

セボフルランによるプレコンディショニングおよびポストコンディショニング  
が心筋虚血再灌流障害に及ぼす影響

ランニングタイトル

セボフルランによるプレコンディショニングおよびポストコンディショニング  
の検討

神奈川歯科大学麻酔科学講座

板倉紹子 今泉うの 油井仁 古屋宗孝 有坂博史 吉田和市

**Key-words : ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY, MYOCARDIAL  
PROTECTION, PRECONDITIONING, POSTCONDITIONING,  
SEVOFLURANE**

【要約】 近年，セボフルランによるプレコンディショニングやポストコンディショニングが心筋虚血再灌流後の心筋梗塞サイズを減少させることが明らかにされている．しかしセボフルランによるプレコンディショニングとポストコンディショニングを併用した場合の心筋保護効果がさらに増強するか否かは十分に検討がなされていない．

本研究では，*in vivo* ウサギ心筋虚血再灌流モデルを用い，セボフルランによるプレコンディショニングおよびポストコンディショニングが心筋虚血再灌流障害に及ぼす影響を循環動態，心筋梗塞サイズおよび再灌流不整脈の発生率を指標とし検討した．その結果，心筋梗塞サイズは薬物を投与しない群に対し，プレコンディショニング群，ポストコンディショニング群，プレコンディショニングとポストコンディショニングの併用群のすべてにおいて有意に減少した．しかし両者の効果に相加作用は認められなかった．またポストコンディショニング群およびプレコンディショニングとポストコンディショニングの併用群で再灌流不整脈の発生が抑制された．

以上の結果より，プレコンディショニングとポストコンディショニングの併用で心筋壊死縮小効果が相加作用は認められなかった．またプレコンディショニングでは再灌流不整脈の発生を抑制することはなかったが，ポストコンディショニングで再灌流直後にセボフルランを短時間曝露すれば再灌流不整脈の発生が抑制されることが示唆された．

## I. 緒 言

1986年にMurryら<sup>1)</sup>がイヌを用いて、心筋梗塞を引き起こす程度の長時間虚血の前に短時間の虚血を頻回行うと、その後の長時間の虚血に耐性をもつようになり、虚血再灌流後の心筋梗塞サイズを減少させるという現象を見出し、虚血プレコンディショニングと命名した。それ以来、数多くの研究がなされ、虚血のみならずセボフルランなどの吸入麻酔薬を虚血前に短時間曝露すると、再灌流後の心筋梗塞サイズが減少することが報告<sup>2)</sup>された。そのメカニズムとしてはATP感受性カリウムチャンネル ( $K_{ATP}$ ) や、ミトコンドリア膜透過性遷移孔 (mPTP) などがエンドエフェクターとして報告されている<sup>3-6)</sup>。また、最近では再灌流時に短時間の虚血やセボフルランなどの揮発性麻酔薬を曝露すると心筋保護効果が認められることが明らかにされており<sup>7,8)</sup>、ポストコンディショニングと呼ばれている。この心筋保護効果はプレコンディショニングとほぼ同様に心筋梗塞サイズを減少させることが明らかにされている。しかしセボフルランによるポストコンディショニングがプレコンディショニングに対して相加的に作用するか否かは十分に検討がなされていない。本研究では、*in vivo* ウサギ心筋虚血再灌流モデルを用い、セボフルランによるプレコンディショニングおよびポストコンディショニングが心筋虚血再灌流障害に及ぼす影響を循環動態、心筋梗塞サイズ、および再灌流不整脈の発生率を指標として検討した。

## II. 方 法

神奈川歯科大学動物実験指針に従い、ウサギ (New Zealand White, 2.5~3.2 kg, 雄, 日本 SLC) を研究材料とした。

### 1. 外科処置

ケタミン (35 mg/kg), ザイラジン (5 mg/kg) の混合液 (以下 K/X) の筋肉内投与による全身麻酔下において、

気管切開し，気管内チューブ（SHERIDAN ID 3.5 mm）を挿入した．

麻酔の維持は K/X の静脈内持続投与（ケタミン 35 mg/kg/h，ザイラジン 5 mg/kg/h）にて行った．本研究では筋弛緩薬は使用しなかったが，浅麻酔や疼痛による動物の逃避行動は認められなかった．換気は動物用人工呼吸器（PRO-45Va，アコマ，東京）と動物用麻酔器（ANS-5000A，アコマ，東京）を用い空気で調節呼吸を行い，必要に応じて純酸素を加えた．換気数は 25～30 回/分に調節し，呼吸ガスモニター（Capnox，日本コーリン，愛知）を用い終末呼気二酸化炭素分圧が 35～45 mmHg になるように，また動脈血液ガス分析により  $\text{PaO}_2 > 100$  mmHg， $\text{PaCO}_2$  : 35～45 mmHg，pH : 7.35～7.45，Base Excess : -3～+3 になるように換気条件を設定した．体温は加温パッドシステム（T/PUMP TP-401，IMI，埼玉）を用い直腸温を 37.5～38.5 °C で維持した．輸液は左頸静脈に留置したポリエチレンカテーテルから生理食塩液を 15 ml/h で実験終了まで持続投与した．また再灌流時の血栓防止のために 500 units/h のヘパリンを持続点滴静脈内投与した．

開胸は左第 4 肋間から行い，心嚢膜を切開し心臓を露出させた．針付絹糸（K-890H，Ethicon，Somerville，NJ）を房室溝と心尖の中間線上の左冠状動脈前下行枝（以下 LAD）の周りに一周させ，その絹糸の両端を内径 2 mm，長さ 2.5 cm のビニールチューブに通して結紮器を作成し，急性心筋梗塞モデルを作成した．虚血は結紮器の糸を牽引し止血鉗子でビニールチューブを固定することにより行い，閉塞は局所のチアノーゼ，および心電図上 ST の変化を指標として確認した．

## 2. 実験プロトコール

32 羽のウサギを無作為に 4 群に分類し，薬物を投与しない群（以下 Control 群：n=8），セボフルランによるプレコンディショニング群（以下 Pre 群：n=8），ポストコンディショニング群（以下 Post 群：n=8），プレ

コンディショニングとポストコンディショニングの併用群 (Pre+Post 群: n=8) とした。すべての実験群で循環動態を安定させるために外科手術後 15 分間放置し, 実験操作に先行し循環動態のコントロール値を測定した。その後, 30 分の虚血に引き続き 180 分の再灌流を行った。また, すべての処置群でセボフルラン吸入を開始後, 終末呼気濃度が 1.5% に達してから 5 分間曝露させ, セボフルランを中止後, 終末呼気濃度が 0% になるまで待った。セボフルランの曝露は Pre 群では虚血前, Post 群では再灌流開始時, Pre + Post 群では虚血前および再灌流開始時に行った (Fig. 1)。

