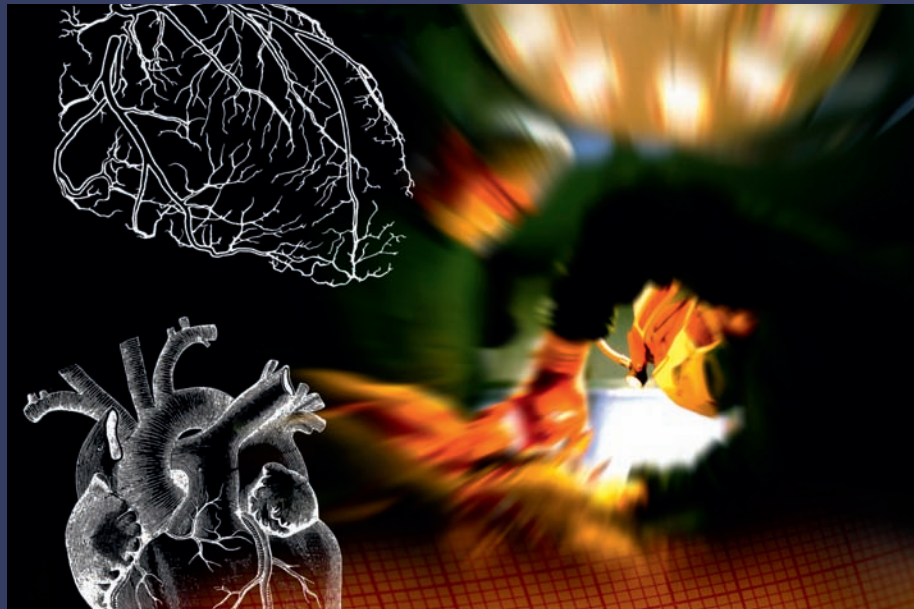


**NOVA ACTA LEOPOLDINA**

**NEUE FOLGE, BAND 108, NUMMER 375**

# **Präkonditionierung und Organprotektion durch Anästhetika**

**Bernhard Zwißler und Jens Scholz (Hrsg.)**



**Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina –  
Nationale Akademie der Wissenschaften, Halle (Saale) 2010  
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart**



## Präkonditionierung und Organprotektion durch Anästhetika



# NOVA ACTA LEOPOLDINA

Abhandlungen der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina

Herausgegeben vom Präsidium der Akademie

---

NEUE FOLGE

NUMMER 375

BAND 108

---

## Präkonditionierung und Organprotektion durch Anästhetika

**Leopoldina-Symposium**

**am 14. November 2008 in Frankfurt am Main**

Herausgeber:

Bernhard ZWISSLER (München)  
Mitglied der Leopoldina

Jens SCHOLZ (Kiel)  
Mitglied der Leopoldina

Mit 19 Abbildungen und 2 Tabellen



**Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina –  
Nationale Akademie der Wissenschaften, Halle (Saale) 2010  
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart**

Redaktion: Dr. Michael KAASCH und Dr. Joachim KAASCH

**Die Schriftenreihe Nova Acta Leopoldina erscheint bei der Wissenschaftlichen Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Birkenwaldstraße 44, 70191 Stuttgart, Bundesrepublik Deutschland.  
Jedes Heft ist einzeln käuflich!**

Die Schriftenreihe wird gefördert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung sowie das Kultusministerium des Landes Sachsen-Anhalt.

**Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über [http//dnb.ddb.de](http://dnb.ddb.de) abrufbar.

Die Abkürzung ML hinter dem Namen der Autoren steht für Mitglied der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina – Nationale Akademie der Wissenschaften.

Alle Rechte, auch die des auszugsweisen Nachdruckes, der fotomechanischen Wiedergabe und der Übersetzung, vorbehalten.

© 2010 Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina e. V. – Nationale Akademie der Wissenschaften  
06108 Halle (Saale), Emil-Abderhalden-Straße 37, Tel. +49 345 4723934  
Herausgeber: Präsidium der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina – Nationale Akademie der Wissenschaften  
Printed in Germany 2010  
Gesamtherstellung: Druck-Zuck GmbH Halle (Saale)  
ISBN: 978-3-8047-2794-6  
ISSN: 0369-5034  
Gedruckt auf chlorfrei gebleichtem Papier.

# Inhalt

Hubert E. BLUM: Grußwort .....	7
Heiko MÜHL und Josef PFEILSCHIFTER: Präkonditionierung und Organprotektion durch Anästhetika. Einführende Bemerkungen .....	11
Manfred THIEL: Präkonditionierung – Wie macht es die Natur? Eine Übersicht .....	15
Michael ZAUGG: Molecular and Cellular Mechanisms of Anesthetic-Induced Preconditioning .....	33
Kai ZACHAROWSKI: Alternative Mechanism of Organ Protection .....	45
Stefan G. DE HERT: Preconditioning and Organprotection by Anesthetic Agents Clinical Outcome – Cardioprotection .....	51
Christian WERNER: Cerebral Protection by Volatile Anesthetics .....	61
Christian HOFSTETTER: Pulmonale Protektion durch volatile Anästhetika .....	69
Alexander CHOUKÈR: Hepatische Protektion – Von der ischämischen Präkonditionierung zur pharmakologischen Konditionierung durch den Anästhesisten .....	77
Berthold BEIN: Präkonditionierung – ein universelles Prinzip? .....	89





## Grußwort

Hubert E. BLUM ML (Freiburg i. Br.)

Mitglied des Präsidiums der Akademie

Spectabilis, sehr geehrter Herr Kollege PFEILSCHIFTER,  
Sehr geehrter Herr Kollege SCHOLZ,  
Sehr geehrter Herr Kollege ZWISSLER,  
Meine sehr verehrten Damen und Herren,

ich darf Sie im Namen der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina und in Vertretung ihres Präsidenten, Herrn Prof. Volker TER MEULEN ML, ganz herzlich zu dem heutigen Leopoldina-Symposium zum Thema „Präkonditionierung und Organprotektion durch Anästhetika“ begrüßen. Besonders begrüßen darf ich Herrn Prof. SCHULTE AM ESCH ML, Obmann der Leopoldina-Sektion „Anästhesiologie“ sowie Herrn Prof. BENAD ML und seine Gattin. Ich möchte diesen besonderen Anlass als Gelegenheit nehmen, Ihnen kurz die Geschichte und Ziele der Leopoldina sowie deren Verbindung zur Anästhesiologie aufzuzeigen.

*Die Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina.* Die Akademie wurde 1652 in Schweinfurt gegründet und hat seit 1878 ihren Sitz in Halle (Saale). Sie ist eine überregionale Gelehrten-gesellschaft mit gemeinnützigen Aufgaben und Zielen, u. a. der inter- und transdisziplinären Diskussion von gesellschaftlich relevanten Themen im Rahmen von öffentlichen Symposien, Meetings und Vorträgen, der Einrichtung von Arbeitsgruppen, der Verbreitung wissenschaftlicher Erkenntnisse sowie der Erarbeitung von formalen Stellungnahmen zu wichtigen gesellschaftlich-relevanten Themen im Sinne der Beratung der Öffentlichkeit wie auch politisch Verantwortlicher. Ferner ist es ein Ziel der Leopoldina, junge Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler zu fördern und sich der wissenschaftshistorischen Forschung zu widmen.

Die Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina hat weltweit etwa 1300 Mitglieder, davon kommen 75 % aus den Stammländern Deutschland, Österreich und Schweiz sowie etwa 25 % aus mehr als 30 anderen Ländern weltweit. Mitglieder sind Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler mit besonderen Leistungen in den Bereichen Naturwissenschaften, Medizin, Technische Wissenschaften, Kulturwissenschaften, empirische Geisteswissenschaften sowie Verhaltens- und Sozialwissenschaften. Die Leopoldina gliedert sich in 28 Sektionen. Thematisch sind heute die Sektionen 15 „Physiologie, Pharmakologie und Toxikologie“ sowie 17 „Chirurgie, Orthopädie und Anästhesiologie“ vertreten. Die Finanzierung der Leopoldina erfolgt zu 80 % über den Bund (BMBF) und zu 20 % über das Land Sachsen-Anhalt.

*Die Leopoldina und die Anästhesiologie.* Die Verbindung der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina mit der „Anästhesiologie“ basiert in erster Linie auf den Mitgliedern der Akademie, die auf diesem Gebiet tätig waren und sind. Frühe Mitglieder der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina, die sich mit „Anästhesiologie“ als Forscher, vor allem als Chemiker und Physiologen befassten, waren u. a.: Michael FARADAY (1791–1867, zugewählt 1857), der 1818 die betäubende Wirkung von Äther entdeckte. Justus von LIEBIG (1803–1873, zugewählt 1859), der 1831 Chloroform entdeckte. Marie-Jean-Pierre FLOURENS (1794–1867, zugewählt 1841), der 1847 im Tierversuch die Narkosewirkung von Chloroform entdeckte. Wilhelm LOSSEN (1838–1906, zugewählt 1887), der 1864 die Struktur von Cocain identifizierte. Emil FISCHER (1852–1919) [kein Mitglied, aber 1898 mit der Cothenius-Medaille der Leopoldina ausgezeichnet] und Friedrich Joseph Frhr. VON MERING (1849–1908, zugewählt 1887), die die narkotisierende Wirkung der Barbiturate entdeckten und die intravenöse Barbiturat-Anästhesie in die Klinik einführten. Oscar LIEBREICH (1839–1908, zugewählt 1888), der 1869 die schlafinduzierende Wirkung von Chloralhydrat entdeckte. Carl Dietrich HARRIES (1866–1923, zugewählt 1909), der 1897 Eucaïn B als Cocain-Ersatz herstellte. Hans Horst MEYER (1853–1939, zugewählt 1911), der 1899 die Lipidtheorie der Narkosewirkung aufstellte. Alfred EINHORN (1857–1917, zugewählt 1891), der 1905 Novocain, das erste synthetische Lokalanästhetikum, herstellte, sowie Hellmut WEESE (1897–1954, zugewählt 1942), der das kurzwirksame Evipan entwickelte.

Mitglieder der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina, die vor allem als Kliniker zur Entwicklung der „Anästhesiologie“ beitrugen, waren u. a.: Johann Sigismund ELSHOLZ (1623–1688, zugewählt 1674), der erstmals 1665 einen Opiumextrakt intravenös applizierte. Philibert-Joseph ROUX (1780–1854, zugewählt 1853), der 1847 die erste Operation in Äthernarkose durchführte. Benjamin Ward RICHARDSON (1828–1896, zugewählt 1867), der als Erster Ätherzerstäuber zur Kälteanästhesie einsetzte. Heinrich Ludwig MEDING (1822–1865, zugewählt 1853), Friedrich Julius SICHEL (1802–1868, zugewählt 1854) und Johann Baptist ROTTENSTEIN (1832–?, zugewählt 1879), die die Verbindung der Leopoldina mit dem Verein Deutscher Ärzte in Paris hielten. Dieser wirkte als Initiator der Äthernarkose in Frankreich und als Vermittler für ganz Mittel- und Osteuropa. Aloys MARTIN (1818–1891, zugewählt 1878) nimmt eine besondere Stellung ein: er ist der erste Chronist, der 1847 die „Pariser Äthernarkose“ in der *Augsburger Allgemeine Zeitung* in Süddeutschland bekannt machte. Ebenfalls 1847 fertigte er eine Dissertationsarbeit zum Thema „Zur Physiologie und Pharmakodynamik des Ätherismus“ an sowie die erste Habilitationsschrift im deutschsprachigen Raum auf dem Gebiet der Narkosepraxis „Geschichte der Entdeckung und Ausbreitung des Ätherismus“ (Nürnberg 1847). Diese Arbeit ist das erste Werk in der Weltliteratur, das ausschließlich der Geschichte der chirurgischen Anästhesie gewidmet ist. Weiter seien genannt Johann Ferdinand Martin VON HEYFELDER (1798–1869, zugewählt 1828), der einer der ersten Anwender der Äthernarkose in Deutschland war, und Friedrich TRENDELENBURG (1844–1924, zugewählt 1884), der 1869 die erste endotracheale Anästhesie am Menschen nach Tracheotomie mit einem Tubus mit aufblasbarer Manschette durchführte, sowie August VON ROTHMUND (1830–1906, zugewählt 1887), der als Chirurg einen ganz wesentlichen Beitrag zur Einführung und Verbreitung der Äthernarkose leistete, und Emil Karl FREY (1888–1977, zugewählt 1952), ein Pionier des Fachs Anästhesiologie, der 1965 auf den ersten Lehrstuhl für Anästhesiologie in Deutschland an der Universität Mainz berufen wurde, sowie Otto MAYRHOFER (\*1920, zugewählt 1985), einer der ersten Habilitierten für

Anästhesiologie in Österreich, der auf den ersten Lehrstuhl für Anästhesiologie in Österreich an der Universität Wien berufen wurde.

So spiegelt sich die Geschichte der Anästhesiologie beginnend 1818 mit der Entdeckung der betäubenden Wirkung von Äther durch Michael FARADAY (zugewählt 1857) bis zum heutigen Symposium der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina in ihren Mitgliedern wider. Gerade mit dem heutigen Symposium zum Thema „Präkonditionierung und Organprotektion durch Anästhetika“ wird deutlich, dass sich die forschende Anästhesie von einem primär mit „Serviceleistungen“ und damit zusammenhängend im Vordergrund stehenden pharmakologischen und technischen Fragestellungen zu einem Fachgebiet gewandelt hat, das sich zunehmend auch mit den biomedizinischen Grundlagen Anästhesie-relevanter Aspekte befasst. Damit ergeben sich Kooperationen mit Physiologen, Zell- und Molekularbiologen, die im Sinne der „translationalen Forschung“ auch praktisch-klinische Relevanz besitzen.

Meine sehr verehrten Damen und Herren, im Namen der Leopoldina und als Vertreter unseres Präsidenten, Prof. Volker TER MEULEN, darf ich Ihnen allen ein interessantes und erfolgreiches Symposium wünschen mit vielen neuen Informationen und lebhaften Diskussionen sowie Raum für persönliche Begegnungen und Gespräche.

### *Dank*

Für die medizinhistorischen Recherchen bin ich Herrn Dr. Michael KAASCH, Redaktion Nova Acta Leopoldina, Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina in Halle, zu ganz besonderem Dank verpflichtet.

Prof. Dr. Hubert E. BLUM  
Medizinische Universitätsklinik  
Abteilung Innere Medizin II  
Hugstetter Straße 55  
79106 Freiburg (i. Br.)  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 761 2703403  
Fax: +49 761 2703610  
E-Mail: hubert.blum@uniklinik-freiburg.de



## **Präkonditionierung und Organprotektion durch Anästhetika Einführende Bemerkungen**

Heiko MÜHL und Josef PFEILSCHIFTER ML (Frankfurt/Main)

Adaptation ist ein archaisches Prinzip physiologischer Regelkreise, das die Anpassung des Organismus an wechselnde Umweltbedingungen sicherstellt und auf diese Weise Überleben oft erst ermöglicht. Dies gilt naturgemäß nicht nur für den Gesamtorganismus, sondern findet seinen Niederschlag ebenso auf zellulärer und biochemischer Ebene. Paradigma eines solchen Regelkreises ist die Anpassung des Organismus an Sauerstoffmangelzustände (Hypoxie). Tatsächlich sind die Mechanismen dieses Adaptationsprozesses inzwischen bis in die molekularen Details geklärt. So wird der Sauerstoffsensoren ‚Hypoxie-induzierbarer Faktor‘ bei Normoxie nach Sauerstoff-abhängiger Hydroxylierung dem proteasomalen Abbau zugeführt. Bei Hypoxie hingegen ist das als Transkriptionsfaktor fungierende Protein aufgrund insuffizienter Hydroxylierung (die Verfügbarkeit des Kosubstrates Sauerstoff wirkt hier limitierend) stabilisiert und kann die Expression spezifischer Gene vermitteln. Unter diesen befindet sich das in der Niere produzierte Hormon Erythropoietin, das nun seinerseits die Erythropoese im Knochenmark steigert. Unmittelbare Folge ist eine Erhöhung der O<sub>2</sub>-Transportkapazität im Blut und somit Adaptation an Sauerstoffmangelzustände.

Das hier einzuführende Phänomen der Präkonditionierung bezeichnet nun einen protektiven Prozess, bei dem zeitlich und quantitativ limitierte Reize, hinsichtlich ihrer Stärke im Allgemeinen die Schwelle zur Gewebeschädigung nicht überschreitend, vor einem nachfolgenden fulminanten Reiz mit Potential zur Gewebeschädigung schützen. In diesem Sinne handelt es sich um einen klassischen Adaptationsprozess, der besonders in pathophysiologischer Hinsicht augenfällig und von zentraler Bedeutung ist. In seinen Ausführungen zur *Angina Pectoris* gelang dem englischen Arzt William HEBERDEN (1710–1801) die Erstbeschreibung dieses Phänomens, als er über die Behandlung der Erkrankung schreibt: „I knew one who set himself a task of sawing wood for half an hour every day, and was nearly cured.“ Tatsächlich sind kardioprotektive Aspekte körperlicher Arbeit bei Gesunden wie bei Patienten mit koronaren Herzerkrankungen heute unbestritten. Hitze und Stress (z. B. nach Exposition mit Arsen oder Thapsigargin) sind ebenfalls Faktoren mit Potential zur Präkonditionierung. Mit Blick auf klinische Relevanz und Erarbeitung neuer Therapiestrategien zur Gewebeprotektion ist neben der körperlichen Arbeit insbesondere die Arzneimittel-induzierte Präkonditionierung im Fokus der pharmakologischen Forschung. Beispiele hierfür sind kardioprotektive Wirkungen von stabilen Prostazyklinderivaten und insbesondere die der volatilen Anästhetika. Davon aber mehr in den nachfolgenden Beiträgen.

Besonders gut charakterisiert ist Gewebeschutz durch Präkonditionierung im Kontext von Reperfusionsschäden nach Ischämie im Zentralnervensystem und am Herzmuskel mit den klinischen Korrelaten des Schlaganfalls und des Myokardinfarktes. Wichtige Mechanismen der Gewebeschädigung bei Reperfusionsschäden nach Ischämie sind dabei einerseits die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale nach Umwandlung der Xanthindehydrogenase in eine Oxidase unter NADH/Xanthin-Überschuss und andererseits die unkontrollierte Freisetzung von Entzündungsmediatoren unter dem Einfluss der proentzündlichen Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und STAT1. Der resultierende Gewebeschaden kann dabei die kurative Funktion der Reperfusion deutlich konterkarieren. Beispielhaft sei hier auf tierexperimentelle Studien zum Schlaganfall hingewiesen, in denen belegt ist, dass wiederholte Phasen kurzer Ischämie-reperfusionen eindrucksvoll vor Gewebeschäden nach fulminanter Ischämie/Reperfusion bewahren. Dabei zeigen sich die protektiven Auswirkungen von Präkonditionierung sowohl durch ein entsprechend verkleinertes Infarktareal als auch durch eine herabgesetzte Apoptoserate und reduzierte Freisetzung proentzündlicher Zytokine. Während auf Ebene der Transkriptionsfaktoren pathologisch überschießende Aktivitäten von NF- $\kappa$ B und STAT1 als Amplifikatoren des Gewebeunterganges gelten, erfüllt STAT3 eine protektive Rolle. Entsprechend konnte gezeigt werden, dass der IL-6/STAT3-Signalweg bei zerebraler Ischämie in der Maus Schutzfunktionen wahrnimmt. In diesen Untersuchungen wurde Mäusen u. a. ein Antikörper verabreicht, der an den IL-6-Rezeptor bindet und so die biologische Aktivität dieses Zytokins *in vivo* blockiert. Dass zerebrale Präkonditionierung tatsächlich durch Aktivierung von STAT3 vermittelt sein kann, belegen Experimente zum protektiven Potential des Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors (G-CSF) in der Maus. Hier kann G-CSF nur in Anwesenheit funktioneller STAT3-Proteine seine Schutzfunktionen bei Ischämie/Reperfusion wahrnehmen.

Tatsächlich stellt sich die Rolle des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B bei Ischämie/Reperfusion janusköpfig dar. Eine nur moderate Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch beispielsweise mäßige Spiegel von IL-1 kann protektive Funktionen vermitteln. Unter diesen Bedingungen sind wahrscheinlich anti-apoptotische Charakteristika von NF- $\kappa$ B hinsichtlich seiner biologischen Funktion dominant. Diesen protektiven Eigenschaften steht Destruktion bei überschießender und unkontrollierter Aktivierung gegenüber. Zu Mechanismen reduzierter Aktivierung von NF- $\kappa$ B unter Präkonditionierung gibt es unterschiedliche Hypothesen. Beispielhaft sei an dieser Stelle auf die Modulation von TNF $\alpha$ -induzierter NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch Stressgranula eingegangen. Signaltransduktion von TNF $\alpha$  führt über die Bindung des Adaptorproteins TRAF2 an das „SxxE“-Aminosäuremotiv des TNF-Rezeptors letztlich zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und nachfolgend zur Expression potentiell gewebeschädigender Mediatoren. Stressgranula sind nun zytosolische Aggregate, die unter Zellstress nachweisbar werden, u. a. nach ER-Stress durch Thapsigargin oder unter dem Einfluss von Arsen. Biochemisch handelt es sich bei Stressgranula überwiegend um RNA/Protein-Aggregate, die insbesondere aus arretierten translationalen Initiationskomplexen bestehen. Entsprechend ist die Proteinsyntheseleistung der gestressten Zelle insgesamt herabgesetzt, obwohl gleichzeitig sogenannte Stressproteine wie HSP-27, HO-1 und IL-8 vermehrt exprimiert sein können. In translozierten Initiationskomplexen ist nun das Aminosäuremotiv „SxxE“ des eukaryotischen Initiationsfaktors eIF4G1 freigelegt und konkurriert so mit dem TNF-Rezeptor um die Bindung von TRAF2. Dies kann unter bestimmten Bedingungen zur Blockade der TNF $\alpha$ -Signaltransduktion mit Reduktion pathologisch gesteigerter Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen. Die Folge ist Zellschutz durch Präkonditionierung nach Stress.

Wir haben bereits die Präkonditionierung im Sinne von Adaptationsprozessen eingeführt. Diese sind für den Gesamtorganismus zweifellos essentiell. So ist beispielsweise die bei Hypertonie oder Herzinfarkt zu beobachtende Myokardhypertrophie eine wichtige kompensatorische Strategie zur Erhaltung vitaler physiologischer Funktionen. Chronische Hypertrophie gilt jedoch als pathologisch und somit folgerichtig als Risikofaktor späteren Herzversagens. Neben der Myokardhypertrophie ist die Insulinresistenz ein weiteres Beispiel für archaische Adaptationsmechanismen mit pathophysiologischer Relevanz. Zytokine wie TNF $\alpha$  und IL-1 sind in der Lage, im Rahmen von Entzündungsprozessen beziehungsweise Immunaktivierung Insulinresistenz hervorzurufen. Dies kann als essentieller Adaptationsmechanismus bei erhöhtem Glukosebedarf von Leukozyten im Fall einer fulminanten Infektion verstanden werden. Chronische Insulinresistenz als Folge permanenter subklinischer Entzündung im Kontext kalorienreicher Ernährung und mangelnder Bewegung führt jedoch bekanntermaßen zu Diabetes mellitus Typ II. In Anbetracht dieser Beispiele drängt sich mithin die zu prüfende Hypothese auf, ob Veränderungen homöostatischer Regelkreise durch persistierende Adaptationsmechanismen das Potential in sich tragen, chronische Erkrankungen hervorzurufen. Mithin wären Zivilisationskrankheiten wie Allergien, Morbus Crohn und Diabetes mellitus Typ II möglicherweise klinische Konsequenzen chronischer Adaptation an das Leben in der modernen Industriegesellschaft.

### Literatur

- BARRY, S. P., TOWNSEND, P. A., LATCHMAN, D. S., and STEPHANOU, A.: Role of the JAK-STAT pathway in myocardial injury. *Trends Mol. Med.* 13, 82–89 (2007)
- BROWN, D. A., and MOORE, R. L.: Perspectives in innate and acquired cardioprotection: cardioprotection acquired through exercise. *J. Appl. Physiol.* 103, 1894–1899 (2007)
- DAS, M., and DAS, D. K.: Molecular mechanism of preconditioning. *IUBMB Life* 60, 199–203 (2008)
- GIDDAY, J. M.: Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nature Rev. Neurosci.* 7, 437–448 (2006)
- GUEST, C. B., PARK, M. J., JOHNSON, D. R., and FREUND, G. G.: The implication of proinflammatory cytokines in type 2 diabetes. *Front Biosci.* 13, 5187–5194 (2008)
- INAGI, R., KUMAGAI, T., NISHI, H., KAWAKAMI, T., MIYATA, T., FUJITA, T., and NANGAKU, M.: Preconditioning with endoplasmic reticulum stress ameliorates mesangioproliferative glomerulonephritis. *J. Amer. Soc. Nephrol.* 19, 915–922 (2008)
- JONES, W. K., BROWN, M., WILHIDE, M., HE, S., and REN, X.: NF- $\kappa$ B in cardiovascular disease: diverse and specific effects of a “general” transcription factor? *Cardiovasc. Toxicol.* 5, 183–202 (2005)
- KHAN, I. A., and MEHTA, N. J.: Initial historical descriptions of the angina pectoris. *J. Emerg. Med.* 22, 295–298 (2002)
- LECOUR, S., ROCHETTE, L., and OPIE, L.: Free radicals trigger TNF alpha-induced cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* 65, 239–243 (2005)
- MALHOTRA, S., SAVITZ, S. I., OCAVA, L., and ROSENBAUM, D. M.: Ischemic preconditioning is mediated by erythropoietin through PI-3 kinase signaling in an animal model of transient ischemic attack. *J. Neurosci. Res.* 83, 19–27 (2006)
- MCDUNN, J. E., and COBB, J. P.: That which does not kill you makes you stronger: a molecular mechanism for preconditioning. *Sci. STKE* 291, pe34 (2005)
- MEDZHITOV, R.: Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428–435 (2008)
- MELDRUM, D. R.: Tumor necrosis factor in the heart. *Amer. J. Physiol.* 274, R577–R595 (1998)
- PAPA, S., BUBICI, C., ZAZZERONI, F., PHAM, C. G., KUNTZEN, C., KNABB, J. R., DEAN, K., and FRANZOSO, G.: The NF- $\kappa$ B-mediated control of the JNK cascade in the antagonism of programmed cell death in health and disease. *Cell Death Differ.* 13, 712–729 (2006)
- SEMENZA, G. L.: Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology* 19, 176–182 (2004)
- STARNEs, J. W., and TAYLOR, R. P.: Exercise-induced cardioprotection: endogenous mechanisms. *Med. Sci. Sports Exerc.* 39, 1537–1543 (2007)

- WANG, L., TRAYSTMAN, R. J., and MURPHY, S. J.: Inhalational anesthetics as preconditioning agents in brain. *Curr. Opin. Pharmacol.* 8/1, 104–110 (2008)
- YAMASHITA, T., SAWAMOTO, K., SUZUKI, S., SUZUKI, N., ADACHI, K., KAWASE, T., MIHARA, M., OHSUGI, Y., ABE, K., and OKANO, H.: Blockade of interleukin-6 signaling aggravates ischemic cerebral damage in mice: possible involvement of Stat3 activation in the protection of neurons. *J. Neurochem.* 94, 459–468 (2005)

Prof. Dr. Heiko MÜHL  
Prof. Dr. Josef PFEILSCHIFTER  
Pharmazentrum Frankfurt  
Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie  
Klinikum der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität  
Theodor-Stern-Kai 7  
60590 Frankfurt am Main  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 69 63016962  
+49 69 63016951  
Fax: +49 69 63017942  
E-Mail: h.muehl@em.uni-frankfurt.de  
pfeilschifter@em.uni-frankfurt.de



## Präkonditionierung – Wie macht es die Natur? Eine Übersicht

Manfred THIEL (Mannheim)

Mit 2 Abbildungen

### Zusammenfassung

Das Phänomen der Präkonditionierung stellt ein herausragendes Beispiel für die Fähigkeit des Lebens dar, sich an potentiell tödliche Stressoren anzupassen. Im Fall der ischämischen Präkonditionierung führen eine oder mehrere kurze Phasen von Ischämie und Reperfusion (präkonditionierende Ischämie) zur Ausbildung eines Schutzeffektes vor Schäden durch eine nachfolgende länger andauernde schwere Ischämie (Index-Ischämie). Der Schutz durch ischämische Präkonditionierung beruht auf der Bildung bzw. Freisetzung von Autocoiden, die über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren die Entwicklung eines protektiven Gedächtnisses induzieren. Während Bradykinin und Opioidpeptide über die Öffnung von (mitochondrialen) ATP-sensitiven  $K^+$ -Kanälen ( $mK_{ATP}$ ) und der konsekutiven Produktion von Sauerstoffradikalen zur Ausbildung des protektiven Gedächtnisses führen, kann Adenosin am Herzen nach Bindung an Adenosin-A1/A3-Rezeptoren auch unabhängig von der Stimulation von  $mK^+$ -Kanälen und der assoziierten Sauerstoffradikalproduktion das protektive Gedächtnis induzieren. Das biochemische Korrelat des protektiven Gedächtnisses basiert vor allem auf der Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). In der Phase der Reperfusion bewirkt die aktivierte PKC eine verstärkte Stimulation von *Prosurvival*-Kinasen bzw. *Reperfusion-Injury-Survival*-Kinase (RISKS). Zu diesen Kinasen zählen die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K- $\beta$ )/AKT, die MEK/Erk1/2 und die p70S6K, die zusammen mit der PKC das Enzym, die Glykogensynthasekinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), als Substrat gemeinsam haben. Durch Phosphorylierung wird diese Kinase inaktiviert und die Bildung von „Permeability Transitionpores“ (PTPs) im Mitochondrium verhindert. Hierdurch bleibt das Membranpotential in den Mitochondrien als Voraussetzung für die Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien länger aufrechterhalten, und der Tod der Zelle wird verzögert oder verhindert. Die Hemmung der Öffnung von mitochondrialen PTPs kann zudem durch die PKC indirekt verstärkt werden, da die PKC durch Phosphorylierung des Adenosin-A<sub>2B</sub>-Rezeptors die Affinität für Adenosin erhöht. Da der A<sub>2B</sub>-Rezeptor *Prosurvival*-Kinasen aktivieren kann, wird hierdurch die Stimulation von RISKS weiter verstärkt. Damit ist Adenosin zugleich Trigger und Mediator der Protektion durch ischämische Präkonditionierung.

### Abstract

The phenomenon of preconditioning represents an outstanding example for the capacity of life to adapt to potentially lethal stressors. Ischemic preconditioning by one or several repetitive brief periods of ischemia followed by short reperfusion provides powerful protection against a subsequent more severe ischemic episode (index ischemia). Protection by ischemic preconditioning is mainly due to the endogenous production and release of autocooids which acting via Gi-protein coupled receptors induce a protective memory. While bradykinine and opioid peptides exert protection by the opening of mitochondrial ATP sensitive  $K^+$  channels ( $mK_{ATP}$ ) and the subsequent production of oxygen reactive metabolites, preconditioning by adenosine occurs independently from such signaling pathways via binding to adenosine A1/A3 receptor sites. As a result, protein kinase C (PKC) becomes activated which during reperfusion will stimulate prosurvival kinases or reperfusion injury survival kinases (RISKS), respectively. RISKS comprise phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K $\beta$ )/Akt, MEK/Erk 1/2 and p70S6K which altogether with PKC phosphorylate and thereby inactivate glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). Inactivation of GSK3 $\beta$  finally inhibits the opening of mitochondrial permeability transition pores (mPTPs). Inhibition of mPTP opening at the onset of reper-

fusion preserves mitochondrial membrane potential, mitochondrial energy production and reduces cell death by 30–50%. Additionally, inhibition of mPTPs is indirectly enforced by PKC because PKC mediated phosphorylation of the adenosine A28 receptor increases its binding affinity for its ligand. As the A28 receptor stimulates prosurvival kinases, protective signaling by RISKS becomes further strengthened. Thus, adenosine is trigger and mediator of protection by ischemic preconditioning, respectively.

## 1. Einleitung

Seit Entstehung des Lebens ist es ein allgemeingültiges Prinzip, dass alles Leben zur Anpassung an die Natur verurteilt ist. Dies gilt insbesondere, wenn es sich um „widrige Lebensumstände“ handelt. Erleichtert wird die Anpassung durch die Fähigkeit lebender Organismen – angefangen von der einfachen Zelle, dem einzelnen Organ bis hin zum ganzen Organismus –, eine Stressantwort zu entwickeln. Leben und Stress gehören damit untrennbar zusammen. Der Pionier der Stressforschung Hans SELYE brachte es auf den Punkt mit den Worten: „Komplette Freiheit von Stress ist der Tod.“ Dabei dient die Stressantwort dazu, das Gleichgewicht im Organismus – die Homöostase – wieder herzustellen (SCHULZ und GOLD 2006). Im Laufe der Evolution hat die Anpassungsfähigkeit des Lebens zu einzigartigen Beispielen eines Überlebens unter extremen Bedingungen geführt. Diese reichen von *Picrophilus torridus* (JONES 1981), einem thermoacidophilen Mikroorganismus, der in 1 molarer Säure bei 60 °C lebensfähig ist, über Röhrenwürmer (*Riftia pachyptila*), die in der Tiefsee in der Nähe von schwarzen Rauchern bei Temperaturen von bis zu 113 °C und über 100 atm Druck wachsen, bis zu Kaiserpinguinen in der Antarktis, die im Winter eisigen Temperaturen von bis zu –90 °C und Windgeschwindigkeiten von bis zu 350 km/h standhalten. Angesichts dieses unglaublich großen Potentials des Lebens, sich durch kurzfristige und langfristige adaptive Mechanismen widrigen Umständen anzupassen, erstaunt es eigentlich nicht, dass das Phänomen der Präkonditionierung als Spezialfall der akuten Adaptation von Organen an widrige Umstände, wie sie eine nachfolgende schwere Ischämie bzw. Hypoxie darstellen, existiert.

## 2. Der Begriff der Konditionierung und seine Verwendung in der Stressforschung

Der Begriff der Konditionierung findet vor allem im Bereich der Psychologie und der Pädagogik Verwendung und geht auf Versuche zurück, die von Nobelpreisträger PAVLOV bereits 1904 durchgeführt wurden (PAVLOV 2009). In diesen historischen Experimenten an Hunden führte die Konditionierung, d. h. die wiederholte zeitnahe Anbietung eines primär unabhängigen neutralen Reizes (Klang einer Glocke) zusammen mit dem natürlichen, spezifischen Reiz (Futter) bei Präsentation allein ohne Darbietung von Futter zur Auslösung des Speichelflusses als einem natürlichen Reflex. Der bisher neutrale Reiz, das Erklingen der Glocke, erwarb durch die Konditionierung die Eigenschaft, den Reflex auszulösen. Bei der klassischen Konditionierung wurde somit eine neue Beziehung zwischen einem primär neutralen Reiz und einem Reflex hergestellt. Bei der ischämischen Präkonditionierung hingegen, die von MURRY erst viele Jahre später (1986) ebenfalls an Hunden durchgeführt wurde, bewirkte eine kurze Ischämie des Myokards eine veränderte Reaktionslage des Organs mit der Entwicklung einer erhöhten Resistenz gegenüber einer nachfolgenden schweren Ischämie (MURRY et al. 1986). Beide Verwendungen des Begriffes der Konditionierung beschreiben damit unterschiedliche Zusammenhänge, die dennoch eine Gemeinsamkeit aufweisen, nämlich das Phänomen der Herstellung einer Beziehung zwischen zwei Ereignissen.

Zwischen diesen beiden historischen Experimenten von PAVLOV und MURRY beschäftigte sich NOBLE 1942 im Rahmen der Stressforschung mit den Möglichkeiten, den gesamten Organismus gegenüber einem normalerweise tödlichen Trauma resistent zu machen (NOBLE 1942). In seinen Untersuchungen wurden Ratten, deren Vorder- und Hinterläufe zusammengebunden waren, in eine Art Wäschetrommel gesetzt. In der Trommel befanden sich zwei einander gegenüberliegende Querleisten, so dass bei Rotation der Trommel die Tiere hochgehoben wurden, um dann ca. 30–40 cm auf den Boden der Trommel zu fallen. Am 1. Tag des Experimentes rotierten die Tiere zunächst für 200 Umdrehungen, am 2. Tag für 400 Umdrehungen. NOBLE erhöhte die Drehzahl pro Tag um jeweils weitere 200 Umdrehungen, bis eine Anzahl von 1000 erreicht wurde. Wurden die Tiere ohne die Phase der langsamen Adaptation des Organismus an das Trauma den 1000 Umdrehungen ausgesetzt, so überlebte nur 1 % der Tiere, wohingegen fast alle (99 %) der adaptierten Tiere überlebten. NOBLE schrieb in seinem Laborbuch über die Adaptation des Organismus an ein üblicherweise tödliches Trauma folgende Bemerkungen: „Resistant animals, when exposed to severe trauma, appear normal in every respect and do not show any signs of shock as encountered in normal animals prior conditioning.“ JANOFF wiederholte und bestätigte die Versuche von NOBLE, und er verwendete ebenfalls den Begriff des „prior conditioning“ für den gesamten Organismus (JANOFF et al. 1962). MURRY benutzte 1986 dann erstmals den Begriff des „preconditioning“ für die Adaptation eines einzelnen Organs, wie des Herzens, an eine potentiell tödliche nachfolgende Ischämie.

### **3. Die Erstbeschreibung der Präkonditionierung**

Mit seinen Versuchen wollte MURRY eigentlich genau das Gegenteil dessen erreichen, was er am Ende beobachtete und mit dem Begriff der Präkonditionierung bezeichnete. So sollte die Hypothese geprüft werden, dass die Effekte mehrerer kurzer Phasen einer Ischämie sich auf die Schädigung einer nachfolgenden Ischämie nachteilig hinzuaddieren. Geprüft wurde diese Hypothese am Modell des Myokardinfarktes durch das Abklemmen der linken Koronararterie für die Dauer von 45 min. Das Ausmaß des Infarktes wurde 4 Tage nach Reperfusion bestimmt. Die kurzen Phasen von Ischämie/Reperfusion bestanden aus 5 Zyklen von jeweils 5-minütiger bzw. 3-minütiger Dauer. Im Vergleich zur Kontrollgruppe trat bei Vorbehandlung jedoch keine Zunahme, wie erwartet, sondern eine Reduktion des Myokardinfarktareals um durchschnittlich 75 % ein (MURRY et al. 1986). Das Besondere an diesem in nachfolgenden Versuchen gut reproduzierbaren Ergebnis war die Tatsache, dass es offensichtlich durch ischämische Vorbehandlung gelang, natürliche Mechanismen zu induzieren, die eine höchstwirksame Protektion des ansonsten gegenüber einer Ischämie bzw. Hypoxie so empfindlichen Myokards erzeugten. Dieses enorme Schutzpotential von körpereigenen Mechanismen war in diesem Ausmaß bis zur Entdeckung MURRYS nicht bekannt und stellte einen starken Impuls für deren Erforschung dar.

### **4. Die Präkonditionierung wird durch G<sub>i</sub>-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt**

Durch die grundlegenden Arbeiten der Physiologen BERNE in den USA (BERNE 1963) und GERLACH in Deutschland (GERLACH et al. 1963) über die metabolische Regulation der Myo-

kardperfusion war bekannt, dass Adenosin als Abbauprodukt von Adeninnukleotiden bei Störungen im Energiestoffwechsel in Folge einer Ischämie schnell gebildet wird. Danach bewirkt jede Ursache, die zu einer Minderversorgung des Myokards mit Sauerstoff führt, einen gesteigerten Abbau von ATP über ADP, AMP, bis hin zur Bildung von Adenosin. Dabei kann die Sauerstoffminderversorgung des Myokards relativ oder absolut sein. Ein relativer Sauerstoffmangel kann durch Erhöhung der Arbeitsleistung des Myokards, z. B. infolge Nachlaststeigerung oder Schlagfrequenzerhöhung, bedingt sein, ein absoluter Mangel kann z. B. infolge einer Stenosierung der Koronararterien eintreten. Das infolge des gesteigerten Abbaus der Adeninnukleotide vermehrt gebildete Adenosin vermag an spezifische Rezeptoren der Koronargefäße zu binden, diese zu dilatieren und somit der Ursache seiner Entstehung, der Gewebsischämie bzw. -hypoxie, durch Verbesserung der Koronarperfusion entgegenzuwirken. Vor dem Hintergrund dieser Arbeiten lag es nahe, die Rolle von Adenosin bei der ischämischen Präkonditionierung des Myokards zu prüfen. LIU konnte tatsächlich auch erstmals zeigen, dass das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung durch einen unspezifischen Adenosinrezeptorantagonisten, dem 8-Sulphophenyltheophyllin aufgehoben wurde (LIU et al. 1991). Da eine der ischämischen Präkonditionierung vergleichbare Protektion durch die Infusion von Adenosin oder durch die Applikation eines Adenosin-A1-Rezeptor-Agonisten, des PIA, hervorgerufen werden konnte, lagen zudem Befunde vor, die dafür sprachen, dass die Schutzwirkung der ischämischen Präkonditionierung durch die Entstehung von Adenosin und seiner Bindung an A1-Rezeptoren ausgelöst wird. Es folgten ähnliche Versuche, in welchen die Rolle weiterer körpereigener Botenstoffe bei der ischämischen Präkonditionierung untersucht wurde. Da A1-Rezeptoren  $G_i$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren sind, konzentrierte sich die Prüfung auf Substanzen, von denen bekannt war, dass sie ebenfalls an  $G_i$ -gekoppelte Rezeptoren binden. Neben Adenosin konnte durch die Infusion von Katecholaminen (BANERJEE et al. 1993), Angiotensin II (LIU et al. 1995), Endothelin-1 (WANG et al. 1996) und Acetylcholin (OLDENBURG et al. 2003) eine der ischämischen Präkonditionierung (IPC) vergleichbare Schutzwirkung erzielt werden. Allerdings konnte durch Einsatz von spezifischen Antagonisten die IPC-induzierte Protektion nur durch Antagonismus an den Bradykinin- (WALL et al. 1994) und Opioidrezeptoren (SCHULTZ et al. 1995) aufgehoben werden. Dies legte den Schluss nahe, dass vor allem die  $G_i$ -gekoppelten Rezeptoren für Adenosin, Bradykinin und Opioidrezeptoren an der Induktion der Protektion durch ischämische Präkonditionierung beteiligt sind. Im Gegensatz dazu spielen die anderen Rezeptorarten eher eine untergeordnete Rolle. Dies dürfte auf der unzureichenden Bildung ihrer physiologischen Liganden während der präkonditionierenden Ischämie beruhen.

## 5. Die „Multiple Trigger Theory“

DOWNEY und Mitarbeiter entwickelten am Herzen des Kaninchens ein hochstandardisiertes Modell für die ischämische Präkonditionierung. Sie zeigten, dass eine additive Wirkung für die oben genannten Triggersubstanzen besteht, die während einer präkonditionierenden Ischämie endogen gebildet werden. Erst bei Überschreiten einer sogenannten „Preconditioning Threshold“ infolge Summation der Einzelwirkungen der Triggersubstanzen wird die protektive Wirkung durch die ischämische Präkonditionierung ausgelöst. Dieses Konzept der „Multiple Trigger Theory“ beinhaltet somit die parallele und additive Aktivierung von Adenosin-, Bradykinin- und Opioidrezeptoren und basierte auf folgenden Befunden (GOTO et al.

1995): Maßnahmen, die beispielsweise ein Erreichen der Schwelle verhinderten, ließen eine ischämische Präkonditionierung erfolglos bleiben. Dies war der Fall, wenn man zu kurz präkonditionierte (3 min anstelle von 5 min ischämischer Präkonditionierung), oder wenn einer der Trigger pharmakologisch durch einen spezifischen Antagonisten an seinem zugehörigen Rezeptor ausgeschaltet wurde (5 min ischämische Präkonditionierung, jedoch Blockade von Bradykinin-Typ2-Rezeptoren). Andererseits konnte auch bei einer an und für sich zu kurzen Präkonditionierungsdauer die Präkonditionierungsschwelle dennoch erreicht werden, wenn z. B. der Abbau eines Mediators verhindert wurde. Dies war z. B. bei Anwendung von ACE-Hemmern der Fall, die den Abbau von Bradykinin verzögern (3 min ischämische Präkonditionierung und ACE-Hemmer). Die additive, synergistische Wirkung von Adenosin, Bradykinin und endogenen Opioidpeptiden reflektiert zugleich eine gewisse Redundanz. Bei Ausfall eines dieser Systeme kann so bei ausreichender Erhöhung der Präkonditionierungsdauer dennoch die Präkonditionierungsschwelle erreicht und eine Protektion erzielt werden. Bemerkenswert ist, dass die hierfür hauptverantwortlichen Triggersubstanzen in drei verschiedenen Kompartimenten gebildet werden. Aus dem Stoffwechsel des Myokards stammt Adenosin (metabolische Komponente), aus dem Intravasalraum Bradykinin (humorale Komponente) und aus dem Nervensystem verschiedene Opioidpeptide (nervale Komponente).

