Prophylaxe hypoxisch-entzündlicher Hirnschädigungen bedingt durch die extrakorporale Zirkulation (Herz-Lungen-Maschine) am narkotisierten Schwein

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med. dent.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von: Lydia Kühne

Geburtsdatum / Geburtsort: 22.05.1988 / Leisnig

angefertigt am / in: Dezember 2015 / Abteilung Forschung und Lehre der Kinderkardiologie
des Herzzentrums der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Betreuer: apl. Prof. Dr. med. Aida Salameh

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 22.11.2016

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einführung 1

1.1 Kinderherzchirurgie 2

1.2 Herz-Lungen-Maschine 3

1.3 Pathophysiologie der HLM 6

1.3.1 Inflammationsreaktion 6

1.3.2 Ischämie 8

1.3.3 Reperfusion 9

1.4 HLM und Folgen für das Gehirn 12

1.5 Neuroprotektive Strategien 14

1.5.1 Pulsatile Perfusion 15

1.5.2 Minozyklin 17

1.6 Hippocampus 18

2 Aufgabenstellung 20

3 Tiere, Material und Methoden 21

3.1 Versuchstiere 21

3.2 Versuch Teil 1: Operation 21

3.2.1 Gruppeneinteilung und Versuchsaufbau 21

3.2.2 Anästhesie 23

3.2.3 Operation 24

3.2.3.1 Vorbereitungszeit 24

3.2.3.2 Kardioplegie 26

3.2.3.3 Herz-Lungen-Maschine mit nicht-pulsatilen Blutfluss/ pulsatilen Blutfluss 27

3.2.3.4 Medikation mit Minozyklin 28

3.2.4 Intraoperatives Monitoring 29

3.2.4.1 Vitalparameter 29

3.2.4.2 Arterielle Blut-Gas-Analyse 30

3.2.4.3 Elektrolyt-Haushalt 30

3.2.4.4 Laktat- und Glukose-Haushalt 30

3.3. Versuch Teil 2: Laboruntersuchungen 31

3.3.1 Einbetten der Proben und Herstellung der Schnittpräparate 31

3.3.2 Histologie 32

3.3.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung 32

3.3.3 Immunhistochemie 33

3.3.3.1 Allgemeines Prinzip 33
3.3.3.2 Nachweis: Apoptose-induzierender Faktor 34
3.3.3.3 Nachweis: Hypoxie-induzierter Faktor 1-alpha 35
3.3.3.4 Nachweis: cleaved Caspase 3 35
3.3.3.5 Nachweis: 3-Nitrotyrosin 36
3.3.3.6 Nachweis: Poly-(ADP)-Ribose 37
3.3.4 RP-HPLC – Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography 37
3.4 Blutgasanalyse 39
3.5 Auswertung am Mikroskop 39
3.6 Statistik 41
4 Ergebnisse 42
4.1 Intraoperatives Monitoring 42
4.2 Arterielle Blutproben 42
4.3 Arterielles Blut: Laktat-Haushalt 45
4.4 Ergebnisse der RP-HPLC 45
4.5 Ergebnisse der Hämatoxylin-Eosin-Färbung 46
4.6 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen 50
4.6.1 Apoptose-induzierender Faktor 50
4.6.2 Hypoxie-induzierter Faktor 1-alpha 52
4.6.3 3-Nitrotyrosin 54
4.6.4 Cleaved Caspase 3 56
4.6.5 Poly-(ADP)-Ribose 58
5 Diskussion 60
5.1 Tiermodell und Versuchsaufbau 62
5.2 Blutproben 65
5.3 Herz-Lungen-Maschine und nicht-pulsatiler Blutfluss versus pulsatiler Blutfluss 67
5.4 Extrakorporale Zirkulation und die Gabe von Minozyklin 76
5.5 Beantwortung der Fragestellungen 79
6 Zusammenfassung 81
7 Literaturverzeichnis 83
8 Anhang 109
8.1 Einführung 109
8.1.1 Kinderherzchirurgie 109
8.1.2 Pathophysiologie der HLM 110
8.2 Tiere, Material und Methoden 111

8.2.1 Operation 111
8.2.2 Intraoperatives Monitoring 115
8.2.3 Laboruntersuchungen 115
8.3 Ergebnisse 126
8.3.1 Intraoperatives Monitoring 126
8.3.2 Arterielle Blutproben 128
8.3.3 Arterielles Blut – Laktat-Haushalt 129
8.3.4 RP-HPLC 129
8.3.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung 130
8.3.6 Immunhistochemie 131
9 Selbständigkeitserklärung 134
10 Lebenslauf 135
11 Koautorenschaft 136
12 Danksagung 137

Bibliographische Beschreibung

Kühne, Lydia

Prophylaxe hypoxisch-entzündlicher Hirnschädigungen bedingt durch die extrakorporale Zirkulation (Herz-Lungen-Maschine) am narkotisierten Schwein

Universität Leipzig, Dissertation

137 S., 291 Lit., 22 Abb., 38 Tab., 35 Anlagen

Referat:

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Auswirkungen der Herz-Lungen-Maschine auf das Gewebe des Hippocampus in einem Ferkelmodell. Die Tiere untereilte man in 5 Gruppen: „Kontrolle“, „Kontrolle mit Minozyklin“, „HLM pulsatil“, „HLM nicht-pulsatil“, sowie „HLM nicht-pulsatil mit Minozyklin“. Es wurde untersucht, ob eine pulsatile Perfusion Schäden in den Zellen des Hippocampus gegenüber eines nicht-pulsatilen Blutflusses während der extrakorporalen Zirkulation abmildern kann. Des Weiteren überprüfte man neuroprotektive Effekte des Tetrazyklin-Derivates Minozyklin während eines kardiochirurgischen Eingriffes mit Herz-Lungen-Maschine. Während der Operation wurde bei allen Ferkeln eine Hypothermie von 28 °C durchgeführt und die HLM-Zeit betrug 90 Minuten. Die Rekonvaleszenzzeit umfasste 120 Minuten. Minozyklin verabreichte man in den entsprechenden Gruppen zu Beginn des Versuches (4 mg/kg Körpermasse) und nach Abkopplung von der Herz-Lungen-Maschine (2 mg/kg Körpermasse) intravenös. Hauptbestandteil der Arbeit waren histologische, immunhistochemische Färbemethoden zur Untersuchung des Hippocampus. Mithilfe eines Mikroskops wurden Veränderungen auf zellulärer Ebene im CA1- und CA3-Areal des Cornu ammonis im Hippocampus ausgewertet. Für die Ergebnisse betrachtete man die Pyramidenzellen des Stratum pyramidale. In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden Zellen mit den Eigenschaften „Ödem“, „Eosinophilie“ und „Pyknose“ für jedes Versuchstier gezählt. Mit den immunhistochemischen Färbungen sollten Faktoren für den programmierten Zelltod, für Hypoxie (HIF 1-alpha) und für oxidativen Stress (3-Nitrotyrosin) detektiert werden. Als Marker für Apoptose wählte man den Apoptose-induzierenden Faktor, cleaved Caspase 3 und Poly-(ADP)-Ribose.

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ACT	*activated clotting time*
ADP	Adenosindiphosphat
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AG	Antigen
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophsophat
AMPA-Rezeptor	alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic-acid-Rezeptor
AMV	Atem-Minuten-Volumen
aqua dest.	Destillliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
B	Belgien
bcl-2	*B-cell lymphoma 2*
BE	*Base Excess* (Basenüberschuss)
BGA	Blutgasanalyse
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
ca.	circa
CA1-4	Cornu ammonis-Region 1-4 des Hippocampus
C1-10	Komplementfaktoren 1-10
cC3	cleaved Caspase 3
cm	Zentimeter
cm^3	Kubikzentimeter
$CMRO_2$	zerebrale Sauerstoffumsatzrate
CO	Colorado
co.	Compagnie
CPB	*cardiopulmonary bypass*
D	Deutschland
d.h.	das heißt

DHCA	*deep hypothermic circulatory arrest* - (tiefer hypothermer Herz-Kreislaufstillstand)
DK	Dänemark
dl	Deziliter
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dt	*change in time at the end of flow and pressure cycles*
EGCG	Epigallocatechin-3-Gallat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEP	*energy equivalent pressure*
EKG	Elektrokardiogramm
EKZ	extrakorporale Zirkulation
ergs	Verhältnis von Energie und mechanischer Arbeit
et al.	et alii und et alliae
F	Frankreich
f	*pump flow rate* (Pumpenflussrate)
FFP	*fresh frozen plasma*
g	Erdbeschleunigung (Maßeinheit für das Zentrifugieren)
g/l	Gramm pro Liter
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
Gpt/l	Gigaparts pro Liter
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hg	Hydrargyrum (Quecksilber)
HIF 1-alpha	Hypoxie-induzierter Faktor 1-alpha
HLM	Herz-Lungen-Maschine
HMK	hochmolekulares Kininogen
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HRP	Horseradisch Peroxidase
I	Italien
i.d.R.	in der Regel
I.E.	Internationale Einheiten
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie

IL-1, -6, -8,-10	Interleukin-1, -6, -10
i.m.	intramuskulär
IPPV	intermittent positive pressure ventilation
i.v.	intravenös
kg	Kilogramm
KM	Körpermasse
l	Liter
M	Mol
MA	Massachusetts
mbar	Millibar
MCAO	Okklusion der A. cerebri media
mg	Milligramm
min.	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
MN	Minnesota
MW	Mittelwert
n	number
NAD^+	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, oxidiert
NaCl	Natriumchlorid
NADPH-Oxidase	Nikotin-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Oxidase
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
NH	New Hampshire
NIRS	Nahinfrarotspektroskopie
nm	Nanometer
NMDA-Rezeptor	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NOS	Stickstoffsynthase
Nr.	Nummer
OP	Operation
OR	Oregon
p	arterial pressure
PA	Pennsylvania

PAN	Prävalenz angeborener Herzfehler bei Neugeborenen
PAR	Poly-(ADP)-Ribose
PAR(P)-1	Poly-(ADP)-Ribose-Polymerase 1
PBS	*Phospahte Buffered Saline*
pCO_2	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PEEP	*positive end expiratory pressure*
pH	potentia hydrogenii
PiCCO	*pulse contour cardiac output*
P_{max}	*maximal pressure*
PMNL	polymorphkernige Leukozyten
pO_2	Sauerstoffpartialdruck
PVC	Polyvinylchlorid
RNS	*reactive nitrosative species*
ROS	*reactive oxygen species*
RP-HPLC	Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography
sec.	Sekunden
SEM	*standard error of the mean* (Standardfehler des Mittelwerts)
SHE	*surplus hemodynamic energy*
SIRS	*systemic inflammatory response syndrome*
Tab.	Tabelle
TBS	*Tris Buffered Saline*
TCD	Transkranielle Doppler-Sonographie
$T_I : T_E$	*time inspiration : time expiration*
TIVA	totalintravenöse Anästhesie
TNF-alpha	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
u.a.	unter anderem
USA	United States of America
u.U.	unter Umständen
UV	ultraviolett
V.	Vena
v.a.	vor allem
VEGF	vascular endothelial growth factor
vgl.	vergleiche
Vol.-%	Volumenprozent
vs.	versus

Vt	Tidalvolumen
z.B.	zum Beispiel
ZVK	zentralvenöser Katheter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
μm^2	Quadratmikrometer
µmol	Mikromol
3-N	3-Nitrotyrosin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	schematische Darstellung einer extrakorporalen Zirkulation mit Herz-Lungen-Maschine
Abbildung 2:	schematische Darstellung: Folgen einer Ischämie und Reperfusion auf zellulärer Ebene
Abbildung 3:	mikroskopischer Frontalschnitt des Cornu ammonis, Hippocampus
Abbildung 4:	Anteil des Gesamteiweißes im Blut
Abbildung 5:	prozentualer Anteil des Albumins am Gesamteiweiß im Blut
Abbildung 6:	Leukozyten-Konzentration im Blut
Abbildung 7:	graphische Darstellung der Laktat-Produktion, gemessen im arteriellen Blut
Abbildung 8:	Verhältnis ATP/ADP der Gewebeproben des Hippocampus
Abbildung 9:	HE-Färbung, prozentualer Anteil an Zellen mit Ödem-Bildung an der Gesamtzahl der Zellen pro CA-Region
Abbildung 10:	HE-Färbung, prozentualer Anteil an Zellen mit Eosinophilie des Zytoplasmas an der Gesamtzahl der Zellen pro CA-Region
Abbildung 11:	HE-Färbung, graphische Darstellung des prozentualen Anteils an Zellen mit Pyknose an der Gesamtzahl der Zellen pro CA-Region
Abbildung 12:	HE-Färbung
Abbildung 13:	IHC-Färbung für den Nachweis von AIF, prozentualer Anteil an Zellen mit positiven Zellkern bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen pro CA-Region
Abbildung 14:	IHC-Färbung für den Nachweis von AIF
Abbildung 15:	IHC-Färbung für den Nachweis von HIF 1-alpha, prozentualer Anteil an Zellen mit positiven Zellkern an der Gesamtzahl der Zellen pro CA-Region
Abbildung 16:	IHC-Färbung für den Nachweis von HIF 1-alpha
Abbildung 17:	IHC-Färbung für den Nachweis von 3-Nitrotyrosin, prozentualer Anteil der positiven Zell-Fläche an der Gesamtfläche der Pyramiden-Zellen im Stratum pyramidale
Abbildung 18:	IHC-Färbung für den Nachweis von 3-Nitrotyrosin
Abbildung 19:	IHC-Färbung für den Nachweis von cleaved Caspase 3, prozentualer Anteil an Zellen mit positiven Zellkern an der Gesamtzahl der Zellen pro CA-Region
Abbildung 20:	IHC-Färbung für den Nachweis von cleaved Caspase 3
Abbildung 21:	IHC-Färbung für den Nachweis von Poly-(ADP)-Ribose, prozentualer Anteil an Zellen mit positiven Zellkern an der Gesamtzahl der Zellen pro CA-Region
Abbildung 22:	IHC-Färbung für den Nachweis von Poly-(ADP)-Ribose

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Prävalenz angeborener Herzfehler

Tabelle 2: Versuchsablauf

Tabelle 3: Zubehör für die Operation

Tabelle 4: Medikamente während der Operation

Tabelle 5: Beatmungsparameter

Tabelle 6: Blutgase: Normwerte für Ferkel

Tabelle 7: Elektrolyte: Normwerte für das Schwein

Tabelle 8: Geräte für Histologie

Tabelle 9: Zubehör und Materialien für Histologie

Tabelle 10: Chemikalien für Histologie

Tabelle 11: Lösungen für Histologie

Tabelle 12: Protokoll Einbettautomat

Tabelle 13: Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Tabelle 14: Antikörper für Immunhistochemie

Tabelle 15: Färbeprotokoll AIF

Tabelle 16: Färbeprotokoll HIF 1-alpha

Tabelle 17: Färbeprotokoll cleaved Caspase 3

Tabelle 18: Färbeprotokoll 3-Nitrotyrosin

Tabelle 19: Färbeprotokoll PAR

Tabelle 20: Zubehör für die RP-HPLC

Tabelle 21: Retentionszeiten

Tabelle 22: Vitalparameter, MW $\pm$ SEM (0 Minuten)

Tabelle 23: Vitalparameter, MW $\pm$ SEM (240 Minuten)

Tabelle 24: BGA, MW $\pm$ SEM (0 Minuten)

Tabelle 25: BGA, MW $\pm$ SEM (240 Minuten)

Tabelle 26: arterielle Blutproben: Gesamteiweiß, MW $\pm$ SEM und p-Werte

Tabelle 27: arterielle Blutproben: Albumin, MW $\pm$ SEM und p-Werte

Tabelle 28: arterielle Blutproben: Leukozyten-Konzentration, MW $\pm$ SEM

Tabelle 29: arterielles Blut: Laktatproduktion, MW $\pm$ SEM und p-Werte

Tabelle 30: Verhältnis ATP/ADP für die Gewebeprobe des Hippocampus, MW ± SEM und p-Werte
Tabelle 31: HE-Färbung, Ödem, MW ± SEM und p-Werte
Tabelle 32: HE-Färbung, Eosinophilie, MW ± SEM und p-Werte
Tabelle 33: HE-Färbung, Pyknose, MW ± SEM und p-Werte
Tabelle 34: IHC-Färbung, AIF, MW ± SEM und p-Werte
Tabelle 35: IHC-Färbung, HIF 1-alpha, MW ± SEM und p-Werte
Tabelle 36: IHC-Färbung, 3-Nitrotyrosin, MW ± SEM und p-Werte
Tabelle 37: IHC-Färbung, cleaved Caspase 3, MW ± SEM und p-Werte
Tabelle 38: IHC-Färbung, PAR, MW ± SEM und p-Wert

1 Einführung

Angeborene Herzfehler sind mit eine der häufigsten angeborenen Organfehlbildungen des Menschen. Mit der Entwicklung und Einführung der Herz-Lungen-Maschine im klinischen Alltag können zahlreiche kongenitale Vitien bereits in den ersten Lebensmonaten korrigiert werden. Durch stetige Weiterentwicklungen auf diesem Gebiet verringerte sich insbesondere die Mortalitäts-, aber auch die Morbiditätsrate. Während zu Beginn der Herzchirurgie vor mehr als 50 Jahren das Überleben der häufig sehr jungen Patienten im Fokus stand, treten heute immer mehr Fragen und Prognosen zu Langzeitmorbiditäten in den Vordergrund. Neben funktionellen und physiologischen Aspekten einzelner Organe, wie z.B. des Herzens, der Lunge und der Niere, werden in der Literatur ebenso Studienergebnisse zu etwaigen neurologischen Defiziten nach komplexen kardiochirurgischen Eingriffen, sowie deren Folgen für den Patienten und seinem sozialem Umfeld intensiv diskutiert. Hierbei sind mögliche neurologische Defizite nicht unmittelbar an einem verminderten Intelligenz-Quotienten erkennbar – vielmehr handelt es sich um subtile und kleine Einschränkungen der kognitiven Fähigkeiten, wie z.B. des Erinnerungsvermögens (Heinemann et al. 2014, Bellinger et al. 2011, Calderon et al. 2010).

Eine ständige Optimierung der operativen Strategien, sowie stetige Weiterentwicklungen der verwendeten Technologien reduzieren mögliche Risiken und Komplikationen, die u.U. mit einem kardiochirurgischen Eingriff verbunden sind (Ballweg et al. 2007, Australien Institute of Health and Welfare 2004). Die Untersuchung unterschiedlicher Perfusionstechniken der HLM, das Säure-Basen-Management während des operativen Eingriffes, die intraoperative Thermoregulation des Patienten, pharmakologische Therapiekonzepte, sowie die Auswahl der geeigneten einzelnen Komponenten für die Herz-Lungen-Maschine sind verschiedene Ansätze, um etwaige Schäden einzelner Organe, wie z.B. des Gehirns, weiter zu senken.

1.1 Kinderherzchirurgie

Gemäß einer PAN-Studie (Erfassungszeitraum 2006 bis 2008) treten angeborene Herzfehler mit einer Prävalenz von 1,1 % unter allen Lebendgeborenen in Deutschland auf. Das entspricht ca. 7000 bis 8000 neuen Patientenfällen pro Jahr. Die Fehlbildungen am Herzen und deren Schweregrad werden in drei Gruppen eingeteilt: leichte (61 %), moderate (27 %) und schwere (12 %) kongenitale Vitien. Mit einer Prozentzahl von 48,3 % tritt der Ventrikelseptumdefekt am häufigsten auf, am zweithäufigsten wird mit 15,6 % ein Vorhofseptumdefekt diagnostiziert (Lindinger et al. 2013) (siehe Anhang 8.1.1 Tab. 1).
Operationen der Kinderherzchirurgie werden unterteilt in Palliativ- und Korrektur-Eingriffe, sowie - als ultima ratio - die Transplantation. Palliativ-Eingriffe werden möglichst vermieden und nur dann durchgeführt, wenn primäre Korrekturen mit einem hohen Risiko verbunden sind. Angestrebt wird die Stabilisierung des Kreislaufes mit einer weitgehend kontrollierten Lungendurchblutung. Mithilfe eines palliativen Eingriffes können neben einer verbesserten Hämodynamik weiterhin spätere Korrektur-Eingriffe erleichtert werden (Gerelli et al. 2014). Ein zu geringes Gewicht des Patienten und eine fortschreitende Zyanose sind häufig Indikationen, welche z.B. bei einem bestehenden Ventrikel-Septum-Defekt (auch im Zusammenhang mit der Fallot‘schen Tetralogie) oder bei einem univentrikulärem Herzen mit schwerwiegender Pulmonal-Stenose zu einem Palliativ-Eingriff führen, um eine verbesserte Sauerstoffsättigung zu erreichen (Lizano Santamaria et al. 2015). Laut der *International Society for Heart and Lung Transplantation* werden 14 % aller Herztransplantationen in der Kinderherzchirurgie durchgeführt. In den 90er Jahren waren angeborene Herzfehler mit ca. 76 % die Haupt-Indikation zur Transplantation. Im Jahr 2013 sank dieser Prozentsatz auf 54 % der unter 1-jährigen Patienten (Dipchand et al. 2013). Durch Weiterentwicklungen und verbesserte OP-Techniken, v.a. im Bereich der korrektiven Kinderherzchirurgie unter Verwendung der Herz-Lungen-Maschine, kam es in den letzten Jahrzehnten zu einer veränderten Indikationsstellung. So galt das hypoplastische Linksherz-Syndrom früher als Indikation für eine Herz-Transplantation. Die Therapie dieser angeborenen Herzfehler besteht heutzutage in palliativen und rekonstruktiven chirurgischen Eingriffen (Bailey 2011). Zahlreiche kardiochirurgische Eingriffe zur Korrektur kongenitaler Vitien werden durch den Einsatz der Herz-Lungen-Maschine erst ermöglicht. Weiterentwicklungen der technischen Systeme, u.a. kleinere Komponenten der extrakorporalen Zirkulation mit verbesserter Biokompatibilität und kleinere Schlauchsysteme erleichtern den Einsatz der HLM in der Kinderherzchirurgie (Joubert-Huebner 2005). Die Zahl der korrektiven Operationen in der pädiatrischen Kinderherzchirurgie ist in den letzten Jahren deutlich gestiegen. 2013 wurden 85 % der kardiochirurgischen Operationen zur Behandlung angeborener Herzfehler mit Herz-Lungen-Maschine durchgeführt. Dabei werden möglichst Früh-Korrekturen kongenitaler Vitien angestrebt, d.h. operative Eingriffe erfolgen bereits im Säuglingsalter (Heinemann et al. 2015).

1.2 Herz-Lungen-Maschine

Während der extrakorporalen Zirkulation übernimmt die Herz-Lungen-Maschine die Funktion der Lunge und des Herzens. Mithilfe von Pumpen zirkuliert das Blut des Patienten außerhalb des Körpers in einem künstlichen Kreislauf, wobei der Gasaustausch über einen Oxygenator realisiert wird. Elementare Bestandteile der HLM sind: das venöse Reservoir (mit Blasenfalle), der Oxygenator, mindestens ein oder zwei Pumpen, arterielle Filter und das Schlauchsystem mit einem venösen und arteriellen Teil, sowie die Kardioplegie-Lösung und die Priming-Lösung. Die Verbindung zwischen Patient und Herz-Lungen-Maschine wird über eine venöse und arterielle Kanülierung hergestellt. Die venöse Kanülierung kann über die V. cava superior et inferior erfolgen (bicaval, zwei Kanülen), über den rechten Vorhof oder als cavo-artriale Kanülierung (eine Kanüle, proximaler Anteil im rechten Vorhof und distaler Anteil in der V. cava inferior). Bevor die Ankopplung der HLM mit dem Patienten erfolgen kann, wird das komplette Schlauchsystem mit der Priming-Lösung befüllt. Mit Beginn der extrakorporalen Zirkulation wird das Blut über die natürliche Gravitation (i.d.R. befindet sich der OP-Tisch deutlich höher als die HLM) in das venöse Reservoir geleitet. Zusätzlich enthält diese Komponente der HLM eine Blasenfalle zur Elimination von Luftbläschen. Blut aus dem Koronarsinus, den Pulmonalvenen und dem OP-Gebiet kann durch einen Koronarsauger drainiert und ebenfalls dem venösen Reservoir zugeführt werden. Anschließend erfolgt die Anreicherung des venösen Blutes mit Sauerstoff über einen Oxygenator mit integriertem Wärmeaustauscher. Durch eine oder mehrere Pumpen wird das oxygenierte Blut dem Patienten wieder zugeführt. Die arterielle Kanülierung erfolgt über die Aorta ascendens. Bei Re-Eingriffen werden u.U. auch die A. femoralis und selten die A. iliaca kanüliert. Der arterielle Teil des Schlauchsystems der HLM enthält Mikroporenfilter (arterielle Filter): Dadurch können u.a. Zell- und Gewebetrümmer, Thrombozytenaggregate, Luftbläschen und Mikropartikel aus dem Blut eliminiert werden, bevor es erneut in den Kreislauf des Patienten gelangt. Die Kardioplegie-Lösung induziert den künstlichen Herzstillstand und wird i.d.R. über eine Sonder-Kanüle direkt in die Aortenwurzel injiziert (siehe Abb. 1). Während der HLM-Zeit ist die Heparinisierung des Blutes obligat. Das intraoperative Monitoring beinhaltet u.a. die Kontrolle der Blutgerinnung, des Hämatokrit-Wertes, des Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxid-Partialdruckes, des Säure-Basen-Haushalts, des Elektrokardiogrammes, des mittleren arteriellen Blutdruckes, des zentralvenösen Druckes, der Körpertemperatur, des Elektrolyt-Haushaltes und der Urin-Produktion. In der Kinderherzchirurgie erfolgt zudem ein neurozerebrales Monitoring mittels Nahinfrarotspektroskopie (*near infrared spectroscopy* - NIRS) zur Messung der regionalen Sauerstoffsättigung. (Schmid 2006, Abdul-Khaliq et al. 2005, Weitkemper 2005).

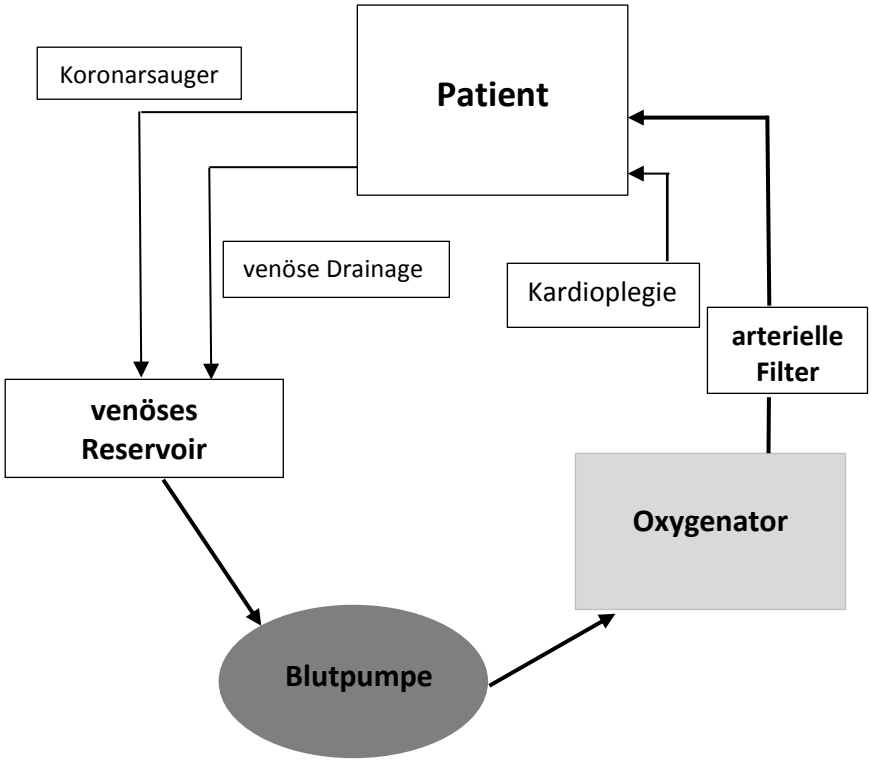

Abbildung 1: schematische Darstellung einer extrakorporalen Zirkulation mit Herz-Lungen-Maschine

Zu Beginn des klinischen Einsatzes der Herz-Lungen-Maschine wurden Film- und Bubble-Oxygenatoren verwendet. Seit nahezu 2 Jahrzehnten werden im klinischen Alltag fast ausschließlich Membran-Oxygenatoren genutzt (Haworth 2003). Vorteile dieses Typs sind: kleineres Priming-Volumen bei ausreichend großer Fläche für einen suffizienten Gasaustausch, geringere Hämolyse-Rate und geringere postoperative Morbiditäten (Herzleistung, respiratorische und renale Funktion weniger stark beeinträchtigt) (Iwahashi et al. 2004, Nilsson et al. 1990). Das Prinzip der mikroporösen Hohlfaser-Membran-Oxygenatoren besteht darin, dass das Blut außen im Gegenstrom entlang der Hohlfasern (enthalten ein Sauerstoff-Luftgemisch) geleitet wird und über Diffusion ein Gasaustausch stattfindet. Integrierte Wärmeaustauscher ermöglichen über das physikalische Prinzip des Wärmedurchgangs eine Thermoregulation des Blutes: Entlang eines Trennsystems fließt das Blut in Gegenrichtung zur Wasserströmung (Dramburg et al. 2005). Nachteile der Membran-Oxygenatoren sind: die Entstehung von gasförmigen Mikrobläschen, ein Druckabfall und hämodynamische Energieverluste, wobei die Intensität dieser Beobachtungen von Modell zu Modell differieren (Dogal et al. 2012, Guan et al. 2009).

Die Priming-Lösung dient der Entlüftung der Herz-Lungen-Maschine. In der Kinderherzchirurgie wird ein Volumen von 350 bis 1000 ml benötigt, um eine Einheit vollständig zu befüllen. Das initiale Füllvolumen setzt sich häufig zusammen aus u.a. Ringer-Lösung, Natriumbikarbonat, Mannitol und Albumin (5 bis 20 %). Die Priming-Lösung bei Neugeborenen beinhaltet im Gegensatz zum adulten

Patienten zusätzlich Vollblut oder *fresh frozen plasma* (FFP), wobei die Blutprodukte nicht älter als 48 Stunden sein dürfen. Infolge des Primings kann es zu einer Hämolyse im Kreislauf des Patienten kommen. Die Zugabe von FFP zu der Priming-Lösung führt zu einer postoperativ besseren hämodynamischen Stabilität (Lee et al. 2013, Joubert-Huebner 2005).

Ebenso gibt es interinstitutionell Unterschiede bezüglich der verwendeten Kardioplegie-Lösung in der Kinderherzchirurgie. Als Standard-Verfahren hinsichtlich der Myokardprotektion werden in der Regel eine Hypothermie des Patienten und die Verwendung einer kalten kristalloiden Kardioplegie kombiniert (Born 2005). Seit einigen Jahren gibt es auch Untersuchungen zur Verwendung warmer Blut-Kardioplegien im Zusammenhang mit einer Normothermie während der extrakorporalen Zirkulation in der Kinderherzchirurgie (Poncelet et al. 2011, Durandy et Hulin 2007, Pouard et al. 2006). Bisher konnte keine eindeutige Überlegenheit der einen oder anderen Methode dargestellt werden.

Kristalloide Kardioplegie-Lösungen werden nach extra- und intrazellulärem Wirkprinzip unterschieden. Extrazelluläre Kardioplegien bewirken durch eine hohe Konzentration von Kalium eine dauerhafte Depolarisation der Zellmembran der Herzmuskelzellen, wodurch ein künstlicher Herzstillstand induziert wird (z.B. St.Thomas-Lösung). Die Wirkung der intrazellulären Kardioplegie (z.B. Custodiol) beruht auf einem Absenken der extrazellulären Natrium-Konzentration auf intrazelluläre Werte und erhöhte extrazelluläre Kalium-Konzentrationen. Infolge dessen kommt es zu einer Hyperpolarisation und anschließendem Herzstillstand. Die Anforderungen an eine Kardioplegie-Lösung sind: Auslösen eines sofortigen Herzstillstandes, um den Energieverbrauch der Herzmuskelzellen maximal zu reduzieren; es sollten Substrate für die Energiegewinnung während der Ischämiephase enthalten sein; Puffer-Substrate, aufgrund der anaeroben Azidose während der Ischämiephase und Substanzen für die Membranstabilisierung der Herzmuskelzellen (Born 2005). Custodiol – Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung nach Bretschneider (kristalloide Kardioplegie mit intrazellulärem Wirkprinzip) – enthält u.a. Histidin als Puffer, Ketoglutarat für eine verbesserte Energiegewinnung während der Reperfusionsphase, Tryptophan zur Membranstabilisierung und Mannitol als Radikalfänger (Bretschneider 1980).

Elementarer Bestandteil der Herz-Lungen-Maschine ist die Blutpumpe. Grundsätzlich kann man zwischen Verdrängungspumpen und Zentrifugalpumpen unterscheiden. Der Transport des Blutes bei Verdrängungspumpen erfolgt mittels Bewegung von Rollen, Stempeln oder Kolben, während bei Zentrifugalpumpen durch Rotation dieser, kinetische Energie auf das Blut übertragen wird. Die am häufigsten verwendete Pumpe ist die Rollerpumpe nach De Bakey (1934) (Boettcher et al. 2003). Mittlerweile gibt es zahlreiche Modifikationen (u.a. Einfach- oder Doppel-Rollerpumpen), jedoch ist das grundlegende Prinzip des Bluttransportes in allen Modellen gleich. In einem annähernd halbkreisförmigen Gehäuse wird der Schlauch fixiert und durch Rotation des Pumpenarms, an dessen Ende zylindrische Kolben befestigt sind, rhythmisch komprimiert. Vor und hinter den Rollen können im

Schlauch kleine Turbulenzen im Blut entstehen, was letztendlich zu einer Hämolyse führt. Die Verwendung von Zentrifugal-Pumpen wird mit einer geringeren Hämolyse-Rate assoziiert (Byrnes et al. 2011, Schmid 2006, Lauterbach 2002). Andere Studiengruppen hingegen konnten eine höhere Komplikationsrate (u.a. auch eine vermehrte Hämolyse) bei Einsatz der Zentrifugalpumpen beobachten (Barrett et al. 2013). Das Risiko für die Entstehung von gasförmigen Mikrobläschen ist bei Verwendung von Rollerpumpen höher als bei Zentrifugalpumpen. Jedoch produzieren diese Verdrängungspumpen eine höhere hämodynamische Energie (Yee et al. 2010). Die Vorteile der Rollerpumpe liegen weiterhin bei dem einfachen technischen Aufbau und der problemlosen klinischen Anwendung. Das generierte Flussmuster entspricht einer Mitteldruck-Kurve, sodass für das Herstellen eines pulsatilen Flusses eine technische Aufrüstung der Pumpe erfolgen muss (Weitkemper et al. 2005).

1.3 Pathophysiologie der Herz-Lungen-Maschine

1.3.1 Inflammationsreaktion

Der Kontakt des Blutes mit Fremdoberflächen, der auf die Blutbestandteile einwirkende mechanische Stress und das operative Trauma an sich sind wesentliche Ursachen für die Entstehung einer Entzündungsreaktion infolge des kardio-pulmonalen Bypasses (Baehner et al. 2012, Suleimann et al. 2008). In einigen Fällen kann sich eine Inflammationsreaktion einzelner Organe oder Gewebe letztendlich im gesamten Organismus als *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) manifestieren und zu einem Multi-Organversagen führen (Kunes et al. 2007). In einer retrospektiven Studie von Soares et al. 2010 entwickelten 21,9 % der unter 3-jährigen Patienten ein SIRS, wobei als prädisponierende Faktoren ein geringes Körpergewicht und längere HLM-Zeiten benannt werden konnten. Die Entzündungsreaktion setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen und wird sowohl durch zelluläre Elemente als auch durch lösliche Proteine realisiert (Esper et al. 2014, Laffey et al. 2002).

Der mechanische Pumpvorgang für den Transport des Blutes durch die HLM resultiert in einer veränderten Hämodynamik, d.h. die einwirkenden Scherkräfte können mitunter zu einer Zerstörung der Zellen führen. Durch die deformierten oder irreversibel zerstörten Erythrozyten kann es zu einer Hämolyse kommen (Ensminger 2006, Vogt et al. 2005).

In der Regel besteht das Schlauchsystem der HLM aus Kopolymeren (PVC, Polyurethan). Diese Materialien gelten als blutinkompatibel und fördern eine Thrombozyten-Adhäsion, -Aktivierung und -Aggregation. Eine Aktivierung der Thrombozyten verursacht u.a. Gerinnungsstörungen und

Koagulopathien nach Einsatz der HLM. Neben Thrombozyten haften weiterhin Plasmaproteine an der künstlichen Oberfläche des Schlauchsystems und können denaturieren. Dieser Vorgang ist selbstlimitierend, hat aber zur Folge, dass es zu einer Flüssigkeitsverschiebung im Blut des Patienten durch den Verlust von Proteinen und Thrombozyten kommen kann – man spricht von einem Kapillarleck-Syndrom (Ensminger 2006).

Die Veränderungen des Blutflusses während der extrakorporalen Zirkulation, die Hämodilution und der Kontakt des Blutes mit den künstlichen Oberflächen der Herz-Lungen-Maschine aktiviert neben Thrombozyten auch polymorphkernige Leukozyten (PMNL). Adhäsionsmoleküle wie P- und E-Selektine der Endothelzellen interagieren mit L-Selektinen der Neutrophilen (*rolling*). Nachdem Vorgang des *rolllings* entlang der Endothelzellen und anschließender Adhäsion, kommt es zur Migration der Leukozyten in die Zellen (Diapedese). Dieser Prozess wird chemotaktisch durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), vasoaktiven Substanzen (Histamine, Serotonin), Plasma-Proteinen, Arachidonsäure-Metaboliten, Zytokinen, plättchenaktivierenden Faktor und Nitritoxid gefördert. Im aktivierten Zustand exprimieren Leukozyten zahlreiche Proteasen, wie z.B. Phospholipase A_2, Elastase und Myeloperoxidase. Dies führt zur Schädigung der Zellmembranen und erhöhter Membranpermeabilität. Phospholipase A_2 aktiviert Arachidonsäure und somit die Bildung von Leukotrienen, Prostaglandinen und Thromboxanen. Aktivierte neutrophile Granulozyten bilden weiterhin in der Phase der Reperfusion mithilfe von molekularen Sauerstoff Superoxid-Anion. Die in Leukozyten exprimierte Myeloperoxidase katalysiert die Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Chlorid. Es entsteht hypochlorige Säure, wodurch zahlreiche zelluläre Bestandteile beeinflusst werden. U.a. kann es zur Peroxidation von Phospholipiden und Lipoproteinen kommen (Laffey et al. 2002, Schuster et Müller-Werdan 2000, Panasenko 1997, Panasenko et al. 1995).

Trotz der Heparinisierung während der extrakorporalen Zirkulation kommt es zu einer Aktivierung der extrinsischen und intrinsischen Gerinnungskaskade infolge der Expression von Gewebefaktor auf den Endothelzellen, aber auch zur Fibrinolyse. Der Schlauchkontakt des Blutes aktiviert die Umwandlung von Faktor XII zu XIIa und führt zur Entstehung von Thrombin bis hin zur Fibrin-Bildung. Als Gegenregulation zur Blutgerinnung wird ebenso die Fibrinolyse aktiviert, wobei zwischen diesen beiden Vorgängen durch die extrakorporale Zirkulation ein Ungleichgewicht herrscht – es also zu verstärkten Blutungen, aber auch vermehrten Koagulum-Bildungen kommen kann (Ensminger 2006, Laffey et al. 2002).

Das Komplement-System und das Kinin-Kallikrein-System werden infolge der Kontaktfläche Blut/Schlauchsystem der HLM ebenso aktiviert. Wie bereits erwähnt erfolgt die Umwandlung von Faktor XII zu XIIa. Zusammen mit hochmolekularen Kininogen (HMK) wird aus Präkallikrein Kallikrein gebildet. Kallikrein selbst besitzt eine positive Rückkopplung zum Faktor XII. Weiterhin wird die Freisetzung von Bradykinin angeregt, welches an Endothelzellen binden kann und zur Bildung von

Prostaglandinen und Nitritoxid beiträgt. Es kommt zu einer Vasodilatation und zu einer erhöhten Permeabilität. Dadurch gelangen Proteine und neutrophile Granulozyten schneller in das Gewebe (Ensminger 2006, Kozik et Tweddell 2006).

Die Aktivierung der Komplement-Kaskade kann über mehrere Wege erfolgen: Plasmin als Bestandteil der Fibrinolyse fördert die Bildung von C3a aus C3, Kallikrein die Bildung von C5a aus C5 und Faktor XII fördert die Komplentkaskade auf dem klassischen Weg. C4a, als Bestandteil des klassischen Weges, wird zusätzlich durch die Bildung von Heparin-Protamin-Komplexen aktiviert. Letztendlich führt die ablaufende Komplementkaskade zur Freisetzung von ROS, lysosomalen Enzymen und Interleukinen aus neutrophilen Granulozyten, sowie Freisetzen von vasoaktiven und permeabilitätssteigender Substanzen aus Mastzellen und basophilen Granulozyten (Ensminger 2006, Kozik et Tweddell 2006, Laffey et al. 2002).

Infolge der Komplement-Aktivierung wird die Produktion von Zytokinen stimuliert. Eine wichtige Rolle spielen die proinflammatorischen Zytokine TNF-alpha, Interleukin (IL)-1, IL-6 und IL-8 und die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-1ra. Zu Beginn der HLM-Zeit können vordergründig IL-1 und TNF-alpha nachgewiesen werden, während IL-6 und IL-8 am Ende des kardiopulmonalen Bypasses verstärkt exprimiert werden. Aufgabe der Zytokine ist es, Leukozyten chemotaktisch anzulocken. Wiederum sezernieren aktive Leukozyten u.a. Zytokine, es besteht also eine synergistische Wirkung zwischen diesen beiden Komponenten (Ensminger 2006, Kozik et Tweddell 2006, Laffey et al. 2002).

1.3.2 Ischämie

Während der extrakorporalen Zirkulation kann es aufgrund der unphysiologischen Perfusion, verursacht durch die Herz-Lungen-Maschine, in verschiedenen Geweben teilweise zu einer inadäquaten Durchblutung kommen. Unter Umständen kann ebenfalls eine vorübergehende Hypoxie entstehen. Eine Hypotension, der Verlust der zerebralen Autoregulation durch Abfall des mittleren arteriellen Blutdruckes und die Hämodilution erhöhen das Risiko für einen ischämischen Schaden im Gehirn - besonders bei Kleinkindern von unter 4 Jahren (Brady et al. 2010, Mathew et al. 2007, Hayashida et al. 2004).

Auf zellulärer Ebene können folgende Prozesse infolge eines verminderten Sauerstoffangebots vorangetrieben werden:

Wird einer Zelle nicht genügend molekularer Sauerstoff als Substrat für die Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien zur Verfügung gestellt, sistiert die Bildung des Energieträgers ATP. Die Stoffwechselprozesse innerhalb der Zelle werden von aerober auf anaerobe Glykolyse umgestellt. Während durch die aerobe Glykolyse 32 mol ATP gebildet werden, können

sauerstoffunabhängig nur 2 mol ATP entstehen (Folkerts 2005). Die vermehrte Bildung von Laktat, als eines der Endprodukte der anaeroben Glykolyse und der Abbau des energiereichen ATP zu Hypoxanthin fördern eine Azidose innerhalb der Zelle. Durch das Energiedefizit kommen wichtige intrazelluläre, sowie membranständige Transport-Prozesse zum Erliegen. Ein wichtiger Transportprozess ist die ATP-abhängige Natrium-Kalium-Pumpe – kann diese ihre Funktion nicht mehr ausführen, kommt es zu einem intrazellulären Anstieg von u.a. Natrium. Mit der Aktivierung des Natrium-Protonen-Austauschers (im Austausch gegen Natrium werden Protonen aus der Zelle ausgeschleust) soll einem weiteren Abfallen des intrazellulärem pH-Wertes entgegengewirkt werden. Dies führt zu einer Akkumulation von Natrium innerhalb der Zelle, wodurch ein weiterer Transportprozess aktiviert wird. Der Natrium-Calcium-Austauscher transportiert Natrium-Ionen im Austausch gegen Calcium wieder in den Extrazellularraum. Folglich kann es zu einer zytotoxischen Akkumulation von Calcium innerhalb der Zelle kommen (Song et al. 2014, Suleimann et al. 2008, Van Emous et al. 1998). Die fortschreitende Dysregulation der Transportprozesse, u.a. auch des Natrium-Kalium-Chlorid-Co-Transporters, zwischen Intra- und Extrazellularraum bewirkt ein osmotisches Konzentrationsgefälle mit Einstrom von Wasser in die Zelle und nachfolgender Ödem-Bildung. Das Anschwellen der Zelle ist lichtmikroskopisch sichtbar (Dreier et al. 2013, Chen et Sun 2005). Eine massive intrazelluläre Akkumulation von Calcium triggert die Bildung von Nitritoxid, freien Sauerstoffradikalen, Freisetzung von Proteasen, Lipidperoxidation und DNA-Fragmentierung. Weiterhin werden Phospholipase A_2 und Calpain aktiviert (Silveira et Yoshida 2004, Kristián et Siesjö 1997). Die Expression des Faktors HIF 1-alpha ist eine Reaktion der Zellen auf eine Minder-Durchblutung und reduziertem Sauerstoffangebot. Unter physiologischen Bedingungen wird HIF 1-alpha im Zytoplasma kontinuierlich exprimiert aber auch über den Ubiquitinase-Weg rasch wieder abgebaut. Bei ungenügendem Sauerstoffangebot für die Zelle akkumuliert HIF 1-alpha und wandert in den Zellkern, wo es mit der HIF 1-beta Untereinheit den Hypoxie-induzierten Faktor 1 bildet (Kunes et al. 2007, Semenza 2000). Dieser Transkriptionsfaktor aktiviert wiederum die Bildung verschiedener Faktoren, mit dem Ziel die Sauerstoffversorgung der Zelle zu optimieren. U.a. werden Erythropoetin, VEGF und Nitritoxid gebildet, um die Vaskularisation des Gewebes und eine Vasodilatation für eine bessere Durchblutung zu fördern (Bernaudin et al. 2002).

1.3.3 Reperfusion

In der Phase der Reperfusion erfolgt die Wiederherstellung der physiologischen Durchblutung für den Organismus. Die erneute Versorgung des Gewebes mit ausreichend Sauerstoff, das zuvor ischämisch geschädigt wurde, führt zu einer verstärkten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und intensiviert die

Inflammationsreaktion. Eine Calcium-Überladung der Zelle und die vermehrte Entstehung von ROS und reaktiver Stickstoffspezies (RNS) charakterisieren einen Reperfusionsschaden (Sanada et al. 2011, Prasad et al. 2009, Gürsoy-Özdemir et al. 2004).

Calcium-abhängige Proteasen verändern die Spezifität der Xanthin-Dehydrogenase, wodurch Xanthin-Oxidase entsteht. Diese wiederum katalysiert die Reaktion von Hypoxanthin mit molekularen Sauerstoff, sodass neben Harnsäure ebenfalls Superoxid-Anion entsteht (Chung et al. 1997, McCord 1987). In einem weiteren Schritt wird über eine Spontan-Reaktion oder, katalysiert über die Superoxid-Dismutase, aus Superoxid-Anion Wasserstoffperoxid gebildet. Bei einer massiven Akkumulation kann das in der Zelle vorhandene Wasserstoffperoxid nicht über die Glutathion-Peroxidase, bzw. Katalase abgebaut werden, sondern generiert über die Haber-Weiss-Reaktion (katalysiert über die Fenton-Reaktion) weitere reaktive Sauerstoffspezies in Form von Hydroxl-Radikalen (Amantea et al. 2009, Kehrer 2000). ROS können die Permeabilität der Mitochondrien-Membran verändern, indem *mitochondrial permeability transition pores* (mPTP) geöffnet werden. Dadurch gelangen noch mehr, in den Mitochondrien gebildete, reaktive Sauerstoffspezies in das Zytoplasma, wo sie wiederum das Öffnen der mPTP weiter vorantreiben (Zakkar et al. 2015). Die massive Bildung von ROS kann dazu führen, dass aus dem physiologisch in Neuronen vorkommenden Nitritoxid und Superoxid-Anion Peroxynitrit (reaktive Stickstoffspezie) entsteht. In der Folge werden Protein-Reste, wie z.B. Tyrosin im Zytosol nitrosyliert und es entsteht 3-Nitrotyrosin – ein Marker für nitrosativen, bzw. oxidativen Stress (Yamaguchi et al. 2015, Lu et Gong 2009, Beckmann et Koppenol 1996). Neben der Bildung von 3-Nitrotyrosin wird in der Zelle durch ROS und RNS ebenso Poly-(ADP)-Ribose-Polymerase 1 aktiviert (van Wijk et Hagemann 2005). Eine Überladung der Zelle mit reaktiven Sauerstoff-, bzw. Stickstoffspezies führt zu Lipid- und Protein-Peroxidation und Schäden an der DNA (Vanlangenakker et al. 2008). Die geschädigten Zellen weisen eine erhöhte Durchlässigkeit der Mitochondrien-Membran auf, sodass der Transkriptionsfaktor AIF aus den intermembranösen Räumen des Mitochondriums in das Zytosol und anschließend in den Zellkern transloziert, wo die DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation gefördert werden (Lorenzo et al. 1999, Candé et al. 2002). Besonders in Neuronen spielt der Apoptose-induzierende Faktor (AIF) eine wichtige Rolle für die Einleitung des programmierten Zelltodes (Zhu et al. 2007, Norberg et al. 2008, Cao et al. 2007). Durch Schäden an der DNA im Nukleus werden in der Zelle Reparaturmechanismen in Gang gesetzt – u.a. wird Poly-(ADP)-Ribose-Polymerase 1 (PAR(P)-1) aktiviert. Eine vermehrte Expression von PAR(P)-1 ist mit einem sehr hohen Energie-Verbrauch von ATP und NAD^+ verbunden. Die negative Energie-Bilanz der Zelle wird somit weiter verschlechtert und es kann zum nekrotischen Untergang der Zelle kommen (Sairanen et al. 2009, Virág 2005). Andere Autoren wiederum beschreiben den Untergang der Zelle infolge einer massiven PAR(P)-1-Aktivierung mit hohem Energieverbrauch als apoptose-ähnlich – als den sogenannten Parthanatos-Weg (Galluzzi et al. 2012, Wang et al. 2011). Einige Studien diskutieren,

ob ein Zusammenhang zwischen der nukleären Translokation von AIF und der Aktivität von PAR(P)-1 existiert (Virág 2005, Yu et al. 2002). Die Studie von Yu et al. aus dem Jahr 2006 fand heraus, dass Poly-(ADP)-Ribose (PAR) im Zellkern (entstanden bei einer übermäßigen Aktivität von PAR(P)-1) an AIF bindet und die Freisetzung des Apoptose-induzierenden Faktors aus dem Mitochondrien weiter vorantreibt. Laut einer Studie von Gerace aus dem Jahr 2014 führt PAR zu einem vermehrten Einstrom von Calcium durch die Aktivierung unselektiver Kationen-Kanäle. Diese Autoren beschreiben weiterhin, dass in der CA1-Region des Hippocampus die Aktivität von PAR(P)-1 die Exprimierung von Calcium-permeablen AMPA-Rezeptoren fördert. NMDA- und AMPA-Rezeptoren wiederum fördern den Einstrom von Calcium in das Zytosol des Neurons und werden durch den Neurotransmitter Glutamat aktiviert. Ein Mangel an ATP mit Sistieren der Natrium-Kalium-ATPase führt zu einer vermehrten Aktivierung der Glutamat-Rezeptoren und zu einem toxischen Anstieg der intrazelllulären Calcium-Konzentration. Dieser Mechanismus wird als Glutamat-induzierte Exzitotoxizität bezeichnet (Dong et al. 2009, Kontos 2001, McConkey 1998).

