

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

Sevofluran-induzierte Präkonditionierung: Einfluss des Protokolls und
der Verabreichung von Aprotinin auf die Infarktgröße und die eNOS-
Phosphorylierung im Rattenherz
in vivo

Dissertation

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

vorgelegt von
Nadja Mayer-Wingert

2019

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

gez.:

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

Erstgutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Dirk Ebel

Zweitgutachter: Univ.- Prof. Dr. med. Udo Boeken

Widmung

Meinem Vater. In Dankbarkeit und stiller Erinnerung.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

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. 2010 Dec;113(6):1289-98

Fräßdorf J, Huhn R, Weber NC, Ebel D, Wingert N, Preckel B, Toma O, Schlack W, Hollmann MW

1. ZUSAMMENFASSUNG

ZUSAMMENFASSUNG (deutsch)

Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung der Fragen, inwieweit das Protokoll der Sevofluran-induzierten Präkonditionierung und die Verabreichung von Aprotinin Einfluss auf die Infarktgröße und die eNOS-Phosphorylierung im Rattenherz in vivo nehmen.

Um diese Fragestellungen zu beantworten, wurden 90 männliche Wistar Ratten verwendet. Die Ratten wurden in 15 Gruppen (6 Tiere/Gruppe) randomisiert. Bei allen Tieren wurde die linke Koronararterie für 25 Minuten okkludiert, im Anschluss erfolgte eine Reperfusion von 2 Stunden. Die Kontrollgruppe wurde vor der induzierten Ischämie nicht speziell behandelt. Die Gruppen, die nach dem Präkonditionierungsprotokoll (Sevo-I, Sevo-II, Sevo-III und Sevo-VI) behandelt wurden, inhalierten 1 MAC Sevofluran für 1 x 5, 2 x 5, 3 x 5 und 6 x 5 Minuten. Weiterhin wurde Aprotinin in der Kombination mit Sevofluran, aber auch ohne Sevofluran eingesetzt (APRO-Sevo-I, APRO-Sevo-II, APRO-Sevo-III und APRO).

Die Beteiligung der eNOS wurde durch den Einsatz von einem unspezifischen NOS-Blocker L-NAME (L-NAME-Sevo-III, L-NAME), dem spezifischen Blocker 7-NI der neuronalen NOS (nNOS) (7-NI-Sevo-III, 7-NI) sowie dem spezifischen Blocker AG der induzierbaren NOS (iNOS) (AG-Sevo-III, AG) untersucht.

Es zeigte sich in allen 4 Gruppen, die nach dem oben genannten Präkonditionierungsprotokoll mit Sevofluran behandelt wurden, eine Reduzierung der Infarktgröße (Sevo-I: 42 ± 6 %, Sevo-II: 33 ± 4 %, Sevo-III: 11 ± 5 %, Sevo-VI: 16 ± 4 %; $P < 0,05$ versus Con: 67 ± 3 %). Die deutlichste Reduzierung der Infarktgröße stellte sich nach der Inhalation von 3 beziehungsweise 6 Zyklen Sevofluran dar.

Die nachgewiesene Präkonditionierung durch Sevofluran wurde komplett durch die zusätzliche Gabe von Aprotinin blockiert. Die alleinige Gabe von Aprotinin hatte keinen Einfluss auf die Infarktgröße.

Der Einsatz des unspezifischen eNOS-Blockers L-NAME hebt die Sevofluran-induzierte Präkonditionierung komplett auf (L-NAME-Sevo-III: 67 ± 4 %; $P < 0,05$ versus Sevo-III), wohingegen die spezifischen Blocker AG und 7-NI die Sevofluran-induzierte Präkonditionierung nur zum Teil blockieren (AG-Sevo-III: 25 ± 6 %, 7-NI-Sevo-III: 31 ± 6 %; $P < 0,05$ versus Con). L-NAME, 7-NI und AG alleine haben keinen Einfluss auf die Infarktgröße.

Durch den Einsatz von Aprotinin wurde die Phosphorylierung der eNOS, die durch die Sevofluran-induzierte Präkonditionierung getriggert wird, komplett aufgehoben. Die alleinige Gabe von Aprotinin hatte keinen Einfluss auf die Phosphorylierung der eNOS.

Aprotinin scheint in dem Kollektiv der „Hoch-Risiko-Patienten“ einen Vorteil hinsichtlich des Blutungsrisikos und der damit verbundenen Gabe von Transfusionen im Rahmen von ACVB-Operationen zu bieten. In der hier vorliegenden Studie konnte dargestellt werden, dass die komplette positive Sevofluran-induzierte Präkonditionierung durch den Einsatz von Aprotinin aufgehoben wird, so dass der Einsatz von diesem Medikament auch in dieser Patientengruppe kritisch zu diskutieren ist.

Zusammenfassend kamen wir zu dem Ergebnis, dass mehrere Zyklusgaben eines volatilen Anästhetikums den myokardialen Zellschaden signifikant reduzierten und das Aprotinin die eNOS-Phosphorylierung in der Sevofluran-induzierten Präkonditionierung blockierte und damit ein wichtiger Schritt in der Signalkaskade der Präkonditionierung verhindert wurde.

ZUSAMMENFASSUNG (englisch)

The focus of this investigation was to evaluate if the influence of the protocol of the Sevofluran induced preconditioning and the application of Aprotinin reduces the size of the myocardial infarction and the eNOS-phosphorylation in the rats heart in vivo.

To answer this question 90 male Wistar rats were used. The rats were randomly divided into 15 groups (6 rats per group). All animals underwent 25 minutes of left coronary artery occlusion and 2h of reperfusion. The control group did not receive any special treatment before coronary occlusion. The other groups (sevo-I through sevo-IV), inhaled were given by inhaling 1 MAC Sevofluran 1x5, 2x5, 3x5 und 6x5 minutes. Furthermore, Aprotinin was combined with and without Sevofluran (APRO-Sevo-I through APRO-Sevo-III and APRO).

The involvement of eNOS was tested by using an unspecific NOS-blocker called L-NAME (L-NAME-Sevo-III, L-NAME), using a specific Blocker 7-NI of the neuronal NOS (nNOS) (7-NI-Sevo-III) and using the specific blocker AG of the inducible NOS (iNOS) (AG-Sevo-III, AG).

All four Sevofluran treated groups, following the preconditioning protocol, as mentioned above, showed a decreased infarction size (Sevo-I: 42 ± 6 %, Sevo-II: 33 ± 4 %, Sevo-III: 11 ± 5 %, Sevo-VI: 16 ± 4 %; $P < 0,05$ versus Con: 67 ± 3 %).

The most obvious infarct size reduction showed the group inhaling 3 and 6 cycles of Sevoflurane.

The detected Sevofluran induced preconditioning was blocked completely by adding Aprotinin. The addition of Aprotinin alone had no effect on the infarction size.

Using the unspecific eNOS-blocker L-NAME neutralized the Sevofluran induced preconditioning completely (L-NAME-Sevo-III: 67 ± 4 %; $P < 0,05$ versus Sevo-III). Using the unspecific Blocker AG and 7-NI the Sevoflurane-induced preconditioning was blocked just in parts (AG-Sevo-III: 25 ± 6 %, 7-NI-Sevo-III: 31 ± 6 %; $P < 0,05$ versus Con). L-NAME, 7NI and AG alone did not influence the infarct size. The phosphorylation of eNOS, which was triggered by the Sevofluran induced phosphorylation, was completely neutralized by using Aprotinin. Using Aprotinin alone did not influence the phosphorylation of eNOS.

In the "High-risk-group" of coronary bypass surgeries there seemed to be an advantage regarding the risk of bleeding when blood transfusions were required and aprotinin was used.

In this study it could be shown that the Sevoflurane induced preconditioning is completely neutralised by using Aprotinin and this is the reason why the use of Aprotinin needs to be discussed, especially in this group of patients.

In summary it can be stated that repetitive cycles of a volatile anaesthetic reduced the myocardial cell damage significantly and that Aprotinin blocked the eNOS-Phosphorylation in the Sevofluran induced preconditioning and that an important stage in the preconditioning signal cascade is inhibited.

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG 5

2. EINLEITUNG..... 14

 2.1. Allgemeine Einführung..... 15

 2.2. Myokardiale Präkonditionierung 18

 2.3. Endotheliale NO-Synthase (eNOS) 23

 2.4. Aprotinin 25

 2.4.1. Allgemeines 25

 2.4.2. Aufbau und Struktur 26

 2.4.3. Wirkungsweise 26

 2.4.4. Indikationen..... 26

 2.4.5. Nebenwirkungen 27

 2.5. Sevofluran 28

 2.5.1. Allgemeines 28

 2.5.2. Aufbau und Struktur 28

 2.5.3. Wirkungsweise 28

 2.5.4. Metabolismus und Nebenwirkungen 29

 2.6. Fragestellungen..... 30

3. MATERIAL UND METHODEN 31

 3.1. Aufbau des Tierversuches 32

 3.2. Bestimmung der Infarktgröße..... 33

 3.2.1. Vorbereitung der Tiere 35

 3.2.2. Durchführung des Versuches 37

 3.2.3. Bestimmung der Infarktgröße 38

 3.3. eNOS Western Blot 40

 3.3.1. Western Blot..... 40

 3.4. Substanzen und Lösungen 43

 3.4.1. Vorbereitung der Tiere 43

3.4.2.	Durchführung des Versuches	43
3.4.3.	Bestimmung der Infarktgröße	43
3.4.4.	Western Blot.....	44
3.5.	Statistische Auswertung.....	47
4.	ERGEBNISSE	48
4.1.	Ergebnisse der Infarktgrößenbestimmung	49
4.2.	Ergebnisse der Hämodynamik	52
4.3.	Ergebnisse des eNOS Western Blotes	54
5.	DISKUSSION.....	55
5.1.	Multiple Zyklen der Präkonditionierung	57
5.2.	Einfluss von Aprotinin auf die Sevofluran-induzierte Präkonditionierung.....	60
5.3.	eNOS, Aprotinin und die Sevofluran-induzierte Präkonditionierung.....	62
5.4.	Zusatzinformation zum Aprotinin	67
5.5.	Limitierung und verbliebene Fragestellungen der Studie	70
5.6.	Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Studie	72

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

7-NI	7-Nitroindazole
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ACVB	Aorto-Coronarer-Venen-Bypass
AG	Aminoguanide
Akt	Akt (eng.) Abkürzung für Proteinkinase B
ANOVA	Analysis of variance
APC	Anästhetika-induzierte Präkonditionierung
APRO	Aprotinin
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	zyklische Adenosin Monophosphatase
cGMP	zyklische Guanosinmonophosphat
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use
Con	Kontrollgruppe
CSE	Cholesterin-Synthese-Enzym
EMA	Europäische Arzneimittelbehörde
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ERK	Extrazelluläre-Signal-regulierte-Kinase
HR	Herzfrequenz
HSP	Hitze-Schock-Proteine
HZV	Herzzeitvolumen
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IPC	Ischämische Präkonditionierung
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
kiU	Kallikrein-Inhibitor-Einheiten
L-NAME	N-Nitro-L-Arginin
LAD	Left anterior descending (Ast der Linke Koronararterie)
MAC	minimale alveoläre Konzentration

MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mM	Millimol
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	rounds per minute
SDS-Pages	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel
Ser	Serin
Sevo	Sevofluran
SevoPC	Sevofluran-induzierte Präkonditionierung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
VEGF	Vaskulärer-Endothelialer-Wachstumsfaktor

2. EINLEITUNG

2.1. Allgemeine Einführung

Die häufigste Todesursache weltweit sind nach wie vor die kardiovaskulären Erkrankungen[1-3]. Das bedeutet für das öffentliche Gesundheitssystem eine zunehmende finanzielle Belastung durch die Therapie der koronaren Herzerkrankung (KHK) und der Behandlung ihrer Komplikationen[4]. Vor dem Hintergrund der immensen Kosten und der hohen Inzidenz der kardialen Erkrankungen erscheint es nur selbstverständlich, dass große Bereiche der aktuellen Forschung sich mit der Prävention, der Beeinflussung des Verlaufes sowie der Therapie dieses Krankheitsbildes beschäftigen[5, 6]. Seit über dreißig Jahren sind Risikofaktoren wie Dyslipidämie[7], Nikotinabusus[8], familiäre Disposition[9], Diabetes mellitus[10] und arterielle Hypertonie[11] als entscheidende kausale Risikofaktoren für die koronare Herzerkrankung (KHK) bekannt. Die Folgen der KHK sind höher- bis hochgradige Stenosen der Koronararterien, welche bis zum kompletten Verschluss und somit zum Myokardinfarkt mit all seinen Folgen (z.B. Einschränkungen der linksventrikulären Funktion, maligne Herzrhythmusstörungen, ICD-Versorgung[12] usw.) führen können. Durch die Weiterentwicklung von Therapien wird versucht, der Progression dieser Erkrankung auf allen Ebenen zu begegnen. Bei bekannter koronarer Herzerkrankung wird sowohl ein sekundärpräventiver, wie die Reduzierung von bestehenden Risikofaktoren, als auch ein medikamentöser Ansatz durch die Gabe von Betablockern[13], ACE-[14] und CSE-Hemmern[15] usw. verfolgt, um den häufig progredienten Verlauf dieser Erkrankung zu verzögern bzw. aufzuhalten. Wenn trotz dieser Maßnahmen das Fortschreiten dieser Erkrankung nicht verhindert werden kann und klinisch relevante Stenosen (>75%[16]) entstehen, welche unter anderem zu Angina Pectoris-Beschwerden führen können, besteht die Möglichkeit diese interventionell-kardiologisch im Rahmen einer Koronarangiographie, verbunden mit einer Dilatation und gegebenenfalls Versorgung mit medikamentenfreisetzungsfähigen Stents zu versehen. Sollte, aufgrund einer diffusen schweren koronaren 3-Gefäßerkrankung oder prognostisch günstiger Bypassversorgung[17] (bei einer hochgradigen Stenose im Bereich der proximalen LAD[18], Patienten mit langjährig bestehendem Diabetes mellitus[19] oder ein zusätzliches operationspflichtiges Klappenvitium) diese Möglichkeit der Therapie keine Option mehr für den Patienten darstellen, so bleibt als Methode der Wahl die

operative Myokardrevaskularisierung[20]. Im Rahmen dieser Operation werden entweder native (Venen oder Arterien) Gefäße und/oder Kunststoffinterponate mit der betroffenen Koronararterie distal der relevanten Stenose anastomosiert[21], so dass wieder eine effektive Blut- und damit Sauerstoffversorgung der Herzmuskelzellen ermöglicht wird. Da die operative Myokardrevaskularisierung eine sehr häufige Operation ist[22], besteht hier ein erhebliches Interesse an qualifizierter Forschung. Einerseits um das operative Risiko mittels neuer Verfahren zu minimieren (z.B. die "minimalinvasive Bypass-Operation, MIDCAB = Minimal Invasive Direct Coronary Artery Bypass[23]), andererseits um im perioperativen Management verschiedene Risiken und Komplikationen soweit wie möglich zu reduzieren oder gar auszuschalten[24]. Eine der Möglichkeiten diese Risiken zu minimieren, besteht jetzt wieder in der Gabe von Aprotinin. Aprotinin ist ein unspezifischer Proteaseinhibitor, dessen Wirkungsweise in der Hemmung der Serinprotease Plasmin besteht. Das Medikament wurde 2008 weltweit vom Markt genommen, die Zulassungsbeschränkung wurde aber im September 2013 wieder aufgehoben und ist seitdem wieder für den klinischen Einsatz im Gebrauch (Details s.u.). Durch dieses Medikament kann sowohl das intra- als auch postoperative Blutungsrisiko vermindert und damit eine Sauerstoffunterversorgung des myokardialen Gewebes gegebenenfalls minimiert werden[25]. Unter Umständen kann dadurch die Gabe von Erythrozytenkonzentraten reduziert oder gänzlich unterlassen werden. Eine Reduktion des intra- und postoperativen Blutungsrisiko ist deshalb wichtig, da auf der einen Seite Transfusionen Risiken[26, 27] (anaphylaktische Reaktionen bis hin zum Schock, Infektionen usw.) bergen und zum anderen eine durch Blutungen bedingte myokardiale Sauerstoffunterversorgung eine prognostisch ungünstigere Ausgangslage für den postoperativen Verlauf des Patienten darstellt[28]. Ein weiterer Ansatz, um die perioperativen Risiken und Komplikationen zu reduzieren, stellt die Protektion von Myokardzellen durch Präkonditionierung dar, welche durch eine kurze subletale Ischämie das myokardiale Gewebe vor den Folgen einer nachfolgenden längeren Ischämie schützen kann[29]. Die Präkonditionierung kann sowohl mechanisch (z.B. durch eine Ligatur von einer Herzkranzarterie[30]) als auch medikamentös induziert werden. Es liegen klinische Studien vor, welche die Anwendung der medikamenten-induzierten (z.B. durch volatile Anästhetika) Präkonditionierung bei herzchirurgischen Patienten untersucht haben[31]. In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass unter der Gabe von volatilen

Anästhetika der myokardiale Zellschaden, welcher zwangsläufig intraoperativ bei herzchirurgischen Operationen unter Verwendung einer Herz-Lungen-Maschine und dem damit verbundenen Einsatz einer Aortenklemme entsteht, reduziert werden kann[31]. Jedoch scheint dieser Mechanismus nur zum Tragen zu kommen, sofern diese volatilen Anästhetika kontinuierlich während der Operation verabreicht werden[32], so dass eine Präkonditionierung (kurze Stimuli wie Ischämien oder Medikamente) nicht effektiv zu sein scheint. Allerdings konnten Frassdorf et al. mittels einer klinischen Studie nachweisen, dass der myokardiale Zellschaden aufgrund einer Bypassoperation durch Präkonditionierung mit zwei Zyklen Sevofluran signifikant reduziert werden konnte[33]. Ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Präkonditionierung mittels Sevofluran, kann der Einsatz des Proteinaseinhibitors Aprotinin sein. Wie bereits Eingangs erwähnt, wird Aprotinin speziell bei herzchirurgischen Eingriffen eingesetzt, um schwere Blutungskomplikationen zu verhindern. Die kardiale Wirkung von Aprotinin wird kontrovers diskutiert. In einer tierexperimentellen Studie von Bukhari et al. zeigte sich unter der Gabe von Aprotinin eine hohe kardiale Komplikationsrate. Es konnte eine Vergrößerung des Infarktareales sowie eine Blockierung der ischämischen Präkonditionierung nachgewiesen werden[34]. Hendriks et al. hingegen konnten ebenfalls tierexperimentell zeigen, dass es unter der Gabe von Aprotinin zu einer Kardioprotektion kam[35].

2.2. Myokardiale Präkonditionierung

Murry et al. konnten 1986 zeigen, dass kurze subletale Intervalle von myokardialen Ischämien das Herz vor den Folgen nachfolgender Ischämien schützt. Diesen Effekt konnten Murry et al. zunächst an Hundeherzen nachweisen[36]. Im Gegensatz zu der Kontrollgruppe kam es zu einer deutlichen Reduzierung des Infarktareals. In weiterführenden Untersuchungen konnten peri- und postoperative Herzrhythmusstörungen reduziert und eine Verminderung der postischämischen kontraktile Dysfunktion erreicht werden[37]. Es wurde der Begriff der ischämischen Präkonditionierung (IPC) geprägt. Durch weitere Studien wurde nachgewiesen, dass es sowohl eine frühe- als auch eine späte Präkonditionierung gibt[36, 38-40]. Wenn der protektive Schutz unmittelbar nach dem ischämischen Stimulus auftritt, bezeichnet man dieses als frühe Präkonditionierung (early preconditioning). Die Herzmuskelzellen sind dann für ca. ein bis zwei Stunden vor den Auswirkungen nachfolgender Ischämien geschützt. Diese Art der Konditionierung wird auch als „klassische Präkonditionierung“ bezeichnet. Zusätzlich zu der frühen Präkonditionierung konnte in weiteren Arbeiten eine zweite Phase der Myokardprotektion gezeigt werden[39, 41]. Hier setzt die ischämische Präkonditionierung (IPC) nach dem initialen Stimulus nach ungefähr 24 Stunden ein und die protektive Wirkung hält für ca. 48 Stunden an. Diese Art der Präkonditionierung ist als „späte Präkonditionierung“ (late preconditioning) bekannt. Ebenfalls kann eine Protektion des Myokards durch pharmakologische Stimuli erreicht werden. Hierzu zählen neben körpereigenen Substanzen wie Adenosin[42], NO[41] und Bradykinin[43], auch die in der Anästhesie gebräuchlichen Medikamente wie volatile Anästhetika (wie z.B. Isofluran[44, 45], Sevofluran[46]) und Opioide[47] (z.B. Morphin[48] und Remifentanyl[49]). In diesem Zusammenhang spricht man von pharmakologischer- bzw. von der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung (APC).

