Präkonditionierung

Die kardioprotektive Wirkung volatiler Anästhetika wurde zunächst durch die günstige Beeinflussung der myokardialen Sauerstoffbilanz erklärt, da diese durch ihre negativ inotrope und chronotrope Wirkung den myokardialen Sauerstoffverbrauch vermindern. Für Halothan wurde allerdings nachgewiesen, dass der kardioprotektive Effekt auch unter Kardioplegie auftritt.<sup>11</sup>

Kurz nach der Erstbeschreibung der IPC durch Murry et al. erkannten Warltier et al., dass volatile Anästhetika die Erholung von reversibel geschädigtem Myokard beschleunigen, d.h. sie können das Stunning günstig beeinflussen.<sup>12</sup> Für Halothan<sup>13</sup> und Isofluran<sup>14</sup> konnte gezeigt werden, dass sie ATP-abhängige  $K^+$ -Kanäle ( $K_{ATP}$ -Kanäle) aktivieren können. Diese Aktivierung führte zu einer Reduktion der nach einer Ischämie entstehenden Infarktgröße. Diese Beobachtung führte zur These, dass auch volatile Anästhetika das Myokard präkonditionieren können und dass diese Anästhetika-



induzierte Präkonditionierung durch  $K_{ATP}$ -Kanäle vermittelt wird. Diese Beobachtungen wurden durch weitere Untersuchungen gestärkt, die zeigen konnten, dass nichtselektive  $K_{ATP}$ -Kanal-Antagonisten wie Glyburid die positive Wirkung volatiler Anästhetika auf das Stunning blockieren. Kersten et al. konnten zeigen, dass Isofluran das Myokard präkonditionieren kann.<sup>15</sup> Das Ausmaß der Infarktgrößenreduktion war in dieser Untersuchung dem der IPC vergleichbar. Der kardioprotektive Effekt von Isofluran wurde durch den nichtselektiven  $K_{ATP}$ -Kanal-Antagonisten Glibenclamid aufgehoben, was ein Indiz für die zentrale Rolle ATP-abhängiger  $K^+$ -Kanäle auch bei der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung (APC) darstellt.

Die Präkonditionierung des Myokards durch Isofluran ist dabei dosisabhängig. Kehl et al. konnten zeigen, dass Isofluran bereits in einer subanästhetischen Konzentration von 0,25 MAC das Myokard präkonditionieren kann.<sup>16</sup> Eine Konzentrationserhöhung des volatilen Anästhetikums führte zwar zu keiner weiteren Verminderung der Herzinfarktgröße, machte aber die Wirkung der Präkonditionierung unabhängig vom koronaren kollateralen Blutfluss.

Es konnte bislang für alle klinisch relevanten volatilen Anästhetika, d.h. Halothan,<sup>17;18</sup> Enfluran,<sup>17</sup> Isofluran,<sup>17;18</sup> Sevofluran<sup>18</sup> und Desfluran,<sup>18</sup> im Tiermodell eine präkonditionierende Wirkung nachgewiesen werden. In einer direkt vergleichenden Untersuchung am Kaninchen konnten erstmals Unterschiede in der präkonditionierenden Wirksamkeit der volatilen Anästhetika gezeigt werden.<sup>18</sup>

Der Begriff Memory-Phase kennzeichnet den Zeitraum zwischen Ende der Applikation des volatilen Anästhetikums und Beginn der Koronararterienokklusion. Dies bedeutet hinsichtlich der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung, dass während der Ischämiephase das volatile Agens nicht mehr im Organismus nachweisbar ist, aber dennoch eine verlängerte Ischämietoleranz besteht. Bisherige Studien zur APC untersuchten die Präkonditionierung mit einer Memory-Periode zwischen 10 und 30 Minuten Länge.<sup>15;17;19-22</sup> Für die ischämische Präkonditionierung konnte gezeigt werden, dass kardioprotektive Effekte auch Tage nach einem ischämischen Stimulus nachweisbar sind.<sup>8-10</sup>

Das zweite Fenster der IPC kann unter anderem durch  $K_{ATP}$ -Kanal-Antagonisten blockiert werden.<sup>23</sup> Da auch volatile Anästhetika in der Lage sind, myokardiale  $K_{ATP}$ -Kanäle zu aktivieren,<sup>15;24;25</sup> ist es denkbar, dass auch die APC ein zweites Fenster der Präkonditionierung induziert. Dies wurde erstmals von Kehl et al. an Hunden untersucht, die über 6 Stunden 1,0 MAC Isofluran erhielten. Nach 24-stündiger Memory-Phase, einstündiger Koronararterienokklusion und dreistündiger Reperfusionphase ließ sich hier kein kardioprotektiver Effekt nachweisen.<sup>26</sup> In einer anderen Untersuchung an Kaninchen konnte nach zweistündiger Exposition mit 1,0 MAC Isofluran ein zweites Fenster der Präkonditionierung 24 Stunden nach Exposition gezeigt werden.<sup>27</sup>

Unklar sind bislang jedoch der genaue Zeitverlauf und die Dauer der kardioprotektiven Wirkung des zweiten Fensters der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung.

### 1.1.3 Mechanismen der Präkonditionierung

Der kardioprotektive Effekt der Präkonditionierung wird durch komplexe intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden vermittelt, deren Einzelheiten bis heute nicht vollständig verstanden sind. Nach heutigem Kenntnisstand münden die verschiedenen Signalwege in der Aktivierung und Öffnung mitochondrialer ATP-regulierter  $K^+$ -Kanäle ( $K_{ATP}$ -Kanäle). Die Signaltransduktionskette der APC umfasst die Aktivierung von Adenosin-<sup>28;29</sup> sowie  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren,<sup>30</sup> der Proteinkinase C,<sup>31</sup> inhibitorischen G-Proteinen<sup>32</sup> sowie die Generation von ROS, die sowohl bei der Signaltransduktion der IPC<sup>33-36</sup> als auch der APC<sup>19;37-40</sup> mitwirken. Neueren Untersuchungen zufolge spielen die Mitochondrien eine entscheidende Rolle zum einen in der Vermittlung der ischämiebedingten Zellschädigung und zum anderen in der Vermittlung der kardioprotektiven Effekte der Präkonditionierung.<sup>41-46</sup>

Stickstoffmonoxid (NO) ist in der Lage, ATP-abhängige  $K^+$ -Kanäle zu aktivieren und spielt damit ebenfalls eine Rolle bei der APC.<sup>37;47;48</sup> NO ist ein kurzwirksamer, sehr potenter Vasodilatator und hemmt des Weiteren die Thrombozytenaggregation sowie die endotheliale Leukozytenadhärenz. Verantwortlich für die Bildung von NO sind spezielle Enzyme, die NO-Synthasen (NOS). Es wurden bislang drei Isoformen

identifiziert: neuronale (nNOS), endotheliale (eNOS) und induzierbare (iNOS) NO-Synthase.<sup>49</sup> Alle NOS katalysieren die Reaktion von L-Arginin zu L-Citrullin, wobei NO freigesetzt wird. NO wiederum vermittelt die Aktivierung der NO-sensitiven Guanylatcyclyase, welche zur Bereitstellung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) führt. Dieser second messenger aktiviert u.a. verschiedene Ionenkanäle, die Phosphodiesterasen II und III sowie die cGMP-abhängige Proteinkinase G, welche hauptverantwortlich für Vasodilatation und Inhibition der Thrombozytenaggregation ist.<sup>50</sup>

NO besitzt in verschiedenen Spezies kardioprotektive Effekte.<sup>51-59</sup> Interessanterweise ist die frühe IPC unabhängig von endogenem NO,<sup>60,61</sup> wohingegen exogen zugeführtes NO kardioprotektive Effekte im Sinne der Präkonditionierung besitzt.<sup>61,62</sup> Beim zweiten Fenster der IPC scheint endogenes, NOS-generiertes NO eine wichtige Rolle zu spielen. Bolli et al. konnten zeigen, dass NO sowohl als Trigger als auch als Mediator des zweiten Fensters der IPC fungiert.<sup>51</sup> Der gleiche Autor postuliert, dass eNOS-abhängiges NO als Trigger wirkt und eine Signalkaskade anstößt, die in einer späteren Aktivierung der iNOS mündet, welche dann für die kardioprotektiven Effekte verantwortlich ist („NO-Hypothese der späten Präkonditionierung“).<sup>63</sup> Es konnte zudem gezeigt werden, dass iNOS-generiertes NO als Mediator von verschiedenen Formen der pharmakologischen verzögerten Präkonditionierung wirkt, u.a. durch Stimulation von Adenosin A1-Rezeptoren,<sup>52;64;65</sup>  $\delta_1$ -Opioid-Rezeptoren<sup>64</sup> und NO-Donatoren.<sup>64</sup>

Die genauen intrazellulären Mechanismen, durch welche die kardioprotektiven Wirkungen von NO vermittelt werden, sind bislang weitestgehend unklar. Diskutiert werden eine Verminderung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in die Zelle,<sup>66</sup> ein Antagonismus zu den Effekten  $\beta$ -adrenerger Stimulation,<sup>67</sup> das Öffnen sarkolemmaler  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle<sup>48</sup> sowie eine Verringerung der myokardialen Kontraktilität<sup>68</sup> und des myokardialen Sauerstoffverbrauches.<sup>69;70</sup>

### 1.3 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir zum einen den bislang unbekanntem Zeitverlauf der durch das volatile Anästhetikum Desfluran induzierten

Präkonditionierung. Des Weiteren untersuchten wir die Rolle von Stickstoffmonoxid (NO) im Rahmen des zweiten Fensters der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung. Dazu wurden im *in vivo - in situ* Herzinfarktmodell des Kaninchens die resultierenden Herzinfarktgrößen in Abhängigkeit vom Zeitintervall zwischen Desfluran-Applikation und Beginn der Myokardischämie charakterisiert. Zudem wurde die Rolle von NO durch pharmakologische Blockade der NO-Synthasen untersucht.

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

1. Desfluran ein erstes Fenster getrennt von einem zweiten Fenster der Präkonditionierung gegen Myokardinfarkt induziert,
2. der Zeitverlauf der Desfluran-induzierten Präkonditionierung dem der ischämischen Präkonditionierung parallel läuft und
3. NO als Mediator der Desfluran-induzierten Präkonditionierung wirkt.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Versuchsgenehmigung**

Gemäß dem Tierschutzgesetz über Versuche an lebenden Tieren wurde ein Antrag bei der zuständigen Behörde der Regierung von Unterfranken in Würzburg gestellt. Das Versuchsvorhaben wurde am 29.07.2004 unter dem Aktenzeichen 621-2531.01-12/04 genehmigt. Im Zeitraum vom 01.08.2004 bis zum 09.12.2004 wurden die Versuche gemäß der Versuchsgenehmigung durchgeführt.

### **2.2 Durchführung der Untersuchung**

#### **2.2.1 Versuchstiere**

Die experimentellen Untersuchungen wurden an männlichen weißen Neuseeland-Kaninchen durchgeführt. Diese wurden in den Tierställen des Universitätsklinikums Würzburg gehalten und erhielten flüssige und feste Nahrung ad libitum bis zum Vorabend des Experiments.