Fig. 1

### 3. 循環動態の測定

循環動態の測定には生体情報モニター (コーリン BP-508, 日本コーリン, 愛知) を使用した。心拍数, 収縮期血圧, 拡張期血圧, 平均血圧は左頸動脈にポリエチレンカテーテルを留置し血圧トランスデューサー (TP-400T, 日本光電, 東京) を介して測定した。心電図は第 II 誘導で持続的にモニタリングした。測定ポイントは虚血直前をベースラインとし, 虚血 30 分後, 再灌流 15 分後, 30 分後, 60 分後, 120 分後, 180 分後とした。

### 4. 虚血域 (Risk area)/左心室 (Left ventricle), 心筋梗塞サイズ (Infarct size)/虚血域の計測

虚血域は LAD の結紮により虚血になった範囲である。その虚血域の中で心筋壊死に陥った部分を心筋梗塞域とした。虚血域を同定するために上記測定終了後, LAD を再結紮し 10% エバンスブルーを頸静脈より投与して虚血域と非虚血域に明らかな境界ができるのを視認し, 結紮したまま直ちに心臓を摘出し, 凍結させた。凍結した心臓は 2 mm 厚にスライスし, その切片を 37°C, pH 7.4 に調整した 1% トリフェニルテトラゾリウムクロライド (以下 TTC 溶液) に浸漬, 染色し, 染色されなかった部位を心筋梗塞域と同定した。虚血域, 非虚血域, 心筋梗塞域の境界をスキャナーで取り込み, コンピューター処

理により各々の面積 (mm<sup>2</sup>) の総和を計測し, 虚血域が左心室に占める百分率および心筋梗塞サイズの虚血域に占める百分率を算出した.

#### 5. 再灌流不整脈発生率の測定

再灌流不整脈の発生は再灌流開始から 20 分までに発現したものと定義し, その間の発生頻度を観察した.

また本研究において, 実験中に心室細動を起こしたものはなかった.

#### 6. 統計処理

各々の実験結果は平均値±標準誤差で示した. 虚血域/左心室, 心筋梗塞サイズ/虚血域の統計処理は Kruskal-Wallis 検定を用い,  $p < 0.05$  で有意差が認められた場合には Dunn's procedure の多重比較検定を行い,  $p < 0.05$  で有意差ありとした. 心拍数, 平均血圧, rate pressure products (以下 RPP) の各測定ポイントにおける群間の比較は一元配置分散分析を用い,  $p < 0.05$  にて有意差が認められた場合には, Fisher's PLSD の多重比較検定を行い,  $p < 0.05$  で有意差ありとした. また再灌流不整脈発生率の検定は  $\chi^2$  検定を用い,  $p < 0.05$  で有意差ありとした.

### III. 結 果

#### 1. 循環動態

心拍数はすべての群間で有意差はなかった. 平均血圧は Control 群と比較して Post 群では虚血 30 分と再灌流 15 分で有意に低下した. RPP は Control 群と比較して Post 群では虚血 30 分と再灌流 15 分, 60 分で有意に減少した (Table 1).

Table 1

#### 2. 心筋梗塞サイズおよび虚血域

虚血域/左心室は Control 群 ( $48.7 \pm 4.3\%$ ) と比較して Pre 群 ( $43.3 \pm 16.1\%$ ), Post 群 ( $40.1 \pm 7.0\%$ ), Pre+Post 群 ( $39.8 \pm 3.9\%$ ) のすべてにおいて有意差は

Fig. 2a

なかった (Fig. 2a). 心筋梗塞サイズ/虚血域は Control 群 ( $49.7 \pm 5.7\%$ ) と比較して Pre 群 ( $31.3 \pm 8.2\%$ ), Post 群 ( $16.5 \pm 7.4\%$ ), Pre+Post 群 ( $19.0 \pm 9.1\%$ ) のすべてにおいて有意に減少した. また Post 群と Pre+Post 群では Pre 群と比較して心筋梗塞サイズ/虚血域は有意に減少した (Fig. 2b).

Fig. 2b

### 3. 再灌流不整脈の発生率

再灌流不整脈の発生率は Control 群 (75.0%) と比較して, Post 群 (12.5%) と Pre+Post 群 (12.5%) で有意に減少した (Fig. 3).

Fig. 3

## IV. 考 察

高齢化に伴い歯科口腔外科を含む非心臓手術においても周術期の心筋虚血はよく遭遇する病態であり, 冠動脈疾患を有する患者では特に心筋梗塞に発展するリスクが高い<sup>9)</sup>. したがって麻酔中にいかに心筋を保護するかは常に考慮しなければならない. 最近では最も臨床使用頻度の高いセボフルランによるプレコンディショニングやポストコンディショニングによる心筋保護法が報告<sup>10, 11)</sup>されているが, 実験的段階であり, 本格的な臨床応用には至っていない.

本研究は, ヒト同様, 極めて側副血行路の少ないウサギでセボフルランによる再灌流後の心筋保護効果を心筋梗塞サイズ, 循環動態, 再灌流不整脈の発生率をエンドポイントとして詳細に検討した.

心筋梗塞サイズに関しては, セボフルランによるプレコンディショニングとポストコンディショニングで心筋壊死縮小効果がともに観察されたが, ポストコンディショニングにおける心筋保護効果のほうがプレコンディシ

ヨニングよりも強力であった。また両操作を行うことにより、プレコンディショニング効果と比較し心筋梗塞サイズが有意に縮小した。しかし Post 群と Pre+Post 群では心筋壊死縮小効果に差がなく、これはポストコンディショニングのみで十分な心筋保護効果が得られたことを示唆するものである。

循環動態に関しては、心拍数はすべての群間において有意差はないものの平均血圧、RPP は虚血 30 分、再灌流 15 分に Post 群で有意に減少したことからポストコンディショニングにおける心筋保護は一部心筋酸素需要量の低下に起因する可能性がある。これは再灌流直後から投与したセボフルランによる血圧低下が主因であると考えられる。

また本研究の基礎麻酔薬に使用したケタミンはエナチオマーである R(-) ケタミンを含み、 $K_{ATP}$  チャンネルの抑制作用があることが報告されている<sup>12-14)</sup>。したがって、ケタミンにより再灌流障害そのものが促進され、セボフルランによる心筋保護効果がその分、相殺されている可能性がある。