Wie bereits erwähnt führen hohe Konzentrationen von Calcium im Zytoplasma u.a. zu einer vermehrten Durchlässigkeit der Mitochondrien-Membran. Die Freisetzung von AIF und deren Folgen wurden bereits erläutert. Weiterhin kann es zum Übertritt von Cytochrom c in das Zytoplasma kommen – wodurch die caspase-abhängige Apoptose aktiviert werden kann. Inaktive Procaspase 3 wird durch Cytochrom c zu cleaved Caspase 3 aktiviert (Yuan et al. 2003). Aktive, also cleaved Caspase 3, transloziert in den Zellkern und zeigt im weiteren Verlauf der Apoptose eine Akkumulation in diesem Zellkompartiment (Kamada et al. 2005). Neben Chromatin-Kondensation und DNA-Fragmentierung wird durch cleaved Caspase 3 u. a. die Bildung von membranös umschlossenen Zellfragmenten (apoptotic bodies) vorangetrieben (Porter et Jänicke 1999). Caspasen sind wichtige Mediatoren des programmierten Zelltodes, werden Neuronen akut geschädigt (Eldadah et Faden 2000). Zahlreiche Studien verwenden den Faktor cleaved Caspase 3, um apoptotische Zellen im Gewebe des Hippocampus nachzuweisen, die auf einen hypoxisch-ischämischen Schaden zurückzuführen sind (Takada et al. 2015, Ness et al. 2008, Plesnila 2004).

Zusammenfassend kann ein möglicher Reperfusionsschaden zu folgenden Prozessen auf zellulärer Ebene führen: Ein intrazellulärer Anstieg der Calcium-Konzentration fördert die Entstehung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies. Die Zellen werden oxidativen, bzw. nitrosativen Stress ausgesetzt. Über zahlreiche biochemische Prozesse können Zellen der Apoptose (caspase-abhängig, caspase-unabhängig, Parthanatos-Weg) zugeführt werden (siehe Anhang 8.1.2, Abb. 2). In Neuronen, welche Glutamat als Neurotransmitter verwenden, kann es zu einer Glutamat-induzierten Exzitotoxizität kommen. ROS fördern weiterhin die Inflammationsreaktion.

1.4 Herz-Lungen-Maschine und Folgen für das Gehirn

Schäden des Gehirns können direkt nach der chirurgischen Korrektur des kongenitalen Herzfehlers mit Herz-Lungen-Maschine auftreten oder sich erst in der späteren Kindheit und Jugend, bzw. im Erwachsenenalter manifestieren (Kirkham 1998). *The American College of Cardiology* und *The American Heart Association* unterscheidet zwischen zwei Formen des Gehirnschadens nach extrakorporaler Zirkulation. Als Typ 1 gelten schwerwiegende Verletzungen, wie z.B. Hirninfarkt, transitorische ischämische Attacken oder fatale zerebrale Verletzungen (u.a. Blutungen). Schäden des Gehirns vom Typ 1 treten seltener auf. Unter dem Typ 2 eines möglichen Gehirn-Schadens nach extrakorporaler Zirkulation werden postoperative neurokognitive Dysfunktionen zusammengefasst (Eagle et al. 1999).

Neurologische Auffälligkeiten, welche mittels Elektroenzephalogramm (EEG) detektiert werden können einen Hinweis auf einen akuten Schaden des Gehirns infolge eines kardiochirurgischen Eingriffes sein. In einer prospektiven Studie (HLM-Zeit 60 Minuten, moderate Hypothermie) wurden bei 68 Neugeborenen prä- und postoperative EEG-Messungen ausgewertet. Die postoperativ mittels EEG aufgezeichneten neurologischen Auffälligkeiten traten mit einer niedrigen Inzidenz von 1,5 % auf (Andropoulos et al. 2010).

In einer retrospektiven Studie wurden die Ergebnisse von 74 Patienten (mittleres Alter 9 Jahre) nach Korrektur des kongenitalen Herzfehlers (HLM-Zeit ca. 110 Minuten, moderate Hypothermie) ausgewertet und mit einer Kontrollgruppe verglichen. Perioperative neurologische Auffälligkeiten traten mit einer Inzidenz von 6,8 % auf, wobei die meisten Veränderungen bereits präoperativ diagnostiziert wurden. Zusätzlich wurden in dieser Studie unterschiedliche Tests zur Einschätzung der Intelligenz und zur Erfassung der motorischen Leistungsfähigkeit durchgeführt. Im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe erzielten die Kinder mit korrigiertem Herzfehler niedrigere Punktwerte. Alle Ergebnisse blieben jedoch im angegebenen Normalbereich. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass neurologische Dysfunktionen mit einem Prozentsatz von 20 % in dieser Studie auftraten (Karl et al. 2004).

Bellinger und Mitarbeiter untersuchten in einer prospektiven Studie ca. 160 Patienten (mittleres Alter 8 Jahre) nach Korrektur eines kongenitalen Herzfehlers. Es wurden standardisierte Tests zur Ermittlung der Intelligenz, Lernfähigkeit, Problem-Lösung, visuell-räumlichen und visuell-motorischen Fähigkeiten, der Feinmotorik und der Aufmerksamkeit, sowie neurologische Untersuchungen durchgeführt. Neurologische Veränderungen traten mit einem Prozentsatz von 64 % auf und waren mit einer Einschränkung der neurokognitiven oder motorischen Fähigkeiten verbunden (Bellinger et al. 2003). Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte 139 dieser Patienten 8 Jahre später erneut (mittleres

Alter 16 Jahre). Die Ergebnisse der standardisierten Tests blieben erneut unter den erwarteten Werten (Bellinger et al. 2011).

In einer prospektiven Studie von Sananes et al. (2012) wurden 106 Patienten jeweils im Alter von 8, 12 und 24 Monaten untersucht. Die Ergebnisse zeigten ebenfalls Einschränkungen der Grob-und Feinmotorik, der kognitiven und Sprach-Entwicklung nach erfolgtem kardiochirurgischen Eingriff.

Langzeitmorbiditäten nach Korrektur angeborener Herzfehler, wie subtile Verzögerungen/ Störungen der neurologischen und kognitiven Entwicklung werden in der Literatur mit einer Inzidenz von 20 - 64 % angegeben (Karl et al. 2004, Bellinger et al. 2003). Diese Langzeitfolgen können charakterisiert sein, durch: Störungen der Fein-und Grobmotorik, der visuell-motorischen integrativen Funktion, einem reduzierten Erinnerungsvermögen und durch Aufmerksamkeitsdefizite. Daraus folgen u.U. verminderte schulische Leistungen und ein geringeres Selbstbewusstsein. Trotz Hinweisen für verzögerte Lernfähigkeiten, Konzentrationsschwäche und Hyperaktivität gibt es keine Differenzen bezüglich des Intelligenz-Quotienten zwischen den Patienten und gesunden Kindern (Calderon et al. 2010, Nieminen 2003).

Die Entstehung von neurologischen und kognitiven Störungen ist multifaktoriell, d.h. sowohl prä-, intra-, als auch postoperative Faktoren haben Einfluss, wobei der chirurgische Eingriff an sich die Hauptursache darstellt (Ballweg 2007, Hsia et Gruber 2006). Zu den präoperativen Faktoren zählen u.a. eine genetische Prädisposition (Polymorphismus des Apolipoprotein E (Gaynor et al. 2003)), genetische Syndrome (u.a. Trisomie 21, DiGeorge-Syndrom oder 22q1L-Deletion (Williams et Ramamoorthy 2007)) und pränatale Faktoren (veränderter zerebraler Gefäßwiderstand in uteri bei bestehenden kongenitalen Herzfehler (Kaltmann et al. 2005)). Kongenitale Herzfehler, welche zu einer Zyanose des Patienten führen, können das Risiko für neurologische Dysfunktionen steigern (Wright et al. 1994).

Postoperativ können Symptome, wie z.B. das *low-cardiac-output*-Syndrom die Perfusion des Gehirns erheblich beeinträchtigen (Ungerleider et al. 2004). Postoperative Hypoxie und Hypotension, sowie verlängerte Operations-Zeiten können Ursachen für eine periventrikuläre Leukomalazie (Nekrose der weißen Substanz) sein, wodurch Aufmerksamkeitsdefizite und eine verzögerte Entwicklung entstehen können (Galli 2004). Weiterhin beeinflussen die Komplexität des angeborenen Herzfehlers an sich, der Schwierigkeitsgrad des chirurgischen Eingriffes, postoperative Komplikationen und ein längerer Krankenausaufenthalt eine verzögerte neurologische Entwicklung (Sananes et al. 2012).

1.5 Neuroprotektive Strategien

Die älteste und effektive Methode zum Schutz der Neuronen ist die Durchführung einer Hypothermie. Mit Absinken der Körpertemperatur wird die Metabolismus-Rate gesenkt und somit auch der Sauerstoffbedarf des Gewebes, sowie die Ischämie-Toleranz im Gewebe erhöht. Zerebrale Schäden können mit Anwendung einer moderaten Hypothermie (25-32 °C) während des kardio-pulmonalen Bypasses reduziert, aber nicht verhindert werden (Nelson et al. 2008, Böttger 2005). Wird die Temperatur um 10 °C reduziert, vermindert sich die zerebrale Sauerstoffumsatzrate ($CMRO_2$) um den Faktor 2,2 bis 2,4. Das bedeutet, dass die Ischämietoleranz des Gehirns bei 27 °C auf ca. 10 Minuten ansteigt (bei 37 °C beträgt die Ischämietoleranz ca. 5 Minuten) (Tzanova et Kerz 2012).

Empfehlungen bezüglich des Säure-Basen-Managements sind sehr variabel. Es existieren 2 Methoden für die Einstellung und Überwachung des pH-Wertes – die alpha-stat-Methode (konstant pH von 7,4 gemessen bei 37 °C) und die pH-stat-Methode (pH von 7,4 auch bei jeder Temperatur). In einer prospektiven, randomisierten Studie (182 pädiatrische Patienten, HLM mit tiefer Hypothermie) wurden beide Varianten miteinander verglichen. Bei Anwendung der pH-stat-Methode traten weniger postoperative Morbiditäten auf und die Dauer des Krankenhausaufenthalts verkürzte sich (du Plessis et al. 1997). Bei Anwendung der pH-stat-Methode muss dem Organismus intraoperativ konstant Kohlenstoffdioxid zugeführt werden. Hingegen folgt die alpha-stat-Methode der natürlichen Verschiebung der Sauerstoffdissoziationskurve und bewahrt den intrazellulären pH-Wert (Griffin 2005). In einer prospektiven, randomisierten Langzeit-Studie von Bellinger et al. (2001) konnte kein Einfluss auf die psychomotorische Entwicklung der Patienten durch eine der beiden Methoden festgestellt werden. Nelson und Mitarbeiter (2008) empfahlen neben einem pH-stat-Management, einen Pumpenfluss von 150 ml/kg/min, Hämatokrit-Werte zwischen 30-35 % und ein zerebrales intraoperatives Monitoring mittels Nahinfrarotspektroskopie (*near infrared spectroscopy* - NIRS) und transkranieller Doppler-Sonographie (TCD) für die Überwachung der zerebralen Sauerstoffsättigung und zerbralen Blutflussgeschwindigkeit in der Kinderherzchirurgie. Halstead und Mitarbeiter (2005) kamen in ihrer experimentellen Studie am Schweinemodell (HLM-Zeit 90 Minuten, moderate Hypothermie) zu dem Ergebnis, das mit einem alpha-stat-Management der zerebrale Blutfluss sinkt, jedoch die zerebrale Autoregulation erhalten bleibt.

In einer experimentellen Studie (Ferkelmodell) von Salameh et al. (2015a) konnten neuroprotektive Eigenschaften der Substanz Epigallo-Catechin-3-Gallat (EGCG) während eines kardiochirurgischen Eingriffes mit Herz-Lungen-Maschien nachgewiesen werden. Immunhistochemische Untersuchungen des Hippocampus zeigten, dass Marker für Apoptose (cleaved Caspase 3, Poly-(ADP)-Ribose) und nitrosativen Stress (3-Nitrotyrosin) gegenüber der Kontrollgruppe signifikant reduziert waren. EGCG ist ein Bestandteil des grünen Tees und fungiert als Radikalfänger (Twal et al. 2013).

Eine weitere experimentelle Studie (Ferkelmodell) von Wang et al. (2013) untersuchte die anti-inflammatorische Wirkung von Ulinastatin während des Einsatzes einer Herz-Lungen-Maschine. Faktoren der Inflammationsreaktion (IL-10, TNF-alpha), sowie Zellschäden im Gehirn (u.a. Apoptose und Pyknose der Neuronen im Hippocampus) konnten durch die Gabe des Glykoproteins Ulinastatin in deren Studie reduziert werden.

Neuroprotektive Effekte von volativen und intravenösen Anästhetika sind ebenfalls Bestandteil zahlreicher experimenteller Untersuchungen. Allerdings sind die Ergebnisse hinsichtlich einer Neuroprotektion sehr variabel und treten nicht kontinuierlich auf (Bilotta et al. 2014, Kitano et al. 2007). Eine experimentelle Studie (Ferkelmodell) von Loepke et al. (2002) untersuchte die Wirkung von Fentanyl-Droperidol, Desfluran 4,5 % und Desfluran 9 % während einer extrakorporalen Zirkulation. Mit Anwendung von Desfluran 9 % kam es zu weniger histologisch sichtbaren Nekrosen im Gewebe des Hippocampus und Neokortex.

Ein nahe liegender Ansatz, den zerebralen Blutfluss und die zerebrale Sauerstoffsättigung positiv zu beeinflussen, ist die Veränderung des durch die Pumpe der Herz-Lungen-Maschine generierten künstlichen Blutflusses. Durch den natürlichen Herzschlag entsteht im Organismus ein pulsatiles Flussmuster. Ziel ist es, diese physiologische Perfusion so weit wie möglich durch Anwendung einer pulsatilen Blutfluss-Methode während der extrakorporalen Zirkulation zu simulieren (siehe 1.5.1).

Ein weiterer, pharmakologischer Ansatz zum Schutz der Neuronen besteht in der perioperativen Gabe von Tetrazyklin-Derivaten während der extrakorporalen Zirkulation (siehe 1.5.2).

1.5.1 Pulsatile Perfusion

Mit Beginn der klinischen Anwendung der Herz-Lungen-Maschine wurden zeitgleich beständig neue Studien zur Frage, ob ein pulsatiler Blutfluss Vorteile für den Patienten ermöglicht, entwickelt und veröffentlicht. In der Klinik kommen seit Beginn der extrakorporalen Zirkulation hauptsächlich Rollerpumpen zum Einsatz, durch welche ein laminares Flussprofil generiert wird (siehe 1.2). Die Arbeitsgruppe um Taylor (1979) untersuchte 24 Patienten bezüglich Änderungen des peripheren Gefäßwiderstandes und der Expression von Angiotensin II bei Anwendung einer pulsatilen, bzw. nicht-pulsatilen Perfusion. Bei einem laminaren Flussprofil der Blutpumpe kam es zum Anstieg des peripheren Gefäßwiderstandes und es wurden erhöhte Werte für Angiotensin II im Plasma gemessen. Die Expression von Angiotensin II war während einer pulsatilen Perfusion demgegenüber reduziert. Dies führt zu einer verminderten Vasokonstriktion und könnte dadurch die Perfusion bestimmter Gewebe während des kardiochirurgischen Eingriffes steigern (Taylor et al. 1979).

Wird in der Klinik eine pulsatile Perfusion während der extrakorporalen Zirkulation bevorzugt, so kommt am häufigsten eine modifizierte Rollerpumpe zum Einsatz. Durch einen zusätzlich eingebauten Motor mit hohem Drehmoment können mittels einer elektronischen Kontrolle intermittierende Beschleunigungen der Pumpenumdrehungszahl entstehen. Dadurch können folgende Parameter bestimmt und verändert werden: Pulsvolumen („Pulsdauer"), Pulswiederholungsrate („Frequenz") und Rotorbeschleunigungsrate („Geschwindigkeit") (Taylor et al. 1982).

Ein pulsatiler Fluss ist abhängig vom Energiegradienten und weniger vom Druckgradienten. Shepard und Mitarbeiter entwickelten bereits 1966 den Begriff *energy equivalent pressure* (EEP), um eine pulsatile Perfusion zu charakerisieren. Abhängig von der Zeit variieren Fluss und Druck bei einem pulsatilen Modus. Diese zusätzlich entstehende Energie wird als *surplus hemodynamic energy* (SHE) bezeichnet. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass hohe SHE-Werte zu einer verbesserten Mikrozirkulation führen (Undar et al. 2011, Ji et Undar 2006). Höhere SHE-Werte, wie sie mit einer pulsatilen Perfusion erreicht werden, beeinflussen die Mikrozirkulation. Dadurch soll die Inflammationsreaktion vermindert und der Schutz einzelner Organe gefördert werden (O'Neil 2012).

In einer experimentellen Studie (Schweinemodell) von Undar et al. (2000a) konnte mittels Nahinfrarotspektroskopie (*near infrared spectroscopy* - NIRS) keine Reduzierung der zerebralen Sauerstoffsättigung durch Anwendung eines pulsatilen Blutflusses beobachtet werden. Eine klinische Studie von Su und Mitarbeitern (2011) an 111 Patienten bestätigt, dass durch eine pulsatile Perfusion die zerebrale Sauerstoffsättigung weniger stark reduziert wird, als mit einem nicht-pulsatilem Blutfluss. Wang und Mitarbeiter (2010) untersuchten mittels transkranieller Doppler-Sonographie (TCD) 30 Patienten und gelangten zu folgenden Ergebnissen: Bei einem pulsatilen Blutfluss steigt der zerebrale Blutfluss und der zerebrale Gefäßwiderstand sinkt ab. Die Studie an 40 Patienten von Zhao et al. (2011) bestätigt, dass die zerebrale Sauerstoffsättigung durch eine Pulsatilität nicht negativ beeinträchtigt wird. Weiterhin kam es zu einer geringeren Freisetzung von Endothelin-1 im Vergleich zu einem nicht-pulsatilem Blutfluss. Endothelin-1 wirkt vasokonstriktorisch und beeinträchtigt die Mikrozirkulation negativ. Eine pulsatile Perfusion führt demnach zu einer verbesserten regionalen Durchblutung. Die Autoren beobachteten jedoch auch erhöhte Werte für freies Hämoglobin im Plasma bei einer pulsatilen Perfusion, was auf eine Schädigung der Erythrozyten hinweist. Erhöhte Werte des freien Hämoglobins im Plasma und ein erhöhtes Risiko für eine Hämolyse bei Durchführung eines pulsatilen Blutflusses wurden auch von Goto et al. (1993) in einer klinischen Studie an 32 Patienten beobachtet. Unabhängig der verwendeten Blutpumpe kann es durch die Pulsatilität zu einer verstärkten Bildung von gasförmigen Mikrobläschen auf der post-Pumpenseite kommen (Wang et al. 2008).

1.5.2 Minozyklin

Das Tetrazyklin-Derivat Minozyklin wurde erstmals 1967 isoliert. Minozyklin ist ein semi-synthetisches Tetrazyklin der 2. Generation und wird seit vielen Jahren als Breitspektrum-Antibiotikum gegen gram-positive und gram-negative Bakterien eingesetzt. Es wirkt vorzugsweise bakteriostatisch, kann aber in höheren Dosen ebenso bakterizide Wirkungen entfalten (Plane et al. 2010, Allen et al. 1976). In der Pädiatrie findet die Substanz Anwendung bei der Behandlung von Acne vulgaris (Mohammad et Ruiz 2013, Garner et al. 2012, Freeman 1989). Es wird keine Langzeit-Applikation empfohlen, sondern ein maximales Therapie-Intervall von 3 Wochen, aufgrund der bekannten Nebenwirkungen (Cascio et al. 2004). Minozyklin bindet an Calcium und kann die Knochen- und Zahnentwicklung beeinflussen und zu bräunlichen Pigmentbildungen führen (Kerblesky et al. 2013, Cale et al. 1988, Poliak et al. 1985). Weitere Nebenwirkungen können in Form von Schwindel, Übelkeit und Erbrechen auftreten, die jedoch nach Absetzen des Medikaments reversibel sind (Garrido-Mesa et al. 2013). Die Substanz Minozyklin ist lipophil und passiert ohne Schwierigkeiten die Blut-Hirn-Schranke (Plane et al. 2010).

Seit einigen Jahren treten die anti-inflammatorischen, anti-apoptotischen und anti-oxidativen Eigenschaften von Minozyklin mehr und mehr in den Vordergrund der Forschung. Zahlreiche tierexperimentelle Studien zeigen einen neuroprotektiven Effekt des Medikaments, besonders nach einem vorangegangenen hypoxisch-ischämischen Hirnschaden (Kim et Su 2009, Carty et al. 2008).

Anti-inflammatorische Wirkungen von Minozyklin sind folgende: Inhibition der Mikroglia-Aktivierung, reduzierte Freisetzung von Zytokinen (IL-6 und TNF-alpha), reduzierte Expression von Chemokinen im zentralen Nervensystem, reduzierte Freisetzung von Lipiden und Matrix-Metalloproteinasen (Kim et Su 2009, Stirling et al. 2005).

Die anti-apoptotischen Eigenschaften sind zum einen auf einen verminderten Calcium-Einstrom in die Mitochondrien der Neuronen zurückzuführen. Durch Stabilisierung der Mitochondrien-Membran gelangen keine pro-apoptotischen Substanzen (z. B. Cytochrom c) in das Zytosol und führen zu keiner Aktivierung der Caspase-Kaskade (Antonenko et al. 2010, Garcia-Martinez et al. 2010, Kim et al. 2009). Hingegen werden anti-apoptotische Faktoren, wie z. B. Bcl-2 aktiviert (Matsukawa et al. 2009). Weiterhin wird Poly-(ADP)-Ribose-Polymerase 1 durch Minozyklin in seiner Aktivität inhibiert (Alano et al. 2006). Guimarães und Mitarbeiter (2010) vermuten zusätzlich, dass Minozyklin die Glutamat-induzierte Exzitotoxizität in Neuronen mindert.

Die Produktion von freien Sauerstoffradikalen wird durch Minozyklin reduziert, aufgrund der inhibitorischen Wirkung auf Cyclooxygenase 2, die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase und der NADPH-Oxidase (Choi et al. 2005, Ryu et al. 2004).

1.6 Hippocampus

Als wichtiger Bestandteil des limbischen Systems befindet sich die Hippocampus-Formation jeweils im rechten und linken Lobus temporalis. Der Hippocampus ist neben dem Cerebellum eine der sensitivsten Gehirnstrukturen gegenüber ischämischen und/ oder hypoxischen Reizen. Wird diese Struktur geschädigt, können dadurch Defizite im Erinnerungsvermögen resultieren, was sowohl klinische Studien (Cooper et al. 2011) als auch Studien am Tiermodell nachweisen konnten (Sheng et al. 2015, Bothe et al. 1986). Als Bestandteil des Papez'schen Neuronenkreises spielt die Funktion des Hippocampus eine entscheidende Rolle bei der Überführung bestimmter Lerninhalte vom Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis (Zeidman et al. 2015, Trepel 2004). Werden Anteile des Hippocampus im Rahmen einer extrakorporalen Zirkulation geschädigt, kommt es zu Defiziten in der Funktion des Langzeitgedächtnisses und zu einem reduzierten Erinnerungsvermögen, wobei niedrige Perfusionsraten einen Ischämie-Schaden verstärken (Ishibashi et al. 2010). Eine experimentelle Studie (Schweinemodell) von Tóth et al. (2006) bestätigt die Schädigung bestimmter Neuronen-Populationen im Hippocampus, sowie im präfrontalen Kortex und im Kortex des Cerebellums durch die Anwendung einer Herz-Lungen-Maschine.

Mehrere Autoren konnten in ihren Studien berichten, dass die Neurone des Hippocampus eine selektive Vulnerabilität gegenüber einem hypoxischen Geschehen besitzen. Entsprechend der histologischen Untergliederung in Cornu ammonis mit 4 Arealen (CA1 – CA4), dem Gyrus dentatus und des Subiculums werden deren Neurone hinsichtlich ihrer differenten Vulnerabilität gegenüber einer Hypoxie in zahlreichen Studien untersucht. Als besonders sensitiv gegenüber einer Hypoxie, bzw. Ischämie gelten die Pyramidenzellen des CA1-Areals (Gerace et al. 2014, Rininger et al. 2012). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die Neurone des CA3-Areals durch eine Ischämie weniger stark geschädigt werden (Zhang et al. 2011, Stanika et al. 2010). Einige Autoren hingegen bewiesen in ihren Studien jedoch auch eine Vulnerabilität anderer Regionen des Cornu ammonis, u. a. des CA3-Areals (Hatanpaa et al. 2014, Jung et al. 2012, Yu et al. 2012).

Die Ursachen für die unterschiedlichen Schädigungsmuster im Hippocampus konnten bislang noch nicht vollständig geklärt werden. Die Funktion des Glutamats als Neurotransmitter, die Ausprägung bestimmter Calcium-permeabler Rezeptoren, sowie das Vorhandensein des Kalium-Chlorid-Co-Transporters scheinen hierbei u. a. eine Rolle zu spielen (Gerace et al. 2014, Papp et al. 2008, Gee et al. 2006).

Der histologische Aufbau des Cornu ammonis (CA1 – CA4, Terminologie nach Lorente de Nó) erfolgt in 3 Schichten: von außen nach innen wird zwischen einem Stratum oriens, Stratum pyramidale und einem Stratum moleculare differenziert (siehe Abb. 3). Die Pyramidenzellen sind exzitatorische Projektionsneurone (Glutamat fungiert als Neurotransmitter) und sind in den verschiedenen CA-

Arealen unterschiedlich stark ausgeprägt. Während sich im Stratum pyramidale der CA1-Region überwiegend kleine, dicht gelagerte Pyramidenzellen befinden, sind es in der CA2- und CA3-Region große Pyramidenzellen. Beginnend im CA3-Areal lockert sich der Zellverband des Stratum pyramidale bis zum CA4-Areal immer weiter auf. Dadurch kann mikroskopisch eine deutliche Abgrenzung zwischen der CA1-Region und der CA3-Region erfolgen (Schmidt-Kastner et Freund 1991, Stephan et Manolescu 1980). Der Hippocampus besitzt eine trisynaptische Verschaltungskette: Entorhinale Afferenzen erreichen (1) die Körnerzellen des Gyrus dentatus. Diese leiten das Signal über die Moosfasern zu (2) den Pyramidenzellen des CA3-Areals, welche wiederum Schaffer-Kollaterale zu (3) den Pyramidenzellen der CA1-Region entsenden (Amaral et Witter 1989). Efferenzen werden über Axonkollaterale einerseits in den entorhinalen Kortex, andererseits über das Subiculum oder über die Fimbria und den Fornix zum Corpus mamillare geleitet (Trepel 2004).

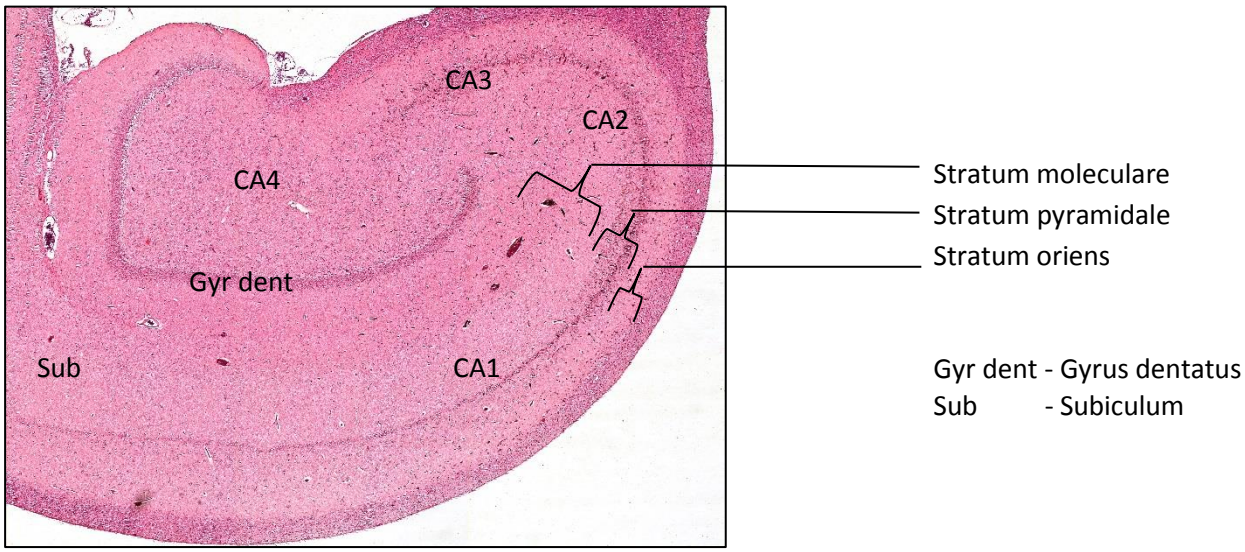

Abbildung 3: mikroskopischer Frontalschnitt des Cornu ammonis, Hippocampus

2 Aufgabenstellung

Mit dieser Arbeit werden die Auswirkungen eines kardiochirurgischen Eingriffes mit Herz-Lungen-Maschine auf den Organismus näher betrachtet. Es handelt sich um eine experimentelle Studie am Ferkelmodell. Untersucht wurde die Struktur des Hippocampus als Bestandteil des limbischen Systems. Ziel ist es, nachzuweisen ob es zu hypoxischen oder apoptotischen Veränderungen innerhalb der Neurone infolge der extrakorporalen Zirkulation kommt. Weiterhin wurden zwei Modifikationen während des kardiochirurgischen Eingriffes angewandt um zu evaluieren, ob es dadurch zu einer positiven Beeinflussung der Neurone im Hippocampus kommen kann:

- die Perfusionstechnik der extrakorporalen Zirkulation: nicht-pulsatiler Blutfluss versus pulsatiler Blutfluss
- intraoperative Gabe des Medikaments Minozyklin während der nicht-pulsatilen extrakorporalen Zirkulation

Für die experimentellen Untersuchungen wurden Ferkel mit einem Alter von 3 bis 5½ Wochen verwendet und in 5 Versuchsgruppen unterteilt. Nach Beendigung des kardiochirurgischen Eingriffes wurde das Gewebe des Hippocampus mit verschiedenen immunhistochemischen und histologischen Färbemethoden untersucht und mit dem Mikroskop ausgewertet.

Die Ergebnisse dieser Studie sollen zum weiteren Verständnis möglicher Veränderungen auf zellulärer Ebene im Hippocampus infolge eines kardiochirurgischen Eingriffes beitragen. Ein weiteres Ziel ist es, gegebenenfalls einen möglichen Ansatz aufzuzeigen, wie Schäden auf zellulärer Ebene im Hippocampus in diesem experimentellen Tierversuch vermindert werden konnten.

Im Rahmen der Diskussion sollen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Inwieweit ist das verwendete Tiermodell und der Versuchsaufbau für die Beantwortung der Fragen 2 und 3 geeignet?
2. Werden durch die Anwendung der Herz-Lungen-Maschine mit nicht-pulsatilen Blutfluss Schäden im Gewebe des Hippocampus verursacht?
3. Kann ein pulsatiler Blutfluss, bzw. die Gabe des Medikaments Minozyklin während der extrakorporalen Zirkulation mögliche Schäden im Hippocampus abmildern?

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich sowohl um männliche, als auch weibliche Ferkel im Alter von 3 bis 5 ½ Wochen mit einem Gewicht von 8 kg bis 15 kg und einer Größe von 65 cm bis 83 cm. Alle Ferkel stammten von dem Lehr- und Versuchsgut Oberholz der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig und gehörten der Rasse „Angler-Sattelschwein“ an.
Die Versuchsdurchführungen waren unter der Nummer W05/12 und W05/11 anzeigepflichtig und wurden vom Regierungspräsidium Leipzig, Referat 24, Braustraße 2 in 04013 Leipzig genehmigt.

3.2 Versuch Teil 1: Operation

3.2.1 Gruppeneinteilung und Versuchsaufbau

Es wurden 5 Versuchsgruppen aus den insgesamt 37 Versuchstieren gebildet: eine Kontrollgruppe (n = 6 Versuchstiere), eine Kontrollgruppe mit Gabe von Minozyklin (n = 8 Versuchstiere), eine HLM-Gruppe mit pulsatilen Blutfluss (n = 9 Versuchstiere) und eine HLM-Gruppe mit nicht-pulsatilen Blutfluss und der Gabe von Minozyklin (n = 6 Versuchstiere), sowie eine HLM-Gruppe mit nicht-pulsatilen Blutfluss (n = 8 Versuchstiere).
Der grundlegende Aufbau der Versuche gestaltete sich wie folgt:
Die Ferkel wurden im Stall für den Transport in den Tier-OP sediert. Nach erfolgreicher Anästhesie und Intubation wurden alle Ferkel im Operationssaal thorakotomiert und das Herz mit den umliegenden anatomischen Strukturen, wie V. cava inferior et superior, Truncus pulmonalis und Aortenwurzel, freigelegt. Die durchschnittlich hierfür benötigte Zeitdauer lag bei ca. 30 Minuten und entspricht der Vorbereitungszeit. Den Versuchstieren aus den Gruppen „Kontrolle mit Minozyklin“ und „HLM nicht-pulsatil mit Minozyklin“ verabreichte man in dieser Zeit zusätzlich die erste Dosis des Medikamentes Minozyklin.
Die beiden Gruppen „Kontrolle“ und „Kontrolle mit Minozyklin“ wurden über den Zeitraum, in dem bei den anderen Gruppen der Anschluss an die HLM stattfand, bei eröffneten aber abgedeckten Brustsitus ausschließlich überwacht.
Bei den Gruppen „HLM pulsatil“, „HLM nicht-pulsatil“ und „HLM nicht-pulsatil mit Minozyklin“ wurde in einem weiteren Schritt das Herz kanüliert, um einen Zugang für die Kardioplegie-Lösung herzustellen. Außerdem wurden die Schläuche der HLM an den jeweiligen Gefäßen positioniert.

Mit Beginn der HLM wurde der Körper der Versuchstiere bis auf 28 °C heruntergekühlt. Auf 60 Minuten HLM-Zeit folgten 30 Minuten HLM-Zeit mit Wiedererwärmung auf die normale Körpertemperatur (37 °C). Dieser Zeitraum entsprach der Ischämiezeit, d.h. es könnte unter Umständen aufgrund der Minderperfusion zu einer Hypoxie mit anschließenden Organ- und Gewebsschäden gekommen sein. Mit Beginn der Reperfusionszeit sollte die Herz-Lungen-Maschine auf den Kreislauf des Ferkels lediglich unterstützend einwirken. Innerhalb dieser 30 Minuten injizierte man den Gruppen „Kontrolle mit Minozyklin“ und „HLM nicht-pulsatil mit Minozyklin“ die zweite Dosis des Medikaments Minozyklin. In der anschließenden Rekonvaleszenzzeit (90 Minuten) konnten sich etwaige ischämische Gewebs- und Organschäden entweder regenerieren oder manifestieren (siehe Tab. 2).

Tabelle 2 Versuchsablauf

Zeitpunkt	0-30 Minuten	30-120 Minuten	120-150 Minuten	150-240 Minuten
	Vorbereitungszeit	**HLM-Zeit**	**Reperfusionszeit**	**Rekonvaleszenz-zeit**
Dauer	30 Minuten	90 Minuten	30 Minuten	90 Minuten
Kontrollgruppe				
Kontrollgruppe mit Minozyklin	*Minozyklin: 4 mg/ kg KM*		*Minozyklin: 2 mg/ kg KM*	
HLM pulsatil		*pulsatiler Fluss*		
HLM nicht-pulsatil		*nicht-pulsatiler Fluss*		
HLM nicht-pulsatil mit Minozyklin	*Minozyklin: 4 mg/ kg KM*	*nicht-pulsatiler Fluss*	*Minozyklin: 2 mg/ kg KM*	
Proben	Zeitpunkt 0: - art. Blut - BGA (venös und arteriell)			Zeitpunkt 240: - art. Blut - BGA (venös und arteriell)

Zum Ende der Versuchsdurchführung wurde die Narkose durch kontinuierliche Erhöhung der Isofluran- und Opiat-Gabe vertieft. Die Ferkel wurden durch Entblutung und Organentnahme euthanasiert. Für die Entnahme des Gehirns wurde sofort nach Ende des Versuches mit einem Skalpell ein ca. 6 x 6 cm langer Haut-Schnitt am Kopf des Ferkels vorgenommen. Nach dem Entfernen der bedeckenden Weichgewebe wurde die Schädelkalotte mit einer oszillierenden elektrisch-chirurgischen Säge eröffnet und das Gehirn mit einem stumpfen Präparierinstrument vorsichtig gelöst. Nach Darstellung der Hippocampusformation entnahm man diesen vollständig und lagerte das Gewebe in 4 % gepuffertes Formalin nach Lillie (siehe 3.3.1).

Der körperliche Zustand der Versuchstiere wurde während der Operation von einer Tierärztin überwacht. Den chirurgischen Eingriff führte ein Herzchirurg durch. Bei den Versuchen mit Herz-

Lungen-Maschine wurde zusätzlich ein Kardiotechniker benötigt. Das verwendete Zubehör und die verabreichten Medikamente für die Operationen sind im Anhang, 8.2.1 Tab. 3 und 4 aufgelistet.

3.2.2 Anästhesie

Die Prämedikation erfolgte im Stall, nachdem man das Ferkel vom Muttertier trennte. Mittels intramuskulärer Gabe von Midazolam wurde eine erste Sedierung mit anxiolytischer Wirkung vorgenommen. Zusätzlich wurden, ebenfalls intramuskulär, Atropin als Parasympatholytikum und Ketamin als analgetisch wirksames Hypnotikum eingesetzt. Die Dosierungen der einzelnen Medikamente richteten sich nach dem zuvor ermittelten Körpergewicht des Tieres (siehe Anhang, 8.2.1 Tab. 4). Nach ca. 10 Minuten war das Versuchstier ausreichend sediert und wurde in diesem Zustand in die Klinik und den OP-Raum gebracht. Somit sollte der psychische und physische Stress aufgrund der veränderten Umgebung für das Tier weitesgehend minimiert werden.

Nach Ankunft im Operationssaal wurde als erstes eine Ohrflexüle in die V. auricularis gelegt, um weitere Medikamente für eine tiefer gehende Sedierung vor der Narkose-Einleitung verabreichen zu können. Auf diesem Wege erfolgte bei Bedarf eine Nachdosierung von Ketamin.

Die orale Intubation wurde in Bauchlage auf dem OP-Tisch durchgeführt, sobald das Versuchstier ausreichend sediert und ruhig gestellt war. Nach sofortiger Kontrolle der korrekten Tubuslage, Einstellen der Beatmungsparameter (siehe Tab. 5) und Sicherung der künstlichen Beatmung lagerte man das Versuchstier in Rückenlage um.

Zu Beginn der Beatmung erfolgte ein Anfluten mit 100 Vol-% Sauerstoff. Zugleich wurde dem Organismus 2,5-4 Vol-% Isofluran zugeführt. Die Dosis wurde solang beibehalten, bis man einen exspiratorischen Wert von 1,5 Vol-% Isofluran messen konnte. Nach erfolgreicher Ansättigung wurde die Gabe auf 1,5 Vol-% Isofluran herabgesenkt und kontinuierlich bis zum Anschluss an die HLM beibehalten. Um eine ausreichende Analgesie zu gewährleisten, verabreichte man das Opiat Sufentanil.

Bevor der Blutkreislauf des Versuchstieres an die HLM angeschlossen wurde, entsprach die durchgeführte Narkose einer Inhalationsanästhesie mit Isofluran in einem Sauerstoff-Luftgemisch.

Da während der HLM der Blutfluss und der Gasaustausch über eben diese geregelt werden, war eine Umstellung auf eine Injektionsanästhesie erforderlich. Wird also die HLM an den Körperkreislauf des Ferkels angeschlossen, spricht man von einer total intravenösen Anästhesie (TIVA) mit Propofol.

Regelmäßig kontrolliert wurden während der Operation der positive endexspiratorische Druck (PEEP), das Atemminutenvolumen (AMV = Vt x Atemfrequenz), das Atemzugvolumen (Tidalvolumen Vt) und die Atemfrequenz.

Der positive endexspiratorische Druck (PEEP) beschreibt das Volumen, welches nach Ausatmung in der Lunge verbleibt. Nach 90 minütiger HLM-Zeit wurde der Wert kurzzeitig auf 10 mbar eingestellt, um ein Kollabieren der Lunge sicher zu vermeiden. Nach Umstellen der total intravenösen Anästhesie mit Propofol auf eine Inhalationsanästhesie mit Isofluran senkte man den Wert anschließend wieder auf 1 mbar herab.

Tabelle 5 Beatmungsparameter

Beatmungsparameter	Einstellung
Ventilation	IPPV (intermittent positive pressure ventilation)
T_i (time inspiratory): T_e (time expiratory)	1 : 1,5
Tidalvolumen Vt	10 ml/kg KM
PEEP	1 mbar
P_{max}	25 mbar
Atemfrequenz	20-30/min
O_2	0,8 l/min
Luft	1,5 l/min
Isofluran	1,5 Vol-%

3.2.3 Operation

3.2.3.1 Vorbereitungszeit

Zu Beginn des chirurgischen Eingriffes wurde ein zentralvenöser Zugang mit Katheter (ZVK) über die V. jugularis hergestellt. Er ermöglichte eine intravenöse Medikation und wurde für die ZVD-Messung benötigt. Die mit der Messsonde ermittelten Werte des zentralvenösen Druckes (ZVD) sollten zwischen 8-12 mmHg liegen. Zusätzlich befand sich an diesem drei-lumigen Zugang die Temperatursonde für die Kalibrierung der PiCCo-Messung.

Ein arterieller Zugang erfolgte über die A. femoralis. Dieser wurde für das Legen eines Katheters zur Blutdruck-Messung und für Messungen des Herz-Zeit-Volumens mittels PiCCo-Gerät benötigt.

Des Weiteren konnten arterielle Blutproben entnommen werden.

Über die V. femoralis wurde ein zweiter venöser Zugang für die Gabe von Infusionen und zur venösen Blutprobenentnahme hergestellt.

Während der gesamten OP-Zeit war zur Überwachung der Herzfunktion des Ferkels ein Elektrokardiogramm (EKG) angeschaltet.

Vor Eröffnung des Brustkorbs führte man außerdem eine Echokardiographie durch.

Mit dem Skalpell wurde mittig entlang des Sternums, beginnend auf Höhe der Clavicula, ein Hautschnitt gemacht. Mit der Sternumsäge wurde der Brustkorb eröffnet und das Herz mit zu- und abführenden Gefäßen dargestellt. Kleinere Blutungen aus den umliegenden peripheren Gefäßen stoppte man mittels Druck und Kompressen, sowie Elektrokauterisation.

Vor Beginn der Thorakotomie wurde jedem Ferkel Pancuroniumbromid injiziert. Dadurch konnten die reflexartigen Kontraktionen der Brustmuskulatur während der Elektrokauterisation abgeschwächt werden.

Vor Kanülierung des Herzens verabreichte man das Mukopolysaccharid Heparin zur Antikoagulation. Wird das Blut des Versuchstieres durch das Schlauchsystem der HLM transportiert, kommt es mit einem Fremdmaterial in Kontakt. Dabei können Blutzellen geschädigt werden, sowie eine Thrombozytenadhäsion an den Wänden mit anschließender Aggregation stattfinden. Lösen sich diese Aggregate kann das zu einem thrombotischen Verschluss in den peripheren Blutgefäßen des Versuchstieres führen. Um diesen pathologischen Prozess vorzubeugen wurde während der Operation Heparin-Natrium zur Blutverdünnung verabreicht. Bevor der Körperkreislauf des Ferkels mit der HLM verbunden wurde, infundierte man 300 internationale Einheiten Heparin-Natrium intravenös. In die Maschine selbst wurden 1000 internationale Einheiten Heparin-Natrium gegeben. Die Dosierung entsprach einer Vollheparinisierung.

Während der Operation kontrollierte man die Aufrechterhaltung der Antikoagulation über die *activated clotting time* (ACT). Der 1966 von Hattersley beschriebene Test misst die Gerinnungszeit und sollte in diesem Tiermodell größer als 400 Sekunden bei Vollheparinisierung betragen. Wurde der Wert während der Operationszeit unterschritten, musste Heparin nachdosiert werden. Der ACT-Wert wurde alle 30 Minuten gemessen.

Nach der Eröffnung des Perikards wurde das Herz kanüliert. Die venöse Kanüle platzierte man über das rechte Herzohr in den rechten Vorhof, um das sauerstoffarme Blut aus dem Körperkreislauf in die Herz-Lungen-Maschine einzuleiten.

Die arterielle Kanüle, welche das mit Sauerstoff angereicherte Blut aus der Herz-Lungen-Maschine dem Organismus wieder zuführte, wurde in die Aorta ascendens gelegt. Der Katheter, über den die Kardioplegie-Lösung infundiert wurde, befand sich an der Aortenwurzel.

Nach Abgang von der HLM und nach Dekanülierung wurde Heparin mit dem Wirkstoff Protamin in Form von Protaminhydrochlorid antagonisiert. Dadurch bilden sich Heparin-Protamin-Komplexe, d. h.

Heparin wird der Komplexbildung mit Antithrombin III entzogen und es folgt keine Hemmung der intrinsischen Gerinnungskaskade.

3.2.3.2 Kardioplegie

Damit Operationen direkt am Herzen sicher durchgeführt werden können, muss der kontinuierliche physiologische Herzschlag für eine bestimmte Zeitdauer unterbrochen werden.
Mit der Gabe von einer Kardioplegie-Lösung soll ein künstlicher reversibler Herzstillstand herbeigeführt werden.
Die für die Versorgung der Herzmuskelzellen zuständigen Herzkranzgefäße sind die ersten arteriellen Abzweige aus der Aortenwurzel. Über eine Kardioplegie-Nadel in der Aortenwurzel wurden während des Anschlusses der HLM an den Körperkreislauf rund 1000 ml Kardioplegie-Lösung infundiert.
Das Funktionsprinzip der Kardioplegie-Lösung ist die Membranstabilisierung der Herzmuskelzellen. Werden keine elektrischen Impulse zwischen den Zellen weitergeleitet, kommt es zu keiner Kontraktion des Herzmuskels und somit zum Stillstand des gesamten Herzens.
Die hier verwendete Kardioplegie-Lösung nach Bretschneider („Custodiol“) ist eine nichtkolloidale Lösung mit intrazellulärem Wirkprinzip. Die extrazelluläre Natrium-Konzentration wird soweit abgesenkt das annähernd die intrazelluläre Natrium-Konzentration erreicht wird. Ebenso wird die Konzentration des Calciums abgesenkt. Zusätzlich ist die extrazelluläre Kalium-Konzentration erhöht, wodurch das Membranruhepotential nochmals stabilisiert wird. Die Erregungsleitung, welche auf Depolarisation der Zellen beruht, ist blockiert (Born 2005, Bretschneider 1980).
Kardioplegie-Lösungen besitzen auch eine myokardprotektive Wirkung. Wird sie auf 4°C abgekühlt infundiert, ist die Toleranzphase des Herzens vor Schäden aufgrund einer Ischämie nach Herzstillstand etwas verlängert. Durch Hypothermie sind die Stoffwechselprozesse der Herzmuskelzellen herabgesetzt, sowie der Sauerstoffverbrauch geringer (Born 2005).
Direkt nach Abklemmen der Aorta wurden initial 350 ml Kardioplegie-Lösung nach Bretschneider verabreicht und nach Bedarf während der 90 minütigen HLM-Zeit nachgegeben.

3.2.3.3 Herz-Lungen-Maschine mit nicht-pulsatilen/ pulsatilen Fluss

Bevor die HLM zum Einsatz kommt, muss das Schlauchsystem und das Reservoir mit einer Flüssigkeit befüllt und entlüftet werden. Dieses Volumen wird als Primingvolumen bezeichnet und setzt sich folgendermaßen zusammen: 200 ml Hydroxyethylstärke, 50 ml Natriumhydrogencarbonat, Heparin-Natrium und mindestens 500 ml Vollblut. Das Vollblut stammte von einem ausgewachsenen Schwein des Lehr- und Versuchsgutes Oberholz der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig, das als Spenderschwein für mehrere Versuchstiere fungierte. Das Blut wurde in speziellen Transfusionssystemen aufgefangen und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Da bei beiden Kontrollgruppen keine HLM an den Körperkreislauf angeschlossen wurde, erhielten diese Schweine lediglich eine Bluttransfusion von ca. 200-500 ml Vollblut vom Spenderschwein.