Zum jetzigen Zeitpunkt ist der genaue Signaltransduktionsweg der frühen und späten sowie der ischämischen als auch der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung noch nicht abschließend geklärt. Hinsichtlich der frühen ischämischen Präkonditionierung kommen Yang X. et al. zu dem Ergebnis, dass es durch einen ischämischen Stimulus zu einer Aktivierung von Adenosin-, Bradykinin- und Opiodrezeptoren kommt, die ihrerseits über

verschiedene Signalwege die Proteinkinase C (PKC) aktivieren und diese durch Phosphorylierung wiederum den "low-affinity" A(2b) Adenosin Rezeptor (A(2b)AR). Durch die vorangegangenen ischämischen Stimuli erfolgt eine Freisetzung von endogenem Adenosin aus den Kardiomyozyten, welches an den durch PKC-aktivierten A(2b)AR bindet. Der so sensibilisierte Rezeptor ist dann verantwortlich für die Aktivierung verschiedener Kinasen, wie Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K), Proteinkinasen B (Akt) und Extrazelluläre-Signal-regulierte-Kinasen (ERK), welche in der Lage sind eine mitochondriale Kanalöffnung zu inhibieren und damit den Untergang der (Kardio-)Myozyten in den ersten Minuten der Reperfusion zu unterbinden. Wenn es zu dieser besagten Kanalöffnung kommt, entkoppeln die Mitochondrien und es kommt zum Zelltod[50].

Yang C. et al. konnten mittels einer tierexperimentellen Studie an Mäusen aufzeigen, dass es durch ischämische Stimuli zu einer endothelialen NO-Synthase (eNOS) vermittelten frühen Präkonditionierung kommt; bis zu diesem Zeitpunkt war man davon ausgegangen, dass nur die späte Präkonditionierung eNOS vermittelt ist. Die eNOS-Aktivierung hängt von deren Phosphorylierung an Serin¹¹⁷⁶ ab, die durch Signalwege der PI3K/Akt und Proteinkinase A (PKA) vermittelt wird[51].

In einem 2014 erschienenen Artikel in "Perfusion" von Swyers et al.[52] gehen die Autoren davon aus, dass es in der frühen Präkonditionierung durch ischämische Stimuli zu einer Freisetzung von Adenosin kommt, welches über Signalkaskaden in der Lage ist, sowohl die mitochondrialen Kalium-Kanäle als auch Opiod- und Bradykinin-Rezeptoren zu aktivieren. Die späte Präkonditionierung sei durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS), Superoxid-Dismutasen (SOD) und Hitze-Schock-Proteine (HSP) vermittelt[52]. Die volatilen Anästhetika wie Sevofluran, Iso- und Desfluran sind laut Swyers in der Lage die frühe Phase der ischämischen Präkonditionierung zu imitieren und die mitochondrialen Kalium-Kanäle zu stimulieren.

Durch eine Arbeit von Sergeev, bei der es sich um genetische Expression im Vergleich ischämischer und Anästhetika-induzierter Präkonditionierung handelt, konnte gezeigt werden, dass es viele Gemeinsamkeiten, aber auch große Unterschiede hinsichtlich der Genexpression im Rahmen der Präkonditionierung gibt[53]. Das Endergebnis der Präkonditionierung kann zwar ähnlich oder identisch ausfallen, aber diese erfolgt nach den bisherigen Studienergebnissen über zum Teil unterschiedliche Expressionen von Genen und

Aktivierungen von Proteinkaskaden. Dieses belegt auch eine Studie von Amour[54], in der durch Inhibierung bestimmter Proteine die Anästhetika-induzierte-, nicht aber die ischämische Präkonditionierung blockiert wird (Details siehe unten).

Die Signaltransduktion der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung ist, wie schon oben erwähnt, nicht abschließend geklärt. Einer der Schwerpunkte scheint sowohl die mitochondrialen als auch die sarkolemmalen Adenosintriphosphat (ATP)-regulierten Kalium-Kanäle (K_{ATP})[55, 56] zu haben. Marinovic et al. kamen zu dem Ergebnis, dass beide K_{ATP} -Kanäle entscheidend für die Anästhetika-induzierte Präkonditionierung sind. Sarkolemmale K_{ATP} -Kanäle scheinen Effektoren (für den präkonditionierenden Trigger, z.B. Sevofluran) darzustellen, wohin gegen mitochondriale K_{ATP} -Kanäle sowohl Trigger, als auch Effektoren der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung zu sein scheinen. Eine Aktivierung der Kalium-Kanäle durch volatile Anästhetika hat in der Folge verschiedene Effekte auf unterschiedliche Proteinkinasen. Ein besonderer Schwerpunkt liegt in der Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und ihrer Isoformen[57]. Uecker et al. verwendeten für eine Anästhetika-induzierte Präkonditionierung Isofluran und konnten nachweisen, dass es zu einer Translokation der PKC δ und PKC ϵ in den Zellkern, der PKC δ in die Mitochondrien sowie der PKC ϵ in das Sarkomer und in die Glanzstreifen kommt[58]. Zhong et al. zeigte, dass eine Aktivierung und damit in Folge eine Translokation der PKC ϵ aus der Zellmembran in das Cytosol wiederum eine Aktivierung von Mitogen-aktivierten-Protein-Kinasen (MAP-Kinasen) nach sich zieht. MAP-Kinasen und insbesondere die p38-MAP-Kinase[59] sowie Hitze-Schock-Proteine (Heat shock protein, HSP)[60] scheinen dann unter anderem über eine veränderte Gen-Transkription und Protein-Synthese maßgeblich an der Präkonditionierung und damit an dem Zellschutz beteiligt zu sein[61]. Eine weitere wichtige MAP-Kinase wird in der Extrazellulären-Signal-regulierten-Kinase (ERK 1/2) vermutet, deren Aktivierung mit einer Hochregulation des durch Hypoxie-induzierbaren-Faktor 1 (HIF-1 α) und des Vaskulären-Endothelialen-Wachstums-Faktor (VEGF) in vivo einhergeht und ebenfalls eine Rolle in der Präkonditionierung zu spielen scheint[62].

Neuere Studien weisen einen zusätzlichen Ansatzpunkt bezüglich der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung auf. Ein weiterer wichtiger Schwerpunkt scheint in der Aktivierung der eNOS (endothelial nitric-oxide synthase) zu liegen, deren Aktivierung durch

HSP90 (Heat shock protein 90) erfolgt[63]. Amour zeigte, dass es durch die Verabreichung des volatilen Anästhetikums Isofluran (kontinuierliche Gabe von 30 Minuten) zu einer Steigerung der Produktion von NO (Stickstoffmonoxid) in Endothelzellen menschlicher Koronarien kommt, einhergehend mit einer deutlich erhöhten Interaktion zwischen HSP90 und eNOS[54]. Dieser Effekt konnte auch durch ischämische Präkonditionierung (Okklusion der Koronararterie von 5 Minuten) hervorgerufen werden. Durch Zugabe von Inhibitoren wie Geldanamycin (spezifischer HSP90-Inhibitor, Ansamycin welches durch das Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* gebildet wird) oder aber auch N-Nitro-L-Arginin (L-NAME, unspezifischer Inhibitor der NOS) wurde die Anästhetika-induzierte Präkonditionierung komplett blockiert, hingegen die ischämische Präkonditionierung nicht. Ebenfalls konnten Smul et al.[64] zeigen, dass eine durch Desfluran-induzierte Präkonditionierung durch Zugabe von N-Nitro-L-Arginin aufgehoben wird. Welche Isoform der NOS (eNOS, iNOS, nNOS) in erster Linie für die Präkonditionierung mit verantwortlich ist, ist unklar, da es sich bei N-Nitro-L-Arginin um einen unspezifischen Inhibitor der NOS handelt. Vor dem Hintergrund der aktuellen Studienlage und dem häufigen Einsatz von Aprotinin bei herzchirurgischen Eingriffen rückt eine Studie von Ulker in diesem Zusammenhang besonders in den Vordergrund. Ulker et al.[65] demonstrierten, dass es unter der Gabe von höheren Dosen Aprotinin (> 250 kIU/ml) zu einer Herunterregulierung der eNOS-messengerRNA und damit zu einer verminderten Bildung der eNOS kommt. Die endotheliale NO-Synthetase ist eng mit der Regulation des Gefäßtonus verbunden. Eine Verringerung der eNOS bedeutet eine Zunahme des Gefäßtonus beziehungsweise eine Konstriktion der Gefäße, was zu einer Abnahme der Durchblutung, ein vermindertes Sauerstoffangebot (in dem Fall der Herzmuskelzellen) und damit eine Zunahme des Infarktareales bedeutet, was die Studienergebnisse von Bukhari et al.[34] unterstreicht.

Ob die genannten Signaltransduktionswege jeweils unabhängig/nebeneinander zum Tragen kommen oder ob je nach auslösendem Trigger einer dieser Kaskaden aktiviert wird und dann eine gemeinsame Endstrecke zur Anästhetika-induzierten Präkonditionierung führt, wird sich im Verlauf weiterer Forschung noch zeigen müssen.

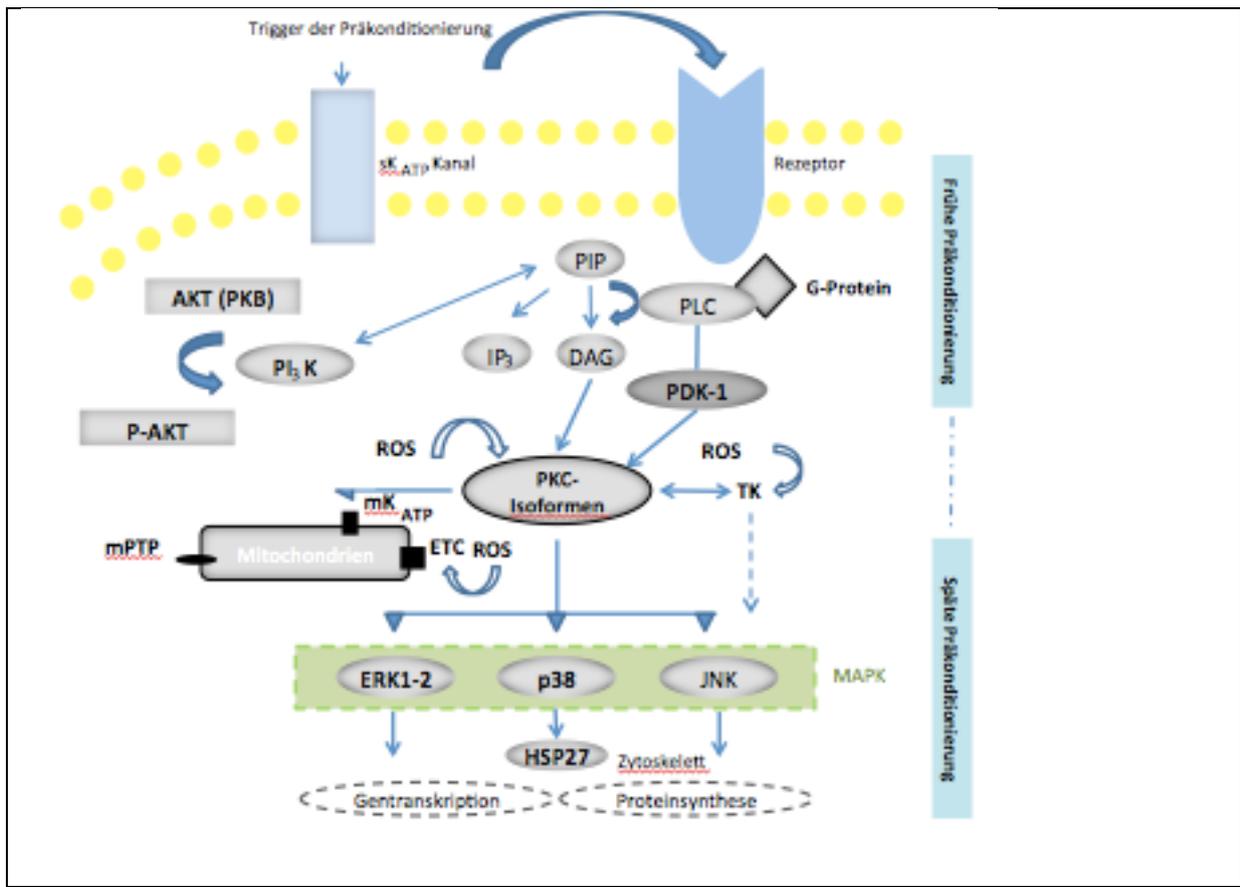
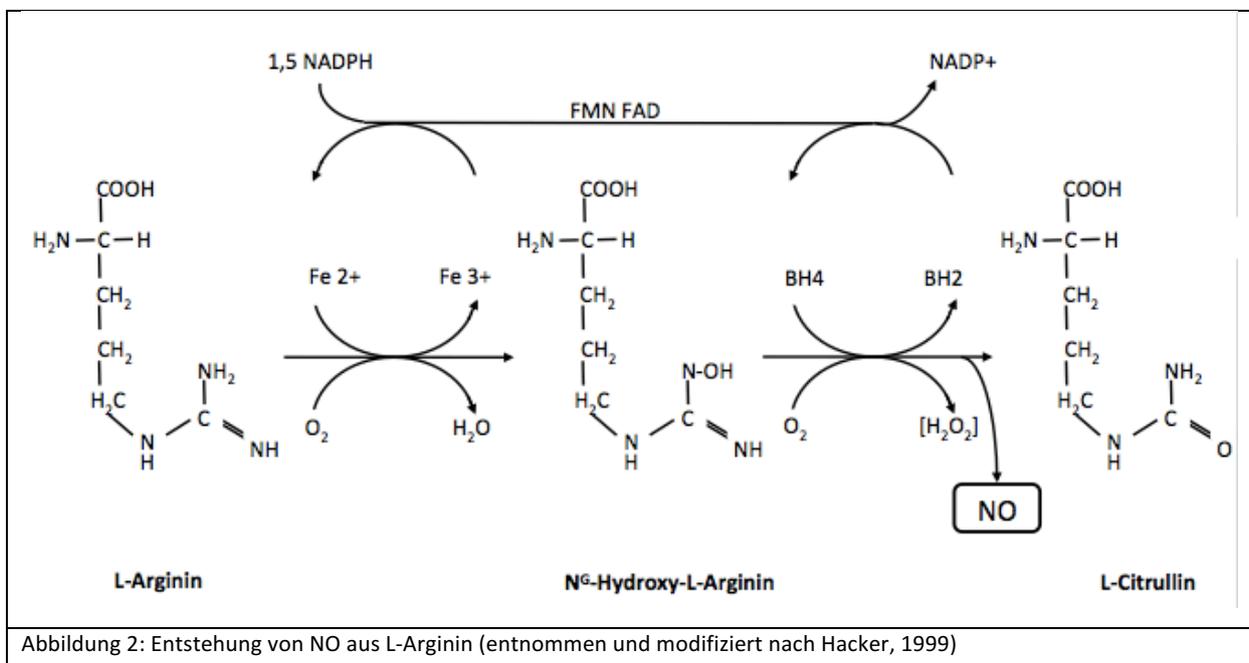


Abbildung 1 (entnommen und modifiziert aus „Molecular biology in cardiovascular anaesthesia“, Weber 2008), Übersicht über die verschiedenen Mediatoren, Effektoren und Signaltransduktionswege der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung sK_{ATP} , sarkolemmaler K_{ATP} -Kanal; mK_{ATP} -Kanal, mitochondrialer K_{ATP} -Kanal; PKC, Proteinkinase C; TK, Thyrosinkinase; ETC, Elektronen-Transport-Kanal; ROS, Reaktive Sauerstoffspezies MAPK, Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase; ERK, Extrazellulär-Signal-regulierte-Kinase; HSP, Hitze-Schock-Proteine

2.3. Endotheliale NO-Synthase (eNOS)

Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) gehört zu der Enzymfamilie der NO-Synthasen. Insgesamt sind drei NO-Synthasen bekannt, die endotheliale (eNOS), die induzierbare (iNOS) und die neuronale (nNOS)[66]. Alle drei Formen liegen als Homodimere (Molekül, welches aus zwei identischen Monomeren besteht) mit einer C-terminalen Reduktase- und einer N-terminalen Oxygenase-Domäne vor. Sie unterscheiden sich durch den Ort und Zelltypen ihrer Expression. Die eNOS kommt in Endothelzellen, aber auch in Kardiomyozyten und Plättchen vor[67]. Die iNOS wird in Makrophagen durch die Stimulation von Zytokinen als Antwort auf eine Immun- und Entzündungsreaktion aktiviert[68]. Die nNOS wird in Nervenzellen exprimiert[66]. Alle drei Formen der NOS können Stickstoffmonoxid (NO) bilden.

In den Endothelzellen der Gefäßwände wird NO hauptsächlich durch die eNOS gebildet. NO entsteht unter Verbrauch von NADPH durch NO-Synthasen aus der Aminosäure L-Arginin und Sauerstoff. Als Endprodukte entstehen dabei Citrullin und Wasser.



Die NO-Wirkung im Gefäßsystem besteht in einer Dilatation der Gefäße durch eine indirekte Erhöhung des cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat) und in einer damit einhergehenden Relaxation der Gefäße[69]. Ferner kann NO frei durch Membranen

diffundieren und so als Botenstoff funktionieren. Weitere Wirkung des Stickstoffmonoxids besteht in dem aggregationshemmenden Effekt in Thrombozyten und die antiadhäsive Wirkung in Leukozyten[70].

Die eNOS ist in den Endothelzellen in Caveoli (Einstülpungen der Plasmamembran) eingeschlossen[71]. Die Aktivierung und Freisetzung der eNOS erfolgt durch einen Calcium-Einstrom in die Zelle. Calcium bindet an Calmodulin und dieses wiederum an die eNOS. Durch diesen Schritt wird der Elektronentransport der eNOS aktiviert und es entsteht NO.

Die Regulation der eNOS-Expression hängt von der mRNA und der damit einhergehenden Genexpression ab und kann durch Faktoren wie zum Beispiel mechanische Dehnung (wie laminare Scherkräfte, „shear stress“), cGMP-Analoga und Inhibitoren der Proteinkinase C[72] gesteigert werden. Die Aktivierung der eNOS erfolgt durch Phosphorylierung der Serin- und Thyrosin-Epitope durch die Proteinkinase A und Akt , über die PKC sowie über cAMP[73] und HSP90[74].

Die eNOS (aber auch alle anderen NOS-Formen) können freie Radikale (Superoxidradikale) bilden. Eine Bildung von freien Radikalen durch die eNOS wird als „Entkopplung“ bezeichnet, hier wird der Elektronenfluss von NADPH fehlgeleitet und es entstehen freie Radikale, die unter Umständen einen zusätzlichen oxidativen Stress in den Gefäßen verursachen können[75, 76].

2.4. Aprotinin

2.4.1. Allgemeines

Aprotinin gehört in die Gruppe der Antifibrinolytika, welche eingesetzt werden, um eine gesteigerte lokale oder generalisierte Fibrinolyse und damit Blutungen zu therapieren bzw. diesen vorzubeugen[77].

Aprotinin wurde, wie auch viele andere Medikamente, zufällig in den 30er Jahren[78] entdeckt und in erster Linie als unspezifischer Proteinaseinhibitor (Kallikrein- und Trypsinaktivator) bei einer Vielzahl von Erkrankungen gegeben[79]. Seit den 70iger Jahren ist Aprotinin unter anderem in dem Gebiet der Herzchirurgie im Gebrauch. 1986/87 konnte durch die Einführung hoher Dosisregime die deutliche klinische Relevanz hinsichtlich der Senkung der Blutungsneigung nachgewiesen und seitdem gezielt bei operativen Eingriffen mit einer hohen Blutungsgefahr eingesetzt werden[80]. Das auf dem Markt gebräuliche Produkt ist Trasylo[®], welches systemisch eingesetzt wird (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland; seit 2012 wird es über die Nordic Group vertrieben). Aprotinin wurde aufgrund einer erhöhten Letalität[81-83] von der Firma Bayer im November 2007 zunächst vorläufig und dann endgültig im Mai 2008 weltweit vom Markt genommen, da es unter anderem im Verdacht stand, die Letalität nach Bypass-Operationen zu erhöhen[83]. Grundlage für diesen Verdacht war die so genannte BART-Studie ("Blood Conservation Using Antifibrinolytics in a Randomized Trial") von Ferguson[84], in der vermeintlich gezeigt wurde, dass es unter der Gabe von Aprotinin zu weniger schweren Blutungen, aber zu einer deutlich erhöhten Sterblichkeit innerhalb von 30 Tagen nach dem herzchirurgischen Eingriff kam. Im Februar 2012 empfahl die europäische Arzneimittelbehörde (EMA) die Aufhebung des Verkaufsstopps für Aprotinin, da die Studien, die diesen veranlasst haben, fehlerhaft seien[84]. Der Ausschuss für Humanarzneimittel (englisch: Committee for Medicinal Products for Human Use, CHMP), der EMA, kam unter anderem zu dem Ergebnis, dass es durch den Einsatz von Aprotinin gerade bei herzchirurgischen Eingriffen zu einer signifikanten Verminderung von Blutungen kommt und so der Einsatz von Transfusionen sowie Re-Operationen aufgrund von Blutungen deutlich reduziert werden kann[85]. Die europäische

Kommission folgte den Empfehlungen der EMA und gab Aprotinin unter bestimmten einzuhaltenden Kriterien und Anwendungsbeschränkungen für den klinischen Gebrauch wieder frei (Details siehe Diskussion). Seit dem 18.09.2013 steht Aprotinin wieder zur klinischen Anwendung zur Verfügung[77].