近年、セボフルランなどのハロゲン化揮発性麻酔薬<sup>15-17)</sup>、MLA (Monophosphoryl lipid A)<sup>18)</sup>、シルデナフィル<sup>19)</sup>、ニコランジル<sup>20)</sup>などの薬剤に心筋プレコンディショニング効果が認められることが報告され、これらは薬剤によるプレコンディショニング (pharmacological preconditioning) と呼ばれ臨床に応用されているものもある。虚血やセボフルランによるプレコンディショニングの心筋保護メカニズムとしては、 $K_{ATP}$  チャンネルの開口がエンドエフェクターとして有力視されてきた<sup>3,4)</sup>。しかし最近では mPTP の抑制もメカニズムの一つとして示唆されており、そこに至る経路も、Adenosine A1/A3,



Protein kinase C, Phosphoinositide 3-kinase, Mitogen-activated protein kinase 1/2, Protein kinase B, Glycogen synthase kinase 3 beta などの Reperfusion Injury Salvage Kinase pathway のみならず Ca 感受性 K チャネルなどの関与も指摘されている<sup>5,6)</sup>。

一方、虚血ポストコンディショニングは再灌流の早期に冠血流を短時間、間欠的に遮断することで得られる心筋壊死縮小効果で、Zhao ら<sup>7)</sup>のイヌの実験ではじめて明らかにされた。また揮発性麻酔薬によるポストコンディショニング効果もイソフルランやセボフルランで明らかにされている<sup>2,8)</sup>。これらのメカニズムにも虚血プレコンディショニングや麻酔薬によるプレコンディショニングと共通するメカニズムとして、 $K_{ATP}$  チャネルや mPTP の抑制などが示唆されている<sup>21-26)</sup>。また、ポストコンディショニングでは独自の細胞質成分に依存しない他のメカニズムが存在することも報告されている<sup>6)</sup>。しかしこのような種々の心筋保護法を併用した場合の効果が増強するか否かについては報告が少ない。

虚血プレコンディショニングとセボフルランやイソフルランによるプレコンディショニングはお互いに増強しない<sup>10)</sup>ことがウサギ *in vivo* モデルで報告されている。またラット *in vitro* モデル<sup>27)</sup>では我々の結果と同様にセボフルランによるプレコンディショニングとポストコンディショニングは相加的に作用しないことが明らかにされている。しかしラット *in vivo* モデルでは逆に相加的であったという報告<sup>28)</sup>もあり実験系により異なる所見が見られる。

Post 群と Pre+Post 群では Pre 群と比較して心筋壊死縮小効果が大きく、また相加的な効果が認められなかったことは、ポストコンディショニング効果には共通

のメカニズムとは異なる作用機序が加担した可能性も示唆されるが、今回の実験からは推測の域を出ない。

我々は同様のウサギ *in vivo* モデル実験系で異なる濃度のセボフルランを曝露した結果、1.5%のセボフルランが最も心筋保護効果をもたらすことを見出し、本研究ではセボフルランの濃度を1.5%とした（未発表データ）。またセボフルランの曝露時間に関しては、揮発性麻酔薬によるプレコンディショニングの研究<sup>28,29,30</sup>)において5分間曝露させている研究が多いため、本研究でも5分間とした。

プレコンディショニングやポストコンディショニングによる心筋保護効果は心筋梗塞サイズの縮小をエンドポイントとしてとらえることがゴールドスタンダードであったが、最近では心室性不整脈の抑制や心機能の改善も指標<sup>31-33</sup>)としていることから本研究では再灌流不整脈を検討した。再灌流不整脈の発生はPost群、Pre+Post群ともに有意に減少した。この結果は再灌流不整脈をラットで検討した報告<sup>30</sup>)と同様、プレコンディショニングはセボフルランによる再灌流時の不整脈を抑制しないが、ポストコンディショニングでは再灌流不整脈を抑制することを示すものである。これらの所見はセボフルランを再灌流後に短時間曝露させると、致死的な再灌流不整脈を抑制する可能性を示唆するものである。このような作用は虚血ポストコンディショニングにおいても認められている<sup>31-33</sup>)。またわれわれの結果と同様、虚血プレコンディショニングでは再灌流不整脈は抑制されないという報告<sup>34</sup>)が多い。

また、ポストコンディショニング効果として心筋壊死縮小効果と抗不整脈効果が得られたということは共通の

メカニズムが作用したか，あるいはセボフルランの曝露そのものによる抗不整脈作用が推察される．

手術侵襲による痛みや麻酔操作は周術期の循環動態を大きく変動させ，心筋虚血のリスクを増大させ，心筋梗塞などの重大な合併症を引き起こし予後に影響する．心筋虚血を避けるには循環動態の変動を最小限とし，心筋酸素需給バランスを適切に保つことが重要である．しかし臨床では自律神経系，内分泌系，循環系，呼吸系など多くの因子が心筋虚血に関与するので，すべての心筋虚血を予防することは困難である．したがって心筋虚血後の心筋保護法が重要となる．虚血やセボフルランによるプレコンディショニングは心筋梗塞を引き起こす前に操作しなければならず，心筋梗塞が予測できない以上，実際には困難である．しかしセボフルランによるポストコンディショニング操作は虚血が解除された再灌流時に行うため，臨床での有用性は極めて高いと考えられる．

## V．結 論

セボフルランによるプレコンディショニングとポストコンディショニングの併用で心筋壊死縮小効果が相加することはなかった．またポストコンディショニングでは再灌流不整脈の発生が抑制されることが示唆された．心筋梗塞などの冠動脈の閉塞が生じた場合，セボフルランによるポストコンディショニング操作を行えば心筋保護作用が期待されるが，臨床応用には今後のさらなる大規模臨床研究が必要である．

## 文 献

- 1) Murry CE, Jennings RB, Reimer KA: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium, *Circulation*, 1986, 74(5), 1124-1136.
- 2) Redel A, Stumpner J, Tischer-Zeitz T, Lange M, Smul TM, Lotz C, Roewer N, Kehl F: Comparison of isoflurane-, sevoflurane-, and desflurane-induced pre- and postconditioning against myocardial infarction in mice in vivo, *Exp Biol Med*, 2009, 234(10), 1186-1191.
- 3) Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC: Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of  $K_{ATP}$  channels: Reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase, *Anesthesiology*, 1997, 87(2), 361-370.
- 4) 吉田和市: 麻酔薬が心筋虚血再灌流障害に及ぼす影響, *日歯麻誌*, 1999, 27(3), 276-280.
- 5) 山中寛男, 林 行雄: プレコンディショニングと麻酔への臨床応用, *麻酔*, 2009, 58(3), 279-287.
- 6) Pravdic D, Mio Y, Sedlic F, Pratt PF, Warltier DC, Bosnjak ZJ, Bienengraeber M: Isoflurane protects cardiomyocytes and mitochondria by immediate and cytosol-independent action at reperfusion, *Br J Pharmacol*, 2010, 160(2), 220-232.
- 7) Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J: Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic

- preconditioning, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285(2), H579-588.
- 8) Yu LN, Yu J, Zhang FJ, Yang MJ, Ding TT, Wang JK, He W, Fang T, Chen G, Yan M: Sevoflurane postconditioning reduces myocardial reperfusion injury in rat isolated hearts via activation of PI3K/Akt signaling and modulation of Bcl-2 family proteins, *J Zhejiang Univ Sci B*, 2010, 11(9), 661-672.
- 9) Gordon EK, Fleisher LA: Reducing perioperative cardiac morbidity and mortality: is this the right goal? , *Curr Opin Crit Care*, 2013, 19(4), 342-345.
- 10) Ohdachi M, Nishida N, Furuya M, Yoshida K: Sevoflurane does not confer additive cardioprotection on early ischemic preconditioning in rabbit hearts, *Circ Cont*, 2005, 26(4), 314-321.
- 11) Chen D, Cheng B, Zhou HY, Li LH: The effect of sevoflurane postconditioning on cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in rabbits, *Mol Biol Rep*, 2012, 39(5), 6049-6057.
- 12) Kawano T, Oshita S, Takahashi A, Tsutsumi Y, Tanaka K, Tomiyama Y, Kitahata H, Nakaya Y: Molecular mechanisms underlying ketamine-mediated inhibition of sarcolemmal adenosine triphosphate-sensitive potassium channels, *Anesthesiology*, 2005, 102(1), 93-101.
- 13) Müllenheim J, Fräßdorf J, Preckel B, Thämer V, Schlack W: Ketamine, but not S(+)-ketamine,

- blocks ischemic preconditioning in rabbit hearts in vivo, *Anesthesiology*, 2001, 94(4), 630-636.
- 14) Müllenheim J, Rulands R, Wietschorke T, Frässdorf J, Preckel B, Schlack W: Late preconditioning is blocked by racemic ketamine, but not by S(+)-ketamine, *Anesth Analg*, 2001, 93(2), 265-270.
- 15) Onishi A, Miyamae M, Kaneda K, Kotani J, Figueredo VM: Direct evidence for inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by sevoflurane preconditioning in cardiomyocytes: comparison with cyclosporine A, *Eur J Pharmacol*, 2012, 675(1-3), 40-46.
- 16) Kiani A, Sadeghi MM, Gharipour M, Farahmand N, Hoveida L: Preconditioning by isoflurane as a volatile anesthetic in elective coronary artery bypass surgery, *ARYA Atheroscler*, 2013, 9(3), 192-197.
- 17) Landoni G, Fochi O, Torri G: Cardiac protection by volatile anaesthetics: a review, *Curr Vasc Pharmacol*, 2008, 6(2), 108-111.
- 18) Yoshida K, Maaieh MM, Shipley JB, Doloresco M, Bernardo NL, Qian YZ, Elliott GT, Kukreja RC: Monophosphoryl lipid A induces pharmacologic 'preconditioning' in rabbit hearts without concomitant expression of 70-kDa heat shock protein, *Mol Cell Biochem*, 1996, 159(1), 73-80.
- 19) Salloum FN, Takenoshita Y, Ockaili RA, Daoud VP, Chou E, Yoshida K, Kukreja RC: Sildenafil and vardenafil but not nitroglycerin limit

- myocardial infarction through opening of mitochondrial  $K_{ATP}$  channels when administered at reperfusion following ischemia in rabbits, *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 42(2), 453-458.
- 20) Ahmed LA, Salem HA, Attia AS, Agha AM: Pharmacological preconditioning with nicorandil and pioglitazone attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats, *Eur J Pharmacol*, 2011, 663(1-3), 51-58.
- 21) Sawada H, Yoshida K, Kukreja RC: Blockade of ischemic preconditioning by glibenclamide in rabbits anesthetized with sevoflurane, *Bull Kanagawa Dent Coll*, 1997, 25(2), 65-71.
- 22) Jin C, Wu J, Watanabe M, Okada T, Iesaki T: Mitochondrial  $K^+$  channels are involved in ischemic postconditioning in rat hearts, *J Physiol Sci*, 2012, 62(4), 325-332.
- 23) Das B, Sarkar C: Is preconditioning by oxytocin administration mediated by iNOS and/or mitochondrial  $K_{ATP}$  channel activation in the in vivo anesthetized rabbit heart? , *Life Sci*, 2012, 90(19-20), 763-769.
- 24) Kaneda K, Miyamae M, Sugioka S, Okusa C, Inamura Y, Domae N, Kotani J, Figueredo VM: Sevoflurane enhances ethanol-induced cardiac preconditioning through modulation of protein kinase C, mitochondrial  $K_{ATP}$  channels, and nitric oxide synthase, in guinea pig hearts, *Anesth Analg*, 2008, 106(1), 9-16.

- 25) Hausenloy DJ, Yellon DM: Preconditioning and postconditioning: United at reperfusion, *Pharmacol Ther*, 2007, 116(2), 173-191.
- 26) Feng J, Lucchinetti E, Ahuja P, Pasch T, Perriard JC, Zaugg M: Isoflurane postconditioning prevents opening of the mitochondrial permeability transition pore through inhibition of glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , *Anesthesiology*, 2005, 103(5), 987-995.
- 27) Deyhimy DI, Fleming NW, Brodtkin IG, Liu H: Anesthetic preconditioning combined with postconditioning offers no additional benefit over preconditioning or postconditioning alone, *Anesth Analg*, 2007, 105(2), 316-324.
- 28) Obal D, Dettwiler S, Favoccia C, Scharbatke H, Preckel B, Schlack W: The influence of mitochondrial K<sub>ATP</sub>-channels in the cardioprotection of preconditioning and postconditioning by sevoflurane in the rat in vivo, *Anesth Analg*, 2005, 101(5), 1252-1260.
- 29) Knapp J, Bergmann G, Bruckner T, Russ N, Böttiger BW, Popp E: Pre- and postconditioning effect of sevoflurane on myocardial dysfunction after cardiopulmonary resuscitation in rats, *Resuscitation*, 2013, 84, 1450-1455.
- 30) Dai AL, Fan LH, Zhang FJ, Yang MJ, Yu J, Wang JK, Fang T, Chen G, Yu LN, Yan M: Effects of sevoflurane preconditioning and postconditioning on rat myocardial stunning in



- ischemic reperfusion injury, *J Zhejiang Univ Sci B*, 2010, 11(4), 267-274.
- 31) Kloner RA, Dow J, Bhandari A: Postconditioning markedly attenuates ventricular arrhythmias after ischemia-reperfusion, *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2006, 11(1), 55-63.
- 32) Sasaki H, Shimizu M, Ogawa K, Okazaki F, Taniguchi M, Taniguchi I, Mochizuki S: Brief ischemia-reperfusion performed after prolonged ischemia (ischemic postconditioning) can terminate reperfusion arrhythmias with no reduction of cardiac function in rats, *Int Heart J*, 2007, 48(2), 205-213.
- 33) Dow J, Bhandari A, Kloner RA: Ischemic postconditioning's benefit on reperfusion ventricular arrhythmias is maintained in the senescent heart, *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2008, 13(2), 141-148.
- 34) Kolettis TM, Vilaeti AD, Tsalikakis DG, Zoga A, Valenti M, Tzallas AT, Papalois A, Iliodromitis EK: Effects of pre-and postconditioning on arrhythmogenesis in the in vivo rat model, *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2013, 18(4), 376-385.

