

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Benedikt Pannen

**Desfluran-Präkonditionierung am normo- und hyperglykämien
Rattenherzen *in vivo*
- Rolle der mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK, JNK und p38 -**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Christine Goletz

2016

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Benedikt Preckel

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Stefan A. Topp

Für meine Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Publikation:

Weber NC, Goletz C, Huhn R, Grueber Y, Preckel B, Schlack W, Ebel D

Blockade of anaesthetic-induced preconditioning in the hyperglycaemic myocardium: the regulation of different mitogen-activated protein kinases.

Eur J Pharmacol 2008;592(1-3):48-54

Poster/Abstract:

Christine Goletz, Nina C. Weber, Dirk Ebel, Benedikt Preckel, Wolfgang Schlack

Spielt die p38 MAPK eine Rolle in der Desfluran-vermittelten Präkonditionierung während Hyperglykämie?

Deutscher Anästhesie Kongress (DAC) 2006, Leipzig

Zusammenfassung

Präkonditionierung (PC) mit volatilen Anästhetika führt zu einer Myokardprotektion gegen nachfolgende Ischämien und kann durch Hyperglykämie blockiert werden. Verschiedene Substrate, unter anderem mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK), sind an der zellulären Signaltransduktion der Protektion beteiligt, wurden jedoch noch nicht bezüglich ihrer Rolle während hyperglykämischer Stoffwechsellaage untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob die Desfluran-Präkonditionierung (DesPC) durch akute Hyperglykämie am Rattenmodell *in vivo* blockiert wird. Zudem sollte untersucht werden, in welcher Phase eine mögliche Blockade stattfindet und ob die MAPK ERK, JNK und p38 während einer früh induzierten Hyperglykämie unter DesPC unterschiedlich reguliert werden. Hierzu wurde bei Ratten *in vivo* eine temporäre regionale Myokardischämie induziert und die resultierende Infarktgröße nach unterschiedlicher Vorbehandlung der Herzen verglichen. Es zeigte sich nach DesPC (2x5 min., 1 minimale alveoläre Konzentration) eine signifikante Infarktgrößenreduktion, welche sowohl durch früh (vor der Ischämie) als auch spät (während der Ischämie) induzierte Hyperglykämie (Glukoselösung 50%, Blutzucker 500-600 mg/dl) vollständig aufgehoben wurde. Um die molekularen Mechanismen und die Beteiligung der MAPK ERK, JNK und p38 zu entschlüsseln, wurden Herzen der Gruppen DesPC, FH (frühe Hyperglykämie) und FH+DesPC zusätzlich mittels Western Blot untersucht. Hierbei zeigten alle MAPK ein ähnliches Phosphorylierungsmuster im Zeitverlauf der jeweiligen Gruppen. Eine Zunahme der Phosphorylierung der MAPK war im hyperglykämischen Myokard zu ausgewählten Zeitpunkten nachweisbar.

Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal, dass Hyperglykämie in der Lage ist die Präkonditionierung durch Desfluran aufzuheben und dass diese Blockade in der Mediatorphase oder in der Trigger- und Mediatorphase der Präkonditionierung stattfindet. Die Enzyme ERK, JNK und p38 scheinen innerhalb des untersuchten Abschnittes des Signalweges nur bedingt an der Blockade beteiligt zu sein.

Abkürzungsverzeichnis

A

(m)A	(milli)Ampere
AKT	Proteinkinase B
AMI	akute(r) Myokardinfarkt
(c)AMP	(zyklisches) Adenosinmonophosphat
APC	Anästhetika-induzierte Präkonditionierung
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest	destilliertes Wasser (<i>Aqua destillata</i>)
ASK	Apoptose-Signal-regulierende Kinase
ATP	Adenosintriphosphat

B

BSA	bovines Serumalbumin
-----	----------------------

C

Ca ²⁺	Calcium
------------------	---------

D

DAG	Diacylglycerol
Des	Desfluran
DesPC	Desfluran-Präkonditionierung
DM	Diabetes mellitus
DTT	Dithiothreitol

E

ECL	Chemilumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>)
Elk-1	E 26-ähnlicher Transkriptionsfaktor 1 (<i>E 26-like transcription factor 1</i>)
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extrazellulär-regulierte Kinase

F

FH	frühe Hyperglykämie
FH+DesPC	frühe Hyperglykämie und Desfluran-Präkonditionierung

G

g	Zentrifugalbeschleunigung, Vielfaches der Erdbeschleunigung
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein

H

HbA1c	Glykohämoglobin, glykiertes Hämoglobin
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HSP27/90	Hitzeschockprotein (<i>heatshock protein</i>) 27/90

I

IL-1	Interleukin-1
IPC	ischämische Präkonditionierung
IP 3	Inositoltrisphosphat

J

JNK c-Jun-N-terminale Kinase

K $K_{ATP/Ca}$ Adenosintriphosphat/Calcium-abhängiger Kaliumkanal

kDa Kilodalton

KHK koronare Herzkrankheit

Kon Kontrolle/Kontrollgruppe

M

(m)M (milli)Molar, molare Masse

MAC minimale alveoläre Konzentration

MAPK mitogen-aktivierte Proteinkinase(n)

MAPKAP mitogen-aktivierte-proteinkinase-aktivierte Proteinkinase

MEK MAPK/ERK Kinase

min. Minute(n)

mito mitochondriale/Mitochondrium

MKK/MKKK MAP Kinase Kinase/MAP Kinase Kinase Kinase

N

n Anzahl (der Versuchstiere)

NaCl 0,9% physiologische Kochsalzlösung

NF- κ B Nukleärer Faktor '*kappa-light-chain-enhancer*'

(e)NO(S) (endotheliale) Stickstoffmonoxid (Synthase)

P

P Phosphat

P1 Zytosolfraktion

P2 Membranfraktion

P3 Kernfraktion

p38 p38 MAPK

PAA Polyacrylamid

pCO₂ Kohlendioxidpartialdruck

(T)PBS Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (mit Tween)

PC Präkonditionierung

PDK-1 3-Phosphoinositol-abhängige Kinase 1

PEEP positiver endexpiratorischer Druck

Pim-1-K proto-onkogene Serin/Threonin-Proteinkinase Pim-1

PIP2 Phosphatidylinositolbisphosphat

PI₃K Phosphatidylinositol-3-Kinase

PL(C/D) Phospholipase (C/D)

PK(A/C) Proteinkinase (A/C)

mPTP mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore

RRaf *Rapid accelerating fibrosarcoma*

RezG G-Protein gekoppelter Rezeptor

RIVA *Ramus interventrikularis anterior*

ROS freie Sauerstoffradikale

S

SAPK stress-aktivierte Proteinkinase (= JNK)

SD	Standardabweichung
SDS(-PAGE)	Sodiumdodecylsulfat(-Polyacrylamidgelelektrophorese)
SH	späte Hyperglykämie
SH+DesPC	späte Hyperglykämie und Desfluran-Präkonditionierung
SIRS	entzündliche Systemreaktion (<i>systemic inflammatory response syndrome</i>)
T	
Tabl.	Tablette
Temed	Tetramethylethylendiamin
TK	Tyrosinkinase
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TPA	<i>Tumor Promoting Agent</i>
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
TTC	Triphenyltetrazoliumhydrochlorid
U	
UV	ultraviolett

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abkürzungsverzeichnis	II
Inhaltsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 Koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt, Diabetes mellitus und Hyperglykämie	2
1.1.1 Koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt	2
1.1.2 Diabetes mellitus und Hyperglykämie	3
1.1.3 Gestörte Glukosetoleranz und KHK	3
1.1.4 Stresshyperglykämie	4
1.1.5 Pathophysiologie - Ischämie und Reperfusion	5
1.2 Präkonditionierung	7
1.2.1 Ischämische Präkonditionierung	8
1.2.2 Pharmakologische Präkonditionierung	9
1.2.3 Präkonditionierung mit Desfluran	10
1.2.4 Blockade der Präkonditionierung durch Hyperglykämie und Diabetes mellitus	11
1.3 Klinische Relevanz	11
1.4 Signalkaskade und molekulare Mechanismen	13
1.4.1 Aktivierung	14
1.4.2 Proteinkinase C und B	15
1.4.3 mitogen-aktivierte Proteinkinasen	16
1.4.4 Weitere Substrate	21
1.5 Fragestellung	23
2. Material und Methoden	24
2.1 Präparation	25
2.2 Infarktgrößenbestimmung	26
2.2.1 Experimentelles Protokoll	26
2.2.2 Infarktgrößenbestimmung durch Färbung	29
2.3 Western Blot-Analyse	30
2.3.1 Experimentelles Protokoll	30
2.3.2 Probenaufarbeitung für den Western Blot	32
2.3.3 Proteinbestimmung nach Lowry	34
2.3.4 Verdünnung der Proben	35
2.3.5 Herstellung der Gele	35
2.3.6 Lösungen und Material für Elektrophorese und Transfer	37
2.3.7 Elektrophorese	38
2.3.8 Transfer	38
2.3.9 Gel-Kontrolle	39

2.3.10	Blocken der Membran	39
2.3.11	Material: Antikörper und Detektion.....	39
2.3.12	Inkubation mit Antikörpern	40
2.3.13	Detektion.....	41
2.3.14	Auswertung.....	41
2.3.15	Datenanalyse und Statistik	41
3.	Ergebnisse.....	42
3.1	Blutglukosekonzentration.....	43
3.2	Hämodynamik.....	44
3.3	Infarktgröße	45
3.4	Molekularbiologie.....	46
3.4.1	Phosphorylierung der ERK 1/2	46
3.4.2	Phosphorylierung der JNK 1 und 2/3.....	48
3.4.3	Phosphorylierung der p38 MAPK.....	50
4.	Diskussion	51
4.1	Blockade der Desfluran-Präkonditionierung durch Hyperglykämie während der Mediatorphase	53
4.2	Rolle der MAPK	53
4.2.1	ERK.....	54
4.2.2	JNK	55
4.2.3	p38	56
4.3	Methodenkritik	57
4.4	Translationelle Aspekte	62
4.5	Ausblick	64
4.6	Schlussfolgerung	65
5.	Literaturverzeichnis	66
6.	Anhang	79
6.1	Summenformeln	80
6.2	Abbildungsverzeichnis	81
	Danksagung	82
	Eidesstattliche Versicherung	82

1. Einleitung

1.1 Koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt, Diabetes mellitus und Hyperglykämie

In unserer Bevölkerung steigt der Anteil älterer Menschen stetig an - und damit auch die Rate an altersbedingten Erkrankungen. Immer mehr Patienten leiden unter Bluthochdruck, koronarer Herzkrankheit und Diabetes mellitus. Bestehen diese Vorerkrankungen, steigt für den betroffenen Patienten das Risiko einen akuten Myokardinfarkt zu erleiden. Unter anderem sind Chirurgen und Anästhesisten mit dieser Entwicklung konfrontiert und müssen verstärkt darauf achten, das Risiko kardiovaskulärer Komplikationen während einer Operation so weit wie möglich zu reduzieren.

1.1.1 Koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt

Jedes Jahr versterben in Deutschland etwa 350.000 Menschen an Herz-Kreislaufkrankungen, zu denen die koronare Herzkrankheit (KHK) und der akute Myokardinfarkt (AMI) gezählt werden¹. Die KHK ist charakterisiert durch atherosklerotische Veränderungen der Herzkranzarterien, die im fortgeschrittenen Stadium zu einer regionalen Minderperfusion der durch die betroffene Koronararterie versorgten Myokardabschnitte führen. Durch diese flusslimitierenden Koronarstenosen kommt es zur Koronarinsuffizienz, das heißt zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf des Herzens und in Folge dessen zu einer Myokardischämie. Klinisch kann sich die KHK als Angina pectoris, Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörung oder als lebensbedrohliches Akutes Koronarsyndrom (instabile Angina pectoris, akuter Myokardinfarkt, plötzlicher Herztod) manifestieren. Laut Todesursachenstatistik für das Jahr 2012 macht die KHK 14,7% aller Todesfälle aus und ist damit die führende Todesursache in Deutschland. Der akute Myokardinfarkt folgt mit einer Häufigkeit von 6%¹. Im Rahmen des Projektes „MONICA“ der Weltgesundheitsorganisation wurde eine Letalität nach erstem AMI von 51% bei Frauen und 49% bei Männern angegeben². Ein bedeutender Risikofaktor für die Entwicklung einer KHK bei einem Patienten ist unter anderem das Vorliegen eines Diabetes mellitus.

1.1.2 Diabetes mellitus und Hyperglykämie

Der Diabetes mellitus (DM) ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, bei der es infolge eines absoluten oder relativen Insulinmangels zu erhöhten Blutglukosekonzentrationen kommt. Per Definition bedeutet dies, dass der Anteil glykierten (mit Glukose gekoppelten) Hämoglobins (HbA1c-Wert) $\geq 6,5\%$ liegt oder ein Blutzuckerwert bei nüchternen Patienten ≥ 126 mg/dl bzw. bei nicht nüchternen Patienten mit klassischen Symptomen ≥ 200 mg/dl oder im oralen Glukosetoleranztest von ≥ 200 mg/dl nach 2 Stunden vorliegt³. Etwa 90% der Diabetiker weisen einen Diabetes mellitus Typ 2 auf⁴, welcher durch einen relativen Insulinmangel (bedingt durch Insulinresistenz und Insulinsekretionsstörung) charakterisiert ist. Etwa 5-10% leiden unter einem juvenilen Diabetes mellitus Typ 1⁴ und damit unter einem absoluten Insulinmangel. Weitere Formen, zum Beispiel genetisch bedingte Veränderungen oder der schwangerschaftsinduzierte Diabetes mellitus, treten deutlich seltener auf⁴.

Nach Schätzungen der Internationalen Diabetesvereinigung (*International Diabetes Federation*) lag der Anteil der an Diabetes mellitus erkrankten deutschen Erwachsenen im Jahr 2013 bei rund 12%⁵. Zusätzlich wurde bei etwa 9% der Deutschen eine verminderte Glukosetoleranz vermutet⁵. Eine Untersuchung in Süddeutschland hat sogar eine DM Prävalenz von 17% bei Erwachsenen zwischen 55 und 74 Jahren ermittelt. In der Hälfte der Fälle wurde der DM jedoch erst im Rahmen der Studie diagnostiziert. Zusätzlich hatten 23% der Untersuchten eine verminderte Glukosetoleranz oder erhöhte Nüchternblutzuckerwerte⁶.

Hyperglykämien (Blutzuckerwerte ≥ 120 mg/dl oder $\geq 6,67$ mmol/l) kommen im Rahmen von Stoffwechselentgleisungen bei Diabetikern vor, aber auch während Operationen, Infektionen und in anderen Stresssituationen. Über das physiologische Maß erhöhte Blutzuckerwerte verschlechtern bei hospitalisierten Patienten das *Outcome*: Diese Patienten haben im Vergleich zu normoglykämien Patienten oder bereits bekannten Diabetikern ein vielfach höheres Risiko, im Krankenhaus zu versterben, müssen häufiger intensivmedizinisch behandelt werden und haben im Durchschnitt eine längere Krankenhausverweildauer⁷.

1.1.3 Gestörte Glukosetoleranz und KHK

Verschiedene Arbeiten konnten unabhängig von anderen Risikofaktoren ein dosisabhängiges Verhältnis zwischen Glukoseintoleranz und KHK Inzidenz, KHK Mortalität und Gesamtmortalität zeigen⁸⁻¹²: Je höher der Nüchtern- und postprandiale

Blutzuckerwert ist, desto höher ist das Risiko, an einer KHK oder einem Myokardinfarkt zu erkranken oder zu versterben. Das gilt auch im normoglykämischen Bereich^{13,14}. Grund dafür scheint zu sein, dass eine akute Hyperglykämie bei Patienten mit Risikofaktoren für Arteriosklerose eine mikrovaskuläre Dysfunktion an den Koronarien, die gesteigerte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (oxidativer Stress) und eine erhöhte sympathische Aktivierung mit möglicher koronarer Vasokonstriktion auslöst¹⁷. Die im Rahmen eines Krankenhausaufenthaltes neu entdeckten Hyperglykämien sind mit einem schlechteren funktionellen und klinischen *Outcome* (längere Krankenhausverweildauer, häufigere intensivmedizinische Behandlung, weniger direkte Entlassungen ins häusliche Umfeld) und signifikant höheren Mortalitätsraten bei Patienten mit und ohne Diabetes mellitus in der Vorgeschichte assoziiert⁷: für diese Patientengruppe besteht ein 18,3-faches Risiko zu sterben, im Gegensatz zu einem 2,7-fachen Risiko bei bereits bekanntem DM⁷. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren (höhere Werte für *Body Mass Index*, Hüftumfang, systolischen Blutdruck, Triglyceridwert) bei Patienten mit neu diagnostiziertem DM⁶ oder verminderter Glukosetoleranz⁸ häufiger vorkamen als bei Patienten mit normaler Glukosetoleranz.

Umgekehrt liegt bei 59% aller KHK Patienten eine gestörte Glukosetoleranz oder ein DM vor¹⁵. Auch der Schweregrad der KHK zeigt eine Assoziation zur Häufigkeit der verminderten Glukosetoleranz: Patienten mit stark ausgeprägter KHK haben gleichzeitig öfter eine verminderte Glukosetoleranz oder einen Diabetes mellitus als Patienten mit weniger stark ausgeprägter KHK^{15,16}. Drechsler und Kollegen haben in einer Untersuchung bei KHK Patienten in Deutschland festgestellt, dass der DM bei diesen Patienten häufig unerkannt bleibt. So zeigte sich bei mehr als einem Drittel der untersuchten KHK Patienten ohne bereits diagnostiziertem DM eine verminderte Glukosetoleranz im oralen Glukosetoleranztest¹⁸.

1.1.4 Stresshyperglykämie

Unter Stresshyperglykämie wird die vorübergehende Blutzuckererhöhung in Stresssituationen verstanden.

Der Körper reguliert die Blutglukosekonzentration über verschiedene Mechanismen: hormonell, neuronal und über hepatische Autoregulation¹⁹. Durch akute Stresssituationen, zum Beispiel beim akuten Myokardinfarkt, im Rahmen von Operationen oder bei kritisch kranken Patienten¹⁹ kommt es über die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren Achse zu Hyperglykämien. Diese resultieren vor allem aus vermehrter Glukoseproduktion durch gesteigerte Glykogenolyse,

Lipolyse und Glukoneogenese und Resistenz der Insulin-vermittelten Glukoseaufnahme in der Muskulatur¹⁹.

In verschiedenen Untersuchungen bei Patienten mit AMI konnte gezeigt werden, dass sowohl bei Diabetikern als auch bei Nicht-Diabetikern der Blutzuckerwert bei Krankenhausaufnahme des Patienten einen unabhängigen Risikofaktor für die Langzeitmortalität²⁰⁻²⁶ und für das Verbleiben größerer Infarktareale²⁷ darstellt. Stresshyperglykämie ist mit einem erhöhten Mortalitäts-Risiko im Krankenhaus assoziiert²⁸⁻³¹. Auch bei Nicht-Diabetikern steigt durch Stresshyperglykämie das Risiko eines Herzversagens³¹, schwerer Arrhythmien²⁹ oder eines kardiogenen Schocks^{31,32}. Die Messung des Nüchternblutzuckers und die Messung des Blutzuckers nach zwei Stunden während eines oralen Glukosetoleranztestes können bei Patienten mit AMI nützlich sein, um Betroffene mit einem hohen Risiko für die Entwicklung eines DM frühzeitig zu identifizieren³³. Bei Nicht-Diabetikern stellt die Höhe des Nüchternblutzuckers einen unabhängigen Risikofaktor für die Mortalität innerhalb von 30 Tagen nach AMI dar³⁴. Die Behandlung der Hyperglykämie mit Insulin, ob bei Diabetikern oder Nicht-Diabetikern, reduziert Morbidität und Mortalität auch bei kritisch kranken Patienten³⁵.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Hyperglykämien auch bei Patienten ohne Diabetes mellitus in der Klinik sehr häufig vorkommen und das Risiko für Morbidität und Mortalität der Patienten signifikant steigern. Ein Erklärungsansatz für dieses Phänomen könnte die Blockade endogener Protektionsmechanismen durch Hyperglykämie und DM sein. In der vorliegenden Arbeit wurde nach molekularbiologischen Ursachen dieser nachteiligen Wirkung auf Ebene der mitogen-aktivierten Proteinkinasen gesucht.

1.1.5 Pathophysiologie - Ischämie und Reperfusion

Eine Ischämie entsteht infolge eines insuffizienten lokalen (arteriellen) Blutflusses, der dazu führt, dass gemessen am Energiebedarf einer Zelle, eines Zellverbandes, Gewebes oder Organs eine unzureichende Versorgung mit essentiellen Stoffen wie Sauerstoff (Hypoxie) entsteht^{36,37}. Infolge dessen verändert sich der intrazelluläre Metabolismus und die Struktur der Zellen: Die Energiegewinnung aus anaerober Glykolyse führt zu vermehrtem Anfall von Laktat³⁶ und zu einem Mangel an Glykogen und energiereichen Phosphaten wie Adenosintriphosphat (ATP)³⁷. Im hypoxischen Gewebe entsteht eine Veränderung des Membranpotentials und der Ionenverteilung und es kommt zum Anschwellen (Ödem) der Zellen³⁸. Am Endothel wird die Bildung

proinflammatorischer Genprodukte (z.B. Zytokine, Leukozyten-Adhäsionsmoleküle) begünstigt, während die Bildung anderer Produkte (z.B. der Stickstoffmonoxid Synthese, NOS) unterdrückt wird³⁸. Insgesamt befindet sich das Gewebe ischämiebedingt in einem entzündlich veränderten, vulnerablen Zustand^{37,38}. Wird die Ischämietoleranz des entsprechenden Gewebes überschritten, kommt es in der Folge zur Nekrose, das heißt zum Zelltod und Untergang des betroffenen Gewebes. Kann jedoch eine baldige Reperfusion (Wiederherstellung des Blutflusses) des Risikogebietes erreicht werden, wird oft ein Teil des betroffenen Gewebes in seiner Funktion erhalten. Die Reperfusion kann allerdings auch die durch die Ischämie bedingten schädliche Reaktionen an den Endothelzellen aggravieren und einen zusätzlichen Zellverlust hervorrufen, den so genannten Reperfusionsschaden³⁹. Dieser ist definiert als die Konversion reversibel geschädigter Zellen hin zu irreversiblen metabolischen, funktionellen und strukturellen Zellveränderungen nach Wiederherstellung des Blutflusses, induziert durch die Reperfusion³⁷. Das während der Ischämie exzessiv produzierte Xanthin und Hypoxanthin wird während der Reperfusion in freie Sauerstoffradikale umgewandelt³⁷, welche zum einen Proteine (z.B. der Zellmembran) direkt schädigen, zum anderen die Aktivierung und Chemotaxis neutrophiler Granulozyten verstärken^{40,41}. Die verminderte Freisetzung und der daraus folgende Mangel an Stickstoffmonoxid (NO) begünstigt die endotheliale Plättchenadhäsion und führt zu einer gesteigerten mikrovaskulären Permeabilität³⁷. Die an den Endothelzellen vermehrt exprimierten Adhäsionsmoleküle ermöglichen die transendotheliale Einwanderung von Granulozyten. Diesen wird eine zentrale Rolle bei der Entstehung des Reperfusionsschadens zuteil: die neutrophilen Granulozyten erzeugen eine Entzündungsreaktion⁴² durch die Freisetzung von Arachidonsäure und deren Metabolisierung zu Leukotrienen sowie weiteren Botenstoffen, die Freisetzung weiterer Sauerstoffradikale und proteolytischer lysosomaler Enzyme⁴³. Hierdurch akkumulieren wiederum weitere neutrophile Granulozyten in diesem Gebiet. Es resultiert schließlich eine mikrovaskuläre Dysfunktion mit - durch erhöhte Endotheldurchlässigkeit bedingter - Ödembildung, steigendem Gewebedruck und Schäden an Zellmembran, Zytoskelett und Zellorganellen³⁸. Die folgende Abbildung stellt die komplexe Entwicklung des Reperfusionsschadens vereinfacht schematisch dar.

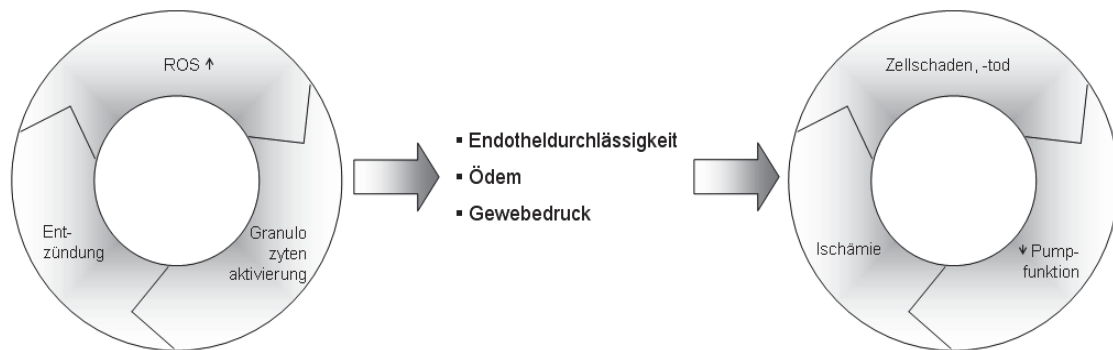


Abb. 1.1: **Entwicklung des Reperfusionsschadens bis hin zum Herzversagen.** Die Bildung freier Sauerstoffradikale (ROS) verstärkt die Granulozytenaktivierung und den Entzündungsprozess, der schließlich eine gesteigerte Endotheldurchlässigkeit, Ödembildung und erhöhten Gewebedruck hervorruft. Dies wiederum verursacht eine Ischämie, die in Zellschädigung und Zelltod resultiert, was wiederum eine Reduktion der Pumpfunktion hervorruft und erneut in Ischämie und Zellschädigung resultiert.

Verschiedenste Ursachen können eine Ischämie bedingen, am häufigsten dafür verantwortlich sind Stenosen aufgrund einer veränderten Morphologie der Blutgefäße (Vasokonstriktion bei Kreislaufzentralisation, Atherosklerose, arterieller Gefäßverschluss). Des Weiteren entstehen Gefäßverschlüsse im Rahmen von Embolien, Thrombosen oder Dissektionen.

Am Herzen gehen häufig atherosklerotische Veränderungen der Koronargefäße einer Stenose voraus. Akute Myokardischämien führen am menschlichen Herzen oft zu verhängnisvollen Folgen, da unter physiologischen Verhältnissen keine Kollateralen zwischen den Herzkranzgefäßen bestehen. Das Herzmuskelgewebe jenseits der koronaren Stenose wird vermindert mit Sauerstoff versorgt, es kommt zur Koronarinsuffizienz. Kann dieses ischämische Risikogebiet nicht zügig reperfundiert werden, entwickelt sich eine Nekrose und Narbengewebe, welches zu Wandbewegungsstörungen und Abnahme der ventrikulären Funktion und damit zu Herzinsuffizienz und Herzrhythmusstörungen führen kann. Ein AMI ohne Reperfusion verursacht also einen enormen zellulären Schaden. Ein Infarkt mit Reperfusion hingegen führt zu deutlicher Reduktion der Infarktgröße, hinterlässt jedoch den Reperfusionsschaden. Dieser scheint umso ausgeprägter zu sein, wenn Risikofaktoren für die Entstehung einer kardiovaskulären Erkrankung, wie Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und arterielle Hypertension vorliegen⁴⁴.

1.2 Präkonditionierung

Endogene kardioprotektive Mechanismen können durch bestimmte Interventionen verstärkt werden und das Herz während einer Ischämie (zum Beispiel während eines

Herzinfarktes) schützen. Die Durchführung solcher Interventionen bewirkt eine Konditionierung und führt zur Prävention von Ischämie-Reperfusions-Schäden auf zellulärer Ebene. Dieser Schutz kann in verschiedenen Phasen induziert werden: vor (frühe und späte Präkonditionierung⁴⁵) und nach der Ischämie (Postkonditionierung⁴⁶) und kann durch verschiedene Stimuli hervorgerufen werden. Ischämische Episoden (zum Beispiel während einer Angina pectoris) sind der stärkste endogene Schutzmechanismus, aber auch andere Methoden, wie die Applikation pharmakologischer Substanzen, zum Beispiel volatiler Anästhetika, bewirken auf diese Weise eine Kardioprotektion.

In der Signalkaskade der Präkonditionierung unterscheidet man Trigger und Mediatoren⁴⁵. Trigger- und Mediatorphase sind durch die infarktbedingende Ischämie (Indexischämie) voneinander getrennt. Trigger sind als Stimuli zu sehen, die die Präkonditionierung (und damit den schützenden Mechanismus gegen einen Infarkt) initiieren. Als Mediatoren werden die in den Signalweg involvierten Effektoren bezeichnet, die nach der Indexischämie den weiteren Protektionsmechanismus vermitteln.

1.2.1 Ischämische Präkonditionierung

Charles E. Murry und seine Kollegen veröffentlichten 1986 die erste Arbeit, die zeigte, dass eine ischämische Präkonditionierung (IPC) bei Hunden zu einer Infarktgrößenreduktion von 25% führte. Das durch die *Arteria circumflexa* versorgte Gewebe wurden dazu vier Mal für je fünf Minuten einer Ischämie unterzogen (präkonditioniert), jeweils gefolgt von fünf Minuten Auswaschphase. Die nachfolgende Ischämiephase betrug 40 Minuten⁴⁷. Kurze Ischämien schienen das Herz also gegen nachfolgende länger andauernde Ischämien zu schützen^{48,49}. Auch weitere protektive Effekte, hervorgerufen durch die ischämische Präkonditionierung, konnten identifiziert werden. So wurden die Arrhythmiefrequenz^{50,51}, das myokardiale *stunning*⁵² und der Zellmetabolismus⁴⁷ positiv beeinflusst.