2.4.2. Aufbau und Struktur

Die Strukturformel von Aprotinin lautet $C_{284}H_{432}N_{84}O_{79}S_7$. Es ist ein einkettiges basisches Polypeptid und besteht aus 58 Aminosäuren. Das Molekulargewicht dieses Polypeptides wird in Dalton angegeben und beträgt 6512 Da[79]. Es ist ein natürlich vorkommender unspezifischer Proteaseinhibitor, der vorwiegend aus Rinderlungen, aber auch aus dem Pankreas von Rindern[86] isoliert werden kann.

2.4.3. Wirkungsweise

Aprotinin gehört zu der Gruppe der Serin-Proteasehemmer und bildet mit Plasmin einen inaktiven Komplex und hat damit die Wirkung eines direkten Antifibrinolytikums, da es die Wirkung des Plasmins selbst hemmt. Ebenfalls hemmt Aprotinin andere proteolytische Enzyme wie Trypsin, Chemotrypsin und Kallikrein, durch dessen Hemmung die Bildung von Faktor XIIa der Gerinnungskaskade verhindert wird. Somit hat Aprotinin sowohl eine direkte antifibrinolytische als auch eine indirekte antikoagulatorische Wirkung[87].

Aprotinin muss parenteral appliziert werden, da es bei oraler Gabe während der Magenpassage inaktiviert wird. Die Aktivität dieses Polypeptids wird in Kallikrein-Inhibitor-Einheiten (KIU) (1,4 mg Aprotinin entspricht 1×10^4 KIU) angegeben[79]. Die Elimination von Aprotinin erfolgt renal und die Eliminationshalbwertszeit liegt bei 7 Stunden[88].

2.4.4. Indikationen

Aprotinin wurde unter anderem bei generalisierter und lokaler Hyperfibrinolyse eingesetzt, so wie bei lebensbedrohlichen Blutungen nach thrombolytischer Therapie (Lyse), in der Geburtshilfe wie auch bei Lebererkrankungen mit schweren Gerinnungsstörungen und damit

verbundenen Blutungen[89]. Im Rahmen von kardiochirurgischen Eingriffen und dem Einsatz von Herz-Lungen-Maschinen konnte unter der Gabe von Aprotinin intraoperative Blutungen und der gegebenenfalls verbundene Transfusionsbedarf reduziert werden[57, 62-64], zum einem aufgrund der Inaktivierung des Plasmins, zum anderem aber auch durch eine Verminderung der Aktivierung der Thrombozyten an der Fremdoberfläche der Herz-Lungen-Maschine[89].

2.4.5. Nebenwirkungen

Bei Erstgabe von Aprotinin (Rindereiweiß) wurden anaphylaktische Reaktionen in weniger als 0,5% der Fälle beobachtet, aber vermehrt bei Reexpositionen[90]. Es kann zu einem Anstieg der Transaminasen und des Serumkreatinins bis hin zur Dialysepflichtigkeit kommen[91]. Des Weiteren muss das prothrombotische Risiko und die damit verbundenen Risiken wie ein Lungenembolie oder thrombotische Verschlüsse bedacht werden.

In einer tierexperimentellen Studie von Bukhari et al. vergrößerte Aprotinin die Infarktgröße nach Ischämie und Reperfusion[34]. Das würde eine Gefährdung des Patienten während einer herzchirurgischen Operation bedeuten (Vergrößerung des Infarktgebietes einhergehend mit sämtlichen oben beschriebenen Komplikationen versus Reduzierung des Blutverlustes und Abnahme des Transfusionsbedarfes unter Aprotinin).

2.5. Sevofluran

2.5.1. Allgemeines

Sevofluran [Fluormethyl-2,2,2-trifluor-1-(trifluormethyl)äthyl-Äther] ist ein volatiles Anästhetikum, welches 1995 in Deutschland eingeführt wurde. Sevofluran hat einen niedrigen Blut-Gas-Verteilungskoeffizient (0,69) und damit eine sehr geringe Löslichkeit im Blut, wodurch es zu einem schnelleren Ein- und Ausleiten so wie zu einer guten Steuerbarkeit der Narkose kommt. Sevofluran ist anästhetisch wirksamer als Desfluran[92]. Der MAC50-Wert (Minimal alveoläre Konzentration eines Inhalationsanästhetikum, bei der 50% aller Patienten auf die Hautinzision nicht mehr mit Abwehrbewegungen reagieren) von Sevofluran liegt beim gesunden Erwachsenen bei 2,05 Vol.% in 100% O₂[92]. Der MAC-Wert ist altersabhängig und nimmt mit zunehmendem Alter ab, Kinder benötigen deutlich mehr Sevofluran, als ein älterer Mensch (> 60 Jahre bei 1,6 Vol.%)[93]. Es kann aufgrund seines akzeptablen Geruches und seiner raschen Anflutung anstelle eines Injektionsanästhetikums zur Einleitung einer (Kinder-)Anästhesie verwendet werden[93].

2.5.2. Aufbau und Struktur

Sevofluran ist ein "halogenierter Fluoromethyl-Polyfluoroisopropyläther"[92] mit einem Molekulargewicht von 200 Dalton, der als Halogen nur Fluorid enthält. Es ist eine Flüssigkeit, die farblos und nicht brennbar ist. Sevofluran besitzt, im Gegensatz zu den anderen Inhalationsanästhetika, kein asymmetrischen Kohlenstoff, so dass es auch keine optischen Isomere gibt[92, 93].

2.5.3. Wirkungsweise

Sevofluran wird hämodynamisch von den Patienten gut vertragen. Es kommt zu geringen Veränderung der Herzfrequenz sowie zu einer dosisabhängigen Abnahme des peripheren Widerstandes, des mittleren Blutdruckes sowie zu einer negativ inotropen Wirkung

(Abnahme der Myokardkontraktilität)[92, 93]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es unter der Gabe von volatilen Anästhetika wie Sevofluran[32, 46] zu einer pharmakologischen Präkonditionierung mit den schon Eingangs erwähnten Vorteilen kommen kann.

2.5.4. Metabolismus und Nebenwirkungen

Sevofluran hat eine Metabolisierungsrate von 3–5 % (deutlich höher als die z.B. von Isofluran → 0,2%). Es wird in der Leber metabolisiert (über Cytochrom P₄₅₀) und es entstehen Hexafluoridisopropanol und anorganisches Fluorid[92]. Das Hexafluoridisopropanol wird zum Teil glukuronidiert als auch ausgeatmet und hat keine toxische Wirkung. Das anorganische Fluorid ist ab einer Konzentration von > 50 µmol/l nephrotoxisch. Während einer Narkose entstehen in der Regel Fluorid-Konzentrationen von 30-35 µmol/l im Serum[93]. Des Weiteren ist Sevofluran im Atemkalk (Narkosegerät, Absorption von Kohlendioxid und volatiles Anästhetikum aus der Ausatemluft) nicht stabil und bildet in Kombination mit dem Kalk unter anderem das Abbauprodukt Compound A, ein Vinyläther mit nephrotoxischen Eigenschaften (im Rattenversuch). Bei Patienten konnte bisher, auch bei vorgeschädigter Niere, unter einer Narkose mit Sevofluran keine dauerhaften Nierenschädigungen nachgewiesen werden[92, 93].

Bei Disposition oder Verdacht auf eine maligne Hyperthermie ist der Einsatz von Sevofluran (wie auch von allen anderen volatilen Anästhetika) absolut kontraindiziert[92].

2.6. Fragestellungen

Wie oben beschrieben, spielt im klinischen Alltag der Einsatz von Sevofluran als volatiles Anästhetikum eine große Rolle. Ebenfalls wurde zum Entstehungszeitpunkt dieser Studie auch Aprotinin bei herzchirurgischen Operationen regelhaft eingesetzt und darf auch seit September 2013 wieder verwendet werden (siehe Aprotinin), so dass die Zielsetzung dieser Studie nach wie vor aktuell ist.

Die durch volatile Anästhetika, wie zum Beispiel durch Sevofluran[33], induzierte Präkonditionierung ist hinreichend nachgewiesen worden, so dass es jetzt gilt, Einfluss- und gegebenenfalls Störfaktoren der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung ausfindig zu machen und die Voraussetzungen dieser zu optimieren, um einerseits die Myokardprotektion durch den Einsatz volatiler Anästhetika und andererseits die Reduktion schwerer Blutungsereignisse durch die Verwendung des Proteinaseinhibitors Aprotinin zu rechtfertigen. Daher war es Ziel der hier vorliegenden Studie zu untersuchen:

- a) ob mehrere Zyklusgaben von Sevofluran eine ausgeprägtere Anästhetika-induzierte Präkonditionierung hervorrufen können, im Gegensatz zu der einmaligen Gabe von Sevofluran,
- b) ob und welchen Einfluss Aprotinin auf die durch Sevofluran-induzierte Präkonditionierung nimmt,
- c) ob die eNOS einen relevanten Stellenwert in der Sevofluran-induzierten Präkonditionierung einnimmt und ob die Blockierung dieser durch Aprotinin für eine mögliche Inhibition der Präkonditionierung verantwortlich ist.

3. MATERIAL UND METHODEN

In dem Teil "Material und Methoden" werden die Protokolle der Präkonditionierung sowie die einzelnen Schritte des Tierversuches dargestellt. Des Weiteren wird die Methode des Western Blotes vorgestellt und zuletzt wird auf die Datengewinnung und Dokumentation sowie auf die statistische Auswertung der Daten eingegangen.

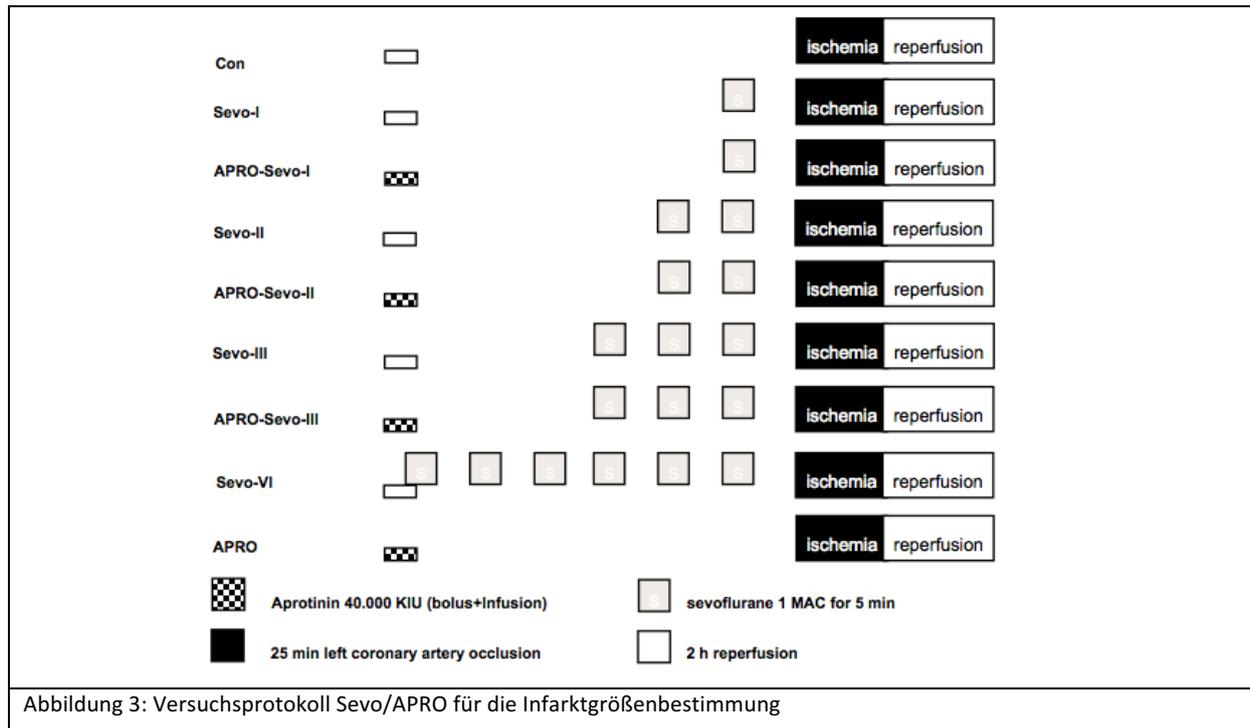
3.1. Aufbau des Tierversuches

Der Tierversuch besteht aus zwei Teilen. Der erste Teil des Versuches zielte darauf ab, die Infarktgröße unter dem Einfluss verschiedener Präkonditionierungsprotokolle mittels des volatilen Anästhetikums Sevofluran sowie den Einfluss von Aprotinin und eNOS auf die Infarktgröße und damit auf die Anästhetika-induzierte Präkonditionierung zu bestimmen. Im zweiten Teil des Tierversuches wurde mit der Methode des Western Blots untersucht, ob es unter dem Einfluss der Sevofluran-induzierten Präkonditionierung zu einer Zunahme der Phosphorylierung der eNOS kommt und ob dieser Vorgang durch die Zugabe von Aprotinin geblockt werden kann.

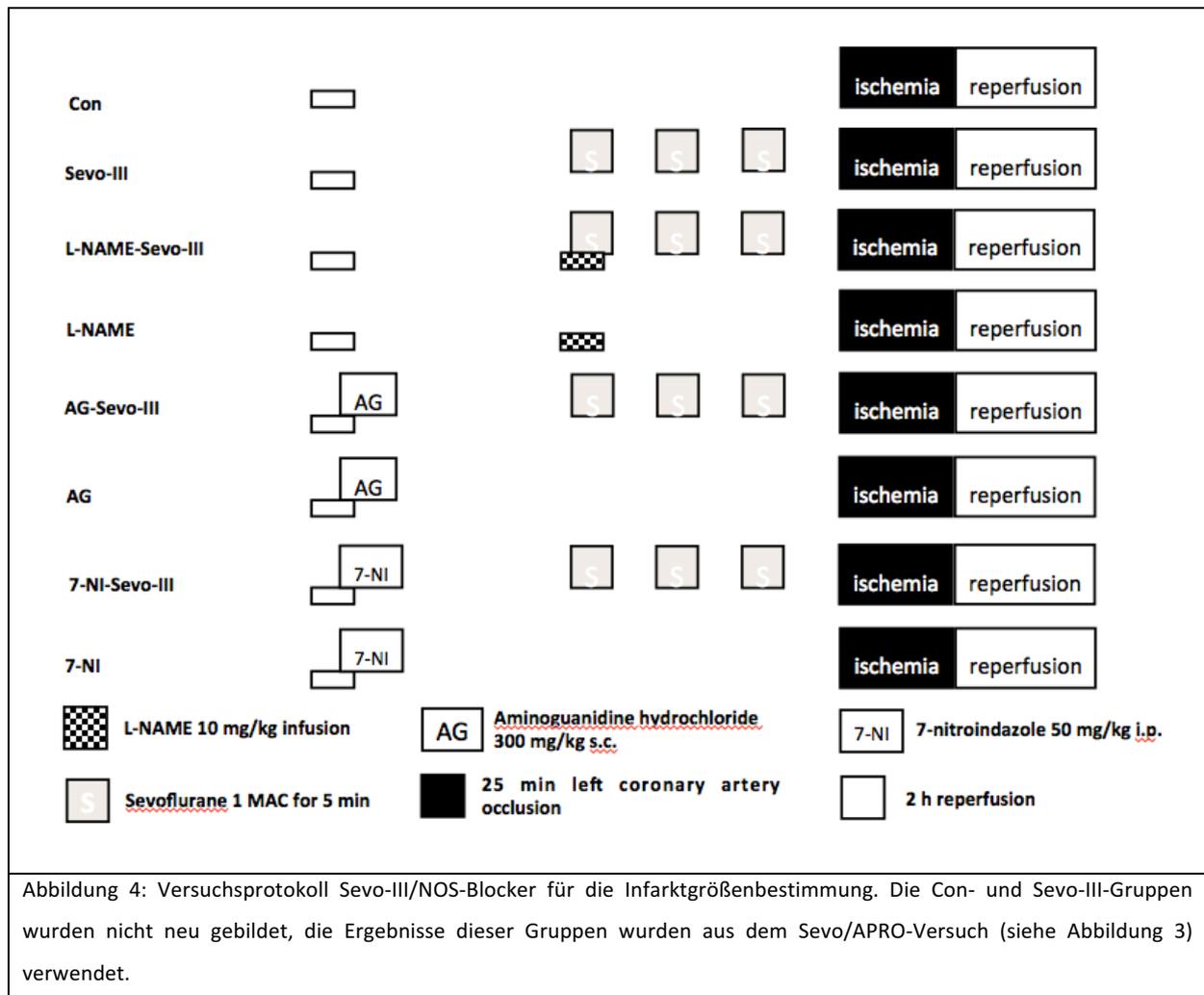
Die Studie wurde nach Genehmigung des Regierungspräsidenten Düsseldorf an narkotisierten Ratten durchgeführt. Aufgrund des Versuchsaufbaues (Details s.u.) waren 90 Ratten (Körpergewicht 380 – 420 g) für die Bestimmung der Infarktgröße und die Durchführung des Western Blotes erforderlich.

3.2. Bestimmung der Infarktgröße

Der erste Teil des Versuches zielte darauf ab, die Infarktgröße unter dem Einfluss verschiedener Präkonditionierungsmodelle mittels des volatilen Anästhetikums Sevofluran und zusätzlich den Einfluss von Aprotinin zu untersuchen. Dafür wurden 9 Versuchsgruppen und pro Gruppe sechs Tiere benötigt. Die erste Gruppe stellte die Kontrollgruppe (Con) dar, diese wurde vor der induzierten Ischämie nicht spezifisch behandelt. In den folgenden drei Gruppen wurde entweder einmal Sevofluran (1 MAC) für fünf Minuten (Sevo-I), zweimal Sevofluran für jeweils fünf Minuten mit einer Unterbrechung von fünf Minuten (Sevo-II), dreimal Sevofluran mit einer jeweiligen Unterbrechung von fünf Minuten (Sevo-III) oder sechsmal Sevofluran (Sevo-VI) mit erneuter Unterbrechung von jeweils fünf Minuten gegeben. Nach der letztmaligen Gabe von Sevofluran wurde nach weiteren zehn Minuten eine Infarkt-auslösende Ischämie von 25 Minuten mit anschließender Reperfusion von zwei Stunden durchgeführt. Um den Einfluss von Aprotinin auf die Präkonditionierung feststellen zu können, wurde der Versuch mit den Gruppen (Sevo I-III) noch einmal wiederholt, zusätzlich wurde allerdings zuerst ein Bolus und dann eine kontinuierliche Infusion von Aprotinin (40.000 KIU(kg/h) gegeben (APRO, APRO-Sevo I-III). Nach der Reperfusion wurde bei allen Tieren die Herzen entnommen (Durchführung s.u.) und die Infarktgröße bestimmt.



Um eine mögliche Beteiligung der eNOS an der Sevofluran-induzierten Präkonditionierung zu untersuchen, wurde die oben erwähnte Präkonditionierung mit der Sevo-III-Gruppe, unter Hinzugabe von Inhibitoren der NOS, wiederholt. In Ermangelung eines spezifischen Inhibitors der eNOS, wurde ein kompletter Inhibitor der NOS (N-Nitro-L-Arginin = L-NAME), ein spezifischer Blocker der nNOS (neuronaler NOS, 7-Nitroindazole = 7-NI) und der iNOS (induzierbarer NOS, Aminoguanide = AG) eingesetzt. So konnte unter anderem auch das Ausmaß einer Beteiligung der Isoformen der NOS an der Präkonditionierung untersucht werden. Für den Teil der Studie wurden 6 Gruppen mit jeweils sechs Tieren gebildet (L-NAME-Sevo-III, L-NAME, AG-Sevo-III, AG, 7-NI-Sevo-III, 7-NI), zudem wurden die Ergebnisse der Kontroll- und der Sevo-III-Gruppe aus dem Versuchsprotokoll Sevo/APRO (siehe Abbildung 3) verwendet. Auch hier wurde nach Abschluss der Reperfusion die Herzen entnommen und die Infarktgröße untersucht.