The Effects of Sevoflurane-induced Pre- and Postconditioning on  
Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury

Shoko ITAKURA, Uno IMAIZUMI, Hitoshi YUI, Munetaka FURUYA,  
Hirofumi ARISAKA and Kazu-ichi YOSHIDA

Department of Anesthesiology, Kanagawa Dental University

Abstract

Recent investigations demonstrate that anesthetic pre- and postconditioning reduce myocardial infarct size to a degree comparable to that achieved with ischemic preconditioning. We hypothesized that the combination of sevoflurane-induced pre- and postconditioning would result in greater preservation of myocardium.

*In vivo* rabbit hearts (n=32) received regional ischemia by 30 min of the left anterior descending artery (LAD) occlusion followed by 180 min of reperfusion under general anesthesia with ketamine and xylazine. A lead II ECG was recorded throughout the experiment for observation of reperfusion-induced arrhythmias. In this study, four groups of rabbits were studied for the effects of sevoflurane on infarct size and reperfusion-induced arrhythmias associated with ischemia and

reperfusion. In control group, rabbits (n=8) were subjected to 30 min of LAD occlusion and 180 min of reperfusion. The Pre group (n=8) animals received sevoflurane (1.5 %) 5 min prior ischemia. The Post group (n=8) animals received sevoflurane (1.5 %) 5 min after reperfusion. The Pre + Post group (n=8) animals received sevoflurane (1.5 %) 5 min before ischemia and after reperfusion, respectively (Fig. 1). During ischemia and reperfusion hemodynamics (heart rate, mean arterial pressure, and rate pressure products) were measured. At the end of reperfusion, the infarct size was measured with 1 % triphenyl tetrazolium chloride staining at the end of the experiment by re-ligation of LAD. Reperfusion-induced arrhythmias were observed for 20 min after reperfusion.

The risk area ranged from  $39.8 \pm 3.9$  % to  $48.7 \pm 4.3$  % with no significant difference among groups (Fig. 2a), suggesting that changes in the size of infarct observed among groups were not related to the percentage of area of left ventricle occluded by our technique. Fig. 2b shows the infarct size expressed as percentage of risk area in four groups. Infarct size/risk area was  $49.7 \pm 5.7$  % in the Control group; the

size was reduced significantly to  $31.3 \pm 8.2\%$  in the Pre group,  $16.5 \pm 7.4\%$  in the Post group, and  $19.0 \pm 9.1\%$  in the Pre + Post group. The incidence of arrhythmias during reperfusion was 75.0% in the Control group; the incidence was reduced significantly to 12.5% in the Post group and 12.5% the Pre + Post groups (Fig. 3).

The combination of sevoflurane pre- and postconditioning offered no additional benefit over either intervention alone. Sevoflurane postconditioning may be clinically applicable in situations where the potential for ischemia/reperfusion injury is of concern.

---

Address correspondence to;

Uno IMAIZUMI

Department of Anesthesiology, Kanagawa Dental University,

82 Inaoka-cho, Yokosuka, Kanagawa 238-8580, Japan

## セボフルランによるプレコンディショニングおよびポストコンディショニングの心筋虚血再灌流障害における保護効果

近年の研究では麻酔薬プレコンディショニングとポストコンディショニングを比較して心筋梗塞サイズが減少すると示している。我々はセボフルランプレコンディショニングおよびポストコンディショニングがより広範囲の心筋保護を示す結果になると仮説を立てた。

*In vivo* ウサギ (32 羽) の心臓に 30 分の左冠状動脈前下行枝虚血に続いて 180 分の再灌流をケタミンおよびザイラジン麻酔下で行った。再灌流不整脈は心電図の第 II 誘導で記録された。本研究では、4 群のウサギを用いて虚血再灌流に関連した心筋梗塞サイズや再灌流不整脈に対するセボフルランの効果を研究した。コントロール群では 30 分の左冠状動脈前下行枝の虚血と 180 分の再灌流を行った。プレコンディショニング群は 1.5% のセボフルランを虚血前に 5 分、ポストコンディショニング群は 1.5% のセボフルランを虚血後に 5 分間、プレコンディショニングおよびポストコンディショニング群は 1.5% のセボフルランを虚血前後にそれぞれ 5 分間曝露した (Fig. 1)。虚血再灌流中の循環動態は心拍数、平均血圧、rate pressure products を測定した。実験の最後に左冠状動脈前下行枝を再結紮し、1% トリフェニルテトラゾリウムにて染色し、心筋梗塞サイズを測定した。再灌流不整脈は再灌流後 20 分観察した。

危険域は  $39.8 \pm 3.9\%$  から  $48.7 \pm 4.3\%$  で、すべての群間で有意差は認められず (Fig. 2a)、すべての群間で観察された心筋梗塞サイズの変化は虚血域の割合と関連がなかった。Fig. 2b は 4 群の心筋梗塞サイズの割合を示す。コントロール群は  $49.7 \pm 5.7\%$  で、 $31.3 \pm 8.2\%$  のプレコンディショニング群、 $16.5 \pm 7.4\%$  のポストコンディショニング群、 $19.0 \pm 9.1\%$  のプレコンディショニングおよびポストコンディショニング群で有意に減少した。再灌流不整脈の発生率はコントロール群は  $75.0\%$  で、 $12.5\%$  のポストコンディショニング群と  $12.5\%$  のプレコンディショニングおよびポストコンディショニング群で有意に減少した (Fig. 3)。

プレコンディショニングとポストコンディショニングの併用はポストコンディショニング単独以上の効果はなかった。セボフルランポストコンディショニングは虚血再灌流障害の関与がある場合、臨床応用が可能である。

## Figure and Table Legends

Fig.1. Schematic diagram of the protocol

Fig.2a. The figure shows R/L value (%), which means the risk area for ischemia expressed as percentage of left ventricle. After completion of each measurement, the risk area for ischemia was determined by the injection of 10% Evans Blue dye via the jugular vein following LAD reocclusion. Statistical comparisons of R/L among groups were made using Kruskal-Wallis test followed by Dunn's procedure. Data are reported as group mean  $\pm$  SEM (n=8), and probability values (P) less than 0.05 were considered statistically significant. The R/L ranged from  $39.8 \pm 3.9\%$  to  $48.7 \pm 4.3\%$  and revealed no significant difference among groups, suggesting that the changes in the infarct size observed among groups did not depend on R/L.