Zu unterscheiden sind die frühe und die späte Phase der Protektion bei ischämischer Präkonditionierung. Der Schutz durch frühe Präkonditionierung beginnt sofort nach Einsetzen der Ischämie und dauert 2-3 Stunden an⁴⁵. Dieser protektive Effekt wird durch Aktivierung von zum Beispiel mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) vermittelt. Nach einem freien Intervall beginnt mit einer Latenz von 12-24 Stunden die späte Phase der Protektion⁵³⁻⁵⁶. Diese dauert wesentlich länger, bis zu 72 Stunden,

an⁵⁷ und wird insbesondere durch Neusynthese von Proteinen vermittelt⁵⁸. Ein Schema dieses biphasischen Verlaufes ist in Abbildung 1.2 dargestellt.

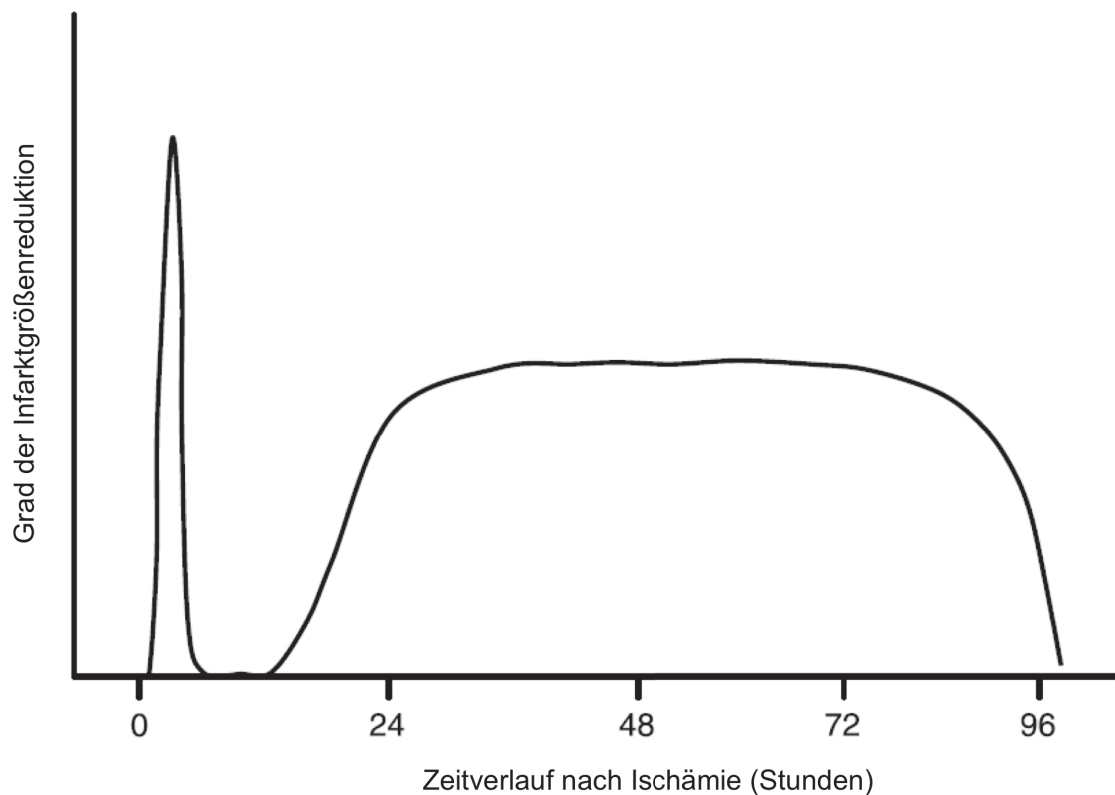


Abb. 1.2: **Schema des biphasischen Verlaufes der Protektion während ischämischer Präkonditionierung.** Der Schutz durch frühe Präkonditionierung setzt unmittelbar nach dem Stimulus ein und hält 2-3 Stunden an. Die späte Phase der Protektion durch Präkonditionierung beginnt 12-24 Stunden nach dem präkonditionierenden Stimulus und hält bis zu 3 Tage an. Dargestellt ist die relative Reduktion der Herzinfarktgröße in % gegenüber unbehandelten Tieren in Abhängigkeit von dem Zeitintervall (Stunden) nach der Ischämie. Modifiziert und mit freundlicher Genehmigung veröffentlicht; basierend auf Yellon DM, Downey JM. *Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. Physiol Rev* 2003;83: 1113-51⁴⁵

1.2.2 Pharmakologische Präkonditionierung

Auch verschiedene Pharmaka, unter anderem volatile Anästhetika, sind in der Lage, als präkonditionierende Stimuli endogene Protektionsmechanismen zu aktivieren. Auf diese so genannte Anästhetika-induzierte Präkonditionierung (APC) geht die vorliegende Arbeit näher ein. Warltier *et al.* demonstrierten bereits 1988 bei mit Halothan oder Isofluran vorbehandelten Hunden eine Verbesserung der myokardialen linksventrikulären Funktion nach Koronarokklusion⁵⁹. Weitere Arbeitsgruppen führten *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen bei Kaninchen bzw. Hunden durch und zeigten unabhängig voneinander eine Kardioprotektion im Sinne einer signifikanten Infarktgrößenreduktion nach Myokardischämie bei Vorbehandlung mit Isofluran⁶⁰⁻⁶²

sowie eine schnellere postischämische Erholung der myokardialen Kontraktilität⁵⁹ und eine Verbesserung der Endothelfunktion⁶³. In den folgenden Jahren wurden viele wissenschaftliche Untersuchungen diesbezüglich durchgeführt. Bisher zeigten sich protektive Effekte für die volatilen Anästhetika Halothan⁶¹, Enfluran⁶¹, Isofluran⁶², Sevofluran⁶⁴, Desfluran⁶⁵ sowie für die Edelgase Helium⁶⁶, Neon⁶⁷, Argon⁶⁷ und Xenon⁶⁸. Auch für die APC ist – ähnlich der IPC – eine frühe und eine späte Phase der Präkonditionierung nachzuweisen⁶⁹. Die Konzentration des volatilen Anästhetikums scheint dabei nicht von wesentlicher Bedeutung zu sein; ausschlaggebend ist viel mehr die Art der Verabreichung: Es konnte gezeigt werden, dass die kontinuierliche Gabe niedrigdosierten Desflurans, über 30 oder 90 Minuten appliziert, keinen Einfluss auf die Infarktgröße ausübt, die wiederholte Verabreichung des Anästhetikums in der gleichen Dosis über jeweils kurze Episoden (3 x 10 Minuten) hingegen eine signifikante Reduktion der Infarktgröße bewirkt⁷⁰.

1.2.3 Präkonditionierung mit Desfluran

Desfluran (Des) gehört zu den volatilen Anästhetika die im klinischen Alltag zur Inhalationsanästhesie eingesetzt werden. Vorteilhafte Eigenschaften sind seine geringe Blut- und Gewebelöslichkeit und niedrige Metabolisierungsrate. Desfluran unterliegt einer sehr schnellen Aufnahme- und Eliminationskinetik und macht äußerst rasche Anpassungen der Narkosetiefe möglich. Nachteile des Anästhetikums sind der sehr niedrige Siedepunkt und der hohe Dampfdruck, die im klinischen Alltag den Einsatz spezieller Verdampfer erfordern. Des Weiteren besitzt Desfluran eine geringe anästhesiologische Potenz und muss deshalb in hohen Konzentrationen im Inspirationsgemisch angeboten werden (1 minimale alveoläre Konzentration, MAC entspricht 6-9 Vol%). Desfluran führt bei wachen Patienten zu einer starken Atemwegsreizung, so dass das Anästhetikum nur nach intravenöser Einleitung der Narkose zur weiteren Aufrechterhaltung der Narkose verwendet wird. Als weiterer möglicherweise relevanter Nachteil sind die kardiovaskulären Eigenschaften des Desflurans zu nennen, da die Verabreichung eine sympathoadrenerge Stimulation (Herzfrequenzanstieg, Vasodilatation mit Abnahme des peripheren Gefäßwiderstandes und Blutdruckabfall) hervorrufen kann.

Mittlerweile konnten viele Studien die präkonditionierenden Effekte von Desfluran nachweisen^{65,70-73}. Bereits 1998 zeigten Schlack und Mitarbeiter am isolierten Rattenherzen, dass Desfluran neben dem Schutz vor dem Reperfusionsschaden, verglichen mit den volatilen Anästhetika Halothan, Enfluran, Isofluran und Sevofluran,

am schnellsten zu funktioneller Erholung des Myokards führt⁷⁴. In *in vivo*-Modellen, bei denen die Wirkung verschiedener volatiler Anästhetika verglichen wurde, zeigte ebenfalls Desfluran die größte Potenz zur Infarktgrößenreduktion^{65,75}.

Um zu verstehen inwiefern die Konzentration des Desflurans und die Art und Dauer der Applikation eine Rolle für den präkonditionierenden Effekt spielen, führten Kehl und Kollegen eine Untersuchung mit verschiedenen minimalen alveolären Konzentrationen (0.5, 1.0, 1.5 MAC Desfluran) durch und verglichen kontinuierliche und repetitive Verabreichung des Anästhetikums und die Dauer der Exposition. Es stellte sich heraus, dass die repetitive Gabe der minimalen Konzentration von 0.5 MAC Desfluran einen gleichwertigen präkonditionierenden Effekt hat wie die (kontinuierliche oder repetitive) Gabe von 1.0 oder 1.5 MAC Desfluran. Eine Verlängerung der Applikation oder Erhöhung der Konzentration führte dabei zu keiner Wirkungssteigerung⁷⁰. Eine weitere Untersuchung dieser Arbeitsgruppe beschreibt zudem einen Zeitverlauf in der Desfluran-Präkonditionierung (DesPC). Ähnlich zur IPC konnte eine frühe (0,5-2 Stunden nach dem Stimulus) und eine späte Phase (Latenz zwischen DesPC und Okklusion 24-72 Stunden) der Präkonditionierung nachgewiesen werden⁶⁹.

In den molekularen Signalweg der Desfluran-Präkonditionierung sind verschiedenste Mechanismen mit einbezogen. Die ausführliche Beschreibung des Signalweges erfolgt im Kapitel 1.4.

1.2.4 Blockade der Präkonditionierung durch Hyperglykämie und Diabetes mellitus

Die oben beschriebenen positiven Effekte der Präkonditionierung können durch Hyperglykämie und Diabetes mellitus blockiert werden. In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass bereits eine moderate Hyperglykämie die durch IPC^{76,77} und APC⁷⁸ herbeigeführte Kardioprotektion blockiert. Diabetes mellitus blockiert ebenfalls die Kardioprotektion⁷⁹⁻⁸¹ und Blutglukosekonzentration und Infarktgröße stehen dabei in direktem Zusammenhang zueinander⁸².

1.3 Klinische Relevanz

Koronare Herzerkrankungen und Myokardinfarkte treten in der Klinik häufig bei Patienten mit Risikofaktoren und Vorerkrankungen auf. Diabetes mellitus und verminderte Glukosetoleranz nehmen in diesem Zusammenhang eine zentrale

Bedeutung ein: Wie klinische Untersuchungen darlegen konnten, leidet ein großer Teil der Patienten mit Myokardinfarkt unter erhöhten Blutzuckerwerten, auch jene, bei denen zuvor kein Diabetes mellitus bekannt war. Erschwerend kommt für diese Patienten der Anstieg des Blutzuckerlevels unter Stress (wie ihn zum Beispiel ein akuter Myokardinfarkt oder eine Operation auslöst) hinzu. Ein Schwerpunkt der medizinischen Forschung besteht in der Ausarbeitung der Ursachen für diese akkumulierenden nachteiligen Effekte, der Entwicklung neuer Möglichkeiten um diese negativen Faktoren zu umgehen und letztlich in der Minimierung des Morbiditäts- und Mortalitätsrisikos dieser Patientengruppe. Klinische Untersuchungen konnten in diesem Zusammenhang bereits wegweisende Ergebnisse präsentieren.

Ischämie und Reperfusion sind während einer Vielzahl medizinischer Prozeduren und Situationen relevant: Zum Beispiel während Organtransplantation, koronarer Bypassoperation unter kardiopulmonalem Bypass, bei akutem Myokardinfarkt, während eines hämorrhagischen Schockes oder nach Reanimation³⁷. Die lokale, auf das jeweils betroffene Organ beschränkte, primäre inflammatorische Reaktion kann am Herzen eine temporäre myokardiale Dysfunktion (*stunning*)^{83,84}, Reperfusions-Arrhythmien⁸⁵ oder eine persistierende mikrovaskuläre Minderperfusion („*No reflow*“-Phänomen)⁸⁵ bewirken. Auch systemische Reaktionen (*systemic inflammatory response syndrome*, SIRS), die primär nicht betroffene Organe und Organsysteme mit ein beziehen werden nach Ischämie-Reperfusion beobachtet^{37,85} und stellen ein hohes Mortalitätsrisiko für die Betroffenen dar.

Präkonditionierung bewirkt klinisch nachweisbar eine Reduktion von Ischämie-Reperfusion-Schäden: Patienten, die vor einem Myokardinfarkt unter Angina pectoris Beschwerden leiden (ischämische Präkonditionierung), weisen eine geringere Morbidität (reduzierte Infarktgröße, geringere Inzidenz von schwerer Herzinsuffizienz oder Schock⁸⁶, verbesserte ventrikuläre Funktion⁸⁷) und Mortalität auf als Patienten ohne Prä-Infarkt-Angina⁸⁶. Auch volatile Anästhetika (Anästhetika-induzierte Präkonditionierung) bewirken in klinischen Untersuchungen protektive Effekte. Verschiedene Untersuchungen bei Patienten mit koronarer Bypass-Operation zeigen, dass die Anästhetika einen günstigen Einfluss auf die postoperative linksventrikuläre Funktion^{88,89}, biochemische Marker myokardialer Dysfunktion (*Brain Natriuretic Peptide*⁹⁰) und myokardialen Schadens (postoperative Troponin I Freisetzung⁹¹⁻⁹³, Creatinkinase⁹⁴) sowie die Verweildauer auf der Intensivstation^{92,95} und die Gesamtligedauer im Krankenhaus⁹⁵ haben. Des Weiteren wird durch die Verabreichung bestimmter Anästhetika der Bedarf an inotropen Substanzen, die

Beatmungsdauer der Patienten, die Inzidenz eines postoperativen Myokardinfarktes und die postoperative Mortalität reduziert⁹⁵. Die größten protektiven Effekte werden erreicht, wenn das Anästhetikum repetitiv vor Beginn der Ischämie⁹³ oder kontinuierlich während der gesamten Operation verabreicht wird⁹². Die Durchführung der Anästhesie mit Desfluran führt zu geringerem zellulärem Schaden postoperativ und verbesserter Erhaltung der linksventrikulären Funktion im Vergleich zur totalen intravenösen Anästhesie mit Propofol⁸⁸. Guarracino und Kollegen verglichen ebenfalls Patienten, die Desfluran oder Propofol während einer Bypass-Operation erhielten und registrierten eine verminderte postoperative Troponin I Freisetzung bei Patienten in der Desfluran-Gruppe⁹⁶. Hier fand der Eingriff allerdings am schlagenden Herzen ohne kardiopulmonalen Bypass statt. Insofern lassen sich diese Ergebnisse auch auf andere chirurgische Prozeduren übertragen, bei denen kardiale Risikopatienten eine Koronarischemie erleiden könnten und hierbei von der Anästhesie mit einem volatilen Anästhetikum profitieren würden.

Hyperglykämie Stoffwechsellagen erbrachten in experimentellen und klinischen Untersuchungen Nachteile: normoglykämie Patienten zeigten im Vergleich zu Patienten mit Hyperglykämie (ohne Diabetes mellitus) eine bessere linksventrikuläre Funktion und ein vermindertes Mortalitätsrisiko^{97,98}.

1.4 Signalkaskade und molekulare Mechanismen

Der Präkonditionierungsstimulus induziert die Aktivierung einer Kaskade stress-aktivierter Kinasen. Diese leiten das Signal weiter und bewirken letztlich die Aktivierung schützender Kinasen oder die Generierung schützender Proteine.

Bereits bei mehr als 100 Proteinen, die mit Kardioprotektion assoziiert sind, konnten durch Gabe volatiler Anästhetika lang anhaltende Veränderungen im Expressionsprofil nachgewiesen werden⁹⁹.

Die APC vermittelt über sogenannte Trigger (z.B. Adenosin¹⁰⁰, Stickstoffmonoxid-Synthase¹⁰¹, freie Sauerstoffradikale¹⁰²) die Aktivierung intrazellulärer Kinasen. Diese Enzyme bewirken ihrerseits durch Phosphorylierung bestimmter Proteine (Mediatoren) die Aktivierung von Endeffektoren, welche die Kardioprotektion während und nach der Koronarischemie vermitteln.

Ob IPC und APC über einen gemeinsamen Signalweg vermittelt werden, ist bislang unklar. Verschiedene Arbeiten konnten sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede in der Signalvermittlung zeigen¹⁰³⁻¹⁰⁶.

Der Signalweg der APC, soweit er bisher entschlüsselt werden konnte, wird in der folgenden Abbildung (Abb. 1.3) dargestellt und im nachfolgenden Text erläutert.

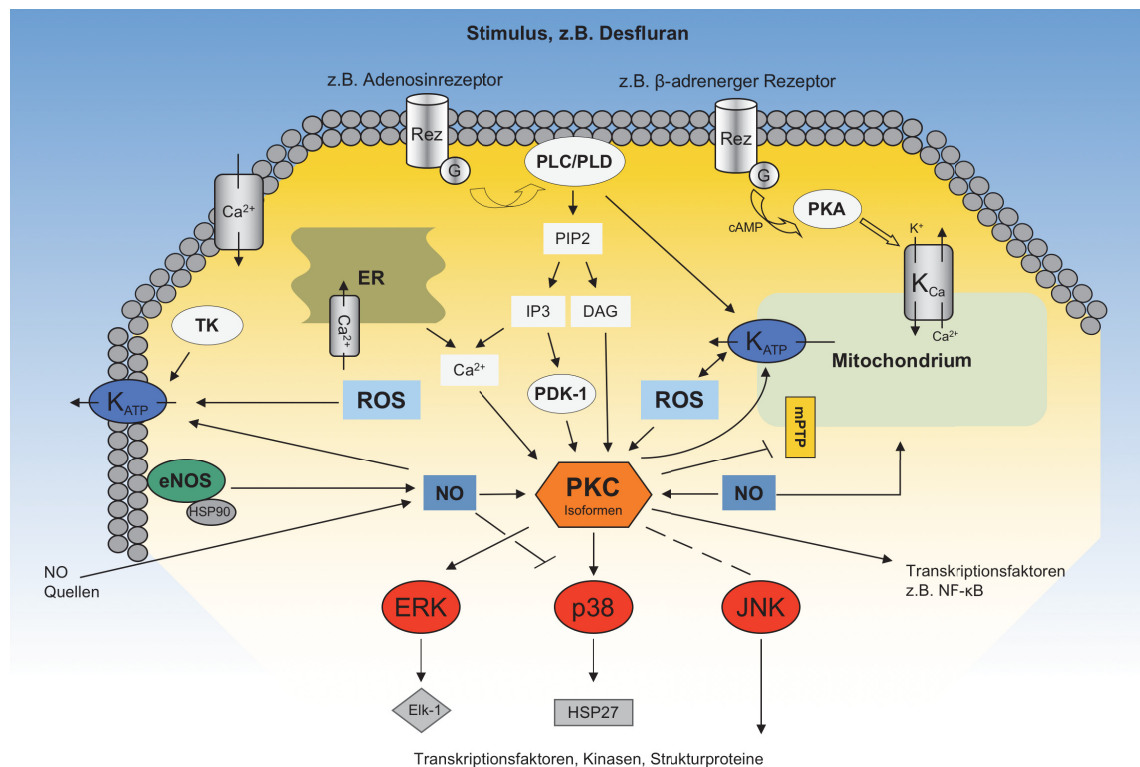


Abb. 1.3: **Schema des Signalweges der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung.** Die Aktivierung der Signalkaskade durch Anästhetika erfolgt über den ATP-abhängigen Kaliumkanal (K_{ATP}) oder G-Protein gekoppelte Rezeptoren (RezG). Der K_{ATP} öffnet sich bei Änderung der intrazellulären Adenosintriphosphat (ATP) Konzentration und bei vermehrtem Anfall freier Sauerstoffradikale (ROS). Die Aktivierung der RezG beeinflusst die Phospholipase C (PLC) und D (PLD) und darüber die Phosphatidylinositol-abhängige Kinase 1 (PDK-1). Dies wiederum kann zur Phosphorylierung der Proteinkinase C (PKC) führen, die unter anderem die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) Extrazellulär-regulierte Kinase (ERK) und p38 MAPK (p38) beeinflusst. An der Signalweiterleitung beteiligt sind außerdem Calcium-abhängige Kaliumkanäle (K_{Ca}), die zyklisches Adenosinmonophosphat- (cAMP-) abhängige Proteinkinase A (PKA), Calcium (Ca^{2+}), die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) und das durch die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) hergestellte Stickstoffmonoxid (NO). Letztlich kommt es über die Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren, weiteren Kinasen und Strukturproteinen zur Genregulation. DAG = Diacylglycerol, Elk-1 = E twenty-six-like transcription factor 1, ER = Endoplasmatisches Retikulum, HSP27/90 = Hitzeschockprotein 27/90, IP 3 = Inositoltrisphosphat, JNK = c-Jun-N-terminale Kinase, NF- κ B = Nukleärer Faktor 'kappa-light-chain-enhancer', (e)NOS = (endotheliale) Stickstoffmonoxid-Synthase, PIP2 = Phosphatidylinositolbisphosphat, TK = Tyrosinkinase

1.4.1 Aktivierung

Eine zentrale Rolle der APC auf molekularer Ebene spielt die Aktivierung des Adenosintriphosphat-abhängigen Kalium Kanals (K_{ATP})^{62,107-113}. Dieser ist sowohl an der Plasmamembran (sarkolemmal) als auch an der inneren Mitochondrienmembran

(mitochondrial) der Kardiomyozyten gelegen und reagiert auf Verminderung der intrazellulären Adenosintriphosphat Konzentration und den vermehrten Anfall von freien Sauerstoffradikalen (ROS) mit Öffnung¹¹⁴⁻¹¹⁶. Verbleiben die Kanäle im stabilen Öffnungsstatus, führt dies über eine Stabilisierung des Membranpotentials und eine Verkürzung des Aktionspotentials zu einer Verminderung des zytosolischen und mitochondrialen Calcium-Überschusses und somit zum Zellschutz¹¹⁶. Die Aktivierung der Signalkaskade kann auch über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (wie Adenosin-, α - und β - oder Opioid-Rezeptoren) stattfinden^{70,117-121}. Über deren Veränderung kommt es unter anderem zur Beeinflussung der Phospholipase C (PLC) und D (PLD) und 3-Phosphoinositol-abhängigen Kinase-1 (PKC-1)^{116,122-125}. Letztlich kann dies zu einer Phosphorylierung und Dissoziation der Proteinkinase C ins Zytosol führen¹²⁶.

1.4.2 Proteinkinase C und B

Infolge der oben genannten Mechanismen werden weitere Kaskaden aktiviert. Zunächst sind vor allem die Proteinkinasen C (PKC) und B (AKT) involviert.

Die PKC existiert in verschiedenen Isoformen, welche über Translokation in verschiedene Zellkompartimente (Zytosol, Kern, Zytoskelett) und über Phosphorylierung aktiviert werden¹²⁷⁻¹²⁹. Wie verschiedene Untersuchungen gezeigt haben, spielt die Isoform PKC ϵ besonders in der Kaskade der Kardioprotektion eine bedeutende Rolle¹³⁰⁻¹³². Bei der Präkonditionierung mit Isofluran und Xenon wurde die PKC ϵ als wichtiger Signaltransduktor identifiziert^{68,133,134}.

Die AKT nimmt ebenfalls eine wichtige Stellung in der Signalkaskade ein. Wie schematisch in Abbildung 1.4 dargestellt, wird die AKT durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI₃K) aktiviert¹³⁵. Aktivierung dieser Kinase führt zu Infarktgrößenreduktion und durch Phosphorylierung proapoptotischer und Hochregulation antiapoptotischer Gene zu verminderter myokardialer Apoptose¹³⁶. Weitergeleitet wird das Signal unter anderem durch die proto-onkogene Serin/Threonin-Proteinkinase Pim-1 (Pim-1-K)¹³⁷, deren Expression ebenfalls einen schützenden Effekt auf die Infarktgröße ausübt und myokardiale Hypertrophie und Apoptose hemmt^{138,139}. Diabetes mellitus führt zu einer Abschwächung des PI₃K-AKT Signalweges¹⁴⁰.

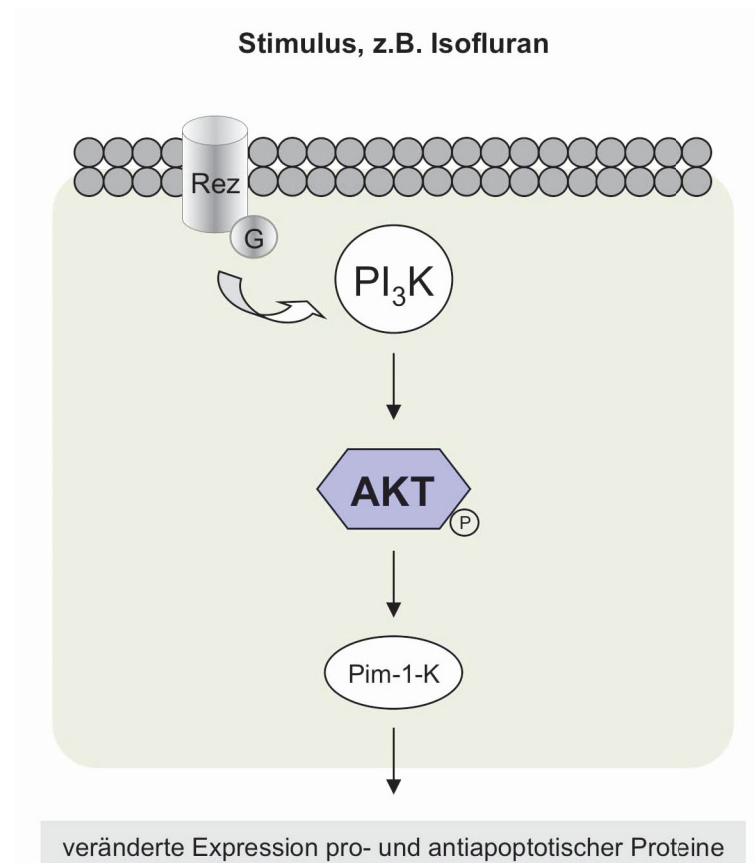


Abb. 1.4: **Signalweg der Proteinkinase B (AKT)**. Ein Stimulus erreicht den G-Protein gekoppelten Rezeptor (RezG), dem die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI₃K) nachgeschaltet ist. Diese phosphoryliert (P = Phosphat) die AKT. Die Signalweiterleitung erfolgt über die proto-onkogene Serin/Threonin-Proteinkinase Pim-1 (Pim-1-K) und führt zu veränderter Genexpression.

1.4.3 mitogen-aktivierte Proteinkinasen

Der PKC im Signalweg nachfolgend existieren kleine Proteinkinasen mit einer Molekülmasse zwischen 36 und 44 kDa, die so genannten mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Hierzu zählen: die Extrazellulär-regulierte Kinase (ERK), auch p42/p44 MAPK genannt, die c-Jun-N-terminale Kinase (JNK), auch stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK) genannt und die p38 MAPK (p38)¹⁴¹. Diese werden mitogen- und/oder stressaktiviert durch verschiedenste Stimuli wie Hyperosmolarität, mechanische Dehnung und Hitzeschock, Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität (Wachstumsfaktoren), Zytokinrezeptoren wie Interleukin-1 (IL-1) oder der Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) oder G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Adenosin, Angiotensin II)¹⁴². Die MAPK sind in die Signalübermittlung zwischen Zellmembran und Transkriptionsapparat involviert und beeinflussen dadurch unter anderem Wachstum und Differenzierung der Zelle¹⁴³⁻¹⁴⁶. Wie schematisch in Abbildung 1.5 dargestellt, erreicht das Signal zunächst bestimmte Serin/Threonin-Kinasen, die MAP Kinase Kinase Kinasen (MKKK). Diese wiederum phosphorylieren die

dualspezifischen Kinasen, die MAP Kinase Kinasen (MKK). Die dualspezifischen Kinasen sind in der Lage, die ihr nachfolgenden MAPK an zwei verschiedenen Aminosäuren, Threonin und Tyrosin, gleichzeitig zu phosphorylieren und damit zu aktivieren¹⁴⁷.

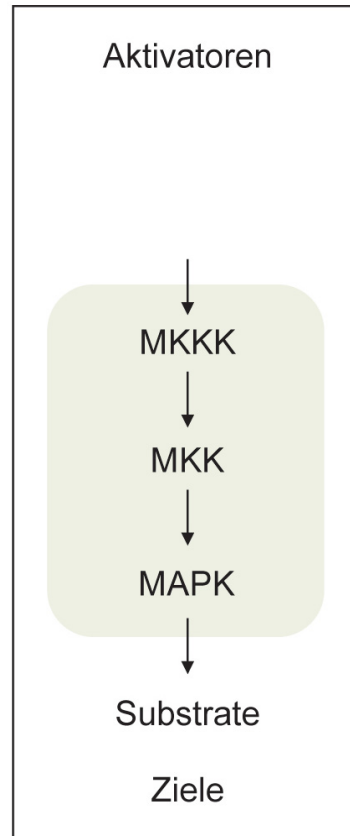


Abb. 1.5: **Schema Signalweg.** Ein Signal erreicht die MAP Kinase Kinase Kinasen (MKKK), die die MAP Kinase Kinasen (MKK) phosphorylieren, welche ihrerseits die mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) aktivieren. Die MAPK sind an der Signalübermittlung zwischen Zellmembran und Transkriptionsapparat beteiligt und beeinflussen unter anderem Wachstum und Differenzierung der Zelle.