3.2.1. Vorbereitung der Tiere

Bei den verwendeten Ratten handelt es sich um männliche Wistar Ratten (Körpergewicht 380 - 420 g). Zu Versuchsbeginn wurde die Narkose mit S(+)-Ketamin (150mg/kg KG) intraperitoneal eingeleitet. Im Anschluss daran wurden die Ratten orotracheal intubiert (Vasifixbraunüle, 2,2 mm Durchmesser, Firma Braun, Deutschland) und maschinell beatmet. Die Beatmung erfolgte mit einem Tidalvolumen von 5 ml und einer Atemfrequenz von 60 Atemzügen pro Minute (Rema Labortechnik Beatmungsgerät, Typ 10 ml, Cass, Deutschland) bei O₂ angereicherter Raumluft (FiO₂ 0,4). Um eine Normoventilation der Ratten zu gewährleisten, wurde die Zusammensetzung des Atemgases kontinuierlich gemessen und die endexpiratorische CO₂-Konzentration bei 40 mmHg gehalten. Mittels Heizdecke und

Wärmelampe konnte eine Körpertemperatur von konstant $38,8 \pm 0,3^{\circ}$ C erreicht werden. Für die Verabreichung von notwendiger Medikamente und für venöse Blutabnahmen wurde die rechte Vena jugularis punktiert und ein Katheter eingebracht. Dadurch konnte die Narkose durch eine permanente Gabe von α -Chloralose (25 mg/kg KG/h) intravenös unterhalten werden. Zum Ausgleich von Flüssigkeitsverlusten wurden 5 ml/h NaCl 0.9% intravenös infundiert. Zur Bestimmung des aortalen Druckes wurde nach Präparation der HalsgefäÖe über die Arteria carotis communis rechts eine gelbe Braunüle (Vasifixbraunüle, 0,7 mm Durchmesser, Firma Braun, Deutschland) eingebracht. So konnte die Herzfrequenz sowie der mittlere Aortendruck (Mean aortic pressure, AoPmean) kontinuierlich in einen PC übertragen (PowerLab/8SP, Chart 5.0, ADInstruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia) und aufgezeichnet werden. Über eine linksseitige Sternotomie und anschließende Perikardiotomie wurde das Herz freigelegt und der Hauptast der linken Koronararterie ligiert (Prolene 5.0, Ethocon GmbH, Norderstedt, Deutschland). Die Enden der Ligatur wurden in eine Gummischlinge geschoben, so dass die linke Koronararterie verschlossen, aber auch zu dem Zeitpunkt der Reperfusion wieder eröffnet werden konnte. Eine erfolgreiche Okklusion der linken Koronarie zeigte sich an der Zyanose des epikardialen Versorgungsgebietes der verschlossenen Koronararterie.

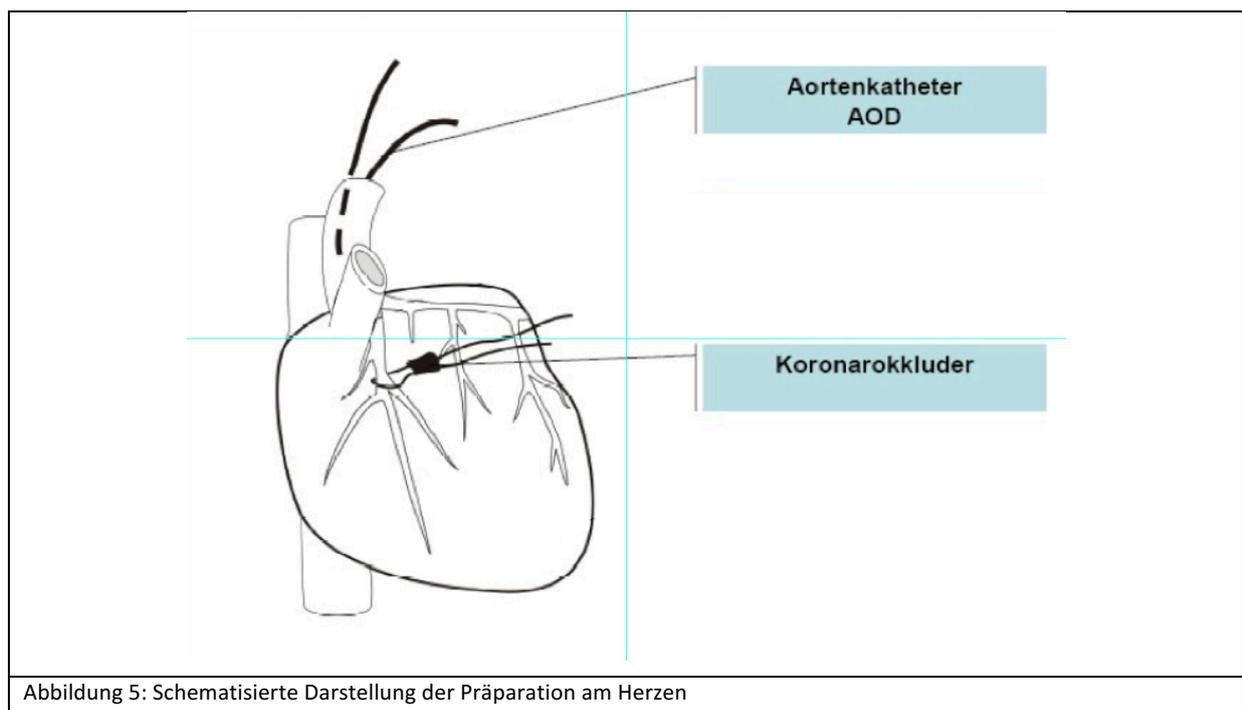


Abbildung 5: Schematisierte Darstellung der Präparation am Herzen

3.2.2. Durchführung des Versuches

Nach Beendigung der Präparation wurden die Eingangs- und Vitalparameter nach einer Ruhephase von ca. 15 Minuten erhoben. Im Anschluss erfolgte die randomisierte Einteilung und Behandlung nach dem Versuchsprotokoll (Con, Sevo-I-III und VI, APRO-Sevo-I-III, APRO). Die erste Gruppe stellte die unbehandelte Kontrollgruppe dar. Die Sevo-I-Gruppe erhielt dann für 5 Minuten 1 MAC Sevofluran (1 MAC= minimale alveoläre Konzentration, 2,4 Vol% bei Ratten). In der Sevo-II-Gruppe erfolgte eine zweimalige 5-minütige Verabreichung von 1 MAC Sevofluran im Abstand von jeweils 5 Minuten. Bei der Sevo-III-Gruppe wurde die Sevoflurangabe auf 3 x 5 Minuten ausgedehnt, jeweils von 5-minütigen Pausen unterbrochen. Ebenso erfolgte die Durchführung der Sevo-VI-Gruppe mit entsprechend 6 x 5-minütigen Gaben von Sevofluran und wieder jeweils 5 Minuten Pausen zwischen den Applikationen. Nach der letzten Sevoflurangabe wurde nach einer weiteren Pause von 10 Minuten die Okklusion der linken Coronararterie vorgenommen. Die durch Okklusion ausgelöste Ischämie wurde für 25 Minuten aufrecht erhalten, um dann im Anschluß eine Reperfusionphase von zwei Stunden erfolgen zu lassen. Um den Einfluss des Aprotinins auf die Infarktgröße bestimmen zu können, wurde dieser Versuch mit dem gleichem Präkonditionierungsmodell wie oben beschrieben durchgeführt, unter der zusätzlichen Gabe von Aprotinin, welches zunächst als Bolus (Aprotinin 40.000 KIU/kg), gefolgt von Aprotinin (40.000 KIU/kgKG/h) als Dauerinfusion über 45 Minuten gegeben wurde (Sevo-APRO I– III). Die letzte Gruppe (APRO) wurde alleine mit Aprotinin (zuerst Bolusgabe von 40.000 KIU/kg, dann mit einer Dauerinfusion von Aprotinin mit 40.000 KIU/kgKG/h über 45 Minuten) behandelt.

Im zweiten Teil der Infarktgrößenbestimmung wurde untersucht, ob die eNOS einen relevanten Stellenwert in der Sevofluran-induzierten Präkonditionierung einnimmt und ob die Blockierung dieser durch Aprotinin für die Inhibition der Präkonditionierung verantwortlich ist. Daher wurden erneut sechs Gruppen (L-NAME-Sevo-III, L-NAME, AG-Sevo-III, AG, 7-NI-Sevo-III, 7-NI) mit jeweils sechs Tieren gebildet und zudem die Ergebnisse der Con- und Sevo-III-Gruppe aus dem Sevo/APRO-Versuch (siehe Abbildung 3) verwendet. In der L-NAME-Sevo-III-Versuchsgruppe wurde der nicht-selektive NOS-Inhibitor N-Nitro-L-Arginin (10 mg/kg KG) eingesetzt, der als eine Infusion über 10 Minuten unmittelbar vor

Beginn der Sevofluran-induzierten Präkonditionierung und 30 Minuten vor Okklusion der linken Koronararterie gegeben wurde (L-NAME-Sevo-III). In der L-NAME-Gruppe (L-NAME) wurde der nicht-selektive NOS-Inhibitor wieder als 10-minütige Infusion (10 mg/kg KG) 30 Minuten vor Okklusion der linken Koronararterie gegeben. In der darauf folgenden Versuchsgruppe (AG-Sevo-III) wurde ein selektiver Inhibitor (Aminoguanide, AG) der iNOS (induzierbare NOS) gegeben. Dieser wurden den Tieren 30 Minuten vor Beginn der Sevofluran-induzierten Präkonditionierung und 60 Minuten vor Okklusion der linken Koronararterie subkutan injiziert (300 mg/kg KG). In der AG-Gruppe (AG) injizierte man den selektiven Inhibitor AG (300 mg/kg KG) 60 Minuten vor Okklusion der linken Koronararterie subkutan. Die 7-NI-Sevo-III-Gruppe wurde mit einem weiteren selektiven Inhibitor behandelt. Hierbei handelt es sich um einen Blocker der neuronalen NOS (nNOS), dem 7-Nitroindazol (7-NI). 30 Minuten vor Beginn der Sevofluran-induzierten Präkonditionierung und 60 Minuten vor Verschließung der linken Koronararterie wurde der Blocker in das Peritoneum (50 mg/kg KG) der Tiere eingebracht.

In der 7-NI-Gruppe (7-NI) wurde dieser selektive Blocker 60 Minuten vor Okklusion der linken Koronararterie in das Peritoneum (50 mg/kg KG) eingebracht. Die hier genannten Dosisangaben sowie die Orte der Verabreichung der NOS-Inhibitoren (L-NAME, AG und 7-NI) sind aus einer Arbeit von Krolkowski et al.[94] entnommen.

3.2.3. Bestimmung der Infarktgröße

Die Aortenwuzel der Herzen wurde an eine modifizierte Langendorff-Apparatur angeschlossen, nachdem diese 120 Minuten reperfundiert wurden. Die retrograde Perfusion erfolgte mittels Knopfkanüle und einem Dreiwegehahn über 15 Minuten mittels 0.9%iger NaCl-Lösung bei einem Druck von 80 mmHg. Durch dieses Prozedere wurde das im Myokard verbliebene Blut ausgewaschen. Im Anschluss daran wurde erneut die linke Koronararterie verschlossen und es erfolgte eine Perfusion des Myokards mit 0,2%igem Evans – Blau in 1% Dextranlösung für 10 Minuten. Durch diese Abfolge verfärbte sich das perfundierte Areal blau, wohingegen die ischämische Zone nicht angefärbt wurde. Um die in den Arterien verbliebene Farbe zu entfernen, erfolgte eine erneute kurzzeitige Spülung mit NaCl. Zur weiteren Vorbereitung der endgültigen Infarktgrößenbestimmung wurden die Herzen dann

bei -78°C tiefgefroren und nach 24 Stunden in 1 mm dicke Scheiben geschnitten. Im darauf folgenden Arbeitsgang wurden diese Scheiben für 15 Minuten in einer TTC-Lösung bei 37°C inkubiert und anschließend für 24 Stunden in 0,4%igem Formaldehyd fixiert. Das wasserlösliche und farblose TTC wird in dem ehemals vitalen Gewebe durch Dehydrogenasen zum wasserunlöslichen und roten Formazan reduziert. Diese Reaktion findet im Bereich des nekrotischen Areals nicht mehr statt, so dass hier kein Farbumschlag zu erkennen ist.



Zur Bestimmung des Infarktareales wurden die einzelnen Scheiben eingescannt (CanonScanFB620P, Canon Deutschland GmbH, Krefeld, Deutschland) und die Fläche des linken Ventrikels, die des Risikogebietes und des Infarktareales planimetriert (SigmaScan Pro5[®], Imageanalysis, Version 5.0.0, SPSS Science Software, Chicago, IL, USA). Nach der Planimetrie wurden die Herzscheiben bei 45°C in einem Wärmeschrank getrocknet und im Anschluss daran das Trockengewicht bestimmt. Aus dem Gewicht und dem Flächenanteil wurde dann das Trockengewicht des Infarktes sowie des verbliebenen linken Ventrikels errechnet.

3.3. eNOS Western Blot

Um den möglichen Einfluss der Sevofluran-induzierten Präkonditionierung auf die eNOS, deren Phosphorylierung und letztlich die Wirkung von Aprotinin auf diese zu untersuchen, wurden in diesem Teil des Versuches sieben Gruppen (Con, Sevo-I, Sevo-II, Sevo-III, Sevo-IV, APRO-Sevo-III, APRO) gebildet, die nach dem schon zuvor beschriebenen Präkonditionierungsprotokoll behandelt und deren Herzen dann mittels Western Blot untersucht wurden.

3.3.1. Western Blot

Die Ratten wurden nach dem oben genannten Präkonditionierungsprotokoll behandelt. Unmittelbar nach Beendigung des Präkonditionierungsprotokolls wurden die Herzen entnommen, mit kalter NaCl-Lösung gewaschen (um die verbliebenen Blutrückstände zu entfernen), um dann in flüssigen Stickstoff getaucht und im Anschluß bei -80° Celsius tiefgefroren zu werden.

In einem nächsten Schritt erfolgte die zelluläre Fraktionierung mit anschließender Durchführung des Western Blots mit dem Ziel den Gesamtgehalt der eNOS beziehungsweise den Anteil der phosphorylierten eNOS zu bestimmen. Für diese Bestimmung wurde die cytosolische (P1-Fraktion)- und die membranöse (P2-Fraktion) Fraktion benötigt. Für die zelluläre Fraktionierung wurden die eingefrorenen Herzen, je nach Größe, halbiert und geviertelt und dann in flüssigen Stickstoff gegeben. Die so schockgefrorenen Herzhälften oder -viertel wurden dann aus dem Stickstoff genommen und im Anschluss pulverisiert. Das gewonnene Pulver wurde in ein großes Falcon überführt und mit Lysepuffer durch einen Homogenisator gemischt. Für die nun folgende Fraktionierung wurde das Homogenisat (= Pellet) eines Herzens gleichmäßig auf Eppendorfgefäße (1,5 ml) verteilt, um dann bei 2400 rpm (Umdrehungsgeschwindigkeit der Zentrifuge) und 4°C 10 Minuten zentrifugiert zu werden. Die Zentrifugation bei niedrigen Geschwindigkeiten erlaubt eine grobe Trennung zwischen cytosolischer Fraktion und der Partikelfraktion. Der dadurch entstandene Überstand wurde in neue Eppendorfgefäße überführt und erneut bei 12000 rpm und 4°

Celsius für 15 Minuten zentrifugiert. Der so entstandene Überstand ist die P1-Fraktion (Cytosol-Fraktion). In einem nächsten Schritt wurden Lysepuffer mit Triton X-100 1% gemischt und mit dem oben genannten Pellet gut durchmischt. Das Pellet-/Puffergemisch wurde dann noch mal für 60 Minuten auf Eis gestellt und im Anschluss erneut gemischt, um dann für 15 Minuten bei 12000 rpm und 4° Celsius zentrifugiert zu werden. Der so gewonnene Überstand ist die P2-Fraktion (Membran-Fraktion); diese wurde ebenfalls in frische Eppendorfgefäße umgefüllt. Zuletzt wurde das Pellet mit 500 µl Triton-Puffer versetzt. Das Pellet selbst ist unlöslich, es handelt sich um die P3-Fraktion (Kern-Fraktion). Alle gewonnenen Fraktionen werden, bis zum Gebrauch bei -80° C tiefgefroren.

Um in allen Proben den gleichen Proteingehalt zu haben (unabhängig von der Fraktion), wird die Proteinmenge jedes einzelnen Eppendorfgefäßes nach der Methode von Lowry[95] bestimmt. Die Methode von Lowry beruht auf zwei Reaktionen. Durch Hinzugabe von verschiedenen Reagenzien (alkalische Lösung, Kupfer-Sulfat, Folins Reagenz; nähere Angaben siehe unter Kapitel „Substanzen und Lösungen“) in die Lösung, die untersucht werden soll, kommt es zur Ausbildung eines planar-quadratisch, blau-violetten Komplexes. Dieser besteht aus den Peptidbindungen der Lösung und den in alkalischer Lösung enthaltenden Kupfer(II)-Ionen. Diese Reaktion wird als Biuretreaktion bezeichnet. Weiterhin kommt es zu einer Reduzierung des Kupfer(II) zu Kupfer(I). Im Anschluss kommt es zur Ausbildung von Molybdänblau, indem das reduzierte Kupfer(I) seinerseits das gelbe Folins Reagenz Molybdän(VI)- und Wolfram(VI)-Heteropolysäuren reduziert. Durch diese Reaktionen kommt es zu einer intensiven Blaufärbung der Probe, die zur quantitativen Bestimmung der Proteinmenge genutzt werden kann. Diese Messung erfolgt 750 nm durch die Photometrie. Nach Bestimmung der Proteinmenge werden die einzelnen Proben so aufgeteilt, dass letztendlich in jeder Probe die gleiche Menge an Protein vorhanden ist.

Die zu untersuchenden Proben sowie ein Marker wurden mit Loading-Buffer verdünnt, zentrifugiert und für 5 Minuten auf 95°Celsius erhitzt, um so Sekundär- und Tertiärstrukturen von Proteinen aufzubrechen durch z.B. die Spaltung von Wasserstoffbrücken. Die denaturierten Proben wurden auf SDS-Pages 7,5% aufgetragen, um dann durch Elektrophorese voneinander getrennt und mittels Tank blotting bei 100 V für 1 Stunde (Transfer unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes) auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidfluorid-Membran) transferriert (vom Gel auf die Membran) zu werden. Aufgrund

von Wechselwirkungen (hydrophob) bleiben sie an der Oberfläche der Membran haften. Das Muster der Auftrennung (elektrophoretisch) bleibt erhalten. Um die unspezifische Bindung von Antikörpern zu verhindern, wurde der Western Blot für 2 Stunden in einer 5%igen Fett-Trockenmilchlösung (Blotto 5%) in Tris-Puffer welcher Tween (TBS-T) enthält, inkubiert. Nach diesen 2 Stunden wurde die Membran über Nacht bei 4° Celsius mit einem spezifischen Antikörper inkubiert (Phospho-eNOS-Antikörper #9571, Cell Signalling), um so die Phosphorylierung der eNOS an Serin¹¹⁷⁷ (Ser¹¹⁷⁷) dem phosphorylierten Ende der eNOS zu detektieren. Der antigenspezifische Primärantikörper bindet dabei an dem Serin¹¹⁷⁷. Um den Gesamtgehalt der totalen eNOS zu bestimmen, wurde alternativ zu dem Phospho-eNOS-Antikörper ein spezifischer totaler eNOS-Antikörper (Totaler-eNOS-Antikörper #9572, Cell Signalling) eingesetzt. Nach dem Einwirken des Antikörpers über Nacht wurde in einem nächsten Schritt der Blot in kaltem TBS-T gewaschen. Im Anschluss wurde ein zweiter Antikörper (Anti-Rabbit-Horseradish-Peroxidase-Konjugat, sekundärer Markierungsantikörper) zu dem Western Blot hinzugegeben, der bei Raumtemperatur für zwei Stunden einwirken mußte. Dieser bindet an der Fc-Region des primären Antikörpers und es kann so die Detektion durch die Katalysierung einer Chemilumineszenzreaktion erfolgen. Dieser sekundäre Antikörper katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, bei der eine Lumineszenz detektiert werden kann. Um diese Lumineszenz auf Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham) sichtbar zu machen, wurde das Chemilumineszenz-System Santa Cruz verwendet. Die Quantifizierung der Western Blots erfolgte mittels der Kodak Image Station® (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA). Die Ergebnisse wurden als Ratio der phosphorylierten eNOS zu der totalen eNOS sowie der totalen eNOS zum α -Tubulin dargestellt.