Für alle Versuche stand eine Herz-Lungen-Maschine der Firma Stöckert vom Typ „SIII“ zur Verfügung. Da es sich bei den Versuchstieren um 3 bis 5½ Wochen alte Ferkel handelte, nutzte man für den Bluttransport vom Körperkreislauf zur Maschine und wieder zurück ein Schlauchsystem aus der Pädiatrie („Kinder Kompl. Set“ Sourin Group Deutschland GmbH).

Zum Start der HLM befüllte man die Maschine mit dem Priming-Volumen und Heparin-Natrium (1000 internationale Einheiten Heparin). Nach Abklemmen der Aorta wurde sofort die Kardioplegie-Lösung injiziert. Das venöse Blut wurde über die venöse Kanüle im rechten Vorhof der Maschine zugeführt. Aufgrund der Gravitation war eine Flussrichtung vom Versuchstier auf dem OP-Tisch über das Schlauchsystem hin zur tiefer gelegenen Maschine gegeben. Spezielle Sauger drainierten zusätzlich Blut aus dem OP-Gebiet, was zusammen mit dem Anteil aus der venösen Kanüle in einem Hartplastikreservoir gesammelt wurde. Um das Risiko einer Luftembolie zu vermeiden, wurde das Blut zuvor durch eine Blasenfalle gefiltert. Anschließend beförderte eine Pumpe das gesammelte Blut für eine Kohlenstoffdioxid-Eliminierung und Oxygenierung zu einem Membranoxygenator mit integriertem Wärmeaustauscher. Zu Beginn der HLM wurde die Pumpe erst mit einer niedrigen Flussrate gestartet und langsam gesteigert, damit sich der Organismus an die extrakorporale Blut-Zirkulation anpassen konnte. Die verwendete Roller-Pumpe entspricht einer Verdrängungspumpe. Das Flussmuster, welches sich daraus ergibt, ist kontinuierlich. Um einen pulsatilen Blutfluss zu erreichen, bedarf es einer Zusatzsteuerung. Durch diese Modulation ist ein periodisches Anhalten und schnelles Beschleunigen der Pumpe möglich. Es wurden für die Versuche der Gruppe „HLM mit pulsatilen Fluss“ folgende Einstellungen vorgenommen:

- Basis-Fluss 30 %
- Pulsatil 70 %
- Impulsrate 50 %
- Puls von 100 pro Minute.

Für die Zeit der HLM wurde das Blut auf 28 °C gekühlt. In den letzten 30 Minuten der HLM-Zeit wurde es schließlich auf 37 °C wieder erwärmt. Das mit Sauerstoff angereicherte Blut (mittels Membranoxygenator) konnte schließlich über eine Perfusionskanüle in die Aorta ascendens transportiert und dem Körperkreislauf wieder zugeführt werden.
Die Entwöhnung von der HLM beginnt mit Aufwärmen des Blutes auf 37 °C. Anschließend entfernte man die Aortenklemme. Die Reperfusionszeit setzt ein. Wenn ein regelmäßiger Herzschlag vorhanden war, wurde die HLM-Flussrate kontinuierlich reduziert. Somit übernahm das Herz nach und nach wieder die vollständige Pumpleistung.
Zur Unterstützung des Herzschlages konnte Calciumchlorid, bzw. als Medikament der 2. Wahl Katecholamine (Norepinephrin, Epinephrin) verabreicht werden. Bei Herzflimmern wurde sofort defibrilliert (10 Joule). Hatte sich ein physiologischer Herzschlag eingestellt, wurden alle Kanülen vollständig abgeklemmt und die Blutpumpe der HLM abgeschaltet.

3.2.6.6 Medikation mit Minozyklin

Minozyklin ist ein Antibiotikum und gehört zur Gruppe der Tetrazykline. Neben seiner bakteriziden Wirkung soll Minozyklin zusätzlich neuroprotektive Eigenschaften aufweisen. Es passiert problemlos die Blut-Hirnschranke. Die neuroprotektive Wirkung ist dosisabhängig, d. h. ausschließlich niedrige Konzentrationen von Minozyklin haben einen positiven Effekt. Wird eine zu hohe Dosis des Medikamentes verabreicht können ischämische Zellschädigungen verschlimmert werden. Des Weiteren wurden antiapoptotische Effekte bei Neuronen, jedoch nicht an Astrozyten nachgewiesen (Matsukawa et al. 2009).
Beiden Gruppen („Kontrolle mit Minozyklin“, „HLM nicht-pulsatil mit Minozyklin“) wurde das Medikament, aufgelöst in 10 ml 0,9 %iger Natriumchlorid-Lösung, jeweils vor Anschluss an die HLM und direkt nach Abkopplung intravenös über den zentral-venösen Katheter verabreicht. Die erste Dosis betrug 4 mg/kg KM, die zweite Dosis 2 mg/kg KM (siehe Tab. 2).

3.2.4 Intraoperatives Monitoring

3.2.4.1 Vitalparameter

Um das Herzkreislaufsystem auf Funktion und Stabilität hin zu untersuchen, wurden u. a. der arterielle Blutfluss, der mittlere arterielle Blutdruck und das Herz-Zeit-Volumen, sowie der zentralvenöse Druck in regelmäßigen Abständen kontrolliert.

Mit Anschluss an die HLM wurde bei allen Ferkeln ein Blutfluss von 100 ml/Minute/kg KM angestrebt. In der gesamten Zeit der Operation sollte der mittlere arterielle Blutdruck zwischen 40-60 mmHg betragen. Gemessen wurde er über den arteriellen Katheter in der A. femoralis mit „Pulsiocath 5 F Thermodilution“. Zu dem verwendeten PiCCo-System war zusätzlich eine Temperatursonde, platziert an dem ZVK in der V. jugularis, notwendig. Bevor die gemessenen Werte zur Beurteilung des Herzkreislaufsystems herangezogen werden konnten, wurde das System geeicht.

Die Durchführung der Thermodilutionsmethode gestaltete sich wie folgt: Es werden 10 ml einer 0,9 %igen und 4 °C kalten Kochsalzlösung mit hoher Geschwindigkeit über den ZVK infundiert. Die Infusion durchströmt das rechte Herz, den Lungenkreislauf, das linke Herz und schließlich den Körperkreislauf. Die Messsonde in der A. femoralis registriert beim Vorbeifließen der Kochsalzlösung den Temperatur-Abfall, welcher über das Monitoring-Gerät graphisch als Thermodilutionskurve dargestellt wird. Mit dem PiCCo-System (*Pulse Contour Cardiac Output*) ist die Messung des Herz-Zeit-Volumens möglich, indem eine kontinuierliche Analyse der Thermodilutionskurve durch das Monitoring-Gerät erfolgt. Den endgültigen Wert erhält man nach Anwendung der Stewart-Hamilton-Gleichung (Nishikawa 1993).

Um eine ausreichende Sauerstoffsättigung des Blutes zu gewährleisten wurde der prozentuale Anteil des oxygenierten Blutes über ein Pulsoximeter, welches an der Zunge des Versuchstieres befestigt war, kontrolliert. Der Normwert liegt im Bereich von mindestens 96-98 % und sollte während der Operation konstant bleiben.

Des Weiteren wurde der Hämatokrit-Wert von allen Versuchstieren in regelmäßigen Abständen gemessen. Der Anteil der zellulären Blutbestandteile im Serum bestimmt die Fließeigenschaft des Blutes. Bei einem hohen Hämatokrit-Wert ist das Blut in seiner Eigenschaft viskös und das Risiko der Thromben-Bildung steigt. Im Rahmen der Versuchsdurchführung war aufgrund der Thorakotomie, Kanülierung des Herzens und der Kontakt des Blutes mit Fremdoberflächen (Schlauchsystem, Filter, Membranoxygenator) das Thromboserisiko erhöht. Der Hämatokrit-Wert musste engmaschig überprüft werden und sollte nicht zu hoch, jedoch ausreichend für eine konstante Sauerstoffsättigung von mindestens 96-98 % sein. Als kritischer Hämatokrit-Wert werden bei Schweinen 10 % angegeben (Hiebl et al. 2010). Für die durchgeführten Operationen strebte man demnach Werte größer 10 % an.

3.2.4.2 Arterielle Blutgas-Analyse

Für die Analyse der Blutgase wie pCO_2, pO_2, pH-Wert und Basenüberschuss (BE) entnahm man über den Zugang der A. femoralis eine Blutprobe von ca. 0,5 ml alle 30 Minuten. Das Blut wurde in einem Teströhrchen mit dem BGA-Gerät „ABL 725“ untersucht. Somit konnte außerdem der Säure-Basen-Haushalt, sowie die Laktat- und Glukose-Werte und der Elektrolyt-Haushalt des Ferkels beobachtet werden. Wichen einzelne Werte von den Normwerten ab und war der Zustand des Organismus somit instabil, konnten über entsprechende Infusionen und Einstellung der Beatmungsparameter die nötigen Gegenmaßnahmen ergriffen werden. Bei der hier angewendeten alpha-stat-Methode wurde der pH-Wert mit dem BGA-Gerät bei einer Temperatur von 37 °C gemessen und sollte zwischen 7,35-7,45 betragen. Die Beeinflussung und Regulierung des Säure-Basen-Haushaltes bei Azidose war mit der Gabe von Natriumhydrogencarbonat oder Trometamol möglich.
Die Normwerte für Ferkel sind im Anhang, 8.2.2 Tab. 6 aufgelistet (Ketz Riley et al. 1999).

3.2.4.3 Elektrolyt-Haushalt

Für die Kontrolle des Elektrolyt-Haushaltes wurden Natrium, Kalium, Chlorid und Calcium untersucht. Abhängig vom Flüssigkeitshaushalt und dem Blutdruck bekam jedes Versuchstier wenn nötig eine Elektrolyt-Infusion mit E 153. Des Weiteren bestand die Möglichkeit einer Infusion mit Hydroxyethylstärke. Die Normwerte für das Schwein sind im Anhang, 8.2.2 Tab. 7 aufgelistet (Ketz Riley et al. 1999).

3.2.4.4 Laktat- und Glukose-Haushalt

Für die Energiegewinnung der Zellen wird unter physiologischen Bedingungen und ausreichendem Sauerstoffangebot Glukose über den Weg der aeroben Glykolyse zu Pyruvat abgebaut, wobei ATP als Energieträger entsteht. Pyruvat wird unter aeroben Bedingungen in den Mitochondrien für die weitere Energiegewinnung dem Citratzyklus und der Atmungskette zugeführt. Ist nicht genügend Substrat (Glukose) vorhanden, kann es zu oxidativen Stress und Zelltod infolge einer Hypoglykämie kommen (Languren et al. 2013). Der Normwert für Glukose beträgt beim Schwein 4,0-6,5 mmol/l (Ketz Riley et al. 1999). Wurde in der Blutgasanalyse deutlich, dass der Wert sinkt, verabreichte man Glucose-Monohydrat als Infusion nach Bedarf.
Herrscht im Gewebe Sauerstoffmangel wird in den Zellen Pyruvat über den Prozess der Milchsäuregärung (anaerobe Glykolyse) zu Laktat reduziert und ins Blut abgegeben.

3.3 Versuch Teil 2: Laboruntersuchungen

3.3.1 Einbetten der Proben und Herstellung der Schnittpräparate

Alle Geräte, Materialien, Chemikalien und Lösungen für die Histologie sind im Anhang, 8.2.3 Tab. 8 bis 11 aufgelistet. Die Hippocampusformation wurde nach Ablauf der Operation und der Gehirn-Entnahme vorsichtig herausgelöst, bzw. mit einer Pinzette stumpf von den umgebenden Strukturen des Großhirns abpräpariert und in 4 % gepuffertes Formalin nach Lillie für 1 Woche eingelegt. Dann erfolgte das Zurechtschneiden der Gewebestücke, Einlegen in die Einbettkassetten und Überführen in den Einbettautomaten. Die Schnittfläche war so gewählt, dass für die spätere Auswertung ein Frontalschnitt vom Cornu ammonis, welches sich um den Gyrus dentatus legt, vorhanden war. Von diesen Proben sollten später die Schnittpräparate für die histologischen Untersuchungsmethoden hergestellt werden. Für die Bestimmung von Adenosintri- und Adenosindi-phosphat (ATP und ADP) mittels Chromatographie wurden nochmals 2 kleine Gewebe-Proben gewonnen und unmittelbar in flüssigen Stickstoff schockgefrostet, später erfolgte die Lagerung bis zur Labor-Untersuchung bei -80 °C im Gefrierschrank. Die Präparate wurden in dem Einbettautomaten nach folgenden Protokoll mit den genannten Lösungen behandelt (siehe Tab. 12):

Tabelle 12 Protokoll Einbettautomat

Lösung	Zeit (Minuten)	Temperatur (°C)
1. gepuffertes Formalin 4 %	60	35
2. 50 % Isopropanol	60	35
3. 70 % Isopropanol	60	35
4. 80 % Isopropanol	60	35
5. 96 % Isopropanol	60	35
6. 96 % Isopropanol	60	35
7. 100 % Isopropanol	60	35
8. 100 % Isopropanol	60	35
9. 100 % Xylol	30	35
10. 100 % Xylol	30	35
11. Paraffin	30	60
12. Paraffin	30	60
13. Paraffin	60	60
14. Paraffin	60	60

Für das weitere Einbetten wurden die Proben in den Einbettkassetten vom Einbettautomaten direkt in ein Wärmebad mit flüssigem Paraffin überführt. In speziellen Ausgießformen konnte man die Lage der Gewebestücke nochmals korrigieren, bevor die Förmchen mit erwärmten, flüssigen Paraffin aufgefüllt wurden und der obere Anteil der Einbettkassette aufgelegt wurde. Bei Zimmertemperatur begannen die Proben langsam abzukühlen. Zum endgültigen Aushärten des Paraffins konnte eine Lagerung auf einer Kühlplatte für ca. 30 Minuten folgen, bevor die Ausgießformen entfernt wurden.
Die Herstellung der Schnittpräparate für die spätere histologische Auswertung erfolgte mit einem Schlitten-Mikrotom. Dafür wurden die einzelnen Präparate zuerst auf einer Kühlplatte für mindestens 45 bis 60 Minuten gekühlt. Für die Auswertung fanden ausschließlich die Proben des rechten Hippocampus Verwendung. Mit dem Mikrotom wurde mit 5-10 µm starken Schnitten die oberste Paraffinschicht so weit entfernt, bis ein vollständiger Schnitt vom gesamten eingebetteten Präparat entstand. Für die mikroskopische Auswertung der Proben benötigte man Schnitte von 2 µm. Nach Lagerung im warmen Wasserbad für wenige Minuten, um eine etwaige Faltenbildung im Paraffin zu glätten, wurden die Präparate auf die beschrifteten Objektträger gegeben. Die anschließende Trocknung dieser erfolgte in einem Wärmeschrank für mindestens 8 Stunden.

3.3.2 Histologie

3.3.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin, kurz HE, war Teil der Auswertung, um allgemeine morphologische Veränderungen der Pyramidenzellen im Stratum pyramidale des CA1- und CA3-Areals des Cornu ammonis der Hippocampusformation beurteilen zu können.
Es wurde nach folgenden Protokoll vorgegangen (siehe Anhang 8.2.3, Tab. 13): Zu Beginn wurden die Objektträger für mehrere Minuten in Xylol belassen, um das vorhandene Paraffin aus dem Schnittpräparat vollständig herauszulösen. Anschließend folgte eine Rehydrierung des Gewebes in einer absteigenden Alkoholreihe. Mit destilliertem Wasser wurden die Schnittpräparate gewaschen, bevor mittels Hämalaun-Lösung die Färbung der Zellkerne erfolgte. Der natürliche Farbstoff Hämatoxylin färbt die basophilen, also sauren Strukturen, wie z.B. den Zellkern mit der darin enthaltenen Desoxyribonukleinsäure, blau. Zunächst sind die basophilen Strukturen aufgrund des niedrigen pH-Wertes der Hämalaun-Lösung jedoch rotbraun. Erst das Überführen der Präparate in eine Lösung mit einem leicht basischen pH-Wert führt zum Farbumschlag in blau-violett. Das Bläuen erfolgte in einer Scott-Puffer-Lösung. Für die Zytoplasma-Färbung wurden die Proben in 0,1 %iger Salzsäure gewaschen und schließlich in eine wässrige Eosin-Färbelösung überführt. In destilliertem Wasser wurden überschüssige Anteile des Eosins herausgespült. Über eine aufsteigende Alkoholreihe

erfolgte ein Dehydrieren der Proben. Vor dem Eindeckeln wurden die Präparate mittels Xylol geklärt, bzw. gereinigt. Abschließend wurden die vollständig gefärbten Präparate mit Entellan eingedeckelt und für mindestens 12 Stunden unter Druck belassen. Überschüsse des Entellans entfernte man vorsichtig mit auf Zellstoff, bzw. Wattestäbchen appliziertem Xylol.

3.3.3 Immunhistochemie

3.3.3.1 Allgemeines Prinzip

Mit Hilfe der Immunhistochemie (IHC) ist es möglich, spezifische Proteine (die in diesem Fall als Antigen fungieren) durch Interaktion mit bestimmten Antikörpern und unter Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen darzustellen. Somit kann festgestellt werden, ob und in welchen Zellkompartimenten das gesuchte Antigen lokalisiert ist.
Für die histologische Untersuchung wurde eine indirekte Nachweismethode gewählt.
In diesem Fall bindet ein primärer Antikörper an das nachzuweisende Antigen. Dann wird ein weiterer (sekundärer) Antikörper hinzugefügt, der sich gegen den ersten Antikörper richtet. Zusätzlich ist an diesem ein Enzym gekoppelt. Wird in einem nächsten Schritt ein Substrat hinzugefügt, kommt es zu einer Enzym-Substrat-Reaktion und es bilden sich farbige Komplexe aus. Über diese Zwei-Schritt-Methode wird das zu untersuchende Antigen sichtbar gemacht.
In dieser Arbeit wurde die PAP-Methode (Peroxidase-Anti-Peroxidase-Komplex-Methode) genutzt, d.h. an den sekundären Antikörper ist eine Peroxidase gebunden. Diese interagiert mit Wasserstoffperoxid aus der hinzugefügten Substratlösung (Sternberger et al. 1970). Das zusätzlich in der Substratlösung enthaltene, erst farblose Chromogen bildet dabei ein rotes Endprodukt.
Nachfolgend werden die einzelnen Schritte der immunhistochemischen Färbungen beschrieben:
Die Präparate wurden zuerst mehrmals in Xylol gebracht, um das Paraffin vollständig herauszulösen. In einer absteigenden Alkohol-Reihe erfolgte eine Rehydrierung der Schnitte. Reste der Alkohol-Lösungen wurden im destillierten Wasser herausgespült. In TBS 1x-Puffer konnten die Präparate bei einem pH-Wert von 7,6 gewaschen werden. Um die weiteren Schritte durchführen zu können, musste die Zellmembran im vorliegenden Gewebe permeabilisiert werden. Hierfür wurden die Präparate für eine bestimmte Zeit in einer 0,01 M Natrium-Citrat-, bzw. Tris-EDTA-Lösung bis auf 92 °C bis max. 98 °C erhitzt. Für die weitere Verarbeitung folgte eine Abkühlung der Objektträger auf Raumtemperatur in der jeweiligen Lösung. Anschließend wurden die Schnittpräparate wieder in TBS 1x-Puffer gewaschen und in eine methanolische Wasserstoffperoxidlösung gebracht. Dadurch sollte die im Gewebe vorkommende endogene Peroxidase geblockt werden. Diese Lösung wurde mit TBS 1x-Puffer aus dem Gewebe wieder herausgespült. Für die nächsten Schritte mussten sich die einzelnen

Objektträger in einer feuchten Kammer befinden, um ein Austrocknen zu vermeiden. Dafür wurde eine kleine Plastikwanne mit angefeuchtetem Zellstoff am Boden verwendet. Die Objektträger befanden sich auf kleinen Glasplatten und die Schnitte sind mit einem Fettstift umrandet worden, um ein Wegfließen der applizierten Lösungen zu vermeiden. Unspezifische Bindungsstellen im Gewebe wurden mit 2 % BSA, gelöst in TBS 1x-Puffer, geblockt. Somit konnte man zu starke Hintergrund-Färbungen vermeiden. Anschließend wurde der Primär-Antikörper in entsprechender Verdünnung aufgetragen (siehe Anhang, 8.2.3, Tab. 14). Die Plastikwanne mit den so beschichteten Objektträgern lagerte man im Kühlschrank über Nacht bei 4 °C.

Am 2. Tag wurden die Präparate zunächst auf Raumtemperatur erwärmt. Mit TBS 1x-Puffer spülte man den überschüssigen Primär-Antikörper aus dem Gewebe. Es erfolgte die Applikation des Sekundär-Antikörpers mit gekoppeltem Enzym (horseradish-Peroxidase). Die Präparate befanden sich während dieser Zeit wieder in der feuchten Kammer. Nach vorgegebener Einwirkzeit wurde auch diese Lösung mit TBS 1x-Puffer abgespült. Anschließend löste man durch Auftragen von AEC Substrat Chromogen (3-Amino-9-Ethylkarbazol) von DAKO eine Enzym-Substrat-Reaktion aus, wodurch eine makroskopisch sichtbare intensive rote Färbung der Schnittpräparate entstand.

Überschüssiges AEC wurde in TBS 1x-Puffer entfernt und durch eine Hämalaun-Lösung erfolgte die Gegen-Färbung der Zellkerne. Nach dem „Bläuen“ in der Scott-Puffer-Lösung überführte man die Präparate in destilliertes Wasser, bevor die Schnittpräparate mit Glyceringelatine eingedeckelt werden konnten. Für mindestens 12 Stunden wurden die Objektträger unter Druck so belassen, bevor mit Nagellack die Ränder der Deckgläschen abgedichtet und überschüssige Reste der Glyceringelatine mit lauwarmen Leitungswasser vorsichtig gelöst wurden.

3.3.3.2 Nachweis: Apoptose-induzierender Faktor

Der Apoptose-induzierende Faktor (AIF) ist ein zwischen der äußeren und inneren Mitochondrienmembran lokalisiertes Protein und wird über eine Caspase-unabhängige Signalkaskade aktiviert. AIF beeinflusst den Metabolismus der Zelle, wenn es vom Zytoplasma in den Zellkern übertritt. Innerhalb des Nukleus führt AIF zu einer DNA-Fragmentation, sowie Chromatinkondensation und induziert den Apoptose-Vorgang, den programmierten Zelltod (Candé et al. 2002).

Durch Anwendung der immunhistochemischen Färbe-Methode können Zellen mit aktivem Apoptose-induzierenden Faktor (AIF) durch intensive Rotfärbung des Zellkerns nachgewiesen werden.

Für die Färbung des Gewebes mit Verwendung des Antikörpers für AIF mussten die Präparate 30 Minuten in einer 0,01 M Natrium-Citrat-Lösung (pH-Wert von 6) bei 92 °C-max. 98 °C erhitzt werden.

Der Primär-Antikörper, gelöst in Antibody-Diluent von DAKO, wurde in einer Verdünnung von 1:100 aufgetragen.
Als Sekundär-Antikörper verwendete man DAKO Real Envision. Dessen Einwirkzeit betrug 30 Minuten (siehe Anhang, 8.2.3 Tab. 15).

3.3.3.3 Nachweis: Hypoxie-induzierter Faktor 1-alpha

Hypoxie-induzierter Faktor (HIF) ist ein heterodimeres Protein, bestehend aus einer HIF 1-alpha und HIF 1-beta Untereinheit. Unter hypoxischen Bedingungen kommt es zur Aktivierung der HIF 1-alpha-Untereinheit: Nach Translokation vom Zytosol in den Zellkern reguliert und aktiviert es die Transkription von u. a. VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und GLUT1 (*glucose-transporter-1*). HIF 1-alpha nimmt dadurch u. a. Einfluss auf den Glukose-Stoffwechsel der Zelle und die Angiogenese (Chavez et LaManna 2002, Damert et al. 1997, Semenza 1985).
Durch intensive Rotfärbung der Zellkerne in der immunhistochemischen Untersuchung werden Zellen mit aktiven HIF1-alpha sichtbar gemacht.
Für die Färbung des Gewebes mit Verwendung des Antikörpers für HIF 1-alpha mussten die Präparate 30 Minuten in einer 0,01 M Natrium-Citrat-Lösung (pH-Wert von 6) bei 92 °C-max. 98 °C erhitzt werden.
Der Primär-Antikörper, gelöst in Antibody-Diluent von DAKO, wurde in einer Verdünnung von 1:100 aufgetragen.
Als Sekundär-Antikörper verwendete man DAKO Real Envision. Dessen Einwirkzeit betrug 30 Minuten (siehe Anhang, 8.2.3 Tab. 16).

3.3.3.4 Nachweis: cleaved Caspase 3

Caspase 3 gehört zu den sogenannten Effektor-Caspasen, einer Gruppe aus der Familie der Cystein-Proteasen. Die inaktive Vorstufe (Procaspase 3) ist im Zytosol lokalisiert und kann über die Initiator-Caspasen 8 und 9 zu cleaved Caspase 3 umgewandelt werden. Nach Translokation in den Zellkern beeinflusst und reguliert cleaved Caspase 3 apoptotische Vorgänge innerhalb der Zelle, es kommt zur DNA-Fragmentierung, sowie Inaktivierung von DNA-Reparatur-Mechanismen (Kamada et al. 2005, Porter et Jänicke 1999).
Das Vorhandensein von cleaved Caspase 3 innerhalb des Zellkerns wurde mit der immunhistochemischen Färbemethode durch Rotfärbung des Nukleus untersucht.

Die Präparate wurden in einer Tris-EDTA-Lösung für 20 Minuten bei 92 °C-max. 98 °C erhitzt. Die verwendete Lösung hatte einen pH-Wert von 9.
Für den Nachweis von cleaved Caspase 3 wurde der Primär-Antikörper in 2 % BSA in TBS 1x-Puffer gelöst. Die Verdünnung betrug 1:50.
Der Sekundär-Antikörper wurde mit einer Verdünnung von 1:100 ebenfalls in 2 % BSA in TBS 1x-Puffer gelöst. Die Einwirkzeit betrug 1 Stunde (siehe Anhang, 8.2.3 Tab. 17).

3.3.3.5 Nachweis: 3-Nitrotyrosin

Die nicht-proteinogene Aminosäure 3-Nitrotyrosin ist ein Produkt aus der Reaktion von reaktiven Stickstoffspezies (RNS) mit der proteinogenen Aminosäure Tyrosin.
Ein wichtiger Vertreter der reaktiven Stickstoffspezies ist z. B. Peroxynitrit. Diese Verbindung entsteht aus Nitritoxid und der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) Superoxid-Anion.
Im physiologischen Zustand können ROS z. B. in den Mitochondrien der Zellen bei den oxidativen Prozessen der Zellatmung als Nebenprodukt oder aber auch bei Entzündungsprozessen des Organismus entstehen. Die Zellen besitzen mehrere Schutzmechanismen (Antioxidantien) um diese Oxidantien wieder zu eliminieren. Kommt es zu einer Dysbalance zugunsten der ROS wird dies als oxidativer, bzw. nitrosativer Stress bezeichnet. Eine erhöhte Konzentration von 3-Nitrotyrosin ist ein Biomarker für oxidativen Stress der Zellen des zu untersuchenden Gewebes und verursacht zelluläre Dysfunktionen bis hin zum programmierten Zelltod (Beckman et Koppenol 1996).
Es wurde die rotgefärbte Fläche innerhalb der Zellen ausgewertet und zwischen den einzelnen Gruppen verglichen. Bevor die Flächen-Auswertung erfolgen konnte, musste zuerst das Stratum pyramidale in jedem Mikroskop-Bild mit einem Bildbearbeitungsprogramm umrandet und anschließend ausgeschnitten werden. Stark erhöhte Werte der rotgefärbten Zellflächen können darauf hinweisen, dass das vorliegende Gewebe unter Umständen oxidativem, bzw. nitrosativem Stress ausgesetzt war.
Für die Färbung des Gewebes mussten die Präparate in einer 0,01 M Natrium-Citrat-Lösung (pH-Wert von 6) bei 92 °C-max. 98 °C für 30 Minuten erhitzt werden.
Der Primär-Antikörper, gelöst in DAKO Antibody-Diluent, wurde in einer Verdünnung von 1:200 aufgetragen.
Als Sekundär-Antikörper verwendete man DAKO Real Envision. Dessen Einwirkzeit betrug 30 Minuten (siehe Anhang, 8.2.3 Tab. 18).

3.3.3.6 Nachweis: Poly-(ADP)-Ribose

Wirkt oxidativer Stress auf die Zelle ein, können im Zellkern DNA-Reparaturmechanismen aktiviert werden. Ein wichtiges Enzym, das in diese Vorgänge involviert ist, stellt die Poly-(ADP)-Ribose-Polymerase1 dar. Wird das Enzym im Zellkern aktiv, entsteht zusätzlich Poly-(ADP)-Ribose (PAR). Eine Überaktivierung von Poly-(ADP)-Ribose-Polymerase 1 führt zu einem hohen Energie-Verbrauch der Zelle und kann zur Einleitung der Apoptose führen. Diese Form des programmierten Zelltodes bezeichnet man auch als *poly-(ADP)-ribose-polymerase 1-mediated cell death* (Parthanatos) (Wang et al. 2011). In diesen Untersuchungen wurde PAR als indirekter Nachweis von Poly(ADP)-Ribose-Polymerase-1 verwendet. Eine intensive Rotfärbung des Zellkerns, aufgrund einer erhöhten Konzentration von PAR, weist somit auf eine vermehrte Aktivität des Enzyms hin.
Die Präparate wurden bei 92 °C-max. 98 °C für 30 Minuten in einer 0,01 M Natrium-Citrat-Lösung (pH-Wert von 6) erhitzt.
Für den Nachweis von PAR wurde der Primär-Antikörper in 2 % BSA in TBS 1x-Puffer gelöst. Die Verdünnung betrug 1:100.
Den Sekundär-Antikörper applizierte man mit einer Verdünnung von 1:100. Dieser war ebenfalls in 2 % BSA in TBS 1x-Puffer gelöst. Die Einwirkzeit betrug 1 Stunde (siehe Anhang, 8.2.3 Tab. 19).

3.3.4 RP-HPLC – Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography

Die RP-HPLC ist eine Standardmethode der Chemie und beschreibt einen Trennprozess, bei welchem die einzelnen Stoffkomponenten einer Gewebeprobe durch Interaktion mit 2 Phasen chromatographisch verteilt werden. Der Trenneffekt beruht auf unterschiedlicher Polarität der mobilen (flüssigen) und stationären Phase. Die in der Probe enthaltenen Komponenten wandern unterschiedlich schnell in der mobilen Phase entlang einer Trennsäule, der stationären Phase.
Gewebeproben des Hippocampus von allen Versuchstieren wurden mit dieser Methode hinsichtlich ihres Gehaltes an Adenosintriphosphat (ATP) und Adenosindiphosphat (ADP) untersucht.
Bei der hier angewandten Ionenpaarchromatographie reagiert Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBAHS), ein Bestandteil der mobilen Phase, einerseits mit seinem apolaren Rest mit den C-18-Ketten der HPLC-Säule (Octadecyl-Säule, stationäre Phase) und andererseits mit seinen polaren Rest mit der jeweiligen Komponente ATP und ADP. Der zu untersuchende Stoff und TBAHS bilden so ein Ionenpaar.
Die RP-HPLC wurde nach dem Protokoll von Volonté et al. 2004 durchgeführt.
Während der Vorbereitung der Gewebeproben für die HPLC wurde auf Eis gearbeitet. Nach Wiegen der gefrorenen Präparate versetzte man diese mit 5 ml 0,4 M Perchlorsäure, um diese anschließend

im Homogenisator innerhalb 10 Minuten zu homogenisieren. Nach Hinzufügen von 0,8 ml 0,2 M Kaliumhydroxid kam es durch Vermengen mithilfe eines Vortex-Gerätes zum Ausfällen der Proteine. Für weitere 10 Minuten erfolgte das Zentrifugieren bei 3000 x g und einer Temperatur von 4 °C. Der erhaltene Überstand wurde mit einem Spitzenvorsatzfilter filtriert und das Filtrat (mindestens 0,12 ml) in Autosampler-Vials abgefüllt. Für die Durchführung der HPLC für eine Probe benötigte man 0,02 ml des Filtrates.

Alle für die HPLC notwendigen Lösungen wurden mit hochaufgereinigten Wasser hergestellt.

Der grundlegende Aufbau einer HPLC-Anlage besteht aus einer Pumpe, einem Probeninjektor, einer Trennsäule als stationäre Phase, einem mobilen Phasensystem und einem Detektor.

Über die Pumpe angetrieben strömt das Filtrat in der flüssigen Phase entlang der Trennsäule. Die verwendete Säule besteht aus Silica-Gel, woran 18 Methylengruppen kovalent gebunden sind. Bestandteile der mobilen Phase sind 2,3 mM TBAHS, 215 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 4 % Acetonitril und 0, 4 % 1 M Kaliumhydroxid.

Bei jeder HPLC liefen neben der eigentlichen Probe auch Standardlösungen für ATP und ADP mit drei unterschiedlichen Probenkonzentrationen für die Kalibrierung mit. Die Konzentrationen für ATP waren 60, 20 und 2 µg/ml und für ADP 15, 5, 0,5 µg/ml. Um Stammlösungen zu erhalten, wurden die Standards (jeweils 0,12 ml) in 0,4 M Perchlorsäure gelöst. Anschließend wurden diese zusätzlich im Verhältnis 1:10 in 0,4 M Perchlorsäure nochmals verdünnt.

Die Flussgeschwindigkeit entlang der HPLC betrug 1 ml pro Minute. Mittels UV-Detektor (Wellenlänge von 254 nm) wurde die chromatographische Trennung des Filtrates gemessen und visualisiert. Jede Probe durchlief die HPLC dreimal, sodass man daraus einen Mittelwert für jede einzelne Komponente bestimmen konnte (siehe Anhang, 8.2.3 Tab. 20). Nach 20 Minuten Analysezeit für einen HPLC-Durchgang waren die Retentionszeiten (Zeit mit maximalen Spitzenwerten) der zu untersuchenden Stoffe ermittelt (siehe Tab. 21).

Tabelle 21 Retentionszeiten

Komponente	Retentionszeit (Minuten)
ATP	zwischen 8-10
ADP	6,3

Für die Auswertung wurden Standardkurven aus den Peakflächen und den dazugehörigen Konzentrationen für jede einzelne Komponente erstellt, um anschließend deren Quantität zu errechnen.

3.4 Blutanalyse

Für die Analyse der Blutproben war das MVZ-Labor Dr. Reising-Ackermann und Kollegen zuständig. Von jedem Versuchstier wurden jeweils 2 Blutproben zur Untersuchung gegeben. Zeitpunkt der Blutabnahme waren 0 Minuten (Beginn der Operation) und 240 Minuten (Ende der Rekonvaleszenzzeit). Das Blut des Versuchstieres wurde auf folgende Parameter hin untersucht: Elektrolyte, Entzündungsfaktoren, Analyse der Serumproteine mittels Eiweißelektrophorese (Gesamteiweiß, Albumin, alpha-1-Globulin, alpha-2-Globulin, beta-Globulin, gamma-Globulin) und Erstellung eines großen Blutbildes mit mikroskopischer Differenzierung der Leukozyten.

In dieser Dissertation beschränkt sich die Auswertung der Blutproben auf die Parameter Gesamteiweiß, Albumin und Leukozyten-Konzentration. Zusammen mit der Blutgasanalyse konnte somit für jedes Versuchstier der körperliche Zustand vor, während und nach der Versuchsdurchführung beurteilt werden. Ein erniedrigter Albumin-Wert kann ein Hinweis auf Störungen des kolloidosmotischen Druckes sein und zu einer interstitiellen Ödem-Bildung führen. Des Weiteren können erhöhte Konzentrationen des Gesamteiweißes, bzw. ein Ansteigen der Leukozyten-Anzahl auf eine akute Entzündung innerhalb des Organismus hinweisen.

3.5 Auswertung am Mikroskop

Für die Auswertung stand ein Mikroskop von Carl Zeiss, Modell AXIO Imager M1 zur Verfügung. Mithilfe einer Kamera von Carl Zeiss, Modell AXIO Cam Mrc5 konnte der mikroskopierte Gewebe-Ausschnitt auf einen Computer übertragen und am Monitor betrachtet werden. Die dafür benötigte Software AxioVision Rel. 4.8.2. war auf dem Computer gespeichert.

In einer 5 fachen Vergrößerung wurde das gesamte gefärbte Präparat betrachtet, um eine Übersicht über Färbegrad, etwaige Artefakte und Lage der einzelnen Gewebsstrukturen zu erlangen. Auf jedem Objektträger waren für jedes Versuchstier mindestens zwei oder drei Frontalschnitte des rechten Hippocampus pro Färbung vorhanden. Es wurden für die Auswertung jene Präparate mit dem besten Färbe-Ergebnis verwendet.

Eine optimale Darstellung der für die Auswertung relevanten Zellstrukturen war mit einer 200fachen Vergrößerung möglich.

Für die Auswertung wurde die Pyramiden-Zellschicht in der CA1- und CA3-Region des Cornu ammonis betrachtet. In diesen Regionen waren die morphologischen Zellveränderungen am deutlichsten sichtbar. Mit der 200fachen Vergrößerung zoomte man in den jeweiligen Bereich und fertigte von beiden Regionen Fotos mit der Kamera von Carl Zeiss, Modell AXIO Cam Mrc5 an. Bevor man das

Gewebe fotografieren konnte, erfolgt die korrekte Einstellung der Belichtung, das Köhlern und ein Weißabgleich für eine optimale Farbwiedergabe auf den Bildern am Computer. Um das gesamte CA3-Areal fotografisch zu erfassen, werden mindestens 6 Bilder benötigt. Das CA1-Areal ist weiter ausgedehnt und konnte mit ca. 11 Bildern vollständig dargestellt werden. Die Bild-Anzahl variiert leicht zwischen den einzelnen Versuchstieren, abhängig von der Größe des Hippocampus. Wichtig war es, beide Bereiche für jedes Versuchstier vollständig zu erfassen. Alle Bilder der CA1- und CA3-Region wurden auf dem Computer für die spätere Auswertung im czi.- bzw. im jpg.-Format gespeichert. Zusätzlich fügte man in jedem Bild einen Maßstabsbalken von 20 µm ein.

Die CA1- und CA3-Region wurden getrennt voneinander ausgewertet.

Alle Bilder für den Nachweis von AIF, HIF 1-alpha, cleaved Caspase 3 und Poly-(ADP)-Ribose, sowie die HE-Färbung konnten mit der Software ZEN 2011 geblindet ausgewertet werden.

Es wurde für jedes Areal pro Färbung die Gesamtzahl der mikroskopisch sichtbaren Pyramidenzellen ermittelt.

Die Anzahl der Zellen in der CA1-Region betrug annähernd 900, für die CA3-Region waren es ca. 600 Pyramiden-Zellen. Da die Dichte der Zellen, die Breite des Stratum pyramidale und die Ausdehnung der beiden Regionen für jedes Versuchstier individuell ausgeprägt waren, gelten diese Zahlen nur als Richtwerte.

Für den Nachweis von AIF, HIF 1-alpha, cleaved Caspase 3 und Poly-(ADP)-Ribose wurde neben der Gesamtzahl der Pyramiden-Zellen die Anzahl der positiven Zellen mit rot gefärbten Zellkern ermittelt und anschließend der prozentuale Anteil dieser an der jeweiligen Gesamtzahl der Zellen errechnet.

Mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde ebenfalls die Gesamtanzahl der Pyramidenzellen je zu untersuchendes Areal erfasst, sowie ausgezählt wie viele Zellen morphologische Veränderungen, wie Ödembildung, erhöhte Eosinophilie des Zytoplasmas oder Pyknose des Zellkerns aufweisen.

Die Zellen mit Ödem erschienen teilweise „losgelöst“ vom umliegenden Gewebe zu sein. Eine Eosinophilie war durch ein intensiv rosa-rot gefärbtes Zytoplasma charakterisiert. Eine deutliche Schrumpfung des Zellkerns und unter Umständen des Zytoplasmas waren Kennzeichen der Pyknose.

Für die Auswertung des immunhistochemischen Nachweises von 3-Nitrotyrosin wurden die Flächen des rotgefärbten Zytoplasmas und die Gesamtflächen der Pyramiden-Zellschicht des jeweiligen CA-Areals errechnet. Als Auswertungsprogramm verwendete man die Software ImageJ.

Zunächst musste die Gesamtfläche des Stratum pyramidale pro CA-Region für jedes einzelne Versuchstier ermittelt werden. Dafür musste auf allen Bildern die Pyramidenzellschicht mit der Software GIMP 2 ausgeschnitten werden. Über das Programm ImageJ erfolgte anschließend die Flächen-Auswertung. In diesem Programm konnte zudem die Fläche mit intensiver Rotfärbung für jedes Bild bestimmt werden. Anschließend wurde der prozentuale Anteil dieser von der zuvor ermittelten Gesamtfläche errechnet. Alle Präparate wurden geblindet ausgewertet.

3.6 Statistik

Aus allen Ergebnissen wurde der Mittelwert (MW) mit dessen Standardfehler (SEM) aus n Experimenten errechnet. Für die Untersuchung, ob Unterschiede zwischen den 5 Gruppen signifikant waren oder nicht, wurde die mehrfaktorielle Varianzanalyse ANOVA verwendet. Der post-hoc Tukey HSD Test wurde angewandt, um darzustellen, zwischen welchen Versuchsgruppen Signifikanzen bestanden.

Die Ergebnisse der RP-HPLC-Messung wurden ebenfalls mit der mehrfaktoriellen Varianzanlayse ANOVA analysiert, um festzustellen ob signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen vorhanden waren oder nicht. Man verwendete den Kruskal-Wallis post-hoc Test um festzustellen, zwischen welchen Gruppen signifikante Unterschiede bestanden.

Die Ergebnisse waren signifikant bei einem p-Wert kleiner als 0,05.

Für die statistische Analyse wurde die Software Systat für Windows, Version 11 (Systat Inc., Evanston, IL USA) angewandt.

Die graphische Umsetzung der statistischen Auswertung erfolgte mit der Software SigmaPlot, Version 10.

4 Ergebnisse

4.1 Intraoperatives Monitoring

Für alle Ferkel konnte während der gesamten OP eine arterielle Sauerstoffsättigung von mindestens 96 % aufrechterhalten werden.

Es wurde deutlich, dass während der Phase der extrakorporalen Zirkulation der mittlere arterielle Blutdruck in allen 3 Gruppen mit Anschluss an die HLM absank, jedoch über dem Mindest-Wert von 40 mmHg blieb. Ein Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks wurde in beiden Kontrollgruppen zu keiner Zeit beobachtet.

Der zentralvenöse Venendruck befand sich für alle Versuchstiere im Bereich der Normwerte.

Der Hämatokrit-Wert blieb in allen Gruppen über 15 %.

Alle Mittelwerte sind im Anhang, 8.3.1 Tab. 22 und 23 aufgelistet.

Wie im Anhang, 8.3.1 aus den Tab. 24 und 25 ersichtlich wird, konnte für alle Versuchstiere konstant ein physiologischer pH-Wert im Bereich von 7,35 – 7,45 aufrechterhalten werden.

Während der 90-minütigen HLM-Zeit und in der anschließenden Reperfusionsphase wurde in der Versuchsreihe „HLM nicht-pulsatil“ ein pCO_2 über dem angestrebten Maximalwert von 45 mmHg gemessen. Die Kontrollgruppe und die Versuchsreihe „HLM nicht-pulsatil mit Minozyklin“ zeigten bereits zu Beginn der Versuchsdurchführung einen erhöhten pCO_2-Wert von über 45 mmHg.

Für alle Ferkel konnte über den gesamten Zeitraum der Operation ein Sauerstoff-Partialdruck von über 90 mmHg erreicht werden.

Die Werte des Basen-Überschusses orientierten sich in allen 5 Versuchsgruppen am Norm-Bereich und zeigten keine deutlichen Abweichungen.

Es kam zu keiner Zeit zu einer Entgleisung des Säure-Basen-Haushaltes. Mit entsprechenden Infusionen und regulierenden Maßnahmen (siehe Tiere, Material und Methoden, 3.2.3.3, 3.2.4.2 und 3.2.4.3) wurden ebenso die Vitalparameter im Bereich der geltenden Normwerte gehalten.

4.2 Arterielle Blutproben

In Abb. 4 wird der Anteil des Gesamteiweißes im Blut für jede Gruppe zu Beginn des Versuches und nach Abschluss der Rekonvaleszenzzeit dargestellt. Vor Start der Operation gab es zwischen den 5 Versuchsgruppen keine Unterschiede ($p = 0,463$). Am Ende des operativen Eingriffes (nach 240 Minuten) konnten deutliche Differenzen ($p = 0,001$) zwischen den Versuchsreihen gemessen werden. Durch den Einsatz der HLM kam es zu einem signifikanten Abfall des Gesamteiweißes im Serum

(p < 0,05) während der Reperfusionsphase (siehe Anhang, 8.3.2 Tab. 26). Dieser Wert sank bei den Versuchstieren mit HLM und nicht-pulsatilem Blutfluss am weitesten ab, wie in Abb. 4 deutlich wird. Durch die Gabe von Minozyklin in der Gruppe „HLM nicht-pulsatil mit Minozyklin“ konnte einem Abfall des Gesamteiweißes im Serum (p > 0,05) entgegen gewirkt werden.

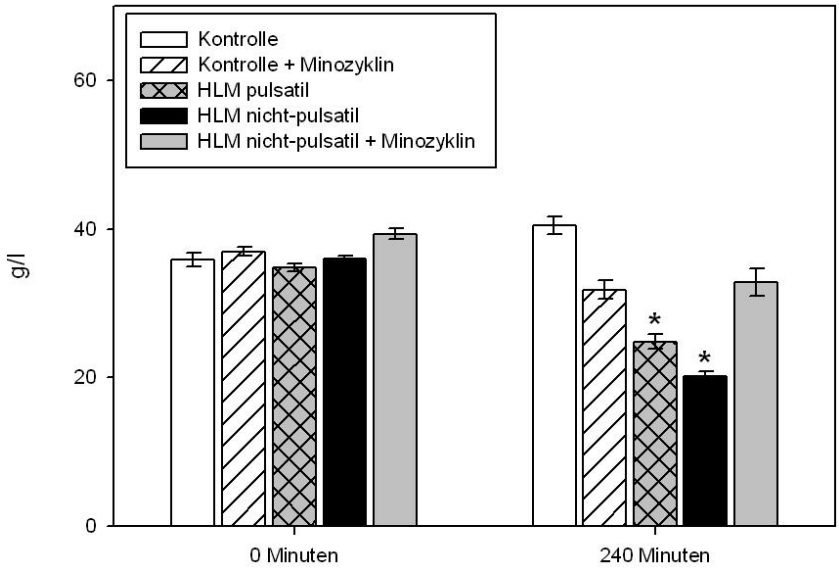

Abbildung 4: Anteil des Gesamteiweißes im Blut
p < 0,05 * gegen Kontrolle

Abb. 5 zeigt den prozentualen Anteil des Albumins am Gesamteiweiß im Blut bei allen 5 Versuchsgruppen zu Beginn der Operation und nach Abschluss der Rekonvaleszenzzeit. Vor Start der Operation gab es zwischen den 5 Versuchsgruppen keine Differenzen (p = 0,133). Nach 240 Minuten kam es zu deutlichen Unterschieden des Albumin-Wertes (p = 0,004) zwischen den Versuchsreihen. In der Gruppe „HLM mit nicht-pulsatilem Blutfluss“ stieg der Prozentsatz des Albumins in der Reperfusionsphase an (p < 0,05). In Abbildung 2 wird dargestellt, dass die Versuchsreihe „HLM mit pulsatilem Blutfluss“ hingegen keinen Anstieg des prozentualen Anteils an Albumin zeigte. Diese Gruppe unterschied sich von der HLM-Gruppe mit nicht-pulsatilem Blutfluss (p < 0,05). Alle Werte sind im Anhang, 8.3.2 Tab. 27 aufgelistet.

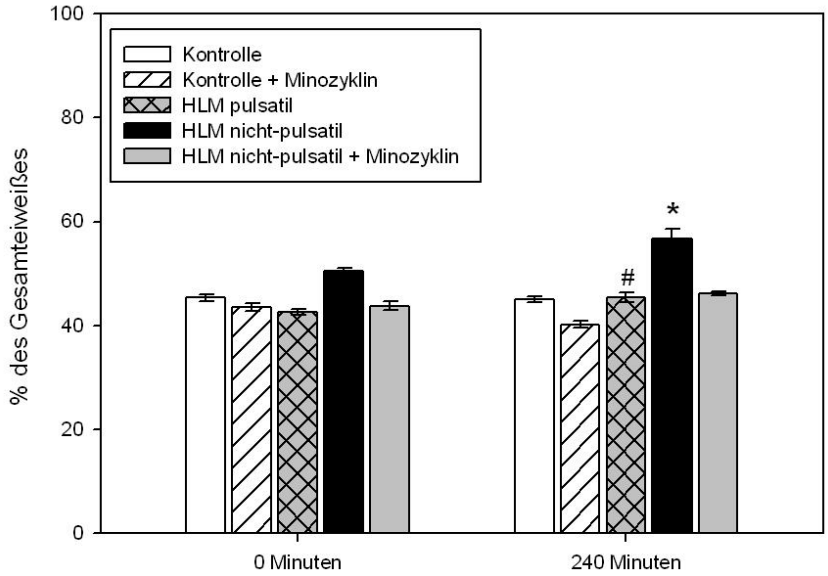

Abbildung 5: prozentualer Anteil des Albumins am Gesamteiweiß im Blut
p < 0,05 * gegen Kontrolle
p < 0,05 # gegen HLM nicht-pulsatil

Die Abb. 6 zeigt die Leukozyten-Konzentration für jede Gruppe zu Beginn des Versuches und nach Abschluss der Rekonvaleszenzzeit. Die Werte zeigen, dass es in keiner Versuchsreihe während der Operation zu einem signifikanten Veränderung der Leukozyten-Konzentration kam (Zeitpunkt 0 Minuten: p = 0,527 und Zeitpunkt 240 Minuten: p = 0,970). Alle Mittelwerte sind im Anhang, 8.3.2 Tab. 28 aufgelistet.

