

Aus der
Klinik für Kleintiere
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

und der
Klinik für Herzchirurgie am Herzzentrum
der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Aufbau und Evaluierung eines
Herz-Lungen-Maschinen-Verfahrens
anhand eines Ferkelmodells**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Katja Schneider
aus
Demmin

Leipzig, 2006

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig.

Dekan: Prof. Dr. med. vet. Karsten Fehlhaber

Betreuer: Prof. Dr. med. vet. Gerhard Oechtering
Prof. Dr. med. Stefan Dhein

Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Gerhard Oechtering, Klinik für Kleintiere der
Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
Prof. Dr. med. Stefan Dhein, Klinik für Herzchirurgie, Herzzentrum Leipzig
der Universität Leipzig
Prof. Dr. med. vet. James Grant Ferguson, Chirurgische Tierklinik der
Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
Prof. Dr. med. Uwe Mehlhorn, Klinik und Poliklinik für Herz- und
Thoraxchirurgie, Klinikum der Universität zu Köln

Tag der Verteidigung: 26.01.2006

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1 Einleitung | 1 |
| 2 Literaturübersicht | 3 |
| 2.1 Verteilung der Herzerkrankungen beim Menschen | 3 |
| 2.2 Verteilung der Herzerkrankungen beim Tier | 3 |
| 2.3 Therapiemöglichkeiten beim Tier | 5 |
| 2.4 Extrakorporale Zirkulation | 6 |
| 2.5 Optimierungsmöglichkeiten des CPB | 9 |
| 2.5.1 Hypothermie | 9 |
| 2.5.2 Flussmanagement | 11 |
| 2.5.3 Flüssigkeitsmanagement | 11 |
| 2.5.4 Blutgasmanagement | 12 |
| 2.5.5 Zerebrale Autoregulation | 14 |
| 2.6 Pathophysiologie der zerebralen Ischämie | 14 |
| 2.6.1 Gehirnstoffwechsel | 14 |
| 2.6.2 Pathophysiologie der Ischämiephase | 16 |
| 2.6.3 Pathophysiologie der Reperfusionsphase | 18 |
| 2.6.4 Chaperone als zelluläre Reparaturmechanismen | 23 |
| 2.6.4.1 Familie der Heat-shock-proteine (HSP) | 24 |
| 2.6.4.2 HSP70-Familie | 24 |
| 2.6.4.3 Regulation der HSP-Synthese | 25 |
| 2.6.4.4 HSP70 und zerebrale Ischämie | 25 |
| 2.7 Intraoperativ erfassbare Parameter | 26 |
| 2.7.1 Tissue oxygenation index | 26 |
| 2.7.2 Protein S100 β | 27 |
| 2.7.3 Neuronenspezifische Enolase | 27 |
| 2.7.4 Gehirnisofom der Kreatinphosphokinase | 28 |
| 2.7.5 Laktat | 28 |
| 2.7.6 Jugularvenöse Sättigung | 29 |
| 2.7.7 Malondialdehyd | 29 |
| 2.7.8 Zielparameter dieser Studie | 29 |
| 3 Tiere, Material und Methoden | 31 |
| 3.1 Versuchsdurchführung | 31 |
| 3.1.1 Versuchstiere und Gruppeneinteilung | 31 |
| 3.1.2 Anästhesie | 32 |
| 3.1.3 Versuchsablauf und operatives Vorgehen | 34 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 3.1.4 | Medikamentöse Interventionen während der OP | 37 |
| 3.1.5 | Extrakorporale Zirkulation | 37 |
| 3.1.6 | Kardioplegie | 39 |
| 3.1.7 | Flüssigkeitsmanagement | 39 |
| 3.1.8 | Bluttransfusion | 39 |
| 3.2 | Verlaufsparemeter unter EKZ | 40 |
| 3.2.2 | Messprinzipien | 40 |
| 3.2.2.1 | Blutfluss | 40 |
| 3.2.2.2 | Arterieller Blutdruck und intrakranialer Druck | 40 |
| 3.2.2.3 | Hirntemperatur | 41 |
| 3.2.2.4 | Nah-Infrarot-Spektroskopie | 41 |
| 3.2.2.5 | Optische Sauerstoffsättigungsmessung | 43 |
| 3.2.2.6 | Arterielle Blutgasmessung | 43 |
| 3.2.2.7 | Laktatmessung | 43 |
| 3.2.2.8 | S100β | 44 |
| 3.3 | Postoperative Untersuchungen | 44 |
| 3.3.1 | Gehirnexplantation/ Probenaufbereitung | 44 |
| 3.3.2 | Histologie | 45 |
| 3.3.2.1 | Hämatoxilin-Eosin-Histologie | 45 |
| 3.3.2.2 | Immunhistologie | 45 |
| 3.3.2.2.1 | Indirekte Immunfluoreszenz | 45 |
| 3.3.2.2.2 | Immunhistologische Protokolle | 46 |
| 3.3.3 | Hochleistungschromatographie | 48 |
| 3.3.4 | Bildauswertung | 48 |
| 3.4 | Statistik | 49 |
| 4 | Ergebnisse | 50 |
| 4.1 | Versuchsdurchführung | 50 |
| 4.1.1 | Versuchsablauf | 50 |
| 4.1.2 | Anästhesie | 50 |
| 4.1.3 | Flüssigkeitsmanagement | 50 |
| 4.1.4 | Bluttransfusion | 51 |
| 4.2 | Veränderungen der Verlaufsparemeter | 52 |
| 4.2.1 | Parameterverläufe der am stärksten geschädigten Gruppe (38 °C 25 %) | 52 |
| 4.2.2 | Gruppenvergleich einzelnen Parameter | 55 |
| 4.2.2.1 | Blutfluss der Arteria carotis | 55 |
| 4.2.2.2 | Mittlerer arterieller Blutdruck und intrakranialer Druck | 57 |
| 4.2.2.3 | Tissue oxygenation index und Tissue hemoglobin index | 60 |

| | |
|--|-----|
| 4.2.2.4 Sauerstoffsättigung im jugularvenösen Blut | 63 |
| 4.2.2.5 arterieller Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck | 67 |
| 4.2.2.6 pH-Wert | 68 |
| 4.2.2.7 Laktat | 70 |
| 4.2.2.8 Protein S100 β | 72 |
| 4.3 postoperative Untersuchungsergebnisse | 74 |
| 4.3.1 Gehirnexplantation und Probenaufbereitung | 74 |
| 4.3.2 Histologie | 74 |
| 4.3.2.1 H.E. Histologie | 75 |
| 4.3.2.2 Immunhistologie mittels HSP70 | 76 |
| 4.3.2.2.1. Immunfluoreszenz am Kryoschnitt | 76 |
| 4.3.2.2.2 Immunhistologie am Paraffinschnitt | 78 |
| 4.3.3 Malondialdehyd | 79 |
| 4.4 Ergebnisse der Kontrollgruppe ohne HLM-Intervention | 81 |
| 4.5 Prädiktiver Wert der Parameter | 81 |
| 5 Diskussion | 82 |
| 5.1 Einfluss des HLM-Flusses | 84 |
| 5.2 Einfluss der Temperatur | 87 |
| 5.3 Interaktion zwischen Fluss und Temperatur | 89 |
| 5.4 Ischämische Reaktionen des Gehirns | 90 |
| 5.5 Parameter zur Abschätzung des ischämischen Schadens | 93 |
| 5.6 Schlussfolgerungen | 94 |
| 6 Zusammenfassung | 96 |
| 7 Summary | 98 |
| 8 Literaturverzeichnis | 100 |
| 9 Anhang | 125 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tab.1: Vergleich der prozentualen Verteilung der kongenitalen Herzerkrankungen bei Kindern in Deutschland | 3 |
| Tab.2: Vergleich der prozentualen Verteilung der wichtigsten Herzerkrankungen bei Hunden in Europa und den USA | 5 |
| Tab.3: Überblick über die einzelnen Versuchsgruppen | 30 |
| Tab.4: Angewendete Medikamente während des Operationsverlaufes | 32 |
| Tab.5: Anästhesiezubehör für Ferkel der Gewichtsklasse 7-10 kg KM | 33 |
| Tab.6: Zubehör der HLM für Ferkel der Gewichtsklasse 7-10 kg KM | 37 |
| Tab.7: Messgeräte und dafür notwendige Verbrauchsmaterialien | 43 |
| Tab.8: Eingesetzte Materialien für die Immunhistologie | 46 |
| Tab.9: Beatmungsparameter während des Versuchsablaufs | 49 |
| Tab.10: Vergleich der venösen Blutkaliumwerte während der Reperfusion zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (n=9) | 50 |
| Tab.11: Darstellung der Veränderungen des intrakranialen Druckes (ICP in mmHg) der Schweine aller Versuchsgruppen (n=6 pro Gruppe) im Verlauf des Experimentes | 58 |
| Tab.12: Darstellung der Veränderungen des Tissue hemoglobin index (THI in %) der Schweine aller Versuchsgruppen (n=6 pro Gruppe) im Verlauf des Experimentes | 61 |
| Tab.13: Darstellung der Veränderungen des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes (paO ₂ in mmHg) der A. femoralis der Schweine aller Versuchsgruppen (n=6 pro Gruppe) im Verlauf des Experimentes | 64 |
| Tab.14: Darstellung der Veränderungen des arteriellen Kohlendioxidpartialdruckes (paCO ₂ in mmHg) der A. femoralis der Schweine aller Versuchsgruppen (n=6 pro Gruppe) im Verlauf des Experimentes | 65 |
| Tab.15: Semiquantitative Darstellung des Sensibilitätsgrades der einzelnen Gehirnareale | 73 |
| Tab.16: Berechneter prozentualer Anteil der HSP70 positiven Fluoreszenz mittels ks300 | 75 |
| Tab.17: Q (ml/min) und MAP (mmHg) aller Versuchstiere (n=4) der anästhesierten Kontrollgruppe ohne EKZ zu den entsprechenden Zeitpunkten im Verlauf des Experiments | 130 |
| Tab.18: TOI (%) und THI (%) aller Versuchstiere (n=4) der anästhesierten Kontrollgruppe ohne EKZ zu den entsprechenden Zeitpunkten | |

