

Aus der Klinik für Anästhesiologie  
der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Benedikt Pannen

# Sevofluran induziert Präkonditionierung im humanen Myokard

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
vorgelegt von

Thomas Meemann

2017

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfgang Schlack

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Alexander Albert

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

J. Fräßdorf, A. Borowski, D. Ebel, P. Feindt, M. Hermes, **T. Meemann**, R. Weber, J. Müllenheim, N. C. Weber, B. Preckel, und W. Schlack, „Impact of preconditioning protocol on anesthetic-induced cardioprotection in patients having coronary artery bypass surgery“, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, Bd. 137, Nr. 6, S. 1436–1442.e2, Juni 2009.

## Zusammenfassung

**Einleitung:** In klinischen Studien wurde gezeigt, dass Sevofluran wie auch andere volatile Anästhetika eine protektive Wirkung am menschlichen Myokard besitzen. Unklar ist, welcher Mechanismus für diese Myokardprotektion verantwortlich ist. Ein potentieller Mechanismus ist die Kardioprotektion durch anästhetikainduzierte pharmakologische Präkonditionierung (APC). Hierbei wird durch Vorbehandlung mit einem Anästhetikum ein endogener Schutzmechanismus des Herzens aktiviert, der vor den Folgen einer Ischämie-Reperfusion schützt. Ziel der Studie war es zu untersuchen, ob das Konzept der APC auch im humanen Myokard unter klinischen Bedingungen nachweisbar ist. In dieser Studie wurde untersucht ob die repetitive Bolusgabe des volatilen Anästhetikums Sevofluran die APC induzieren kann. Diese Studie wurde bei Patienten durchgeführt, die sich einem elektiven herzchirurgischen Eingriff unterziehen mussten, da bei diesen Patienten genau bekannt ist wann sie während der Operation einer Myokardischämie ausgesetzt werden.

**Material und Methoden:** Nach Zustimmung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wurden 20 Patienten zur elektiven aortokoronaren Bypassoperation nach entsprechender Aufklärung und Einwilligung in eine Kontroll- und eine Behandlungsgruppe randomisiert. Die Anästhesie erfolgte als totalintravenöse Anästhesie (TIVA) mit Propofol und Sufentanil in beiden Gruppen. In der Behandlungsgruppe erhielten die Patienten vor kardiopulmonalem Bypass zwei 5-minütige Sevoflurangaben (Konzentration jeweils 1 MAC), gefolgt von einer 5-minütigen bzw. einer 10-minütigen Auswaschphase. Troponin I wurde als Marker des myokardialen Zellschadens gemessen. In Gewebeproben aus dem rechten Vorhof wurden mittels Western Blot Analyse die Proteine PKC- $\epsilon$  (Proteinkinase C, Isoform  $\epsilon$ ) und die phosphorylierte PKC- $\epsilon$  bestimmt. Die Phosphorylierung der PKC- $\epsilon$  ist einer der bedeutenden Schritte in der Signalkaskade der ischämischen Präkonditionierung.

**Ergebnisse:** Es konnte nachgewiesen werden, dass Kardioprotektion mittels APC am menschlichen Herzen möglich ist. Zwei Zyklen Sevofluran (1 MAC 5 Minuten), jeweils gefolgt von einer Auswaschphase, vor Beginn des kardiopulmonalen Bypasses reduzieren den postoperativen Myokardschaden. In der Sevofluran- Gruppe zeigten sich signifikant niedrigere Werte für Troponin I in der postoperativen Phase im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine Phosphorylierung der PKC- $\epsilon$  konnte in unserer Arbeit nicht beobachtet werden.

## Abkürzungsverzeichnis

ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>
ACT	<i>Activated clotting time</i>
AoX	Aortenklemmzeit
ACVB	Aorto-koronarer Venenbypass
APC	Anästhetika induzierte pharmakologische Präkonditionierung
APS	Ammoniumpersulfat
ASA	<i>American Society of Anesthesiology</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	<i>Body Mass Index</i>
BNP	<i>Brain Natriuretic Peptide</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CABG	<i>Coronary artery bypass graft</i>
CI	<i>Cardiac Index</i>
CK	Creatinkinase
CK-MB	Creatinkinase (Myokardtyp)
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CPB	Kardiopulmonaler Bypass
DTT	Dithiothreitol
EF	Ejektionsfraktion
EGTA	<i>Ethyleneglycol-bis(β-Aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EPC	<i>early preconditioning</i>
EuroSCORE	<i>European System for Cardiac Operative Risk Evaluation</i>
G <sub>i</sub> -Protein	inhibitorisches      Guaninnucleotid-bindendes Protein
HF	Herzfrequenz
HLP	Hyperlipoproteinämie
HZV	Herzzeitvolumen
IPC	Ischämische Präkonditionierung
ITS	Intensivstation
KHK	koronaren Herzkrankheit
KOF	Körperoberfläche
LPC	<i>late preconditioning</i>
LVEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVPmax/min	maximaler/minimaler linksventrikulärer Druck
MAC	Minimale alveoläre Konzentration
MAP	Mittlerer arterieller Druck
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MPAP	mittlerer pulmonalarterieller Druck
mitoK <sub>ATP</sub> -Kanal	mitochondrialer ATP-sensitiver Kaliumkanal
mitoPTP	<i>mitochondrial permeability transition pore</i>

NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NTproBNP	N-terminales Fragment des brain natriuretic peptide
OP	Operation
PAA	Polyacrylamid
PAOP	Pulmonalarterieller Okklusionsdruck
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Präkonditionierung
PCWP	<i>Pulmonary Capillary Wedge Pressure</i>
PKC	Proteinkinase C
PLC/D	Phospholipase C/D
PTCA	Perkutane Transluminale Koronarangiographie
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SaO <sub>2</sub>	arterielle Sauerstoffsättigung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SvO <sub>2</sub>	gemischtvenöse Sauerstoffsättigung
TCI	Target controlled infusion
TIVA	totale intravenöse Anästhesie
ZVD	Zentraler Venendruck

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Koronare Herzkrankheit und perioperatives Risiko myokardialer Ischämie.....	1
1.2 Präkonditionierung.....	1
1.2.1 Ischämische Präkonditionierung (IPC).....	1
1.2.2 Anästhetika- induzierte Präkonditionierung (APC).....	4
1.3 Sevofluran.....	4
1.4 Studienlage.....	5
1.5 Ziele dieser Studie.....	6
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>8</b>
2.1 Patientenkollektiv.....	8
2.2 Studiengruppen.....	10
2.3 Studienprotokoll.....	10
2.4 perioperatives Management.....	12
2.5 hämodynamische Datenanalyse.....	13
2.6 biochemische Datenanalyse.....	15
2.7 Molekularbiologische Datenanalyse (Fraktionierung und <i>Western- Blot-</i> Analyse).....	16
2.7.1 Homogenisierung und Fraktionierung.....	16
2.7.2 Proteinbestimmung.....	16
2.7.3 Elektrophorese.....	17
2.7.4 Transfer.....	18
2.7.5 Immunologischer Proteinnachweis.....	18
2.7.6 Densidometrie.....	19
2.7.7 Auswertung.....	19
2.7.8 Zusammensetzung der Lösungen.....	20
2.7.9 Antikörper.....	22
2.8 Statistische Datenanalyse.....	23

<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>24</b>
3.1 Hämodynamische Daten.....	25
3.2 Biochemische Daten.....	25
3.3 Molekularbiologische Daten.....	28
3.3.1 PKC $\epsilon$ .....	28
3.3.2 PKC $\alpha$ .....	30
3.3.3 Src-Tyrosinkinase.....	30
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>31</b>
<b>5. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>39</b>
<b>6. Danksagung</b> .....	<b>46</b>

## **1. Einleitung**

### **1.1 Koronare Herzkrankheit und perioperatives Risiko myokardialer Ischämien**

Die koronare Herzkrankheit (KHK) stellt die häufigste Todesursache in der Bundesrepublik Deutschland dar [1]. Durch die sich verändernde Altersstruktur der Bevölkerung in den westlichen Staaten mit einem stetig steigenden durchschnittlich erreichten Lebensalter steigt auch die Inzidenz der KHK in der Bevölkerung. Da die Häufigkeit notwendiger Operationen beim alten Menschen deutlich steigt [2], wird sich der Anteil der Patienten mit einer KHK, die sich einem operativen Eingriff unterziehen müssen, somit beständig vergrößern [3]. In Deutschland werden ca. 8 Millionen nicht- kardiologische Operationen pro Jahr durchgeführt, davon leiden 1 Million Patienten an einer KHK [4]. Perioperative Myokardinfarkte treten bei einer geschätzten Anzahl von 15 000 Patienten auf, die Letalität beträgt zwischen 20 - 50 %. Zu den wesentlichen Aufgaben der Anästhesie gehört daher heutzutage, neben dem sicheren und schmerzfreien Aufwachen des Patienten nach Allgemeinanästhesie, die Entwicklung und Etablierung von Konzepten zur Verhinderung und rechtzeitigen Behandlung von perioperativen myokardialen Ischämien.

### **1.2 Präkonditionierung**

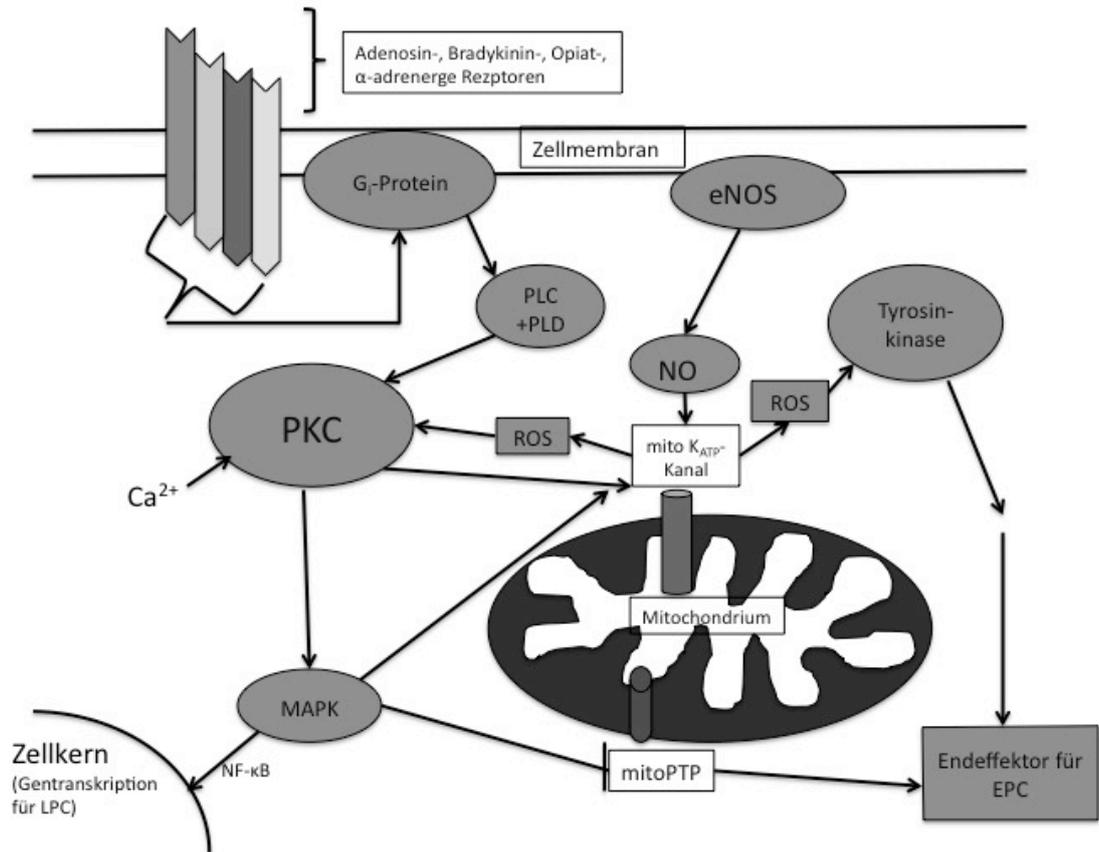
#### **1.2.1 Ischämische Präkonditionierung (IPC)**

Eine oder mehrere kurze Episoden einer subletalen myokardialen Ischämie mit anschließender Reperfusion erhöhen die Resistenz des Herzmuskelgewebes gegenüber den Folgen einer nachfolgenden, länger dauernden Ischämie. Dieses Phänomen wird als Ischämische Präkonditionierung (IPC) bezeichnet und wurde 1986 erstmalig von Murry et al nachgewiesen [5]. Ischämische Präkonditionierung verringert nicht nur die Infarktgröße, sondern auch das Ausmaß von Arrhythmien während Ischämie und Reperfusion [6]. Dieser

endogene Protektionsmechanismus konnte bisher an allen untersuchten Säugetierspezies nachgewiesen werden [7][8][9].

Man unterscheidet zwei Phasen der Protektion: Eine frühe Phase, welche wenige Minuten nach der präkonditionierenden Ischämie einsetzt. Diese hält für etwa zwei bis drei Stunden an. Sie wird auch als „klassische“ oder „frühe Präkonditionierung“ bezeichnet (*early preconditioning*, EPC). Nach einem protektionsfreien Intervall folgt 12-24 Stunden nach der präkonditionierenden Ischämie die späte Phase der Präkonditionierung (*late preconditioning*, LPC). Diese hält für zwei bis drei Tage an [10].

Die zugrunde liegenden zellulären Mechanismen der Präkonditionierung sind in vielen wissenschaftlichen Studien untersucht worden, jedoch noch nicht vollständig geklärt. An der Signaltransduktion der EPC sind u.a. die Stimulation von Adenosin [11]-, Bradykinin [12]-, Opiat [13]-, Muskarin [14]- oder  $\alpha$ -adrenerge [15] Rezeptoren mit anschließender Aktivierung von inhibitorischen G-Proteinen beteiligt. Neben vielen anderen Schritten erfolgt die Öffnung mitochondrialer ATP-abhängiger Kaliumkanäle (mitoK<sub>ATP</sub>-Kanäle). Diese führt dann über die Freisetzung von einer geringen Menge von Sauerstoffradikalen (ROS) zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und Tyrosinkinasen. Ein paralleler Signalweg führt über die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) bzw. von Extrazellulär zur Öffnung von mitoK<sub>ATP</sub>-Kanälen bzw. zur Aktivierung der PKC. Im weiteren Verlauf der Signalkaskade folgen Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK), *Extracellular-signal Regulated Kinases* (ERK) und Hitzeschockproteine (HSP) mit Interaktionen zum Zytoskelett, die auf einen noch unbekanntem Effektor wirken, der das Herz vor einem Ischämie-/Reperfusionsschaden schützt [16][17]. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Inhibierung der Öffnung des *mitochondrial permeability transition pore* (mitoPTP) eines der wesentlichen Schritte im unteren Bereich der Signalkaskade des Präkonditionierungsmechanismus ist [18]. Nach derzeitigem Kenntnisstand geht man davon aus, dass mindestens 2 alternative Signalwege, einer über die PKC, der andere über die Tyrosinkinase, existieren [19] (Abb.1).