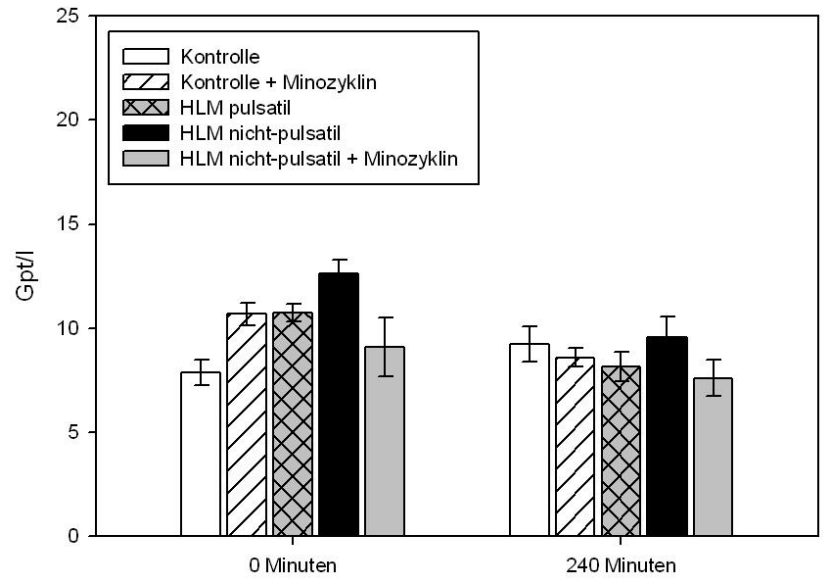

Abbildung 6: Leukozyten-Konzentration im Blut

4.3 Arterielles Blut: Laktat-Haushalt

In Abb. 7 wird die Laktat-Produktion im arteriellen Blut für alle 5 Versuchsgruppen zu Beginn des Versuches und nach Abschluss der Rekonvaleszenzzeit dargestellt. Zu Beginn der Operation wurde bei allen Versuchstieren eine annähernd gleiche Laktat-Produktion ohne bedeutsame Unterschiede ($p = 0,654$) festgestellt. Nach 240 Minuten kam es zu signifikanten Veränderungen zwischen den 5 Gruppen ($p = 0,0001$). In der Reperfusionsphase ergaben die Messungen in allen Gruppen mit Anschluss an die HLM im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen signifikant erhöhte Werte (jeweils $p < 0,05$). In Abb. 7 wird deutlich, dass mit Anschluss an die Herz-Lungen-Maschine die Bildung von Laktat am stärksten in der HLM-Gruppe mit nicht-pulsatilem Blutfluss angestiegen ist (siehe Anhang, 8.3.3 Tab. 29). In der Phase der Reperfusion beeinflusste die Art der Herz-Lungen-Maschine die Menge an produziertem Laktat.

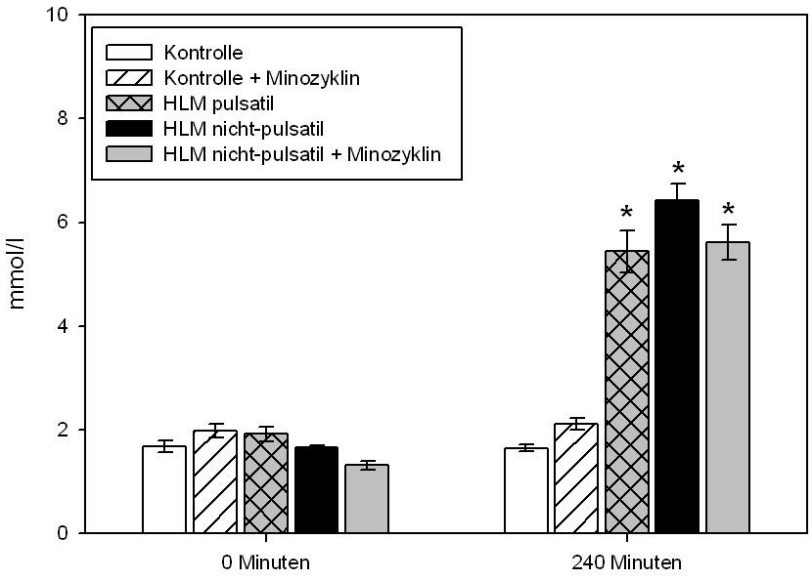

Abbildung 7: graphische Darstellung der Laktat-Produktion, gemessen im arteriellen Blut
$p < 0,05$ * gegen Kontrolle

4.4 Ergebnisse der RP-HPLC

Aus den ermittelten Werten für das energiereiche Phosphat ATP und das energieärmere Phosphat ADP wurde für jedes Versuchstier das Verhältnis ATP/ADP errechnet. Für die Auswertung verwendete man Gewebeproben des rechten Hippocampus.

In Abb. 8 wird das Verhältnis ATP/ADP für alle Gruppen nach Abschluss der Rekonvaleszenzzeit dargestellt.

Zwischen den 5 Versuchsgruppen gab es deutliche Unterschiede (p = 0,020). Die niedrigeren ATP/ADP - Werte der 3 HLM-Gruppen wiesen darauf hin, dass durch Anschluss an die Herz-Lungen-Maschine der ATP-Verbrauch angestiegen ist. Der Verbrauch von energiereichen Phosphaten war in der Gruppe „HLM mit nicht-pulsatilem Blutfluss“ am stärksten. Die Abb. 8 zeigt, dass in der Gruppe „HLM mit pulsatilem Blutfluss“ weitaus weniger ATP verbraucht wurde (p < 0,05). Die Medikation mit Minozyklin konnte den ATP-Verbrauch nicht senken (siehe Anhang, 8.3.4 Tab. 30). Es wurde festgestellt, dass die Art der Herz-Lungen-Maschine Einfluss auf den Verbrauch von energiereichen Phosphaten nahm.

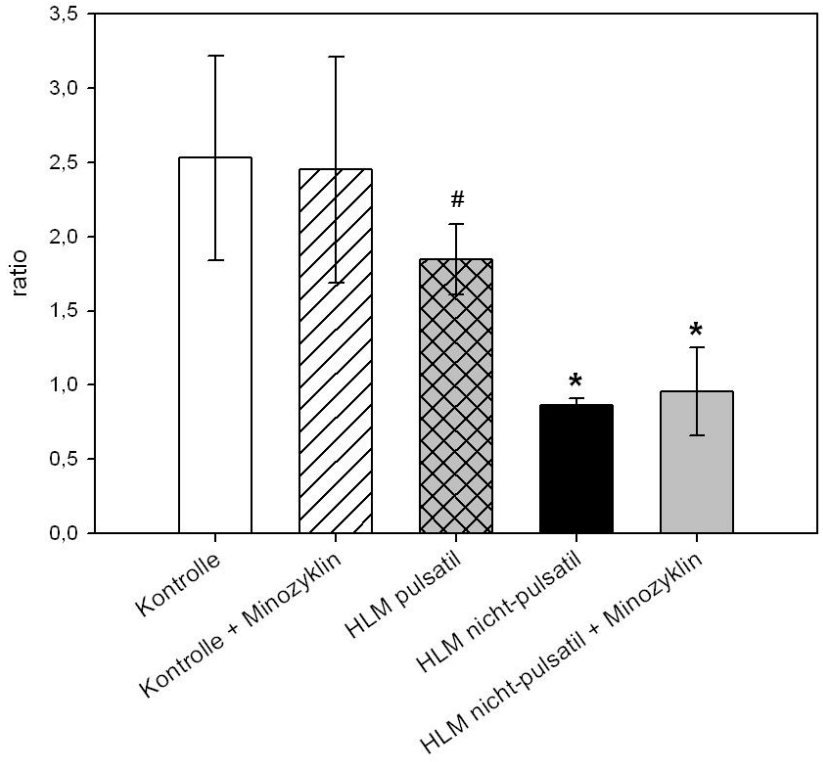

Abbildung 8: Verhältnis ATP/ADP der Gewebeproben des Hippocampus
p < 0,05 * gegen Kontrolle
p < 0,05 # gegen HLM nicht-pulsatil

4.5 Ergebnisse der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Von allen Versuchstieren konnten Gewebeproben des rechten Hippocampus verwendet werden. Die Abb. 12 zeigt von allen 5 Versuchsgruppen Mikroskop-Bilder mit entsprechenden Änderungen in der Zellmorphologie für die CA1- und CA3-Region. In Abb. 9 wird der prozentuale Anteil an Zellen mit Ödem-Bildung an der Gesamtzahl der Zellen pro CA-Region für jede Gruppe dargestellt. Die Ausbildung eines Ödems war sowohl in der CA1-Region (p = 0,004), als auch in der CA3-Region (p = 0,004) des Hippocampus in allen 5 Versuchsgruppen unterschiedlich stark ausgeprägt (siehe Anhang, 8.3.5 Tab. 31). Der höchste Anteil an Zellen mit Ödem wurde in der Gruppe „HLM mit nicht-pulsatilem Blutfluss“

gemessen. Die Auswertung ergab, dass in dieser Versuchsreihe in beiden CA-Arealen mehr Zellen mit Ödem vorkamen als in der Kontrollgruppe (jeweils $p < 0,05$). Wie in Abb. 9 ersichtlich wird, konnte ein pulsatiler Blutfluss während der extrakorporalen Zirkulation die Anzahl an Zellen mit Ödem in der CA1-Region signifikant vermindern. In der CA3-Region zeigte sich ebenfalls eine Reduktion der Zellen mit Ödem, diese war aber nicht signifikant. Ebenso verringerte die Gabe des Medikaments Minozyklin den Anteil an Zellen mit Ödem in beiden CA-Arealen (jeweils $p < 0,05$). Es stellte sich heraus, dass die Art der Herz-Lungen-Maschine, sowie die Gabe von Minozyklin Einfluss auf die Entstehung eines Zellödems nahmen. Die Analyse, ob die Ausbildung eines Ödems zwischen CA1- und CA3-Areal innerhalb eines Versuchstieres unterschiedlich war, ergab keine Differenzen. Unter Kontrollbedingungen beeinflusste Minozyklin die Bildung eines Ödems nicht.

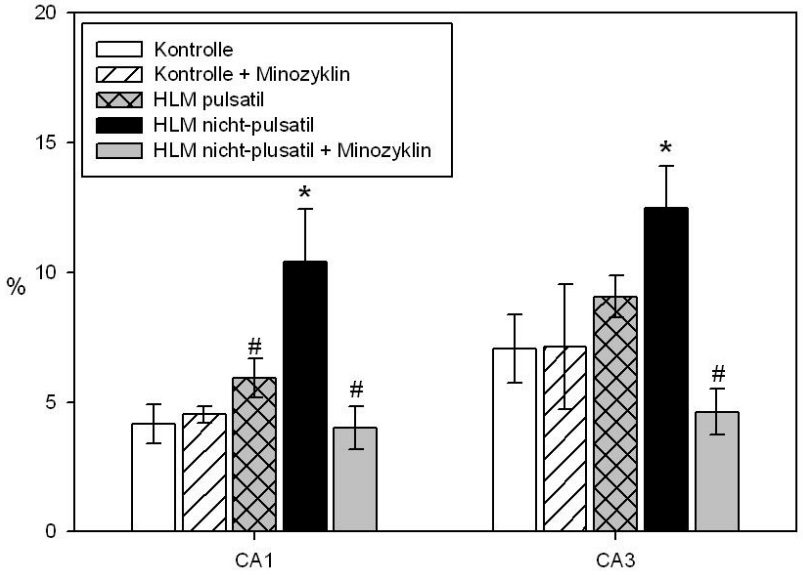

Abbildung 9: HE-Färbung, prozentualer Anteil an Zellen mit Ödem-Bildung an der Gesamtzahl der Zellen pro CA-Region
$p < 0,05$ * gegen Kontrolle
$p < 0,05$ # gegen HLM nicht-pulsatil

In Abb. 10 wird der prozentuale Anteil an Zellen mit Eosinophilie des Zytoplasmas an der Gesamtzahl der Zellen pro CA-Region für jede Gruppe dargestellt. Weder in der CA1-Region ($p = 0,869$), noch in der CA3-Region ($p = 0,961$) konnten Signifikanzen gemessen werden (siehe Anhang, 8.3.5 Tab. 32).

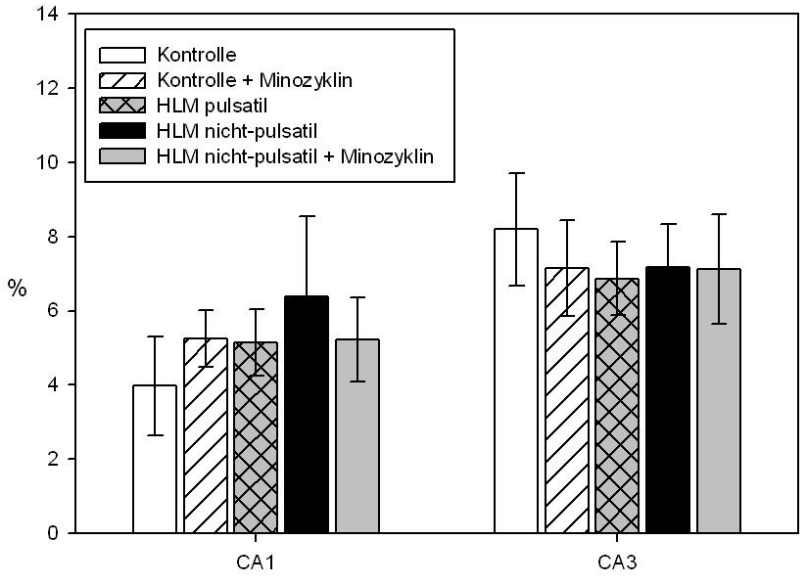

Abbildung 10: HE-Färbung, prozentualer Anteil an Zellen mit Eosinophilie des Zytoplasmas an der Gesamtzahl der Zellen pro CA-Region

In Abb. 11 wird der prozentuale Anteil an Zellen mit Pyknose an der Gesamtzahl der Zellen pro CA-Region für jede Gruppe dargestellt. Sowohl im CA1- ($p = 0{,}152$), als auch im CA3-Areal ($p = 0{,}074$) konnten zwischen den 5 Gruppen keine Unterschiede ermittelt werden (siehe Anhang, 8.3.5 Tab. 33).

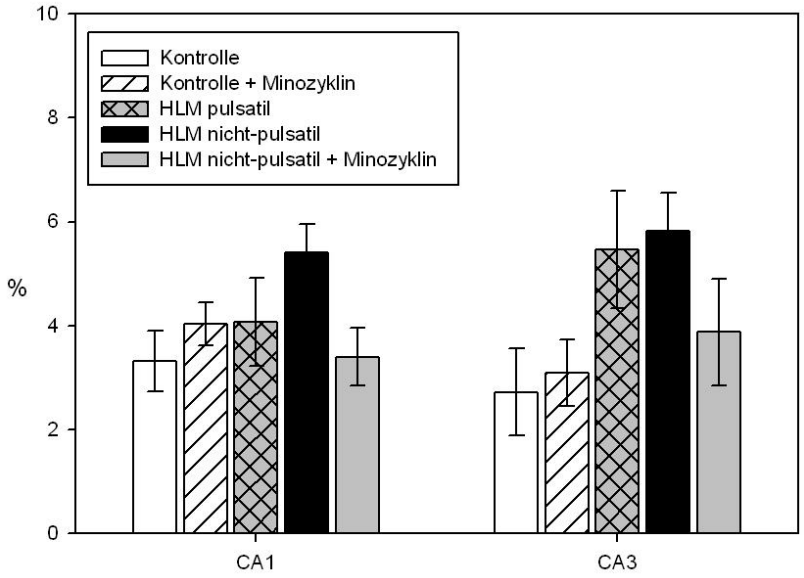

Abbildung 11: HE-Färbung, graphische Darstellung des prozentualen Anteils an Zellen mit Pyknose an der Gesamtzahl der Zellen pro CA-Region

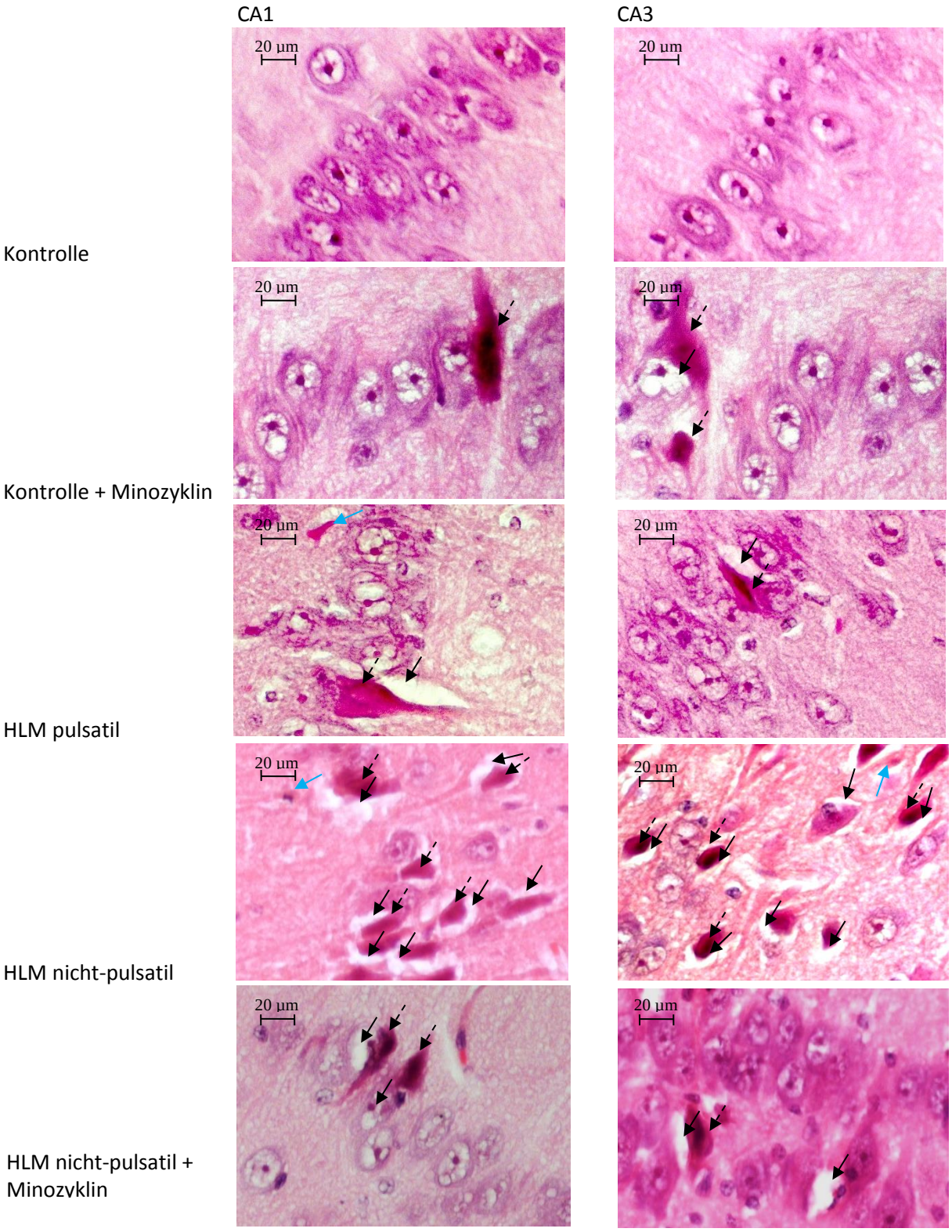

Abbildung 12: HE-Färbung

Cornu ammonis (CA1- und CA3-Region) des Hippocampus,
Stratum pyramidale, Vergrößerung 200 fach

→ schwarzer Pfeil markiert Zellen mit Ödem

- - - ▶ schwarzer, gestrichelter Pfeil markiert Zellen mit stark eosinophilen Zytoplasma

→ blauer Pfeil markiert pyknotische Zellen

4.6 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen

4.6.1 Apoptose-induzierender Faktor

Für alle 5 Versuchsreihen sind Mikroskop-Bilder der IHC-Färbung für den Nachweis von AIF in Abb. 14 dargestellt. Es wurden Proben des rechten Hippocampus verwendet. Die Abb. 13 zeigt die Anzahl der positiven Zellkerne mit AIF von der Gesamtzahl der Zellen für die CA1- und CA3-Region für jede Gruppe. In beiden CA-Regionen war die Anzahl der rot-gefärbten Zellkerne zwischen den Versuchsreihen unterschiedlich (CA1: $p = 0{,}0001$ und CA3: $p = 0{,}0001$) ausgeprägt (siehe Anhang, 8.3.6 Tab. 34). In der HLM-Gruppe mit nicht-pulsatilem Blutfluss war die Anzahl der Zellen mit Apoptose-induzierendem Faktor im Nukleus am höchsten ($p < 0{,}05$). Hingegen wiesen die HLM-Gruppe mit pulsatilem Blutfluss und die HLM-Gruppe mit Minozyklin-Gabe nicht mehr positive Zellkerne mit AIF auf, als die Kontroll-Gruppe (jeweils $p > 0{,}05$). Ein pulsatiler Blutfluss und die Medikation mit Minozyklin während der extrakorporalen Zirkulation konnte die Anzahl der Zellen mit AIF im Zellkern im Vergleich zu einem nicht-pulsatilem Blutfluss vermindern (jeweils $p < 0{,}05$). Die Art der Herz-Lungen-Maschine und die Gabe von Minozyklin während der extrakorporalen Zirkulation beeinflussten die Aktivierung des Apoptose-induzierenden Faktors in den Pyramiden-Zellen. Unter Kontrollbedingungen führte die Gabe von Minozyklin zu keiner vermehrten Bildung von AIF. Die Anzahl der positiven Zellen zwischen CA1- und CA3-Region innerhalb eines Versuchstieres war nicht unterschiedlich ausgeprägt.

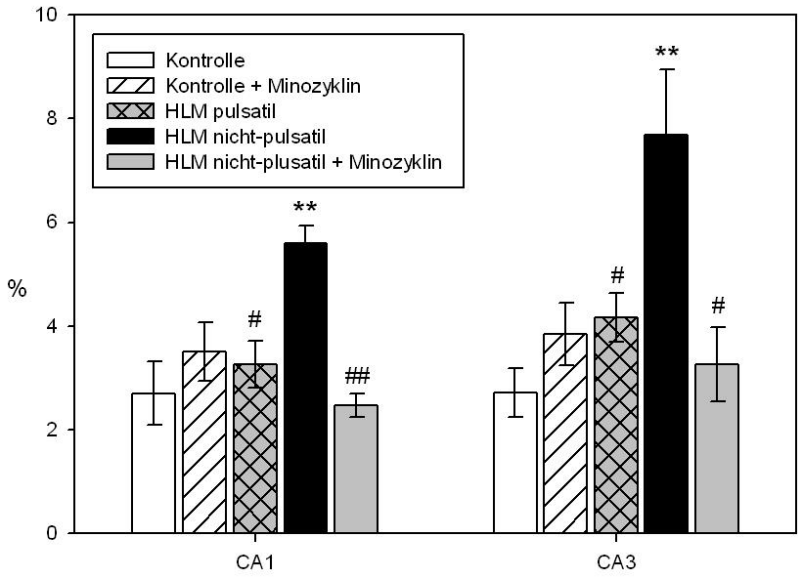

Abbildung 13: IHC-Färbung für den Nachweis von AIF, prozentualer Anteil an Zellen mit positiven Zellkern bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen pro CA-Region
$p \leq 0{,}001$ ** gegen Kontrolle
$p < 0{,}05$ # gegen HLM nicht-pulsatil
$p \leq 0{,}001$ ## gegen HLM nicht-pulsatil

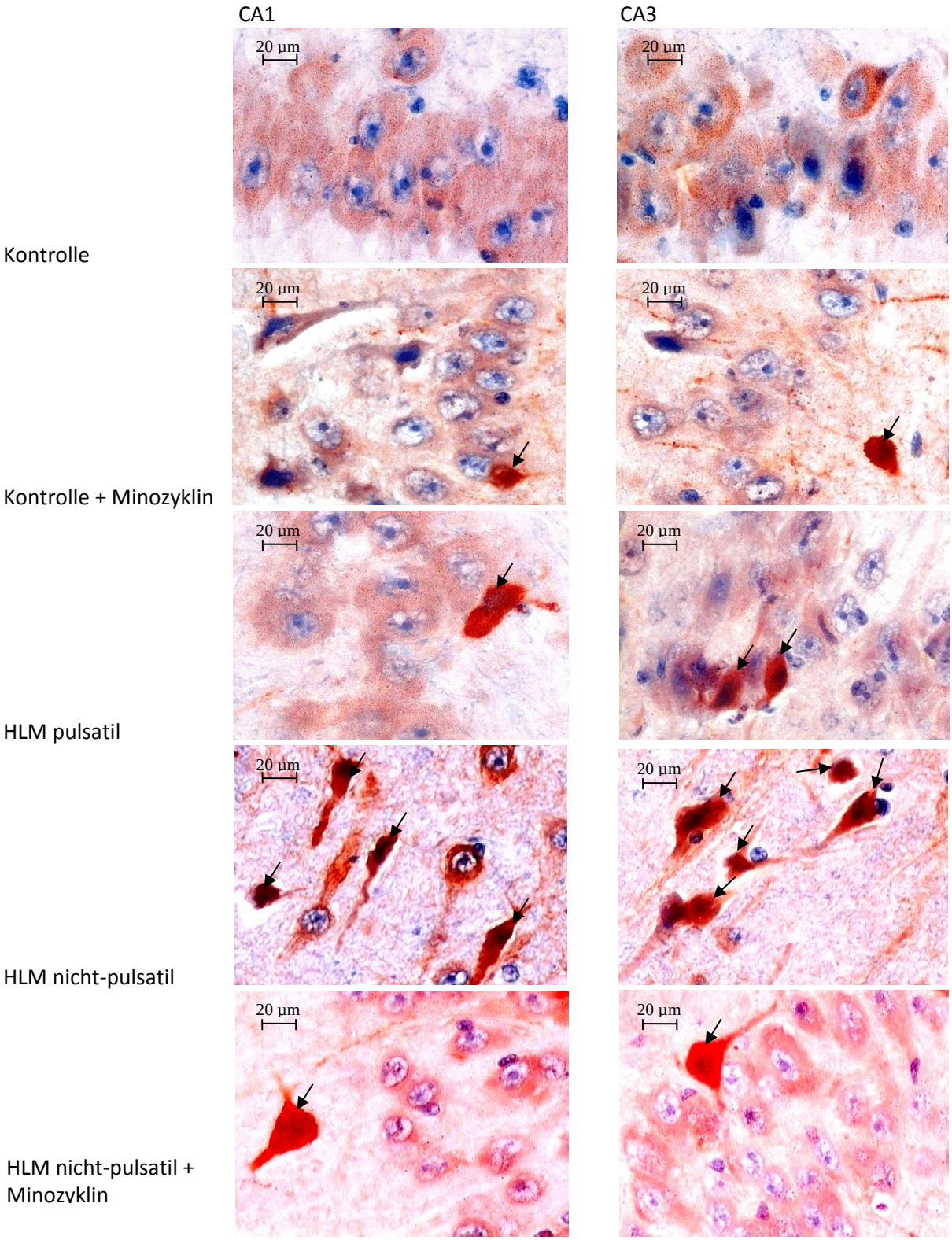

Abbildung 14: IHC-Färbung für den Nachweis von AIF

Cornu ammonis (CA1- und CA3-Region) des Hippocampus, Stratum pyramidale, Vergrößerung 200 fach

→ schwarzer Pfeil markiert Zellen mit positivem Zellkern für AIF

4.6.2 Hypoxie-induzierter Faktor 1-alpha

In Abb. 16 sind die Mikroskopbilder beider CA-Regionen von den 5 Versuchsgruppen der IHC-Färbung für den Nachweis von HIF 1-alpha dargestellt. Es konnten Gewebeproben des rechten Hippocampus verwendet werden. Die Abb. 15 veranschaulicht den prozentualen Anteil der Zellen mit aktivierten HIF 1-alpha im Zellkern von der Gesamtzahl der Pyramidenzellen für die CA1- und CA3-Region für jede Gruppe. In beiden CA-Arealen wurden zwischen den 5 Versuchsreihen (CA1: $p = 0{,}0001$ und CA3: $p = 0{,}001$) unterschiedlich viele positiv rot-gefärbte Zellkerne gezählt (siehe Anhang, 8.3.6 Tab. 35). Die HLM-Gruppe mit nicht-pulsatilem Blutfluss wies die höchste Anzahl an Zellen mit HIF 1-alpha im Nukleus auf ($p < 0{,}05$). Für die HLM-Gruppen mit pulsatilem Blutfluss, bzw. durch die Gabe von Minozyklin bei nicht-pulsatilem Blutfluss wurden weniger Zellen mit positivem Zellkern gezählt (jeweils $p < 0{,}05$). Deren gemessenen Werte unterschieden sich nicht von denen der Kontrollgruppe (jeweils $p > 0{,}05$). Unter Kontrollbedingungen beeinflusste Minozyklin die Bildung von HIF 1-alpha nicht. Auf die Anzahl der Zellen mit HIF 1-alpha im Nukleus nahmen sowohl die Art der HLM, als auch die Gabe von Minozyklin während der extrakorporalen Zirkulation Einfluss. Bereits unter Kontrollbedingungen waren im CA3-Areal mehr positive Zellkerne sichtbar als im CA1-Areal.

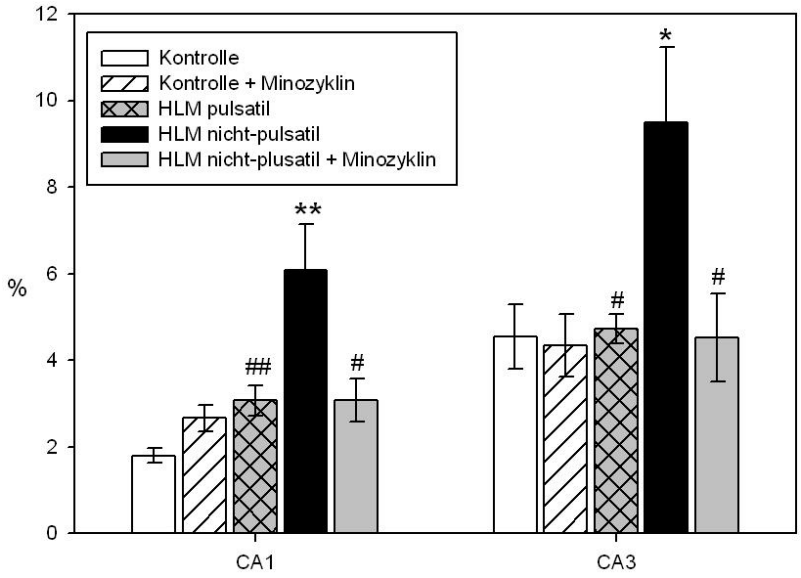

Abbildung 15: IHC-Färbung für den Nachweis von HIF 1-alpha, prozentualer Anteil an Zellen mit positiven Zellkern an der Gesamtzahl der Zellen pro CA-Region
$p < 0{,}05$ * gegen Kontrolle
$p \leq 0{,}001$ ** gegen Kontrolle
$p < 0{,}05$ # gegen HLM nicht-pulsatil
$p \leq 0{,}001$ ## gegen HLM nicht-pulsatil

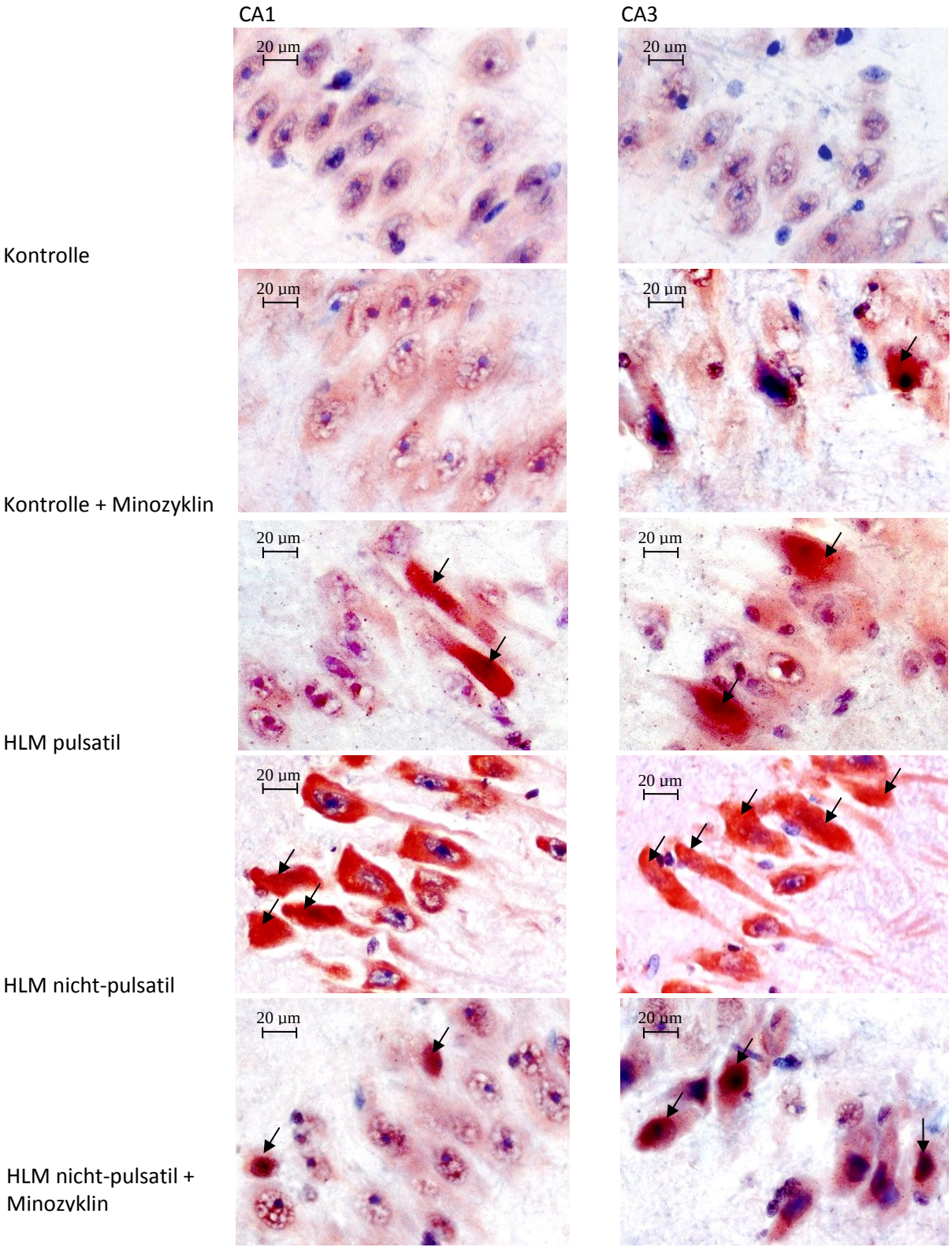

Abbildung 16: IHC-Färbung für den Nachweis von HIF 1-alpha

Cornu ammonis (CA1- und CA3-Region) des Hippocampus, Stratum pyramidale, Vergrößerung 200 fach

→ schwarzer Pfeil markiert Zellen mit positivem Zellkern für HIF 1-alpha

4.6.3 3-Nitrotyrosin

Die Abb. 18 zeigt Mikroskop-Bilder der IHC-Färbung für den Nachweis von 3-Nitrotyrosin von allen Versuchsgruppen für beide CA-Regionen. Es wurden ausschließlich Gewebeproben des rechten Hippocampus verwendet. Die Abb. 17 zeigt die Darstellung des prozentualen Anteils der positiv rot-gefärbten Zellfläche von der Gesamt-Zellfläche für das CA1- und CA3-Areal in den 5 Gruppen. Es stellte sich heraus, dass die Bildung von 3-Nitrotyrosin in beiden CA-Regionen zwischen den Versuchsreihen unterschiedlich (CA1: $p = 0{,}0001$ und CA3: $p = 0{,}0001$) ausgeprägt war (siehe Anhang, 8.3.6 Tab. 36). In der Gruppe „HLM mit nicht-pulsatilem Blutfluss“ war die durch 3-Nitrotyrosin rot-gefärbte Fläche am größten ($p < 0{,}05$). Die rot-gefärbten Zellflächen der HLM-Gruppen mit pulsatilem Blutfluss bzw. Minozyklin-Gabe bei nicht-pulsatilem Blutfluss waren kleiner und zeigten keine Differenzen zur Kontroll-Gruppe (jeweils $p > 0{,}05$). Lediglich im CA1-Areal führte ein pulsatiler Blutfluss während der HLM zu einem Anstieg des 3-Nitrotyrosins gegenüber der Kontrolle ($p < 0{,}05$). Das Vorhandensein von 3-Nitrotyrosin innerhalb des Zytoplasmas wurde durch die Art der HLM und die Gabe von Minozyklin während der extrakorporalen Zirkulation beeinflusst. Unter Kontrollbedingungen beeinflusste das Medikament Minozyklin die Bildung von 3-Nitrotyrosin nicht. Innerhalb eines Versuchstieres war die Fläche an Zytoplasma mit 3-Nitrotyrosin zwischen CA1- und CA3-Region nicht different.

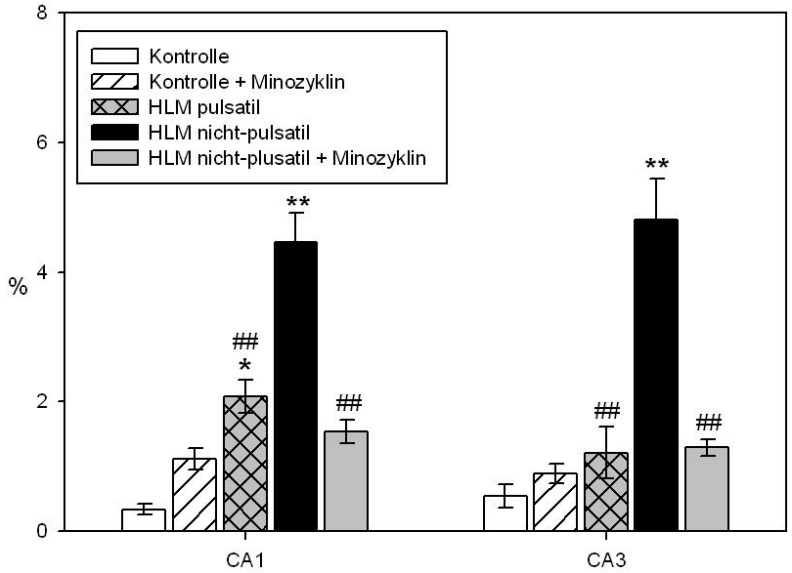

Abbildung 17: IHC-Färbung für den Nachweis von 3-Nitrotyrosin, prozentualer Anteil der positiven Zell-Fläche an der Gesamtfläche der Pyramiden-Zellen im Stratum pyramidale
$p < 0{,}05$ * gegen Kontrolle
$p \leq 0{,}001$ ** gegen Kontrolle
$p \leq 0{,}001$ ## gegen HLM nicht-pulsatil

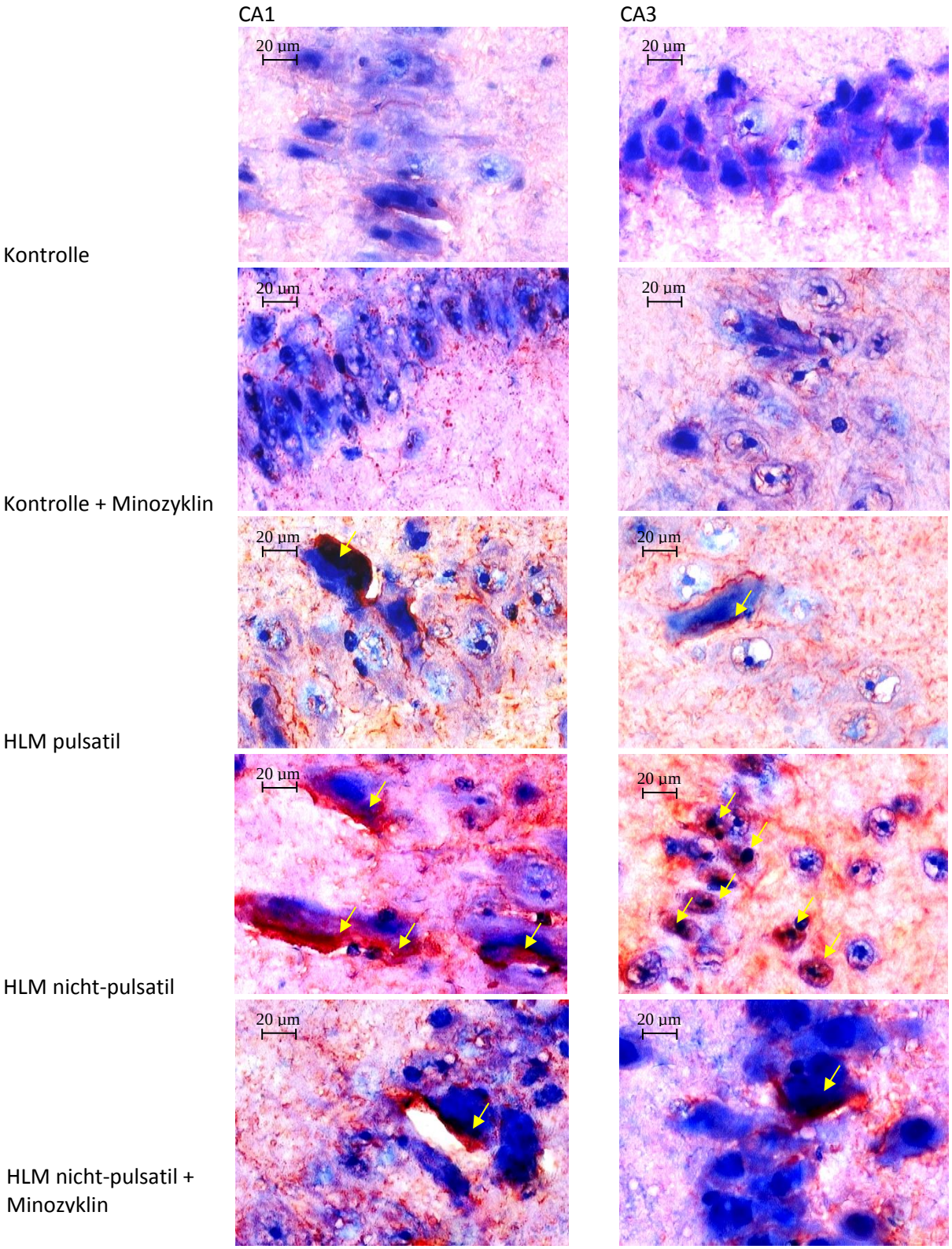

Abbildung 18: IHC-Färbung für den Nachweis von 3-Nitrotyrosin

Cornu ammonis (CA1- und CA3-Region) des Hippocampus, Stratum pyramidale
Vergrößerung 200 fach
→ gelber Pfeil markiert Zellen mit positivem Zytoplasma für 3-Nitrotyrosin

4.6.4 Cleaved Caspase 3

Für alle 5 Versuchsgruppen sind jeweils für das CA1- und CA3-Areal Mikroskop-Bilder in der Abb. 20 dargestellt. Es wurden Proben des rechten Hippocampus ausgewertet. In Abb. 19 erfolgt die Darstellung des prozentualen Anteils der Zellen mit positivem Zellkern für cleaved Caspase 3 an der Gesamtzahl der Zellen in beiden CA-Regionen für die 5 Gruppen. Sowohl im CA1- als auch im CA3-Areal wurden unterschiedliche Werte (CA1: $p = 0{,}0001$ und CA3: $p = 0{,}0001$) für die Anzahl an Zellen mit cleaved Caspase 3 zwischen den Versuchsreihen ermittelt (siehe Anhang, 8.3.6 Tab. 37). Die meisten Zellen mit cleaved Caspase 3 zählte man in den HLM-Gruppen mit nicht-pulsatilem Blutfluss bzw. mit der Gabe von Minozyklin bei nicht-pulsatilem Blutfluss. Deren Werte lagen über den Messwerten für die Kontrollgruppe (jeweils $p < 0{,}05$). Wurde für die Herz-Lungen-Maschine ein pulsatiler Blutfluss angewandt, kam es zu keinem Anstieg der Zellen mit positiver Rotfärbung für cleaved Caspase 3 im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p > 0{,}05$). Durch einen pulsatilen Blutfluss bei der extrakorporalen Zirkulation konnte im Gegensatz zu einem nicht-pulsatilem Blutfluss die Aktivierung der Caspase 3 reduziert werden ($p < 0{,}05$). Die Art der Herz-Lungen-Maschine beeinflusste die Anzahl an Zellen mit positiver Rotfärbung für cleaved Caspase 3. Unter Kontrollbedingungen beeinflusste Minozyklin die Bildung von cleaved Caspase 3 nicht. Zwischen CA1- und CA3-Region innerhalb eines Versuchstieres gab es keine Unterschiede.

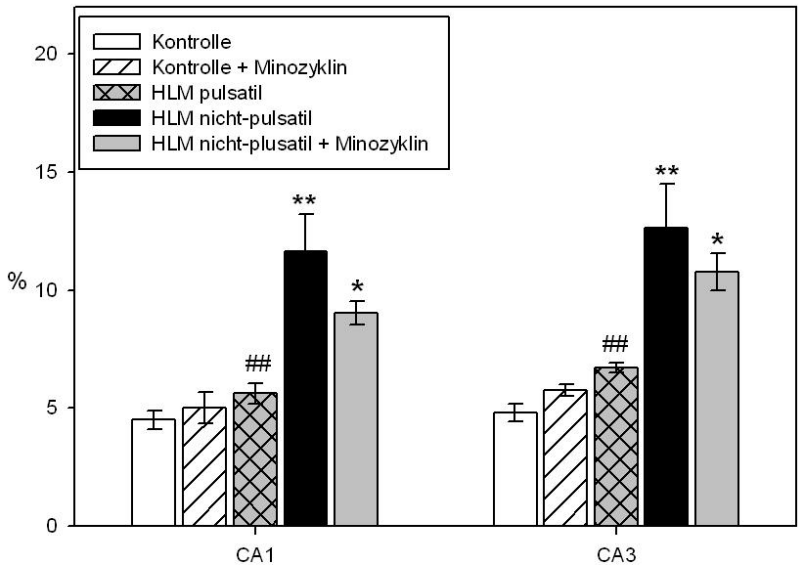

Abbildung 19: IHC-Färbung für den Nachweis von cleaved Caspase 3, prozentualer Anteil an Zellen mit positiven Zellkern an der Gesamtzahl der Zellen pro CA-Region
$p < 0{,}05$ * gegen Kontrolle
$p \leq 0{,}001$ ** gegen Kontrolle
$p \leq 0{,}001$ ## gegen HLM nicht-pulsatil

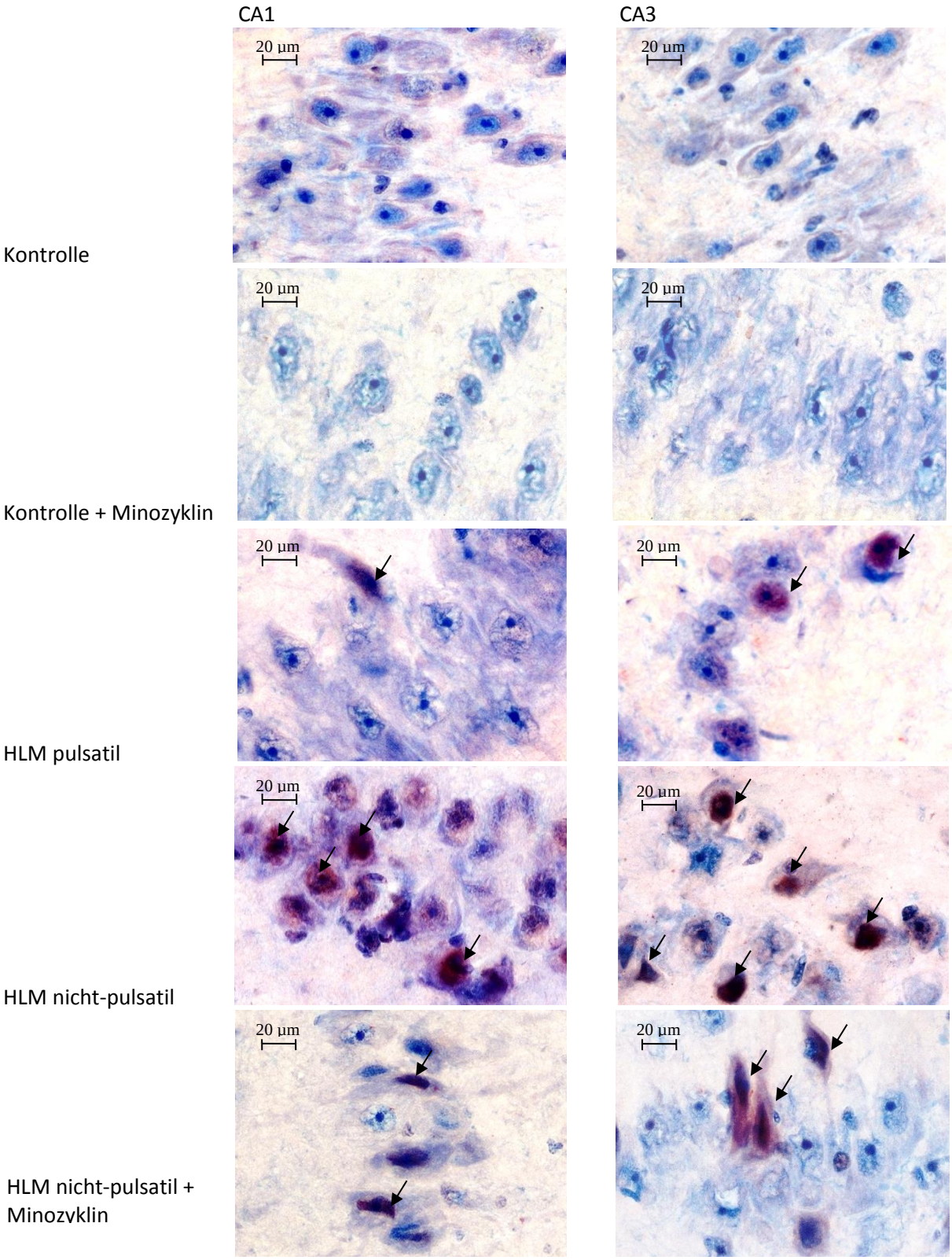

Abbildung 20: IHC-Färbung für den Nachweis von cleaved Caspase 3

Cornu ammonis (CA1- und CA3-Region) des Hippocampus, Stratum pyramidale
Vergrößerung 200 fach
→ schwarzer Pfeil markiert Zellen mit positivem Zellkern für cleaved Caspase 3

4.6.5 Poly-(ADP)-Ribose

In Abb. 22 werden die Mikroskop-Bilder der IHC-Färbung für Poly-(ADP)-Ribose in beiden CA-Regionen für die 5 Versuchsgruppen gezeigt. Man verwendete Proben des rechten Hippocampus. Eine graphische Darstellung des prozentualen Anteils der Zellen mit positivem Zellkern für PAR an der Gesamtzahl der Zellen pro CA-Region wird für alle Gruppen in Abb. 21 vorgenommen. Zwischen den Versuchsreihen ermittelte man im CA1- und CA3-Areal unterschiedliche Werte (CA1: $p = 0{,}0001$ und CA3: $p = 0{,}0001$) für Zellen mit Rotfärbung des Zellkerns (siehe Anhang, 8.3.6 Tab. 38). In jeder HLM-Gruppe wurde eine höhere Anzahl an positiv-rot gefärbten Zellen als in der Kontrollgruppe gezählt (jeweils $p < 0{,}05$). Die meisten Zellen mit PAR im Zellkern wurden in der HLM-Gruppe mit nicht-pulsatilem Blutfluss gemessen. Die Verwendung eines pulsatilen Blutflusses und die Gabe von Minozyklin während der extrakorporalen Zirkulation konnte die Anzahl der rot gefärbten Pyramiden-Zellen im Vergleich zur HLM-Gruppe mit nicht-pulsatilem Blutfluss senken (jeweils $p < 0{,}05$). Sowohl die Art der Herz-Lungen-Maschine, als auch die Medikation mit Minozyklin während der extrakorporalen Zirkulation beeinflussten die Bildung von PAR innerhalb der Pyramiden-Zellen. Unter Kontrollbedingungen wurde die Bildung von PAR durch Minozyklin nicht beeinflusst. Zwischen der CA1- und CA3-Region innerhalb eines Versuchstieres gab es keine Unterschiede.