#### **2.2.2 Narkose und Beatmung**

Zur Narkoseinduktion wurde den Kaninchen nach vorheriger Lokalanästhesie mittels EMLA (eutectic mixture local anesthetic)-Crème eine 24G intravenöse Verweilkanüle (Optiva<sup>®</sup>, Medex Medical Ltd. Haslingden, Rossendale, Großbritannien) durch Punktion einer marginalen Ohrvene angelegt. Nach Sicherstellung der intravenösen Lage erfolgte die Narkoseeinleitung mittels intravenöser Applikation von Natrium-Pentobarbital (Narcoren<sup>®</sup>, 30mg/kg Körpergewicht; Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland). Die Narkose wurde durch eine kontinuierliche intravenöse Infusion (30mg/kg Körpergewicht/h) des Barbiturats aufrechterhalten. Zusätzliche Gaben von Pentobarbital wurden während der Operation nach Bedarf verabreicht. Die

Anästhesietiefe wurde in regelmäßigen Abständen überprüft, indem der Palpebral-Reflex sowie der Fußwegzieh-Reflex der Hinterpfote nach Druckreiz der Zehe getestet wurden. Es wurden keine Medikamente zur Prämedikation sowie keine weiteren, außer denen im experimentellen Protokoll vorgesehenen Anästhetika verwendet. Nach einer ventralen Mittellinien-Inzision wurde die Trachea auf einer Länge von ca. 1cm dargestellt. Kranial und kaudal wurde die Trachea mittels zweier Seidenfäden (3.0 USP, Resorba, Nürnberg, Deutschland) umschlungen. Zwischen den Fäden wurde die Tracheotomie durchgeführt und eine Trachealkanüle eingebracht. Diese wurde mit Hilfe der Fäden befestigt. Die Kaninchen wurden während des gesamten Experiments kontrolliert mit einem Luft-Sauerstoff-Gemisch ( $FiO_2=0,3$ ) beatmet (Cicero<sup>®</sup>, Dräger, Lübeck, Deutschland). Der endexpiratorische  $CO_2$ -Partialdruck wurde mittels einer Messsonde (Dräger, Lübeck, Deutschland) kontinuierlich überwacht und diente als Grundlage zur Modifikation der Beatmungsparameter Atemfrequenz und Tidalvolumen. Zur weiteren Kontrolle wurden regelmäßig arterielle Blutgasanalysen über einen in die Ohrarterie platzierten Katheter durchgeführt (ABL 505, Radiometer Copenhagen, Kopenhagen, Dänemark).

### 2.2.3 Präparation

Über die A. femoralis wurde ein Katheter (Micro-Tip Catheter, Millar Instruments, Inc., Houston, Texas, USA) in der Aorta abdominalis platziert, um den mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) zu überwachen.

In Linksseitenlage wurde eine Thorakotomie im 4. Interkostalraum (ICR) durchgeführt. Das Herz wurde dargestellt und das Perikard stumpf eröffnet. Es erfolgte die vorsichtige Präparation und Darstellung der A. pulmonalis. Um diese herum wurde eine Ultraschall-Sonde (Transonic<sup>®</sup> Flowprobe, Transonic Systems Inc., Ithaca, New York, USA) gelegt, um kontinuierlich die rechtsventrikuläre Auswurfleistung und damit das Herzzeitvolumen (HZV) zu messen. Alle hämodynamischen Parameter (HF, MAP und HZV) wurden kontinuierlich mittels einer speziellen Software (Notocord-hem<sup>TM</sup> 3.5, Notocord Systems, Croissy-sur-Seine, Frankreich) auf einem Personal Computer aufgezeichnet.

Ein prominenter Ast der linken Koronararterie wurde aufgesucht und etwa auf der Hälfte der Strecke zwischen Herzbasis und Herzspitze mittels eines chirurgischen Nahtmaterials (2/0 Ethicon Perma-Hand® Seide, Fa. Johann+Johann Intl.) umschlungen. Beide Enden des Fadens wurden durch einen Kunststoffschlauch geführt, um eine Schlinge entstehen zu lassen.

Es wurden weiterhin ein 3-Kanal Elektrokardiogramm (EKG) sowie eine rektale Temperatursonde platziert. Die Körpertemperatur der Kaninchen konnte somit überwacht und über einen Regelkreis mittels eines beheizbaren OP-Tisches (Föhr Medical Instruments, Seeheim, Deutschland) konstant gehalten werden. Zur Aufrechterhaltung der intraoperativen Flüssigkeitshomöostase wurde physiologische Kochsalzlösung (0,9%; 15 ml/kg/h) kontinuierlich infundiert.

### **2.2.4 Induktion der myokardialen Ischämie**

Um die myokardiale Ischämie zu erreichen, wurde der umschlungene Ast der linken Koronararterie okkludiert, indem die Schlinge geschlossen und mittels einer chirurgischen Péan-Klemme fixiert wurde. Fünf Minuten vor Beginn der Koronararterienokklusion wurden den Tieren 300 IE/kg Heparin-Natrium (Liquemin N 25000, Hoffmann-La-Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Schweiz) zur Antikoagulation intravenös appliziert. Die myokardiale Ischämie wurde anhand der Zeichen EKG-ST-Strecken-Veränderungen, regionaler myokardialer Zyanose sowie regionaler Wandbewegungsstörungen verifiziert. Adäquate Reperfusion wurde anhand einer Hyperämie des Epikards sowie dem Verschwinden der EKG-Veränderungen festgestellt.

### **2.2.5 Beendigung des Experiments**

Nach Abschluss der Reperusionszeit wurde die umschlungene Koronararterie erneut okkludiert und den Kaninchen wurden 2 ml Patent-Blau-Lösung (0,1 mg/ml, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) intravenös injiziert. Dadurch kam es zu einer Separation von durchblutetem („normale Zone“, NZ) und ischämischem

Myokard („area at risk“, AAR). Die Kaninchen wurden mittels einer letalen Dosis Natrium-Pentobarbital euthanasiert und das Herz wurde entnommen.

Es erfolgte nun die Präparation des linken Ventrikels und die sorgfältige Trennung von blau – d.h. regelhaft perfundierten – und rot erscheinenden - d.h. ischämischen – Arealen. Sowohl das blaue als auch das rote Areal wurden für 20 min in eine auf 37° C erwärmte Lösung aus Kaliumdihydrogenphosphat/Kaliumhydrogenphosphat ( $K_3PO_4$ , Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und 100 mg 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), welche mittels NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 adjustiert wurde, gegeben und anschließend für 24 Stunden in 3,5%iger Formaldehydlösung (Otto Fischer GmbH&Co. KG, Saarbrücken, Deutschland) konserviert.

TTC wird durch oxidative Enzymsysteme wie z.B. NAD- bzw. NADP- abhängige Oxidasen zu einem lipidlöslichen Formazan reduziert und erscheint in dieser Form rot. Somit erscheint nach der Inkubation mit TTC lebendes Herzmuskelgewebe rot, während sich abgestorbenes Gewebe grauweiß darstellt.<sup>71</sup>

### 2.2.6 Auswertung des Experiments

Die Versuchsauswertung erfolgte am Folgetag der Untersuchung nach 24stündiger Konservierung des Myokardgewebes in 3,5%iger Formaldehydlösung. Unter einem Stereomikroskop (Leica MS5, Leica Mikroskopie Systeme AG, Heerbrugg, Schweiz) wurde die AAR sorgfältig in rot - d.h. vitales Myokard - und weiß erscheinende - d.h. irreversibel infarziertes Myokard - Komponenten separiert und getrennt voneinander aufbewahrt. Es erfolgte anschließend mittels einer digitalen Messwaage (Sartorius R 180 D, Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland) die gravimetrische Bestimmung des infarzierten Areals, des ischämischen Areals, der AAR (entspricht der Summe aus vitalem und irreversibel infarziertem Myokard), des nicht ischämischen Anteils des linken Ventrikels sowie des Gesamtgewichts des linken Ventrikels. Die Herzinfarktgröße wurde als Prozentwert der AAR ausgedrückt. Die gravimetrische Bestimmung wurde von einer geblindeten Person durchgeführt.



### 2.3 Experimentelles Protokoll

Die Kaninchen wurden randomisiert 11 verschiedenen Experimentgruppen zugeordnet. Alle Versuchstiere erhielten Natrium-Pentobarbital als Hintergrundnarkose. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten kein Desfluran. Alle anderen Gruppen erhielten je 1,0 MAC (minimal alveolar concentration) Desfluran (Baxter Deutschland GmbH, Heidelberg, Deutschland). Dies entspricht beim Kaninchen einer endtidalen Konzentration von 8,9 Vol.-%.<sup>72</sup> Die endtidalen Konzentrationen von Desfluran wurden kontinuierlich mit einem kalibrierten Infrarot-Analysegerät (Dräger, Lübeck, Deutschland) gemessen. Die Kaninchen wurden dem volatilen Anästhetikum über einen Zeitraum von 30 Minuten exponiert. Nach Erwachen aus der Kurznarkose blieben die Tiere für 5 Stunden unter Beobachtung.

Die inhalative Desfluran-Applikation wurde entweder 0,5 (DES+0.5h), 2 (DES+2h), 3 (DES+3h), 12 (DES+12h), 24 (DES+24h), 48 (DES+48h), 72 (DES+72h), oder 96 Stunden (DES+96h) vor Beginn des Koronararterienverschlusses beendet (Abb. 2). Zwischen Präkonditionierung und Koronarischemie wurden die Tiere in ihre gewohnte Umgebung im Tierstall verbracht.

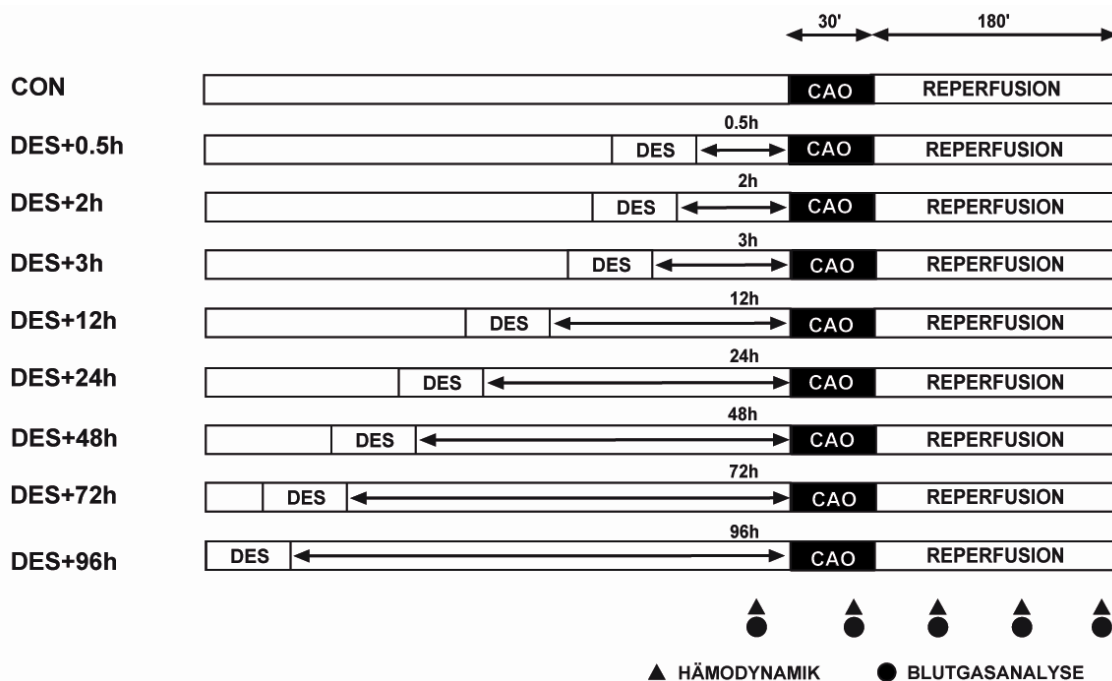


Abb. 2: Experimentelles Protokoll 1. CON: Kontrollgruppe. CAO: Koronararterienokklusion. DES entspricht 1,0 MAC Desfluran für 30 Minuten, welches entweder 0,5, 2, 3, 12, 24, 48, 72 oder 96 Stunden vor Koronararterienokklusion abgeflutet wurde.