Den MAPK wurde in den letzten Jahren eine zentrale Rolle in der Kardioprotektion durch ischämische Präkonditionierung zugeschrieben. Bereits 1996 konnte am isolierten Herzen gezeigt werden, dass die p38 durch globale Ischämie und die JNK durch Ischämie-Reperfusion aktiviert wird¹⁴⁸. Auch die Anästhetika-induzierte Präkonditionierung zeigt Effekte auf die unterschiedlichen MAPK.

Der Signalweg der **Extrazellulär-regulierten Kinase** (ERK) ist mitogen-aktiviert. ERK 1 (Molekülmasse 44 kDa) und ERK 2 (Molekülmasse 42 kDa) weisen große strukturelle Ähnlichkeiten auf und werden in der Signaltransduktion häufig gemeinsam untersucht¹⁴⁹. Signale wie Wachstumsfaktoren, Phorbol ester (z.B. *Tumor Promoting Agent*, TPA) oder Virustransformation treiben die Zelle zur Teilung an¹⁴¹. Die Stimulation von Rezeptor-Tyrosinkinasen, G-Protein gekoppelten Rezeptoren oder spezifischen Zytokinrezeptoren bewirkt über einige Zwischenschritte die Aktivierung

der Serin/Threonin-Kinase *Rapid accelerating fibrosarcoma* (Raf). Diese phosphoryliert in der Folge die dualspezifische MAPK/ERK Kinase (MEK) an Serin-Resten. Die dualspezifische Kinase verdient ihre Bezeichnung weil sie nun die ihr nachfolgende Kinase, in diesem Fall die ERK, an zwei verschiedenen Aminosäureresten, Threonin und Tyrosin, gleichzeitig phosphorylieren kann. Die aktivierten MAPK vermitteln nun Signale an Transkriptionsfaktoren im Zellkern, wie den E 26-ähnlichen Transkriptionsfaktor 1 (Elk-1), wodurch eine Veränderung der Genexpression, weiterer Kinasen und zytosolischer Proteine induziert werden kann^{146,149,150}. Letztlich werden hierdurch Wachstum und Differenzierung der Zelle gesteuert. Ein Schema der Kaskade ist in Abbildung 1.6 dargestellt. Präkonditionierung sowohl mit Xenon als auch mit Desfluran bewirkt einen zeitabhängigen Anstieg der ERK Phosphorylierung^{73,151}. Auch für Isofluran konnte eine Erhöhung der Aktivität der ERK nach Ischämie-Reperfusion gezeigt werden^{104,134}.

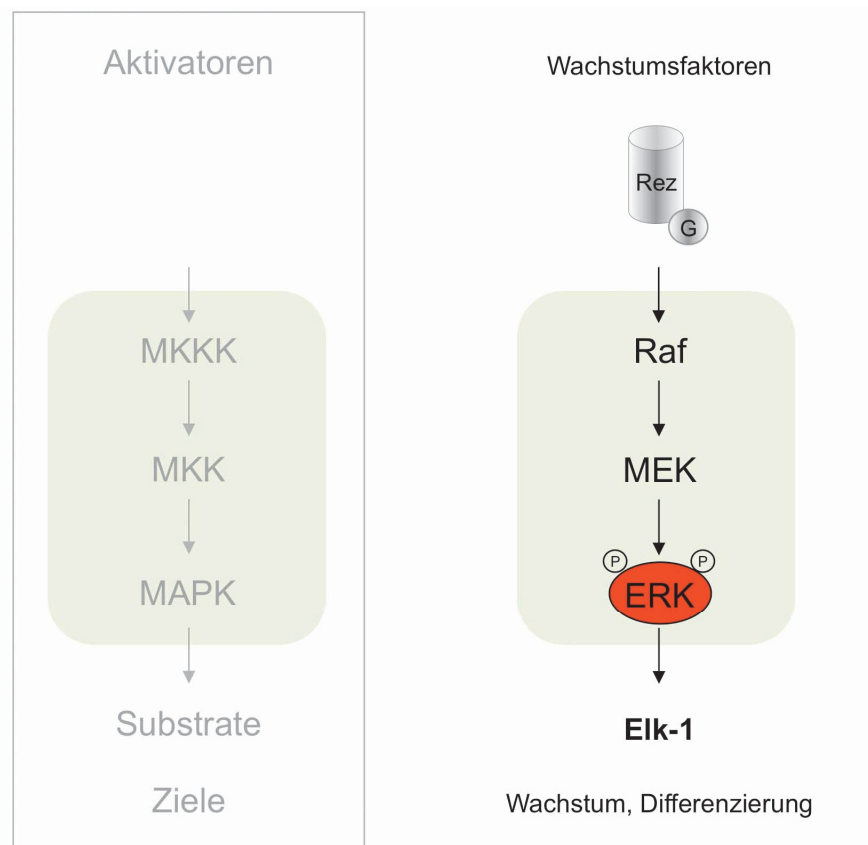


Abb. 1.6: **Schema ERK Signalweg.** Die Aktivierung des Signalweges erfolgt unter anderem über Wachstumsfaktoren. Über Rezeptoren wie den G-Protein gekoppelten Rezeptor (RezG) wird die Kinase *Rapid accelerating fibrosarcoma* (Raf) aktiviert. Diese phosphoryliert die MAPK/ERK Kinase (MEK), welche ihrerseits die Extrazellulär-regulierte Kinase (ERK) phosphoryliert (P = Phosphat). Die ERK vermittelt wiederum die Signalweiterleitung, unter anderem zum E 26-ähnlichen Transkriptionsfaktor 1 (Elk-1) und induziert auf diesem Weg Wachstum und Differenzierung der Zelle.

Die **c-Jun-N-terminale Kinase** (JNK) wurde 1990 zum ersten Mal als eine 54-kD Proteinkinase beschrieben¹⁵². Sie besteht aus 3 Subgruppen: JNK 1 und 2 kommen in

verschiedensten Geweben vor, die JNK 3 hingegen findet sich vorwiegend in Herz-, Hoden- und Nervengewebe. Eine Vielzahl unterschiedlicher Stimuli bewirkt die Signalvermittlung über die JNK. Neben Wachstumsfaktoren werden dazu Stressoren wie die inflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF α , UV-Strahlung, Hyperosmolarität und Hitzeschock gezählt. Über die Aktivierung spezifischer Serin/Threonin-Kinasen (z.B. die Apoptose-Signal-regulierende Kinase 1, ASK 1) und dualspezifischer Kinasen (MKK 7, MKK 4) wird letztlich die JNK phosphoryliert, und übermittelt, je nach Stimulus, die Befehle für Zellwachstum oder -differenzierung, Zellüberleben oder Apoptose¹⁵³. Schematisch dargestellt ist die Kaskade in Abbildung 1.7. Ischämische Präkonditionierung führt zur Aktivierung der JNK und damit zur Kardioprotektion¹⁴⁸. Zum Einfluss der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung auf die JNK in Kardiomyozyten liegt bisher nur eine aussagekräftige Studie vor. Diese konnte keine Involvement der JNK bei Präkonditionierung durch Xenon nachweisen¹⁵¹. Die Rolle dieser Kinase in der APC bleibt somit bislang ungeklärt.

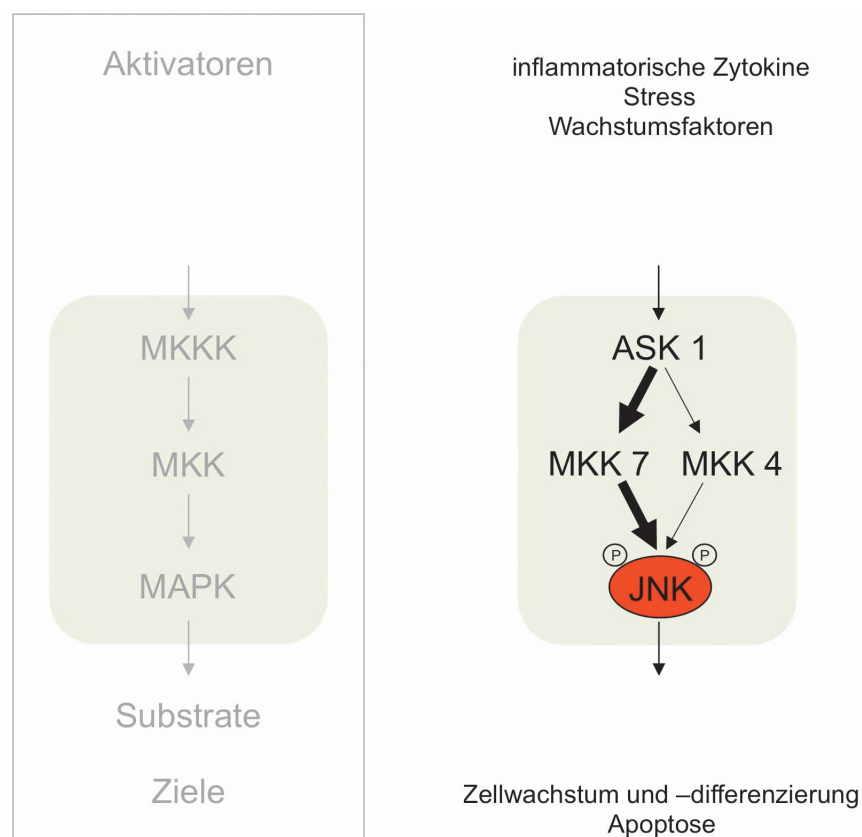


Abb. 1.7: **Schema JNK Signalweg.** Die Kaskade wird über inflammatorische Zytokine, Stress und Wachstumsfaktoren induziert. Es folgt die Aktivierung bestimmter Kinasen, unter anderem der Apoptose-Signal-regulierenden Kinase 1 (ASK 1), welche zur Aktivierung der MAP Kinase Kinase 7 und 4 (MKK 7, MKK 4) führt und eine Phosphorylierung (P = Phosphat) der c-Jun-N-terminalen Kinase (JNK) bewirkt. Je nach Stimulus werden hierdurch Zellwachstum und -differenzierung oder Apoptose vermittelt.

Die **p38 MAPK** (p38) wird ähnlich wie die JNK über Stressoren aktiviert¹⁵⁴. Wie in Abbildung 1.8 dargestellt, führt die Signalkaskade über die Aktivierung der ASK 1 zur

leichten Aktivierung der MKK 3 und zur ausgeprägten Aktivierung der MKK 6, welche letztlich die Threonin- und Tyrosin-Reste auf der p38 phosphorylieren¹⁵⁵. Diese vermittelt in der Zelle schließlich eine Entzündungsreaktion bzw. hypertrophe Reaktion, leitet die Apoptose ein oder führt zu Zellwachstum und Genregulation. Sowohl globale als auch regionale Ischämie und Reperfusion führen zu einem starken Anstieg der p38 Phosphorylierung *in vitro* und *in vivo* in Ratten-, Hunde- und Schweineherzen^{148,155-158}. Im menschlichen Herzen scheint die Aktivierung ähnlich zu verlaufen¹⁵⁹. Hemmung der p38 während Ischämie oder Ischämie-Reperfusion führt zu Kardioprotektion¹⁶⁰⁻¹⁶² und zur Verbesserung der myokardialen Kontraktilität¹⁶³. Im Kontrast zu diesen offensichtlich negativen Effekten durch Aktivierung der p38 steht die Tatsache, dass dieser Kinase eine bedeutende Rolle in der Präkonditionierung zugeschrieben wird¹⁶⁴. Isofluran und Xenon zeigen einen starken Anstieg der Phosphorylierungsrate dieses Enzyms nach Präkonditionierung⁶⁸. Hemmung der p38 führt zu kompletter Blockade der Kardioprotektion¹⁶⁵⁻¹⁶⁷. Gründe für diesen Widerspruch sind bisher nicht eindeutig auszumachen. Ursächlich könnten kontroverse Wirkmechanismen der vier Isoformen (α , β , γ und δ) der p38 sein. α - und β -Subform besitzen viele sequenzielle Ähnlichkeiten und lassen sich beide durch den p38-selektiven Proteinkinase-Inhibitor SB203580 hemmen. γ - und δ -Subform hingegen unterscheiden sich wesentlich von den beiden erstgenannten Formen und können durch SB203580 nicht gehemmt werden¹⁶⁸. Insbesondere die Isoform α tritt im menschlichen Myokard gehäuft auf^{162,169} und wird häufig in Zusammenhang mit Zelltod und Apoptose beschrieben, da zahlreiche Studien ihre starke Aktivierung durch Myokardischämie mit konsekutiv erhöhtem kardialen Schaden belegen^{155,170,171}. Doch sie wurde auch als notwendiger Mediator in der ischämischen Präkonditionierung identifiziert¹⁷² und vermittelt nicht ausschließlich die Apoptose¹⁷³. Die p38-Isoformen β und γ zeigen eine schwache Aktivierung, die Isoform δ zeigt keine Aktivierung nach Myokardischämie¹⁵⁵. Der p38 in der Signalkaskade nachgeschaltet ist die mitogen-aktivierte-proteinkinase-aktivierte Proteinkinase 2 (MAPKAP 2), welche wiederum das Hitzeschockprotein (HSP) 27¹⁷⁴ oder den TNF α phosphorylieren kann. Hemmung der p38 führt auch zu Hemmung der HSP27-Phosphorylierung¹⁷⁵.

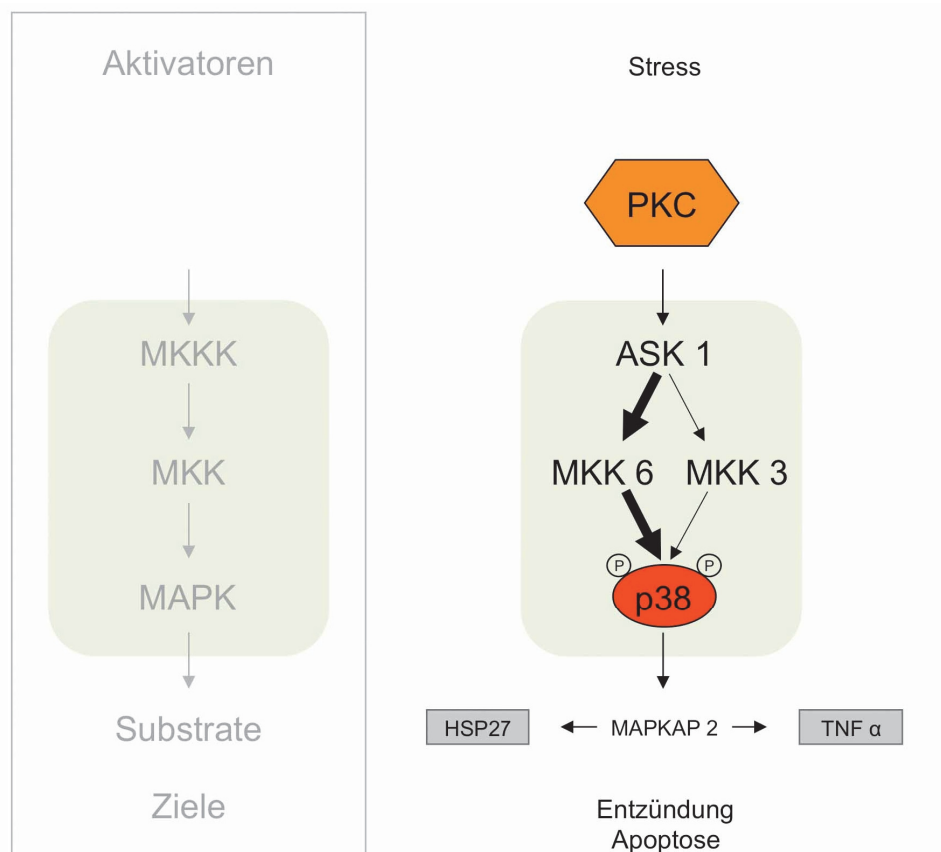


Abb. 1.8: **Schema p38 Signalweg.** Die Kaskade wird durch Stressoren aktiviert und bewirkt zunächst eine Stimulation der Apoptose-Signal-regulierenden Kinase 1 (ASK 1) und über diesen Weg eine starke Aktivierung der MAP Kinase Kinase 6 (MKK 6, dicker Pfeil) und eine leichte Aktivierung der MAP Kinase Kinase 3 (MKK 3, dünner Pfeil), welche schließlich die Phosphorylierung (P = Phosphat) der p38 MAPK (p38) bewirkt. Dadurch kommt es zur Aktivierung der mitogen-aktivierte-proteinkinase-aktivierte Proteinkinase 2 (MAPKAP 2), die ihrerseits zu einer Phosphorylierung des Hitzeschockproteins 27 (HSP27) oder des Tumornekrosefaktors α (TNF α) führen kann und über diesen Weg Entzündung oder Apoptose induzieren kann.

1.4.4 Weitere Substrate

Neben den Adenosintriphosphat-abhängigen Kaliumkanälen sind an der inneren Mitochondrienmembran auch Calcium-abhängige Kaliumkanäle vorhanden (K_{Ca}), die unabhängig von der Aktivierung der mitochondrialen (mito) K_{ATP} agieren und deren Öffnung mit konsekutiver Kalium-Aufnahme ins Mitochondrium ebenfalls kardioprotektiv wirkt¹⁷⁶. Die Öffnung dieser Kanäle wird durch die zyklische Adenosinmonophosphat- (cAMP-) abhängige Proteinkinase A (PKA) beeinflusst¹⁷⁷. Diese depolarisiert das Membranpotential und vermindert die mitochondriale Calcium-Last¹⁷⁸. Der verminderte zytosolische Calciumgehalt und die verbesserte myokardiale Reaktion auf Calcium spielen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Präkonditionierung¹⁰³. Des Weiteren ist die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) in die Signalvermittlung der APC involviert. Öffnung der Pore vermittelt letztlich den Zelltod. Die Hemmung der Öffnung ist somit entscheidend für die

Kardioprotektion und wird durch Anästhetika-induzierte Präkonditionierung über die PKC ϵ vermittelt^{71,179}. Eine Absenkung des Membranpotentials an isolierten Kardiomyozyten während der APC hat sich als kardioprotektiv erwiesen, da dies die Öffnung der mPTP verzögert¹⁸⁰. Bei Diabetikern konnte eine erhöhte Sensitivität gegenüber der durch Calcium vermittelten Öffnung der mPTP gezeigt werden¹⁸¹. In der Signalkaskade aktivierend wirkt zudem die mitochondriale Produktion freier Sauerstoffmetabolite¹⁰² sowie die Bereitstellung von Stickstoffmonoxid (NO), welches durch die in verschiedenen Kompartimenten lokalisierte Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) hergestellt wird¹⁸². Die endotheliale NOS (eNOS) vermittelt die frühe Desfluran-Präkonditionierung¹⁸³. Die eNOS benötigt die Interaktion mit dem Hitzeschockprotein 90 (HSP90), welche durch APC verstärkt wird und damit zu einer vermehrten NO-Produktion führt¹⁸⁴. Dieser Mechanismus wird durch Hyperglykämie blockiert¹⁸⁵. Die Rolle der Tyrosinkinase (TK) während der myokardialen Präkonditionierung durch Anästhetika ist bislang nicht eindeutig geklärt. Die Präkonditionierung mit Desfluran bleibt von diesem Enzym unbeeinflusst¹⁸⁶. Isofluran hingegen scheint über die Tyrosinkinase eine Veränderung der sarkolemmalen K_{ATP} zu bewirken¹⁸⁷.

Die induzierten Signalkaskaden führen letztlich über die Beeinflussung verschiedener Transkriptionsfaktoren (z.B. NF- κ B¹⁸⁸) zur Genregulation mit Stimulation von Wachstum oder Differenzierung, Entzündung oder Apoptose.

Unklar bleibt bisher, wann (frühe *versus* späte Präkonditionierung) und wo in der Signalkaskade der Präkonditionierung die Blockade stattfindet. Dies wird in der vorliegenden Arbeit untersucht.

1.5 Fragestellung

Die kardioprotektiven Eigenschaften volatiler Anästhetika wurden vielfach experimentell und klinisch nachgewiesen. Gut belegt ist auch die Tatsache, dass Hyperglykämien und ein vorliegender Diabetes mellitus eine Blockade dieser Protektion bewirken können. In welcher Phase der Präkonditionierung diese Blockade stattfindet, bleibt bislang allerdings unklar. Des Weiteren unbekannt ist die Rolle der MAPK in Bezug auf die Organprotektion durch Präkonditionierung während einer Hyperglykämie.

Ziel dieser Arbeit war es, zur Aufklärung dieser Aspekte anhand der Präkonditionierung mit Desfluran beizutragen.

Es ergaben sich die folgenden Fragestellungen:

1. Wird die Präkonditionierung mit Desfluran durch akute Hyperglykämie am Rattenherzen *in vivo* blockiert?
2. In welcher Phase (während der Trigger- oder während der Mediatorphase) wird die Präkonditionierung durch Hyperglykämie blockiert?
3. Zeigt sich bei den MAPK ERK, JNK und p38 ein Unterschied hinsichtlich der Regulierung der Kinasen (gemessen an der Phosphorylierung) während einer früh induzierten Hyperglykämie unter Desfluran-Präkonditionierung?

2. Material und Methoden

Die experimentellen Untersuchungen erfolgten in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz und den geltenden Bestimmungen. Für die Versuche lag die Genehmigung des Regierungspräsidenten vor (Aktenzeichen 50.05-230-23/04). Die Teilnahme an der versuchstierkundlichen Einführung zum Erwerb des Fachkundenachweises gemäß § 9 des geltenden Tierschutzgesetzes erfolgte im Sommer 2005. Die tierexperimentellen Teile der Arbeit wurden mit Unterstützung von Kollegen durchgeführt.

Für die Versuche wurden 250-320 g schwere männliche Wistar Ratten aus der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bezogen.

2.1 Präparation

Zur Narkoseeinleitung erhielten die Ratten S-Ketamin 150 mg kg^{-1} und Diazepam intraperitoneal. Nach endotrachealer Intubation wurden die Tiere an das Beatmungsgerät angeschlossen und mit einem Luft-Sauerstoffgemisch beatmet (Rhema-Labortechnik Beatmungsgerät, Typ 10 ml, Cass 34931, Deutschland). Der positive endexpiratorische Druck (PEEP) betrug bei einem Atemzugvolumen von ca. 5 ml und einer Atemfrequenz von ca. 60 pro Minute 2-3 cmH_2O . Zur Aufrechterhaltung der physiologischen Grenzen des Kohlendioxidpartialdrucks (pCO_2) wurde die Atemfrequenz entsprechend reguliert. Die Körpertemperatur der Ratten wurde mit Hilfe von Wärmeplatten, auf denen die Tiere während der gesamten Dauer der Präparation lagen, bei ca. 38°C aufrechterhalten. Nach Freilegen und Kanülieren der rechten Jugularvene war es möglich, über diesen Zugang Flüssigkeit (5 ml h^{-1} physiologische Kochsalzlösung, NaCl 0,9%) und Medikamente zu applizieren. Zunächst wurden 0,8 mg des Muskelrelaxans Pancuronium in die Vene injiziert. Die Aufrechterhaltung der Anästhesie fand durch kontinuierliche Perfusion einer α -Chloralose-Infusion ($5 \text{ ml } \alpha\text{-Chloralose}$ + $20 \text{ ml NaCl 0,9\%}$; $\alpha\text{-Chloralose } 25 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) über die Jugularvene statt. Die linke *Arteria carotis* wurde freigelegt und kanüliert. Die Kanüle wurde bis zum Aortenbogen vorgeschoben und anschließend mit einem Druckaufnehmer verbunden, um eine kontinuierliche Aortendruckmessung gewährleisten zu können. Die Impulse wurden mit Hilfe eines Umwandlers digitalisiert (PowerLab/8SP, ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia) und mit einer Abtastfrequenz von 500 Hz kontinuierlich auf einen Computer mit dem Betriebsprogramm Windows (ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia) aufgezeichnet. Um die später folgende Okklusion zu ermöglichen, wurde eine

Thorakotomie und Perikardiotomie links, mit Umstechung des *Ramus interventrikularis anterior* des Herzens durchgeführt (Prolene 5-0). Arterielle Blutgasanalysen zu Beginn und während der Versuche ermöglichten durch Anpassung der Beatmungsparameter die Aufrechterhaltung einer Normokapnie. Um einen stabilen Zustand der Tiere sicherzustellen, erfolgte ein zeitlicher Abstand von 15-20 Minuten zwischen Präparation und Versuchsbeginn.

α-Chloraloselösung	
1 g	α-Chloralose
1,5 g	Sodium Tetra Borat
100 ml	NaCl 0,9%

2.2 Infarktgrößenbestimmung

Es wurden die Unterschiede der Infarktausdehnung bei Desfluran-Präkonditionierung unter Normo- und Hyperglykämie während der Trigger- und der Mediatorphase untersucht.

2.2.1 Experimentelles Protokoll

Im Anschluss an die chirurgische Präparation erfolgte die Randomisierung der Tiere in sechs Gruppen. Bei allen Gruppen folgte nach Ablauf der ersten 40 Minuten eine Ischämiephase für 25 Minuten. Dabei wurde der vorher eingebrachte Okkluder um den *Ramus interventrikularis anterior* zugezogen und so eine Ischämie des Herzmuskelgewebes herbeigeführt. Die erfolgreiche Koronarokklusion konnte durch Entstehen einer lokalen myokardialen Zyanose verifiziert werden. Ein Schema der Koronarokklusion ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

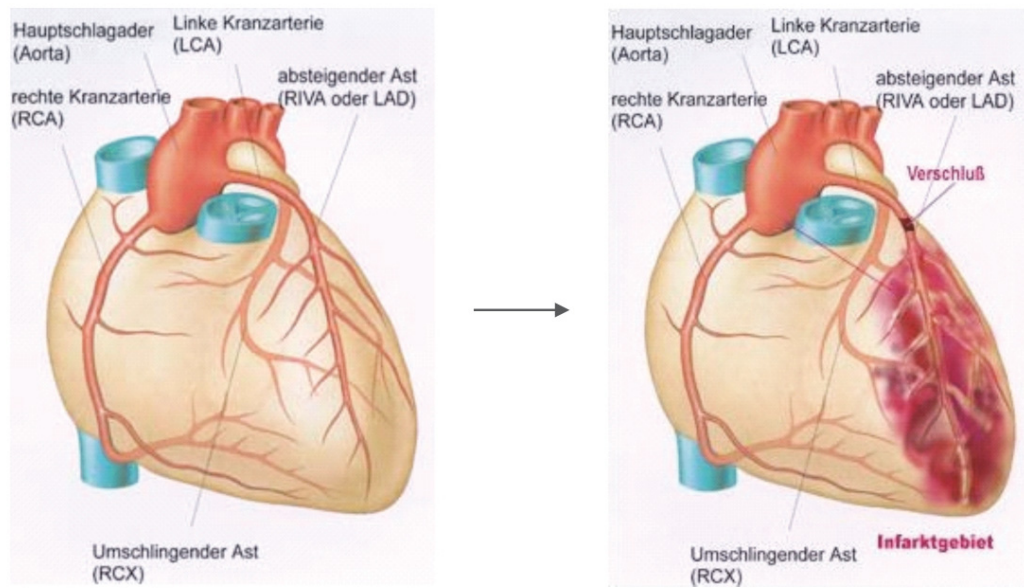


Abb. 2.1: **Darstellung der Koronarien.** Abbildung links: physiologische Verhältnisse, Abbildung rechts: Infarkt durch Verschluss des *Ramus interventrikularis anterior* (RIVA); die Abbildung links wurde von Schwarz Pharma AG, Monheim erstellt und mit deren Genehmigung von Dr. med. C. Leuner modifiziert und veröffentlicht; die Weiterverwendung erfolgt mit der Genehmigung von Dr. med. C. Leuner.

Im Anschluss an die Ischämiephase wurde durch Öffnen des Okkluders eine Reperfusion des Gewebes ermöglicht, welche durch Verschwinden der lokalen Zyanose erkennbar wurde. Die Reperusionsphase dauerte in allen Gruppen zwei Stunden.

Abbildung 2.2. stellt den Versuchsablauf schematisch dar.