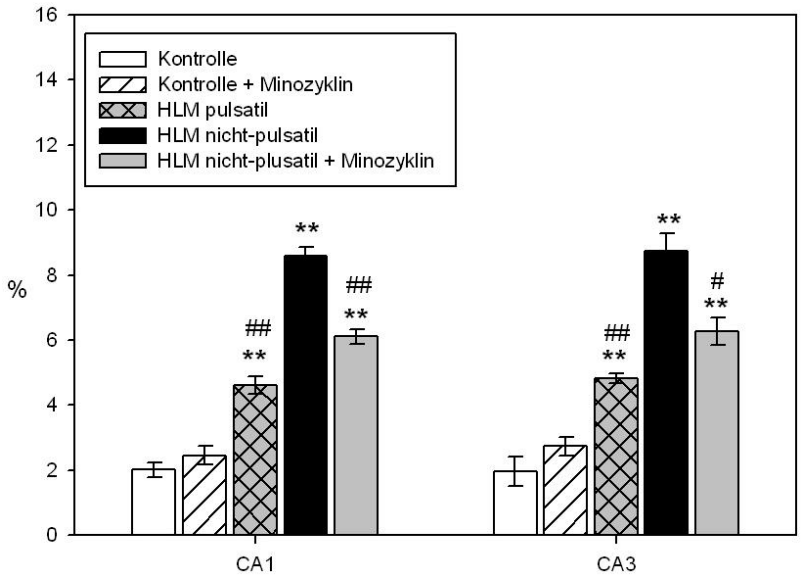

Abbildung 21: IHC-Färbung für den Nachweis von Poly-(ADP)-Ribose, prozentualer Anteil an Zellen mit positiven Zellkern an der Gesamtzahl der Zellen pro CA-Region
$p \leq 0{,}001$ ** gegen Kontrolle
$p < 0{,}05$ # gegen HLM nicht-pulsatil
$p \leq 0{,}001$ ## gegen HLM nicht-pulsatil

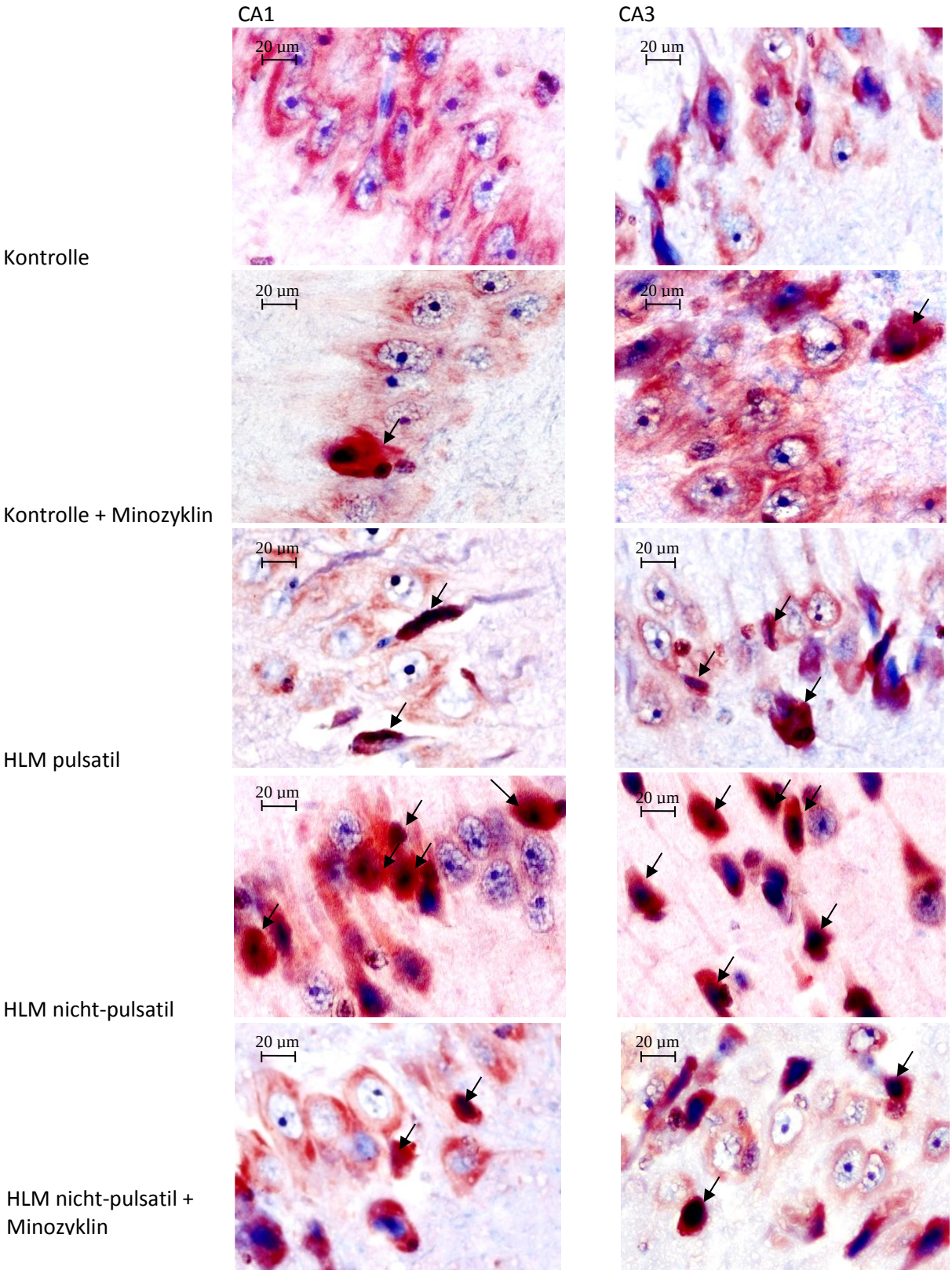

Abbildung 22: IHC-Färbung für den Nachweis von Poly-(ADP)-Ribose

Cornu ammonis (CA1- und CA3-Region) des Hippocampus, Stratum pyramidale
Vergrößerung 200 fach
→ schwarzer Pfeil markiert Zellen mit positivem Zellkern für Poly-ADP-Ribose

5 Diskussion

Folgende Fragestellungen sollen mit dieser Arbeit beantwortet werden:

1. Inwieweit ist das verwendete Tiermodell und der Versuchsaufbau für die Beantwortung der Fragen 2 und 3 geeignet?
2. Werden durch die Anwendung der Herz-Lungen-Maschine mit nicht-pulsatilem Blutfluss Schäden im Gewebe des Hippocampus verursacht?
3. Kann ein pulsatiler Blutfluss, bzw. die Gabe des Medikaments Minozyklin während der extrakorporalen Zirkulation mögliche Schäden im Hippocampus abmildern?

Seit vielen Jahren ist im klinischen Alltag ein kontinuierlicher, nicht-pulsatiler Blutfluss die Methode der Wahl bei der Verwendung einer Herz-Lungen-Maschine. Mit Beginn der extrakorporalen Zirkulation kommt es zu gravierenden Veränderungen im Organismus:
Ein Merkmal ist die Aktivierung von Zellen im Blut durch den Kontakt mit Fremdoberflächen (Hussaini et al. 2009, Sonntag et al. 1998). Die Reaktion des Organismus auf den Einsatz der Herz-Lungen-Maschine wird als systemische Entzündungsreaktion bezeichnet (*systemic inflammatory response syndrom*, SIRS) oder auch Post-Perfusionssyndrom genannt (Wilcox et al. 2014, Engels et al. 2014, Allan et al. 2010, Kozik et Tweddell 2006). Infolge dessen kann es zu multiplen Organdysfunktionen kommen. Betroffen sind u. a. die Lunge (Yuan et al. 2014, Yu et al. 2013), die Niere (Sgouralis et al. 2015, Twal et al. 2013), das Herz (Turer et Hill 2010, Hövels-Gürich et al. 2002) und das Gehirn (Nelson et al. 2008). Durch den Einsatz der Herz-Lungen-Maschine kann eine Hypotension entstehen (Pretorius et al. 2005, Morales et al. 2003). Außerdem kann im peripheren Gewebe u.U. eine Hypoperfusion (Lonsky et al. 2011) auftreten. Die Akkumulation von Laktat im Organismus nach der extrakorporalen Zirkulation (Munoz et al. 2000) lässt vermuten, dass es während des operativen Eingriffes zu einer anaeroben Stoffwechsellage kommen kann. Die Gabe verschiedenster Infusionen kann eine Hämodilution mit relativer Anämie verstärken. Mit sinkendem Hämatokrit steigt das Risiko für Organschäden. U.U. sind Bluttransfusionen notwendig (Campbell et al. 2008, Engoren et al. 2002). Desweiteren beeinflussen die Hypothermie und ein laminares Flussprofil der Herz-Lungen-Maschine den Organismus zusätzlich (Kozik et Tweddell 2006).
Unter physiologischen Bedingungen wird die zerebrale Durchblutung und somit eine adäquate Sauerstoff-Zufuhr des Gehirns über die zerebrale Autoregulation gesteuert. Ono und Mitarbeiter (2012) konnten in ihrer klinischen Studie über intraoperative Mess-Methoden (Nahinfrarotspektroskopie – NIRS und transkranielle Doppler-Sonografie – TCD) nachweisen, dass durch den Einsatz der Herz-Lungen-Maschine (mit nicht-pulsatiler Perfusion) der zerebrale Blutfluss

negativ beeinflusst wird. Mit einer Inzidenz von 20 % von insgesamt 234 Patienten war die natürliche zerebrale Autoregulation beeinträchtigt. In einer weiteren klinischen Studie von Quarti und Mitarbeitern (2011) wurde bei 40 pädiatrischen Patienten während der extrakorporalen Zirkulation mit nicht-pulsatilen Blutfluss die regionale zerebrale Sauerstoffsättigung ebenfalls über die Anwendung der Nahinfrarotspektroskopie (NIRS) ermittelt. Mit Anschluss an die Herz-Lungen-Maschine (und somit Verlust der physiologischen Durchblutung) fiel die zerebrale Sauerstoffsättigung signifikant ab.
Der Verlust des physiologisch pulsatilen Blutflusses wirkt sich negativ auf die zerebrale Durchblutung aus. Dadurch kann es zu ischämischen/ hypoxischen Schäden im zerebralen Gewebe kommen.
Undar et al. veröffentlichten in ihrer Studie von 1999, dass bei Anwendung der konventionellen OP-Technik (Hypothermie und nicht-pulsatile Perfusion) die Verletzungsrate der Organe (Gehirn, Niere, Herz) bei bis zu 30 % liegt.

Das Risiko für Organschäden nach Einsatz der HLM ist in der Kinderherzchirurgie durch die Wachstums- und Entwicklungsprozesse des Organismus besonders hoch. Hirnareale, welche sich in einer Wachstumsphase befinden, besitzen eine wesentlich höhere metabolische Aktivität und benötigen mehr Sauerstoff. Eine Änderung der Hämodynamik durch die HLM wirkt sich in diesen Bereichen besonders negativ aus (Chugani et al. 1998, Hoffmann et al. 2013). Das Gehirn des Kindes reagiert hoch-sensibel auf Einflüsse wie z.B. Entzündungsmediatoren und Hypoxie. Neben einer hohen Stoffwechselrate ist auch die noch nicht ausgereifte Vaskularisation des kindlichen Gehirns ein limitierender Faktor (Johnson 2001). Durch kardiochirurgische Eingriffe und Einsatz der Herz-Lungen-Maschine steigt das Risiko für Defizite bezüglich der neurologischen Entwicklung und die Entstehung subtiler neurokognitiver Dysfunktionen (Bellinger et al. 2011, Calderon et al. 2010).

In einer experimentellen Studie an Nagetieren von Mackensen et al. (2001) konnten zerebrale Dysfunktionen nach Einsatz einer HLM bewiesen werden. In einer Studie (Schweinemodell) von Tóth et al. (2006) konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine Schäden an den Zellen im Hippocampus (Gyrus dentatus, Cornu ammonis CA1-CA3), des präfrontalen Cortex und im Cortex des Cerebellums entstehen können. Die Arbeitsgruppe von Walther et al. (2013) demonstrierte anhand eines Ferkelmodells, dass insbesondere die Hippocampusformation sensibel auf Hypothermie und niedrige Perfusionsraten während Einsatz der Herz-Lungen-Maschine reagiert. Blue et al. (2014) kamen in ihrer Studie (Hundemodell) zu dem Schluss, dass eine Schädigung der Neuronen in Form von Apoptose und Nekrose entstehen kann und Bereiche wie Hippocampus, Amygdala und Nucleus caudatus besonders betroffen sind.

Um die Auswirkungen der extrakorporalen Zirkulation auf das Gewebe des Hippocampus zu analysieren, standen folgende Untersuchungsmaterialien und –methoden zur Verfügung:

-Paraffinschnitte des Hippocampus für histologische und immunhistochemische Färbungen,
- RP-HPLC für Messungen des ATP/ADP-Verhältnis im Hippocampus,
- Proben der Blutgasanalyse für Bestimmung des arteriellen Laktat-Wertes und
- arterielle Blutproben.

Vor allem durch die immunhistochemischen Färbemethoden war es möglich, Faktoren für Hypoxie, oxidativen Stress, Einleitung der Apoptose, bzw. des Zelluntergangs über den Parthanatos-Weg nachzuweisen. Die vorliegenden Ergebnisse sollen zeigen, ob Modifikationen des Blutflusses der HLM oder die Verwendung des Medikaments Minozyklin mögliche Schäden im Gewebe des Hippocampus reduzieren können.

5. 1 Tiermodell und Versuchsaufbau

Als Versuchstiere wurden Ferkel der Rasse „Angler-Sattelschwein“ gewählt. Das Schwein gilt seit langer Zeit als standardisiertes Tiermodell (Smith et Swindle 2006) und wird bis zum heutigen Zeitpunkt für Modell-Operationen am Kiefer, in der Abdominal-/ Thoraxchirurgie und der Herzchirurgie (Kudlicka et al. 2015, Mardas et al. 2014, Kotoulas et al. 2014) verwendet. In der Kinderherzchirurgie wurde das Schwein als Versuchsmodell bereits 1972 durch Berry beschrieben. Für die durchgeführten Operationen und die Verwendung der Herz-Lungen-Maschine war es wichtig, ein Tiermodell zu wählen, welches Ähnlichkeiten in Anatomie und Physiologie zum menschlichen Organismus aufweist. Der Mensch, als auch das Schwein sind omnivor (Dauborn 2004a). Die Größe, Form und der grundsätzliche Aufbau vieler Organe (Herz, Lunge, Niere und Gehirn) und das Herz-Kreislauf-System beim Schwein zeigen Parallelen zum menschlichen Organismus auf (Swindle 2011, Dauborn 2004b). Bei Untersuchungen in der vergleichenden Anatomie wird deutlich, dass im Aufbau und der Funktion des limbischen Systems und insbesondere der Hippocampusformation im Gehirn des Schweines Analogien zum menschlichen Organismus vorhanden sind (Nickel et al. 2004). Trotz dessen, das zahlreiche Studien in der Literatur das Schwein als geeignetes Tiermodell beschreiben, ist die absolute Übertragbarkeit der Ergebnisse der experimentellen Studien auf den menschlichen Organismus nur mit Einschränkungen möglich. Um den Pathomechanismus von Komplikationen während einer extrakorporalen Zirkulation zu evaluieren, ist ein standardisiertes Tiermodell jedoch unerlässlich. Die Arbeitsgruppe von Abdul-Khaliq untersuchte 2001 die Durchführbarkeit eines neonatalen Schweinemodells, um neuronale Veränderungen in Folge einer extrakorporalen Zirkulation zu indentifizieren. Hierfür wurden 10 Ferkel an eine Herz-Lungen-Maschine mit anschließenden Herz-Kreislaufstillstand für 60 Minuten angeschlossen (Flussrate 200-250 ml/kg/min, tiefe Hypothermie von

14°C). Nach Reperfusion und Wiedererwärmung, sowie 6 Stunden postoperativer Überwachung folgten umfangreiche histologische und immunhistochemische Untersuchungen des Gehirns (u.a. Hippocampus: CA1-CA4 und Gyrus dentatus). Die Ergebnisse zeigten, dass mit diesem Schweinemodell Untersuchungen für das Verständnis der biochemischen Prozesse während der HLM-Zeit möglich sind. Des Weiteren gibt es mehrere ökonomische Aspekte, welche ebenso zur Wahl eines geeigneten Tiermodells beitragen: unkomplizierte Haltung und Zucht, schnelles Wachstum, gute Fruchtbarkeit und geringe Haltungskosten.

Für den Versuchsaufbau war es wichtig, standardisierte und etablierte Methoden, sowie chirurgische Vorgehensweisen zu wählen, welche auch in der klinischen Praxis routinemäßig angewendet werden. Ein wichtiger Punkt hierbei ist die Wahl des pH-Wert-Managements. In der Literatur existieren zahlreiche Studien zu diesem Thema, welche bis zum heutigen Zeitpunkt bezüglich der Wahl der geeigneten Methode kontrovers diskutiert werden. Grundsätzlich stehen in der Klinik zwei Methoden zur Verfügung: alpha-stat und pH-stat. Mit ersterem Vorgehen wird der pH-Wert des Blutes unabhängig der aktuellen Temperatur des Organismus bei 37 °C gemessen und auf den Normwert zwischen 7,35 – 7,45 eingestellt. Mit sinkender Körpertemperatur kommt es somit zu einer respiratorischen Alkalose. Mit der pH-stat-Methode wird der pH-Wert bei der aktuellen Körpertemperatur des Versuchstieres gemessen und auf die Normwerte eingestellt. Die vorliegende Studie orientierte sich bei der Kontrolle des pH-Wertes an der alpha-stat-Methode aus folgenden Gründen: Es ist nachgewiesen, dass mit dieser Vorgehensweise der zerebrale Blutfluss sinkt. Die Autoregulation des Gehirns für die Durchblutung des zerebralen Gewebes wird jedoch beibehalten. Es wurde nachgewiesen, dass mit der alpha-stat -Methode der zerebrale Blutfluss niedriger ist als bei Anwendung der pH-stat-Methode, jedoch konnten keine Anzeichen einer zerebralen Hypoperfusion gemessen werden (Halstead et al. 2005). Mit Anwendung der pH-stat-Methode kommt es zu einer zerebralen Vasodilatation, welche wiederum mit einer besseren Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff assoziiert wird (Duebener et al. 2002). Jedoch konnte auch ein stärkerer Verlust der zerebralen Autoregulation (Venn et al. 1995) festgestellt werden. Die Vorteile der pH-stat-Methode werden in der Literatur in Zusammenhang mit einer tiefen Hypothermie (18-20 °C) und niedrigen Blutflussrate (bis maximal 50 ml/Minute/kg KM) der Herz-Lungen-Maschine beschrieben (Pirzadeh et al. 2011) und häufig bei Operationen mit tiefer Hypothermie und Herzkreislaufstillstand (deep hypothermic circulatory arrest, DHCA) verwendet (Williams et Ramamoorthy 2007). Für den Versuchsaufbau dieser Studie wurde jedoch eine moderate Hypothermie von 28 °C und eine Blutflussrate von 100 ml/Minute/kg KG gewählt, sodass diese genannten Ergebnisse nicht ohne weiteres übertragen werden können. Nauphal et al. untersuchten in ihrer Studie von 2007 mittels zerebraler Oxymetrie die Sauerstoffsättigung im zerebralen Gewebe an 14 adulten Patienten, welche unter moderater Hypothermie und Herz-Lungen-Maschine operiert wurden und kamen zu dem

Ergebnis, dass mit der alpha-stat-Methode das Risiko einer Luxusperfusion niedriger ist. Die Untersuchungen von Piccioni et al. 2004 ergaben keine Unterschiede hinsichtlich der Gewebsperfusion beim Vergleich der beiden pH-Wert-Messmethoden, wenn während des kardiochirurgischen Eingriffes eine moderate Hypothermie (32 °C) gewählt wird.

Mit sinkender Körpertemperatur verringert sich die Stoffwechselrate und die Aktivität in den Mitochondrien der Zellen ist vermindert. Dadurch wird weniger Sauerstoff im Gewebe benötigt und energiereiche Phosphate wie ATP in geringeren Mengen verbraucht. Bei einer moderaten Hypothermie zwischen 25 – 35 °C reduziert sich die zerebrale Flussrate (CBF) um 6,7 % pro 1 °C Temperaturabsenkung (Tzanova et Kerz 2012). In ihrer Studie am Schweine-Modell berichteten Qing et al. (2001) dass eine moderate Hypothermie während der HLM anti-inflammatorische Effekte besitzt und folglich postoperativ weniger Organschäden zu erwarten sind (24 Schweine, 3 Gruppen: Gruppe 1 mit einer Körpertemperatur von 37 °C, Gruppe 2 mit moderater Hypothermie von 28 °C und in Gruppe 3 mit tiefer Hypothermie von 20 °C). Die Versuchstiere, bei denen während der OP eine moderate Hypothermie angewandt wurde, zeigten mit Abstand die wenigsten Organschäden (Herz, Lunge, Leber, Niere und Darm). TNF-alpha und die Anzahl der Leukozyten stiegen nicht deutlich an. Das anti-entzündlich wirkende Zytokin Interleukin 10 wurde in diesen Versuchstieren verstärkt exprimiert.

Wiederum konnten andere Autoren keinen positiven Einfluss einer moderaten Hypothermie auf die Inflammationsreaktion als Folge der Anwendung einer Herz-Lungen-Maschine nachweisen. Birdi et al. (1999) untersuchten 45 Patienten (3 Gruppen: HLM und Hypothermie (n=15, 28 °C), HLM und moderate Hypothermie (n=15, 32 °C), HLM und Normothermie (n=15, 37 °C)). Es wurden verschiedene Marker für das Vorhandensein einer Inflammationsreaktion gemessen und ausgewertet (u.a. neutrophile Elastase, Interleukin 8 und C3d, IgG). Es konnte in keiner Gruppe ein signifikanter Unterschied gemessen werden. In einer multiinstitutionalen Studie aus Nordamerika von Kotani et al. (2013) berichten die Autoren, dass trotz einer hohen Variabilität bei der Wahl der Methoden zum Schutz des Gehirns und des Myokards bei kardiochirurgischen Eingriffen die moderate Hypothermie (26-30 °C) die am häufigsten gewählte Methode bei Neugeborenen und Kindern darstellt. Wird zur Messung des pH-Wertes die alpha-stat-Methode gewählt und eine moderate Hypothermie durchgeführt, kann dies zu einer Neuroprotektion beitragen (Venn et al. 1995, Stephan et al. 1992).

Im vorliegenden Versuchsaufbau verwendete man als kardioplegische Lösung zur Auslösung des Herzstillstands eine kristalloide Kardioplegie nach Bretschneider, welche auch im klinischen Alltag routinemäßig angewandt wird. Vorteil dieser Kardioplegie-Lösung ist die einmalige Gabe bei Anschluss an die Herz-Lungen-Maschine. Bei Verwendung von Blut-Kardioplegie-Lösungen werden deutlich größere Volumina und u.U. Nachinjektionen erforderlich (Chen et al. 2013).

Eine weitere wichtige Komponente zur Neuroprotektion stellt die Verwendung eines Membranoxygenators und des Arterienfilters dar. Mikroembolien, entstanden im Schlauchsystem der

HLM durch Fibrin-Ablagerungen, gelöste Silikon-Partikel oder kleine Luftbläschen waren u.a. Hauptgründe für postoperative Schäden am Gehirn. Mit fortschreitenden klinischen Einsatz der HLM berichteten mehrere Autoren über eine deutliche Reduktion dieser Risiken, wenn während der Operation Membranoxygenatoren und Arterienfilter eingesetzt werden (Solis et al. 1975, Aberg et Kihlgren 1977). Heutzutage sind diese ein fester Bestandteil der Herz-Lungen-Maschine, sowohl im klinischen Alltag, als auch in vielen Studien-Designs zu Untersuchungen der Blutflussraten während der extrakorporalen Zirkulation (O´Neil et al. 2012, Sharma et al. 2000).

Beeinflussbare Faktoren während der extrakorporalen Zirkulation (u.a. pH-Management, Hypothermie während der HLM-Zeit, verwendete Kardioplegie-Lösung und die Verwendung eines Membranoxygenators und Arterienfilter) wurden für das Tiermodell der vorliegenden Arbeit so gewählt, dass keine zusätzlichen Schäden im Gehirn des Versuchstieres provoziert, sondern weitesgehend minimiert werden. Die Aufzeichnungen der Vitalparameter und der Blutgasanalyse bzgl. pH, pCO_2, pO_2 und BE zeigen, dass bei allen Ferkeln während der Versuchsdurchführung keine Entgleisung des Säure-Basen-Haushaltes entstanden sind, sowie alle Vitalparameter im Normbereich blieben. Alle 5 Versuchsreihen durchliefen das gleiche OP-Procedere (siehe 3.2). Für die Ferkel, welche während des Versuches an die Herz-Lunge-Maschine angeschlossen wurden, kam das gleiche HLM-Gerät mit Rollerpumpe und entsprechendem Schlauchsystem zum Einsatz. Durch Anbringen einer Zusatzsteuerung an der Rollerpumpe wurde ein pulsatiler Blutfluss für die Ferkel der Gruppe „HLM pulsatil“ induziert. Damit sind die Untersuchungsergebnisse ausschließlich Folgen des veränderten Blutflusses und nicht auf unterschiedliche HLM-/ Pumpen-Systeme zurückzuführen.

5. 2 Blutproben

In einer Tierstudie (Lammmodell) von Cavaglia et al. (2004) wurden die Auswirkungen der HLM (nicht-pulsatil, Normothermie) und des tiefen hypothermen Herz-Kreislaufstillstands auf die Funktion der Blut-Hirnschranke untersucht. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass sowohl die Operation mit Herz-Lungen-Maschine als auch der tiefe hypotherme Herz-Kreislaufstillstand zu einer Dysfunktion der Blut-Hirnschranke führen können. Durch eine erhöhte Permeabilität gelangen Serumproteine (u.a. Albumin) aus dem Blut in den extravaskulären Raum. In diesem Tiermodell wurde infolge eines tiefen, hypothermen Herz-Kreislaufstillstands die Funktion der Blut-Hirnschranke stärker negativ beeinflusst als durch die Verwendung der Herz-Lungen-Maschine unter normothermen Bedingungen.

Wiederum fanden Okamura et al. (2010a) in einer Tierstudie (Ferkelmodell) heraus, dass der Einsatz der Herz-Lungen-Maschine (nicht-pulsatil und „fullflow“) unter normothermen (37 °C) Bedingungen keine Veränderungen des Albumin-Wertes im Plasma, bzw. Liquor hervorruft. Wird bei Verwendung

der Herz-Lungen-Maschine die Blutflussrate reduziert („lowflow“) und herrschen hypotherme (25 °C) Bedingungen, so erhöhte sich in diesem Tiermodell die Permeabilität der Blut-Liquor-Schranke. In einer weiteren Versuchsreihe (Okamura et al. 2010b) mit tiefem hypothermen Herz-Kreislaufstillstand konnte ebenfalls eine Dysfunktion der Blut-Liquor-Schranke beobachtet werden.

Ein Verlust an Albumin im Blut ist u.a. Merkmal einer systemischen Entzündungsreaktion und nur dann möglich, wenn natürliche Barrieren im Körper, wie z.B. die Blut-Hirn-Schranke, pathologisch für Albumin durchlässig werden. Bei einer nicht intakten Blut-Hirn-Schranke wäre Albumin zusätzlich im zerebralen Gewebe nachweisbar (Miclescu et al. 2010). Ob es tatsächlich zu einer Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke aufgrund der extrakorporalen Zirkulation kam, ist mit den durchgeführten Untersuchungsmethoden nicht nachweisbar.

Kommt es zu einer Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke, kann die Intensität postoperativer Hirnschäden negativ beeinflusst werden (Moody 2006). In einer prospektiven klinischen Studie von Baranyi et Rothenhäusler 2012 konnte gezeigt werden, dass Patienten mit niedrigsten Werten für Albumin im Serum ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines postoperativen Deliriums aufwiesen. In einer klinischen Studie von Alkan-Bozkaya et al. (2013) wurde herausgefunden, dass mit einem pulsatilem Blutfluss während der HLM postoperativ höhere Albumin-Werte im Serum erreicht werden, als bei einer nicht-pulsatilen Perfusion. In der vorliegenden Arbeit am Ferkelmodell konnte kein Unterschied zwischen diesen beiden Blutfluss-Methoden gemessen werden.

Die Leukozyten und deren Aktivierung sind maßgeblich an einer möglichen Inflammationsreaktion infolge der extrakorporalen Zirkulation beteiligt, wobei neutrophile Granulozyten in den ersten 6 bis 24 Stunden postoperativ vorherrschend sind. Weiterhin kommt es zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (u.a. TNF-alpha, Interleukin-1, Interleukin-6 und Interleukin-8), welche hauptsächlich von Makrophagen, Lymphozyten und auch Endothelzellen produziert werden (Francischetti et al. 2010).

In einer Arbeit von Engels et al. 2014 (Rattenmodell) wurde gezeigt, dass infolge der extrakorporalen Zirkulation eine Leukozytose und erhöhte Produktion von Interleukin-6 und TNF-alpha als Zeichen eines SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*) entstehen können.

Ein Anstieg der Leukozyten-Anzahl nach Verwendung einer Herz-Lungen-Maschine wurde in der vorliegenden Arbeit am Ferkelmodell nicht ersichtlich. Das Tiermodell in der Arbeit von Engels und Mitarbeitern unterscheidet sich weiterhin bezüglich des Versuchsaufbaus: Zusätzlich zur Herz-Lungen-Maschine wurde ein tiefer hypothermer Herz-Kreislaufstillstand für 45 Minuten bei 15 °C induziert.

In einer klinischen Studie von Allan et al. (2010) wurden 93 Patienten nach einem kardiochirurgischen Eingriff (HLM und nicht-pulsatiler Blutfluss) untersucht: Bis 24 Stunden nach der Operation wurde ein Anstieg der Zytokine Interleukin-6 und Interleukin-8 nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Blutproben direkt nach der Rekonvaleszenzzeit postoperativ entnommen. Möglicherweise war der Zeitpunkt zu früh, um eine ausgeprägte systemische Inflammationsreaktion infolge des kardiochirurgischen Eingriffes mit HLM in Form einer Leukozytose nachzuweisen. Für die Untersuchung einer möglichen Inflammationsreaktion, müsste neben der Leukozyten-Anzahl u. a. auch die Aktivität der weißen Blutkörperchen (Produktion von Zytokinen) näher bestimmt werden (Onorati et al. 2010).

Um zu untersuchen, ob es infolge der extrakorporalen Zirkulation zu einer anaeroben Stoffwechsellage kam, wurden die prä- und postoperativen Laktat-Werte im Serum bestimmt. In allen drei HLM-Gruppen erhöhten sich die Laktat-Werte.
O´Neil und Mitarbeiter kamen in ihrer Studie (2012) zu ähnlichen Ergebnissen: Die Untersuchung von jeweils 10 Patienten (HLM und nicht-pulsatiler bzw. pulsatiler Blutfluss, Hypothermie 32 °C-34 °C) ergab, dass in beiden Gruppen die Werte für Laktat postoperativ erhöht sind. Spitzenwerte werden in der HLM-Gruppe mit nicht-pulsatilem Blufluss erreicht. Allerdings wurden in dieser klinischen Studie ausschließlich Hochrisiko-Patienten untersucht.
Die Arbeitsgruppe von Karaci et al. (2011) untersuchte 60 pädiatrische Patienten, unterteilt in 4 Gruppen (HLM mit pulsatilen Blutfluss und Normothermie (35 °C), bzw. Hypothermie (25 °C), sowie HLM mit nicht-pulsatilen Blutfluss und Normothermie (35 °C) bzw. Hypothermie (25 °C)). Es gab keine Unterschiede bezüglich der Laktatproduktion zwischen den 4 Versuchsreihen. Diese Beobachtungen gehen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit am Ferkelmodell einher.
Kommt es intraoperationem zu einer Hyperlaktatämie, steigt die postoperative Morbiditäts- und Mortalitätsrate (Noval-Padillo et al. 2011, Alves et al. 2012).

5. 3 Herz-Lungen-Maschine und nicht-pulsatiler Blutfluss versus pulsatiler Blutfluss

Bereits mit der histologischen Färbemethode Hämatoxylin-Eosin konnten Unterschiede in der Zellmorphologie zwischen den Versuchsgruppen veranschaulicht werden. Die Untersuchungen bezogen sich auf die Eigenschaften Ödem, Eosinophilie und Pyknose. Die Ausbildung eines Zellödems kann u.a. dann entstehen, wenn das physiologische Volumen innerhalb der Zelle nicht mehr aufrechterhalten werden kann. Die intrazellulär hohe Konzentration von Kalium-Ionen und niedrige Konzentration von Natrium-Ionen im Vergleich zum extrazellulären Raum wird maßgeblich durch eine membranständige Natrium-Kalium-Ionenpumpe realisiert. Dieser aktive Ionen-Transport ist energieabhängig. Kommt es zu einem Sistieren des Transport-Prozesses, erfolgt ein Ausgleich der Kalium- und Natrium-Ionen zwischen dem intra- und extrazellulären Raum in Form der passiven

Diffusion. Da hochmolekulare Substanzen, wie z.B. Proteine nicht durch die Zellmembran diffundieren können, erhöht sich der intrazelluläre osmotische Druck, wodurch es zu einem Einstrom von Wasser in die Zelle kommt (Khanna et al. 2014, Song et al. 2014).
Die Gewinnung der Gewebsproben für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung erfolgte in der vorliegenden Arbeit direkt nach Abschluss der Rekonvaleszenzzeit (240 Minuten). In der HLM-Gruppe mit nicht-pulsatilem Blutfluss wurden vermehrt Pyramidenzellen mit Ödem-Bildung mikroskopisch sichtbar.
Die Arbeitsgruppe von Abdul-Khaliq et al. (2001) untersuchte in ihrer Studie (Ferkelmodell) ebenfalls die Auswirkungen der extrakorporalen Zirkulation auf verschiedene Bereiche des Gehirns mittels histologischer Färbemethoden. Hämatoxylin-Eosin-Färbungen der Gewebsproben des Hippocampus zeigten ödematöse Schwellungen v.a. der perivaskulären Räume und Astrogliazellen – Neurone waren weniger stark betroffen. Allerdings wurde in diesem Versuch zusätzlich zur Verwendung der Herz-Lungen-Maschine ebenfalls ein tiefer hypothermer Herz-Kreislaufstillstand induziert. Weiterhin wurde die Entnahme der Gewebsproben in dieser Studie 6 Stunden postoperativ durchgeführt.

Histologische Untersuchungen des Hippocampus mittels Hämatoxylin-Eosin von Tóth et al. 2006 (Ferkelmodell) führten zu der Annahme, dass durch die Verwendung der Herz-Lungen-Maschine (nicht-pulsatiler Fluss) u.a. die Pyramidenzellen geschädigt werden können. Die histologischen Färbungen zeigten jedoch nur eine geringe Anzahl an pyknotischen Zellen ohne große Differenz zur Kontrollgruppe in dieser Studie.
Die vorliegende Arbeit kam zu einer ähnlichen Aussage: Unabhängig der gewählten Blutfluss-Methode während der extrakorporalen Zirkulation konnten nur wenige Pyramidenzellen mit Pyknose, bzw. Eosinophilie des Zytoplasmas detektiert werden.
Eine eosinophile Degeneration mit anschließender Zellschrumpfung, bzw. Kernpyknose tritt frühestens 4 - 6 Stunden nach dem gesetzten Schaden auf. Teilweise können diese morphologischen Zelländerungen auch erst nach 12 - 18 Stunden lichtmikroskopisch sichtbar werden (Kuchelmeister 2012, Garman 2011, Pfeiffer 1984). Die Gewebsentnahme erfolgte in vorliegendem Versuchsaufbau direkt nach Abschluss der Rekonvaleszenzzeit, also nach 240 Minuten. Die Zeitspanne von 4 Stunden war möglicherweise nicht ausreichend, um die Zellveränderungen „Eosinophilie“ und „Pyknose“ eindeutig und differenziert nachweisen zu können. Dass in den Zellen des Hippocampus eine Hypereosinophilie in Folge einer extrakorporalen Zirkulation entstehen kann, zeigt die Arbeit von Kerendi et al. 2005 (Ferkelmodell): Die Verwendung einer Herz-Lungen-Maschine mit nicht-pulsatilem Blutfluss führte zu histologischen Veränderungen der Zellen des Hippocampus (u.a. Hypereosinophilie und Gewebsnekrose). Limitierend wirkt sich jedoch aus, dass für diese Versuchsreihe zusätzlich ein tiefer hypothermer Herz-Kreislaufstillstand induziert wurde. Die Gewinnung der Gewebsproben erfolgte in dieser Studie nach einer Überlebenszeit der Versuchstiere von 6 Tagen.

Ergebnisse aus der Arbeit von Blue et al. 2014 (Hundemodell) bestätigen die Annahme, dass nekrotische Zellveränderungen, wie z.B. Pyknose des Zellkerns erst mehrere Stunden (24 Stunden) postoperativ histologisch nachweisbar sind.

Die Studie von Anstadt et al. 1991 (Hundemodell) unterstützen die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit: Durch einen pulsatilen Blutfluss während der extrakorporalen Zirkulation (moderate Hypothermie) wird der Grad der Zellschädigung der Neurone des Hippocampus abgemildert. Für die histologische Untersuchung wurde jedoch ausschließlich die CA1-Region des Cornu ammonis betrachtet. Des Weiteren erfolgte auch hier die Probenentnahme nach einer Überlebenszeit von 8 Tagen.

Zelluläre Veränderungen im CA1- und CA3-Areal des Cornu ammonis in Form von Hypereosinophilie und Pyknose nach Einsatz der Herz-Lungen-Maschine (nicht-pulsatiler Blutfluss) wurden in einer Arbeit von de Lange et al. 2008 (Rattenmodell) beschrieben. Allerdings wurden auch hier die Hämatoxylin-Eosin-Färbungen nach einer Überlebenszeit der Versuchstiere von 9 Tagen durchgeführt.

Die Ausbildung eines Zellödems infolge einer sistierenden Natrium-Kalium-Ionenpumpe setzt voraus, dass für den aktiven Transportprozess intrazellulär nicht genügend Energie in Form von ATP bereitgestellt werden kann. Die Herstellung des energiereichen Phosphats ATP erfolgt über die Atmungskette und oxidative Phosphorylierung in den Kompartimenten der Mitochondrien. Kommt es zu einem Sauerstoffmangel innerhalb der Zelle, können die frei gewordenen Elektronen des Komplex IV nicht an den molekularen Sauerstoff abgegeben werden und der für die oxidative Phosphorylierung benötigte Protonengradient kommt zum Erliegen. Folglich ist die Phosphorylierung von ADP zu ATP durch den Enzymkomplex ATP-Synthase verhindert.

Durch den immunhistochemischen Nachweis von HIF 1-alpha sollte untersucht werden, ob es während des kardiochirurgischen Eingriffes mittels Herz-Lungen-Maschine zu einer Hypoxie in den Pyramidenzellen des Hippocampus kam. Mit dem Nachweis des Faktors HIF 1-alpha kann die Reaktion der Zellen auf eine Minder-Durchblutung und reduziertem Sauerstoffangebot im Gewebe bewiesen werden (Tsai et al. 2011, Semenza 2000). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie führen zu der Annahme, dass durch den Einsatz der Herz-Lungen-Maschine (nicht-pulsatiler Blutfluss) die Sauerstoffversorgung der Pyramidenzellen des Hippocampus beeinträchtigt wird. Eine pulsatile Perfusion führte in der vorliegenden Studie zu einer verminderten Aktivierung von HIF 1-alpha.

In der Arbeit von Chiral et al. 2004 (neonatales Schweinemodell) konnte eine gesteigerte HIF 1-alpha-Expression im Gewebe des Hippocampus der Versuchstiere unter Hypoxie-Bedingungen nachgewiesen werden. Erhöhte Konzentrationen dieses Faktors waren auch mehrere Stunden nach Beendigung der induzierten Hypoxie messbar.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam die Arbeitsgruppe Yu et al. 2011. Nach Induktion einer Ischämie (mittels bilateraler Okklusion der A. carotis) am Rattenmodell konnten bis zu 4 Wochen postoperativ eine

gesteigerte Expression von HIF 1-alpha im Hippcampus der Versuchstiere nachgewiesen werden (CA1, CA3 und Gyrus dentatus). Die Autoren dieser Studie kamen zu dem Schluss, dass durch die plötzliche Reduktion des zerebralen Blutflusses HIF 1-alpha vermehrt in den Zellen exprimiert wird.
Neben einer Gewebsischämie mit nachfolgender Hypoxie kann auch eine vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) HIF 1-alpha stabilisieren, bzw. aktivieren (Goyal et al. 2004, Chandel et al. 2000).
Es ist nachgewiesen, dass nach Abschluss der extrakorporalen Zirkulation und mit Beginn der Reperfusionsphase die Bildung von ROS durch erhöhten oxidativen Stress gesteigert ist (Zakkar et al. 2015).
Die Ursachen für die erhöhte Aktivität von HIF 1-alpha in der vorliegenden Studie sind möglicherweise zum einen der veränderte Blutfluss (bei nicht-pulsatiler Perfusion) zu Beginn der extrakorporalen Zirkulation und zum anderen die erhöhte Bildung von ROS während der Rekonvaleszenzzeit. Eine pulsatile Perfusion führte zu keiner gesteigerten HIF 1-alpha-Expression – die Blutzufuhr wurde weniger stark beeinträchtigt, wodurch es zu keiner ausgeprägten Hypoxie im Hippocampus kam.

Die Wahl der Perfusionsmethode kann erheblichen Einfluss auf die Blutzufuhr der verschiedenen Gewebe während der extrakorporalen Zirkulation nehmen. Bereits 1999 untersuchte die Arbeitsgruppe von Undar et al. (Ferkelmodell) mittels Mikrosphärentechnik mit Radionukleotiden die regionale und globale Durchblutung des Gehirns während der extrakorporalen Zirkulation mit pulsatiler bzw. nicht-pulsatiler Perfusion und tiefem hypothermen Herz-Kreislaufstillstand. Sowohl die linke als auch die rechte Hemisphäre zeigten mit pulsatilem Blutfluss eine bessere Durchblutung. In einer Studie von Inamori et al. 2013 (Rattenmodell) konnten die Autoren zeigen, dass bei einer pulsatilen Perfusion während des Einsatzes der Herz-Lungen-Maschine auch der Druchmesser der A. carotis interna größer war, als bei Anwendung einer nicht-pulsatilen Perfusion. Die Autoren vermuteten, dass durch die zerebrale Vasodilatation ebenso die Mikrozirkulation positiv beeinflusst wird. Ob neben einer günstigeren Durchblutung auch die tatsächliche Sauerstoffversorgung der Gewebe während der extrakorporalen Zirkulation mit pulsatilem Blutfluss positiv beeinflusst werden kann, untersuchten Su et al. 2011 in einer klinischen Studie. Die Ergebnisse (Untersuchungen erfolgten mittels Nahinfrarotspektroskopie – NIRS) bestätigten, dass mit pulsatiler Perfusion die zerebrale Sauerstoffsättigung weniger stark abfällt, als mit der laminaren Blutflussmethode.
Demgegenüber stehen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Grubhofer et al. 2000. In einer klinischen Studie wurden sowohl ein pulsatiles, als auch ein nicht-pulsatiles Flussmuster für jeweils 10 Minuten induziert. Mittels NIRS konnte ein Anstieg von Deoxyhämoglobin bei beiden Flussprofilen detektiert werden. Differenzen der Konzentration von Oxyhämoglobin wurden ebenfalls nicht gemessen. Limitierend in dieser Studie ist möglicherweise jedoch die kurze Versuchszeit von wenigen Minuten.

Bei einem zeitlich länger andauernden Versuch wären gegebenenfalls Differenzen zwischen beiden Flussprofilen entstanden.

Zhao et al. 2011 konnten in ihrer klinischen Studie in der Kinderherzchirurgie nachweisen, dass bei Verwendung einer pulsatilen Perfusion intraoperationem die zerebrale Sauerstoffsättigung deutlich erhöht ist gegenüber der konventionellen, laminaren Blutflussmethode. Weiterhin verbesserte sich die Mikrozirkulation. Es wurde aber auch ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Hämolyse durch den pulsatilen Blutfluss festgestellt (freies Hämoglobin im Plasma bei der Gruppe mit pulsatiler Perfusion erhöht). Untersucht wurden 40 pädiatrische Patienten mit Fallot'scher Tetralogie.

Die Serinprotease cleaved Caspase 3 wird in zahlreichen Studien verwendet, um apoptotische Zellen nachzuweisen, die auf einen hypoxisch-ischämischen Schaden zurückzuführen sind (Takada et. al 2015, Ness et al. 2008, Plesnila 2004, Rami 2003). In Anlehnung an die Ergebnisse der vorliegenden Studie konnten Pastuszko et al. 2009 ähnliche Beobachtungen veröffentlichen. Allerdings wurde in diesem Ferkelmodell zusätzlich ein tiefer hypothermer Herz-Kreislaufstillstand (30 Minuten) zu Beginn der extrakorporalen Zirkulation (nicht-pulsatiler Blutfluss) induziert und die Blutflussrate lag durchschnittlich bei 20 ml/kg/min. Pastuszko und Mitarbeiter fanden heraus, dass Zellen mit dem Faktor cleaved Caspase 3 bereits 2 bis 3 Stunden postoperativ im Gewebe des Hippocampus messbar waren. Trotz der höheren Blutflussrate von 100 ml/kg/min in der vorliegenden Arbeit wurden in der Versuchsgruppe mit nicht-pulsatilem Blutfluss ebenfalls verstärkt Zellen mit cleaved Caspase 3 im Hippocampus mikroskopisch sichtbar.

Dass es zur Einleitung der Apoptose über den caspase-abhängigen Weg während der extrakorporalen Zirkulation kommt, wurde u. a. von Ditsworth et al. 2003 beschrieben (Ferkelmodell): Die Anzahl der apoptotischen Neuronen war jedoch während des Einsatzes der Herz-Lungen-Maschine (nicht-pulsatiler Blutfluss und 100 ml/kg/min) deutlich vermindert, als bei Durchführung des tiefen hypothermen Herz-Kreislaufstillstandes. Neurone mit cleaved Caspase 3 wurden v.a. bei letzterer Methode detektiert. In der Kontrollgruppe, bzw. HLM-Gruppe der Studie von Ditsworth konnten keine Zellen mit cleaved Caspase 3 nachgewiesen werden. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie. Allerdings untersuchten Ditsworth und Mitarbeiter hauptsächlich Neurone des Neocortex und nicht des Cornu ammonis des Hippocampus. Apoptotische Neurone mit Expression von cleaved Caspase 3 wurden in der Studie von Blue et al. 2014 (Hundemodell) besonders in der Region des Gyrus dentatus des Hippocampus nachgewiesen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass bei einem Ferkelmodell die Pyramidenzellen der CA1- und CA3-Region des Hippocampus den Faktor cleaved Caspase 3 exprimieren.

