Aus der
Klinik für Anästhesiologie
der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. J. Tarnow, FRCA

Isofluran präkonditioniert das Myokard durch Freisetzung von freien Radikalen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Ragnar Huhn

2005

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.:	Dekan der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H. M. Raab
Referent:	Prof. Dr. med. Wolfgang Schlack, DEAA
Korreferent:	Univ.-Prof. em. Dr. med. Volker Thämer

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS.. 3

EINFÜHRUNG 4

METHODEN 7

CHIRURGISCHE PRÄPARATION 7
STUDIENPROTOKOLL 10
INFARKTGRÖßENBESTIMMUNG 12
DATENVERARBEITUNG 13
HÄMODYNAMISCHE VARIABLEN 14
STATISTISCHE ANALYSEN 15

ERGEBNISSE 16

HÄMODYNAMISCHE VARIABLEN 16
RISIKOGEBIET UND INFARKTGRÖßE 20

DISKUSSION 22

MECHANISMUS DER ISOFLURAN-INDUZIERTEN PRÄKONDITIONIERUNG 23

METHODENKRITIK 29

AUSBLICK 31

LITERATURVERZEICHNIS 33

DANKSAGUNG 41

LEBENSLAUF 42

ZUSAMMENFASSUNG 43

Tabellen und Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNGEN

ABBILDUNG 1: INSTRUMENTIERUNG DER KANINCHENHERZEN 9
ABBILDUNG 2: VERSUCHSPROTOKOLL 10
ABBILDUNG 3: HÄMODYNAMIK 17
ABBILDUNG 4: INFARKTGRÖßEN 21
ABBILDUNG 5: SIGNALTRANSDUKTIONSKETTE 28

TABELLEN

TABELLE 1: HÄMODYNAMISCHE VARIABLEN 18
TABELLE 2: GEWICHTE UND INFARKTGRÖßEN 20

EINFÜHRUNG

Kurze subletale Perioden myokardialer Ischämien erhöhen die Toleranz des Myokards gegen die Folgen einer nachfolgenden längeren Ischämie. Die Protektion bewirkt eine Verkleinerung des Infarktareals, eine Reduzierung der postischämischen kontraktilen Dysfunktion und führt zu einem verminderten Auftreten von Arrhythmien. Dieses Phänomen wurde zuerst von Murry et al.[1] beschrieben und ist seitdem als ischämische Präkonditionierung (Preconditioning [PC]) bekannt. Es gibt zwei Phasen der Protektion; der initiale protektive Effekt der ischämischen Präkonditionierung tritt unmittelbar nach dem präkonditionierenden ischämischen Stimulus auf und schützt das Myokard für ca. 1 bis 2 Stunden. Diese Phase der Protektion wird als „klassische Präkonditionierung“ bezeichnet (early preconditioning [EPC]). Frühere Studien [2] haben gezeigt, dass die Myokardprotektion der ischämischen Präkonditionierung ca. 24 Stunden nach der initialen präkonditionierenden Ischämie erneut einsetzt und im Anschluss für etwa 48 Stunden die negativen Folgen einer Ischämie-Reperfusionssituation reduziert. Diese zweite Protektionsphase wird als „späte Präkonditionierung“ oder „Zweites Fenster der Protektion“ (late preconditioning [LPC]) bezeichnet. Neben einer kurzen Ischämie kann das Herz auch durch verschiedene andere Stimuli präkonditioniert werden, z.B. pharmakologisch durch Aktivierung von myokardialen Adenosin-[3], Opioid-[4], α-adrenergen-[5], muskarinischen-[6], oder Bradykininrezeptoren.[7] Verschiedene Inhalationsanästhetika[8-13], wie auch Isofluran[8,11-17], führen ebenfalls zu einer Präkonditionierung am Herzen (pharmakologisch induziertes PC).

Bei bisher allen untersuchten Tierspezies (Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Hund, Schwein) und auch beim Menschen konnte der

protektive Effekt der ischämischen Präkonditionierung gezeigt werden.[18,19,46] Bei diesem stärksten endogenen Protektionsmechanismus des Myokards gegen eine Ischämie handelt es sich offenbar um einen ubiquitären Mechanismus.

Arstall et al. zeigten an isolierten Herzmuskelzellen des Menschen protektive Effekte sowohl durch klassische als auch durch späte Präkonditionierung *in vitro*.[19] Kloner et al. zeigten in ihrer retrospektiven Datenauswertung bei Patienten mit akutem Herzinfarkt, dass diejenigen, die innerhalb von 48 Stunden vor dem Infarkt eine Angina-Pectoris-Symptomatik aufwiesen, eine signifikant geringere Infarktgröße zeigten, als die Vergleichsgruppe ohne vorausgegangene Angina-pectoris-Symptomatik.[18,20]

Es wurde zudem gezeigt, dass durch die vorangehende Gabe von Isofluran 10 Minuten vor Beginn der Myokardischämie während einer koronaren Bypassoperation der Schaden am Myokard reduziert wird.[21,45]

Obwohl der genaue Signaltransduktionsweg der myokardialen Präkonditionierung noch nicht vollständig geklärt ist, spielt die Aktivierung von mitochondrialen und/oder sarkolemmalen Adenosintriphosphat (ATP)-regulierten Kalium (K_{ATP}) Kanälen, sowohl für die ischämische als auch für die durch Inhalationsanästhetika induzierte pharmakologische Präkonditionierung [22], eine wichtige Rolle. Jüngste Ergebnisse lassen vermuten, dass die Öffnung von mitochondrialen K_{ATP}-Kanälen während der präkonditionierenden Ischämie nicht als Endeffektormechanismus die Protektion vermittelt, sondern als Trigger wirkt: Über die Öffnung von mitochondrialen K_{ATP}-Kanälen kommt es zu einer Freisetzung von freien Radikalen, die zu einer Aktivierung der Proteinkinase C und im weiteren von Tyrosin- und Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) führen. Diese Signaltransduktionskaskade schützt das Myokard über einen bislang

unbekannten Endeffektormechanismus.[23] Zwei aktuelle Studien von McPherson und Yao zeigten zum ersten Mal, dass Opioid-induzierte Präkonditionierung zu einer Öffnung von mitochondrialen K_{ATP}-Kanälen führt, die einen Anstieg von intrazellulären freien Radikalen bewirkt.[4,24]

Es stellt sich nun die Frage, ob die Radikalfreisetzung von entscheidender Bedeutung für die durch das volatile Anästhetikum Isofluran-induzierte Myokardpräkonditionierung ist.

Ziel der hier vorliegenden Studie war es zu untersuchen, ob die Bildung freier Radikale ein entscheidender Bestandteil der Signaltransduktionskette der Isofluran-induzierten Präkonditionierung ist. Im speziellen wurde untersucht, ob die Gabe der zwei strukturell unterschiedlichen Antioxidantien N-(2-mercaptopropionyl) glycin (MPG) und Mn(III)tetrakis(4-Benzoesäure)porphyrin chlorid (MnTBAP) die durch Isofluran-Präkonditionierung hervorgerufene Myokardprotektion *in vivo* blockiert.

Als Versuchstier wurde das Kaninchen gewählt, da es bei dieser Spezies zwischen den einzelnen Koronararterien keine relevanten Kollateralen gibt.[25] Bei der Infarktgrößenauswertung musste somit keine Kollateralperfusion gemessen und berücksichtigt werden.

METHODEN

Die Studie wurde nach Genehmigung durch den Regierungspräsidenten Düsseldorf an narkotisierten Kaninchen durchgeführt.