| | |
|--|-----|
| im Verlauf des Experiments | 130 |
| Tab.19: S_vO_2 (%) und Laktat (mmol/l) aller Versuchstiere (n=4) der anästhesierten Kontrollgruppe ohne EKZ zu den entsprechenden Zeitpunkten im Verlauf des Experiments | 130 |
| Tab.20: p_aO_2 (mmHg), p_aCO_2 (mmHg) und pH aller Versuchstiere (n=4) der anästhesierten Kontrollgruppe ohne EKZ zu den entsprechenden Zeitpunkten im Verlauf des Experiments | 131 |
| Tab.21: S100 β (μ g/l) aller Versuchstiere (n=4) der anästhesierten Kontrollgruppe ohne EKZ zu den entsprechenden Zeitpunkten im Verlauf des Experiments | 131 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb.1: Schematische Darstellung der pathophysiologischen Mechanismen in bzw. auf die Nervenzellen während Ischämie und Reperfusion | 21 |
| Abb.2: Darstellung der Herzkanülierung zum Zeitpunkt des HLM-Anschlusses | 35 |
| Abb.3: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes mit Kennzeichnung der Ischämie- und Reperfusionsphase | 37 |
| Abb.4: links: Schematische Darstellung der HLM mit Kennzeichnung der Blutflussrichtung rechts: Aufbau der HLM aller Schweine dieser Studie | 37 |
| Abb.5: Extinktionskurven der funktionellen Hämoglobin-Fractionen | 41 |
| Abb.6: Messapparatur (NIRO 300, LICOX-Sonden) am Schädel der Ferkel | 42 |
| Abb.7: Darstellung von Q, MAP, TOI eines Einzeltieres der 38 °C 25 % Gruppe über den gesamten Versuchszeitraum (Versuchsphasen vgl. Abb.3) | 52 |
| Abb.8: Darstellung von S _v O ₂ , pH, Laktat eines Einzeltieres der 38 °C 25 % Gruppe über den gesamten Versuchszeitraum | 53 |
| Abb.9: Vergleichende Darstellung der Veränderungen des Blutflusses (Q in ml/min) an der A. carotis der Schweine aller Versuchsgruppen (n=6 pro Gruppe) im Verlauf des Experimentes | 55 |
| Abb.10: Vergleichende Darstellung der Veränderungen des mittleren arteriellen Blutdruckes (MAP in mmHg) in der A. femoralis der Schweine aller Versuchsgruppen (n=6 pro Gruppe) im Verlauf des Experimentes | 57 |
| Abb.11: Vergleichende Darstellung der Veränderungen des Tissue oxygenation index (TOI in %) der Schweine aller Versuchsgruppen (n=6 pro Gruppe) im Verlauf des Experimentes | 60 |
| Abb.12: Vergleichende Darstellung der Veränderungen der Sauerstoffsättigung (SvO ₂ in %) in der V. jugularis der Schweine aller Versuchsgruppen (n=6 pro Gruppe) im Verlauf des Experimentes | 63 |
| Abb.13: Vergleichende Darstellung der Veränderungen des pH-Wertes in der A. femoralis der Schweine aller Versuchsgruppen (n=6 pro Gruppe) im Verlauf des Experimentes | 68 |
| Abb.14: Vergleichende Darstellung der Veränderungen des venösen Laktats in mmol/l der Schweine aller Versuchsgruppen (n=6 pro Gruppe) im Verlauf des Experimentes | 70 |
| Abb.15: Vergleichende Darstellung der Veränderungen von S100β in µg/l der Schweine aller Versuchsgruppen (n=6 pro Gruppe) im Verlauf des Experimentes | 72 |

| | |
|--|----|
| Abb.16: Einteilung der verschiedenen Hippocampusabschnitte (CA1-CA4) am Hippocampusquerschnitt eines Schweines dieser Studie | 74 |
| Abb.17: Darstellung der H.E. Histologie aus der CA1-Region des Hippocampus von jeweils einem repräsentativen Schwein der Versuchsgruppe 38 °C 100 % und 38 °C 25% | 74 |
| Abb.18: Immunfluoreszenzdarstellung der CA1-Region des Hippocampus von jeweils einem repräsentativen Schwein der Versuchsgruppe 38 °C 100 %, 38 °C 25 %, 25 °C 25 % und 18 °C 2 5 % | 75 |
| Abb.19: Vergleichende Darstellung der HSP70 positiven Immunfluoreszenz der Schweine aller Versuchsgruppen (n=6 pro Gruppe) im Verlauf des Experimentes | 76 |
| Abb.20: Peroxidase gekoppelte immunhistologische Färbung der CA1-Region des Hippocampus eines Schweines der 38 °C 25 % Gruppe | 77 |
| Abb.21: Vergleichende Darstellung der Malondialdehydewerte in µg/l der Schweine aller Versuchsgruppen (n=6 pro Gruppe) im Verlauf des Experimentes | 78 |
| Abb.22: Originalregistrierung der HPLC für den Nachweis von Malondialdehyd von jeweils einem repräsentativen Schwein der Versuchsgruppen am Ende der Reperfusion. Nach dem Injektionspeak erkennt man zum Zeitpunkt 3,00 min der HPLC den MDA-Peak | 79 |
| Abb.23: Korrelationen von TOI~S _v O ₂ (r ² =0,61) und HSP70~S _v O ₂ (r ² =0,72) | 85 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|--|
| ACT | Antikoagulationszeit |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| AMPA | Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat |
| AMV | Atemminutenvolumen |
| AS | Aortenstenose |
| ASD | Vorhofseptumdefekt |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AZV | Atemzugvolumen |
| α | spezifischer Extinktionskoeffizient |
| ΔA | Lichtabschwächung |
| BE | Baseexcess |
| BHS | Blut-Hirn-Schranke |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CBF | zerebraler Blutfluss |
| CMRO ₂ | zerebrale metabolische Sauerstoffrate |
| CPB | Cardiopulmonaler Bypass |
| CPK-BB | Kreatinphosphokinase (Gehirnisofom) |
| CPP | zerebraler Perfusionsdruck |
| CuZnSOD | Kupfer-Zink-Superoxiddismutase |
| CytOx | Cytochromoxydase |
| Δc | Absorberkonzentration |
| d | optische Weglänge |
| Da | Dalton |
| DAG | Daicylglycerin |
| DPF | Differentieller Weglängenfaktor |
| ELISA | Enzym gekoppelter Immunassay |
| EKZ | Extrakorporale Zirkulation |
| FITC | Fluorescinisothiocyant |
| Fr | French |
| GM | Gehirnmasse |
| H.E. | Hämatoxylin-Eosin |
| HLM | Herz-Lungen-Maschine |
| HMV | Herzminutenvolumen |
| HPLC | Hochleistungschromatographie |

| | |
|-------------------------------|--|
| HSP | Heat shock protein |
| ICP | Intrakranialer Druck |
| KM | Körpermasse |
| MAP | Mittlerer arterieller Druck |
| Median | Medianwert |
| MDA | Malondialdehyd |
| MK | Mitralklappe |
| MnSOD | Mangan-Superoxyddismutase |
| NADP | Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat |
| NIRS | Nahinfrarot Spektroskopie |
| NMDA | N-Methyl-D-Aspartat |
| NO | Stickoxyd |
| NSE | Neuronenspezifische Enolase |
| OD | Optische Dichte |
| PARP | Poly(ADP-ribose) Polymerase |
| PBS | Phosphat gepufferte Saline |
| PEEP | positiv endexpiratorischer Partialdruck |
| PIP ₂ | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat |
| PK C | Proteinkinase C |
| PL A ₂ | Phospholipase A ₂ |
| pO ₂ cran | intracranieller Sauerstoffpartialdruck |
| PS | Pulmonalstenose |
| Q | Blutfluss |
| Q10 | Temperaturkoeffizient |
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies |
| SOD | Superoxyddismutase |
| S _v O ₂ | venöse Sauerstoffsättigung |
| THI | Tissue hemoglobin index |
| TOI | Tissue oxygenation index |
| TK | Trikuspidalklappe |
| TBS | Tris gepufferte Saline |
| VSD | Ventrikelseptumdefekt |
| ZVK | Zentralvenöser Katheter |