Zwei Versuchsgruppen erhielten den unspezifischen<sup>73</sup> NO-Synthase-Inhibitor L- $\omega$ -Nitro-Arginin (LNA) in einer Dosierung von 1,3 mg/kg Körpergewicht/min kontinuierlich über 10 Minuten. Die Gesamtdosis von 13 mg/kg wurde aufgrund der Ergebnisse einer Untersuchung von Bolli et al. gewählt.<sup>74</sup> Bolli et al. konnten zeigen, dass eine Gesamtdosis von 13 mg/kg LNA die stimulierte Freisetzung von NO durch die endotheliale NO-Synthase suffizient inhibiert, ohne den basalen Gefäßtonus über eine Abnahme der basalen endothelialen NO-Freisetzung zu beeinflussen. Demzufolge wurden auch die hämodynamischen Parameter in wachen Kaninchen nicht beeinflusst. Die intravenöse Applikation von LNA wurde 10 Minuten vor Beginn der Koronararterienokklusion beendet (Abb. 3). Eine der Versuchsgruppen erhielt kein Desfluran (LNA), die andere Versuchsgruppe erhielt 1,0 MAC Desfluran über 30 Minuten, welches 72 Stunden vor Koronararterienokklusion abgeflutet wurde (DES+72h+LNA).

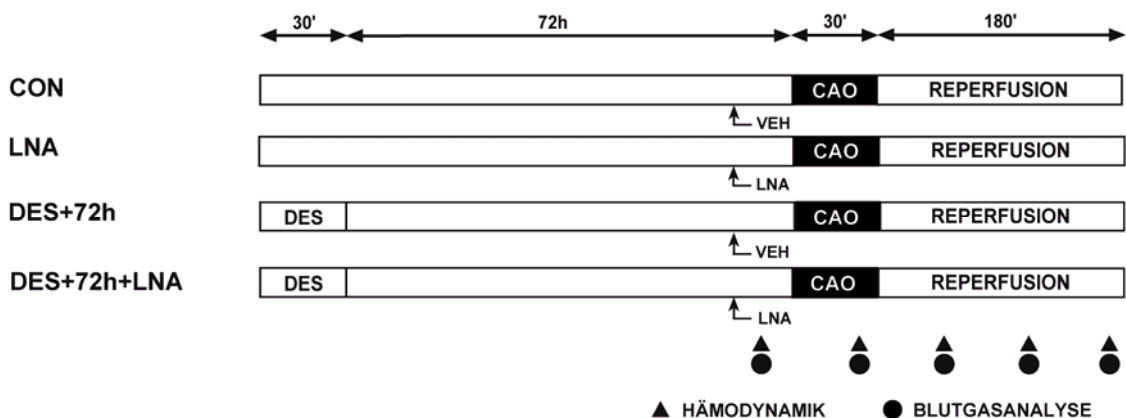


Abb. 3: Experimentelles Protokoll 2. CON: Kontrollgruppe. CAO: Koronararterienokklusion. DES entspricht 1,0 MAC Desfluran für 30 Minuten, welches 72 Stunden vor CAO abgeflutet wurde. LNA: 1,3 mg/kg Körpergewicht/min L- $\omega$ -Nitro-Arginin in 10ml 0,9%iger NaCl-Lösung über 10 Minuten. VEH: Infusion des Vehikels (10 ml 0,9%ige NaCl-Lösung).

Die hämodynamischen Parameter Herzfrequenz (HR), mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) sowie das Rate-Pressure-Produkt (HR\*MAP/1000) als indirektes Maß des myokardialen Sauerstoffverbrauchs wurden zu Baseline-Bedingungen, vor Koronararterienverschluss sowie nach einer, zwei und drei Stunden der Reperfusionszeit bestimmt.

### 2.4 Auswertung und Statistik

Die hämodynamischen Parameter, die Körpertemperatur sowie das Elektrokardiogramm wurden kontinuierlich aufgezeichnet. Hierfür wurde ein analog-digital Konverter (Data Translation<sup>TM</sup>, Marlboro, USA) sowie ein Personal Computer verwendet. Die Daten wurden mittels einer kommerziell erhältlichen Software (Notocord-hem<sup>TM</sup> 3.5, Notocord Systems, Croissy-sur-Seine, Frankreich) aufgezeichnet und mittels Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA) analysiert.

Die statistische Analyse der Daten innerhalb und zwischen den Experimentgruppen wurde durch Varianzanalyse mittels ANOVA für wiederholte Messungen und post-hoc Duncan's Test durchgeführt (StatMost 3.6 für Windows<sup>TM</sup>, Dataxiom Software Inc., Los Angeles, USA).

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

### 3 Ergebnisse

Es wurden 78 Versuchstiere instrumentiert, um 75 erfolgreiche Experimente abzuschließen. Zwei Kaninchen wurden wegen einer AAR von unter 15% des linksventrikulären Gewichts ausgeschlossen, wovon ein Versuchstier der DES+48h-, ein anderes der DES+72h-Gruppe angehörte. Ein Tier wurde von der Untersuchung ausgeschlossen aufgrund eines therapierefraktären Kammerflimmerns während der Reperfusionphase (1 DES+96h).

**Tabelle 1. Area at Risk**

	n	IS/AAR (%)	AAR (%)	AAR (g)	LV (g)	Körpergewicht (kg)
CON	7	63 ± 5	38 ± 6	1,21 ± 0,21	3,1 ± 0,1	2,3 ± 0,1
LNA	7	64 ± 4	33 ± 4	1,15 ± 0,15	2,8 ± 0,2	2,5 ± 0,1
DES+0.5h	7	35 ± 2*	30 ± 2	1,01 ± 0,11	3,4 ± 0,1	2,4 ± 0,2
DES+2h	7	35 ± 4*	31 ± 4	1,08 ± 0,19	3,3 ± 0,3	2,4 ± 0,1
DES+3h	7	53 ± 4	35 ± 2	1,03 ± 0,08	2,9 ± 0,2	2,1 ± 0,1
DES+12h	7	71 ± 3	40 ± 2	1,13 ± 0,06	2,9 ± 0,2	2,1 ± 0,1
DES+24h	7	31 ± 3*	36 ± 3	1,27 ± 0,21	3,5 ± 0,3	2,4 ± 0,2
DES+48h	6	30 ± 5*	37 ± 5	1,19 ± 0,17	3,2 ± 0,2	2,4 ± 0,2
DES+72h	6	39 ± 2*§	39 ± 3	1,11 ± 0,11	2,9 ± 0,2	2,2 ± 0,1
DES+96h	7	66 ± 2	38 ± 4	1,16 ± 0,13	3,0 ± 0,1	2,1 ± 0,1
DES+72h+LNA	7	52 ± 7	30 ± 5	0,91 ± 0,12	2,8 ± 0,2	2,3 ± 0,2

Alle Angaben sind Mittelwert ± SEM.

\*Signifikant ( $p < 0,05$ ) verschieden von CON. § Signifikant ( $p < 0,05$ ) verschieden von LNA und DES+72h+LNA.

Alle Tiere wurden einer 30minütigen Koronararterienokklusion gefolgt von 3 Stunden Reperfusion unterzogen. Die Tiere erhielten entweder 0,0 (CON) oder 1,0 MAC Desfluran (DES) für 30 Minuten. Desfluran wurde entweder 30 Minuten (DES+0.5h), 2 h (DES+2h), 3 h (DES+3h), 12 h (DES+12h), 24 h (DES+24h), 48 h (DES+48h), 72 h (DES+72h) oder 96 h (DES+96h) vor Koronararterienokklusion (CAO) abgeflutet. In zwei separaten Experimentgruppen wurde der nicht selektive NOS-Inhibitor LNA (1,3 mg/kg/min über 10 Minuten i.v.) 20 Minuten vor CAO in Kombination mit 0,0 MAC (LNA) oder 1,0 MAC Desfluran 72 Stunden vor CAO (DES+72h+LNA) verabreicht.

IS = Infarktgröße; AAR = area at risk; LV = linker Ventrikel; CON = Kontrollgruppe; DES = Desfluran; LNA = L- $\omega$ -Nitro-Arginin; MAC = minimale alveoläre Konzentration.

Es gab keine Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich des Körpergewichts, des linksventrikulären Gewichts und des Gewichts der AAR. Die relative Größe der AAR im Verhältnis zum linken Ventrikel (AAR/LV) zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 1).

#### *Systemische hämodynamische Parameter*

Es waren keine signifikanten Unterschiede in den hämodynamischen Parametern zu Baseline-Bedingungen zu beobachten (Tabelle 2). Während der Reperfusionphase kam es in allen Gruppen zu einem Abfall der Herzfrequenz, des mittleren arteriellen Blutdrucks, des Rate-Pressure-Produkts (RPP) sowie des Herzminutenvolumens. Das RPP errechnet sich aus Herzfrequenz und mittlerem arteriellen Blutdruck und gilt als indirekter Marker des myokardialen Sauerstoffbedarfes. Vor, während und nach Koronararterienokklusion gab es keine signifikanten Unterschiede der hämodynamischen Messwerte.

**Tabelle 2. Systemische hämodynamische Parameter während Ischämie und Reperfusion**

	Baseline	CAO	Reperfusion		
			1 h	2 h	3 h
<b>HF, 1/min</b>					
CON	242 ± 17	246 ± 14	239 ± 12	233 ± 7	228 ± 7
LNA	244 ± 13	251 ± 19	233 ± 14	231 ± 13	234 ± 10
DES+0.5h	254 ± 7	257 ± 10	243 ± 14	237 ± 13	232 ± 13
DES+2h	259 ± 9	258 ± 8	255 ± 8	256 ± 15	245 ± 12
DES+3h	249 ± 7	244 ± 8	242 ± 9	242 ± 8	244 ± 10
DES+12h	245 ± 8	250 ± 10	234 ± 12	234 ± 10	232 ± 9
DES+24h	251 ± 9	239 ± 14	238 ± 18	227 ± 17	221 ± 18
DES+48h	255 ± 8	259 ± 9	243 ± 12	237 ± 12	236 ± 10
DES+72h	251 ± 13	252 ± 17	238 ± 14	231 ± 14	235 ± 11
DES+96h	248 ± 11	263 ± 10	255 ± 8	246 ± 11	240 ± 13
DES+72h+LNA	243 ± 12	242 ± 8	235 ± 7	221 ± 7	225 ± 7
<b>MAP, mmHg</b>					
CON	66 ± 4	61 ± 5	57 ± 4	57 ± 5	56 ± 4
LNA	78 ± 8	65 ± 7	65 ± 7	66 ± 5	60 ± 5*
DES+0.5h	73 ± 7	69 ± 8	70 ± 7	67 ± 6	59 ± 5
DES+2h	75 ± 8	72 ± 10	67 ± 9	63 ± 7	64 ± 6
DES+3h	72 ± 4	63 ± 5	59 ± 4	60 ± 5	60 ± 4
DES+12h	67 ± 5	60 ± 4	56 ± 3	52 ± 4*	54 ± 4*
DES+24h	73 ± 3	65 ± 6	62 ± 8	58 ± 6	60 ± 6
DES+48h	66 ± 4	68 ± 7	56 ± 6	57 ± 7	52 ± 7
DES+72h	62 ± 4	57 ± 5	57 ± 3	51 ± 3	53 ± 4
DES+96h	70 ± 5	62 ± 4	58 ± 4	59 ± 3	58 ± 4
DES+72h+LNA	76 ± 6	64 ± 7	65 ± 5	63 ± 6	60 ± 6