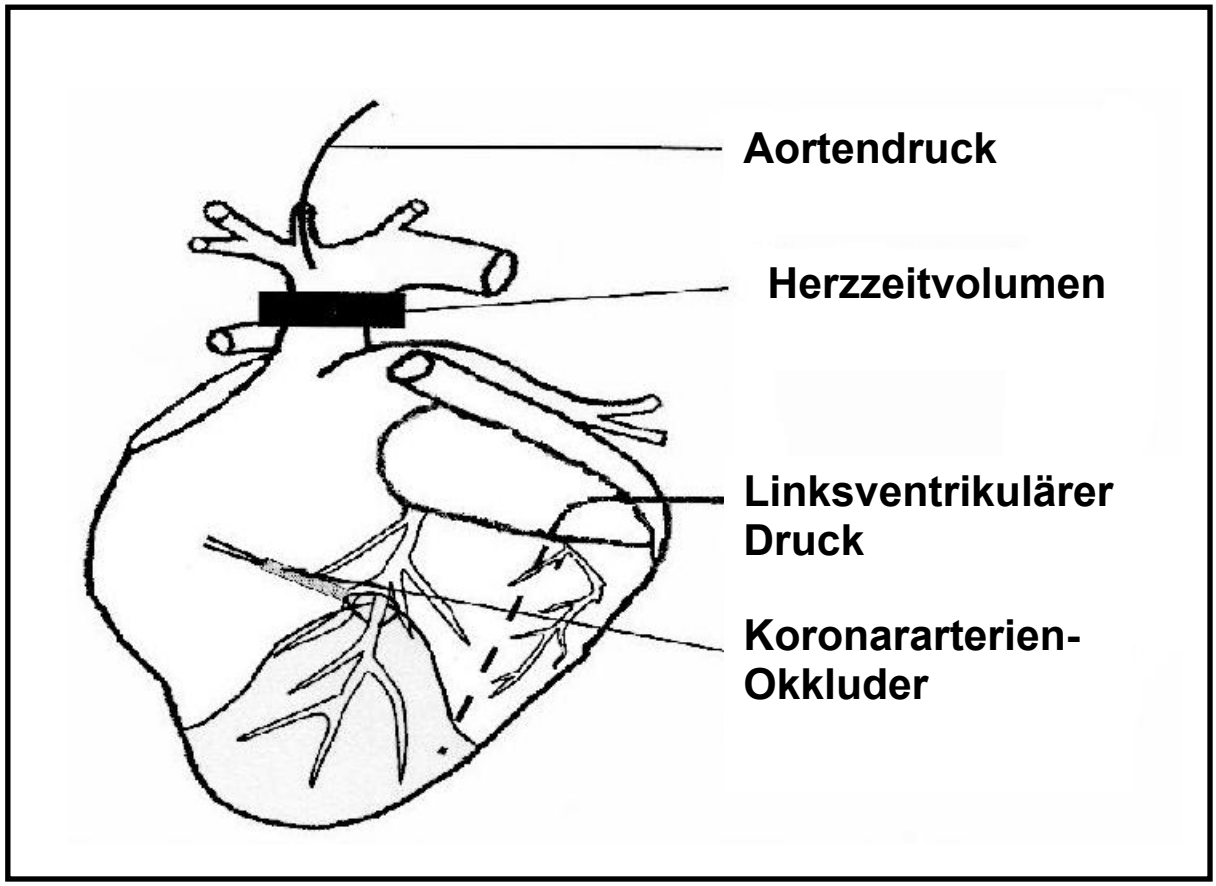
Chirurgische Präparation

Nach Rasur und Desinfektion der Ohrinnenseite wurde eine lokalanästhetische Creme (EMLA®) aufgetragen; nach ausreichender Einwirkzeit wurde die laterale Ohrvene von 61 weißen Neuseeland Kaninchen, mit einem mittleren Körpergewicht von 2.98±0.14 kg, kanüliert und eine Infusion angelegt. Über den liegenden Zugang wurde die Narkose mit Propofol (Disoprivan®; 10 mg/kg KG) eingeleitet. Die Tiere wurden zunächst orotracheal intubiert (Endotrachealtubus, 3.0 mm ID) und maschinell beatmet. Zur Narkoseaufrechterhaltung erhielten die Tiere eine kontinuierliche Infusion des Narkosemittels α-Chloralose (40 $mg \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$). Die Tiere wurden auf einem Operationstisch für Kaninchen fixiert und die Lungen maschinell ventiliert (Sulla 808, Dräger AG, Lübeck, Deutschland). Die Beatmungsfrequenz lag zwischen 30-35/min und das Hubvolumen zwischen 15 und 20 ml. Die Beatmung wurde so eingestellt, dass das endtidal gemessene Kohlendioxyd bei 35 mmHg (Datex Capnomac Ultima, Division of Instrumentarium Corp., Helsinki, Finnland) lag.

Nach Rasur des übrigen Operationsgebietes werden zunächst die Halsgefäße präpariert . Zur Messung des Aortendruckes wurde ein 20-Gauge Teflonkatheter über die linke Arteria carotis communis in den Aortenbogen eingeführt, mit Flüssigkeit (NaCl 0,9%) gefüllt und mit

einem Drucktransducer (PD 23, Gould, Cleveland, Ohio, USA) verbunden. Nach Punktion der rechten Vena jugularis communis mit einer Venenverweilkanüle (Venflon™, 1,2mm, Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden) erhielten die Tiere eine kontinuierliche Infusion einer physiologischen NaCl-Lösung (15 ml/kg KG h), um intraoperative Flüssigkeitsverluste zu kompensieren. Nach medianer Thorakotomie und Eröffnung des Perikardes wurde ein Ultraschallflussmesskopf (4S, T208, Transonic System Inc., Ithaca, NY, USA) um die Aorta ascendens gelegt, mit dem das Herzzeitvolumen (HZV) (abzüglich der Koronardurchblutung) gemessen wurde. Zur Messung des linksventrikulären Druckes wurde ein Katheterspitzenmanometer (Sensodyn S PO SF-1, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) über den linken Vorhof in den linken Ventrikel eingebracht. Für die spätere Okklusion wurde ein Hauptast der linken Koronararterie identifiziert und mit einer 5-0 Prolenenaht mit einer atraumatischen Nadel (Ethicon 5/0, 1-metrisch, TF) umstochen. Über die Fäden wurde ein Plastikröhrchen (Okkluder) gezogen. Mit diesem Okkluder konnte die Koronararterie zur Induktion der Ischämie (30 Minuten) verschlossen werden. Die Temperatur wurde in der Herzhöhle gemessen (GTH 1160, Digital Thermometer, Geisinger Elektronik, Deutschland) und mittels einer Wärmematte und einer Infrarotlampe zwischen 38,3 °C und 38,7 °C konstant gehalten.

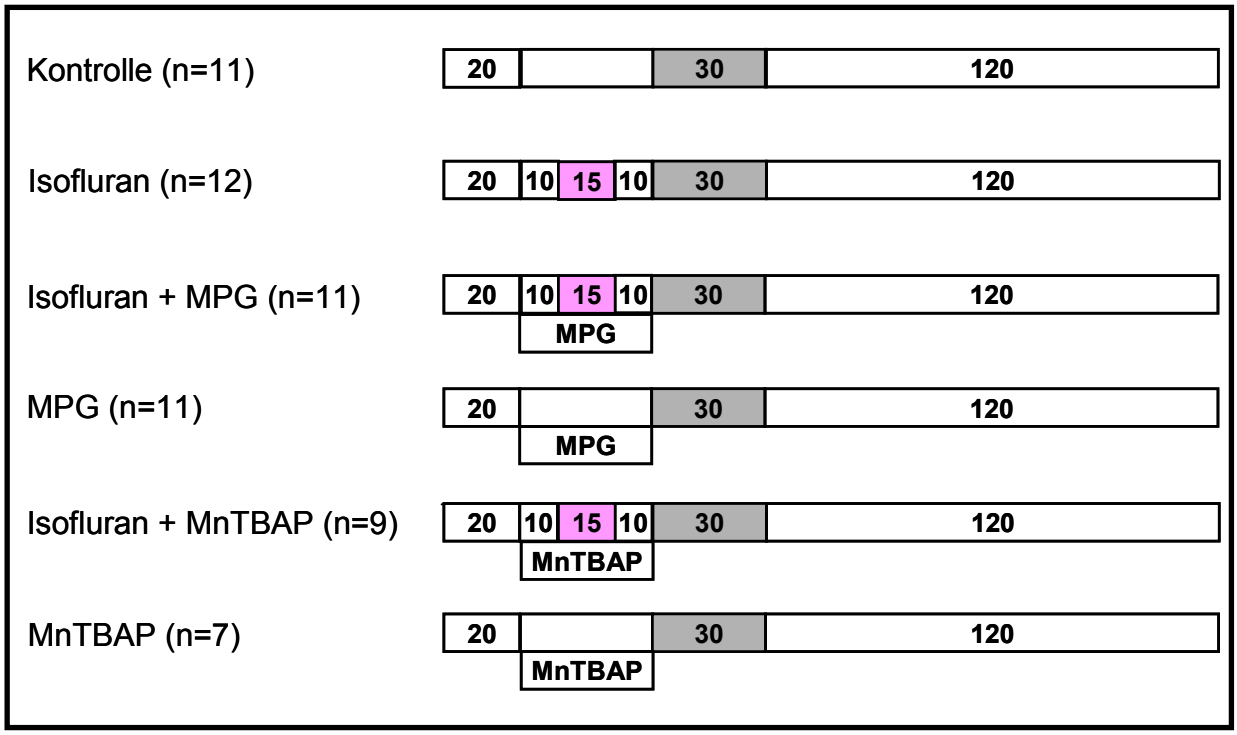
Abbildung 1: Instrumentierung der Kaninchenherzen



Studienprotokoll

Die Tiere wurden vor dem ersten Eingriff in eine der 6 Gruppen randomisiert. Alle Kaninchen wurden einer 30-minütigen regionalen Myokardischämie gefolgt von zwei Stunden Reperfusion unterzogen (s. Abb. 2).

Abbildung 2: Versuchsprotokoll



20 = Stabilisierungsphase

15 = Isofluran (2%)

35 = MPG (*N*-(2-mercaptoproprionyl) glycin; 1 mg/kg/min)

35 = MnTBAP (Mn(III)tetrakis(4-Benzoesäure)porphyrin chlorid; 0.1 mg/kg/min)

30 = regionale Myokardischämie

120 = Reperfusion

Nach einer 20-minütigen Stabilisierungsphase wurden die hämodynamischen Ausgangswerte registriert und bis zum Ende des Versuches in regelmäßigen Abständen erneut gemessen (s. Tab. 1 und Abb. 2).

Die Kaninchen aller Gruppen wurden durch Verschluss der Koronararterie einer 30-minütigen regionalen Myokardischämie unterzogen. Das Vorliegen einer Ischämie wurde durch die sofort auftretende epikardiale Zyanose im abhängigen Versorgungsgebiet verifiziert. Eventuell auftretendes Kammerflimmern wurde durch sofortige interne elektrische Defibrillation (5J, DCS 261 Defibrillator, Piekser, Ratingen, Deutschland) therapiert. Nach dieser Ischämie wurde für 120 Minuten reperfundiert. Das Verschwinden der Zyanose zeigte die erfolgreiche Reperfusion an.

Die Kaninchen der Kontrollgruppe (KON, n=11) wurden keiner weiteren Behandlung unterzogen. Kaninchen aus der Isofluran-Gruppe (ISO, n=12) erhielten Isofluran in einer endexspiratorischen Konzentration von 2% (entspricht 1 MAC; MAC = minimale alveoläre Konzentration, Konzentration bei der 50% der Patienten auf einen definierten Schmerzreiz keine Abwehrreaktion mehr zeigen; Datex Capnomac Ultima, Division of Instrumentarium Corp., Helsinki, Finnland) über 15 Minuten, gefolgt von einer 10 minütigen Auswaschphase (s. Abb. 2). Nach der Isoflurangabe wurde für 10 Minuten ohne Inhalationsanästhetikum beatmet, so dass vor der 30-minütigen Okklusion Isofluran endexspiratorisch nicht mehr nachweisbar war.