**Abb. 1:** Schematische Darstellung einiger Signalschritte des Präkonditionierungsmechanismus. Die Rolle der Tyrosinkinase in Bezug zur PKC ist nur unvollständig geklärt. G<sub>i</sub>-Protein: inhibitorische Guanin-nucleotidbindende Proteine; PLC/PLD: Phospholipase C/D; PKC: Proteinkinase C; MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase; mitoK<sub>ATP</sub>-Kanal: mitochondrialer adenosintriphosphatsensitiver Kaliumkanal; mitoPTP: mitochondrial permeability transition pore; eNOS: endotheliale NO-Synthase; NO: Stickstoffmonoxid; ROS: reaktive Sauerstoffspezies

In Tierversuchen wurde gezeigt, dass die Kardioprotektion durch IPC durch mehrere Zyklen Ischämie mit anschließender Reperfusion im Vergleich zu einem Zyklus kurzer Ischämie mit anschließender Reperfusion verstärkt wird [20]. Bei mehrfachen Zyklen IPC war es notwendig, beide parallele Signaltransduktionsketten, sowohl über die PKC als auch über die Tyrosinkinase zu blockieren, um die IPC vollständig zu verhindern. Bei nur einem Zyklus IPC reicht es, nur eine der beiden Kinasen zu blockieren, um die IPC vollständig zu verhindern.

### **1.2.2 Anästhetika- induzierte Präkonditionierung (APC)**

Das Phänomen der Präkonditionierung kann nicht nur durch subletale Ischämien, sondern auch durch eine Reihe verschiedener pharmakologischer Substanzen ausgelöst werden, diese Form wird als pharmakologische Präkonditionierung bezeichnet. Zu diesen Substanzen zählen auch die volatilen Anästhetika (halogenierte Äther), hier spricht man von Anästhetika- induzierte Präkonditionierung (APC) [21]. APC wurde in zahlreichen Studien an verschiedenen Säugetierspezies für Halothan, Isofluran, Sevofluran und Desfluran gezeigt [22][23][24].

Die IPC ist definiert als kurzer ischämischer Stimulus mit anschließender Reperfusion [5]. In Analogie ergibt sich für die Definition der APC ein kurzer Stimulus durch volatile Anästhetika mit einer anschließenden, essentiellen Auswaschphase.

### **1.3 Sevofluran**

Sevofluran ist ein seit Mitte der 90er Jahre in Deutschland verfügbares volatiles Anästhetikum. Chemisch ist es ein fluorierter Methylpropyläther ohne asymmetrischen Kohlenstoff. Der genaue Mechanismus wie Sevofluran und auch die anderen volatilen Anästhetika Anästhesie induzieren ist noch ungeklärt. Sevofluran ist durch einen niedrigen Blut/ Gas- Koeffizient und dem damit verbundenem schnellen An- und Abfluten ein sehr gut steuerbares Anästhetikum. Anstiege der Herzfrequenz, negativ inotrope Eigenschaften sowie eine periphere Vasodilation sind geringer ausgeprägt als bei anderen volatilen Anästhetika. Im Vergleich zum Desfluran ist für Sevofluran keine sympathoadrenerge Aktivierung mit Tachykardie und Hypertonie bei schnellen Konzentrationsänderungen beschrieben [25]. Aufgrund der geringeren hämodynamischen Nebenwirkungen und der guten Steuerbarkeit wird Sevofluran in vielen herzchirurgischen Zentren als Standardanästhetikum eingesetzt.

## 1.4 Studienlage

APC wurde in mehreren tierexperimentellen Studien nachgewiesen [26][22][24]. Über die klinische Relevanz dieses Phänomens liegen bisher keine großen Studien vor. Es gibt mehrere klinische Studien mit Hinweisen bzw. Beweisen für eine Myokardprotektion beim Menschen durch Sevofluran und andere volatile Anästhetika. Keine dieser Studien erfüllt jedoch das Protokoll einer APC mit kurzzeitigem Anfluten des volatilen Anästhetikums und anschließender Auswaschphase vor CBP mit folgender Ischämie.

Die erste Studie wurde von Belhomme et al. 1999 publiziert, sie zeigten, dass Isofluran (2,5 Vol %), gegeben vor extrakorporaler Zirkulation, eine Zunahme der 5`Nucleotidase- Aktivität, einem Marker der Proteinkinase C (PKC) Aktivierung, in Vorhofgewebe des rechten Herzens bewirkt. Eine Verringerung des myokardialen Zellschadens gemessen an der Freisetzung von Troponin I oder CK- MB konnte allerdings nur tendenziell, aber nicht signifikant beobachtet werden [27]. De Hert und Mitarbeiter konnten bei Patienten, die sich einer aortokoronaren Bypassoperation (CABG) unterziehen mussten, zeigen, dass die Narkose mit Sevofluran im Vergleich zu einer total intravenösen Anästhesie (TIVA) mit Propofol zu einer Verbesserung der myokardialen Funktion und zu einer Reduzierung des myokardialen Zellschadens führt. Ob die beobachtete Myokardprotektion durch eine APC induziert wurde, lässt sich aus dieser Studie nicht beantworten, da die Narkose während der gesamten Operation mit Sevofluran bzw. Propofol aufrechterhalten wurde [28][29]. In einer weiteren Studie von De Hert wurde der Einfluss von Sevofluran auf die myokardiale Funktion und den myokardialen Zellschaden in unterschiedlichen Studienprotokollen beobachtet. Die kontinuierliche Applikation des volatilen Anästhetikums zwischen Sternotomie und extrakorporaler Zirkulation ohne Auswaschphase bzw. die kontinuierliche Applikation nach extrakorporaler Zirkulation bis OP- Ende zeigten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe mit TIVA [30].

In einer Metaanalyse von Landoni und Mitarbeitern wurden die Ergebnisse von 22 klinischen Studien mit insgesamt 1922 Patienten zusammengefasst. Narkoseregime während kardiochirurgischen Eingriffen mit volatilen Anästhetika zeigten hier eine deutliche Reduzierung der Infarktgrößen im Vergleich zur TIVA mit Propofol bzw. Midazolam [31]. Zusammenfassend wurde in mehreren Studien also gezeigt, dass ein Sevofluran basiertes Anästhesieregim eine Myokardprotektion induzieren kann. Ob dies ein APC- Effekt ist konnte nicht nachgewiesen werden.

Im Tierversuch [20] wurde eine verstärkte IPC- induzierte Myokardprotektion durch multiple aufeinanderfolgende Zyklen kurzer Ischämie und Reperfusion gezeigt. Bei multiplen Zyklen IPC war es nötig, parallele Signalkaskaden über die PKC $\epsilon$  bzw. die Tyrosinkinase zu blockieren, um die Myokardprotektion vollständig aufzuheben, während bei einfachem Zyklus IPC die Blockierung eines einzigen Enzyms zur vollständigen Aufhebung der Myokardprotektion ausreichte. Auch für die APC gelang am Tiermodell der Nachweis der verstärkten Myokardprotektion durch multiple Zyklen im Vergleich zu einem einfachen Zyklus [32][33].

### **1.5 Ziele dieser Studie**

In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass Sevofluran bzw. auch andere volatile Anästhetika eine protektive Wirkung am menschlichen Myokard besitzen, der genaue Mechanismus wurde jedoch nicht geklärt. Der Beweis, dass die Kardioprotektion durch APC vermittelt wird, wurde aber bis zu unserer Studiendurchführung noch in keiner Studie erbracht. Ziel der Studie war es zu untersuchen, ob das Konzept der APC auch im humanen Myokard unter klinischen Bedingungen nachweisbar ist. Hierzu wurde in dieser Studie insbesondere der Einfluss verschiedener APC Protokolle untersucht. Da zur Durchführung dieser Studie der Beginn der myokardialen Ischämie genau bekannt sein muss, haben wir diese Studie an Patienten durchgeführt, die sich elektiv einem herzchirurgischen Eingriff mit Einsatz der Herz - Lungenmaschine unterziehen mussten. Eine wesentliche Rolle scheint uns

dabei eine Auswaschphase nach der Sevofluran- Applikation zu spielen bzw. die Anwendung mehrerer Zyklen APC.

In einem ersten Teil der Studie [34] wurde versucht, die APC mit einem Zyklus Sevofluran (1 MAC 5 Min.), gefolgt von einer Auswaschphase (10 Min.) vor Beginn der extrakorporalen Zirkulation und nachfolgender Myokardischämie, auszulösen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Propofol-basierter TIVA konnten keine Unterschiede in Bezug auf postischämischem myokardialen Zellschaden bzw. myokardiale Dysfunktion gezeigt werden. Es konnte ebenfalls keine Aktivierung bzw. Translokation der molekularbiologisch untersuchten Enzyme PKC $\epsilon$  bzw. Src- Tyrosinkinase nachgewiesen werden, die als wichtige Bestandteile paralleler Signalkaskaden in experimentellen Studien nachgewiesen wurden [20].

Ziel dieses Teils der Studie war es zu zeigen, dass die Applikation zweier Zyklen Sevofluran, jeweils gefolgt von einer Auswaschphase, vor Beginn der extrakorporalen Zirkulation und nachfolgender Myokardischämie, beim Menschen eine APC induziert und den postischämischen myokardialen Zellschaden reduziert. Des Weiteren wurde untersucht, ob dabei die Aktivierung oder Translokation der PKC $\epsilon$  bzw. der Src- Tyrosinkinase eine wesentliche Rolle spielen.

## 2. Material und Methoden

Die vorliegende Studie wurde nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt (Aktenummer 2052). Die Patienten wurden ausführlich über das Ziel und die Methoden der Studie aufgeklärt und eine schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme wurde eingeholt. Nach Sichtung der Krankenakten in Hinblick auf Ein- und Ausschlusskriterien wurden die Patienten nach ihrer Bereitschaft zur Teilnahme befragt, über die Risiken der Studie aufgeklärt und bei Einwilligung in die Studie eingeschlossen. Die Auswahl der Patienten erfolgte fortlaufend entsprechend des Operationsplanes. Die Patienten wurden nach erfolgter Einwilligung vor der Anästhesieeinleitung randomisiert in eine der zwei Studiengruppen eingeteilt.

### 2.1 Patientenkollektiv

In die Untersuchung wurden 20 Patienten (18 Männer und 2 Frauen) mit koronarer Herzerkrankung mit der Indikation zur elektiven aorto-koronaren Bypass-Operation unter extrakorporaler Zirkulation als Ersteingriff und einer präoperativen linksventrikulären Ejektionsfraktion (EF) >40% eingeschlossen. Zu den präoperativen Ausschlusskriterien zählten das fehlende Einverständnis beziehungsweise die fehlende Geschäftsfähigkeit des Patienten, eine *American-Society-of-Anesthesiologists*(ASA)-Klassifizierung IV oder V, eine innerhalb von 24 Stunden präoperativ aufgetretene Angina pectoris, eine instabile Angina pectoris oder ein frischer Myokardinfarkt, Rezidivoperationen nach früherer operativer Koronarrevaskularisation, gleichzeitige Indikation zur Herzklappen- oder Aorten Chirurgie, Notwendigkeit der Gabe von Katecholaminen präoperativ oder notwendiger Einsatz mechanischer Unterstützungsverfahren (z.B. intraaortale Ballonpumpe), eine medikamentöse Therapie mit oralen Antidiabetika sowie Niereninsuffizienz (Kreatinin > 1.5 mg/dl), eine eingeschränkte Leberfunktion (GOT oder GPT > 150 U/l) oder eine klinisch relevante Lungenerkrankung. Eine Therapie mit

Thrombozytenaggregationshemmern wurde 1 Woche vor der Operation gestoppt. (Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Patientendaten und Risikoprofil

	<b>Kontrolle (n = 10)</b>	<b>Sevofluran (n = 10)</b>
<b>Patientendaten</b>		
Geschlecht [M/F]	9/1	9/1
Alter [Jahre]	66 ± 7	67 ± 8
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	30.2 ± 3.4	29.0 ± 2.7
Ejektionsfraktion [%]		
EuroSCORE, Median (Bereich)	4.0 (1-8)	5.0 (0-6)
<b>Vorerkrankungen</b>		
Hypertonie	10	8
HLP	9	8
Hauptstammstenosen	3	4
Herzinfarkt: <3 Monate	0	1
Herzinfarkt: >3 Monate	3	3
PTCA / Stent	1	2
Neurologische Vorerkrankungen	0	1
pAVK	8	4
Diabetes mellitus	0	0
COPD	3	1
Nikotin	3	3
<b>Medikamente</b>		
ACE-Hemmer	7	8
β-Blocker	8	7
Calciumantagonisten	1	2
Nitrate	3	2
Molsidomin	1	2
Diuretika	4	5
Insulin	0	0
Bronchodilatatoren	1	1
Heparine	7	7
Statine	6	7

m: männlich; w: weiblich; BMI: *Body Mass Index*; EuroSCORE: *European System for Cardiac Operative Risk Evaluation*; ACE-Inhibitor: *Angiotensin Converting Emzyme Inhibitor*; Ca<sup>2+</sup>-Antagonist: Calciumkanalantagonist; HLP: Hyperlipoproteinämie; PTCA: perkutane transluminale coronare Angioplastie; AVK: arterielle Verschlusskrankheit; COPD: Chronisch obstruktive Lungenerkrankung

## 2.2 Studiengruppen

Die Patienten wurden vor Operationsbeginn in zwei verschiedene Studienprotokoll-Gruppen randomisiert. Um den Datenschutzbestimmungen zu entsprechen, wurde jedem in chronologischer Reihenfolge in die Studie aufgenommenen Patienten eine Behandlungsnummer zugewiesen. Die Zuteilung des Patienten in eine der zwei Studiengruppen wurde bis zum Anästhesiebeginn in einem Umschlag verschlossen gehalten. Die Studie wurde als Doppelblindstudie geführt, weder die Operateure, die Stationsärzte, das Pflegepersonal noch die wissenschaftlichen Mitarbeiter waren darüber informiert, welcher Protokollgruppe die Patienten angehörten.