1 Einleitung

Trotz langjähriger Erfahrungen in der Chirurgie am offenen Herzen mit Benutzung der Herz-Lungen-Maschine (HLM) in der Humanmedizin steht die tiermedizinische Kardiochirurgie noch immer in den Anfängen. Die humanmedizinische Forschung dient zwar als Basis für die Entwicklung und den routinemässigen Einsatz des kardiopulmonalen Bypass (CPB) zur Behandlung verschiedener Herzerkrankungen der Tiere, aber die derzeit hohen finanziellen Kosten verzögern die klinische Anwendung. Die momentan gängigste Therapiemethode besteht in der symptombezogenen medikamentösen Behandlung. In wenigen Kliniken wurden seit den 90er Jahren vereinzelte Mitralklappenrekonstruktionen (White et al., 1995; Boggs et al., 1996), chirurgische Behandlungen einer Fallotschen Tetralogie (Lew et al., 1998; Orton et al., 2001) und die Resektion einer subvalvulären Aortenstenose (Monnet et al., 1996) durchgeführt.

Die klinische Problematik des CPB für die Humanmedizin nach herzchirurgischen Eingriffen besteht in den neurologischen und neuropsychologischen Defiziten infolge zerebraler Hypoxie und Ischämie. Sie stellen eine der Hauptursachen für die postoperative Morbidität bzw. Letalität dar. Die Inzidenz von neuropsychologischen Defiziten in der akuten postoperativen Phase ist abhängig von den Autoren und der Interpretation der neuropsychologischen Tests von 18-28 % (Savageau et al., 1982; Nevin et al., 1987) bis 47-70 % (Treasure et al., 1989; Venn et al., 1987; Vingerhoets et al., 1997). Die meisten dieser Defizite sind von mildem Charakter und das klinische Substrat bezieht sich auf Störungen der Konzentration, Aufmerksamkeit und des Gedächtnisses (Patel et al., 1993). Der Großteil dieser Defizite scheint reversibel zu sein und vergeht innerhalb eines Monats (Townes et al., 1989), allerdings besteht auch die Möglichkeit einer bis zu einem Jahr oder längeren, neurologischen Einschränkung (McKhann et al., 1997).

Das gegenwärtig effektivste Prinzip der Reduktion des Sauerstoffverbrauches und des Schutzes vor neurologischen Schäden stellt die Absenkung der Körpertemperatur (Barone et al., 1997), als Einstellparameter der Herz-Lungen-Maschine (HLM), dar. Somit konnten verschiedene Autoren ein signifikant verbessertes neurologisches Resultat nach fokaler oder globaler Ischämie mit moderater Hypothermie (32 °C- 28° C) nachweisen (Reith et al., 1996; Wass et Lanier, 1996). Ein weiterer variabler Parameter der HLM ist die Flussrate, deren Reduktion die Sichtverhältnisse für den Operateur innerhalb des Operationsfeldes verbessern, andererseits aber auch eine Ischämie induziert. Um die Frage der für den Patienten bestmöglichen Kombination zwischen Reduktion der Temperatur einerseits und Flussreduktion andererseits zu beantworten, ist es

unumgänglich, ischämierrelevante Marker am Gehirn nach verschiedenen EKZ-Verfahren und bei unterschiedlichen Temperaturen zu bestimmen. Dies ist auch für die Evaluierung geeigneter HLM-Verfahren für den veterinärmedizinischen Einsatz von Bedeutung.

In diesem Zusammenhang ergeben sich die Fragestellungen dieser Arbeit:

1. Lässt sich die EKZ durch Variation des Maschinenflusses und der Temperatur vor allem für kleine Tiere optimieren?
2. Gibt es Zeichen einer zerebralen Ischämie unter EKZ, die spätere neuropsychologische Defizite erklären können?
3. Eignet sich der tissue oxygenation index (TOI), gemessen mittels Nahinfrarot-Spektroskopie (NIRO 300), zum intraoperativen Monitoring? Kann anhand dieses Parameters das Maß der zerebralen Ischämie erfasst werden?
4. Korrelieren ischämietypischen Veränderungen mit zerebraler Laktat- und Malondialdehydproduktion?
5. Kann die zerebrale Auswirkung der Ischämie anhand der Hämatoxylin-Eosin (H.E.) gefärbten Gehirnschnitten und der Expression des Zielparameters Heat shock protein 70 (HSP70) bestimmt werden?

2 Literaturübersicht

2.1 Verteilung der Herzerkrankungen beim Menschen

Patienten mit erworbenen oder angeborenen Herzerkrankungen werden zur Verbesserung der Lebenserwartung, der Beschwerdesymptomatik und der Lebensqualität herzhirurgisch behandelt. Ziel der modernen Chirurgie angeborener Herzfehler ist es, so früh wie möglich operativ die bestmögliche Korrektur des Defektes zu erreichen. Nur eine weitgehende Normalisierung der Blutströme im Herzen kann Folgeschäden an Herz und Körper verhindern. Die Inzidenz der kongenitalen Herzdefekte in der Humanmedizin beläuft sich auf insgesamt 0,2-1,1 % der Lebendgeborenen. Auf das Jahr 2002 bezogen, wurden in den 79 herzhirurgischen Zentren Deutschlands insgesamt 96194 Herzoperationen unter Verwendung der HLM durchgeführt, wobei davon 4424 angeborene Herzfehler therapiert wurden (Kalmar et al.,

Tab.1: Vergleich der prozentualen Verteilung der kongenitalen Herzerkrankungen bei Kindern in Deutschland (Brode et al., 2002)

| Herzerkrankung | % aller Herzfehler | Geschlechtsdisposition |
|---------------------------------|--------------------|------------------------|
| VSD | 25-41 % | weiblich |
| Ductus arteriosus Botalli | 10-14 % | weiblich |
| ASD | 7-12 % | / |
| PS, valvulär | 5-7 % | / |
| Aortenisthmusstenose | 6-10 % | männlich |
| Fallotsche Tetralogie | 5 % | männlich |
| AS, valvulär | 5-7 % | männlich |
| Transposition grosser Arterien | 5-7 % | männlich |
| Atrio-Ventrikular-Septum-Defekt | 3-4 % | / |
| seltene Herzfehler | 21 % | / |

2003):

2.2 Verteilung der Herzerkrankungen beim Tier

In der Veterinärmedizin sind Herzerkrankungen am besten bei Hunden diagnostiziert, wobei angeborene Erkrankungen bei etwa 2,5 % der Hunde auftreten. Studien über die Verteilung angeborener Herzerkrankungen bei Hunden gibt es kaum, obwohl eine Prädisposition z.B. für die Rassen Boxer, Golden Retriever, Bullterrier, Labrador und Neufundländer und Deutscher Schäferhund bekannt ist (Stockhoff,1998). Tidholm (1997) untersuchte in Schweden 151 herzkranken Hunde, wobei in 35 % der Fälle eine Aortenstenose (AS), in 20 % Pulmonalstenose (PS), in 12 % Ventrikelseptumdefekt

(VSD), in 11 % Ductus arteriosus botalli, Mitralklappendysplasie (MK-Dysplasie) zu 8 %, Trikuspidalklappendysplasie (TK-Dysplasie) zu 7 % und Fallotsche Tetralogie zu 0,6 % auftrat. Unter den 151 Hunden im Alter von 2 Monaten bis 10 Jahren waren 24 % Golden Retriever, 17 % Deutsche Schäferhunde und 11 % Boxer. Ebenfalls fiel den Autoren bei den prozentual am häufigsten vorkommenden Herzerkrankungen eine Geschlechtsprädisposition von vermehrt männlich erkrankten Hunden auf (s. Tab. 2).

Die erworbenen Herzerkrankungen entwickeln sich mit zunehmendem Lebensalter und die krankheitsspezifische Symptomatik tritt meist erstmals mit etwa 2 Jahren auf und 20-50 % der Hunde haben sogar schon ein Mindestalter von 8 Jahren erreicht. Zu den besonders häufig betroffenen Rassen zählen Cavalier King Charles Spaniel, Teckel, Terrier, Shi Tzu, Malteser, Pekinese, Pudeln, Irischer Wolfshund, Cocker Spaniel, Deutsche Dogge und Dobermann (Buchanan, 1999).