**Tabelle 2: Fortsetzung**

CO, ml/min															
CON	234	±	24	204	±	18	201	±	19	200	±	17	197	±	14
LNA	257	±	15	213	±	20	213	±	13	206	±	14*	197	±	11*
DES+0.5h	239	±	8	218	±	13	222	±	11	215	±	14	204	±	15
DES+2h	253	±	15	229	±	18	213	±	20	210	±	21	200	±	19
DES+3h	251	±	13	229	±	12	220	±	15	216	±	19	206	±	15
DES+12h	241	±	14	224	±	13	194	±	12	187	±	11*	187	±	10*
DES+24h	237	±	13	200	±	15	200	±	19	188	±	18	181	±	17*
DES+48h	251	±	10	221	±	13	209	±	16	200	±	14	193	±	15*
DES+72h	251	±	13	222	±	20	219	±	18	232	±	16	211	±	23
DES+96h	237	±	14	205	±	18	190	±	14	190	±	11	190	±	18
DES+72h+LNA	239	±	15	213	±	19	195	±	15	186	±	16	180	±	17*
RPP, min <sup>-1</sup> *mmHg*10 <sup>-3</sup>															
CON	16,2	±	1,8	15,2	±	1,8	13,6	±	1,2	13,3	±	1,2	12,9	±	1,2
LNA	19,2	±	2,5	16,6	±	2,7	15,4	±	2,5	15,5	±	2,1	14,2	±	1,8
DES+0.5h	18,8	±	2,1	18,1	±	2,3	17,4	±	2,3	16,1	±	2,0	13,7	±	1,4
DES+2h	19,5	±	2,2	18,6	±	2,7	17,0	±	2,4	16,4	±	2,7	15,9	±	2,2
DES+3h	18,0	±	1,1	15,5	±	1,4	14,4	±	1,1	14,6	±	1,6	14,7	±	1,5
DES+12h	16,6	±	1,6	15,1	±	1,2	13,1	±	1,1	12,1	±	1,1*	12,4	±	0,8*
DES+24h	18,4	±	1,1	15,8	±	2,0	15,3	±	2,8	13,6	±	2,4	13,8	±	2,5
DES+48h	16,8	±	1,2	17,7	±	1,7	13,6	±	1,9	13,6	±	2,1	12,5	±	2,0
DES+72h	15,6	±	1,4	14,5	±	2,0	13,6	±	1,0	11,7	±	0,7	12,4	±	1,0
DES+96h	17,3	±	1,7	16,3	±	1,4	14,8	±	1,4	14,6	±	1,2	14,0	±	1,5
DES+72h+LNA	18,5	±	1,9	15,5	±	1,9	15,4	±	1,3	13,9	±	1,6	13,5	±	1,4*

Alle Angaben sind Mittelwert ± SEM.

\*Signifikant (p<0,05) verschieden von Baseline.

Baseline = nach Äquilibration; CAO = während Koronararterienokklusion;

1h, 2h, 3h = nach 1h, 2h bzw. 3h Reperfusion.

CAO = Koronararterienokklusion; HF = Herzfrequenz; MAP = mittlerer arterieller Blutdruck; CO = Herzzeitvolumen; RPP = Rate-Pressure-Produkt; CON = Kontrollgruppe; LNA = L-ω-Nitro-Arginin ; DES = 1,0 MAC Desfluran für 30 Minuten.

*Herzinfarktgröße*

Die Herzinfarktgröße der Kontrollgruppe betrug 63% (CON:  $63\pm 5\%$ ,  $n=7$ ). Die Applikation des volatilen Anästhetikums Desfluran führte zu einer signifikanten Reduktion der myokardialen Infarktgröße, wenn es 0,5 (DES+0.5h:  $35\pm 2\%$ ,  $n=7$ ) oder 2 Stunden (DES+2h:  $35\pm 4\%$ ,  $n=7$ ) vor Koronararterienokklusion verabreicht wurde.

Lag zwischen dem Ende der Desfluran-Applikation und dem Verschluss der Koronararterie ein Zeitintervall von 3 Stunden (DES+3h:  $53\pm 4\%$ ,  $n=7$ ), so zeigte die Herzinfarktgröße keinen signifikanten Unterschied zu der der Kontrollgruppe.

Desfluran induzierte ein zweites Fenster der Präkonditionierung, welches 24 Stunden (DES+24h:  $31\pm 3\%$ ,  $n=7$ ), 48 Stunden (DES+48h:  $30\pm 5\%$ ,  $n=6$ ) sowie 72 Stunden (DES+72h:  $39\pm 2\%$ ,  $n=6$ ) nach Applikation des Agens nachweisbar war.

Betrug das Intervall 12 Stunden (DES+12h:  $71\pm 3\%$ ,  $n=7$ ) bzw. 96 Stunden (DES+96h:  $66\pm 2\%$ ,  $n=7$ ), so ließ sich kein präkonditionierender Effekt nachweisen (Abb. 4).

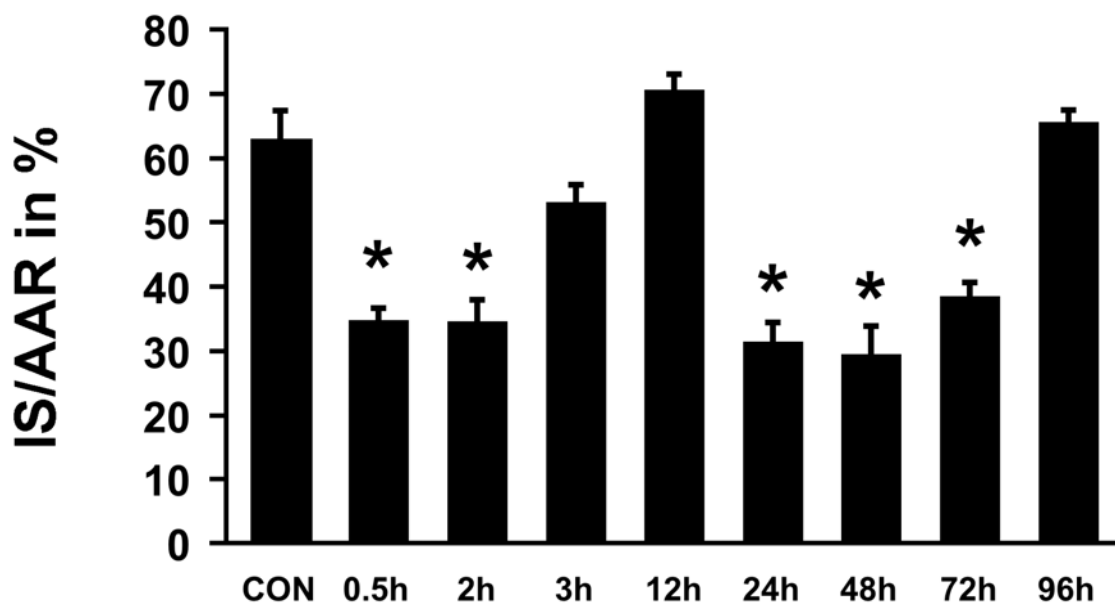


Abb. 4: Herzinfarktgröße als Prozentwert des ischämischen Areals. Angegeben sind Mittelwert $\pm$ SEM. IS = Herzinfarktgröße; AAR = area at risk. CON: Kontrollgruppe. 0.5h: DES+0.5h. 2h: DES+2h. 3h: DES+3h. 12h: DES+12h. 24h: DES+24h. 48h: DES+48h. 72h: DES+72h. 96h: DES+96h. \* = signifikant verschieden von CON.



Das zweite Fenster der Präkonditionierung war nicht nachweisbar, wenn die NO-Synthasen während der Koronararterienokklusion mittels des nicht selektiven NO-Synthase-Blockers L- $\omega$ -Nitro-Arginin (LNA) blockiert wurden (DES+72h+LNA:  $52\pm 7\%$ , n=7). LNA alleine hatte keinen Einfluss auf die Infarktgröße (LNA:  $64\pm 4\%$ , n=7) (Abb. 5).

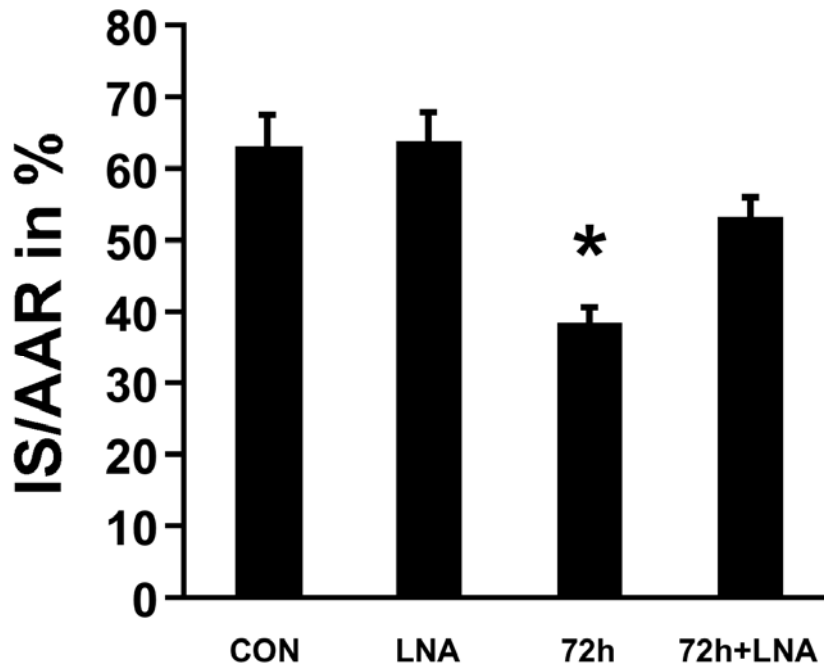


Abb. 5: Herzinfarktgröße als Prozentwert des ischämischen Areals. Angegeben sind Mittelwert $\pm$ SEM. IS = Herzinfarktgröße; AAR = area at risk. CON: Kontrollgruppe. LNA: 1,3 mg/kg Körpergewicht/min L- $\omega$ -Nitro-Arginin in 10ml 0,9%iger NaCl-Lösung über 10 Minuten. 72h: DES+72h. 72h+LNA: DES+72h+LNA. \* = signifikant verschieden von CON.

Nach einer Untersuchung von Ytrehus et al. stellt die Größe des myokardialen ischämischen Areals einen wesentlichen Prädiktor der resultierenden Infarktgröße dar.<sup>75</sup> Je größer die AAR, desto größer ist auch die Infarktgröße. Demzufolge bewirkt eine kleine AAR eine kleinere Infarktgröße. Um die Wahrscheinlichkeit zu vermindern, dass die Größe der AAR allein die Ergebnisse beeinflussen könnte, war in unserer Untersuchung eine Größe der AAR von mindestens 15 % des linksventrikulären Gewichts erforderlich.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Größe der AAR zwischen den verschiedenen Experimentgruppen. Somit konnten wir folgern, dass die Reduktion der myokardialen Infarktgröße keine Folge einer unterschiedlich großen AAR war.

## 4 Diskussion

Der Begriff der Präkonditionierung beschreibt die Änderung des Phänotyps einer Zelle dahingehend, dass eine vergrößerte Toleranz dieser Zelle gegenüber ischämischen Phasen resultiert. Als Trigger dieser Änderung des Phänotyps können zum einen kurze ischämische Episoden – sog. ischämische Präkonditionierung (IPC) – und zum anderen bestimmte Pharmaka fungieren. Zu diesen Pharmaka gehören u.a. Opioid<sup>4</sup>, Adenosin<sup>5</sup> und volatile Anästhetika. Man spricht dann von Anästhetika-induzierter Präkonditionierung (APC).

Das *in vivo*-Herzinfarktmodell des Kaninchens<sup>9;76</sup> ist neben den *in vivo*-Modellen der Ratte<sup>77</sup> und des Hundes<sup>8</sup> ein weit verbreitetes und anerkanntes Modell zur Erforschung des Phänomens der Präkonditionierung. Wir nutzten dieses Modell im Rahmen unserer Fragestellung nach dem Zeitverlauf der durch das volatile Anästhetikum Desfluran induzierten Präkonditionierung sowie der Rolle von NO bezüglich des zweiten Fensters der Präkonditionierung.