## 6. Das Modell der ischämischen Präkonditionierung in den 1990er Jahren

Gemäß der „Multiple Trigger Theory“ war bekannt, dass es im Wesentlichen die drei  $G_i$ -Protein-gekoppelten Rezeptoren für Adenosin, Bradykinin und endogene Opioidpeptide waren, welche die wichtigste Rolle in der Auslösung der Protektion durch ischämische Präkonditionierung einnahmen. Unklar hingegen war jedoch, welche Signalwege nach Besetzung des jeweiligen Rezeptors stimuliert wurden und wie diese die erhöhte Resistenz bzw. Toleranz gegenüber einer nachfolgenden schweren Ischämie bewirken sollten. Hierzu wurde auf der Grundlage vor allem von tierexperimentellen Ergebnissen in den 1990er Jahren ein relativ einfaches Modell entwickelt (Abb. 1).

Danach ging man davon aus, dass nach Binden z. B. von Adenosin an den Adenosin-A1-Rezeptor (LIU et al. 1991), die Phospholipasen C und D (LEE et al. 2001) aktiviert werden. Deren Produkte stellen Inositol-2,3,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) dar, die wiederum verschiedene Unterformen der Proteinkinase-C-Familie aktivieren (YTREHUS et al. 1994). Nach Stimulation und Translokation der Proteinkinase C (PKC) aus dem Zytosol an die Innenseite der Zellmembran kann die PKC sarkolemmale ATP-sensitive  $K^+$ -Kanäle phosphorylieren und damit deren Öffnung bewirken (GROSS und AUCHAMPACH 1992). Dies sollte zu einem Ausstrom von  $K^+$ -Ionen und somit zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran führen. Mit Zunahme des Membranpotentials würden in der Folge spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle (VDCC, *Voltage dependent Calcium Channels*) verschlossen. Die Herzmuskelzelle würde auf diese Weise vor einer Überladung mit potentiell zytotoxischen  $Ca^{2+}$ -Ionen geschützt (LIANG 1996, CAMERON und BAGHDADY 1994). Dieses Modell war schon recht gut entwickelt, es hatte jedoch einen gewissen „Denkfehler“. Dieser Denkfehler lag darin, dass es nach der präkonditionierenden Ischämie einer Reperfusionphase bedarf, die eine Reoxygenierung des Gewebes ermöglicht. Nur wenn die Reoxygenierung erfolgt, können sich ein Gedächtnis und der volle Schutz der ischämischen Präkonditionierung entwickeln. Hierfür ist offensichtlich Sauerstoff notwendig. Dies klingt paradox, aber warum das so ist, kann aus

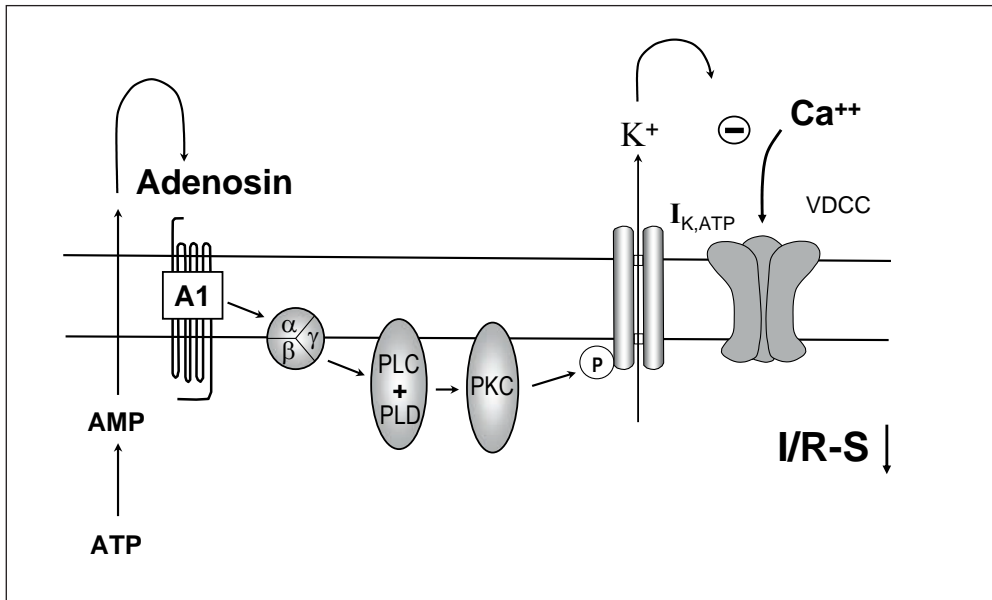


Abb. 1 Mechanismen der ischämischen Präkonditionierung – Stand der frühen 1990er Jahre. Nach Binden beispielsweise von Adenosin an den Adenosin-A1-Rezeptor kommt es über G-Protein-gekoppelte Proteine zur Signaltransduktion mit Stimulation der Phospholipasen C und D, die durch Phosphorylierung die Proteinkinase C aktivieren. Die stimulierte PKC phosphoryliert ihrerseits sarkolemmale ATP-sensitive K<sup>+</sup>-Kanäle und bewirkt deren Öffnung. Dies führt zu einem Ausstrom von K<sup>+</sup>-Ionen und bewirkt dadurch eine Hyperpolarisation der Zellmembran. Mit Zunahme des Membranpotentials werden „Voltage dependent Ca<sup>++</sup> Channels (VDCC)“ verschlossen, sodass die intrazelluläre Calciumkonzentration abnimmt. Die Reduktion der intrazellulären Calciumüberladung wurde letztlich als Ursache für die Protektion vor Ischämieperfusionsschäden durch ischämische Präkonditionierung betrachtet.

heutiger Sicht mit aktuellen Modellen zu den Mechanismen der ischämischen Präkonditionierung erklärt werden.

## 7. Die Mechanismen der Präkonditionierung aus heutiger Sicht

### 7.1 Die Ausbildung des protektiven Gedächtnisses

In den letzten Jahren wurden erhebliche Fortschritte in der Identifikation der Signalwege erzielt, über welche die klassischen Triggersubstanzen, die Opiode, Bradykinin und Adenosin, zur Bildung des protektiven Gedächtnisses führen. Hierbei bestehen zwischen Opioiden und Bradykinin gegenüber dem Adenosin gewisse Unterschiede (Abb. 2). Stark vereinfacht, bewirkt die Bindung von Opioidliganden an den zugehörigen Rezeptor eine Aktivierung des Enzyms Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) infolge Dimerisation und Transaktivierung von membrangebundenen „Epidermal Growth Factor Receptors (EGFRs)“. Die EGFR-Aktivierung ist dabei das Ergebnis einer Metalloproteinase-vermittelten Spaltung von „Heparin binding Epidermal Growth Factor“ aus einem membrangebundenem Vorläufermolekül (KRIEG et al. 2004a). Bradykinin kann ebenfalls nach Binden an seinen Rezeptor die PI3K aktivieren.

Die dazwischen liegenden Schritte sind noch nicht geklärt, erfordern jedoch nicht die Stimulation von EGFRs (COHEN et al. 2007). Unter Mitwirkung von phosphoinositolabhängigen Kinasen (PDK1/2) wird die Kinase AKT phosphoryliert und aktiviert (KRIEG et al. 2004b). Diese Kinase, auch Proteinkinase B genannt, vermag über die Stimulation der „Mitogen Activated Protein Kinase Kinase (MAPKK)“, MEK, die nachgeordnete MAPK ERK zu phosphorylieren und zu aktivieren. Dies führt zur Stimulation konstitutiv exprimierter NO-Synthase (OLDENBURG et al. 2004), welche über NO-Produktion und Guanylatzyklase abhängige cGMP-Produktion die Proteinkinase G stimuliert (COSTA et al. 2005). Die PKG vermag unter Beteiligung von Connexin und PKC- $\epsilon$  die Öffnung von ATP-sensitiven Kaliumkanälen in der inneren Mitochondrienmembran zu bewirken (FORBES et al. 2001). Die Öffnung von mitochondrialen ATP-sensitiven K<sup>+</sup>-Kanälen stellt dabei einen wichtigen Schritt dar. Er bewirkt nicht nur eine geringfügige Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials, sondern auch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im Mitochondrium. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind nicht geklärt. Es gilt jedoch als gesichert, dass es dieser moderate mitochondriale oxidative Stress ist, der schließlich zur Aktivierung der Proteinkinase C als letztem Schritt führt (KORICHNEVA et al. 2002). Dabei beinhaltet die aktivierte Form der PKC die Information im Sinne eines Gedächtnisses für die Induktion der Protektion mit Beginn der Reperfusion am Ende einer nachfolgenden schweren Ischämie.

Tatsächlich konnte in mehreren Untersuchungen gezeigt werden, dass die pharmakologische Präkonditionierung z. B. mit Morphin oder Bradykinin durch 5-Hydroxydecanoat, einem Inhibitor mitochondrialer ATP-sensitiver K<sup>+</sup>-Kanäle (mKATP), unterbunden wird (COHEN et al. 2001). Darüber hinaus wurde in diesen Untersuchungen gezeigt, dass Mercaptopropionylglyzin (MPG), ein potenter Radikalfänger, den Schutzeffekt der ischämischen Präkonditionierung eliminiert. Diese Befunde legen den Schluss nahe, dass für die Ausbildung des protektiven Gedächtnisses der ischämische Präkonditionierung die Bildung von Sauerstoffradikalen notwendig ist. Im Gegensatz dazu hatte weder 5-HD noch MPG einen Einfluss auf die pharmakologische Präkonditionierung mittels Adenosin oder dem Adenosin-A1-Rezeptoragonisten PIA (COHEN et al. 2001). Dies bedeutet, dass Adenosin offensichtlich weitgehend unabhängig von der Öffnung mK<sub>ATP</sub>s und der damit assoziierten ROS-Bildung die PKC über die Stimulation der Phospholipasen C bzw. D direkt stimulieren kann. Insgesamt verdeutlichen diese Befunde, dass die ischämische Präkonditionierung auf unterschiedlichen, aber im Ergebnis redundanten Wegen erzielt werden kann. Das macht Sinn, denn wenn es um das Überleben geht, dann sollte dieses nicht gefährdet sein, wenn der eine oder der andere Weg ausfällt oder beeinträchtigt ist.

## 7.2 Die Pathobiochemie des Ischämier reperfusionsschadens

Um die molekularen Vorgänge besser verstehen zu können, deren Aktivierung infolge ischämischer Präkonditionierung zu einem Schutz der Zelle vor dem nekrotischen oder apoptotischen Tod führt, bedarf es einer kurzen Betrachtung der Initialmechanismen der Schädigung durch Ischämier reperfusion im *nicht präkonditioniertem* Gewebe. Bei Ischämie führt die Reduktion bzw. das Erliegen der Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung zur ATP-Depletion. Kompensatorisch ist die Energiegewinnung durch die anaerobe Glykolyse gesteigert, mit einem erhöhtem Anfall von H<sup>+</sup>-Ionen im Zytosol. Über den Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher gelangen vermehrt Na<sup>+</sup>-Ionen in die Zelle (MURPHY et al. 1991). Die Na<sup>+</sup>-Ionen können über den Austausch mit Ca<sup>2+</sup>-Ionen über den gleichnamiger Austauscher aus dem Zytosol

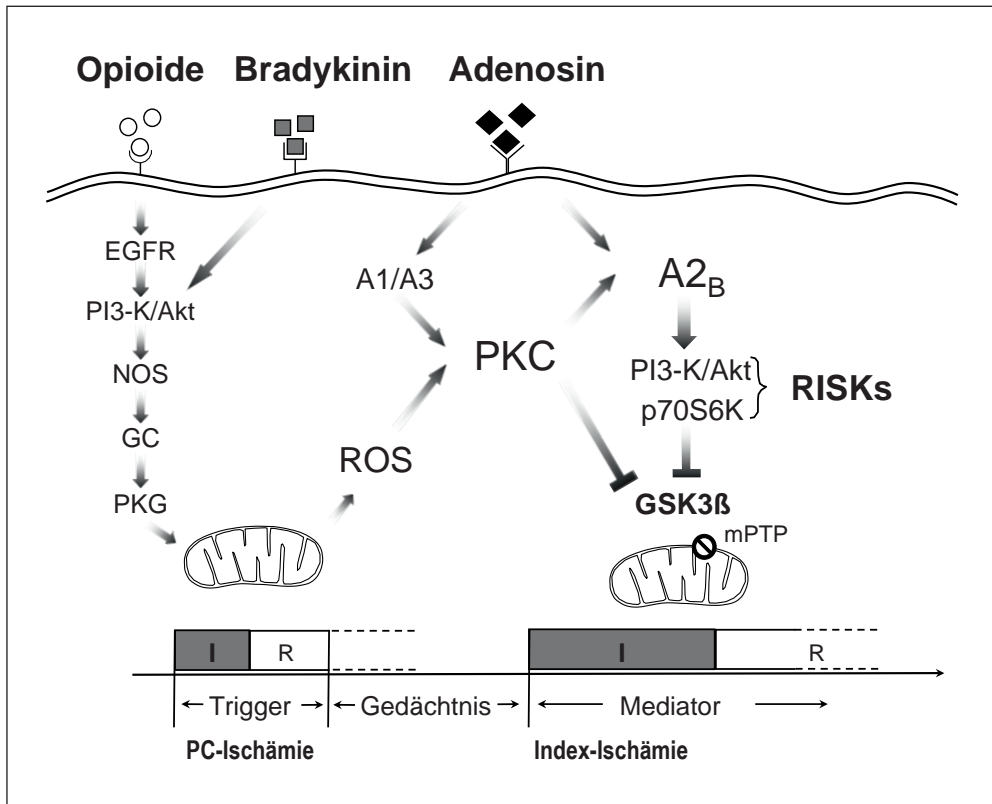


Abb. 2 Mechanismen der ischämischen Präkonditionierung – Kenntnisse heute. Während einer kurzen Phase einer Ischämie (I) und anschließender Reperfusion (R) zur Präkonditionierung, sogenannte präkonditionierende Ischämie (PC-Ischämie; siehe unten), werden endogene Opiode, Bradykinin und Adenosin gebildet. Diese binden an ihre entsprechenden Rezeptoren, welchen die Signaltransduktion über G-Protein-gekoppelte Proteine gemeinsam ist. Während Opioidrezeptoren *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR)-abhängig unter Transaktivierung von src-Tyrosinkinasen den Phosphoinositolkinase-3(PI3K)/Akt-Kinase-Signalweg aktivieren, erfolgt die Stimulation des PI3K/Akt-Signalweges durch Bradykinin EGFR-unabhängig. Es folgt die Aktivierung von NO-Synthase (NOS) und über NO->cGMP die Stimulation der Proteinkinase G (PKG). Die PKG induziert die Öffnung ATP-sensitiver Kaliumkanäle in der inneren Mitochondrienmembran und bewirkt hierdurch eine geringfügige Depolarisation mit der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). ROS sind starke Stimulatoren der Proteinkinase C (PKC), die in ihrer aktivierten Form die Information einer vorausgegangenen Präkonditionierung im Sinne eines Gedächtnisses trägt. Da ROS nur bei Verfügbarkeit von Sauerstoff gebildet werden, erklärt dies die Notwendigkeit einer kurzen Reperfusion, um ein protektives Gedächtnis auszubilden. Im Gegensatz dazu kann Adenosin unabhängig von der Öffnung mitochondrialer ATP-sensitiver K<sup>+</sup>-Kanäle und der ROS-Produktion die PKC direkt stimulieren. Nach einer schweren Ischämie (Index-Ischämie) kommt es im Falle einer vorangegangenen ischämischen Präkonditionierung in der Phase der Reperfusion zur Stimulation von „pro survival kinases“, den sogenannten „Reperfusion Injury Survival Kinases (RISK)“. Alle diese Kinasen haben mit der PKC gemeinsam, dass sie die Glykogen-Synthetase-3β (GSK-3β) phosphorylieren. Durch die Phosphorylierung der GSK-3β wird deren Aktivität gehemmt und die Öffnung von mitochondrialen „Permeability Transitionpores (mPTP)“ vermindert. Hierdurch wird das Ausmaß des Ischämie-reperfusionsschadens in präkonditioniertem Gewebe erheblich reduziert. Verstärkt werden kann die Stimulation der „pro survival kinases“ durch die Aktivierung von Adenosin-A<sub>2B</sub>-Rezeptoren. A<sub>2B</sub>-Rezeptoren sind niederaffin und werden deshalb erst bei hohen Adenosinkonzentrationen stimuliert. Die Affinität der A<sub>2B</sub>-Rezeptoren wird jedoch nach Phosphorylierung durch die während der Präkonditionierung aktivierte PKC wesentlich erhöht, sodass die aktivierte PKC die A<sub>2B</sub>-Rezeptor-abhängige Stimulation der RISKs wesentlich steigern kann. Adenosin ist damit Trigger und Mediator des Schutzeffektes bei der ischämischen Präkonditionierung.



entfernt werden, allerdings zum Preis des vermehrten Einstroms von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in das Zellinnere. In der Situation eines Energiedefizits können zudem ATP-abhängige Mechanismen der  $\text{Na}^+$ - und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase nicht adäquat erfolgen (Erliegen der  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase und der  $\text{CA}^{2+}$ -ATPase). Die Folgen sind eine zunehmende Azidifizierung und Calciumüberladung der Zelle. Eine weitere Ursache des ATP-Verbrauchs liegt in der umgekehrten Funktionsweise der F1F0ATPase in der inneren Mitochondrienmembran. Ungefähr 50% des durch anaerobe Glykolyse gewonnenen ATPs werden hierfür verbraucht, um das Membranpotential ( $\Delta\psi$ ) im Mitochondrium annähernd aufrechtzuerhalten (JENNINGS et al. 1991). Dieser Kompensationsmechanismus ist mitverantwortlich für den Einstrom der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über den mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter. Darüber hinaus sprechen einige Befunde dafür, dass es auch zu einer Umkehr in der Funktion des mitochondrialen  $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$ -Tauschers während Ischämie kommt, ebenfalls mit dem Ergebnis des verstärkten Einstroms zytosolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in den mitochondrialen Matrixraum. Während Ischämie kommt es damit zu einer Abnahme der ATP-Konzentration, zu einem Abfall des pH-Wertes, zu einer Überladung mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und zu einer Verminderung des mitochondrialen Membranpotentials. Die Bildung von Sauerstoffradikalen spielt während der Ischämie jedoch nur eine untergeordnete Rolle.

Mit der Reperfusion hingegen nimmt die Produktion von Sauerstoffradikalen im Zytosol also auch im Mitochondrium stark zu. Zudem steigt der pH-Wert wieder an. Diese Konstellation einer erhöhten ROS-Produktion und einer nun wieder beginnenden Abnahme der freien Protonenkonzentration begünstigt bei der inzwischen erfolgten  $\text{Ca}^{2+}$ -Akkumulation die Öffnung von großmolekularen Poren in der Mitochondrienmembran (HAUSENLOY et al. 2004, JUHASZOVA et al. 2004). Bis heute ist der Aufbau dieser Poren, der sogenannten mitochondrialen *Permeability Transition Pores* (mPTPs), nicht vollständig verstanden (JUHASZOVA et al. 2008). Man nimmt an, dass diese aus drei Komponenten bestehen: einem „Voltage Dependent Anion Channel (VDAC)“ in der äußeren Mitochondrienmembran, der „Adenin Nucleotide Translocase (ANT)“ in der inneren Mitochondrienmembran und mitochondrialem Cyclophilin an der Innenseite der inneren Mitochondrienmembran.

Mit der Öffnung der mPTPs strömen verstärkt  $\text{Na}^+$ -,  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und Wasser in das Innere des Mitochondriums ein. Das Membranpotential bricht zusammen, die oxidative Phosphorylierung kommt zum Erliegen. Durch Schwellung der Mitochondrien kann die äußere Membran der Organellen zerreißen, und aus dem mitochondrialen Intermembranraum werden proapoptotische Faktoren wie das Cytochrom C in das Zytosol freigesetzt. In Abhängigkeit der Ausprägung dieser Vorgänge resultiert der Tod der Zelle, wobei sich das Spektrum von der Nekrose bis zur Apoptose erstrecken kann. Doch über welche Mechanismen wird in präkonditionierten Zellen die Öffnung der mPTPs verhindert?

### 7.3 Die Schutzmechanismen in der Reperfusion

Ursprünglich nahm man an, dass die ischämische Präkonditionierung die Verarmung der Zellen an ATP während der Ischämie vermindert und so ihre schützende Wirkung entfaltet (MURRY et al. 1991). Diese Auffassung wurde jedoch durch Befunde von HAUSENLOY herausgefordert. Die Ergebnisse HAUSENLOYS legten den Schluss nahe, dass die ischämische Präkonditionierung vor allem erst nach der Ischämie, d. h. mit Beginn der Reperfusion, protektiv wirkt. So konnte gezeigt werden, dass die ischämische Präkonditionierung die PI3K-Akt als auch die MEK1/2-ERK1/2-Kaskade und die  $\text{p}70^{\text{S6K}}$ -Kinase in der Reperfusion aktiviert, und dass bereits die pharmakologische Hemmung von nur einer der genannten Signalkaskaden in der frü-

hen Phase der Reperfusion die Protektion durch die ischämische Präkonditionierung beseitigte (HAUSENLOY et al. 2005). Diese Befunde waren insofern revolutionär, als sie die Möglichkeit beinhalteten, bei Patienten, die mit einem Gefäßverschluss in die Klinik kommen, protektive Signalkaskaden der ischämischen Präkonditionierung pharmakologisch zu aktivieren – und dies vor allem bevor man therapeutisch reperfundiert. In der Tat gibt es eine Vielzahl von Substanzen (siehe Abschnitt 9. Postkonditionierung), die bei Applikation kurz vor oder mit Beginn der Reperfusion in der Lage sind, das Myokard zu schützen. All diesen Substanzen ist die Stimulation der oben genannten Signalkaskaden gemeinsam. HAUSENLOY bezeichnete die in der frühen Reperfusion IPC-abhängig stimulierten und protektiv wirksamen Kinasen mit dem Überbegriff der *Prosurvival*-Kinasen (HAUSENLOY et al. 2005). Heute werden sie auch unter den *Reperfusion-Injury-Survival*-Kinasen (RISK) zusammengefasst. Ihnen gemeinsam ist ein Substrat, das ein Enzym darstellt. Es handelt sich dabei um die Glykogensynthasekinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ). Die GSK-3 $\beta$  repräsentiert eine von zwei Isoformen ( $\alpha$  und  $\beta$ ) des gleichnamigen Enzyms. Die GSK-3 $\beta$  wird konstitutiv mit relativ höherer Aktivität gegenüber der GSK-3 $\alpha$ -Form in Kardiomyozyten exprimiert. Neben den RISKS wird die GSK-3 $\beta$  insbesondere auch durch die PKC phosphoryliert, aber auch andere übergeordnete Kinasen, wie die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), können die GSK-3 $\beta$  phosphorylieren. Durch die Phosphorylierung der GSK-3 $\beta$  wird das Enzym inaktiviert. Dies wurde als ein wichtiger Schritt bei der Protektion durch ischämische Präkonditionierung aufgezeigt (TONG et al. 2002). Die Inaktivierung der GSK-3 $\beta$  bewirkt dabei über bis heute noch nicht geklärte Mechanismen eine Verzögerung der Öffnung der mPTPs in der Reperfusion. In eleganten Untersuchungen zeigte HAUSENLOY tatsächlich auch erstmals, dass es durch die ischämische Präkonditionierung zu einer Hemmung der Öffnung von mPTPs kommt (HAUSENLOY et al. 2004). JUHASZOVA demonstrierte nach Inhibition der GSK-3 $\beta$ -Enzymexpression durch „knock-down“ mittel siRNA eine signifikante Steigerung der Zeitspanne bis zur ROS-induzierbaren Öffnung von mPTP in neonatalen Kardiomyozyten (JUHASZOVA et al. 2004). Die zentrale Rolle einer Hemmung der Aktivität der GSK-3 $\beta$  wurde darüber hinaus in Untersuchungen bestätigt, in welchen Kardiomyozyten von transgenen Mäusen verwendet wurden, die in Position 9 des Enzyms eine gezielte Mutation für Ser-9 durch Ersatz mit Alanin aufwiesen. Die GSK-3 $\beta$ S9A-Mutante stellt eine signalresistente Form dar, die ständig aktiv bleibt, da sie nicht phosphoryliert und damit nicht inaktiviert werden kann. Während Zellen aus Wildtypmäusen hypoxisch präkonditioniert werden konnten, war eine hypoxische Präkonditionierung von Zellen aus GSK-3 $\beta$ S9A-Mutanten nicht mehr möglich (HAUSENLOY et al. 2004).

Die phosphorylierungsabhängige Inaktivierung der GSK-3 $\beta$  repräsentiert damit einen essentiellen Schritt, auf welchen viele verschiedene kardioprotektive Signalwege konvergieren.

Die GSK-3 $\beta$  vermag zudem selbst viele Substrate zu phosphorylieren. Dazu zählen eine große Zahl an Transkriptionsfaktoren, Kinasen und andere Enzyme (MURPHY und STEENBERGEN 2005). Die GSK-3 $\beta$  bevorzugt dabei Substrate, die bereits durch andere Kinasen phosphoryliert wurden („sogenannte gepriimte Substrate“). Diese Präferenz für „gepriimte Substrate“ lässt eine integrative Rolle der GSK-3 $\beta$  für multiple Signalwege erkennen. Unter anderem wird der pro-apoptotische Faktor BAX durch die GSK-3 $\beta$  phosphoryliert und seine Translokation in Mitochondrien induziert. Durch Inaktivierung der GSK-3 $\beta$  wird die Phosphorylierung von BAX vermindert. Es gibt darüber hinaus viele andere Enzyme aus dem Metabolismus, die durch die GSK-3 $\beta$  phosphoryliert werden. Angesichts dieser großen Vielfalt an Substraten der GSK-3 $\beta$  ist es schwierig, die Mechanismen zu identifizieren, die nach Inaktivierung der GSK-3 $\beta$  zur Kardioprotektion führen. Da die Hemmung der Aktivität der GSK-3 $\beta$  die Öffnung

mitochondrialer PTPs verzögert, erscheint es vielversprechend, die Interaktion des Enzyms mit weiteren mitochondrialen Zielstrukturen genauer zu analysieren. Dabei sind viele direkte und indirekte Interaktionen zwischen der GSK-3 $\beta$  und mPTPs vorstellbar.

## **8. Amplifikation der Aktivierung von RISKS durch die PKC-abhängige Aktivierung des Adenosin-A<sub>2B</sub>-Rezeptors**

Die ischämische Präkonditionierung entfaltet ihre protektive Wirkung innerhalb der ersten Minuten der Reperfusion. Vor diesem Zeitpunkt ist es zur Entwicklung eines protektiven Gedächtnisses gekommen, das u. a. von der Bildung von ROS und der Aktivierung der PKC abhängt. Die PKC kann jedoch nicht nur die GSK-3 $\beta$  direkt phosphorylieren, sondern vermag auch auf eine indirekte Weise dieses Schlüsselereignis zu stimulieren. So wurde gezeigt, dass eine pharmakologische Stimulation von A<sub>2B</sub>-Rezeptoren die protektive Kaskade der RISKS aktivieren kann (PHILIPP et al. 2006). A<sub>2B</sub>-Rezeptoren sind jedoch niederaffine Rezeptoren, die nur bei hohen Konzentrationen von Adenosin (> 2 – 20  $\mu$ M) stimuliert werden. Wenngleich eine Ischämie zu hohen Konzentrationen von Adenosin in der Reperfusion führt, reichen diese kaum aus, um A<sub>2B</sub>-Rezeptoren im größeren Umfang zu aktivieren. Aber kann daran eine vorhergehende ischämische Präkonditionierung etwas ändern? Mögliche Antworten auf diese Frage könnten sein, dass eine ischämische Präkonditionierung die Adenosinkonzentrationen während der Reperfusion noch stärker ansteigen lässt oder die Empfindlichkeit der A<sub>2B</sub>-Rezeptoren für Adenosin steigert. Gegen Ersteres spricht die Beobachtung, dass nach einer ischämischen Präkonditionierung die ATP-Konzentrationen im Gewebe während der nachfolgenden Ischämie besser aufrechterhalten werden. Für eine Erhöhung der Sensitivität des A<sub>2B</sub>-Signalweges sprechen hingegen Befunde, die zeigen, dass eine Protektion durch Infusion von Phorbolmyristateacetate (PMA), einem starken Aktivator der PKC, zum Zeitpunkt der Reperfusion durch den A<sub>2B</sub>-Rezeptorantagonisten MRS1754 (KUNO et al. 2007) aufgehoben wird. Dies spricht dafür, dass die Aktivierung der PKC der Stimulation von A<sub>2B</sub>-Rezeptoren vorausgeht. Folgerichtig bedeutet dies, dass die Sequenz der Aktivierung der PKC und der Adenosinrezeptoren in der Reperfusion umgekehrt zu ihrer Abfolge in der Triggerphase erfolgt.

Unterstützt wird diese Schlussfolgerung durch Experimente, in welchen A<sub>2B</sub>-Rezeptoren mit dem hochpotenten Adenosinrezeptor-Agonisten NECA stimuliert wurden. Wenngleich NECA ein unspezifischer Adenosinrezeptor-Agonist ist, wurde er noch bis vor kurzem in der Adenosinrezeptorforschung zur Stimulation von A<sub>2B</sub>-Rezeptoren eingesetzt. Bei Behandlung von nicht ischämischen Herzen mit NECA konnten die RISKS Erk-1/2, PI3K und p70S6K aktiviert werden, und es stellte sich die Frage, ob durch Vorbehandlung mit PMA oder durch ischämische Präkonditionierung die Empfindlichkeit des Myokards gegenüber NECA noch weiter gesteigert wird. Die Behandlung von nicht ischämischem Myokard mit PMA oder ischämischer Präkonditionierung alleine hatte keinen Einfluss auf die Stimulation der RISK-Signalwege. In beiden Fällen der Vorbehandlung führte dies jedoch zu einer ausgeprägten Reduktion der Konzentration von NECA, die für eine Stimulation von RISKS notwendig war.

Basierend auf diesen Befunden wurde der Schluss gezogen, dass die Protektion durch ischämische Präkonditionierung auf einer Aktivierung der PKC beruht, die die Empfindlichkeit des Herzens gegenüber Adenosin in der Reperfusion erhöht, sodass endogen gebildetes Adenosin an A<sub>2B</sub>-Rezeptoren mit wesentlich höherer Affinität binden und die Kaskade der

RISKS verstärkt stimulieren kann. Tatsächlich konnte eine Steigerung der Sensitivität der A<sub>2B</sub>-Rezeptoren durch die PKC-abhängige Phosphorylierung als dem zugrundeliegenden Mechanismus aufgezeigt werden (KUNO et al 2007). Damit ist Adenosin nicht nur Trigger, sondern auch Mediator der Protektion durch die ischämische Präkonditionierung.

## 9. Postkonditionierung

Jüngste Untersuchungen bestätigen, dass der A<sub>2B</sub>-Rezeptor eine wichtige Funktion in der Vermittlung des Schutzeffektes der ischämischen Präkonditionierung am Herzen (ECKLE et al. 2007) und der Niere (GRENZ et al. 2007) spielt. Bei der Protektion der Leber durch hypoxische Präkonditionierung sind A<sub>2B</sub>-Rezeptoren ebenfalls von großer Bedeutung. Aufgrund der PKC-abhängigen Phosphorylierung des A<sub>2B</sub>-Rezeptors und dessen Affinitätszunahme für Adenosin, insbesondere in der Reperfusion, erstaunt es nicht, dass es zunehmend mehr Hinweise dafür gibt, dass dieser Rezeptortyp auch beim Phänomen der Postkonditionierung eine erhebliche Rolle spielt. Unter dem Phänomen der ischämischen Postkonditionierung (PostC) versteht man den Schutz vor Reperfusionsschäden durch die wiederholte Applikation kurzer Ischämien während der Reperfusion nach einer andauernden Ischämie. Im Gegensatz zur ischämischen Präkonditionierung sind jedoch die Unterbrechungen der Reperfusion wesentlich kürzer und betragen in der Regel weniger als 60 s (PENNA et al. 2008). Man könnte auch von einer Art modifizierten Reperfusion sprechen. Bemerkenswert ist, dass der Schutzeffekt durch Postkonditionierung im Übrigen genauso stark ausgeprägt sein kann, wie er durch Präkonditionierung erzielbar ist (ZHAO et al. 2003). Von großer klinischer Bedeutung an der Postkonditionierung ist, dass diese Art der Reperfusion auch erst nach einer bereits eingetretenen Ischämie, d. h. also erst mit Beginn der Reperfusion, Mechanismen in Gang setzt, die einen Schutz vor weiteren Schäden ermöglichen. Die Stimulation von Adenosin-A<sub>2B</sub>-Rezeptoren erscheint hierfür vielversprechend zu sein, nachdem deren Aktivierung als ursächlich für die RISK-abhängige Protektion bei der Postkonditionierung von mehreren Gruppen aufgezeigt wurde (PHILIPP et al. 2006, KUNO et al. 2007).

## 10. Das *Second Window of Protection*

Nach erfolgter ischämischer Präkonditionierung besteht der anti-ischämische Schutz nur für eine begrenzte Dauer von ca. 1 h. Danach geht die Protektion wieder verloren. Dieser ungeschützten Phase folgt ca. 12 h später eine zweite Phase, in welcher erneut das zuvor präkonditionierte Organ vor den Folgen einer Ischämie/Reperfusion geschützt ist. Man spricht von einem zweiten Fenster der Protektion („Second Window of Protection, SWOP“) (YELLON und BAXTER 1995). Zwischen beiden Phasen der Protektion bestehen grundlegende Unterschiede. Der Schutz durch die klassische ischämische Präkonditionierung setzt rasch, d. h. innerhalb von Minuten ein. Er ist stark ausgeprägt, hält allerdings – wie bereits erwähnt – nur für 1 bis 2 h an. Der Schutz im zweiten Zeitfenster entwickelt sich erst nach 12 bis 24 h, ist schwächer wirksam, hält jedoch bis zu 3 Tage lang an. Die klassische ischämische Präkonditionierung ist von der Synthese von Proteinen unabhängig und beruht, wie dargestellt, auf der Aktivierung von Signalkaskaden durch Kinasen und somit auf der posttranslationalen Modifizierung von Proteinen durch Phosphorylierung und deren Translokation zwischen räumlichen bzw. funktionell unter-

schiedlichen Kompartimenten innerhalb der Zelle. Die Protektion im SWOP basiert hingegen auf der *De-novo*-Synthese von Enzymen. Sie kann damit durch Inhibitoren der Proteinbiosynthese, z. B. durch Cycloheximid, gehemmt werden. So bewirken die Trigger der ischämischen Präkonditionierung nicht nur eine schnelle Stimulation protektiver Signalwege im Sinne der klassischen Protektion, sondern auch eine mehr Zeit benötigende Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie NfκB, AP-1 oder des JAK/STAT-Signalweges, die nach Translokation in den Zellkern zu einer erhöhten Expression von Enzymen führen. Diese Enzyme schützen, indem sie anti-oxidativ wirken oder die Aktivität von Stoffwechselprozessen steigern, deren Produkte zytoprotektive Wirkungen besitzen. Neben der Expression von Superoxiddismutase, Gluthathionperoxidase usw. ist vor allem die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) für die Ausbildung der Protektion im SWOP wichtig. Der Bildung von NO kommt dabei eine wichtige Rolle in der Expression weiterer, nachgeordneter Enzyme mit zytoprotektiven Wirkungen zu. Eine kostimulierende Wirkung von NO auf die Expression der Cyclooxygenase Typ 2 (COX-2) und der Hämoxigenase – 1 (HO-1) wurde aufgezeigt und wirkt zusätzlich protektiv. Die Mechanismen des SWOP sind damit bei weitem nicht dargestellt; dies würde den Rahmen dieser kurzen Übersicht sprengen. Der interessierte Leser findet weiterführende Informationen in den Übersichtsarbeiten von PAGLIARO et al. (2001) bzw. DAS und DAS (2008).

## 11. Aktuelle Mechanismen und neueste Erkenntnisse

### 11.1 Hypoxie-induzierbarer Faktor 1: O<sub>2</sub>-Sensor und Adapter des Organismus an Hypoxie

Der Hypoxie-induzierbare Faktor 1 (HIF-1) ist ein Transkriptionsfaktor, der zugleich als ein biologischer Sensor für Sauerstoff entdeckt wurde (WANG et al. 1995). HIF-1 erlaubt einem aeroben Organismus, sich durch Veränderung seiner Genexpression an eine Hypoxie anzupassen. HIF-1 besteht aus zwei Untereinheiten. Die HIF-1 $\alpha$ -Untereinheit ist O<sub>2</sub> labil, denn sie enthält eine O<sub>2</sub>-abhängige Abbaudomäne. Unter Normoxie führt der verfügbare Sauerstoff zur Hydroxylierung der Aminosäure Prolin an zwei Positionen in der  $\alpha$ -Untereinheit, sodass sie nach der Von-Hippel-Lindau-Faktor-abhängigen Ubiquitinierung im Proteasom abgebaut werden kann. Unter hypoxischen Bedingungen unterbleibt die O<sub>2</sub>-abhängige Prolylhydroxylierung und damit der Abbau der HIF-1 $\alpha$ -Untereinheit mit Stabilisierung des Faktors. Nach Dimerisation der unter Hypoxie stabilisierten HIF-1 $\alpha$ -Untereinheit mit der konstitutiv exprimierten HIF-1 $\beta$ -Untereinheit entsteht der Transkriptionsfaktor HIF-1. Seine Hauptaufgabe ist die Transkription von Genen, die über Veränderungen des Sauerstofftransportes, des Stoffwechsels und der Inflammation eine Anpassung des Organismus an eine Hypoxie ermöglichen. Die Hochregulation der Erythropoese über die Expression des Hormons Erythropoetin führte 1992 zur Entdeckung von HIF-1. Über die transkriptionelle Steigerung der VEGF-Expression verbessert HIF-1 die Vaskularisation und damit die Perfusion im Gewebe. Schlüsselenzyme des anaeroben Stoffwechsels unterliegen ebenfalls seiner transkriptionellen Regulation. Weitere HIF-1 abhängig bei Ischämie/Reperfusion exprimierte und protektiv wirksame Enzyme sind die iNOS, HO-1 und COX-2 (KENNETH und ROCHA 2008). Darüber hinaus spielt HIF-1 eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellen des unspezifischen und spezifischen Immunsystems (SITKOVSKY et al. 2004). Wenngleich die Funktionen von polymorphkernigen Leukozyten bei Fehlen von HIF-1 infolge Hemmung der anaeroben Energiegewinnung stark beeinträchtigt werden, führt die konditionale Elimination des Tran-

skriptionsfaktors zu einer Enthemmung der Funktionen von T-Zellen mit überschießender Zytokinproduktion und inflammatorischen Gewebeschäden. Da zunehmend mehr Befunde für eine Aktivierung von T-Zellen als eine weitere Ursache für die Entwicklung inflammatorischer Gewebeschäden infolge Ischämie/Reperfusion sprechen (LINFERT et al. 2009), dürfte die suppressive Wirkung von HIF-1 auf die adaptive Immunität eine weitere protektive Wirkung sein (THIEL et al. 2005). Alle diese Befunde weisen dem Transkriptionsfaktor HIF-1 eine wichtige Rolle für die Expression von protektiv wirksamen Genen, insbesondere für die Entwicklung einer verzögerten Schutzwirkung im SWOP nach hypoxischer (HPC) oder ischämischer Präkonditionierung zu. Darüber hinaus spielt HIF-1 auch bei der kurzfristigen Adaptation des Myokards an eine Ischämie im Sinne der klassischen Präkonditionierung eine erst vor kurzem beschriebene Rolle (CAI et al. 2008). Die Arbeitsgruppe um SEMENZA, dem Erstentdecker von HIF-1 als Transkriptionsfaktor für die Hypoxie-abhängige Expression von Erythropoetin (WANG et al. 1995), zeigte, dass HIF-1 in der Triggerphase für die Entstehung von ROS in den Mitochondrien unerlässlich ist. Die HIF-1-abhängige ROS-Produktion resultiert in einer verstärkten Aktivierung der RISKs, gemessen an der gesteigerten Phosphorylierung der AKT (Proteinkinase B). Dementsprechend konnte demonstriert werden, dass der im Vergleich zu Wildtyptieren in partiell für die Expression von HIF-1 defizienten, heterozygoten Tieren (HIF-1 +/-) zu beobachtende vollständige Verlust der durch ischämische Präkonditionierung induzierbaren Kardioprotektion mit einer verminderten mitochondrialen ROS-Produktion, PTEN-Oxidation und AKT-Phosphorylierung einhergeht (CAI et al. 2008). PTEN steht für Phosphatasen aus der Familie der „Phosphatasen and Tensin Homolog deleted on Chromosome Ten“ (PTEN). PTEN dephosphoryliert das von der PI3K gebildete IP3, welches die „Phosphoinositide dependent Kinases 1/2 (PKD1/2)“ aktiviert. Letztere Kinasen sind für die Phosphorylierung und damit für die Aktivierung der RISKs verantwortlich. Die PTENs wirken somit als Gegenspieler zu den durch ischämische Präkonditionierung induzierbaren RISKs. Aus ROS wie Superoxidanionen gebildetes Wasserstoffperoxid  $H_2O_2$  oxidiert besonders leicht Sulfhydrylgruppen im katalytischen Zentrum von PTEN und verursacht unter Ausbildung von Disulfidbrücken deren Inaktivierung (LEE et al. 2002). Da die Aktivierung von RISKs eine maßgebliche Rolle bei der Ausbildung der Protektion durch ischämische Präkonditionierung spielt, stellt die Inaktivierung von PTENs durch ROS neben der Stimulation der PKC in der Triggerphase einen weiteren Mechanismus für die Entwicklung eines protektiven Gedächtnisses bei der ischämischen Präkonditionierung dar (CAI und SEMENZA 2005; siehe auch Mechanismen der Präkonditionierung aus heutiger Sicht). Im Gegensatz zu den HIF-1-abhängigen Mechanismen der ROS-Produktion blieb die von der mitochondrialen Bildung von Sauerstoffradikalen unabhängige Präkonditionierung mit Adenosin bei partieller Suppression der HIF-1-Expression unbeeinträchtigt (CAI et al. 2008). Diese neuesten Ergebnisse lassen damit folgende Schlussfolgerungen zu:

- HIF-1 ist an der akuten und der verzögerten Ausbildung einer Protektion nach ischämischer Präkonditionierung beteiligt.
- HIF-1 ist Teil des mitochondrialen ROS-abhängigen Signalweges der klassischen Präkonditionierung.
- Vom HIF-1-mitochondrialen ROS-abhängigen Signalweg ist der von der mitochondrialen ROS-Produktion unabhängige Adenosinrezeptor-Signalweg zu unterscheiden. Dabei ist nicht geklärt, welche Bedeutung die beiden Wege relativ zueinander einnehmen. Ebenso ist unklar, ob HIF-1 über die Öffnung von ATP-sensitiven  $K^+$ -Kanälen in der inneren Mitochondrienwand die Bildung von ROS induziert.

## 11.2 Besondere Trigger

In Einklang mit der Rolle des Hypoxie-induzierbaren Faktors (HIF-1) als Regulator adaptiver transkriptioneller protektiver Antworten des Organismus in Reaktion auf eine Hypoxie steht die Bildung von Erythropoietin (WANG und SEMENZA 1993). So zeigten für HIF-1 $\alpha$  heterozygote Tiere im Vergleich zu Wildtyptieren keinen Anstieg der systemischen Erythropoietinkonzentrationen im Blut nach 30-minütiger hypoxischer Präkonditionierung (CAI et al. 2003). Während 24 h später aus Wildtyptieren entnommene Herzen gegenüber einer schweren Ischämie geschützt waren, zeigten hypoxisch vorbehandelte Herzen aus HIF-1 partiell defizienten Tieren keine Reduktion des Infarktareals. Der in HIF-1(+/-)-Mäusen fehlende Schutzeffekt konnte jedoch durch pharmakologische Präkonditionierung mit exogen zugeführtem Erythropoietin vollständig wieder erzielt werden. Neben Erythropoietin können auch Endocannabinoide eine Protektion im Sinne der Präkonditionierung induzieren (PACHER und HASKO 2008). So existieren gute Hinweise darauf, dass Endocannabinoide, wie Anandamid oder 2-Arachidonoylglycerol, während Ischämie/Reperfusion vermehrt gebildet werden. Diese endogenen Produkte werden einerseits bei überschießender systemischer Produktion, z. B. bei einem Schockgeschehen, für die hämodynamische Instabilität als mitursächlich betrachtet, andererseits können sie über die Stimulation von Cannabinoid-CB1- und insbesondere von -CB2-Rezeptoren protektive Effekte im Sinne der Präkonditionierung auslösen (PACHER und HASKO 2008). So konnte kürzlich im Modell des „remote preconditioning“ gezeigt werden, dass der anti-ischämische Effekt einer transienten präkonditionierenden Ischämie/Reperfusion des Darmes durch vorhergehende Applikation eines CB2-Rezeptorantagonisten, nicht jedoch eines CB1-Rezeptorantagonisten auf die Ausdehnung eines nachfolgenden Myokardinfarktes vollständig aufgehoben wurde (HAJRASOULIHA et al. 2008).