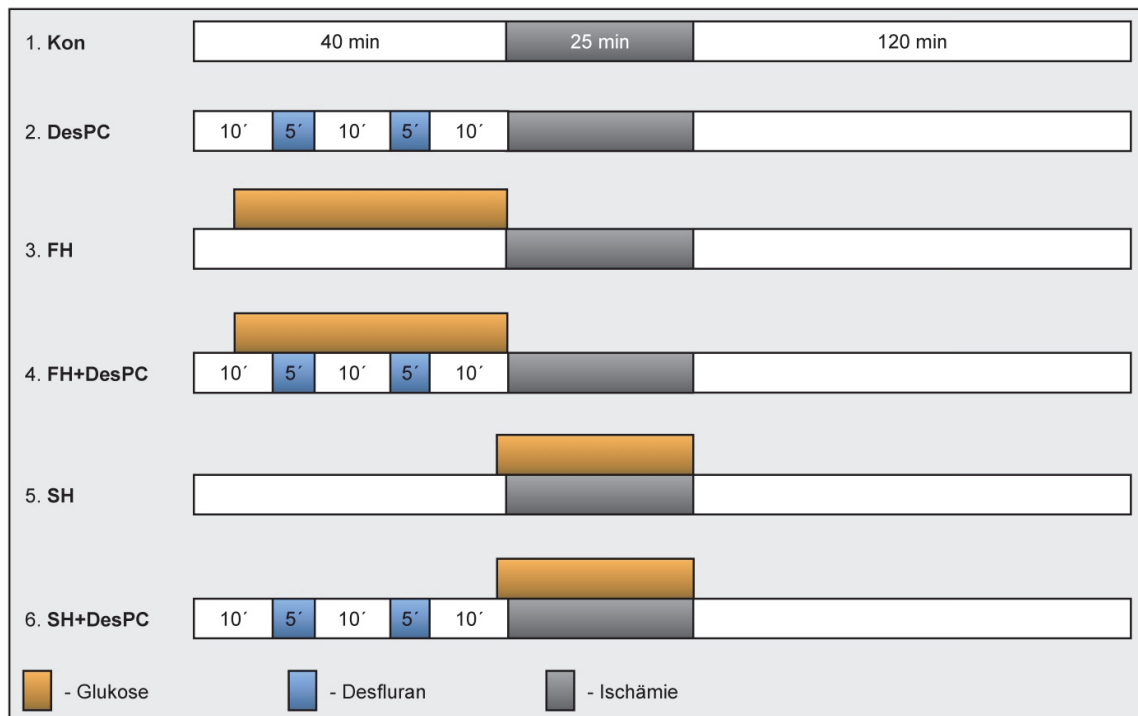


Abb. 2.2: **Protokoll Infarktgrößenbestimmung.** Es erfolgte eine Unterteilung in 6 Gruppen: Kontrolltiere (Kon) wurden einer 25-minütigen Ischämie mit nachfolgender 120-minütiger Reperfusion unterzogen. Desfluran-Präkonditionierung (DesPC) bezeichnet die zweimalige 5-minütige Präkonditionierung mit Desfluran, jeweils gefolgt von einer 10-minütigen Auswaschphase vor Ischämie und Reperfusion. Tiere der Gruppe frühe Hyperglykämie (FH) erhielten eine Glukoseinfusion vor Ischämie und Reperfusion, Tiere der Gruppe frühe Hyperglykämie und Desfluran-Präkonditionierung (FH+DesPC) wurden zusätzlich mit Desfluran präkonditioniert. Tiere der Gruppe späte Hyperglykämie (SH) erhielten eine Glukoseinfusion während der Ischämiephase, Tiere der letzten Gruppe (späte Hyperglykämie und Desfluran-Präkonditionierung, SH+DesPC) wurden zuvor mit Desfluran präkonditioniert. Zeitangabe (') = min., die übrigen Zeitangaben beziehen sich wenn nicht anders gekennzeichnet auf alle Gruppen: 40 min. Präkonditionierung, 25 min. Ischämie, 120 min. Reperfusion. Die orangefarbenen Balken stellen die Dauer der Glukosezufuhr dar, die grauen Balken die Zeit der Koronarischämie. Die Ventilation der Tiere mit Desfluran wurde blau gekennzeichnet.

Die Kontrollgruppe (**Kon**, n = 10) wurde, neben Ischämie und Reperfusion, keiner zusätzlichen Behandlung unterzogen.

Tiere der Desfluran-Präkonditionierungsgruppe (**DesPC**, n = 11) wurden nach zehn Minuten für je zwei Mal fünf Minuten mit Desfluran im Inspirationsgemisch ventiliert, jeweils gefolgt von einer zehnminütigen Auswaschphase. Diese Gruppe diente als Positivkontrolle, da die Infarktgrößenreduktion durch Desfluran-Präkonditionierung bereits nachgewiesen werden konnte⁶⁵.

Die Hyperglykämiegruppe der frühen Phase (**FH**, n = 12) erhielt eine Glukoseinfusion, die 5 Minuten vor Beginn des Präkonditionierungsprotokolles gestartet und zu Beginn der infarktinduzierenden Ischämie gestoppt wurde. Diese Tiere wurden nicht präkonditioniert.

Die vierte Gruppe (**FH+DesPC**, n = 9) erhielt ebenfalls eine Glukoseinfusion vor der Koronarokklusion, wurde jedoch zusätzlich mit Desfluran präkonditioniert.

Tiere der Hyperglykämiegruppe der späten Phase (**SH**, n = 9) erhielten eine Glukoseinfusion, die in der 40. Minute des Protokolls gestartet wurde und über 26 Minuten, über die gesamte Dauer der infarktinduzierenden Ischämie hinweg, andauerte. Diese Tiere wurden nicht präkonditioniert.

Der letzten Gruppe (**SH+DesPC**, n = 9) wurde ebenfalls eine Glukoseinfusion während der Koronarokklusion verabreicht, zusätzlich wurden diese Tiere nach Protokoll mit Desfluran präkonditioniert.

Die Desfluranventilation der Präkonditionierungsgruppen erfolgte durch die Beimischung von 1 MAC (minimale alveoläre Konzentration) Desfluran zu dem über das Beatmungsgerät verabreichten Inspirationsgemisch. Das verwendete Desfluran wurde bei Baxter (Unterschleissheim, Deutschland) bezogen.

Zur Induktion einer Hyperglykämie wurde den entsprechenden Gruppen eine Infusion mit 50 % Glukose verabreicht. Die Blutzuckerwerte dieser Tiere wurden während der Dauer der Infusion zwischen 400 und 600 mg dl⁻¹ konstant gehalten. Eine Kontrolle erfolgte durch Blutzuckermessungen im Abstand von fünf Minuten, die eine entsprechende Anpassung der Glukosezufuhr ermöglichten.

2.2.2 Infarktgrößenbestimmung durch Färbung

Im Anschluss an die Reperfusion wurde eine mediane Sternotomie durchgeführt, das Herz entnommen und an eine modifizierte Langendorff-Anlage angeschlossen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die, ursprünglich zur Untersuchung der mechanischen Tätigkeit des Herzens und des Myokardstoffwechsels verwendete Anlage, zum Auswaschen des Blutes aus den Koronargefäßen und der anschließenden Perfusion der Koronargefäße mit einer Färbelösung genutzt. Die Aorta wurde dabei an einer Metallkanüle (Olive) befestigt um so eine retrograde Perfusion des Herzens zu ermöglichen. Zum Auswaschen der Koronargefäße wurde physiologische Kochsalzlösung mit einem Druck von 80 mmHg infundiert. Nach erneutem Verschluss des *Ramus interventrikularis anterior* konnten dann anschließend 5-10 ml 0,2 % Evansblue-Lösung über die Aortenwurzel ins Herz gespült werden. Durch diese Färbung imponierte das unbeschädigte Gebiet blau, wohingegen das vom *Ramus interventrikularis anterior* versorgte Risikogebiet ungefärbt blieb und damit sichtbar

wurde. Die Herzen wurden im nächsten Schritt bei -80° C gefroren und später quer zur Herzachse in 1-2 mm dicke Scheiben geschnitten. Nach dem Tauen wurde jede Herzscheibe für 10 Minuten in 500 µl 37° C warmer Triphenyltetrazoliumchlorid- (TTC-) Lösung inkubiert. Das farblose TTC wird in vitalem Gewebe in einen roten Farbstoff umgewandelt und macht damit eine Abgrenzung zwischen nekrotischem und vitalem Gewebe sichtbar. Diese Reaktion erlaubt es somit, im Risikogebiet das Ausmaß der stattgehabten Schädigung zu erfassen. Im Anschluss an die Färbung wurden die Scheiben für sechs Stunden bei Raumtemperatur in 4 % Formalin inkubiert. Dadurch wurde das auszuwertende Gebiet deutlicher abgrenzbar. Infarktgewebe erschien grau, Risikogewebe rötlich. Mit Hilfe von Planimetrie konnte letztlich die Ausdehnung der Gebiete quantifiziert werden (Software: SigmaScan Pro, SPSS Inc., Chicago, USA). Im Anschluss wurde das Trockengewicht der einzelnen Myokardscheiben bestimmt (Analysenwaage LA230 S, Sartorius, Göttingen), anhand dessen die ermittelten Werte des Infarktgebietes in Bezug auf das Gewicht korrigiert wurden. Die Angabe der Infarktgröße erfolgte in Prozent des Risikogebietes.

Evansblue-Lösung	
1 g	Evansblue
5 g	Dextran
ad 500 ml	NaCl 0,9%

Triphenyltetrazoliumchlorid- (TTC) Lösung, pH =7,42	
200 ml	NaCl 0,9%
2,42 g	Trishydroxymethylaminomethan (Tris-Puffer)
1,5 g	Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)

2.3 Western Blot-Analyse

In einem Zeitverlauf wurde die Desfluran-Präkonditionierung während Hyperglykämie molekularbiologisch untersucht.

2.3.1 Experimentelles Protokoll

Nach Präparation der Tiere folgte der Versuchsablauf wie in Abbildung 2.3 dargestellt.

Die nächsten vier Gruppen (**FH+DesPC**) wurden nach dem gleichen Protokoll behandelt wie die DesPC-Gruppen. Allerdings erhielten alle Tiere dieser Gruppen zusätzlich eine Glukoseinfusion.

Tiere der letzten vier Gruppen (**FH**) wurden nicht mit Desfluran präkonditioniert, bekamen jedoch Glukose infundiert. Die Herzentnahme erfolgte jeweils zum gleichen Zeitpunkt wie bei den DesPC und FH+DesPC-Gruppen.

Auch in diesem Protokoll erhielten die Tiere der präkonditionierten Gruppen jeweils 1 MAC Desfluran. Die Ratten, bei denen eine Hyperglykämie induziert wurde, bekamen eine Glukoseinfusion von 50% Glukose. Die Blutzuckerwerte dieser Tiere wurden während der Dauer der Infusion zwischen 400 und 600 mg dl⁻¹ konstant gehalten.

Im direkten Anschluss an die Herzentnahme wurde das jeweilige Herz halbiert und in flüssigem Stickstoff schock gefroren.

2.3.2 Probenaufarbeitung für den Western Blot

Die schock gefrorenen Herzen wurden für die **Homogenisation** aus dem flüssigen Stickstoff herausgenommen und mit Hilfe eines Hammers in einem Metall Potter (Dick, Deizisau, Deutschland) pulverisiert. Das Pulver wurde anschließend mittels eines Homogenisators (T8 Ultra-Turrax, IKA, Staufen, Deutschland) gründlich mit dem beigefügten Lysepuffer vermischt und die entstandene Mischung gleichmäßig in Reaktionsgefäße verteilt. Puffer und Mischung standen während des Vorgangs ständig auf Eis. Die Homogenisation bewirkt das Aufbrechen der Zellen und ist Voraussetzung für die Auftrennung der Zelle in ihre Subsegmente.

Lysepuffer		
Stammlösung		10ml
Aqua dest	100 ml	
Sigma 7-9	60,57 mg	
Natriumfluorid (NaF)	210 mg	
Natriumvanadat (Na_3VO_4)	36,78 mg	
EGTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$)	76,08 mg	
Inasen-Inhibitoren-Mix, pH = 7,4		200µl
Aprotinin	1 mg	
Leupeptin	1 mg	
Pepsatin	1 mg	
Tris-HCl	10 ml	
Dithiothreitol (DTT)		7,7mg
Okadaic Acid (100µM/ml)		100 µl

Im nächsten Schritt erfolgte die zelluläre **Fraktionierung** in Zytosol-, Membran- und Kernfraktion. Diese Separierung der Zellkomponenten ermöglicht die Bestimmung des gesuchten Proteins in der jeweiligen Fraktion und kann Aufschluss über Translokationen zwischen den jeweiligen Fraktionen geben. Dazu wurde das Homogenisat zunächst für 10 Minuten bei 1000 *g* und 4° C zentrifugiert (Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf, Deutschland). Der Überstand wurde abpipettiert und erneut zentrifugiert, diesmal für 15 Minuten bei 16000 *g* und 4° C. Der nun entstandene Überstand stellte die Zytosolfraktion (P1) dar und wurde nach Abfüllen in Gefäße bei -80° C tiefgefroren. Die Zytosolfraktion wurde in dieser Arbeit untersucht. Das nach dem ersten Zentrifugieren entstandene Pellet wurde in weiteren Schritten mit Tritonpuffer (1% Triton x 100) vermischt und geschüttelt, nach 60 Minuten Inkubation auf Eis erneut gründlich geschüttelt und für 15 Minuten bei 16000 *g* und 4° C zentrifugiert. Der nun entstandene Überstand wurde als Membranfraktion (P2) aufgefangen, das Pellet wurde ein weiteres Mal mit Tritonpuffer gemischt und stellte die Kernfraktion (P3) dar. Auch diese Proben wurden aliquotiert und bei -80° C eingefroren. Ein Schema zur Fraktionierung ist in Abbildung 2.4 dargestellt.

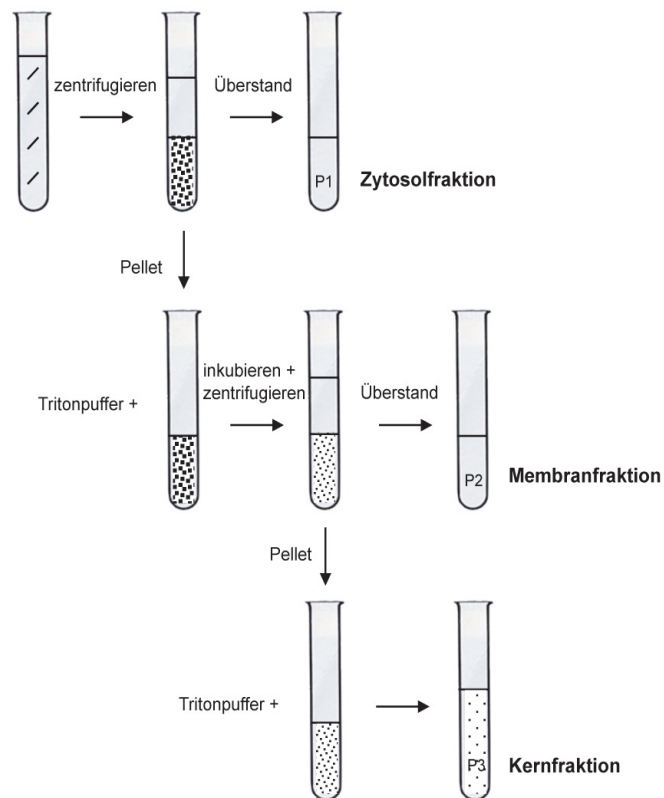


Abb. 2.4: **Schema der Fraktionierung.** Separierung der Zellkomponenten in Zytosol-, Membran- und Kernfraktion. Nach Zentrifugation des Homogenisats wird der Überstand abpipettiert und erneut zentrifugiert. Dies ist die Zytosolfraktion (P1). Dem Pellet wird Tritonpuffer zugefügt, die Mischung wird geschüttelt, auf Eis inkubiert und zentrifugiert, der Überstand wird abpipettiert und stellt die Membranfraktion (P2) dar. Das verbliebene Pellet wird erneut mit Tritonpuffer vermischt und stellt die Kernfraktion dar (P3).

2.3.3 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Bestimmung der Proteinmengen geht auf Oliver Lowry¹⁸⁹ zurück und erfolgt durch die Bildung von Farbkomplexen, die sich proportional zu der Menge an enthaltenen Proteinen verhält. Nach Berechnung der benötigten Mengen (für jede Probe und jeden der sieben Standards der Eichreihe werden 500 µl Lowry Reagenz benötigt) wurden die entsprechenden Lösungen hergestellt. Lösung 1 bestand aus drei verschiedenen Reagenzien, deren Zusammensetzung in der dem Textabschnitt nachfolgenden Tabelle aufgeführt wird. Reagenz A wurde im Verhältnis 100:1:1 mit Reagenz B und Reagenz C vermischt. In diesem ersten Schritt kommt es zur Komplexbildung zwischen Peptidbindung und Kupfer-Ionen in alkalischer Lösung. Mit Hilfe von bovinem Serumalbumin (BSA) wurde eine Eichreihe hergestellt, deren Proteinwerte als Referenz für die Herzproben genutzt wurden. Die eigenen Proben der Zytosolfraktion wurden 1:100 mit *Aqua destillata* (Aqua dest) verdünnt. In weiteren Schritten wurden Mischungen für die Proteinbestimmung fertig gestellt. Für die Mischung für die Eichreihe wurde Lösung 1 mit den Standards und Lösung 2 vermischt. Die Mischung

für die Herzproben bestand aus Lösung 1, verdünnten Proben und Lösung 2. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur wurden Proben und Standards als Doppelbestimmungen auf eine 96 Well Platte übertragen und die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe eines Plattenlesegerätes (Plate-Reader μ -Quant, BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland) gemessen. Durch Reaktion der Proteine mit den entsprechenden Lösungen und den dadurch hervorgerufenen Farbumschlag konnte die Extinktion der Proben mit der BSA-Kurve abgeglichen werden. Über eine Exceltabelle ließen sich die entsprechenden Konzentrationen und die Umrechnungsfaktoren für die Probenverdünnung darstellen und berechnen.

Lösung 1 (Reagenz A:B:C im Verhältnis 100:1:1)	
Reagenz A	
500 ml	Aqua dest
10 g	Natriumcarbonat (Na_2CO_3)
2 g	Natronlauge (NaOH)
Reagenz B	
2 g	Kalium-Natrium-Tartrat
ad 100 ml	Aqua dest
Reagenz C	
2 g	Kupfersulfat ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$)
ad 100 ml	Aqua dest

Lösung 2 (im Verhältnis 1:1)	
	Folins Reagenz
	Aqua dest

2.3.4 Verdünnung der Proben

Für den Western Blot müssen alle Herzproben die gleiche Proteinmenge beinhalten. Um dies zu erreichen, wurden die Proben auf den niedrigsten Proteinwert, der durch das Plattenlesegerät gemessen wurde, mit Lysepuffer (siehe 2.3.2) verdünnt. Die fertigen Proben wurden aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

2.3.5 Herstellung der Gele

Die Gele wurden einen Tag vor dem geplanten Western Blot gegossen. Damit wurde sichergestellt, dass das Gel ausreichend fest geworden war. Man benötigt zwei verschiedene Gele, das Trenngel, in dem die Proteine während der Elektrophorese der

Größe nach aufgetrennt werden und das Sammelgel, das die Proteine vor der Trennung auf eine gleiche Ausgangsbasis bringt.

Das Trenngel beinhaltet Polyacrylamid 30% (PAA), destilliertes Wasser (Aqua dest), 1,5 M Sigma 7-9 (pH = 8,8), das anionische Tensid Sodiumdodecylsulfat 10% (SDS, $C_{12}H_{25}NaO_4S$), das die Eigenladungen der Proteine überdeckt und damit dazu führt, dass die Proteine eine konstante Ladungsverteilung aufweisen. Zudem den Quervernetzer und Polymerisationskatalysator Tetramethylethyldiamin (Temed) und Ammoniumpersulfat 10% (APS, $(NH_4)_2S_2O_8$), das durch seinen hohen Sauerstoffgehalt ein starker Radikalbildner ist. Bei der Herstellung von Gelen wirkt APS als Polymerisationsinitiator. Die gebildeten Sulfat-Radikale können durch einen nukleophilen Angriff die Doppelbindung von Kohlenstoff-Atomen auflösen und so eine Kettenreaktion starten, die die Härtung des Gels bewirkt. Je nach Zusammensetzung der Komponenten PAA und Aqua dest wird das hergestellte Gel gröber oder feiner. Je höherprozentiger das Gel, desto feiner - kleinere Proteine wandern schneller und trennen sich besser als große. Je niederprozentiger das Gel, desto gröber - größere Proteine trennen sich besser auf.

	Trenngel 10% (ERK und JNK)	Trenngel 12% (p38)	Sammelgel
PAA 30%	6,6 ml	7,92 ml	2,55 ml
Aqua dest	8,2 ml	6,88 ml	10,5 ml
Sigma 7-9	5 ml	5 ml	1,5 ml
SDS 10%	0,2 µl	0,2 µl	0,15 µl
Temed	0,02 µl	0,02 µl	0,03 µl
APS 10%	0,1 µl	0,1 µl	0,15 µl

Das Sammelgel wird erst auf das Trenngel aufgetragen, wenn dieses nach 10 bis 30 Minuten ausgehärtet ist. Es besteht aus den gleichen Inhalten wie das Trenngel, mit der Ausnahme, dass hier 1,25 M Sigma 7-9 (pH = 6,8) anstelle von 1,5 M Sigma 7-9 (pH = 8,8) zur Verwendung kommt.

2.3.6 Lösungen und Material für Elektrophorese und Transfer

Ladepuffer	
7 ml	Aqua dest
1 ml	Tris-HCl, 500 mM, pH 6,8
2 ml	Glycerol
1 g	SDS
30 mg	Bromphenolblau (= 0,5%)

Laufpuffer (10x)	
30 g	Sigma 7-9
144 g	Gylcin
10 g	SDS
ad 1000 ml	Aqua dest

Coomassie Färbelösung	
750 mg	Coomassie Blau
25 ml	Eisessig
112,5 ml	Ethanol
112,5 ml	Aqua dest

Coomassie Entfärbelösung	
100 ml	Eisessig
333,3 ml	Ethanol
ad 1000 ml	Aqua dest

Transferpuffer (1x)	
6 g	Sigma 7-9
28,8 g	Gylcin
400 ml	Methanol
ad 1600 ml	Aqua dest

Waschpuffer (TPBS), pH = 8,0	
2000 ml	Aqua dest
10 Tabl.	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)
2 ml	Tween 20 (0,1%)

Blocklösung 5%	
5 Tabl.	PBS
50 g	Trockenmilchpuder
1000 ml	Aqua dest
1 ml	Tween 20 (0,1%)

Blocklösung 1%, pH = 8,0	
Blocklösung 5% 1:5 mit Waschpuffer (TPBS) verdünnt	

BSA 5%	
50 g	bovines Serumalbumin (BSA)
1000 ml	Waschpuffer (TPBS)

Das Material stammt von der Firma BioRad aus Hercules, California, USA.

2.3.7 Elektrophorese

Mercaptoethanol (C_2H_6OS), zum Aufbrechen von Disulfidbrücken, und Ladepuffer wurden 1:10 vermischt. Anschließend wurden Puffer und Proben 1:1 verdünnt und bei $95^\circ C$ für 5 Minuten erhitzt, was zur Denaturierung der Proteine führte. Die Gelplatten wurden in die vorgesehenen Halterungen eingesetzt und der Zwischenraum mit Laufpuffer (1x) gefüllt. Nach Entfernen der Kämme konnten die Geltaschen mit dem Proben/Puffer-Gemisch beladen werden. Eine bestimmte Tasche wurde mit einem Marker beladen, der als Referenz für die Proteinbanden diente. Die Elektrophorese zur Auftrennung der Proteine dauerte ca. 1,5 Stunden bei einer Spannung von 100 Volt (Powersupply EPS1001, Amersham pharmacia biotech). Bei der Elektrophorese wandern die negativ geladenen Proteine durch das Gel. Kleinere Moleküle wandern schneller durch das Gel, große Moleküle langsamer. Dadurch erfolgt die Auftrennung der Proteine im Gel, es entstehen Molekülbanden. Die Gele wurden zur späteren Identifizierung markiert.

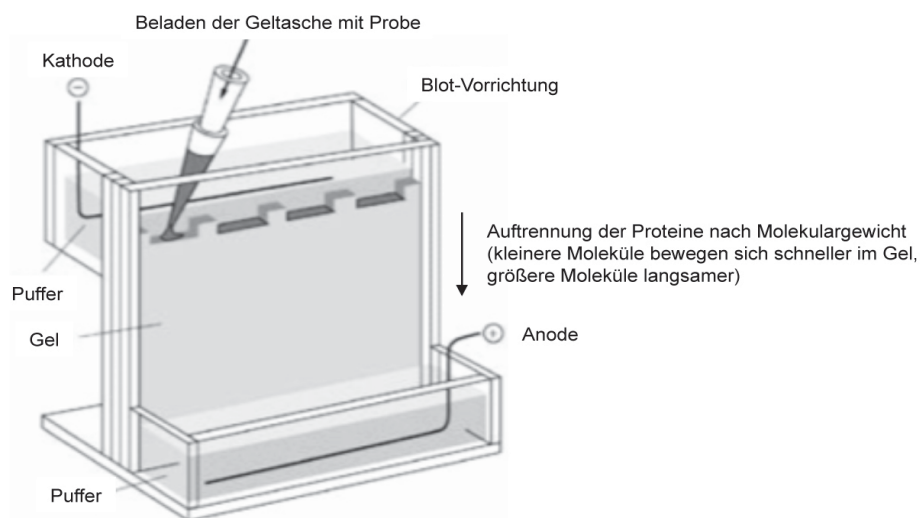


Abb. 2.5: **Schema der Gel-Elektrophorese.** Die Gelplatten werden in die Blot-Vorrichtung eingesetzt und es wird Laufpuffer zugefügt. Die Geltaschen werden mit den Proteinproben beladen, danach wird der Strom angeschlossen. Während der Elektrophorese wandern negativ geladene Proteine durch das Gel und werden nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Abbildung erstellt von Dr. rer. nat. Olivia Barton, mit freundlicher Genehmigung modifiziert und veröffentlicht.

2.3.8 Transfer

Zur Vorbereitung wurden die Membranen auf die Größe der Gele zugeschnitten und *Fiberpad* und Filterpapier in kalten Transferpuffer eingelegt. Nach Ende der Elektrophorese wurden die Transferkammern wie folgt beladen (von Minus- zu

Pluspol): 1 *Fiberpad*, 3 Filterpapiere, Gel, Membran, 3 Filterpapiere, 1 *Fiberpad*. Je zwei fertige Transferkammern kamen gemeinsam mit einem Kühlelement in einen Tank mit kaltem Transferpuffer. Der Proteintransfer von den Gelen auf die Membranen dauerte 60 Minuten bei einer Stromstärke von 230 mA.

2.3.9 Gel-Kontrolle

Im Anschluss an den Transfer wurden die Gele zum Anfärben mit Coomassie Färbelösung bedeckt und 30 Minuten geschüttelt (Schüttler VXR basic IKA-Vibrax, IKA, Staufen, Deutschland). Der Farbstoff Coomassie-Blau lagert sich dabei an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an und färbt damit die Proteine. Der in der Lösung enthaltene Eisessig fixiert die Proteine am Gel. Danach wurde die Färbelösung entfernt und das Gel mit Coomassie Entfärbelösung für 60 Minuten und anschließend in Leitungswasser entfärbt. Die Proteinbanden wurden nach der Entfärbung des Gels sichtbar und ermöglichten eine zusätzliche Kontrolle über die Beladung der Geltaschen mit gleichen Proteinmengen.

2.3.10 Blocken der Membran

Freie Bindungsstellen wurden auf der Membran blockiert. Dazu wurden die Membranen nach dem Transfer für zwei Stunden in Blocklösung 5 % inkubiert. Würde diese Absättigung der Bindungsstellen mit BSA, einem für die Antikörper nicht erkennbaren Protein, nicht stattfinden, würden sich Antikörper an diese Bindungsstellen heften und einen spezifischen Nachweis von Antigenen verhindern.

2.3.11 Material: Antikörper und Detektion

Die polyklonalen *Rabbit*-Antikörper phospho und totale p38 MAPK, phospho und totale ERK 1/2, totale JNK 1/2, 3 und die polyklonalen *Mouse*-Antikörper phospho JNK 1/2, 3 stammten von Cell Signaling, Frankfurt am Main, Deutschland; ebenso der Anti-Biotin-Antikörper. Der monoklonale *Mouse*-Antikörper Anti- α -Tubulin wurde von der Firma Sigma-Aldrich Chemie in Taufkirchen, Deutschland bezogen. Von Jackson/Dianova Immunolab, Hamburg, Deutschland verwendeten wir die Peroxidase-gekoppelten *Goat* Anti-*Rabbit*- und *Monkey* Anti-*Mouse*-Antikörper. Das Chemilumineszenz- (ECL-) Reagenz wurde von Santa Cruz in Heidelberg, Deutschland bezogen. Der Papierentwickler (Eukobrom) stammte von Tetanal (Norderstedt, Deutschland), der Fixierer (Dental Readymatic) von Kodak (Chalon sur Saone, Frankreich). Die

Kassetten (Hypercassetten) und den Röntgenfilm (Hyperfilm) mit den Maßen 18x24 cm lieferte die Firma Amersham Biosciences (München, Deutschland), der transparente Film wurde von Ahrend (Neuss, Deutschland) bezogen.

Primärantikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
phospho-ERK (phospho-p42/44 MAPK = Thr202/Tyr204)	Kaninchen	Cell Signaling	1:10.000, BSA 5%
ERK (p42/44 MAPK)	Kaninchen	Cell Signaling	1:10.000, BSA 5%
phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	Maus	Cell Signaling	1:5.000, Blocklösung 1%
SAPK/JNK	Kaninchen	Cell Signaling	1:5.000, BSA 5%
phospho-p38 MAP Kinase	Kaninchen	Cell Signaling	1:1.000, BSA 5%
p38 MAP Kinase	Kaninchen	Cell Signaling	1:1.000, BSA 5%
Anti- α -Tubulin	Maus	Sigma-Aldrich	1:50.000, Blocklösung 1%

Sekundärantikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Anti- <i>Rabbit</i> IgG	Ziege	Dianova	1:10.000, Blocklösung 1%
Anti- <i>Mouse</i> IgG	Affe	Dianova	1:10.000, Blocklösung 1%
Anti-Biotin (HRP-konjugiert)	Ziege	Cell Signaling	1:2.000, Blocklösung 1%

2.3.12 Inkubation mit Antikörpern

Nach Blocken der Membran wurde diese über Nacht bei 4° C in einer Lösung mit dem Primärantikörper inkubiert, um eine spezifische Bindung der Antikörper an das gesuchte Protein zu ermöglichen. Dabei wurden die polyklonalen *Rabbit*-Antikörper phospho- und totale p38 MAPK (1:10.000), ebenso wie phospho- (phospho-p42/44 MAPK = Thr202/Tyr204) und totale (p42/44 MAPK) ERK 1/2 (1:1.000) und totale SAPK/JNK (1:5.000) mit BSA 5% verdünnt. Der polyklonale *Mouse*-Antikörper phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) wurde im Gegensatz zu den anderen 1:5.000 mit Blocklösung 1% verdünnt. Nach ca. 20 Stunden Inkubation mit dem Primärantikörper wurde die Membran am nächsten Tag mit frischer, kalter TPBS gewaschen um schwächer haftende, unspezifische Antikörperbindungen von der Membran zu entfernen. Anschließend wurde die Membran bei Raumtemperatur für etwa 2 Stunden in einer Lösung mit Meerrettichperoxidase- (HRP-) gekoppeltem Anti-Biotin- und Sekundärantikörper inkubiert. Dies sollte gewährleisten, dass der Sekundärantikörper spezifisch an bestimmte Bereiche des Primärantikörpers binden konnte. Auf Membranen mit *Rabbit*-Antikörpern kam nun Anti-*Rabbit*-, auf die mit *Mouse*-Antikörpern Anti-*Mouse*-Antikörper, 1:10.000 verdünnt mit Blocklösung 1%. Darüber hinaus wurde der Lösung Anti-Biotin-Antikörper in einer Verdünnung von 1:2.000 beigegeben, um bei der Detektion auch den biotinylierten Proteinmarker sichtbar machen

zu können. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Membranen wiederum mit TPBS gewaschen.

2.3.13 Detektion

In der Dunkelkammer wurde die Membran in ECL-Reagenz geschwenkt. Dies ermöglichte das spätere Sichtbarmachen der immunreaktiven Proteinbanden auf dem Film. Das ECL-Reagenz reagierte mit der an den Sekundärantikörper gebundenen Meerrettichperoxidase, wodurch das Luminol in seine oxidierte Form umgesetzt wurde, und führte zur Lumineszenz dieser Banden und dadurch während der Belichtungszeit zur Schwärzung des Filmes. Die Belichtung erfolgte in einer Kassette. Darin befanden sich in dieser Reihenfolge: ein transparenter Film, die Membranen, ein weiteres Blatt transparenter Film und schließlich der Röntgenfilm. Die Kassette wurde geschlossen und der Film je nach Antikörper unterschiedlich lange exponiert. Im Anschluss wurde der Film in Eukobrom-Entwickler geschwenkt, dann ins Stopfbad und schließlich in ein Behältnis mit Fixierer getaucht. Nach Abspülen des Fixierers wurde der Film zum Trocknen aufgehängt. Die Membran wurde in TPBS gespült und dem nächsten Antikörper ausgesetzt.

2.3.14 Auswertung

Die Auswertung fand mit Hilfe der Kodak Image Station 440 CF (Eastman Kodak Comp., Rochester, New York, USA) statt. Mit diesem Gerät konnte die Intensität der Schwärzung der einzelnen Banden gemessen und somit quantifiziert werden. Die Ergebnisse zeigen das Verhältnis phosphorylierter (aktivierter) Proteine zu α -Tubulin.

2.3.15 Datenanalyse und Statistik

Alle Daten sind als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung (SD) dargestellt. Zur Prüfung auf statistische Signifikanz wurde ein Student's *t*-test (Graph Pad Prism version 4.00), gefolgt von einer Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche für den statistischen Vergleich der hämodynamischen Daten verwendet. Die Western Blot Daten wurden durch One-way ANOVA und Dunnett's Test für Mehrfachvergleiche analysiert. Ein α -Fehler (P-Wert) von kleiner 0,05 ($p < 0.05$) wurde als signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Blutglukosekonzentration

Die Glukosekonzentration im Blut der Tiere über die Dauer des Versuches wird in Abbildung 3.1 gezeigt. Unter Ausgangsbedingungen betrug die Blutglukosekonzentration bei den Tieren $120 \pm 28 \text{ mg dl}^{-1}$. Im Versuchsverlauf sank der Blutzucker der nicht mit Glukose behandelten Gruppen leicht ab: bei den Kontrolltieren auf $91 \pm 32 \text{ mg dl}^{-1}$ und bei den mit Desfluran behandelten Tieren auf $93 \pm 43 \text{ mg dl}^{-1}$. Die FH und FH+DesPC Tiere, die während der Triggerphase eine Glukoseinfusion erhielten, erreichten im Mittel Werte zwischen 500 und 600 mg dl^{-1} , die nach Stoppen der Infusion stetig abfielen und zum Ende der Ischämiephase $248 \pm 153 \text{ mg dl}^{-1}$ und $284 \pm 77 \text{ mg dl}^{-1}$ und nach Ablauf der zwei Stunden Reperfusion $80 \pm 25 \text{ mg dl}^{-1}$ und $124 \pm 93 \text{ mg dl}^{-1}$ betrugen. In den Gruppen der späten Glukoseinfusion stiegen die Blutzuckerwerte während der Mediatorphase ebenfalls auf 500 bis 600 mg dl^{-1} , um dann nach Ende der Infusion bis zum Ende des Versuches auf $120 \pm 48 \text{ mg dl}^{-1}$ bei den Tieren der SH-Gruppe und auf $107 \pm 39 \text{ mg dl}^{-1}$ bei denen der SH+DesPC-Gruppe abzufallen.

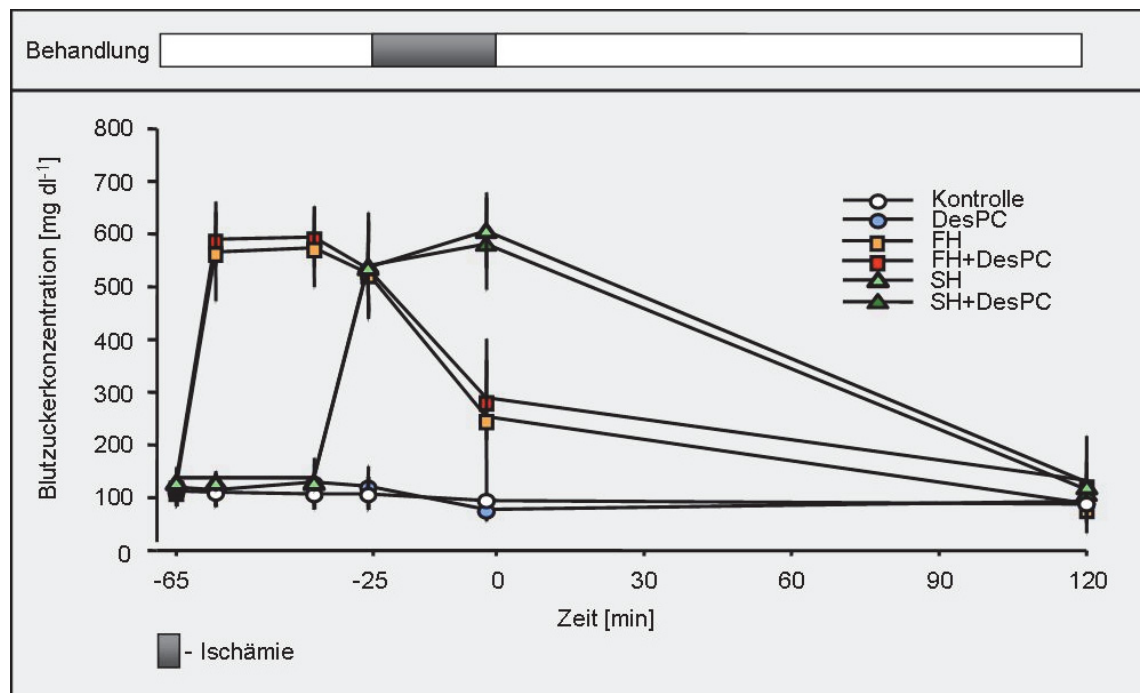


Abb. 3.1: **Blutzuckerkonzentration.** Darstellung der Ergebnisse der Messungen des Blutzuckers (Einheit mg dl^{-1}) der verschiedenen Gruppen während der Versuchsphasen (in Anlehnung an das Protokoll Infarktgrößenbestimmung, Abbildung 2.2). DesPC = Desfluran-Präkonditionierung, FH = frühe Hyperglykämie, FH+DesPC = frühe Hyperglykämie und Desfluran-Präkonditionierung, SH = späte Hyperglykämie, SH+DesPC = späte Hyperglykämie und Desfluran-Präkonditionierung. Die Behandlung der Tiere wurde oben skizziert, der graue Balken stellt die Ischämiephase dar. Tiere, die eine Glukoseinfusion erhielten, erreichten Blutzuckerwerte zwischen 500 und 600 mg dl^{-1} . Der Blutzuckerwert stieg dabei jeweils rasch an. Tiere, die einer frühen Hyperglykämie unterzogen wurden, hatten auch noch während der Ischämie (Mediatorphase) erhöhte Blutzuckerwerte. Am Versuchsende waren alle Tiere wieder normoglykäm.

3.2 Hämodynamik

Der Verlauf von Herzfrequenz und mittlerem Aortendruck während des Versuches ist in den Abbildungen 3.2.1 und 3.2.2 dargestellt. Unter Ausgangsbedingungen zeigten die hämodynamischen Variablen der verschiedenen Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Die Herzfrequenz betrug im Mittel 434 ± 48 Schläge pro Minute, der Aortendruck 132 ± 25 mmHg. Während der ersten Präkonditionierung mit Desfluran fiel in den entsprechenden Gruppen die Herzfrequenz auf $85 \pm 11\%$ und der mittlere Aortendruck auf $55 \pm 11\%$ des Ausgangswertes, während der zweiten Präkonditionierung auf $84 \pm 6\%$ und $49 \pm 10\%$. In den Auswaschphasen stiegen die Werte jedoch wieder auf das Ausgangsniveau. Vor Beginn der Ischämiephase betrug in allen Gruppen die Herzfrequenz $93 \pm 10\%$ und der mittlere Aortendruck $91 \pm 16\%$ des Ausgangswertes. Bis zum Ende der Reperfusion sank die Herzfrequenz nur noch um weitere 3% ab, der mittlere Aortendruck jedoch um weitere 24%. Es gab weder im Verlauf der Ischämie- noch im Verlauf der Reperusionsphase hämodynamische Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen.

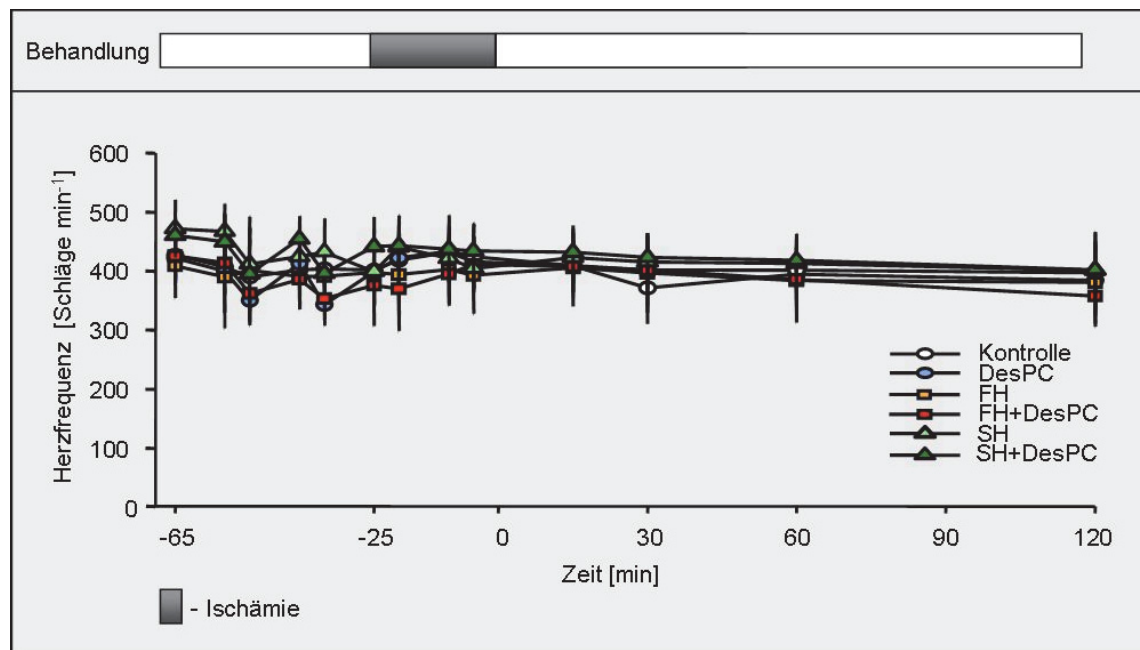


Abb. 3.2.1: **Herzfrequenz.** Verlauf der Herzfrequenz der verschiedenen Gruppen während der Versuchsphasen (in Anlehnung an das Protokoll Infarktgrößenbestimmung, Abbildung 2.2). DesPC = Desfluran-Präkonditionierung, FH = frühe Hyperglykämie, FH+DesPC = frühe Hyperglykämie und Desfluran-Präkonditionierung, SH = späte Hyperglykämie, SH+DesPC = späte Hyperglykämie und Desfluran-Präkonditionierung. Die Behandlung der Tiere wurde zur Orientierung oben in der Abbildung skizziert: der graue Balken stellt die Ischämiephase dar. Desflurangaße führte bei den behandelten Gruppen jeweils zu einem leichten Abfall der Herzfrequenz. Die Werte erholten sich nach Beendigung der Desfluranzufuhr zügig.

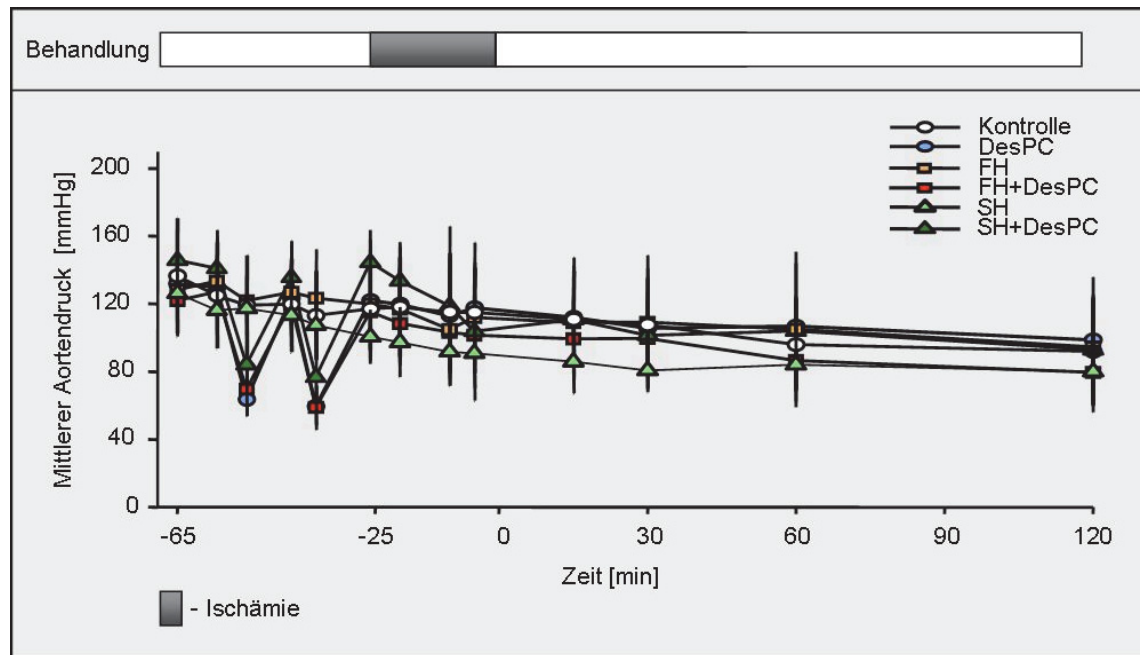


Abb. 3.2.2: **Mittlerer Aortendruck.** Verlauf des mittleren Aortendruckes der verschiedenen Gruppen während der Versuchsphasen (in Anlehnung an das Protokoll Infarktgrößenbestimmung, Abbildung 2.2). DesPC = Desfluran-Präkonditionierung, FH = frühe Hyperglykämie, FH+DesPC = frühe Hyperglykämie und Desfluran-Präkonditionierung, SH = späte Hyperglykämie, SH+DesPC = späte Hyperglykämie und Desfluran-Präkonditionierung. Die Behandlung der Tiere wurde zur Orientierung jeweils oben in der Abbildung skizziert: der graue Balken stellt die Ischämiephase dar. Desflurangabe führte bei den behandelten Gruppen jeweils zu einem deutlichen Abfall des mittleren Aortendruckes. Die Werte erhielten sich nach Beendigung der Desfluranzufuhr zügig.

3.3 Infarktgröße

Abbildung 3.3 zeigt die Ergebnisse der Messung der Infarktgröße. Im Vergleich zu den Kontrollen ($51,7 \pm 9,0\%$) reduzierte die Präkonditionierung mit Desfluran die Infarktgröße signifikant auf $28,9 \pm 11,9\%$ des Risikogebietes ($P = 0,0005$). Weder die frühe (FH $51,5 \pm 9,0\%$, $P = 1,0$ vs. Kon) noch die späte Hyperglykämie (SH $42,2 \pm 16,5\%$, $P = 1,0$ vs. Kon) alleine beeinflussten die Größe des Infarktes. Beide führten jedoch zu vollständiger Blockierung der durch Desfluran-Präkonditionierung vermittelten Kardioprotektion (FH+DesPC $49,1 \pm 12,3$, $P = 0,005$ vs. DesPC; SH+DesPC $48,1 \pm 17,6\%$, $P = 0,04$ vs. DesPC). Das Trockengewicht der Herzen betrug im Mittel $0,134 \pm 0,026$ g und unterschied sich nicht zwischen den Gruppen. Das Risikogebiet machte im Mittel $39 \pm 14\%$ des Herzens aus und wog $0,052 \pm 0,025$ g. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich der Gruppen.

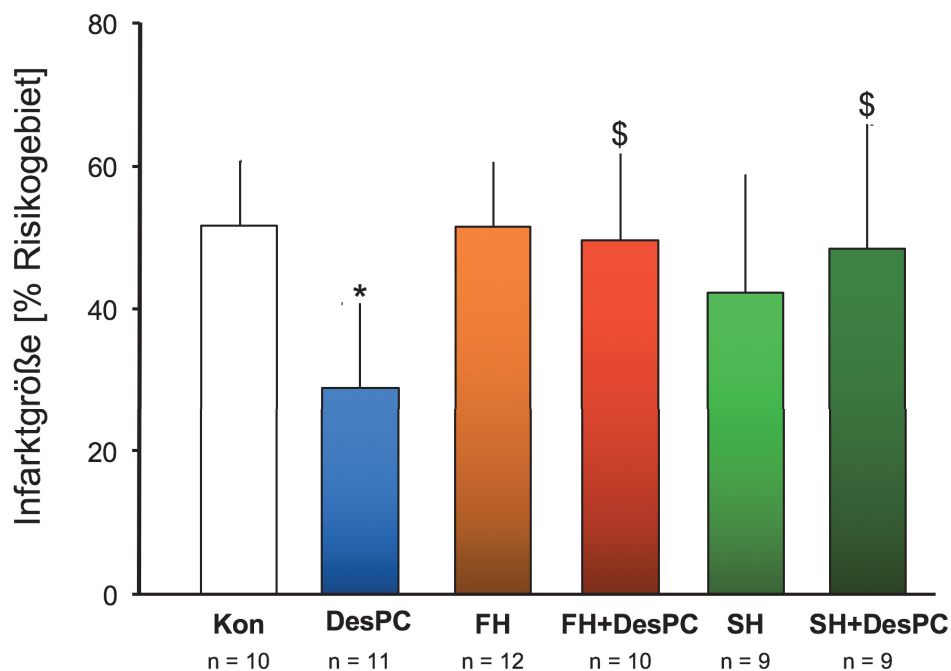


Abb. 3.3: **Ergebnisse Infarktgröße.** Die Infarktgröße wird angegeben in % des Risikogebietes in der jeweiligen Versuchsgruppe: Kon = Kontrolle, DesPC = Desfluran-Präkonditionierung, FH = frühe Hyperglykämie, FH+DesPC = frühe Hyperglykämie und Desfluran-Präkonditionierung, SH = späte Hyperglykämie, SH+DesPC = späte Hyperglykämie und Desfluran-Präkonditionierung. Desfluran-Präkonditionierung führt zu einer signifikanten Infarktgrößenreduktion im Vergleich mit den Kontrollen. [* = Signifikanz ($p < 0.05$) Kon zu DesPC]. Frühe (während der Triggerphase) oder späte (während der Mediatorphase) Glukosezufuhr blockiert die Infarktgrößenreduktion durch Desfluran-Präkonditionierung vollständig [\$ = Signifikanz ($p < 0.05$) DesPC zu FH+DesPC und DesPC zu SH+DesPC]. n = Anzahl der Versuchstiere.

3.4 Molekularbiologie

Mit dem Western Blot wurde der Grad der Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK, JNK und p38 in der zytosolischen Fraktion bestimmt. Die Herzen von DesPC, FH+DesPC und FH Tieren wurden zu fünf unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Den Kontrolltieren wurden die Herzen sofort nach der chirurgischen Präparation entnommen. Der Kontrollwert wurde bei 100% festgelegt. Die Western Blot Daten der anderen Gruppen sind als Prozentwert der Kontrollen dargestellt. Die Werte ergeben sich aus dem Quotienten aus der Menge an phosphoryliertem Protein und α -Tubulin als Standard.

3.4.1 Phosphorylierung der ERK 1/2

Wie in Abbildung 3.4 dargestellt, ist eine Abnahme der Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK im Vergleich zu den Kontrollen auszumachen. Was sich bei der Isoform ERK 1 nur als Tendenz andeutet, erreicht bei Isoform 2 Signifikanz. Hier zeigt sich

deutlich eine Abnahme der Phosphorylierung in den DesPC-Gruppen, deren Herzen nach 15, 25 und nach 30 Minuten entnommen wurden. Dies wurde ebenfalls nach 30 Minuten in der Gruppe FH+DesPC beobachtet. Hyperglykämie alleine nimmt keinen signifikanten Einfluss auf die Phosphorylierung der ERK 1/2 während des Zeitverlaufes.

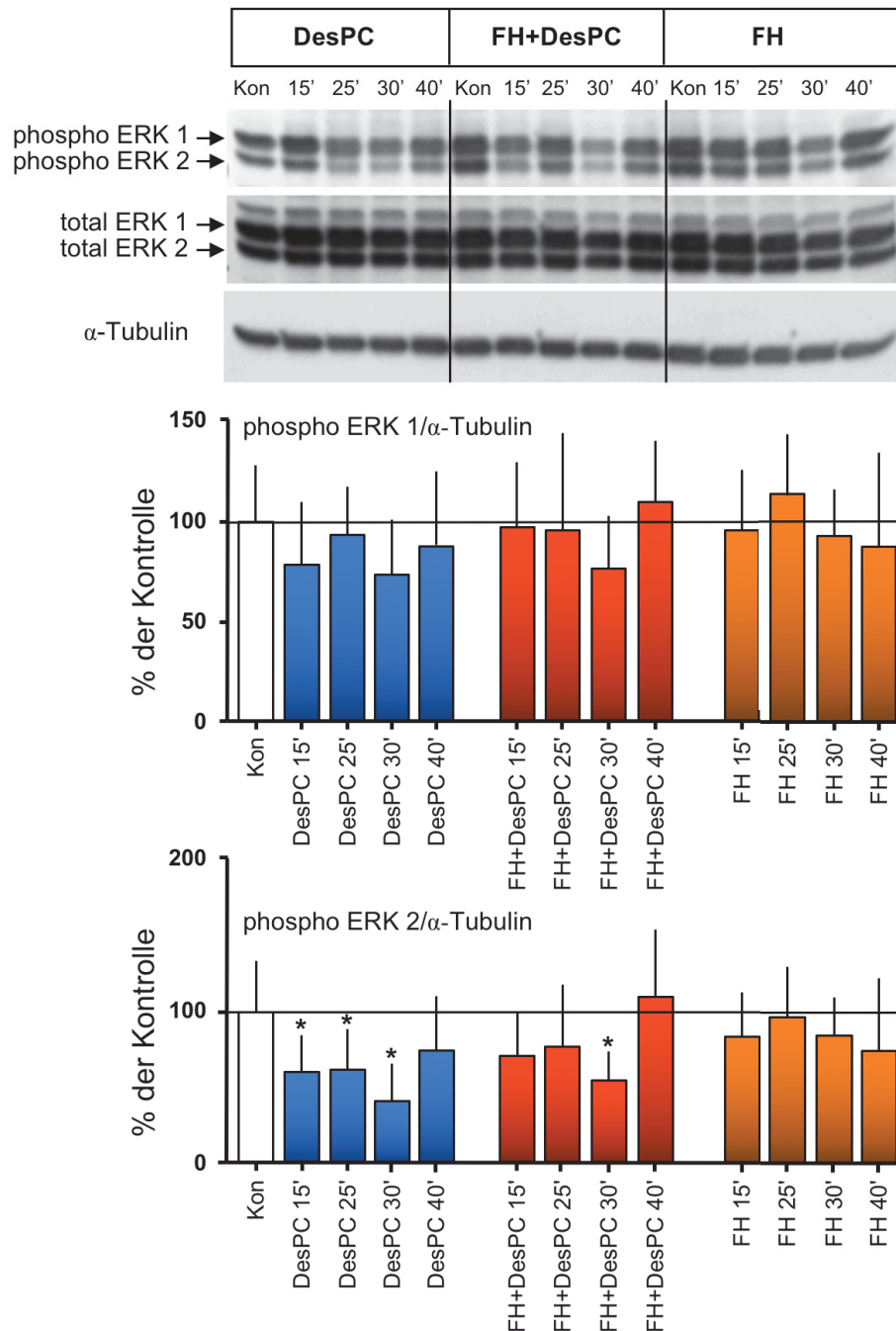


Abb. 3.4: **Ergebnisse Zeitverlauf ERK.** Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot der Kontrollen (Kon) und mit Desfluran präkonditionierten Herzen (DesPC, blaue Balken), Entnahme nach 15, 25, 30 oder 40 min. bzw. mit Desfluran präkonditionierten und hyperglykämischen Herzen (FH+DesPC, rote Balken) oder nur hyperglykämie, nicht präkonditionierte Herzen (FH, orange Balken), jeweils n = 3. Oben: Ergebnisse der Densitometrie: phosphorylierte ERK 1 und 2, totale ERK 1 und 2 und der Standard α -Tubulin. Erstes Histogramm: Verhältnis phospho ERK 1 zu α -Tubulin. Zweites Histogramm: Verhältnis phospho ERK 2 zu α -Tubulin, jeweils angegeben in % der Kontrolle. Mittelwert $\pm$ Standardfehler. * = p < 0.05 vs. Kon

3.4.2 Phosphorylierung der JNK 1 und 2/3

Entsprechend der Ergebnisse der p38 MAPK zeigte sich sowohl bei Untersuchung der JNK 1 als auch bei Untersuchung der JNK 2/3 ein zeitabhängiger Phosphorylierungsverlauf. Für die Isoform JNK 2/3 ist nach 40 Minuten ein signifikanter Anstieg der Phosphorylierung in Herzen der FH-Gruppe nachweisbar. Außerdem ist zum gleichen Zeitpunkt auch die phosphorylierte Form in der FH+DesPC-Gruppe signifikant erhöht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.5 dargestellt.