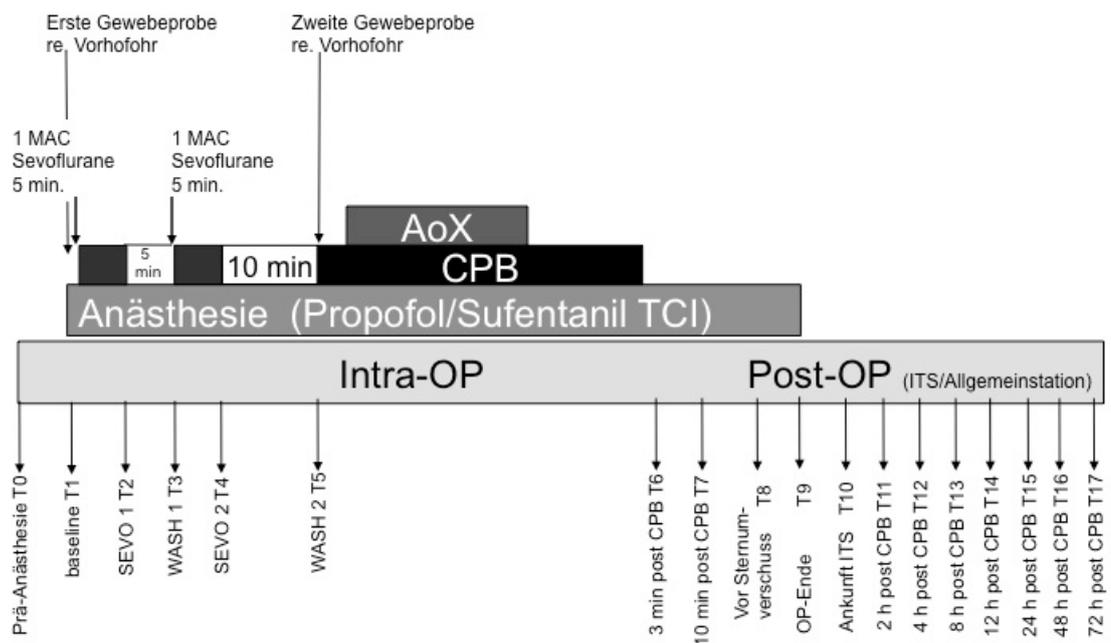
## 2.3 Studienprotokoll

Alle Patienten wurden nach einem standardisierten und etablierten Verfahren prämediziert und anästhesiert:

Alle präoperativen kardialen Medikamente wurden bis zum OP-Morgen weiter appliziert. Alle Patienten erhielten eine Standardprämedikation von 0.02 - 0.04 mg/kg Flunitrazepam (Rohypnol®) am Vorabend und ca. 90 Minuten vor dem operativen Eingriff. In allen Gruppen erhielten die Patienten zur Narkoseeinleitung 0.5 – 2.0 mg/kg Propofol (Disoprivan®), 0.1 – 0.4µg/kg Sufentanil (Sufenta®) und 0.1 mg/kg Pancuroniumbromid (Pancuronium-ratiopharm®). Anschließend wurde die Narkose mit einer kontinuierlichen Infusion von Propofol (*target controlled infusion*, angestrebter Plasmaspiegel 3 µg/ml) und Sufentanil (0.1 – 0.6 µg/kg/h) aufrechterhalten. Zur Antikoagulation erfolgt nach der Präparation der Arteria thoracica interna bei allen Patienten eine ACT (*activating clotting time*) gesteuerte Heparinisierung mit einem Heparin Bolus von 0,3 mg/ kg Körpergewicht Heparin-Natrium. Während kardiopulmonalem Bypass (CPB) wurde die ACT regelmäßig gemessen und durch weitere Heparinungen der Zielwert von grösser 400 sec eingehalten. Die Heparinwirkung wurde nach Beendigung des CPB ACT-kontrolliert mit Protaminhydrochlorid antagonisiert.

Das Studienprotokoll sah vor, dass in allen Gruppen bei Patienten mit einem mittleren arteriellen Druck (MAP) von unter 70mmHg Noradrenalin titrierend intravenös appliziert wurde. Bei einem *Cardiac Index* (CI) von unter 2,5 l/m<sup>2</sup> KOF (Körperoberfläche) sollte den Patienten Dobutamin intravenös verabreicht werden.

In der Kontrollgruppe wurde die Narkose während der gesamten Operation ausschließlich mit Propofol und Sufentanil als totale intravenöse Anästhesie aufrecht erhalten. Nach der ersten Gewebeprobeentnahme aus dem rechten Vorhof wurden den Patienten in der Sevoflurangruppe 5 Minuten ein MAC Sevofluran appliziert mit einer anschließenden 5-minütigen Auswaschphase (12 l/min Frischgasfluß), gefolgt von einer weiteren 5-minütigen Zufuhr von einem MAC Sevofluran. Im Anschluss an die zweite Sevoflurangabe folgt eine 10-minütige Auswaschphase (12 l/min Frischgasfluss). Während der Sevofluranapplikation wurde die Propofolinfusion kurzzeitig pausiert. Die zweite Gewebeprobeentnahme aus dem rechten Vorhof wurde anschließend, vor Beginn des CPB, entnommen (Abb.2).



**Abb. 2:** Studienprotokoll MAC: minimal alveoläre Konzentration; AOX: Aortenklammzeit; CPB: Extrakorporale Zirkulation; TCI (Target controlled infusion): zielgerichtete Infusion mit definiertem Plasmaspiegel; ITS: Intensivstation

## 2.4 Perioperatives Management

Alle Patienten wurden nach Ankunft im Operationssaal zunächst mit einem Elektrokardiogramm (EKG; Ableitungen II und V5), einem Pulsoxymeter und einem peripher-venösen Zugang versorgt. Nach einmaliger nicht invasiver Blutdruckmessung erhielt jeder Patient einen arteriellen Zugang (A. radialis) zur kontinuierlichen invasiven Blutdruckmessung.

Nach Applikation der Medikamente zur Narkoseeinleitung wurden alle Patienten orotracheal intubiert und beatmet. Ein dreilumiger zentralvenöser Katheter (Arrow Multi-Lumen) zur kontinuierlichen Messung des Zentralvenendruckes (ZVD) sowie ein pulmonalarterieller Katheter (Swan-Ganz CCOmbo CCO/SvO<sub>2</sub>, Edwards Lifesciences) zur kontinuierlichen Messung von venöser Sauerstoffsättigung (SvO<sub>2</sub>), *cardiac index* (CI), Temperatur und pulmonalarteriellem Druck bzw. Pulmonal-arteriellen Okklusionsdruckes (PAOP) konnten anschließend über die rechte Vena jugularis interna mit Hilfe der dazugehörigen Applikationssysteme (Introducerset) unter Monitorkontrolle in die entsprechenden Positionen vorgeschoben bzw. eingeschwenkt werden.

Nach Sternotomie platzierte der Operateur einen linksventrikulären Katheter (Millar-Katheter) zur Messung der linksventrikulären Drücke bzw. Druckänderungen. Über eine Lungenvene, dem linken Vorhof und durch die Mitralklappe wurde der Katheter positioniert.

Die intraoperativ entnommenen Gewebeproben aus dem rechten Vorhof wurden jeweils entsprechend gekennzeichnet und direkt nach jeweiliger Entnahme in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Vor Beendigung der extrakorporalen Zirkulation erhielten die Patienten epimyokardiale Schrittmacherelektroden und wurden dann mit einer Frequenz von 90 1/min stimuliert.

Vor Sternumverschluss entfernte der Operateur den Millar-Katheter.

Nach Beendigung der Operation wurden die Patienten in beatmetem Zustand auf die Intensivstation verlegt, ein 12 Kanal-EKG wurde unter kurzzeitiger Deaktivierung des Schrittmachers, sofern die Eigenfrequenz des Patienten dies

erlaubte, geschrieben. Die Extubation erfolgte je nach Zustand des einzelnen Patienten noch am OP- Tag bzw. in der folgenden Nacht. Vor Verlegung der Patienten am ersten post- OP- Tag auf die periphere Station wurden der Swan-Ganz- Katheter und der arterielle Zugang entfernt, der zentralvenöse Katheter wurde bis zum 3. post- OP- Tag belassen.

Die Therapie der Patienten auf der Intensiv- bzw. Allgemeinstation wurde nach klinischem Zustand durch die behandelnden Ärzte festgelegt. Diese waren gegenüber der Gruppenzugehörigkeit verblindet.

## **2.5 Hämodynamische Datenanalyse**

Zur Beurteilung der Herz- Kreislauffunktion wurden zu definierten Zeitpunkten verschieden hämodynamische Parameter bestimmt. Zur Angleichung der intrathorakalen Drücke erfolgte die Messung zu den einzelnen Messzeitpunkten jeweils nach Diskonnektion der Beatmungsschläuche vom Tubus in Apnoephasen.

Herzfrequenz und arterielle Sauerstoffsättigung ( $\text{SaO}_2$ ) wurden kontinuierlich gemessen. Der mittlere arterielle Druck (MAP), der das Produkt aus Herzzeitvolumen (HZV) und totalem peripheren Widerstand wiedergibt, wurde über den arteriellen Zugang abgeleitet und mittels Transducer- System am Monitor angezeigt. Vor der ersten Messung erfolgt ein Null- Abgleich zum atmosphärischen Druck. Analog dazu wurde der zentrale Venendruck (ZVD) als Parameter der rechtsventrikulären Vorlast über den zentralvenösen Schenkel des Pulmonalarterienkatheters gemessen. Zur Beurteilung der Druckverhältnisse im Lungenkreislauf wurde der mittlere pulmonalarterielle Druck (MPAP) von der Spitze des Pulmonalarterienkatheters abgeleitet und auf gleiche Art und Weise wie MAP und ZVD gemessen. In allen drei Fällen wurde der Transducer auf Höhe der jeweiligen Messsensoren positioniert.

Nach Registrierung des MPAP wurde der Ballon an der Spitze des Pulmonalarterienkatheters mit Luft gefüllt und unter Monitorkontrolle in die PAOP- Position eingeschwenkt. Anschließend erfolgte die Messung des pulmonalkapillären Verschlussdrucks (PAOP), der unter physiologischen

Bedingungen die Druckverhältnisse im linken Vorhof widerspiegelt und somit der Abschätzung der linksventrikulären Vorlast dient.

Über den Pulmonalarterienkatheter wurden außerdem das Herzzeitvolumen (HZV) und die venöse Sauerstoffsättigung ( $SvO_2$ ) gemessen und über einen Vigilanz- CCO- Monitor ( Baxter Healthcare) abgeleitet.

Die Messung des Herzzeitvolumens erfolgte mittels Thermodilution. Ein Heizfilament am proximalen Ende des Pulmonalarterienkatheters erzeugt jeweils kurzzeitig Wärme, die entsprechende Änderung der Bluttemperatur über die Zeit wird am Thermistor der Katheterspitze gemessen und kann zum Herzzeitvolumen (HZV) umgerechnet werden. Unter Berücksichtigung von Größe und Gewicht und der daraus resultierenden Körperoberfläche (KOF) der Patienten wird das HZV als *cardiac index* (CI) angegeben, der sich wie folgt berechnet:  $CI = HZV / KOF$

Die Messung der  $SvO_2$  erfolgte kontinuierlich nach Kalibrierung des Systems mit Hilfe der Ergebnisse einer gemischtvenösen Blutgasanalyse. Die  $SvO_2$  korreliert bei annähernd gleichem Sauerstoffverbrauch des Organismus und bei vollständiger arterieller Sauerstoffsättigung mit dem HZV. Sinkt das HZV, so erhöht sich die Sauerstoffausschöpfung des Blutes und die  $SvO_2$  fällt entsprechend ab.

Alle bisher genannten Parameter wurden direkt nach Anlage der jeweiligen Messeinheit als Ausgangswert präoperativ gemessen. Weitere Messungen erfolgten nach Sternotomie, jeweils vor und nach den einzelnen Sevofluran-Gaben bzw. an entsprechender Stelle in der Kontrollgruppe, dann 3 min nach Beendigung des CPB, 10 min. nach Beendigung des CPB, vor Sternumverschluß und nach OP- Ende. Auf der Intensivstation erfolgten Messungen nach Ankunft, in den ersten 4 Stunden stündlich, später dann nach 8, 12 und 24 h post- OP.

Mit Hilfe des Millar- Katheters konnten intraoperativ die Druckverhältnisse im linken Ventrikel gemessen werden. Die Daten wurden über eine Messeinheit mit Hilfe des Computerprogramms Chart 4 aufgezeichnet bzw. verschiedene Parameter berechnet.

Die Messzeitpunkte waren jeweils vor und nach Gabe von Sevofluran bzw. zur entsprechenden Zeit in der Kontrollgruppe als Ausgangswerte, weitere Messungen erfolgten jeweils 3 und 10 min nach Beendigung des CPB.

Als Maß für die linksventrikuläre Funktion wurden der Spitzendruck LVPmax und der Minimaldruck LVPmin gemessen. Der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) markiert den Punkt direkt vor dem Druckanstieg im linken Ventrikel und ist ein sensibler Marker für die Vorlast des linken Ventrikels. Mit Hilfe der ersten Ableitung der Druckkurve wurden maximaler Druckanstieg  $dP/dt \max$  und maximaler Druckabfall  $dP/dt \min$  als Kontraktilitätsparameter berechnet. Des Weiteren wurde die Zeitkonstante der isovolumetrischen Relaxation  $\tau$ , einem sensiblen Parameter der LV-Relaxation, anhand der folgenden Formel berechnet:

$P(t) = P_0 \cdot \exp(-t/\tau)$ , wobei  $P(t)$  der Druck zum Zeitpunkt  $t$  ist und  $P_0$  der LVEDP.