Typen und Prävalenzen von Herzerkrankungen allgemein wurden vor 40 Jahren als erstes innerhalb einer Studienuntersuchung von 5000 Hunden in der Tierklinik der Universität Pennsylvania charakterisiert. 11 % der Hunde zeigten zuverlässige Zeichen von Herzerkrankungen und in weiteren 9 % bestand eine Wahrscheinlichkeit von Herzerkrankungen (Detweiler und Patterson, 1965). In weiteren Studien der Tierkliniken New York City und in Italien konnte der Prozentsatz von 11 % bestätigt werden (Fox et al., 1999). Die kongenitalen Herzerkrankungen hingegen, ermittelt von verschiedenen veterinärmedizinischen Universitäten der Vereinigten Staaten von Amerika, umfassen 0,46-0,85 % (Buchanan, 1992). Die Prävalenz variiert zwischen den Hunderassen und den einzelnen Ländern und ist anscheinend vom regionalen Genpool abhängig.

Tab. 2: Vergleich der prozentualen Verteilung der wichtigsten Herzerkrankungen bei Hunden in Europa und den USA (Tidholm, 1997; Fox et al., 1999)

| Herzerkrankung | % Europa | % USA | Rassedisposition | Geschlechtsdisposition |
|-----------------------------|----------|-------|---|------------------------|
| AS | 35,2 | 25,5 | Boxer, Golden Retriever, Labrador, Neufundländer, Bullterrier, Deutscher Schäferhund, Rottweiler, Deutsche Dogge | männlich |
| PS | 20,4 | 20,8 | Boxer, Beagle, Labrador, Englische Bulldogge, Chihuahua, Mastiff, Chow Chow, Neufundländer, Zwergschnauzer, Spaniel, Basset Terrier | männlich |
| VSD | 12,3 | 9,8 | Spaniel, West Highland Terrier, Basset, Englische Bulldogge | männlich |
| Ductus arteriosus | 11,1 | 27,7 | Pudel, Labrador, Colli, Schäferhund, Neufundländer, Malteser, Spaniel, Chihuahua | weiblich |
| persistierende rechte Aorta | | 3,1 | Deutscher Schäferhund, Irish Setter, Boston Terrier, Malteser, Bichon frise, Keeshound | / |
| MK-Dysplasie | 8 | 1,7 | Rottweiler, Golder Retriever, Bullterrier, Dalmatiner, Deutscher Schäferhund | / |
| TK-Dysplasie | 7,4 | 5,1 | Golden Retriever, Schäferhund, Labrador | / |
| Fallotsche Tetralogie | 0,6 | 3,9 | Englische Bulldogge, Pudel, Zwergschnauzer, Collie, Terrier, Beagle, Keeshound | / |

2.3 Therapiemöglichkeiten beim Tier

Die therapeutischen Möglichkeiten bei angeborenen Herzerkrankungen des Hundes beruhen vorwiegend auf einer symptomatischen Behandlung. Die Herzchirurgie bei Hunden ist aufgrund der vielen experimentellen Eingriffe prinzipiell sehr weit entwickelt, da die Operation an Hunden vielfach als Voraussetzung für die Weiterentwicklung der humanmedizinischen Kardiochirurgie dient. Die Anwendung des CPB kann unter Einsatz der HLM (s. Abb. 1) erfolgen.

Die ersten kardiopulmonalen Bypassversuche mit Hilfe einer HLM am Hund wurden schon 1987 von Klement et al. durchgeführt (Klement et al., 1987). Der erste Einsatz von Hypothermie bei einem Hund mit VSD erfolgte sogar schon 1971 in einem Eisbad, in dem die Körpertemperatur somit auf 28 °C reduziert wurde (Breznock et al., 1971). Die Anzahl der veterinärmedizinischen Publikationen über erfolgreiche Operationen unter Einsatz der HLM steigt stetig und es werden bereits Rekonstruktionen von Mitralklappen (White et al., 1995; Boggs et al., 1996), chirurgische Behandlungen einer Fallotschen Tetralogie (Lew et al., 1998; Orton et al., 2001) und die Resektion einer subvalvulären Aortenstenose (Monnet et al., 1996) durchgeführt. Der Einsatz des CPB bei Hunden war Mitte der 90er Jahre jedoch noch mit einer hohen operativen Mortalität von 25-50 % verbunden (Monnet et al., 1996). Als Komplikationen sind milde bis moderate

Lungenschäden mit verschlechtertem Gasaustausch, Azidose, erniedrigte renale Funktion und Hyperkaliämie beschrieben (Monnet et al., 1996; Lew et al., 1997).

Das Hauptproblem am Einsatz der HLM beim Menschen besteht in den neurologischen Schädigungen, die bislang nur sehr schlecht am Tier untersucht wurden. Aber für sehr viele chirurgisch zu behandelnden Fälle ist der Einsatz der HLM unumgänglich. Sie ermöglicht dem Chirurgen für die Zeit des Einflusses aufgrund der Stilllegung des Herzens, die Defekte unter besserer Sicht und ohne große Blutungen im OP-Feld zu beheben und somit die Lebenserwartung deutlich zu steigern.

2.4 Extrakorporale Zirkulation

Bei Herzoperationen wie z.B. die Korrektur eines Ventrikelseptumdefektes wird mit Hilfe der HLM die Pumpfunktion des Herzens und der Gasaustausch der Lunge für die Zeit des Eingriffs aufrechterhalten. Die Aufgabe der extrakorporalen Zirkulation besteht darin, ein ausreichendes Perfusionsminutenvolumen in der Größenordnung des normalen Herzminutenvolumens und einen ausreichenden Perfusionsdruck im Bereich des arteriellen Mitteldrucks bereitzustellen. Zur Aufrechterhaltung des Körperkreislaufes trotz Stilllegung des Herzens übernimmt eine entsprechende Pumpe die Transportfunktion des Blutes und ein Oxygenator die Gasaustauschfunktion der Lunge.

Der typische Aufbau einer HLM besteht aus einem Reservoir, einer Blutpumpe, einem Oxygenator, einem Wärmeaustauscher und diversen Schlauchsystemen. Der Oxygenator, dessen Hauptfunktion der Gasaustausch ist, muss die adäquate Oxygenierung des Blutes und die Kohlendioxideliminierung garantieren. Im klinischen Alltag werden seit 1969 Membranoxygenatoren eingesetzt, in denen vergleichbar zur Lunge, Blut und Gas mittels gasdurchlässiger Membran voneinander getrennt sind. Der Gasaustausch im Oxygenator wird von einer Konzentrationsdifferenz der Atemgase zwischen Blut- und Gasseite angetrieben.

In den Membranoxygenatoren ist heutzutage ein Wärmeaustauscher integriert, der innerhalb des EKZ-Systems der Bluttemperaturregulierung dient, da bei zahlreichen Operationsverfahren eine Abkühlung und anschließende Erwärmung des Patienten gewünscht wird. Der Wärmeaustausch erfolgt über mit Blut gefüllte dünnwandige Rohrsysteme, die mit einer definiert temperierten Wassermenge umströmt sind, wodurch die Temperatur des Blutes reguliert werden kann.

Ein weiterer Baustein der HLM stellt das venöse Reservoir dar, welches als Ausgleichsgefäß für Volumenschwankungen während des Bypasses dient. Somit wird dem Reservoir heparinisiertes Blut aus rechten Vorhof (bzw. den beiden Hohlvenen) und abgesaugtes Blut aus dem OP-Situs, dem Sinus coronarius und über den linksventrikulären Vent, zugeführt. Eine integrierte Filtereinheit verhindert, dass

Thromben und Gewebepartikel (vorwiegend Fett) und Mikroluftblasen aus dem OP-Situs wieder in den Blutkreislauf gelangen und Embolien hervorrufen (Weitkemper et al., 1999). Um eine exakte Pumpleistung mit einem ausreichend hohen Pumpzeitvolumen zu erreichen, kommen in Abhängigkeit von der benötigten Perfusionszeit zwei verschiedene Blutpumpen zum Einsatz. Bei Perfusionszeiten unter 4 Stunden werden Rollerpumpen und bei Perfusionszeiten über 4 Stunden blutschonendere Zentrifugalpumpen eingesetzt (Lauterbach, 2002).

Die Verbindung einzelnen Komponenten der HLM wird durch Schlauchsysteme hergestellt. Um das Volumen des zirkulierenden Blutes so gering wie möglich zu halten, wird vorwiegend an den Schlauchwegen gespart, da die einzelnen Komponenten schon den unterschiedlichen Patienten angepasst werden (Ferichs, 1999).