In der vorliegenden Untersuchung war der kardioprotektive Effekt einer 30minütigen Desfluran-Applikation in einer Konzentration von 1,0 MAC nach 0,5 und 2 Stunden vorhanden, aber nach 3 und 12 Stunden nicht nachweisbar. Das erste Fenster der Präkonditionierung begann nach 30 Minuten und verschwand 2 bis 3 Stunden nach Beendigung der Desfluran-Applikation. Diese Ergebnisse bestätigen Daten aus vorhergehenden Untersuchungen bzgl. des ersten Fensters der Präkonditionierung, welches zwischen 10 und 30 Minuten nach Applikation des volatilen Anästhetikums beginnt.<sup>15-17;19;22;78</sup> Die vorliegenden Daten sind die ersten Daten zur Zeitdauer des ersten Fensters der APC, die mit Daten der IPC übereinstimmen. Dort hält das erste Fenster bis zu 2 Stunden an.<sup>79</sup>

In der vorliegenden Untersuchung waren kardioprotektive Effekte durch Desfluran-Applikation nach 3 und 12 Stunden nicht nachweisbar. Diese Daten zeigen, dass das erste Fenster der Präkonditionierung bis zu 2 Stunden anhält und darauf eine Phase ohne nachweisbaren kardioprotektiven Effekt folgt, welche bis zu 12 Stunden lang anhält.

Wir konnten somit zeigen, dass der Zeitverlauf des ersten Fensters der APC ähnlich dem des ersten Fensters der IPC ist.<sup>79</sup>

Verzögerte kardioprotektive Effekte kurzer Ischämiephasen wurden erstmals 1993 von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben.<sup>8,9</sup> Zwei Jahre später wurde dieses Phänomen von Yellon et al. als „Zweites Fenster der Präkonditionierung“ bezeichnet.<sup>80</sup> In nahezu allen Untersuchungen zum zweiten Fenster der ischämischen Präkonditionierung (IPC) wurde ein Zeitintervall von 24 Stunden zwischen ischämischer Präkonditionierung und Ischämie gewählt. Das zweite Fenster der IPC konnte bislang u.a. an Ratten,<sup>77</sup> Kaninchen<sup>9,76</sup> und Hunden<sup>8</sup> nachgewiesen werden. Baxter et al. untersuchten den genauen Zeitverlauf des zweiten Fensters der IPC am Kaninchenmyokard.<sup>10</sup> In dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass ein zweites Fenster der IPC in einem Zeitraum von 24 Stunden bis 72 Stunden nach vier je fünfminütigen Koronararterienokklusionen nachweisbar ist, wobei die kardioprotektive Wirkung bei 72 Stunden ein Maximum erzielt. 96 Stunden nach IPC war in dieser Untersuchung kein kardioprotektiver Effekt mehr vorhanden. Baxter et al. konnten zeigen, dass das erste Fenster einen größeren kardioprotektiven Effekt bewirkt als das zweite Fenster.<sup>10</sup>

Es war bislang nicht untersucht worden, ob die Präkonditionierung durch das volatile Anästhetikum Desfluran ebenfalls dieses charakteristische biphasische Zeitfenster der Kardioprotektion induziert. Es ist allerdings seit einigen Jahren bekannt, dass auch volatile Anästhetika verzögert einsetzende protektive Effekte auf den Ischämie-Reperfusionsschaden nach Myokardischämie im Tiermodell haben.

Eine 30minütige Desfluran-Applikation induzierte in unserer Untersuchung im *in vivo*-Herzinfarktmodell des Kaninchens ein zweites Fenster der Präkonditionierung, welches 24 Stunden nach Beendigung der Desfluran-Gabe begann und bei 96 Stunden beendet war. Das Desfluran-induzierte zweite Fenster der Präkonditionierung war zwischen 24 und 72 Stunden nachweisbar. Dieser Zeitverlauf stimmt mit dem des zweiten Fensters der IPC überein.<sup>10</sup> Baxter et al. konnten am Kaninchenmyokard zeigen, dass das zweite Fenster der IPC nach 24 Stunden auftritt und 72 Stunden nach Beendigung des ischämischen Stimulus sein Maximum erreicht.<sup>10</sup> Nach 96 Stunden war kein

kardioprotektiver Effekt der IPC mehr nachweisbar.<sup>10</sup> Wir konnten zeigen, dass Desfluran ein zweites Fenster der Präkonditionierung induziert, welches in seinem Zeitverlauf dem zweiten Fenster der IPC ähnelt.

Der kardioprotektive Effekt des zweiten Fensters der APC ist in seinem Ausmaß vergleichbar mit dem des ersten Fensters. Desfluran reduzierte die Herzinfarktgröße sowohl im ersten als auch im zweiten Fenster um den gleichen Faktor. Hier zeigt sich ein Unterschied zur IPC, da dort die Infarktgrößenreduktion des zweiten Fensters weniger ausgeprägt ist als die des ersten Fensters.<sup>6;8;9</sup>

Es konnte sowohl an neonatalen<sup>23</sup> als auch an adulten<sup>81</sup> Kaninchen nach zweistündiger Exposition von 1,0 MAC Isofluran ein zweites Fenster der Präkonditionierung 24 Stunden nach Ende der Exposition gezeigt werden. In der Untersuchung von Tanaka et al.<sup>81</sup> wurde eine 30minütige Koronararterienokklusion gefolgt von einer dreistündigen Reperfusionphase gewählt. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte in einer tierexperimentellen Untersuchung an Hunden für Isofluran kein zweites Fenster der Präkonditionierung gezeigt werden. In dieser Untersuchung von Kehl et al.<sup>26</sup> erhielten die Hunde über 6 Stunden eine Konzentration von 1,0 MAC Isofluran. Nach 24stündiger Memory-Phase, einstündiger Koronararterienokklusion und dreistündiger Reperfusionphase konnte keine Reduktion der Herzinfarktgröße gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe gezeigt werden. Dies scheint auf Speziesunterschieden zu beruhen, da unsere vorliegenden Resultate im *in vivo*-Herzinfarktmodell des Kaninchens zeigen, dass auch das volatile Anästhetikum Desfluran ein erstes getrennt von einem zweitem Fenster der Präkonditionierung gegen Myokardinfarkt induziert.

Das erste Fenster der Präkonditionierung ist auf zellulärer Ebene als eine zügige und nur kurzzeitig anhaltende posttranslationale Veränderung präexistenter Proteine zu verstehen, die in einer erhöhten Toleranz gegenüber ischämischem Stress resultiert. Als fundamentaler Unterschied des ersten Fensters zum zweiten Fenster wird angenommen, dass letzteres hauptsächlich das Resultat einer *de-novo*-Synthese kardioprotektiv wirksamer Proteine in Folge einer genetischen Umprogrammierung des Myokards darstellt. Als ein möglicher Erklärungsansatz der fehlenden kardioprotektiven Wirkung bei 12 Stunden kann also dienen, dass der Effekt der posttranslationalen Modifizierung

nicht mehr vorhanden ist, während der Effekt neu synthetisierter Proteine noch nicht eingesetzt hat. Weitere molekularbiologische Studien auf Protein- und DNA-Ebene sind notwendig, um zu untersuchen, warum frühe und späte Phase der Präkonditionierung von einem Intervall ohne nachweisbaren kardioprotektiven Effekt getrennt sind bzw. was genau auf zellulärer Ebene für dieses Phänomen verantwortlich ist.

Es ist bekannt, dass Stickstoffmonoxid (NO) beim zweiten Fenster der ischämischen Präkonditionierung eine wichtige Rolle spielt. So konnte gezeigt werden, dass NO sowohl bei der Präkonditionierung gegen Stunning als auch bei der Präkonditionierung gegen myokardialen Infarkt als Trigger wirkt.<sup>74;82</sup> Des Weiteren ist NO ein wichtiger Mediator des zweiten Fensters der IPC.<sup>63;83</sup> Smul et al. konnten zeigen, dass NO ein Mediator des ersten Fensters der Desfluran-induzierten Präkonditionierung ist.<sup>84</sup> In der vorliegenden Untersuchung wurde die Rolle von NO als Mediator des zweiten Fensters der APC untersucht. Als für das zweite Fenster repräsentativer Zeitpunkt wurden 72 Stunden gewählt. Die NO-Synthasen (NOS) wurden während der Koronararterienokklusion pharmakologisch mittels LNA blockiert. Das zweite Fenster der APC war hierbei nicht nachweisbar. Wir konnten also zeigen, dass durch NOS generiertes NO ein Mediator des zweiten Fensters der Desfluran-induzierten Präkonditionierung ist.

Verschiedene Untersuchungen lassen eine entscheidende Rolle der induzierbaren Isoform der NOS (iNOS) in der Vermittlung des zweiten Fensters der IPC vermuten. Das zweite Fenster der IPC ist nicht nachweisbar, wenn die iNOS nach Präkonditionierung blockiert wird.<sup>51;83;85;86</sup> Guo et al. konnten zeigen, dass das zweite Fenster der IPC in iNOS-knock-out-Mäusen nicht nachweisbar ist.<sup>83</sup> Die induzierbare Isoform der NOS kann durch verschiedene Mediatoren induziert werden, die möglicherweise während der pharmakologischen oder ischämischen Präkonditionierung freigesetzt werden. Eine mögliche Erklärung für das Verschwinden des zweiten Fensters der APC durch Blockade der NOS in unserer Untersuchung ist daher die Blockade der iNOS. Diese Hypothese bedarf allerdings weiterer Untersuchungen, da der Ursprung des NO im zweiten Fenster der APC in der gegenwärtigen Literatur kontrovers diskutiert wird.<sup>87-89</sup>

Chiari et al. konnten zeigen, dass endogenes, d.h. durch NOS generiertes NO sowohl als Trigger als auch als Mediator der Isofluran-induzierten späten Präkonditionierung gegen Myokardinfarkt wirkt, und dass die endotheliale NOS für dessen Bildung verantwortlich ist.<sup>87</sup> Wang et al. konnten ebenfalls ein zweites Fenster der Präkonditionierung 24 Stunden nach Exposition gegenüber 1,0 MAC Isofluran in männlichen Kaninchen nachweisen, nicht jedoch in weiblichen.<sup>88</sup> Die Autoren führten dies auf eine höhere basale eNOS-Aktivität in weiblichen Kaninchen zurück, die durch einen nicht-genomischen Effekt von Östrogen zu erklären ist. Eine Untersuchung von Wakeno-Takahashi et al. konnte dagegen eine Hochregulation der iNOS 24 Stunden nach Gabe von Isofluran in der Ratte zeigen.<sup>89</sup>

Alle drei Isoformen – neuronale NOS (nNOS), induzierbare NOS (iNOS) und endotheliale NOS (eNOS) – werden durch LNA blockiert.<sup>73;90</sup> Die nNOS ist nur in niedrigen Konzentrationen in beiden Ventrikeln nachweisbar.<sup>49</sup> Während die iNOS unter physiologischen Bedingungen nicht nachweisbar ist, wird sie durch Stimulation hochreguliert, wie z.B. während des zweiten Fensters der IPC.<sup>82;91</sup> Im normalen Myokard ist die eNOS die dominierende Isoform und wird sowohl in kleinen Koronargefäßen als auch in Kardiomyozyten exprimiert.<sup>49</sup> Daher ist der wahrscheinlichste Ursprung von NO in normalen Kaninchenherzen die Generation durch eNOS.