## 2.6 Biochemische Datenanalyse

Bei allen Patienten wurden Blutentnahmen am Vortag der Operation, prä-, intra- und postoperativ zu den Zeitpunkten T1 (Ausgangswert), T7 (10 Minuten post-CPB), T12 (4h post-CPB), T14 (12h post-CPB), T15 (24h post-CPB), T16 (48h post-CPB) und T17 (72h post-CPB) durchgeführt. Gemessen wurden Troponin I, CK (Kreatinkinase) und die herzspezifische Isoform CK-MB, sowie das *brain natriuretic peptide* (BNP) als Indikatoren des myocardialen Zellschadens bzw. der myocardialen Dysfunktion. Des Weiteren wurden Kreatinin, Harnstoff, Blutbild mit Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, mittlerem korpuskulärem Volumen (MCV) und mittlerem korpuskulärem Hämoglobin (MCH), sowie eine Gerinnungsbestimmung mit Thromboplastinzeit nach Quick und partielle Thromboplastinzeit (pTT) gemessen. Alle Blutproben wurden unmittelbar nach Entnahme zentrifugiert und das Plasma bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren und gelagert.

Troponin I wurde mittels Mikropartikel-Enzymimmunoassay (MEIA), Sandwich-Assay, Analysensystem Abbott AxSYM bestimmt. Der Referenzbereich bei der Troponin-I-Bestimmung betrug  $\leq 0,4 \text{ ng/ml}$ . Die BNP-Messungen wurden von Siemens Medical Solutions Diagnostics (Fernwald, Deutschland) durchgeführt.

Zusätzlich zu den im Labor bestimmten Parametern wurden bei allen Patienten Blutgasanalysen durchgeführt. Dabei sind nachfolgende Werte untersucht worden: pH-Wert, partielle Sauerstoffsättigung ( $pO_2$ ), partielle Kohlendioxidsättigung ( $pCO_2$ ), Basenüberschuss (BE), Hämoglobin (Hb), Natrium-, Kalium- und Calciumkonzentration und Glukosekonzentration.

## **2.7 Molekularbiologische Datenanalyse (Fraktionierung und *Western-Blot*-Analyse)**

### **2.7.1 Homogenisation und Fraktionierung**

Die bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagerten Gewebeproben aus den rechten Herzvorhoföhren wurden nach eintauchen in Flüssigstickstoff durch einen Edelstahl- Potter pulverisiert, anschließend mit 2,5ml Lysepuffer übergossen und dann mittels Homogenisator durchmischt.

Anschließend wurde das Homogenisat mit 2400 rpm (1000g) bei  $4^\circ\text{C}$  10min zentrifugiert, der Überstand entspricht der Cytosolfraktion der Zellen.

Das Pellet (Bodensatz) wurde dann mit Tritonpuffer vermischt und für 60 min auf Eis gelagert, anschließend mit 12000 rpm (16000g) bei  $4^\circ\text{C}$  15min zentrifugiert, der Überstand entspricht der Membranfraktion der Zellen. Das jetzt verbliebene Pellet wurde mit Tritonpuffer übergossen und gemischt, es entspricht der Kernfraktion der Zellen.

### **2.7.2 Proteinbestimmung**

Um sicherzustellen, dass jede Probe die gleiche Proteinmenge enthielt, musste die Proteinkonzentration jeder Probe ermittelt werden. Hierfür wurde das

Verfahren nach Lowry verwendet. Dabei wurden 100µl im Verhältnis 1:100 verdünnte Probe mit 500µl Lowry I- Lösung gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 50µl Lowry II- Lösung dazugegeben und für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die nun auftretende Farbreaktion wurde im Spektrometer bei 750 nm gemessen und die Proteinkonzentration anhand eines Abgleichs mit einer Eichgeraden bestimmt. Anschließend wurden die Konzentrationen der Proben einer Fraktion durch Verdünnen mit Lysepuffer angeglichen.

### **2.7.3 Elektrophorese**

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch eine Gelelektrophorese im Molekulargewichtsbereich von 10 – 100 kDa. Die verwendeten Gele bestanden aus einem Sammelgel und einem 7,5%igem Trenngel.

Die Proben wurden zunächst mit Loadingbuffer (Verhältnis 2/3 Probe zu 1/3 Loadingbuffer) gemischt und anschließend für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Diese Behandlung induzierte eine Anlagerung stark negativ geladener SDS-Moleküle an die hydrophoben Abschnitte der Proteine. Dadurch wurde deren Eigenladung überdeckt, so dass die resultierende Gesamtladung proportional zur Molekülgröße der Proteine war. Die Verwendung des reduzierenden Agens DTT im Lysepuffer bewirkte das Lösen der intra- und intermolekulären Disulfidbrücken und ermöglichte dadurch die elektrophoretische Auftrennung von Proteinuntereinheiten. Außerdem hingen so die Laufeigenschaften der Proteine nur von deren Molekülgröße ab. Der Elektrophoreselauf erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100V über 90 Minuten. Im ersten *Slot* wurde jeweils ein Standardproteingemisch (Precision Plus Protein, BioRad) aufgetragen, welches als Größenstandard bei der Auswertung diente. Die weiteren *Slots* wurden dann mit beiden Proben eines Patienten direkt nebeneinander befüllt.

#### **2.7.4 Transfer**

Für die *Western-Blot*-Analyse wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine in einem elektrischen Feld (100V für 1 Stunde) mit einem Transferpuffer auf eine mit Methanol aktivierte Nitrozellulosemembran transferiert um sie so einem immunologischen Nachweis zugänglich zu machen. Anschließend wurden die Membranen zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen in ein mit Blocking- Lösung 5% gefülltes Gefäß gegeben und für 2 Stunden auf einen Rüttler gestellt.

Zum Nachweis einer erfolgreichen Elektrophorese wurden die Gele mit einer Coomassie- Färbelösung für 30 Minuten angefärbt und anschließend für 2 x 30 Minuten in einer Coomassie- Entfärbelösung wieder entfärbt. Die Gele mit den nun sichtbaren Proteinbanden wurden mit Hilfe eines KODAK imager fotografiert.

#### **2.7.5 Immunologischer Proteinnachweis**

Die geblockten Membranen wurden mit dem 1. Antikörper, verdünnt in Blocking- Lösung 1% / BSA- Lösung im Verhältnis nach Angaben des jeweiligen Herstellers, bedeckt und bei +4°C für 24 Stunden inkubiert. Danach wurden die Membranen 3x 10 Minuten in TBST- Puffer gewaschen und anschließend mit peroxidase markiertem Sekundäntikörper, verdünnt in Blocking- Lösung 1% nach Angaben des Herstellers, bedeckt, bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubiert und erneut 3x 10 Minuten mit TBST- Puffer gewaschen.

Dann wurden die Membranen in einer Dunkelkammer bei Rotlicht mit ECL 1+2 Lösung für 1 Minute angefärbt und zusammen mit einem Hyperfilm und einer durchsichtigen, flüssigkeitsisolierenden lichtdurchlässigen Folie in eine Filmkassette gelegt. Die Belichtungszeit orientierte sich jeweils an der Stärke der Lichtreaktion. Der Film wurde anschließend in einem Entwickler (Eucobrom) entwickelt, die Reaktion in einem Stopbad (Wasser) gestoppt und anschließend mit einem Fixierer (Kodak) fixiert.

### **2.7.6 Densidometrie**

Die Filme wurden mit Hilfe des KODAK imager eingescannt, danach wurde eine Dichtemessung (Densidometrie) der jeweiligen spezifischen Banden durchgeführt und als Zahlenwert ausgegeben. Eine hohe Zahl entsprach dabei einer hohen Dichte der Bande auf dem Film bzw. einer großen Menge des jeweiligen Proteins. Die Ergebnisse wurden als Quotient aus der mittleren Lichtintensität der Banden ausgedrückt.

### **2.7.7 Auswertung**

Zur Auswertung der Phosphorylierung der einzelnen Proteine (PKC $\epsilon$ , PKC $\alpha$  und Src- Tyrosinkinase) in den unterschiedlichen Fraktionen wurde zunächst der Quotient zwischen Proteingesamtmenge und phosphorylierter Menge in den einzelnen Proben bestimmt und anschließend zwischen den beiden Gewebeproben eines Patienten verglichen. Danach wurden die Daten der Sevoflurangruppe und die der Kontrollgruppe gegenübergestellt.

Zur Bestimmung einer möglichen Translokation wurden die entsprechenden Proteine gegen Tubulin bzw. Aktin gemessen um unterschiedliche Proteinmengen der einzelnen Proben in die Berechnung mit einbeziehen zu können. Anschließend wurden die relativen Mengen der Proteine in den unterschiedlichen Fraktionen verglichen.

In allen Fällen wurden die zu vergleichenden Proben jeweils in nebeneinander liegenden *Slots* der Gele aufgetragen.

## 2.7.8 Zusammensetzung der einzelnen Lösungen:

Lysepuffer:	10ml STAMM- Lösung 200µl Inasen- Inhibitor- Mix 7,7 mg DTT 100µl Okadaic- Acid
STAMM-Lösung:	60,57 mg Sigma 7-9 (=5mM) 210 mg NaF (=50mM/ml) 36,78 mg Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (=2mM/ml) 76,08 mg EGTA (=2mM/ml) 100 ml Aqua dest
Inasen-Inhibitor-Mix:	1 mg Aprotinin 1 mg Leupeptin 1 mg Pepsatin 10 ml Tris-HCl Lösung, pH 7,4
Triton- Puffer:	8 ml Lysepuffer 80 µl Triton
Trenngele 7,5% :	5ml PAA 30% 9,8ml Aqua dest 5ml 1,5M Sigma 7-9, pH 8,8 200µl SDS 10% 20µl Temed 100µl APS 10%
Sammelgele:	2,55ml PAA 30% 10,5ml Aqua dest 1,5ml 1,5M Sigma 7-9, pH 6,8 150µl SDS 10% 30µl Temed 150µl APS

Loading Buffer:	30mg Bromphenolblau 1g SDS 2ml Glycerol 1ml 500mM Tris-HCl, pH 6,8 7ml Aqua dest
Running Buffer:	3g Sigma 7-9 14,4 g Glycin 1g SDS Aqua dest ad 1l
Transfer Buffer:	6g Sigma 7-9 28,8g Glycin 400ml Methanol 1600ml Aqua dest
Coomassie- Färbung Färbelösung:	750mg Coomassie Blue 25ml Eisessig 112,5ml Ethanol 112,5ml Aqua dest Zum Abtrennen unlöslicher Farbstoffanteile muss die Lösung vor Gebrauch filtriert werden.
Entfärbelösung:	100ml Eisessig 333,3ml Ethanol Aqua dest ad 1l
Waschpuffer:	2000ml Aqua dest 10 Tabletten PBS 2ml Tween 20 auf pH 8,0 einstellen

5% Blocking Lösung:	50g dried skimmed milk 5 Tabletten PBS 1ml Tween 20 1000ml Aqua dest
1% Blocking Lösung:	5% Blocking Lösung 1:5 mit Waschpuffer verdünnen

### 2.7.9 Antikörper

anti- PKC $\epsilon$ , 1:10000	Upstate, Lake Placid, NY, USA
anti- phospho PKC $\epsilon$ (ser 729), 1:10000	Upstate, Lake Placid, NY, USA
anti- PKC $\alpha$ , 1:10000	Upstate, Lake Placid, NY, USA
anti- phospho PKC $\alpha$ , 1:10000	Upstate, Lake Placid, NY, USA
anit- src, 1:10000	Cell Signalling, Danvers, MA, USA
anti- phospho src, 1:10000	Cell Signalling, Danvers, MA, USA
anti- tubulin, 1:50000	Sigma, Taufkirchen
anti- actin, 1:10000	Sigma, Taufkirchen

Die Antikörper wurden nach Angaben des Herstellers entweder in einer fünfprozentigen BSA Lösung oder in einer einprozentigen Blocklösung verdünnt.

## 2.8 Statistische Datenanalyse

Primärer Endpunkt unserer Studie war die Reduktion des myokardialen Zellschadens dargestellt durch die Troponin I- Freisetzung. Vor Beginn der Studie führten wir eine *Poweranalyse* zur Berechnung der notwendigen Gruppengröße durch (GraphPad StatMate, San Diego, Kalifornien, USA). Die Berechnung ergab eine Gruppengröße von 10 Patienten pro Gruppe um einen Unterschied von 40% der Mittelwerte mit einer Power von 95% nachweisen zu können.