Fig.2b. The figure shows I/R value (%), which means the infarct size expressed as percentage of risk area for ischemia. Statistical comparisons of I/R between groups were made using Kruskal-Wallis test followed by Dunn's procedure. Data are reported as group mean  $\pm$  SEM (n=8), and probability values (P) less than 0.05 were considered statistically significant. The I/R was  $49.7 \pm 5.7\%$  in Control group; the I/R was significantly decreased to  $31.3 \pm 8.2\%$  in

the Pre group,  $16.5 \pm 7.4\%$  in the Post group,  $19.0 \pm 9.1\%$  in the Pre+Post group.

\*Significantly different ( $P < 0.05$ ) from the Control group

#Significantly different ( $P < 0.05$ ) from the Pre group

Fig.3 The figure shows the incidence of arrhythmias during myocardial reperfusion.

The difference in the incidence of arrhythmias was analyzed with a  $\chi^2$  test and probability values (P) less than 0.05 were considered statistically significant.

\* Significantly different ( $P < 0.05$ ) from the Control group.

Incidence of arrhythmias during myocardial reperfusion was 75.0% in control; the incidence was significantly decreased to 12.5% in the Post group, 12.5% in the Pre+Post group, respectively.

Table 1 Hemodynamics during ischemia and reperfusion

HR revealed no significant difference between groups. MAP was significantly decreased at 30 min after ischemia and 15 min after reperfusion in the Post group. RPP was significantly decreased at 30 min after ischemia, 15 min and 60 min after reperfusion in the Post group. Statistical comparisons of individual hemodynamic parameters between

groups were made by using one-way ANOVA followed by Fisher's protected least significant difference. Bartlett's test for equality of variances was used to ensure the validity of statistical comparison using the one-way ANOVA.

Data are expressed as mean $\pm$ SEM.

\*Significantly different ( $P < 0.05$ ) from the Control group.