3.4. Substanzen und Lösungen

3.4.1. Vorbereitung der Tiere

- S(+)-Ketamin 150 mg/kg KG
- α -Chloralose 25 mg/kg KG/h
- Natriumchlorid (NaCl) 0,9% 5 ml/h

3.4.2. Durchführung des Versuches

- Sevofluran 1-6 MAC für jeweils 5 Minuten
- Aprotinin Bolus 40.000 KIU/kg,
Dauerinfusion 40.000 KIU/kgKG/h für 45 Minuten
- N-Nitro-L-Arginin 10 mg/kg KG als Infusion über 10 Minuten
- Aminoguanide (AG) 300 mg/kg KG, subkutane Gabe
- 7-Nitroindazol (7-NI) 50 mg/kg KG, Gabe ins Peritoneum

3.4.3. Bestimmung der Infarktgröße

- Natriumchlorid (NaCl) 0,9% Spülung der Herzen an der Langendorff-Apparatur
- Evans-Blau 0,2% in 1% Dextranlösung
- Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) Nährmedienzusatz zur farblichen Markierung
- Formaldehyd 0,4% Fixierung

3.4.4. Western Blot

• Lysepuffer	60,57 mg	Sigma 7-9
	210,00 mg	Natriumfluorid (NaF)
	36,78 mg	Na ₃ VO ₄
	76,08mg	Ethylenglycoltetra- essigsäure (EGTA)
	100,00 ml	Aqua dest
	1,00 mg	Aprotinin
	1,00 mg	Leupeptin
	1,00 mg	Pepsatin
	10,00 ml	Tris-HCl Lösung, pH 7,4
	7,70 mg	Dithiothreitol (DTT)
	100,00 µl	Okadaic-Acid
• Triton X-100	1%,	Octylphenol- poly(ethylenglycerol)
• Triton-Puffer		
• Lowry-Proteinbestimmung	10,00 g	Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)
	0,10 mol	Natriumhydroxid (NaOH)
	2,00 g	Kalium-Natrium-Tartrat (KNa)
	1,00 g	Kupfer-Sulfat (CuSO ₄)
	5,00 ml	1,2Naphthochinon- Natriumsulfat (Folins- Reagenz)
• Loading Buffer	7,00 ml	Aqua dest
	1,00 ml	500 mM Tris-HCl, pH 6,8
	2,00 ml	Glycerol
	1,00 g	Natriumdodecylsulfat
	30,00 mg	Bromphenolblau

		Mercaptoethanol
• Trenngele (SDS-Pages 7,5%)	5 ml	Polyacrylamid 30% (PAA)
	9,8 ml	Aqua dest
	5 ml	1,5 M Sigma 7-9, pH 8,8
	200 µl	Natriumdodeylsulfat (SDS)
	20 µl	Tetramethylethylendiamin (Temed)
	100 µl	Ammoniumpersulfat 10% (APS)
• Blocking Solution (Blotto 5%)	50 g	Dried skimmed milk
	1000 ml	Aqua dest
	5 Tabletten	Phosphatgepufferte Salz- lösungen (PBS)
	1 ml	Polysorbat 0,1% (Tween) Tris-Puffer
• Phospho-eNOS-Antikörper	1:1000 #9571, Cell Signalling, Danvers, MA, USA	
• Totaler-eNOS-Antikörper	1:1000 #9572, Cell Signalling, Danvers, MA, USA	
• Rinderalbuminserum (BSA) 5%	50 g	Rinderalbuminserum
	1000 ml	TBS-T, pH 8,0
• Tris-gepufferte Salzlösung (TBS-T)	2000 ml	Aqua dest
	10 Tabletten	Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)
	2 ml	Polysorbat 20% (Tween)
• Anti-Rabbit-Antikörper	1:10000	Anti-Rabbit-Horseradish- Peroxidase-Antikörper, Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland

- ECL-Reagenz Chemilumineszenz-Reagenz
für die Detektierung des Anti-Rabbit-
Antikörper

3.5. Statistische Auswertung

Die Analyse der Gruppenstärke hat ergeben, dass eine Anzahl von $n=6$ in jeder Gruppe notwendig war, um einen Unterschied der Infarktgröße von 25% mit einer Power (Teststärke) von 80% und einem α von 0,05 (Signifikanzniveau) zu ermitteln.

Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

Die statistische Analyse der Infarktgröße und die Bestimmungen der eNOS wurden mittels ANOVA (analysis of variance) und der mehrfaktoriellen Varianzanalyse nach Bonferroni durchgeführt.

Für die statistische Analyse der hämodynamischen Variablen wurde die „two-way-ANOVA“ für Zeit- und Behandlungseffekte eingesetzt.

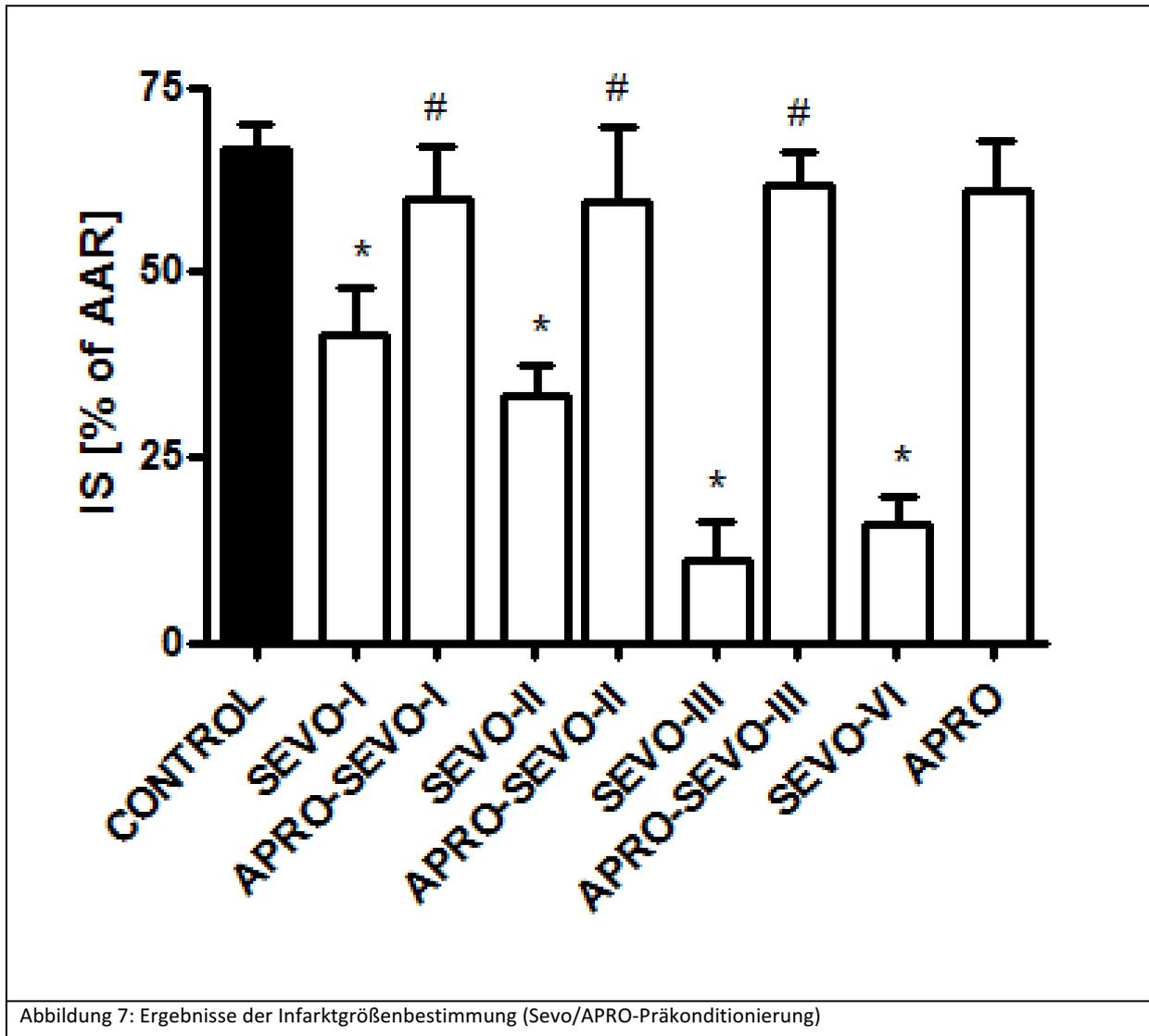
Bei Feststellung einer Signifikanz erfolgte der Vergleich zwischen den Gruppen für jeden Zeitpunkt mittels ANOVA, gefolgt von dem Dunnett post hoc Test mit der Kontrollgruppe als Referenz. Zeitliche Effekte innerhalb jeder Gruppe wurden durch ANOVA, gefolgt von einem zweiarmigen Dunnett, post hoc mit einem Ausgangswert entsprechend dem Referenzzeitpunkt analysiert.

$P < 0.05$ wurde als statistisch signifikant erachtet.

4. ERGEBNISSE

4.1. Ergebnisse der Infarktgrößenbestimmung

Der erste Teil des Versuches zielte darauf ab, die Infarktgröße unter dem Einfluss verschiedener Präkonditionierungsmodelle mittels des volatilen Anästhetikums Sevofluran und zusätzlich den Einfluss von Aprotinin zu untersuchen. Es zeigte sich in allen Gruppen (Sevo-I-III und -VI), die mit Sevofluran nach dem oben genannten Präkonditionierungsprotokoll behandelt wurden, eine signifikante Reduzierung ($P < 0.05$) der Infarktgröße im Gegensatz zu der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 10). In der Kontrollgruppe betrug die Infarktgröße 67% ($67 \pm 3\%$), in der Sevo-I-Gruppe lag die Infarktgröße bei 42% ($42 \pm 6\%$), in der Sevo-II-Gruppe bei 33% ($33 \pm 4\%$), in der Sevo-III-Gruppe bei 11% ($11 \pm 5\%$) und in der Sevo-VI-Gruppe bei 16% ($16 \pm 4\%$). Die ausgeprägteste Reduzierung der Infarktgröße wurde nach den Gaben von drei oder sechs Zyklen (Sevo-III und -VI) Sevofluran beobachtet ($P < 0,05$ versus Sevo-II und -I). Jede Sevofluran-induzierte Präkonditionierung (Sevo-I-III und -VI) wurde durch die Gabe von Aprotinin während der Präkonditionierung blockiert (siehe Abbildung 10). Die alleinige Gabe von Aprotinin hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Infarktgröße (APRO: $61 \pm 7\%$, $P > 0,05$ versus der Kontrollgruppe).



Um eine mögliche Beteiligung der eNOS an der Sevofluran-induzierten Präkonditionierung zu untersuchen, wurde die oben erwähnte Präkonditionierung noch einmal mit der Sevo-III-Gruppe, unter Hinzugabe von Inhibitoren der NOS, wiederholt. In Ermangelung eines spezifischen Inhibitors der eNOS, wurde ein kompletter Inhibitor der NOS (N-Nitro-L-Arginin = L-NAME), ein spezifischer Blocker der nNOS (neuronaler NOS, 7-Nitroindazole = 7-NI) und der iNOS (induzierbarer NOS, Aminoguanidine = AG) eingesetzt. Durch die Hinzugabe von L-NAME konnte kein Unterschied in dem Ausmaß der Infarktgröße hinsichtlich der Kontrollgruppe dedektiert werden (L-NAME-Sevo-III: $67 \pm 4\%$, $P < 0,05$ versus Sevo-III). Die isolierte Gabe von L-NAME hatte keinen Einfluss auf die Infarktgröße (L-NAME: $66 \pm 5\%$, $P > 0,05$ versus Con). Die selektiven Inhibitoren der iNOS und nNOS AG und 7-NI blockieren den Effekt der Sevofluran-induzierten Präkonditionierung teilweise (AG-Sevo-III: $25 \pm 5\%$, 7-NI-

Sevo-III: $31 \pm 5\%$, $P < 0.05$ versus Sevo-III und Con). Die alleinige Gabe der selektiven Inhibitoren zeigte keine Veränderung der Größe des Infarktes (AG: $68 \pm 4\%$, 7-NI: $67 \pm 7\%$), $P > 0,05$ versus Con; siehe Abbildung 11).

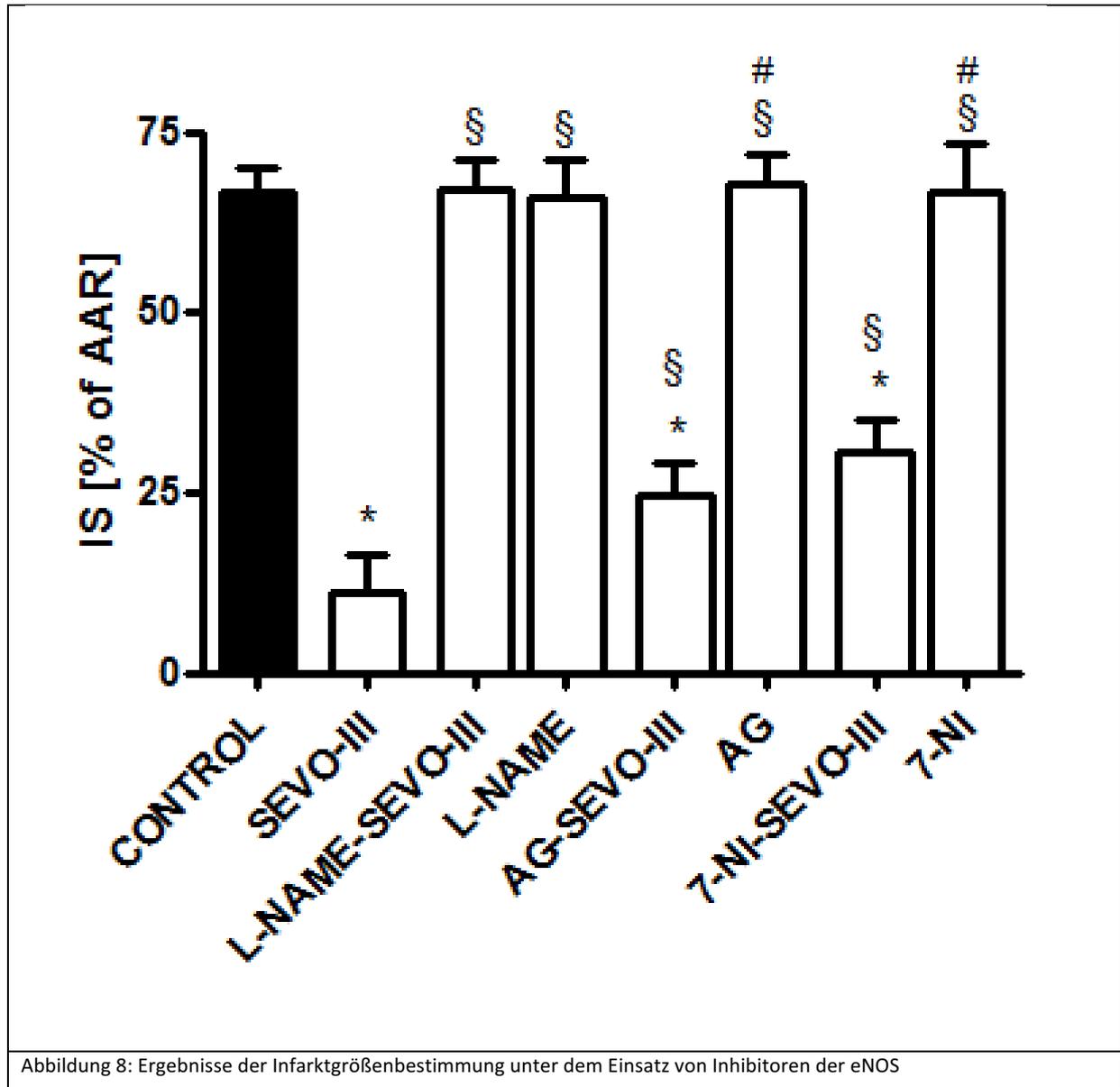


Abbildung 8: Ergebnisse der Infarktgrößenbestimmung unter dem Einsatz von Inhibitoren der eNOS

4.2. Ergebnisse der Hämodynamik

Während der Durchführung des Versuches und insbesondere während der Präkonditionierung wurden kontinuierlich die Vitalparameter (Herzfrequenz und der Blutdruck) bestimmt. Während des Präkonditionierungsprotokolles mit Sevofluran kam es zu einem Abfall des mittleren aortalen Blutdruckes (AoP_{mean}) und der Herzfrequenz (HR; siehe Abbildung 12). Dieser Effekt war in der letzten Auswaschphase vor Beginn der Ischämie nicht mehr nachweisbar.

Weiterhin zeigte sich im Vergleich zu der Kontrollgruppe ein Abfall der Herzfrequenz während der Ischämiephase in der AG-Sevo-III- sowie in der 7-NI-Sevo-III-Gruppe.

In der Sevo-II und Sevo-III-Gruppe konnte ebenfalls ein Abfall der Herzfrequenz, allerdings in der Reperfusionphase, verzeichnet werden.

	Baseline			Preconditioning						Ischemia		Reperfusion		
	Base	Post INT	Sevo-I	Wash-I	Sevo-II	Wash-II	Sevo-III	Wash-III	Occ 15	Occ 24	Rep 15	Rep 60	Rep 120	
HR [min⁻¹]														
CON	434 ± 24	434 ± 25	433 ± 25	429 ± 30	434 ± 30	434 ± 22	434 ± 23	434 ± 11	437 ± 33	433 ± 41	446 ± 38	430 ± 18	390 ± 56	
Sevo-I	430 ± 16	441 ± 25	446 ± 32	442 ± 26	440 ± 24	440 ± 25	392 ± 37	419 ± 51	405 ± 22	420 ± 22	406 ± 18	411 ± 52	405 ± 41	
APRO-Sevo-I	451 ± 36	444 ± 42	437 ± 47	449 ± 47	441 ± 44	438 ± 40	394 ± 57	431 ± 66	424 ± 74	422 ± 55	401 ± 53	409 ± 70	407 ± 84	
Sevo-II	431 ± 16	434 ± 15	418 ± 23	424 ± 10	386 ± 19	392 ± 23	374 ± 18†	387 ± 18	399 ± 21	388 ± 22	378 ± 28†	349 ± 44†	329 ± 68†	
APRO-Sevo-II	425 ± 22	416 ± 30	406 ± 29	405 ± 30	368 ± 22	399 ± 35	361 ± 20*	380 ± 47	389 ± 57	375 ± 75	374 ± 47	381 ± 39	365 ± 40	
Sevo-III	440 ± 20	415 ± 16	365 ± 18*†	392 ± 24	343 ± 27†	372 ± 38†	339 ± 6*†	364 ± 16†	352 ± 37*†	346 ± 35*†	351 ± 39*†	325 ± 36†	302 ± 39*†	
APRO-Sevo-III	412 ± 21	396 ± 30	362 ± 34*†	392 ± 28	354 ± 31†	383 ± 30	350 ± 32*†	372 ± 24	383 ± 15	386 ± 22	372 ± 30	372 ± 29	361 ± 32†	
APRO	429 ± 27	384 ± 42*	365 ± 69*	377 ± 28*	390 ± 30	386 ± 29	374 ± 34*	374 ± 47	381 ± 52	372 ± 51	361 ± 53*	330 ± 34†	330 ± 16†	
L-NAME-Sevo-III	402 ± 43	388 ± 27	317 ± 55*	324 ± 72	310 ± 56	307 ± 68	336 ± 57*	319 ± 59	305 ± 63	313 ± 64	319 ± 65	296 ± 68	351 ± 106	
L-NAME	400 ± 52	390 ± 38	374 ± 42	368 ± 40	365 ± 39	364 ± 39*	367 ± 32*	370 ± 33	370 ± 32	362 ± 35	332 ± 80	294 ± 88	314 ± 55	
AG-Sevo-III	350 ± 24	319 ± 44	306 ± 34	315 ± 39	288 ± 33	293 ± 37	278 ± 28	285 ± 38	301 ± 36	296 ± 40	286 ± 32	286 ± 24	284 ± 23	
AG	396 ± 36*	375 ± 29	368 ± 36*	368 ± 40	359 ± 52	361 ± 51*	352 ± 62*	365 ± 32	352 ± 49*	361 ± 34	331 ± 39	312 ± 24	349 ± 42	
7-NI-SEVO-III	364 ± 34	350 ± 32	321 ± 29	335 ± 38*	314 ± 33	318 ± 36	305 ± 32	313 ± 51	338 ± 47*	330 ± 42	320 ± 42	287 ± 47†	296 ± 34†	
7-NI	398 ± 56*	389 ± 50	388 ± 50	388 ± 49	389 ± 52	388 ± 50	389 ± 44	383 ± 43	388 ± 47	385 ± 47	370 ± 48*	351 ± 52	339 ± 32	
AoPmean [mmHg]														
CON	135 ± 15	135 ± 15	134 ± 15	136 ± 9	130 ± 15	133 ± 14	131 ± 15	130 ± 16	103 ± 28†	98 ± 25†	102 ± 18†	101 ± 14†	94 ± 13†	
Sevo-I	115 ± 28	124 ± 24	114 ± 26	117 ± 23	119 ± 23	119 ± 25	74 ± 23*	109 ± 28	81 ± 27	78 ± 22	96 ± 30	84 ± 28	77 ± 31	
APRO-Sevo-I	126 ± 35	116 ± 45	109 ± 41	113 ± 43	113 ± 49	108 ± 39	81 ± 35*	115 ± 44	98 ± 40	91 ± 37	94 ± 49	89 ± 59	99 ± 52	
Sevo-II	120 ± 19	129 ± 22	121 ± 30	133 ± 30	94 ± 27	128 ± 24	85 ± 17*	117 ± 29	108 ± 30	93 ± 27	84 ± 17	70 ± 15†	59 ± 13†	
APRO-Sevo-II	137 ± 17	123 ± 26	117 ± 19	114 ± 19	89 ± 32	119 ± 37	84 ± 30*	112 ± 42	96 ± 48	99 ± 49	91 ± 25	101 ± 38	85 ± 41	
Sevo-III	122 ± 16	121 ± 14	82 ± 23*†	113 ± 22	69 ± 24*†	97 ± 24	64 ± 25*†	116 ± 14	71 ± 23†	74 ± 31†	78 ± 25†	67 ± 18†	62 ± 19†	
APRO-Sevo-III	119 ± 11	93 ± 12*	78 ± 9*†	102 ± 22	71 ± 5*†	105 ± 19	73 ± 7*†	106 ± 12	105 ± 11	104 ± 18	99 ± 18	107 ± 16	90 ± 15†	
APRO	117 ± 14	92 ± 21*	88 ± 21*	87 ± 29*	89 ± 31	88 ± 37	86 ± 29*	92 ± 28	87 ± 37	91 ± 31	85 ± 28	64 ± 9†	59 ± 13†	
L-NAME-Sevo-III	120 ± 29	109 ± 40	112 ± 34	160 ± 20	124 ± 31	143 ± 27	109 ± 25	143 ± 36	118 ± 37	111 ± 43	132 ± 38	99 ± 27	87 ± 21	
L-NAME	126 ± 34	147 ± 44†	182 ± 22*	179 ± 25	173 ± 26	166 ± 27	163 ± 25	163 ± 22	125 ± 29	131 ± 22	119 ± 45	85 ± 47	72 ± 42	
AG-Sevo-III	135 ± 18	137 ± 28	93 ± 19†	125 ± 29	78 ± 14*†	113 ± 27	71 ± 11†	119 ± 27	97 ± 26†	91 ± 28†	88 ± 22†	74 ± 10†	77 ± 7†	
AG	108 ± 20	120 ± 28	124 ± 28	128 ± 30	126 ± 29	127 ± 27	127 ± 25	129 ± 26	107 ± 38	97 ± 38	85 ± 30	70 ± 25	91 ± 30	
7-NI-SEVO-III	144 ± 21	147 ± 17	101 ± 24†	133 ± 18	88 ± 23†	113 ± 21	74 ± 13*†	112 ± 27	102 ± 22	92 ± 16†	91 ± 17†	78 ± 9†	74 ± 8†	
7-NI	116 ± 26	121 ± 37	121 ± 38	119 ± 34	119 ± 35	122 ± 25	119 ± 29	113 ± 27	86 ± 37	79 ± 31	76 ± 16	59 ± 14†	60 ± 18†	
HR [min⁻¹]														
Sevo-VI	381 ± 29		336 ± 30	358 ± 34	316 ± 32†	334 ± 35	291 ± 25†	326 ± 30†	337 ± 32	329 ± 31	313 ± 31†	300 ± 31†	283 ± 40†	
AoPmean [mmHg]														
Sevo-VI	144 ± 11		100 ± 11*†	137 ± 10	77 ± 8*†	123 ± 20	68 ± 11*†	101 ± 41†	101 ± 23†	93 ± 20†	88 ± 12†	79 ± 13†	72 ± 15†	