Alle Daten wurden auf eine normale Verteilung untersucht (GraphPad Prism4 for Windows, Graph Pad). Die Patienteneigenschaften der Studiengruppen wurden mit Hilfe des *Fisher exact test* analysiert. Die gemessenen Parameter wurden mit Hilfe einer zwei- Wege Varianzanalyse gefolgt von *Dunnetts Post-Hok- Test* untersucht, sowohl für Gruppeneffekte zwischen den Gruppen als auch für Zeiteffekte innerhalb der Gruppen mit Bezug zum Ausgangswert. Die Daten sind alle als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

### 3. Ergebnisse

Das perioperative Risiko der Populationen in beiden Gruppen wurde mit Hilfe des *EuroSCORE* bestimmt, es wurde sowohl für die Sevoflurangruppe als auch für die Kontrollgruppe ein durchschnittlich mittleres Operationsrisiko berechnet. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Anzahl der Koronarbypässe war in beiden Gruppen gleich, ebenso die Ischämiezeiten während ausgeklemmter Aorta und die Reperfusionzeiten (Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Intraoperative Daten

	Kontrolle (n=10)	Sevofluran (n=10)
Bypassanzahl	4 (2-4)	4 (2-5)
Extrakorporale Zirkulation (Minuten)	98 ± 27	95 ± 22
Aortenklammzeit (Minuten)	52 ± 17	51 ± 16
Reperusionszeit (Minuten)	39 ± 13	41 ± 9

Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen in Bezug auf Anzahl der Bypässe, Dauer der extrakorporalen Zirkulation, Aortenklammzeit oder Reperusionszeit

Der Zeitraum bis zur Extubation der Patienten war in den Gruppen vergleichbar. Auch die postoperative Verweildauer auf der Intensivstation bzw. der gesamte Krankenhausaufenthalt waren nicht signifikant unterschiedlich (Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Postoperative Daten

	Kontrolle (n=10)	Sevofluran (n=10)
Zeitdauer der Intubation (Minuten)	348±191	296±166
Dauer ITS- Aufenthalt (Stunden)	25±8	21±1
Dauer Krankenhausaufenthalt (Tage)	15±5	12±5

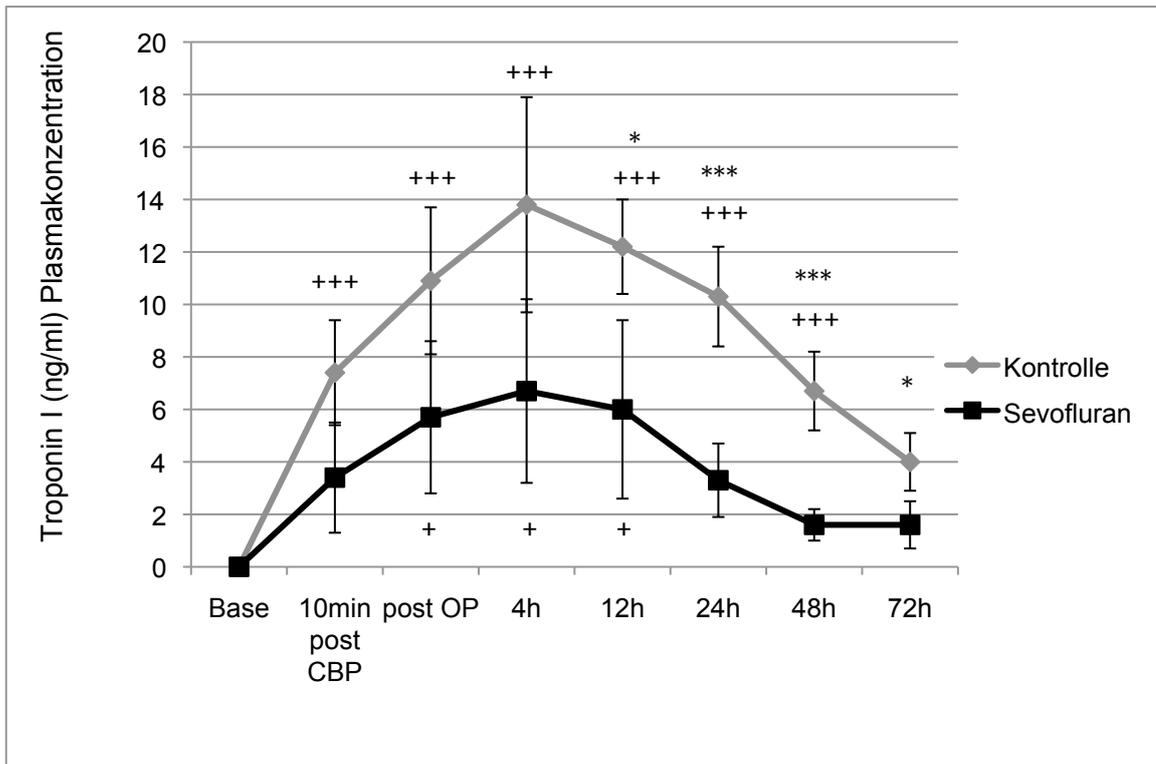
Die Intubationsdauer, Verweildauer auf der ITS und Krankenhausverweildauer unterschieden sich nicht signifikant im Vergleich beider Gruppen; ITS: Intensivstation

### **3.1 Hämodynamische Daten**

Die allgemeinen hämodynamischen Parameter waren praeoperativ (T1) bzw. am Ende der Überwachung (T15, 24 h post- CPB) zwischen den Gruppen nicht unterschiedlich. Vor Beginn des CPB wurde in der Sevoflurangruppe eine Verlangsamung der Herzfrequenz und ein Anstieg des pulmonalarteriellen Okklusionsdrucks (PAOP) im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet. 8 Stunden post- CPB (T13) war ein Anstieg des CI in der Sevoflurangruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zu sehen, der Effekt verschwand allerdings 24h post- CPB (T 15) wieder. In Relation zu den Ausgangswerten war der CI post- CPB erhöht, dP/dtmax und linksventrikulärer Druck waren 10 Minuten nach CPB signifikant gestiegen. Aufgrund der Schrittmacherstimulation war die Herzfrequenz bei allen Patienten postoperativ erhöht. Die differenzierte Auswertung der hämodynamischen Daten war nicht Gegenstand dieser Arbeit.

### **3.2 Biochemische Daten**

In Bezug zur Kontrollgruppe waren die Plasmakonzentrationen von Troponin I in der Sevoflurangruppe signifikant reduziert (Abb. 3). Bei CK, CK- MB und BNP gab es allerdings keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Tabelle 4).



**Abb. 3:** Zeitlicher Verlauf der Troponinplasmakonzentration mit Standardabweichung; Kontrollgruppe vs. Sevoflurangruppe; Base: Ausgangswert vor CPB; CPB: cardiopulmonaler Bypass; +++ P < 0,001 versus Ausgangswert (Kontrolle); + P < 0,05 versus Ausgangswert (Sevoflurangruppe); \* P < 0,05, \*\*\* P < 0,001 Kontrolle versus Sevoflurangruppe

**Tabelle 4: Biochemische Daten**

	BASE	10 min post CPB	An-kunft ITS	4 h post CPB	12 h post CPB	24 h post CPB	48 h post CPB	72 h post CPB
Zeitpunkt	T1	T7	T10	T12	T14	T15	T16	T17
<b>Trop I [ng/ml]</b>								
CON	0	7.4±4.1†	10.9±5.7†	13.8±8.2†	12.2±3.7†	10.3±3.9†	6.7±3.1†	4.0±2.2
SEVO	0	3.4±4.2	5.7±5.8†	6.7±7.0†	6.0±6.9†*	3.3±2.9*	1.6±1.3*	1.6±1.8*
<b>CK [U/l]</b>								
CON	57±25	n/a	576±252	605±244	595±241	598±328	629±572	456±373
SEVO	69±36	n/a	576±282	609±339	595±269	701±486	442±265	213±101
<b>CK-MB [U/l]</b>								
CON	10.8±2.3	n/a	38.1±19.1	26.8±11.1	21.6±8.1	15.7±12.9	14.3±13.8	10.8±9.0
SEVO	5.2±2.9	n/a	28.6±16.1	22.4±15.2	18.9±10.2	20.2±17.4	8.8±8.1	4.9±5.3
<b>BNP [pg/ml]</b>								
CON	17.2±9.9	32.6±14.1	38.8±14.1	52.6±25.4	90.0±34.4	141.3±60.1†	133.1±71.2†	146.1±104.0†
SEVO	34.8±30.5	37.7±29.4	48.7±34.4	59.7±36.7	141.3±84.2	233.5±155.3†	239.1±120.8†	247.2±123.5†

CPB: kardiopulmonaler Bypass; CON: Kontroll-Gruppe; SEVO: Sevofluran-Gruppe; BASE: Ausgangswerte; CPB: cardio-pulmonaler Bypass; ITS: Intensivstation; Trop I: Troponin I in ng/ml; CK: Creatinkinase in U/l; CK-MB: Isoform der Creatinkinase in U/l; BNP: brain natriuretic peptide in pg/ml; \* P<0.05 vs. CON, † P< 0.05 vs. baseline

### 3.3 Molekularbiologischen Daten

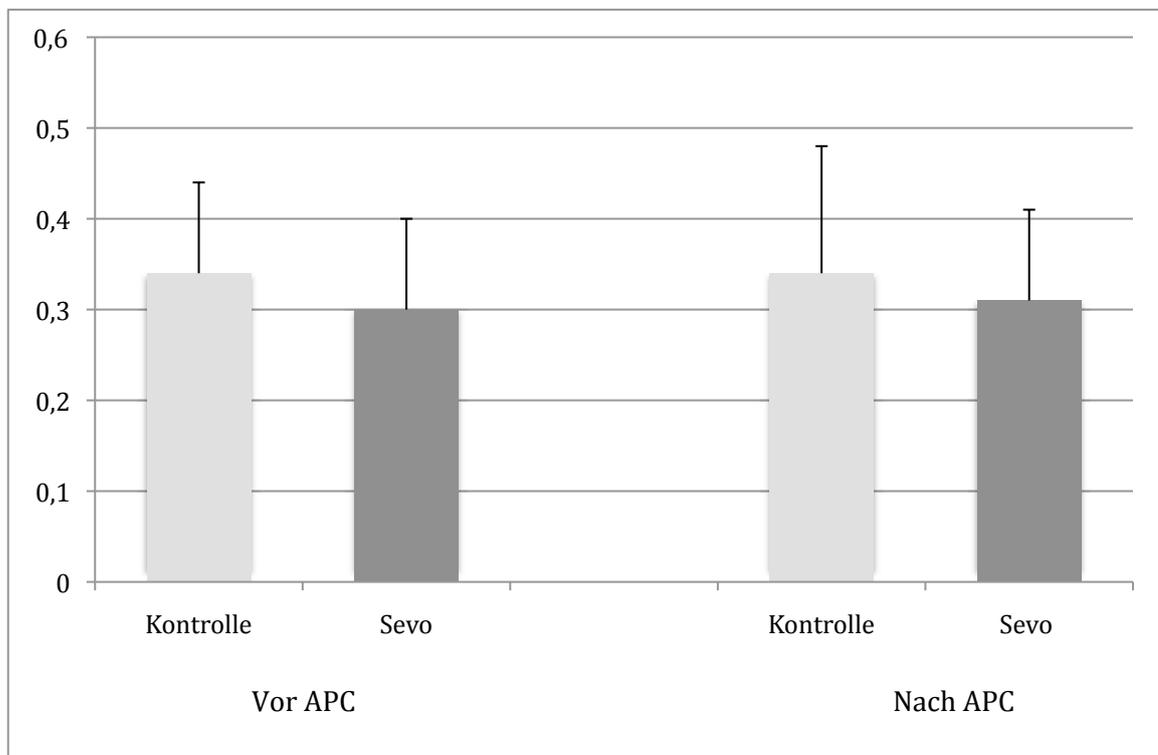
#### 3.3.1 PKC $\epsilon$

Bei der phosphorylierten Form der PKC $\epsilon$  gab es keine Unterschiede zwischen den beiden Proben eines Patienten bzw. auch nicht zwischen den Gruppen (Tabelle 5; Abb. 4).

**Tabelle 5:** Phosphorylierung der PKC $\epsilon$

PKC $\epsilon$ - Phosphorylierung	Gewebeprobe 1 (vor APC)	Gewebeprobe 2 (nach APC)
Kontrolle	0,34 $\pm$ 0,1	0,34 $\pm$ 0,14
Sevofluran	0,3 $\pm$ 0,1	0,31 $\pm$ 0,1

Der Zahlenwert ergibt die Mengenrelation der pPKC $\epsilon$  zur Gesamt- PKC $\epsilon$



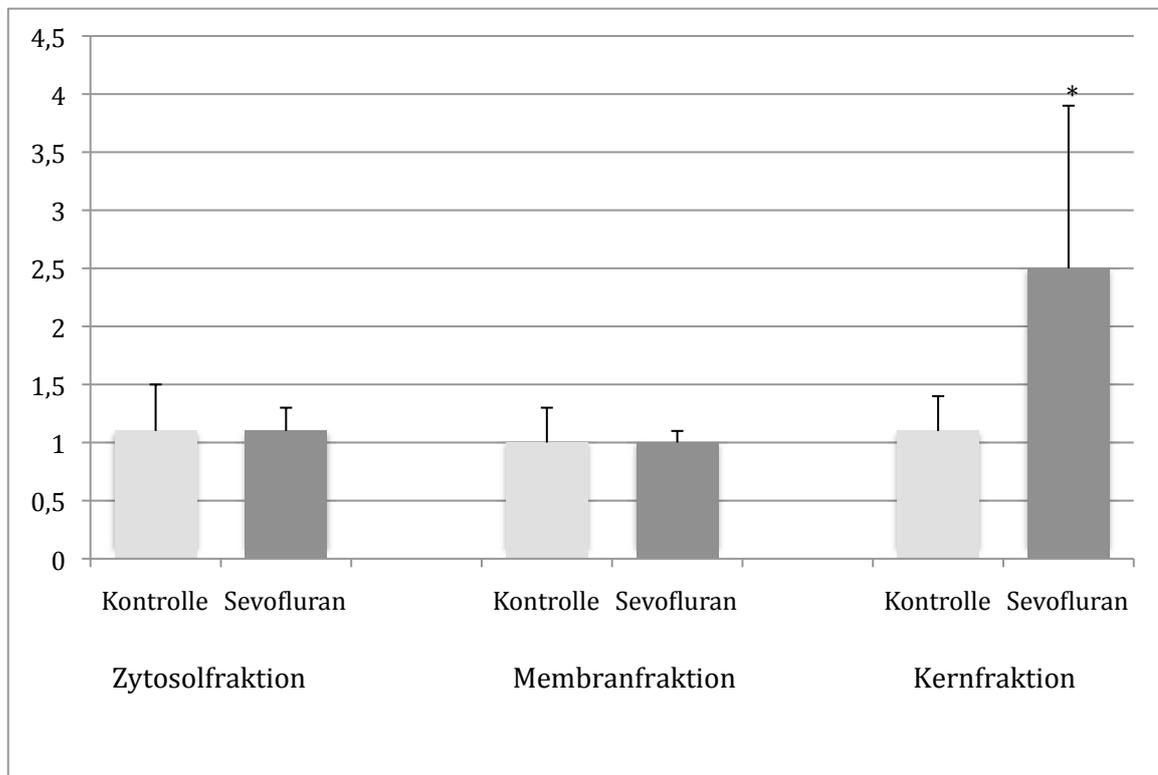
**Abb. 4:** Phosphorylierung PKC $\epsilon$ ; Relativer Anteil der pPKC $\epsilon$  zur Gesamt PKC $\epsilon$  vor und nach APC in den Studiengruppen (Sevo: Sevofluran), es gibt keine signifikanten Unterschiede weder innerhalb der Gruppen noch zwischen den Gruppen.