Die Einleitung des Apoptose-Vorgangs kann innerhalb der Neuronen auch über den caspase-unabhängigen Weg erfolgen: Eine wichtige Rolle spielt hierbei das Flavoprotein AIF. Die Untersuchungen von Zhang et al. 2006 (Rattenmodell) ergaben, dass bei Einsatz der Herz-Lungen-Maschine (nicht-pulsatiles Flussmuster, moderate Hypothermie) die Werte für blc-2 und bax in der CA1-Region, jedoch nicht in der CA2-, CA3-, CA4-Region erhöht sind. Weiterhin kam es in dieser Region zu morphologischen Änderungen innerhalb der Zellen des Hippocampus (u.a. Kernpyknose, irreguläre Kernformen). Wiederum kann AIF in den bax-abhängigen programmierten Zelltod der Neuronen involviert sein (Cheung et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden nicht nur in der CA1-Region, sondern auch erhöhte Werte für AIF in den Pyramidenzellen des CA3-Areals gemessen. Plesnila et al. 2004 induzierten in ihrer Studie am Mausmodell eine Okklusion der mittleren zerebralen Arterie links (MCAO) für 45 Minuten. Nach vorangegangener fokaler Ischämie kam es 4 Stunden nach dem Versuch zur Freisetzung von AIF aus den intermembranösen Räumen der Mitochondrien und Translokation in den Zellkern. Kernatypien, wie Pyknose und irreguläre Formen wurden erst 8 bis 24 Stunden postoperativ sichtbar.

In der vorliegenden Arbeit am Ferkelmodell konnte ebenfalls die Translokation von AIF in den Nukleus nachgewiesen werden – möglicherweise als Folge einer vorangegangenen inadäquaten Durchblutung des Gewebes (HLM und nicht-pulsatile Perfusion). Da die Proben des Hippocampus direkt nach Abschluss der Rekonvaleszenzzeit (240 Minuten) entnommen wurden, war die Zeitdauer zu kurz, um morphologische Änderungen (z.B. Kernpyknose) mittels HE-Färbung nachweisen zu können.

Versuche am Mausmodell von Thal et al. 2011 (induzierte globale zerebrale Ischämie) führten ebenfalls zu dem Ergebnis der Translokation von AIF in den Zellkern in der CA1-Region des Cornu ammonis.

Die Translokation von AIF in den Nukleus ist u. a. abhängig von Poly-(ADP)-Ribose-Polymerase 1 (PAR(P)-1). Eine übermäßige Aktivierung von PAR(P)-1 führt zur Bildung von Poly-(ADP)-Ribose (PAR). PAR triggert die Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien. Transloziert AIF in den Zellkern, kommt es zur DNA-Fragmentierung und anschließendem Zelltod (Wang et al. 2011, Yu et al. 2006, Virág 2005). PAR(P)-1 wiederum kann durch eine übermäßige Produktion von ROS und erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentrationen aktiviert werden. Eine Überaktivierung von PAR(P)-1 führt zu einem hohen Energiedefizit (massiver Verbrauch von ATP und NAD^+) für die Zelle (van Wijk et Hagemann 2005, Ha et Snyder 2000).

In der vorliegenden Studie am Ferkelmodell zeigten die Versuchsgruppen mit dem höchsten Energie-Verbrauch (niedrige Werte für das ATP/ADP-Verhältnis) die meisten Pyramidenzellen mit den Faktoren PAR und AIF.

In einem neonatalen Rattenmodell von Joly et al. 2003 konnte ebenfalls PAR als Folge von oxidativen Stress nach vorangegangener Ischämie (einseitige MCAO) nachgewiesen werden. Oxidativer Stress entsteht bei einer übermäßigen Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies. ROS entstehen

physiologisch in den Mitochondrien während der oxidativen Phosphorylierung (Boveris et Chance 1973). Ca. 1-3 % des Sauerstoffs wird bei diesem Prozess unvollständig reduziert. Dadurch entsteht u.a. Superoxidanion (Kudin et al. 2004). Während Einsatz der Herz-Lungen-Maschine kommt es durch den Kontakt des Blutes mit den künstlichen Oberflächen u. a. zur Aktivierung der polymorphkernigen Leukozyten (PMNL) mit gesteigerter Bildung von ROS. In der Phase der Reperfusion und Abkopplung der Herz-Lungen-Maschine ist der Organismus verstärkt oxidativem Stress ausgesetzt und es werden nochmals exzessiv ROS gebildet (Zakkar et al. 2015).

Als Marker für oxidativen Stress gilt 3-Nitrotyrosin (Abu-Qare et Abou-Donia 2001). 3-Nitrotyrosin entsteht, wenn Peroxynitrit (gebildet aus Superoxid-Anion und Nitritoxid) mit Tyrosin-Resten von Proteinen im Zytosol interagiert (Beckmann et Koppenol 1996). Eine gesteigerte Bildung von 3-Nitrotyrosin und somit erhöhter oxidativer Stress in Folge der extrakorporalen Zirkulation (nicht-pulsatiler Blutfluss) wurde auch in der Studie von Hayashi et al. 2004 am Rattenmodell nachgewiesen. In der Arbeit von Walther et al. 2013 (Ferkelmodell) wurde die CA1-Region des Hippocampus als sensitive Region detektiert. Mit sinkender Blutflussrate während des kardio-pulmonalen Bypasses steigt die Produktion von 3-Nitrotyrosin unabhängig der gewählten Temperatur während des operativen Eingriffes.

Die Bildung von 3-Nitrotyrosin in der vorliegenden Studie wurde verstärkt sowohl im CA1-Areal als auch im CA3-Areal während der extrakorporalen Zirkulation mit nicht-pulsatilen Blutfluss nachgewiesen. Sowohl die Höhe der Blutflussrate, als auch das Flussprofil nehmen Einfluss auf die Bildung von 3-Nitrotyrosin (und den entstehenden oxidativen Stress) in den Neuronen des Hippocampus.

Bei einem nicht-pulsatilen Blutfluss während der extrakorporalen Zirkulation wird weniger Energie an die Gefäßwände weitergeleitet. Der dadurch verminderte *endothelial shear stress* (ESS) führt zu einer verminderten Nitritoxid-Produktion in den Endothelzellen. Es kommt zu einer Vasokonstriktion und Neutrophilen-Aktivierung (Lanzarone et al. 2010, Macha et al 1996). Die verminderte Produktion von Nitritoxid bei Anwendung eines laminaren Flussprofils könnte zu der Annahme führen, dass weniger Peroxynitrit (entstanden aus Superoxid-Anion und Nitritoxid) und folglich weniger 3-Nitrotyrosin in den Zellen gebildet werden kann. Dies steht im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit, in welcher höchste Werte für 3-Nitrotyrosin in der HLM-Gruppe mit nicht-pulsatilen Blutfluss gemessen wurden. Möglicherweise hat die verstärkte Bildung von ROS, wie sie nach Leukozyten-Aktivierung bei einem laminaren Flussprofil beobachtet wurde, einen stärkeren Einfluss auf die mögliche Bildung von 3-Nitrotyrosin (O'Neil et al. 2012). Mehrere Studien haben gezeigt, dass mithilfe einer pulsatilen Perfusion der *endothelial shear stress* in den Gefäßzellen weites gehend erhalten werden kann. Dadurch ist eine verstärkte Produktion von Nitritoxid innerhalb der Endothelzellen möglich, was wiederum zu einer Vasodilatation führt (Nour et al. 2014). Weiterhin sind die Entzündungszeichen bei

einer pulsatilen Perfusion deutlich abgemildert (Onorati et al. 2010), was zur Folge hat, dass weniger ROS durch die Neutrophilen-Migration in das umliegende Gewebe gelangen. Da weniger ROS (u.a. Superoxid-Anion) zur Bildung von u.a. Peroxynitrit vorhanden sind, können weniger Tyrosin-Reste innerhalb der Zellen mit Peroxynitrit reagieren. Dadurch könnte sich die Ausbildung von 3-Nitrotyrosin vermindern, wie es in der vorliegenden Arbeit in der HLM-Gruppe mit pulsatilem Blutfluss beobachtet wurde.

Um die Ergebnisse verschiedener Studien besser miteinander vergleichen zu können, wurde bereits 1966 von Shephard und Mitarbeitern der Begriff des *energy equivalent pressure* (EEP) definiert. Damit sollte eine möglichst genaue Quantifizierung eines pulsatilen Flussprofils möglich sein.
EEP (in mmHg) kann nach folgender Formel berechnet werden:

$$EEP = (\int f \times p \times dt) / (\int f \times dt)$$

f = Pumpenflussrate
p = arterieller Druck
dt = zeitliche Änderung am Ende der Fluss- und Druck-Zyklen (Einordnung in zeitlichen Ablauf)

Da sowohl der Blutfluss, als auch der Druck bei einen pulsatilen Fluss variieren, ist es möglich eine zusätzliche Energie zu berechnen - *surplus hemodynamic energy* (SHE – in ergs/cm^3):

$$SHE = 1{,}332 \times (EEP — \text{mean pressure})$$

Undar et al. 2011 stellten die Hypothese auf, dass die zusätzliche Energie (SHE) eine verbesserte Mikrozirkulation in den Organen hervorrufen kann. Durch einen pulsatilen Fluss kann eine höhere hämodynamische Energie erreicht werden (Rider et al. 2009). Limitierend auf die Effektivität der Pulsatilität wirken sich jedoch u.U. die einzelnen Komponenten der Herz-Lungen-Maschine aus. Sowohl die Arbeitsgruppe von Rider et al. 2009, als auch Undar et al. 2011 berichten, dass das Pumpensystem, der Membranoxygenator und der innere Durchmesser der Aorten-Kanüle, sowie die arteriellen Filter die Qualität des Pulses beeinflussen können.
Milano et al. 2013 untersuchten verschiedene Typen von Membranoxygenatoren während ihres Einsatzes sowohl mit pulsatilem, als auch mit nicht-pulsatilen Blutfluss hinsichtlich der Bildung von gasförmigen Mikrobläschen. Durch eine Pulsatilität kann u.U. das Risiko zur Bildung von Mikrobläschen steigen. Weiterhin zeigte sich, dass durch eine pulsatile Perfusion die Effektivität des Membranoxygenators reduziert werden kann. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Oxygenator (Lilliput D901) wurde in der Studie von Milano nicht mit untersucht. In allen untersuchten Modellen konnte die Anzahl der Mikrobläschen durch Integration zusätzlicher arterieller Filter reduziert werden.

Andere Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass im Vergleich zu anderen Membranoxygenatoren (Capiox SX10) durch Verwendung des Oxygenators Lilliput D901 ein höherer Druckabfall entsteht. Damit würde u.U. das Risiko eines Bluttraumas mit Schädigung der zellulären Bestandteile im Blut erhöht (Undar et al. 2005, Undar et al. 2000b). Unabhängig des Oxygenator-Typs (Capiox SX10 und Lilliput D901) ist jedoch der SHE-Wert in jedem Fall höher bei einem pulsatilen Flussprofil gegenüber einem nicht-pulsatilen Blutfluss (Undar et al. 2006).

Lim und Mitarbeiter veröffentlichten in ihrer Studie von 2009, dass ca. 80 % der hämodynamischen Energie durch die einzelnen Komponenten der Herz-Lunge-Maschine absorbiert werden. Nur ein geringer Anteil an „Pulsatilität“ erreicht demnach den Patienten und den Bereich der Mikrozirkulation der Organe. Die Arbeitsgruppe um Voss et al. 2010 kam in ihrer Studie zu dem Schluss, dass durch eine pulsatile Perfusion kein Benefit für den Organismus erreicht werden kann. Die Studie am Schweinemodell untersuchte 3 verschiedene Pumpsysteme (physiologisch-pulsatiler Fluss mit einer neu entwickelten pulsatilen HLM, „konventioneller“ pulsatiler Blutfluss durch eine modifizierte Rollerpumpe und laminares Flussprofil durch eine Rollerpumpe). Die Autoren stellten keine Unterschiede zwischen den 3 Versuchsgruppen fest. Es gab keine Veränderungen des regionalen Blutflusses oder der Entzündungsreaktion. Untersucht wurden die Organe Niere (beidseits) und Teile des Duodenums, Ileums und Colons.
Möglicherweise werden die verschiedenen Gewebe und Organe unterschiedlich stark durch die verschiedenen Blutflussmodalitäten während der extrakorporalen Zirkulation beeinflusst. So scheinen Niere und Leber weniger sensitiv zu sein, als das Gewebe des Hippocampus (Salameh et al. 2015b).

Einen weiteren wichtigen beeinflussbaren Faktor stellt die Länge des künstlichen Kreislaufes an sich dar. Nour et al. 2014 veröffentlichten in ihrer in-vitro Studie, dass die Energieverluste mit der metrischen Länge des künstlichen Kreislaufes steigen. Die im gleichen Jahr von denselben Autoren veröffentlichte in-vivo Studie zeigte, das bei einer adäquaten Länge des künstlichen Kreislaufes und einer ausreichend hohen Pulsatilität, die Hämodynamik mit einer pulsatilen Perfusionsmethode verbessert werden kann.
In der vorliegenden Studie am Ferkelmodell wurde ein der Größe der Versuchstiere entsprechendes Schlauch- und Kanülen-System aus der Kinderherzchirurgie für die Operationen verwendet (siehe Anhang, 8.2.1), um etwaige Energieverluste zu vermeiden.

5. 4 Extrakorporale Zirkulation und die Gabe von Minozyklin

Neben Änderung der Blutflussmethode sollte mit dieser Arbeit untersucht werden, ob die Substanz Minozyklin neuroprotektive Effekte besitzt und dadurch Schäden in den Zellen des Hippocampus während Einsatz der Herz-Lungen-Maschine vermindert werden. Das Medikament Minozyklin ist ein Antibiotikum und zählt zu den Tetrazyklinen der 2. Generation. Es passiert problemlos die Blut-Hirn-Schranke. Die neuroprotektive Wirkung von Minozyklin wird als dosisabhängig beschrieben: niedrige Level des Medikaments haben eine positive Wirkung, eine zu hohe Dosis kann einen bestehenden Ischämie-Schaden in den Zellen verstärken (Matsukawa et al. 2009, Kim et Su 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde Minozyklin nach folgendem Protokoll verabreicht: vor Beginn der extrakorporalen Zirkulation wurden 4 mg/kg KM und nach Abkopplung von der Herz-Lungen-Maschine nochmals 2 mg/kg KM intravenös appliziert.

Da es sich um eine einmalige Medikamentengabe intraoperationem handelt und Minozyklin nicht über einen längeren Zeitraum von mehreren Tagen bis Wochen verabreicht wurde, ist das Risiko einer übermäßigen Akkumulation im Organismus der Versuchstiere nicht gegeben.

Die neuroprotektive Wirkung von Minozyklin wird als antiinflammatorisch, antiapoptotisch und als Inhibitor von Proteasen beschrieben (Elewa et al. 2006).

Unabhängig der Gabe von Minozyklin wurde in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit deutlich, dass durch die Anwendung der Herz-Lungen-Maschine im Organismus der Versuchstiere ein erhöhter Verbrauch energiereicher Phosphate zu beobachten war. Die Energiebilanz bezüglich des ATP/ADP-Verhältnisses konnte durch das Medikament nicht beeinflusst werden und wurde auch im Rahmen der Literatur-Recherche für die vorliegende Arbeit von keinem weiteren Autor beschrieben.

Die entzündungshemmende Wirkung bezieht sich besonders auf die neutrophilen Leukozyten, Makrophagen und Mikrogliazellen (Chu et al. 2007). Durch Inhibition der Neutrophilen-Migration und Degranulation ins Gewebe wird die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies gemindert. Zusätzlich ist die Freisetzung von Nitritoxid aus den Makrophagen reduziert (Dunston et al. 2011, Jiang et al. 2009, Brundula et al. 2002). Das verminderte Substratangebot führt möglicherweise zu einer verminderten Bildung von Peroxynitrit, wodurch die Nitrierung von Tyrosin-Resten der Proteine innerhalb der Zellen erschwert wird. In der vorliegenden Arbeit am Ferkelmodell konnte eine geminderte Expression von 3-Nitrotyrosin in der HLM-Gruppe mit Minozyklin-Gabe beobachtet werden.

Aufgrund der chemischen Struktur von Minozyklin fungiert es auch als Radikalfänger (*free radical scavenger*) (Schildknecht et al. 2011, Plane et al. 2010). Die Wirkung als Anti-Oxidans inhibiert zusätzlich eine mögliche Nitrierung von Tyrosin-Resten.

Die verminderte Bildung von ROS-Formationen könnte auch erklären, weshalb in der vorliegenden Arbeit neben einer verminderten Bildung von 3-Nitrotyrosin ebenfalls der biochemische Marker HIF 1-

alpha durch Gabe von Minozyklin in den Pyramidenzellen des Hippocampus vermindert exprimiert wurde. Wie bereits erwähnt, erfolgt die Aktivierung von HIF 1-alpha neben einer ischämisch-bedingten Hypoxie im Gewebe auch durch eine erhöhte Anzahl reaktiver Sauerstoffspezies im Gewebe (Chandel et al. 2000).
Tang et al. 2010 zeigten in ihrer Studie (Rattenmodell), dass durch Minozyklin die Aktivierung der Mikrogliazellen (und somit u. a. auch die Produktion an ROS und Zytokinen) v. a. im Hippocampus reduziert werden kann.
Das Vertreter der Tetrazykline unabhängig ihrer antimikrobiologischen Eigenschaften auch eine antiinflammatorische Wirkung besitzen, wurde ebenfalls in der Arbeit von Yrjänheikki et al. 1998 beschrieben: In deren experimentellen Tier-Studie (Mausmodell, induzierte externe globale Ischämie) wurden die Auswirkungen von Minozyklin und Doxycyclin auf die Pyramidenzellen in der CA1-Region des Hippocampus untersucht. Durch die Gabe der beiden Medikamente stieg die Zahl der intakten Neurone an. Wurde dabei Minozyklin 12 Stunden vor der induzierten Ischämie verabreicht, war der neuroprotektive Effekt stärker, als bei Medikamenten-Gabe nach 30 Minuten postoperativ. Neuroprotektive Wirkungen wurden ebenso bei lokalen zerebralen Ischämien beobachtet (Yrjänheikki et al. 1999).

Die antiapoptotischen Eigenschaften von Minozyklin beziehen sich sowohl auf den caspase-abhängigen, als auch auf den caspase-unabhängigen Weg. In-vivo und in-vitro Studien der Arbeitsgruppe Matsukawa et al. 2009 konnte demonstrieren, dass der Vorgang der Apoptose in den Neuronen inhibiert werden kann. Während bei niedrigen Dosierungen von Minozyklin die Aktivität von cleaved Caspase 3 gehemmt wurde, wirkten sich in diesen Studien hohen Dosierungen des Medikaments zytotoxisch sowohl auf die Neurone als auch auf die Astrozyten aus.
Untersuchungen am Ferkelmodell in der vorliegenden Arbeit hingegen gaben keinen Hinweis auf eine verminderte oder erhöhte Aktivierung von cleaved Caspase 3. Die Ergebnisse zeigten nur eine tendenziell verminderte Expression von cleaved Caspase 3 in den Pyramidenzellen im Vergleich zu der Gruppe ohne Minozyklin-Behandlung, was eine antiapoptotische Wirkung vermuten lässt. Das Minozyklin den Apoptose-Vorgang über den caspase-abhängigen Weg hemmen kann, belegen Studien von Garcia-Martinez et al. 2010 und Antonenko et al. 2010: Durch Stabilisierung der Mitochondrien-Membran wird die Freisetzung von Cytochrom c vermindert und die Aktivierung von Caspase 3 im Zytosol gehemmt.

In der Arbeit von Heo et al. 2006 (Mausmodell) konnte nachgewiesen werden, das Minozyklin den Apoptose-Vorgang über den caspase-abhängigen und caspase-unabhängigen Weg hemmen kann: Die Untersuchungen erfolgten im Gewebe des Hippocampus und zeigten u.a. eine verminderte AIF-Translokation in den Zellkern. Auch in der vorliegenden Studie am Ferkelmodell konnte gezeigt

werden, dass durch die Gabe von Minozyklin in den Pyramidenzellen des Hippocampus weniger cleaved Caspase 3 und der Faktor AIF lichtmikroskopisch sichtbar waren.

Wie bereits erwähnt wird das Flavoprotein AIF u.a. maßgeblich durch eine übermäßige Produktion von PAR(P)-1 aktiviert. Eine verminderte Aktivität von AIF lässt vermuten, dass auch weniger PAR(P)-1 in den Zellen aktiviert wurde. Die dadurch reduzierte Bildung von PAR im Nukleus führt zu keiner getriggerten Freisetzung des Faktors AIF und dessen Translokation in den Zellkern. Studien von Alano et al. 2006 und Tao et al. 2010 führten zu der Annahme, dass durch Minozyklin das Enzym PAR(P)-1 in seiner Aktivität gehemmt wird. Weniger PAR-Formationen reduzieren weiterhin die AIF-Translokation (Cieslik et al. 2013). Die vorliegende Arbeit unterstützt diese Annahme, sowohl PAR als auch AIF wurden in den Zellen des Hippocampus der Versuchstiere mit Minozyklin-Applikation deutlich weniger lichtmikroskopisch sichtbar.

Die neuroprotektiven Wirkungen von Minozyklin scheinen von Tiermodell zu Tiermodell different zu sein, wie die Studie von Tsuji et al. 2004 zeigte: Während im neonatalen Rattenmodell Minozyklin hypoxisch-ischämische Schäden des Gehirns abmildern konnte, wurden diese Schäden unabhängig der gewählten Dosis im neonatalen Mausmodell verstärkt. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie am Ferkelmodell deuten darauf hin, dass Schäden im Hippocampus gesetzt durch die HLM mit Hilfe des Medikaments gemildert werden können.

In der Klinik findet Minozyklin derzeit Anwendung bei der Behandlung von Acne vulgaris bei Kindern und Jugendlichen. Aufgrund zahlreicher Nebenwirkungen wird eine Langzeit-Applikation von länger als 3 Wochen nicht empfohlen (Cascio et al. 2004, Freeman 1989). In der *American Academy of Pediatrics* wurde die Applikation von Minozyklin erst ab einem Mindestalter von 8 Jahren postuliert (Eichenfield et al. 2013). Diese Aspekte limitieren aktuell den Einsatz des Tetrazyklin-Derivats in klinischen Human-Studien. Ein weiterer Tetrazyklin-Abkömmling - Doxycyclin - besitzt eine ähnliche neuroprotektive Wirkung: Jantzie et al. 2005 untersuchten die Wirkung von Doxycyclin auf einen induzierten ischämisch-hypoxischen Schaden im Gewebe des Hippocampus. Cleaved Caspase 3 als Biomarker für den programmierten Zelltod, sowie die Aktivierung der Mikroglia konnten reduziert werden. Die Anzahl der intakten Neurone konnte erhöht werden. Neuroprotektive Effekte durch Doxycyclin wurden ebenso bereits von Yrjänheikki et al. 1998 und Yrjänheikki et al. 1999 beschrieben.

5. 5 Beantwortung der Fragestellungen

1. Inwieweit ist das verwendete Tiermodell und der Versuchsaufbau für die Beantwortung der Fragen 2 und 3 geeignet?

Die Versuche wurden an 3 bis 5½ Wochen alten Ferkeln und nicht in einer Human-Studie durchgeführt. Demnach ist eine direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen nicht uneingeschränkt möglich. Das verwendete Ferkelmodell und der Versuchsaufbau sind jedoch für die Untersuchung der folgenden Fragestellungen geeignet.

2. Werden durch die Anwendung der Herz-Lungen-Maschine mit nicht-pulsatilem Blutfluss Schäden im Gewebe des Hippocampus verursacht?

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass durch den Einsatz der Herz-Lungen-Maschine mit nicht-pulsatilem Blutfluss die Pyramiden-Zellen der CA1- und CA3-Region des Hippocampus geschädigt werden. Es konnten drei verschiedene Wege des Zelluntergangs nachgewiesen werden: Beginn der Apoptose über den caspase-abhängigen (cleaved Caspase 3) und caspase-unabhängigen Weg (AIF), sowie der Zelltod über den Parthanatos-Weg (PAR). Erhöhte Werte der Faktoren HIF 1-alpha und 3-Nitrotyrosin weisen darauf hin, dass die Neuronen hypoxischen Bedingungen und vermehrt oxidativem Stress ausgesetzt waren. Niedrige Werte des ATP/ADP-Verhältnisses deuten auf einen hohen ATP-Verbrauch während des kardiochirurgischen Eingriffes hin.

3. Kann ein pulsatiler Blutfluss, bzw. die Gabe des Medikaments Minozyklin während der extrakorporalen Zirkulation mögliche Schäden im Hippocampus abmildern?

Die Schäden in den Pyramidenzellen der CA1- und CA3-Region des Hippocampus, verursacht durch die HLM, konnten in diesem Tier-Modell durch eine pulsatile Perfusionstechnik nicht vollständig verhindert, aber deutlich reduziert werden.

Grundsätzlich wurden auch bei einem pulsatilen Blutfluss Pyramidenzellen mit den Faktoren für Hypoxie, oxidativen Stress und Einleitung des programmierten Zelltodes mikroskopisch sichtbar. Allerdings waren die Werte für HIF 1-alpha, AIF, cleaved Caspase 3, 3-Nitrotyrosin (CA3-Region) und die Ausbildung eines Ödems der Pyramidenzellen (CA3-Region) in der HLM-Gruppe mit pulsatiler Perfusionstechnik soweit reduziert, dass diese sich den Bereichen annäherten, welche für die jeweiligen Faktoren unter Kontrollbedingungen gemessen wurden. Die Werte für die Ausbildung eines Ödems der Pyramidenzellen (CA1-Region), 3-Nitrotyrosin (CA1-Region) und PAR waren ebenfalls signifikant geringer als in der Gruppe „HLM nicht-pulsatil“. Mittels pulsatiler Perfusionstechnik wurde eine für den Organismus günstigere Energiebilanz erreicht (hohes ATP/ADP-Verhältnis).

Nach Betrachtung aller Ergebnisse wird deutlich, dass durch die Gabe von Minozyklin während der HLM-Zeit die Schäden an den Pyramidenzellen der CA1- und CA3-Region des Hippocampus reduziert werden können. Unabhängig der Medikamenten-Gabe beeinflusst die Herz-Lungen-Maschine jedoch den Metabolismus in den Pyramidenzellen: Faktoren für Hypoxie (HIF 1-alpha), Einleitung des programmierten Zelltodes (AIF, cleaved Caspase 3), Zelluntergangs über den Parthanatos-Weg (PAR) und oxidativen Stress (3-Nitrotyrosin) wurden bei allen Ferkeln durch die Färbemethoden nachgewiesen. Die verminderte Ausbildung eines Ödems der Pyramidenzellen und verminderte Expression der Faktoren HIF 1-alpha, AIF, 3-Nitrotyrosin und PAR gegenüber der Gruppe „HLM nicht-pulsatil“ bestätigen jedoch eine neuroprotektive Wirkung des Medikaments Minozyklin. Die Faktoren „Ödem“, HIF 1-alpha, AIF und 3-Nitrotyrosin reduzierten sich auf Werte, wie sie auch unter Kontrollbedingungen gemessen wurden.

6 Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med. dent.

Prophylaxe hypoxisch-entzündlicher Hirnschädigungen bedingt durch die extrakorporale Zirkulation (Herz-Lungen-Maschine) am narkotisierten Schwein

eingereicht von: Lydia Kühne

angefertigt am / in: Abteilung Forschung und Lehre der Kinderkardiologie des Herzzentrums der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

betreut von: apl. Prof. Dr. med. Aida Salameh

Dezember 2015

Mithilfe der Herz-Lungen-Maschine können zahlreiche angeborene Herzfehler frühzeitig korrigiert werden. Durch die extrakorporale Zirkulation kommt es zu einer Inflammationsreaktion und hämodynamischen Veränderungen im Organismus des Patienten, wodurch einzelne Organe mehr oder weniger stark beeinträchtigt werden können. Schädigungen des Gehirns äußern sich mitunter in Form von einem eingeschränkten Erinnerungsvermögen oder einer verminderter Lernfähigkeit, wodurch die Lebensqualität beeinflusst werden kann. Besonders betroffen sind pädiatrische Patienten. Häufig wird in der klinischen Praxis eine nicht-pulsatile Perfusion während der extrakorporalen Zirkulation angewandt. In dieser tierexperimentellen Studie wurden die Auswirkungen der Herz-Lungen-Maschine auf den Hippocampus als Bestandteil des limbischen Systems untersucht. Ziel der Arbeit war es zu evaluieren, ob ein pulsatiler Blutfluss der Herz-Lungen-Maschine Schäden des Hippocampus auf zellulärer Ebene gegenüber einer nicht-pulsatilen Perfusion abmildern kann. Weiterhin wurden neuroprotektive Effekte des Tetrazyklin-Derivats Minozyklin während des kardiochirurgischen Eingriffes untersucht. Für die Studie wurden 37 Ferkel der Rasse „Angler-Sattelschwein“ in 5 Versuchsgruppen unterteilt: „Kontrolle“, „Kontrolle mit Minozyklin“, „HLM pulsatil“, „HLM nicht-pulsatil“, sowie „HLM nicht-pulsatil mit Minozyklin“. Während der HLM-Zeit von 90 Minuten führte man eine moderate Hypothermie von 28 °C durch. Die Gabe von Minozyklin erfolgte

intravenös mit Beginn der Operation (4 mg/kg Körpermasse) und nach Abkopplung von der Herz-Lungen-Maschine (2 mg/kg Körpermasse). Die Rekonvaleszenzzeit betrug 120 Minuten. Das Gewebe des Hippocampus wurde histologisch mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung und immunhistochemischer Färbemethoden untersucht. Für die mikroskopische Auswertung betrachtete man die Pyramidenzellen des Stratum pyramidale der CA1- und CA3-Region des Cornu ammonis. Mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden signifikant mehr Zellen mit Ödem in der Gruppe „HLM nicht-pulsatil“ gegenüber der Kontrolle nachgewiesen. In den Gruppen „HLM pulsatil“ und „HLM nicht-pulsatil mit Minozyklin“ waren die Zellen mit Ödembildung gegenüber der Gruppe „HLM nicht-pulsatil“ signifikant reduziert. Die Untersuchungen der Faktoren „Eosinophilie“ und „Pyknose“ führten zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen den 5 Versuchsgruppen. Die immunhistochemischen Färbemethoden ergaben, dass in der Gruppe „HLM nicht-pulsatil“ signifikant die meisten Zellen mit Faktoren für Apoptose (Apoptose-induzierender Faktor (AIF), cleaved Caspase 3 und Poly-(ADP)-Ribose), Hypoxie (Hypoxie-induzierter Faktor 1-alpha (HIF 1-alpha)) und oxidativen Stress (3-Nitrotyrosin) gemessen wurden. Eine pulsatile Perfusion (Gruppe „HLM pulsatil“) resultierte in einer signifikant verminderten Aktivierung von AIF, cleaved Caspase 3, Poly-(ADP)-Ribose, HIF 1-alpha und 3-Nitrotyrosin. Das Medikament Minozyklin (Gruppe „HLM nicht-pulsatil mit Minozyklin“) verminderte signifikant gegenüber der Gruppe „HLM nicht-pulsatil“ die Aktivierung von AIF, Poly-(ADP)-Ribose, HIF 1-alpha und 3-Nitrotyrosin. Das Vorkommen des Faktors cleaved Caspase 3 konnte durch die Gabe von Minozyklin nicht signifikant reduziert werden. Die CA1- und die CA3-Regionen waren in allen Gruppen, sowohl bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung als auch bei den immunhistochemischen Untersuchungen gleichermaßen betroffen. Jede Versuchsreihe mit Anschluss an die Herz-Lungen-Maschine wies signifikant erhöhte Laktat-Werte im arteriellen Blut nach Abschluss der Operation gegenüber der Kontrollgruppe auf. Die Ergebnisse der Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography ergaben, dass der Verbrauch an energiereichen Phosphaten (niedriges ATP/ADP-Verhältnis) infolge des kardiochirurgischen Eingriffes in den Gruppen „HLM nicht-pulsatil“ und „HLM nicht-pulsatil mit Minozyklin“ am stärksten (im Vergleich zur Gruppe „Kontrolle“) war. Eine pulsatile Perfusion („HLM pulsatil“) führte zu einer positiveren Energiebilanz (höheres ATP/ADP-Verhältnis) im Vergleich zu der Gruppe „HLM nicht-pulsatil“. In dieser tierexperimentellen Studie am Ferkelmodell konnte eine pulsatile Perfusion Schäden der Pyramidenzellen des Hippocampus in der CA1- und CA3-Region abmildern. Faktoren für Apoptose (AIF, cleaved Caspase 3, Poly-(ADP)-Ribose), Hypoxie (HIF 1-alpha) und oxidativen Stress (3-Nitrotyrosin), sowie eine Ödembildung der Zellen waren reduziert. Weiterhin konnten neuroprotektive Effekte von Minozyklin während eines kardiochirurgischen Eingriffes mit Herz-Lungen-Maschine in diesem Tiermodell bestätigt werden. Faktoren für Apoptose (AIF, Poly-(ADP)-Ribose), Hypoxie (HIF 1-alpha) und oxidativen Stress (3-Nitrotyrosin), sowie die Ausbildung eines Ödems waren durch das Medikament in den Pyramidenzellen vermindert.

7 Literaturverzeichnis

Abdul-Khaliq H, Schubert S, Troitzsch D, Wehsack A, Böttcher W, Gutsch E, Hübler M, Schmitt B, Crausaz M, Schwaller B, Celio M, Stoltenburg-Didinger G, Blasig I, Volk HD, Liebenthal C, Hetzer R, Lange PE. Ein neonatales Schweinemodell zur Evaluierung neuroprotektiver Strategien in der Kinderherzchirurgie. Zeitschrift für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie. 2001; 15:253-260

Abdul-Khaliq H, Troitzsch D, Vogt S, Alexi-Meskhishvilli, Lange PE. Neurozerebrales Monitoring bei Korrekturoperationen angeborener Herzfehler mit extrakorporaler Zirkulation im Säuglings- und Kleinkindesalter. In: Tschaut RJ. Hrsg. Extrakorporale Zirkulation in Theorie und Praxis. 2.Aufl. Lengerich: Pabst Science Publishers;2005.p.496-512

Aberg T, Kihlgren M. Cerebral protection during open-heart surgery.Thorax. 1977; 32:525-33

Abu-Qare AW, Abou-Donia MB. Biomarkers of apoptosis: release of cytochrome c, activation of caspase-3, induction of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, increased 3-nitrotyrosine, and alteration of p53 gene. J Toxicol Envivon Health B Crit Rev. 2001; 4:313-32

Alano CC, Kauppinen TM, Valls AV, Swanson RA. Minocycline inhibits poly(ADP-ribose)polymerase-1 at nanomolar concentrations. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103:9685-90

Allan CK, Newburger JW, McGrath E, Elder J, Psoinos C, Laussen PC, del Nido PJ, Wypij D, McGowan FX Jr. The relationship between inflammatory activation and clinical outcome after infant cardiopulmonary bypass. Anesth Analg. 2010; 111:1244-51

Allen JC. Minocycline. Ann Intern Med. 1976; 85:482-7

Alkan-Bozkaya T, Akcevin A, Türkoglu H, Ündar A. Impact of pulsatile perfusion on clinical outcomes of neonates and infants with complex pathologies undergoing cardiopulmonary bypass procedures. Artif Organs. 2013; 37:82-6

Alves RL, Aragao e Silva AL, Kraychete NC, Campos GO, Martins Mde J, Módolo NS. Intraoperative lactate levels and postoperative complications of pediatric cardiac surgery. Paediatr. Anaesth. 2012; 22:812-7

Amantea D, Marrone MC, Nisticò R, Federici M, Bagetta G, Bernardi G, Mercuri NB. Oxidative stress in stroke pathophysiology validation of hydrogen peroxide metabolism as a pharmacological target to afford neuroprotection. 2009; 85:363-74

Amaral DG, Witter MP. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. Neuroscience. 1989; 31:571-91

Andropoulos DB, Mizrahi EM, Hrachovy RA, Stayer SA, Stark AR, Heinle JS, McKenzie ED, Dickerson HA, Meador MR, Fraser CD Jr. Electroencephalographic seizures after neonatal cardiac surgery with high-flow cardiopulmonary bypass. Anesth Analg. 2010; 110:1680-5

Anstadt MP, Stonnington MJ, Tedder M, Crain BJ, Brothers MF, Hilleren DJ, Rahija RJ, Menius JA Jr, Lowe JE. Pulsatile reperfusion after cardiac arrest improves neurologic outcome. Ann Surg. 1991; 214:478-90

Antonenko YN, Rokitskaya TJ, Cooper AJ, Krasnikov BF. Minocycline chelates Ca2+, binds to membranes, and depolarizes mitochondria by formation of Ca2+-dependent ion channels. J Bioenergy Biomembr. 2010; 42:151-63

Australian Institute of Health and Welfare. Heart, Stroke & Vascular Diseases: Australian Facts 2004. Canberra, Australia: AIHW and National Heart Foundation of Australia; 2004. AIHW No. CVD27

Baehner T, Boehm O, Probst C, Poetzsch B, Hoeft A, Baumgarten G, Knuefermann P. Kardiopulmonaler bypass in der Herzchirurgie. Anaesthesist. 2012; 61:846-56

Bailey LL. Origins of neonatal heart transplantation: an historical perspective. Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu. 2011; 14:98-100

Ballweg JA, Wernovsky G, Gaynor JW. Neurodevelopmental outcomes following congenital heart surgery. Pediatr Cardiol. 2007; 28:126-33

Baranyi A, Rothenhäusler HB. The impact of intra- and postoperative albumin levels as a biomarker of delirium after cardiopulmonary bypass: results of an exploratory study. Psychiatry Res. 2012; 200:957-63

Barrett CS, Jaggers JJ, Cook EF, Graham DA, Yarlagadda VV, Teele SA, Almond CS, Bratton SL, Seeger JD, Dalton HJ, Ryans PT, Laussen PC, Thiagarajan RR. Pediatric ECMO Outcomes: comparison of centrifugal versus roller blood pumps using propensity score matching. ASAIO J. 2013; 59: 145-51

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. Am J Physiol. 1996; 271:C1424-37

Bellinger DC, Wypij D, du Plessis AJ, Rappaport LA, Riviello J, Jonas RA, Newburger JW. Developmental and neurologic effects of alpha-stat versus pH-stat strategies for deep hypothermic cardiopulmonary bypass in infants. J Thorac Cardiovasc Surg. 2001; 121:374-83.

Bellinger DC, Wypij D, duPlessis AJ, Rappaport LA, Jonas RA, Wernovsky G, Newburger JW. Neurodevelopmental status at eight years in children with dextro-transposition of the great arteries: the Boston Circulatory Arrest Trial. J Thorac Cardiovasc Surg. 2003; 126:1385-96

Bellinger DC, Wypij D, Rivkin MJ, DeMaso DR, Robertson RL Jr, Dunbar-Masterson C, Rappaport LA, Wernovsky G, Jonas RA, Newburger JW. Adolescents with d-transpostion of the great arteries corrected with the arterial switch procedure: neuropsychological assessment and structural brain imaging. Circulation. 2011; 52:1139-44

Bernaudin M, Nedelec AS, Divoux D, MacKenzie ET, Petit E, Schumann-Bard P. Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain. J Cereb Blood Flow Metab. 2002; 22:393-403

Berry CL. The place and importance of animals in experimental pathology. Proc R Soc Med. 1972 Apr; 65:345-6

Bilotta F, Stazi E, Zlotnik A, Gruenbaum SE, Rosa G. Neuroprotective effects of intravenous anesthetics: a new critical perspective. Curr Pharm Des. 2014; 20:5469-75

Birdi J, Caputo M, Underwood M, Bryan AJ, Angelini GD. The effects of cardiopulmonary bypass temperature on inflammatory response following cardiopulmonary bypass. Eur J Cardiothorac Surg. 1999; 16:540-5

Blue ME, Wilson MA, Beaty CA, George TJ, Arnaoutakis GJ, Haggerty KA, Jones M, Brawn J, Manmohan S, Lange MS, Johnston MV, Baumgartner WA, Troncoso JC. Brain injury in canine models of cardiac surgery. J Neuropath Exp Neurol. 2014; 73:1134-43

Boettcher W, Merkle F, Weitkemper HH. History of extracorporeal circulation: the invention and modification of blood pumps. J Extra Corpor Technol, 2003; 35:184-91

Born F. Myokardprotektion mit kardioplegischen Lösungen. In: Tschaut RJ. Hrsg. Extrakorporale Zirkulation in Theorie und Praxis. 2.Aufl. Lengerich: Pabst Science Publishers;2005.p.345-355

Bothe HW, Bosma HJ, Hofer H, Hossmann KA, Angermeier WF. Selective vulnerability of hippocampus and disturbances of memory storage after mild unilateral ischemia of gerbil brain. Stroke. 1986; 17:1160-3

Böttger PF. Hypothermie. In: Tschaut RJ. Hrsg. Extrakorporale Zirkulation in Theorie und Praxis. 2.Aufl. Lengerich: Pabst Science Publishers;2005.p.236-242

Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochem J. 1973; 134:707-16

Brady K, Joshi B, Zweifel C, Smielewski P, Czosnyka M, Easley RB, Hogue CW. Real-time continuous monitoring of cerebral blood flow autoregulation using near-infrared spectroscopy in patients undergoing cardiopulmonary bypass. Stroke. 2010; 41:1951-6

Bretschneider HJ. Myocardial protection. Thorac Cardiovasc Surg. 1980; 28:295-302

Brundula V, Rewcastle NB, Metz LM, Bernard CC, Yong VW. Targeting leukocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. Brain. 2002; 125:1297-308

Byrnes J, McKamie W, Swearingen C, Prodhan P, Bhutta A, Jaquiss R, Imamura M, Fiser R. Hemolysis during cardiac extracorporeal membrane oxygenation: a case-control comparison of roller pumps and centrifugal pumps in a pediatric population. ASAIO J. 2011; 57:456-61

Calderon J, Bonnet D, Courtin C, Concordet S, Plumet MH, Angeard N. Executive function and theory of mind in school-aged children after neonatal corrective cardiac surgery for transposition of the great arteries. Dev Med Child Neurol. 2010; 52:1139-44

Cale AE, Freedman PD, Lumerman H. Pigmentation of the jawbones and teeth secondary to minocycline hydrochloride therapy. J Periodontol. 1988; 59:112-4

Campbell JA, Holt DW, Shostrom VK, Durham SJ. Influence of intraoperative fluid volume on cardiopulmonary bypass hematocrit and blood transfusions in coronary artery bypass surgery. J Extra Corpor Technol. 2008; 40:99-108

Candé C, Cecconi F, Dessen P, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? J Cell Sci. 2002; 115:4727-34

Cao G, Xing J, Xiao X, Liou AK, Gao Y, Yin XM, Clark RS, Graham SH, Chen J. Critical role of calpain I in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor in ischemic neuronal injury. J Neurosci. 2007; 27:9278-93

Carty ML, Wixey JA, Colditz PB, Buller KM. Post-insult minocycline treatment attenuates hypoxia-ischemia-induced neuroinflammation and white matter injury in the neonatal rat: a comparison of two different dose regimens. Int J Dev Neurosci. 2008; 26:477-85

Cascio A, Di Liberto C, D'Angelo M, Iaria C, Scarlata F, Titone L, Campisi G. No findings of dental defects in children treated with minocycline. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48:2739-41

Cavaglia M, Seshadri SG, Marchand JE, Ochocki CL, Mee RB, Bokesch PM. Increased transcription factor expression and permeability of the blood brain barrier associated with cardiopulmonary bypass in lambs. Ann Thorac Surg. 2004; 78:1418-25

Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing. J Biol Chem. 2000; 275: 25130-8

Chavez JC, LaManna JC. Activation of hypoxia-inducible factor-1 in the rat cerebral cortex after transient global ischemia: potential role of insulin-like growth factor-1. J Neurosci. 2002; 22:8922-31

Chen Y, Lin J, Li S, Li W, Yan F, Sun P, Wang H, Long C. Which is the better option during neonatal cardiopulmonary bypass: HKT solution or cold blood cardioplegia?. ASAIO J. 2013; 59:69-74

Chen H, Sun D. The role of Na-K-Cl-co-transporter in cerebral ischemia: Neurol Res. 2005; 27:280-6

Cheung ECC, Melanson-Drapeau L, Cregan SP, Vandarluit JL, Ferguson KJ, McIntosh WC, Park DS, Bennett SAL, Slack RS. Apoptosis-inducing factor is a key factor in neuronal cell death propagated by bax-dependent and bax-independent mechanisms. The Journal of Neuroscience. 2005; 25:1324-1334

Chiral M, Grongnet JF, Plumier JC, David JC. Effects of hypoxia on stress proteins in the piglet brain at birth Pediatr. Res. 2004; 56:775-82

Choi SH, Lee DY, Chung ES, Hong YB, Kim SU, Jin BK. Inhibition of thrombin-induced microglial activation and NADPH oxidase by minocycline protects dopaminergic neurons in the substantia nigra in vivo. J Neurochem. 2005; 95:1755-65

Chu LS, Fang SH, Zhou Y, Yu GL, Wang ML, Zhang WP, Wei EQ. Minocycline inhibits 5-lipoxygenase activation and brain inflammation after focal cerebral ischemia in rats. Acta Pharmacol Sin. 2007; 28:763-72

Chugani HT. Biological basis of emotions: brain systems and brain development. Pediatrics. 1998; 102: 1225-9

Chung HY, Baek BS, Song SH, Kim MS, Huh JI, Shim KH, Kim KW, Lee KH. Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress. Age (Omaha). 1997; 20: 127–140

Cieslik M, Pyszko J, Strosznajder JB. Docosahexaenoic acid and tetracyclines as promising neuroprotective compounds with poly(ADP-ribose)polymerase inhibitory activities for oxidative/ genotoxic stress treatment. Neurochem Int. 2013; 62:626-36

Cooper JM, Vargha-Khadem F, Gadian DG, Maguire EA. The effect of hippocampal damage in children on recalling the past and imagining new experiences. Neuropsychologia. 2011; 49:1843-50

Damert A, Ikeda E, Risau W. Activator-protein-1 binding potentiates the hypoxia-inducible factor-1-mediated hypoxia-induced transcriptional activation of vascular-endothelial growth factor expression in C6 glioma cells. Biochem J. 1997; 327:419-23

Dauborn S. Metazoa (Vielzeller). In: Dauborn S. Hrsg. Lehrbuch für Tierheilpraktiker. 2. Aufl. Stuttgart: Sonntag; 2004a.p.59-62

Dauborn S. Anatomie und Physiologie des Schweines. In: Dauborn S. Hrsg. Lehrbuch für Tierheilpraktiker. 2. Aufl. Stuttgart: Sonntag; 2004b.p.194-201

de Lange F, Jones WL, Mackensen CB, Grocott HP. The effect of limited rewarming and postoperative hypothermia on cognitive function in a rat cardiopulmonary bypass model. Anesth Analg. 2008; 106: 739-45

Dipchand AJ, Kirk R, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Christie JD, Dobbels F, Lund LH, Rahmel AO, Yusen RD, Stehlik J, International Society for Heart and Lung Transplantation. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Sixteenth Official Pediatric Heart Transplantation Report -- 2013; focus theme: age. J Heart Lung Transplant. 2013; 32:979-88

Ditsworth D, Priestley MA, Loepke AW, Ramamoorthy C, McCann J, Staple L, Kurth CD. Apoptotic neuronal death following deep hypothermic circulatory arrest in piglets. Anesthesiology. 2003; 98:1119-27

Dogal NM, Mathis RK, Lin J, Qin F, Kunselman A, Ündar A. Evaluation of three hollow-fiber membrane oxygenators without integrated arterial filters for neonatal cardiopulmonary bypass. Perfusion. 2012; 27:132-40

Dong XX, Wang Y, Qin ZH. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. Acta Pharmacol Sin. 2009; 30:379-87

Dramburg W, Schmidt B, Optenhöfel J, Knobl HJ, Körfer R. Oxygenatoren und Wärmetauscher. In: Tschaut RJ. Hrsg. Extrakorporale Zirkulation in Theorie und Praxis. 2. Aufl. Lengerich: Pabst Science Publishers; 2005.p.278-286

Dreier JP, Vajkoczy P, Bohner G, Graf R, Vatter H, Sakowitz OW, Martus P, Dohmen C, Sarrafzadeh A, Scheel M, Major S, Woitzik J. “Spreading Depolarization” bei Migräneaura und Schlaganfall im menschlichen Gehirn. Journal für Neurologie Neurochirurgie und Psychatrie. 2013; 14:8-17

Duebener LF, Hagino I, Sakamoto T, Mime LB, Stamm C, Zurakowski D, Schäfers HJ, Jonas RA. Effects of pH management during deep hypothermic bypass on cerebral microcirculation: alpha-stat versus pH-stat. Circulation. 2002; 106:103-8

Dunston CR, Griffiths HR, Lambert PA, Staddon S, Vernallis AB. Proteomic analysis of the anti-inflammatory action of minocycline. Proteomics. 2011; 11:42-51

du Plessis AJ, Jonas RA, Wypij D, Hickey PR, Riviello J, Wessel DL, Roth SJ, Burrows FA, Walter G, Farrell DM, Walsh AZ, Plumb CA, del Nido P, Burke RP, Castaneda AR, Mayer JE Jr, Newburger JW. Perioperative effects of alpha-stat versus pH-stat strategies for deep hypothermic cardiopulmonary bypass in infants. J Thorac Cardiovasc Surg. 1997; 114:991-1000

Durandy Y, Hulin S. Intermittent warm blood cardioplegia in the surgical treatment of congenital heart disease: clinical experience with 1400 cases. J Thorac Cardiovasc Surg. 2007; 133:241-6

Eagle KA, Guyton RA, Davidoff R, Ewy GA, Fonger J, Gardner TJ, Gott JP, Herrmann HC, Marlow RA, Nugent WC, O'Connor GT, Orszulak TA, Rieselbach RE, Winters WL, Yusuf S, Gibbons RJ, Alpert JS, Eagle KA, Garson A Jr, Gregoratos G, Russell RO, Smith SC Jr. ACC/AHA Guidelines for Coronary Artery Bypass Graft Surgery: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 1991 Guidelines for Coronary Artery Bypass Graft Surgery). American College of Cardiology/American Heart Association. J Am Coll Cardiol. 1999; 34:1262-347

Eichenfield LF, Krakowski AC, Piggott C, Del Rosso J, Baldwin H, Friedlander SF, Levy M, Lucky A, Mancini AJ, Orlow SJ, Yan AC, Vaux KK, Webster G, Zaenglein AL, Thiboutot DM, American Acne and Rosacea Society. Evidence-base recommendations for the diagnosis and treatment of pediatric acne. Pediatrics. 2013; 131:163-86