Der Anschluss eines Patienten an die HLM im klinischen Alltag erfolgt nach der Sternotomie über die Kanülierung des rechten Herzohrs, in dem das venöse Blut über ein Schlauchsystem aus dem rechten Vorhof in das Reservoir der HLM geleitet wird. Aufgrund des hydrostatischen Druckgradienten muss sich das Reservoir einige Zentimeter unterhalb des Herzens befinden. Vom Reservoir ausgehend gelangt das Blut über eine Blutpumpe durch den Oxygenator, in welchem das Blut oxygeniert wird und fließt als arterielles Blut über die kanülierte Aorta wieder in den Patienten (Moosdorf et al., 1999; Lorenz u. Erhardt, 1999). Zusätzlich erfolgt die Platzierung eines linksventrikulären Vents über das linke Herzohr oder die Herzspitze bzw. die rechte obere Pulmonalvene, um eine Überdehnung des linken Ventrikels zu vermeiden (Lorenz u. Erhardt, 1999). Nach dem Beginn des CPB und der Abkühlung auf die gruppenspezifische Temperatur wird die Aorta abgeklemmt und eine kardioplegische Lösung über die Aortenwurzel in den Koronarkreislauf infundiert. Mit dieser Kardioplegie wird eine anhaltende Unterbrechung der elektrischen und mechanischen Aktivität des Herzens ausgelöst, welche einen schlaffen Herzstillstand zur Folge hat. Dieser pharmakologisch induzierte Herzstillstand steigert die Ischämietoleranz des Myokards. Aufgrund der Fragilität der Hundeaorta wird die direkte Kanülierung der Aorta nicht routinemässig empfohlen, sondern über die A. femoralis oder die A. iliaca perfundiert (Lew et al., 1997). Weiterhin wird die laterale Thorakotomie anstelle der medianen Sternotomie empfohlen, da von Hunden diese besser toleriert wird (Klement et al., 1987). Mit zunehmendem Einsatz der HLM steigen auch die Erfahrungen mit den möglichen Komplikationen, die die Genesung der Patienten aufgrund verschiedener klinischer Organschäden hinauszögern. Die systemischen Entzündungsreaktionen nach EKZ werden unter dem Begriff Postperfusionssyndrom zusammengefasst und dieser Begriff beinhaltet die Nieren- und Lungendysfunktion, die Blutungsneigung, die neurologischen

Veränderungen, gesteigerte Zellmembranpermeabilität mit Ödembildung, Leukozytose sowie Fieber.

Ein großer Nachteil des CPB am Mensch besteht in den neuropsychologischen Defiziten, die bei Kindern noch bis zum 10. Lebensjahr sichtbar werden können. In Prozenten ausgedrückt treten laut Studien 40 % Sprachstörungen, 27 % neurologische Defizite und 6,6 % Intelligenzdefizite auf (Bellinger et al., 1999; Hövels-Gürich, 2002). Bereits 1987 veröffentlichte Ferry eine Reihe von Studien mit akuten postoperativen neurologischen Komplikationen wie Bewusstseinsverlust, Anfällen, motorische Defizite und Bewegungsstörungen. Zu den Langzeitstörungen hingegen zählen Sprach- und Lernstörungen, mentale Entwicklungsstörungen bzw. Unterentwicklung bis hin zu zerebralen Lähmungen (Ferry, 1987). Aufgrund der ähnlichen Physiologie bei Tieren, die hinter dem Einsatz der HLM steht, ist zu vermuten, dass ebenfalls neurologische Defizite auftreten, welche sich eventuell in verändertem Verhalten, z.B. gesteigerter Aggressivität ausdrücken können.

Obwohl der Mechanismus einer postoperativen zerebralen Dysfunktion nach CPB wahrscheinlich multifaktoriell ist, wurden zwei spezifische Hypothesen für die postoperativen Veränderungen der neuronalen Funktion vermutet. Einerseits kommt ein globales Sauerstoffdefizit während des CPB direkt induziert durch die zerebrale Hypoxie in Frage und andererseits kann ein fokales Sauerstoffdefizit durch Embolie vorherrschen (Nollert et al., 2000). Eine zerebrale Dysfunktion steht in engen Zusammenhang mit der Operationsdauer, dem Verwenden von Bubbleoxygenatoren im Gegensatz zu Membranoxygenatoren, der Abwesenheit von arteriellen Filtern, zerebrovaskulärer Schäden und dem Patientenalter, wobei vorwiegend der Membranoxygenator mit integrierter Filtereinheit die Inzidenz von Mikroembolien verringert (Schell et al., 1993).

Als Hauptkomplikation der Lunge treten nach herzchirurgischen Eingriffen mit 70 % Atelektasen auf, da die Lunge während des CPB kollabiert ist und nicht perfundiert wird (Sladen u. Berkowitz, 1993). Diese Atelektasen resultieren in einer Verminderung der funktionellen Residualkapazität und der Compliance (Sladen u. Berkowitz, 1993). Eine weitere Komplikation stellt die Ansammlung von interstitieller Flüssigkeit aufgrund erhöhter Membranpermeabilität dar, welche wiederum zu einer verringerten Compliance, erhöhter Atmungsarbeit und verlängerter Beatmungsdauer führt (Boldt et al., 1990). Zusätzlich ist auch ein Auswaschen und eine verringerte Produktion von Surfactant an den Perfusionsschäden beteiligt (Borghetti et al., 1999).

Das akute Nierenversagen steht mit einer relativ hohen Mortalitätsrate an erster Stelle der gefürchteten Komplikationen nach herzchirurgischen Interventionen. Eine renale Schädigung tritt bei 1,2-13 % der Bypasspatienten auf und ist stark von der Bypasszeit, einem niedrigen Herzminutenvolumen (HMV) (Utley, 1993), einem exzessiven

Blutverlust, einem perioperativen Myokardinfarkt und dem Vasopressoreinsatz vor dem CPB abhängig (Slogoff et al., 1990). Der pathophysiologische Mechanismus ist noch nicht völlig geklärt, aber anhand der experimentellen Modelle zeigt sich ein anfangs verringerter renaler Blutfluss, eine verringerte glomeruläre Filtrationsrate, eine tubuläre Obstruktion und eine Erhöhung der Plasmarenin-Aktivität mit nachfolgender renaler Vasokonstriktion (Borghetti et al., 1999).

2.5 Optimierungsmöglichkeiten des CPB

2.5.1 Hypothermie

Die Hypothermie ist momentan das wirkungsvollste und allgemein akzeptierte Verfahren zur Reduktion des zerebralen Sauerstoffverbrauchs (Barone et al., 1997) und wurde 1941 erstmals eingesetzt (Hewer u. Lee, 1957). Rosomoff und Mitarbeiter (1954) konnten in den 50er Jahren in einer Hundestudie mit einer Temperatursenkung auf 28 °C eine Reduktion der Organschäden deutlich nachweisen. Nach der Reaktions-Geschwindigkeit-Temperatur-Regel ändert sich die Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion in Abhängigkeit von der Temperatur und führt bei homoiothermen Lebewesen bei abnehmender Temperatur zur Verringerung des Energieumsatzes. Bei einer Temperaturdifferenz von 10 °C wird das Verhältnis zweier Stoffwechselraten über den Temperaturkoeffizienten (Q_{10}) bestimmt, was am Beispiel des Gesamtstoffwechsels von 100 % bei 38 °C auf 41 % bei 28 °C einem Q_{10} von 2,4 entspricht. Das bedeutet, dass bei einer Temperaturabnahme um 10 °C sich die Stoffwechselrate und somit der Sauerstoffverbrauch halbiert und die Ischämietoleranz der Gewebe im Gegenzug erhöht (Werner, 1997).

Die therapeutische Hypothermie in Verbindung mit neuroprotektiven Interventionen wird in vier verschiedene Grade eingeteilt: leichte (37-32 °C), moderate (32-28 °C), tiefe (28-15 °C) und profunde (<15 °C) (Marion et al., 1996). Die derzeitige Forschung konzentriert sich vorwiegend auf die leichte bzw. moderate Hypothermie, da nach ersten tierexperimentellen und klinischen Erfahrungen die Reduktion der Körpertemperatur um wenige Grade bereits eine Hirnprotektion bewirkt (Shiozaki et al., 1993; Marion et al., 1993; Werner, 1997). Das Konzept der Hirnprotektion gegenüber hypoxisch / ischämischen Ereignissen scheint auf Mechanismen der Prävention der postischämischen Perfusionsstörungen, Reduktion der Laktatazidose und des Hirnödems, der Suppression verschiedener intrazellulärer katabolischer Prozesse (Lipidperoxidation, Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter bzw. Bildung freier Radikale) zu basieren und reduziert vor allem die histopathologischen Zellschäden in Verbindung mit der Stimulation von Reparaturgenen (Illievich et al., 1994; Baiping et al.,

1994; Karibe et al., 1994). Die Effektivität der Neuroprotektion ist außerdem noch abhängig von der Ischämiezeit, dem Ischämietyp [Stillstand (Arrest) oder Blutflussreduktion (low flow)] und der Unterscheidung zwischen globaler und lokaler Ischämie (Kong et Smith, 2000). Anhand der bisherigen experimentellen Daten zeigt sich, dass ein 30 minütiger totaler Kreislaufstillstand mit einer Temperatur von 18 °C als morphologisch und funktionell sicher gilt (Treasure, 1997; Fessatidis et al., 1993). Bei einer Erhöhung der Arrestzeit auf 45 Minuten ist bei etwa 70% der Fälle mit strukturellen Gehirnschäden, aber nicht mit funktionellen Ausfällen zu rechnen (Knobl et al., 2002).