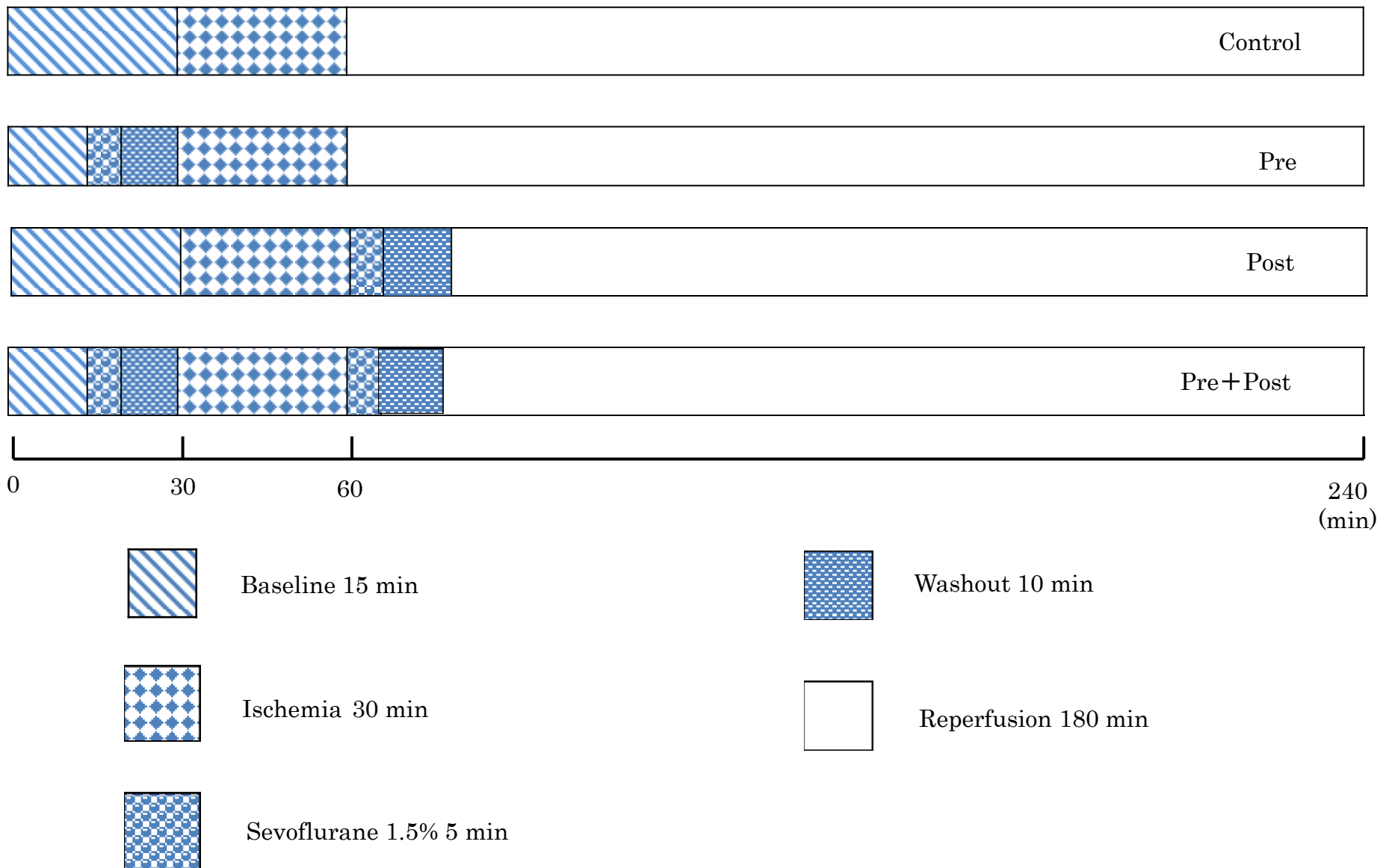


Fig. 1 Schematic diagram of the protocol

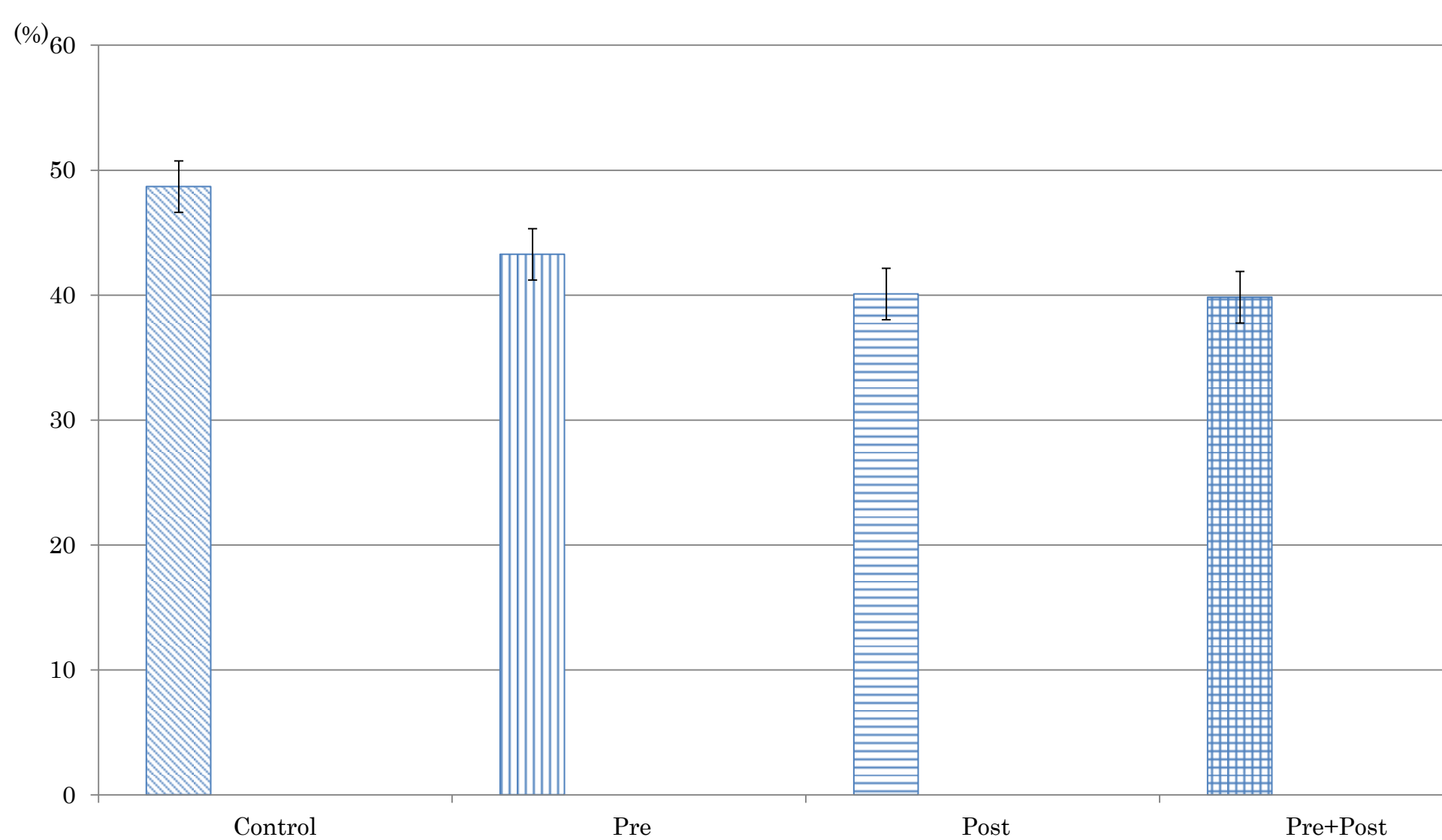


Fig. 2a The figure shows R/L value (%), which means the risk area for ischemia expressed as percentage of left ventricle. Statistical comparisons of R/L among groups were made using Kruskal-Wallis test followed by Dunn's procedure. Data are reported as group mean  $\pm$  SEM (n=8), and probability values (P) less than 0.05 were considered statistically significant. The R/L ranged from  $39.8 \pm 3.9\%$  to  $48.7 \pm 4.3\%$  and revealed no significant difference among groups, suggesting that the changes in the infarct size observed among groups did not depend on R/L.

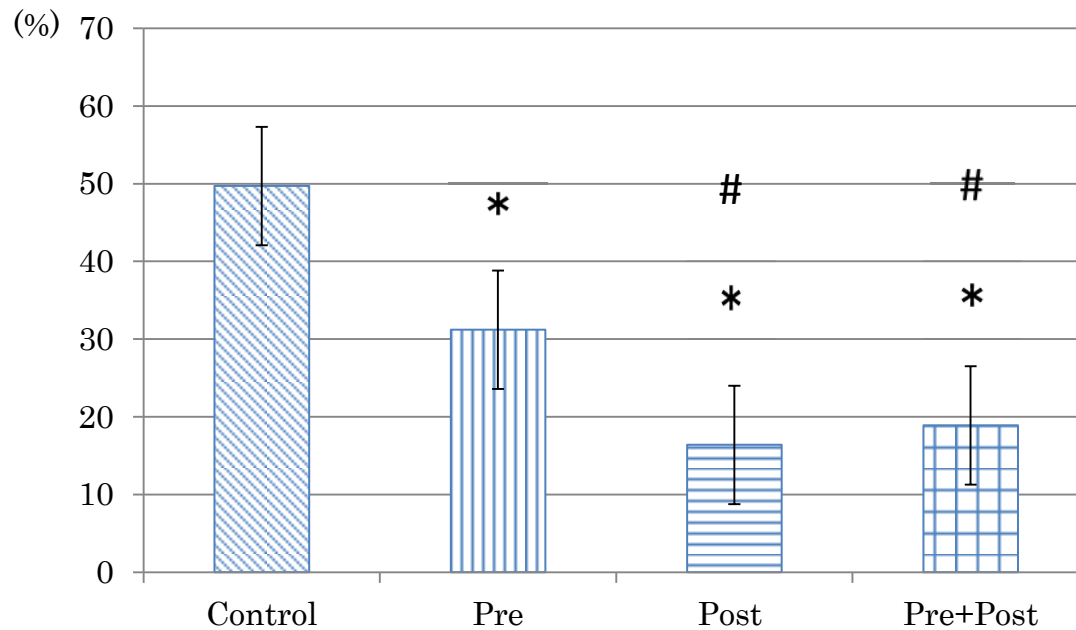


Fig. 2b The figure shows I/R value (%), which means the infarct size expressed as percentage of risk area for ischemia. Statistical comparisons of I/R between groups were made using Kruskal-Wallis test followed by Dunn's procedure. Data are reported as group mean  $\pm$  SEM (n=8), and probability value (P) less than 0.05 were considered statistically significant. The I/R was  $49.7 \pm 5.7\%$  in Control group; the I/R was significantly decreased to  $31.3 \pm 8.2\%$  in the Pre group,  $16.5 \pm 7.4\%$  in the Post group,  $19.0 \pm 9.1\%$  in the Pre+Post group.  
 \* Significantly different (P<0.05) from the Control group  
 # Significantly different (P<0.05) from the Pre group