Um nachzuweisen, daß die Freisetzung von Radikalen entscheidender Bestandteil der Signaltransduktionskette der Isofluran-induzierten Präkonditionierung ist, wurde in der 1. Versuchsserie der Radikalfänger MPG [N-(2-mercapto-propionyl)glycin, 1 mg $\cdot$ kg^{-1} $\cdot$ min^{-1}] und in der 2. Versuchserie MnTBAP [Mn(III)-tetrakis(4-

Benzoesäure)porphyrin chlorid, 100 µg · kg^{-1} · min^{-1}] verabreicht. Beide Antioxidantien unterscheiden sich chemisch und haben einen unterschiedliches Wirkspektrum. Die beiden Radikalfänger wurden über einen Zeitraum von jeweils 35 Minuten appliziert: 10 Minuten vor Isoflurangabe, während der 15-minütigen Isoflurangabe und 10 Minuten nach Isoflurangabe (Isofluran+MPG, n=11; Isofluran+MnTBAP, n=9; s. Abb. 2). Um zu untersuchen, ob MPG und MnTBAP einen eigenen Effekt auf die Infarktgröße haben, wurden in zwei weiteren Gruppen die Antioxidantien über 35 Minuten alleine gegeben (MPG, n=11; MnTBAP, n=7; s. Abb. 2).

Infarktgrößenbestimmung

Nach zwei Stunden Reperfusion wurde das Herz durch Injektion von 20 ml eiskalter Kaliumchloridlösung (16 mmol/l) in den linken Vorhof stillgestellt, schnell entnommen und an eine modifizierte Langendorff-Apparatur überführt. Diese bestand aus einer Knopfkanüle und einem Dreiwegehahn, über den die Perfusionslösungen luftfrei retrograd über die Aortenwurzel in die Koronararterien eingebracht wurden. An dieser wurde die Koronararterie für fünf Minuten mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung mit einem Druck von 40 cm Wassersäule perfundiert. Dadurch wurden in den Koronarien verbliebene Blutreste ausgewaschen. Dann wurde die zuvor verschlossene Koronararterie mit dem verbliebenen Okkluder erneut verschlossen und das Herz mit einer 0,2%igen Evans-Blau-Lösung für 10 min mit einem Druck von 40 cm Wassersäule perfundiert. Intravaskuläre Evans-Blau-Lösung wurde danach durch erneute Perfusion mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen. Durch dieses Verfahren wurde das ischämisch-

reperfundierte Gewebe (Risikogebiet) als ungefärbt identifiziert. Anschließend wurden die Herzen durch transversale Schnitte in 2 mm dicke Scheiben geschnitten. Der rechte Ventrikel wurde entfernt, alle Auswertungen beziehen sich nur auf den linken Ventrikel. Danach wurden die Myokardscheiben für 15 Minuten in einer gepufferten 0,75%igen Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung bei 38 °C inkubiert. Durch diese Färbung erscheint vitales Gewebe rot, nekrotisches Gewebe wird hingegen nicht angefärbt. Die Größe des linken Ventrikels, des Risikogebietes und des Infarktes wurde mittel Computer-unterstützer Planimetrie bestimmt. Nach dem Trocknen (24 Stunden im Wärmeschrank bei 45 °C) wurden alle Scheiben gewogen und so die Trockengewichte bestimmt. Die durch die Planimetrie bestimmten Flächen wurden dann im entsprechenden Verhältnis zum Trockengewicht der entsprechenden Scheibe als Gewichte errechnet.

Datenverarbeitung

Die Studie bestand aus 2 Versuchsserien. In der 1. Versuchsserie wurde der Radikalfänger MPG [N-(2-mercapto-propionyl)glycin, 1 mg · kg^{-1} · min^{-1}] und in der 2. Versuchserie MnTBAP [Mn(III)-tetrakis(4-Benzoesäure)porphyrin chlorid, 100 µg · kg^{-1} · min^{-1}] verabreicht.

Linksventrikulärer Druck, dessen erste Ableitung nach der Zeit (dP/dt), der Aortendruck und das Herzzeitvolumen wurden kontinuierlich auf einen Mehrkanaltintenschreiber (Recorder 2800, Gould Inc., Cleveland, Ohio, USA) registriert. Zu den Messzeitpunkten wurden die Daten mittels eines Analog-Digital-Konverters (Data Translation, Marlboro, MA, USA) digitalisiert und an einem Personalcomputer weiterverarbeitet.

Hämodynamische Variablen

Linksventrikulärer Spitzendruck (LVSD) und die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}) wurden als Maß für die globale systolische Funktion gemessen. Die maximale Druckabfall-geschwindigkeit (dP/ dt_{min}) definierte das Ende der Systole. Der steile Anstieg des dP/dt_{max} markierte das Ende der Diastole. Der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDD) und die Zeitkonstante der isovolumetrischen Relaxation (τ) wurden zur Beurteilung der linksventrikulären diastolischen Funktion herangezogen. Die Zeitkonstante der isovolumetrischen Relaxation wurde anhand folgender Formel errechnet:

$$P(t) = P_0 \,\%\, \exp(-t/\tau),$$

wobei P_t der Druck zum Zeitpunkt t ist, P_0 der LVEDD und τ die Zeitkonstante der isovolumetrischen Relaxation.

Das Produkt aus Herzfrequenz (HF) und LVSD (rate-pressure-product, RPP) wurde als Determinante des myokardialen Sauerstoffverbrauches berechnet. Der systemische vaskuläre Widerstand (SVR) wurde aus dem mittleren Aortendruck (AOP_{mean}) und dem HZV unter der Annahme berechnet, dass bei geöffnetem Thorax der rechtsatriale Druck 0 mmHg beträgt.

Statistische Analysen

Alle Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung (SD) angegeben.

Hämodynamische Gruppeneffekte wurden mit einer Einweg Varianzanalyse gefolgt von einem Student`s t-test für unpaare Daten mit Bonferronikorrektur für Mehrfachvergleiche analysiert. Zeiteffekte innerhalb der Gruppen wurden mit einer ein-Wege Varianzanalyse gefolgt von Dunnets Post-Hoc-Test mit dem Ausgangswert als Referenzwert untersucht. Unterschiede der Infarktgröße in der ersten Versuchsgruppe wurden durch eine Varianzanalyse gefolgt von Dunnets Post-Hoc-Test berechnet, wobei die Isofluran-Gruppe als Referenzgruppe diente. In der zweiten Versuchsgruppe wurden Unterschiede in der Infarktgröße durch eine Varianzanalyse gefolgt von einem Student`s t-test für unpaare Daten mit Bonferronikorrektur für Mehrfachvergleiche analysiert. Die hämodynamischen Effekte durch MPG- und MnTBAP-Gabe wurden durch einen Student`s t-test für abhängige Daten analysiert. Unterschiede innerhalb und zwischen den Gruppen wurden ab einem P-Wert kleiner 0,05 als signifikant erachtet.

ERGEBNISSE

Es wurden insgesamt 66 Tiere untersucht. 5 Tiere starben aufgrund von Kammerflimmern während der Koronarokklusion. Von den verbleibenden 61 Tieren wurden komplette Datensätze erhoben (Kontroll-Gruppe, n=11; Isofluran-Gruppe, n=12; Isofluran + MPG-Gruppe, n=11; MPG-Gruppe, n=11; Isofluran + MnTBAP-Gruppe, n=9; MnTBAP-Gruppe, n=7).

Hämodynamische Variablen

Die hämodynamischen Variablen sind in Abbildung 3 und Tabelle 1 zusammengefaßt.

Zu Versuchsbeginn gab es hinsichtlich der HF, des HZV, des LVSD und des errechneten RPP keine Unterschiede zwischen den Gruppen (vgl. Abb. 3).