Die großen Vorteile der Hypothermie stellen die Abnahme der Stoffwechselaktivität und damit die Senkung des Sauerstoffbedarfs dar sowie eine zeitliche Verlängerung der Reserve an energiereichen Phosphaten, was wiederum einer Verlängerung des sicheren Zeitintervalls entspricht. Neben der Reduktion des Struktur- und Funktionsstoffwechsel des Gehirns nimmt auch die Hirndurchblutung infolge der Temperatursenkung ab. Weiterhin verursacht die Hypothermie eine Vasokonstriktion, eine Abnahme der zerebralen metabolischen Sauerstoffrate ($CMRO_2$), einen alkalischen pH und eine Linksverschiebung der Sauerstoffbindungskurve (Laussen, 2002). Unter hypothermen Bedingungen nimmt der Steigungswinkel der Kurve zu und somit verschiebt sich die Kurve nach links, was eine gesteigerte Affinität des Hämoglobins zum Sauerstoff und eine sich verschlechternde Sauerstoffabgabe an das Gewebe bedeutet.

Als positiver Nebeneffekt der Hypothermie zeigt sich ein verminderter Anästhetikumbedarf, da sich bei reduzierten Temperaturen die Aufnahme und Elimination von Inhalationsanästhetika verändert. Gleichzeitig reduziert die Hypothermie den Wert für die minimale alveoläre Konzentration von volatilen Anästhetika und den Bedarf an den meisten intravenösen Hypnotika (Eger et al., 1976).

Als Nachteile der Hypothermie werden eine um die Abkühl- und Aufwärmphase verlängerte Bypasszeit und eine Steigerung der Blutviskosität diskutiert. Die Viskositätssteigerung kann jedoch durch eine Hämodilution kompensiert werden. Mit zunehmender Tiefe und Dauer der Hypothermie steigt jedoch wieder die Gefahr der Schädigung der Organe, da z.B. 15 °C als Kältetoleranzschwelle angesehen wird und das Gehirn den limitierenden Faktor darstellt (Böttger, 1999).

Zusätzlich neigen die Erythrozyten bei niedrigen Temperaturen zur Bildung von Aggregaten, die wiederum die Kapillare bei Reperfusionbeginn verstopfen können und somit das „no reflow phenom“ als einen diskutierten Mechanismus der globalen Ischämie des Gehirns auslösen (Schelkle et al., 2002). Zum einen entnahmen Chiang et al. (1968) aus ihren elektronenmikroskopischen Untersuchungen, dass die Kompression des Gefäßlumens durch die perivaskuläre Glia und Schwellung der Endothelzellen verursacht wird. Zum anderen wurde die Bedeutung des no reflow phenom für die

Entwicklung irreversibler Veränderungen bei der globalen Ischämie in letzter Zeit in Frage gestellt (Brierley et al., 1973; Levy et al., 1975; Harrison et al., 1975), da keine Korrelation zwischen den ischämischen Veränderungen der Nervenzellen und dem Vorhandensein oder Fehlen des no reflow phenomen besteht.

2.5.2 Flussmanagement

Der Blutfluss stellt die entscheidende Größe für die Perfusionsqualität während der EKZ dar, denn er bestimmt, in welcher Zeit wie viel Sauerstoff zu den Geweben transportiert wird. Innerhalb einer Vergleichsstudie zwischen tiefen hypothermischen Arrest und low flow CPB mit 50ml/min zeigten Kinder unter drei Monaten, die einem Arrest unterzogen wurden, in der späteren Entwicklung einen deutlicheren Nachteil in Bezug auf die Entstehung neurologischer Dysfunktion. Als Beweis galten höhere Epilepsieanfallsraten, die klinisch und mittels Elektronenenzephalogramm (EEG) bestätigt werden konnten und bei 26 % der Kinder auftraten. Klinische Schäden hingegen wurden bei 12 % der Kinder festgestellt. Die Autoren konnten weiterhin eine strenge Korrelation zwischen der Arrestdauer und dem Auftreten der Schädigungen aufzeigen (Newburger et al., 1993).

In einer anderen Studie von Kurth et al. (1992) wurden 17 Neonaten auf eine Temperatur von 15 °C abgekühlt und die zerebrale Oxygenierung verbesserte sich mit der Kühlung und verschlechterte sich dann wieder während der Arrestdauer. Der totale Arrest vereinfacht es dem Chirurgen, die komplexen Schäden zu beheben, aber der Stillstand ist mit einem höheren Risiko von klinischen Schäden und längeren Zeitintervallen bis zum Wiedererlangen der EEG Aktivität verbunden (Newburger et al., 1993).

Einige Autoren konnten eine verstärkte Freisetzung von Laktat im Anschluss an die Arrestphase aufzeigen, woraus sie schlussfolgerten, dass der aerobe zerebrale Metabolismus möglicherweise, im Gegensatz zu Laktatfreisetzungen bei low flow CPB gestört ist (van der Linden et al., 1993).

2.5.3 Flüssigkeitsmanagement

In den Anfangszeiten der Kardiochirurgie des Menschen kam vorwiegend Blut zur Füllung der HLM in Frage, wobei das Primingvolumen der HLM im Durchschnitt 3-5 Liter betrug. Die daraus resultierende Hauptkomplikation, die Unverträglichkeitsreaktion zwischen den verschiedenen Blutkonserven, wurde durch den Einsatz blutfreier Lösungen in den sechziger Jahren in den Hintergrund gedrängt. Aufgrund der Weiterentwicklung der einzelnen HLM-Komponenten konnte das Primingvolumen reduziert werden, was den Einsatz von Vollblut nicht mehr unbedingt erforderlich machte. In einigen Fällen reicht aber die Sauerstoffbindungskapazität der neuen Priminglösung wie z.B. Gelafundin oder Haes nicht aus und Vollblut wird wieder erforderlich.

Ab welchem Hämatokrit (Hkt) eine Bluttransfusion angezeigt ist, wird unterschiedlich beantwortet, aber als genereller Richtwert gilt $Hkt < 20\%$. In der Herzchirurgie kommt die indirekte Transfusion zum Einsatz und zwischen Blutentnahme und Blutübertragung steht die Ungerinnbarmachung des Blutes durch Zusatz von Antikoagulantien bzw. die Verzögerung der Gerinnung. Das Ziel der Konservierung ist die Aufrechterhaltung der biologischen Funktion der Blutbestandteile, der Ausschluss der Koagulation bzw. einer eventuellen Infektion des Blutes und eine möglichst lange Hämolyseverzögerung (Dietz u. Nagel, 1959). Dazu werden dem Blut so genannte Stabilisatorlösungen zugesetzt, welche der Gerinnungshemmung und Ernährung dienen. Mit der Einführung von Natriumcitrat als Gerinnungshemmer wird der Beginn der Blutkonservierung eingeleitet (Benedum, 1988). Der ionisierte Kalziumkomplex wird vom Citrat gebunden und stoppt auf diese Weise die kalziumabhängigen Schritte der Blutgerinnung. Zur Aufrechterhaltung des Energiestoffwechsels der konservierten Zellen erfolgt der Zusatz von Glukose in der Additivlösung (Hartmann u. Staufenbiel, 1995; Hunt u. Moore, 1990).

2.5.4 Blutgasmanagement

Es kommen zwei verschiedene Verfahren zur Steuerung des Säure-Basen-Haushaltes während der EKZ zum Einsatz, obwohl in den Anfangszeiten der Herzchirurgie mit EKZ die pH-stat Methode am häufigsten verwendet wurde. In den achtziger Jahren ging der Trend in Richtung α -stat, mit dem Ziel, eine umfassende Hirnperfusion zu sichern.

Bei dem pH-stat Verfahren werden die Blutwerte bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ gemessen, auf die aktuelle Körpertemperatur korrigiert, wobei die bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ geltenden Normalwerte anzustreben sind. Im Gegensatz dazu geht man bei dem α -stat Verfahren davon aus, dass in verschiedenen Geweben temperaturabhängige $p\text{CO}_2$ und pH-Werte existieren. Bei einer Bluttemperatur von $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ werden der pH-Wert mit 7,4 und der $p\text{CO}_2$ mit 40 mmHg als normal angesehen (Davies, 1993). Mit abnehmender Temperatur kann CO_2 besser physikalisch gelöst werden und der $p\text{CO}_2$ sinkt (Davies, 1993). Infolgedessen verschiebt sich pro $^{\circ}\text{C}$ Temperatursenkung der pH-Wert des Blutes um 0,015 mmHg in Richtung Alkalose (Rahn, 1974).