Abbildung 9: Hämodynamische Parameter

Daten wurden dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung. HR: Herzfrequenz in Schläge pro Minute, AoPmean: mittlerer aortaler Blutdruck in mmHg, Base: Basis Messwerte, Post INT: Meßwerte nach Gabe der Inhibitoren, Sevo-I, -II, -III, -VI: Sevofluran-induzierte Präkonditionierung, Waschphase-I, -II, -III, -VI: Auswaschen nach Gabe von Sevofluran, Occ 15 und Occ 24: Okklusion der linken Koronararterie nach 15 and 24 Minuten, beziehungsweise, Reperfusion 15, Reperfusion 60 and Reperfusion 120: nach 15, 60 and 120 Minute der Reperfusion, beziehungsweise Con = Kontrollgruppe; Sevo-I, Sevo-II, Sevo-III, Sevo-VI: 1, 2, 3 oder 6 Zyklen Sevofluran-induzierte Präkonditionierung; APRO-Sevo-I, APRO-Sevo-II, APRO-Sevo-III = Aprotinin + 1, 2, 3 Zyklen Sevofluran-induzierte Präkonditionierung; APRO = Aprotinin; L-NAME: N-Nitro-L-Arginin, AG: Aminoguanide, 7-NI: 7-Nitroindazole *P<0.05 versus Con, †P<0.05 versus Base

4.3. Ergebnisse des eNOS Western Blotes

Um den möglichen Einfluss der Sevofluran-induzierten Präkonditionierung auf die eNOS, deren Phosphorylierung und letztlich die Wirkung von Aprotinin auf diese zu untersuchen, wurde sowohl die cytosolische- (P1) als auch die membranöse Fraktion (P2) untersucht. In der cytosolischen Fraktion (P1) konnte keine Zunahme der totalen- oder phosphorylierten eNOS verzeichnet werden (dazu keine Abbildung). In der membranösen Fraktion (P2) blieb der Anteil der totalen eNOS konstant, aber es zeigte sich eine 2,4 – 3,2 fache Erhöhung der phosphorylierten eNOS nach der Sevofluran-induzierten Präkonditionierung (Sevo-I-III und -VI). In der APRO-Sevo-III-Gruppe hingegen kam es zu keiner Zunahme der phosphorylierten eNOS. Aprotinin alleine hat keinen Effekt auf die phosphorylierte eNOS (siehe Abbildung 13).

	membrane fraction (P2)	
	total eNOS	phospho eNOS
Con	0.41 ± 0.15	0.22 ± 0.13
Sevo-I	0.39 ± 0.10	0.55 ± 0.22*
Sevo-II	0.40 ± 0.10	0.70 ± 0.25*
Sevo-III	0.49 ± 0.14	0.53 ± 0.16*
Sevo-VI	0.45 ± 0.10	0.62 ± 0.17*
APRO-Sevo-III	0.51 ± 0.16	0.26 ± 0.16 [#]
APRO alone	0.31 ± 0.10	0.29 ± 0.18

Abbildung 10: Ergebnisse der totalen-/phosphorylierten eNOS in der membranösen Fraktion (P2) eNOS: endothelial nitric oxide synthetase, phospho eNOS: phosphorylierte eNOS Con: Kontrollgruppe, Sevo-I, -II, -III, -IV: Sevofluran-induzierte Präkonditionierung mit 1, 2, 3 oder 6 Zyklen, beziehungsweise APRO-Sevo-III: Aprotinin-Gabe plus Sevo-III Protokoll; APRO alleine: Kontrollgruppe plus Aprotinin-Gabe. *P<0.05 versus Kontrollgruppe, #P<0.05 vs. Sevo-III

5. DISKUSSION

Ziel der hier vorliegenden Studie war es zu untersuchen,

a) ob mehrere Zyklusgaben von Sevofluran eine ausgeprägtere Anästhetika-induzierte Präkonditionierung hervorrufen können, im Gegensatz zu der einmaligen Gabe von Sevofluran

b) ob und welchen Einfluss Aprotinin auf die durch Sevofluran-induzierte Präkonditionierung nimmt

c) ob die eNOS einen relevanten Stellenwert in der Sevofluran-induzierten Präkonditionierung einnimmt und ob die Blockierung dieser durch Aprotinin für die Inhibition der Präkonditionierung verantwortlich ist.

In unserer Studie zeigte sich, dass mehrere Zyklusgaben von Sevofluran zu einer Steigerung der Myokardprotektion in vivo führt und dadurch das Infarktareal verkleinert wurde. Des Weiteren konnten wir beobachten, dass unter dem Einsatz von Aprotinin der Effekt der Sevofluran-induzierte Präkonditionierung auf das Infarktareal aufgehoben wird. Den gleichen Effekt konnten wir unter dem Einsatz von L-NAME (totaler NOS-Blocker) beobachten. Bei der Gabe von AG und 7-NI (selektive Inhibitoren der iNOS und der nNOS) war der Effekt der Sevofluran-induzierten Präkonditionierung noch nachweisbar, aber nicht mehr in der Intensität wie ohne die Gabe von Inhibitoren.

Hinsichtlich der eNOS konnten wir nachweisen, dass jedes Präkonditionierungsprotokoll der Sevofluran-induzierten Präkonditionierung zu einer gleichen Steigerung des Anteiles der phosphorylierten eNOS führt, der absolute Wert der totalen eNOS blieb hingegen unverändert. Ebenfalls zeigte sich, dass die Gabe von Aprotinin eine Phosphorylierung der eNOS und damit auch die Sevofluran-induzierte Präkonditionierung verhindert.

5.1. Multiple Zyklen der Präkonditionierung

Murry et al.[36] konnte 1986 zeigen, dass mehrere Episoden kurzer subletaler Intervalle (ischämische Präkonditionierung) das Myokard vor den Folgen nachfolgender Ischämien schützt. In den darauffolgenden frühen Studien wurde das Zustandekommen von Präkonditionierung unter dem „Alles oder Nichts-Gesetz“ subsumiert, da die Präkonditionierung und der damit verbundene Zellschaden weder durch die zeitliche Verlängerung der Ischämie noch durch die Anzahl der ischämischen Stimuli zu beeinflussen zu sein schien[96, 97]. Sandhu et al.[98] hingegen konnten in ihrer Studie zeigen, dass drei Zyklen subletaler Ischämien wirkungsvoller vor einem myokardialen Zellschaden schützen als ein Zyklus subletaler Ischämie. Aber auch ein einziger Zyklus IPC führt schon zu einer myokardialen Protektion. Gezeigt werden konnte das in der gleichen Studie durch den Einsatz von Inhibitoren (Inhibitoren der PKC oder Substanzen, die in der Lage waren, die cAMP zu erhöhen). Die PKC wie auch die cAMP scheinen eine entscheidende Rolle in dem Signalweg der Präkonditionierung zu spielen. Durch die Gabe von Inhibitoren bei Tieren, die mit einem Zyklus ischämischer Präkonditionierung vorbehandelt worden sind, konnte die ischämische Präkonditionierung nicht komplett unterbunden werden, so dass hinsichtlich dieses Ergebnisses davon ausgegangen werden muss, dass ein Zyklus ischämischer Präkonditionierung ausreicht, um verschiedene Signalwege der Präkonditionierung zu aktivieren, dass aber mehrere Zyklen der ischämischen Präkonditionierung diese Aktivierung noch aggraviert. Dieses Phänomen konnte auch in einer Studie von Amour[54] gezeigt werden. Yang C. et al.[51] haben tierexperimentell zeigen können, dass die eNOS-Aktivierung durch Phosphorylierung von Serin¹¹⁷⁶ ebenfalls zu einer stabilen frühen IPC führt, die Phosphorylierung der eNOS scheint über PI3K/Akt und PKA vermittelte Signalwege statt zu finden. Eine pharmakologische Inhibierung dieser Signalwege verhindert die Phosphorylierung der eNOS.

Abschließend zeigt sich also, dass die ischämische Präkonditionierung anscheinend über einen ischämischen Stimulus aktiviert, aber durch mehrere Zyklen kurzer Ischämien intensiver vor nachfolgenden Zellschäden schützen kann. Ein Erklärungsansatz für dieses

Phänomen kann in der Aktivierung (durch mehrere Episoden kurzer Ischämien) zusätzlicher Signalwege liegen.

Inwieweit diese Erkenntnisse auch auf die pharmakologische beziehungsweise Anästhetika-induzierte Präkonditionierung zu übertragen sind, war ein Ziel der hier vorliegenden Studie.

In einer Arbeit von Riess et al.[99] wurden mittels verschiedener Präkonditionierungsprotokolle Herzen von Meerschweinchen (Ginuea Pigs) an der Langendorff-Apparatur untersucht. Es wurden Experimente hinsichtlich der Fragestellung durchgeführt, in wie weit die Dosis und die Anzahl der Präkonditionierungszyklen eines volatilen Anästhetikums (hier Sevofluran), Einfluss auf die Präkonditionierung nimmt. In diesem Versuch wurde Sevofluran in einer Konzentration von 0,4 mM (ca. 2,8 Volumen%) für einmal 15 Minuten oder zweimal 5 Minuten gegeben oder Sevofluran in einer Konzentration von 0,2 mM für einmal 15 Minuten oder zweimal 5 Minuten. Die ausgeprägteste Reduzierung der Infarktgröße zeigte sich in der Gruppe, in der Sevofluran in einer Dosis von 0,4 mM (ca. 2,4 Volumen%) für zweimal 5 Minuten gegeben wurde. Hier wurde das erstmalig in der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung gezeigt, dass multiple Zyklen der Präkonditionierung zu einer ausgeprägteren Kardioprotektion führen, als ein einmaliger Zyklus. Aber auch die Dosis eines Pharmakons hat einen wichtigen Stellenwert in der Präkonditionierung. Dieses konnte für Desfluran in einer Studie von Lange et al.[100] bestätigt werden. Hier wurden 0,5 MAC Desfluran kontinuierlich für eine halbe Stunde oder drei Zyklen 0,5 MAC Desfluran für jeweils 10 Minuten gegeben. Durch die kontinuierliche Gabe von Desfluran kam es zu keiner Präkonditionierung, hingegen unter der pulsatilen Gabe von Desfluran schon. Ebenso konnte in dieser Studie beobachtet werden, dass die Dosis von Desfluran bis zu einem gewissen Grenzwert bei repetitiver Gabe reduziert werden konnte. Bein et al.[101] zeigten dieses in einer klinischen Studie, die 42 Patienten umfasste und einer operativen Myokardrevaskularisierung (ACVB-OP) unterzogen wurden. Es erfolgte eine Einteilung der Patienten in drei Gruppen und sie bekamen als Basisanästhesie Propofol. Die erste Gruppe diente als Kontrollgruppe (ausschließlich Propofol), in der zweiten Gruppe wurde zudem kontinuierlich Sevofluran verabreicht und die dritte Gruppe erhielt neben Propofol zyklische Gaben von Sevofluran. Um das Ausmaß des myokardialen Zellschadens, welcher bei der Operation entsteht, unter den genannten jeweiligen Protokollen vergleichen zu können, wurden in definierten Abständen myokardiale Zellmarker (Troponin T und CK-

MB) bestimmt, zu dem wurden transösophageale Echo-Untersuchungen durchgeführt. Es zeigte sich, dass in der Patientengruppe, die mit der zyklischen Gabe von Sevofluran behandelt worden ist, das Ausmaß des myokardialen Zellschadens am geringsten war. In einer weiteren klinischen Studie, hier von Frassdorf et al.[33], wurden ebenfalls Patienten, die Bypass-operiert (ACVB-OP) wurden, einem Präkonditionierungsprotokoll unterzogen. Auch hier zeigte sich, dass unter einem Präkonditionierungsprotokoll mit zwei Zyklen Sevofluran der myokardiale Zellschaden signifikant verringert werden konnte.

Aus den experimentellen Studien von Riess und Lange[99, 100] und den klinischen Studien von Bein[101] und Frassdorf[33] lässt sich ableiten, dass die repetitive Gabe von Anästhetika den Effekt der Präkonditionierung aggraviert. Dieses Ergebnis korreliert mit den Ergebnissen der ischämischen Präkonditionierung.

In unserer Studie konnten wir zeigen, dass es mit zunehmender Anzahl der Sevofluran-induzierten Präkonditionierungen zu einer signifikanten Abnahme der Infarktgröße kam. Das Maximum der Reduzierung der Infarktgröße, konnte nach der Gabe von drei Zyklen Sevofluran beobachtet werden.

Zusammenfassend ergibt sich aus der hier vorliegenden sowie aus den oben genannten experimentellen wie auch klinischen Studien die Aussage, dass mittels eines Präkonditionierungsprotokolls, welches aus mehreren Zyklusgaben eines volatilen Anästhetikums besteht, der myokardiale Zellschaden signifikant reduziert werden kann. Die optimale Anzahl der Zyklen, die Zyklusdauer und die Dosis des jeweilig eingesetzten volatilen Anästhetikums könnte in Zukunft noch Gegenstand weiterer Studien sein.

5.2. Einfluss von Aprotinin auf die Sevofluran-induzierte Präkonditionierung

Der klinische Einsatz von Aprotinin ist umstritten, zum einen kann es schwere Blutungskomplikationen verhindern, zum anderen gibt es in tierexperimentellen Studien wie von Bukhari et al.[34] Hinweise darauf, dass es unter Aprotinin zu einer Zunahme des Infarktareals und damit zu einer erhöhten Rate von kardialen Komplikationen kommen kann. Studien von Hendrix et al.[35] wie auch von Pruefer et al.[102] zeigten ebenfalls tierexperimentell, dass es unter Aprotinin zu einer Kardioprotektion kam.

Mittels der hier vorliegenden Studie konnte nicht gezeigt werden, dass der alleinige Einsatz von Aprotinin das Infarktareal vergrößert oder verkleinert (siehe Abbildung 10). Die Infarktgröße blieb im Vergleich zu der Kontrollgruppe konstant. Diese Studie zeigt eindeutig, dass Aprotinin den nachgewiesenen pharmakologischen Präkonditionierungseffekt durch Sevofluran komplett aufhebt. Die Aufhebung der Präkonditionierung ist völlig unabhängig von dem benutzten Präkonditionierungsprotokoll.

Inamura et al.[103] untersuchten mittels ihrer Studie die Sevofluran-induzierte Postkonditionierung unter dem Einfluss von Aprotinin. Auch hier zeigte sich die komplette Inhibierung der Postkonditionierung. Sowohl in unserer wie auch in der Studie von Inamura wurde Aprotinin kontinuierlich während der Intervention gegeben. Zu diskutieren wäre, ob es auch zu der kompletten Blockierung der Konditionierungswege kommt, wenn Aprotinin nach einem anderen Protokoll gegeben wird.

Ob diese genannte Aufhebung der Präkonditionierung durch Aprotinin auch für die ischämische Präkonditionierung gilt, können wir mit unserer Studie nicht beantworten. Andere Studien[98, 104], die sich mit der Fragestellung der Inhibition der ischämischen Präkonditionierung befaßt haben, konnten nachweisen, dass die Blockierung eines Signalweges oft nicht ausreichend ist, um die gesamte ischämische Präkonditionierung zu verhindern.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Aprotinin die Sevofluran-induzierte Präkonditionierung komplett blockiert. Daraus ergibt sich die Frage des Signalweges der Sevofluran-induzierten Präkonditionierung. Wenn Aprotinin in der Lage ist, die gesamte Präkonditionierung zu verhindern, muss man vermuten, dass durch die Sevofluran-induzierte Präkonditionierung entweder nur ein Signalweg aktiviert wird, der durch die Gabe von Aprotinin blockiert werden kann oder dass die Wirkung von Aprotinin an einem sehr frühen Punkt der Präkonditionierung einsetzt, so dass auch mehrerer Signalwege (sofern vorhanden) an einem gemeinsamen Anfangspunkt unterbrochen werden. Für den klinische Anwendung muss erörtert werden, ob der Einsatz von Aprotinin hinsichtlich schwerer Blutungsrisiken und all seiner Komplikationen gerechtfertigt ist versus den anscheinenden Verlust der Kardioprotektion zumindest durch Anästhetika-induzierten Präkonditionierung. Weiterhin könnte man den Einsatz anderer Antifibrinolytika erwägen und deren Wirkung hinsichtlich der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung untersuchen, um so den mehrfach nachgewiesenen Vorteil durch den Einsatz volatiler Anästhetika und die damit verbundene Prä- und Postkonditionierung weiter nutzen zu können und gleichzeitig schwere Blutungskomplikationen mit den in der Einleitung genannten Komplikationen zu verhindern

5.3. eNOS, Aprotinin und die Sevofluran-induzierte Präkonditionierung

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war, ob die eNOS einen relevanten Stellenwert in der Sevofluran-induzierten Präkonditionierung einnimmt und ob die Blockierung dieser durch Aprotinin für die Inhibition der Präkonditionierung verantwortlich ist.

Amour[54] konnte in einer Studie von 2009 zeigen, dass es durch die Verabreichung volatiler Anästhetika (hier Isofluran) zu einer Steigerung der NO-Produktion in menschlichen Endothelzellen sowie zu einer vermehrten Interaktion zwischen der eNOS und HSP90 kommt. Dass die frühe Anästhetika-induzierte Präkonditionierung unter anderem über die NOS vermittelt oder induziert wird, konnte indirekt in einer Arbeit von Smul et al.[64] nachgewiesen werden. Hier wurde als volatiles Anästhetikum Desfluran zur Präkonditionierung eingesetzt und auch unter diesem Protokoll konnte eine Reduzierung der Infarktgröße nachgewiesen werden. Dieses Präkonditionierungsprotokoll wurde wiederholt, zusätzlich wurde aber ein totaler Inhibitor (L-NAME) der NOS eingesetzt. Im Ergebnis zeigte sich, dass die durch Desfluran-induzierte Präkonditionierung komplett blockiert wurde. Der gleiche Effekt konnte in der Sevofluran-induzierten Postkonditionierung durch Inamura[103] nachgewiesen werden, so dass die NOS beziehungsweise die eNOS[54] eine entscheidende Rolle in der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung zu spielen scheint. Ob neben der eNOS auch die anderen Isoformen der NOS, wie die iNOS und/oder die nNOS bei der Präkonditionierung eine wichtige Rolle spielen, ist unklar, da es sich bei N-Nitro-L-Arginin (L-NAME) um einen unspezifischen Inhibitor der NOS handelt.

In dieser Arbeit konnten wir die schon oben erwähnte Blockierung der Sevofluran-induzierten Präkonditionierung durch L-NAME ebenfalls zeigen. Mit dem Einsatz von spezifischen Inhibitoren der iNOS (AG) und der nNOS (7-NI) konnten wir nachweisen, dass die Präkonditionierung zum Teil blockiert wird. Die Infarktgröße war unter der Gabe der Inhibitoren mit der Infarktgröße der Sevo-II-Gruppe zu vergleichen. In Ermangelung eines spezifischen Inhibitors konnte die direkte Beteiligung der eNOS nicht nachgewiesen werden,

aber indirekt durch die komplette Blockierung der Präkonditionierung die relevante Beteiligung der eNOS an der Präkonditionierung gezeigt werden. Auch konnte durch den Versuchsaufbau gezeigt werden, dass die Isoformen iNOS und nNOS an der Präkonditionierung beteiligt sind. Die Infarktgröße nimmt unter der Blockierung dieser beiden NOS-Formen zu. Allerdings erreicht sie nicht das Ausmaß wie bei der kompletten Blockierung durch L-NAME, so dass auch hier die zusätzliche Rolle der eNOS indirekt vermutet werden kann.