Es wurde eine signifikante Translokation der PKC $\epsilon$  in die Kernfraktion in der Sevoflurangruppe beobachtet, in der Kontrollgruppe gibt es keine Veränderungen der PKC $\epsilon$  zwischen den einzelnen Fraktionen (Tabelle 6, Abb. 5).

**Tabelle 6:** Translokation PKC $\epsilon$

PKC $\epsilon$ - Translokation	P1 (Zytosolfraktion)	P2 (Membranfraktion)	P3 (Kernfraktion)
Kontrolle	1,1 $\pm$ 0,4	1,0 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,3
Sevofluran	1,1 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 1,4*

Der Zahlenwert zeigt das Mengenverhältnis der PKC $\epsilon$  der Probe2 (nach APC) in Relation zur Probe1 (vor APC). \*P < 0.001 vs P1 und P2.



**Abb. 5:** Translokation PKC $\epsilon$ ; Relative PKC $\epsilon$ -Mengenänderung nach APC in den einzelnen Zellkompartimenten, in der Sevoflurangruppe wird eine signifikante Zunahme der PKC $\epsilon$  in die Kernfraktion beobachtet, \*P < 0.001 versus Zytosolfraktion.

### 3.3.2 PKC $\alpha$

Wir haben weder eine Aktivierung noch eine Translokation für die PKC $\alpha$  beobachtet (Tabellen 7 und 8).

**Tabelle 7:** Phosphorylierung PKC $\alpha$

<b>PKC<math>\alpha</math>- Phosphorylierung</b>	Gewebeprobe 1 (vor APC)	Gewebeprobe 2 (nach APC)
Kontrolle	0,6 $\pm$ 0,14	0,64 $\pm$ 0,15
Sevofluran	0,56 $\pm$ 0,11	0,61 $\pm$ 0,21

Der Zahlenwert zeigt das Verhältnis der pPKC $\alpha$ / Gesamt- PKC $\alpha$  in der entsprechenden Probe

**Tabelle 8:** Translokation PKC $\alpha$

<b>PKC<math>\alpha</math>- Translokation</b>	P1 (Zytosolfraktion)	P2 (Membranfraktion)	P3 (Kernfraktion)
Kontrolle	1,0 $\pm$ 0,2	0,96 $\pm$ 0,1	0,94 $\pm$ 0,2
Sevofluran	1,06 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	0,97 $\pm$ 0,1

Der Zahlenwert beschreibt das Mengenverhältnis der PKC $\alpha$  der Probe2 (nach APC) in Relation zur Probe Probe1 (vor APC).

### 3.3.3 Src-Tyrosinkinase

Auch für die Tyrosinkinase wurde keine Aktivierung gesehen (relatives Mengenverhältnis phospho- Src vor versus nach APC, Kontrollgruppe 0,95  $\pm$  0,3; Sevoflurangruppe 0,86  $\pm$  0,3)

## 4. Diskussion

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen, dass Kardioprotektion mittels APC am menschlichen Herzen möglich ist. Zwei Zyklen Sevofluran (je 1 MAC über 5 Minuten), jeweils gefolgt von einer Auswaschphase, vor Beginn der extrakorporalen Zirkulation mit anschließender Ischämie reduzieren den postoperativen Myokardschaden und verbessern die frühe postoperative myokardiale Funktion.

In der Sevofluran- Gruppe zeigten sich signifikant niedrigere Werte für Troponin I in der postoperativen Phase als Marker des myokardialen Zellschadens im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieser zelluläre Schutz ist auch in der linksventrikulären Funktion nachweisbar. 10 Minuten nach Beendigung der extrakorporalen Zirkulation war die linksventrikuläre myokardiale Funktion in der Sevoflurangruppe, gemessen an der linksventrikulären Druckerhöhungsgeschwindigkeit  $dp/dt_{max}$  als Maß der Inotropie, und der linksventrikulär entwickelte Druck signifikant besser als in der Kontrollgruppe (Daten in dieser Arbeit nicht gezeigt).

Zahlreiche experimentelle Studien der letzten Jahre zeigten, dass volatile Anästhetika, vor oder nach Ischämie verabreicht, die myokardialen Infarktgrößen reduzieren und die kardiale Funktion verbessern [35][36][37][38][39][40][41][22][21][42]. Diese Studien nehmen zum einen Bezug auf die APC, zum anderen auf kardioprotektive Effekte der volatilen Anästhetika, wenn sie während der Reperfusionphase nach Ischämie verabreicht werden.

Im Gegensatz zu den experimentellen Studien sind die Ergebnisse klinischer Studien noch sehr heterogen. Kardioprotektive Effekte durch volatile Anästhetika konnten in einigen Studien nachgewiesen werden, diese vermochten aber nicht darzulegen, auf welchen Mechanismen diese Effekte beruhen.

Belhomme et al. verabreichten eine Dosis von 2,5 MAC Isofluran für 5 Minuten über die Herzlungenmaschine während extrakorporaler Zirkulation mit anschließender 10 minütiger Auswaschphase vor Ausklemmen der Aorta. In dieser Arbeit konnten keine signifikanten Unterschiede in der postoperativen

Freisetzung von Troponin I bzw. der CK- MB als Marker des myokardialen Zellschadens im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden [27].

In einer Studie von Penta de Peppo et al. wurde der Einfluss von Enfluran in CABG untersucht. In der Studiengruppe erhielten die Patienten für 5 Minuten 1,3% Enfluran direkt vor CPB. Die linksventrikuläre Funktion war verbessert im Vergleich zur Kontrollgruppe, Unterschiede von Troponin I und CK-MB wurden auch hier nicht beobachtet [43].

Tomai et al. applizierten in einer Studiengruppe 1,5% Isofluran mit anschließender 10 minütiger Auswaschphase unmittelbar vor CBP. Es konnten keine Unterschiede in Bezug auf kardialer Funktion und Troponin I zwischen Studien- und Kontrollgruppe beobachtet werden. Jedoch waren die Troponin I-Konzentrationen in der Untergruppe mit einer EF < 50% 24 Stunden postoperative niedriger in der Isoflurangruppe als in der Kontrollgruppe [44].

In der bisher größten klinischen Studie, durchgeführt von Julier et al., erhielten die Patienten der Studiengruppe 4% Sevofluran während der ersten 10 Minuten des CPB vor Ausklemmen der Aorta, verabreicht über einen in die Herzlungenmaschine integrierten Vapor. In dieser Studie wurde allerdings Phenylephrine zur Stabilisierung des Kreislaufs während der Phase der hohen Sevoflurankonzentration verwendet. Sowohl Phenylephrine, als auch CPB sind in der Lage, Präkonditionierung auszulösen [45][46][47]. Daher ist es möglich, dass protektive Effekte von Sevofluran überlagert sind durch Effekte von Phenylephrine oder CPB. Als weitere Kritikpunkt in der Arbeit von Julier et. al. ist zu nennen, dass keine Auswaschphase nach Sevofluranapplikation in dem Studienprotokoll vorgesehen war. Zur Definition der APC gehört, daß das Anästhetikum während der infarktinduzierenden Ischämie nicht mehr im Organ anwesend ist. Des Weiteren wurde den Patienten Aprotinin verabreicht, Aprotinin ist ein Proteaseninhibitor, der in der Lage ist, Präkonditionierung zu verhindern [48]. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde in der Studie von Julier eine signifikant niedrigere postoperative NTpro-BNP- Freisetzung, einem sensitiven Marker der myokardialen kontraktile Dysfunktion, in der Sevoflurangruppe beobachtet, es gab jedoch keine Unterschiede für Troponin T oder CK-MB zwischen den Gruppen. In unserer Studie gab es keine Unterschiede für BNP, jedoch für Troponin I. Die genannten Unterschiede der

Ergebnisse beruhen möglicherweise auf der Anwendung unterschiedlicher Protokolle [49].

De Hert und Mitarbeiter haben in klinischen Studien die kardioprotektiven Effekte von volatilen Anästhetika untersucht. Sevofluran und Desfluran bzw. Propofol wurden jeweils während der gesamten Operationszeit als Narkotikum benutzt. Bis zum CPB waren die hämodynamischen Parameter kaum unterschiedlich, nach CPB war die linksventrikuläre Funktion in den Sevofluran- / Desflurangruppen signifikant besser als in der Propofolgruppe. Auch der myokardiale Zellschaden, gemessen am Troponin I, war in den Sevofluran- / Desflurangruppen postoperativ deutlich geringer. Es folgten Untersuchungen mit geändertem Studienprotokoll, in denen Sevofluran ausschließlich vor bzw. nach der Ischämiephase appliziert wurde. Im Vergleich zur TIVA mit Propofol gab es hier jedoch keine Unterschiede für den myokardialen Zellschaden bzw. die kardiale Funktion. Zusammenfassend konnte von De Hert und Mitarbeitern zwar gezeigt werden, dass volatile Anästhetika kardioprotektive Eigenschaften besitzen, die Frage nach dem entsprechenden Mechanismus bzw. ob hier APC eine Rolle spielt, wurde dabei jedoch nicht beantwortet [28][29][30].

In einer vorangegangenen Arbeit unserer Arbeitsgruppe zeigte die einmalige Gabe von Sevofluran (1 MAC 5 Minuten mit anschließender Auswaschphase (10 Minuten) vor CPB keine signifikanten Unterschiede zwischen Studien- und Kontrollgruppe in Bezug auf myokardialen Zellschaden bzw. hämodynamischer Parameter.

In der hier gezeigten Arbeit ist es gelungen, sowohl eine Reduktion des myokardialen Zellschadens als auch eine Verbesserung der frühen myokardialen Funktion durch zwei Zyklen Sevofluran mit anschließender Auswaschphase vor CPB zu erzielen. Der gezeigte Effekt am menschlichen Herzen ist folglich abhängig vom Protokoll, übereinstimmend mit experimentellen Studien und auch neueren klinischen Studien in denen gezeigt wurde, dass mehrere Zyklen Präkonditionierung einen stärkeren Effekt haben als ein einzelner Zyklus [50][32].

Die ersten Studien zur IPC wurden unter Verwendung eines Protokolls mit mehreren Zyklen kurzer Ischämie mit anschließender Reperfusion von Murry et. al durchgeführt [5]. Später wurde aufgrund weiterer Studien zunächst

gefolgert, dass ein Zyklus IPC den gleichen kardioprotektiven Effekt hervorruft wie mehrere Zyklen IPC. Sandhu und Mitarbeiter konnten jedoch im Tiermodell nachweisen, dass drei Zyklen IPC vor einer 30 minütigen Ischämie eine verstärkte Kardioprotektion im Vergleich zu einem einfachen Zyklus IPC bewirken [19]. Es folgten experimentelle Studien die nachweisen konnten, dass mehrere Zyklen APC mit Sevofluran bzw. Desfluran im Vergleich zu einem Zyklus APC eine verstärkte Kardioprotektion bewirkten [51][32]. Im Gegensatz dazu erfolgte nach Erhöhung der Konzentration des volatilen Anästhetikums bzw. nach verlängerter Zufuhr bei einem einzigen Zyklus APC keine Reduktion des myokardialen Zellschadens.

Später konnten Bein und Kollegen in einer klinischen Studie an Patienten zur koronaren Bypassoperation nachweisen, dass wiederholte Zyklen APC mit Sevofluran vor CPB kardioprotektive Effekte bewirken. In den Vergleichsgruppen mit Propofol-basierter TIVA bzw. mit kontinuierlicher Gabe von Sevofluran vor CPB ohne Auswaschphase konnte keine Kardioprotektion nachgewiesen werden [50].

In experimentellen Studien wurde gezeigt, dass die Aktivierung der PKC $\epsilon$  neben der Öffnung von mitoK<sub>ATP</sub>- Kanälen eine zentrale Rolle in den Signaltransduktionsketten der APC spielt [52][21]. Die Regulation der PKC $\epsilon$  erfolgt über eine Translokation [52][53] in verschiedene Kompartimente (Plasmamembran, Zellkern, Zytoskelett) und eine Phosphorylierung, die zu einer Aktivierung führt. Ob die Aktivierung der PKC über eine Signalkaskade über G<sub>i</sub>-Protein vermittelte Rezeptoren und Phospholipase oder über Öffnung von mitoK<sub>ATP</sub>-Kanälen mit Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies erfolgt, oder über beide Wege parallel, ist noch ungeklärt. Des Weiteren wird angenommen, dass bei der APC die Aktivierung von endothelialer NO-Synthase (eNOS) mit Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) zu einer Öffnung der mitoK<sub>ATP</sub>-Kanäle führt. Weiter abwärts in der Signalkaskade folgen die Aktivierung von MAP-Kinasen (mitogen aktivierte Proteinkinasen) und Hitzeschockproteinen, die über weitere Schritte auf einen noch unbekanntem Endeffektor wirken. Tyrosinkinasen werden ebenfalls als wichtige Mediatoren der APC beschrieben, die genaue Beziehung zur PKC ist jedoch nicht genau geklärt[17].

Uecker und Mitarbeiter zeigten in einer Studie an Rattenherzen eine Translokation der PKC $\epsilon$  aus dem Zytosol an den Zellkern als Teil der Signalketten sowohl für IPC als auch für APC [54]. Möglicherweise ist dies ein Schritt, der über anschließende Veränderung der Genexpression bzw. -transkription zum LPC führt. Die Untersuchung des LPC ist allerdings nicht Gegenstand unserer Studie. Eine Phosphorylierung der PKC $\epsilon$  konnte in unserer Arbeit nicht beobachtet werden. Möglicherweise ist dafür ein noch stärkerer APC- Stimulus nötig als zwei Zyklen 1 MAC Sevofluran für 5 Minuten mit anschließender Auswaschphase vor CPB um entsprechende Ergebnisse zu erzielen. In einer experimentellen Studie von Toma und Mitarbeitern wurde für die APC an Rattenherzen außerdem gezeigt, dass die Aktivierung der PKC $\epsilon$  zeitabhängig und schnell reversibel ist. Am Ende der 2. Auswaschphase nach zwei Zyklen APC mit Desfluran erreichte die phosphorylierte Form der PKC $\epsilon$  bereits wieder das Niveau der Ausgangswerte, zu diesem Zeitpunkt wurde jedoch die stärkste Translokation der PKC $\epsilon$  von der Zytosol- zur Membranfraktion gesehen [55].