Eldadah BA, Faden AI. Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. J Neurotrauma. 2000; 17:811-29

Elewa HF, Hilali H, Hess DC, Machado LS, Fagan SC. Minocycline for short-term neuroprotection. Pharmacotherapy. 2006; 26:515-21

Engels M, Bilgic E, Pinto A, Vasquez E, Wollschläger L, Steinbrenner H, Kellermann K, Akhyari P, Lichtenberg A, Boeken U. A cardiopulmonary bypass with deep hypthermic circulatory arrest rat model for the investigation of the systemic inflammation response and induced organ damage. J Inflamm. 2014; 11:26

Engoren MC, Habib RH, Zacharias A, Schwann TA, Riordan CJ, Durham SJ. Effect of blood transfusion on long-term survival after cardiac operation. Ann Thorac Surg. 2002; 74:1180-6

Ensminger C, Buckert R, Ensminger SM. Spezielle Pathophysiologie der Extrakorporalen Zirkulation. In: Feindt P, Harig F, Weyand M. Hrsg. Empfehlungen zu Einsatz und zur Verwendung der Herz-Lungen-Maschine. 1. Aufl. Darmstadt: Steinkopf; 2006.p.44-70

Esper SA, Subramaniam K, Tanaka KA. Pathophysiology of Cardiopulmonary Bypass: Current Strategies for the Prevention and Treatment of Anemia, Coagulopathy, and Organ dysfunction. Semin Cardiothorac Vasc Anesth, 2014; 18:161-176

Folkerts M. Der Kohlenhydratstoffwechsel. In: Dettmer U, Folkerts M, Kächler E, Sönnichsen A. Hrsg. Intensivkurs Biochemie. 1.Aufl. München: Urban & Fischer; 2005.p.41-81

Francischetti I, Moreno JB, Scholz M, Yoshida WB, Leukocytes and the inflammatory response in ischemia-reperfusion injury. Rev Bras Cir Cardiovasc. 2010; 25:575-584

Freeman K. Therapeutic focus. Minocycline in the treatment of acne. Br J Clin Pract. 1989; 43:112-5

Galli KK, Zimmerman RA, Jarvik GP, Wernovsky G, Kuypers MK, Clancy RR, Montenegro LM, Mahle WT, Newman MF, Saunders AM, Nicolson SC, Spray TL, Gaynor JW. Periventricular leukomalacia is common after neonatal cardiac surgery. J Thorac Cardiovasc Surg. 2004; 127:692-704

Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. Cell Death Differ. 2012; 19:107-20

Garcia-Martinez EM, Sanz-Blasco S, Karachitos A, Bandez MJ, Fernandez-Gomez FJ, Perez-Alvarez S, de Mera RM, Jordan MJ, Aguirre N, Galindo MF, Villalobos C, Navarro A, Kmita H, Jordán J. Mitochondria and calcium influx as targets of neuroprotection caused by minocycline in cerebellar granule cells. Biochem Pharmacol. 2010; 79:239-50

Garman RH. Histology of the central nervous system. Toxicol Pathol. 2011; 39:22-35

Garner SE, Eady A, Bennett C, Newton JN, Thomas K, Popescu CM. Minocycline for acne vulgaris: efficacy and safety. Cochrane Database Syst Rev. 2012; 8:CD002086

Garrido-Mesa N, Zarzuelo A, Gálvez J. Minocycline: far beyond an antibiotic. Br J Pharmacol. 2013; 169:337-52

Gaynor JW, Gerdes M, Zackai EH, Bernbaum J, Wernovsky G, Clancy RR, Newman MF, Saunders AM, Heagerty PJ, D'Agostino JA, McDonald-McGinn D, Nicolson SC, Spray TL, Jarvik GP. Apolipoprotein E genotype and neurodevelopmental sequelae of infant cardiac surgery. J Thorac Cardiovasc Surg. 2003; 126:1736-45

Gee CE, Benquet P, Raineteau O, Rietschin L, Kirbach SW, Gerber U. NMDA receptors and the differential ischemic vulnerability of hippocampal neurons. Eur J Neurosci. 2006; 23:2595-603

Gerace E, Masi A, Resta F, Felici R, Landucci E, Mello T, Pellegrini-Giampietro DE, Mannaioni G, Moroni F. PARP-1 activation causes neuronal death in the hippocampal CA1 region by increasing the expression of Ca(2+)-permeable AMPA receptors. Neurobiol Dis. 2014; 70:43-52

Gerelli S, van Steenberghe M, Murtuza B, Bojan M, Harding ED, Bonnet D, Vouhé PR, Raisky O. Neonatal right ventricle to pulmonary connection as a palliative procedure for pulmonary atresia with ventricular septal defect or severe tetralogy of Fallot. Eur J Cardiothorac Surg. 2014; 45:278-88

Goto M, Kudoh K, Minami S, Nukariya M, Sasaguri S, Watanabe M, Hosoda Y. The renin-angiotensin-aldosterone system and hematologic changes during pulsatile and nonpulsatile cardiopulmonary bypass. Artif Organs. 1993; 17:318-22

Goyal P, Weissmann N, Grimminger F, Hegel C, Bader L, Rose F, Fink L, Ghotrani HA, Schermuly RT, Schmidt HHHW, Seeger W, Hänze J. Upregulation of NAD(P)H Oxidase 1 in hypoxia activates hypoxia-inducible factor 1 via increase in reactive oxygen species. Free Radical Biology & Medicine. 2004; 36:1279-88

Griffin DA. Blood gas strategies and management during pediatric cardiopulmonary bypass. ASAIO J. 2005; 51:657-8

Grubhofer G, Mares P, Rajek A, Müllner T, Haisjackl M, Dworschak M, Lassnigg A. Pulsatility does not change cerebral oxygenation during cardiopulmonary bypass. Acta Anaesthesiol Scand. 2000; 44:586-91

Guan Y, Palanzo D, Kunselman A, Ündar A. Evaluation of membrane oxygenators and reservoirs in terms of capturing gaseous microemboli and pressure drops. Artif Organs. 2009; 33:1037-43

Guimarães JS, Freire MA, Lima RR, Picanço-Diniz CW, Pereira A, Gomes-Leal W. Minocycline treatment reduces white matter damage after excitotoxic striatal injury. Brain Res. 2010; 1329:182-93

Gürsoy-Özdemir Y, Can A, Dalkara T. Reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to neurovascular unit after focal cerebral ischemia. Stroke. 2004; 35:1449-1453

Ha HC, Snyder SH. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 in the nervous system. Neurobiol Dis. 2000; 7:225-39

Halstead JC, Spielvogel D, Meier DM, Weisz D, Bodian C, Zhang N, Griepp RB. Optimal pH strategy for selective cerebral perfusion. Eur J Cardiothorac Surg. 2005; 28:266-73

Hatanpaa KJ, Raisanen JM, Herndon E, Burns DK, Foong C, Habib AA, White CL 3rd. Hippocampal sclerosis in dementia, epilepsy, and ischemic injury: differential vulnerability of hippocampal subfields. J Neuropathol Exp Neurol. 2014; 73:136-42

Hattersley PG. Activated coagulation time of whole blood. JAMA. 1966; 196:436-40

Haworth WS. The development of the Modern Oxygenator. Ann Thorac Surg. 2003; 76:2216-9

Hayashi Y, Sawa Y, Nishimura M, Fukuyama N, Ichikawa H, Ohtake S, Nakazawa H, Matsuda H. Peroxynitrite, a product between nitritc oxide and superoxide anion, plays a cytotoxic role in the development of post-bypass systemic inflammatory response. European Journal of Cardio-thoracic Surgery. 2004; 26:276-280

Hayashida M, Kin N, Tomioka T, Orii R, Sekiyama H, Usui H, Chinzei M, Hanaoka K. Cerebral ischemia during cardiac surgery in children detected by combined monitoring of BIS and near-infrared spectroscopy. British Journal of Anaesthesia. 2004; 92:662-9

Heinemann M, Stiller B, Schlensack Ch, Schmaltz A. Angeborene Herzfehler. In: Deutsche Herztiftung. Hrsg. Deutscher Herzbericht 2014. Nürnberg: hofmann infocom GmbH; 2014.p.151-178

Heo K, Cho YJ, Kim HW, Kim HJ, Shin HY, Lee BJ, Kim GW. Minocycline inhibits caspase-dependent and –independent cell death pathways and is neuroprotective against hippocampal damage after treatment with kainic acid in mice. Neurosci Lett. 2006; 398:195-200

Hiebl B, Mrowietz C, Ploetze K, Matschke K, Jung F. Critical hematocrit and oxygen partial pressure in the beating heart of pigs. Microvasc Res. 2010; 80:389-93

Hoffmann GM, Brosiq CL, Mussatto KA, Tweddell JS, Ghanayem NS. Perioperative cerebral oxygen saturation in neonates with hypoplastic left heart syndrome and childhood neurodevelopmental outcome. J Thorac Cardiovasc Surg. 2013; 146: 1153-64

Hövels-Gürich HH, Vazquez-Jimenez JF, Silvestri A, Schumacher K, Minkenberg R, Duchateau J, Messmer BJ, von Bernuth G, Seghaye MC. Production of proinflammatory cytokines and myocardial dysfunction after arterial switch operation in neonates with transposition of the great arteries. J Thorac Cardiovasc Surg. 2002; 124:811-20

Hsia TY, Gruber PJ. Factors influencing neurologic outcome after neonatal cardiopulmonary bypass: what we can and cannot control. Ann Thorac Surg. 2006; 81:2381-8

Hussaini BE, Treanor PR, Healey NA, Tilahun D, Srey R, Lu XG, Khuri SF, Thatte HS. Evaluation of blood components exposed to coated arterial filters in extracorporeal circuits. Perfusion. 2009; 24:317-23

Inamori S, Shirai M, Yahagi N, Pearson JT, Fujii Y, Umetani K, Kobayashi Y, Okura Y, Yakehiro M, Minamiyama M. A comparative study of cerebral microcirculation during pulsatile and nonpulsatile selective cerebral perfusion: assessment by synchrotron radiation microangiography. ASAIO J. 2013; 59:374-9

Ishibashi N, Iwata Y, Okamura T, Zurakowski D, Lidov HG, Jonas RA. Differential neuronal vulnerability varies according to specific cardiopulmonary bypass insult in a porcine survival model. J Thorac Cardiovasc Surg. 2010; 140:1408-15

Iwahashi H, Yuri K, Nosé Y. Development of the oxygenator: past, present, and future. J Artif Organs. 2004; 7:111-20

Jantzie LL, Cheung PY, Todd KG. Doxycycline reduces cleaved Caspase-3 and microglial activation in an animal model of neonatal hypoxia-ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 2005; 25:314-24

Ji B, Undar A. An evaluation of the benefits of pulsatile versus nonpulsatile perfusion during cardiopulmonary bypass procedures in pediatric and adult cardiac patients. ASAIO J. 2006; 52:357-61

Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF. Minocycline attenuates oxidative/nitrosative stress and cerebral complications of acute liver failure in rats. Neurochem Int. 2009; 55:601-5

Johnson MH. Functional brain development in humans. Nat Rev Neurosci. 2001; 2:475-83

Joly LM, Benjelloun N, Plotkine M, Charriant-Marlangue C. Distribution of Poly(ADP-ribosyl)ation and cell death after cerebral ischemia in the neonatal rat. Pediatr Res. 2003; 53:776-82

Joubert-Huebner E. EKZ bei Neugeborenen und Kleinkindern. In: Tschaut RJ. Hrsg. Extrakorporale Zirkulation in Theorie und Praxis. 2. Aufl. Lengerich: Pabst Science Publishers; 2005.p.473-495

Jung YJ, Suh EC, Lee KE. Oxygen/Glucose Deprivation and Reperfusion Cause Modifications of Postsynaptic Morphology and Activity in the CA3 Area of Organotypic Hippocampal Slice Cultures. Korean J Physiol Pharmacol. 2012; 16:423-9

Kaltman JR, Di H, Tian Z, Rychik J. Impact of congenital heart disease on cerebrovascular blood flow dynamics in the fetus. Ultrasound Obstet Gynecol. 2005; 25:32-6

Kamada S, Kikkawa U, Tsujimoto Y, Hunter T. Nuclear translocation of caspase-3 is dependent on its proteolytic activation and recognition of a substrate-like protein(s). J Biol Chem. 2005; 280:857-60

Karaci AR, Sasmazel A, Aydemir NA, Saritas T, Harmandar B, Tuncel Z, Undar A. Comparison of parameters for detection of splanchnic hypoxia in children undergoing cardiopulmonary bypass with pulsatile versus nonpulsatile normothermia or hypothermia during congenital heart surgeries. Artif Organs. 2011; 35:1010-7

Karl TR, Hall S, Ford G, Kelly EA, Brizard CP, Mee RB, Weintraub RG, Cochrane AD, Glidden D. Arterial switch with full-flow cardiopulmonary bypass and limited circulatory arrest: neurodevelopmental outcome. J Thorac Cardiovasc Surg. 2004; 127:213-22

Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. Toxicology. 2000; 149:43-50

Kerbleski GJ, Hampton TT, Cornejo A. Black bone disease of the foot: a case study and review of literature demonstrating a correlation of long-term minocycline therapy and bone hyperpigmentation. J Foot Ankle Surg. 2013; 52:239-41

Kerendi F, Halkos ME, Kin H, Corvera JS, Brat DJ, Wagner MB, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Forbess JM, Kanter KR, Kelley ME, Kirshbom PM. Upregulation of hypoxia inducible factor is associated with attenuation of neuronal injury in neonatal piglets undergoing deep hypothermic circulatory arrest. J Thorac Cardiovasc Surg. 2005; 130:1079

Ketz Riley CJ, Schlerka G, Schuh M, Schusser G, Scope A, Thalhammer J, Tipold A, Vasicek L. Klinische Propädeutik der inneren Krankheiten und Hautkrankheiten der Haus- und Heimtiere. Baumgartner W. Hrsg. 4. Aufl. Berlin: Parey Buchverlag; 1999

Khanna A, Kahle KT, Walcott BP, Gerzanich V, Simard JM. Disruption of ion homeostasis in the neurogliovascular unit underlies the pathogenesis of ischemic cerebral edema. Transl Stroke Res. 2014; 5:3-16

Kim HS, Su YH. Minocycline and neurodegenerative diseases. Behav Brain Res. 2009; 196:168-79

Kirkham FJ. Recognition and prevention of neurological complications in pediatric cardiac surgery. Pediatr Cardiol. 1998; 19:331-45

Kitano H, Kirsch JR, Hurn PD, Murphy SJ. Inhalational anesthetics as neuroprotectants or chemical preconditioning agents in ischemic brain. J Cereb Blood Flow Metab. 2007; 27:1108-28

Kontos HA. Oxygen radicals in cerebral ischemia: the 2001 Willis lecture. Stroke. 2001; 32:2712-6

Kotani Y, Tweddell J, Gruber P, Pizarro C, Austin EH 3rd, Woods RK, Gruenwald C, Caldarone CA. Current cardioplegia practice in pediatric cardiac surgery: a North American multiinstitutional survey. Ann Thorac Surg. 2013; 96:923-9

Kotoulas C, Panagiotou I, Tsipas P, Melachrinou M, Alexopoulos D, Dougenis D. Experimental studies in the bronchial circulation. Which is the ideal animal model?. J. Thorac Dis. 2014; 6:1506-12

Kozik DJ, Tweddell JS. Characterizing the Inflammatory Response to Cardiopulmonary Bypass in Children. Ann Thorac Surg. 2006; 81:2347-54

Kristián T, Siesjö BK. Calcium in Ischemic Cell Death. Stroke. 1998; 29:705-718

Kuchelmeister K. Zellen des Zentralnervensystems und ihre Reaktionsformen. In: Klöppel G, Kreipe HH, Remmele W. Hrsg. Pathologie Neuropahtologie. 3.Aufl. Berlin Heidelberg: Springer; 2012.p.4-27

Kudin AP, Bimpong-Buta NY, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS. Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. J Biol Chem. 2004; 279:4127-35

Kudlicka J, Mlcek M, Belohlavek J, Hala P, Lacko S, Janak D, Havranek S, Malik J, Janota T, Ostadal P, Neuzil P, Kittnar O. Inducibility of ventricular fibrillation during mild therapeutic hypothermia: electrophysiological study in a swine model. J Transl Med. 2015; 13:72

Kunes P, Lonský V, Mand'ák J, Brtko M, Kolácková M, Andrýs C, Kudlová M, Krejsek J. The inflammatory response in cardiac surgery. An up-to-date overview with the emphasis on the role of heat shock proteins (HSPs) 60 and 70. Acta Medica (Hradec Kralove). 2007; 50:93-99

Laffey JG, Boylan JF, Cheng DCH. The systemic inflammatory response to cardiac surgery: implications for the anesthesiologist. Anesthesiol. 2002; 97:215-52

Languren G, Montiel T, Julio-Amilpas A, Massieu L. Neuronal damage and cognitive impairment associated with hypoglycemia: An integrated view. Neurochem Int. 2013; 63:331-43

Lanzarone E, Gelmini F, Fumero A, Carini M, Costantino ML, Fumero R, Alfieri O. Preservation of endothelium nitric oxide release during beating heart surgery with respect to continuous flow cardiopulmonary bypass. Perfusion. 2010; 25:57-64

Lauterbach G. Komponenten der EKZ – Herz-Lungen-Maschine. In: Lauterbach G, Erber M, Lorenz D, Philipp A, Schelkle H. Hrsg. Handbuch der Kardiotechnik. 4.Aufl. München Jena: Urban & Fischer; 2002.p.185-200

Lee JW, Yoo YCh, Park HK, Bang SO, Lee KY, Bai SJ. Fresh Frozen Plasma in Pump Priming for Congenital Heart Surgery: Evaluation of Effects on Postoperative Coagulation Profiles Using a Fibrinogen Assay and Rotational Thromboelastometry. Yonsei Med J. 2013; 54:752-62

Leite LM, Carvalho AG, Ferreira PL, Pessoa IX, Gonçalves DO, Lopes Ade A, Góes JG, Alves VC, Leal LK, Brito GA, Viana GS. Anti-inflammatory properties of doxycycline and minocycline in experimental models: an in vivo and in vitro comparative study. Inflammopharmacology. 2011; 19:99-110

Lim CH, Yang S, Choi JW, Sun K. Optimizing the circuit of a pulsatile extracorporeal life support system in terms of energy equivalent pressure and surplus hemodynamic energy. Artif Organs. 2009; 33:1015-20

Lindinger A, Schwedler G, Hense HW. Prevalence of Congenital Heart Defects in Newborns in Germany: Results of the First Registration Year of the PAN Study. Klin Pädiatr. 2010; 222:1-10

Lizano Santamaria RW, Gillespie MJ, Dori Y, Rome JJ, Glatz AC. Palliative balloon pulmonary valvuloplasty for infants with unrestrictive ventricular septal defect or single ventricle associated with severe pulmonary stenosis. Catheter Cardiovasc Interv. 2015; 86:829-33

Loepke AW, Priestley MA, Schultz SE, McCann J, Golden J, Kurth CD. Desflurane improves neurologic outcome after low-flow cardiopulmonary bypass in newborn pigs. Anesthesiology. 2002; 97:1521-7

Lonsky V, Svitek V, Brzek V, Kubicek J, Volt M, Horak M, Mandak J. Direct oxymetric peripheral tissue perfusion monitoring during open heart surgery with the use of cardiopulmonary bypass: preliminary experience. Perfusion. 2011; 26:510-5

Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, Kroemer G. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. Cell Death Differ. 1999; 6:516-24

Lu M, Gong X. Upstream reactive oxidative species (ROS) signals in exogenous oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction. Cell Biol Int. 2009; 33:658-64

Macha M, Yamazaki K, Gordon LM, Watach MJ, Konishi H, Billiar TR, Borovetz HS, Kormos RL, Griffith BP, Hattler BG. The vasoregulatory role of endothelium derived nitric oxide during pulsatile cardiopulmonary bypass. ASAIO J. 1996; 42:M800-4

Mackensen GB, Sato Y, Nellgard B, Pineda J, Newman MF, Warner DS, Grocott HP. Cardiopulmonary bypass induces neurologic and neurocognitive dysfunction in the rat. Anesthesiology. 2001; 95:1485-91

Mardas N, Dereka X, Donos N, Dard M. Experimental model for bone regeneration in oral and cranio-maxillo-facial surgery. J Invest Surg. 2014; 27:32-49

Mathew JP, Mackensen GB, Phillips-Bute B, Stafford-Smith M, Podgoreanu MV, Grocott HP, Hill SE, Smith PK, Blumenthal JA, Reves JG, Newman MF; Neurologic Outcome Research Group (NORG) of the Duke Heart Center. Effects of extreme hemodilution during cardiac surgery on cognitive function in the elderly. Anesthesiology. 2007; 107:577-84

Matsukawa N, Yasuhara T, Hara K, Xu L, Maki M, Yu G, Kaneko Y, Ojika K, Hess DC, Borlongan C. Therapeutic targets and limits of minocycline neuroprotection in experimental ischemic stroke. BMC Neurosci. 2009; 10:126

McConkey DJ. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. Toxicol Lett. 1998; 99:157-68.

McCord JM. Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. Fed Proc. 1987; 46:2402-6

Miclescu A, Sharma HS, Martijn C, Wiklund L. Methylene blue protects the cortical blood-brain barrier against ischemia/reperfusion-induced disruptions. Crit Care Med. 2010; 38:2199-206

Milano AD, Dodonov M, Onorati F, Menon T, Gottin L, Malerba G, Mazzucco A, Faggian G. pulsatile flow decreases gaseous micro-bubble filtering properties of oxygenators without integrated arterial filters during cardiopulmonary bypass. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2013; 17:811-7

Mohammad S, Ruiz D. Minocycline for acne vulgaris. Am Fam Physician. 2013; 88:300

Morales DL, Garrido MJ, Madigan JD, Helman DN, Faber J, Williams MR, Landry DW, Oz MC. A double-blind randomized trial prophylactic vasopressin reduces hypotension after cardiopulmonary bypass. Ann Thorac Surg. 2003; 75: 926-30

Moody DM. The blood-brain barrier and blood-cerebral spinal fluid barrier. Semin Cardiothorac Vasc Anesth. 2006; 10:128-31

Munoz R, Laussen PC, Palacio G, Zienko L, Piercey G, Wessel DL. Changes in whole blood lactate levels during cardiopulmonary bypass for surgery for congenital cardiac disease: an early indicator of morbidity and mortality. J Thorac Cardiovasc Surg. 2000; 119:155-62

Nauphal M, El-Khatib M, Taha S, Haroun-Bizri S, Alameddine M, Baraka A. Effect of alpha-stat vs. pH-stat strategies on cerebral oximetry during moderate hypothermic cardiopulmonary bypass. Eur J Anaesthesiol. 2007; 24:15-9

Nelson DP, Andropoulos DB, Fraser CD Jr. Perioperative neuroprotective strategies. Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu. 2008; 49-56

Ness JM, Harvey CR, Washington JD, Roth KA, Carroll SL, Zhang J. Differential activation of c-Fos and caspase-3 in hippocampal neuron subpopulations following neonatal hypoxia-ischemia. J Neurosci Res. 2008; 86: 1115-1124

Nickel R, Schummer A, Seiferle E. Endhirn. In: Nickel R, Schummer A, Seiferle E. Hrsg. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band 4. 4. Aufl. Stuttgart: Parey; 2004.p.133-184

Nieminen H, Sairanen H, Tikanoja T, Leskinen M, Ekblad H, Galambosi P, Jokinen E. Long-term results of pediatric cardiac surgery in Finland: education, employment, marital status, and parenthood. Pediatrics. 2003; 112:1345-50

Nilsson L, Tydén H, Johansson O, Nilsson U, Ronquist G, Venge P, Aberg T; Nyström SO. Bubble and membrane oxygenators – comparison of postoperative organ dysfunction with special reference to inflammatory activity. Scand J Thorac Cardiovasc Surg. 1990; 24:59-64

Nishikawa T. Hemodynamic changes associated with thermodilution cardiac output determination in canine acute blood loss or endotoxemia. Acta Anaesthesiol Scand. 1993; 37:602-6

Norberg E, Gogvadze V, Ott M, Horn M, Uhlén P, Orrenius S, Zhivotovsky B. An increase in intracellular Ca2+ is required for the activation of mitochondrial calpain to release AIF during cell death. Cell Death Differ. 2008; 15:1857-64

Nour S, Lin J, Dai G, Carbognani D, Yang D, Wu G, Wang Q, Chachques JC. Shear stress, energy losses, and costs: a resolved dilemma of pulsatile cardiac assist devices. Biomed Res Int. 2014; 2014:651769

Noval-Padillo JA, Serra-Gomez C, Gomez-Sosa L, Hinojosa-Perez R, Huici-Moreno MJ, Asduar A, Herruzo-Avilés A, Lopez-Romero JL, León-Justel A, Guerrero-Montavez JM. Changes of lactate levels during cardiopulmonary bypass in patients undergoing cardiac transplantation: possible early marker of morbidity and mortalitiy. Transplant Proc. 2011; 43:2249-50

Okamura T, Ishibashi N, Zurakowski D, Jonas RA. Cardiopulmonary bypass increases permeability of the blood-cerebrospinal fluid barrier. Ann Thorac Surg. 2010a; 89:187-94

Okamura T, Ishibashi N, Kumar TS, Zurakowski D, Iwata Y, Lidov HG, Jonas RA. Hypothermic circulatory arrest increases permeability of the blood brain barrier in watershed areas. Ann Thorac Surg. 2010b; 90:2001-8

Ono M, Joshi B, Brady K, Easley RB, Zheng Y, Brown C, Baumgartner W, Hogue CW. Risks for impaired cerebral autoregulation during cardiopulmonary bypass and postoperative stroke. Br J Anaesth. 2012; 109:391-8

Onorati F, Rubin AS, Nucera S, Foti D, Sica V, Santini F, Gulletta E, Renzulli A. Off-pump coronary artery bypass surgery versus standard linear or pulsatile cardiopulmonary bypass: endothelial activation and inflammatory response. Eur J Cardiothorac Surg. 2010; 37:897-904

O'Neil MP, Fleming JC, Badhwar A, Guo LR. Pulsatile versus nonpulsatile flow during cardiopulmonary bypass: microcirculatory and systemic effects. Ann Thorac Surg. 2012; 94:2046-53

Panasenko OM. The mechanism of the hypochlorite-induced lipid peroxidation. Biofactors. 1997; 6:181-90

Panasenko OM, Evgina SA, Driomina ES, Sharov VS, Sergienko VI, Vladimirov YA. Hypochlorite induces lipid peroxidation in blood lipoproteins and phospholipid liposomes. Free Radic Biol Med. 1995; 19:133-40

Papp E, Rivera C, Kaila K, Freund TF. Relationship between neuronal vulnerability and potassium-chloride cotransporter 2 immunoreactivity in hippocampus following transient forebrain ischemia. Neuroscience. 2008; 154:677-89

Pfeiffer J, Nekroseformen und zirkulatorisch, hypoxisch und hypoglykämisch bedingte Gewebsschäden. In: Remmele W. Hrsg. Pathologie 4 Neuropathologie Sinnesorgane Muskulatur Angeborene Stoffwechselkrankheiten. Berling Heidelberg New York Tokyo: Springer; 1984.p. 45-69

Piccioni MA, Leirner AA, Auler Jo Jr. Comparison of pH-stat versus Alpha-stat during hypothermic cardiopulmonary bypass in the prevention and control of acidosis in cardiac surgery. Artif Organs. 2004; 28:347-52

Pirzadeh A, Schears G, Pastuszko P, Liu H, Kubin J, Reade E, Mendoza-Paredes A, Greeley W, Nadkarni V, Wilson DF, Pastuszko A. Effect of deep hypothermic circulatory arrest followed by low-flow

cardiopulmonary bypass on brain metabolism in newborn piglets: comparison of pH-stat and α-stat management. Pediatr Crit Care Med. 2011; 12:e79-86

Plane JM, Shen Y, Pleasure DE, Deng W. Prospects for minocycline neuroprotection. Arch Neurol. 2010; 67:1442-8

Plesnila N. Role of mitochondrial proteins for neuronal cell death after focal cerebral ischemia. Acta Neurochir Suppl. 2004; 89:15-9

Plesnila N, Zhu C, Culmsee C, Gröger M, Moskowitz MA, Blomgren K. Nuclear translocation of apoptosis-inducing factor after focal cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 2004; 24:458-66

Poliak SC, DiGiovanna JJ, Gross EG, Gantt G, Peck GL. Minocycline-associated tooth discoloration in young adults. JAMA. 1985; 254:2930-2

Poncelet AJ, van Steenberghe M, Moniotte S, Detaille T, Beauloye C, Bertrand L, Nassogne MC, Rubay JE. Cardiac and neurological assessment of normothermia/ warm blood cardioplegia vs hypothermia/ cold crystalloid cardioplegia in pediatric cardiac surgery: insight from a prospective randomized trial. Eur J Cardiothorac Surg. 2011; 40:1384-90

Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. Cell Death Differ. 1999; 6:99-104

Pouard P, Mauriat P, Ek F, Haydar A, Gioanni S, Laquay N, Vaccaroni L, Vouhé PR. Normothermic cardiopulmonary bypass and myocardial cardioplegic protection for neonatal arterial switch operation. Eur J Cardiothorac Surg. 2006; 30:695-9

Prasad A, Stone GW, Holmes DR, Gersh B. Reperfusion injury, microvascular dysfunction, and cardio-protection: the “dark side” of reperfusion. Circulation. 2009; 120:2105-12

Pretorius M, Scholl FG, McFarlane JA, Murphy LJ, Brown NJ. A pilot study indicating that bradykinin B2 receptor antagonism attenuates protamine-related hypotension after cardiopulmonary bypass. Clin Pharmacol Ther. 2005; 78:477-85

Qing M, Vazquez-Jimenez JF, Klosterhalfen B, Sigler M, Schuhmacher K, Duchateau J, Messmer BJ, von Bernuth G, Seghaye MC. Influence of temperature during cardiopulmonary bypass on leukocyte activation, cytokine balance, and post-operative organ damage. Shock. 2001; 15:372-7

Quarti A, Manfrini F, Oggianu A, D'Orfeo F, Genova S, Silvano R, Pozzi M. Non-invasive cerebral oximetry monitoring during cardiopulmonary bypass in congenital cardiac surgery: a starting point. Perfusion. 2011; 26:289-93

Rami A. Ischemic neuronal death in the rat hippocampus: the calpain-calpastatin-caspase hypothesis. Neurobiol Dis. 2003; 13: 75-88

Rider AR, Ressler NM, Karkhanis TR, Kunselman AR, Wang S, Undar A. The impact of pump settings on the quality of pulsatility. ASAIO J. 2009; 55:100-5

Rininger A, Wayland A, Prifti V, Halterman MW. Assessment of CA1 injury after global ischemia using supervised 2D analyses of nuclear pyknosis. J Neurosci Methods. 2012; 207:181-8

Ryu JK, Franciosi S, Sattayaprasert P, Kim SU, McLarnon JG. Minocycline inhibits neuronal death and glial activation induced by beta-amyloid peptide in rat hippocampus. Glia. 2004; 48:85-90

Sairanen T, Szepesi R, Karjalainen-Lindsberg ML, Saksi J, Paetau A, Lindsberg PJ.
Neuronal caspase-3 and PARP-1 correlate differentially with apoptosis and necrosis in ischemic human stroke. Acta Neuropathol. 2009; 118:541-52.

Salameh A, Einenkel A, Kühne L, Grassl M, von Salisch S, Kiefer P, Vollroth M, Dähnert I, Dhein S. Hippocampal Neuroprotection by Minocycline and Epigallo-Catechin-3-Gallate Against Cardiopulmonary Bypass-Associated Injury. Brain Pathol. 2015a. doi: 10.1111

Salameh A, Kühne L, Grassl M, Gerdom M, von Salisch S, Vollroth M, Bakthiary F, Mohr FW, Dähnert I; Dhein S. Protective effects of pulsatile flow during cardiopulmonary bypass. Ann Thorac Surg. 2015b; 99:192-9

Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011; 301:1723-41

Sananes R, Manlhiot C, Kelly E, Hornberger LK, Williams WG, MacGregor D, Bunic R, McCrindle BW. Neurodevelopmental outcomes after open-heart operations before 3 months of age. Ann Thorac Surg.. 2012; 93:1577-83

Schildknecht S, Pape R, Müller N, Robotta M, Marquardt A, Bürkle A, Drescher M, Leist M. Neuroprotection by minocycline caused by direct and specific scavenging of peroxynitrite. J Biol Chem. 2011; 286:4991-5002

Schmid C. Techniken der extrakorporalen Zirkulation. In: Feindt P, Harig F, Weyand M. Hrsg. Empfehlungen zum Einsatz und zur Verwendung der Herz-Lungen-Maschine. Darmstadt: Steinkopff-Verlag; 2006.p.309-315

Schmidt-Kastner R, Freund TF. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. Neuroscience. 1991; 40:599-636

Schuster HP, Müller-Werdan U. Abriß der Pathophysiologie als Grundlage der Therapie. In: Schuster HP, Werdan K Hrsg. Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen. 3. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer; 2000.p.27-72

Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. J Appl Physiol. 1985; 88:1474-80

Semenza GL. Surviving ischemia: adaptive responses mediated by hypoxia-inducible factor 1. J Clin Invest. 2000; 106:809-12

Sgouralis J, Evans RG, Gardiner BS, Smith JA, Fry BC, Layton AT. Renal hemodynamics, function, and oxygenation during cardiac surgery performed on cardiopulmonary bypass: a modeling study. Physiol Rep. 2015; 3.pii:e12260

Sharma R, Chondhary SK, Mohan MR, Padma MV, Jain S, Bhardwaj M, Bhan A, Kiran U, Saxena N, Venugopal P. Neurological Evaluation and intelligence testing in the child with operated congenital heart disease. Ann Thorac Surg. 2000; 70:575-81

Sheng T, Zhang X, Wang S, Zhang J, Lu W, Dai Y. Endothelin-1-induced mini-stroke in the dorsal hippocampus or lateral amygdala results in deficits in learning and memory. J Biomed Res. 2015; 29:362-9

Shephard RB, Simpson DC, Sharp JF. Energy equivalent pressure. Arch Surg. 1966; 93:730-740

Silveira M, Yoshida WB. Isquemia e reperfusao em músculo esquelético: mecanismo de lesao e perspectivas de tratamento. J Vasc Br. 2004; 3:367-78

Smith AC, Swindle MM. Preparation of swine for the laboratory. ILAR J. 2006; 47:358-63

Soares LC, Ribas D, Spring R, Silva JM, Miyague NI. Clinical profile of systemic inflammatory response after pediatric cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. Arg Bras Cardiol. 2010; 94:127-33

Solis RT, Kennedy PS, Beall AC Jr, Noon GP, DeBakey ME. Cardiopulmonary bypass. Microembolization and platelet aggregation. Circulation. 1975; 52:103-8

Song D, Xu J, Du T, Yan E, Hertz L, Walz W, Peng L. Inhibition of Brain Swelling after Ischemia-Reperfusion by ß-Adrenergic Antagonists: Correlation with Increased K+ and Decreased Ca2+ Concentrations in Extracellular Fluid. Biomed Res Int. 2014; 2014:873590

Sonntag J, Dähnert J, Stiller B, Hetzer R, Lange PE. Complement and contact activation during cardiovascular operations in infants. Ann Thorac Surg. 1998; 65:525-31

Stanika RI, Winters CA, Pivovarova NB, Andrews SB. Differential NMDA receptor-dependent calcium loading and mitochondrial dysfunction in CA1 vs. CA3 hippocampal neurons. Neurobiol Dis. 2010; 37:403-11

Stephan H, Manolescu J. Comparative investigations on hippocampus in insectivores and primates. Z Mikrosk Anat Forsch. 1980; 94:1025-50

Stephan H, Weyland A, Kazmaier S, Henze T, Menck S, Sonntag H. Acid-base management during hypothermic cardiopulmonary bypass does not affect cerebral metabolism but does affect blood flow and neurological outcome. Br J Anaesth. 1992; 69:51-7

Sternberger LA, Hardy PH Jr, Cuculis JJ, Meyer HG. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. J Histochem Cytochem. 1970; 18:315-33

Stirling DP, Koochesfahani KM, Steeves JD, Tetzlaff W. Minocycline as a neuroprotective agent. Neuroscientist. 2005; 11:308-22

Su XW, Guan Y, Barnes M, Clark JB, Myers JL, Undar A. Improved cerebral oxygen saturation and blood flow pulsatility with pulsatile perfusion during pediatric cardiopulmonary bypass. Pediatr Res. 2011; 70:181-5

Suleimann MS, Zacharowski K, Angelini GD. Inflammatory response and cardioprotection during open-heart surgery: the importance of anaesthetics. Br J Pharmacol. 2008; 153:21-33

Swindle MM, Makin A, Herron AJ, Clubb FJ Jr, Frazier KS. Swine as models in biomedical research and toxicology testing. Vet Pathol. 2012; 49:344-56

Takada SH, dos Santos Haemmerle CA, Motta-Teixeira LC, Machado-Nils AV, Lee VY, Takase LF, Cruz-Rizzolo RJ, Kihara AH, Xavier GF, Watanabe JS, Noqueira MJ. Neonatal anoxia in rats: hippocampal cellular and subcellular changes related to cell death and spatial memory. Neuroscience. 2015; 284:247-59

Tang M, Alexander H, Clark RS, Kochanek PM, Kagan VE, Bayir H. Minocycline reduces neuronal death and attenuates microglial response after pediatric asphyxia cardiac arrest. J Cereb Blood Flow Metab. 2010; 30:119-29

Tao R, Kim SH, Honbo N, Karliner JS, Alano CC. Minocycline protects cardiac myocytes against simulated ischemia-reperfusion injury by inhibiting poly(ADP-ribose)polymerase-1. J Cardiovasc Pharmacol. 2010; 56:659-68

Taylor KM, Bain WH, Russell M, Brannan JJ, Morton IJ. Peripheral vascular resistance and angiotensin II levels during pulsatile and no-pulsatile cardiopulmonary bypass. Thorax. 1979; 34:594-8

Taylor KM, Bain WH, Davidson KG, Turner MA. Comparative clinical study of pulsatile and non-pulsatile perfusion in 350 consecutive patients. Thorax. 1982; 37:324-30

Thal SE, Zhu Ch, Tahl SL, Blomgren K, Plesnila N. Role of apoptosis inducing factor (AIF) for hippocampal neuronal cell death following global cerebral ischemia in mice. Neuroscience Letters. 2011; 499:1-3

Tóth Z, Györimolnár I, Abrahám H, Hevesi A. Cannulation and cardiopulmonary bypass produce selective brain lesions in pigs. Asian Cardiovasc Thorac Ann. 2006; 14:273-8

Trepel M. Archikortex und limbisches System. In: Trepel M. Neuroanatomie Struktur und Funktion. 3.Aufl.München Jena: Urban&Fischer;2004.p.203-208

Tsai YW, Yang YR, Wang PS, Wang RY. Intermittent hypoxia after transient focal ischemia induces hippocampal neurogenesis and c-Fos expression and reverses spatial memory deficits in rats. PLoS One. 2011; 6:e24001

Tsuji M, Wilson MA, Lange MA, Johnston MV. Minocycline worsens hypoxic-ischemic brain injury in a neonatal mouse model. Exp Neurol. 2004; 189:58-65

Turer AT, Hill JA. Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy. Am J Cardiol. 2010; 106:360-8

Twal M, Kiefer P, Salameh A, Schnabel J, Ossmann S, von Salisch S, Krämer K, Sobiraj A, Kostelka M, Mohr FW, Dhein S. Renoprotective effects of epigallocatechingallate in a small piglet model of extracorporeal cirdulation. Pharmacol Res. 2013; 67: 68-78

Tzanova I, Kerz T. Anästhesie in der Neurochirurgie. In: Rossaint R, Werner Ch, Zwißler B. Hrsg. Die Anästhesiologie. 3. Aufl. Berlin Heidelberg New York: Springer; 2012.p.839-852

Undar A, Masai T, Yang SQ, Goddard-Finegold J, Frazier OH, Fraser CD Jr. Effects of perfusion mode on regional and global organ blood flow in a neonatal piglet model. Ann Thorac Surg. 1999; 68:1336-42

Undar A, Eichstaedt HC, Frazier OH, Fraser CD Jr. Monitoring regional cerebral oxygen saturation using near-infrared spectroscopy during pulsatile hypothermic cardiopulmonary bypass in a neonatal piglet model. ASAIO J. 2000a; 46:103-6

Undar A, Koenig KM, Frazier OH, Fraser CD Jr. Impact of membrane oxygenators on pulsatile versus nonpulsatile perfusion in a neonatal model. Perfusion. 2000b; 15:111-20

Undar A, Owens WR, McGarry MC, Surprise DL, Kilpack VD, Mueller MW, McKenzie ED, Fraser CD Jr. Comparison of hollow-fiber membrane oxygenators in terms of pressure drop of the membranes during normothermic and hypothermic cardiopulmonary bypass in neonates. Perfusion. 2005; 20:135-8

Undar A, Ji B, Lukic B, Zapanta CM, Kunselman AR, Reibson JD, Khalapyan T, Baer L, Weiss WJ, Rosenberg G, Myers JL. Comparison of hollow-fiber membrane oxygenators with different perfusion modes during normothermic and hypothermic CPB in a simulated neonatal model. Perfusion. 2006; 21:381-90

Undar A, Palanzo D, Qiu F, Alkan-Bozkaya T, Akcevin A, Talor J, Baer L, Woitas K, Wise R, McCoach R, Guan Y, Haines N, Wang S, Clark JB, Myers JL. Benefits of pulsatile flow in pediatric cardiopulmonary bypass procedures: from conception to conduction. Perfusion. 2011; 26:35-39

Ungerleider RM, Shen I, Yeh T, Schultz J, Butler R, Silberbach M, Giacomuzzi C, Heller E, Studenberg L, Mejak B, You J, Farrel D, McClure S, Austin EH. Routine mechanical ventricular assist following the Norwood procedure--improved neurologic outcome and excellent hospital survival. Ann Thorac Surg. 2004; 77:18-22

Van Emous JG, Schreur JH, Ruigrok TJ, Van Echteld CJ. Both Na+-K+ ATPase and Na+-H+exchanger are immediately active upon post-ischemic reperfusion in isolated rat hearts. J Mol Cell Cardiol. 1998; 30:337-48

Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Krysko DV, Festjens N, Vandenabeele P. Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. Curr Mol Med. 2008; 8:207-20

van Wijk SJL, Hagemann GJ. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 mediated caspase-independent cell death after ischemia/reperfusion. Free Radical Biology & Medicine. 2005; 39:81-90

Venn GE, Patel RL, Chambers DJ. Cardiopulmonary bypass: perioperative cerebral blood flow and postoperative cognitive deficit. Ann Thorac Surg. 1995; 59:1331-5

Virág L. Struture and function of poly(ADP-ribose)polymerase-1: role in oxidative stress-related pathologies. Curr Vasc Pharmacol. 2005; 3:209-14

Vogt S, Troitzsch D, Kasseckert S, Moosdorf R, Weitkemper HH. Interaktionen des Blutes mit den künstlichen Oberflächen im extrakorporalen Kreislauf. In: Tschaut RJ. Hrsg. Extrakorporale Zirkulation in Theorie und Praxis. 2. Aufl. Lengerich: Pabst Science Publishers; 2005.p.523-529

Volonté MG, Yuln G, Quiroga P, Consolini AE. Development of an HPLC method for determination of metabolic compounds in myocardial tissue. J Pharm Biomed Anal. **2004**; 35:647-53

Voss B, Krane M, Jung C, Brockmann G, Braun S, Günther T, Lange R, Bauernschmitt R. cardiopulmonary bypass with physiological flow and pressure curves: pulse is unnecessary! Eur J Cardiothorac Surg. 2010; 37:223-32.

Walther T, Dhein S, Ullmann C, Schneider K, Bilz T, Rastan A, Garbade J, Falk V, Emrich FC, Muth P, Mohr FW, Kostelka M. Cerebral protection during controlled hypoperfusion in a piglet model: comparison of moderate (25°C) versus deep (18°C) hypothermia at various flow rates using intraoperative measurements and ex vivo investigation. Thorac Cardiovasc Surg. 2013; 61:546-52

Wang S, Kunselman AR, Myers JL, Undar A. Comparison of two different blood pumps on delivery of gaseous microemboli during pulsatile and nonpulsatile perfusion in a simulated infant CPB model. ASAIO J. 2008; 54:538-41

Wang W, Bai SY, Zhang HB, Bai J, Zhang SJ, Zhu DM. Pulsatile flow improves cerebral blood flow in pediatric cardiopulmonary bypass. Artif Organs. 2010; 34:874-8

Wang Y, Kim NS, Haince JF, Kang HC, David KK, Andrabi SA, Poirier GG, Dawson VL, Dawson TM. Poly(ADP-ribose) (PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos). Sci Signal. 2011; 4:ra20

Wang X, Xue Q, Yan F, Li L, Liu J, Li S, Hu S. Ulinastatin as a neuroprotective and anti-inflammatory agent in infant piglets model undergoing surgery on hypothermic low-flow cardiopulmonary bypass. Paediatr Anaesth. 2013; 23:209-16

Weitkemper HH, Troitzsch D, Böttcher W, Körter R. Elemente und Funktionsprinzip einer Herz-Lungen-Maschine (HLM). In: Tschaut RJ. Hrsg. Extrakorporale Zirkulation in Theorie und Praxis. 2. Aufl. Lengerich: Pabst Science Publishers; 2005.p.257-267

Wilcox ME, Charbonney E, d'Empaire PP, Duggal A, Pinto R, Javid A, Dos Santos C, Rubenfeld GD, Sutherland S, Liles WC, Glogauer M. Oral neutrophils are an independent marker of the systemic inflammatory response after cardiac bypass. J Inflamm. 2014; 11:32

Williams GD, Ramamoorthy C. Brain monitoring and protection during pediatric cardiac surgery. Semin Cardiothorac Vasc Anesth. 2007; 11:23-33

Wright M, Nolan T. Impact of cyanotic heart disease on school performance. Arch Dis Child. 1994; 71:64-70

Yamaguchi M, Okamoto K, Kusano T, Matsuda Y, Suzuki G, Fuse A, Yokota H. The Effects of Xanthine Oxidoreductase Inhibitors on Oxidative Stress Markers following Global Brain Ischemia Reperfusion Injury in C57BL/6 Mice. PLoS One. 2015; 10:e0133980

Yee S, Qin F, Su X, Rider A, Kunselman AR, Guan Y, Ündar A. Evaluation of HL-20 roller pump and Rotaflow centrifugal pump on perfusion quality and gaseous microemboli delivery. Artif Organs. 2010; 34:937-43

Yrjänheikki J, Keinänen R, Pellikka M, Hökfelt T, Koistinaho J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95:15769-15774

Yrjänheikki J, Tikka T, Keinänen R, Goldsteins G, Chan PH, Koistinaho J. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96:13496-500

Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. Science. 2002; 297:259-63.

Yu SW, Andrabi SA, Wang H, Kim NS, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL. Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103:18314-9

Yu CH, Moon CT, Sur JH, Chun YI, Choi WH, Yhee JY. Serial expression of hypoxia inducible factor-1α and neuronal apoptosis in hippocampus of rats with chronic ischemic brain. J Korean Neurosurg Soc. 2011; 50:481-5

Yu DK, Yoo KY, Shin BN, Kim IH, Park JH, Lee CH, Choi JH, Cho YJ, Kang IJ, Kim YM, Won MH. Neuronal damage in hippocampal subregions induced by various durations of transient cerebral ischemia in gerbils using Fluoro-Jade B histofluorescence. Brain Res. 2012; 1437:50-7

Yu Y, Gao M, Li H, Zhang F, Gu C. Pulmonary artery perfusion with anti-tumor necrosis factor alpha antibody reduces cardiopulmonary bypass-induced inflammatory lung injury in a rabbit model. PLoS One. 2013; 8:e83236

Yuan SM. Postperfusion lung syndrome: physiopathology and therapeutic options. Rev Bras Cir Cardiovasc. 2014; 29:414-25

Yuan J, Murrell GA, Trickett A, Wang MX. Involvement of cytochrome c release and caspase-3 activation in the oxidative stress-induced apoptosis in human tendon fibroblasts. Biochim Biophys Acta. 2003; 1641:35-41

Zakkar M, Guida G, Suleiman MS, Angelini GD. Cardiopulmonary bypass and oxidative stress. Oxid Med Cell Longev. 2015; 2015:189863

Zeidman P, Lutti A, Maguire EA. Investigating the functions of subregions within anterior hippocampus. Cortex. 2015; 73:240-256

Zhang TJ, Hang J, Wen DX Hang YN, Sieber FE. Hippocampus bcl-2 and bax expression and neuronal apoptosis after moderate hypothermic cardiopulmonary bypass in rats. Anesth Analg. 2006; 102:1018-25

Zhang M, Li WB, Liu YX, Liang CJ, Liu LZ, Cui X, Gong JX, Gong SJ, Hu YY, Xian XH. High expression of GLT-1 in hippocampal CA3 and dentate gyrus subfields contributes to their inherent resistance to ischemia in rats. Neurochem Int. 2011; 59:1019-28

Zhao J, Yang J, Liu J, Li S, Yan J, Meng Y, Wang X, Long C. Effects of pulsatile and nonpulsatile perfusion on cerebral regional oxygen saturation and endothelin-1 in tetralogy of fallot infants. Artif Organs. 2011; 35:E54-8

Zhu C, Wang X, Huang Z, Qiu L, Xu F, Vahsen N, Nilsson M, Eriksson PS, Hagberg H, Culmsee C, Plesnila N, Kroemer G, Blomgren K. Apoptosis-inducing factor is a major contributor to neuronal loss induced by neonatal cerebral hypoxia-ischemia. Cell Death Differ. 2007; 14:775-84.