Abbildung 3: Hämodynamik

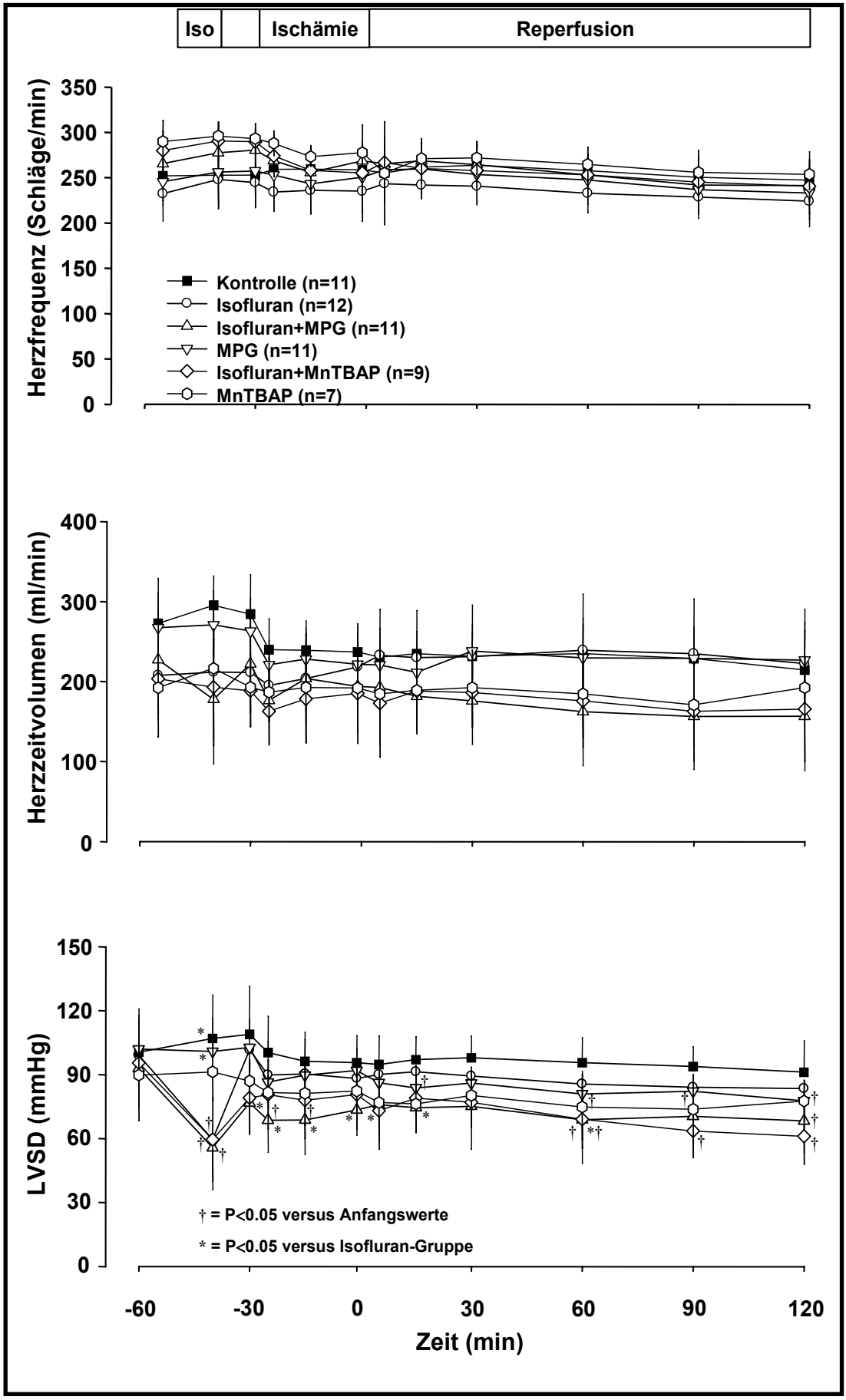


Tabelle 1: Hämodynamische Variablen

	Versuchsbeginn	ISO	Auswaschphase	Myokardischämie		Reperfusion		
				5	25	5	30	120
LVEDD (mmHg)								
Kontrolle	2.6 ± 2.9	3.1 ± 4.5	2.4 ± 2.4	7.9 ± 4.1	7.1 ± 4.7	8.5 ± 5.2	7.3 ± 4.8	7.6 ± 5.4
ISO	1.8 ± 2.2	2.2 ± 1.9	3.2 ± 2.7	6.2 ± 5.8	7.4 ± 7.2	6.9 ± 6.9	5.3 ± 5.3	6.0 ± 7.7
ISO+MPG	3.7 ± 2.7	3.9 ± 4.5	5.3 ± 4.7	5.1 ± 5.0	5.3 ± 3.6	4.1 ± 3.3	3.5 ± 3.0	4.6 ± 2.7
MPG	4.0 ± 4.1	4.9 ± 2.8	6.2 ± 3.4	8.5 ± 6.7	9.6 ± 7.1	10.5 ± 7.0	8.2 ± 6.8	6.7 ± 4.9
ISO+MnTBAP	3.1 ± 3.9	2.9 ± 5.2	2.6 ± 4.0	4.7 ± 5.6	4.8 ± 5.9	4.8 ± 7.1	4.8 ± 7.2	2.6 ± 1.3
MnTBAP	2.2 ± 0.9	2.6 ± 1.7	2.2 ± 2.3	2.3 ± 1.6	4.4 ± 3.2	4.1 ± 4.0	3.2 ± 2.3	2.3 ± 1.8
dP/dtmax (mmHg)								
Kontrolle	4583 ± 1528	5037 ± 1764*	5107 ± 1801	4209 ± 1494	4223 ± 976	3032 ± 681	3909 ± 705	3398 ± 1241
ISO	4566 ± 1329	2328 ± 1147†	4766 ± 985	3347 ± 752†	3619 ± 750	2992 ± 789†	3266 ± 1024†	2656 ± 917†
ISO+MPG	4027 ± 1086	1858 ± 1222†	3537 ± 1155	2584 ± 960†	3120 ± 944	2674 ± 709	2681 ± 1021	2434 ± 958†
MPG	4967 ± 1312	5510 ± 2086*	5648 ± 2029	3961 ± 1142	4069 ± 907	3074 ± 899	3926 ± 822	3189 ± 664
ISO+MnTBAP	4133 ± 1395	2288 ± 763†	3416 ± 1512	2921 ± 901	3145 ± 924	2337 ± 757	2755 ± 652	2150 ± 657†
MnTBAP	3901 ± 1319	4215 ± 975*	3886 ± 563	3547 ± 675	3733 ± 830	3059 ± 1411	3353 ± 871	3175 ± 682
SVR (mmHg min l^{-1})								
Kontrolle	332 ± 62*	331 ± 69*	356 ± 65	374 ± 87	364 ± 102	346 ± 86	352 ± 91	332 ± 81
ISO	465 ± 160	219 ± 43†	454 ± 223	406 ± 158	405 ± 185	375 ± 139	343 ± 114	303 ± 48
ISO+MPG	385 ± 97	243 ± 72†	271 ± 63*	324 ± 94	316 ± 101	336 ± 95	326 ± 126	385 ± 157
MPG	341 ± 66	333 ± 60*	344 ± 70	350 ± 84	360 ± 65	338 ± 46	326 ± 53	297 ± 62
ISO+MnTBAP	318 ± 213	229 ± 43	347 ± 86	418 ± 126	353 ± 92	337 ± 76	341 ± 81	301 ± 74
MnTBAP	412 ± 65	379 ± 68*	403 ± 68	399 ± 88	392 ± 105	365 ± 84	365 ± 51	344 ± 56
RPP (mmHg min^{-1} 10^{-3})								
Kontrolle	25.3 ± 6.2	27.0 ± 6.6*	27.5 ± 6.6	26.2 ± 6.0	25.8 ± 5.1	24.4 ± 5.4	25.8 ± 3.7	22.9 ± 4.4
ISO	22.9 ± 4.0	15.6 ± 4.5†	24.7 ± 4.3	21.0 ± 4.0	20.7 ± 3.7	21.9 ± 3.1	21.6 ± 4.5	18.9 ± 7.5
ISO+MPG	24.3 ± 3.5	15.0 ± 6.7†	21.1 ± 4.6	18.1 ± 4.7	19.8 ± 4.8	19.8 ± 4.9	19.6 ± 7.0	16.6 ± 6.3
MPG	25.1 ± 5.2	26.3 ± 6.8*	26.9 ± 6.3	22.1 ± 6.7	23.2 ± 4.4	22.3 ± 3.8	22.1 ± 4.6	18.3 ± 3.0
ISO+MnTBAP	26.7 ± 5.9	17.4 ± 6.1†	22.9 ± 4.7	22.0 ± 4.1	20.1 ± 5.5†	19.4 ± 4.3†	19.8 ± 2.6†	14.7 ± 3.3†
MnTBAP	26.2 ± 7.8	27.1 ± 4.9*	25.6 ± 3.8	23.5 ± 2.2	22.8 ± 3.4	19.3 ± 5.6	21.7 ± 2.1	19.7 ± 3.1
τ (ms)								
Kontrolle	12.1 ± 2.6	13.1 ± 2.0	13.1 ± 3.4	15.3 ± 3.7	16.0 ± 2.9	17.9 ± 4.0†	16.7 ± 3.0	18.3 ± 4.8†
ISO	12.4 ± 2.8	14.5 ± 4.5	14.3 ± 4.2	17.6 ± 5.4	17.1 ± 5.0	15.3 ± 4.6	15.6 ± 4.4	18.1 ± 7.8
ISO+MPG	13.9 ± 3.7	19.4 ± 9.5	16.6 ± 6.9	16.8 ± 4.0	14.2 ± 3.1	13.6 ± 3.4	14.7 ± 4.3	18.4 ± 8.3
MPG	15.1 ± 2.7	14.6 ± 2.4	15.3 ± 2.4	18.1 ± 3.7	18.3 ± 4.5	18.0 ± 4.2	17.4 ± 4.8	17.4 ± 3.9
ISO+MnTBAP	12.4 ± 3.0	14.6 ± 5.5	12.9 ± 4.4	15.4 ± 4.8	18.3 ± 8.1	15.9 ± 6.4	14.3 ± 6.1	14.0 ± 3.4
MnTBAP	12.4 ± 2.4	11.7 ± 1.8	10.9 ± 2.2	14.0 ± 1.4	14.2 ± 1.8	13.8 ± 2.9	12.7 ± 2.3	11.6 ± 1.5

Daten als MW ± SD. LVEDD = linksventrikulärer enddiastolischer Druck; dP/dtmax = maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit; SVR = Systemischer Vasculärer Widerstand; RPP = Produkt aus Herzfrequenz und LVSD; τ = Zeitkonstante der isovolumetrischen linksventrikulären Relaxation. ISO=Isofluran; MPG = *N*-(2-mercaptoproprionyl) glycin;MnTBAP = Mn(III)tetrakis(4-Benzoesäure)porphyrin chlorid; †P<0.05 versus Anfangswerte; *P<0.05 versus Isofluran-Gruppe

Die Gabe von MPG oder MnTBAP hatte keinen Einfluß auf die Hämodynamik. LVSD, dP/dtmax, RPP und SVR wurden durch die Isoflurangabe reduziert: in der Isofluran-Gruppe der LVSD um 39±18%, dP/dtmax um 43±24%, RPP um 30±23% und SVR um 49±12% der Ausgangswerte; in der Isofluran + MPG-Gruppe LVSD um 41±14%, dP/dtmax um 52±24%, RPP um 40±20%, SVR um 38±12% und in der Isofluran + MnTBAP-Gruppe LVSD um 34±24%, dP/dtmax um 39±27%, RPP um 32±26%, SVR um 29±11%. Nach der 10-minütigen Auswaschphase von Isofluran waren die Werte nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den Ausgangswerten.

Die 30-minütige Koronarokklusion führte zu einem Abfall des LVSD um 9±24% vs. Ausgangswerte und des dP/dtmax um 9±38% in allen Gruppen (Werte nach 25 Minuten Okklusion; vgl. Tabelle 1 und Abbildung 3). Das RPP wies keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf. τ stieg um 35±53% und der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) im Durchschnitt um 3±2 mmHg während der Koronarokklusion an.

Nach 120 Minuten Reperfusion blieb der LVSD um 22±18% und das dP/dtmax um 30±26% im Vergleich zum Ausgangswert erniedrigt. Diese Abnahme zeigt die beeinträchtigte Myokardkontraktilität am Ende der Versuche in allen Gruppen. Als Folge einer Abnahme von Herzfrequenz und linksventrikulärem Spitzendruck, reduzierte sich das RPP im Durchschnitt um 32±17%. Am Ende der Versuche blieb τ im Durchschnitt um 19±28% erhöht.

Risikogebiet und Infarktgröße

Bei der Bestimmung der Risikogebiete und der Infarktgrößen wurde nur der linke Ventrikel ausgewertet (s. Infarktgrößenbestimmung).