In der klinischen Studie von Belhomme et al. konnte eine Zunahme der 5'Nucleotidase, einem Marker der PKC- Aktivierung, aus Vorhofgewebe des rechten Herzens nachgewiesen werden [27]. In der klinischen Studie von Julier et al. wurde erstmals eine Translokation der PKC $\epsilon$  an die Mitochondrienmembranen und der PKC $\delta$  an die Zellmembran in Kardiomyozyten aus Vorhofgewebe des rechten Herzens beobachtet [49]. In unserer Studie konnten wir erstmalig unter Verwendung eines APC- Protokolls die Translokation der PKC $\epsilon$  in die Kernfraktion als möglichen Schritt der Aktivierung nachweisen.

Für alle an der Studie teilnehmenden Patienten wurde der *EuroSCORE* berechnet. Der *EuroSCORE* dient der Stratifikation des perioperativen Risikos bzw. der differenzierten Vorhersage über das Ausmaß der Heilungschancen oder fataler Ausgänge von Patienten vor CABG. Es gab in unserer Studienpopulation diesbezüglich keine wesentlichen Unterschiede zwischen Sevofluran- und Kontrollgruppe.

Der Großteil unserer Patienten in beiden Gruppen erhielt perioperativ Betablocker. In experimentellen Studien wurde gezeigt, dass Betablocker

Teilblockaden auf die Signaltransduktionsketten in APC ausüben [56]. Es ist nicht gänzlich auszuschließen, daß Teilblockaden einzelner der parallelen Signaltransduktionswege, wie z.B. durch Betablocker verursacht, die Ursache dafür sind, daß wir keine Phosphorylierung der PKC $\epsilon$ , sondern ausschließlich eine Translokation beobachtet haben. Eventuell könnten diese möglichen Teilblockaden durch einen noch stärkeren APC- Stimulus als 2 Zyklen Sevoflurane mit Auswaschphase durchbrochen werden. Des Weiteren können hohe Blutzuckerkonzentrationen oder orale Antidiabetika hemmende Wirkung auf die APC besitzen, daher wurden diabetische Patienten von der Studie ausgeschlossen, intraoperativ wurden in unseren Studiengruppen keine relevanten Hyperglykämien beobachtet [57][58].

Weitere variable perioperative Faktoren, die einen Einfluss auf den myokardialen Zellschaden haben können, waren ebenfalls nicht unterschiedlich für die beiden Studiengruppen. Sowohl CPB- Zeit, als auch Ischämie- und Reperfusionzeit waren kaum unterschiedlich. Alle teilnehmenden Patienten wurden vollständig revaskularisiert, die Operationen wurden vom selben Operateur durchgeführt und die gleichen Kardioplegietechniken benutzt. Da keine wesentlichen perioperativen Unterschiede in beiden Gruppen zu sehen sind, ist es gerechtfertigt davon aus zu gehen, dass die gezeigten Effekte auf die Applikation von Sevofluran mit anschließender Auswaschphase nach dem entsprechenden Studienprotokoll zurückzuführen sind.

Die Applikation von Sevofluran erfolgte inhalativ über ein Standardnarkosesystem, die Konzentration wurde endexpiratorisch in der Ausatemluft gemessen. Das An- und Abfluten erfolgte mit hohem Frischgasfluss von 12L/min. 5 Minuten nach Beginn der Auswaschphasen wurde bei allen Patienten eine endexpiratorische Sevofluran- Konzentration von 0% gemessen. Sevofluranspiegel im Blutplasma bzw. im Herzmuskelgewebe wurden nicht gemessen.

Als Biomarker für den myokardialen Zellschaden benutzten wir kardiales Troponin I, einem hoch sensitiven und spezifischen Marker, der in der Lage ist, sehr kleine Myokardnekrosen zu identifizieren [59], ebenso wie irreversible Zellschäden operierter Patienten [60]. Des Weiteren bestehen Zusammenhänge zwischen Troponin I und dem kurz- bzw. langfristigen *Outcome* von Patienten nach CABG [61]. Unsere Studie ist allerdings nicht

konzipiert um Rückschlüsse über Zusammenhänge zwischen APC und dem *Outcome* der Patienten zu erlauben.

Die Präkonditionierung durch volatile Anästhetika am menschlichen Herzen während CABG wird durch diese Arbeit belegt. Andere Arbeitsgruppen versuchten mit höheren Dosen oder längerer Applikationszeit von Sevofluran das Herz zu präkonditionieren, teils mit und teils ohne Auswaschphase, sie konnten aber keine eindeutigen kardioprotektiven Effekte erzielen. In einer Versuchsreihe unserer Arbeitsgruppe wurden durch die Verabreichung von 1 MAC Sevofluran für 5 Minuten mit anschließender Auswaschphase vor CPB ebenfalls keine Hinweise auf eine Präkonditionierung gefunden. Aufgrund experimenteller Studien, in denen eine Verstärkung der IPC durch mehrere Zyklen gegenüber einem Zyklus beobachtet wurde, entschieden wir uns dazu ein Protokoll mit zwei Zyklen Sevofluran (1MAC 5Minuten mit jeweils anschließender Auswaschphase) zu wählen. Es kann hier jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eine Verlängerung eines Zyklus bzw. eine höhere Konzentration von Sevofluran eine Präkonditionierung gezeigt hätte. In einer Studie von Bein und Mitarbeitern wurde allerdings gezeigt, dass die Gabe von Sevofluran in 2 kurzen Zyklen vor CABG zu einer Reduzierung des myokardialen Zellschadens führte, während ein langer Zyklus keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe (TIVA mit Propofol) zeigte [50]. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob eine Verstärkung des Präkonditionierungsstimulus durch höhere Konzentrationen, verlängerte Applikationszeiten oder Integration weiterer APC- Zyklen noch deutlichere Ergebnisse gezeigt hätten, z.B. durch Phosphorylierung der PKC $\epsilon$ , eine Aktivierung der Tyrosinkinase oder eine Reduktion des BNP. Hierzu wären noch weitere Untersuchungen nötig.

Unsere Studie ist nicht dazu konzipiert, Aussagen über langfristige Effekte der gezeigten APC am menschlichen Herzen zu machen. Um Rückschlüsse über das *Outcome* der Patienten oder über die Mortalität nach CABG mit APC machen zu können sind große Multicenterstudien mit mehreren 10.000 Patienten notwendig. In einer dänischen retrospektiven Analyse mit über 10.000 kardiochirurgischen Patienten wurden mögliche kardioprotektive Effekte für Sevofluran untersucht. Es wurde kein signifikanter Unterschied der 30-Tage-Mortalität nachgewiesen zwischen Patienten, die entweder eine Sevofluran-

oder Propofolanästhesie erhielten. In einer Subgruppenanalyse wurde jedoch belegt, dass bei Patienten ohne anamnestisch instabiler Angina pectoris oder Myokardinfarkt, also ohne potentiellen IPC- Stimulus, die 30-Tage-Mortalität in der Sevoflurangruppe geringer war. Andererseits profitierten Notfallpatienten von einer propofolbasierten Anästhesie [62]. In einer Meta-Analyse von Landoni und Mitarbeitern wurden 22 Studien mit insgesamt 1.922 Patienten, die sich kardiochirurgischen Eingriffen unterzogen, ausgewertet. Verglichen wurden propofolbasierte total intravenöse Anästhesieregime mit Sevofluran- oder Desfluran- basierten Anästhesien. Patienten, die volatile Anästhetika erhielten, hatten signifikant geringere Raten an perioperativen Myokardinfarkten und eine reduzierte Krankenhausmortalität [31]. Beide genannten Metaanalysen sind jedoch nicht in der Lage darzulegen, ob APC eine Rolle im Rahmen der gezeigten kardioprotektiven Effekte der volatilen Anästhetika spielt.

Das Ergebnis dieser Studie ist, dass die Anästhetika- induzierte Präkonditionierung im menschlichen Herzen beobachtet werden kann, allerdings abhängig ist vom entsprechenden Präkonditionierungsprotokoll.

## 5. Literaturverzeichnis

- [1] Statistisches Bundesamt, "Häufigste Todesursachen 2012", *Statistisches Jahrbuch 2014*, S. 117
- [2] A. Hilienhof, „Zahl der Operationen in Krankenhäusern auf Rekordhoch“. *Dtsch Arztebl* 2013; 110(44): A-2048 / B-1812 / C-1772
- [3] B. M. Graf, *Anästhesie bei alten Menschen: 52 Tabellen*. Georg Thieme Verlag, 2010.
- [4] D. Mangano und B. Böttiger, „Kardiovaskuläre Morbidität und Anästhesie“, *AINS - Anesthesiol. · Intensivmed. · Notfallmedizin · Schmerzther.*, Bd. 30, Nr. 03, S. 136–140, Jan. 2008.
- [5] C. E. Murry, R. B. Jennings, und K. A. Reimer, „Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium“, *Circulation*, Bd. 74, Nr. 5, S. 1124–1136, Nov. 1986.
- [6] A. Vegh, S. Komori, L. Szekeres, und J. R. Parratt, „Antiarrhythmic effects of preconditioning in anaesthetised dogs and rats“, *Cardiovasc. Res.*, Bd. 26, Nr. 5, S. 487–495, Mai 1992.
- [7] Y. Liu und J. M. Downey, „Ischemic preconditioning protects against infarction in rat heart“, *Am. J. Physiol.*, Bd. 263, Nr. 4 Pt 2, S. H1107–1112, Okt. 1992.
- [8] G. S. Liu, J. Thornton, D. M. Van Winkle, A. W. Stanley, R. A. Olsson, und J. M. Downey, „Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart“, *Circulation*, Bd. 84, Nr. 1, S. 350–356, Juli 1991.
- [9] C. Vahlhaus, R. Schulz, H. Post, R. Onallah, und G. Heusch, „No prevention of ischemic preconditioning by the protein kinase C inhibitor staurosporine in swine“, *Circ. Res.*, Bd. 79, Nr. 3, S. 407–414, Sep. 1996.
- [10] D. M. Yellon und G. F. Baxter, „A 'second window of protection' or delayed preconditioning phenomenon: future horizons for myocardial protection?“, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, Bd. 27, Nr. 4, S. 1023–1034, Apr. 1995.
- [11] M. Kitakaze, M. Hori, T. Morioka, T. Minamino, S. Takashima, H. Sato, Y. Shinozaki, M. Chujo, H. Mori, und M. Inoue, „Infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning is blunted by inhibition of 5'-nucleotidase activity and attenuation of adenosine release“, *Circulation*, Bd. 89, Nr. 3, S. 1237–1246, März 1994.

- [12] J. C. Hartman, T. M. Wall, T. G. Hullinger, und R. J. Shebuski, „Reduction of myocardial infarct size in rabbits by ramiprilat: reversal by the bradykinin antagonist HOE 140“, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, Bd. 21, Nr. 6, S. 996–1003, Juni 1993.
- [13] J. Frässdorf, N. C. Weber, D. Obal, O. Toma, J. Müllenheim, G. Kojda, B. Preckel, und W. Schlack, „Morphine induces late cardioprotection in rat hearts in vivo: the involvement of opioid receptors and nuclear transcription factor kappaB“, *Anesth. Analg.*, Bd. 101, Nr. 4, S. 934–941, table of contents, Okt. 2005.
- [14] S. D. Critz, M. V. Cohen, und J. M. Downey, „Mechanisms of acetylcholine- and bradykinin-induced preconditioning“, *Vascul. Pharmacol.*, Bd. 42, Nr. 5–6, S. 201–209, Mai 2005.
- [15] A. Tsuchida, Y. Liu, G. S. Liu, M. V. Cohen, und J. M. Downey, „alpha 1-adrenergic agonists precondition rabbit ischemic myocardium independent of adenosine by direct activation of protein kinase C“, *Circ. Res.*, Bd. 75, Nr. 3, S. 576–585, Sep. 1994.
- [16] T. Pain, X. M. Yang, S. D. Critz, Y. Yue, A. Nakano, G. S. Liu, G. Heusch, M. V. Cohen, und J. M. Downey, „Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals“, *Circ. Res.*, Bd. 87, Nr. 6, S. 460–466, Sep. 2000.
- [17] N. C. Weber und W. Schlack, „Inhalational anaesthetics and cardioprotection“, *Handb. Exp. Pharmacol.*, Nr. 182, S. 187–207, 2008.
- [18] J. Frässdorf, S. De Hert, und W. Schlack, „Anaesthesia and myocardial ischaemia/reperfusion injury“, *Br. J. Anaesth.*, Bd. 103, Nr. 1, S. 89–98, Juli 2009.
- [19] R. Sandhu, R. J. Diaz, G. D. Mao, und G. J. Wilson, „Ischemic preconditioning: differences in protection and susceptibility to blockade with single-cycle versus multicycle transient ischemia“, *Circulation*, Bd. 96, Nr. 3, S. 984–995, Aug. 1997.
- [20] R. M. Fryer, J. E. Schultz, A. K. Hsu, und G. J. Gross, „Importance of PKC and tyrosine kinase in single or multiple cycles of preconditioning in rat hearts“, *Am. J. Physiol.*, Bd. 276, Nr. 4 Pt 2, S. H1229–1235, Apr. 1999.
- [21] M. Zaugg, E. Lucchinetti, D. R. Spahn, T. Pasch, und M. C. Schaub, „Volatile anesthetics mimic cardiac preconditioning by priming the activation of mitochondrial K(ATP) channels via multiple signaling pathways“, *Anesthesiology*, Bd. 97, Nr. 1, S. 4–14, Juli 2002.
- [22] W. G. Toller, J. R. Kersten, P. S. Pagel, D. A. Hettrick, und D. C. Warltier, „Sevoflurane reduces myocardial infarct size and decreases the time threshold for ischemic preconditioning in dogs“, *Anesthesiology*, Bd. 91, Nr. 5, S. 1437–1446, Nov. 1999.