Trotz der erhöhten Löslichkeit von CO_2 im Plasma unter hypothermen Bedingungen, wird bei der Anwendung des pH-stat Verfahrens eine relative Hyperkapnie und eine Azidose ausgelöst. Die aus dem Anstieg von CO_2 resultierende Hyperkapnie bewirkt eine deutliche zerebralen Vasodilatation und eine Aufhebung der zerebralen Autoregulation. Die Vorteile dieser Perfusion liegen in einer effektiveren zerebralen Kühlung durch die bessere Perfusatverteilung und einer Rechtsverschiebung der Sauerstoffbindungskurve, durch welche die Hypothermie induzierte Linksverschiebung vermindert wird (Kern u. Greeley, 1995). Ein positiver Effekt der Rechtsverschiebung besteht in der besseren

Sauerstoffabgabe an das Gewebe (Laussen, 2002). Jonas und Mitarbeiter (1993) beschreiben einen besseren zerebralen Schutz verbunden mit einem verbesserten neurologischen Outcome unter Verwendung der pH-stat Methode. Sie begründen das aufgrund der verbesserten Gehirnkühlung und dem erhöhten zerebralen Blutfluss. Der diskutierte Nachteil beruht auf der verstärkten Möglichkeit der Entstehung von Mikroembolien und Hirnödemen mit kombiniertem Anstieg der intrakraniellen Hypertension. (Kofstad, 1996) und dem erhöhten Sauerstoffverbrauch (Willford et al., 1990) verschlechterte Herzfunktion (Kern u. Greeley, 1995) und der Azidose. Während und nach der Erwärmungsphase müssen der niedrige pH-Wert, der CO_2 und der pCO_2 auf normale Werte korrigiert werden. In Verbindung mit der Azidose nach Kreislaufstillstand steht auch die erhöhte metabolische Schädigung des Gehirns während der Aufwärmphase (Kern u. Greeley, 1995).

Der intrazellulär gemessene pH-Wert bei verschiedenen Tieren zeigt eine korrelierende Veränderung mit der Temperatur (Malan et al., 1976). Wechselwarme Tiere können den p_aCO_2 Sollwert temperaturabhängig einstellen (Hickey u. Hansen, 1989). Bei einer Hypothermie mit hypokapnischen p_aCO_2 und alkalischen pH unter α -stat stellt der Imidazolring der Histidinanteile in den Blutproteinen den wichtigsten Puffer dar. Die Fraktion der unproteinierten Imidazolgruppen, bekannt als α , bleibt konstant und unter diesen Bedingungen bleibt der CO_2 -Gehalt des Organismus konstant und der pH ändert sich temperaturabhängig. Das Puffersystem erlaubt eine konstante Rate von OH^-/H^+ im Blut mit einem durchschnittlichen Verhältnis von 16:1 über eine große Temperaturspanne. Diese konstante intrazelluläre elektrochemische Neutralität scheint essentiell für die normale Zellfunktionen zu sein (Hickey u. Hansen, 1989; Nattie, 1990). Das α -stat Verfahren ermöglicht die Aufrechterhaltung des physiologischen pH-Wertes im Intrazellulärraum und die Aufrechterhaltung der zerebralen Autoregulation.

Der große Vorteil des pH-stat Verfahrens wiederum liegt in der Luxusperfusion des Gehirns und der besseren Kühlung (Greeley et al., 1991; Venn et al., 1995), im Gegensatz zu niedrigeren Hämoglobin-(Hb) und Oxyhämoglobin-(HbO_2) Werten während der Kühlung mittels α -stat, was auf ein ungenügendes zerebrales Blutangebot und ungenügende Oxygenierung hinweist (Sakamoto et al., 2002).

Verschiedene Herzzentren verwenden auch eine Kombination aus beiden Verfahren, in Form von pH-stat in der Abkühlungsphase und α -stat in der Stillstands oder low flow Phase und in der Aufwärmphase. Diese Kombination von kurzen pH-stat Perioden initial zur Kühlung und im Anschluss α -stat zur Minimierung der Azidose und der Gewebeschädigung und wird im Moment als die am wenigsten schädliche Wahl des Blutgasmanagements eingestuft (Kern u. Greeley, 1995).

2.5.5 Zerebrale Autoregulation

Das Gehirn besitzt die Fähigkeit, die Hirnperfusion innerhalb eines breiten Blutdruckbereiches konstant halten zu können und sich damit optimal den metabolischen Bedürfnissen der Neuronen und Neuroglia bzw. dem Substratangebot anzupassen. Unter physiologischen Bedingungen wurde der „autoregulatorische Bereich“ der mittleren arteriellen Drücke zwischen 60 mmHg und 150 mmHg ermittelt (Paulson et al., 1990). Erst unterhalb dieser Autoregulationsgrenze kommt es über die maximale Gefäßdilatation hinaus bei weiterer Senkung des Perfusionsdruckes zum Gefäßkollaps bzw. zum Perfusionsstillstand. Umgekehrt bewirken Werte über 150 mmHg Gefäßwandschäden, Störungen der Blut-Hirn-Schranke mit konsekutivem, vasogenem Ödem (Heckmann et al., 2001).

Jegliche Störung der Autoregulation trägt zu einem ungünstigen neuronalen Ergebnis bei (Czosnyka et al., 2001), so dass der Status der Autoregulation sogar als Marker für Schäden des zentralen Nervensystems angesehen wird (Neri et al., 2004). Verschiedene Autoren zeigen anhand von Untersuchungen bei hypothermen CPB mit und ohne low flow, dass bei Temperaturen unter 20 °C der zerebrale Perfusionsdruck (CPP) nicht mehr autoreguliert wird (Pua u. Bissonnette, 1998; Greeley et al., 1989).

Weiterhin zeigte sich unter Verwendung des α -stat Verfahrens eine Aufrechterhaltung der Autoregulation bei Drücken bis zu 30 mmHg oder sogar 20 mmHg (Govier et al., 1984; Murkin et al., 1987), gleichzeitig aber auch ein Verlust der Autoregulation bei pH-stat Verfahren (Stephan et al., 1992).

2.6 Pathophysiologie der zerebralen Ischämie

2.6.1 Gehirnstoffwechsel

Eine Verminderung der Durchblutung des Gehirns bis hin zur zerebralen Ischämie führt je nach Dauer und Ausprägung zu unterschiedlichen Gewebsschädigungen. Ursachen einer solchen Ischämie basieren vorwiegend auf thromboembolischen und hämodynamischen Insulten.

Das Gehirn benötigt trotz seines geringen Anteils von 2 % an der Körpermasse (KM) ca. 20 % des Herzminutenvolumens, um seinen enormen Sauerstoff- und Energieverbrauch decken zu können. (Siesjö, 1984). Da es nicht über große Energiereserven verfügt, führt eine Abnahme des zerebralen Blutflusses (CBF) zu neuronalen Funktions- und später auch zu Strukturausfällen. Fällt die regionale Durchblutung bezogen auf die Gehirnmasse (GM) und ausgehend vom Normalwert der Hirndurchblutung von 80ml/100g GM/min auf temporär 20 ml/100 g GM/min, so kommt es zu neuronalen Funktionsstörungen, welche

sich als reversibel beim Wiederanstieg der Durchblutung erweisen. Unterhalb eines Durchblutungswertes von 20 ml/100 g GM/min also 25 % treten EEG Ausfälle, Verluste von evozierten Potentialen und ein Sistieren der elektrischen Aktivität kortikaler Neurone auf. Ein Ausfall der Proteinsynthese zeigt sich hingegen schon bei einer Hirndurchblutung von unter 55 ml/100 g GM/min (Oertel, 1994).

Für die Entwicklung morphologischer und somit irreversibler struktureller Schäden sind als zweiter Faktor die Zeitdauer der initialen Durchblutungsstörung von Bedeutung. Somit verursacht eine globale Ischämie infolge eines Herzstillstandes bei normaler Körpertemperatur innerhalb kürzester Zeit (etwa 10 min) einen zum Zelluntergang führenden Schaden (Safar, 1993). Das Ausmaß der globalen Hirnischämie verursacht durch die notwendige Unterbrechung des Blutflusses unter Einsatz der HLM bei kardiochirurgischen Eingriffen ist daher abhängig von der Körpertemperatur, dem HLM-Fluss, der Operationszeit und der daraus resultierenden Aortenklemmzeit.