## 12. Ungeklärte Fragen und Ausblick

Wenngleich während der letzten zehn Jahre erhebliche Fortschritte im Verständnis der Mechanismen gemacht wurden, die dem Phänomen der klassischen Prä- und Postkonditionierung zugrunde liegen, gibt es selbst auf dem Weg der bis heute erreichten Einsichten und Modelle viele methodische Unsicherheiten und offene Fragen. Diese betreffen letztlich jeden Abschnitt der Präkonditionierung, angefangen von der Triggerphase bis hin zur Mediatorphase. So wurde die Existenz von ATP-sensitiven K<sup>+</sup>-Kanälen eindeutig in der äußeren Zellmembran, nicht jedoch zweifelsfrei in der inneren Mitochondrienmembran nachgewiesen. In diesem Zusammenhang muss auch die Frage nach der Selektivität von 5-Hydroxydecanoat erhoben werden, dessen Wirkungen als Folge der Blockade von mitochondrialen ATP-sensitiven K<sup>+</sup>-Kanälen gelten. Schließlich muss man davon ausgehen, dass der GSK-3 $\beta$  sicherlich eine wichtige, aber nicht eine alleinige Mediatorfunktion bei der Protektion durch ischämische Präkonditionierung zukommt. Darüber hinaus erfordern jüngste Untersuchungen mit *Knock-out*-Mäusen eine Überarbeitung des Bildes vom Aufbau der mitochondrialen *Permeability Transition Pore* (mPTP) (JUHASZOVA et al. 2008). Dabei ist der Stellenwert der Grundlagenforschung nicht hoch genug einzustufen, denn nur auf der Basis eindeutig identifizierter molekularer Zielstrukturen und Mechanismen können Pharmaka entwickelt werden, die alleine oder in Kombination, ein „Anschalten“ protektiver Signalwege ermöglichen. Wünschenswert wäre hierbei je nach klinischer Situation des Patienten, entweder in Erwartung oder bei bereits eingetretenem ischämischen Ereignis präventiv bzw. therapeutisch anti-ischämische Wirkungen

mit Hilfe der pharmakologischen Prä- und Postkonditionierung zu erzielen. Angesichts der hohen protektiven Wirksamkeit des Phänomens der ischämischen Präkonditionierung und des daraus potentiell zu ziehenden klinischen Nutzens wird es sich lohnen, die molekularen Mechanismen der Präkonditionierung zu erforschen, nicht zuletzt um zu erfahren, „wie es die Natur tatsächlich macht“.

## Literatur

- BANERJEE, A., LOCKE-WINTER, C., ROGERS, K. B., MITCHELL, M. B., BREW, E. C., CAIRNS, C. B., BENSARD, D. D., and HARKEN, A. H.: Preconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion by an alpha 1-adrenergic mechanism. *Circ. Res.* 73, 656–670 (1993)
- BERNE, R. M.: Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *Amer. J. Physiol.* 204, 317–322 (1963)
- CAI, Z., MANALO, D. J., WEI, G., RODRIGUEZ, E. R., FOX-TALBOT, K., LU, H., ZWEIER, J. L., and SEMENZA, G. L.: Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 108, 79–85 (2003)
- CAI, Z., and SEMENZA, G. L.: PTEN activity is modulated during ischemia and reperfusion: involvement in the induction and decay of preconditioning. *Circ. Res.* 97, 1351–1359 (2005)
- CAI, Z., ZHONG, H., BOSCH-MARCE, M., FOX-TALBOT, K., WANG, L., WEI, C., TRUSH, M. A., and SEMENZA, G. L.: Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 alpha. *Cardiovasc. Res.* 77, 463–470 (2008)
- CAMERON, J. S., and BAGHDADY, R.: Role of ATP sensitive potassium channels in long term adaptation to metabolic stress. *Cardiovasc. Res.* 28, 788–796 (1994)
- COHEN, M. V., PHILIPP, S., KRIEG, T., CUI, L., KUNO, A., SOLODUSHKO, V., and DOWNEY, J. M.: Preconditioning-mimetics bradykinin and DADLE activate PI3-kinase through divergent pathways. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 42, 842–851 (2007)
- COHEN, M. V., YANG, X. M., LIU, G. S., HEUSCH, G., and DOWNEY, J. M.: Acetylcholine, bradykinin, opioids, and phenylephrine, but not adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial K (ATP) channels. *Circ. Res.* 89, 273–278 (2001)
- COSTA, A. D., GARLID, K. D., WEST, I. C., LINCOLN, T. M., DOWNEY, J. M., COHEN, M. V., and CRITZ, S. D.: Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circ. Res.* 97, 329–336 (2005)
- DAS, M., and DAS, D. K.: Molecular mechanism of preconditioning. *IUBMB Life* 60, 199–203 (2008)
- ECKLE, T., KRAHN, T., GRENZ, A., KOHLER, D., MITTELBRONN, M., LEDENT, C., JACOBSON, M. A., OSSWALD, H., THOMPSON, L. F., UNERTL, K., and ELTZSCHIG, H. K.: Cardioprotection by ecto-5'-nucleotidase (CD73) and A2B adenosine receptors. *Circulation* 115, 1581–1590 (2007)
- FORBES, R. A., STEENBERGEN, C., and MURPHY, E.: Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. *Circ. Res.* 88, 802–809 (2001)
- GERLACH, E., DEUTICKE, B., und DREISBACH, R. H.: Der Nukleotidabbau im Herzmuskel bei Sauerstoffmangel und seine mögliche Bedeutung für die Koronardurchblutung. *Naturwissenschaft* 50, 228–229 (1963)
- GOTO, M., LIU, Y., YANG, X. M., ARDELL, J. L., COHEN, M. V., and DOWNEY, J. M.: Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts. *Circ. Res.* 77, 611–621 (1995)
- GRENZ, A., ZHANG, H., ECKLE, T., MITTELBRONN, M., WEHRMANN, M., KOHLE, C., KLOOR, D., THOMPSON, L. F., OSSWALD, H., and ELTZSCHIG, H. K.: Protective role of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in renal ischemia. *J. Amer. Soc. Nephrol.* 18, 833–845 (2007)
- GROSS, G. J., and AUCHAMPACH, J. A.: Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ. Res.* 70, 223–233 (1992)
- HAJRASOULIHA, A. R., TAVAKOLI, S., GHASEMI, M., JABEH DAR-MARALANI, P., SADEGHPOUR, H., EBRAHIMI, F., and DEHPUR, A. R.: Endogenous cannabinoids contribute to remote ischemic preconditioning via cannabinoid CB2 receptors in the rat heart. *Eur. J. Pharmacol.* 579, 246–252 (2008)
- HAUSENLOY, D. J., TSANG, A., MOCANU, M. M., and YELLON, D. M.: Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288, H971–H976 (2005)
- HAUSENLOY, D. J., YELLON, D. M., MANI-BABU, S., and DUCHEN, M. R.: Preconditioning protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287, H841–H849 (2004)



- JANOFF, A., WEISSMANN, G., ZWEIFACH, B., and THOMAS, L.: Pathogenesis of experimental shock. IV. Studies on lysosomes in normal and tolerant animals subjected to lethal trauma and endotoxemia. *J. Exp. Med.* 116, 451–466 (1962)
- JENNINGS, R. B., REIMER, K. A., and STEENBERGEN, C.: Effect of inhibition of the mitochondrial ATPase on net myocardial ATP in total ischemia. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 23, 1383–1395 (1991)
- JONES, M. L.: *Riftia pachytila* Jones: Observations on the Vestimentiferan Worm from the Galapagos Rift. *Science* 213, 333–336 (1981)
- JUHASZOVA, M., WANG, S., ZOROV, D. B., NUSS, H. B., GLEICHMANN, M., MATTSON, M. P., and SOLLLOTT, S. J.: The identity and regulation of the mitochondrial permeability transition pore: where the known meets the unknown. *Ann. New York Acad. Sci.* 1123, 197–212 (2008)
- JUHASZOVA, M., ZOROV, D. B., KIM, S. H., PEPE, S., FU, Q., FISHBEIN, K. W., ZIMAN, B. D., WANG, S., YTREHUS, K., ANTOS, C. L., OLSON, E. N., and SOLLLOTT, S. J.: Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J. Clin. Invest.* 113, 1535–1549 (2004)
- KENNETH, N. S., and ROCHA, S.: Regulation of gene expression by hypoxia. *Biochem. J.* 414, 19–29 (2008)
- KORICHNEVA, I., HOYOS, B., CHUA, R., LEVI, E., and HAMMERLING, U.: Zinc release from protein kinase C as the common event during activation by lipid second messenger or reactive oxygen. *J. Biol. Chem.* 277, 44327–44331 (2002)
- KRIEG, T., CUI, L., QIN, Q., COHEN, M. V., and DOWNEY, J. M.: Mitochondrial ROS generation following acetylcholine-induced EGF receptor transactivation requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 36, 435–443 (2004a)
- KRIEG, T., QIN, Q., PHILIPP, S., ALEXEYEV, M. F., COHEN, M. V., and DOWNEY, J. M.: Acetylcholine and bradykinin trigger preconditioning in the heart through a pathway that includes Akt and NOS. *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287, H2606–H2611 (2004b)
- KUNO, A., CRITZ, S. D., CUI, L., SOLODUSHKO, V., YANG, X. M., KRAHN, T., ALBRECHT, B., PHILIPP, S., COHEN, M. V., and DOWNEY, J. M.: Protein kinase C protects preconditioned rabbit hearts by increasing sensitivity of adenosine A2b-dependent signaling during early reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 43, 262–271 (2007)
- LEE, J. E., BOKOCH, G., and LIANG, B. T.: A novel cardioprotective role of RhoA: new signaling mechanism for adenosine. *FASEB J.* 15, 1886–1894 (2001)
- LEE, S. R., YANG, K. S., KWON, J., LEE, C., JEONG, W., and RHEE, S. G.: Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* 277, 20336–20342 (2002)
- LIANG, B. T.: Direct preconditioning of cardiac ventricular myocytes via adenosine A1 receptor and KATP channel. *Amer. J. Physiol.* 271, H1769–H1777 (1996)
- LINFERT, D., CHOWDHRY, T., and RABB, H.: Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury. *Transplant Rev. (Orlando)* 23, 1–10 (2009)
- LIU, G. S., THORNTON, J., VAN WINKLE, D. M., STANLEY, A. W., OLSSON, R. A., and DOWNEY, J. M.: Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* 84, 350–356 (1991)
- LIU, Y., TSUCHIDA, A., COHEN, M. V., and DOWNEY, J. M.: Pretreatment with angiotensin II activates protein kinase C and limits myocardial infarction in isolated rabbit hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27, 883–892 (1995)
- MURPHY, E., PERLMAN, M., LONDON, R. E., and STEENBERGEN, C.: Amiloride delays the ischemia-induced rise in cytosolic free calcium. *Circ. Res.* 68, 1250–1258 (1991)
- MURPHY, E., and STEENBERGEN, C.: Inhibition of GSK-3 $\beta$  as a target for cardioprotection: the importance of timing, location, duration and degree of inhibition. *Expert. Opin. Ther. Targets* 9, 447–456 (2005)
- MURRY, C. E., JENNINGS, R. B., and REIMER, K. A.: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74, 1124–1136 (1986)
- MURRY, C. E., JENNINGS, R. B., and REIMER, K. A.: New insights into potential mechanisms of ischemic preconditioning. *Circulation* 84, 442–445 (1991)
- NOBLE, R. L.: The development of resistance by rats and guinea pigs to amounts of trauma usually fatal. *Amer. J. Physiol.* 183, 346–351 (1942)
- OLDENBURG, O., CRITZ, S. D., COHEN, M. V., and DOWNEY, J. M.: Acetylcholine-induced production of reactive oxygen species in adult rabbit ventricular myocytes is dependent on phosphatidylinositol 3- and Src-kinase activation and mitochondrial K(ATP) channel opening. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35, 653–660 (2003)
- OLDENBURG, O., QIN, Q., KRIEG, T., YANG, X. M., PHILIPP, S., CRITZ, S. D., COHEN, M. V., and DOWNEY, J. M.: Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection. *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286, H468–H476 (2004)
- PACHER, P., and HASKO, G.: Endocannabinoids and cannabinoid receptors in ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. *Br. J. Pharmacol.* 153, 252–262 (2008)

- PAGLIARO, P., GATTULLO, D., RASTALDO, R., and LOSANO, G.: Ischemic preconditioning: from the first to the second window of protection. *Life Sci.* 69, 1–15 (2001)
- PAVLOV, I.: Noble Lecture, Physiology of Digestion. Nobelprize.org. Ref Type: Electronic Citation 2009
- PENNA, C., MANCARDI, D., RAIMONDO, S., GEUNA, S., and PAGLIARO, P.: The paradigm of postconditioning to protect the heart. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 435–458 (2008)
- PHILIPP, S., YANG, X. M., CUI, L., DAVIS, A. M., DOWNEY, J. M., and COHEN, M. V.: Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A2b receptor cascade. *Cardiovasc. Res.* 70, 308–314 (2006)
- SCHULTZ, J. E., ROSE, E., YAO, Z., and GROSS, G. J.: Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. *Amer. J. Physiol.* 268, H2157–H2161 (1995)
- SCHULZ, K. H., and GOLD, S.: [Psychological stress, immune function and disease development. The psychoneuro-immunologic perspective]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 49, 759–772 (2006)
- SITKOVSKY, M. V., LUKASHEV, D., APASOV, S., KOJIMA, H., KOSHIBA, M., CALDWELL, C., OHTA, A., and THIEL, M.: Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A(2A) receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 657–682 (2004)
- THIEL, M., CHOUKER, A., OHTA, A., JACKSON, E., CALDWELL, C., SMITH, P., LUKASHEV, D., BITTMANN, I., and SITKOVSKY, M. V.: Oxygenation inhibits the physiological tissue-protecting mechanism and thereby exacerbates acute inflammatory lung injury. *Plos. Biology* 3, 1088–1100 (2005)
- TONG, H., IMHASHI, K., STEENBERGEN, C., and MURPHY, E.: Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway is cardioprotective. *Circ. Res.* 90, 377–379 (2002)
- WALL, T. M., SHEEHY, R., and HARTMAN, J. C.: Role of bradykinin in myocardial preconditioning. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270, 681–689 (1994)
- WANG, G. L., JIANG, B. H., RUE, E. A., and SEMENZA, G. L.: Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5510–5514 (1995)
- WANG, G. L., and SEMENZA, G. L.: General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4304–4308 (1993)
- WANG, P., GALLAGHER, K. P., DOWNEY, J. M., and COHEN, M. V.: Pretreatment with endothelin-1 mimics ischemic preconditioning against infarction in isolated rabbit heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 28, 579–588 (1996)
- YELLON, D. M., and BAXTER, G. F.: A “second window of protection” or delayed preconditioning phenomenon: future horizons for myocardial protection? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27, 1023–1034 (1995)
- YTREHUS, K., LIU, Y., and DOWNEY, J. M.: Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Amer. J. Physiol.* 266, H1145–H1152 (1994)
- ZHAO, Z. Q., CORVERA, J. S., HALKOS, M. E., KERENDI, F., WANG, N. P., GUYTON, R. A., and VINTEN-JOHANSEN, J.: Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285, H579–H588 (2003)

Prof. Dr. Manfred THIEL  
Universitätsklinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin  
Universitätsmedizin Mannheim  
Theodor-Kutzer-Ufer 1–3  
68167 Mannheim  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 621 832614  
Fax: +49 621 3833806  
E-Mail: manfred.thiel@umm.de

## Molecular and Cellular Mechanisms of Anesthetic-Induced Preconditioning

Michael ZAUGG (Edmonton)

With 3 Figures

### *Abstract*

Brief episodes of ischemia – either before prolonged ischemia or immediately during reperfusion – protect the heart and other vital organs against ischemia-reperfusion injury. These phenomena are called pre- and postconditioning and are mediated by innate cellular protective mechanisms which include the activation of G protein coupled receptors and a complex network of “survival” kinases. The signaling pathways converge at the mitochondria opening the ATP-dependent potassium channel which preserves mitochondrial structure under ischemic stress and ultimately energy production of the electron transport chain and transfer of ATP to the cytosolic sites of ATP consumption. Ether-derived halogenated volatile anesthetics such as isoflurane and sevoflurane mimic ischemic pre- and postconditioning (pharmacologic conditioning) without jeopardizing already diseased hearts. Our extensive studies in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery also demonstrate that volatile anesthetics elicit a highly protective gene expression profile which is associated with improved functional activity of the heart and reduced plasma levels of cardiac injury markers. Most recent studies from our laboratory also provide evidence that volatile anesthetics enhance endothelial function after ischemia-reperfusion and promote tissue repair activity of stem-cell like endothelial progenitor cells.

### *Zusammenfassung*

Kurze Episoden von Ischämie – kurz vor einer letalen Ischämie oder zum Zeitpunkt der Reperfusion – schützen das Herz und andere vitale Organe vor einem irreversiblen Ischämieschaden. Diese Phänomene heißen Prä- und Postkonditionierung und basieren auf zelleigenen Schutzmechanismen, die über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und ein komplexes Netzwerk von Kinasen vermittelt werden. Die Signalwege konvergieren an den Mitochondrien und öffnen die ATP-abhängigen Kaliumkanäle, welche schließlich die Mitochondrien vor irreversiblen Strukturschäden schützen und so die Energieproduktion von ATP an der Atmungskette aufrechterhalten. Moderne halogenierte Ether wie Isofluran und Sevofluran imitieren die ischämische Prä- und Postkonditionierung, ohne das (meist kranke) Herz der Gefahr einer Ischämie auszusetzen. Unsere klinischen Studien mit Patienten, die sich einer koronaren Bypass-Operation unterziehen müssen, zeigen, dass volatile Anästhetika das Transkriptom im Herzen vorteilhaft verändern, was mit einer besseren Herzfunktion und reduzierten Markern für Gewebeschaden einhergeht. Unsere allerneuesten Daten zeigen auch, dass volatile Anästhetika die postischämische Endothelfunktion verbessern und die Funktion von endothelialen Progenitorzellen (endotheliale „Stammzellen“) günstig beeinflussen.

### **1. Ischemic Conditioning**

The phenomenon of ischemic preconditioning was first described in 1986 by MURRY and coworkers in the canine myocardium. Several (3–6) brief ischemic episodes interspersed by equally brief reperfusion periods (lasting 2–5 min each) increase the tolerance against subsequent severe ischemia (test ischemia of 30–60 min or more) and significantly reduce the in-

farct size (extent of necrosis) in the myocardial area at risk. Some years later, it was discovered that the immediate cytoprotection subsides after a few hours to be followed by a second phase of protection occurring 12–24 h later and lasting for 3–4 days. Signs of naturally occurring ischemic preconditioning in patients with coronary artery disease have indeed been inferred from the observation that pre-infarction angina reduces subsequent myocardial infarct size, improves ventricular function and reduces arrhythmias. The notion that reoxygenation during reperfusion induces the most severe cell damage led to the idea of modulating this process. Subsequently, a kind of graded reperfusion regimen comprising a series of short bouts of coronary artery occlusions (lasting for 20–60 s with equally short intervals) proved to offer cardioprotection against the detrimental consequences of a preceding long-lasting ischemic insult comparable to ischemic preconditioning. This procedure was termed ischemic postconditioning. Ischemic postconditioning with four episodes of 1-min balloon inflations starting within one minute after reflow was recently performed in patients undergoing percutaneous coronary interventions leading to a significant reduction of myocardial damage as assessed by creatine kinase for surrogate marker. Ischemic conditioning (pre- or post-) thus induces cytoprotection by subjecting the tissue to short-lasting ischemic stress. The immediate early protection phase relies on signaling events, which activate innate cellular protective mechanisms. The second delayed phase of protection occurring only ~20 h later seems to depend on *de novo* protein synthesis after the initially triggering signals have subsided. Despite the clinical observation mentioned before, treatments involving ischemic preconditioning or ischemic postconditioning are not advisable to be employed in patients with already compromised cardiovascular status. Pharmacological agents in lieu of ischemic conditioning may provide a more benign approach for eliciting cardioprotection in the clinical setting.

## 2. Molecular Mechanisms of Cytoprotection

From the large body of literature, it emerges that a wide variety of noxious stimuli can trigger cardioprotection including ischemia, hypoxia, heat shock, hypothermia, and  $\text{Ca}^{2+}$  overload. Such insults produce the liberation of transmitters and hormones (adenosine, purines, angiotensin-II, endothelin, opioids, bradykinin, catecholamines, acetylcholine), which act systemically or in a paracrine fashion after accumulation within the interstitial tissue, mainly by stimulating G-protein-coupled receptors (GPCR). Depending on the type of stimuli and their temporal occurrence, several different GPCRs may become activated together or in succession. Accordingly, different downstream signaling pathways may be activated in parallel or in temporal succession leading to cytoprotection. Many of the targeted receptors are coupled to phospholipase C (PLC), whose activation catalyses the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>), generating the secondary messengers inositol 1,3,4-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) and diacylglycerol (DAG), which, in turn, stimulate protein kinase-C (PKC) (Fig. 1). PKC is thought to be a central mediator of ischemic conditioning, which requires its translocation from the cytoplasm to anchoring proteins associated with the cytoskeleton and with membranes of cell organelles. PKC may directly phosphorylate the effector proteins or switch the signaling to other kinase cascades. Additional signaling pathways involved comprise the protein kinases G, and A, members of the MAPK (mitogen activated protein kinases) family (ERK1/2, p38, JNK and BMK1), the PI3K–PDK1–PKB(Akt) cascade, and the JAK–STAT pathway. In particular, the PKB(Akt) and the ERK1/2 pathways may play a dominant role

in cytoprotective signaling after ischemic conditioning and have thus been called the RISK (reperfusion injury salvage kinase) pathways. The different signaling pathways finally converge and affect the target sites of some major cytoprotective mechanisms associated with the mitochondria including the mitochondrial ATP-dependent potassium channels (mitoKATP channels) and the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) (Fig. 1). The sarcolemmal KATP channels (sarcoKATP channels) seem also to play some role under certain conditions, particularly in small animal models like mice. Activation of the sarcoKATP channels (potassium flows out of the cell) causes membrane hyperpolarization and shortens the duration of the action potential (AP) thus reducing  $\text{Ca}^{2+}$  influx into the cell. Activation of the mitoKATP channels at the inner mitochondrial membrane causes potassium to flow into the mitochondrial matrix for regulation of the mitochondrial matrix volume, supports coupling of the respiratory chain and ATP synthesis, attenuates  $\text{Ca}^{2+}$  entry from the cytoplasm, and inhibits apoptosis. Activation of the KATP channels during ischemia is thought to be due to phosphorylation by Ser/Thr-kinases PKC and/or PKG (Fig. 1). The mPTP represents a multiprotein complex comprising the adenine nucleotide transporter (ANT) at the inner mitochondrial membrane and the voltage-dependent anion channel (VDAC or porin) at the outer mitochondrial membrane. Additional proteins may be associated with the mPTP at these contact sites between the outer and inner mitochondrial membrane including the mitochondrial creatine kinase (mCK), hexokinase (HK), glycerol kinase (GK), the proapoptotic Bax and the antiapoptotic Bcl2. The mPTP and the mitoKATP channel are functionally coupled in so far as opening of the mPTP counteracts all effects of the activated mitoKATP channel. When the mPTP opens irreversibly solutes exchange between the cytoplasm and the mitochondrial matrix,  $\text{Ca}^{2+}$  enters the mitochondrial matrix, ROS are generated, the proton gradient driving ATP synthesis collapses, and the energy production comes to a halt. Under such conditions the ATP synthase (complex V) was observed to hydrolyze ATP thus using up what was left as energy source. Activation of the mitoKATP channels favors closure of the mPTP and may support survival while irreversible opening of the mPTP irrevocably leads to death. High  $\text{Ca}^{2+}$  in the mitochondrial matrix, cyclophilinD (peptidylprolyl cis-trans isomerase), and depolarization promote opening of the mPTP. Fatal opening of the mPTP most likely occurs during the early reperfusion phase. In principle, similar molecular mechanisms are also operative during the delayed second window of protection. However, the signaling pathways are supported by *de novo* protein synthesis induced by NF- $\kappa$ B and other transcription factors. Notably, the survival proteins iNOS (inducible nitric oxide synthase), Bcl2 (antiapoptotic protein), COX2 (cyclooxygenase-2), MnSOD (mitochondrial manganese superoxide dismutase), and heat shock proteins (HSP27/70) display an increased expression after ischemic conditioning. NF- $\kappa$ B is activated by dissociation from its inhibitor I $\kappa$ B when the latter has been phosphorylated by PKC.

### **3. Pharmacologic Conditioning**

According to the different signaling pathways triggered by ischemic pre- and postconditioning for induction of cytoprotection, different classes of pharmaceuticals have been identified to be able to elicit cardioprotection including opioids, adenosine and its analogues, KATP channel openers (KCO), such as cromakalim, pinacidil, diazoxide, nicorandil, and ether-derived halogenated volatile anesthetics like isoflurane and sevoflurane. While opioids and adenosine

have proven their cardioprotective potential in animal experiments, they did not make their way into the clinical armamentarium for this purpose. Neither could the KCOs be clinically used for cardioprotective therapy because their activity is not selective for the mitoKATP channels and their major effects *in vivo* relate to the sarcoKATP channels of smooth muscle cells causing vasodilatation. An interesting pharmacodynamic profile has been demonstrated for the anti-arrhythmic drug bepridil, which exhibits a unique combination of inhibiting the sarcoKATP channels while activating the mitoKATP channels. On the other hand, the volatile anesthetics can afford powerful cytoprotection against severe ischemia in experimental animal models as well as in humans with coronary artery disease. Furthermore, they are the best studied pharmaceuticals with regard to their mode of cytoprotective action not only in the heart but also in brain, kidney and liver.

#### 4. Cardioprotection by Volatile Anesthetics

In a series of experiments, we have delineated the major signaling pathways for volatile anesthetics in cardioprotection on isolated ventricular adult rat cardiomyocytes in short-term culture by live cell imaging microscopy and on isolated beating rat hearts in the Langendorff apparatus. Signaling by volatile anesthetics was usually compared to that elicited by ischemic conditioning. The experiments on isolated beating rat hearts combine functional contractile parameters with morphological (immunohistochemistry) and biochemical (immunoblotting and enzyme activity) parameters, and were finally complemented by studies on gene activity profiles. The effects of different commonly used anesthetics was tested on the intrinsic fluorescence of mitochondrial flavoproteins as a direct measure of mitoKATP channel activity and on survival of isolated cardiomyocytes exposed to 60 min of ischemia using subsequent hypoosmolar trypan blue staining. Diazoxide-induced mitoKATP channel opening was inhibited by the anesthetics R-ketamine and the barbiturates thiopental and pentobarbital. S-ketamine, propofol, midazolam and etomidate did not affect mitoKATP channel activity, while the volatile anesthetics positively activated these channels. The significance of these modulatory effects of the different anesthetics on the mitoKATP channels was substantiated in the cellular model of simulated ischemia. Infarct size and recovery of contractile parameters were similarly improved by volatile anesthetics applied for preconditioning (VApreC) and for postconditioning (VApostC) when compared to ischemic pre- and postconditioning. The signaling pathways for conditioning were delineated by using inhibitors and activators specific for individual signaling components. The signaling pathways utilized by volatile anesthetics for the early protection phase are summarized in Figure 1. Inhibition of beta-adrenergic receptors by propranolol or of alpha1-adrenergic receptors by prazosin had no effect on VA cardioprotection. The two major signaling routes for VApreC are (i) AdR1 – activation of PLC – production of IP3 and DAG – phosphorylation of PKC isoforms and subcellular translocation resulting in activation of mitoKATP channels, and (ii) probably direct activation of NOS by volatile anesthetics – production of NO – activation of soluble GCs by binding of NO to the heme group of the protein – generation of the second messenger cGMP – activation of PKG and stimulation of the mitoKATP channels (for details and abbreviations see legends of Fig. 1). Inhibition of either of the two signaling routes by any of the involved blockers partially reduces cardioprotection. That both signaling routes converge on activating the mitoKATP channels can be demonstrated by the almost complete inhibition of cardioprotection when

these channels are specifically blocked by 5HD. On the other hand, application of the specific channel opener diazoxide induces the cardioprotective effects like the volatile anesthetics. Together with ROS, NO leads to formation of POXN, which may directly activate PKC by oxidation and/or nitration. This signaling route can be inhibited by the ROS scavenger MPG. In contrast, application of exogenous NO derived from SNAP (nitroso acetyl penicillamine) induces cardioprotection. VA signaling from the AdR1 probably via the G-betagamma component can also activate the axis PI3K – PDK – PKB resulting in inhibiting GSK3beta by phosphorylation at Ser9 (Fig. 1). Inactivation of GSK3- $\beta$  is associated with keeping the mPTP closed during reperfusion by an as yet unknown mechanism. Pore opening and mitochondrial integrity can be assessed in two ways, (i) biochemically by measuring the tissue content of NAD<sup>+</sup> which is released from inactive dysfunctional mitochondria upon pore opening, and (ii) morphologically by visualizing the active uptake of the red-fluorescing MitoTracker Red 580 by viable mitochondria, while dysfunctional mitochondria do not accumulate the stain. The involvement of mPTP opening during reperfusion and cell damage can be shown by application of the pore openers atractyloside (a diterpenoid glycoside) or bongkreic acid (BKA). As the mPTP typically opens during reperfusion, it seems natural that the signaling for mPTP closing plays a more prominent role in VApostC and in ischemic postconditioning than in preconditioning procedures. In addition to the PI3K–PKB pathway, cardioprotection may also be supported by inhibition of GSK3- $\beta$  by MAPKs including ERK1/2 and p38. PKC seems to function as upstream kinase for the MAPKs pathways. This illustrates the intimate and complex cross-connections in cardioprotective signaling (Fig. 1). The lack of effect of the specific HMR-1098 inhibitor indicates that the sarcoKATP channels are not significantly involved in cardioprotection induced by volatile anesthetics or ischemic conditioning in the rat heart.

## **5. Gene Activity Profiles in Cardioprotection of Rat Hearts**

VAPreC resembles ischemic preconditioning in so far as the major signaling pathways (PKC and NO routes) are also activated in ischemic preconditioning. On the other hand, the MAPKs (ERK1/2 and p38) are activated during the conditioning phase of ischemic preconditioning but not of VAPreC. However, the postischemic cellular and functional recovery proved to depend also in VAPreC on activation of ERK1/2. These findings indicate that different gene activity profiles may be generated by the two different conditioning procedures (VAPreC versus ischemic preconditioning), despite a similar cardioprotective potential in both cases. Moreover, the profiles may also differ after the 40 min test ischemia was applied. Transcriptome profiles induced by volatile anesthetics or ischemic conditioning triggers and those obtained after ischemia-reperfusion injury are summarized in Figure 2. Without further analysis, it is clear from inspection of the gene expression matrix that the volatile anesthetics and the ischemic conditioning triggers regulate a number of genes in parallel, while a large portion of genes are differentially regulated, as indicated by noncorresponding colored rows (first two column groups in Fig. 2). On the other hand, a large portion of genes display a similar color pattern after test ischemia alone and after ischemic preconditioning followed by test ischemia (last two column groups in Fig. 2). Finally, a similar correspondence of commonly regulated genes appears in time-matched perfusion controls when compared with VAPreC followed by test ischemia (middle two column groups in Fig. 2).

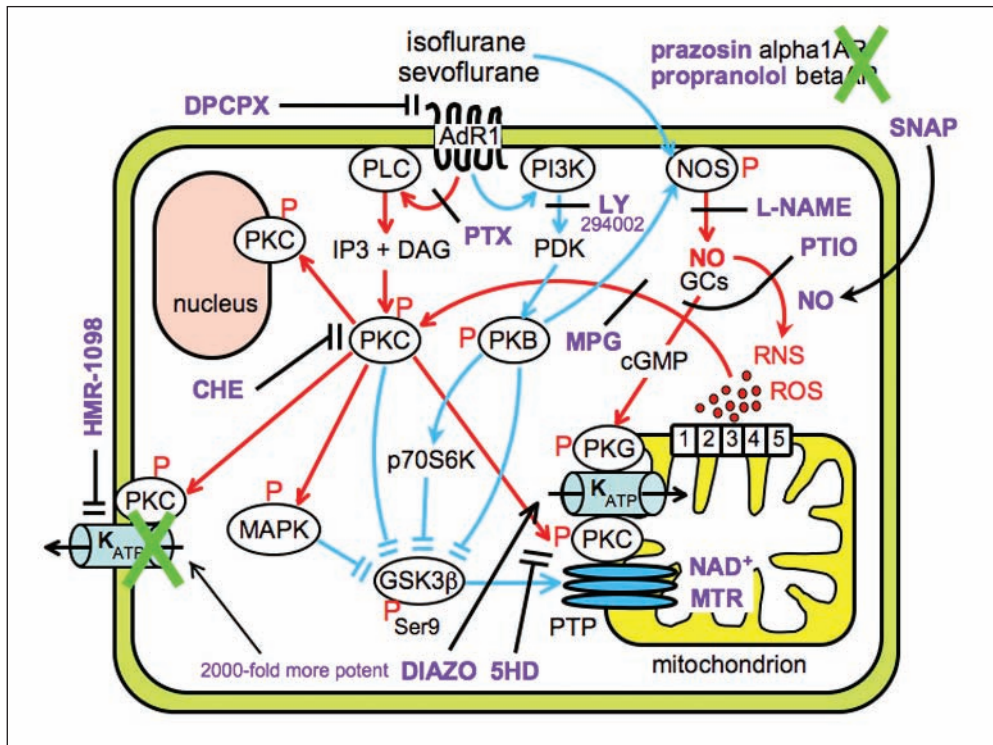


Fig. 1 Major signaling pathways for cardioprotective effects by volatile anesthetics (isoflurane and sevoflurane) in rat cardiomyocyte, as assessed by using inhibitors specific for certain signaling components. The red bars and abbreviations denote inhibition of the corresponding signaling route. DPCPX (cyclopentyl dipropylxanthine) specifically inhibits the adenosine receptor1. PTX (pertussis toxin) inhibits the protein Gi signaling. CHE (chelerythrine) inhibits phosphorylation of protein kinase-C isoforms and their translocation to specific subcellular sites. DPCPX, PTX or CHE each partially inhibit cardioprotection by volatile anesthetics. L-NAME (nitro L-arginine methyl ester) is a nonspecific inhibitor of the different nitric oxide (NO) synthase (NOS) isoforms (eNOS, iNOS and nNOS). Signaling by NO can also be inhibited by the NO scavenger PTIO (carboxyphenyl tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide). NO forms reactive nitrogen species (RNS), which react with the reactive oxygen species (ROS) originating from the partially uncoupled mitochondrial metabolism to form peroxynitrite, which may directly activate PKC. This side route can be inhibited by the free radical scavenger MPG (N-2-mercaptopropionyl glycine). Inhibition of the mitoKATP channel with the specific inhibitor 5HD (5-hydroxydecanoate) completely abrogates volatile anesthetics and ischemic preconditioning. The inhibitor HMR (HMR1098, cardiac selective sulfonyleurea derivative) specific for the sarcoKATP channels has no effect in either volatile anesthetics or ischemic preconditioning. Signaling from AdR1 via the PI3K (phosphoinositide-3 kinase) – PKB (protein kinase-B) path inhibits GSK3beta (glycogen synthase kinase-3 beta), which, in turn, keeps the mitochondrial permeability transition pore (PTP) closed is more prominent in preconditioning. This path can be inhibited by LY (LY294002, morpholinyl-phenylbenzopyran) abrogating cardioprotection (PTP opens during reperfusion), while BKA (bongkreic acid) mimicking conditioning inhibits opening of the PTP. In addition, MAPK (mitogen activated protein kinase) pathways may be involved in conditioning to various degrees. PDK = phosphoinositide-dependent kinase-1; p70S6K = ribosomal protein S6 kinase.

The difference of activity profiles between the two conditioning triggers and the substantial overlapping of the profiles, first, between volatile anesthetics protection and untreated controls, and second, between ischemic protection and unprotected ischemic hearts, can be visualized by the method of principal component analysis, a technique used to reduce multi-



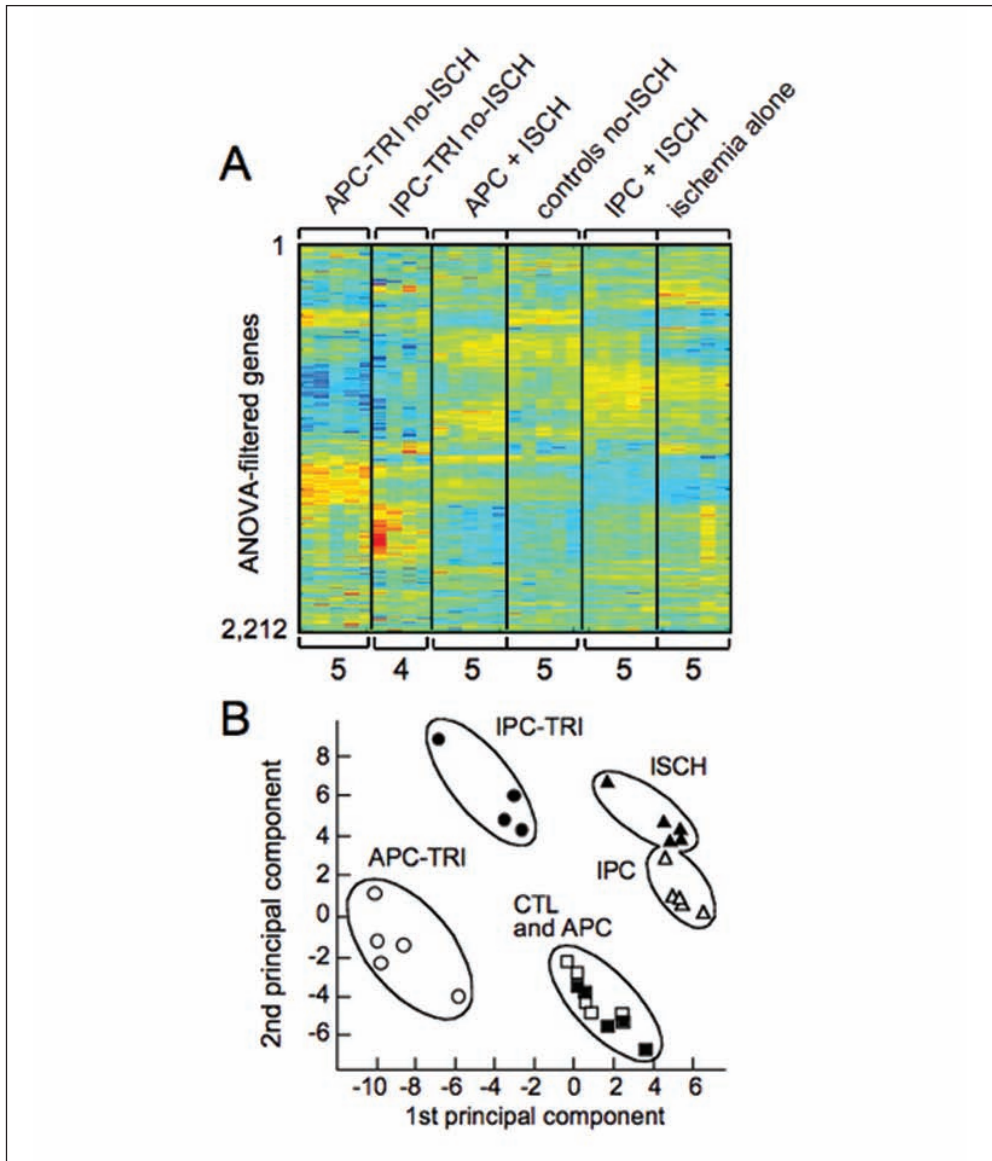


Fig. 2 Transcriptome profiles of isolated beating rat hearts after conditioning trigger alone and after ischemia-reperfusion injury. Panel A: Global gene expression matrix (heat map) of 2'212 ANOVA-filtered genes that are either upregulated (red) or downregulated (blue) derived from coupled two-way clustering with six experimental groups. Horizontal rows correspond to genes, and columns correspond to individual hearts (number of hearts per group is given underneath on the abscissa). APC-TRI = trigger by volatile anesthetic isoflurane (15 min followed by 10 min washout); IPC = ischemic conditioning trigger (3 cycles of 5 min ischemia interspersed by 5 min reperfusion); APC = APC-TRI followed by 40 min test ischemia; controls = time-matched perfusion without treatment; IPC = IPC-TRI followed by 40 min test ischemia; ischemia = 40 min test ischemia alone. Samples for gene chip analysis were taken in all cases at the time point corresponding to 180 min after completion of the 40 min test ischemia. Panel B: Principal component analysis showing that the transcriptional profile of CTL (time-matched virgin myocardium) and APC are closely related, while IPC profile is much closer to ISCH (damaged myocardium).

dimensional data sets to lower dimensions. These findings are partly unexpected in so far as both volatile anesthetics and ischemic conditioning provide cardioprotection by signaling for activation of the mitoKATP channels and for prevention of mPTP opening by activation of the reperfusion injury salvage kinase pathways, yet the two conditioning procedures induce two different gene activity profiles. Ischemic conditioning elicits cardioprotection by activation of endogenous reaction mechanisms against the afflicted sublethal cell damages. One may speculate that a number of these cellular reactions are similar or identical to those induced by severe tissue ischemia in unprotected hearts, thus contributing to the similar transcriptome profiles. On the other hand, the similar profiles after test ischemia with prior volatile anesthetics conditioning and that of untreated controls clearly favors this conditioning procedure for clinical application rather than ischemic conditioning. Moreover, volatile anesthetics represent an accepted and widely used class of pharmaceuticals.

## 6. Clinical Application of Volatile Anesthetics for Cardioprotection

The general experimental findings on volatile anesthetics conditioning could be directly translated to clinical randomized trials. In one set of 72 patients (40–80 years old) undergoing coronary artery bypass graft surgery (2–6 grafts) on cardiopulmonary bypass circuit with cardioplegic arrest, preconditioning was applied by administering sevoflurane (4 vol%) or an oxygen-air gas mixture (placebo) for 10 min after initiating the anesthesia with either propofol or etomidate and immediately before cross clamping the aorta. In a second set of 20 patients (50–80 years old) undergoing off-pump coronary artery bypass graft surgery (2–5 grafts), anesthesia was maintained with either sevoflurane gas or with intravenous propofol from the moment of taking the first atrial biopsy (B1) before vessel surgery started until  $180 \pm 40$  min later when the second atrial biopsy (B2) was collected after termination shortly before chest closing. The atrial biopsies were used for microarray analysis using Affymetrix GeneChip Human Genome U\_133 Plus 2.0 arrays. Among several biomarkers measured in blood samples taken at 0, 24, 48 and 72 h in both studies, plasma levels of N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) were significantly lower from 24 up to 72 h post-surgery in patients treated with sevoflurane (Fig. 3A). High plasma levels of NTproBNP are indicative of cardiac dysfunction due to myocyte damage. In addition, this finding indicates that in both clinical studies the sevoflurane treatment provided cardioprotection covering the delayed protection phase over several days. In the one year follow-up of the first study with 72 patients, 6 patients (17%) of the placebo group developed adverse cardiac events such as coronary artery reocclusions and congestive heart failure, while only one patient (3%) of the sevoflurane group was newly affected by congestive heart failure. The perioperative peak concentration of the myocardial injury marker NT-proBNP was significantly higher in all patients subject to late cardiac events. In the second study with coronary artery bypass graft off-pump surgery patients, cardiac output and myocardial velocity mapping were determined by pulmonary artery catheter and echocardiography just before (B1) and after (B2) excision of the atrial biopsies. Two atrial samples were collected per patient and used for hybridization (no sample pooling). Sample B1 constitutes the background expression profile before exposure to either sevoflurane or propofol, whereas sample B2 reflects the gene response to surgery in the two anesthetic groups. The existence and direction of gene expression changes over time (from B1 to B2) was reliably detected by the microarray technology, as confirmed by real-time quan-

titative polymerase chain reaction. The global gene matrix containing the expression values of the 54'675 probe sets was used as input for the Gene Set Enrichment Analysis. Gene Set Enrichment Analysis considers predefined gene sets based on previous biologic knowledge such as signaling or metabolic pathways, or groups of genes pertaining to particular subcellular structural or functional entities, and determines whether the members of these sets are over- or under-represented in a list of genes that correlate with a specific phenotype or class

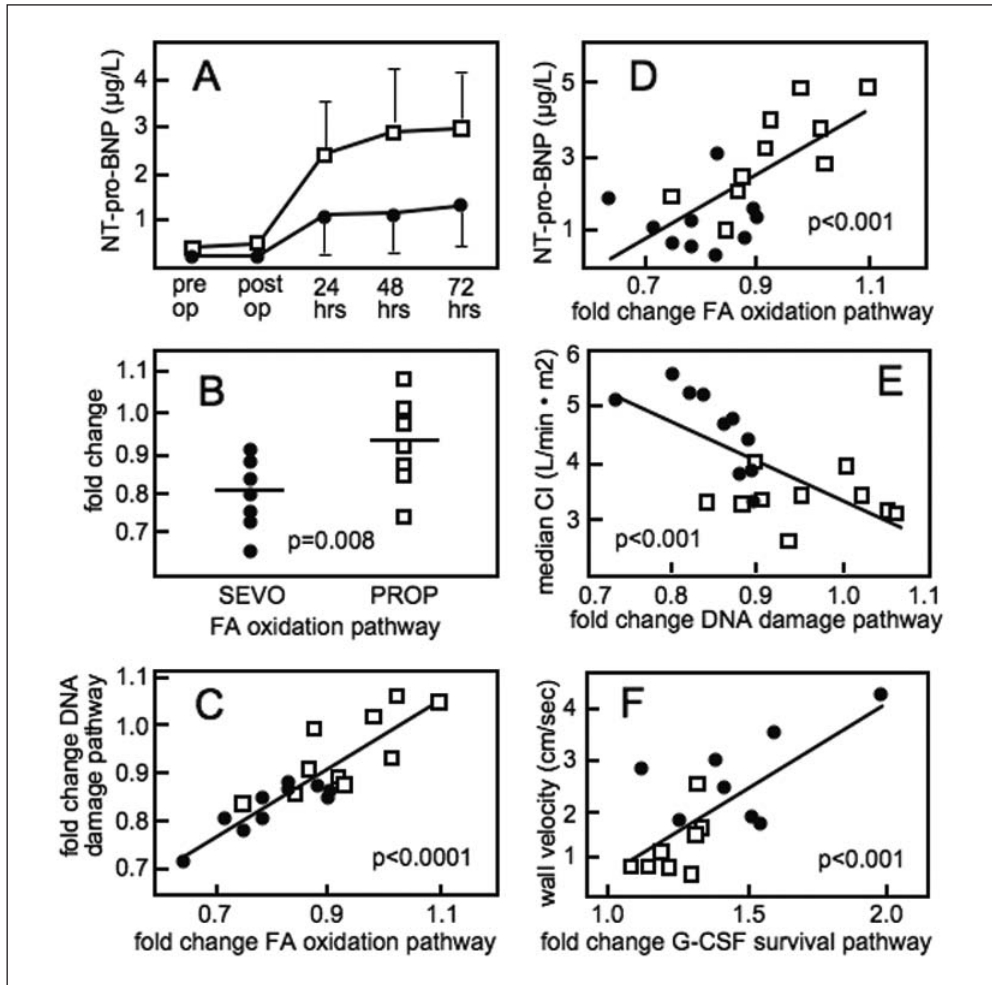


Fig. 3 Perioperative plasma levels of N-terminal probrain natriuretic peptide (NT-proBNP) and correlations between anesthetic-induced transcriptional phenotypes and post-surgery cardiac function of patients with coronary artery bypass graft surgery. Panel A: Plasma levels of NT-proBNP are significantly higher in the propofol than in the sevoflurane group from 24 up to 72 h after the operation (time effect  $p < 0.001$ ; treatment effect  $p = 0.002$ ). Panel B: Differential regulation of the fatty acid oxidation pathway. Panel C: Relation between metabolic changes in fatty acid oxidation and DNA damage signaling. Panel D: NT-proBNP levels best correlate with fatty acid oxidation path. Panel E: Cardiac index best correlates with DNA damage signaling. Panel F: Early diastolic left ventricular wall movement best correlates with the granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) survival pathway (JAK-STAT). Black dots = sevoflurane; open squares = propofol; SEVO = sevoflurane; PROP = propofol.

distinction. The output is a normalized enrichment score that represents a measure of the degree of enrichment (positive or negative or no significant correlation) of the gene set in question. The results revealed over 500 pathways differing over time from B1 to B2 (start and end of bypass surgery) in sevoflurane and propofol patients, the bulk (494) of which was commonly regulated by both anesthetic regimens. Among the pathways differently regulated by the two anesthetics, sevoflurane compared to propofol, reduced the transcriptional activity of genes in the fatty acid (FA) oxidation pathway and in the DNA-damage signaling cascade, while the genes in the granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) survival pathway were upregulated (Fig. 3). The tight correlation between these regulated pathways over both anesthetic groups implies a possible link between the metabolic phenotype and cardioprotection.