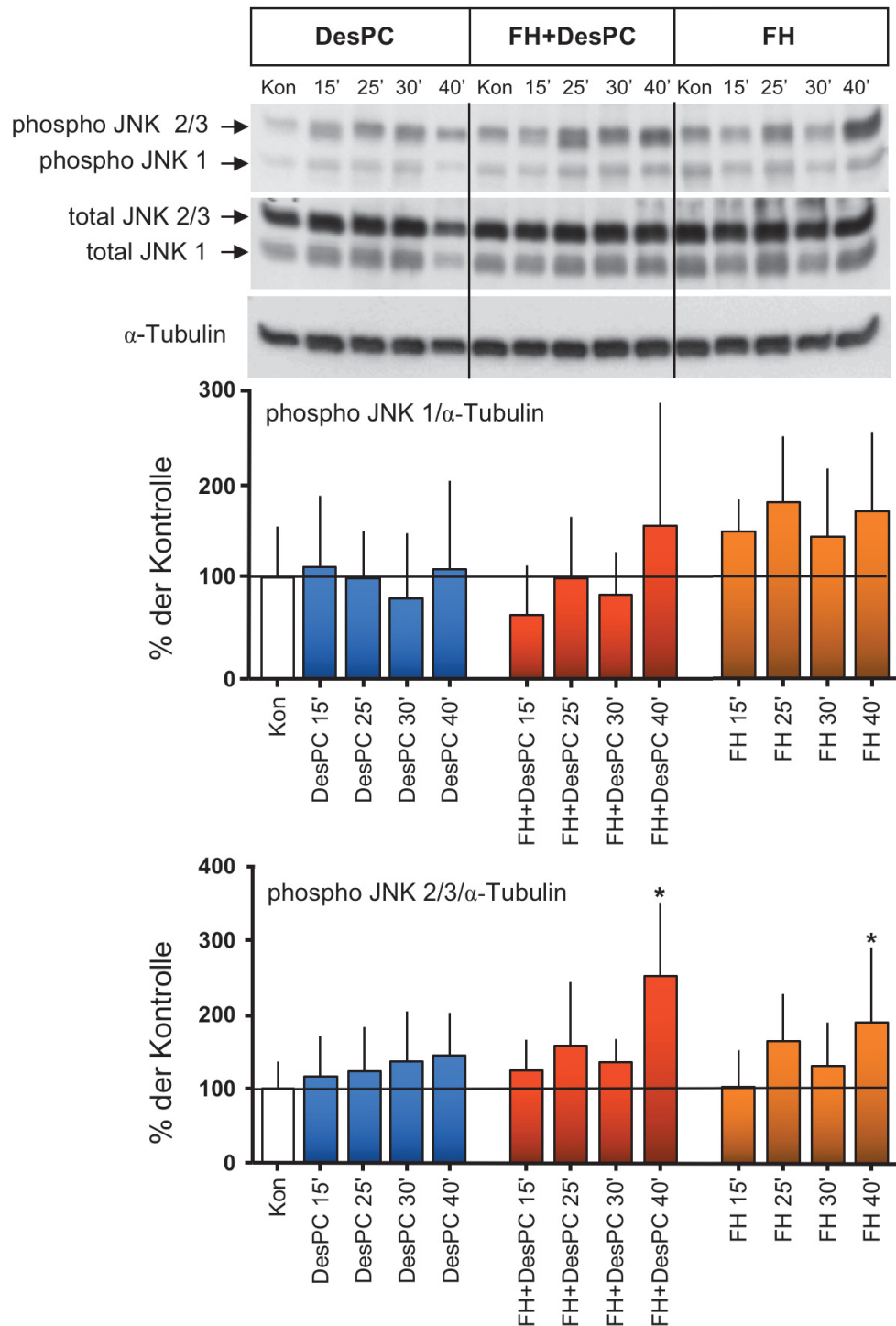


Abb. 3.5: **Ergebnisse Zeitverlauf JNK.** Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot der Kontrollen (Kon) und mit Desfluran präkonditionierten Herzen (DesPC, blaue Balken), Entnahme nach 15, 25, 30 oder 40 min. bzw. mit Desfluran präkonditionierten und hyperglykämischen Herzen (FH+DesPC, rote Balken) oder nur hyperglykämischen, nicht präkonditionierten Herzen (FH, orange Balken), jeweils $n = 3$. Oben: Ergebnisse der Densitometrie: phosphorylierte JNK 2/3 und 1, totale JNK 2/3 und 1 und der Standard α -Tubulin. Erstes Histogramm: Verhältnis phospho JNK 1 zu α -Tubulin. Zweites Histogramm: Verhältnis phospho JNK 2/3 zu α -Tubulin, jeweils angegeben in % der Kontrolle. Mittelwert $\pm$ Standardfehler. * = $p < 0.05$ vs. Kon

3.4.3 Phosphorylierung der p38 MAPK

Die Abbildung 3.6 zeigt die Ergebnisse der Messungen. Die phosphorylierte Form der p38 MAPK war nach 25 Minuten in FH+DesPC Herzen und nach 40 Minuten in FH Herzen signifikant erhöht. Zu allen anderen Zeitpunkten zeigten sich keine Signifikanzen.

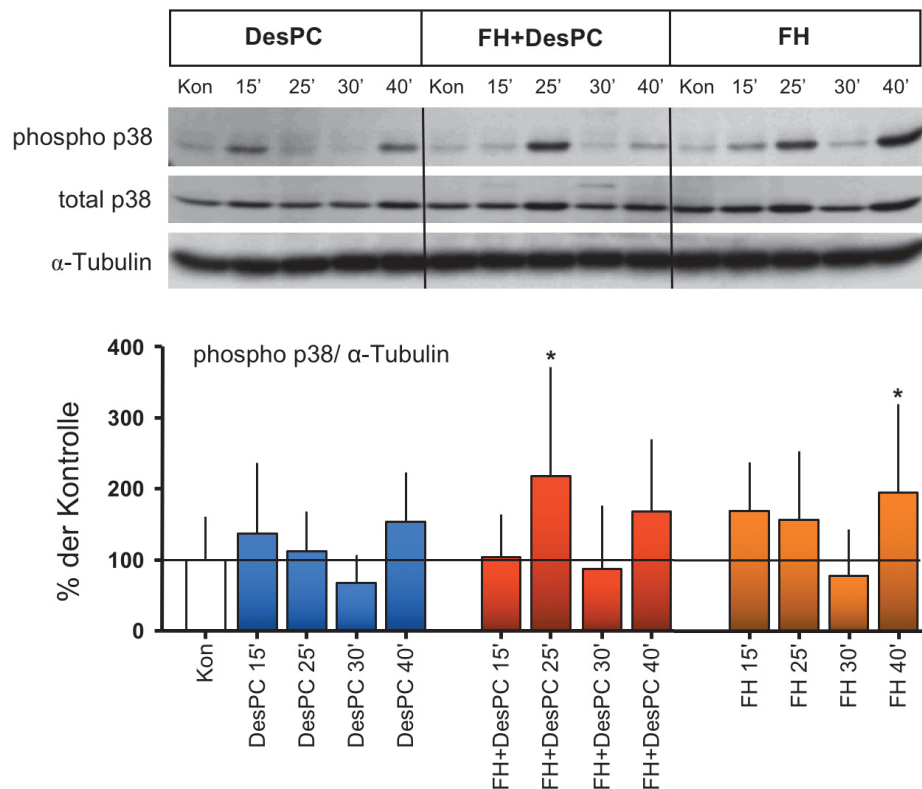


Abb. 3.6: **Ergebnisse Zeitverlauf p38.** Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot der Kontrollen (Kon) und mit Desfluran präkonditionierten Herzen (DesPC, blaue Balken), Entnahme nach 15, 25, 30 oder 40 min. bzw. mit Desfluran präkonditionierten und hyperglykämischen Herzen (FH+DesPC, rote Balken) oder nur hyperglykämischen, nicht präkonditionierten Herzen (FH, orange Balken), jeweils $n = 3$. Oben: Ergebnisse der Densitometrie: phosphorylierte p38, totale p38 und der Standard α -Tubulin. Histogramm: Verhältnis phospho p38 zu α -Tubulin, angegeben in % der Kontrolle. Mittelwert $\pm$ Standardfehler. * = $p < 0.05$ vs. Kon

Alle vorliegenden Ergebnisse wurden in Form eines *peer-reviewed* Manuskriptes im *European Journal of Pharmacology* publiziert¹⁹⁰.

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Kardioprotektion durch Desfluran-Präkonditionierung am Rattenherzen *in vivo* unter normo- und hyperglykämischen Bedingungen zu untersuchen und die Regulation der MAP-Kinasen ERK, JNK und p38 im Zeitverlauf darzustellen.

Die durch Desfluran-Präkonditionierung vermittelte kardiale Protektion wird durch Hyperglykämie blockiert. Mit dieser Arbeit gelang der Nachweis, dass die Blockade durch Hyperglykämie in der Mediatorphase (während der Ischämie) stattfindet. Hierzu wurde das Modell der durch Glukoseinfusion induzierten Hyperglykämie (Blutzuckerwerte zwischen 500 bis 600 mg dl⁻¹) verwendet.

Die Enzyme ERK, JNK und p38 vermitteln keine Kardioprotektion während Desfluran-Präkonditionierung in der frühen Phase. Früh induzierte Hyperglykämie unter Desfluran-Präkonditionierung wirkt sich auf die Kinasen unterschiedlich aus.

Für die MAP-Kinase ERK zeigt sich eine Abnahme der Phosphorylierung in der zytosolischen Fraktion der mit Desfluran präkonditionierten Herzen, der mit Desfluran präkonditionierten und hyperglykämischen Herzen und der nicht präkonditionierten hyperglykämischen Herzen (Abbildung 3.4, Seite 47). Signifikant ist diese Abnahme bei der Isoform ERK 2 nach 15, 25 und 30 min. bei normoglykämischen mit Desfluran präkonditionierten Tieren (Abbildung 3.4 unteres Histogramm, blaue Rechtecke) und nach 30 min. bei hyperglykämischen mit Desfluran präkonditionierten Tieren (Abbildung 3.4, unteres Histogramm, rote Rechtecke). Die Isoform ERK 1 zeigt tendenziell einen ähnlichen Phosphorylierungsverlauf, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen (Abbildung 3.4, oberes Histogramm).

Die Kinasen JNK und p38 werden im hyperglykämischen Myokard anders reguliert als die ERK. Hier zeigt sich eine zeitabhängige Zunahme der Phosphorylierung. Wie in Abbildung 3.5 auf Seite 49 im unteren Histogramm dargestellt, ist die Phosphorylierung der Isoform JNK 2/3 nach 40 min. bei hyperglykämischen mit Desfluran präkonditionierten Tieren (rote Rechtecke) und bei hyperglykämischen, nicht präkonditionierten Tieren (orange Rechtecke) erhöht. Für die Isoform JNK 1 zeigt der Verlauf die gleiche Tendenz, statistische Signifikanz wird jedoch nicht erreicht (Abbildung 3.5, oberes Histogramm). Der Anteil phosphorylierter p38 MAP-Kinase ist nach 25 min. in mit Desfluran präkonditionierten hyperglykämischen Herzen (Abbildung 3.6, Seite 50, rote Balken) und nach 40 min. in hyperglykämischen nicht präkonditionierten Herzen erhöht (orange Balken).

4.1 Blockade der Desfluran-Präkonditionierung durch Hyperglykämie während der Mediatorphase

Experimentelle Untersuchungen zeigen, dass hyperglykämie oder diabetische Stoffwechsellagen die schützenden Effekte einer Präkonditionierung blockieren^{78,82,185,191}, während kurzzeitiger Glukoseentzug präkonditionierend und damit organprotektiv wirkt^{192,193}. Um den negativen Effekt der Hyperglykämie zu verhindern, ist es zwingend notwendig den Mechanismus der Blockade zu verstehen. Die vier bisher vorliegenden *in vivo* Arbeiten zu diesem Thema wurden allesamt mit dem volatilen Anästhetikum Isofluran durchgeführt, drei am Hundemodell und eine Arbeit am Kaninchenmodell^{78,82,185,191}. Aussagekräftige Untersuchungen mit anderen Anästhetika oder an anderen Spezies liegen bisher nicht vor. Die vorliegenden Daten lassen leider keinen definitiven Rückschluss darauf zu, in welcher Phase die Präkonditionierung durch Hyperglykämie blockiert wird. Die Glukose wurde im Protokoll der Arbeit von Kehl *et al.* in der Triggerphase verabreicht. Weitere Messungen des Blutzuckers in der Ischämie- oder Mediatorphase fanden jedoch nicht statt. Es ist wahrscheinlich, dass die Blutzuckerwerte bei den behandelten Tieren auch in der Mediatorphase noch hoch waren. Daher kann man anhand dieser Daten nicht auf eine alleinige Blockade der Präkonditionierung durch Hyperglykämie während der Triggerphase schließen. Die vorliegende Arbeit untersucht diesen Sachverhalt über einen erweiterten Ansatz, indem die Glukose zum einen in der Trigger-, zum anderen in der Mediatorphase verabreicht wurde. Es zeigt sich, dass beide Varianten zu einer Blockade der Präkonditionierung führen. Definitiv nachgewiesen ist die Blockade durch Hyperglykämie während der Mediatorphase. Auch während Trigger- und Mediatorphase zusammen findet eine Blockade durch Hyperglykämie statt. Ob dahingegen auch isoliert in der Triggerphase ein Teil der Blockade durch Hyperglykämie stattfindet, kann mit dieser Arbeit leider nicht beantwortet werden, da die Blutzuckerwerte bis zur Mediatorphase noch nicht ausreichend abgefallen waren, um auf eine alleinige Blockade in der Triggerphase schließen zu können.

4.2 Rolle der MAPK

Bislang bleibt unklar, an welcher Stelle in der Signalkaskade die Hemmung der Präkonditionierung durch Hyperglykämie stattfindet. Eine Reihe unterschiedlicher Substrate und Mechanismen scheint hierbei beteiligt zu sein: Die endotheliale

Stickstoffmonoxid-Synthase, Stickstoffmonoxid^{194,195}, Tetrahydrobiopterin (BH₄)¹⁸⁵, mito K_{ATP}¹⁹⁶⁻¹⁹⁸ sowie die Freisetzung von Sauerstoffradikalen¹¹⁵.

Die meisten Untersuchungen, die die wichtige Rolle der mitochondrialen K_{ATP} hervorheben, können bisher nicht ausschließen, dass eine Blockade durch Hyperglykämie auch in den weiteren Schritten der komplexen Kaskade stattfindet. Eine Arbeit von del Valle *et al.* mit diabetischen Schafen konnte zeigen, dass durch akute Hyperglykämie alleine keine Aufhebung der Präkonditionierung auftritt¹⁹⁹. Dies zeigt auch eine weitere Arbeit, die bei hyperglykämischen Tieren, die seit zwei Wochen unter einem induzierten Diabetes mellitus litten, einen größeren Schutz durch Präkonditionierung vor Kammertachykardien und -flimmern nachwies als bei normoglykämischen, nicht diabetischen Tieren. Dieser Schutz war nur vorübergehend. Tiere, die 4 oder 8 Wochen diabetisch waren, hatten signifikant mehr kardiale Ereignisse und keine Kardioprotektion durch Präkonditionierung⁷⁹. Zu beachten ist, dass Studien, die Diabetes-Modelle untersuchen, sich von jenen, die akute Hyperglykämie untersuchen, unterscheiden.

Die durch die Öffnung der mito K_{ATP} freigesetzten ROS sind in der Lage, verschiedenste Kinasen zu aktivieren²⁰⁰. Neben der PKC, die nachweislich eine zentrale Rolle innerhalb des Signalweges der APC spielt^{113,129,134}, werden viele weitere Substrate bezüglich ihrer Funktion innerhalb des Signalweges untersucht, unter anderem die MAPK. Für ERK 1/2, JNK und p38 konnte eine Beteiligung bei der ischämischen Präkonditionierung nachgewiesen werden^{45,142,164}. Die Rolle dieser MAP-Kinasen während pharmakologischer Präkonditionierung wurde bislang nur wenig untersucht.

4.2.1 ERK

Die ERK wird bei der Präkonditionierung mit Isofluran (als Mediator)¹⁰⁴, Desfluran⁷³ und Xenon (in der partikulären Fraktion) im Rattenherzen aktiviert¹⁵¹. Es gibt auch Untersuchungen zum Einfluss der ERK während Isofluran-Präkonditionierung auf die Nierenfunktion²⁰¹, auf Neuroblastomzellen²⁰² und Neurone des Hippocampus²⁰³, sowie die Neuroprotektion während Sevofluran-Präkonditionierung^{204,205}. Im Rahmen der Präkonditionierung gibt es bislang keine überzeugenden Daten zum Einfluss von Hyperglykämie oder Diabetes mellitus auf die ERK. Die vorliegende Arbeit zeigt eine verminderte Phosphorylierung der ERK im Zytosol in allen drei Gruppen (DesPC, FH+DesPC, FH; Abbildung 3.4, Seite 47). Dies bestätigt die Ergebnisse von Weber *et al.*, die für die Präkonditionierung mit Xenon ebenfalls eine Abnahme der

Phosphorylierung der ERK im Zytosol, jedoch einen zeitabhängigen Anstieg derselben in der partikulären Fraktion nachweisen konnten¹⁵¹. Die partikuläre Fraktion wurde in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht untersucht, eine definitive Aussage kann bezüglich der möglichen Translokation der Kinase anhand der vorliegenden Ergebnisse also nicht getroffen werden. Auch da Silva und Kollegen konnten bei der Präkonditionierung mit Isofluran keinen Anstieg der Phosphorylierung der ERK in der Triggerphase nachweisen. Einen signifikanten Anstieg gab es erst nach Ischämie und Reperfusion (insgesamt 80 min. nach Beendigung der Isofluran-Gabe)¹⁰⁴. Es erscheint also aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeiten möglich, dass die zytosolische ERK in der Signalkaskade der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung eine Funktion als Mediator (nach der Indexischämie), nicht jedoch als Trigger einnimmt. Eine Arbeit von Toma *et al.* hingegen zeigt eine ansteigende Phosphorylierung der ERK nach Desfluran-Präkonditionierung. Hier wurde jedoch im Vergleich zur vorliegenden Untersuchung ein anderes Präkonditionierungsprotokoll verwendet und die Kontrollherzen wurden den Tieren erst nach 40 min. entnommen⁷³.

4.2.2 JNK

Bezüglich der Beteiligung der JNK, an der durch Anästhetika-induzierte Präkonditionierung vermittelten Kardioprotektion, wurden neben einer Arbeit von Weber *et al.* bislang keine überzeugenden Daten publiziert. Die genannte Arbeit konnte keine Beteiligung der stress-aktivierten Kinase während Xenon-Präkonditionierung nachweisen¹⁵¹. Einen schützenden Einfluss der JNK, allerdings auf die Nierenfunktion, durch Hemmung der Kinase während Isofluran-Präkonditionierung, wurde von Hashigushi und Kollegen nachgewiesen²⁰¹. Bisher liegen keine eindeutigen Daten zum Einfluss von Hyperglykämie auf die JNK vor. Die vorliegende Arbeit konnte eine signifikante Zunahme der Phosphorylierung der JNK 2/3 nach 40 min. bei mit FH+DesPC und mit FH alleine behandelten Herzen zeigen (Abbildung 3.5, Seite 49). Die nur leicht ansteigende Phosphorylierung bei den lediglich mit Desfluran behandelten Herzen erreichte keine Signifikanz. Dies korreliert mit den Ergebnissen früherer Arbeiten, in denen die Anästhetika-induzierte Präkonditionierung ebenfalls keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus der kardialen JNK ausübte¹⁵¹. Die JNK scheint somit keinen Einfluss als Trigger auf die Anästhetika-induzierte Präkonditionierung zu nehmen.

4.2.3 p38

Die Kardioprotektion durch Xenon-Präkonditionierung wird über die p38, ein Enzym welches in der Signaltransduktionskaskade der Präkonditionierung der PKC nachgeordnet ist, vermittelt⁶⁸. Die Präkonditionierung mit Isofluran zeigte keinen Einfluss auf die p38 in einer Untersuchung von da Silva und Kollegen¹⁰⁴, eine Arbeit von Weber *et al.* hingegen konnte eine Aktivierung der p38 nach Xenon- und Isofluran-Präkonditionierung nachweisen¹⁷⁴. Der Versuchsaufbau beider Arbeiten unterscheidet sich jedoch wesentlich. Da Silva *et al.* untersuchen in ihrer Arbeit die Anästhetika-induzierte Präkonditionierung an isolierten Rattenherzen in der Triggerphase und nach Ischämie-Reperfusion. In der Arbeit von Weber *et al.* hingegen wird ein *in vivo*-Modell verwendet und Messung der Enzymaktivität mittels Nachweis eines direkten Substrates der p38 (ATF-2) durchgeführt. Die pharmakologische Präkonditionierung mittels Adenosin und Phenylephrin (α_1 Agonist) zeigte eine Beteiligung des Adenosin- und α_1 -Rezeptors, den Beginn der Signalweiterleitung durch Öffnung der mitochondrialen K_{ATP} , eine Aktivierung der PKC und die nachfolgende Aktivierung der p38 im Signalweg²⁰⁶.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Effekte der frühen Hyperglykämie während Präkonditionierung mit Desfluran auf die p38 im Myokard. Ein eindeutiger Einfluss auf die p38 konnte nicht nachgewiesen werden. Wie auf Seite 50 in Abbildung 3.6 dargestellt, liegen, ähnlich zur Regulierung der JNK im Zeitverlauf, auch hier vereinzelt erhöhte Phosphorylierungsraten in den hyperglykämischen Gruppen vor. Signifikanz erreicht der Unterschied bei den hyperglykämischen Herzen nach 40 min. und bei den präkonditionierten und hyperglykämischen Herzen nach 25 min. Dies korreliert mit den Ergebnissen von Strniskova *et al.*, deren Untersuchung bei diabetischen Ratten ebenfalls einen Anstieg in der Phosphorylierung der zytosolischen p38 nach längerer Ischämie (30 min.) nachweisen konnte²⁰⁷. Trotz der gleichen Tendenz der Ergebnisse ist ein direkter Vergleich der Arbeiten nicht möglich, da Strniskova *et al.* isolierte Herzen mit Streptozotocin-induziertem Diabetes mellitus nach ischämischer Präkonditionierung untersucht haben, im Gegensatz zu einer durch Glukoseinfusion induzierten Hyperglykämie in der vorliegenden, *in vivo* durchgeführten Arbeit. Igarashi *et al.* untersuchten die p38 in Zellen der glatten Muskulatur der Rattenaorta und zeigten zum einen, dass durch Glukoseinfusion induzierte Hyperglykämie zu einem zeitabhängigen Anstieg der p38 Aktivität führt, zum anderen, eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung der p38, 6 Wochen nach Streptozotocin-induziertem Diabetes mellitus²⁰⁸. Die Ergebnisse der zahlreichen Untersuchungen der p38 stehen teilweise in

Widerspruch zueinander. Dies mag zum einen an dem unterschiedlichen Studiendesign der verschiedenen Arbeiten liegen: Es werden Zellkulturen oder isoliert perfundierte Organe untersucht oder Versuche *in vivo* durchgeführt. Der präkonditionierende Stimulus unterscheidet sich in den Arbeiten hinsichtlich seiner Art (ischämische vs. Anästhetika-induzierte Präkonditionierung) und Konzentration (bei Anästhetika-induzierter Präkonditionierung) bzw. Dauer (bei ischämischer Präkonditionierung) der Verabreichung. Die Hyperglykämie besteht in den verschiedenen Arbeiten unterschiedlich lange und wird durch verschiedene Methoden induziert. Die Regulierung der Kinase wird durch Bestimmung der Enzymaktivität oder anhand der Phosphorylierung gemessen. Zum anderen könnten die widersprüchlichen Ergebnisse auch Resultat unterschiedlicher Aktivierung der verschiedenen Isoformen (α , β , γ und δ) der p38 sein, die unterschiedliche biologische Funktionen innehaben könnten (siehe Kapitel 1.4.3 mitogen-aktivierte Proteinkinasen, Seite 19-20). Die beschriebenen Arbeiten sowie die vorliegende Arbeit gehen jedoch leider nicht näher auf die Wirkweisen der unterschiedlichen Isoformen ein. Die gezielte Aktivierung oder Hemmung der einzelnen p38-Isoformen müsste in weiteren Studien untersucht werden, um die Rolle der p38 im Rahmen der Desfluran-Präkonditionierung mit oder ohne Hyperglykämie besser zu verstehen.

Letztlich bleibt bislang der Endeffektor, also das Substrat, das für die Blockade der Präkonditionierung durch Hyperglykämie bzw. Diabetes mellitus verantwortlich ist, unbekannt. Nicht ausschließen sollte man die Wechselwirkung verschiedener Mechanismen. Die Vielfalt der bisher nachweislich involvierten Substanzen lässt immer unwahrscheinlicher erscheinen, dass nur ein einzelner Effektor für die Blockade verantwortlich ist.

4.3 Methodenkritik

Eine Einschränkung dieser Arbeit ist die mangelnde Beurteilbarkeit der Blockade der Präkonditionierung durch Hyperglykämie isoliert in der Triggerphase. In der vorliegenden Arbeit wurde die Glukose zwar zum einen in der Trigger-, zum anderen in der Mediatorphase verabreicht, wir können jedoch anhand der vorliegenden Ergebnisse dennoch nicht ausschließen, dass Hyperglykämie alleine während der Triggerphase, ebenfalls eine Blockade hervorrufen kann. Die Blutzuckerwerte waren bei unseren Untersuchungen bis zur Mediatorphase noch nicht ausreichend abgefallen, um beide Phasen getrennt beurteilen zu können. Zur Klärung dieses

Sachverhaltes bedarf es weiterer Untersuchungen, die einer isolierten Hyperglykämie in der Trigger- und einer Normoglykämie in der Mediatorphase bedürfen. Eine Umsetzung im *in vivo* Modell erscheint jedoch schwierig, da eine rapide Blutzuckersenkung innerhalb kürzester Zeit kaum möglich sein wird, ohne durch Nebeneffekte das empfindliche physiologische Gleichgewicht der Versuchstiere zu stören. Eine Blutzuckersenkung durch Insulin könnte zum Beispiel Hypoglykämien, Elektrolytstörungen und Osmolaritätsschwankungen verursachen, die das Ergebnis beeinflussen und die Aussagekraft limitieren könnten. Alternativ könnte die Glukosezufuhr während der Triggerphase vorzeitig beendet werden. Dies würde jedoch bewirken, dass die Tiere nur für einen Teil der Triggerphase und nicht während der gesamten Triggerphase hyperglykäm sind. Findet die hyperglykämiebedingte Blockade erst am Ende der Triggerphase statt, so würde dies durch ein solches Protokoll nicht erfasst werden. Ein *in vitro* Modell könnte möglicherweise hilfreicher für die Beantwortung dieser wichtigen Frage sein.

Zur Induktion der Hyperglykämie verwendeten wir in der vorliegenden Arbeit eine Infusion von Glukose 50%. Die Infusionsrate zu Beginn der jeweiligen Versuche betrug 1 ml/h, Messungen der Blutglukose wurden dem Protokoll gemäß alle 5 min. durchgeführt. Die Glukosezufuhr wurde jeweils entsprechend der gemessenen Werte angepasst. Die gemessenen Werte 5 min. nach Beginn der Glukoseinfusion lagen alle über 500 mg dl⁻¹. Vereinzelt wurden über die Versuchsdauer Werte von über 600 mg dl⁻¹ erreicht. Eine genauere Differenzierung der Werte über 600 mg dl⁻¹ war leider nicht möglich, da das verwendete Blutzuckermessgerät Werte über 600 mg dl⁻¹ nicht mehr als Einzelwert angeben konnte. Es besteht somit die Möglichkeit, dass vereinzelt Werte wesentlich höher als 600 mg dl⁻¹ waren. Tanaka *et al.* zeigten ein dosisabhängiges Verhältnis zwischen Blutglukosekonzentration und Größe des Infarktareals und postulierten, dass schwere Hyperglykämien einen größeren myokardialen Schaden verursachen als moderate Hyperglykämien⁸². In der vorliegenden Arbeit wurde bei den entsprechenden Tieren eine schwere Hyperglykämie mit einem Ziel von 400 bis 600 mg dl⁻¹ Blutglukose induziert. Frühere Arbeiten, in denen der Einfluss der Blutglukose auf die ischämische und Anästhetika-induzierte Präkonditionierung untersucht wurde, verwendeten ähnliche Blutglukoselevel⁷⁶⁻⁷⁸. Auch in diesen Arbeiten wurde die Glukose über eine intravenöse Infusion verabreicht. Grundsätzlich kann Hyperglykämie auch durch andere Modelle erzeugt werden. In vielen Arbeiten wurden Tiere mit chronischer Hyperglykämie bei Diabetes mellitus untersucht. Die Induktion des Diabetes mellitus Typ 1 kann über Verabreichung chemischer Substanzen wie Streptozotozin oder Alloxan erfolgen.

Diese Medikamente verursachen eine Zerstörung der insulinproduzierenden Betazellen des Pankreas und lösen somit einen Insulinmangeldiabetes aus. Wie Tosaki und Kollegen zeigen konnten, scheint die Höhe des Blutglukosespiegels dabei abhängig von der Dauer des induzierten Diabetes mellitus zu sein. Je länger der Diabetes mellitus Typ 1 bestand, desto höher war die gemessene Plasmaglukose der Tiere⁷⁹. Die verschiedenen Zeitpunkte der Versuchsdurchführung nach Diabetesinduktion könnten ein Grund für die sehr unterschiedlichen Ergebnisse bei der Infarktgrößenbestimmung bei diabetischen Tiermodellen sein. Als weiterer ergebnisbeeinflussender Faktor wird der Insulinplasmaspiegel diskutiert. Dieser ist in den Tiermodellen mit induziertem Diabetes mellitus Typ 2 (Hyperinsulinämie bei Insulinresistenz) deutlich erhöht gegenüber normoglykämischen Tieren und Tieren mit Diabetes mellitus Typ 1 (absoluter Insulinmangel). Die meisten der Arbeiten, die den Diabetes mellitus Typ 2 am Tiermodell untersuchen, kommen zu dem Ergebnis einer Infarktgrößenreduktion nach Ischämie-Reperfusion. Jedoch liegen auch hierzu Ergebnisse vor, die keine Kardioprotektion nachweisen. Eine gute Übersicht über die Arbeiten, die Diabetes mellitus und Hyperglykämie im Zusammenhang mit Ischämie-Reperfusion untersuchen, bietet der Artikel von Miki und Kollegen²⁰⁹.

Die hämodynamischen Variablen der hyperglykämischen Tiere unterscheiden sich während unserer Versuche nicht von denen der Kontrolltiere (dargestellt in den Abbildungen 3.2.1 und 3.2.2 auf Seite 44-45). Aortendruck und Herzfrequenz erreichen lediglich bei den (normo- und hyperglykämischen) mit Desfluran präkonditionierten Tieren eine andere Tendenz. Die Parameter werden folglich somit durch Desfluran, nicht jedoch durch Hyperglykämie beeinflusst.

Glukose 50% bewirkt neben einer Hyperglykämie auch eine Osmolalitätssteigerung. Inwiefern sich die Veränderung der Osmolalität auf die durch Anästhetika-Präkonditionierung induzierte Kardioprotektion auswirkt ist unbekannt. Kersten und Mitarbeiter konnten keine Wirkung einer Osmolalitätsveränderung während früher ischämischer Präkonditionierung nachweisen⁸¹, somit erscheint ein Einfluss auf die Anästhetika-induzierte Präkonditionierung ebenfalls wenig wahrscheinlich.