Das mittlere linksventrikuläre Trockengewicht betrug 0,68±0,19 g und unter-schied sich nicht signifikant zwischen den sechs Versuchsgruppen (Daten der einzelnen Gruppen in Tabelle 2).

Tabelle 2: Gewichte und Infarktgrößen

	Kontrolle	ISO	ISO+MPG	MPG	ISO+MnTBAP	MnTBAP
Körpergewicht (g)	3003 ± 241	2948 ± 189	2993 ± 71	2948 ± 89	2999 ± 133	2999 ± 38
LV-Gewicht (g)	0.79 ± 0.28	0.69 ± 0.16	0.55 ± 0.18	0.60 ± 0.09	0.75 ± 0.06	0.77 ± 0.15
Risikogebiet (g)	0.45 ± 0.33	0.37 ± 0.18	0.25 ± 0.18	0.26 ± 0.17	0.35 ± 0.10	0.28 ± 0.14
Risikogebiet/LV(%)	54.4 ± 29.7	50.4 ± 17.5	43.0 ± 15.1	42.4 ± 23.5	46.5 ± 12.2	35.9 ± 16.1
Infarktgröße (g)	0.19 ± 0.14	0.11 ± 0.08	0.14 ± 0.12	0.13 ± 0.09	0,19 ± 0.06*	0,14 ± 0,06

Daten als MW ± SD. LV = Linker Ventrikel; ISO = Isofluran; MPG = *N*-(2-mercaptoproprionyl) glycin; MnTBAP = Mn(III)tetrakis(4-Benzoesäure)porphyrin chlorid; ∗P<0.05 versus Isofluran-Gruppe

Das mittlere Trockengewicht des Risikogebietes des linken Ventrikels betrug 0,33±0,21 g und somit 46±20 % des linken Ventrikels. Auch hier gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

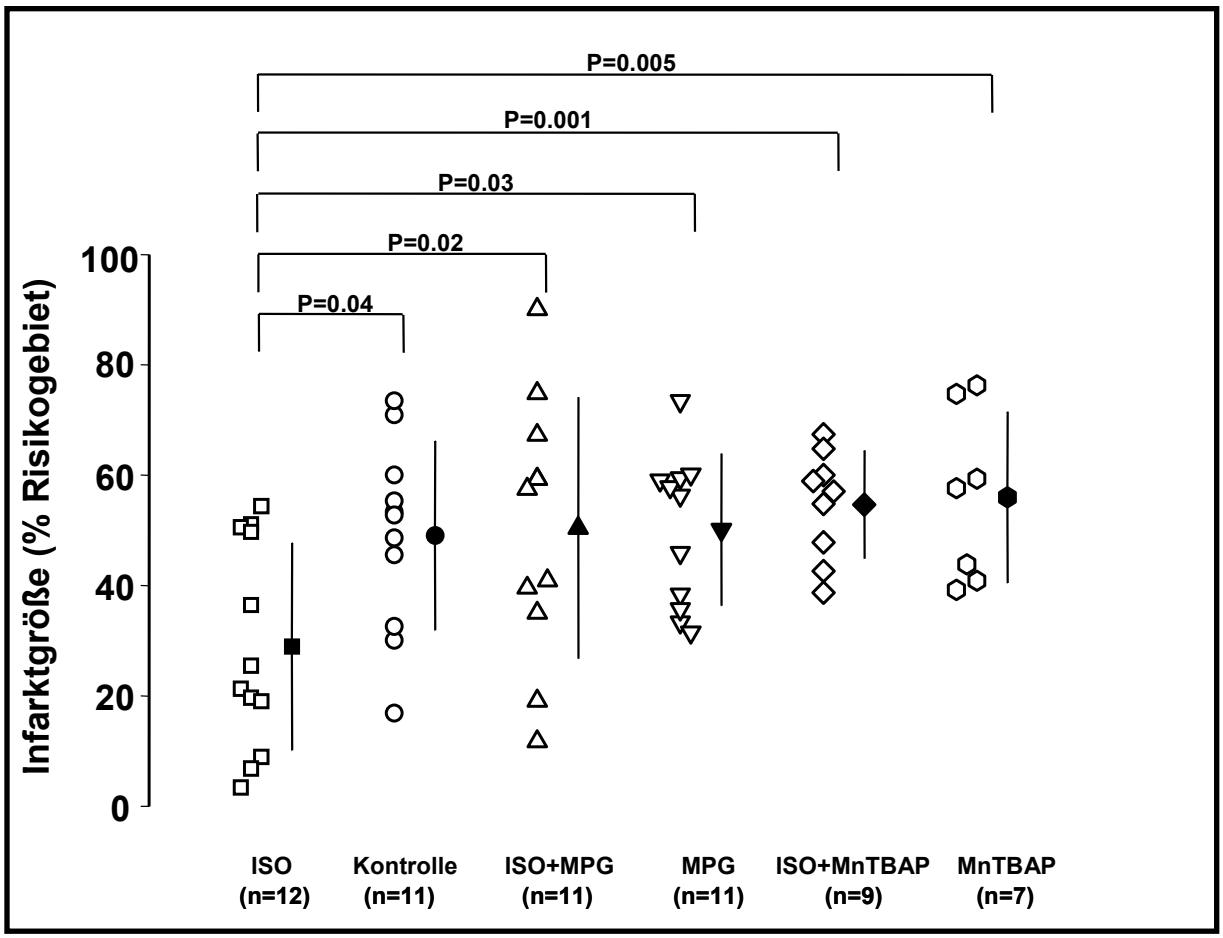
Die Infarktgrößen der einzelnen Gruppen sind in Abbildung 4 in Prozent des Risikogebietes dargestellt.

Die Isoflurangabe führte zu einer signifikanten Reduzierung der Infarktgröße von 49±17% des Risikogebietes in der Kontroll-Gruppe auf 29±19% in der Isofluran-Gruppe (P=0.04, Isofluran vs. Kontroll-Gruppe).

Die alleinige Vorbehandlung mit den Antioxidantien MPG oder MnTBAP hatte keinen Einfluß auf die Infarktgröße (MPG: 50±14%, MnTBAP: 56±15%).

Die gleichzeitige Gabe von Isofluran und Radikalfänger führte zu einer Blockade der Isofluran-induzierten Präkonditionierung: die Infarktgröße betrug 50±24% in der Isofluran + MPG-Gruppe (P=0.02 vs. Isofluran-Gruppe) und 55±10% in der Isofluran + MnTBAP-Gruppe (P=0.001 vs. Isofluran-Gruppe).

Abbildung 4: Infarktgrößen



ISO = Isofluran; Es sind für jede Gruppe Einzelwerte (offene Symbole) und Mittelwerte (geschlossene Symbole) ± Standardabweichung dargestellt.

DISKUSSION

Wesentliches Ergebnis unserer Studie ist, dass durch die jeweilige Gabe der zwei strukturell unterschiedlichen Antioxidantien MPG und MnTBAP der kardioprotektive Effekt der Isofluran-induzierten Präkonditionierung *in vivo* vollständig blockiert wird. Demnach ist die Freisetzung von Radikalen entscheidender Bestandteil der Signaltransduktionskette der Isofluran-induzierten Präkonditionierung.

Unsere Studie bestätigt die Ergebnisse verschiedener früherer Studien, die zeigen konnten, dass eine klinisch relevante Dosis von Isofluran (1.1-2% = 0.5-1 MAC) das Myokard gegen die Folgen einer länger andauernden Ischämie schützt.[12,14,15,17] In unserer aktuellen Studie wurde durch eine 15-minütige Vorbehandlung mit Isofluran in einer endtidalen Konzentration von 2%, die Infarktgröße um 42% im Vergleich zur Kontroll-Gruppe reduziert. In einer früheren Untersuchung, die in unserem Labor durchgeführt wurde, haben wir einen identischen Versuchsaufbau[26] verwendet und gezeigt, dass eine 5-minütige präkonditionierende Ischämie die Infarktgröße um 47% reduziert. Somit können wir die Ergebnisse von Ismaeil et al.[14] und Piriou et al.[15] bestätigen, die zeigen konnten, dass durch Isofluran-Präkonditionierung wie auch durch EPC, das gleiche Maß an Protektion erreicht wird.

Es ist nicht auszuschließen, dass es einen Zusammenhang zwischen der durch Isofluran-induzierten Hypotension und der verminderten Infarktgröße in der Isofluran-Gruppe gibt. Dennoch ist es unwahrscheinlich, dass dieser Blutdruckabfall zu einer Myokardischämie mit nachfolgender ischämischer Präkonditionierung führt, da wir eine ähnliche Abnahme des Blutdruckes bei den Tieren der MPG + Isofluran-

und der MnTBAP + Isofluran-Gruppe beobachteten. Der kardioprotektive Effekt durch eine Isofluranvorabgabe wurde in diesen Gruppen vollständig blockiert.

Endexspiratorisch konnte 5 Minuten nach Isoflurangabe kein Isofluran mehr nachgewiesen werden. In der 10-minütigen Auswaschphase erholte sich die Myokardfunktion vollständig. Demnach ist die Kardioprotektion durch Isofluran nicht auf einem direkten antiischämischen Effekt zurückzuführen.