## 7. Conclusions and Final Remarks

The results show that inhalation of sevoflurane for only 10 min immediately before cardiovascular surgery, or alternatively, when used to maintain anesthesia during surgery for around 3 h, can provide effective cardioprotection up to several days postsurgery. On a genome-wide basis we have shown that different anesthetics differently modulate the transcriptional activity in response to cardiac surgery in human hearts. The genomic reprogramming induced by the volatile ether sevoflurane, as compared to the intravenous anesthetic propofol, seems to exert cardioprotection over a period of at least one year. The reduction of fatty acid oxidation leads to a relative increase in glucose utilization *via* the so-called glucose-fatty acid cycle. Even small but coordinate changes in a majority of genes encoding members of a particular pathway (gene set) may dramatically alter the flux through that pathway. In the postischemic myocardium, fatty acid oxidation provides nearly 100 % of the cellular energy requirement. The relative shift away from fatty acid oxidation was shown to improve contractile recovery after ischemia and affect long-term outcome. In fact, favoring the energetically more economical glucose (3.17 ATP per oxygen molecule) over fatty acid oxidation (2.83 ATP per oxygen molecule) may be beneficial in the mechanically stressed heart with only limited oxygen supply. In conclusion, our results indicate that experimentally applied volatile anesthetics mobilize cardioprotective cellular mechanisms including activation of the mitoKATP channels and preservation of a functionally intact mPTP. Furthermore, analysis on a genome-wide basis revealed that treatment of CABG surgery patients in the perioperative phase with volatile anesthetics reduces the activity of genes involved in noxious pathways and shifts the energy metabolism away from fatty acid oxidation towards the more economical glucose utilization. Most importantly, the beneficial effects of the fatty acids are long-lasting and patients may suffer from fewer adverse cardiac events over a period up to one year or more. Therefore, clinical surveys are required to establish whether the application of volatile anesthetics in cardiovascular and non-cardiovascular surgery will be beneficial for the patients with regard to peri- and post-operative outcome including cardiovascular complications, hospitalization time and mortality.

## Acknowledgments

The work referred to was supported by the Swiss National Science Foundation (Grants #3200-063417.00 and #3200B0-103980/1); 5th Frontiers in Anesthesia Research Award from the International Anesthesia Research Society; Novartis Foundation; Swiss Heart Foundation; Swiss University Conference; the Olga Mayenfisch Foundation; Swiss Society of Anesthesiology and Reanimation; Mazankowski Alberta Heart Institute, Canada.

*References*

- DA SILVA, R., GRAMPP, T., PASCH, T., SCHAUB, M. C., and ZAUGG, M.: Differential activation of mitogenactivated kinases in ischemic and anesthetic preconditioning. *Anesthesiology* 100, 59–69 (2004)
- DA SILVA, R., LUCCHINETTI, E., PASCH, T., SCHAUB, M. C., and ZAUGG, M.: Ischemic but not pharmacological preconditioning elicits a gene expression profile similar to unprotected myocardium. *Physiol. Genomics* 20, 117–130 (2004)
- DOLDER, M., WENDT, S., and WALLIMANN, T.: Mitochondrial creatine kinase in contact sites: interaction with porin and adenine nucleotide translocase, role in permeability and sensitivity to oxidative damage. *Biol. Signals Recept* 10, 93–111 (2001)
- FENG, J., FISCHER, G., LUCCHINETTI, E., ZHU, M., BESTMANN, L., JEGGER, D., ARRAS, M., PASCH, T., PERRIARD, J. C., SCHAUB, M. C., and ZAUGG, M.: Infarctremodeled myocardium is receptive to protection by isoflurane postconditioning: role of protein kinase B/Akt signaling. *Anesthesiology* 104, 1004–1014 (2006)
- FENG, J., LUCCHINETTI, E., AHUJA, P., PASCH, T., PERRIARD, J. C., and ZAUGG, M.: Isoflurane postconditioning prevents opening of the mitochondrial permeability transition pore through inhibition of glycogen synthase kinase 3beta. *Anesthesiology* 103, 987–995 (2005)
- GARCIA, C., JULIER, K., BESTMANN, L., ZOLLINGER, A., SEGESSER, L. K. VON, PASCH, T., SPAHN, D. R., and ZAUGG, M.: Preconditioning with sevoflurane decreases PECAM-1 expression and improves one-year cardiovascular outcome in coronary artery bypass graft surgery. *Br. J. Anaesth.* 94, 159–165 (2005)
- GATEAU-ROESCH, O., ARGAUD, L., and OVIZE, M.: Mitochondrial permeability transition pore and postconditioning. *Cardiovas. Res.* 70, 264–273 (2006)
- HALESTRAP, A. P., CLARKE, S., and JAVADOV, S. A.: Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion – a target for cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* 61, 372–385 (2004)
- HANLEY, P. J., and DAUT, J.: K(ATP) channels and preconditioning: a re-examination of the role of mitochondrial K(ATP) channels and an overview of alternative mechanisms. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 39, 17–50 (2005)
- HAUSENLOY, D. J., and YELLON, D. M.: Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc. Res.* 70, 240–253 (2006)
- JULIER, K., DA SILVA, R., GARCIA, C., BESTMANN, L., FRASCAROLO, P., ZOLLINGER, A., CHASSOT, P. G., SCHMID, E. R., TURINA, M. I., SEGESSER, L. K. VON, PASCH, T., SPAHN, D. R., and ZAUGG, M.: Preconditioning by sevoflurane decreases biochemical markers for myocardial and renal dysfunction in coronary artery bypass graft surgery: a double-blinded, placebo-controlled, multicenter study. *Anesthesiology* 98, 1315–1327 (2003)
- KUDO, N., BARR, A. J., DESAI, S., and LOPASCHUK, G. D.: High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J. Biol. Chem.* 270, 17513–17520 (1995)
- LAZAR, H. I., CHIPKIN, S. R., FITZGERALD, C. A., BAO, Y., CABRAL, H., and APSTEIN, C. S.: Tight glycemic control in diabetic coronary artery bypass graft patients improves perioperative outcome and decreases recurrent ischemic events. *Circulation* 109, 1497–1502 (2004)
- LUCCHINETTI, E., DA SILVA, R., PASCH, T., SCHAUB, M. C., and ZAUGG, M.: Anaesthetic preconditioning but not postconditioning prevents early activation of the deleterious cardiac remodelling programme: evidence of opposing genomic responses in cardioprotection by pre- and postconditioning. *Br. J. Anaesth.* 95, 140–152 (2005)
- LUCCHINETTI, E., FENG, J., DA SILVA, R., TOLSTONOG, G. V., SCHAUB, M. C., SCHUMANN, G. G., and ZAUGG, M.: Inhibition of LINE-1 expression in the heart decreases ischemic damage by activation of Akt/PKB signaling. *Physiol. Genomics* 25, 314–324 (2006)
- LUCCHINETTI, E., HOFER, C., BESTMANN, L., HERSBERGER, M., FENG, J., ZHU, M., FURRER, L., SCHAUB, M. C., TAVAKOLI, R., GENONI, M., ZOLLINGER, A., and ZAUGG, M.: Gene regulatory control of myocardial energy metabolism predicts postoperative cardiac function in patients undergoing off-pump coronary artery bypass graft surgery. *Anesthesiology* 106, 444–457 (2007)
- MARBER, M. S., LATCHMAN, D. S., WALKER, J. M., and YELLON, D. M.: Cardiac stress protein elevation 24 h after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 88, 1264–1272 (1993)
- MURRY, C. E., JENNINGS, R. B., and REIMER, K. A.: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74, 1124–1136 (1986)
- PRATT, P. F., WANG, C., WEIHRAUCH, D., BIENENGRABER, M. W., KERSTEN, J. R., PAGEL, P. S., WARLTIER, D. C.: Cardioprotection by volatile anesthetics: new applications for old drugs? *Curr. Opin. Anaesthesiology* 19, 397–403 (2006)
- RANDLE, P. J., GARLAND, P. B., HALES, C. N., and NEWSHOLME, E. A.: The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbance of diabetes mellitus. *Lancet* 1, 785–789 (1963)

- SCHAUB, M. C., HEFTI, M. A., and ZAUGG, M.: Integration of calcium with the signalling network in cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *41*, 183–214 (2006)
- SERGEEV, P., DA SILVA, R., LUCCHINETTI, E., ZAUGG, K., PASCH, T., SCHAUB, M. C., and ZAUGG, M.: Triggerdependent gene expression profiles in cardiac preconditioning: evidence for distinct genetic programs in ischemic and anesthetic preconditioning. *Anesthesiology* *100*, 474–488 (2004)
- STAAT, P., RIOUFOL, G., PIOT, C., COTTIN, Y., CUNG, T. T., L'HUILLIER, I., AUPETIT, J. F., BONNEFOY, E., FINET, G., FOUET, X. A., and OVIZE, M.: Postconditioning the human heart. *Circulation* *112*, 2143–2148 (2005)
- TESTAI, L., RAPPOSELLI, S., and CALDERONE, V.: Cardiac ATP-sensitive potassium channels: a potential target for an anti-ischaemic pharmacological strategy. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* *5*, 79–90 (2007)
- UECKER, M., DA SILVA, R., GRAMPP, T., PASCH, T., SCHAUB, M. C., and ZAUGG, M.: Translocation of protein kinase C isoforms to subcellular targets in ischemic and anesthetic preconditioning. *Anesthesiology* *99*, 138–147 (2003)
- ZAUGG, M., LUCCHINETTI, E., GARCIA, C., PASCH, T., SPAHN, D. R., and SCHAUB, M. C.: Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part II. Clinical implications. *Br. J. Anaesth.* *91*, 566–576 (2003a)
- ZAUGG, M., LUCCHINETTI, E., SPAHN, D. R., PASCH, T., and SCHAUB, M. C.: Volatile anesthetics mimic cardiac preconditioning by priming the activation of mitochondrial K(ATP) channels via multiple signaling pathways. *Anesthesiology* *97*, 4–14 (2002a)
- ZAUGG, M., LUCCHINETTI, E., SPAHN, D. R., PASCH, T., GARCIA, C., and SCHAUB, M. C.: Differential effects of anesthetics on mitochondrial K(ATP) channel activity and cardiomyocyte protection. *Anesthesiology* *97*, 15–23 (2002b)
- ZAUGG, M., LUCCHINETTI, E., UECKER, M., PASCH, T., and SCHAUB, M. C.: Anaesthetics and cardiac preconditioning. Part I. Signalling and cytoprotective mechanisms. *Br. J. Anaesth.* *91*, 551–565 (2003b)
- ZHAO, Z. Q., CORVERA, J. S., HALKOS, M. E., KERENDI, F., WANG, N. P., GUYTON, R. A., and VINTEN-JOHANSEN, J.: Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with preconditioning. *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *285*, H579–H588 (2003)
- ZHAO, Z. Q., and VINTEN-JOHANSEN, J.: Myocardial apoptosis and ischemic preconditioning. *Cardiovasc. Res.* *55*, 438–455 (2002)
- ZHU, M., FENG, J., LUCCHINETTI, E., FISCHER, G., XU, L., PEDRAZZINI, T., SCHAUB, M. C., and ZAUGG, M.: Ischemic postconditioning protects remodelled myocardium via PI3K-PKB/Akt reperfusion injury salvage kinase pathway. *Cardiovasc. Res.* *72*, 152–162 (2006)

Prof. Michael ZAUGG, MD DEAA FRCPC  
Department of Anesthesiology and Pain Medicine  
University of Alberta  
Clinical Sciences Building, Room 8-120  
113 St 83 Ave  
Edmonton, AB T6G 2G3  
Canada  
Phone: 001 404 7804073854  
Fax: 001 404 7804073200  
E-Mail: michael.zaugg@ualberta.ca

## Alternative Mechanism of Organ Protection

Kai ZACHAROWSKI (Frankfurt/Main)

With 3 Figures

### Abstract

Fibrinogen turnover and fibrin degradation occurs 24/7. Therefore, the organism is challenged constantly with pro- and anti-inflammatory ‘blood derived signals’ directed at endothelial cells among others. Interestingly, these players have different half-life’s and potencies at the target site, i.e. VE-cadherin. High fibrinogen levels and high levels of D-dimers are associated with cardiovascular disease and inflammation. The concept that fibrinogen is only cleaved to fibrin in order to promote clotting, and that the byproducts ‘fibrin fragments’ are only markers of activation – is not valid anymore. Fibrin fragments in its own rights present new players in cell-cell interaction (e.g. leukocyte – endothelial cell), have disease character and angiogenic/anti-angiogenic effects. The latter executes some of its effects via cytokines and/or specific intracellular signals (*unpublished*). This new concept requires step by step investigations using *in vitro* and *in vivo* models in order to understand the course of inflammation triggered by fibrin fragments.

### Zusammenfassung

Fibrinogenumsatz und Fibrindegredation stellen Prozesse dar, die kontinuierlich in der Blutbahn stattfinden. Daher wird der Organismus ständig mit pro- und antiinflammatorischen „Blut-Signalen“ konfrontiert, die hauptsächlich gegen endotheliale Zellen gerichtet sind. Interessanterweise haben diese Fibrinfragmente unterschiedliche Halbwertszeiten und Wirkungsstärken an Zielstrukturen, wie z. B. VE-Cadherin. Hohe Fibrinogenspiegel und hohe D-Dimer-Spiegel wurden mit kardiovaskulären Erkrankungen und Entzündungen in Verbindung gebracht. Das Konzept, dass Fibrinogen nur zu Fibrin gespalten wird, um die Gerinnung zu initiieren, und dass die sogenannten Abfallprodukte ‚Fibrinfragmente‘ nur Marker der Aktivierung darstellen, ist nicht mehr zeitgemäß. Fibrinfragmente präsentieren sich als neue Moleküle in der Regulierung von Zell-Zell-Kontakten (z. B. Leukozyten – Endothelzelle), haben Krankheitscharakter und angiogenetische und antiangiogenetische Effekte. Diese Effekte werden zum Teil über Zytokine und spezifische intrazelluläre Signale hervorgerufen.

### 1. Fibrinogen

Fibrinogen is a 340 kDa glycoprotein synthesized in the liver by hepatocytes and megakaryocytes. In addition to its major function as a precursor to fibrin, fibrinogen can form bridges between platelets *via* GpIIb/IIIa surface membrane proteins. Fibrinogen is a hexamer containing two sets of three different chains ( $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ ), which are linked to each other by disulfide bonds. The interaction of thrombin with fibrinogen causes the release of two small peptides known as fibrinopeptides A and B. As a result, a series of delicately modulated and interdependent reactions are initiated, the end point is the transition of fibrinogen into cross-linked insoluble fibrin. This form of fibrin is found in most thrombi. As fibrin forms, part of a physiological counter regulation is that it orchestrates its own degradation. Soluble fibrin

degradation products occur as a result of plasmin digestion (GAFFNEY 2001). After an attack of plasmin, main soluble degradation products are fibrin D fragments consisting of the C-terminal parts and fibrin E-fragments consisting of the N-terminal sections. D fragments (D dimers) are routinely measured as markers for hypercoagulability, i.e., the formation and lysis of cross-linked fibrin. With regard to the N-terminal degradation products, the E1 fragment is the first intermediate product. In this molecule, the N-terminal amino acids of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -chain are the same as those of the intact fibrin monomer molecule. These N-terminal sequences represent, so far, only known active sites of E1-fragments. The N terminus of the  $\alpha$ -chain interacts with CD18 (LOIKE et al. 1991), while the N terminus of the  $\beta$ -chain interacts with vascular endothelial (VE)-cadherin. E1 fragments are rapidly digested into fragments E2 and E3; in these molecules the N-terminal sequences are truncated and thus inactive (OLEXA et al. 1981).

## **2. Fibrin(ogen) during Inflammation**

There is increasing evidence that the plasma protein fibrinogen, which is constitutively expressed in the liver, plays a major role in the inflammatory process. Several studies proposed a role for fibrinogen in the stimulation of inflammatory mediators such as IL-1 $\beta$  (PEREZ and ROMAN 1995), IL-8 (QI and KREUTZER 1995), macrophage inflammatory proteins, and monocyte chemoattractant protein-1 (HARLEY et al. 2000). The Framingham study, where 1,315 participants who were free of cardiovascular disease were followed up for 12 years, confirmed blood levels of fibrinogen as an independent risk factor for cardiovascular disease of comparable importance to blood pressure, haematocrit, obesity, cigarette smoking, and diabetes. In addition, fibrinogen values were significantly related to these risk factors, concluding that fibrinogen should be included on the profile of cardiovascular risk factors (KANNEL et al. 1987).

This finding was supported by KOEHLER et al., who reported that plasma D dimer levels are independently associated with the presence of coronary artery disease in patients with stable angina pectoris. Moreover, plasma concentrations of D dimers and fibrinogen are independently correlated to the severity of atherosclerosis patients with stable angina after myocardial infarction (TATARU et al. 1999, 2001). Another group determined the role of D dimer in patients with 230 unstable angina pectoris on presentation to the emergency department.

D dimer levels were significantly correlated to cardiac risk factors and to the length of stay in the hospital (SHITRIT et al. 2004). Finally, levels of soluble fibrin monomers are considered as predictors of mortality in patients with myocardial infarction (KONTNY et al. 1999). A recent study evaluated the contribution of haematological factors and chronic inflammation to the development of myocardial infarction at a young age (younger than 45 years old). Plasma levels of soluble fibrin and C-reactive protein were significantly higher in patients than in controls. On multivariate regression analysis, soluble fibrin was the strongest predictor of myocardial infarction (SAIGO et al. 2004). These data provide strong evidence for the role of fibrin formation and degradation as important events in the development, progression, and prognosis of cardiovascular disease.

Binding sites to various integrins or intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) have been described to reside on fibrin D fragment (ALTIERI et al. 1990, 1993, 1995, FARRELL et al. 1992, SUEHIRO et al. 1997, YOKOYAMA et al. 1999). Fibrin-derived E1 fragments on the



other hand have epitopes binding to VE-cadherin (BACH et al. 1998) and CD11c (LOIKE et al. 1991). Pro-inflammatory activities of fibrinogen and fibrin-derived degradation products have been investigated in our laboratories. Based on the well established mechanism of leukocyte adhesion and transmigration (see Fig. 1), we found that fibrin E1 fragment *in vitro* contribute to the process of leukocyte transmigration. This function of the E1 fragment is based on its ability to bind to the endothelial cell adhesion molecule VE cadherin (see Fig. 2). This interaction is mediated by the N-terminal amino acids of the fibrin  $\beta$ -chain, covering amino acids B $\beta$ 15–42. Using a small peptide with exactly this sequence (peptide B $\beta$ 15–42), we were able to block E1 fragment induced transmigration *in vitro* (PETZELBAUER et al. 2005). This peptide constitutes the development product FX06 (= B $\beta$ 15–42), which has entered clinical development as a cardioprotective.

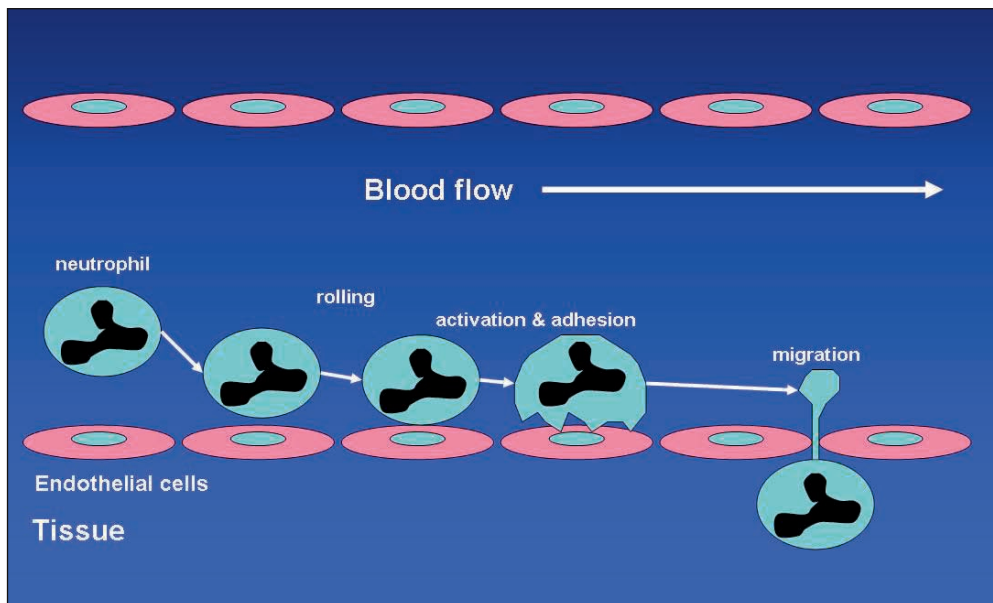


Fig. 1 Consensus mechanism of leukocyte adhesion and transmigration. Tethering and rolling is induced through interaction of selectins with their carbohydrate receptors. Firm adhesion is orchestrated by binding of leukocyte integrins with their cognate receptors. Finally, migration into tissue follows a highly orchestrated process, in which a multi-layered molecular zipper of molecular interactions between neighbouring endothelial cells is opened up.

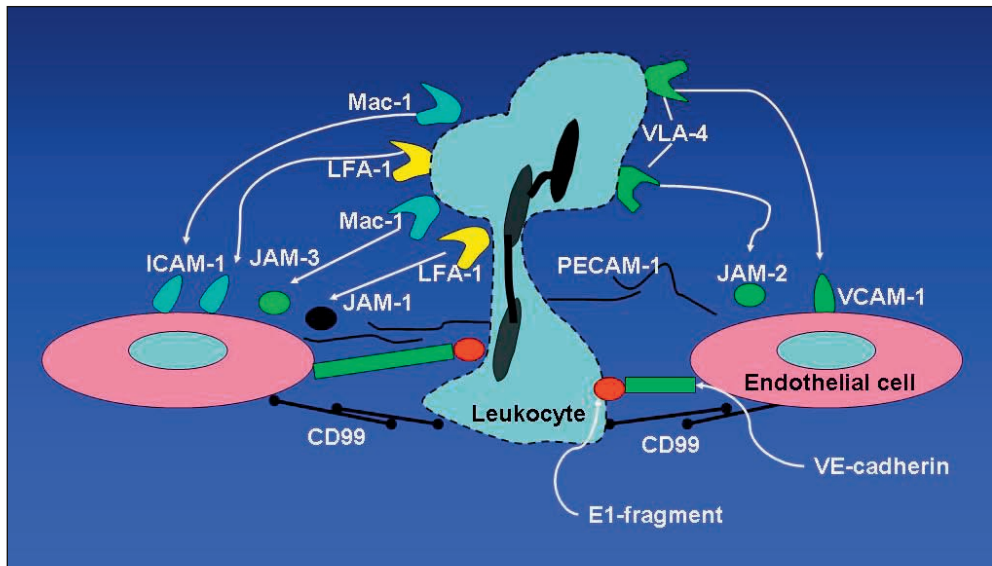


Fig. 2 A schematic illustrating leukocyte diapedesis. To leave postcapillary venules and reach tissues, circulating leukocytes undergo a tightly coordinated multistep process. At sites of endothelial activation, leukocytes tether, roll, become activated, and adhere to endothelial surfaces. Up to this point, this process is fully reversible and leukocytes can return into the blood stream. The final step, transmigration through endothelial junctions, is thought to be irreversible. Leukocytes must cross the multilayered molecular zipper of interendothelial junctions. Molecules configuring this zipper include, e.g., junctional adhesion molecules (JAMs), platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31), CD99 and VE cadherin (CD144). Each of these molecules participates in zipper formation by homophilic adhesion with neighboring endothelial cells. JAMs, PECAM-1, and CD99 contribute to leukocyte transmigration by building junctional and/or heterotypic adhesion to leukocytes. For VE cadherin, we recently described a novel indirect mechanism, by which this molecule is able to interact with inflammatory cells, namely, the E1 fragments of fibrin. These fragments build a bridge between VE cadherin and leukocytes, thereby directing cells into tissues.

### 3. Summary and Perspective

We have recently identified a novel fibrin-derived peptide, B $\beta$ 15-42 with cardioprotective effects in models of myocardial ischaemia-reperfusion (PETZELBAUER et al. 2005, ROESNER et al. 2007, ZACHAROWSKI et al. 2006, 2007). This peptide consists of 28 amino acids corresponding to the N-terminal sequence of the fibrin  $\beta$ -chain. Its mechanism of action was recently reviewed and discussed (for review, see ZACHAROWSKI et al. 2006). Briefly, we found that specific derivatives of fibrin, i.e. E1 fragments are pro-inflammatory. They induce transmigration of leukocytes *in vitro*. By binding to endothelial cell junctions, E1 fragments induce migration through endothelial monolayers. The N terminus of the  $\beta$ -chain of E1 fragments (B $\beta$ 15-42) interacts with VE cadherin (PETZELBAUER et al. 2005) and the N terminus of the  $\alpha$ -chain interacts with CD11c. Thereby, E1 fragments build a bridge between endothelial and inflammatory cells. Consequently, peptides matching the VE cadherin binding site (FX06) prevent bridge formation thereby reducing leukocyte transmigration *in vitro* and myocardial inflammation and infarct size following ischaemia-reperfusion injury *in vivo* (see Fig. 3). FX06 is currently developed clinically as therapeutic to prevent myocardial ischaemia-reperfusion injury in STEMI patients undergoing PCI (F. I. R. E. Study 2008).

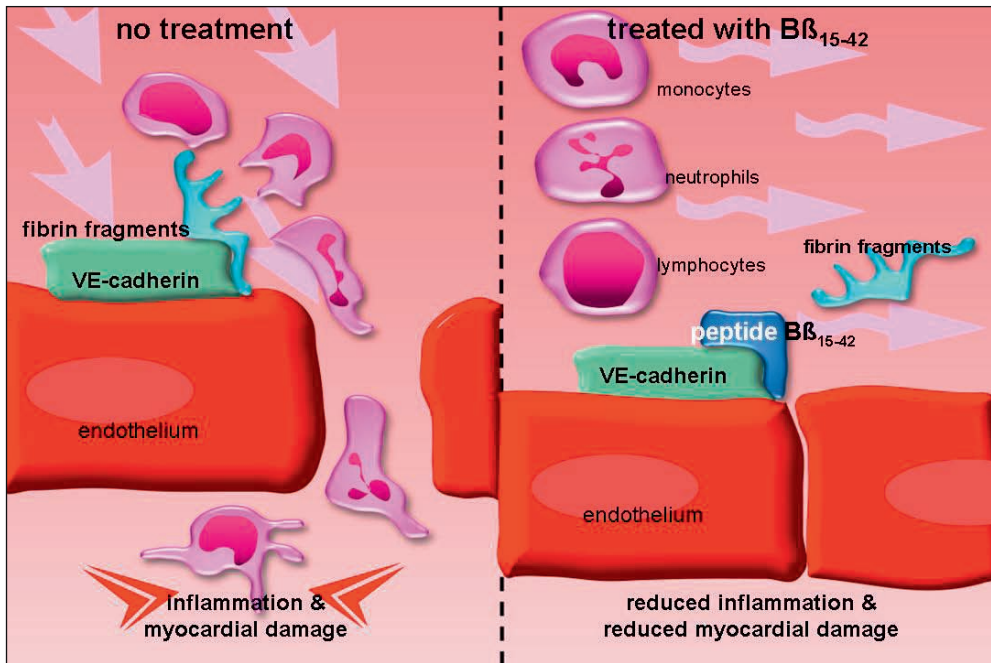


Fig. 3 Mechanism of action. Leukocyte transmigration is critically controlled by fibrin fragments. These short lived intermediates engage leukocytes to the endothelial cell junction, which breaks up the VE cadherin interaction between neighboring endothelial cells. This interaction allows the leukocyte to pass through into the tissue (diapedesis). The anti-inflammatory peptide FX06 ( $B\beta_{15-42}$ ) prevents this interaction between fibrin fragments and VE cadherin.

## References

- ALTIERI, D. C., AGBANYO, F. R., PLESCIA, J., GINSBERG, M. H., EDGINGTON, T. S., and PLOW, E. F.: A unique recognition site mediates the interaction of fibrinogen with the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Biol. Chem.* 265/21, 12119–12122 (1990)
- ALTIERI, D. C., DUPERRAY, A., PLESCIA, J., THORNTON, G. B., and LANGUINO, L. R.: Structural recognition of a novel fibrinogen gamma chain sequence (117–133) by intercellular adhesion molecule-1 mediates leukocyte-endothelium interaction. *J. Biol. Chem.* 270/2, 696–699 (1995)
- ALTIERI, D. C., PLESCIA, J., and PLOW, E. F.: The structural motif glycine 190-valine 202 of the fibrinogen gamma chain interacts with CD11b/CD18 integrin (alpha M beta 2, Mac-1) and promotes leukocyte adhesion. *J. Biol. Chem.* 268/3, 1847–1853 (1993)
- BACH, T. L., BARSIGIAN, C., YAEN, C. H., and MARTINEZ, J.: Endothelial cell VE-cadherin functions as a receptor for the beta 15–42 sequence of fibrin. *J. Biol. Chem.* 273/46, 30719–30728 (1998)
- F.I.R.E. Study: A multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study to measure the effect of FX06 (a fibrin-derived peptide  $B\beta_{15-42}$ ) on ischemia-reperfusion injury in patients with acute myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00326976?term=F.I.R.E.&rank=1>. Clinical Trials Gov. 2008
- FARRELL, D. H., THIAGARAJAN, P., CHUNG, D. W., and DAVIE, E. W.: Role of fibrinogen alpha and gamma chain sites in platelet aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89/22, 10729–10732 (1992)
- GAFFNEY, P. J.: Fibrin degradation products. A review of structures found in vitro and in vivo. *Ann. New York Acad. Sci.* 936, 594–610 (2001)
- HARLEY, S. L., STURGE, J., and POWELL, J. T.: Regulation by fibrinogen and its products of intercellular adhesion molecule-1 expression in human saphenous vein endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20/3, 652–658 (2000)

- KANNEL, W. B., WOLF, P. A., CASTELLI, W. P., and D'AGOSTINO, R. B.: Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. The Framingham Study. *JAMA* 258/9, 1183–1186 (1987)
- KONTNY, F., DEMPFLER, C. E., and ABILDGAARD, U.: Fibrin monomer antigen: a novel marker of mortality in acute myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 20/11, 808–812 (1999)
- LOIKE, J. D., SODEIK, B., CAO, L., LEUCONA, S., WEITZ, J. I., DETMERS, P. A., WRIGHT, S. D., and SILVERSTEIN, S. C.: CD11c/CD18 on neutrophils recognizes a domain at the N terminus of the A alpha chain of fibrinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88/3, 1044–1048 (1991)
- OLEXA, S. A., BUDZYNSKI, A. Z., DOOLITTLE, R. F., COTTRELL, B. A., and GREENE, T. C.: Structure of fragment E species from human cross-linked fibrin. *Biochemistry* 20/21, 6139–6145 (1981)
- PEREZ, R. L., and ROMAN, J.: Fibrin enhances the expression of IL-1 beta by human peripheral blood mononuclear cells. Implications in pulmonary inflammation. *J. Immunol.* 154/4, 1879–1887 (1995)
- PETZELBAUER, P., ZACHAROWSKI, P. A., MIYAZAKI, Y., FRIEDL, P., WICKENHAUSER, G., CASTELLINO, F. J., GRÖGER, M., WOLFF, K., and ZACHAROWSKI, K.: The fibrin-derived peptide B beta(15–42) protects the myocardium against ischemia-reperfusion injury. *Nature Med.* 11/3, 298–304 (2005)
- QI, J., and KREUTZER, D. L.: Fibrin activation of vascular endothelial cells. Induction of IL-8 expression. *J. Immunol.* 155/2, 867–876 (1995)
- ROESNER, J. P., PETZELBAUER, P., KOCH, A., MERSMANN, J., ZACHAROWSKI, P. A., BOEHM, O., REINGRUBER, S., PASTEINER, W., MASCHER, D., WOLZT, M., BARTHUBER, C., NÖLDGE-SCHOMBURG, G. E., SCHEEREN, T. W., and ZACHAROWSKI, K.: The fibrin-derived peptide Bbeta15–42 is cardioprotective in a pig model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Crit. Care Med.* 35/7, 1730–1735 (2007)
- SAIGO, M., WATERS, D. D., ABE, S., BIRO, S., MINAGOE, S., MARUYAMA, I., and TEI, C.: Soluble fibrin, C-reactive protein, fibrinogen, factor VII, antithrombin, proteins C and S, tissue factor, D-dimer, and prothrombin fragment 1 + 2 in men with acute myocardial infarction  $\leq$ 45 years of age. *Amer. J. Cardiol.* 94/11, 1410–1413 (2004)
- SHITRIT, D., BAR-GIL, S. A., RUDENSKY, B., SULKES, J., GUTTERER, N., and ZVIONY, D.: Role of ELISA D-dimer test in patients with unstable angina pectoris presenting at the emergency department with a normal electrocardiogram. *Amer. J. Hematol.* 77/2, 147–150 (2004)
- SUEHIRO, K., GAILIT, J., and PLOW, E. F.: Fibrinogen is a ligand for integrin alpha5beta1 on endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 272/8, 5360–5366 (1997)
- TATARU, M. C., HEINRICH, J., JUNKER, R., SCHULTE, H., ECKARDSTEIN, A. VON, ASSMANN, G., and KOEHLER, E.: D-dimers in relation to the severity of arteriosclerosis in patients with stable angina pectoris after myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 20/20, 1493–1502 (1999)
- TATARU, M. C., SCHULTE, H., ECKARDSTEIN, A. VON, HEINRICH, J., ASSMANN, G., and KOEHLER, E.: Plasma fibrinogen in relation to the severity of arteriosclerosis in patients with stable angina pectoris after myocardial infarction. *Coron. Artery Dis.* 12/3, 157–165 (2001)
- YOKOYAMA, K., ZHANG, X. P., MEDVED, L., and TAKADA, Y.: Specific binding of integrin alpha v beta 3 to the fibrinogen gamma and alpha E chain C-terminal domains. *Biochemistry* 38/18, 5872–5877 (1999)
- ZACHAROWSKI, K., ZACHAROWSKI, P., FRIEDL, P., MASTAN, P., KOCH, A., BOEHM, O., ROTHER, R. P., REINGRUBER, S., HENNING, R., EMEIS, J. J., and PETZELBAUER, P.: The effects of the fibrin-derived peptide Bb15–42 in acute and chronic models of myocardial ischemia-reperfusion. *Shock* 27/6, 1–8 (2007)
- ZACHAROWSKI, K., ZACHAROWSKI, P., REINGRUBER, S., and PETZELBAUER, P.: Fibrin(ogen) and its fragments in the pathophysiology and treatment of myocardial infarction. *J. Mol. Med.* 84/6, 469–477 (2006)

Prof. Dr. Dr. Kai ZACHAROWSKI, FRCA  
Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie  
Klinikum der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main  
Theodor-Stern-Kai 7  
60590 Frankfurt (Main)  
Germany  
Phone: +49 69 63015998  
Fax +49 69 63015881  
E-Mail: [Direktion.Anaesthesie@kgu.de](mailto:Direktion.Anaesthesie@kgu.de)

# **Preconditioning and Organprotection by Anesthetic Agents Clinical Outcome – Cardioprotection**

Stefan G. DE HERT (Amsterdam)

With 1 Figure and 2 Tables

## *Abstract*

Over the years various cardioprotective strategies have been developed to reduce the incidence of perioperative cardiac events. The great majority of these strategies showed promising results in experimental settings but mostly failed to provide convincing significant clinical effects. Anesthetic cardioprotection, however, seems to be an exception to this. The experimentally observed protective effects seem to translate also to a clinically relevant cardioprotection with a beneficial effect on patients' outcome. Although the initial data seem to be promising, further studies will have to confirm these beneficial effects.

## *Zusammenfassung*

In den letzten Jahren wurden verschiedene kardioprotektive Strategien entwickelt, um die Häufigkeit des Auftretens kardialer Ereignisse nach Operationen zu verringern. Die Mehrheit dieser Vorgehensweisen zeigt in Experimenten vielversprechende Ergebnisse, erreicht aber keine überzeugenden klinischen Wirkungen. Kardioprotektion durch Anästhetika scheint in dieser Hinsicht eine bemerkenswerte Ausnahme darzustellen. Die experimentell beobachteten Schutzeffekte lassen sich auch in klinisch relevante Wirkungen umsetzen, die einen Nutzen für den Patienten besitzen. Obwohl die ersten Daten dazu sehr vielversprechend sind, bedarf es weiterer Studien, um diese günstigen Effekte abzusichern.

## **1. Introduction**

Clinical cardioprotection faces the failure to translate experimentally effective interventions and new therapies into clinical effective therapies. The reason for such failure is multifactorial and can be distinguished in possible barriers at the preclinical level and barriers at the clinical level (BOLLI et al. 2004). This is also true for the possible cardioprotection by anesthetic agents. Despite the overwhelming evidence for anesthetic cardioprotection obtained in numerous experimental settings, the clinical results show highly variable results.

## **2. From Experimental Data to Clinical Reality**

It could be expected that the implementation of the experimentally observed cardioprotective effects of anesthetic agents during clinical anesthesia should provide an additional tool in the treatment and/or prevention of cardiac dysfunction in the perioperative period. In clinical prac-

tice, these effects should then be associated with improved cardiac function, ultimately resulting in a better outcome in patients with coronary artery disease. Is this a clinical reality?

A major obstacle to translate the experimental observations to a clinical setting is that myocardial ischemia has to be present in a predictable and reproducible manner. Cardiac surgery constitutes a suitable, but still suboptimal model for the study of potential cardioprotective effects of anesthetic agents (Fig. 1).

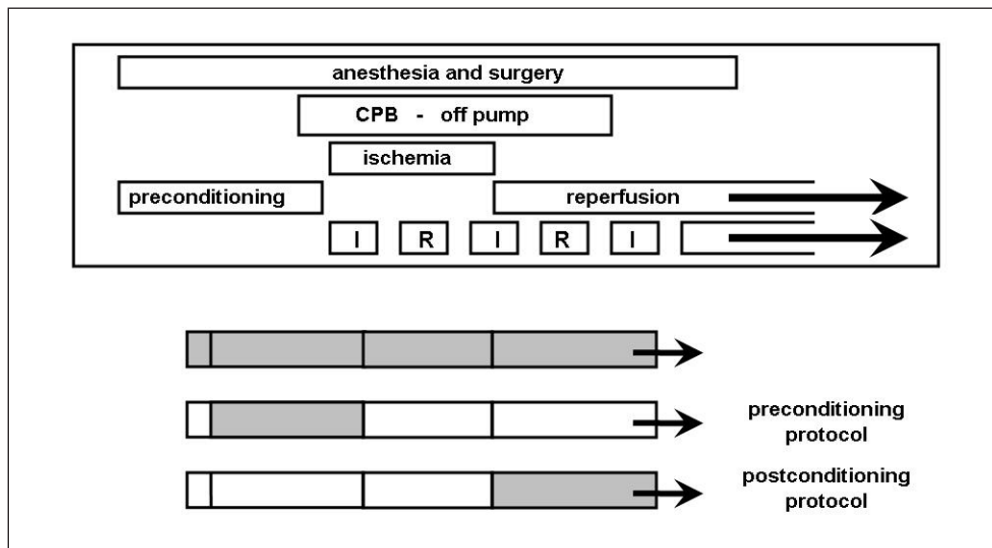


Fig. 1 Schematic representation of the different clinical anesthetic cardioprotection protocols used. In cardiac surgery there is a reproducible period of myocardial ischemia during the aortic crossclamp period. This period of myocardial ischemia is preceded by a period during which different sorts of preconditioning stimuli can be applied. The ischemic period is followed by a period of reperfusion during which different postconditioning protocols can be applied. With interventions on cardiopulmonary bypass (CPB) there is one large period of myocardial ischemia followed by a reperfusion period, whereas in off-pump coronary surgery, intermittent crossclamping is applied with alternating short periods of ischemia (I) followed by short periods of reperfusion (R).

### 2.1 Anesthetic Agents and Preconditioning: The Clinical Situation

The first studies that were performed consisted of a protocol where the anesthetic agent was administered before the ischemic episode (preconditioning protocols) (reviewed in ref. DE HERT et al. 2005 and DE HERT 2008 and summarized in Tab. 1). In contrast to the straightforward data obtained in the different experimental animal studies, the data from the various clinical anesthetic preconditioning studies show highly variable results and fail to demonstrate an unequivocal beneficial effect on the extent of post-ischemic myocardial function and damage. Taken together, it would appear that none of these “preconditioning” studies, although suggesting some protective action on either a biochemical or a functional variable, unequivocally demonstrate that the use of a volatile anesthetic regimen resulted in a clinical benefit for the patients. Part of the variability between studies can be attributed to differences in protocols, such as choice of the anesthetic agent, duration of the administration, inclusion of a washout period, etc. This has become apparent from two recent studies demonstrating

that the preconditioning protocol used could make an essential difference in the extent of the cardioprotection (BEIN et al. 2008, FRÄSSDORF et al. 2009).

Tab. 1 Summary of clinical data on anesthetic preconditioning protocols in patients undergoing coronary artery bypass surgery.

Anesthetic agent	Number	Cardiac function	Biochemical marker	Reference
isoflurane	n = 20	not reported	lower 5' nucleotidase lower CK-MB and TnI	BELHOMME et al. 1999
enflurane	n = 16	improved function	no effect	PENTA DE PEPPA et al. 1999
isoflurane	n = 40	improved function (in subgroup)	lower Tn I (in subgroup)	TOMAI et al. 1999
isoflurane	n = 49	improved function	not reported	HAROUN-BIZRI et al. 2001
sevoflurane	n = 20	not reported	no effect	POUZET et al. 2002
sevoflurane	n = 72	not reported	lower BNP no effect on Tn T	JULIER et al. 2003
isoflurane	n = 40	no effect	lower Tn I and CK-MB	FORLANI et al. 2004
isoflurane	n = 359	not reported	no effect	FELLAHI et al. 2004
isoflurane	n = 40	improved function	lower Tn I	LEE et al. 2006
morphine	n = 46	improved function	no effect	MURPHY et al. 2006
desflurane	n = 28	improved function	lower Tn I and BNP	MECO et al. 2007
sevoflurane	n = 72	no effect	no effect	PIRIOU et al. 2007

CK-MB = creatine kinase isoenzyme MB, Tn = cardiac troponin, BNP = brian natriuretic peptide

### *2.2 Anesthetic Agents and the Ischemic Period: the Clinical Situation*

Anesthetic agents have been claimed to have a direct protective action when administered during ischemia. In a few observational studies on a limited number of cardiac surgery patients, propofol was shown to attenuate free-radical-mediated lipid peroxidation and systemic inflammation (CORCORAN et al. 2004, 2006, XIA et al. 2006). Although in one study (XIA et al. 2006) this was associated with a lower postoperative troponin release no differences in outcome were observed. A similar phenomenon has been reported with volatile anesthetics. Administration of sevoflurane in the cardioplegic solution during cardiopulmonary bypass was associated with lower postoperative levels of inflammatory markers and troponin I together with a better postoperative function but no differences in outcomes (NADER et al. 2004, 2006).