An humanen atrialen Kardiomyozyten konnten Roscoe et al. erstmals die Präkonditionierung durch Isofluran *in vitro* zeigen und in der selben Untersuchung eine Beteiligung von Adenosin A1-Rezeptoren sowie  $K_{ATP}$ -Kanälen nachweisen.<sup>28</sup> Für Desfluran und Sevofluran konnte im gleichen *in vitro*-Modell ebenfalls eine Beteiligung von  $K_{ATP}$ -Kanälen gezeigt werden.<sup>30;92</sup> Die Arbeitsgruppe um Loubani konnte an humanen atrialen Zellen *in vitro* ein zweites Fenster sowohl der ischämischen als auch der pharmakologisch durch Phenylephrin und Adenosin induzierten Präkonditionierung zeigen, welches zwischen 24 und 72 Stunden nach Triggerung nachweisbar war.<sup>93</sup> In dieser Untersuchung waren erstes und zweites Fenster ebenfalls durch eine Phase ohne kardioprotektiven Effekt getrennt.

Die meisten klinischen Daten zur Präkonditionierung am Menschen existieren zu Patienten, die sich einem koronaren bypasschirurgischen Eingriff unterzogen haben.

Wurden Protokolle benutzt, die der experimentellen Situation nachempfunden waren, d.h. Applikation des volatilen Anästhetikums vor, während oder nach kardialer Ischämie, so konnten die bisher publizierten Ergebnisse schwach kardioprotektive Wirkungen für volatile Anästhetika im Menschen zeigen.<sup>94-96</sup> Vergleicht man jedoch eine komplette Inhalationsanästhesie mit einem komplett intravenösen Regime, so sind die Ergebnisse eindeutiger. Es konnte in einer kleineren Studie gezeigt werden, dass Patienten, die für diese Eingriffe eine inhalative Anästhesie mit Desfluran oder Sevofluran erhielten, nach Beendigung der extrakorporalen Zirkulation und im postoperativen Verlauf hämodynamisch stabiler waren als Patienten unter Propofol-Narkose sowie geringere postoperative TroponinT-Werte aufwiesen.<sup>97</sup> Diese Ergebnisse konnten in weiteren klinischen Studien bestätigt werden.<sup>98-100</sup> De Hert et al. publizierten 2004 eine Studie mit 320 Patienten und konnten zeigen, dass eine Anästhesie mit Sevofluran oder Desfluran den postoperativen Aufenthalt auf der Intensivstation sowie die Länge des Krankenhausaufenthaltes gegenüber einer Midazolam oder Propofol basierten Anästhesie signifikant reduzieren konnte.<sup>2</sup> Garcia et al. konnten bei Patienten, die mit Sevofluran präkonditioniert wurden, erstmals einen positiven Effekt auf das 1-Jahres-Outcome nach bypasschirurgischen Eingriffen zeigen.<sup>3</sup>

Die bislang publizierten Ergebnisse weisen auf einen klinisch validen präkonditionierenden Effekt volatiler Anästhetika hin. Man muss jedoch einschränkend sagen, dass randomisiert kontrollierte Studien an größeren Patientenkollektiven bislang fehlen. Des Weiteren konnte bislang in keiner Studie ein positiver Effekt volatiler Anästhetika auf die perioperative kardiale Morbidität und Mortalität nachgewiesen werden. Eine kürzlich publizierte erste Metaanalyse von 32 klinischen Studien konnte keine Verbesserung des Outcomes sowie der Inzidenz postoperativer Myokardinfarkte nachweisen.<sup>101</sup> Es fehlen bislang ebenfalls Untersuchungen zu den genauen protektiven Mechanismen der humanen Präkonditionierung sowie Ergebnisse zur besten Applikationsdauer und -dosis der volatilen Anästhetika. Weiterhin muss noch geklärt werden, ob es klinisch relevante Unterschiede in der kardioprotektiven Wirksamkeit zwischen den volatilen Anästhetika gibt. Die Ergebnisse der hier vorgelegten Untersuchung müssen, wie alle tierexperimentellen Studien, hinsichtlich der Übertragbarkeit auf den Menschen gesehen werden. Bei den Versuchstieren handelte es



sich um kardial gesunde Kaninchen. Dies steht in Kontrast zu den in der klinischen Situation zumeist kardial vorgeschädigten Patienten.

Die vorliegenden Ergebnisse müssen in Zusammenhang mit verschiedenen potenziell limitierenden Faktoren interpretiert werden. LNA ist ein Substratanalogon von L-Arginin und inhibiert alle Isoformen der NOS.<sup>73;102</sup> Es kann aber nicht komplett ausgeschlossen werden, dass LNA auch andere in die Kardioprotektion involvierte Signalkaskaden oder Proteine beeinflusst. Die Größe der ischämischen Zone des Myokards stellt einen wesentlichen Prädiktor der resultierenden Herzinfarktgröße dar.<sup>75</sup> Je größer die Ischämiezone, desto größer ist auch die zu erwartende Infarktgröße. Dieser Effekt auf die Ergebnisse der Untersuchung kann weitestgehend ausgeschlossen werden, da kein signifikanter Unterschied der Größe der Ischämiezone (AAR) zwischen den einzelnen Gruppen bestand. Maxwell et al. konnten zeigen, dass im Kaninchenmyokard der koronare Kollateralblutfluss, der ebenfalls einen wesentlichen Prädiktor der resultierenden Herzinfarktgröße darstellt, vernachlässigbar ist.<sup>103</sup>

Eine weitere potenzielle Einflussgröße auf die resultierende Herzinfarktgröße stellen Veränderungen der systemischen hämodynamischen Parameter dar, allen voran der Herzfrequenz, des mittleren arteriellen Blutdrucks und des sich daraus ergebenden Rate-Pressure-Produkts. Die Herzfrequenz bestimmt maßgeblich die Dauer der diastolischen Koronarperfusion, während der arterielle Mitteldruck, genauer der diastolische Blutdruck, zusammen mit dem koronarvenösen Druck den koronaren Perfusionsdruck determiniert. In unserer Untersuchung waren vor, während und nach Koronararterienokklusion keine signifikanten Unterschiede der hämodynamischen Parameter vorhanden. Es ist von daher unwahrscheinlich, dass Veränderungen der systemischen Hämodynamik die myokardiale Infarktgröße beeinflusst haben. Auf der anderen Seite haben wir in dieser Untersuchung aber weder die koronarvenöse O<sub>2</sub>-Sättigung noch die myokardiale O<sub>2</sub>-Ausschöpfung direkt bestimmt. Des Weiteren können wir nicht sicher ausschließen, dass die notwendige Hintergrundnarkose mit Pentobarbital die Herzinfarktgrößen beeinflusst hat, wobei hier eine Untersuchung von Haessler et al. zeigt, dass Pentobarbital in der von uns verwendeten Dosierung von 30 mg/kg Körpergewicht/h die resultierende Infarktgröße nicht beeinflusst.<sup>104</sup>

Die perioperative kardiale Morbidität und Mortalität stellt auch heute noch ein schwerwiegendes Problem der modernen Medizin dar. Die häufigsten kardialen Ischämieereignisse finden hierbei in der postoperativen Phase statt. Hierbei sind vor allem Patienten mit vor bestehender koronarer Herzerkrankung (KHK) oder isolierten kardialen Risikofaktoren wie arterieller Hypertonie oder Hypercholesterinämie gefährdet. In Patientenkollektiven mit bekannter KHK wurden Inzidenzen manifester postoperativer Myokardinfarkte von ca. 5-6% bestimmt.<sup>105-107</sup> Einer älteren Untersuchung von von Knorring zu Folge ereignen sich 85 Prozent der postoperativen Myokardinfarkte innerhalb der ersten 72 Stunden.<sup>105</sup> Badner et al. konnten in ihrer Arbeit von 1998 zeigen, dass sich die Mehrheit der frühen postoperativen Myokardinfarkte am Operationstag selbst und am ersten postoperativen Tag ereignet.<sup>107</sup>

Wir konnten in unserer tierexperimentellen Untersuchung eine kardioprotektive Wirkung des Inhalationsanästhetikums Desfluran für bis zu 72 Stunden nach Applikation zeigen. Sollten diese Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sein, so könnte dies eine Möglichkeit darstellen, durch die Auswahl des Narkoseverfahrens die Morbidität und Mortalität postoperativer Myokardinfarkte positiv zu beeinflussen.

## 5 Zusammenfassung

Das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung beschreibt einen endogenen Schutzmechanismus, der in einer erhöhten Toleranz des Gewebes gegenüber ischämischen Episoden resultiert. Volatile Anästhetika sind in der Lage, diesen Mechanismus zu aktivieren und somit betroffene Gewebe zu präkonditionieren. Die ischämische Präkonditionierung zeigt an Kaninchen ein biphasisches Verlaufsmuster, bestehend aus einem frühen ersten Fenster sowie einem späten zweiten Fenster der Präkonditionierung. Beide Fenster sind durch eine Phase ohne kardioprotektiven Effekt getrennt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, für das volatile Anästhetikum Desfluran ebenfalls dieses biphasische Zeitmuster nachzuweisen sowie die Rolle von Stickstoffmonoxid (NO) in diesem Prozess zu charakterisieren.

Wir führten unsere Untersuchungen in einem *in vivo*-Herzinfarktmodell an Kaninchen durch. Wir konnten zeigen, dass Desfluran ein erstes Fenster der Präkonditionierung induziert, welches bis zu zwei Stunden nach Abflutung des volatilen Agens nachweisbar ist. Weiterhin induzierte Desfluran ein zweites Fenster der Präkonditionierung, dessen kardioprotektiver Effekt nach 24 Stunden einsetzt und bis zu 72 Stunden nach Applikation des Anästhetikums nachweisbar ist. Erstes und zweites Fenster der Präkonditionierung waren durch eine Episode ohne nachweisbaren kardioprotektiven Effekt getrennt. 96 Stunden nach Abflutung des Anästhetikums war keine präkonditionierende Wirkung mehr nachweisbar. Um die Rolle von NO beim zweiten Fenster der Desfluran-induzierten Präkonditionierung zu untersuchen, verabreichten wir den NO-Synthase-Blocker L- $\omega$ -Nitro-Arginin (LNA) vor der Koronararterienokklusion.