Alle Versuche wurden unter Anästhesie mit α-Chloralose durchgeführt. Diese Anästhesie hat nahezu keinen Einfluß auf die kardialen Reflexe und ist das klassische Anästhetikum für physiologische und pharmakologische Experimente.[27] In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass eine ischämische Präkonditionierung auch während α-Chloralose-Anästhesie auszulösen ist.[26]

Mechanismus der Isofluran-induzierten Präkonditionierung

Obwohl der genaue Mechanismus dieses protektiven Phänomens nur teilweise verstanden ist, hat man Übereinstimmungen zwischen dem Signaltransduktionsweg der Präkonditionierung durch Isofluran und dem der ischämischen Präkonditionierung gefunden. Verschiedene jüngere Studien messen dem Adenosinrezeptor eine wesentliche Rolle bei der Isofluran-induzierten Präkonditionierung bei.[3] Die Blockade von A_1-Rezeptoren hebt sowohl die Isofluran-induzierte Protektion gegen die myokardiale postischämische kontraktile Dysfunktion,[11] als auch die Infarktgrößenreduktion im Kaninchen auf.[14] Untersuchungen von Piriou et al. deuten darauf hin, dass dehnungsaktivierte Kanäle eine Rolle bei

diesem Phänomen spielen, denn die Gabe von Gadolinium, einem Blocker dieser Kanäle, vor der präkonditionierenden Isoflurangabe führt ebenfalls zu einer Blockade der Protektion.[15]

Untersuchungen konnten zeigen, dass die Öffnung von K_{ATP}-Kanälen eine zentrale Rolle, sowohl im Signaltransduktionsweg der ischämischen,[28] als auch der Isofluran-induzierten Präkonditionierung[11, 13,14,15,17] spielten. Durch die Gabe eines K_{ATP}-Kanal Blockers vor und/oder während der Isoflurangabe wird die Kardioprotektion vollständig blockiert. Toller et al. wiesen nach, dass die Isofluranpräkonditionierung die Infarktgröße durch eine Isofluranvorabgabe über eine Aktivierung inhibitorischer G-Proteine reduziert und postulierten, dass diese durch Besetzung von A_1-Rezeptoren aktiviert werden, was dann schließlich in einer Öffnung von K_{ATP}-Kanälen resultiert.[29]

Bislang wurde davon ausgegangen, dass eine Öffnung von K_{ATP}-Kanälen der Endeffektormechanismus sowohl der ischämischen als auch der pharmakologischen PC darstellt.

Gegen diese Annahme sprechen jedoch die Ergebnisse einer kürzlich von Pain et al. publizierten Studie, die nachwiesen, dass die Öffnung von K_{ATP}-Kanälen die Entstehung freier Radikale triggert, die dann weitere Schritte in der Signaltransduktionskette auslösen.[23] MPG und MnTBAP wurden über 35 Minuten vor der 30-minütigen Ischämie gegeben, weil gezeigt wurde, dass die Entstehung freier Radikale eher als Trigger (Wirkung während der Präkonditionierung) und nicht als Mediator (direkte Wirkung während der Ischämie), der durch Präkonditionierung erzeugten Kardioprotekion fungiert.[23] Diese Theorie wird durch viele andere Studien bestätigt, die gezeigt haben, dass der kardioprotektive Effekt der ischämischen Präkonditionierung durch Verabreichung von

Radikalfängern wie Superoxiddismutase oder MPG während der präkonditionierenden Ischämie blockiert wird.[30-33]

Es gibt jedoch keine Studien, die untersucht haben, ob es zu einer Freisetzung von freien Radikalen während einer pharmakologischen Präkonditionierung durch volatile Anästhetika kommt. McPherson und Yao haben jüngst gezeigt, dass eine Präkonditionierung mit Morphin zu einer Aktivierung mitochondraler K_{ATP}-Kanäle führt, die einen intrazellulären Anstieg freier Radikale zur Folge hat.[4,24] Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die Gabe einer geringen Dosis freier Radikale den kardioprotektiven Effekt der ischämischen Präkonditionierung imitieren konnte.[33] Basierend auf diesen Ergebnissen haben wir die Hypothese aufgestellt, dass der Radikalfänger MPG die Isofluran-induzierte Präkonditionierung blockieren könnte. Tatsächlich zeigen unsere Ergebnisse, dass die Gabe von MPG kurz vor, während und kurz nach der Isoflurangabe die Kardioprotektion der Isofluran-induzierten Präkonditionierung vollständig blockiert. In einer zweiten Versuchsreihe wurden die Ergebnisse auch bei Anwendung des chemisch unterschiedlichen Radikalfängers MnTBAP bestätigt. Beide Antioxidantien, sowohl MPG, als auch MnTBAP sind zellpermeabel und blockieren OH^- -Radikale. MnTBAP verhält sich ähnlich wie Superoxiddismutase und ist zusätzlich noch in der Lage Peroxinitrit zu blockieren. Übereinstimmend mit anderen Studien hatten MPG[23,32,34] oder MnTBAP[23] selber keinen Effekt auf die Infarktgröße.

Die Infarktgrößenunterschiede wurden weder durch Unterschiede in der Größe des Risikogebietes oder der Temperatur, noch durch unterschiedliche Hämodynamik während Ischämie und Reperfusion verursacht.

Im Gegensatz zu Ergebnissen von Kersten et al.,[11] konnten wir keine verbesserte postischämische funktionelle Erholung in der Isofluran-

Gruppe nachweisen. Vermutliche Ursache für diese heterogenen Ergebnisse ist die Dauer der Ischämie: Kersten et al. präkonditionierten das Myokard mit vier Perioden a 5 Minuten, jeweils unterbochen durch 5 Minuten Reperfusion um den Einfluss von Isofluran auf die myokardiale postischämische kontraktile Dysfunktion zu untersuchen. Unsere Studie hatte zum Ziel, den Mechanismus der Isofluran-induzierten Präkonditionierung gegen die Folgen einer längeren Koronarischämie, (z.B. Herzinfarkt), zu untersuchen. Aus diesem Grund wurden die Herzen einer 30 minütigen Ischämieperiode unterzogen, wobei aus Vorversuchen bekannt war, dass dadurch ein Myokardinfarkt induziert wird. Eine Studie von Cohen et al. hat gezeigt, dass es zwar keinen direkten Zusammenhang zwischen einer reduzierten Infarktgröße nach Präkonditionierung und einer frühen myokardialen Funktionserholung gibt, dass aber 2-4 Tage nach einer Myokardischämie eine signifikante Funktionserholung nachweisbar war.[35] Zudem ist die absolute Differenz der Infarktgröße (in g) zwischen der Isofluran- und den anderen Gruppen im Vergleich zur totalen linksventrikulären Masse klein, wodurch sich der Einfluß der Infarktgrößenreduzierung auf die globale myokardiale Funktion reduziert.

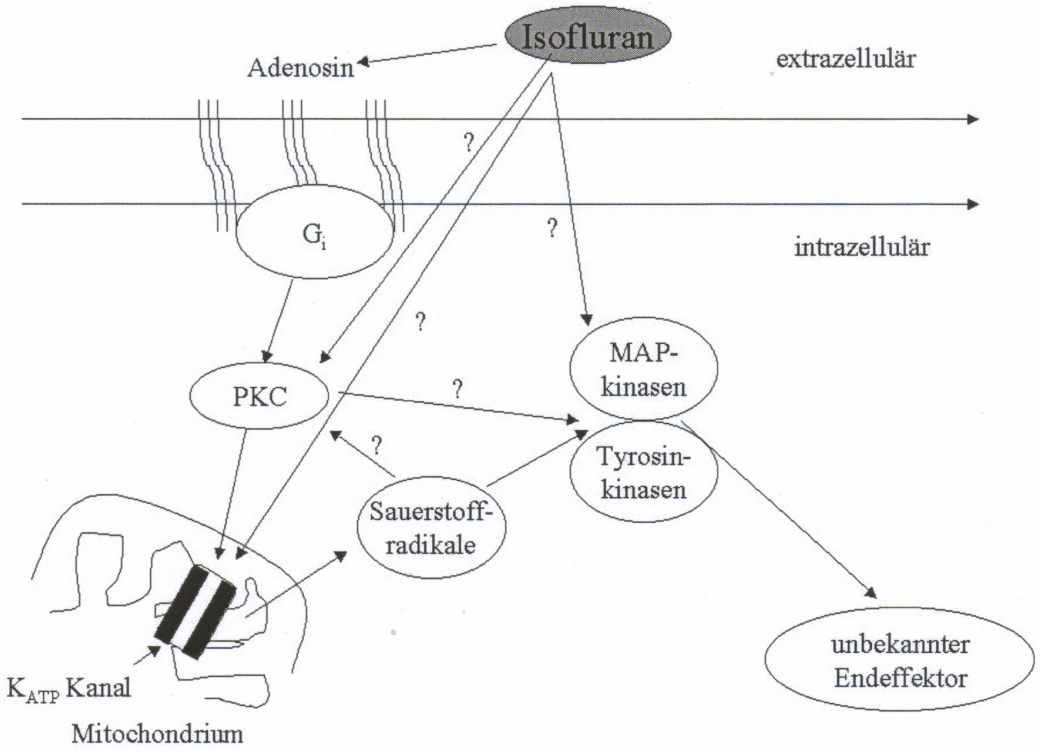
Was ist die Quelle der freien Radikale und über welchen Mechanismus wirkt die Radikalfreisetzung protektiv? Radikale werden nach Öffnen von K_{ATP}-Kanälen in geringen Mengen freigesetzt. [4,36,37,38] Im Gegensatz dazu, verhindern K_{ATP}-Kanal Blocker deren Freisetzung.[4,24,38] McPherson und Yao zeigten, dass eine Stimulation von Opiod-Rezeptoren durch Morphin eine Aktivierung von K_{ATP}-Kanälen bewirkt, die zu einem intrazellulären Anstieg freier Radikale führt, freie Radikale wiederum fördern die K_{ATP}-Kanalöffnung [4,24] Desweiteren wurde gezeigt, dass die Proteinkinase C durch freie Radikale aktiviert wird.[39] Die Aktivierung von Proteinkinase C ist ein wichtiger Schritt in der

Signaltransduktionskaskade, sowohl der pharmakologisch-induzierten Präkonditionierung durch volatile Anästhetika[8], als auch der ischämischen Präkonditionierung.[40]

Die folgende Abbildung (Abb. 5) zeigt einen möglichen Signaltransduktionsweg der chemischen Präkonditionierung durch Isofluran. Bislang ist nur eine Aktivierung von Adenosinrezeptoren und die Öffnung von ATP-sensitiven Kaliumkanälen als Trigger und/oder Mediator geklärt.

Unsere Untersuchung zeigt nun, dass die Freisetzung von Radikalen eine bedeutende Rolle bei der Isofluran-induzierten Präkonditionierung spielt und das Isofluran die Radikalfreisetzung triggert, da durch die gleichzeitige Gabe von Isofluran und Antioxidantien die Präkonditionierung aufgehoben wurde.