Die vorliegende Arbeit untersucht die kardiale ERK, JNK und p38 im Zeitverlauf, um anhand der Phosphorylierungsraten dieser MAPK Unterschiede zwischen den mit Desfluran behandelten und hyperglykämischen Tieren und nur hyperglykämischen Tieren zu ermitteln. Alle drei Kinasen werden bekanntermaßen durch Ischämie und Reperfusion beeinflusst und sind an der durch ischämische Präkonditionierung vermittelten Kardioprotektion beteiligt^{45,142,164}. Auch bei der Anästhetika-induzierten

Präkonditionierung spielen die MAPK ERK und p38 eine Rolle^{68,73,151}. Bezüglich der JNK liegen bislang kaum aussagekräftige Untersuchungen vor. Wir sind somit vor Beginn unserer Untersuchungen davon ausgegangen, dass die untersuchten MAPK ebenfalls an der Präkonditionierung mit Desfluran beteiligt sind. Ziel war es herauszufinden, welche Rolle die jeweilige MAPK im Zusammenhang mit Hyperglykämie im Zeitverlauf einnimmt. Wie sich letztlich durch unsere Untersuchungen zeigte, scheint von den MAPK lediglich die ERK 2 durch die Präkonditionierung mit Desfluran beeinflusst zu werden (siehe Abbildung 3.4). Signifikante Änderungen der Phosphorylierung der JNK und p38 zeigen sich im untersuchten Zeitverlauf nicht (Abbildung 3.5 und 3.6). Retrospektiv hätte sich hierfür zunächst die Durchführung einer Voruntersuchung angeboten, die lediglich den Einfluss der Desfluran-Präkonditionierung unabhängig von der Hyperglykämie untersucht hätte, um zu verhindern, dass Gruppen untersucht werden, die im Nachhinein betrachtet, unbeteiligt sind. Andererseits wäre dann nicht aufgefallen, dass auch ohne Einfluss der alleinigen Desfluran-Präkonditionierung auf die jeweilige Kinase Veränderungen im Phosphorylierungsmuster in den hyperglykämischen Gruppen vorkommen können und die Untersuchung der MAPK wäre unvollständig geblieben. Unser Vorgehen erklärt sich zudem dadurch, dass eine adäquate Randomisierung der Tiere in die jeweiligen Gruppen nur mit Einschränkungen möglich gewesen wäre.

Um die notwendige Präkonditionierung hervorzurufen, haben wir in dieser Arbeit das volatile Anästhetikum Desfluran verwendet. Für Desfluran konnte bereits in verschiedenen Untersuchungen die Potenz zur kardialen Präkonditionierung nachgewiesen werden^{65,70-73,210}. Das Anästhetikum, als präkonditionierender Stimulus, darf definitionsgemäß während der Ischämiephase nicht mehr im Gewebe vorhanden sein. Desfluran besitzt die geringste Blut- und Gewebelöslichkeit aller volatilen Anästhetika und somit ist die Wahrscheinlichkeit, dass das Anästhetikum in der vorliegenden Arbeit bis zur Ischämiephase aus dem Gewebe eliminiert war, aufgrund der zugrunde liegenden Kinetik des Anästhetikums recht hoch. Sicherheitshalber erfolgte jedoch nach jeder Desflurangabe eine 10-minütige Auswaschphase. Eine Messung des myokardialen Gasgehaltes zur Objektivierung konnte nicht stattfinden. Die Metabolisierungsrate des Desflurans ist jedoch im Vergleich zu anderen gasförmigen Anästhetika gering. Nur 0,02% der applizierten Menge werden in der Leber metabolisiert, der übrige Anteil wird im Rahmen des Gasaustausches über die Lunge eliminiert. Die Verabreichung von Desfluran kann kardiovaskuläre Nebenwirkungen durch eine sympathoadrenerge Stimulation (Herzfrequenzanstieg, Vasodilatation mit Abnahme des peripheren Gefäßwiderstandes und Blutdruckabfall)

hervorrufen. Aus diesem Grunde fand die kontinuierliche Messung von Blutdruck und Herzfrequenz während der Versuche statt.

In der vorliegenden Arbeit wurde Desfluran nicht als Narkosemittel sondern rein zur Präkonditionierung in einer Konzentration von 1 MAC in maximal zwei Gaben zu je 5 min. verabreicht. Dieses Protokoll hat sich bereits in vorherigen Studien mit Desfluran bewährt⁷³. Eine andere Untersuchung aus dem Jahr 2004 zeigt für die Anwendung von 1 MAC Desfluran ebenfalls eine signifikante Infarktgrößenreduktion und zwar unabhängig davon, ob Desfluran vor, während oder nach der Ischämie oder über die gesamte Dauer hinweg verabreicht wird²¹¹. Kehl und Kollegen veröffentlichten eine Präkonditionierungsuntersuchung, in der die kontinuierliche mit der repetitiven Gabe von 0.5, 1.0 und 1.5 MAC Desfluran verglichen wurde. Allein die kontinuierliche Gabe von 0.5 MAC über 30 min. erbrachte keine Infarktgrößenreduktion, im Gegensatz zur kontinuierlichen Gabe von 1.0 oder 1.5 MAC oder zur wiederholten Verabreichung aller getesteten Konzentrationen (3 x 10 min. jeweils unterbrochen durch 10 min. Auswaschphase). Mit Ausnahme der Ersten führten alle übrigen Versuchsanordnungen zu einer vergleichbaren signifikanten Infarktgrößenreduktion; die Erhöhung der Konzentration oder eine längere Verabreichung der jeweiligen Konzentration verbesserte den Effekt nicht weiter⁷⁰. Trotz des Unterschiedes zu unserer Arbeit (2 x 5 min. Desfluran) weist das Ergebnis darauf hin, dass auch das hier vorliegende Protokoll einen maximalen präkonditionierenden Effekt auszulösen vermag. Die Desflurangabe in mehr als zwei Zyklen, länger anhaltender Verabreichung oder veränderter Konzentration wurde jedoch in dieser Arbeit nicht untersucht.

Wir konnten jeweils zum Zeitpunkt der Desfluranverabreichung einen Abfall von Blutdruck und Herzfrequenz feststellen. Dies lässt darauf schließen, dass die Verabreichung des Anästhetikums zu keiner sympathotonen Reaktion des kardiovaskulären Systems führte. Blutdruck und Herzfrequenz der Tiere erholten sich in den Auswaschphasen zügig und waren zum Zeitpunkt der Indexischämie wieder auf dem gleichen Niveau wie in den übrigen Gruppen. Es ist unwahrscheinlich, dass die arterielle Hypotension und der Abfall der Herzfrequenz während der Desfluranapplikationen für die Kardioprotektion verantwortlich sind, da dies auch die mit Desfluran präkonditionierten hyperglykämischen Tiere betraf, bei denen keine Kardioprotektion gezeigt werden konnte. Eine direkte Übertragung vom Tiermodell auf den klinischen Alltag ist jedoch nicht möglich, insbesondere da bei den Versuchstieren keinerlei kardiale Vorerkrankungen bestanden.

Von der Vielfalt möglicher Störfaktoren bei experimentellen Versuchen können einige in dieser Arbeit ausgeschlossen werden. So bleibt die Präkonditionierung der Tiere *in vivo* bei Verwendung von S-Ketamin, welches wir zur Narkoseeinleitung verwendet haben, nachweislich unbeeinträchtigt²¹², ebenso die Wirkung von S-Ketamin auf die untersuchten Enzyme. Dies konnte bereits zuvor durch Western Blot Analysen, die S-Ketamin behandelte und nicht behandelte Tiere verglichen, ausgeschlossen werden¹⁷⁴.

4.4 Translationelle Aspekte

Versucht man die experimentellen Daten in einen klinischen Kontext einzuordnen, so ist zu berücksichtigen, dass eine Übertragung der Ergebnisse aus Arbeiten mit Tiermodellen auf den Menschen nicht ohne weiteres möglich ist. Die Tiere sind in der überwiegenden Zahl der Arbeiten jung und gesund, Multimorbidität und regelmäßige Medikamenteneinnahme oder Risikofaktoren kommen nicht vor. Der Myokardinfarkt wird in der vorliegenden Arbeit künstlich, an einem gesunden Herzen mit gesunden Koronarien, herbeigeführt, ebenso die Reperfusion. Im Gegensatz dazu, bestehen bei Patienten, die im Laufe ihres Lebens einen Herzinfarkt erleiden, in der Regel schon lange vor dem akuten ischämischen Ereignis atherosklerotische Gefäßveränderungen und endotheliale Funktionseinschränkungen, initial meist ohne klinische Symptome bei den Patienten. Oft sind die Patienten zudem weiteren Risikofaktoren, die das Fortschreiten einer KHK begünstigen, wie arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus, Rauchen und Hypercholesterinämie ausgesetzt.

Die meisten klinischen Arbeiten, die die kardioprotektive Wirkung volatiler Anästhetika untersuchen, wurden bei Patienten durchgeführt, die sich einer koronaren Bypassoperation unterziehen mussten und damit dem Risiko einer perioperativen Myokardischämie unterlagen. Als möglicher Nachteil für die Anwendung der Anästhetika bei koronarkranken Patienten wurde das Risiko kardiovaskulärer Nebenwirkungen durch sympathoadrenerge Stimulation diskutiert. Zahlreiche klinische Studien haben mittlerweile die Anwendung von Desfluran auf herzkranken Patienten untersucht und konnten die Bedenken gegen den Einsatz dieses Anästhetikums bei kardial vorerkrankten Patienten verringern. De Hert und Kollegen veröffentlichten 2003 eine Arbeit über kardiochirurgische Hochrisikopatienten (>70 Jahre, 3-Gefäßkrankheit, Ejektionsfraktion <50%), die eine Bypass-Operation erhielten. Im Vergleich zur Propofolgruppe zeigten die Patienten mit Sevo- oder Desfluran-Anästhesie eine bessere linksventrikuläre Funktion und einen geringeren Myokardschaden

postoperativ⁸⁸. But und Kollegen zeigten, dass es keine hämodynamischen Unterschiede bei Bypass-Patienten gab, die entweder Desfluran und Fentanyl oder Midazolam und Fentanyl erhielten. Nach Anwendung von Desfluran konnten die Patienten im Durchschnitt schneller extubiert und zügiger von der Intensivstation entlassen werden²¹³. Zwei weitere klinische Arbeiten vergleichen Desfluran, Isofluran und Sevofluran in Bezug auf die linksventrikuläre diastolische Relaxation. Dabei scheinen die drei Anästhetika keine nachteiligen Effekte bei Gesunden oder Patienten mit früher diastolischer Dysfunktion hervorzurufen. Bei allen Patienten war die Nachlast signifikant reduziert und die linksventrikuläre Funktion verbessert. Allerdings konnten in der Arbeit bei gesunden Patienten Hinweise für eine Beeinträchtigung der späten diastolischen Füllung des Ventrikels während der Vorhofkontraktion gefunden werden^{214,215}. Zusammenfassend scheinen alle drei volatilen Anästhetika kaum hämodynamisch relevante Nebenwirkungen hervorzurufen und erweisen sich auch im klinischen Einsatz als potente Kardioprotektoren.

Die beschriebenen Arbeiten verwenden Desfluran zur Basisnarkose, nicht jedoch als präkonditionierenden Stimulus. Meco und Kollegen setzten Desfluran in ihrer Untersuchung bei koronarkranken Patienten als präkonditionierenden Stimulus ein und konnten eine Reduktion der myokardialen Nekrose und eine Verbesserung der kardialen Funktion postoperativ nachweisen²¹⁶. Präkonditionierung mit den volatilen Anästhetika Iso- und Sevofluran konnte bei Patienten teilweise kardioprotektive Effekte hervorrufen, teilweise erbrachte die Präkonditionierung keinen Schutz. Ähnlich wie bei den tierexperimentellen Untersuchungen ist auch hier davon auszugehen, dass die Kardioprotektion von dem verwendeten Präkonditionierungsprotokoll abhängt. So konnte eine Untersuchung von Fräßdorf *et al.* nachweisen, dass die einmalige Verabreichung von Sevofluran über fünf Minuten bei Patienten vor koronarer Bypassoperation keine kardioprotektiven Effekte hatte, die zweimalige Sevoflurangabe den myokardialen Schaden jedoch signifikant reduzierte⁹³. Bein und Kollegen verglichen die kontinuierliche Sevofluranverabreichung vor Beginn des kardiopulmonalen Bypasses, gegenüber der zweimaligen intermittierenden Gabe (Präkonditionierung) und konnten ebenfalls eine Kardioprotektion bei zyklischer Verabreichung nachweisen²¹⁷. Dies deckt sich mit der Erkenntnis aus tierexperimentellen Studien, dass die Präkonditionierung durch wiederholte Verabreichung des Stimulus eine sicherere Kardioprotektion hervorruft als die einmalige Verabreichung⁷⁰.

In der Klinik leidet ein großer Teil der koronarkranken Patienten zusätzlich unter erhöhten Blutzuckerwerten. Wie Untersuchungen zeigten, haben viele dieser Patienten einen Diabetes mellitus Typ 2 oder eine verminderte Glukosetoleranz ohne Kenntnis davon zu haben (siehe Kapitel 1.1.2 Diabetes mellitus und Hyperglykämie). Das in dieser Arbeit verwendete Modell, der durch Glukoseinfusion induzierten Hyperglykämie, soll der durch verminderte Glukosetoleranz und Stress ausgelösten Hyperglykämie bei Patienten mit Myokardinfarkt nahe kommen. Hyperglykämie ist nicht nur in Tiermodellen, sondern auch bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt und koronarer Bypassoperation mit einer erhöhten Morbidität und Letalität assoziiert²¹⁸. Die Relevanz eines adäquaten Blutglukosemanagements ist in der Klinik schon lange bekannt. Die von der Gesellschaft für Thoraxchirurgie herausgegebenen Empfehlungen sehen während und nach einem herzchirurgischen Eingriff eine Senkung der Blutglukose auf unter 180 mg/dL vor²¹⁸.

4.5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit weist keine Beeinflussung der drei untersuchten MAPK während der Präkonditionierung mit Desfluran nach. Interessant erscheint, dass eine Aktivierung der JNK und der p38 nach längerer Hyperglykämie stattfindet. Welchen Weg diese Aktivierung nimmt und welchen Mechanismus sie letztlich auszulösen vermag, bleibt unklar. Es ist vorstellbar, dass die stress-aktivierten Proteinkinasen nach längerer Hyperglykämie in der Zelle Apoptose induzieren; es ist jedoch auch denkbar, dass Hyperglykämie über einen gewissen Zeitraum einen protektiven Effekt auslöst. Denn wie beschrieben, löst eine Diabetesmanifestation auch eine gewisse Protektion aus²⁰⁷. Ein „schützendes Fenster“, das möglicherweise eine halbe bis eine Stunde nach Hyperglykämie beginnt und fraglich bis zu Wochen anhält, wäre somit vorstellbar und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Zudem ist die weitere Erforschung der Trigger und Mediatoren der Signalkaskade notwendig, um letztlich den Endpunkt der Blockade der Präkonditionierung durch Hyperglykämie zu identifizieren und damit Mechanismen zu entwickeln, die die negativen Effekte einer Hyperglykämie auf die Kardioprotektion durch Präkonditionierung ausschalten oder umgehen und diese Mechanismen schließlich klinisch einsetzbar zu machen.

4.6 Schlussfolgerung

Die Kardioprotektion durch Desfluran-Präkonditionierung wird während der Mediatorphase oder während Trigger- und Mediatorphase durch Hyperglykämie blockiert. Eine Aktivierung der mitogen-aktivierten Proteinkinasen findet trotz mangelnder Kardioprotektion während Hyperglykämie statt. Die Ergebnisse lassen unwahrscheinlich erscheinen, dass Veränderungen im Phosphorylierungsmuster der MAPK für die mangelnde Protektion während Hyperglykämie verantwortlich sind. Somit muss vermutet werden, dass die Blockade der Präkonditionierung durch Hyperglykämie nicht auf dieser molekularen Ebene, sondern in einer anderen Signalkaskade stattfindet, oder aber, dass der Blockademechanismus zwar in dieser Signalkaskade, jedoch distal der Ebene der MAPK vermittelt wird.

5. Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland 2012. Wiesbaden; 2013.
2. Chambless L, Keil U, Dobson A, et al. Population Versus Clinical View of Case Fatality From Acute Coronary Heart Disease : Results From the WHO MONICA Project 1985–1990. *Circulation* 1997;96:3849-59.
3. American Diabetes Association - Standards of medical care in diabetes 2012. *Diabetes Care* 2012;35 Suppl 1:S11-63.
4. Hauner H. DiabetesDE. Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2011. Diabetesepidemie und Dunkelziffer.
5. International Diabetes Federation: IDF Diabetes Atlas. Sixth ed; 2013.
6. Rathmann W, Haastert B, Icks A, et al. High prevalence of undiagnosed diabetes mellitus in Southern Germany: target populations for efficient screening. The KORA survey 2000. *Diabetologia* 2003;46:182-9.
7. Umpierrez GE, Isaacs SD, Bazargan N, You X, Thaler LM, Kitabchi AE. Hyperglycemia: an independent marker of in-hospital mortality in patients with undiagnosed diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:978-82.
8. Blake DR, Meigs JB, Muller DC, Najjar SS, Andres R, Nathan DM. Impaired glucose tolerance, but not impaired fasting glucose, is associated with increased levels of coronary heart disease risk factors: results from the Baltimore Longitudinal Study on Aging. *Diabetes* 2004;53:2095-100.
9. Brunner EJ, Shipley MJ, Witte DR, Fuller JH, Marmot MG. Relation between blood glucose and coronary mortality over 33 years in the Whitehall Study. *Diabetes Care* 2006;29:26-31.
10. Meigs JB, Nathan DM, D'Agostino RB, Sr., Wilson PW. Fasting and postchallenge glycemia and cardiovascular disease risk: the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care* 2002;25:1845-50.
11. O'Keefe JH, Bell DS. Postprandial hyperglycemia/hyperlipidemia (postprandial dysmetabolism) is a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol* 2007;100:899-904.
12. Rodriguez BL, Lau N, Burchfiel CM, et al. Glucose intolerance and 23-year risk of coronary heart disease and total mortality: the Honolulu Heart Program. *Diabetes Care* 1999;22:1262-5.
13. Coutinho M, Gerstein HC, Wang Y, Yusuf S. The relationship between glucose and incident cardiovascular events. A metaregression analysis of published data from 20 studies of 95,783 individuals followed for 12.4 years. *Diabetes Care* 1999;22:233-40.
14. Gerstein HC, Pais P, Pogue J, Yusuf S. Relationship of glucose and insulin levels to the risk of myocardial infarction: a case-control study. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:612-9.
15. Yamasa T, Ikeda S, Koga S, et al. Evaluation of glucose tolerance, postprandial hyperglycemia and hyperinsulinemia influencing the incidence of coronary heart disease. *Intern Med* 2007;46:543-6.
16. Lankisch M, Futh R, Schotes D, et al. High prevalence of undiagnosed impaired glucose regulation and diabetes mellitus in patients scheduled for an elective coronary angiography. *Clin Res Cardiol* 2006;95:80-7.
17. Takei Y, Tomiyama H, Tanaka N, Yamashina A. Close relationship between sympathetic activation and coronary microvascular dysfunction during acute hyperglycemia in subjects with atherosclerotic risk factors. *Circ J* 2007;71:202-6.
18. Drechsler K, Fikenzer S, Sechtem U, et al. The Euro Heart Survey - Germany: diabetes mellitus remains unrecognized in patients with coronary artery disease. *Clin Res Cardiol* 2008;97:364-70.
19. Mizock BA. Alterations in fuel metabolism in critical illness: hyperglycaemia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2001;15:533-51.
20. Soler NG, Frank S. Value of glycosylated hemoglobin measurements after acute myocardial infarction. *JAMA* 1981;246:1690-3.

21. Bolk J, van der Ploeg T, Cornel JH, Arnold AE, Sepers J, Umans VA. Impaired glucose metabolism predicts mortality after a myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2001;79:207-14.
22. Goyal A, Mahaffey KW, Garg J, et al. Prognostic significance of the change in glucose level in the first 24 h after acute myocardial infarction: results from the CARDINAL study. *Eur Heart J* 2006;27:1289-97.
23. Hadjadj S, Coisne D, Mauco G, et al. Prognostic value of admission plasma glucose and HbA in acute myocardial infarction. *Diabet Med* 2004;21:305-10.
24. Malmberg K, Norhammar A, Wedel H, Ryden L. Glycometabolic state at admission: important risk marker of mortality in conventionally treated patients with diabetes mellitus and acute myocardial infarction: long-term results from the Diabetes and Insulin-Glucose Infusion in Acute Myocardial Infarction (DIGAMI) study. *Circulation* 1999;99:2626-32.
25. Sewdarsen M, Vythilingum S, Jialal I, Becker PJ. Prognostic importance of admission plasma glucose in diabetic and non-diabetic patients with acute myocardial infarction. *Q J Med* 1989;71:461-6.
26. Stranders I, Diamant M, van Gelder RE, et al. Admission blood glucose level as risk indicator of death after myocardial infarction in patients with and without diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 2004;164:982-8.
27. Timmer JR, van der Horst IC, Ottervanger JP, et al. Prognostic value of admission glucose in non-diabetic patients with myocardial infarction. *Am Heart J* 2004;148:399-404.
28. Bellodi G, Manicardi V, Malavasi V, et al. Hyperglycemia and prognosis of acute myocardial infarction in patients without diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 1989;64:885-8.
29. Burden AC, Kupfer R, Davies MK, Pohl JE. Blood-sugar and prognosis of myocardial infarction. *Lancet* 1978;1:820-1.
30. Lakhdar A, Stromberg P, McAlpine SG. Prognostic importance of hyperglycaemia induced by stress after acute myocardial infarction. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1984;288:288.
31. Capes SE, Hunt D, Malmberg K, Gerstein HC. Stress hyperglycaemia and increased risk of death after myocardial infarction in patients with and without diabetes: a systematic overview. *Lancet* 2000;355:773-8.
32. Oswald GA, Corcoran S, Yudkin JS. Prevalence and risks of hyperglycaemia and undiagnosed diabetes in patients with acute myocardial infarction. *Lancet* 1984;1:1264-7.
33. Norhammar A, Tenerz A, Nilsson G, et al. Glucose metabolism in patients with acute myocardial infarction and no previous diagnosis of diabetes mellitus: a prospective study. *Lancet* 2002;359:2140-4.
34. Suleiman M, Hammerman H, Boulous M, et al. Fasting glucose is an important independent risk factor for 30-day mortality in patients with acute myocardial infarction: a prospective study. *Circulation* 2005;111:754-60.
35. van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, et al. Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N Engl J Med* 2001;345:1359-67.
36. Jennings RB, Reimer KA. The Cell Biology of Acute Myocardial Ischemia. *Annual Review of Medicine* 1991;42:225-46.
37. Grace P, Mathie RT. Ischaemia Reperfusion Injury. In. London: Blackwell Science Ltd; 1999.
38. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000;190:255-66.
39. Lucchesi B. Modulation of Leukocyte-mediated myocardial reperfusion injury. *Annu Rev Physiol* 1990;52:561-76.
40. Rounds S, Farber HW, Render ML, Barnard FA. Effects of Hypoxia and Hypercarbia on Cultured Endothelial Cells. *Chest* 1988;93:156S-7S.
41. Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int* 1999;49:91-102.

42. Romson J, Hook B, Kunkel S, Abrams G, Schork M, Lucchesi B. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation* 1983;67:1016-23.
43. Evers AS, Murphree S, Saffitz JE, Jakschik BA, Needleman P. Effects of endogenously produced leukotrienes, thromboxane, and prostaglandins on coronary vascular resistance in rabbit myocardial infarction. *The Journal of Clinical Investigation* 1985;75:992-9.
44. Granger DN. Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation* 1999;6:167-78.
45. Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* 2003;83:1113-51.
46. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H579-88.
47. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-36.
48. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation* 2001;104:2981-9.
49. Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2. *Circulation* 2001;104:3158-67.
50. Shiki K, Hearse DJ. Preconditioning of ischemic myocardium: reperfusion-induced arrhythmias. *Am J Physiol* 1987;253:H1470-6.
51. Vegh A, Komori S, Szekeres L, Parratt JR. Antiarrhythmic effects of preconditioning in anaesthetised dogs and rats. *Cardiovasc Res* 1992;26:487-95.
52. Bolli R, Manchikalapudi S, Tang XL, et al. 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.
53. Arstall MA, Zhao YZ, Hornberger L, et al. Human ventricular myocytes in vitro exhibit both early and delayed preconditioning responses to simulated ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:1019-25.
54. Baxter GF, Marber MS, Patel VC, Yellon DM. Adenosine receptor involvement in a delayed phase of myocardial protection 24 hours after ischemic preconditioning. *Circulation* 1994;90:2993-3000.
55. 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.
56. Qiu Y, Tang XL, Park SW, Sun JZ, Kalya A, Bolli R. The early and late phases of ischemic preconditioning: a comparative analysis of their effects on infarct size, myocardial stunning, and arrhythmias in conscious pigs undergoing a 40-minute coronary occlusion. *Circ Res* 1997;80:730-42.
57. 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.
58. Rizvi A, Tang XL, Qiu Y, et al. Increased protein synthesis is necessary for the development of late preconditioning against myocardial stunning. *Am J Physiol* 1999;277:H874-84.
59. Wartier DC, al-Wathiqui MH, Kampine JP, Schmeling WT. Recovery of contractile function of stunned myocardium in chronically instrumented dogs is enhanced by halothane or isoflurane. *Anesthesiology* 1988;69:552-65.
60. 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.

61. Cope DK, Impastato WK, Cohen MV, Downey JM. Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction. *Anesthesiology* 1997;86:699-709.
62. Kersten JR, Schmeling TJ, Hettrick DA, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC. Mechanism of myocardial protection by isoflurane. Role of adenosine triphosphate-regulated potassium (KATP) channels. *Anesthesiology* 1996;85:794-807; discussion 27A.
63. Novalija E, Fujita S, Kampine JP, Stowe DF. Sevoflurane mimics ischemic preconditioning effects on coronary flow and nitric oxide release in isolated hearts. *Anesthesiology* 1999;91:701-12.
64. Toller WG, Kersten JR, Pagel PS, Hettrick DA, Warltier DC. Sevoflurane reduces myocardial infarct size and decreases the time threshold for ischemic preconditioning in dogs. *Anesthesiology* 1999;91:1437-46.
65. Piriou V, Chiari P, Lhuillier F, et al. Pharmacological preconditioning: comparison of desflurane, sevoflurane, isoflurane and halothane in rabbit myocardium. *Br J Anaesth* 2002;89:486-91.
66. Pagel PS, Krolikowski JG, Pratt PF, Jr., et al. The mechanism of helium-induced preconditioning: a direct role for nitric oxide in rabbits. *Anesth Analg* 2008;107:762-8.
67. Pagel PS, Krolikowski JG, Shim YH, et al. Noble gases without anesthetic properties protect myocardium against infarction by activating prosurvival signaling kinases and inhibiting mitochondrial permeability transition in vivo. *Anesth Analg* 2007;105:562-9.
68. Weber NC, Toma O, Wolter JI, et al. The noble gas xenon induces pharmacological preconditioning in the rat heart in vivo via induction of PKC-epsilon and p38 MAPK. *Br J Pharmacol* 2005;144:123-32.
69. Smul TM, Redel A, Stumpner J, et al. Time course of desflurane-induced preconditioning in rabbits. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2010;24:91-8.
70. Lange M, Redel A, Smul TM, et al. Desflurane-induced preconditioning has a threshold that is lowered by repetitive application and is mediated by beta 2-adrenergic receptors. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2009;23:607-13.
71. Piriou V, Chiari P, Gateau-Roesch O, et al. Desflurane-induced preconditioning alters calcium-induced mitochondrial permeability transition. *Anesthesiology* 2004;100:581-8.
72. Preckel B, Schlack W, Comfere T, Obal D, Barthel H, Thamer V. Effects of enflurane, isoflurane, sevoflurane and desflurane on reperfusion injury after regional myocardial ischaemia in the rabbit heart in vivo. *Br J Anaesth* 1998;81:905-12.
73. Toma O, Weber NC, Wolter JI, Obal D, Preckel B, Schlack W. Desflurane preconditioning induces time-dependent activation of protein kinase C epsilon and extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 in the rat heart in vivo. *Anesthesiology* 2004;101:1372-80.
74. Schlack W, Preckel B, Stunneke D, Thamer V. Effects of halothane, enflurane, isoflurane, sevoflurane and desflurane on myocardial reperfusion injury in the isolated rat heart. *Br J Anaesth* 1998;81:913-9.
75. Redel A, Stumpner J, Tischer-Zeitz T, et al. Comparison of isoflurane-, sevoflurane-, and desflurane-induced pre- and postconditioning against myocardial infarction in mice in vivo. *Exp Biol Med (Maywood)* 2009;234:1186-91.
76. Ebel D, Mullenheim J, Frassdorf J, et al. Effect of acute hyperglycaemia and diabetes mellitus with and without short-term insulin treatment on myocardial ischaemic late preconditioning in the rabbit heart in vivo. *Pflugers Arch* 2003;446:175-82.
77. Kersten JR, Schmeling TJ, Orth KG, Pagel PS, Warltier DC. Acute hyperglycemia abolishes ischemic preconditioning in vivo. *Am J Physiol* 1998;275:H721-5.
78. 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.