Anhand unserer Ergebnisse konnten wir nachweisen, dass die Desfluran-induzierte Präkonditionierung des Kaninchenmyokards ein der ischämischen Präkonditionierung ähnliches charakteristisches biphasisches Verlaufsmuster aufweist und das endogen synthetisierte NO als Mediator des zweiten Fensters der Desfluran-induzierten Präkonditionierung wirkt.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Mangano DT, Hollenberg M, Fegert G, Meyer ML, London MJ, Tubau JF, Krupski WC: Perioperative myocardial ischemia in patients undergoing noncardiac surgery--I: Incidence and severity during the 4 day perioperative period. The Study of Perioperative Ischemia (SPI) Research Group. *J.Am.Coll.Cardiol.* 1991; 17: 843-50
2. De Hert SG, Van der Linden PJ, Cromheecke S, Meeus R, ten Broecke PW, De Blier IG, Stockman BA, Rodrigus IE: Choice of primary anesthetic regimen can influence intensive care unit length of stay after coronary surgery with cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 2004; 101: 9-20
3. Garcia C, Julier K, Bestmann L, Zollinger A, von Segesser LK, Pasch T, Spahn DR, Zaugg M: Preconditioning with sevoflurane decreases PECAM-1 expression and improves one-year cardiovascular outcome in coronary artery bypass graft surgery. *Br.J.Anaesth.* 2005; 94: 159-65
4. Schultz JE, Hsu AK, Gross GJ: Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart. *Circ.Res.* 1996; 78: 1100-4
5. 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: 350-6
6. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA: Preconditioning with Ischemia - A Delay of Lethal Cell Injury in Ischemic Myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-36
7. Kloner RA, Jennings RB: Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation* 2001; 104: 2981-9

8. 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. *Circ.Res.* 1993; 72: 1293-9
9. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM: Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 1993; 88: 1264-72
10. Baxter GF, Goma FM, Yellon DM: Characterisation of the infarct-limiting effect of delayed preconditioning: timecourse and dose-dependency studies in rabbit myocardium. *Basic Res.Cardiol.* 1997; 92: 159-67
11. Lochner A, Harper IS, Salie R, Genade S, Coetzee AR: Halothane protects the isolated rat myocardium against excessive total intracellular calcium and structural damage during ischemia and reperfusion. *Anesth.Analg.* 1994; 79: 226-33
12. Warltier DC, Alwathiqui 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: 552-65
13. Larach DR, Schuler HG: Potassium Channel Blockade and Halothane Vasodilation in Conducting and Resistance Coronary-Arteries. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1993; 267: 72-81
14. Cason BA, Shubayev I, Hickey RF: Blockade of Adenosine Triphosphate-Sensitive Potassium Channels Eliminates Isoflurane-Induced Coronary-Artery Vasodilation. *Anesthesiology* 1994; 81: 1245-55
15. Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC: Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K-ATP channel - Reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. *Anesthesiology* 1997; 87: 361-70

16. Kehl F, Krolikowski JG, Mraovic B, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR: Is isoflurane-induced preconditioning dose related? *Anesthesiology* 2002; 96: 675-80
17. Cope DK, Impastato WK, Cohen MV, Downey JM: Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction. *Anesthesiology* 1997; 86: 699-709
18. Piriou V, Chiari P, Lhuillier F, Bastien O, Loufoua J, Raisky O, David JS, Ovize M, Lehot JJ: Pharmacological preconditioning: comparison of desflurane, sevoflurane, isoflurane and halothane in rabbit myocardium. *Br.J.Anaesth.* 2002; 89: 486-91
19. 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: 934-40
20. Cason BA, Gamperl AK, Slocum RE, Hickey RF: Anesthetic-induced preconditioning - Previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits. *Anesthesiology* 1997; 87: 1182-90
21. Kehl F, Krolikowski JG, Mraovic B, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR: Hyperglycemia prevents isoflurane-induced preconditioning against myocardial infarction. *Anesthesiology* 2002; 96: 183-8
22. Piriou V, Chiari P, Knezynski S, Bastien O, Loufoua J, Lehot JJ, Foex P, Annat G, Ovize M: Prevention of isoflurane-induced preconditioning by 5-hydroxydecanoate and gadolinium: possible involvement of mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium and stretch-activated channels. *Anesthesiology* 2000; 93: 756-64

23. Tonkovic-Capin M, Gross GJ, Bosnjak ZJ, Tweddell JS, Fitzpatrick CM, Baker JE: Delayed cardioprotection by isoflurane: role of K(ATP) channels. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2002; 283: H61-H68
24. Cason BA, Gamperl AK, Slocum RE, Hickey RF: Anesthetic-induced preconditioning - Previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits. *Anesthesiology* 1997; 87: 1182-90
25. Nakae Y, Kohro S, Hogan QH, Bosnjak ZJ: Intracellular mechanism of mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channel activation with isoflurane. *Anesth.Analg.* 2003; 97: 1025-32, table
26. Kehl F, Pagel PS, Krolikowski JG, Gu W, Toller W, Warltier DC, Kersten JR: Isoflurane does not produce a second window of preconditioning against myocardial infarction in vivo. *Anesth.Analg.* 2002; 95: 1162-8, table
27. Tanaka K, Ludwig LM, Krolikowski JG, Alcindor D, Pratt PF, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC: Isoflurane produces delayed preconditioning against myocardial ischemia and reperfusion injury: role of cyclooxygenase-2. *Anesthesiology* 2004; 100: 525-31
28. Roscoe AK, Christensen JD, Lynch C, III: Isoflurane, but not halothane, induces protection of human myocardium via adenosine A1 receptors and adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Anesthesiology* 2000; 92: 1692-701
29. Kersten JR, Orth KG, Pagel PS, Mei DA, Gross GJ, Warltier DC: Role of adenosine in isoflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology* 1997; 86: 1128-39
30. 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: 33-41

31. 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: 713-22
32. Toller WG, Kersten JR, Gross ER, Pagel PS, Warltier DC: Isoflurane preconditions myocardium against infarction via activation of inhibitory guanine nucleotide binding proteins. *Anesthesiology* 2000; 92: 1400-7
33. Tritto I, D'Andrea D, Eramo N, Scognamiglio A, De Simone C, Violante A, Esposito A, Chiariello M, Ambrosio G: Oxygen radicals can induce preconditioning in rabbit hearts. *Circ.Res.* 1997; 80: 743-8
34. Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, Schumacker PT: Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *J.Biol.Chem.* 1998; 273: 18092-8
35. Das DK, Maulik N, Sato M, Ray PS: Reactive oxygen species function as second messenger during ischemic preconditioning of heart. *Mol.Cell Biochem.* 1999; 196: 59-67
36. Zhang DX, Chen YF, Campbell WB, Zou AP, Gross GJ, Li PL: Characteristics and superoxide-induced activation of reconstituted myocardial mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Circ.Res.* 2001; 89: 1177-83
37. 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. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2002; 283: H44-H52
38. 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: 1485-90



39. Ludwig LM, Tanaka K, Eells JT, Weihrauch D, Pagel PS, Kersten JR, Wartier DC: Preconditioning by isoflurane is mediated by reactive oxygen species generated from mitochondrial electron transport chain complex III. *Anesth.Analg.* 2004; 99: 1308-15
40. Riess ML, Kevin LG, McCormick J, Jiang MT, Rhodes SS, Stowe DF: Anesthetic preconditioning: the role of free radicals in sevoflurane-induced attenuation of mitochondrial electron transport in Guinea pig isolated hearts. *Anesth.Analg.* 2005; 100: 46-53
41. Hanley PJ, Daut J: K(ATP) channels and preconditioning: a re-examination of the role of mitochondrial K(ATP) channels and an overview of alternative mechanisms. *J.Mol.Cell Cardiol.* 2005; 39: 17-50
42. Khaliulin I, Schwalb H, Wang P, Houminer E, Grinberg L, Katzeff H, Borman JB, Powell SR: Preconditioning improves postischemic mitochondrial function and diminishes oxidation of mitochondrial proteins. *Free Radic.Biol.Med.* 2004; 37: 1-9
43. Minners J, Lacerda L, Yellon DM, Opie LH, McLeod CJ, Sack MN: Diazoxide-induced respiratory inhibition - a putative mitochondrial K(ATP) channel independent mechanism of pharmacological preconditioning. *Mol.Cell Biochem.* 2007; 294: 11-8
44. Hausenloy DJ, Yellon DM, Mani-Babu S, Duchon MR: Preconditioning protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2004; 287: H841-H849
45. Javadov SA, Clarke S, Das M, Griffiths EJ, Lim KH, Halestrap AP: Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart. *J.Physiol* 2003; 549: 513-24

46. Argaud L, Gateau-Roesch O, Chalabreysse L, Gomez L, Loufouat J, Thivolet-Bejui F, Robert D, Ovize M: Preconditioning delays Ca<sup>2+</sup>-induced mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc.Res.* 2004; 61: 115-22
47. 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: 4-14
48. Shinbo A, Iijima T: Potentiation by nitric oxide of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> current induced by K<sup>+</sup> channel openers in guinea-pig ventricular cells. *Br.J.Pharmacol.* 1997; 120: 1568-74
49. Brahmajothi MV, Campbell DL: Heterogeneous basal expression of nitric oxide synthase and superoxide dismutase isoforms in mammalian heart : implications for mechanisms governing indirect and direct nitric oxide-related effects. *Circ.Res.* 1999; 85: 575-87
50. Gewaltig MT, Kojda G: Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc.Res.* 2002; 55: 250-60
51. Bolli R, Manchikalapudi S, Tang XL, Takano H, Qiu Y, Guo Y, Zhang Q, Jadoon AK: The protective effect of late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is mediated by nitric oxide synthase. Evidence that nitric oxide acts both as a trigger and as a mediator of the late phase of ischemic preconditioning. *Circ.Res.* 1997; 81: 1094-107
52. Zhao T, Xi L, Chelliah J, Levasseur JE, Kukreja RC: Inducible nitric oxide synthase mediates delayed myocardial protection induced by activation of adenosine A(1) receptors: evidence from gene-knockout mice. *Circulation* 2000; 102: 902-7

53. Hasebe N, Shen YT, Vatner SF: Inhibition of endothelium-derived relaxing factor enhances myocardial stunning in conscious dogs. *Circulation* 1993; 88: 2862-71
54. Hoshida S, Yamashita N, Igarashi J, Nishida M, Hori M, Kamada T, Kuzuya T, Tada M: Nitric oxide synthase protects the heart against ischemia-reperfusion injury in rabbits. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1995; 274: 413-8
55. Williams MW, Taft CS, Ramnauth S, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J: Endogenous nitric oxide (NO) protects against ischaemia-reperfusion injury in the rabbit. *Cardiovasc.Res.* 1995; 30: 79-86
56. Xi L, Jarrett NC, Hess ML, Kukreja RC: Essential role of inducible nitric oxide synthase in monophosphoryl lipid A-induced late cardioprotection: evidence from pharmacological inhibition and gene knockout mice. *Circulation* 1999; 99: 2157-63
57. Kis A, Vegh A, Papp JG, Parratt JR: Repeated cardiac pacing extends the time during which canine hearts are protected against ischaemia-induced arrhythmias: role of nitric oxide. *J.Mol.Cell Cardiol.* 1999; 31: 1229-41
58. Heusch G, Post H, Michel MC, Kelm M, Schulz R: Endogenous nitric oxide and myocardial adaptation to ischemia. *Circ.Res.* 2000; 87: 146-52
59. Gourine AV, Gonon AT, Pernow J: Involvement of nitric oxide in cardioprotective effect of endothelin receptor antagonist during ischemia-reperfusion. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2001; 280: H1105-H1112
60. Post H, Schulz R, Behrends M, Gres P, Umschlag C, Heusch G: No involvement of endogenous nitric oxide in classical ischemic preconditioning in swine. *J.Mol.Cell Cardiol.* 2000; 32: 725-33

61. Nakano A, Liu GS, Heusch G, Downey JM, Cohen MV: Exogenous nitric oxide can trigger a preconditioned state through a free radical mechanism, but endogenous nitric oxide is not a trigger of classical ischemic preconditioning. *J.Mol.Cell Cardiol.* 2000; 32: 1159-67
62. Qin Q, Yang XM, Cui L, Critz SD, Cohen MV, Browner NC, Lincoln TM, Downey JM: Exogenous NO triggers preconditioning via a cGMP- and mitoKATP-dependent mechanism. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2004; 287: H712-H718
63. Bolli R, Dawn B, Tang XL, Qiu Y, Ping P, Xuan YT, Jones WK, Takano H, Guo Y, Zhang J: The nitric oxide hypothesis of late preconditioning. *Basic Res.Cardiol.* 1998; 93: 325-38
64. Guo Y, Stein AB, Wu WJ, Zhu X, Tan W, Li Q, Bolli R: LATE PRECONDITIONING INDUCED BY NO DONORS, ADENOSINE A1 RECEPTOR AGONISTS, AND  $\delta$ -1-OPIOID RECEPTOR AGONISTS IS MEDIATED BY iNOS. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2005;
65. Takano H, Bolli R, Black RG, Jr., Kodani E, Tang XL, Yang Z, Bhattacharya S, Auchampach JA: A(1) or A(3) adenosine receptors induce late preconditioning against infarction in conscious rabbits by different mechanisms. *Circ.Res.* 2001; 88: 520-8
66. Mery PF, Pavoine C, Belhassen L, Pecker F, Fischmeister R: Nitric oxide regulates cardiac Ca<sup>2+</sup> current. Involvement of cGMP-inhibited and cGMP-stimulated phosphodiesterases through guanylyl cyclase activation. *J.Biol.Chem.* 1993; 268: 26286-95
67. Balligand JL, Kelly RA, Marsden PA, Smith TW, Michel T: Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993; 90: 347-51