### *2.3 Anesthetic Agents and Postconditioning: The Clinical Situation*

The clinical implication of an anesthesia-induced postconditioning effect remains to be established in patients undergoing coronary artery bypass grafting, 1.7% of isoflurane given during the first 15 min after the release of the aortic crossclamp reduced the need for inotropic support and protected against myocardial damage as assessed by postoperative troponin release (BUHRE 2001). However, in a more recent study, DE HERT et al. (2004a) observed that consistent protection with better postoperative cardiac function and lower troponin I re-

lease only reached pertinent clinical significance when the volatile anesthetic agent was given throughout the entire procedure.

The absence of clinically straightforward data from anesthetic preconditioning studies has initiated the question whether the choice of the anesthetic regimen during the surgical procedure would really influence myocardial outcome. This was especially of interest as former studies had indicated that the choice of the anesthetic regimen did not really affect outcome (SLOGOFF and KEATS 1989, TUMAN et al. 1989). The first study, by DE HERT et al. (2002) compared the effects of sevoflurane and propofol on myocardial function during and after coronary artery surgery. Before cardiopulmonary bypass, all hemodynamic variables were comparable between the two anesthetic treatment groups. However, after cardiopulmonary bypass, patients who received the volatile anesthetic regimen for anesthesia had preserved cardiac performance, which was evident from a preserved stroke volume and  $dP/dt_{max}$ , and the preservation of the length-dependent regulation of myocardial function. In addition, need for inotropic support in the early postoperative period was significantly less with the volatile anesthetic, and postoperative plasma concentrations of cardiac troponin I were consistently lower when compared with patients who received the total intravenous anesthetic regimen. These data therefore suggested that volatile anesthetics provided a cardioprotective effect that was not observed with the intravenous anesthetic regimen. This was confirmed in a subsequent study by the same authors in a group of elderly, high-risk patients with documented impaired myocardial function (DE HERT et al. 2003). Sevoflurane and desflurane preserved myocardial function after cardiopulmonary bypass with less evidence for myocardial damage and a better postoperative myocardial function compared with the intravenous anesthetic regimen.

A retrospective analysis of data, performed in another centre before and after the implementation of a volatile anesthetic regimen supported the findings on the cardioprotective effects of a volatile anesthetic regimen. The addition of sevoflurane to an intravenous anesthesia regimen for cardiac surgery consistently lowered troponin T levels, there was less need for inotropic support for weaning from cardiopulmonary bypass, and the incidence of low cardiac output was decreased (VAN DER LINDEN et al. 2003). The cardioprotective effects of a volatile anesthetic regimen during coronary surgery were confirmed in other reports that used different anesthetic and surgical protocols (CONZEN et al. 2003, BEIN et al. 2005, GUARACINO et al. 2006, KAWAMURA et al. 2006, TRITAPEPE et al. 2007). All these clinical studies clearly indicated that volatile anesthetics protect the myocardium during coronary surgery (Tab. 2). Another study in patients undergoing off-pump coronary surgery failed to observe such cardioprotective effects (LAW-KOUNE et al. 2006). In this study, however, intra-operative remifentanyl concentrations were consistently higher and bispectral index values lower in the propofol group compared to the sevoflurane-treated patients, indicating that there were probably differences in anesthetic depth that undoubtedly have influenced the results.

### 3. Does Anesthetic Cardioprotection Affect Clinical Outcome?

Although all these clinical observations clearly indicate that volatile anesthetics protect the myocardium during coronary surgery, the impact of this phenomenon on postoperative morbidity and clinical recovery remains to be definitively established. EL AZAB et al. (2003) observed that the use of sevoflurane during coronary surgery was associated with a lower postoperative release of tumor necrosis factor- $\alpha$  but also with a shorter length of stay in the



Tab. 2 Summary of clinical data on protocols with a volatile anesthetic regimen throughout the entire surgical procedure in patients undergoing coronary artery bypass surgery.

Anesthetic agent	Number	Cardiac function	Biochemical marker	Reference
sevoflurane	n = 20	improved function	lower Tn I release	DE HERT et al. 2002
sevoflurane/desflurane	n = 45	improved function	lower Tn I release	DE HERT et al. 2003
sevoflurane	n = 198	not reported	lower Tn T release	VAN DER LINDEN et al. 2003
sevoflurane	n = 20	improved function	lower Tn I release	CONZEN et al. 2003
sevoflurane	n = 20	improved function	no difference	BEIN et al. 2005
desflurane	n = 72	no difference	lower Tn I release	GUARRACINO et al. 2006
sevoflurane	n = 23	improved function	lower Tn I release	KAWAMURA et al. 2006
desflurane	n = 150	no difference	lower Tn I release	TRITAPEPE et al. 2007
sevoflurane	n = 18	no difference	no difference	LAW-KOUNE et al. 2006

Tn = cardiac troponin

intensive care unit compared with patients who had a total intravenous anesthetic regimen. Only recently, this issue was addressed in a larger study population of 320 coronary surgery patients who were randomly assigned to receive either a total intravenous anesthetic regimen or a volatile anesthetic regimen (DE HERT et al. 2004b). The patients who received a volatile anesthetic regimen demonstrated a significantly lower intensive care and hospital length of stay. Multiple regression analysis revealed that prolonged length of stay in the intensive care unit in this particular study was related to the following independent predictors of outcome: occurrence of atrial fibrillation, an increase in postoperative troponin I levels in excess of 4 ng/ml, and the need for prolonged postoperative inotropic support for more than 12 h. Although the differences in incidence of atrial fibrillation between groups in this study did not reach statistical significance, the number of patients with an increase in postoperative troponin I of more than 4 ng/ml and the number of patients who needed prolonged postoperative inotropic support was significantly lower in the volatile anesthetic groups. This was associated with better myocardial function during the first postoperative hours. In another study from the same group it was observed that the use of sevoflurane during coronary artery surgery was associated with a lower incidence of atrial fibrillation (CROMHEECKE et al. 2005).

The effects of the choice of the anesthetic regimen on real outcome variables such as postoperative mortality and morbidity remain to be established. This is mainly related to the fact that sample size of the different studies is too low to address these issues. Recently JAKOBSEN et al. (2007) published a retrospective study from a Danish national registry on 10,535 patients who had undergone cardiac surgery in 3 cardiac centers with either a volatile or an intravenous anesthetic regimen. While there was no difference in 30-day total mortality, cardiac-related mortality seemed to be lower with a volatile anesthetic regimen but non-cardiac death seemed to be higher in this patient population. Correct interpretation of these data remains difficult because of a number of methodological issues – which are inherent to this type of analyses – such as the retrospective design including patients over a period of 6 years, the lack of information on the different surgical and anesthetic techniques, the differences in patient collection between centers, etc.

Three meta-analyses of myocardial protection with volatile anesthetics were performed during the last few years. YU et al. (2006) conducted a systematic review of studies that assessed the effects of volatile anesthetics on cardiac ischemic complications and morbidity. A total of 2,841 coronary surgery patients were included in the analysis. In comparison with intravenous anesthesia, a volatile anesthetic regimen was associated with a reduced-all-cause mortality. Sevoflurane and desflurane reduced cardiac troponin I at 6 h, 12 h, 24 h, and 48 h after operation. The other meta-analysis by SYMONS and MYLES (2006) compared a volatile with a non-volatile anesthetic regimen in 2,979 coronary surgery patients. There was no significant difference in myocardial ischemia, myocardial infarction, intensive care unit length of stay or hospital mortality between the groups. After cardiopulmonary bypass, patients who received volatile anesthetics had 20% higher cardiac indices, significantly lower serum troponin I and less requirement for inotropic support compared with those who received intravenous anesthetics. Duration of mechanical ventilation was reduced by 2.7 h, and there was a 1 day decrease in hospital length of stay. Finally, LANDONI et al. (2007a) focused on the data obtained with the newer volatile anesthetics desflurane and sevoflurane. They included 22 trials with a total of 1,922 patients, comparing a volatile with an intravenous anesthetic regimen. With the volatile anesthetic regimen, postoperative troponin release was lower, cardiac index was better with less need for inotropic support, the incidence of perioperative myocardial infarction was lower, and mechanical ventilation time, intensive care length of stay, and hospital length of stay were shorter.

Until now it is unknown whether this apparently more favorable short term outcome also translates in an improved long term outcome. In a follow-up study on 72 patients, GARCIA et al. (2005) observed a lower incidence of cardiac events on one-year follow-up after cardiac surgery in patients who had a sevoflurane preconditioning protocol at the time of surgery. Now further studies on possible beneficial anesthesia-related effects on long term outcome are awaited to comment more definitively on this issue.

#### 4. Future Directions and Conclusions

Many questions remain to be definitively elucidated. The available clinical data on cardioprotective effects of volatile anesthetics to date are largely confined to coronary surgery patients, mostly with an ejection fraction >50%. One study in aortic valve surgery patients demonstrated that the use of a volatile anesthetic regimen was also associated with preserved cardiac function after cardiopulmonary bypass and less postoperative release of troponin I compared with a total intravenous anesthetic regimen (CROMHEECKE et al. 2006). In isolated mitral valve surgery, however, such effects were not observed (LANDONI et al. 2007b).

Non-cardiac surgery is also associated with a risk of perioperative cardiac events. The observation that anesthetic cardioprotection with volatile anesthetics is also observed during off-pump coronary surgery may suggest that this phenomenon may also be present in patients at risk of myocardial events undergoing surgical procedures without cardiopulmonary bypass. Among these non-cardiac procedures, arterial vascular surgery is considered as a high risk for the development of perioperative cardiac events. Recently, a retrospective analysis has compared the effects of a volatile anesthetic to a non-volatile anesthetic regimen on the incidence of postoperative cardiac events, including the postoperative elevation of troponin I values after vascular surgery in high risk patients. The data were obtained from a phase II study that compared the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger type I inhibitor, zoniporide to placebo on the occurrence of cardiac

events. This multicenter study was conducted in 105 sites throughout the United States, South America, Europe and Asia. Type of anesthesia was retrieved from the database and patients were subdivided in two groups: inhalational *versus* non-inhalational anesthetic regimen. The incidence of postoperative cardiac events and maximum postoperative troponin I levels were not different between the two groups in the total population and in the patients undergoing peripheral arterial surgery. In patients undergoing aortic surgery the incidence of elevated troponin levels higher than 1.5 and 4 ngml<sup>-1</sup> tended to be lower in the inhalational group (28% *versus* 18% and 30% *versus* 20% respectively) but this difference did not reach statistical significance (DE HERT et al. 2008). The results of this hypothesis-generating study suggested that potential beneficial effects on extent of postoperative myocardial damage in high risk patients undergoing arterial surgery will probably be more apparent in abdominal aortic surgery than in peripheral vascular surgery. Further sufficiently powered studies using a standardized protocol should now be performed to definitively address this question. Finally, also in some non-surgical revascularization procedures, such as percutaneous transluminal coronary angioplasty anesthetic cardioprotection might provide another mechanism of protection. However, a recent Italian study could not find evidence for such an effect (LANDONI in press).

In conclusion, over the years various cardioprotective strategies have been developed to reduce the incidence of perioperative cardiac events. The great majority of these strategies showed promising results in experimental settings but mostly failed to provide convincing significant clinical effects. Anesthetic cardioprotection however seems to be an exception to this. The experimentally observed protective effects seem to translate also to a clinically relevant cardioprotection with a beneficial effect on patients' outcome. Although the initial data seem to be promising, further studies will have to confirm these beneficial effects.

## *References*

- BEIN, B., RENNER, J., CALIEBE, D., HANSS, R., BAUER, M., FRAUND, S., and SCHOLZ, J.: The effects of interrupted or continuous administration of sevoflurane on preconditioning before cardiopulmonary bypass in coronary surgery: comparison with continuous propofol. *Anaesthesia* 63, 1046–1055 (2008)
- BEIN, B., RENNER, J., CALIEBE, D., SCHOLZ, J., PARIS, A., FRAUND, S., ZAEHLE, W., and TONNER, P. H.: Sevoflurane but not propofol preserves myocardial function during minimally invasive direct coronary artery bypass surgery. *Anesth. Analg.* 100, 610–616 (2005)
- BELHOMME, D., PEYNET, J., LOUZY, M., LAUNAY, J. M., KITAKAZE, M., and MENASCHÉ, P.: Evidence for preconditioning by isoflurane in coronary artery bypass graft surgery. *Circulation* 100 (Suppl.), II340–II344 (1999)
- BOLLI, R., BECKER, L., GROSS, G., MENTZER, R., BALSHAW, D., and LATHROP, D. A.: Myocardial protection at a crossroads: the need for translation into clinical therapy. *Circ. Res.* 95, 125–134 (2004)
- BUHRE, W: Cardioprotective and anti-inflammatory action of isoflurane during coronary artery bypass surgery. *Habilitationsschrift RWTH, Aachen*, 2001
- CONZEN, P. F., FISHER, S., DETTER, C., and PETER, K.: Sevoflurane provides greater protection of the myocardium than propofol in patients undergoing off-pump coronary artery bypass surgery. *Anesthesiology* 99, 826–833 (2003)
- CORCORAN, T. B., ENGEL, A., SAKAMOTO, H., O'CALLAGHAN-ENRIGHT, S., O'DONNELL, A., HEFFRON, J. A., and SHORTEN, G.: The effects of propofol on lipid peroxidation and inflammatory response in elective coronary artery bypass grafting. *J. Cardiothor. Vasc. Anesth.* 18, 592–604 (2004)
- CORCORAN, T. B., ENGEL, A., SAKAMOTO, H., O'CALLAGHAN-ENRIGHT, S., and SHORTEN, G.: The effects of propofol on neutrophil function, lipid peroxidation and inflammatory response during elective coronary artery bypass grafting in patients with impaired ventricular function. *Br. J. Anaesth.* 97, 825–831 (2006)
- CROMHEECKE, S., PEPERMANS, V., HENDRICKX, E., LORSOMRADEE, S., TEN BROECKE, P. W., STOCKMAN, B. A., RODRIGUS, I. E., and DE HERT, S. G.: Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing aortic valve replacement with cardiopulmonary bypass. *Anesth. Analg.* 103, 289–296 (2006)

- CROMHEECKE, S., TEN BROECKE, P. W., HENDRICKX, E., MEEUS, R., and DE HERT, S. G.: Atrial fibrillation after coronary surgery: Can choice of the anesthetic regimen influence the incidence? *Acta Anaesthesiol. Belg.* 56, 147–154 (2005)
- DE HERT, S. G.: Cardioprotection in anesthesia. *Minerva Anesthesiologica* 74, 259–270 (2008)
- DE HERT, S. G., CROMHEECKE, S., TEN BROECKE, P. W., MERTENS, E., DE BLIER, I. G., STOCKMAN, B. A., RODRIGUS, I. E., and VAN DER LINDEN, P. J.: Effects of propofol, desflurane, and sevoflurane on recovery of myocardial function after coronary surgery in elderly high-risk patients. *Anesthesiology* 99, 314–323 (2003)
- DE HERT, S. G., LONGROIS, D., YANG, H., and FLEISHER, L. A.: Does the use of a volatile anesthetic regimen reduce the incidence of cardiac events after cardiac surgery. *Acta Anaesthesiol. Belg.* 59, 19–25 (2008)
- DE HERT, S. G., TEN BROECKE, P. W., MERTENS, E., VAN SOMMEREN, E. W., DE BLIER, I. G., STOCKMAN, B. A., and RODRIGUS, I. E.: Sevoflurane but not propofol preserves myocardial function in coronary surgery patients. *Anesthesiology* 97, 42–49 (2002)
- DE HERT, S. G., TURANI, F., MATHUR, S., and STOWE, D. F.: Cardioprotection with volatile anesthetics: mechanisms and clinical implications. *Anesth. Analg.* 100, 1584–1593 (2005)
- DE HERT, S. G., VAN DER LINDEN, P. J., CROMHEECKE, S., MEEUS, R., NELIS, A., VAN REETH, V., TEN BROECKE, P. W., DE BLIER, I. G., STOCKMAN, B. A., and RODRIGUS, I. E.: Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration. *Anesthesiology* 101, 299–310 (2004a)
- DE HERT, S. G., VAN DER LINDEN, P. J., CROMHEECKE, S., MEEUS, R., TEN BROECKE, P. W., DE BLIER, I. G., STOCKMAN, B. A., and RODRIGUS, I. E.: Choice of primary anesthetic regimen can influence intensive care unit length of stay after coronary surgery with cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 101, 9–20 (2004b)
- EL AZAB, S. R., ROSSEEL, P. M. J., DE LANGE, J. J., GROENEVELD, A. B. J., VAN STRIK, R., VAN WIJK, E. M., and SCHEFFER, G. J.: Effect of sevoflurane on the ex vivo secretion of TNF- $\alpha$  during and after coronary artery bypass surgery. *Eur. J. Anaesthesiol.* 20, 380–384 (2003)
- FELLAHI, J. L., GUE, X., PHILIPPE, E., RIOU, B., and GERARD, J. L.: Isoflurane may not influence postoperative cardiac troponin I release and clinical outcome in adult cardiac surgery. *Eur. J. Anaesthesiol.* 21, 688–693 (2004)
- FORLANI, S., TOMAI, F., DE PAULIS, R., TURANI, F., COLELLA, D. F., NARDI, P., DE NOTARIS, S., MOSCARELLI, M., MAGLIANO, G., CREA, F., and CHIARIELLO, L.: Preoperative shift from glibenclamide to insulin is cardioprotective in diabetic patients undergoing coronary artery bypass surgery. *J. Cardiovasc. Surg. (Torino)* 45, 117–122 (2004)
- FRÄSSDORF, J., BOROWSKI, A., EBEL, D., FEINDT, P., HERMES, M., MEEMANN, T., WEBER, R., MÜLLENHEIM, J., WEBER, N. C., PRECKEL, B., and SCHLACK, W.: Impact of preconditioning protocol on anesthetic induced cardioprotection in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *J. Thor. Cardiovasc. Surg.* 137, 1436–1442 (2009)
- GARCIA, C., JULIER, K., BESTMANN, L., ZOLLINGER, A., SEGESSER, L. K. VON, PASCH, T., SPAHN, D. R., and ZAUGG, M.: Preconditioning with sevoflurane decreases PECAM-1 expression and improves one-year cardiovascular outcome in coronary artery bypass graft surgery. *Br. J. Anaesth.* 94, 159–165 (2005)
- GUARRACINO, F., LANDONI, G., TRITAPEPE, L., POMPEI, F., LEONI, A., ALETTI, G., SCANDROGLIO, A. M., MASELLI, D., DE LUCA, M., MARCHETTI, C., CRESCENZI, G., and ZANGRILLO, A.: Myocardial damage prevented by volatile anesthetics: A multicenter randomised controlled study. *J. Cardiothor. Vasc. Anesth.* 20, 477–483 (2006)
- HAROUN-BIZRI, S., KHOURY, S. S., CHEHAB, I. R., KASSAS, C. M., and BARAKA, A.: Does isoflurane optimize myocardial protection during cardiopulmonary bypass? *J. Cardiothor. Vasc. Anesth.* 15, 418–421 (2001)
- JAKOBSEN, C. J., BERG, H., HINDSHOLM, K. B., FADDY, N., and SLOTH, E.: The influence of propofol versus sevoflurane anesthesia on outcome in 10,535 cardiac surgical procedures. *J. Cardiothor. Vasc. Anesth.* 21, 664–671 (2007)
- JULIER, K., DA SILVA, R., GARCIA, C., BESTMANN, L., FRASCAROLO, P., ZOLLINGER, A., CHASSOT, P. G., SCHMID, E. R., TURINA, M. I., SEGESSER, L. K. VON, PASCH, T., SPAHN, D. R., and ZAUGG, M.: Preconditioning by sevoflurane decreases biochemical markers for myocardial and renal dysfunction in coronary artery bypass graft surgery: a double-blinded, placebo-controlled, multicenter study. *Anesthesiology* 98, 1315–1327 (2003)
- KAWAMURA, T., KADSAKI, M., NARA, N., KAISE, A., SUZUKI, H., ENDO, S., WEI, J., and INADA, K.: Effects of sevoflurane on cytokine balance in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *J. Cardiothor. Vasc. Anesth.* 20, 503–508 (2006)
- LANDONI, G., BIONDI-ZOCCAI, G. G., ZANGRILLA, A., BIGNAMI, E., D'AVOLIO, S., MARCHETTI, C., CALABRÒ, M. G., FOCHI, O., GUARRACINO, F., TRITAPEPE, L., DE HERT, S., and TORRI, G.: Desflurane and sevoflurane in cardiac surgery: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J. Cardiothor. Vasc. Anesth.* 21, 502–511 (2007a)
- LANDONI, G., CALABRO, M. G., MARCHETTI, C., BIJNAMI, E., SCANDROGLIO, A. M., DEDOLA, E., DE LUCA, M., TRITAPEPE, L., CRESCENZI, G., and ZANGRILLO, A.: Desflurane versus propofol in patients undergoing mitral valve surgery. *J. Cardiothor. Vasc. Anesth.* 21, 672–677 (2007b)
- LANDONI, G., ZANGRILLO, A., FOCHI, O., MAJ, G., SCANDROGLIO, M., MORELLI, A., TRITAPEPE, L., MONTORFANO, M., and COLOMBO, A.: Cardiac protection with volatile anesthetics in stenting procedures. *J. Cardiothor. Vasc. Anesth.* 22, 543–547 (2008)

- LAW-KOUNE, J. D., RAYNAUD, C., LIU, N., DUBOIS, C., ROMANO, M., and FISCHLER, M.: Sevoflurane-remifentanyl versus propofol-remifentanyl anesthesia at a similar bispectral level for off-pump coronary artery surgery: no evidence of reduced myocardial ischemia. *J. Cardiothor. Vasc. Anesth.* 20, 484–492 (2006)
- LEE, M. C., CHEN, C. H., KUO, M. C., KANG, P. L., LO, A., and LIU, K.: Isoflurane preconditioning-induced cardioprotection in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Eur. J. Anaesthesiol.* 23, 841–847 (2006)
- MECO, M., CIRRI, S., GALLAZZI, C., MAGNANI, G., and COSSETA, D.: Desflurane preconditioning in coronary artery bypass graft surgery: a double-blinded, randomised and placebo-controlled study. *Eur. J. Cardiothor. Surg.* 32, 319–325 (2007)
- MURPHY, G. S., SZOKOL, J. W., MARYMONT, J. H., AVRAM, M. J., and VENDER, J. S.: Opioids and cardioprotection: the impact of morphine and fentanyl on recovery of ventricular function after cardiopulmonary bypass. *J. Cardiothor. Vasc. Anesth.* 20, 493–502 (2006)
- NADER, N. D., KARAMANOUKIAN, H. L., REEDY, R. L., SALEHPOUR, F., and KNIGHT, P. R.: Inclusion of sevoflurane in cardioplegia reduces neutrophil activity during cardiopulmonary bypass. *J. Cardiothor. Vasc. Anesth.* 20, 57–62 (2006)
- NADER, N. D., LI, C. M., KHADRA, W. Z., REEDY, R., and PANOS, A. L.: Anesthetic myocardial protection with sevoflurane. *J. Cardiothor. Vasc. Anesth.* 18, 269–274 (2004)
- PENTA DE PEPPA, A., POLISCA, P., TOMAI, F., DE PAULIS, R., TURANI, F., ZUPANCICH, E., SOMMARIVA, L., PASQUALETTI, P., and CHIARIELLO, L.: Recovery of LV contractility in man is enhanced by preischemic administration of enflurane. *Ann. Thorac. Surg.* 68, 112–118 (1999)
- PIRIOU, V., MANTZ, J., GOLDFARB, G., KITAKAZE, M., CHIARI, P., PAQUIN, S., CORNU, C., LECHARNY, J. B., AUSAUGE, P., VICAUT, E., PONS, A., and LEHOT, J. J.: Sevoflurane preconditioning at 1 MAC only provides limited protection in patients undergoing coronary artery bypass surgery: a randomized bi-centre trial. *Br. J. Anaesth.* 99, 624–631 (2007)
- POUZET, B., LECHARNY, J. B., DEHOUX, M., PAQUIN, S., KITAKAZE, M., MANTZ, J., and MENASCHÉ, P.: Is there a place for preconditioning during cardiac operations in humans? *Ann. Thorac. Surg.* 73, 843–848 (2002)
- SLOGOFF, S., and KEATS, A. S.: Randomized trial of primary anesthetic agents on outcome of coronary bypass operations. *Anesthesiology* 70, 179–188 (1989)
- SYMONS, J. A., and MYLES, P. S.: Myocardial protection with volatile anaesthetic agents during coronary artery bypass surgery: a meta-analysis. *Br. J. Anaesth.* 97, 127–136 (2006)
- TOMAI, F., DE PAULIS, R., PENTA DE PEPPA, A., COLAGRANDE, L., CAPRARA, E., POLISCA, P., DE MATTEIS, G., GHINI, A. S., FORLANI, S., COLELLA, D., and CHIARIELLO, L.: Beneficial impact of isoflurane during coronary bypass surgery on troponin I release. *G. Ital. Cardiol.* 29, 1007–1014 (1999)
- TRITAPEPE, L., LANDONI, G., GUARRACINO, F., POMPEI, F., CRIVELLARI, M., MASELLI, D., DE LUCA, M., FOCHI, O., D'AVOLIO, S., BIGNAMI, E., CALABRÒ, M. G., and ZANGRILLO, A.: Cardiac protection by volatile anaesthetics: a multicentre randomized controlled study in patients undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass. *Eur. J. Anaesthesiol.* 24, 323–331 (2007)
- TUMAN, K. J., MCCARTHY, R. J., SPIESS, B. D., DAVALLE, M., DABIR, R., and IVANKOVICH, A. D.: Does choice of anesthetic agent significantly affect outcome after coronary artery surgery? *Anesthesiology* 70, 189–198 (1989)
- VAN DER LINDEN, P. J., DAPER, A., and DE HERT, S. G.: Cardioprotective effects of volatile anesthetics in cardiac surgery. *Anesthesiology* 99, 516–517 (2003)
- XIA, Z., HUANG, Z., and ANSLEY, D. M.: Large-dose propofol during cardiopulmonary bypass decreases biochemical markers of myocardial injury in coronary surgery patients: a comparison with isoflurane. *Anesth. Analg.* 103, 527–532 (2006)
- YU, C. H., and BEATTIE, W. S.: The effects of volatile anesthetics on cardiac ischemic complications and mortality in CABG: a meta-analysis. *Can. J. Anesth.* 53, 906–918 (2006)

Stefan G. DE HERT, MD, PhD  
Professor of Anesthesiology and Chair of the Division  
Department of Anesthesiology  
Division of Cardiothoracic and  
Vascular Anesthesiology  
Academic Medical Center  
University of Amsterdam  
Meibergdreef 9  
1100DD Amsterdam  
The Netherlands  
Phone: +31 20 5662533  
Fax: +31 20 6979441  
E-Mail: s.g.dehert@amc.uva.nl

# Medicine at the Interface between Science and Ethics

*Leopoldina-Symposium*

vom 30. Mai bis 1. Juni 2007 in Weißenburg, Bayern

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 98, Nr. 361

Herausgegeben von Walter DOERFLER (Erlangen/Köln), Hans-G. ULRICH (Erlangen) und Petra BÖHM (Köln)

(2010, 258 Seiten, 31 Abbildungen, 4 Tabellen, 23,95 Euro,

ISBN: 978-3-8047-2605-5)

Naturwissenschaft und Theologie/Ethik versuchen mit unterschiedlichen Konzepten, ein Weltbild zu erfassen, das die *conditio humana* besser zu verstehen erlaubt. Die Fragen sind weit gefasst; endgültige Antworten wird man nicht leicht finden. Gemeinsame Diskussionen über diese Probleme könnten beiden Gebieten Anregungen geben und der Biomedizin im Umgang mit der sehr kritischen Öffentlichkeit helfen. Voraussetzung ist Offenheit gegenüber der anderen Denkweise. Der vorliegende Band behandelt daher aus der Perspektive von Naturwissenschaftlern und Ethikern so verschiedene Themen wie die neuen Herausforderungen an Moral- und Ethikdiskurse durch die jüngsten Fortschritte der Biowissenschaften, die Grenzen der ethischen Reflexion bei den neueren Entwicklungen der Molekularbiologie, die Geschichte der Auffassungen vom „Gen“ und seiner Bedeutung in der Humanbiologie, aber auch die Missverständnisse zwischen den beiden Kulturen der Naturwissenschaften und der Geisteswissenschaften in der Forschung über Lebensprozesse. Dazu kommen Beiträge zur Stammzellproblematik, der Verwendung von Tiermodellen in der Translationsmedizin, über Würde von Zellen in Kultur, Fragen der Pluripotenz von Zellen und der Reprogrammierung von Zellkernen sowie der Bedeutung von Methylierungsmustern für die Epigenetik. Die Beiträge sind in englischer oder deutscher Sprache verfasst.

## Cerebral Protection by Volatile Anesthetics

Christian WERNER (Mainz)

### *Abstract*

The use of (volatile) anesthetics has been traditionally considered to be “neuroprotective”. This notion is primarily based on the decrease in cerebral metabolic during administration of anesthetic agents. Recent research indicates that the neuroprotective potency of volatile anesthetics relates to the severity of injury and the timing of administration. While mildly injured neurons can be protected, for the severely injured cells volatile anesthetics are less powerful. One of the neuroprotective mechanisms is suppression of excessive glutamate release with acute neurodegeneration and, thereby, the limited excitotoxic neuronal death. This is mediated by the activation of inhibitory GABA<sup>A</sup>-receptors. Other mechanisms involve antiapoptotic effects and a reduction of the frequency of the spreading depression-like depolarization. Furthermore, volatile anesthetics seem to be able to induce protection by preconditioning and preliminary data suggest a beneficial effect on the proliferation of adult endogenous neurons resulting in enhanced neuroregeneration.

### *Zusammenfassung*

(Volatile) Anästhetika besitzen den Ruf, „neuroprotektive“ Wirkung zu entfalten. Diese Sichtweise ist Ausdruck der Reduktion des Hirnstoffwechsels während der Anwendung von Anästhetika. Die Reduktion von Infarktgröße sowie die Verbesserung der neurologischen Funktion nach zerebralen Insulten sind jedoch auch abhängig von der Schwere der Provokation sowie vom Zeitpunkt der Gabe des Anästhetikums. Während kurze ischämische Episoden in Anwesenheit von Anästhetika toleriert werden, bleiben längere Phasen von Minderdurchblutung, insbesondere bei verzögerter Anästhetika-Applikation, letal. Als Mechanismen für das (limitierte) neuroprotektive Potential der Anästhetika werden folgende Vorgänge diskutiert: Reduktion der Exzitotoxizität, Aktivierung GABA-erger Neurotransmission, Reduktion von „spreading depression“, Stimulation anti-apoptotischer Proteine sowie endogener Stammzelllinien („endogenous repair“).

### **1. Introduction**

Acute neurodegeneration (i.e. ischemic or hemorrhagic stroke, traumatic brain injury, or cardiac arrest) is one of the leading etiologies for (perioperative) morbidity and mortality. Patients surviving primary insults frequently suffer from poor neurological function and the impossibility to return to a normal life. The drama of acute neurodegeneration with all its personal as well as social-economical consequences calls for differentiated protective (preventive) and therapeutic concepts, in order to minimize the incidence and extent of neuronal death. This review presents the neuroprotective potential of volatile anesthetics in a scenario of perioperative challenges to the central nervous system.

## 2. Pathophysiology of Cerebral Ischemia

Cerebral ischemia and/or hypoxia occur as a consequence of shock, vascular stenosis or occlusion, hemorrhage, vasospasm, neurotrauma, and cardiac arrest. The ischemic/hypoxic insult evokes a cascade of pathophysiological processes resulting in necrotic or apoptotic cell death (dependent on severity of neuronal injury and the availability of energy to at least fuel basic neuronal metabolism). Immediately following the primary insult accumulation of lactic acid occurs due to anaerobic glycolysis. This leads to increased membrane permeability and consecutive edema formation which further deteriorates microcirculation. In the presence of severe neuronal injury and failure to immediately restore energy supply the cell undergoes necrotic cell death. Since the anaerobic metabolism is inadequate to maintain cellular energy status, ATP-stores deplete and failure of energy-dependent membrane ion pumps occurs. The consecutive terminal membrane depolarization induces excessive release of excitatory neurotransmitters (i.e. glutamate, aspartate), activation of NMDA- (N-methyl-D-aspartate), AMPA- ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat), and activates voltage dependent  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^{+}$  channels. The pathological  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^{+}$  influx triggers selfdigesting intracellular processes and further promotes edema formation.  $\text{Ca}^{2+}$  activates lipidperoxidases, proteases, and phospholipases which in turn increase the intracellular concentration of free fatty acids (FFA) and free radicals. Additionally, activation of caspases (ICE-like proteins), translocases, and endonucleases initiate progressive structural changes of biological membranes and the nucleosomal DNA (DNA fragmentation, inhibition of DNA repair). Together, these events lead to membrane degeneration of vascular and cellular structures and consecutive necrotic cell death.

Apoptosis is an active form of cell death in the absence of edema formation, which requires production of regulating proteins and involves the activation of caspases leading to progressive structural changes of biological membranes and the nucleosomal DNA (e.g. DNA fragmentation, chromatin condensation, and production of small particles consisting of cell debris, apoptotic bodies) over a period of days and weeks. This form of neuronal suicide only occurs in mild injured cells with maintained or rapidly restored energy supply and the execution of apoptotic processes may take as long as days and weeks.

## 3. Neuroprotection

All inhalational anesthetic agents have been tested for their neuroprotective properties in multiple animal studies, using different ischemia models and different species. The results show that all inhalational anesthetics exhibit neuroprotective properties but that the extent/potential of neuroprotection does not necessarily correlate with anesthetic potency (SANDERS et al. 2005). Animal studies with focal or incomplete hemispheric ischemia have shown that isoflurane (WARNER et al. 1986), sevoflurane (WERNER et al. 1995, PAYNE 2005), and desflurane (ENGELHARD et al. 1999, TSAI et al. 2004) reduce infarct size and improve functional outcome when given prior to the ischemic challenge. However, it is questionable whether the anti-necrotic effects of volatile anesthetics seen in these different ischemia models are permanent. Studies in rats subjected to focal cerebral ischemia have shown that necrotic cell death was substantially reduced at two days in isoflurane anesthetized rats compared to awake controls (KAWAGUCHI et al. 2000). However, at 14 days from ischemia cortical and subcortical



damage was not different between isoflurane and the awake state. This questions the sustained neuroprotective effects of volatile anesthetics. In contrast, in studies using an ischemia model of unilateral forebrain ischemia, producing only mild injury, sevoflurane showed sustained neuroprotection within a post-ischemic observation period of 28 days (PAPE et al. 2006). This leads to the conclusion, that if neuronal injury is mild, neuroprotection by inhalational anesthetics is sustained, while with moderate or severe injury neuronal damage can increase over a longer recovery period (KAWAGUCHI et al. 2005). This strengthens the requirement for long-term rather than short-term experimental outcome studies on neuroprotection. Furthermore, volatile anesthetics have no neuroprotective properties in the setting of severe global cerebral ischemia and when given after the insult.

#### 4. Concentration Dependent Effects of Inhalational Anesthetics

After forebrain ischemia high concentrations of isoflurane seem to increase cortical damage and deteriorate neurologic function (1.0 MAC *versus* 2.5 MAC) (NASU et al. 2006). However, in that study isoflurane was administered only during cerebral ischemia, and the anesthetic regime was then switched to fentanyl/nitrous oxide.

#### 5. Anti-Glutamatergic Effects

Halothane inhibits the excitotoxic lesion caused by topical exposure of N-methyl-D-aspartate (NMDA) in cortical cell cultures (BEIRNE et al. 1998). Therefore, a neuroprotective mechanism of volatile anesthetics is characterized by anti-excitotoxicity due to inhibition of glutamate sensitive NMDA-receptors or of presynaptic glutamate release (BICKLER et al. 1995, YANG and ZORUMSKI 1991, MIAO et al. 1995). In a model of forebrain ischemia isoflurane and sevoflurane suppressed the peak of glutamate release and reduced the influx of  $Ca^{2+}$  into the cytosol, one of the most important mediators of excitotoxic neuronal damage (ENGELHARD et al. 2003, PATEL et al. 1995, BICKLER et al. 1994).

#### 6. Activation of GABA Receptors

*In vitro* studies indicate that volatile anesthetics at clinical concentrations potentate the GABA-mediated activity at the GABA<sub>A</sub> receptor (HARRISON et al. 1993, QUINLAN et al. 1995). In organotypic hippocampal slices subjected to oxygen-glucose deprivation isoflurane caused near-complete protection. In an attempt to further specify the mechanism of this effect, bicuculline, a selective GABA<sub>A</sub> antagonist, was co-administered and was able to block neuroprotection by isoflurane, while the GABA<sub>B</sub> receptor antagonist phaclofen had no effect. Therefore, GABA<sub>A</sub> receptors seem to be a major site of action for volatile anesthetic neuroprotection.

## 7. Effects on Programmed Cell Death (Apoptosis)

After severe injury neurons may die from colliquation necrosis, while mild damage induces the cell to undergo delayed neuronal death/apoptosis. One day after 30 min of focal cerebral ischemia in rats histopathological damage was invisible; in contrast, infarct size was large after 90 min of ischemia (DU et al. 1996). However, 14 days from injury infarct size was large in both groups, indicating that neuronal damage increased after the mild injury. As necrotic processes were not initiated by the 30-min insult, it can be assumed that apoptotic cell death caused the maturation of neuronal damage 14 day after the ischemia. The effect of volatile anesthetics on this prolonged cell death is yet undecided. After global or focal cerebral ischemia the neuroprotective effect of isoflurane at days 2–5 was only transient (KAWAGUCHI et al. 2000, ELSERSY et al. 2004). The slow progression of injury suggests that neurons were initially protected but then underwent delayed death. In focal cerebral ischemia the increase in infarct size in isoflurane-treated animals parallels the appearance of markers of apoptosis (KAWAGUCHI et al. 2004). In contrast, sustained neuroprotection by sevoflurane was evident over 28 days in incomplete hemispheric ischemia showed (PAPE et al. 2006). In the brain tissue of these rats the expression of the pro-apoptotic protein Bax was suppressed over the first three days, while the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Mdm-2 were increased. Therefore, in this ischemia model, which is sensitive to anesthetic neuroprotection, sevoflurane seems to have a beneficial influence on apoptosis-regulating proteins and, thereby, reduces delayed neuronal damage up to 28 days.

## 8. Spreading Depression-like Depolarization

Volatile anesthetics can reduce the frequency of spreading depression-like depolarizations in the penumbra of focal ischemia, which can be observed after cerebral ischemia. The spreading depression-like depolarizations increase calcium influx into neurons of the penumbra, which might be salvageable (PATEL et al. 1998). Due to the lack of energy supply during cerebral ischemia the neurons might not to be able to restore ionic homeostasis and, consequently, undergo necrotic or apoptotic cell death. Isoflurane reduces the frequency of these depolarizations (PATEL et al. 1998), which might in part contribute to the neuroprotective effects of volatile anesthetics.

## 9. Preconditioning

The exposure to sublethal insults or pharmacological agents prior to cerebral ischemia can reduce infarct size and improve neurologic behavior. This acquired tolerance seems to be multi-mechanistic, because benefits can be induced either transiently and rapidly or in a delayed and sustained fashion (LUO et al. 2008, TRAYSTMAN 2004). *In vitro* as well as in several animal models of cerebral ischemia volatile anesthetics show neuroprotection by preconditioning when administered 15 min or 20–24 h before the insult. Possible mechanisms of preconditioning are the opening and the activation (hyperpolarization) of cellular and mitochondrial  $K_{ATP}$  channels, which seem to reduce the formation of free radicals, blunt the intra-ischemic mitochondrial  $Ca^{2+}$  accumulation, and economize the post-ischemic mitochondrial energy

production (DIRNAGL and MEISEL 2008, O'ROURKE 2004). Likewise, the activation of protein kinase C-related genes and pathways and the adenosine A1 receptor or the upregulation of p38MAPK are discussed (LUO et al. 2008, ROSCOE et al. 2000, ZHENG and ZUO 2004).

## **10. Regeneration**

The notion that the adult mammalian central nervous system is incapable of significant self-repair or regeneration was revisited after the detection of self-renewing and multipotent neuronal stem cells. By cell division stem cells produce progenitor cells which then rapidly generate new neurons, astrocytes, and oligodendrocytes in the adult brain (TAUPIN and GAGE 2002). The subventricular zone of the lateral ventricle and the subgranule layer of the dentate gyrus seem to be the most important regenerative centers (KUHN et al. 1996). New cells from the subventricular zone migrate into the olfactory bulb *via* the rostro-migratory stream (KIRSCHENBAUM et al. 1999). Cells derived from the subgranular layer of the dentate gyrus move into the granular layer of the dentate gyrus and sprout dendrites to the CA3 region of the hippocampus (HASTINGS and GOULD 1999). Several stimuli can activate the proliferation of progenitor cells, such as social contact, exercise, inflammation or cerebral ischemia (BINGHAM et al. 2005, VAN PRAAG et al. 1999, BROWN et al. 2003). While some of these proliferated cells undergo apoptotic cell death, others survive. Sevoflurane anesthesia over 6 h does not influence neurogenesis in the dentate gyrus. The ischemia induces increase in newborn neurons was dose-dependently augmented 28 days after injury by high concentrations of sevoflurane (ENGELHARD et al. 2007). Therefore, anesthetics might have a beneficial effect on neuroregeneration after a neuronal insult (LASARZIK et al. 2009, WINKELHEIDE et al. 2009).

## **11. Summary**

The neuroprotective potency of volatile anesthetics relate to the severity of injury and the timing of administration. While mildly injured neurons can be protected, for the severely injured cells volatile anesthetics are less powerful. One of the neuroprotective mechanisms is suppression of excessive glutamate release with acute neurodegeneration and, thereby, the limited excitotoxic neuronal death. This might be mediated by the activation of inhibitory GABA<sub>A</sub> receptors. Further mechanisms might involve anti-apoptotic effects and a reduction of the frequency of the spreading depression-like depolarization. Furthermore, volatile anesthetics seem to be able to induce protection by preconditioning and preliminary data suggest a beneficial effect on the proliferation of adult endogenous neurons resulting in enhanced neuroregeneration.