Weiterhin untersuchten wir mittels Western Blot, ob es unter der Sevofluran-induzierten Präkonditionierung zu einer Änderung der totalen beziehungsweise phosphorylierten eNOS kommt.

Ulker et al.[65] hatten gezeigt, dass es unter der Gabe von höheren Dosen von Aprotinin (> 250 kIU/ml) zu einer Herunterregulierung der eNOS-messengerRNA (in mikrovaskulären endothelialen Zellkulturen von Ratten) und damit zu einer verminderten Bildung der eNOS kommt. Dieses Phänomen konnte in dieser Studie nicht gezeigt werden. Der Betrag der totalen eNOS blieb auch unter der Gabe von Aprotinin unverändert. Aprotinin wurde nach dem oben genannten Präkonditionierungsprotokoll zuerst als Bolus und dann kontinuierlich während der Präkonditionierung gegeben, so dass zu diskutieren ist, ob die Gabe von Aprotinin vielleicht zu kurz war, um die Genexpression und de-novo Synthese der totalen eNOS auszulösen, beziehungsweise zu verhindern; vielleicht war aber auch der Zeitpunkt der Bestimmung der totalen eNOS zu früh. Ulker et al. hatten die Zellkulturen über Nacht mit Aprotinin behandelt, so dass hier eventuell das Zeitfenster für eine de-novo Synthese von Proteinen vorlag.

Im Gegensatz zu der „zeitintensiven“- de-novo Synthese der totalen eNOS ist Phosphorylierung (hier auf die eNOS bezogen) eine schnelle und flüchtige Reaktion, so dass wir den Anteil der phosphorylierten eNOS nach jedem Präkonditionierungsprotokoll (Sevo I-III und IV) und damit zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht haben. Es zeigte sich eine Zunahme des Anteiles der phosphorylierten eNOS um den gleichen Betrag (auf die Kontrollgruppe bezogen), egal mit wie vielen Zyklen Sevofluran präkonditioniert wurde. Dieses Ergebnis läßt die Schlußfolgerung zu, dass ein Zyklus der Sevofluran-induzierten Präkonditionierung ausreichend ist, um die maximale Phosphorylierung der eNOS im

Myokard zu erreichen. Unter der zusätzlichen Gabe von Aprotinin (APRO-Sevo-III) kam es zu keiner Zunahme der phosphorylierten eNOS gegenüber dem Ausgangswert in der Kontrollgruppe. Auch kam es zu keiner Reduzierung der Infarktgröße (im Vergleich zur Kontrollgruppe). Diese Ergebnisse zeigen, dass die phosphorylierte eNOS eine relevante Rolle in der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung spielt und dass eine Blockierung dieser durch Aprotinin oder L-NAME eine Präkonditionierung durch zum Beispiel Sevofluran verhindert.

Aufgrund dieses Ergebnisses stellt sich erneut die Frage nach dem Signalweg der Anästhetika-induzierten Prä- aber auch Postkonditionierung. Die Blockierung der Präkonditionierung durch Aprotinin oder auch L-NAME, weist in erster Linie auf einen eNOS vermittelten Signalweg der Präkonditionierung hin. Durch bereits einen Zyklus Sevofluran konnte das Maximum der phosphorylierten eNOS im Myokard bereits erreicht werden. Auf der anderen Seite konnte aber durch eine Steigerung der Sevofluran-Zyklen im Rahmen des Präkonditionierungsprotokolles eine weitere deutliche Reduzierung der Infarktgröße und damit eine Steigerung der Präkonditionierung nachgewiesen werden, so dass zu diskutieren ist, ob hier der gleiche Mechanismus wie bei der ischämischen Präkonditionierung zum Tragen kommt und durch Steigerung der Präkonditionierungszyklen weitere Signalwege aktiviert werden und es so zu einer ausgeprägteren beziehungsweise stabileren Präkonditionierung kommt. Allerdings steht dieser Theorie entgegen, dass in unserer Studie nach drei Zyklen Sevofluran das Maximum der Präkonditionierung, gemessen an der Infarktgröße, zu verzeichnen gewesen ist. L-NAME wie aber auch Aprotinin waren in der Lage diese vermeintlich stabile Präkonditionierung komplett zu blockieren, so dass man sich fragen muss, ob durch zusätzliche Zyklen Sevofluran zwar vermehrt zusätzliche Signalwege rekrutiert werden, diese Signalwege aber alle zu einem bestimmten Zeitpunkt die eNOS als wichtigen Bestandteil dieser Kaskade beinhalten und so durch Blockierung dieser die Präkonditionierung auch nach mehreren Zyklen Sevofluran verhindert werden kann.

In der Einleitung wurde schon erwähnt, dass verschiedene Signalwege für die Anästhetika-induzierte Präkonditionierung diskutiert werden. Eine wichtige Rolle scheint die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und ihrer Isoformen zu sein, die wiederum selber die Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase (vor allem die p38-MAP-Kinase) und Hitze-Schock-Proteine (Hsp)

aktivieren und dadurch eine Präkonditionierung zu vermitteln[59-61]. Amour[54] und Garcia-Cadena[63] konnten zeigen, dass es durch eine gesteigerte Interaktion zwischen Hitze-Schock-Proteinen (Hsp) und der eNOS ebenfalls zu einer Präkonditionierung kommt.

Eine mögliche Gemeinsamkeit beider Aktivierungswege könnte in dem Vorhandensein von Reaktiven Sauerstoff-Spezies (= Reactive Oxygen Species, ROS) liegen. Über einen Trigger wie zum Beispiel eine kurze subletale Ischämie oder durch die Gabe eines volatilen Anästhetikums kommt es zu einer gesteigerten NO-Produktion durch Aktivierung der eNOS[105-107]. Durch oxidativen Stress oder die „Entkoppelung der eNOS“ kann von der eNOS statt NO freie Radikale (ROS) gebildet werden. Aber auch in der Reperfusion kann NO mit in der Ischämiephase entstandenen Superoxid-Anionen reagieren, es entstehen ebenfalls freie Radikale (ROS). Die hier gebildeten freien Radikale nehmen entweder direkt, Kalium-Kanal vermittelt oder über Thyrosinkinase Einfluss auf die Proteinkinase C und damit auf die Präkonditionierung[108]. Sollte es zum Beispiel durch Aprotinin zu einer Blockierung oder sogar Verminderung der eNOS kommen und damit zu einer reduzierten Bildung von NO kommen, kann hier ein möglicher Erklärungsansatz liegen, warum verschiedene Signalwege der Präkonditionierung nicht zum Tragen kommen. Allerdings muss man mit in Erwägung ziehen, dass eine dauerhaft „entkoppelte eNOS“ und die damit verbundene Radikalbildung zu einer Zunahme des oxidativen Stresses (wie die verminderte Vasodilatation) in Blutgefäßen führt. Des Weiteren wird bei länger anhaltender Hypoxie[109] die Transkription der eNOS gehemmt, was eventuell relevant für die späte Prä- oder auch Postkonditionierung sein könnte.

Ein wichtiger Regulationsmechanismus für die eNOS-Aktivität ist die Aktivierung (ihrer Epitope) durch Phosphorylierung. Die zunehmende Phosphorylierung von Serin¹¹⁷⁷ (beim Menschen, bei der Maus Serin¹¹⁷⁶) und die damit einhergehende Aktivierung der eNOS kann durch verschieden Trigger ausgelöst werden. Die Phosphorylierung erfolgt über die Proteinkinase A und Akt[110, 111], über die PKC sowie über die cAMP[112]. Zwei wichtige Signalwege der Präkonditionierung sind die Proteinkinase C- und der eNOS-vermittelte Signalweg. Beide Signalwege werden über die Phosphorylierung gesteuert. Denkbar wäre, dass Aprotinin in der Lage ist, diese Phosphorylierung zu blockieren und so eventuell mehrere Signalwege der Präkonditionierung zu verhindern. Es wäre ein Erklärungsansatz

dafür, dass auf der einen Seite ein Zyklus Sevofluran-induzierte Präkonditionierung ausreicht, um die maximale Phosphorylierung der eNOS zu bewirken, aber gleichzeitig zusätzliche Zyklen von Präkonditionierung eine stärkere oder stabilere Präkonditionierung verursachen und doch auch durch die Zugabe von Aprotinin komplett blockiert werden kann. Ein wichtiger Schwerpunkt der momentanen Forschung ist die Postkonditionierung. Sowohl die frühe als auch späte Präkonditionierung und ebenso die Postkonditionierung scheinen sich gemeinsame Signalwege zu teilen. Ein Signalweg, der hier bisher nicht diskutiert wurde, ist eine eventuelle vermittelte Konditionierung über die Mitochondrien. Ge et al.[113] konnten in einer tierexperimentellen Arbeit zeigen, dass eine Isofluran-induzierte Postkonditionierung durch eine eNOS-abhängige Blockierung von eigentlich transient geöffneten mitochondrialer Poren stattfindet. Eine weitere Theorie, um die NOS vermittelte Präkonditionierung zu verstehen, wurde 2009 von Dedkova et al. aufgestellt. Diese konnte in einer Arbeit zeigen, dass es eine mitochondriale NO-Produktion (über eine mitochondriale NOS) gibt, worüber dann unter anderem Konditionierungswege gesteuert werden könnten. Letztlich muss man sagen, dass es zum abschließenden Verständnis der NOS-vermittelte Präkonditionierung noch weiterer Forschung bedarf.

5.4. Zusatzinformation zum Aprotinin

Aprotinin wurde aufgrund einer erhöhten Mortalität[81-83] von der Firma Bayer im November 2007 zunächst vorläufig und dann endgültig im Mai 2008 weltweit vom Markt genommen, da es im Verdacht steht, die Mortalität nach Bypass-Operationen zu erhöhen. Grundlage für die Entscheidung, Aprotinin vom Markt zu nehmen, war letztlich die sogenannte BART-Studie (Blood Conservation Using Antifibrinolytics in a Randomized Trial) von Fergusson et al., die die Ergebnisse der Studien von Mangano et al. und Karkouti et al. aus dem Jahre 2006 untermauerten. In der BART-Studie, die 2331 Patienten umfasste die sich einer herzchirurgischen Operation unterzogen haben, wurden 3 Gruppen gebildet. Um das erhöhte Blutungsrisiko bei dieser Operation zu minimieren, bekamen 781 Patienten Aprotinin, 770 Patienten Tranexamsäure und 780 Patienten ϵ -Aminocaprinsäure. Mittels der Studie konnte gezeigt werden, dass es zwar unter Aprotinin zu einer deutlichen Reduzierung von schweren Blutungen kam, aber auch zu einer Zunahme der Todesrate nach 30 Tagen, so dass die Studie vorzeitig abgebrochen wurde und Aprotinin zunächst für den klinischen Gebrauch nicht weiter zur Verfügung stand. 2012 verkaufte Bayer den größten Teil seiner Rechte von Aprotinin an die Nordic Group, die sich um eine Re-Evaluierung von Aprotinin und eine Aufhebung der Ruhendstellung bemühte. Im Jahr zuvor (09/2011) hatte Kanada diese schon wieder aufgehoben und Aprotinin wieder für den klinischen Gebrauch frei gegeben. Die Re-Evaluierung von Aprotinin wurde in Europa durch das CHMP der EMA durchgeführt. Diese kamen nach Sichtung der verfügbaren Daten aus klinischen Studien und Publikationen zu dem Schluss, dass die Ergebnisse der BART-Studie nicht reproduzierbar waren und erhebliche methodische Mängel, wie unklare Ausschlüsse von >100 Patienten nach Randomisierung, Unklarheiten hinsichtlich der Anwendung von Heparin (Dosis, Monitoring) usw. aufweist. Letzlich war der Konsens der Überprüfung von Aprotinin, dass dessen Nutzen hinsichtlich eines signifikanten Blutverlustes während einer herzchirurgischen Operation die vermeintlichen Risiken dieses Medikamentes überwiegt. Im September 2013 wurde dann durch die europäische Kommission die Ruhendstellung aufgehoben und Aprotinin wieder für den klinischen Gebrauch in Europa zugelassen mit der Auflage, dass weitere Studien hinsichtlich der Risiken und Wirksamkeit vorgenommen werden müssen. In den USA

wird seit der BART-Studie Tranexamsäure verwendet (Cyclocapron, Produkt der amerikanischen Firma Pfizer). Auch nach der weltweiten Rücknahme von Aprotinin 2008 gab es nachfolgend weitere Studien und Metaanalysen, die sich mit den Risiken, aber auch mit den Vorteilen dieses Medikamentes befasst haben. 2013 erschien eine Metaanalyse von Meybohm et al.[114]. In dieser wurden Daten von 30.000 Patienten aus randomisierten und Anwendungsstudien analysiert, die entweder mit Aprotinin, Tranexamsäure oder ϵ -Aminocapronsäure während eines herzchirurgischen Eingriffes behandelt wurden. Es zeigte sich unter Aprotinin eine erhöhte Mortalität bei den Patienten, die ein niedriges oder moderates Risiko bezüglich Komplikationen während einer herzchirurgischen Operation haben. In der Patientengruppe, die ein hohes Risiko für Komplikationen haben, scheint Aprotinin keinen Effekt auf die frühe Mortalität zu haben, im Gegensatz zu den anderen Antifibrinolytika. Der Einsatz von Aprotinin kann in dieser Patientengruppe hinsichtlich der Vermeidung von schweren Blutungen und den damit verbundenem Gebrauch von Blutprodukten vorteilhaft sein. In der "Hoch-Risiko-Patientengruppe" scheint der Gebrauch von Aprotinin gerechtfertigt oder sogar von Vorteil zu sein, während der Einsatz dieses Medikamentes in der Patientengruppe, die ein geringes oder moderates Risiko hinsichtlich Komplikationen haben, kritisch hinterfragt werden muss. Ebenfalls scheint auch die Dosierung von Aprotinin in Abhängigkeit der Folgekomplikationen eine zentrale Rolle zu spielen. Sabzi et al. haben in einer klinischen Doppelblindstudie die Auswirkungen von "niedrig-dosiertem" Aprotinin bei Patienten untersucht, die sich einer herzchirurgischen Operation unterzogen haben. Eingeschlossen wurden 653 Patienten, 380 erhielten ein Placebo, 273 Patienten haben niedrig-dosiertes Aprotinin (2 Millionen Kallikrein-Inhibitor-Einheiten) bekommen. Im Ergebnis zeigte sich auch hier wieder eine Verminderung des Einsatzes von Blutprodukten, aber ein Anstieg der Morbidität (die Patienten wurden hier nicht in unterschiedliche Risikogruppen eingeteilt). Eine Studie von Ghaffari et al.[115], die ebenfalls den Einsatz von "niedrig-dosiertem" Aprotinin untersucht hat, kommt hinsichtlich der Morbidität zu einem gegenteiligen Ergebnis. In dieser ebenfalls klinischen Doppelblindstudie konnte durch den Einsatz von Aprotinin der Blutverlust und Transfusionsbedarf signifikant reduziert werden und es kam zu keiner Erhöhung der Morbidität und Mortalität. Diese Studie umfasste allerdings ein deutlich kleineres Patientenkollektiv; hier bekamen jeweils 50 Patienten ein Placebo oder Aprotinin. Auch war

die Dosierung von Aprotinin nochmal deutlich geringer als in der Studie von Sabzi. Die Patienten bekamen 1 Millionen Kallikrein-Inhibitor-Einheiten (KIU) Aprotinin.

In Studien[116, 117], in deren die Wirkung von Tranexamsäure und Aprotinin verglichen wurden, zeigte sich unter Aprotinin bei einem "Hoch-Risiko-Kollektiv" deutlich weniger schwerwiegende Blutungen und damit einhergehend eine geringe Mortalität als unter Tranexamsäure. In einer Multicenterstudie, die 2017 publiziert wurde[117], zeigte sich ebenfalls, dass es unter der Anwendung von Aprotinin zu weniger Blutverlusten als unter Tranexamsäure kam. In dieser wurden 2496 Patienten berücksichtigt, die sich einer (isolierten) Bypass-Operation unter Verwendung der Herz-Lungen-Maschine unterzogen haben. 1267 Patienten sind mit Aprotinin, 1229 Patienten mit Tranexamsäure behandelt worden. In einer Metaanalyse[118], die ebenfalls 2017 erschienen ist, wurden 16 Studien berücksichtigt, in die 45.235 Patienten eingeschlossen wurden, die während einer herzchirurgischen Operation Tranexamsäure zugeführt bekamen. Hier zeigte sich ein 4,1% erhöhtes Risiko für Krampfanfälle. Diese Nebenwirkung ist unter Aprotinin bisher nicht beschrieben worden.

5.5. Limitierung und verbliebene Fragestellungen der Studie

Dass die NOS hauptverantwortlich für die Sevofluran-induzierte Präkonditionierung ist, konnten wir durch den totalen Blocker L-NAME zeigen. Allerdings konnten wir in Ermangelung eines spezifischen Inhibitors der eNOS mit unserer Studie nicht endgültig darlegen, dass die eNOS die Sevofluran-induzierte Präkonditionierung vermittelt. Durch den Einsatz der spezifischen Inhibitoren der iNOS und nNOS konnte allerdings gezeigt werden, dass Präkonditionierung, wenn auch nicht so ausgeprägt, trotz der Blockade dieser beider Isoformen stattfindet. Aber auch AG und 7-NI sind keine 100%igen Inhibitoren der iNOS und nNOS[119, 120]. Es ist wahrscheinlich, dass durch die Gabe dieser beiden Inhibitoren die eNOS partiell mit blockiert wurde und es so zu einer abgeschwächteren Form der Präkonditionierung kam.

Weiterhin konnten wir nach drei Zyklen Sevofluran in unserem Studiendesign das Maximum der Präkonditionierung zeigen. Es wurden 1, 2, 3 oder 6 Zyklen Sevofluran gegeben. Wir können aber mit unserer Studie nicht beantworten, wie die Präkonditionierung nach 4 oder 5 Zyklen Sevofluran ausgefallen wäre. Ebenfalls haben wir mit konstanten Gaben einer Dosis gearbeitet, so dass auch hier noch Spielraum für weitere Versuche wäre, um zu untersuchen, in wie weit die Präkonditionierung dosisabhängig ist. Das Gleiche gilt für die Dauer der jeweiligen Zyklen der Präkonditionierung.

In der Bestimmung der hämodynamischen Parameter konnte während der Sevoflurangabe ein Abfall der Herzfrequenz (HR) und des Blutdruckes (AoPmean) beobachtet werden. Allerdings konnte dieser Effekt schon vor Beginn der Ischämie nicht mehr nachgewiesen werden. Lediglich in der Sevo-III-Gruppe zeigte sich ein signifikanter Herzfrequenzabfall während der Ischämiephase. Dass dieser Abfall der Herzfrequenz für die Präkonditionierung verantwortlich sein soll, ist eher unwahrscheinlich, da eine reduzierte Herzfrequenz sich ebenfalls in der L-NAME-Sevo-III-Gruppe beobachten ließ, die aber letztendlich die gleiche Infarktgröße wie die Kontrollgruppe aufzeigte.

Unter dem Einsatz von Aprotinin scheint es nachweislich zu einer signifikanten Reduzierung des Blutverlustes und den damit häufig verbundenen Einsatz von Transfusionsprodukten zu kommen. Dieses beschreiben auch Studien aus anderen chirurgischen Fachrichtungen[121, 122]. Allerdings konnte bisher nicht abschließend geklärt werden, welches Patientenkollektiv von dem Einsatz von Aprotinin profitiert, da dieses zur Zeit "nur" für die isolierte Bypass-Chirurgie zugelassen ist[123]. Ebenfalls muss geklärt werden mit welchem Dosierungsregime die Patienten während eines herzchirurgischen Einsatzes behandelt werden sollten und in wie weit man den positiven Effekt der Anästhesie-induzierten Präkonditionierung aufgeben will zu Gunsten des Einsatzes von Aprotinin. Um diese Fragen zu klären[124], hat die Nordic Group, die Aprotinin vertreibt, ein Patientenregister etabliert (NAPaR, Nordic Aprotinin Patient Registry), mit Hilfe dessen und den dadurch erhobenen und registrierten Patientendaten diese offene Fragen geklärt werden sollen. Es zeichnet sich im Moment ab, dass für die "Hoch-Risiko-Patientengruppe" die Verwendung von Aprotinin vorteilhaft ist.

5.6. Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Studie

Zusammenfassend konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass es unter einem Präkonditionierungsprotokoll mit Sevofluran zu einer Reduzierung der Infarktgröße kam. Nach 3 bzw. 6 Zyklen Sevofluran stellte sich dieser Effekt am ausgeprägtesten dar. Diese, durch Sevofluran-induzierte Präkonditionierung, wurde durch die zusätzliche Gabe von Aprotinin komplett blockiert.