79. Tosaki A, Engelman DT, Engelman RM, Das DK. The evolution of diabetic response to ischemia/reperfusion and preconditioning in isolated working rat hearts. *Cardiovasc Res* 1996;31:526-36.
80. Kristiansen SB, Lofgren B, Stottrup NB, et al. Ischaemic preconditioning does not protect the heart in obese and lean animal models of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2004;47:1716-21.
81. Kersten JR, Toller WG, Gross ER, Pagel PS, Warltier DC. Diabetes abolishes ischemic preconditioning: role of glucose, insulin, and osmolality. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H1218-24.
82. Tanaka K, Kehl F, Gu W, et al. Isoflurane-induced preconditioning is attenuated by diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:H2018-23.
83. Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 1999;79:609-34.
84. Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 1982;66:1146-9.
85. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 2001;94:1133-8.
86. Kloner RA, Shook T, Przyklenk K, et al. Previous angina alters in-hospital outcome in TIMI 4. A clinical correlate to preconditioning? *Circulation* 1995;91:37-45.
87. Matsuda Y, Ogawa H, Moritani K, et al. Effects of the presence or absence of preceding angina pectoris on left ventricular function after acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1984;108:955-8.
88. De Hert SG, Cromheecke S, ten Broecke PW, et al. Effects of propofol, desflurane, and sevoflurane on recovery of myocardial function after coronary surgery in elderly high-risk patients. *Anesthesiology* 2003;99:314-23.
89. De Hert SG, ten Broecke PW, Mertens E, et al. Sevoflurane but not propofol preserves myocardial function in coronary surgery patients. *Anesthesiology* 2002;97:42-9.
90. Julier K, da Silva R, Garcia C, et al. 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.
91. 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:II340-4.
92. De Hert SG, Van der Linden PJ, Cromheecke S, et al. Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration. *Anesthesiology* 2004;101:299-310.
93. Fräßdorf J, Borowski A, Ebel D, et al. Impact of preconditioning protocol on anesthetic-induced cardioprotection in patients having coronary artery bypass surgery. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2009;137:1436-42.e2.
94. Kiani A, Mirmohammad Sadeghi M, Gharipour M, Farahmand N, Hoveida L. Preconditioning by isoflurane as a volatile anesthetic in elective coronary artery bypass surgery. *ARYA Atheroscler* 2013;9:192-7.
95. Landoni G, Fochi O, Tritapepe L, et al. Cardiac protection by volatile anesthetics. A review. *Minerva Anestesiol* 2009;75:269-73.
96. Guarracino F, Landoni G, Tritapepe L, et al. Myocardial damage prevented by volatile anesthetics: a multicenter randomized controlled study. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2006;20:477-83.
97. Ishihara M, Inoue I, Kawagoe T, et al. Impact of acute hyperglycemia on left ventricular function after reperfusion therapy in patients with a first anterior wall acute myocardial infarction. *Am Heart J* 2003;146:674-8.

98. Ishihara M, Inoue I, Kawagoe T, et al. Effect of acute hyperglycemia on the ischemic preconditioning effect of prodromal angina pectoris in patients with a first anterior wall acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2003;92:288-91.
99. Kalenka A, Maurer MH, Feldmann RE, Kuschinsky W, Waschke KF. Volatile anesthetics evoke prolonged changes in the proteome of the left ventricle myocardium: defining a molecular basis of cardioprotection? *Acta Anaesthesiol Scand* 2006;50:414-27.
100. Wakeno-Takahashi M, Otani H, Nakao S, Uchiyama Y, Imamura H, Shingu K. Adenosine and a nitric oxide donor enhances cardioprotection by preconditioning with isoflurane through mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent mechanisms. *Anesthesiology* 2004;100:515-24.
101. Chiari PC, Bienengraeber MW, Weihrauch D, et al. Role of Endothelial Nitric Oxide Synthase as a Trigger and Mediator of Isoflurane-induced Delayed Preconditioning in Rabbit Myocardium. *Anesthesiology* 2005;103:74-83.
102. Hanouz JL, Zhu L, Lemoine S, et al. Reactive oxygen species mediate sevoflurane- and desflurane-induced preconditioning in isolated human right atria in vitro. *Anesth Analg* 2007;105:1534-9, table of contents.
103. An J, Varadarajan SG, Novalija E, Stowe DF. Ischemic and anesthetic preconditioning reduces cytosolic [Ca²⁺] and improves Ca(2⁺) responses in intact hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H1508-23.
104. da Silva R, Grampp T, Pasch T, Schaub MC, Zaugg M. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in ischemic and anesthetic preconditioning. *Anesthesiology* 2004;100:59-69.
105. da Silva R, Lucchinetti E, Pasch T, Schaub MC, Zaugg M. Ischemic but not pharmacological preconditioning elicits a gene expression profile similar to unprotected myocardium. *Physiol Genomics* 2004;20:117-30.
106. Sergeev P, da Silva R, Lucchinetti E, et al. Trigger-dependent gene expression profiles in cardiac preconditioning: evidence for distinct genetic programs in ischemic and anesthetic preconditioning. *Anesthesiology* 2004;100:474-88.
107. Gross GJ, Auchampach JA. Role of ATP dependent potassium channels in myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res* 1992;26:1011-6.
108. 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.
109. Kohro S, Hogan QH, Nakae Y, Yamakage M, Bosnjak ZJ. Anesthetic effects on mitochondrial ATP-sensitive K channel. *Anesthesiology* 2001;95:1435-340.
110. Liu Y, Sato T, O'Rourke B, Marban E. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation* 1998;97:2463-9.
111. Marinovic J, Bosnjak ZJ, Stadnicka A. Distinct roles for sarcolemmal and mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in isoflurane-induced protection against oxidative stress. *Anesthesiology* 2006;105:98-104.
112. 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.
113. 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.
114. De Hert SG, Turani F, Mathur S, Stowe DF. Cardioprotection with volatile anesthetics: mechanisms and clinical implications. *Anesth Analg* 2005;100:1584-93.
115. 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.

116. Zaugg M, Lucchinetti E, Uecker M, Pasch T, Schaub MC. Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part I. Signalling and cytoprotective mechanisms. *Br J Anaesth* 2003;91:551-65.
117. Hanouz JL, Yvon A, Massetti M, et al. Mechanisms of desflurane-induced preconditioning in isolated human right atria in vitro. *Anesthesiology* 2002;97:33-41.
118. Kersten JR, Orth KG, Pagel PS, Mei DA, Gross GJ, Warltier DC. Role of adenosine in isoflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology* 1997;86:1128-39.
119. Lange M, Smul TM, Blomeyer CA, et al. Role of the beta1-adrenergic pathway in anesthetic and ischemic preconditioning against myocardial infarction in the rabbit heart in vivo. *Anesthesiology* 2006;105:503-10.
120. Ludwig LM, Patel HH, Gross GJ, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC. Morphine enhances pharmacological preconditioning by isoflurane: role of mitochondrial K(ATP) channels and opioid receptors. *Anesthesiology* 2003;98:705-11.
121. Roscoe AK, Christensen JD, Lynch C, 3rd. Isoflurane, but not halothane, induces protection of human myocardium via adenosine A1 receptors and adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Anesthesiology* 2000;92:1692-701.
122. Jaken S. Protein kinase C isozymes and substrates. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:168-73.
123. Parekh DB, Ziegler W, Parker PJ. Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J* 2000;19:496-503.
124. Tappia PS, Asemu G, Rodriguez-Leyva D. Phospholipase C as a potential target for cardioprotection during oxidative stress. *Can J Physiol Pharmacol* 2010;88:249-63.
125. Urcelay E, Butta N, Manchon CG, et al. Role of protein kinase-C in the alpha 1-adrenoceptor-mediated responses of perfused rat liver. *Endocrinology* 1993;133:2105-15.
126. Rebecchi MJ, Pentiyala SN. Anaesthetic actions on other targets: protein kinase C and guanine nucleotide-binding proteins. *Br J Anaesth* 2002;89:62-78.
127. Baines CP, Zhang J, Wang GW, et al. Mitochondrial PKCepsilon and MAPK form signaling modules in the murine heart: enhanced mitochondrial PKCepsilon-MAPK interactions and differential MAPK activation in PKCepsilon-induced cardioprotection. *Circ Res* 2002;90:390-7.
128. Shirai Y, Saito N. Activation mechanisms of protein kinase C: maturation, catalytic activation, and targeting. *J Biochem* 2002;132:663-8.
129. Uecker M, Da Silva R, Grampp T, Pasch T, Schaub MC, Zaugg M. Translocation of protein kinase C isoforms to subcellular targets in ischemic and anesthetic preconditioning. *Anesthesiology* 2003;99:138-47.
130. Dorn GW, 2nd, Souroujon MC, Liron T, et al. Sustained in vivo cardiac protection by a rationally designed peptide that causes epsilon protein kinase C translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:12798-803.
131. Obal D, Weber NC, Zacharowski K, et al. Role of protein kinase C-epsilon (PKCepsilon) in isoflurane-induced cardioprotection. *Br J Anaesth* 2005;94:166-73.
132. Ping P, Zhang J, Qiu Y, et al. Ischemic preconditioning induces selective translocation of protein kinase C isoforms epsilon and eta in the heart of conscious rabbits without subcellular redistribution of total protein kinase C activity. *Circ Res* 1997;81:404-14.
133. Aizawa K, Turner LA, Weihsrauch D, Bosnjak ZJ, Kwok WM. Protein kinase C-epsilon primes the cardiac sarcolemmal adenosine triphosphate-sensitive potassium channel to modulation by isoflurane. *Anesthesiology* 2004;101:381-9.
134. Zhong L, Su JY. Isoflurane activates PKC and Ca(2+) -calmodulin-dependent protein kinase II via MAP kinase signaling in cultured vascular smooth muscle cells. *Anesthesiology* 2002;96:148-54.
135. Raphael J, Rivo J, Gozal Y. Isoflurane-induced myocardial preconditioning is dependent on phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signalling. *Br J Anaesth* 2005;95:756-63.

136. Raphael J, Abedat S, Rivo J, et al. Volatile anesthetic preconditioning attenuates myocardial apoptosis in rabbits after regional ischemia and reperfusion via Akt signaling and modulation of Bcl-2 family proteins. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;318:186-94.
137. Stumpner J, Redel A, Kellermann A, et al. Differential role of Pim-1 kinase in anesthetic-induced and ischemic preconditioning against myocardial infarction. *Anesthesiology* 2009;111:1257-64.
138. Muraski JA, Fischer KM, Wu W, et al. Pim-1 kinase antagonizes aspects of myocardial hypertrophy and compensation to pathological pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:13889-94.
139. Muraski JA, Rota M, Misao Y, et al. Pim-1 regulates cardiomyocyte survival downstream of Akt. *Nat Med* 2007;13:1467-75.
140. Sivaraman V, Hausenloy DJ, Wynne AM, Yellon DM. Preconditioning the diabetic human myocardium. *J Cell Mol Med* 2010;14:1740-6.
141. Cano E, Mahadevan LC. Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem Sci* 1995;20:117-22.
142. Michel MC, Li Y, Heusch G. Mitogen-activated protein kinases in the heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001;363:245-66.
143. English J, Pearson G, Wilsbacher J, et al. New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp Cell Res* 1999;253:255-70.
144. Leppa S, Saffrich R, Ansorge W, Bohmann D. Differential regulation of c-Jun by ERK and JNK during PC12 cell differentiation. *EMBO J* 1998;17:4404-13.
145. Mansour SJ, Resing KA, Candi JM, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphorylation of MAP kinase kinase: determination of phosphorylation sites by mass spectrometry and site-directed mutagenesis. *J Biochem* 1994;116:304-14.
146. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001;22:153-83.
147. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 1995;9:726-35.
148. Bogoyevitch MA, Gillespie-Brown J, Ketterman AJ, et al. Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circ Res* 1996;79:162-73.
149. Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 1999;79:143-80.
150. Davis RJ. Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol Reprod Dev* 1995;42:459-67.
151. Weber NC, Stursberg J, Wirthle NM, Toma O, Schlack W, Preckel B. Xenon preconditioning differently regulates p44/42 MAPK (ERK 1/2) and p46/54 MAPK (JNK 1/2 and 3) in vivo. *Br J Anaesth* 2006;97:298-306.
152. Kyriakis JM, Avruch J. pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *J Biol Chem* 1990;265:17355-63.
153. Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19:142-9.
154. Rouse J, Cohen P, Trigon S, et al. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 1994;78:1027-37.
155. Harding SJ, Browne GJ, Miller BW, Prigent SA, Dickens M. Activation of ASK1, downstream MAPKK and MAPK isoforms during cardiac ischaemia. *Biochim Biophys Acta* 2010;1802:733-40.
156. Behrends M, Schulz R, Post H, et al. Inconsistent relation of MAPK activation to infarct size reduction by ischemic preconditioning in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H1111-9.

157. Sanada S, Kitakaze M, Papst PJ, et al. Role of phasic dynamism of p38 mitogen-activated protein kinase activation in ischemic preconditioning of the canine heart. *Circ Res* 2001;88:175-80.
158. Shimizu N, Yoshiyama M, Omura T, et al. Activation of mitogen-activated protein kinases and activator protein-1 in myocardial infarction in rats. *Cardiovasc Res* 1998;38:116-24.
159. Cook SA, Sugden PH, Clerk A. Activation of c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases in human heart failure secondary to ischaemic heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:1429-34.
160. Barancik M, Htun P, Strohm C, Kilian S, Schaper W. Inhibition of the cardiac p38-MAPK pathway by SB203580 delays ischemic cell death. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;35:474-83.
161. Clark JE, Sarafriz N, Marber MS. Potential of p38-MAPK inhibitors in the treatment of ischaemic heart disease. *Pharmacol Ther* 2007;116:192-206.
162. Rakhit RD, Kabir AN, Mockridge JW, Saurin A, Marber MS. Role of G proteins and modulation of p38 MAPK activation in the protection by nitric oxide against ischemia-reoxygenation injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;286:995-1002.
163. Cross HR, Li M, Petrich BG, Murphy E, Wang Y, Steenbergen C. Effect of p38 MAP kinases on contractility and ischemic injury in intact heart. *Acta Physiol Hung* 2009;96:307-23.
164. Ping P, Murphy E. Role of p38 mitogen-activated protein kinases in preconditioning: a detrimental factor or a protective kinase? *Circ Res* 2000;86:921-2.
165. Armstrong SC, Delacey M, Ganote CE. Phosphorylation state of hsp27 and p38 MAPK during preconditioning and protein phosphatase inhibitor protection of rabbit cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:555-67.
166. Maulik N, Yoshida T, Zu YL, Sato M, Banerjee A, Das DK. Ischemic preconditioning triggers tyrosine kinase signaling: a potential role for MAPKAP kinase 2. *Am J Physiol* 1998;275:H1857-64.
167. Nakano A, Baines CP, Kim SO, et al. Ischemic preconditioning activates MAPKAPK2 in the isolated rabbit heart: evidence for involvement of p38 MAPK. *Circ Res* 2000;86:144-51.
168. Evers PA, van den IP, Quinlan RA, Goedert M, Cohen P. Use of a drug-resistant mutant of stress-activated protein kinase 2 α /p38 to validate the in vivo specificity of SB 203580. *FEBS Lett* 1999;451:191-6.
169. Lemke LE, Bloem LJ, Fouts R, Esterman M, Sandusky G, Vlahos CJ. Decreased p38 MAPK activity in end-stage failing human myocardium: p38 MAPK α is the predominant isoform expressed in human heart. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:1527-40.
170. Saurin AT, Martin JL, Heads RJ, et al. The role of differential activation of p38-mitogen-activated protein kinase in preconditioned ventricular myocytes. *FASEB J* 2000;14:2237-46.
171. Wang Y, Huang S, Sah VP, et al. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem* 1998;273:2161-8.
172. Sicard P, Clark JE, Jacquet S, et al. The activation of p38 α , and not p38 β , mitogen-activated protein kinase is required for ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48:1324-8.
173. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68:320-44.
174. Weber NC, Toma O, Wolter JI, Wirthle NM, Schlack W, Preckel B. Mechanisms of xenon- and isoflurane-induced preconditioning - a potential link to the cytoskeleton via the MAPKAPK-2/HSP27 pathway. *Br J Pharmacol* 2005;146:445-55.

175. Tanabe K, Akamatsu S, Suga H, et al. Midazolam suppresses thrombin-induced heat shock protein 27 phosphorylation through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in cardiac myocytes. *J Cell Biochem* 2005;96:56-64.
176. Xu W, Liu Y, Wang S, et al. Cytoprotective role of Ca^{2+} -activated K^{+} channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science* 2002;298:1029-33.
177. Redel A, Lange M, Jazbutyte V, et al. Activation of mitochondrial large-conductance calcium-activated K^{+} channels via protein kinase A mediates desflurane-induced preconditioning. *Anesthesia and Analgesia* 2008;106:384-91.
178. Sato T, Saito T, Saegusa N, Nakaya H. Mitochondrial Ca^{2+} -activated K^{+} channels in cardiac myocytes: a mechanism of the cardioprotective effect and modulation by protein kinase A. *Circulation* 2005;111:198-203.
179. Pravdic D, Sedlic F, Mio Y, Vladic N, Bienengraeber M, Bosnjak ZJ. Anesthetic-induced preconditioning delays opening of mitochondrial permeability transition pore via protein Kinase C-epsilon-mediated pathway. *Anesthesiology* 2009;111:267-74.
180. Sedlic F, Sepac A, Pravdic D, et al. Mitochondrial depolarization underlies delay in permeability transition by preconditioning with isoflurane: roles of ROS and Ca^{2+} . *Am J Physiol Cell Physiol* 2010;299:C506-15.
181. Anderson EJ, Rodriguez E, Anderson CA, Thayne K, Chitwood WR, Kypson AP. Increased propensity for cell death in diabetic human heart is mediated by mitochondrial-dependent pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;300:H118-24.
182. Novalija E, Varadarajan SG, Camara AK, et al. Anesthetic preconditioning: triggering role of reactive oxygen and nitrogen species in isolated hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H44-52.
183. Redel A, Stumpner J, Smul TM, et al. Endothelial nitric oxide synthase mediates the first and inducible nitric oxide synthase mediates the second window of desflurane-induced preconditioning. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2013;27:494-501.
184. Amour J, Brzezinska AK, Weihrauch D, et al. Role of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase during early anesthetic and ischemic preconditioning. *Anesthesiology* 2009;110:317-25.
185. Amour J, Brzezinska AK, Jager Z, et al. Hyperglycemia adversely modulates endothelial nitric oxide synthase during anesthetic preconditioning through tetrahydrobiopterin- and heat shock protein 90-mediated mechanisms. *Anesthesiology* 2010;112:576-85.
186. Ebel D, Müllenheim J, Südkamp H, et al. Role of Tyrosine Kinase in Desflurane-induced Preconditioning. *Anesthesiology* 2004;100:555-61.
187. Stadnicka A, Kwok WM, Warltier DC, Bosnjak ZJ. Protein tyrosine kinase-dependent modulation of isoflurane effects on cardiac sarcolemmal $\text{K}(\text{ATP})$ channel. *Anesthesiology* 2002;97:1198-208.
188. Zhong C, Zhou Y, Liu H. Nuclear factor kappaB and anesthetic preconditioning during myocardial ischemia-reperfusion. *Anesthesiology* 2004;100:540-6.
189. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
190. Weber NC, Goletz C, Huhn R, et al. Blockade of anaesthetic-induced preconditioning in the hyperglycaemic myocardium: the regulation of different mitogen-activated protein kinases. *Eur J Pharmacol* 2008;592:48-54.
191. Kehl F, Krolkowski JG, Weihrauch D, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR. N-acetylcysteine restores isoflurane-induced preconditioning against myocardial infarction during hyperglycemia. *Anesthesiology* 2003;98:1384-90.
192. Awan MM, Makaula S, Forresti S, Sack MN, Opie LH. Mechanisms whereby glucose deprivation triggers metabolic preconditioning in the isolated rat heart. *Mol Cell Biochem* 2000;211:111-21.
193. Ebel D, Redler S, Preckel B, Schlack W, Thamer V. Moderate glucose deprivation preconditions myocardium against infarction. *Horm Metab Res* 2005;37:516-20.

194. Giugliano D, Marfella R, Coppola L, et al. Vascular effects of acute hyperglycemia in humans are reversed by L-arginine. Evidence for reduced availability of nitric oxide during hyperglycemia. *Circulation* 1997;95:1783-90.
195. Barua A, Standen NB, Galinanes M. Modulation of the Nitric Oxide Metabolism Overcomes the Unresponsiveness of the Diabetic Human Myocardium to Protection Against Ischemic Injury. *J Surg Res* 2010;171:452-6.
196. Hassouna A, Loubani M, Matata BM, Fowler A, Standen NB, Galinanes M. Mitochondrial dysfunction as the cause of the failure to precondition the diabetic human myocardium. *Cardiovasc Res* 2006;69:450-8.
197. Kersten JR, Montgomery MW, Ghassemi T, et al. Diabetes and hyperglycemia impair activation of mitochondrial K(ATP) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H1744-50.
198. Smith JM, Wahler GM. ATP-sensitive potassium channels are altered in ventricular myocytes from diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 1996;158:43-51.
199. del Valle HF, Lascano EC, Negroni JA. Ischemic preconditioning protection against stunning in conscious diabetic sheep: role of glucose, insulin, sarcolemmal and mitochondrial KATP channels. *Cardiovasc Res* 2002;55:642-59.
200. Pain T, Yang XM, Critz SD, et al. Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res* 2000;87:460-6.
201. Hashiguchi H, Morooka H, Miyoshi H, Matsumoto M, Koji T, Sumikawa K. Isoflurane protects renal function against ischemia and reperfusion through inhibition of protein kinases, JNK and ERK. *Anesth Analg* 2005;101:1584-9.
202. Zuo Z, Wang Y, Huang Y. Isoflurane preconditioning protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against in vitro simulated ischemia-reperfusion through the activation of extracellular signal-regulated kinases pathway. *Eur J Pharmacol* 2006;542:84-91.
203. Bickler PE, Zhan X, Fahlman CS. Isoflurane preconditions hippocampal neurons against oxygen-glucose deprivation: role of intracellular Ca²⁺ and mitogen-activated protein kinase signaling. *Anesthesiology* 2005;103:532-9.
204. Ding Q, Wang Q, Deng J, et al. Sevoflurane preconditioning induces rapid ischemic tolerance against spinal cord ischemia/reperfusion through activation of extracellular signal-regulated kinase in rabbits. *Anesth Analg* 2009;109:1263-72.
205. Wang S, Dai ZG, Dong XW, et al. Duplicate preconditioning with sevoflurane in vitro improves neuroprotection in rat brain via activating the extracellular signal-regulated protein kinase. *Neurosci Bull* 2010;26:437-44.
206. Loubani M, Galinanes M. Pharmacological and ischemic preconditioning of the human myocardium: mitoK(ATP) channels are upstream and p38MAPK is downstream of PKC. *BMC Physiol* 2002;2:10.
207. Strniskova M, Barancik M, Neckar J, Ravingerova T. Mitogen-activated protein kinases in the acute diabetic myocardium. *Mol Cell Biochem* 2003;249:59-65.
208. Igarashi M, Wakasaki H, Takahara N, et al. Glucose or diabetes activates p38 mitogen-activated protein kinase via different pathways. *J Clin Invest* 1999;103:185-95.
209. Miki T, Itoh T, Sunaga D, Miura T. Effects of diabetes on myocardial infarct size and cardioprotection by preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Diabetol* 2012;11:67.
210. Lange M, Smul TM, Redel A, et al. Differential role of calcium/calmodulin-dependent, protein kinase II in desflurane-induced preconditioning and cardioprotection by metoprolol - Metoprolol blocks desflurane-induced preconditioning. *Anesthesiology* 2008;109:72-80.
211. Haelewyn B, Zhu L, Hanouz JL, et al. Cardioprotective effects of desflurane: effect of timing and duration of administration in rat myocardium. *Br J Anaesth* 2004;92:552-7.
212. Mullenheim J, Frassdorf J, Preckel B, Thamer V, Schlack W. Ketamine, but not S(+)-ketamine, blocks ischemic preconditioning in rabbit hearts in vivo. *Anesthesiology* 2001;94:630-6.

213. But AK, Durmus M, Toprak HI, Ozturk E, Demirbilek S, Ersoy MO. Hemodynamic, hepatorenal, and postoperative effects of desflurane-fentanyl and midazolam-fentanyl anesthesia in coronary artery bypass surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2005;19:597-602.
214. Bolliger D, Seeberger MD, Kasper J, et al. Different effects of sevoflurane, desflurane, and isoflurane on early and late left ventricular diastolic function in young healthy adults. *Br J Anaesth* 2010;104:547-54.
215. Sarkar S, GuhaBiswas R, Rupert E. Echocardiographic evaluation and comparison of the effects of isoflurane, sevoflurane and desflurane on left ventricular relaxation indices in patients with diastolic dysfunction. *Ann Card Anaesth* 2010;13:130-7.
216. Meco M, Cirri S, Gallazzi C, Magnani G, Cosseta D. Desflurane preconditioning in coronary artery bypass graft surgery: a double-blinded, randomised and placebo-controlled study. *Eur J Cardiothorac Surg* 2007;32:319-25.
217. Bein B, Renner J, Caliebe D, et al. The effects of interrupted or continuous administration of sevoflurane on preconditioning before cardio-pulmonary bypass in coronary artery surgery: comparison with continuous propofol. *Anaesthesia* 2008;63:1046-55.
218. Lazar HL. Glycemic Control during Coronary Artery Bypass Graft Surgery. *ISRN Cardiol* 2012;2012:292490.

6. Anhang

6.1 Summenformeln

BH_4	Tetrahydrobiopterin/Sapropterin
$\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$	Mercaptoethanol
$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$	Dithiothreitol (DTT)
$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure (EGTA)
$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$	Sodiumdodecylsulfat (SDS)
CuSO_4	Kupfersulfat
H_2O	Wasser
HCl	Chlorwasserstoff
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natriumhydroxid/Natronlauge
Na_2CO_3	Natriumcarbonat
Na_3VO_4	Natriumvanadat
$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	Ammoniumpersulfat (APS)

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Entwicklung des Reperfusionsschadens bis hin zum Herzversagen.....	7
Abb. 1.2: Schema des biphasischen Verlaufes der Protektion während ischämischer Präkonditionierung. Modifiziert und mit freundlicher Genehmigung veröffentlicht; basierend auf Yellon DM, Downey JM. <i>Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. Physiol Rev</i> 2003;83: 1113-51	9
Abb. 1.3: Schema des Signalweges der APC	14
Abb. 1.4: Signalweg der Proteinkinase B (AKT).....	16
Abb. 1.5: Schema Signalweg	17
Abb. 1.6: Schema ERK Signalweg	18
Abb. 1.7: Schema JNK Signalweg	19
Abb. 1.8: Schema p38 Signalweg	21
Abb. 2.1: Darstellung der Koronarien. Die Abbildung wurde von Schwarz Pharma AG, Monheim erstellt und mit deren Genehmigung von Dr. med. C. Leuner modifiziert und veröffentlicht; die Weiterverwendung erfolgt mit der Genehmigung von Dr. med. C. Leuner.	27
Abb. 2.2: Protokoll Infarktgrößenbestimmung	28
Abb. 2.3: Protokoll Western Blot.	31
Abb. 2.4: Schema der Fraktionierung.....	34
Abb. 2.5: Schema der Gel-Elektrophorese. Abbildung erstellt von Dr. rer. nat. Olivia Barton, mit freundlicher Genehmigung modifiziert und veröffentlicht.....	38
Abb. 3.1: Blutglukosekonzentration	43
Abb. 3.2.1: Herzfrequenz.	44
Abb. 3.2.2: Mittlerer Aortendruck.....	45
Abb. 3.3: Ergebnisse Infarktgröße.....	46
Abb. 3.4: Ergebnisse Zeitverlauf ERK	47
Abb. 3.5: Ergebnisse Zeitverlauf JNK	49
Abb. 3.6: Ergebnisse Zeitverlauf p38	50

Soweit nicht gesondert gekennzeichnet, wurden die Abbildungen selbständig erstellt.

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. Benedikt Preckel und Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Schlack für die freundliche Überlassung des Themas und die Bereitstellung der Ressourcen sowie für die kritische und geduldige Begleitung während der Erstellung dieser Arbeit.

Ein großes Dankeschön gilt meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Nina Hauck-Weber, die mir beigebracht hat wissenschaftlich zu denken und zu arbeiten. Sie hat während der Erstellung dieser Arbeit für Struktur und Systematik gesorgt und mich mit ihrem hohen Anspruch an jedes Detail immer wieder motiviert präzise meine Laborarbeit zu verrichten und jeden Schritt zu hinterfragen. Ich danke ihr für die ständige Bereitschaft auf Fragen und Probleme einzugehen und die großartige Unterstützung in der gesamten Zeit während der Durchführung dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe meinen Dank aussprechen, insbesondere: Dirk Ebel und Jan Fräßdorf, Yvonne Grüber, Nadine Dyballa-Rukes, Jörg Stursberg, Nicole Wirthle und Jessica Görgens, sowie meinen Kommilitonen - und manchmal Leidensgenossen - Jennis Kandler und Christoph Ratajczak.

Ich danke meinen Freunden Matthias Metten und Daniela Bauer, die mir die formelle und technische Seite der Dokumentenerstellung nähergebracht haben und mir damit eine große Hilfe waren.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Freund Oliver und bei meiner gesamten Familie, insbesondere jedoch bei meinen Eltern Mary und Roman bedanken. Sie haben mich immer unterstützt und an mich geglaubt und mir zu jeder Zeit und mit großem Interesse zur Seite gestanden.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

01. Juli 2015, Christine Goletz

Unterschrift