- [23] V. Piriou, P. Chiari, F. Lhuillier, O. Bastien, J. Loufoua, O. Raisky, J. S. David, M. Ovize, und J. J. Lehot, „Pharmacological preconditioning: comparison of desflurane, sevoflurane, isoflurane and halothane in rabbit myocardium“, *Br. J. Anaesth.*, Bd. 89, Nr. 3, S. 486–491, Sep. 2002.
- [24] J. Müllenheim, D. Ebel, M. Bauer, F. Otto, A. Heinen, J. Frässdorf, B. Preckel, und W. Schlack, „Sevoflurane confers additional cardioprotection after ischemic late preconditioning in rabbits“, *Anesthesiology*, Bd. 99, Nr. 3, S. 624–631, Sep. 2003.
- [25] D. M. Loscar und P. Conzen, „Volatile Anästhetika“, *Anaesthesist*, Bd. 53, Nr. 2, S. 183–198, Feb. 2004.
- [26] E. Novalija, S. Fujita, J. P. Kampine, und D. F. Stowe, „Sevoflurane mimics ischemic preconditioning effects on coronary flow and nitric oxide release in isolated hearts“, *Anesthesiology*, Bd. 91, Nr. 3, S. 701–712, Sep. 1999.
- [27] D. Belhomme, J. Peynet, M. Louzy, J. M. Launay, M. Kitakaze, und P. Menasché, „Evidence for preconditioning by isoflurane in coronary artery bypass graft surgery“, *Circulation*, Bd. 100, Nr. 19 Suppl, S. II340–344, Nov. 1999.
- [28] S. G. De Hert, P. W. ten Broecke, E. Mertens, E. W. Van Sommeren, I. G. De Blier, B. A. Stockman, und I. E. Rodrigus, „Sevoflurane but not propofol preserves myocardial function in coronary surgery patients“, *Anesthesiology*, Bd. 97, Nr. 1, S. 42–49, Juli 2002.
- [29] S. G. De Hert, S. Cromheecke, P. W. ten Broecke, E. Mertens, I. G. De Blier, B. A. Stockman, I. E. Rodrigus, und P. J. Van der Linden, „Effects of propofol, desflurane, and sevoflurane on recovery of myocardial function after coronary surgery in elderly high-risk patients“, *Anesthesiology*, Bd. 99, Nr. 2, S. 314–323, Aug. 2003.
- [30] S. G. De Hert, P. J. Van der Linden, S. Cromheecke, R. Meeus, A. Nelis, V. Van Reeth, P. W. ten Broecke, I. G. De Blier, B. A. Stockman, und I. E. Rodrigus, „Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration“, *Anesthesiology*, Bd. 101, Nr. 2, S. 299–310, Aug. 2004.
- [31] G. Landoni, G. G. L. Biondi-Zoccai, A. Zangrillo, E. Bignami, S. D’Avolio, C. Marchetti, M. G. Calabrò, O. Fochi, F. Guarracino, L. Tritapepe, S. De Hert, und G. Torri, „Desflurane and sevoflurane in cardiac surgery: a meta-analysis of randomized clinical trials“, *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.*, Bd. 21, Nr. 4, S. 502–511, Aug. 2007.
- [32] M. L. Riess, L. G. Kevin, A. K. S. Camara, J. S. Heisner, und D. F. Stowe, „Dual exposure to sevoflurane improves anesthetic preconditioning in intact hearts“, *Anesthesiology*, Bd. 100, Nr. 3, S. 569–574, März 2004.

- [33] J. Fräßdorf, R. Huhn, N. C. Weber, D. Ebel, N. Wingert, B. Preckel, O. Toma, W. Schlack, und M. W. Hollmann, „Sevoflurane-induced preconditioning: impact of protocol and aprotinin administration on infarct size and endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation in the rat heart in vivo“, *Anesthesiology*, Bd. 113, Nr. 6, S. 1289–1298, Dez. 2010.
- [34] J. Fräßdorf, A. Borowski, D. Ebel, P. Feindt, M. Hermes, T. Meemann, R. Weber, J. Müllenheim, N. C. Weber, B. Preckel, und W. Schlack, „Impact of preconditioning protocol on anesthetic-induced cardioprotection in patients having coronary artery bypass surgery“, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, Bd. 137, Nr. 6, S. 1436–1442.e2, Juni 2009.
- [35] B. Preckel, W. Schlack, T. Comfère, D. Obal, H. Barthel, und V. Thämer, „Effects of enflurane, isoflurane, sevoflurane and desflurane on reperfusion injury after regional myocardial ischaemia in the rabbit heart in vivo“, *Br. J. Anaesth.*, Bd. 81, Nr. 6, S. 905–912, Dez. 1998.
- [36] W. Schlack, B. Preckel, D. Stunneck, und V. Thämer, „Effects of halothane, enflurane, isoflurane, sevoflurane and desflurane on myocardial reperfusion injury in the isolated rat heart“, *Br. J. Anaesth.*, Bd. 81, Nr. 6, S. 913–919, Dez. 1998.
- [37] D. Obal, B. Preckel, H. Scharbatke, J. Müllenheim, F. Höterkes, V. Thämer, und W. Schlack, „One MAC of sevoflurane provides protection against reperfusion injury in the rat heart in vivo“, *Br. J. Anaesth.*, Bd. 87, Nr. 6, S. 905–911, Dez. 2001.
- [38] J. R. Kersten, T. J. Schmeling, D. A. Hettrick, P. S. Pagel, G. J. Gross, und D. C. Wartier, „Mechanism of myocardial protection by isoflurane. Role of adenosine triphosphate-regulated potassium (KATP) channels“, *Anesthesiology*, Bd. 85, Nr. 4, S. 794–807; discussion 27A, Okt. 1996.
- [39] J. R. Kersten, T. J. Schmeling, P. S. Pagel, G. J. Gross, und D. C. Wartier, „Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase“, *Anesthesiology*, Bd. 87, Nr. 2, S. 361–370, Aug. 1997.
- [40] J.-L. Hanouz, A. Yvon, M. Massetti, O. Lepage, G. Babatasi, A. Khayat, H. Bricard, und J.-L. Gérard, „Mechanisms of desflurane-induced preconditioning in isolated human right atria in vitro“, *Anesthesiology*, Bd. 97, Nr. 1, S. 33–41, Juli 2002.
- [41] D. K. Cope, W. K. Impastato, M. V. Cohen, und J. M. Downey, „Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction“, *Anesthesiology*, Bd. 86, Nr. 3, S. 699–709, März 1997.

- [42] S. G. Varadarajan, J. An, E. Novalija, und D. F. Stowe, „Sevoflurane before or after ischemia improves contractile and metabolic function while reducing myoplasmic Ca(2+) loading in intact hearts“, *Anesthesiology*, Bd. 96, Nr. 1, S. 125–133, Jan. 2002.
- [43] A. Penta de Peppo, P. Polisca, F. Tomai, R. De Paulis, F. Turani, E. Zupancich, L. Sommariva, P. Pasqualetti, und L. Chiariello, „Recovery of LV contractility in man is enhanced by preischemic administration of enflurane“, *Ann. Thorac. Surg.*, Bd. 68, Nr. 1, S. 112–118, Juli 1999.
- [44] F. Tomai, R. De Paulis, A. Penta de Peppo, L. Colagrande, E. Caprara, P. Polisca, G. De Matteis, A. S. Ghini, S. Forlani, D. Colella, und L. Chiariello, „Beneficial impact of isoflurane during coronary bypass surgery on troponin I release“, *G. Ital. Cardiol.*, Bd. 29, Nr. 9, S. 1007–1014, Sep. 1999.
- [45] M. I. Tejero-Taldo, E. Gursoy, T. C. Zhao, und R. C. Kukreja, „Alpha-adrenergic receptor stimulation produces late preconditioning through inducible nitric oxide synthase in mouse heart“, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, Bd. 34, Nr. 2, S. 185–195, Feb. 2002.
- [46] S. Ghosh und M. Galiñanes, „Protection of the human heart with ischemic preconditioning during cardiac surgery: role of cardiopulmonary bypass“, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, Bd. 126, Nr. 1, S. 133–142, Juli 2003.
- [47] P. G. Burns, I. B. Krukenkamp, C. A. Caldarone, G. R. Gaudette, E. A. Bukhari, und S. Levitsky, „Does cardiopulmonary bypass alone elicit myoprotective preconditioning?“, *Circulation*, Bd. 92, Nr. 9 Suppl, S. II447–451, Nov. 1995.
- [48] E. A. Bukhari, I. B. Krukenkamp, P. G. Burns, G. R. Gaudette, J. J. Schulman, M. R. al-Fagih, und S. Levitsky, „Does aprotinin increase the myocardial damage in the setting of ischemia and preconditioning?“, *Ann. Thorac. Surg.*, Bd. 60, Nr. 2, S. 307–310, Aug. 1995.
- [49] K. Julier, R. da Silva, C. Garcia, L. Bestmann, P. Frascarolo, A. Zollinger, P.-G. Chassot, E. R. Schmid, M. I. Turina, L. K. von Segesser, T. Pasch, D. R. Spahn, und M. Zaugg, „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*, Bd. 98, Nr. 6, S. 1315–1327, Juni 2003.
- [50] B. Bein, J. Renner, D. Caliebe, R. Hanss, M. Bauer, S. Fraund, und J. Scholz, „The effects of interrupted or continuous administration of sevoflurane on preconditioning before cardio-pulmonary bypass in coronary artery surgery: comparison with continuous propofol“, *Anaesthesia*, Bd. 63, Nr. 10, S. 1046–1055, Okt. 2008.

- [51] M. Lange, A. Redel, T. M. Smul, C. Lotz, T. Nefzger, J. Stumpner, C. Blomeyer, F. Gao, N. Roewer, und F. Kehl, „Desflurane-induced preconditioning has a threshold that is lowered by repetitive application and is mediated by beta 2-adrenergic receptors“, *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.*, Bd. 23, Nr. 5, S. 607–613, Okt. 2009.
- [52] D. Obal, N. C. Weber, K. Zacharowski, O. Toma, S. Dettwiler, J. I. Wolter, M. Kratz, J. Müllenheim, B. Preckel, und W. Schlack, „Role of protein kinase C-epsilon (PKCepsilon) in isoflurane-induced cardioprotection“, *Br. J. Anaesth.*, Bd. 94, Nr. 2, S. 166–173, Feb. 2005.
- [53] M. Zaugg und M. C. Schaub, „Signaling and cellular mechanisms in cardiac protection by ischemic and pharmacological preconditioning“, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, Bd. 24, Nr. 2–3, S. 219–249, 2003.
- [54] M. Uecker, R. Da Silva, T. Grampp, T. Pasch, M. C. Schaub, und M. Zaugg, „Translocation of protein kinase C isoforms to subcellular targets in ischemic and anesthetic preconditioning“, *Anesthesiology*, Bd. 99, Nr. 1, S. 138–147, Juli 2003.
- [55] O. Toma, N. C. Weber, J. I. Wolter, D. Obal, B. Preckel, und W. Schlack, „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*, Bd. 101, Nr. 6, S. 1372–1380, Dez. 2004.
- [56] M. Lange, T. M. Smul, C. A. Blomeyer, A. Redel, K.-N. Klotz, N. Roewer, und F. Kehl, „Role of the beta1-adrenergic pathway in anesthetic and ischemic preconditioning against myocardial infarction in the rabbit heart in vivo“, *Anesthesiology*, Bd. 105, Nr. 3, S. 503–510, Sep. 2006.
- [57] F. Kehl, J. G. Krolkowski, B. Mraovic, P. S. Pagel, D. C. Warltier, und J. R. Kersten, „Hyperglycemia prevents isoflurane-induced preconditioning against myocardial infarction“, *Anesthesiology*, Bd. 96, Nr. 1, S. 183–188, Jan. 2002.
- [58] J. R. Kersten, D. Lowe, D. A. Hettrick, P. S. Pagel, G. J. Gross, und D. C. Warltier, „Glyburide, a KATP channel antagonist, attenuates the cardioprotective effects of isoflurane in stunned myocardium“, *Anesth. Analg.*, Bd. 83, Nr. 1, S. 27–33, Juli 1996.
- [59] J. S. Alpert, K. Thygesen, E. Antman, und J. P. Bassand, „Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction“, *J. Am. Coll. Cardiol.*, Bd. 36, Nr. 3, S. 959–969, Sep. 2000.
- [60] J. B. Selvanayagam, D. Pigott, L. Balacumaraswami, S. E. Petersen, S. Neubauer, und D. P. Taggart, „Relationship of irreversible myocardial injury to troponin I and creatine kinase-MB elevation after coronary artery bypass surgery: insights from cardiovascular magnetic resonance imaging“, *J. Am. Coll. Cardiol.*, Bd. 45, Nr. 4, S. 629–631, Feb. 2005.

[61] J.-L. Fellahi, X. Gué, X. Richomme, E. Monier, L. Guillou, und B. Riou, „Short- and long-term prognostic value of postoperative cardiac troponin I concentration in patients undergoing coronary artery bypass grafting“, *Anesthesiology*, Bd. 99, Nr. 2, S. 270–274, Aug. 2003.

[62] C.-J. Jakobsen, H. Berg, K. B. Hindsholm, N. Faddy, und E. Sloth, „The influence of propofol versus sevoflurane anesthesia on outcome in 10,535 cardiac surgical procedures“, *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.*, Bd. 21, Nr. 5, S. 664–671, Okt. 2007.

## **6. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Schlack sowie Herrn Priv. Doz. Dr. med. Preckel und Herrn Priv. Doz. Dr. med. Müllenheim für die freundliche Überlassung des Themas sowie die hervorragende Betreuung und kritische Begleitung während der Durchführung der Studie.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Jan Fräßdorf für die bestmögliche Unterstützung bei der Studiendurchführung und für die viele Zeit bei der kritischen Auseinandersetzung mit meiner Arbeit.

Ein weiterer Dank geht an Frau Dr. rer. nat. Hauck-Weber und an Frau Dr. med. Jessica Wolter für die geduldige Anleitung, Unterstützung und Betreuung im Labor.

Ein besonderer Dank gilt meinen Mitdoktoranden Manuel Hermes und René Weber für die exzellente Zusammenarbeit und die gegenseitige Motivation bei unseren Tätigkeiten in Klinik und Labor.

Ein letzter Dank geht an meine Familie für die Unterstützung außerhalb der Klinik, insbesondere an meine Frau Melanie und an meine Söhne Lukas und Felix.

Ein allerletzter Dank bzw. ein stilles Gedenken gilt meiner lieben Schwester Monika und meinem sehr guten Freund Heiko, die den Abschluss meiner Arbeit leider nicht mehr miterleben dürfen.

## 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.

16. Januar 2017

Thomas Meemann