68. Brady AJ, Warren JB, Poole-Wilson PA, Williams TJ, Harding SE: Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *Am.J.Physiol* 1993; 265: H176-H182
69. Shen W, Xu X, Ochoa M, Zhao G, Wolin MS, Hintze TH: Role of nitric oxide in the regulation of oxygen consumption in conscious dogs. *Circ.Res.* 1994; 75: 1086-95
70. Shen W, Hintze TH, Wolin MS: Nitric oxide. An important signaling mechanism between vascular endothelium and parenchymal cells in the regulation of oxygen consumption. *Circulation* 1995; 92: 3505-12
71. Warltier DC, Zyvoloski MG, Gross GJ, Hardman HF, Brooks HL: Determination of experimental myocardial infarct size. *J.Pharmacol.Methods* 1981; 6: 199-210
72. Doorley BM, Waters SJ, Terrell RC, Robinson JL: MAC of I-653 in beagle dogs and New Zealand white rabbits. *Anesthesiology* 1988; 69: 89-91
73. Southan GJ, Szabo C: Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem.Pharmacol.* 1996; 51: 383-94
74. Bolli R, Bhatti ZA, Tang XL, Qiu Y, Zhang Q, Guo Y, Jadoon AK: Evidence that late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is triggered by the generation of nitric oxide. *Circ.Res.* 1997; 81: 42-52
75. Ytrehus K, Liu Y, Tsuchida A, Miura T, Liu GS, Yang XM, Herbert D, Cohen MV, Downey JM: Rat and rabbit heart infarction: effects of anesthesia, perfusate, risk zone, and method of infarct sizing. *Am.J.Physiol* 1994; 267: H2383-H2390
76. Yang XM, Baxter GF, Heads RJ, Yellon DM, Downey JM, Cohen MV: Infarct limitation of the second window of protection in a conscious rabbit model. *Cardiovasc.Res.* 1996; 31: 777-83

77. Yamashita N, Hoshida S, Taniguchi N, Kuzuya T, Hori M: A "second window of protection" occurs 24 h after ischemic preconditioning in the rat heart. *J.Mol.Cell Cardiol.* 1998; 30: 1181-9
78. Cason BA, Gamperl AK, Slocum RE, Hickey RF: Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits. *Anesthesiology* 1997; 87: 1182-90
79. Bolli R: Preconditioning: a paradigm shift in the biology of myocardial ischemia. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2007; 292: H19-H27
80. Yellon DM, Baxter GF: A "second window of protection" or delayed preconditioning phenomenon: future horizons for myocardial protection? *J.Mol.Cell Cardiol.* 1995; 27: 1023-34
81. Tanaka K, Ludwig LM, Krolikowski JG, Alcindor D, Pratt PF, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC: Isoflurane produces delayed preconditioning against myocardial ischemia and reperfusion injury: role of cyclooxygenase-2. *Anesthesiology* 2004; 100: 525-31
82. Qiu Y, Rizvi A, Tang XL, Manchikalapudi S, Takano H, Jadoon AK, Wu WJ, Bolli R: Nitric oxide triggers late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. *Am.J.Physiol* 1997; 273: H2931-H2936
83. Guo Y, Jones WK, Xuan YT, Tang XL, Bao W, Wu WJ, Han H, Laubach VE, Ping P, Yang Z, Qiu Y, Bolli R: The late phase of ischemic preconditioning is abrogated by targeted disruption of the inducible NO synthase gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999; 96: 11507-12
84. Smul TM, Lange M, Redel A, Burkhard N, Roewer N, Kehl F: Desflurane-induced preconditioning against myocardial infarction is mediated by nitric oxide. *Anesthesiology* 2006; 105: 719-25

85. Takano H, Manchikalapudi S, Tang XL, Qiu Y, Rizvi A, Jadoon AK, Zhang Q, Bolli R: Nitric oxide synthase is the mediator of late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. *Circulation* 1998; 98: 441-9
86. Imagawa J, Yellon DM, Baxter GF: Pharmacological evidence that inducible nitric oxide synthase is a mediator of delayed preconditioning. *Br.J.Pharmacol.* 1999; 126: 701-8
87. Chiari PC, Bienengraeber MW, Weihrauch D, Krolikowski JG, Kersten JR, Warltier DC, Pagel PS: Role of endothelial nitric oxide synthase as a trigger and mediator of isoflurane-induced delayed preconditioning in rabbit myocardium. *Anesthesiology* 2005; 103: 74-83
88. Wang C, Chiari PC, Weihrauch D, Krolikowski JG, Warltier DC, Kersten JR, Pratt PF, Jr., Pagel PS: Gender-specificity of delayed preconditioning by isoflurane in rabbits: potential role of endothelial nitric oxide synthase. *Anesth.Analg.* 2006; 103: 274-80, table
89. Wakeno-Takahashi M, Otani H, Nakao S, Imamura H, Shingu K: Isoflurane Induces Second Window of Preconditioning Through Upregulation of Inducible Nitric Oxide Synthase in Rat Heart. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2005;
90. Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H: Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994; 23: 1121-31
91. Shinmura K, Xuan YT, Tang XL, Kodani E, Han H, Zhu Y, Bolli R: Inducible nitric oxide synthase modulates cyclooxygenase-2 activity in the heart of conscious rabbits during the late phase of ischemic preconditioning. *Circ.Res.* 2002; 90: 602-8
92. Yvon A, Hanouz JL, Haelewyn B, Terrien X, Massetti M, Babatasi G, Khayat A, Ducouret P, Bricard H, Gerard JL: Mechanisms of sevoflurane-induced

- myocardial preconditioning in isolated human right atria in vitro. *Anesthesiology* 2003; 99: 27-33
93. Loubani M, Hassouna A, Galinanes M: Delayed preconditioning of the human myocardium: signal transduction and clinical implications. *Cardiovasc.Res.* 2004; 61: 600-9
94. Belhomme D, Peynet J, Louzy M, Launay JM, Kitakaze M, Menasche P: Evidence for preconditioning by isoflurane in coronary artery bypass graft surgery. *Circulation* 1999; 100: II340-II344
95. Pouzet B, Lecharny JB, Dehoux M, Paquin S, Kitakaze M, Mantz J, Menasche P: Is there a place for preconditioning during cardiac operations in humans? *Ann.Thorac.Surg.* 2002; 73: 843-8
96. Julier K, da Silva R, Garcia C, Bestmann L, Frascarolo P, Zollinger A, Chassot PG, Schmid ER, Turina MI, von Segesser LK, Pasch T, Spahn DR, Zaugg M: Preconditioning by sevoflurane decreases biochemical markers for myocardial and renal dysfunction in coronary artery bypass graft surgery: a double-blinded, placebo-controlled, multicenter study. *Anesthesiology* 2003; 98: 1315-27
97. De Hert SG, Cromheecke S, ten Broecke PW, Mertens E, De Blier IG, Stockman BA, Rodrigus IE, Van der Linden PJ: Effects of propofol, desflurane, and sevoflurane on recovery of myocardial function after coronary surgery in elderly high-risk patients. *Anesthesiology* 2003; 99: 314-23
98. Van der Linden PJ, Daper A, Trenchant A, De Hert SG: Cardioprotective effects of volatile anesthetics in cardiac surgery. *Anesthesiology* 2003; 99: 516-7
99. Conzen PF, Fischer S, Detter C, Peter K: Sevoflurane provides greater protection of the myocardium than propofol in patients undergoing off-pump coronary artery bypass surgery. *Anesthesiology* 2003; 99: 826-33



100. Bein B, Renner J, Caliebe D, Scholz J, Paris A, Fraund S, Zaehle W, Tonner PH: Sevoflurane but not propofol preserves myocardial function during minimally invasive direct coronary artery bypass surgery. *Anesth.Analg.* 2005; 100: 610-6, table
101. Yu CH, Beattie WS: The effects of volatile anesthetics on cardiac ischemic complications and mortality in CABG: a meta-analysis. *Can.J.Anaesth.* 2006; 53: 906-18
102. Klatt P, Schmidt K, Brunner F, Mayer B: Inhibitors of brain nitric oxide synthase. Binding kinetics, metabolism, and enzyme inactivation. *J.Biol.Chem.* 1994; 269: 1674-80
103. Maxwell MP, Hearse DJ, Yellon DM: Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischaemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. *Cardiovasc.Res.* 1987; 21: 737-46
104. Haessler R, Kuzume K, Chien GL, Wolff RA, Davis RF, Van Winkle DM: Anaesthetics alter the magnitude of infarct limitation by ischaemic preconditioning. *Cardiovasc.Res.* 1994; 28: 1574-80
105. von Knorring J: Postoperative myocardial infarction: a prospective study in a risk group of surgical patients. *Surgery* 1981; 90: 55-60
106. Mangano DT, Browner WS, Hollenberg M, London MJ, Tubau JF, Tateo IM: Association of perioperative myocardial ischemia with cardiac morbidity and mortality in men undergoing noncardiac surgery. The Study of Perioperative Ischemia Research Group. *N.Engl.J.Med.* 1990; 323: 1781-8
107. Badner NH, Knill RL, Brown JE, Novick TV, Gelb AW: Myocardial infarction after noncardiac surgery. *Anesthesiology* 1998; 88: 572-8

# Danksagung

Herzlich danken möchte ich meinem Doktorvater Professor Dr. Franz Kehl für die Überlassung des Themas und für die sehr gute Betreuung und Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Ein besonders herzlicher Dank gebührt meinem Betreuer Dr. med. Thorsten Smul. Er stand mir jederzeit für Fragen und konstruktive Gespräche zur Verfügung und lehrte mich vor allem die Herangehensweise an wissenschaftliche Fragestellungen sowie die kritische Hinterfragung und Auseinandersetzung mit deren Ergebnissen.

Die vorliegende Promotionsarbeit widme ich meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben und denen ich dafür sehr dankbar bin.

Ich bestätige, dass ich die vorliegende Dissertation alleine und ohne fremde Hilfe angefertigt habe.

Würzburg, den 12.12.2007



Jan Stumpner

# Curriculum vitae – JAN STUMPNER

## Angaben zur Person

Name: Jan Martin Stumpner  
Anschrift: Mergentheimer Str. 18; 97082 Würzburg  
Geburtstag: 28. April 1981 in Herford  
Familienstand: ledig

## Schulbildung

1987-88 Grundschule Gilching  
1988-89 Volksschule Benediktbeuern  
1989-91 Grundschule Bad Sooden-Allendorf  
1991-93 Orientierungsstufe der Rhenanus-Schule Bad Sooden-Allendorf  
1993-97 Gymnasialer Zweig der Rhenanus-Schule Bad Sooden-Allendorf  
1997-2000 Gymnasiale Oberstufe der Rhenanus-Schule Bad Sooden-Allendorf  
13.06.2000 Abitur, Rhenanus-Schule Bad Sooden-Allendorf /  
Durchschnittsnote 1,0

## Zivildienst

08/2000-06/2001 Deutsches Rotes Kreuz Witzenhausen, Abteilung Rettungsdienst

## Universitäre Ausbildung

10/2001 - 11/2007 Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
20.08.2003 Ärztliche Vorprüfung / Durchschnittsnote 1,66  
13.11.2007 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung / Durchschnittsnote 1,5  
16.11.2007 Approbation als Arzt

Würzburg, den 12.12.2007

  
Jan Stumpner