Abbildung 5: Schematische Darstellung der Signaltransduktions-kaskade der Präkonditionierung durch Isofluran



G_i : inhibitorische G-Proteine
PKC : Proteinkinase C
K_{ATP} : ATP-sensitiver Kaliumkanal
MAP : Mitogen aktivierte Kinasen
? : mögliche Interaktionen bzw. Transduktionswege

METHODENKRITIK

Für die Entwicklung eines Myokardinfarktes sind die Dauer der Ischämie, der myokardiale Sauerstoffverbrauch während der Ischämie, der kollaterale Blutfluss und die Myokardtemperatur wichtige Determinanten.

Kaninchenherzen haben eine nur schwach ausgebildete Kollateraldurchblutung[25], deshalb war es nicht erforderlich den Kollateralblutfluß im Ischämiegebiet zu bestimmen. Das Kaninchenherz besitzt neben dem arteriellen kollateralen Blutfluss aber auch noch weitere Mechanismen der alternativen Sauerstoffversorgung in Form von Diffusion und retrogradem Blutfluss durch Thebesii-Venen.[42] Dadurch erklärt sich eine Sauerstoffversorgung des Myokards mit Ausbleiben der Infarzierung sehr kleiner Ischämiegebiete, da bei kleinen Ischämiegebieten die Diffusionstrecken und die Strecken, die das Blut durch Thebesii-Venen zurücklegen muss, sehr kurz sind. Ist das Risikogebiet kleiner als 0,05 g Trockengewicht, entsteht bei Kaninchenherzen kein Myokardinfarkt. Versuche mit einem Risikogebiet kleiner als 0,05 g Trockengewicht wären aus der Versuchsreihe ausgeschlossen worden.

Die Körpertemperatur der Kaninchen wurde während des gesamten Versuches innerhalb des Perikards gemessen und bei 38,5 ± 0,2°C konstant gehalten. Eine konstante Temperatur war wichtig, da eine Abweichung von 1 °C bereits zu einer Veränderung der Infarktgröße von ungefähr 10% führen kann.[47]

Die Tiere wurden alle mit α-Chloralose anästhesiert. Diese Form der Anästhesie wird häufig in physiologischen und pharmakologischen Studien eingesetzt.[48] In vorausgegangenen Studien konnte gezeigt

werden, dass α-Chloralose keine antiischämischen Eigenschaften besitzt[49,50,51] und es konnte gezeigt werden, dass sowohl ischämische als auch pharmakologische Präkonditionierung während α-Chloralose Anästhesie möglich ist.

Für den Nachweis von Radikalen und zum Ausschluss eines Substanzeffektes haben wir mit MPG und MnTBAP 2 strukturell unterschiedliche Radikalfänger eingesetzt. Der Einsatz von 2 unterschiedlichen Antioxidantien hatte 2 Gründe: zum einen war die Wahrscheinlichkeit höher tatsächlich freie Radikale abzufangen, zum anderen ist anzunehmen, dass MPG und MnTBAP nicht die gleichen Nebeneffekte haben. Beide Radikalfänger, sowohl MPG, als auch MnTBAP, haben den präkonditionierenden Effekt von Isofluran aufgehoben.

AUSBLICK

Es gibt deutliche Evidenz dafür, dass das experimentelle Phänomen der myokardialen ischämischen Präkonditionierung auch klinisch bedeutsam ist: So konnte nicht nur in vitro an menschlichem Myokard die ischämische Präkonditionierung nachgewiesen werden,[19] sondern Präkonditionierung schützt auch den koronarkranken Patienten. So haben z.B. Patienten mit Myokardinfarkt, die im Vorfeld schon Angina-pectoris-Beschwerden hatten, ein besseres „Outcome“.[18,20] Bei koronarkranken Patienten vermutet man, dass diese aufgrund rezidivierender Angina pectoris Anfälle ischämisch präkonditioniert sind. Weiterhin klinische Bedeutung könnte die pharmakologische Präkonditionierung bei kardiologischen (z.B. PTCA) bzw. kardiochirurgischen (z.B. Bypass-OP) Eingriffen erlangen, bei denen es zu wiederholten Myokardischämien kommt.[43] Präkonditionierung kann auch pharmakologisch induziert werden: Die volatilen Anästhetika Enfluran[8], Isofluran[13,29,46], Sevofluran[9,44] und Desfluran[10] konnten den Protektionseffekt einer klassischen Präkonditionierung in verschiedenen *in vitro*- und/oder *in vivo*-Untersuchungen auslösen und damit das Myokard chemisch präkonditionieren. Eine Präkonditionierung ist allerdings auch pharmakologisch blockierbar, z.B. durch Ketamin oder Antidiabetika der Gruppe der Sufonylharnstoffe.

Wir haben in unserer Untersuchung gezeigt, dass die pharmakologische Präkonditionierung durch Isofluran über die Freisetzung von Radikalen getriggert wird, da die Antioxidantien vor der 30 minütigen Ischämie gegeben wurden und dadurch die Präkonditionierung aufgehoben wurde. Bei der Signaltransduktion der Präkonditionierung nimmt die Öffnung von K_{ATP}-Kanälen eine Schlüsselstellung ein und es gibt Untersuchungen, die gezeigt haben,

dass eine K_{ATP}-Kanalöffnung zu einer Radikalfreisetzung führt. Die Bedeutung der Radikale liegt in der protektiven Wirkung für das Myokard über einen bisher unbekannten Endeffektormechanismus. Radikale sind Trigger (Wirkung während der Präkonditionierung) und nicht Mediator (direkte Wirkung während der Ischämie) der Präkonditionierung, durch ihre Freisetzung kommt es zu einer konsekutiven Aktivierung weiterer Kinasen (Proteinkinase C, MAP-Kinasen). Die Menge der intrazellulär freigesetzten Radikale ist gering.

Es ist wichtig den Signaltransduktionsweg der Präkonditionierung zu verstehen, um diesen stärksten endogenen Protektionsmechanismus des Myokard gezielt pharmakologisch zu verstärken und nicht durch ein „falsches“ Pharmakon zu blockieren.

Ziel weiterer Studien ist es, diese neuen Möglichkeiten der gezielten Organprotektion zu überprüfen um Patienten einen verbesserten Schutz bei geplanten Ischämien zu garantieren oder um einen dauernden Schutz möglicherweise sogar koronarkranker Patienten zu erreichen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation 1986; 74:1124-1136.

2. Marber MS, Latchmann 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; 88:1264-1272.

3. Heidland UE, Heintzen MP, Schwartzkopff B, Strauer BE: Preconditioning during percutaneous transluminal coronary angioplasty by endogenous and exogenous adenosine. Am Heart J 2000; 140:813-20

4. McPherson BC, Yao ZH: Morphine mimics preconditioning via free radical signals and mitochondrial K_{ATP} channels in myocytes. Circulation 2001; 103:290-5

5. Tsuchida A, Liu A, Liu GS, Cohen MV, Downey JM: Alpha-1-adrenergic agonists precondition rabbit myocardium independent of adenosine by direct activation of protein kinase C. Circulation Research 1994; 75: 576-85.

6. Yao Z, Gross GJ: Acetylcholine mimics ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in dogs. Am.J.Physiol. 1993; 264: H2221-H2225

7. Hartmann JC, Wall TM, Hulliger TG, Shebuski RJ: Reduction of myocardial infarct size in rabbits by Ramiprilat: Reversal by the bradykinin antagonist HOE 140. Journal of Cardiovascular Pharmacology 1993; 21: 996-1003.

8. Cope DK, Impastato WK, Cohen MV, Downey JM: Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction. ANESTHESIOLOGY 1997; 86:699-709

9. Toller WG, Kersten JR, Pagel PS, Hettrick DA, Warltier DC: Sevoflurane reduces myocardial infarct size and decreases time threshold for ischemic preconditioning in dogs. ANESTHESIOLOGY 1999; 91:1437-46

10. Toller WG, Gross ER, Kersten JR, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC: Sarcolemmal and mitochondrial adenosine triphosphate-dependent potassium channels - Mechanism of desflurane-induced cardioprotection. ANESTHESIOLOGY 2000; 92:1731-9

11. Kersten JR, Schmeling TJ, Hettrick DA, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC: Mechanism of myocardial protection by isoflurane. ANESTHESIOLOGY 1996; 85:794-807

12. 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

13. Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC: Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K_{ATP}-channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. ANESTHESIOLOGY 1997; 87:361-70

14. Ismaeil MS, Tkachenko I, Gamperl AK, Hickey RF, Cason BA: Mechanisms of isoflurane-induced myocardial preconditioning in rabbits. ANESTHESIOLOGY 1999; 90:812-21

15. 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. ANESTHESIOLOGY 2000; 93:756-64

16. Ismaeil MS, Tkachenko I, Hickey RF, Cason BA: Colchicine inhibits isoflurane-induced preconditioning. ANESTHESIOLOGY 1999; 91:1816-22

17. Roscoe AK, Christensen JD, Lynch C: Isoflurane, but not halothane, induces protection of human myocardium via adenosine A_1 receptors and adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. ANESTHESIOLOGY 2000; 92:1692-701

18. Kloner RA, Shook T, Antman EM, Cannon CP, Przyklenk K, Yoo K, McCabe CH, Braunwald E, TIMI-9B investigators: Prospective temporal analysis of the onset of preinfarction angina versus outcome. Circulation 1998; 97:1042-5

19. Arstall MA, Zhao YZ, Hornberger L, Kennedy SP, Buchholz RA, Osathanondh R, Kelly RA: Human ventricular myocytes in vitro exhibit both early and delayed preconditioning responses to simulated ischemia. J Mol Cell Cardiol 1998; 30:1019-25

20. Kloner RA, Shook T, Przyklenk K, Davis VG, Junio L, Matthews RV, Burstein S, Gibson M, Poole WK, Cannon CP, McCabe CH, Braunwald E, TIMI 4 Investigators: Previous angina alters in-hospital outcome in TIMI 4. Circulation 1995; 91: 37-47.