## *References*

- BEIRNE, J., PEARLSTEIN, R., MASSEY, G., and WARNER, D.: Effect of halothane in cortical cell cultures exposed to N-methyl-D-aspartate. *Neurochem. Res.* 23, 17–23 (1998)
- BICKLER, P., BUCK, L., and HANSEN, B.: Effects of isoflurane and hypothermia on glutamate receptor-mediated calcium influx in brain slices. *Anesthesiology* 81, 1461–1469 (1994)

- BICKLER, P. E., BUCK, L. T., and FEINER, J. R.: Volatile and intravenous anesthetics decrease glutamate release from cortical brain slices during anoxia. *Anesthesiology* 83, 1233–1240 (1995)
- BINGHAM, B., LIU, D., WOOD, A., and CHO, S.: Ischemia-stimulated neurogenesis is regulated by proliferation, migration, differentiation and caspase activation of hippocampal precursor cells. *Brain Res.* 1058, 167–177 (2005)
- BROWN, J., COOPER-KUHN, C., KEMPERMANN, G., VAN PRAAG, H., WINKLER, J., GAGE, F., and KUHN, G.: Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* 17, 2042–2046 (2003)
- DIRNAGL, U., and MEISEL, A.: Endogenous neuroprotection: mitochondria as gateways to cerebral preconditioning? *Neuropharmacology* 55, 334–344 (2008)
- DU, C., HU, R., CSERNANSKY, C., HSU, C., and CHOI, D.: Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: A role for apoptosis? *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 16, 195–201 (1996)
- ELSEY, H., SHENG, H., LYNCH, J., MOLDOVAN, M., PEARLSTEIN, R., and WARNER, D.: Effects of isoflurane versus fentanyl/nitrous oxide anesthesia on long-term outcome from severe forebrain ischemia in the rat. *Anesthesiology* 100, 1160–1166 (2004)
- ENGELHARD, K., WERNER, C., HOFFMANN, W., MATTHES, B., BLOBNER, M., and KOCHS, E.: The effect of sevoflurane and propofol on cerebral neurotransmitter concentrations during cerebral ischemia in rats. *Anesth. Analg.* 97, 1155–1161 (2003)
- ENGELHARD, K., WERNER, C., REEKER, W., LU, H., MÖLLENBERG, O., MIELKE, L., and KOCHS, E.: Desflurane and isoflurane improve neurological outcome after incomplete cerebral ischaemia in rats. *Br. J. Anaesth.* 83, 415–421 (1999)
- ENGELHARD, K., WINKELHEIDE, U., WERNER, C., KLUGE, J., EBERSPÄCHER, E., HOLLWECK, R., HUTZLER, P., WINKLER, J., and KOCHS, E.: Sevoflurane affects neurogenesis after forebrain ischemia in rats. *Anesth. Analg.* 104, 898–903 (2007)
- HARRISON, N., KUGLER, J., JONES, M., GREENBLATT, E., and PRITCHETT, D.: Positive modulation of human gamma-aminobutyric acid type A and glycine receptors by the inhalation anesthetic isoflurane. *Mol. Pharmacol.* 44, 628–632 (1993)
- HASTINGS, N. B., and GOULD, E.: Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J. Comp. Neurol.* 413, 146–154 (1999)
- KAWAGUCHI, M., DRUMMOND, J. C., COLE, D. J., KELLY, P. J., SPURLOCK, M. P., and PATEL, P.: Effect of isoflurane on neuronal apoptosis in rats subjected to focal cerebral ischemia. *Anesth. Analg.* 98, 798–805 (2004)
- KAWAGUCHI, M., FURUYA, H., and PATEL, P. M.: Neuroprotective effects of anesthetic agents. *J. Anesth.* 19, 150–156 (2005)
- KAWAGUCHI, M., KIMBRO, J. R., DRUMMOND, J. C., COLE, D. J., KELLY, P. J., and PATEL, P. M.: Isoflurane delays but does not prevent cerebral infarction in rats subjected of focal ischemia. *Anesthesiology* 92, 1335–1342 (2000)
- KIRSCHENBAUM, B., DOETSCH, F., LOIS, C., and ALVAREZ-BUYLLA, A.: Adult subventricular zone neuronal precursors continue to proliferate and migrate in the absence of the olfactory bulb. *J. Neurosci.* 19, 2171–2180 (1999)
- KUHN, H. G., DICKINSON-ANSON, H., and GAGE, F. H.: Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* 16, 2027–2033 (1996)
- LASARZIK, I., WINKELHEIDE, U., STALLMANN, S., ORTH, C., SCHNEIDER, A., TRESCH, A., WERNER, C., and ENGELHARD, K.: Assessment of postischemic neurogenesis in rats with cerebral ischemia and propofol anesthesia. *Anesthesiology* 110/3, 529–537 (2009)
- LUO, Y., IEONG, E., SANDERS, R. D., YIU, B., HOSSAIN, M., and MAZE, M.: Xenon and sevoflurane protect against brain injury in a neonatal asphyxia model. *Anesthesiology* 109, 782–789 (2008)
- MIAO, N., FRAZER, M., and LYNCH, C.: Volatile anesthetics depress Ca<sup>2+</sup> transients and glutamate release in isolated cerebral synaptosomes. *Anesthesiology* 83, 593–603 (1995)
- NASU, I., YOKOO, N., TAKAOKA, S., HOSHIKAWA, T., OKADA, M., and MIURA, Y.: The dose-dependent effects of isoflurane on outcome from severe forebrain ischemia in the rat. *Anesth. Analg.* 103, 413–418 (2006)
- O'ROURKE, B.: Evidence for mitochondrial K<sup>+</sup> channels and their role in cardioprotection. *Circ. Res.* 94, 420–432 (2004)
- PAPE, M., ENGELHARD, K., EBERSPÄCHER, E., HOLLWECK, R., KELLERMANN, K., ZINTNER, S., HUTZLER, P., and WERNER, C.: The long-term effect of sevoflurane on neuronal cell damage and expression of apoptotic factors after cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Anesth. Analg.* 103, 173–179 (2006)
- PATEL, P., DRUMMOND, J., COLE, D., KELLY, P., and WATSON, M.: Isoflurane and pentobarbital reduce the frequency of transient ischemic depolarizations during focal ischemia in rats. *Anesth. Analg.* 86, 773–780 (1998)
- PATEL, P. M., DRUMMOND, J. C., COLE, D. J., and GOSKOWICZ, R. L.: Isoflurane reduces ischemia-induced glutamate release in rats subjected to forebrain ischemia. *Anesthesiology* 82, 996–1003 (1995)

- PAYNE, R. S., AKCA, O., ROEWER, N., SCHURR, A., and KEHL, F.: Sevoflurane-induced preconditioning protects against cerebral ischemic neuronal damage in rats. *Brain Res.* 1034, 147–152 (2005)
- QUINLAN, J., FIRESTONE, S., and FIRESTONE, L.: Isoflurane's enhancement of chloride flux through rat brain gamma-aminobutyric acid type A receptors is stereoselective. *Anesthesiology* 83, 611–615 (1995)
- ROSCOE, A., CHRISTENSEN, J., and LYNCH, C.: Isoflurane, but not halothane, induces protection for human myocardium via adenosine A1 receptors and adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Anesthesiology* 92, 1692–1701 (2000)
- SANDERS, R. D., MA, D., and MAZE, M.: Anaesthesia induced neuroprotection. *Best Practice and Research Clinical Anaesthesiology* 19, 461–474 (2005)
- TAUPIN, P., and GAGE, F.: Adult neurogenesis and neuronal stem cells of the central nervous system in mammals. *J. Neurosci. Res.* 69, 745–749 (2002)
- TRAYSTMAN, R.: Anesthetic mediated neuroprotection: established fact or passing fancy? *J. Neurosurg. Anesthesiol.* 16, 308–312 (2004)
- TSAI, S. K., LIN, S. M., HUNG, W. C., MOK, M. S., CHIH, C. L., and HUANG, S. S.: The effect of desflurane on ameliorating cerebral infarction in rats subjected to focal cerebral ischemia-reperfusion injury. *Life Sci.* 74, 2541–2549 (2004)
- VAN PRAAG, H., KEMPERMANN, G., and GAGE, F. H.: Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature* 2, 266–270 (1999)
- WARNER, D. S., DESHPANDE, J. K., and WIELOCH, T.: The effect of isoflurane on neuronal necrosis following near-complete forebrain ischemia in the rat. *Anesthesiology* 64, 19–23 (1986)
- WERNER, C., MÖLLENBERG, O., KOCHS, E., and SCHULTE AM ESCH, J.: Sevoflurane improves neurological outcome after incomplete cerebral ischaemia in rats. *Br. J. Anaesth.* 75, 756–760 (1995)
- WINKELHEIDE, U., LASARZIK, I., KAEPPEL, B., WINKLER, J., WERNER, C., KOCHS, E., and ENGELHARD, K.: Dose-dependent effect of S(+) ketamine on post-ischemic endogenous neurogenesis in rats. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 53/4, 528–533 (2009)
- YANG, J., and ZORUMSKI, C.: Effects of isoflurane on N-methyl-D-aspartate gated ion channels in cultured rat hippocampal neurons. *Ann. New York Acad. Sci.* 625, 287–289 (1991)
- ZHENG, S., and ZUO, Z.: Isoflurane preconditioning induces neuroprotection against ischemia via activation of p38 mitogen-activated protein kinases. *Mol. Pharmacol.* 65, 1172–1180 (2004)

Professor of Anesthesiology Christian WERNER, MD  
Department of Anesthesiology  
University Hospital Medical Center  
Johannes Gutenberg-University Mainz  
Langenbeckstraße 1  
55131 Mainz  
Germany  
Phone: +49 6131 177177  
Fax: +49 6131 176649  
E-Mail: wernerc@uni-mainz.de

## **Festakt zur Ernennung der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina zur Nationalen Akademie der Wissenschaften**

### **Ceremony to Mark the Nomination of the German Academy of Sciences Leopoldina to the National Academy of Sciences**

Nova Acta Leopoldina N. F., Bd. 98, Nr. 362

Herausgegeben vom Präsidium der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina  
(2009, 76 Seiten, 50 Abbildungen, 21,95 Euro, ISBN: 978-3-8047-2551-5)

Die Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina wurde am 14. Juli 2008 im Rahmen eines Festaktes in Halle zur Nationalen Akademie der Wissenschaften ernannt. Damit erhielt Deutschland – wie andere europäische Länder oder die USA – eine Institution, die Politik und Gesellschaft wissenschaftsbasiert berät und die deutsche Wissenschaft in internationalen Gremien repräsentiert. Der Band dokumentiert den Festakt mit der Übergabe der Ernennungsurkunde durch die Vorsitzende der Gemeinsamen Wissenschaftskonferenz und Bundesministerin für Bildung und Forschung Annette SCHAVAN. Er enthält die Reden von Bundespräsident Horst KÖHLER, Sachsens-Anhalts Ministerpräsident Wolfgang BÖHMER und Leopoldina-Präsident Volker TER MEULEN sowie den Festvortrag „Rolle und Verantwortung nationaler Akademien der Wissenschaften“ von Jules A. HOFFMANN, Präsident der *Académie des sciences*, Paris. Der Aufbau einer Nationalen Akademie ist ein richtungsweisender Schritt für die deutsche Forschungslandschaft, da für den kontinuierlichen Dialog von Wissenschaft und Politik eine solche Einrichtung erforderlich wurde. Der Publikation ist eine DVD mit dem Mitschnitt der Festveranstaltung beigelegt.

## **Pulmonale Protektion durch volatile Anästhetika**

Christian HOFSTETTER (Mannheim)

### *Zusammenfassung*

Die Lunge ist Organmanifestation in zahlreichen klinischen Problemsituationen, die mit einer überschießenden Aktivierung des Immunsystems assoziiert sind. Sowohl primär umschriebene pulmonale Prozesse wie die Lungenkontusion als auch primär extrapulmonale Pathophysiologien wie das systemische Inflammationssyndrom (SIRS) nach extrakorporaler Zirkulation oder Ischämie-Reperfusion können zu einer globalen pulmonalen Inflammationsreaktion bis hin zum akuten Lungenversagen (ARDS) führen. Sowohl *In-vivo*- als auch *In-vitro*-Befunde belegen antiinflammatorische und organprotektive Effekte volatiler Anästhetika im Hinblick auf die pulmonale Entzündungsreaktion in verschiedenen Modellen. Es ist daher denkbar, dass volatile Anästhetika vor diesem Hintergrund zukünftig therapeutische Bedeutung erlangen. Der Beitrag fasst die vorliegenden Befunde hierzu zusammen.

### *Abstract*

Development of acute lung injury up to lung failure (ARDS) can result as a consequence of either primary intrapulmonary or systemic inflammation and may complicate numerous clinical situations like lung contusion or the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) following extracorporeal circulation or ischaemia reperfusion injury. Volatile anesthetics have been shown to attenuate the proinflammatory response of the lung in various experimental models of pulmonary inflammation. Thus, a future role of volatile anesthetics for treatment of pulmonary inflammation is possible. The article summarizes the current available data on this topic.

### **1. Einleitung**

Volatile Anästhetika sind fester Bestandteil der modernen klinischen Anästhesiologie. Ihre Applikation erfolgt mittels spezieller Verdampfer über Zumischung zum Beatmungsgas. Aktuellen Befunden zufolge geht das Wirkprofil volatiler Anästhetika über deren bekannte hypnotische Effekte hinaus. Neben dem Phänomen des „anesthetic preconditioning“ auf das Myokard existieren weitere Befunde über organprotektive, antiinflammatorische Wirkungen volatiler Anästhetika in unterschiedlichen Organen und während unterschiedlicher pathophysiologischer Zustände.

Vergleichsweise wenige Befunde existieren für die Lunge: das Organ, über das volatile Anästhetika letztlich in den Körper gelangen und dessen Strukturen – von der Alveole über das Interstitium bis zum Gefäßendothel sowie den hier befindlichen, ortsständigen und einwandernden Zellpopulationen – dementsprechend regelhaft mit volatilen Anästhetika in Kontakt kommen, bevor diese sich im Blut lösen und über den Systemkreislauf zu den unterschiedlichen Organen und Geweben gelangen.

Die Lunge besitzt ihrerseits eine hohe immunologische Kompetenz und ist Organmanifestation in zahlreichen klinischen Problemsituationen. So ist das akute Lungenversagen (ARDS) eine ernste Komplikation, sowohl der Sepsis als auch beim systemischen Inflammationssyndrom (SIRS), und trägt maßgeblich zur hohen Letalität beider Syndrome bei. Daneben bewirken primär pulmonale Traumen, wie die Lungenkontusion, ebenfalls eine zunächst lokal umschriebene pulmonale Inflammationsreaktion, die progredient verlaufen und neben einer systemischen Inflammationsreaktion ebenfalls die Entwicklung einer globalen Lungenschädigung im Sinne eines ARDS nach sich ziehen kann.

Die passagere Ischämie mit nachfolgender Reperfusion einzelner Organe, wie z. B. der Leber, oder größerer Körperregionen, wie z. B. im Rahmen des Clamping und Declamping der Aorta sowie während bzw. nach extrakorporaler Zirkulation, bewirken die Induktion einer systemischen Inflammationsreaktion, die von einer pulmonalen Inflammationsreaktion mit Sequestration von immunkompetenten Zellen (wie z. B. neutrophilen Granulozyten und Makrophagen) begleitet ist. Dies kann konsekutiv zur Ausbildung einer akuten Lungenschädigung mit Alveolarschaden, Ödem und pulmonalvaskulärer Hypertension führen. Ein weiterer Aspekt in diesem Zusammenhang ist die Lungentransplantation, die seit 1983 zunehmend häufig als Therapieoption von konservativ austerapierten Lungenerkrankungen eingesetzt wird. Trotz der Weiterentwicklungen chirurgischer Techniken und Methoden zur Organkonservierung stellt die potentielle Schädigung des Transplantats durch die unvermeidbare Ischämie-Reperfusionssreaktion ein nach wie vor schwerwiegendes Problem dar, welches bedeutenden Anteil an der postoperativen Morbidität und Mortalität lungentransplantierte Patienten hat. Therapiestrategien mit pulmonal immunmodulierenden Wirkungen erscheinen vor dem oben skizzierten Hintergrund als möglicherweise vielversprechende Option. Die Anwendung von volatilen Anästhetika in diesem Zusammenhang erscheint auf Grund ihres sonst gut charakterisierten Wirkprofils und insbesondere auch ihrer bislang für andere Organsysteme gezeigten antiinflammatorisch-protektiven Effekte attraktiv.

Es liegen sowohl *In-vitro*- als auch *In-vivo*-Befunde zu den Effekten volatiler Anästhetika auf die pulmonale Entzündungsreaktion sowie zum pulmonalen Ischämie-Reperfusionsschaden vor. Gemäß dieser Systematik sind im Folgenden wichtige Befunde zusammengestellt.

## 2. *In-vivo*-Befunde

GIRAUD und Kollegen (2000) verglichen die Effekte der Narkoseführung mit dem volatilen Anästhetikum Halothan in Konzentrationen von 1, 1,5 und 2 MAC (MAC: minimale alveoläre Konzentration eines volatilen Anästhetikums, bei der 50 % der Patienten keine Schmerzreaktion auf einen definierten Schmerzreiz [Hautschnitt] zeigen) mit denen des intravenös applizierten Barbiturats Thiopental (60 mg/kg) im Modell der pulmonalen Inflammation durch intratracheale Instillation von Lipopolysaccharid (100 µg) in der Ratte. Bei den Tieren der mitgeführten Kontrollgruppen erfolgte die intratracheale Instillation von Lipopolysaccharid (erstens) mit bzw. (zweitens) ohne weitere Applikation von Halothan oder Thiopental sowie (drittens) die Exposition mit Halothan oder Thiopental ohne Stimulation mit Lipopolysaccharid.

Das Ausmaß der pulmonalen Inflammation nach einer Beobachtungszeit von 4 h wurde u. a. durch Quantifizierung polymorphkerniger Leukozyten (PMN) sowie proinflammatorischer Mediatoren (u. a. TNF $\alpha$ , IL-6 und MIP-2 [murines IL-8-Analogen macrophage



inflammatory protein-2]) in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BAL) sowie im Lungengewebe bestimmt. Während die Exposition mit Halothan und Thiopental von nicht mit Lipopolysaccharid stimulierten Tieren zu keiner Veränderung der Zielparameter führte, bewirkte demgegenüber die intratracheale Instillation von Lipopolysaccharid erwartungsgemäß deren signifikantes Ansteigen. Gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren mit Endotoxinämie sowie den Tieren aus der Endotoxinämie-Thiopental-Gruppe bewirkte die Applikation von Halothan in Dosierungen  $\geq 1,5$  MAC bei Endotoxinämie eine Reduktion der Konzentration der untersuchten Mediatoren sowie der Anzahl der polymorphkernigen Leukozyten sowohl in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit als auch im Lungengewebe.

Boost und Kollegen (2006) gingen der Frage nach, welchen Einfluss die Applikation des volatilen Anästhetikums Desfluran während experimenteller Endotoxinämie (Lipopolysaccharid, 5 mg/kg, i. v.) in der Ratte hat. Die Exposition mit Desfluran (1 MAC) begann unmittelbar vor der Injektion von Lipopolysaccharid. Nach Ablauf der Beobachtungszeit von 4 h zeigte sich im Plasma der mit Desfluran behandelten Tiere ein signifikant geringerer Gehalt der proinflammatorischen Mediatoren TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . Die Bestimmung der Nitritkonzentration aus dem Kulturüberstand (Kultur *ex vivo* für 24 h) von Alveolarmakrophagen von mit Desfluran behandelten endotoxämischen Tieren zeigte dessen signifikantes Ansteigen. In Übereinstimmung hierzu bewirkte die Behandlung mit Desfluran eine Induktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in den Alveolarmakrophagen. Dieser Befund war sowohl gegenüber den unbehandelten Kontrollen als auch gegenüber den mit Lipopolysaccharid stimulierten Tieren ohne Kontakt mit Desfluran jeweils signifikant. Parallel dazu ergab die Quantifizierung von I $\kappa$ B aus Alveolarmakrophagen dessen signifikante Reduktion im Falle der Tiere mit unbehandelter Endotoxinämie, während die Behandlung mit Desfluran diesen Effekt verhinderte. Bei I $\kappa$ B handelt es sich um den wichtigsten Inhibitor des zentralen proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B. Die Kenntnis dieses Befundes wurde als eine sehr wahrscheinliche Erklärung für das in dieser Studie nachgewiesene immunmodulierende Wirkprofil volatiler Anästhetika interpretiert.

In Ergänzung zu diesen Befunden konnten FLONDOR et al. (2008) zeigen, dass auch die Exposition von Ratten mit Isofluran (1 MAC) unter den Bedingungen einer bereits seit 15 min bestehenden Endotoxinämie (Lipopolysaccharid, 5 mg/kg, i. v.) im Sinne einer Postkonditionierung zu einer signifikanten Reduktion der proinflammatorischen Mediatoren TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sowohl im Plasma als auch in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit – jeweils verglichen mit endotoxämischen Kontrolltieren ohne Kontakt mit Isofluran – führte.

Neben den bislang beschriebenen suppressiven Wirkungen volatiler Anästhetika im Hinblick auf die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine reduzieren diese auch die inflammatorisch getriggerte Gewebeeinfiltration durch immunkompetente Zellpopulationen. So konnten REUTERSHAN und Kollegen (2006) zeigen, dass die Exposition von Versuchstieren (Mäusen) mit Isofluran (1 MAC) zu den Zeitpunkten 12 h und 1 h vor sowie 1 h nach der Induktion eines experimentellen Lungenschadens durch die Inhalation von Lipopolysaccharid (500  $\mu$ g/ml für 30 min) zur signifikanten Reduktion der pulmonalen Sequestration – quantifiziert sowohl in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit als auch im Lungengewebe – von neutrophilen Granulozyten führte.

Beta( $\beta$ )-Adrenozeptoren sind involviert in die proinflammatorische Signaltransduktion sowie in die Mechanismen der Organprotektion durch volatile Anästhetika. Die Evaluation möglicher Interaktionen einer bestehenden pharmakologischen  $\beta$ -Blockade mit den organprotektiven Effekten volatiler Anästhetika ist deshalb von besonderem Interesse, da ein

bedeutender Anteil der Patienten mit kardiovaskulärer Komorbidität einerseits häufig unter Dauertherapie mit  $\beta$ -Blockern steht und andererseits in diesem Kollektiv gehäuft Hochrisikoeingriffe durchgeführt werden. BOOST und Kollegen (2007) gingen daher der Frage nach, ob die i. v. Applikation des  $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten Propranolol die antiinflammatorischen Effekte von Isofluran während experimenteller Endotoxinämie beeinflusst. Die Zumischung von Isofluran (1 MAC) zum Beatmungsgas unmittelbar nach Induktion der experimentellen Endotoxinämie (Lipopolysaccharid, 5 mg/kg, i. v.) bewirkte eine signifikante Reduktion der proinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sowohl im Plasma als auch in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit der Versuchstiere (Ratten), verglichen mit endotoxämischen Kontrolltieren ohne Kontakt mit Isofluran. Parallel ergab die Bestimmung von Nitrit im Kulturüberstand sowie die von iNOS-Protein aus kultivierten Alveolarmakrophagen eine signifikante Erhöhung bzw. Induktion beider Parameter durch Isofluran. Die Injektion von Propranolol (3 mg/kg) unmittelbar vor Induktion der Endotoxinämie inhibierte die antiinflammatorischen Wirkungen der Isofluran-Inhalation. Sowohl im Plasma als auch in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit aus den auch mit Propranolol behandelten endotoxämischen Tieren waren die Konzentrationen von TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  jeweils signifikant erhöht. Daneben bewirkte die Applikation von Propranolol vor der Inhalation von Isofluran während Endotoxinämie die signifikante Reduktion der aus den kultivierten Alveolarmakrophagen sezernierten Menge an Nitrit sowie des nachweisbaren iNOS-Protein in den Alveolarmakrophagen.

### 3. *In-vitro*-Befunde

Neben Befunden zu immunmodulierenden Wirkungen volatiler Anästhetika auf die pulmonale Entzündungsreaktion *in vivo* existieren zu diesem Themenkomplex ebenfalls analog durchgeführte *In-vitro*-Untersuchungen. Ein im Kontext der pulmonalen Inflammation häufig verwendetes Modell ist die *In-vitro*- bzw. *Ex-vivo*-Kultur von Alveolarepithelzellen. Alveolarepithelzellen besitzen eine ausgeprägte Immunkompetenz. Im Rahmen einer inflammatorischen Reaktion des pulmonalen Kompartiments sezernieren sie proinflammatorische Mediatoren. Der Untersuchung des möglichen antiinflammatorischen Wirkprofils volatiler Anästhetika auf diese Zellpopulation kommt auch deshalb besondere Bedeutung zu, da diese auf Grund ihres pulmonal-ubiquitären Vorkommens auch direkt mit dem volatilen Anästhetikum in Kontakt kommen.

GIRAUD und Kollegen (2003) untersuchten, welchen Einfluss die vierstündige Exposition von *ex vivo* mit rekombinantem murinem IL-1 $\beta$ -stimulierten primären Alveolarepithelzellen Typ II der Maus (je  $3 \times 10^6$  Zellen; IL-1 $\beta$ : 1 ng/ml) mit Halothan, Enfluran und Isofluran (je 1 MAC) auf die Sekretion der proinflammatorischen Mediatoren IL-6, MIP-2 sowie auf die des *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) hat. Die Exposition der kultivierten und stimulierten Zellen mit den genannten volatilen Anästhetika bewirkte jeweils eine signifikante Reduktion der Konzentration der bestimmten proinflammatorischen Mediatoren im Kulturüberstand, ohne dass dabei Hinweise auf zytotoxische Nebenwirkungen nachweisbar waren. Im Falle des Versuchsansatzes mit Halothan erfolgte nach dem Ende der Expositionszeit sowie der anschließenden Auswaschung von Halothan mit Luft eine erneute Kultur der Zellen für weitere 24 h. Während dieses zweiten Kulturzeitraumes erfolgten weitere Analysen der genannten Mediatoren aus dem Kulturüberstand, und zwar nach 1 h, 2 h und 4 h sowie zum Zeitpunkt 24 h. Während die Konzentrationen sowohl von IL-6 als auch MIP-2 nach Ende

der Expositionsdauer mit Halothan über die Zeit anstiegen, zeigte sich die Konzentration von MCP-1 bis 24 h weiterhin inhibiert.

SUTER und Kollegen (2007) untersuchten, ob die Präinkubation von Alveolarepithelzellen (CCL-149) mit Sevofluran (0,5 MAC) deren, durch Lipopolysaccharid-Stimulation (20 µg/ml, für 5 h), experimentell induzierte Expression von MIP-1β, MIP-2 und MCP-1 sowie die des *Cytokine-induced Neutrophil Chemoattractant-1* (CINC-1) und die des *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) beeinflusst. Bereits im Vorfeld der Studie untersuchten die Autoren, ob es für die Anwendung von Sevofluran ein Dosisoptimum gibt. Sie inkubierten hierzu Alveolarepithelzellen mit Sevofluran in aufsteigenden Konzentrationen und für unterschiedliche Expositionszeiten (0,25, 0,5, 1 und 1,5 MAC, je für 0,5 h, 2 h, 4 h und 12 h) vor Stimulation der Zellen mit IL-1β (20 µg/ml) für 3 h. Hier zeigte sich, dass die Exposition der Zellen mit Sevofluran in einer Konzentration von 0,5 MAC für 30 min den am meisten ausgeprägten Effekt im Hinblick auf die Suppression der Expression von MCP-1 hatte. Aus diesem Befund wurden die für die Hauptstudie gewählte Sevofluran-Konzentration sowie die Expositionszeit abgeleitet. In der Hauptstudie bedingte die Exposition gegenüber Sevofluran dann eine jeweils signifikante Reduktion der Expression von MIP-1β, MIP-2, MCP-1, CINC-1 sowie ICAM-1 in den kultivierten Alveolarepithelzellen, verglichen mit den nicht mit Sevofluran präinkubierten, jedoch mit Lipopolysaccharid stimulierten Zellen. Daneben zeigt sich eine ebenfalls signifikante Reduktion der Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an die stimulierten Alveolarepithelzellen, wenn diese zuvor Kontakt mit Sevofluran hatten.

In Ergänzung zu diesen Befunden berichten YUE et al. (2008), dass auch die Exposition von Alveolarepithelzellen mit Sevofluran erst nach der inflammatorischen Stimulation der Zellen zu antiinflammatorischen Effekten führt. Hier erfolgte die *Ex-vivo*-Stimulation von Alveolarepithelzellen (CCL-149) mit Lipopolysaccharid (20 µg/ml) für die Dauer von 2 h, bevor die Zellkultur mit Sevofluran in einer Konzentration von 1 MAC inkubiert wurde (Postkonditionierung). Im Zellüberstand zeigte sich eine jeweils signifikante Reduktion der proinflammatorischen Mediatoren CINC-1 und MCP-1 durch Postkonditionierung mit Sevofluran gegenüber den stimulierten Zellen ohne Kontakt mit Sevofluran. Daneben fanden die Autoren die ebenfalls signifikante Reduktion der Expression von ICAM-1 sowie eine signifikante Induktion der iNOS durch Sevofluran.

#### 4. Pulmonale Ischämie-Reperfusion

Den dritten Abschnitt dieser Übersicht über bislang bekannte Befunde zu pulmonal-protectiven Wirkungen volatiler Anästhetika bildet die Betrachtung ihrer Beeinflussung der pulmonalen Ischämie-Reperfusionreaktion. Dieses Phänomen ist – wie bereits einleitend ausgeführt – in zahlreichen Situationen von hoher klinischer Relevanz.

In diesem Zusammenhang untersuchten LIU et al. (2000) am Modell der *ex vivo* perfundierten Rattenlunge, welchen Einfluss die volatilen Anästhetika Sevofluran und Isofluran auf die nachfolgend induzierte Ischämie-Reperfusionreaktion haben. Die Beatmung der Lungen unter Zumischung entweder von Sevofluran oder von Isofluran zum Beatmungsgas in einer Konzentration von je 1 MAC erfolgte jeweils für 30 min, gefolgt von 60 min Ischämie sowie anschließender Reperfusion für ebenfalls 60 min. Die Zielparameter waren dabei u. a. die Bestimmung des Gehaltes von TNFα, Nitrit und der Laktatdehydrogenase (LDH) in der Perfusionslösung. Daneben bestimmten die Autoren zur Quantifizierung des pulmonalen

Ödems das Feucht-Trockengewicht der Lunge. Im Ergebnis bewirkte sowohl die Applikation von Sevofluran als auch die von Isofluran vor Induktion der Ischämie jeweils das signifikante Abfallen der in der Vergleichsgruppe nach Reperfusion deutlich angestiegenen Zielparameter (TNF $\alpha$ , Nitrit, LDH, Feucht-Trockengewicht).

Inwieweit volatile Anästhetika auch protektive Effekte während warmer Ischämie haben, war Gegenstand einer Untersuchung von FUJINAGA und Kollegen (2006). Während 50 min andauernder warmer Ischämie bei 37°C wurden die zuvor explantierten und zunächst *ex vivo* perfundierten Rattenlungen mit Isofluran in Konzentrationen von entweder 1 MAC oder 3 MAC beatmet. Anschließend wurden die Lungen für 60 min reperfundiert. Neben einer globalen Verbesserung der Lungenmechanik (Erhöhung der dynamischen *Compliance* bzw. Reduktion der dynamischen *Resistance*) senkte die Beatmung mit Isofluran sowohl mit 1 MAC als auch mit 3 MAC neben der pulmonalen Shuntfraktion auch den im Rahmen der Ischämie-Reperfusionen deutlich angestiegenen pulmonalvaskulären Widerstand sowie das Lungengewicht als Ausdruck des pulmonalen Ödems signifikant. Daneben konnten die Autoren in einem zweiten, analog durchgeführten Ansatz zeigen, dass die Beatmung der Lungen mit 1 MAC Isofluran zu protektiven Effekten hinsichtlich der mitochondrialen Atmung und Apoptose führte.

Die pulmonale Inflammationsreaktion mit Sequestration immunkompetenter Zellpopulationen tritt auch im Rahmen systemischer Ischämie-Reperfusionen auf. Insofern ergibt sich möglicherweise in diesem Kontext ein mögliches Einsatzgebiet für die Anwendung volatiler Anästhetika. KALB und Kollegen (2008) untersuchten, ob die Exposition von Versuchstieren (Ratte) mit Sevofluran vor (1 MAC für 30 min) bzw. nach (1 MAC für 180 min) experimentellem Clamping der infrarenalen Aorta für 120 min die pulmonale Sequestration von neutrophilen Granulozyten beeinflusst. Während die Ischämie-Reperfusionen zu einem signifikanten Anstieg der pulmonalen Sequestration neutrophiler Granulozyten führte, bewirkte die Präkonditionierung – nicht jedoch die Postkonditionierung – mit Sevofluran eine wiederum signifikante Reduktion der pulmonalen Zellsequestration.

## 5. Konklusion

Die bislang vorliegenden Befunde belegen, dass volatile Anästhetika antiinflammatorische und organprotektive Wirkungen im Hinblick auf die pulmonale Entzündungsreaktion haben. Diese Wirkungen konnten in unterschiedlichen Modellen – von der primär pulmonalen Entzündung durch Inhalation von Lipopolysaccharid über die pulmonale Inflammation sekundär zur systemischen Inflammation während Endotoxinämie, bis hin zur pulmonalen und systemischen Ischämie-Reperfusionen nachgewiesen werden.

Vor dem Hintergrund der bislang verfügbaren Daten könnten volatile Anästhetika im Hinblick auf die Prävention sowie Therapie der akuten pulmonalen Entzündungsreaktion zukünftig Bedeutung erlangen.

Konkrete klinische Szenarien, in denen volatile Anästhetika aus „immunmodulierender pulmonaler“ Indikation eingesetzt werden könnten, sind beispielsweise deren Anwendung während und nach extrakorporaler Zirkulation sowie die Präkonditionierung des Spenderorgans zur Lungentransplantation. Inwieweit intensivmedizinische Erkrankungen und Syndrome, wie das akute Lungenversagen (ARDS) des septischen Patienten, ein mögliches Anwendungsgebiet sein könnten, muss in weiteren Untersuchungen, die auch mögliche nachteilige

Wirkungen der Applikation volatiler Anästhetika auf die Immunkompetenz des kritisch kranken Patienten berücksichtigen, geklärt werden.

*Literatur*

- BOOST, K. A., FLONDOR, M., HOFSTETTER, C., PLATACIS, I., STEGEWERTH, K., HOEGL, S., NGUYEN, T., MUHL, H., and ZWISSLER, B.: The beta-adrenoceptor antagonist propranolol counteracts anti-inflammatory effects of isoflurane in rat endotoxemia. *Acta Anaesthesiol. Scand.* *51*, 900–908 (2007)
- BOOST, K. A., HOFSTETTER, C., FLONDOR, M., BETZ, C., HOMANN, M., PFEILSCHIFTER, J., MUEHL, H., and ZWISSLER, B.: Desflurane differentially affects the release of proinflammatory cytokines in plasma and bronchoalveolar fluid of endotoxemic rats. *Int. J. Mol. Med.* *17*, 1139–1144 (2006)
- FLONDOR, M., HOFSTETTER, C., BOOST, K. A., BETZ, C., HOMANN, M., and ZWISSLER, B.: Isoflurane inhalation after induction of endotoxemia in rats attenuates the systemic cytokine response. *Eur. Surg. Res.* *40*, 1–6 (2008)
- FUJINAGA, T., NAKAMURA, T., FUKUSE, T., CHEN, F., ZHANG, J., UEDA, S., HAMAKAWA, H., OMASA, M., SAKAI, H., HANAOKA, N., WADA, H., and BANDO, T.: Isoflurane inhalation after circulatory arrest protects against warm ischemia reperfusion injury of the lungs. *Transplantation* *82*, 1168–1174 (2006)
- GIRAUD, O., MOLLIEUX, S., ROLLAND, C., LEÇON-MALAS, V., DESMONTS, J. M., AUBIER, M., and DEHOUX, M.: Halogenated anesthetics reduce interleukin-1beta-induced cytokine secretion by rat alveolar type II cells in primary culture. *Anesthesiology* *98*, 74–81 (2003)
- GIRAUD, O., SEINCE, P. F., ROLLAND, C., LEÇON-MALAS, V., DESMONTS, J. M., AUBIER, M., and DEHOUX, M.: Halothane reduces the early lipopolysaccharide-induced lung inflammation in mechanically ventilated rats. *Amer. J. Respir. Crit. Care Med.* *162*, 2278–2286 (2000)
- KALB, R., SCHÖBER, P., SCHWARTE, L. A., WEIMANN, J., and LOER, S. A.: Preconditioning, but not postconditioning, with Sevoflurane reduces pulmonary neutrophil accumulation after lower body ischaemia/reperfusion injury in rats. *Eur. J. Anaesthesiol.* *25*, 454–459 (2008)
- LIU, R., ISHIBE, Y., and UEDA, M.: Isoflurane-sevoflurane administration before ischemia attenuates ischemia-reperfusion-induced injury in isolated rat lungs. *Anesthesiology* *92*, 833–840 (2000)
- REUTERSHAN, J., CHANG, D., HAYES, J. K., and LEY, K.: Protective effects of isoflurane pretreatment in endotoxin-induced lung injury. *Anesthesiology* *104*, 511–517 (2006)
- SUTER, D., SPAHN, D. R., BLUMENTHAL, S., REYES, L., BOOY, C., Z'GRAGGEN, B. R., and BECK-SCHIMMER, B.: The immunomodulatory effect of sevoflurane in endotoxin-injured alveolar epithelial cells. *Anesth. Analg.* *104*, 638–645 (2007)
- YUE, T., ROTH Z'GRAGGEN, B., BLUMENTHAL, S., NEFF, S. B., REYES, L., BOOY, C., STEURER, M., SPAHN, D. R., NEFF, T. A., SCHMID, E. R., and BECK-SCHIMMER, B.: Postconditioning with a volatile anaesthetic in alveolar epithelial cells in vitro. *Eur. Respir. J.* *31*, 118–125 (2008)

Priv.-Doz. Dr. med. Christian HOFSTETTER  
Klinik für Anaesthesiologie und Operative Intensivmedizin  
Universitätsmedizin Mannheim  
Theodor-Kutzer-Ufer 1–3  
68167 Mannheim  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 621 3832614  
Fax: +49 621 3833806  
E-Mail: christian.hofstetter@umm.de

## **Altern in Deutschland**

Die Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina und die Deutsche Akademie für Technikwissenschaften acatech gründeten im Mai 2005 eine gemeinsame interdisziplinäre Akademiengruppe „Altern in Deutschland“, die auf der Grundlage der besten verfügbaren wissenschaftlichen Evidenz öffentliche Empfehlungen erarbeitete, um die Chancen der im letzten Jahrhundert erheblich gestiegenen Lebenserwartung – die „gewonnenen Jahre“ – vernünftig zu nutzen und mit den Herausforderungen des demographischen Alterns klug umzugehen.

### **Nova Acta Leopoldina N. F.**

Bd. 99, Nr. 363 – Altern in Deutschland Band 1

#### **Bilder des Alterns im Wandel**

Herausgegeben von Josef EHMER und Otfried HÖFFE unter Mitarbeit von Dirk BRANTL und Werner LAUSECKER

(2009, 244 Seiten, 32 Abbildungen, 1 Tabelle, 24,00 Euro, ISBN: 978-3-8047-2542-3)

Bd. 100, Nr. 364 – Altern in Deutschland Band 2

#### **Altern, Bildung und lebenslanges Lernen**

Herausgegeben von Ursula M. STAUDINGER und Heike HEIDEMEIER

(2009, 279 Seiten, 35 Abbildungen, 9 Tabellen, 24,00 Euro, ISBN: 978-3-8047-2543-0)

Bd. 101, Nr. 365 – Altern in Deutschland Band 3

#### **Altern, Arbeit und Betrieb**

Herausgegeben von Uschi BACKES-GELLNER und Stephan VEEN

(2009, 157 Seiten, 29 Abbildungen, 20 Tabellen, 24,00 Euro, ISBN: 978-3-8047-2544-7)

Bd. 102, Nr. 366 – Altern in Deutschland Band 4

#### **Produktivität in alternden Gesellschaften**

Herausgegeben von Axel BÖRSCH-SUPAN, Marcel ERLINGHAGEN, Karsten HANK, Hendrik JÜRGES und Gert G. WAGNER

(2009, 157 Seiten, 28 Abbildungen, 2 Tabellen, 24,00 Euro, ISBN: 978-3-8047-2545-4)

Bd. 103, Nr. 367 – Altern in Deutschland Band 5

#### **Altern in Gemeinde und Region**

Stephan BEETZ, Bernhard MÜLLER, Klaus J. BECKMANN und Reinhard F. HÜTTL

(2009, 210 Seiten, 10 Abbildungen, 11 Tabellen, 24,00 Euro, ISBN: 978-3-8047-2546-1)

Bd. 104, Nr. 368 – Altern in Deutschland Band 6 (in Vorbereitung)

#### **Altern und Technik**

Herausgegeben von Ulman LINDENBERGER, Jürgen NEHMER, Elisabeth STEINHAGEN-THIESSEN, Julia DELIUS und Michael SCHELLENBACH

Bd. 105, Nr. 369 – Altern in Deutschland Band 7

#### **Altern und Gesundheit**

Herausgegeben von Kurt KOCHSIEK

(2009, 302 Seiten, 46 Abbildungen, 18 Tabellen, 24,00 Euro, ISBN: 978-3-8047-2548-5)

Bd. 106, Nr. 370 – Altern in Deutschland Band 8

#### **Altern: Familie, Zivilgesellschaft, Politik**

Herausgegeben von Jürgen KOCKA, Martin KOHLI und Wolfgang STRECK unter Mitarbeit von Kai BRAUER und Anna K. SKARPELIS

(2009, 343 Seiten, 44 Abbildungen, 9 Tabellen, 24,00 Euro, ISBN: 978-3-8047-2549-2)

Bd. 107, Nr. 371 (2009) – Altern in Deutschland Band 9

#### **Gewonnene Jahre. Empfehlungen der Akademiengruppe Altern in Deutschland**

(2009, 102 Seiten, 1 Abbildung, 12,00 Euro, ISBN: 978-3-8047-2550-8)

# Hepatische Protektion – Von der ischämischen Präkonditionierung zur pharmakologischen Konditionierung durch den Anästhesisten

Alexander CHOUKÈR (München)

Mit 2 Abbildungen

## Zusammenfassung

Klinische und tierexperimentelle Untersuchungen zeigen die Wirksamkeit der ischämischen Präkonditionierung zum Schutz vor Ischämierепerfusionsschäden der Leber auf. Dabei wird Adenosin als einer der zentralen Mediatoren dieses Mechanismus diskutiert. Die Bedeutung der Adenosin-vermittelten protektiven Wirkung wurde im Tierexperiment durch Infusion nativen Adenosins im Sinne einer pharmakologischen Konditionierung bestätigt. Gerade aufgrund ihrer klinischen Attraktivität könnte eine kombinierte pharmakologische Prä- und Postkonditionierung, beispielsweise durch die Anwendung von Adenosin-Analoga gemeinsam mit ebenfalls bei Konditionierung wirksamen volatilen Anästhetika, angewendet werden, um im Sinne eines „multi-drug-regimen“ die Folgen des durch Trauma und Ischämierепerfusion bedingten Organschadens zum Wohle des Patienten weiter zu reduzieren.

## Abstract

Evidence from clinical and experimental investigations describe the benefits of ischemic preconditioning to protect liver tissue from subsequent more severe ischemic episodes. Protection from the consequences of severe ischemia by ischemic preconditioning is critically mediated by endogenous release of adenosine and adenosine receptor dependent mechanisms. In addition, pharmacologic conditioning through infusion of adenosine as pre-treatment could prevent from hepatic ischemia and reperfusion injury in mice. Since liver ischemia and reperfusion injury is substantially reduced by pre- and post-conditioning regimen either with adenosine or also with volatile anesthetics alone, a multi-drug-regimen combining the redundant and complementary action of adenosine analogues and volatile anesthetics can further limit tissue injury and improve patient outcome.

## 1. Einleitung

Das Fachgebiet der Anästhesiologie umfasst die Vorbereitung des Patienten für den bevorstehenden operativen Eingriff, die intraoperative Betreuung und Therapie sowie die Nachbehandlung. Neben der Durchführung der Anästhesie und Analgesie stellt gerade die Aufrechterhaltung und Wiederherstellung der vitalen Funktionen und der Organ- bzw. Systemhomöostase während und nach operativen Maßnahmen eine zentrale Aufgabe des Anästhesisten dar. Dabei nimmt die Erfassung der Mechanismen der Störungen der Organ- und Zellhomöostase im Rahmen operativer Maßnahmen, die Prävention im Sinne einer sogenannten Zytoprotektion und die Therapie von operativ-bedingten Organdysfunktionen eine wichtige Rolle in der anästhesiologischen klinischen Tätigkeit und Forschung ein. Dieses zunehmende Verständnis und die Übertragung der Ergebnisse *in vitro*, aus tierexperimentellen und vor allem klinischen Studien in die tägliche Praxis ermöglichten eine kontinuierliche Verbesserung der anästhesiologischen Betreuung der Patienten in den letzten Jahrzehnten. So können heute früher nicht

für machbar erachtete operative Eingriffe, vor allem bei Älteren und mehrfach vorerkrankten Patienten erfolgreich durchgeführt werden. Auch in der Leberchirurgie hat dieser Fortschritt – gemeinsam mit einer bedeutenden Weiterentwicklung der Operationsverfahren – die Indikationsstellungen zur Leberteilresektion erweitert. So kann heute die chirurgische Entfernung benignen oder malignen Lebertumoren als ein etabliertes operatives Verfahren zur Behandlung hepatischer Neubildungen erachtet werden (PARKS und GARDEN 2001, FONG 1999). Zumeist handelt es sich dabei um primäre Leberzell- oder Gallengangskarzinome oder um Lebermetastasen infolge eines metastasierten, kolorektalen Karzinoms. Die Hälfte aller Patienten mit einem kolorektalen Karzinom entwickeln Lebermetastasen, und 10–15 % dieser Patienten können vollständig von ihrer Erkrankung geheilt werden (KOOBY et al. 2003). Dabei erlauben die Anwendung moderner prä- und intraoperativer Bildgebungsverfahren eine exakte Tumorkonlokalisierung und somit auch eine anatomisch angepasste und damit auch ein das Leberparenchym schonende Resektion. Ungeachtet dieses auch technisch bedingten medizinischen Fortschritts konnten die Mortalität und Morbidität nach ausgedehnten Resektionen zwar gesenkt werden, doch beträgt die perioperative Mortalität und Morbidität immer noch 5 % bzw. 15 % (HOLT 2000). Bei ausgedehnten leberchirurgischen Eingriffen kann die Rate aufgrund einer postoperativen Organdysfunktion bzw. eines Organversagens immer noch 10 % bzw. 50 % betragen. Dieser Artikel soll beschreiben, in welcher neuen Weise sich die anästhesiologische Betreuung hinsichtlich des Konzepts der Organkonditionierung zum Wohle des Patienten entwickelt hat bzw. sich in Zukunft weiterentwickeln könnte.

## 2. Der Ischämie- und Reperfusionsschaden der Leber

Gerade aufgrund der hohen Durchblutungsrate der Leber über die venösen sowie arteriellen Gefäße der Leberpforte steht die Kontrolle des Blutverlustes während der Tumorentfernung bei der intraoperativen Betreuung durch den Chirurgen und Anästhesisten gleichermaßen im Vordergrund.