Hinsichtlich der eNOS konnte nachgewiesen werden, dass mit der Gabe des unspezifischen eNOS Blocker L-NAME die Sevofluran-induzierte Präkonditionierung komplett inhibiert wurde. Die spezifischen Blocker AG und 7NI blockierten die Sevofluran-induzierte Präkonditionierung nur zum Teil. Durch den Einsatz von Aprotinin wurde die Phosphorylierung der eNOS, die durch die Sevofluran-induzierte Präkonditionierung getriggert wird, komplett aufgehoben.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Neumann, T., et al., *Heart failure: the commonest reason for hospital admission in Germany: medical and economic perspectives*. Dtsch Arztebl Int, 2009. **106**(16): p. 269-75.
2. Organisation, W.H., *Top 10 causes of death*. 2017.
3. Bundesamt, S., *Die 10 häufigsten Todesursachen*. 2015.
4. Bundesamt, S., *Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachen die höchsten Kosten*. 2017(Pressemitteilung Nr. 347).
5. McMurray, J.J., et al., *Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure*. N Engl J Med, 2014. **371**(11): p. 993-1004.
6. Zinman, B., et al., *Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes*. N Engl J Med, 2015. **373**(22): p. 2117-28.
7. Kopin, L. and C. Lowenstein, *Dyslipidemia*. Ann Intern Med, 2017. **167**(11): p. ITC81-ITC96.
8. Gopal, D.M., et al., *Cigarette smoking exposure and heart failure risk in older adults: the Health, Aging, and Body Composition Study*. Am Heart J, 2012. **164**(2): p. 236-42.
9. Colditz, G.A., et al., *A prospective study of parental history of myocardial infarction and coronary artery disease in men*. Am J Cardiol, 1991. **67**(11): p. 933-8.
10. Currie, C.J., et al., *Survival as a function of HbA(1c) in people with type 2 diabetes: a retrospective cohort study*. Lancet, 2010. **375**(9713): p. 481-9.
11. Weinberg, I., et al., *The systolic blood pressure difference between arms and cardiovascular disease in the Framingham Heart Study*. Am J Med, 2014. **127**(3): p. 209-15.
12. Jung, W., et al., *Leitlinien zur Implantation von Defibrillatoren*. 2006.
13. *Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF)*. Lancet, 1999. **353**(9169): p. 2001-7.

14. Investigators, S., et al., *Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure*. N Engl J Med, 1991. **325**(5): p. 293-302.
15. Bohula, E.A., et al., *Inflammatory and Cholesterol Risk in the FOURIER Trial (Further Cardiovascular Outcomes Research With PCSK9 Inhibition in Patients With Elevated Risk)*. Circulation, 2018.
16. Erbel, R., et al., *Richtlinien der interventionellen Koronartherapie*. 1997.
17. Serruys, P.W., et al., *Percutaneous coronary intervention versus coronary-artery bypass grafting for severe coronary artery disease*. N Engl J Med, 2009. **360**(10): p. 961-72.
18. Rodriguez, A., et al., *Coronary stenting versus coronary bypass surgery in patients with multiple vessel disease and significant proximal LAD stenosis: results from the ERACI II study*. Heart, 2003. **89**(2): p. 184-8.
19. Anastasiadis, K. and G. Moschos, *Diabetes mellitus and coronary revascularization procedures*. Int J Cardiol, 2007. **119**(1): p. 10-4.
20. G., M., et al., *2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease—addenda*. European Heart Journal, 2013: p. 32.
21. V., S., B. N., and M. Ul, *Chirurgie*. 2010: p. 546-548.
22. Gefäßchirurgie, D.G.f.T.-H.-. *Gesamtzahl der herzchirurgischen Eingriffe auf stabilem Niveau*. 2016.
23. Soylu, E., et al., *A systematic review of the safety and efficacy of distal coronary artery anastomotic devices in MIDCAB and TECAB surgery*. Perfusion, 2016. **31**(7): p. 537-43.
24. Eeles, A. and R.R. Baikady, *Peri-operative blood management*. Indian J Anaesth, 2017. **61**(6): p. 456-462.
25. Levy, J.H., *Efficacy and safety of aprotinin in cardiac surgery*. Orthopedics, 2004. **27**(6 Suppl): p. s659-62.
26. Rogers, M.A., et al., *Hospital variation in transfusion and infection after cardiac surgery: a cohort study*. BMC Med, 2009. **7**: p. 37.
27. Marik, P.E. and H.L. Corwin, *Efficacy of red blood cell transfusion in the critically ill: a systematic review of the literature*. Crit Care Med, 2008. **36**(9): p. 2667-74.

28. Pasquet, A., et al., *Prediction of global left ventricular function after bypass surgery in patients with severe left ventricular dysfunction. Impact of pre-operative myocardial function, perfusion, and metabolism.* Eur Heart J, 2000. **21**(2): p. 125-36.
29. Cave, A.C., G.L. Horowitz, and C.S. Apstein, *Can ischemic preconditioning protect against hypoxia-induced damage? Studies of contractile function in isolated perfused rat hearts.* J Mol Cell Cardiol, 1994. **26**(11): p. 1471-86.
30. Yellon, D.M., et al., *Ischaemic preconditioning limits infarct size in the rat heart.* Cardiovasc Res, 1992. **26**(10): p. 983-7.
31. Lorsomradee, S., et al., *Cardioprotection with volatile anesthetics in cardiac surgery.* Asian Cardiovasc Thorac Ann, 2008. **16**(3): p. 256-64.
32. De Hert, S.G., 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**(2): p. 299-310.
33. Frassdorf, J., et al., *Impact of preconditioning protocol on anesthetic-induced cardioprotection in patients having coronary artery bypass surgery.* J Thorac Cardiovasc Surg, 2009. **137**(6): p. 1436-42, 1442 e1-2.
34. Bukhari, E.A., et al., *Does aprotinin increase the myocardial damage in the setting of ischemia and preconditioning?* Ann Thorac Surg, 1995. **60**(2): p. 307-10.
35. Hendriks, M., et al., *Na(+)/H(+)-exchange inhibition and aprotinin administration: promising tools for myocardial protection during minimally invasive CABG.* Eur J Cardiothorac Surg, 2001. **19**(5): p. 633-9.
36. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium.* Circulation, 1986. **74**(5): p. 1124-36.
37. McEvoy, M.D., et al., *Aprotinin modifies left ventricular contractility and cytokine release after ischemia-reperfusion in a dose-dependent manner in a murine model.* Anesth Analg, 2009. **108**(2): p. 399-406.
38. Kuzuya, T., et al., *Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia.* Circ Res, 1993. **72**(6): p. 1293-9.

39. Marber, M.S., et al., *Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction*. *Circulation*, 1993. **88**(3): p. 1264-72.
40. Baxter, G.F., F.M. Goma, and D.M. Yellon, *Characterisation of the infarct-limiting effect of delayed preconditioning: timecourse and dose-dependency studies in rabbit myocardium*. *Basic Res Cardiol*, 1997. **92**(3): p. 159-67.
41. Banerjee, S., et al., *Nitroglycerin induces late preconditioning against myocardial stunning via a PKC-dependent pathway*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(6 Pt 2): p. H2488-94.
42. Heidland, U.E., et al., *Preconditioning during percutaneous transluminal coronary angioplasty by endogenous and exogenous adenosine*. *Am Heart J*, 2000. **140**(5): p. 813-20.
43. Hartman, J.C., et al., *Reduction of myocardial infarct size in rabbits by ramiprilat: reversal by the bradykinin antagonist HOE 140*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1993. **21**(6): p. 996-1003.
44. Kersten, J.R., et al., *Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase*. *Anesthesiology*, 1997. **87**(2): p. 361-70.
45. Kersten, J.R., et al., *Mechanism of myocardial protection by isoflurane. Role of adenosine triphosphate-regulated potassium (KATP) channels*. *Anesthesiology*, 1996. **85**(4): p. 794-807; discussion 27A.
46. Toller, W.G., et al., *Sevoflurane reduces myocardial infarct size and decreases the time threshold for ischemic preconditioning in dogs*. *Anesthesiology*, 1999. **91**(5): p. 1437-46.
47. McPherson, B.C. and Z. Yao, *Morphine mimics preconditioning via free radical signals and mitochondrial K(ATP) channels in myocytes*. *Circulation*, 2001. **103**(2): p. 290-5.
48. Frassdorf, J., et al., *Morphine induces late cardioprotection in rat hearts in vivo: the involvement of opioid receptors and nuclear transcription factor kappaB*. *Anesth Analg*, 2005. **101**(4): p. 934-41, table of contents.
49. Yu, C.K., et al., *Remifentanyl preconditioning confers delayed cardioprotection in the rat*. *Br J Anaesth*, 2007. **99**(5): p. 632-8.

-
50. Yang, X., M.V. Cohen, and J.M. Downey, *Mechanism of cardioprotection by early ischemic preconditioning*. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2010. **24**(3): p. 225-34.
 51. Yang, C., et al., *Early ischaemic preconditioning requires Akt- and PKA-mediated activation of eNOS via serine1176 phosphorylation*. *Cardiovasc Res*, 2013. **97**(1): p. 33-43.
 52. Swyers, T., D. Redford, and D.F. Larson, *Volatile anesthetic-induced preconditioning*. *Perfusion*, 2014. **29**(1): p. 10-5.
 53. Sergeev, P., et al., *Trigger-dependent gene expression profiles in cardiac preconditioning: evidence for distinct genetic programs in ischemic and anesthetic preconditioning*. *Anesthesiology*, 2004. **100**(3): p. 474-88.
 54. Amour, J., et al., *Role of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase during early anesthetic and ischemic preconditioning*. *Anesthesiology*, 2009. **110**(2): p. 317-25.
 55. Redel, A., et al., *Activation of mitochondrial large-conductance calcium-activated K⁺ channels via protein kinase A mediates desflurane-induced preconditioning*. *Anesth Analg*, 2008. **106**(2): p. 384-91, table of contents.
 56. Marinovic, J., Z.J. Bosnjak, and A. Stadnicka, *Preconditioning by isoflurane induces lasting sensitization of the cardiac sarcolemmal adenosine triphosphate-sensitive potassium channel by a protein kinase C-delta-mediated mechanism*. *Anesthesiology*, 2005. **103**(3): p. 540-7.
 57. Marinovic, J., Z.J. Bosnjak, and A. Stadnicka, *Distinct roles for sarcolemmal and mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in isoflurane-induced protection against oxidative stress*. *Anesthesiology*, 2006. **105**(1): p. 98-104.
 58. Uecker, M., et al., *Translocation of protein kinase C isoforms to subcellular targets in ischemic and anesthetic preconditioning*. *Anesthesiology*, 2003. **99**(1): p. 138-47.
 59. Weber, N.C., 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**(1): p. 123-32.

-
60. Weber, N.C., et al., *Mechanisms of xenon- and isoflurane-induced preconditioning - a potential link to the cytoskeleton via the MAPKAPK-2/HSP27 pathway*. Br J Pharmacol, 2005. **146**(3): p. 445-55.
 61. Zhong, L. and J.Y. Su, *Isoflurane activates PKC and Ca(2+) -calmodulin-dependent protein kinase II via MAP kinase signaling in cultured vascular smooth muscle cells*. Anesthesiology, 2002. **96**(1): p. 148-54.
 62. Wang, C., et al., *Extracellular signal-regulated kinases trigger isoflurane preconditioning concomitant with upregulation of hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor expression in rats*. Anesth Analg, 2006. **103**(2): p. 281-8, table of contents.
 63. Garcia-Cardena, G., et al., *Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90*. Nature, 1998. **392**(6678): p. 821-4.
 64. Smul, T.M., et al., *Desflurane-induced preconditioning against myocardial infarction is mediated by nitric oxide*. Anesthesiology, 2006. **105**(4): p. 719-25.
 65. Ulker, S., P.P. McKeown, and U. Bayraktutan, *Aprotinin impairs coronary endothelial function and down-regulates endothelial NOS in rat coronary microvascular endothelial cells*. Cardiovasc Res, 2002. **55**(4): p. 830-7.
 66. Heinrich, P., M. Müller, and L. Graeve, *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 2003. **7** p. 809.
 67. Karow, T., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie*. 2010. **18**: p. 108.
 68. Janeway, C., et al., *Immunologie*. 2005. **5**(S.360).
 69. Park, K.H. and R. Levi, *Hypoxic coronary vasodilatation and cGMP overproduction are blocked by a nitric oxide synthase inhibitor, but not by a guanylyl cyclase ANF receptor antagonist*. Eur J Pharmacol, 1994. **256**(1): p. 99-102.
 70. Naseem, K.M., *The role of nitric oxide in cardiovascular diseases*. Mol Aspects Med, 2005. **26**(1-2): p. 33-65.
 71. Shaul, P.W., *Endothelial nitric oxide synthase, caveolae and the development of atherosclerosis*. J Physiol, 2003. **547**(Pt 1): p. 21-33.
 72. Li, H., T. Wallerath, and U. Forstermann, *Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase*. Nitric Oxide, 2002. **7**(2): p. 132-47.

-
73. Mount, P.F., B.E. Kemp, and D.A. Power, *Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation*. J Mol Cell Cardiol, 2007. **42**(2): p. 271-9.
 74. Fontana, J., et al., *Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release*. Circ Res, 2002. **90**(8): p. 866-73.
 75. Heinrich, P., M. Müller, and L. Graeve, *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 2003. **7** p. 550.
 76. Karow, T., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie*. 2010. **18**: p. 109.
 77. Herold, G., *Internistische Intensivmedizin*. 2017: p. 1024f.
 78. Kunitz, M. and J.H. Northrop, *Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, a trypsin inhibitor and an inhibitor trypsin compound*. J Gen Physiol, 1936: p. 991-1007.
 79. Royston, D., *High-dose aprotinin therapy: a review of the first five years' experience*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 1992. **6**(1): p. 76-100.
 80. Dietrich, W., et al., *High-dose aprotinin in cardiac surgery: three years' experience in 1,784 patients*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 1992. **6**(3): p. 324-7.
 81. Schneeweiss, S., et al., *Aprotinin during coronary-artery bypass grafting and risk of death*. N Engl J Med, 2008. **358**(8): p. 771-83.
 82. Shaw, A.D., et al., *The effect of aprotinin on outcome after coronary-artery bypass grafting*. N Engl J Med, 2008. **358**(8): p. 784-93.
 83. Fergusson, D.A., et al., *A Comparison of Aprotinin and Lysine Analogues in High-Risk Cardiac Surgery*. N Engl J Med, 2008.
 84. Fergusson, D.A., et al., *A comparison of aprotinin and lysine analogues in high-risk cardiac surgery*. N Engl J Med, 2008. **358**(22): p. 2319-31.
 85. Agency, E.M., *Antifibrinolytics containing aprotinin, aminocaproic acid and tranexamic acid aprotinin*. 2013.
 86. Wang, T.W. and B. Kassell, *Digestion of the basic trypsin inhibitor of bovine pancreas by thermolysin*. Biochem Biophys Res Commun, 1970. **40**(5): p. 1039-45.
 87. Larsen, R., *Anästhesie*. 2001: p. 1200.

-
88. Larsen, R., *Anästhesie*. 2001. **7**: p. 1201.
 89. Aktories; Förstermann; Hoffmann, S., *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*; . 2005(9. Auflage): p. 547.
 90. Beierlein, W., et al., *Forty years of clinical aprotinin use: a review of 124 hypersensitivity reactions*. *Ann Thorac Surg*, 2005. **79**(2): p. 741-8.
 91. Mangano, D.T., et al., *The risk associated with aprotinin in cardiac surgery*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(4): p. 353-65.
 92. Larsen, R., *Anästhesie*. 2001. **7. Auflage**: p. S. 48 ff.
 93. Aktories, K., et al., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxicologie*. 2017: p. 229ff.
 94. Krolkowski, J.G., et al., *Role of Erk1/2, p70s6K, and eNOS in isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion in vivo*. *Can J Anaesth*, 2006. **53**(2): p. 174-82.
 95. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J Biol Chem*, 1951. **193**(1): p. 265-75.
 96. Jenkins, D.P., G.F. Baxter, and D.M. Yellon, *The pathophysiology of ischaemic preconditioning*. *Pharmacol Res*, 1995. **31**(3-4): p. 219-24.
 97. Li, G.C., et al., *Myocardial protection with preconditioning*. *Circulation*, 1990. **82**(2): p. 609-19.
 98. Sandhu, R., et al., *Ischemic preconditioning: differences in protection and susceptibility to blockade with single-cycle versus multicycle transient ischemia*. *Circulation*, 1997. **96**(3): p. 984-95.
 99. Riess, M.L., et al., *Dual exposure to sevoflurane improves anesthetic preconditioning in intact hearts*. *Anesthesiology*, 2004. **100**(3): p. 569-74.
 100. Lange, M., 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**(5): p. 607-13.
 101. Bein, B., 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**(10): p. 1046-55.

-
102. Pruefer, D., et al., *Cardioprotective effects of the serine protease inhibitor aprotinin after regional ischemia and reperfusion on the beating heart*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2002. **124**(5): p. 942-9.
 103. Inamura, Y., et al., *Aprotinin abolishes sevoflurane postconditioning by inhibiting nitric oxide production and phosphorylation of protein kinase C-delta and glycogen synthase kinase 3beta*. Anesthesiology, 2009. **111**(5): p. 1036-43.
 104. Sanada, S., et al., *Protein kinase A as another mediator of ischemic preconditioning independent of protein kinase C*. Circulation, 2004. **110**(1): p. 51-7.
 105. Chen, C.A., et al., *Phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase regulates superoxide generation from the enzyme*. J Biol Chem, 2008. **283**(40): p. 27038-47.
 106. Chen, J.X. and B. Meyrick, *Hypoxia increases Hsp90 binding to eNOS via PI3K-Akt in porcine coronary artery endothelium*. Lab Invest, 2004. **84**(2): p. 182-90.
 107. Sud, N., et al., *Nitric oxide and superoxide generation from endothelial NOS: modulation by HSP90*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **293**(6): p. L1444-53.
 108. Lebuffe, G., et al., *ROS and NO trigger early preconditioning: relationship to mitochondrial KATP channel*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(1): p. H299-308.
 109. McQuillan, L.P., et al., *Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms*. Am J Physiol, 1994. **267**(5 Pt 2): p. H1921-7.
 110. Dimmeler, S., et al., *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 601-5.
 111. Fulton, D., et al., *Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 597-601.
 112. Michell, B.J., et al., *Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 2001. **276**(21): p. 17625-8.

-
113. Ge, Z.D., et al., *Isoflurane postconditioning protects against reperfusion injury by preventing mitochondrial permeability transition by an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism*. *Anesthesiology*, 2010. **112**(1): p. 73-85.
 114. Meybohm, P., et al., *Aprotinin may increase mortality in low and intermediate risk but not in high risk cardiac surgical patients compared to tranexamic acid and epsilon-aminocaproic acid -- a meta-analysis of randomised and observational trials of over 30.000 patients*. *PLoS One*, 2013. **8**(3): p. e58009.
 115. Ghaffari Nejad, M.H., et al., *Evaluation and Comparison of Using Low-Dose Aprotinin and Tranexamic Acid in CABG: a Double Blind Randomized Clinical Trial*. *J Tehran Heart Cent*, 2012. **7**(1): p. 15-8.
 116. Karkouti, K., et al., *The risk-benefit profile of aprotinin versus tranexamic acid in cardiac surgery*. *Anesth Analg*, 2010. **110**(1): p. 21-9.
 117. Deloge, E., et al., *Aprotinin vs. tranexamic acid in isolated coronary artery bypass surgery: A multicentre observational study*. *Eur J Anaesthesiol*, 2017. **34**(5): p. 280-287.
 118. Takagi, H., et al., *Seizures associated with tranexamic acid for cardiac surgery: a meta-analysis of randomized and non-randomized studies*. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 2017. **58**(4): p. 633-641.
 119. Misko, T.P., et al., *Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine*. *Eur J Pharmacol*, 1993. **233**(1): p. 119-25.
 120. Moore, P.K. and R.L. Handy, *Selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase--is no NOS really good NOS for the nervous system?* *Trends Pharmacol Sci*, 1997. **18**(6): p. 204-11.
 121. Huang, F., et al., *Use of aprotinin to reduce blood loss and transfusion in major orthopedic surgery: a meta-analysis*. *Transfus Apher Sci*, 2014.
 122. Ahmed, Z., et al., *Aprotinin and transfusion requirements in pediatric craniofacial surgery*. *Paediatr Anaesth*, 2014. **24**(2): p. 141-5.
 123. Royston, D., *The current place of aprotinin in the management of bleeding*. *Anaesthesia*, 2015. **70 Suppl 1**: p. 46-9, e17.
 124. Royston, D., et al., *A special article following the relicence of aprotinin injection in Europe*. *Anaesth Crit Care Pain Med*, 2017. **36**(2): p. 97-102.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Dirk Ebel, Herrn Dr. Dr. Jan Frässdorf und Frau Dr. Nina Weber für die Anleitung sowie für die wertvollen Anregungen und Ratschläge bedanken.

Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Yvonne Grüber sowie bei allen anderen Mitarbeitern der experimentellen Anästhesie bedanken, die mir während der Zeit im Labor mehr als einmal hilfreich zur Seite gestanden haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Mann, ohne dessen fortwährende Motivation ich diese Arbeit im klinischen Alltag bestimmt nicht fertig gestellt hätte. Aber auch meinen Eltern, meinen Geschwistern sowie meinen Freunden möchte ich an dieser Stelle danken, sie haben immer an mich geglaubt und mich zum Durchhalten motiviert.

Eidstattliche Versicherung:

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

15.01.19,

Nadja Mayer-Wingert