8 Anhang

8.1 Einführung

8.1.1 Kinderherzchirurgie

Tabelle 1 Prävalenz angeborener Herzfehler

angeborener Herzfehler	prozentualer Anteil an der Gesamtprävalenz kongenitaler Vitien in Deutschland
Ventrikelseptumdefekt	48,3 %
Vorhofseptumdefekt	15,6 %
valvuläre Pulmonalstenose	6,2 %
Aortenisthmusstenose	3,6 %
univentrikuläres Herz	2,8 %
Fallot'sche Tetralogie	2,5 %
atrioventrikulärer Septumdefekt	2,7 %
komplette Transposition der großen Arterien	2,2 %
valvuläre Aortenstenose	2,2 %
double outlet right ventricle	1,3 %
verschiedene	12,6 %

8.1.2 Pathophysiologie der HLM

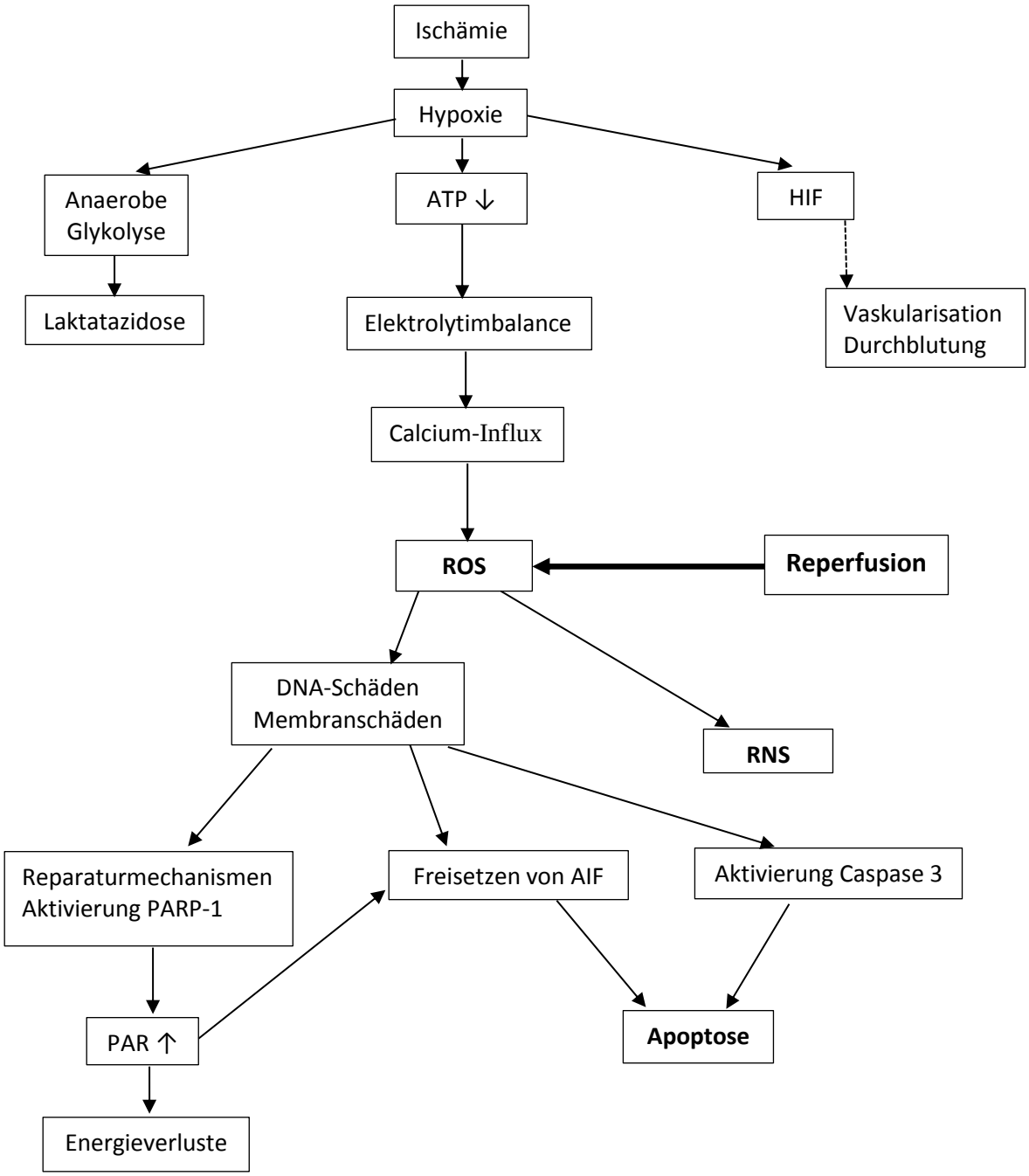

Abbildung 2: schematische Darstellung: Folgen einer Ischämie und Reperfusion auf zellulärer Ebene

8.2 Tiere, Material und Methoden

8.2.1 Operation

Tabelle 3 Zubehör für die Operation

Anästhesie, Monitoring und chirurgische Intervention:			
Gerät/ Zubehör	Bezeichnung	Firma	Größe
PiCCO-Gerät (*Pulse Contour Cardiac Output*)	„PiCCO“	Pulsion Medical Systems AG; München, D	
3-lumiger zentralvenöser Katheter	„viellumiger Polyurethan-Verweilkatheter“	Arrow; Reading, PA, USA	7 Fr*20 cm mit Blue Flex Tip
Arterieller Katheter/ “PiCCO”	Pulsiocath 5 F Thermodilution Catheter 20cm”	Pulsion Medical Systems AG; München, D	5 Fr*20 cm
Beatmungsgerät	„Cato“	Dräger; Lübeck, D	
Blutgasanalysegerät	„ABL 725”	Radiometer Medical ApS; Bronshoj, DK	
Blut-Transfusionssystem	„CPDA-1 Single Blood Bag 450 ml” 100 ml enthalten: Acidum citricum (monohydrate) 0,327 g, Natrii citras (dihydrate) 2,63 g, Mononatrii phosphas (dihydrate) 0,251 g, Dextrosum (anhydrate) 2,90 g, Adenine 0,0275 g, Aq. ad iniectabilia q.s. 100 ml)	Terumo Europe N.V., Leuven, B	
Filter	„DAR“	Covidien; Mansfield, MA, USA	Elektrostatischer Filter, klein
elektrisch-chirurgische Säge	Gipssäge Oscillo III	Tekno- Medical Optik-Chirurgie GmbH; Tuttlingen, D	
Monitoring Device	„Infinity delta”	Dräger; Lübeck, D	

Venenverweilkatheter	„VasofixSafety“	B.Braun; Melsungen, D	22G, 0,9*25 mm
Venöse Schleuse	„Hemostasis Introducer”	St. Jude Medical; Minnetonka, MN, USA	4 Fr
Verdampfer für Isofloran	„Vapor 19.3“	Dräger; Lübbeck, D	

Zubehör für die HLM:		
Gerät/ Zubehör	Bezeichnung	Firma
ACT- Gerät	„Automated CoagulationTimer“	Medtronic HemoTec Englewood; CO, USA
Arterielle Kanüle	„Arterielle Kanüle 10 F”	Polystan A/S; Värlöse, DK
Filter	„40 Micro Lilliput Concept D 736”	Dideco; Mirandola, I
HLM- Gerät/ Rollerpumpe	„SIII”	Dideco; Mirandola, I
Kardioplegiekanüle	„Kardioplegiekanüle 4 Fr 18 G”	Medtronic GmbH Deutschland; Meerbusch, D
Membranoxygenator + Hartplastik-Reservoir	„D901 Lilliput”	Dideco; Mirandola, I
Normohypothermiegerät	„Normohypothermiegerät”	Stöckert Instrumente GmbH; München, D
Schläuche	„Kinder Kompl. Set“	Sourin Group Deutschland GmbH; München, D
Venöse Kanüle	„Venous Catheter Dia 6/8 mm 24F Soft Tip”	Polystan A/S; Värlöse, DK

Tabelle 4 Medikamente während der Operation

Wirkstoff	Präparatname	Firma	Dosierung
Atropinsulfat	„Atropinsulfat 0,5 mg/ml“	B. Braun; Melsungen, D	0,02 mg/kg KM i.m
Calciumgluconat	„Calciumglukonat 10 %“	B. Braun; Melsungen, D	23 mmol/Tier nach Bedarf

Epinephrin	„Suprarenin“ 1 mg/ml	Sanofi- Aventis Deutschland GmbH; Frankfurt a.M, D	0,001 mg-0,02 mg/kg KM/h
Glucose-Monohydrat	„Glukosteril 5 % 500 ml“	Fresenius Kabi Deutschland GmbH; Bad Homburg, D	nach Bedarf
Heparin-Natrium	„Heparin- Natrium-25.000-ratiopharm“	Ratiopharm GmbH; Ulm, D	300 I.E./kg KM
Hydroxyethylstärke	„HES 6 130/0,42 in Ringer Acetat 500 ml Vitafusal 6 %“	Serumwerk Bernburg AG; Bernsburg, D	nach Bedarf
Isofluran	„Isoba“	Intervet; Unterschleißheim, D	2,5-4 Vol-% zur Anflutung 1,5 Vol-% als Erhaltung
Kardioplegielösung nach Bretschneider	„Custodiol“ 1000 ml enthalten: Natriumchlorid 0,8766 g, Kaliumchlorid 0,671 g, Magnesiumchlorid x 6 H_2O 0,8132 g, Histidinhydrochlorid x H_2O 3,7733 g, L-Histidin 27,9289 g, Tryptophan 0,4085 g, Mannitol 5,4651 g, 2-Oxoglutarsäure 0,146 g und Calciumchlorid x 2 H_2O 0,0022 g	Dr. Franz Köhler Chemie GmbH; Bensheim, D	Initial 350 ml, danach nach Bedarf bis Herzstillstand
Ketaminhydro-chlorid	„Ursotamin“ 100 mg/ml	Serumwerk Bernburg AG; Bernburg, D	25 mg/kg KM i.m. Nachdosierung: 10 mg/kg KM i.v.
Magnesiumsulfat-heptahydrat	„Mg 10 % Inresa“	Inresa Arzneimittel GmbH; Freiburg, D	1 g/Tier i.v.
Metamizol	„Vetalgin“ 500 mg/ml	Intervet Deutschland GmbH; Unterschleißheim, D	50 mg/kg KM
Midazolam	„Midazolam-ratiopharm“ 15 mg/3 ml	Ratiopharm GmbH Ulm, D	0,5 mg/kg KM i.m.

Minozyklin	„Minocyclinehydrochlorid“	Sigma- Aldrich; München, D	4 mg /2 mg aufgelöst in 10 ml 0,9 % Natriumchlorid
Natriumchlorid	„Isotonische Kochsalz-lösung 0,9% 500 ml“	Serumwerk Bernburg AG; Bernsburg, D	Nach Bedarf
Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Calciumchloriddihydrat, Magnesiumchlorid-hexahydrat, Natriumacetathydrat	„E 153 Elektrolyt Infusionslösung 500 ml“	Serumwerk Bernburg AG; Bernsburg, D	Nach Bedarf
Natriumhydrogencarbonat	„Natriumhydrogencarbo-nat 1molar 8,4 %“	SeragWiessner KG; Naila, D	(-BE)*0,3*kg KM= mmol Natrium-hydrogen-carbonat i.v.
Norepinephrin	„Arterenol“	Sanofi- Aventis Deutschland GmbH; Frankfurt a.M, D.	0,005 mg-0,02 mg/kg KM/ h
Pancuroniumbromid	„Pancuroniumratiopharm“	Ratiopharm GmbH Ulm, D	0,2 mg/kg KM i.v.
Propofol	„Propofol 2 %“ 20 mg/ml	MCT Fresenius Kabi; Bad Homburg, D	13-17 mg/kg/ml/h i.v.
Protaminhydrochlorid	„Protamin ME 5.000 I.E./ml	MEDA PharmaGmbH&Co. KG; Bad Homburg, D	300 I.E./kg KM
Sufentanildihydrogencitrat	„Sufenta“ 50 µg/ml Injektionslösung	Janssen- Cilag; Neuss,D	0,5-2 µg/kg KM, Nachdosierung: 0,15-0,7 µg/kg KM
Trometamol	„3M-Trometamol-Lösung Baxter“	Baxter Deutschland GmbH; Unterschleißheim, D	(-BE)*0,3*kg KM = mmol Trometamol

8.2.2 intraoperatives Monitoring

Tabelle 6 Blutgase: Normwerte für Ferkel

	Arterielles Blut	Venöses Blut
pH-Wert	7,35-7,45	7,19-7,29
pCO_2	35-45 mmHg	52-70 mmHg
pO_2	>90 mmHg	20-27 mmHg
BE	0-7,0 mmol/l	-8,0-+1,0 mmol/l

Tabelle 7 Elektrolyte: Normwerte für das Schwein

	mmol/l
Natrium	135-143
Kalium	4,5-6,5
Calcium	1,9-2,9
Chlorid	100-110

8.2.3 Labor-Untersuchungen

Tabelle 8 Geräte für Histologie

Gerätename	Firma
Dampfgarer	Braun; Kronberg, D
Einbettautomat „Tissue Tek Vip“	Sakura Fineta Germany GmbH; Staufen, D
Kühlplatte COP 30	MEDITE GmbH; Burgdorf, D
pH- Messgerät inoLab	WTW GmbH; Weilheim, D
Schlittenmikrotom „HM 400“	Microm MikromarketingSysteme Consult GmbH ; Neuss, D
Trocken-/Wärmeschrank	Memmert GmbH & Co. KG; Schwabach, D
Vortex-Genie 2 TM	Scientific Industries GmbH; New York, USA
Waage	Faust Laborbedarf AG; Schaffhausen, D

Wasserdestillierer „Milli-Q- Academic“	Millipore; Schwalbach, D
Wasserbad Medax	Nagel GmbH; Kiel, D
Zentrifuge	Biozym Scientific GmbH; Oldendorf; D

Tabelle 9 Zubehör und Materialien für die Histologie

Bezeichnung	Firma
Ausgießformen	Dr. I. Schubert Laborfachhandel; Leipzig, D
Deckgläser 24 x 32 mm/ 24 x 24 mm/ 24 x 40 mm	Carl Roth GmbH&Co. KG.; Karlsruhe, D
Rotilabo-Einbettkassetten	Carl Roth GmbH&Co. KG.; Karlsruhe, D
Färbeküvetten	Dr. I. Schubert Laborfachhandel; Leipzig, D
Fettstift	DAKO Denmark AIS; Glostrup, DK
Glasplatten	Klaus Hofmann GmbH; Staudt, D
Indikator-Teststreifen PEHANON	Nagel GmbH; Kiel, D
Microtomie Blades S22 Type Soblades	Sakura Finetek Germany GmbH; Staufen, D
Objektträger	Gerhard Menzel GmbH; Braunschweig, D
Eppendorf research Pipette 0,5-10 µl/ 10-100 µl/ 100-1000 µl	Dr. I. Schubert Laborfachhandel; Leipzig, D
Pipettenspitzen „pipette Eppendorf-Gilson-Brand-Socorex type blue/ yellow/ white“	Dr. I. Schubert Laborfachhandel; Leipzig, D
Reaktionsgefäße Eppendorf 2,0ml	Dr. I. Schubert Laborfachhandel; Leipzig, D
Reaktionsgefäße Microtubes 0,5ml/ 1,5ml	Trefflab; Degersheim, CH
Roti-Plast-Paraffin-Pastillen	Carl Roth GmbH&Co. KG.; Karlsruhe, D

Tabelle 10 Chemikalien für die Histologie

Name	Firma
Albumin Fraktion V Protease-frei > 98%	Carl Roth GmbH&Co. KG.; Karlsruhe, D
DAKO AEC+ High Sensitivity Substrate chromogen	Dako North America; Carpinteria; USA

DAKO Antibody Diluent	Dako North America; Carpinteria; USA
Entellan	Merck; Darmstadt, D
Eosin G	Merck; Darmstadt, D
Ethanol vergällt > 99,8 % mit ca. 1 % MEK	Carl Roth GmbH&Co. KG.; Karlsruhe, D
Ethylenediamine-Tetraacetic-Acid (EDTA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, D
Microscopy Kaisers Glyceringelatine	Merck; Darmstadt, D
Hämalaun sauer nach Meyer	Dr. K. Hollborn & Söhne; Leipzig, D
Magnesiumsulfat	Merck; Darmstadt, D
Methanol >99 %	Carl Roth GmbH&Co. KG.; Karlsruhe, D
Microscopy Kaisers Glyceringelatine	Merck; Darmstadt, D
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH&Co. KG.; Karlsruhe, D
Natriumhydrogencarbonat	Merck; Darmstadt, D
Salzsäure rauchend 37 %, p.a., ACS, ISO	Carl Roth GmbH&Co. KG.; Karlsruhe, D
TRIS >99,9 %	Carl Roth GmbH&Co. KG.; Karlsruhe, D
Tris-hydrochlorid	Carl Roth GmbH&Co. KG.; Karlsruhe, D
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth GmbH&Co. KG.; Karlsruhe, D
Tween 20	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, D
Wasserstoffperoxid 30 %, Ph.Eur., stabilisiert	Carl Roth GmbH&Co. KG.; Karlsruhe, D
Xylol (Isomere) > 99 %, p.a., ACS, ISO	Carl Roth GmbH&Co. KG.; Karlsruhe, D

Tabelle 11 Lösungen für die Histologie

Lösung	Zusammensetzung	pH-Wert
Eosin G 0,25 %	0,15 g Eosin G 500 ml dest. Wasser	
Na-Citrat-Lösung	0,01 M Tri- Natriumcirat- Dihydrat 1 l dest. Wasser	6,0
TBS-Lösung	0,05 M Tris- hydrochlorid 0,15 M NaCl	7,6

	1 l dest. Wasser	
Tris-EDTA-Lösung	10 mM Tris Base 1 mM EDTA 1 l dest. Wasser 0,05 % Tween 20	9,0
Scottpuffer-Lösung	0,2 % (w/v) Natriumhydrogencarbonat 2 % (w/v) Magnesiumsulfat dest. Wasser	
methanolische Wasserstoffperoxid-Lösung	36 ml Methanol 24 ml TBS 180 µl Wasserstoffperoxid	

Tabelle 13 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Lösung	Zeit	Vorgang
1. Xylol	10 Minuten	Entparaffinisieren
2. Xylol	3 Minuten	Entparaffinisieren
3. 100 % Ethanol	3 Minuten	Rehydrieren
4. 95 % Ethanol	3 Minuten	Rehydrieren
5. 70 % Ethanol	3 Minuten	Rehydrieren
6. 50 % Ethanol	3 Minuten	Rehydrieren
7. dest. Wasser	2 Minuten	Waschen
8. Hämalaun	10 Minuten	Kernfärbung
9. Scottpuffer	15 Minuten	Bläuen der Präparate
10. 0,1 % Salzsäure	ca. 10 Sekunden	Spülen der Präparate
11. 0,25 % Eosin G, wässrig	5 Minuten	Färbung Zytoplasma
12. dest. Wasser	1 Minute	Waschen
13. 70 % Ethanol	3 Minuten	Dehydrieren
14. 95 % Ethanol	3 Minuten	Dehydrieren
15. 100 % Ethanol	3 Minuten	Dehydrieren
16. Xylol	3 Minuten	Reinigen
17. Xylol	3 Minuten	Reinigen
18. Entellan		Eindeckeln
19. Xylol		Entfernen der Überschüsse von Entellan

Tabelle 14 Antikörper für Immunhistochemie

Primär-Antikörper:	
Name	Firma
AIF rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology; California, USA
cleaved caspase 3 host rabbit	Cell Signaling Technology; Boston, USA
HIF-1 α rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology; California, USA
Anti-Nitrotyrosin host rabbit (IgG)	Millipore; Schwalbach, D
Poly-ADP-Ribose (PAR) host rabbit	BD Bioscience; California, USA
Sekundär-Antikörper:	
Goat antirabbit HRP	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
DAKO REAL TM Envision TM Detection System HRP Rabbit/Mouse	DAKO Denmark AIS; Glostrup, DK
DAKO Envision TM+ DualLink System-HRP	Dako North America; Carpinteria; USA

Tabelle 15 Färbeprotokoll AIF

1. Tag

Lösung	Zeit	Vorgang
1. Xylol	10 Minuten	Entparaffinisieren
2. Xylol	10 Minuten	Entparaffinisieren
3. Xylol	10 Minuten	Entparaffinisieren
4. 100 % Ethanol	5 Minuten	Rehydrieren
5. 95 % Ethanol	5 Minuten	Rehydrieren
6. 70 % Ethanol	5 Minuten	Rehydrieren
7. dest. Wasser	5 Minuten	Waschen
8. TBS 1x	10 Minuten	Puffern und Waschen
9. 0,01 M Na-Citrat	30 Minuten	im Dampfgarer permeabilisieren (92-98 °C)
10. 0,01 M Na-Citrat	30 Minuten	bei Raumtemperatur abkühlen lassen
11. TBS 1x	15 Minuten	Puffern und Waschen

12. methanolische Wasserstoffperoxidlösung	20 Minuten	Blocken der endogenen Peroxidase
13. TBS 1x	15 Minuten	Puffern und Waschen, danach mit Fettstift Präparate umranden
14. in feuchter Kammer: 2 % BSA in TBS 1x	60 Minuten	Blocken unspezifischer Bindungsstellen
15. in feuchter Kammer bei 4 °C: auftragen primärer Antikörper, gelöst in Antibody -Diluent DAKO 1:100	über Nacht	Bildung Antigen-Antikörper-Komplexe

2. Tag

Lösung	Zeit	Vorgang
	30 Minuten	Wärmen bei Raumtemperatur
1. TBS 1x	15 Minuten	Waschen
2. DAKO REAL TM Envision TM Detection System HRP Rabbit/Mouse	30 Minuten	Sekundärer Antikörper
3. TBS 1x	15 Minuten	Waschen
4. AEC Substrat chromogen	3 - 10 Minuten	Farbreaktion
5. TBS 1x	5 Minuten	Waschen
6. Hämalaun	5 Minuten	Kernfärbung
7. Scottpuffer	15 Minuten	Bläuen
8. dest. Wasser	5 Minuten	Waschen
9. dest. Wasser	5 Minuten	Waschen
10. Glyceringelatine		Entfernen der Fettstiftumrandungen, Eindeckeln
11. Nagellack		Versiegeln und Abdichten
12. lauwarmes Leitungswasser		Reinigen der Objektträger

Tabelle 16 Färbeprotokoll HIF 1-alpha

1. Tag

Lösung	Zeit	Vorgang
1. Xylol	10 Minuten	Entparaffinisieren
2. Xylol	10 Minuten	Entparaffinisieren
3. Xylol	10 Minuten	Entparaffinisieren
4. 100 % Ethanol	5 Minuten	Rehydrieren
5. 95 % Ethanol	5 Minuten	Rehydrieren

6. 70 % Ethanol	5 Minuten	Rehydrieren
7. dest. Wasser	5 Minuten	Waschen
8. TBS 1x	10 Minuten	Puffern und Waschen
9. 0,01 M Na-Citrat	30 Minuten	im Dampfgarer permeabilisieren (92-98 °C)
10. 0,01 M Na-Citrat	30 Minuten	bei Raumtemperatur abkühlen lassen
11. TBS 1x	15 Minuten	Puffern und Waschen
12. methanolische Wasserstoffperoxidlösung	20 Minuten	Blocken der endogenen Peroxidase
13. TBS 1x	15 Minuten	Puffern und Waschen, danach mit Fettstift Präparate umranden
14. in feuchter Kammer: 2 % BSA in TBS 1x	60 Minuten	Blocken unspezifischer Bindungsstellen
15. in feuchter Kammer bei 4 °C: auftragen primärer Antikörper, gelöst in Antibody -Diluent DAKO 1:100	über Nacht	Bildung Antigen-Antikörper-Komplexe

2. Tag

Lösung	Zeit	Vorgang
	30 Minuten	Wärmen bei Raumtemperatur
1. TBS 1x	15 Minuten	Waschen
2. DAKO REAL TM Envision TM Detection System HRP Rabbit/Mouse	30 Minuten	Sekundärer Antikörper
3. TBS 1x	15 Minuten	Waschen
4. AEC Substrat chromogen	3 - 10 Minuten	Farbreaktion
5. TBS 1x	5 Minuten	Waschen
6. Hämalaun	5 Minuten	Kernfärbung
7. Scottpuffer	15 Minuten	Bläuen
8. dest. Wasser	5 Minuten	Waschen
9. dest. Wasser	5 Minuten	Waschen
10. Glyceringelatine		Entfernen der Fettstiftumrandungen, Eindeckeln
11. Nagellack		Versiegeln und Abdichten
12. lauwarmes Leitungswasser		Reinigen der Objektträger

Tabelle 17 Färbeprotokoll cleaved Caspase 3

1. Tag

Lösung	Zeit	Vorgang
1. Xylol	10 Minuten	Entparaffinisieren
2. Xylol	10 Minuten	Entparaffinisieren
3. Xylol	10 Minuten	Entparaffinisieren
4. 100 % Ethanol	5 Minuten	Rehydrieren
5. 95 % Ethanol	5 Minuten	Rehydrieren
6. 70 % Ethanol	5 Minuten	Rehydrieren
7. dest. Wasser	5 Minuten	Waschen
8. TBS 1x	10 Minuten	Puffern und Waschen
9. Tris-EDTA	20 Minuten	im Dampfgarer permeabilisieren (92-98 °C)
10. Tris-EDTA	20 Minuten	bei Raumtemperatur abkühlen lassen
11. TBS 1x	15 Minuten	Puffern und Waschen
12. methanolische Wasserstoffperoxid-lösung	10 Minuten	Blocken der endogenen Peroxidase
13. TBS 1x	15 Minuten	Puffern und Waschen, danach mit Fettstift Präparate umranden
14. in feuchter Kammer: 2 % BSA in TBS 1x	60 Minuten	Blocken unspezifischer Bindungsstellen
15. in feuchter Kammer bei 4 °C: auftragen primärer Antikörper, gelöst in 2 % BSA in TBS 1x 1:50	über Nacht	Bildung Antigen-Antikörper-Komplexe

2. Tag

Lösung	Zeit	Vorgang
	30 Minuten	Wärmen bei Raumtemperatur
1. TBS 1x	15 Minuten	Waschen
2. Goat antirabbit HRP gelöst in 2 % BSA in TBS 1x 1:100	60 Minuten	Sekundärer Antikörper
3. TBS 1x	15 Minuten	Waschen
4. AEC Substrat chromogen	15 Minuten	Farbreaktion
5. TBS 1x	5 Minuten	Waschen
6. Hämalaun	5 Minuten	Kernfärbung
7. Scottpuffer	15 Minuten	Bläuen
8. dest. Wasser	5 Minuten	Waschen

9. dest. Wasser	5 Minuten	Waschen
10. Glyceringelatine		Entfernen der Fettstiftumrandungen, Eindeckeln
11. Nagellack		Versiegeln und Abdichten
12. lauwarmes Leitungswasser		Reinigen der Objektträger

Tabelle 18 Färbeprotokoll 3-Nitrotyrosin

1. Tag

Lösung	Zeit	Vorgang
1. Xylol	10 Minuten	Entparaffinisieren
2. Xylol	10 Minuten	Entparaffinisieren
3. Xylol	10 Minuten	Entparaffinisieren
4. 100 % Ethanol	5 Minuten	Rehydrieren
5. 95 % Ethanol	5 Minuten	Rehydrieren
6. 70 % Ethanol	5 Minuten	Rehydrieren
7. dest. Wasser	5 Minuten	Waschen
8. TBS 1x	10 Minuten	Puffern und Waschen
9. 0,01 M Na-Citrat	30 Minuten	im Dampfgarer permeabilisieren (92-98 °C)
10. 0,01 M Na-Citrat	30 Minuten	bei Raumtemperatur abkühlen lassen
11. TBS 1x	15 Minuten	Puffern und Waschen
12. methanolische Wasserstoffperoxidlösung	20 Minuten	Blocken der endogenen Peroxidase
13. TBS 1x	15 Minuten	Puffern und Waschen, danach mit Fettstift Präparate umranden
14. in feuchter Kammer: 2 % BSA in TBS 1x	60 Minuten	Blocken unspezifischer Bindungsstellen
15. in feuchter Kammer bei 4 °C: auftragen primärer Antikörper, gelöst in Antibody -Diluent DAKO 1:200	über Nacht	Bildung Antigen-Antikörper-Komplexe

2. Tag

Lösung	Zeit	Vorgang
	30 Minuten	Wärmen bei Raumtemperatur
1. TBS 1x	15 Minuten	Waschen
2. DAKO Envision TM+ DualLink System-HRP	30 Minuten	Sekundärer Antikörper

3. TBS 1x	15 Minuten	Waschen
4. AEC Substrat chromogen	10-15 Minuten	Farbreaktion
5. TBS 1x	5 Minuten	Waschen
6. Hämalaun	5 Minuten	Kernfärbung
7. Scottpuffer	15 Minuten	Bläuen
8. dest. Wasser	5 Minuten	Waschen
9. dest. Wasser	5 Minuten	Waschen
10. Glyceringelatine		Entfernen der Fettstift-Umrandungen, Eindeckeln
11. Nagellack		Versiegeln und Abdichten
12. lauwarmes Leitungswasser		Reinigen der Objektträger

Tabelle 19 Färbeprotokoll Poly-(ADP)-Ribose (PAR)

1. Tag

Lösung	Zeit	Vorgang
1. Xylol	10 Minuten	Entparaffinisieren
2. Xylol	10 Minuten	Entparaffinisieren
3. Xylol	10 Minuten	Entparaffinisieren
4. 100 % Ethanol	5 Minuten	Rehydrieren
5. 95 % Ethanol	5 Minuten	Rehydrieren
6. 70 % Ethanol	5 Minuten	Rehydrieren
7. dest. Wasser	5 Minuten	Waschen
8. TBS 1x	10 Minuten	Puffern und Waschen
9. 0,01 M Na-Citrat	30 Minuten	im Dampfgarer permeabilisieren (92-98 °C)
10. 0,01 M Na-Citrat	30 Minuten	bei Raumtemperatur abkühlen lassen
11. TBS 1x	15 Minuten	Puffern und Waschen
12. methanolische Wasserstoffperoxid-lösung	20 Minuten	Blocken der endogenen Peroxidase
13. TBS 1x	15 Minuten	Puffern und Waschen, danach mit Fettstift Präparate umranden
14. in feuchter Kammer: 2 % BSA in TBS 1x	60 Minuten	Blocken unspezifischer Bindungsstellen
15. in feuchter Kammer bei 4 °C: auftragen primärer Antikörper, gelöst in 2 % BSA in TBS 1x 1:100	über Nacht	Bildung Antigen-Antikörper-Komplexe

2. Tag

Lösung	Zeit	Vorgang
	30 Minuten	Wärmen bei Raumtemperatur
1. TBS 1x	15 Minuten	Waschen
2. Goat antirabbit HRP gelöst in 2 % BSA in TBS 1x 1:200	60 Minuten	Sekundärer Antikörper
3. TBS 1x	15 Minuten	Waschen
4. AEC Substrat chromogen	15 Minuten	Farbreaktion
5. TBS 1x	5 Minuten	Waschen
6. Hämalaun	5 Minuten	Kernfärbung
7. Scottpuffer	15 Minuten	Bläuen
8. dest. Wasser	5 Minuten	Waschen
9. dest. Wasser	5 Minuten	Waschen
10. Glyceringelatine		Entfernen der Fettstiftumrandungen, Eindeckeln
11. Nagellack		Versiegeln und Abdichten
12. lauwarmes Leitungswasser		Reinigen der Objektträger

Tabelle 20 Zubehör für die RP-HPLC

Zubehör	Firma	Verwendung
Acetonitril	Carl Roth GmbH&Co. KG; Karlsruhe, D	4%ige Lösung, Bestandteil der mobilen Phase
Hochleistungsdispergierer „T25 digital ULTRA-TURRAX“	IKA GmbH und Co. KG; Staufen, D	Homogenisierung der Probe
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH&Co. KG; Karlsruhe, D	215 mM, Bestandteil der mobilen Phase
Kaliumhydroxid	Carl Roth GmbH&Co. KG; Karlsruhe, D	0,4%ige Lösung, Bestandteil der mobilen Phase
Kaliumhydroxid	Carl Roth GmbH&Co. KG; Karlsruhe, D	0,2 M, Protein-Ausfällung
Perchlorsäure Supra-Qualität ROTIPURAN Supra 70%	Carl Roth GmbH&Co. KG; Karlsruhe, D	Homogenisierung der Probe

RP-HPLC	Knauer GmbH; Berlin, D	Ionenpaarchromatographie mit *reversed phase*-Säule
RP (*reversed – phase*) Säule „LiChroCART250-4LiChrospher100RP-18“	Merck KG; Darmstadt, D	stationäre Phase
Tetrabutylammoniumhydro-gensulfat (97%)	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, D	2,3 mM, Bestandteil der mobilen Phase
Wasser ROTISOLV HPLC Gradient Grade	Carl Roth GmbH&Co. KG; Karlsruhe, D	hochaufgereinigtes Wasser
Zentrifuge „Biofuge Strates“	Heraeus Holding GmbH; Hanau, D	Zentrifugieren der Proben, gekühlt auf 4°C, bei 3000xg für 10 Minuten

8.3 Ergebnisse

8.3.1 Intraoperatives Monitoring

Tabelle 22 Vitalparameter, MW ± SEM (0 Minuten)

	arterieller Mitteldruck in mmHg	zentral-venöser Druck in mmHg	arterielle Sauerstoff-sättigung in %	Hämatokrit in %
Kontrolle	65 ± 2,439	8,429 ± 1,088	97,5 ± 1,02	28,97 ± 1,043
Kontrolle + Minozyklin	66,875 ± 2,825	8,167 ± 0,703	100 ± 0	25,2 ± 0,286
HLM pulsatil	60 ± 5,345	9,286 ± 0,808	100 ± 0	25,84 ± 0,601
HLM nicht-pulsatil	53,5 ± 1,92	12,1 ± 1,54	99,9 ± 0,02	23,59 ± 0,554
HLM nicht-pulsatil + Minozyklin	58 ± 3,742	10 ± 1,633	100 ± 0	25,22 ± 0,673

Tabelle 23 Vitalparameter, MW ± SEM (240 Minuten)

	arterieller Mitteldruck in mmHg	zentral-venöser Druck in mmHg	arterielle Sauerstoff-sättigung in %	Hämatokrit in %
Kontrolle	69,286 ± 4,144	11,714 ± 0,747	99,63 ± 0,127	36,9 ± 1,49
Kontrolle + Minozyklin	68,75 ± 3,504	10,333 ± 0,882	98,93 ± 0,102	23,9 ± 0,88
HLM pulsatil	60 ± 2,182	9 ± 1,155	96,94 ± 0,839	20,7 ± 0,49
HLM nicht-pulsatil	43,7 ± 1,69	12 ± 0,99	99,63 ± 0,089	15,1 ± 0,32
HLM nicht-pulsatil + Minozyklin	58 ± 1,633	8,75 ± 0,581	94,33 ± 2,048	27,1 ± 1,21

Tabelle 24 BGA, MW ± SEM (0 Minuten)

	pH-Wert	pCO2 in mmHg	pO2 in mmHg	BE in mmol/l
Kontrolle	7,346 ± 0,02	47,52 ± 2,266	220 ± 26,7	-0,1 ± 0,42
Kontrolle + Minozyklin	7,43 ± 0,006	40,01 ± 0,65	235 ± 3,92	2 ± 0,21
HLM pulsatil	7,408 ± 0,009	40,51 ± 1,001	277 ± 10,3	0,59 ± 0,33
HLM nicht-pulsatil	7,407 ± 0,006	41,43 ± 0,517	287 ± 11,3	1,88 ± 0,28
HLM nicht-pulsatil + Minozyklin	7,391 ± 0,009	48,32 ± 1,428	458 ± 29,5	3,97 ± 0,49

Tabelle 25 BGA, MW ± SEM (240 Minuten)

	pH-Wert	pCO2 in mmHg	pO2 in mmHg	BE in mmol/l
Kontrolle	7,407 ± 0,008	45,4 ± 0,349	175,48 ± 7,928	4,433 ± 0,439
Kontrolle + Minozyklin	7,384 ± 0,002	44,063 ± 0,571	156,33 ± 7,357	1,525 ± 0,327
HLM pulsatil	7,328 ± 0,006	45,044 ± 0,924	151,48 ± 8,432	-1,922 ± 0,456
HLM nicht-pulsatil	7,361 ± 0,013	49,525 ± 1,284	168 ± 6,301	3,925 ± 0,896
HLM nicht-pulsatil + Minozyklin	7,373 ± 0,013	43,45 ± 1,097	177,27 ± 15,567	0,517 ± 0,453

8.3.2 Arterielle Blutproben

Tabelle 26 Arterielle Blutproben: Gesamteiweiß, MW ± SEM und p-Werte

	0 Minuten	240 Minuten		
	MW ± SEM in g/l	MW ± SEM in g/l	p-Wert	
			Kontrolle	HLM nicht-pulsatil
Kontrolle	35,833 ± 0,915	40,500 ± 1,220		
Kontrolle + Minozyklin	36,975 ± 0,617	31,825 ± 1,240	0,347	
HLM pulsatil	34,767 ± 0,526	24,844 ± 0,992	**0,013**	0,801
HLM nicht-pulsatil	35,950 ± 0,496	20,250 ± 0,558	**0,001**	
HLM nicht-pulsatil + Minozyklin	39,333 ± 0,743	32,833 ± 1,821	0,071	0,071

Tabelle 27 Arterielle Blutproben: Albumin , MW ± SEM und p-Werte

	0 Minuten	240 Minuten		
	MW ± SEM in % des Gesamteiweißes	MW ± SEM in % des Gesamteiweißes	p-Wert	
			Kontrolle	HLM nicht-pulsatil
Kontrolle	45,367 ± 0,667	45,083 ± 0,608		
Kontrolle + Minozyklin	43,500 ± 0,821	40,244 ± 0,656	0,655	
HLM pulsatil	42,577 ± 0,548	45,367 ± 0,939	1	**0,033**
HLM nicht-pulsatil	50,575 ± 0,552	56,680 ± 1,986	**0,049**	
HLM nicht-pulsatil + Minozyklin	43,783 ± 0,823	46,100 ± 0,390	0,999	0,086

Tabelle 28 Arterielle Blutproben: Leukozyten-Konzentration, MW ± SEM

	0 Minuten	240 Minuten
	MW ± SEM in Gpt/l	MW ± SEM in Gpt/l
Kontrolle	7,865 ± 0,607	9,243 ± 0,833
Kontrolle + Minozyklin	10,411 ± 0,573	8,6 ± 0,376
HLM pulsatil	10,33 ± 0,531	8,849 ± 0,795
HLM nicht-pulsatil	12,615 ± 0,689	9,589 ± 0,969
HLM nicht-pulsatil + Minozyklin	9,09 ± 1,407	7,608 ± 0,865

8.3.3 Arterielles Blut: Laktat-Haushalt

Tabelle 29 Laktatproduktion , MW± SEM und p-Werte

	0 Minuten	240 Minuten		
	MW ± SEM in mmol/l	MW ± SEM in mmol/l	p-Wert	
			Kontrolle	HLM nicht-pulsatil
Kontrolle	1,683 ± 0,112	1,650 ± 0,069		
Kontrolle + Minozyklin	1,987 ± 0,130	2,114 ± 0,113	0,995	
HLM pulsatil	1,922 ± 0,142	5,438 ± 0,401	**0,023**	0,890
HLM nicht-pulsatil	1,663 ± 0,039	6,425 ± 0,327	**0,003**	
HLM nicht-pulsatil + Minozyklin	1,317 ± 0,090	5,620 ± 0,341	**0,038**	0,965

8.3.4 RP-HPLC

Tabelle 30 Verhältnis ATP/ADP für die Gewebsprobe des Hippocampus, Mittelwerte ± SEM und p-Werte

	MW ± SEM	p-Wert	
		Kontrolle	HLM nicht-pulsatil
Kontrolle	2,53 ± 0,69		
Kontrolle + Minozyklin	2,450 ± 0,759	1	
HLM pulsatil	1,849 ± 0,236	0,600	**0,003**
HLM nicht-pulsatil	0,865 ± 0,045	**0,046**	
HLM nicht-pulsatil + Minozyklin	0,955 ± 0,296	**0,028**	0,432

8.3.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Tabelle 31 HE-Färbung, Ödem, MW ± SEM und p-Werte

	CA1			CA3		
	MW ± SEM in %	p-Wert		MW ± SEM in %	p-Wert	
		Kontrolle	HLM nicht-pulsatil		Kontrolle	HLM nicht-pulsatil
Kontrolle	4,143 ± 0,752			7,048 ± 1,318		
Kontrolle + Minozyklin	4,527 ± 0,327	0,882		7,117 ± 2,412	0,991	
HLM pulsatil	5,923 ± 0,760	0,798	**0,048**	9,068 ± 0,805	0,62	0,328
HLM nicht-pulsatil	10,415 ± 2,025	**0,008**		12,459 ± 1,626	**0,037**	
HLM nicht-pulsatil + Minozyklin	4,016 ± 0,835	1	**0,007**	4,620 ± 0,878	0,951	**0,003**

Tabelle 32 HE-Färbung, Eosinophilie, MW ± SEM

	CA1	CA3
	MW ± SEM in %	MW ± SEM in %
Kontrolle	3,977 ± 1,337	8,192 ± 1,522
Kontrolle + Minozyklin	5,242 ± 0,768	7,138 ± 1,292
HLM pulsatil	5,153 ± 0,895	6,863 ± 0,986
HLM nicht-pulsatil	6,394 ± 2,149	7,167 ± 1,169
HLM nicht-pulsatil + Minozyklin	5,225 ± 1,130	7,126 ± 1,473

Tabelle 33 HE-Färbung, Pyknose, MW ± SEM

	CA1	CA3
	MW ± SEM in %	MW ± SEM in %
Kontrolle	3,317 ± 0,582	2,721 ± 0,842
Kontrolle + Minozyklin	4,038 ± 0,410	3,094 ± 0,637
HLM pulsatil	4,073 ± 0,847	5,461 ± 1,131
HLM nicht-pulsatil	5,416 ± 0,541	5,817 ± 0,742
HLM nicht-pulsatil + Minozyklin	3,400 ± 0,562	3,874 ± 1,020

8.3.6 Immunhistochemie

Tabelle 34 IHC-Färbung AIF, MW ± SEM und p-Werte

	CA1			CA3		
	MW ± SEM in %	p-Wert		MW ± SEM in %	p-Wert	
		Kontrolle	HLM nicht-pulsatil		Kontrolle	HLM nicht-pulsatil
Kontrolle	2,706 ± 0,611			2,723 ± 0,469		
Kontrolle + Minozyklin	3,505 ± 0,564	0,325		3,837 ± 0,601	0,822	
HLM pulsatil	3,254 ± 0,451	0,881	**0,001**	4,158 ± 0,469	0,358	**0,018**
HLM nicht-pulsatil	5,595 ± 0,343	**0,0001**		7,685 ± 1,261	**0,0001**	
HLM nicht-pulsatil + Minozyklin	2,471 ± 0,218	0,996	**0,0001**	3,263 ± 0,718	0,988	**0,002**

Tabelle 35 IHC-Färbung HIF 1-alpha, MW ± SEM und p-Werte

	CA1			CA3		
	MW ± SEM in %	p-Wert		MW ± SEM in %	p-Wert	
		Kontrolle	HLM nicht-pulsatil		Kontrolle	HLM nicht-pulsatil
Kontrolle	1,799 ± 0,164			4,538 ± 0,748		
Kontrolle + Minozyklin	2,665 ± 0,311	0,778		4,337 ± 0,728	1	
HLM pulsatil	3,068 ± 0,358	0,526	**0,0001**	4,720 ± 0,341	1	**0,002**
HLM nicht-pulsatil	6,088 ± 1,052	**0,0001**		9,485 ± 1,749	**0,005**	
HLM nicht-pulsatil + Minozyklin	3,076 ± 0,490	0,514	**0,003**	4,527 ± 1,011	0,986	**0,019**

Tabelle 36 IHC-Färbung 3-Nitrotyrosin, MW ± SEM und p-Werte

	CA1			CA3		
	MW ± SEM in %	p-Wert		MW ± SEM in %	p-Wert	
		Kontrolle	HLM nicht-pulsatil		Kontrolle	HLM nicht-pulsatil
Kontrolle	0,340 ± 0,084			0,546 ± 0,177		
Kontrolle + Minozyklin	1,116 ± 0,165	0,353		0,894 ± 0,147	0,967	
HLM pulsatil	2,077 ± 0,259	**0,001**	**0,0001**	1,210 ± 0,400	0,396	**0,0001**
HLM nicht-pulsatil	4,459 ± 0,450	**0,0001**		4,815 ± 0,621	**0,0001**	
HLM nicht-pulsatil + Minozyklin	1,544 ± 0,179	0,073	**0,0001**	1,293 ± 0,129	0,702	**0,0001**

Tabelle 37 IHC-Färbung cC3, MW ± SEM und p-Werte

	CA1			CA3		
	MW ± SEM in %	p-Wert		MW ± SEM in %	p-Wert	
		Kontrolle	HLM nicht-pulsatil		Kontrolle	HLM nicht-pulsatil
Kontrolle	4,509 ± 0,396			4,834 ± 0,371		
Kontrolle + Minozyklin	5,023 ± 0,649	0,995		5,753 ± 0,249	0,965	
HLM pulsatil	5,638 ± 0,436	0,898	**0,0001**	6,726 ± 0,198	0,644	**0,0001**
HLM nicht-pulsatil	11,651 ± 1,554	**0,0001**		12,659 ± 1,836	**0,0001**	
HLM nicht-pulsatil + Minozyklin	9,025 ± 0,497	**0,021**	0,278	10,772 ± 0,780	**0,0003**	0,667

Tabelle 38 IHC-Färbung PAR, MW ± SEM und p-Werte

	CA1			CA3		
	MW ± SEM in %	p-Wert		MW ± SEM in %	p-Wert	
		Kontrolle	HLM nicht-pulsatil		Kontrolle	HLM nicht-pulsatil
Kontrolle	2,015 ± 0,218			1,963 ± 0,443		
Kontrolle + Minozyklin	2,453 ± 0,288	0,802		2,732 ± 0,283	0,635	
HLM pulsatil	4,624 ± 0,275	**0,0001**	**0,0001**	4,822 ± 0,146	**0,0001**	**0,0001**
HLM nicht-pulsatil	8,583 ± 0,274	**0,0001**		8,741 ± 0,532	**0,0001**	
HLM nicht-pulsatil + Minozyklin	6,108 ± 0,224	**0,0001**	**0,0001**	6,274 ± 0,415	**0,0001**	**0,001**

9 Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

…….
Datum

…….
Unterschrift

10 Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Informationen:

Name:	Lydia Kühne
Geburtsdatum:	22.05.1988
Geburtsort:	Leisnig
Nationalität:	deutsch

Berufsausbildung:

seit 01/2014	Zahnärztin und Weiterbildungsassistentin für FZÄ Oralchirurgie
seit 07/ 2012	Dissertation: „Prophylaxe hypoxisch-entzündlicher Hirnschädigungen bedingt durch die extrakorporale Zirkulation (Herz-Lungen-Maschine) am narkotisierten Schwein“
11/2011 – 12/2013	Assistenz-Zahnärztin
07/2011 – 10/2011	Staatsexamen
02/2011 – 03/2011	Famulatur in Peru in Zusammenarbeit mit dem Deutschen Roten Kreuz
10/2006 – 10/2011	Studium der Zahnmedizin an der Universität Leipzig

Schulausbildung:

08/1998 – 07/2006	G. E. Lessing-Gymnasium Döbeln
08/1995 – 07/1998	Grundschule Großweitzschen
08/1994 – 07/1995	Grundschule „Am Holländer“ Döbeln

……. Ilmenau, den …….

Lydia Kühne

11 Koautorenschaft

Salameh A, Einenkel A, Kühne L, Grassl M, von Salisch S, Kiefer P, Vollroth M, Dähnert I, Dhein S.
Hippocampal Neuroprotection by Minocycline and Epigallo-Catechin-3-Gallate Against Cardiopulmonary Bypass-Associated Injury.
Brain Pathol. 2015 Jan 13. doi: 10.1111

Salameh A, Kühne L, Grassl M, Gerdom M, von Salisch S, Vollroth M, Bakhtiary F, Mohr FW, Dähnert I, Dhein S.
Protective effects of pulsatile flow during cardiopulmonary bypass.
Ann Thorac Surg. 2015 Jan;99(1):192-9.

12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Vor allem möchte ich meiner Betreuerin und Doktormutter apl. Prof. Dr. med. A. Salameh für die Überlassung des interessanten Themas der vorliegenden Dissertation, für die fachliche Betreuung und ihren wertvollen Rat danken.

Mein Dank gilt weiterhin allen Personen, die an der Durchführung der Tierversuche beteiligt waren: Frau Dr. med. vet. S. Oßmann und Frau Dr. med. vet. M. Gerdom für die tiermedizinische Betreuung der Ferkel während der Versuche, Herr Dr. med. M. Vollroth für die Durchführung der Operationen, Herr K. Krämer und dessen Mitarbeitern für die Bedienung der Herz-Lungen-Maschine und Frau apl. Prof. Dr. med. A. Salameh für die kardiologische Überwachung der Ferkel.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern aus dem Labor der Abteilung Forschung und Lehre des Herzzentrums Leipzig bedanken: Frau Dr. rer. nat. S. von Salisch danke ich für die Durchführung der RP-HPLC. Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. K. Blanke, Frau J. Schnabel und Frau F. Schlegel für ihre geduldige und freundliche Beratung und Einarbeitung in die Durchführung der immunhistochemischen Färbemethoden bedanken. Zusätzlich danke ich allen Mit-Doktoranten für die stets freundliche und positive Atmosphäre während der Arbeit im Labor.

Zudem danke ich Herrn Prof. Dr. med. F.-W. Mohr für die Bereitstellung der Räumlichkeiten für die Durchführung der Operationen und Untersuchungen.

Mein Dank gilt ebenso dem Lehr- und Versuchsgut Oberholz in Großpösna für die Bereitstellung der Versuchstiere und dem Labor Dr. Reising-Ackermann und Kollegen in Leipzig für die Auswertung der Blutproben.

Besonders möchte ich mich bei meiner Familie – meinen Eltern K. Funke-Kühne und H. Funke, sowie meiner Schwester S. Kühne – bedanken: für ihre fortwährende Unterstützung, wertvollen Ratschläge, Geduld und positiven Rückhalt in jeder Lebenslage. Danke!