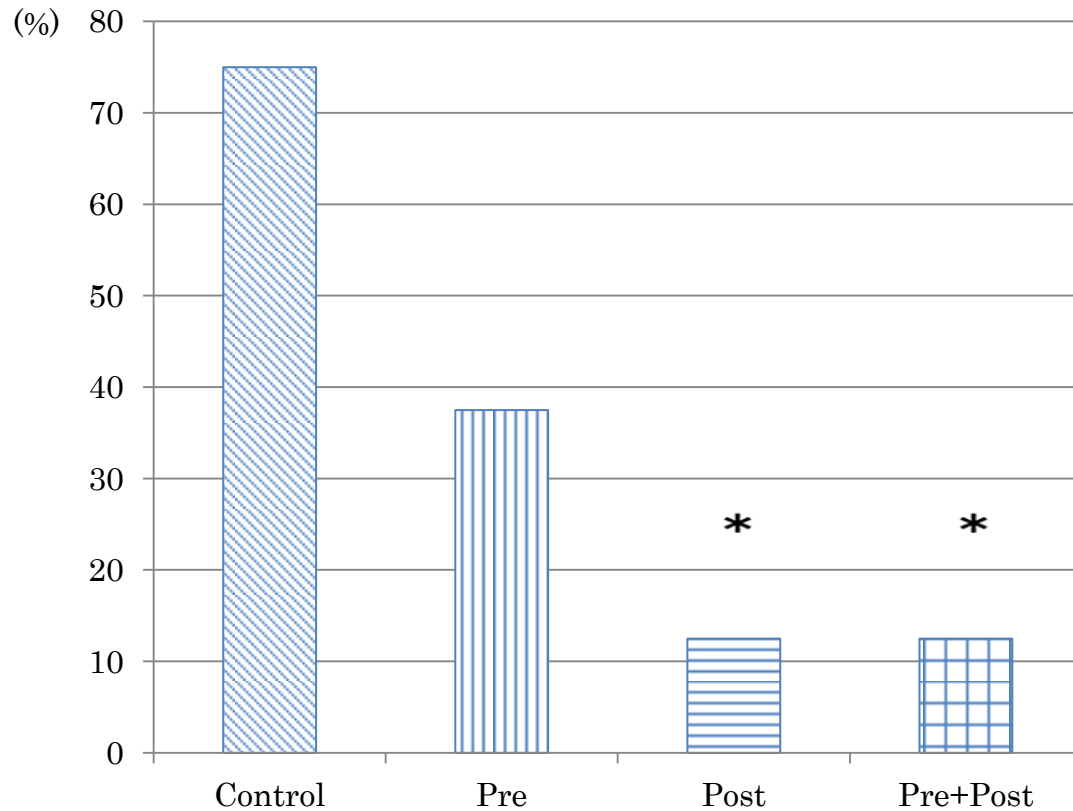


Fig. 3 The figure shows the incidence of arrhythmias during myocardial reperfusion. The difference in the incidence of arrhythmias was analyzed with a  $\chi^2$  test and probability values (P) less than 0.05 were considered statistically significant. \* Significantly different (P<0.05) from the Control group.

Incidence of arrhythmias during myocardial reperfusion was 75.0% in control; the incidence was significantly decreased to 12.5% in the Post group, 12.5% in the Pre+Post group, respectively.

Table 1 Hemodynamics during ischemia and reperfusion

	Group	Pre Ischemia	30min after Ischemia	15min after Reperfusion	30min after Reperfusion	60min after Reperfusion	120min after Reperfusion	180min after Reperfusion
HR (beats/min)	Control	193.3±36.2	198.1±25.8	198.0±17.2	183.6±36.7	198.7±20.5	208.3±26.0	183.6±49.9
	Pre	187.7±38.1	192.3±39.7	183.0±30.4	189.2±36.1	184.5±56.6	205.7±79.5	186.5±73.3
	Post	218.1±51.3	211.1±56.3	176.6±50.0	208.1±50.8	178.8±74.5	188.2±56.2	177.6±63.7
	Pre+post	214.6±69.6	185.2±56.8	193.2±39.7	188.6±34.9	182.3±34.1	186.5±31.3	182.1±24.6
MAP (mmHg)	Control	66.7±14.6	64.1±13.8	63.1±12.5	56.7±22.1	59.2±13.8	53.6±15.4	49.0±21.5
	Pre	59.7±7.6	53.3±11.2	58.2±9.3	56.6±9.6	56.0±8.7	54.2±13.4	54.5±14.0
	Post	69.5±9.2	35.2±27.2 *	38.6±24.5 *	42.8±22.3	44.3±20.3	48.3±23.6	51.1±29.1
	Pre+post	69.6±13.0	57.2±11.9	49.8±13.4	57.8±17.8	57.7±13.7	62.2±20.7	54.1±13.5
RPP (mmHg ·min)	Control	17063.6±5450.8	16519.5±4464.0	16214.2±3205.9	14057.1±6004.4	15841.8±2573.8	15622.7±3781.6	12761.7±6285
	Pre	13453.5±3120.3	12790.3±3038.3	13071.2±2536.4	12653.3±2673.4	12555.7±3806.1	14420.1±6498.0	13474.0±6907.4
	Post	19246.5±4550.1	8998.5±6645.4 *	9609.6±5352.9 *	11728.7±4034.2	10867.1±5795.2	12095.1±6361.5	12302.2±9660.3
	Pre+post	18246.2±4839.0	13317.6±4174.7	12382.3±3519.6	13482.7±2664.2	12018.2±5402.3	14248.2±2534.0	13101.8±2141.5

HR revealed no significant difference between groups. MAP was significantly decreased at 30 min after ischemia, 15 min after reperfusion in the Post group. RPP was significantly decreased at 30 min after ischemia, 15 min and 60 min after reperfusion in the Post group. Statistical comparisons of individual hemodynamic parameters between groups were made by using one-way ANOVA followed by Fisher's protected least significant difference. Bartlett's test for equality of variances was used to ensure the validity of statistical comparison using the one-way ANOVA. Data are expressed as mean±SEM.

\* Significantly different (P<0.05) from the Control group.