21. Belhomme D, Peynet J, Louzy M, Launay JM, Kitakaze M, Menasché P: Evidence for preconditioning by isoflurane in coronary artery bypass graft surgery. Circulation 1999; 100:340-4

22. Kersten JR, Gross GJ, Pagel PS, Warltier DC: Activation of adenosintriphosphate-regulated potassium channels. ANESTHESIOLOGY 1998; 88: 495-513

23. Pain T, Yang XM, Critz SD, Yue Y, Nakano A, Liu GS, Heusch G, Cohen MV, Downey JM: Opening of mitochondrial K_{ATP} channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. Circ Res 2000; 87:460-6

24. McPherson BC, Yao Z: Signal transduction of opiod-induced cardioprotection in ischemia-reperfusion. ANESTHESIOLOGY 2001; 94:1082-8

25. Maxwell MP, Hearse DJ, Yellon DM. Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischemia: a critical determination of the rate of evolution and extend of myocardial infarction. Cardiovasc Res 1987; 21(10):737-746.

26.Müllenheim J, Fräßdorf J, Preckel B, Thämer V, Schlack W: Ketamine but not S(+)-ketamine blocks ischemic preconditioning in rabbit hearts in vivo. ANESTHESIOLOGY 2001; 94:630-6

27. Armstrong GG, Porter H, Langston JB: Alteration of carotid occlusion response by anesthesia. Am J Physiol 1961; 201:897-900

28. Gross GJ, Fryer RM: Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels and myocardial preconditioning. Circ Res 1999; 84:973-9

29. 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

30. Garlid KD: Opening mitochondrial K_{ATP} in the heart-what happens, and what does not happen. Bas Res Cardiol 2000; 95:275-9

31. Das DK, Engelman RM, Maulik N: Oxygen free radical signaling in ischemic preconditioning. Ann NY Acad Sci 1999; 874:49-65

32. Baines CP, Goto M, Downey JM: Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. J Mol Cell Cardiol 1997; 29:207-16

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. Tanaka M, Fujiwara H, Yamasaki K, Sasayama S: Superoxide dismutase and N-2-mercaptopropionyl glycine attenuate infarct size limitation effect of ischaemic preconditioning in the rabbit. Cardiovasc Res 1994; 28:980-6

35. Cohen MV, Yang XM, Downey JM: Smaller infarct after preconditioning does not predict extent of early functional improvement of reperfused heart. Am J Physiol 1999; 277: H1754-61

36. Duranteau J, Chandel NS, Kulisz A, Shao Z, Schumacker PT: Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. J Biol Chem 1998; 273:11619-24

37. Kowaltowski AJ, Seetharaman S, Paucek P, Garlid KD: Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K^+ channel of heart mitochondria. Am J Physiol 2001; 280:H649-57

38. Forbes RA, Steenbergen C, Murphy E: Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. Circ Res 2001; 88:802-9

39. Gopalakrishna R, Anderson WB: Ca^{2+}- and phospholipid-independent activation of protein kinase C by selective oxidative modification of the regulatory domain. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86:6758-62

40. Baines CP, Cohen MV, Downey JM: Signal transduction in ischemic preconditioning: The role of kinases and mitochondrial K_{ATP} channels. J Cardiovasc Electrophysiol 1999; 10:741-54

41. 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: 159-167.

42. Ytrehus K, Liu Y, Tschida A, Miura T, Liu GS, Yang X-M, 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- H 2390.

43. Deutsch E, Berger M, Kussmaul WG, Hirshfeld J, Jr., Herrmann HC, Laskey WK: Adaption to ischemia during percutaneous transluminal coronary angioplasty. Clinical, hemodynamic, and metabolic features. Circulation 1990, 82: 2044-2051.

44. Novalija, E., Fujita, S., Kampine, J. P., and Stowe, D. F. Sevoflurane mimics ischemic preconditioning effects on coronary flow and nitric oxide release in isolated hearts. Anesthesiology 91; 701-712. 1999.

45. Stefan G. De Hert, Stefanie Cromheecke, Pieter W. ten Broecke, Els Mertens, Ivo G. De Blier, Bernard A. Stockman, Inez E. Rodrigus, Philippe J. Van der Linden Effects of Propofol, Desflurane, and Sevoflurane on Recovery of Myocardial Function after Coronary Surgery in Elderly High-risk Patients Anesthesiology 99(2): 314-323; Aug 2003.

46. Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB: Preconditioning the human myocardium. Lancet 1993; 342: 276-7

47. Chien GL, Wolff RA, Davis RF, van WD: “Normothermic range” temperature affects myocardial infarct size. Cardiovasc.Res. 1994;28:1014-1017

48. Harvey RC, Walker MJ: Special considerations for anesthesia in research animals. In: Short CE (ed): Principles and Practice of Veterinary Anesthesia. Baltimore, Williams and Wilkins, 1987, pp 380-392

49. Rath DP, Little CM, Zhang H, Jiang Z, Abduljalil AM, Zhu H, Tong X, Brown C,Hamlin RL, Robitaille PM: Sodium pentobarbital versus alpha-chloraloseanesthesia. Experimental production of substantially different slopes in thetransmural CP/ATP ratios within the left ventricle of the canine myocardium.Circulation 1995;91:471-475

50. Bardaji A, Cinca J, Worner F, Schoenenberger A: Effects of anaesthesia on acuteischaemic arrhythmias and epicardial electrograms in the pig heart in situ.Circulation Research 1990;24:227-231

51. Chakrabarty S, Thomas P, Sheridan DJ: Arrhythmias, haemodynamic changesand extent of myocardial damage during coronary ligation in rabbits anaesthetizedwith halothane, alpha-chloralose or pentobarbitone. Int.J.Cardiol. 1991;31:9-14

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Schlack für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung und kritische Begleitung während der Durchführung der Studie. Mein Dank gilt auch Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Thämer für die Möglichkeit, einen Teil der Studie in seinen Laboren durchzuführen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Jost Müllenheim, Herrn Dr. med Dirk Ebel, Herrn Dr. med. Jan Fräßdorf und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Benedikt Preckel danke ich für ihre Hilfe, ihre exzellente Betreuung und ihre Ausdauer, meine häufigen Fragen zu beantworten.

Nicht unerwähnt bleiben soll die Mitarbeit meiner Mitdoktoranden, mein besonderer Dank für seine Mitarbeit gilt Herrn Dr. med. Frank Höterkes.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei all denen bedanken, die mir geholfen haben, die Ergebnisse zu Papier zu bringen.

Name:	**Ragnar Huhn**
Geburt:	11.01.1975 in Düsseldorf
Familienstand:	ledig
Nationalität:	deutsch

Schulbildung:

1981-1985	Grundschule, Düsseldorf
1985-1994	Leibniz-Gymnasium, Düsseldorf
	Abschluss Allgemeine Hochschulreife

Studium:

1996-2005	Studium der Humanmedizin an der
	Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
Juni 2005	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr:

1. Tertial	Klinik für Allgemeine Chirurgie, Uniklinik Düsseldorf
2. Tertial	Klinik für Anästhesiologie, Uniklinik Düsseldorf
3. Tertial	Zentrum für Innere Medizin, Uniklinik Düsseldorf

Berufliche Tätigkeiten:

Seit Juni 2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter
	Klinik für Anästhesiologie, Uniklinik Düsseldorf

ZUSAMMENFASSUNG

Isofluran präkonditioniert das Myokard über die Freisetzung von freien Radikalen

Fragestellung: Die Gabe des volatilen Anästhetikums Isofluran führt zu kardioprotektiven Effekten, ähnlich denen der ischämischen Präkonditionierung (PC). Radikalfreisetzung spielt eine wichtige Rolle als Trigger der PC. Untersucht wurde, ob die Radikalfreisetzung wesentlich für die durch Isofluran induzierte Präkonditionierung ist.

Methodik: 61, mit α-Chloralose anästhesierten Kaninchen, wurden zur Messung des linksventrikulären Drucks (LVD, Katheterspitzenmanometer), des Herzzeitvolumens (HZV, Ultraschallflussmesskopf) und der Infarktgröße (Tetrazoliumfärbung) instrumentiert. Alle Kaninchen wurden einer 30 min regionalen Myokardischämie und einer 120 min Reperfusion unterzogen (I/R). Die Kaninchen aller 6 Gruppen wurden vor der Ischämie einer 35 minütigen Behandlungsphase unterzogen. Die Kontroll-Gruppe (KON, n=11) wurde nicht präkonditioniert. Tiere der Isofluran-Gruppe (ISO, n=12) erhielten über 15 Minuten Isofluran (2 Vol% = 1 MAC endtidale Konzentration), gefolgt von einer 10-minütigen Auswaschphase. Die anderen 4 Gruppen erhielten während der Behandlungsphase entweder den Radikalfänger N-(2-mercaptoproprionyl)glycin (MPG, 1 mg kg^{-1} min^{-1}) oder Mn(III)tetrakis(4-Benzoesäure)porphyrin chlorid (MnTBAP, 100 µg kg^{-1} min^{-1}), sowohl in Kombination mit Isofluran (Isofluran+MPG, n=11; Isofluran+MnTBAP, n=9), als auch ohne Isofluran (MPG, n=11; MnTBAP, n=7).

Ergebnisse: Die hämodynamischen Ausgangswerte unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen [LVD 97±17 mmHg (MW±SD); HZV 228±61 ml/min]. Während der Okklusion sank der LVD auf 91±17% des Ausgangswertes und das HZV auf 94±21%. Nach 120 Minuten Reperfusion unterschieden sich weder LVD noch HZV zwischen den Gruppen. (LVD 83±20%; HZV 86±23% des Ausgangswertes). Die Infarktgröße wurde von 49±17% des Risikogebietes in der Kontroll-Gruppe auf 29±19% in der Isofluran-Gruppe (P=0.04) reduziert. MPG und MnTBAP alleine hatten keinen Effekt auf die Infarktgröße (MPG 50±14%; MnTBAP 56±15%), blockierten aber den durch Isofluan bewirkten Präkonditionierungseffekt (Isofluran+MPG 50±24%, P=0.02 vs. ISO; Isofluran+MnTBAP 55±10%, P=0.001 vs. ISO).

Interpretation: Die Freisetzung von freien Radikalen ist ein entscheidender Schritt in der Signaltransduktionskette der Isofluran-induzierten Präkonditionierung.

Gesehen und genehmigt

Prof. Dr. med. Wolfgang Schlack, DEAA