Um lebensbedrohliche Blutungen zuverlässig zu vermeiden und die Transfusionshäufigkeit – welche positiv mit einem Tumorzidiv assoziiert ist (STEPHENSON et al. 1988) – von Fremdblut zu reduzieren, können bei Operationen an der Leber die das Organ versorgenden Gefäße für die Dauer der Resektion abgeklemmt werden. James Hogarth PRINGLE beschrieb bereits vor einem Jahrhundert eine einfache und sichere Methode der digitalen Kompression des Leberhilus zur Blutstillung bei Leberverletzungen (PRINGLE 1908). Heute wird durch das Abklemmen der A. hepatica und der V. portae, beispielsweise durch ein temporäres Tourniquet, ein blutverlustarmes Operieren zuverlässig erzielt (MAN et al. 1997, BELGHITI et al. 1999). Infolge des Pringle-Manövers und der daraus resultierenden warmen Ischämie und Reperfusion der Leber können sich jedoch schwere postoperative Störungen der Leberzellintegrität und -funktion bis hin zum Leberversagen entwickeln. Die zugrundeliegende Pathophysiologie wird als Ischämie-reperfusionsschaden bezeichnet: Während der Phase einer warmen *Ischämie* (d. h. *in situ* bei Körpertemperatur) kommt es durch den Mangel an Sauerstoff zur Beeinträchtigung der aeroben Respiration. Die kompensatorische Steigerung der anaeroben Glykolyse reicht jedoch nicht aus, um die Energiehomöostase aufrechtzuerhalten. Es folgt ein verstärkter Abbau von energiereichem Adenosinriphosphat (ATP) und Adenosindiphosphat (ADP) (PERALTA et al. 2000). Das in der Zelle bei Sauerstoffmangel dann vermehrt anfallende Adenosinmonophosphat (AMP) kann durch die Abnahme der mitochondrialen Aktivität



nicht rephosphoryliert werden, sodass es bis zu Hypoxanthin abgebaut wird, welches ein wichtiges Substrat für die Sauerstoffradikal-Produktion in der Reperfusionphase darstellt. Diese initialen Störungen im Energiehaushalt der Zelle stellen einen entscheidenden pathophysiologischen Mechanismus dar, der schließlich zum Verlust der Ionen-Homöostase von  $H^+$ -,  $Na^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Ionen und schließlich zu einer ödematösen Schwellung der Zellen und der Mitochondrien führt (CARINI et al. 1995, XIA et al. 1996) (Abb. 1).

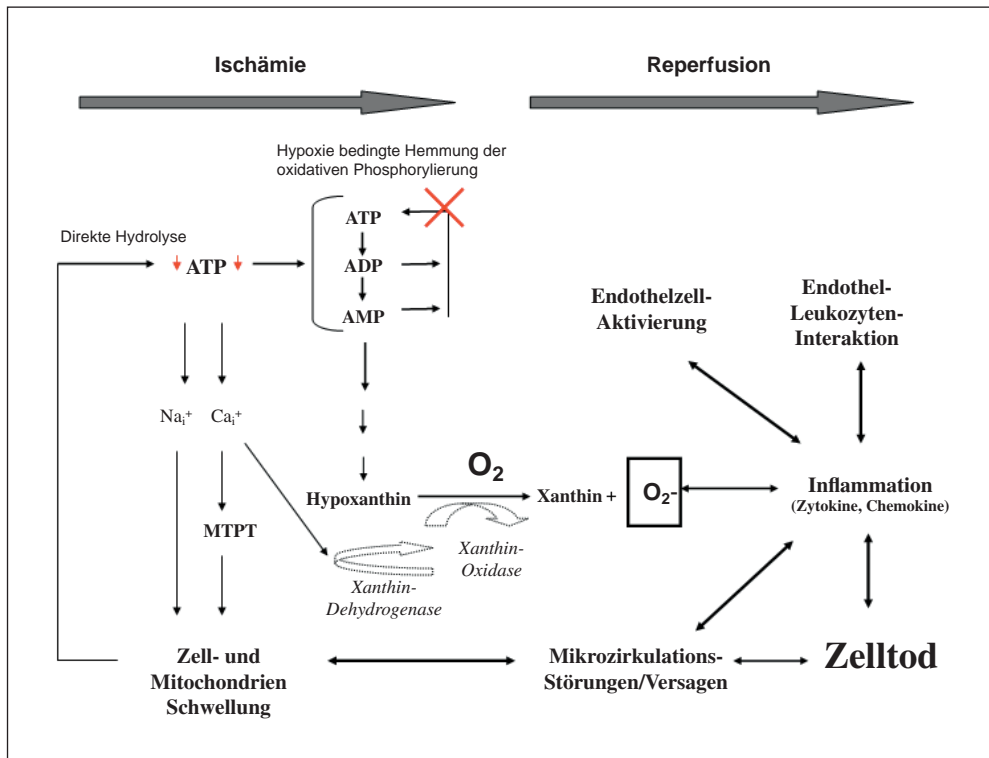


Abb. 1 Initialmechanismen des Ischämie-reperfusionsschadens. Linkes Flussdiagramm: Während Ischämie und Gewebhypoxie werden energiereiche Adeninnukleotide (ATP – Adenosintriphosphat, ADP – Adenosindiphosphat, AMP – Adenosinmonophosphat) verbraucht und aufgrund der hypoxiebedingten Hemmung der oxidativen Phosphorylierung nicht ausreichend regeneriert. Der vermehrte Katabolismus von ATP führt weiter zur Beeinträchtigung energieabhängiger Ionenpumpen und somit zur Störung der Ionenhomöostase mit der Folge erhöhter intrazellulärer  $Na^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen in der Zelle. Durch Calcium-abhängige Öffnung der sogenannten „mitochondrial permeability transition pore (MPTP)“ kann es zur Schwellung der Mitochondrien, zur Ruptur ihrer äußeren Membran und zur weiteren Beeinträchtigung der ATP-Verfügbarkeit durch direkte Hydrolyse von ATP kommen. Der Abbau von ATP bis zum Hypoxanthin sowie die  $Ca^{2+}$ -abhängige Umwandlung der Xanthindehydrogenase in die Xanthinoxidase führen dann in der Reperfusion (rechtes Flussdiagramm) bei Wiederverfügbarkeit von Sauerstoff ( $O_2$ ) zur Bildung reaktiver Superoxidanionen ( $O_2^-$ ). Superoxidanionen stehen am Beginn einer Entzündungskaskade, die vor allem durch Gewebsmakrophagen und Granulozyten vermittelt wird, welche durch Aktivierung der NADPH-Oxidase zu einer weiteren Freisetzung schädigender Superoxidanionen führt. Die Aktivierung und Interaktion der Endothelzellen und der Phagozyten sowie die Freisetzung von Proteasen führen gemeinsam mit den vorbestehenden Zellschädigungen zu Störungen der Mikrozirkulation, zu einer Reduktion des nutritiven Blutflusses und gemeinsam mit den vorangegangenen direkt metabolisch-toxischen Schädigungen schließlich zum hepatozellulären Zelltod bzw. Leberversagen.

Nach Beendigung des Pringle-Manövers beginnt mit Wiederherstellen des hepatischen Blutflusses die Phase der *Reperfusion*, und die primär metabolischen Störungen werden infolge der wieder einsetzenden Durchblutung und Reoxygenierung durch sekundäre inflammatorische Reaktionen erheblich verstärkt. Somit wird in der Phase der Reperfusion Sauerstoff wieder verfügbar, der – katalysiert durch die Xanthinoxidase – Hypoxanthin zu Xanthin oxidiert und selbst zu reagiblen Superoxidanionen reduziert wird (Abb. 1). Die reaktiven Superoxidanionen stellen den Ausgangspunkt für nachfolgende komplexe inflammatorische Reaktionen dar. Dazu tragen initial auch aktivierte Kupfferzellen (gewebständige Makrophagen in der Leber) und polymorphkernige neutrophile Leukozyten (PMN) bei, die ebenfalls Sauerstoffradikale, Stickstoffmonoxid (NO) und auch pro-inflammatorische Zytokine (z. B. Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) oder Chemokine (Interleukin 8) freisetzen (CHOUKÈR et al. 2005a). Diese Mediatoren führen ihrerseits zu einer weiteren auto- und parakrinen Aktivierung der polymorphkernigen neutrophilen Leukozyten und bewirken deren Diapedese in das Leberparenchym. Gerade die polymorphkernigen Leukozyten stellen eine in der Pathologie des Ischämiereperfusionsschadens sehr wichtige Zellpopulation dar, da sie – nach Aktivierung und Adhärenz an das Endothel – bakterizide Substanzen und weitere reaktive Sauerstoffspezies in erheblichem Umfang freisetzen können (JAESCHKE 2006). Unter solchen Bedingungen einer unumkehrbaren, massiven Störung der Energie- und Ionenhomöostase bzw. Inflammation werden Phospholipasen, Nukleasen und Proteasen aktiviert und schließlich der Zelltod durch Apoptose und Nekrose der Zelle verursacht (HALESTRAP et al. 2004). Dies mündet letztlich in die Entwicklung eines Organschocks (JAESCHKE et al. 1990).

### 3. Die intraoperative ischämische Präkonditionierung der Leber

Die Anpassung des Organismus an sich verändernde Umweltbedingungen ist ein wichtiges Prinzip in der Evolutionsbiologie und stellt einen Überlebensvorteil in der Natur dar. Dass diese Anpassung des gesamten Organismus auch gezielt gegen wiederholte Traumata erfolgen kann, konnte NOBLE erstmals im Jahre 1942 an Versuchstieren aufzeigen, und Charles E. MURRY (MURRY et al. 1986) führte später den Begriff des „preconditioning“ ein (siehe Beitrag von M. THIEL) und bezeichnete damit die akute Adaptation eines einzelnen Organs an eine Ischämie. Das Prinzip der ischämischen Präkonditionierung (IPC) beruht auf der präventiven Wirkung einer oder mehrerer kurzer Phasen einer Ischämie und Reperfusion, die vor den Gewebeschäden einer nachfolgenden längeren Ischämie schützen können. Die Effizienz dieser Form der Protektion wurde in tierexperimentellen Untersuchungen für einzelne Organe, beispielsweise das Gehirn und das Herz, aufgezeigt. Die Gültigkeit dieses als universell geltenden Konzeptes konnte in eigenen präklinischen sowie in klinischen, prospektiv randomisierten Studien an Patienten auch für das Organ Leber aufgezeigt werden (CHOUKÈR et al. 2004, 2005a). Unsere Ergebnisse bestätigen und erweitern die Berichte anderer Gruppen (CLAVIEN et al. 2003), die ebenfalls zeigten, dass die ischämische Präkonditionierung auch beim Menschen eine wirksame Maßnahme zum Schutz der Leber vor den Ischämiereperfusionsschäden nach langen Ischämien (>30 min) bei geplanten Leberteilresektionen darstellt.

Die beim Patienten durch ischämische Präkonditionierung induzierte Hepatoprotektion wird laborchemisch an der über 50%-igen Reduktion der im postoperativen Verlauf aus den Leberzellen freigesetzten Transaminasen, z. B. der Alanin-Amino-Transferase (ALT) und der  $\alpha$ -Glutathion-S-Transferase ( $\alpha$ -GST), erkennbar (CHOUKÈR et al. 2005c). Der Anstieg der Se-

rumaktivitäten bzw. -konzentrationen dieser Leberenzyme gilt als wichtiger laborchemischer Parameter einer erheblich gestörten hepatozellulären Integrität. Der Organschaden konnte durch IPC sogar auf ein Ausmaß reduziert werden, welches in der Patientengruppe quantifiziert wurde, bei der die Leberresektion ohne Pringle-Manöver durchgeführt wurde. Daraus lässt sich schließen, dass der durch Ischämierperfusion verursachte Zellschaden durch die IPC vollständig aufgehoben wird (CHOUKÈR et al. 2005a, c). Der durch die ischämische Präkonditionierung induzierte Schutz kann dabei auf (a.) Veränderungen des Zellstoffwechsels sowie auf (b.) die Reduktion inflammatorischer Reaktionen in der Reperusionsphase zurückgeführt werden. Die Wirksamkeit der IPC auf metabolischer Ebene wird dahingehend diskutiert, dass in einer nachfolgenden, längeren Ischämie weniger ATP im Gewebe verbraucht und somit weniger anerobe Glykolyse notwendig ist. Das lässt sich im Begriff des sogenannten „metabolic arrest“ zusammenfassen und sich entsprechend durch niedrigere Blut- und Gewebespiegel der ATP-Abbauprodukte und von Laktat quantifizieren (NAKAYAMA et al. 1999, CHOUKÈR 2005b) und stellt einen wichtigen Befund für den Erhalt der mitochondrialen bzw. hepatozellulären Energiehomöostase dar (CLAVIEN et al. 2003). Zudem konnte die durch Ischämie und Reperfusion induzierte Aktivierung der neutrophilen Granulozyten und das Ausmaß von pro-inflammatorischen Reaktionen signifikant abgeschwächt werden (CHOUKÈR et al. 2005c).

#### 4. Von der ischämischen zur pharmakologischen Präkonditionierung

Das Nukleosid Adenosin konnte nicht nur am Herz und im Gehirn (HAWALESHKA und JACOBSON 1998), sondern auch an der Leber als ein zentraler Mediator des Schutzeffektes der ischämischen Präkonditionierung charakterisiert werden. Beim Patienten konnte aufgezeigt werden, dass unmittelbar nach 10 min Ischämie der Leber zur ischämischen Präkonditionierung die Adenosinkonzentrationen und die Konzentrationen seiner unmittelbaren Metabolite Inosin, Hypoxanthin und Xanthin im Blut anstiegen (CHOUKÈR et al. 2005b). Über welchen der vier bekannten Adenosinrezeptoren (Abb. 2) das gebildete Adenosin seine Wirkung vermittelt, wurde im Modell des hepatischen Ischämierperfusionsschadens der Maus definiert. Es konnte dabei gezeigt werden, dass die ischämische Präkonditionierung in sogenannten A<sub>2A</sub>-Rezeptor-„Knock-out“-Mäusen – d. h. in gen-manipulierten Tieren, die keinen funktionsfähigen Adenosin-A<sub>2A</sub>-Rezeptor exprimieren – keine Hepatoprotektion bewirken kann. Diese *in vivo* erhobenen Befunde bestätigen die mit spezifischen Adenosin-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten *in vitro* und *in vivo* durchgeführten Untersuchungen zur Bedeutung des A<sub>2A</sub>-Rezeptors (ARAI et al. 2000, CARINI et al. 2004). Somit konnte erstmals im Sinne einer „genetischen Evidenz“ gezeigt werden, dass an der Leber Adenosin über den Gs-gekoppelten Adenosin-A<sub>2A</sub>-Rezeptor den hepatoprotektiven Effekt der ischämischen Präkonditionierung der Leber vermittelt (Abb. 2).

Ausgehend von der Bedeutung „endogener“ Adenosinkonzentrationen bei der ischämischen Präkonditionierung und der über den Adenosin-A<sub>2A</sub>-Rezeptor vermittelten hepatoprotektiven Wirkungen haben wir geprüft, ob nicht auch durch „exogen“, d. h. intravenös, infundiertes Adenosin die Leber vor Ischämierperfusionsschäden im Sinne einer pharmakologischen Präkonditionierung geschützt werden kann. Dabei wurde die pharmakologische Wirkung einer 10-minütigen Adenosininfusion auf den nachfolgenden Ischämierperfusionsschaden geprüft. Die intravenöse Gabe von nativem Adenosin über 10 min konnte den nachfolgenden Ischämierperfusionsschaden signifikant reduzieren und auch die nach Isch-

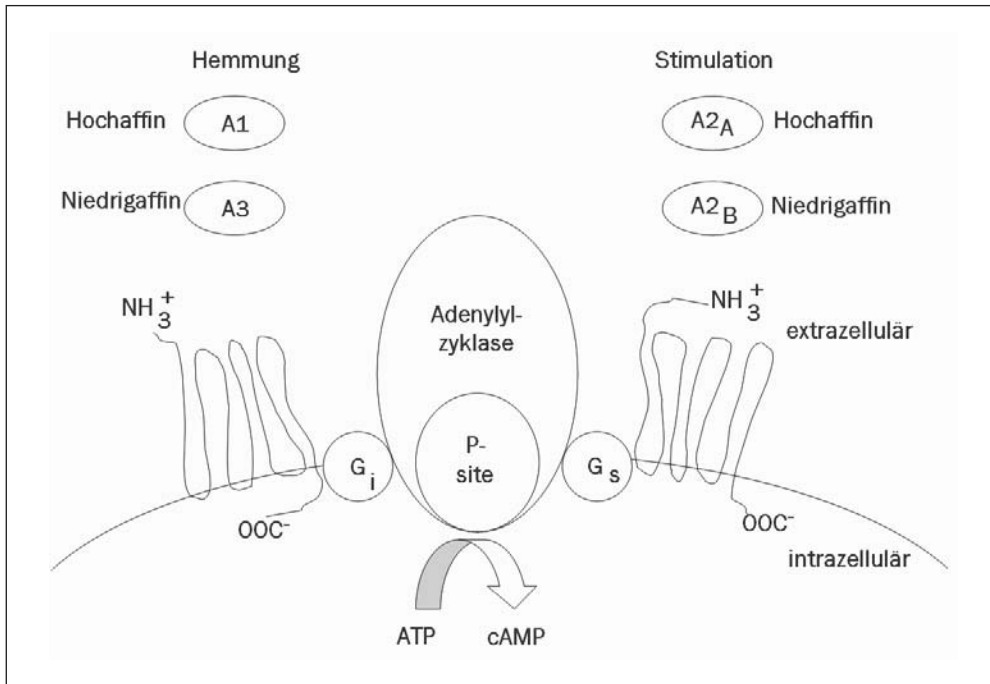


Abb. 2 Adenosinrezeptoren. Es konnten bisher vier Adenosinrezeptoren charakterisiert werden, die alle der Gruppe der transmembranalen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren angehören. Die Adenosinrezeptoren binden Adenosin mit hoher (A1 und A2A) oder niedriger Affinität (A2B, A3) und führen entweder zu einer Aktivierung (A2A, A2B) oder Hemmung (A1, A3) der Adenylylzyklase (SITKOVSKY et al. 2004). Die Adenylylzyklase katalysiert die Umwandlung von Adenosintriphosphat (ATP) in zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP). ( $\text{G}_s$  – stimulierendes Protein,  $\text{G}_i$  – inhibierendes Protein). Die durch ischämische Präkonditionierung vermittelte Zytoprotektion ist nicht ubiquitär in allen Organen von nur einem Adenosin-Rezeptor-(Sub)-Typ vermittelt und ist beispielsweise am Myokard über den A1- (REICHELT et al. 2005) bzw. A3-Rezeptor (DE JONGE et al. 2002), im Gehirn über den A1- (NAKAMURA et al. 2002) und an der Leber über den A2A-Rezeptor induzierbar (CHOUKÈR et al. 2008).

ämie und Reperfusion auftretende inflammatorische Antwort signifikant schwächen. Insgesamt waren die durch die Adenosininfusion vermittelten Schutzeffekte ebenso effizient und vergleichbar mit der Wirkung einer ischämischen Präkonditionierung. Die Wirksamkeit von nativem Adenosin im Sinne einer pharmakologischen Präkonditionierung zeigte auch NILSSON (NILSSON et al. 2000) durch Anwendung von Dipyridamol, einem sogenannten Adenosin-,re-uptake“-Inhibitor, der die endogene Adenosinkonzentration erhöhte, und so den Ischämierperfusionsschaden verringern konnte. Dass dieser Effekt der pharmakologischen Präkonditionierung durch Adenosin ebenfalls über einen Adenosin-A2<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelt ist, zeigten CARINI et al. (2001) durch die Anwendung des hochselektiven, synthetischen A2<sub>A</sub>-Rezeptor-Agonisten CG21680. Zudem bestätigten eigene Untersuchungen die Rolle des A2<sub>A</sub>-Rezeptors bei der pharmakologischen Präkonditionierung.

Die pharmakologische Aktivierung purinerner Signalwege kann daher als ein effizientes Wirkungsprinzip endogener Mechanismen zur Präkonditionierung angesehen werden. Es gilt aber nicht als ein alleingültiges Prinzip, da andere präventive Massnahmen ebenfalls einen Schutz der Leber im Sinne einer Präkonditionierung bewirken können. Weitere Ansätze

zur pharmakologischen Präkonditionierung der Leber zeigten, dass neben NO-abhängigen (CARINI et al. 2003) auch NO-unabhängige Signalwege (CARRASCO-CHAUMEL et al. 2005), Prostazyklin (MEYER et al. 2001) und auch direkt antioxidative Substanzen (beispielsweise N-Acetyl-Cystein; SMYRNIOTIS et al. 2005) eine Hepatoprotektion bewirken können. Dabei könnte die pharmakologische Präkonditionierung im weiteren Sinne durch die Begriffe der „hormonellen“ (durch Atriales Natriuretisches Peptid; KIEMER et al. 2002) oder „anti-inflammatorischen“ (durch Interleukin 10; DONCKIER et al. 2003) bzw. „anti-oxidativen“ (durch N-Acetyl-Cystein; SMYRNIOTIS et al. 2005) Präkonditionierung ergänzt werden.

## **5. Konzepte zum Erhalt der Organhomöostase durch pharmakologische Konditionierung durch den Anästhesisten: Die Rolle von Adenosin und volatilen Anästhetika**

Weitere, gerade in der klinischen Praxis zur Prävention des hepatischen Ischämierperfusionschadens der Leber vielversprechende und praktisch anwendbare Methoden der Konditionierung könnten – neben der gezeigten Wirksamkeit der ischämischen Präkonditionierung und der Präkonditionierung durch Adenosin – vor allem auch unmittelbare anästhesiologische Maßnahmen wie die Konditionierung durch volatile Anästhetika sein. So konnten ZAUGG und Kollegen die Wirksamkeit von Isofluran zur Verringerung des Ischämierperfusionschadens am Herzmuskel zeigen und erstmals unter dem Mikroskop an Herzmuskelzellen nach Präkonditionierung mit Isofluran dokumentieren, dass volatile Anästhetika die Öffnung des mitochondrialen ATP-abhängigen Kalium-Kanals an der Herzmuskelzelle bewirken (ZAUGG et al. 2002). Damit wirken Inhalationsanästhetika, ebenso wie bei der ischämischen Präkonditionierung, auf einen zentralen mitochondrialen Effektormechanismus, der zur raschen Zytoprotektion führt. Die Wirksamkeit der pharmakologischen Präkonditionierung durch volatile Anästhetika im Sinne einer Hepatoprotektion konnte kürzlich erstmals bei Patienten gezeigt werden, die sich einer Leberteilektomie mit Pringle-Manöver unterzogen. Dabei konnte die Präkonditionierung mit Sevofluran den hepatozellulären Schaden im Vergleich mit dem der nicht-präkonditionierten, d. h. durchgehend mit dem intravenösen Narkotikum Propofol anästhesierten, Patienten signifikant reduzieren (BECK-SCHIMMER et al. 2008). Hier stellen inhalative Anästhetika auch in der postschämischen Phase ein interessantes Konzept der Zytoprotektion dar. Tatsächlich beschreiben experimentelle Untersuchungen eine schützende Wirkung volatiler Anästhetika in der postschämischen Phase, beispielsweise für das gesunde oder vorgeschädigte Myokard (LUCCHINETTI et al. 2005, ZHU et al. 2006, TESSIER-VETZEL et al. 2006). Es konnten auch erste Daten erhoben werden, dass (a.) das Narkosegas Sevofluran zusätzlich zum Herzen der Patienten auch deren Nieren gegen den operativen Stress schützt (JULIER et al. 2003) sowie pro-inflammatorisch wirksame Effektorzellen wirksam hemmen und den Entzündungsvorgang im Sinne einer Postkonditionierung abschwächen kann (STEURER et al. 2008). Volatile Anästhetika greifen genau in die Mechanismen des Ischämierperfusionschadens ein, die sonst zum Zelltod und Organschlag führen würden (Abb. 1).

Aus diesen Ergebnissen zur Wirkung der volatilen Anästhetika ließe sich auch eine kombinierte Anwendung im Sinne einer Präkonditionierung und einer nachfolgenden Postkonditionierung für eine präventive als auch therapeutische Zytoprotektion der Leber ableiten. Im Gegensatz zur Präkonditionierung beschreibt das Phänomen der Postkonditionierung die

Applikation von Pharmaka erst in der Phase der Gewebereperfusion, um die gewebeschädigenden Auswirkungen einer Ischämie zu reduzieren (PENNA et al. 2006). Da eine exakte zeitliche Limitierung der pharmakologischen Massnahmen in der Postreperfusionphase – im Gegensatz zur Präkonditionierung – nicht gefordert werden muss, könnten gleich mehrere pharmakologische Konzepte, gegebenenfalls in Kombination miteinander, zur Anwendung kommen, die vor allem die Abschwächung der Entzündungsreaktionen in der Leber dämpfen und somit den postischämischen Schaden reduzieren sollen. Inwieweit sich derartige durch volatile Anästhetika induzierbare Mechanismen beispielsweise durch exogenes Adenosin auf eine synergistische Weise potenzieren lassen, kann erst durch zukünftige Studien beantwortet werden.

Vielversprechend in dieser Hinsicht ist die Beobachtung, dass die Aktivierung des Adenosin-A<sub>2A</sub>-Rezeptor-Signalweges über die Wirkung einer Präkonditionierung hinaus auch im Sinne einer Postkonditionierung durch A<sub>2A</sub>-Rezeptor-abhängige, anti-inflammatorisch wirksame Signalwege den Leberschaden nach Ischämie und Reperfusion begrenzen kann (BILZER und GERBES 2003, DAY 2004). Neben der Reduktion des Ausmaßes der Gewebeeinflammation kann die Zufuhr von Adenosin zudem eine beschleunigte Resynthese energiereicher Phosphate ermöglichen und somit die Energiehomöostase unmittelbar verbessern (PALOMBO et al. 1993). Dementsprechend könnte gerade die Kombination von pharmakologischer Präkonditionierung und Postkonditionierung durch Adenosin den erwarteten hepatoprotektiven Effekt verstärken. Aufgrund der hohen klinischen Bedeutung der pharmakologischen Konditionierung wird aktuell in einer kontrollierten, doppelblind-randomisierten klinischen Studie am Klinikum Großhadern am Patienten geprüft, ob natives, zentral-venös appliziertes Adenosin ebenfalls zur Prä- und Postkonditionierung der Leber vor Anwendung des Pringle-Manövers wirksam ist. Erste Ergebnisse einer Pilotstudie zeigen, dass natives, zentral-venös appliziertes Adenosin während Allgemeinanästhesie mit volatilen Anästhetika die postoperative Organfunktion verbessert und eine hyperinflammatorische Reaktion nach Organreperfusion begrenzen kann.

## 6. Ausblick

Es wird das Ziel zukünftiger klinischer Studien sein zu prüfen, ob die pharmakologische Konditionierung, im Sinne eines „multi-drug-regimen“, durch die kombinierte Anwendung von Anästhetika gemeinsam mit Adenosin aufgrund redundanter oder komplementärer Signalwege die Folgen des chirurgischen Traumas und des durch Ischämie und Reperfusion bedingten Stresses reduzieren kann. Sollte sich das Konzept der durch volatile Anästhetika und Purine (Adenosin) vermittelten Hepatoprotektion klinisch als wirksam erweisen, so könnte diese Form der Zytoprotektion auch in anderen Organsystemen zum Vorteil der Patienten sein. Die pharmakologische Konditionierung könnte somit überall dort für den Patienten von Vorteil sein, wo er vor den Folgen von Ischämie und Reperfusion während einer Operationen zu schützen ist. Dies trifft im Besonderen für die Transplantationsmedizin zu.

## Literatur

- ARAI, M., THURMAN, R. G., and LEMASTERS, J. J.: Contribution of adenosine A<sub>2</sub> receptors and cyclic adenosine monophosphate to protective ischemic preconditioning of sinusoidal endothelial cells against storage/reperfusion injury in rat livers. *Hepatology* 32, 297–302 (2000)
- BECK-SCHIMMER, B., BREITENSTEIN, S., URECH, S., DE CONNO, E., WITTLINGER, M., PUHAN, M., JOCHUM, W., SPAHN, D. R., GRAF, R., and CLAVIEN, P. A.: A randomized controlled trial on pharmacological preconditioning in liver surgery using a volatile anesthetic. *Ann. Surg.* 248/6, 909–918 (2008)
- BELGHITI, J., NOUN, R., MALAFOSSE, R., JAGOT, P., SAUVANET, A., PIERANGELI, F., MARTY, J., and FARGES, O.: Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection: a controlled study. *Ann. Surg.* 229, 369–375 (1999)
- BILZER, M., and GERBES, A. L.: Pivotal role of G-protein-coupled adenosine A<sub>2A</sub> receptors in protection of the liver against inflammation and ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* 36/4, 1009–1011 (2003)
- CARINI, R., AUTELLI, R., BELLOMO, G., DIANZANI, M. U., and ALBANO, E.: Sodium-mediated cell swelling is associated with irreversible damage in isolated hepatocytes exposed to hypoxia or mitochondrial toxins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206, 180–185 (1995)
- CARINI, R., DE CESARIS, M. G., SPLENDORE, R., VAY, D., DOMENICOTTI, C., NITTI, M. P., PAOLA, D., PRONZATO, M. A., and ALBANO, E.: Signal pathway involved in the development of hypoxic preconditioning in rat hepatocytes. *Hepatology* 33, 131–139 (2001)
- CARINI, R., GRAZIA, D. C., SPLENDORE, R., DOMENICOTTI, C., NITTI, M. P., PRONZATO, M. A., and ALBANO, E.: Signal pathway responsible for hepatocyte preconditioning by nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 1047–1055 (2003)
- CARINI, R., GRAZIA, D. C., SPLENDORE, R., BALDANZI, G., NITTI, M. P., ALCHERA, E., FILIGHEDDU, N., DOMENICOTTI, C., PRONZATO, M. A., GRAZIANI, A., and ALBANO, E.: Role of phosphatidylinositol 3-kinase in the development of hepatocyte preconditioning. *Gastroenterology* 127, 914–923 (2004)
- CARRASCO-CHAUMEL, E., ROSELLO-CATAFAU, J., BARTRONS, R., FRANCO-GOU, R., XAUS, C., CASILLAS, A., GELPÍ, E., RODÉS, J., and PERALTA, C.: Adenosine monophosphate-activated protein kinase and nitric oxide in rat steatotic liver transplantation. *J. Hepatol.* 43, 997–1006 (2005)
- CLAVIEN, P. A., SELZNER, M., RUDIGER, H. A., GRAF, R., KADRY, Z., ROUSSON, V., and JOCHUM, W.: A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann. Surg.* 238, 843–850 (2003)
- CHOUKÈR, A., KAUFMANN, I., MARTIGNONI, A., OHTA, A., SCHNERMANN, J., SITKOVSKY, M. V., und THIEL, M.: Hepatoprotektion durch Präkonditionierung: Bedeutung des Adenosin-A<sub>2A</sub> Rezeptors-Systems. *Anästhesie Intensivmedizin* 2008
- CHOUKÈR, A., MARTIGNONI, A., SCHAUER, R., DUGAS, M., RAU, H. G., JAUCH, K. W., PETER, K., and THIEL, M.: Beneficial effects of ischemic preconditioning in patients undergoing hepatectomy: the role of neutrophils. *Arch. Surg.* 140/2, 129–136 (2005a)
- CHOUKÈR, A., MARTIGNONI, A., SCHAUER, R. J., RAU, H. G., VOLK, A., HEIZMANN, O., DUGAS, M., MESSMER, K., PETER, K., and THIEL, M.: Ischemic preconditioning attenuates portal venous plasma concentrations of purines following warm liver ischemia in man. *Eur. Surg. Res.* 37/3, 144–152 (2005b)
- CHOUKÈR, A., MARTIGNONI, A., SCHAUER, R. J., DUGAS, M., SCHACHTNER, T., KAUFMANN, I., SETZER, F., RAU, H. G., LOHE, F., JAUCH, K. W., PETER, K., and THIEL, M.: Alpha-gluthathione S-transferase as an early marker of hepatic ischemia/reperfusion injury after liver resection. *World J. Surg.* 29/4, 528–534 (2005c)
- CHOUKÈR, A., SCHACHTNER, T., SCHAUER, R., DUGAS, M., LOHE, F., MARTIGNONI, A., POLLWEIN, B., NIKLAS, M., RAU, H. G., JAUCH, K. W., PETER, K., and THIEL, M.: Effects of Pringle manoeuvre and ischaemic preconditioning on haemodynamic stability in patients undergoing elective hepatectomy: a randomized trial. *Br. J. Anaesth.* 93/2, 204–211 (2004)
- DAY, Y. J., MARSHALL, M. A., HUANG, L., MCDUFFIE, M. J., OKUSA, M. D., and LINDEN, J.: Protection from ischemic liver injury by activation of A<sub>2A</sub> adenosine receptors during reperfusion: inhibition of chemokine induction. *Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 286/2, G285–G293 (2004)
- DONCKIER, V., LOI, P., CLOSSET, J., NAGY, N., QUERTINMONT, E., LE MOINE, O., DEVIÈRE, J., GOLDMAN, M., GELIN, M., and GIANELLO, P.: Preconditioning of donors with interleukin-10 reduces hepatic ischemia-reperfusion injury after liver transplantation in pigs. *Transplantation* 75, 902–904 (2003)
- FONG, Y.: Surgical therapy of hepatic colorectal metastasis. *CA Cancer J. Clin.* 49, 231–255 (1999)
- HALESTRAP, A. P., CLARKE, S. J., and JAVADOV, S. A.: Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion – a target for cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* 61, 372–385 (2004)

- HAWALESHKA, A., and JACOBSON, E.: Ischaemic preconditioning: mechanisms and potential clinical applications. *Can. J. Anaesth.* 45, 670–682 (1998)
- HOLT, D. R., THIEL, D. V., EDELSTEIN, S., and BREMS, J. J.: Hepatic resections. *Arch. Surg.* 135, 1353–1358 (2000)
- JAESCHKE, H.: Mechanisms of liver injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290, G1083–G1088 (2006)
- JAESCHKE, H., FARHOOD, A., and SMITH, C. W.: Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J.* 4, 3355–3359 (1990)
- JONGE, R. DE, OUT, M., MAAS, W. J., and JONG, J. W. DE: Preconditioning of rat hearts by adenosine A1 or A3 receptor activation. *Eur. J. Pharmacol.* 441, 165–172 (2002)
- JULIER, K., DA SILVA, R., GARCIA, C., BESTMANN, L., FRASCAROLO, P., ZOLLINGER, A., CHASSOT, P. G., SCHMID, E. R., TURINA, M. I., SEGESSER, L. K. VON, PASCH, T., SPAHN, D. R., and ZAUGG, M.: Preconditioning by sevoflurane decreases biochemical markers for myocardial and renal dysfunction in coronary artery bypass graft surgery: a double-blinded, placebo-controlled, multicenter study. *Anesthesiology* 98, 1315–1327 (2003)
- KIEMER, A. K., KULHANEK-HEINZE, S., GERWIG, T., GERBES, A. L., and VOLLMAR, A. M.: Stimulation of p38 MAPK by hormonal preconditioning with atrial natriuretic peptide. *World J. Gastroenterol.* 8, 707–711 (2002)
- KOUBY, D. A., FONG, Y., SURIWINATA, A., GONEN, M., ALLEN, P. J., KLIMSTRA, D. S., DEMATTEO, R. P., D'ANGELICA, M., BLUMGART, L. H., and JARNAGIN, W. R.: Impact of steatosis on perioperative outcome following hepatic resection. *J. Gastrointest. Surg.* 7, 1034–1044 (2003)
- LUCCHINETTI, E., DA SILVA, R., PASCH, T., SCHAUB, M. C., and ZAUGG, M.: Anaesthetic preconditioning but not postconditioning prevents early activation of the deleterious cardiac remodelling programme: evidence of opposing genomic responses in cardioprotection by pre- and postconditioning. *Br. J. Anaesth.* 95, 140–152 (2005)
- MAN, K., FAN, S. T., NG, I. O., LO, C. M., LIU, C. L., and WONG, J.: Prospective evaluation of Pringle maneuver in hepatectomy for liver tumors by a randomized study. *Ann. Surg.* 226, 704–711 (1997)
- MEYER, Z. V., LINK, C., JORNS, A., NAGEL, E., and KOHL, J.: Preconditioning with the prostacyclin analog epoprostenol and cobra venom factor prevents reperfusion injury and hyperacute rejection in discordant liver xenotransplantation. *Xenotransplantation* 8, 41–47 (2001)
- MURRY, C. E., JENNINGS, R. B., and REIMER, K. A.: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74, 1124–1136 (1986)
- NAKAMURA, M., NAKAKIMURA, K., MATSUMOTO, M., and SAKABE, T.: Rapid tolerance to focal cerebral ischemia in rats is attenuated by adenosine A1 receptor antagonist. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 22, 161–170 (2002)
- NAKAYAMA, H., YAMAMOTO, Y., KUME, M., YAMAGAMI, K., YAMAMOTO, H., KIMOTO, S., ISHIKAWA, Y., OZAKI, N., SHIMAHARA, Y., and YAMAOKA, Y.: Pharmacologic stimulation of adenosine A(2) receptor supplants ischemic preconditioning in providing ischemic tolerance in rat livers. *Surgery* 126, 945–954 (1999)
- NILSSON, B., FRIMAN, S., GUSTAFSSON, B. I., and DELBRO, D. S.: Preconditioning protects against ischemia/reperfusion injury of the liver. *J. Gastrointest. Surg.* 4, 44–49 (2000)
- PALOMBO, J. D., BOWERS, J. L., CLOUSE, M. E., MCCULLOUGH, A., FORSE, R. A., and BISTRAN, B. R.: Hepatic utilization of exogenous nucleotide precursors for restoration of ATP after cold ischemia in rats. *Amer. J. Clin. Nutr.* 57/3, 420–427 (1993)
- PARKS, R. W., and GARDEN, O. J.: Liver resection for cancer. *World J. Gastroenterol.* 7, 766–771 (2001)
- PENNA, C., RASTALDO, R., MANCARDI, D., RAIMONDO, S., CAPPELLO, S., GATTULLO, D., LOSANO, G., and PAGLIARO, P.: Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel and protein kinase C activation. *Basic Res. Cardiol.* 101, 180–189 (2006)
- PERALTA, C., BARTONS, R., RIERA, L., MANZANO, A., XAUS, C., GELPÍ, E., and ROSELLÓ-CATAFAU, J.: Hepatic preconditioning preserves energy metabolism during sustained ischemia. *Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279, G163–G171 (2000)
- PRINGLE, J. H.: Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma. 48 ed.; pp. 541–549 (1908)
- REICHEL, M. E., WILLEMS, L., MOLINA, J. G., SUN, C. X., NOBLE, J. C., ASHTON, K. J., SCHNERMANN, J., BLACKBURN, M. R., and HEADRICK, J. P.: Genetic deletion of the A1 adenosine receptor limits myocardial ischemic tolerance. *Circ. Res.* 96, 363–367 (2005)
- SITKOVSKY, M. V., LUKASHEV, D., APASOV, S., and THIEL, M.: Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A(2A) receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 657–682 (2004)
- SMYRNIOTIS, V., ARKADPOULOS, N., KOSTOPANAGIOTOU, G., THEODOROPoulos, T., THEODORAKI, K., FARANTOS, C., KAIRI, E., and PAPHITI, A.: Attenuation of ischemic injury by N-acetylcysteine preconditioning of the liver. *J. Surg. Res.* 129, 31–37 (2005)



- STEPHENSON, K. R., STEINBERG, S. M., HUGHES, K. S., VETTO, J. T., SUGARBAKER, P. H., and CHANG, A. E.: Perioperative blood transfusions are associated with decreased time to recurrence and decreased survival after resection of colorectal liver metastases. *Ann. Surg.* 208, 679–687 (1988)
- STEURER, M., SCHLÄPFER, M., STEURER, M., Z'GRAGGEN, B. R., BOOY, C., REYES, L., SPAHN, D. R., and BECK-SCHIMMER, B.: The volatile anaesthetic sevoflurane attenuates lipopolysaccharide-induced injury in alveolar macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* Nov. 2008 [Epub ahead of print] (2008)
- TESSIER-VETZEL, D., TISSIER, R., WAINTRAUB, X., GHALEH, B., and BERDEAUX, A.: Isoflurane inhaled at the onset of reperfusion potentiates the cardioprotective effect of ischemic postconditioning through a NO-dependent mechanism. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 47, 487–492 (2006)
- THIEL, M., CALDWELL, C. C., and SITKOVSKY, M. V.: The critical role of adenosine A2A receptors in downregulation of inflammation and immunity in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbes Infect.* May 5/6, 515–526 (2003)
- XIA, Z. F., HORTON, J. W., ZHAO, P. Y., BABCOCK, E. E., SHERRY, A. D., and MALLOY, C. R.: Effects of ischemia on intracellular sodium and phosphates in the in vivo rat liver. *J. Appl. Physiol.* 81, 1395–1403 (1996)
- ZAUGG, M., LUCCHINETTI, E., SPAHN, D. R., PASCH, T., and SCHAUB, M. C.: Volatile anesthetics mimic cardiac preconditioning by priming the activation of mitochondrial K(ATP) channels via multiple signaling pathways. *Anesthesiology* 97, 4–14 (2002)
- ZHU, M., FENG, J., LUCCHINETTI, E., FISCHER, G., XU, L., PEDRAZZINI, T., SCHAUB, M. C., and ZAUGG, M.: Ischemic postconditioning protects remodeled myocardium via the PI3K-PKB/Akt reperfusion injury salvage kinase pathway. *Cardiovasc. Res.* 72, 152–162 (2006)

Priv.-Doz. Dr. med. Alexander CHOUKÈR  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Klinikum Großhadern  
Klinik für Anästhesiologie  
Marchioninistraße 15  
81377 München  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 89 7095 6422  
Fax: +49 89 7095 8885  
E-Mail: alexander.chouker@med.uni-muenchen.de

## **Continents under Climate Change**

Konferenz aus Anlass des 200. Gründungsjubiläums der Humboldt-Universität zu Berlin

in Zusammenarbeit mit dem Potsdam-Institut für Klimafolgenforschung (PIK) und der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina

Unter der Schirmherrschaft des Auswärtigen Amtes der Bundesrepublik Deutschland

vom 21. bis 23. April 2010 in Berlin

Nova Acta Leopoldina N. F. Bd. 112, Nr. 384

Herausgegeben von Wilfried ENDLICHER (Berlin) und Friedrich-Wilhelm GERSTENGARBE (Potsdam)

(2010, 320 Seiten, 103 Abbildungen, 17 Tabellen, 25,95 Euro,

ISBN: 978-3-8047-2795-3)

Der Klimawandel gehört zu den drängendsten globalen Problemen unserer Zeit. Die Menschheit steht vor besonderen Herausforderungen, um insbesondere den CO<sub>2</sub>-Ausstoß zu senken. Führende Wissenschaftler aus der Klimaforschung betrachten die Auswirkungen des Klimawandels auf die Kontinente Europa, Asien, Afrika, Amerika und Australien sowie die Polarregionen. Dabei werden neueste Klimadaten unter globalen und regionalen Gesichtspunkten ausgewertet und Simulationsmodelle für zukünftige Entwicklungen diskutiert. Die Ausführungen bieten ein gut fundiertes Bild der Klimaänderungen, die sich weltweit bereits vollziehen bzw. in Zukunft ereignen werden, und untersuchen kritisch die Folgen für Natur, Gesellschaft und Wirtschaft. Der Kongress „Continents under Climate Change“ wurde im Rahmen der 200. Jahrfeier der Humboldt-Universität zu Berlin vom Potsdam-Institut für Klimaforschung und der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina – Nationale Akademie der Wissenschaften veranstaltet. Alle Beiträge sind in englischer Sprache verfasst.

## Präkonditionierung – ein universelles Prinzip?<sup>1</sup>

Berthold BEIN (Kiel)

Mit 8 Abbildungen

### *Zusammenfassung*

*Remote*-Präkonditionierung stellt einen angeborenen, universellen und ubiquitären Schutzmechanismus gegen Organischämie dar. Sie bewirkt – vergleichbar zur ischämischen und Anästhetika-induzierten Präkonditionierung – sowohl tierexperimentell als auch klinisch organprotektive Effekte. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind noch nicht vollständig geklärt. Außer humoralen Mediatoren spielen vermutlich auch neuronale Afferenzen eine Rolle. Auf zellulärer Ebene sind u. a.  $K_{ATP}$ -Kanäle, NO und ROS an der Vermittlung der Protektion beteiligt. Die *Remote*-Präkonditionierung könnte in vielen klinischen Fächern eine vielversprechende Methode zur Organprotektion sein.

### *Abstract*

Remote-preconditioning is an innate, ubiquitous and universal protective mechanism against ischemia, which – comparable to ischemic preconditioning and anaesthetic induced preconditioning – has protective effects on organs. This could be shown in animal experiments as well as clinical studies. The underlying mechanisms have not been fully clarified. Apart from humoral mediators, neuronal afferences are believed to play an important role as well. On cellular level,  $K_{ATP}$  channels, NO, ROS and others are involved in transferring protection. In many clinical areas, remote-preconditioning could be a promising method for protecting organs.

## 1. Einführung

Unter Präkonditionierung versteht man einen Mechanismus, der es einem Organismus durch Anpassungsprozesse nach einer kurzzeitigen, nicht letalen Ischämie ermöglicht, eine darauf folgende, länger dauernde Ischämie besser zu verkraften. Der Organismus erwirbt vorübergehend gewissermaßen eine Immunität gegenüber einer zeitlich begrenzten Ischämie.

Obwohl es sich um einen alten und im Laufe der Evolution gut in vielen Säugetierspezies konservierten Mechanismus handelt, wurde das zugrundeliegende Prinzip erst vor gut 20 Jahren und mehr oder weniger zufällig entdeckt (SCHAPER 1996). Forscher in den Wellcome-Laboratorien in den USA hatten beobachtet, dass geleerte ATP-Speicher nur sehr langsam wieder aufgefüllt werden. Daher vermuteten sie, dass auch einige kurze ischämische Phasen mit anschließender Reperfusion ausreichen müssten, um die zellulären ATP-Speicher völlig

---

<sup>1</sup> Vortrag anlässlich des Symposiums „Präkonditionierung durch Anästhetika“ der Deutschen Gesellschaft der Naturforscher Leopoldina an der Johann-Wolfgang-von-Goethe-Universität Frankfurt am Main, 14. November 2008.

aufzubrechen. Dies war jedoch nicht der Fall. Der ATP-Gehalt nahm nach der zweiten kurzen Ischämie nicht mehr ab. MURRY und REIMER hatten die Idee, dass folgerichtig auch das Infarktareal nach anschließender, längerdauernder Ischämie geringer sein müsste als ohne die sogenannte Präkonditionierung. In einem klassischen Versuch an Hunden überprüften sie diese Hypothese (MURRY et al. 1986). Die Präkonditionierung wurde durch 4 je 5-minütige ischämische Phasen (Ligatur des Ramus interventricularis anterior, RIVA) mit anschließender Reperfusion durchgeführt. Endpunkt der Untersuchung war u. a. das Infarktareal in Prozent des Risikoareals. Bei den präkonditionierten Tieren war das Infarktareal signifikant kleiner als bei den Kontrolltieren. Das Prinzip der Präkonditionierung war erstmals im Tiermodell erfolgreich nachgewiesen worden.

## 2. Kardiale *Remote*-Präkonditionierung

Im Zuge der Aufklärung der der Präkonditionierung zugrundeliegenden Mechanismen war schon früh die Frage aufgetaucht, ob ischämisches Gewebe während der präkonditionierenden Ischämie humorale Faktoren freisetzt, die während der Reperfusion mit dem Blutstrom zu entfernteren Geweben gelangen und dort ebenfalls eine Protektion bewirken könnten. Diese sogenannte *Remote*-Präkonditionierung oder Fern-Präkonditionierung wurde erstmals 1993 im Tiermodell untersucht (PRZYKLENK et al. 1993). Bei 8 Hunden wurde der Ramus circumflexus mit 4 je 5-minütigen Zyklen ischämisch präkonditioniert, 10 Hunde dienten als Kontrolle. Anschließend wurde ein anderes koronares Versorgungsgebiet einer 40-minütigen Ischämie ausgesetzt. In den Tieren mit *Remote*-Präkonditionierung zeigte sich ein deutlich kleineres Infarktareal in Prozent des Risikoareals. Damit war erstmals die Existenz einer *Remote*-Präkonditionierung nachgewiesen worden. Der erste Nachweis einer organübergreifenden *Remote*-Präkonditionierung erfolgte einige Jahre später bei Ratten, die vor einer 60-minütigen Koronarischämie einer 15-minütigen Ligatur der A. mesenterica superior unterzogen worden waren (GHO et al. 1996). Bei den Tieren mit vorhergehender Darmischämie war das Myokardinfarktareal signifikant kleiner als bei den Kontrolltieren ohne Darmischämie (Abb. 1). Interessanter Weise fehlte der protektive Effekt der Darmischämie, wenn die A. mesenterica superior während des gesamten Versuchsprotokolls ligiert wurde, also keine Reperfusion des ischämischen Darmes zugelassen wurde.

## 3. Zerebrale *Remote*-Präkonditionierung

Diese ermutigenden Ergebnisse führten zu einem gesteigerten Interesse an der *Remote*-Präkonditionierung zur Protektion eines Organs, dass auf Ischämie besonders empfindlich reagiert: des Gehirns. Kürzlich konnte ebenfalls bei Ratten gezeigt werden, dass durch wiederholte Ligatur eines Hinterlaufs, jeweils gefolgt von einer Reperusionsphase, das Infarktareal nach Ligatur der A. cerebri media je nach Präkonditionierungsprotokoll um bis zu 40% geringer war als bei den Kontrolltieren (49% vs. 10%) (REN et al. 2008) (Abb. 2). Das Ausmaß der Protektion war dabei vom gewählten Präkonditionierungsprotokoll abhängig. Am effektivsten in dieser Untersuchung war eine Präkonditionierung mit 3 je 15-minütigen Ischämien, gefolgt von einer ebenso langen Reperusionsphase.

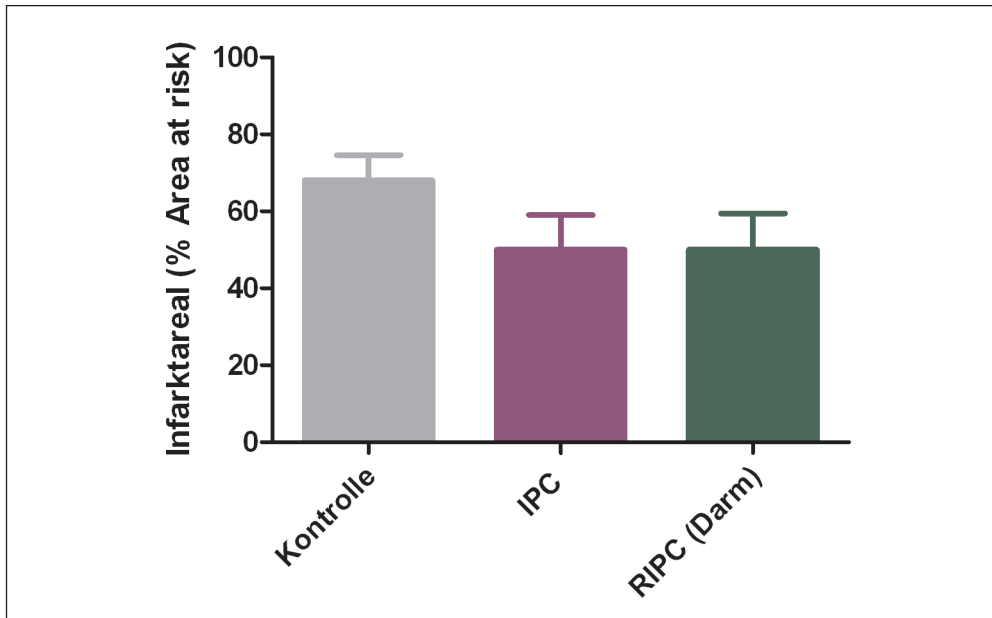


Abb. 1 Effektivität der *Remote*-Präkonditionierung (RIPC) durch vorübergehende Ischämie des Dünndarmes. Das Infarktareal (in Prozent der *Area at risk*, AAR) nach anschließender Koronarischämie ist signifikant vermindert. Die RIPC ist dabei genauso effektiv wie die klassische ischämische Präkonditionierung durch kurzzeitige Koronarischämie (IPC). Modifiziert nach GHO et al. 1996.

#### 4. Mögliche Mechanismen

Im Wesentlichen existieren derzeit drei Hypothesen, wie die Protektion durch *Remote*-Präkonditionierung auf Organebene vermittelt wird. Dabei sind humorale Mediatoren, die mit dem Blutstrom aus dem präkonditionierten Organ zu entfernt liegenden Organen transportiert werden, neuronale Efferenzen und schließlich die Induktion einer systemischen Entzündungsreaktion als auslösende Mechanismen diskutiert worden (HAUSENLOY und YELLON 2008) (Abb. 3).

##### 4.1 Humorale Mediatoren

Ein klassisches Experiment, das die Existenz eines oder mehrerer, humoraler Faktoren für die Übertragung des präkonditionierenden Stimulus nahelegte, wurde von KONSTANTINOV et al. (2005) an Schweinen nach Herztransplantation durchgeführt. Bei den Tieren wurde eine *Remote*-Präkonditionierung durch 4 5-minütige Ischämien des Hinterlaufs erzeugt. Anschließend erhielten die Schweine das denervierte Herz eines Spendertieres transplantiert. Bei diesem transplantierten Organ wurde dann ein Myokardinfarkt durch Ligatur des RIVA erzeugt. Bei den präkonditionierten Tieren war das Infarktareal signifikant kleiner als bei den Kontrolltieren (Abb. 4). Der protektive Effekt der *Remote*-Präkonditionierung konnte durch Blockade der ATP-abhängigen Kalium-Kanäle komplett aufgehoben werden, was eine Beteiligung dieser Kanäle an der intrazellulären Vermittlung der Protektion nahelegt.

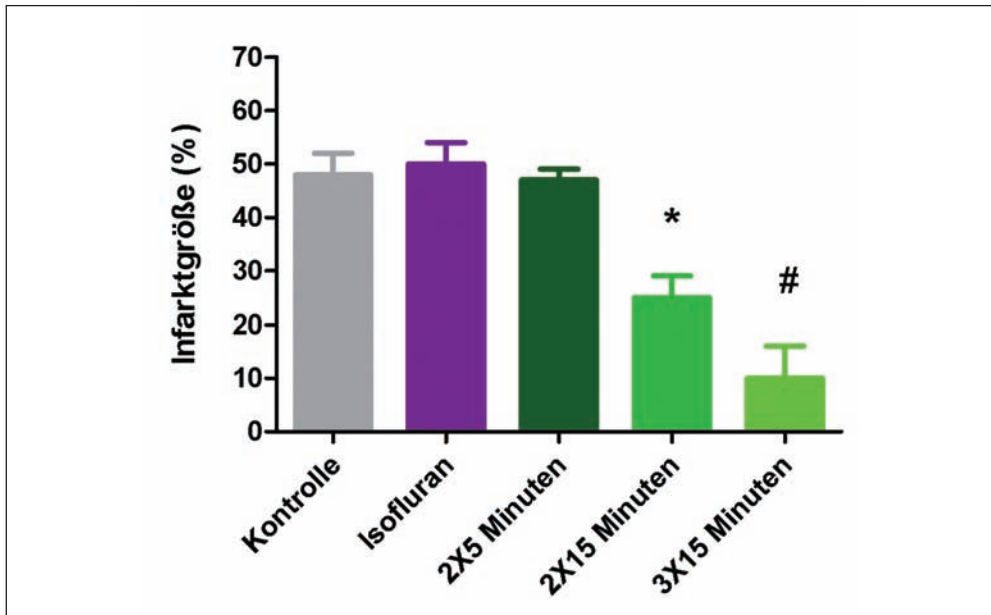


Abb. 2 Zerebrale *Remote*-Präkonditionierung. Nach kurzzeitiger Ischämie eines Hinterlaufes ist der Hirninfarkt nach Ligatur der A. cerebri media – abhängig vom gewählten Präkonditionierungsprotokoll – signifikant kleiner als bei den Kontrolltieren. Modifiziert nach REN et al. 2008.

Ein weiterer Versuch an neonatalen Kaninchenherzen in Langendorff-Präparation unterstützte die Hypothese eines humoral übertragenen, protektiven Agens (WANG 2008). Die Herzen wurden mit Blut von zuvor *Remote*-präkonditionierten Tieren oder Kontrolltieren perfundiert. Anschließend wurden die Herzen einem einstündigen, kardioplegischen Herzstillstand unterzogen und nach Beendigung des Versuchs Funktion und strukturelle Integrität der Mitochondrien untersucht. Bei den mit dem Blut präkonditionierter Kaninchen perfundierten Herzen zeigten sich eine erhaltene Integrität der äußeren Mitochondrienmembran und eine erhaltene Funktion der Atmungskette. Außerdem war die Kontraktilität dieser Herzen signifikant besser als die der Kontrollorgane.

#### 4.2 Neuronale Efferenzen

Im Gegensatz dazu lassen zwei andere Studien zum Mechanismus der *Remote*-Präkonditionierung einen wichtigen Anteil neuronaler Efferenzen vermuten.

In der zuvor schon zitierten Untersuchung, die erstmals eine *Remote*-Präkonditionierung ausgelöst durch eine vorausgehende Darmischämie zeigen konnte, ließ sich der protektive Effekt der Darmischämie durch Gabe eines Ganglienblockers vollständig aufheben (GHO 1996). Dies deutet auf eine Rolle autonomer Ganglien bei der Signaltransduktion hin, zumal die ischämische Präkonditionierung am Herzen direkt durch den Ganglienblocker nicht reversiert werden konnte.

DING et al. (2001) untersuchten bei Kaninchen den protektiven Effekt einer renalen Ischämie auf das Infarktareal nach anschließender Koronarischämie und beobachteten eine

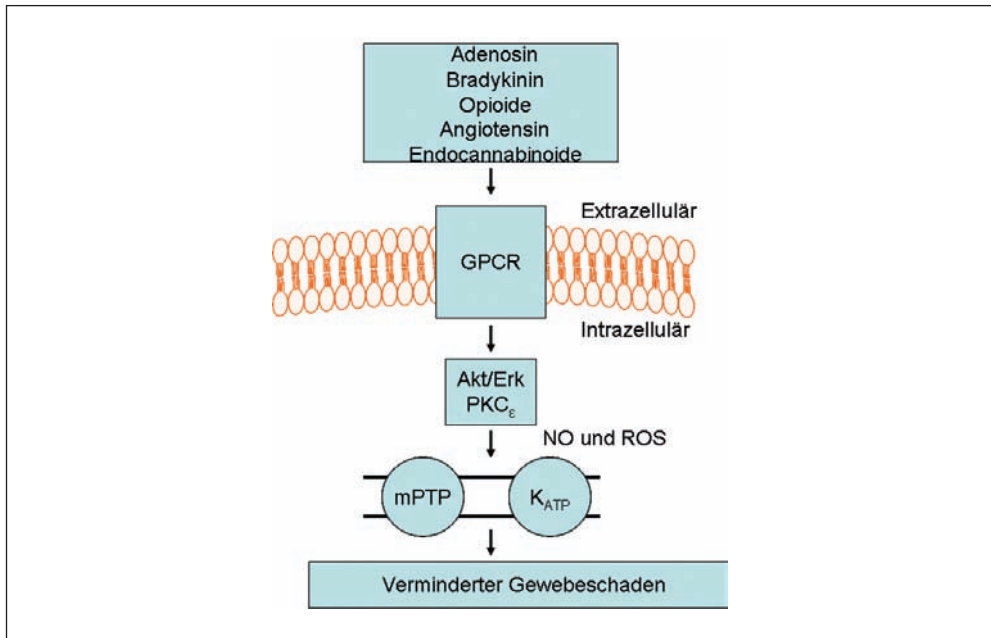


Abb. 3 Möglicher Mechanismus zur Vermittlung des präkonditionierenden Stimulus im entfernt liegenden Gewebe. Mediatoren wie Adenosin oder andere Substanzen lösen über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) intrazelluläre Anpassungsprozesse aus. In die weitere Signalkaskade sind u. a. Kinasen wie Akt und Erk sowie die Proteinkinase C $\epsilon$  involviert, ebenso wie NO und reaktive Sauerstoffradikale (ROS).

Den Endeffektor auf zellulärer Ebene stellen wahrscheinlich im Mitochondrium ein die mitochondriale Permeabilität regulierender Kanal (*mitochondrial permeability transition pore*, mPTP) und ATP abhängige Kalium-Kanäle dar (K<sub>ATP</sub>). Eine geringere Öffnungswahrscheinlichkeit der mPTP führt zu einer erhaltenen Integrität der mitochondrialen Atmungskette, während die Aktivierung der ATP-abhängigen Kalium-Kanäle u. a. zu einer Hyperpolarisation der Zelle und einem verkürzten Aktionspotential führt. Einzelheiten siehe Text. Modifiziert nach (HAUSENLOY und YELLON 2008).

signifikante Reduktion des Infarktes in den präkonditionierten Tieren. Dieser Effekt konnte komplett durch eine Durchtrennung des die Niere versorgenden Nervengeflechts aufgehoben werden. Funktionelles Korrelat dieser neural vermittelten Protektion war eine während der Ischämie signifikant erhöhte Impulsrate renaler Afferenzen. Applikation eines Adenosin-Antagonisten reduzierte die Impulsrate, was auf eine Aktivierung der renalen Afferenzen durch lokal freigesetztes Adenosin hindeutet (Abb. 5). Diese Befunde könnten insofern erklären, dass sowohl humorale Mediatoren (apokrin oder systemisch wirksam) als auch nervale Afferenzen eine Rolle bei der *Remote*-Präkonditionierung spielen. Möglicherweise sind hier auch Unterschiede zwischen den verwendeten Versuchstierspezies oder den untersuchten Organsystemen von Bedeutung.

#### 4.3 Systemische Entzündungsreaktion

Einige Studien legen nahe, dass eine Modulation der systemischen Inflammationsreaktion an der Vermittlung protektiver Effekte der *Remote*-Präkonditionierung beteiligt ist. Beispielsweise konnte in gesunden Probanden gezeigt werden, dass durch eine Unterarmischämie die

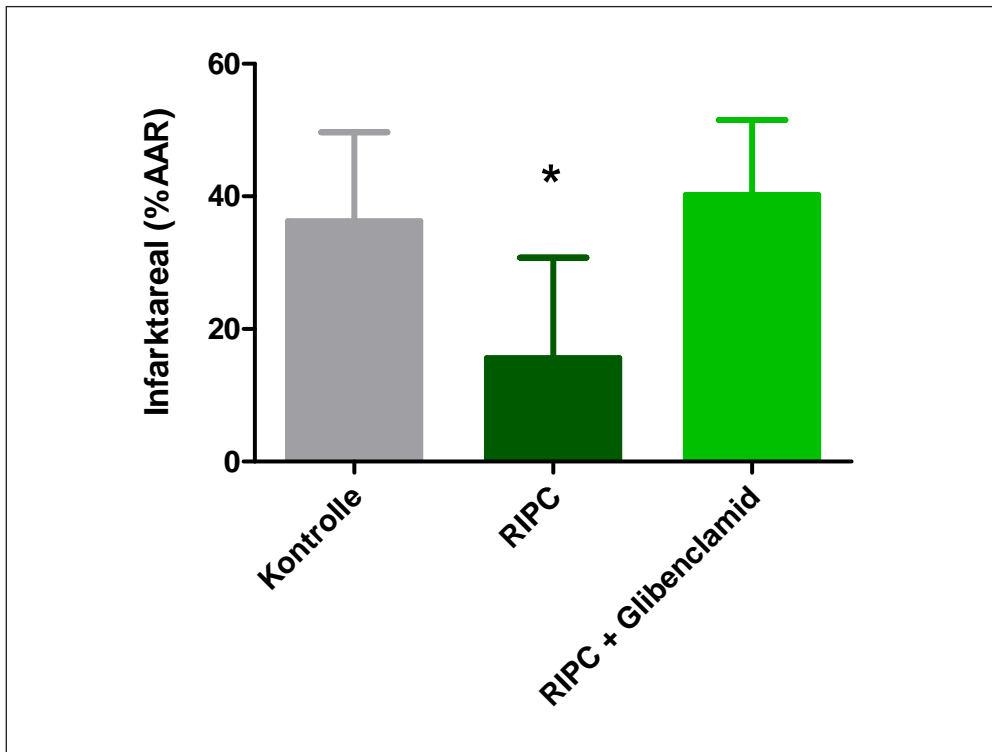


Abb. 4 Klassisches Experiment zum Nachweis einer überwiegend humoral vermittelten *Remote*-Präkonditionierung (RIPC). Bei Schweinen nach Transplantation eines denervierten Spenderherzens wurde eine Koronarschämie induziert. Bei den präkonditionierten Tieren war das Infarktareal (in Prozent der *Area at risk*, AAR) signifikant kleiner als bei den Kontrolltieren. Dieser Effekt konnte durch Blockade der  $K_{ATP}$ -Kanäle durch das Antidiabetikum Glibenclamid komplett aufgehoben werden. Modifiziert nach KONSTANTINOV et al. 2005.

Expression proinflammatorischer Gene in Leukozyten signifikant unterdrückt wird. Innerhalb von 15 min nach dem präkonditionierenden Stimulus war die Transkription von Genen, die bei der Zytokinsynthese, bei der Chemotaxis, der Adhäsion und der Migration von Leukozyten bzw. der Apoptose eine Rolle spielen, deutlich vermindert (KONSTANTINOV et al. 2004). Allerdings sind bislang nur wenige Untersuchungen verfügbar, die auf die Inflammasreaktion nach *Remote*-Präkonditionierung fokussieren.

## 5. Molekulare Mechanismen

Im Gegensatz zur ischämischen und Anästhetika induzierten Präkonditionierung sind die molekularen Mechanismen der *Remote*-Präkonditionierung noch nicht so gut untersucht. Wesentliche Faktoren, die bei der ischämischen Präkonditionierung eine Rolle spielen, nämlich ATP-sensitive Kalium-Kanäle ( $K_{ATP}$ ), Stickstoffmonoxid (NO) und reaktive Sauerstoffradikale (ROS), sind vermutlich auch an der *Remote*-Präkonditionierung beteiligt (HAUSENLOY und YELLON 2008). In einer aktuellen Untersuchung an Ratten wurde das Herz durch eine 15-mi-



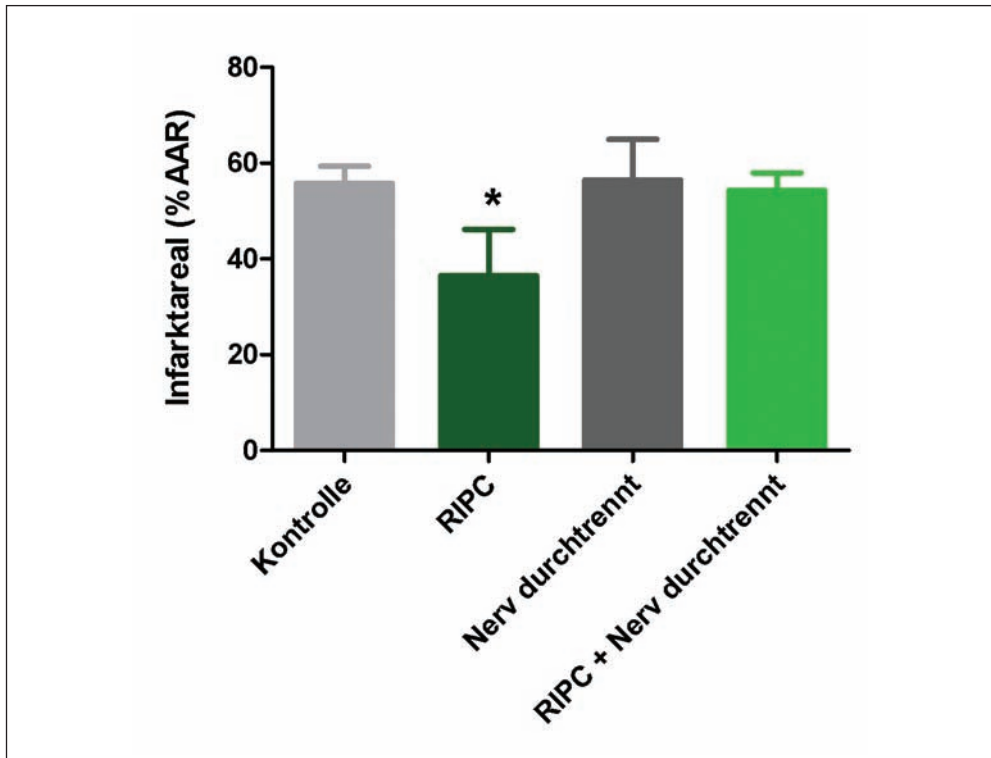


Abb. 5 Einfluss einer Durchtrennung des die Niere versorgenden Nervengeflechts auf die Effektivität der *Remote*-Präkonditionierung (RIPC). Bei Ratten wurde vor Koronarischämie eine Ligatur der Nierenarterie durchgeführt. RIPC führte zu einer signifikanten Verkleinerung des Myokardinfarktareals (in Prozent der *Area at risk*, AAR). Dieser Effekt konnte durch Durchtrennung des renalen Nervenplexus komplett aufgehoben werden. Modifiziert nach DING et al. 2001.

nütige Okklusion beider Aa. femorales präkonditioniert und anschließend einer 30-minütigen Koronarischämie ausgesetzt (SHAHID et al. 2008). Wie schon in anderen Untersuchungen führten sowohl die Präkonditionierung als auch die Infusion des NO-Donators L-Arginin bzw. des  $K_{ATP}$ -Aktivators Diazoxid zu einer signifikanten Verminderung des Infarktareals und des myokardialen Zellschadens und verbesserten ebenfalls signifikant die myokardiale Funktion nach Reperfusion (Abb. 6A und B). Diese Effekte konnten jedoch durch Hemmstoffe der NO-Produktion (L-NAME) und der ROS-Produktion (N-Acetyl-Cystein, NAC) aufgehoben werden. Außerdem bewirkte auch die Gabe des  $K_{ATP}$ -Blockers 5-HD und des Radikalfängers NAC einen Verlust der Protektion. Diese Befunde legen nahe, dass die *Remote*-Präkonditionierung durch eine Kombination aus erhöhter NO-Synthese, Öffnen von  $K_{ATP}$ -Kanälen und gesteigerter ROS-Produktion auf zellulärer Ebene vermittelt wird. Dabei scheint NO am Beginn der Signalkaskade zu stehen, indem es die mitochondrialen  $K_{ATP}$ -Kanäle aktiviert, wodurch wiederum die Produktion von ROS hochreguliert wird. Zahlreiche weitere experimentelle Befunde legen nahe, dass der Endeffektor für die frühe Protektion  $K_{ATP}$ -Kanäle sind (LOUKOGEORGAKIS et al. 2007). Diese bewirken eine Hyperpolarisation der Zelle, eine verkürzte Aktionspotential und verhindern eine Calcium-Überflutung der Zelle. Vergleichbar

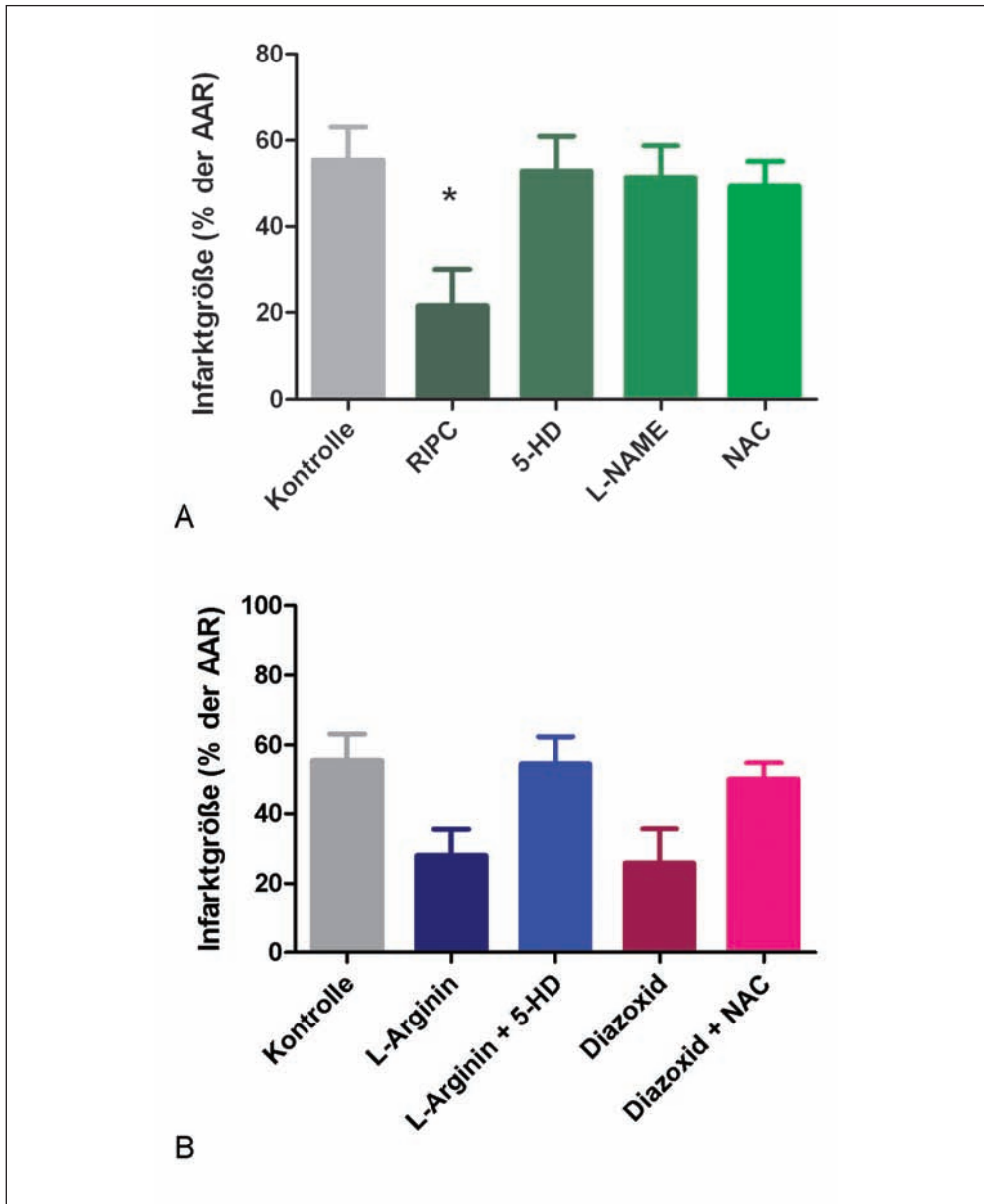


Abb. 6 Mögliche intrazelluläre Mediatoren und Signalkaskaden bei *Remote*-Präkonditionierung (RIPC) im Rattenexperiment. RIPC vor Koronarischämie wurde durch Ischämie der A. femoralis induziert. Das Infarktareal (in Prozent der *Area at risk*, AAR) war nach RIPC signifikant reduziert. Dieser protektive Effekt konnte durch Blockade der  $K_{ATP}$ -Kanäle (5-HD) und der NO-Produktion (L-NAME) bzw. Radikalfänger (NAC) aufgehoben werden (A). Wahrscheinlich ist dabei die NO-Produktion der Aktivierung der  $K_{ATP}$ -Kanäle vorgeschaltet, da eine Blockade der  $K_{ATP}$ -Kanäle den protektiven Effekt der L-Arginin induzierten NO-Produktion aufhebt. Die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) wiederum scheint der Aktivierung der  $K_{ATP}$ -Kanäle nachgeschaltet zu sein, da der Radikalfänger NAC die Protektion durch direkte Aktivierung dieser Kanäle (via Diazoxid) aufheben kann (B). Modifiziert nach SHAHID et al. 2008.

mit der klassischen ischämischen und auch der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung konnte auch bei der *Remote*-Präkonditionierung ein frühes Zeitfenster (effektiv nach Minuten bis zu Stunden nach dem Stimulus) und ein zweites, spätes Zeitfenster (effektiv 12 bis 48 h nach Präkonditionierung) nachgewiesen werden (LOUKOGEORGAKIS et al. 2005).

## 6. Klinische Studien

Trotz dieser ermutigenden, tierexperimentellen Befunde dauerte es relativ lange, bis das Prinzip der *Remote*-Präkonditionierung auch in klinischen Studien untersucht wurde, und bislang sind nur wenige Studien zum Thema *Remote*-Präkonditionierung publiziert worden. Eine der ersten Untersuchungen beschäftigte sich mit dem Zeitfenster und dem zugrundeliegenden Mechanismus einer *Remote*-Präkonditionierung im Gefäßsystem (LOUKOGEORGAKIS et al. 2005). Bei gesunden Probanden wurde ein Endothelschaden durch 20-minütige Ischämie eines Armes induziert. Die *Remote*-Präkonditionierung erfolgte durch 3 je 5-minütige Zyklen von Ischämie und Reperfusion am kontralateralen Arm zu verschiedenen Zeitpunkten vor dieser Armischämie. Anschließend wurde bei den Probanden durch erneute Ischämie eine reaktive Hyperämie provoziert. Endpunkt der Studie war das Ausmaß der während der Hyperämie induzierten Gefäßdilatation, wobei ischämisch geschädigtes Endothel in der Regel eine signifikant geringere Dilatation zeigt. Während bei den Kontrollversuchen eine signifikante Abnahme der Gefäßdilatation auftrat, war sie nach Präkonditionierung uneingeschränkt nachweisbar. Interessanter Weise konnte dieser protektive Effekt durch gleichzeitige Infusion eines Ganglienblockers aufgehoben werden, was auf eine Beteiligung des autonomen Nervensystems an der Vermittlung der Protektion hindeutet.

Die erste Untersuchung an Patienten schloss Kinder zur Korrektur eines angeborenen Herzfehlers ein, bei denen eine *Remote*-Präkonditionierung durch 4 je 5-minütige Zyklen von Ischämie und Reperfusion eines Beines induziert wurde (CHEUNG 2006). Postoperativ zeigten sich geringere Serumkonzentrationen von Troponin I und ein verminderter Bedarf an inotropen Pharmaka bei den präkonditionierten Kindern.

Eine britische Gruppe publiziert 2007 die Ergebnisse einer Pilotstudie an 57 Patienten, die sich einer aortokoronaren Bypassoperation unterziehen mussten (HAUSENLOY et al. 2007). Die Patienten wurden randomisiert und einfach geblindet entweder einer *Remote*-Präkonditionierung mit einer handelsüblichen Blutdruckmanschette am Oberarm unterzogen (jeweils 3 5-minütige Intervalle von einer 5-minütigen Reperfusion unterbrochen) oder erhielten die Blutdruckmanschette als Kontrolle angelegt, ohne sie aufzublasen. Endpunkt war der myokardiale Zellschaden bis 72 h postoperativ. Bei der Untersuchung des myokardialen Zellschadens zeigte sich eine signifikant geringere Serumkonzentration von Troponin T bis zu 48 h postoperativ bei den Patienten, die einer *Remote*-Präkonditionierung unterzogen worden waren (Abb. 7). Im Hinblick auf die simple Intervention ein überraschendes und ermutigendes Ergebnis.

Außerhalb der Kardiochirurgie ist derzeit nur eine Untersuchung an Patienten zur Korrektur eines Bauchaortenaneurysmas verfügbar (ALI et al. 2007). 82 Patienten wurden entweder mittels zweimaliger 10-minütiger Ischämie der A. iliaca communis, gefolgt von einer ebenso langen Reperfusion, präkonditioniert oder der Kontrollgruppe zugewiesen.

*Remote*-Präkonditionierung verminderte postoperativ signifikant die Häufigkeit eines myokardialen Zellschadens um 27 %, von Myokardinfarkten um 22 % und von Niereninsuf-

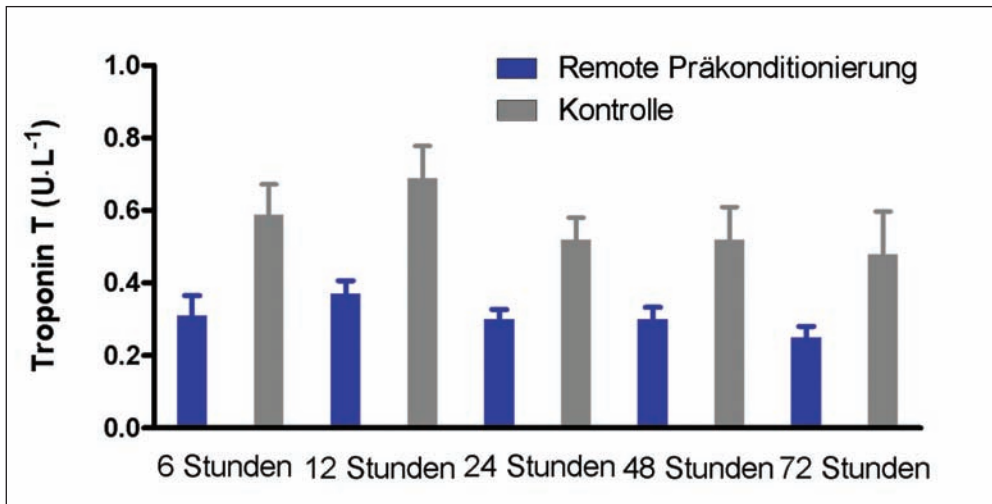


Abb. 7 Remote-Präkonditionierung (RIPC) bei herzchirurgischen Patienten. Die Serumkonzentration von Troponin T war bei den präkonditionierten Patienten bis 48 h signifikant niedriger als bei den Kontrollpatienten. Modifiziert nach HAUSENLOY et al. 2007.

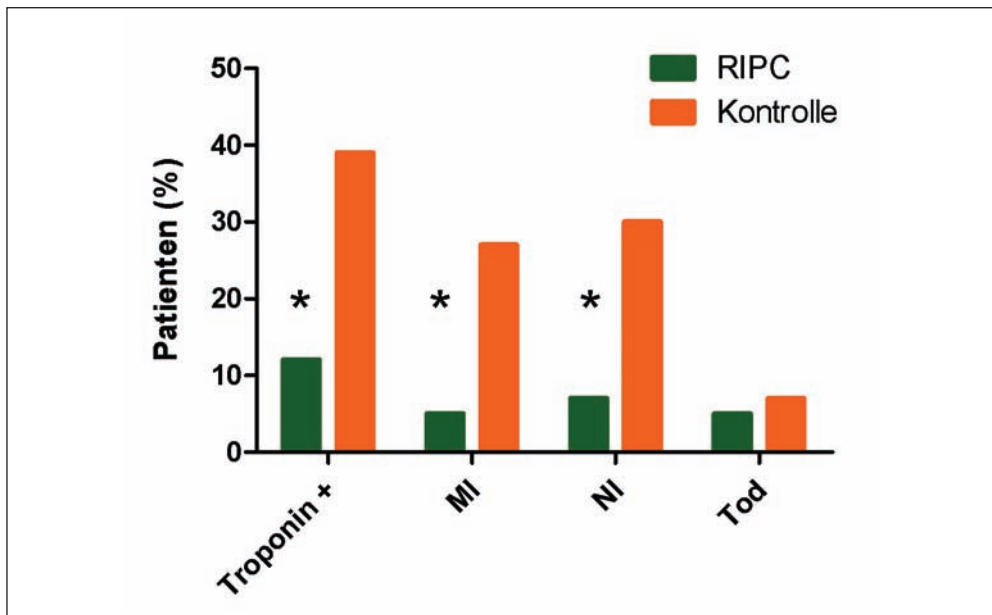


Abb. 8 Remote-Präkonditionierung (RIPC) bei gefäßchirurgischen Patienten. Bei den präkonditionierten Patienten war die Inzidenz eines myokardialen Zellschadens (Troponin I positiv), eines Myokardinfarktes (MI) und einer Niereninsuffizienz (NI) signifikant vermindert. Modifiziert nach ALI et al. 2007.

fizienz um 23 % (Abb. 8). Nebenwirkungen des Präkonditionierungsprotokolls an der betroffenen Extremität konnten dabei nicht beobachtet werden.

## 7. Zusammenfassung und Ausblick

Die Effektivität der *Remote*-Präkonditionierung ist sowohl experimentell als auch klinisch mehrfach nachgewiesen worden. Allerdings ist die Datenlage – insbesondere im Hinblick auf die Zahl der bislang publizierten klinischen Studien – noch nicht sonderlich belastbar. Weitere Untersuchungen zum Thema sind daher notwendig. Weiterhin bleibt zu klären, ob die vorübergehende Ischämie eines entfernten Organs protektive Effekte nur vor der definitiven Ischämie des Zielorgans hat (klassische Präkonditionierung) oder ob auch eine Ischämie während bzw. nach der Ischämie des Zielorgans (*Remote*-Postkonditionierung) gleichermaßen effektiv ist. Eine erste tierexperimentelle Untersuchung zu diesem Thema wurde von ANDREKA et al. (2007) an Schweinen durchgeführt. Bei den Tieren wurde im Anschluss an eine 90-minütige Koronarischämie eine Postkonditionierung mittels 4 je 5-minütiger Zyklen von Ischämie und Reperfusion eines Hinterlaufs durchgeführt. Die postkonditionierten Tiere zeigten ein geringeres Infarktareal und einen geringeren myokardialen Zellschaden im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die Möglichkeit einer effektiven *Remote*-Postkonditionierung eröffnet im klinischen Alltag (akutes Koronarsyndrom, TIA, Apoplex) eine Reihe vielversprechender, therapeutischer Optionen. Auch hier sind weitere Untersuchungen dringend erforderlich.

## Literatur

- ALI, Z. A., CALLAGHAN, C. J., LIM, E., ALI, A. A., NOURAEI, S. A., AKTHAR, A. M., BOYLE, J. R., VARTY, K., KHARBANDA, R. K., DUTKA, D. P., and GAUNT, M. E.: Remote ischemic preconditioning reduces myocardial and renal injury after elective abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trial. *Circulation* 116, 198–205 (2007)
- ANDREKA, G., VERTESALJAI, M., SZANTHO, G., FONT, G., PIROTH, Z., FONTOS, G., JUHASZ, E. D., SZEKELY, L., SZELID, Z., TURNER, M. S., ASHRAFIAN, H., FRENNEAUX, M. P., and ANDREKA, P.: Remote ischaemic postconditioning protects the heart during acute myocardial infarction in pigs. *Heart* 93, 749–752 (2007)
- CHEUNG, M. M., KHARBANDA, R. K., KONSTANTINOV, I. E., SHIMIZU, M., FRNDOVA, H., LI, J., HOLTBY, H. M., COX, P. N., SMALLHORN, J. F., VAN ARSDELL, G. S., and REDINGTON, A. N.: Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: first clinical application in humans. *J. Amer. Coll. Cardiol.* 47, 2277–2282 (2006)
- DING, Y. F., ZHANG, M. M., and HE, R. R.: Role of renal nerve in cardioprotection provided by renal ischemic preconditioning in anesthetized rabbits. *Sheng Li Xue Bao* 53, 7–12 (2001)
- GHO, B. C., SCHOEMAKER, R. G., VAN DEN DOEL, M. A., DUNCKER, D. J., and VERDOUW, P. D.: Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation* 94, 2193–2200 (1996)
- HAUSENLOY, D. J., MWAMURE, P. K., VENUGOPAL, V., HARRIS, J., BARNARD, M., GRUNDY, E., ASHLEY, E., VICHARE, S., DI SALVO, C., KOLVEKAR, S., HAYWARD, M., KEOGH, B., MACALLISTER, R. J., and YELLON, D. M.: Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial. *Lancet* 370, 575–579 (2007)
- HAUSENLOY, D. J., and YELLON, D. M.: Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc. Res.* 79, 377–386 (2008)
- KONSTANTINOV, I. E., ARAB, S., KHARBANDA, R. K., LI, J., CHEUNG, M. M., CHEREPANOV, V., DOWNEY, G. P., LIU, P. P., CUKERMAN, E., COLES, J. G., and REDINGTON, A. N.: The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. *Physiol. Genomics* 19, 143–150 (2004)
- KONSTANTINOV, I. E., LI, J., CHEUNG, M. M., SHIMIZU, M., STOKOE, J., KHARBANDA, R. K., and REDINGTON, A. N.: Remote ischemic preconditioning of the recipient reduces myocardial ischemia-reperfusion injury of the denervated donor heart via a Katp channel-dependent mechanism. *Transplantation* 79, 1691–1695 (2005)

- LOUKOGEORGAKIS, S. P., PANAGIOTIDOU, A. T., BROADHEAD, M. W., DONALD, A., DEANFIELD, J. E., and MACALLISTER, R. J.: Remote ischemic preconditioning provides early and late protection against endothelial ischemia-reperfusion injury in humans: role of the autonomic nervous system. *J. Amer. Coll. Cardiol.* *46*, 450–456 (2005)
- LOUKOGEORGAKIS, S. P., WILLIAMS, R., PANAGIOTIDOU, A. T., KOLVEKAR, S. K., DONALD, A., COLE, T. J., YELLON, D. M., DEANFIELD, J. E., and MACALLISTER, R. J.: Transient limb ischemia induces remote preconditioning and remote postconditioning in humans by a K(ATP)-channel dependent mechanism. *Circulation* *116*, 1386–1395 (2007)
- MURRY, C. E., JENNINGS, R. B., and REIMER, K. A.: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* *74*, 1124–1136 (1986)
- PRZYKLENK, K., BAUER, B., OVIZE, M., KLONER, R. A., and WHITTAKER, P.: Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* *87*, 893–899 (1993)
- REN, C., GAO, X., STEINBERG, G. K., and ZHAO, H.: Limb remote-preconditioning protects against focal ischemia in rats and contradicts the dogma of therapeutic time windows for preconditioning. *Neuroscience* *151*, 1099–1103 (2008)
- SCHAPER, W.: Ischemic preconditioning, remembrances of things past and future. *Basic Res. Cardiol.* *91*, 8–11 (1996)
- SHAHID, M., TAUSEEF, M., SHARMA, K. K., and FAHIM, M.: Brief femoral artery ischaemia provides protection against myocardial ischaemia-reperfusion injury in rats: the possible mechanisms. *Exp. Physiol.* *93*, 954–968 (2008)
- WANG, L., OKA, N., TROPAK, M., CALLAHAN, J., LEE, J., WILSON, G., REDINGTON, A., and CALDARONE, C. A.: Remote ischemic preconditioning elaborates a transferable blood-borne effector that protects mitochondrial structure and function and preserves myocardial performance after neonatal cardioplegic arrest. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* *136*, 335–342 (2008)

Priv.-Doz. Dr. med. Berthold BEIN, DEAA  
Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin  
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
Schwanenweg 21  
24105 Kiel  
Bundesrepublik Deutschland  
Tel.: +49 431 5972991  
Fax: +49 431 5973002  
E-Mail: bein@anaesthesie.uni-kiel.de



**ISSN: 0369-5034**  
**ISBN: 978-3-8047-2794-6**