Neben globalen Hirnischämien führen nicht selten Verschlüsse einzelner Hirnarterien (z.B. Okklusion der Arteria cerebri media) zu lokalen Ischämien innerhalb ihres Versorgungsgebietes. Im Infarktkern, dem zentralen Bezirk in dem keine Durchblutung mehr vorhanden ist (totale Ischämie), entwickelt sich rasch eine irreversible Gewebsschädigung. In der Peripherie schließt sich eine Zone mit einer Restdurchblutung an, welche von Astrup und Mitarbeitern (1981) als Penumbra (ischämischer Halbschatten) bezeichnet wird und in der sich die Schädigung in Abhängigkeit von der Residualdurchblutung langsamer entwickelt. Der Bezirk der totalen Ischämie wird irreversibel geschädigt innerhalb 20-25 min bei Affen und bei Katzen (Heiss, 1991; 1997) bzw. bei Primaten 30-60 min (Siesjö, 1992a), wobei in der Penumbra region des Funktionsstoffwechsel erloschen ist obwohl der Strukturstoffwechsel der Zellen erhalten bleibt (Siesjö, 1992a; Kempinski, 1994). Wichtig ist dabei, dass nur 10-20 % der Energie für die Strukturhaltung (Ionen transport, Membranpotential, Synthese von Eiweißen und Transmittern) und dagegen 80-90 % für die Funktionserhaltung verbraucht werden. Infolge eines Arterienverschlusses verringert sich die Durchblutung im Versorgungsgebiet auf unter 30 %, obwohl der Sauerstoffverbrauch aufgrund der erhöhten Sauerstoffextraktion noch auf einem Grundlevel aufrecht gehalten werden kann, was als Hinweis auf eine Penumbra region zu werten ist. Im weiteren Verlauf bricht die Sauerstoffversorgung zusammen und eine Kaskade pathophysiologischer Prozesse wird ausgelöst an deren Ende eine vom Infarktkern ausgehende Nekrose der Neurone und Gliazellen steht. Das Randzonengebiet ist noch von einer erhöhten Sauerstoffextraktion gekennzeichnet und weist demzufolge noch vitales Gewebe auf.

Die Pathophysiologie der zerebralen Ischämie ist für lokale und globale Ischämien gleich und nur das Ausmaß unterscheidet sich. Pathophysiologisch unterscheidet man die

primären und sekundären Hirnschädigungen. Die Primärschädigung stellt die unmittelbare Folge der Blutflussreduktion in Form von Zellschädigungen dar und wird im Ausmaß von dem Schweregrad der Ischämie bestimmt. Die sekundären Schäden des Gehirns ergeben sich aus den Primärschäden an Herz und Gefäßen während der Ischämie und beruhen auf dem verzögerten Wiedereintritt der normalen Verhältnisse und der pathophysiologischen Prozesse in der Reperfusionphase.

2.6.2 Pathophysiologie der Ischämiephase

Die Verminderung des zerebralen Blutflusses zieht als direkte Folge eine Abnahme des Sauerstoff- und Substratangebots nach sich. Als Reaktion stellt der Organismus innerhalb von 2-4 Minuten die Energieproduktion auf die anaerobe Glykolyse um und daraufhin folgt innerhalb von 4-5 Minuten die völlige Entleerung der Adenosintriphosphat (ATP)-Reserven und dem daraus resultierenden vollständigen Stoppen aller energieabhängigen Reaktionen mit Reduktion des pH-Wertes und Anstieg von Laktat (Siesjö, 1976). Somit entsteht ein ATP- und Phosphokreatinmangel bei gleichzeitiger Anhäufung der Abbauprodukte Adenosindiphosphat (ADP), Adenosinmonophosphat (AMP) und Adenosin. Adenosin wird über Inosin zu Hypoxanthin metabolisiert. Unter Sauerstoffzufuhr in der Reperfusionphase und unter Einfluss der Xanthinoxidase entstehen Xanthin und freie Radikale, die ihrerseits zytotoxisch wirken (Traystman et al., 1991).

Der ATP-Mangel verursacht eine Verschiebung des Ionengleichgewichtes, da die energieabhängigen Ionenpumpen wie z.B. die Na^+/K^+ ATPase versagen und somit ein erhöhter intrazellulärer Gehalt an Natrium, Kalzium und Chlorid entsteht (Kuroda und Siesjö, 1997). Diese Änderung des osmotischen Gradienten zwischen Intra- und Extrazellulärraum führt zu einem dem Konzentrationsgradienten folgendem Wassereinstrom in die Zelle. Dieser Wassereinstrom verursacht wiederum ein intrazelluläres, reversibles zytotoxisches Ödem, welches im Gegensatz zum vasogenen Ödem der Reperfusionphase, nicht in Zusammenhang mit einer Schädigung der Bluthirnschranke steht (Baethmann et al., 1991).

Der starke intrazelluläre Natriumgehalt führt zu einer Aktivierung des durch den elektrochemischen Na-Gradienten getriebenen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauschers und stellt daher eine Ursache für die hohe intrazelluläre Kalziumkonzentration dar. Die Ionengradienten zwischen Intra- und Extrazellulärraum können nicht mehr aufrechterhalten werden, das Membranpotential bricht zusammen und daraus resultiert die sich anschließende Depolarisation der Neuronen (= spreading depression). Infolge dieser Depolarisation wird vermehrt die exzitotoxische Aminosäure Glutamat als exzitatorischer Neurotransmitter aus den präsynaptischen Nervenendigungen freigesetzt.

Zusätzlich verursacht der Energiemangel eine Wiederaufnahmestörung für Glutamat im Bereich der Präsynapse und in die Gliazellen (Hamann, 1997). Das freigesetzte Glutamat aktiviert Glutamatrezeptoren mit assoziierten Ionenkanälen (NMDA, AMPA, Kainate-Rezeptor) und Ionenkanalunabhängige metabotrope Rezeptoren (mglu₁₋₈).

Nach ausreichender Depolarisation wird Magnesium, welches im Normalzustand den NMDA-Rezeptor blockiert, von diesem ionotropen Rezeptor verdrängt und nach Bindung von Glutamat öffnet sich der Ionenkanal und Kalzium-Ionen strömen in die Zelle und aktivieren über Calmodulin die (NO)-Synthetase (Klimm et al., 1992). Unter physiologischen Bedingungen ist die geringe physiologische Konzentration an NO für das Gehirn nicht toxisch, sondern kann Informationen zwischen parallel verlaufenden Nervenbahnen (vor allem Kleinhirn) übertragen (Klimm et al., 1992). In Anwesenheit von Superoxiden während der Reperfusion, die bei Stimulation des AMPA-Rezeptors durch Glutamat generiert werden (Kontos, 2001), reagiert NO zu Peroxynitrit, einer für Neurone hochtoxischen Substanz, die Membranschäden verursacht (Nolte et al., 2002) und zur Nitrosylierung von Tyrosinresten führt.

Bei der Glutamatstimulation Ionenkanalunabhängiger metabotroper Rezeptoren (mglu₁₋₈) wird die Phospholipase C aktiviert, welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Inositoltriphosphat und Diacylglycerin (DAG) spaltet. Diacylglycerin wiederum aktiviert die Proteinkinase C (PK C) während Inositoltriphosphat die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern wie z.B. dem endoplasmatischen Retikulum (ER) speichert (Zivin, 1991). Der Kalziumoverload übersteigt aufgrund des erhöhten Einstroms und der Freisetzung aus dem ER seine Kapazität für Kalzium innerhalb der Zelle (Kristian und Siesjö, 1998) und bewirkt die Induktion einer Reihe von Enzymen (Phospholipase A₂ (PL A₂), PK C, Proteasen, Endonukleasen und Calpainen) und den damit verbundenen sekundären Zellschäden am Ende der Ischämie bzw. in der Reperfusion (Hamann, 1997).

Der Effekt der Proteaseaktivierung resultiert in der Proteolyse, wodurch die Plasmamembran ihre Verankerung im Zytoskelett verliert, was zu Veränderungen der Plasmapermeabilität oder sogar zu Rupturen dieser führen kann (Siesjö, 1988). Calpain, als eine von Kalzium aktivierte Proteinase, deren proteolytische Aktivität gegen das Zytoskelett gerichtet ist, bewirkt ein Aufbrechen des Zytoskeletts mit der Zerstörung von Spektrin und Mikrotubuli (Hamann, 1997). Ein Ansteigen von Calpainen zeigt in fokalen Ischämie-Modellen das Gebiet der zerebralen Ischämie an (Liebetrau et al., 1999).

Die zelleigenen Endonukleasen verursachen eine Fragmentierung der Desoxyribonukleinsäuren (Crow et al., 2002).

Die Proteinkinase C, welche durch DAG aktiviert wird (Kristian und Siesjö, 1998), phosphoryliert Serin- und Threoninreste von Proteinen und ändert somit deren

Funktionszustand. Diese Eiweißphosphorylierung kann sich sowohl positiv als auch negativ auf die Proteinsynthese verschiedener Arten von Proteinen auswirken.

Die allgemeine Funktion der Phospholipase A₂ besteht in der Freisetzung von Arachidonsäure (Crow et al., 2002) aus Phospholipiden und Triglyceriden der Zellmembran. Während der Reperfusion erfolgt die Metabolisierung der in der Ischämiephase akkumulierten Arachidonsäuren über den Lipoxygenaseweg und den Cyclooxygenaseweg mit der Produktion von Leukotrienen, Thromboxanen, Prostaglandinen und Superoxiden (Traystman et al., 1991). Die mitochondrial aktivierte PL A₂ führt zum Aufbrechen der Lipidschicht der inneren Mitochondrienmembran und bewirkt somit einen nichtspezifischen Anstieg der Membranpermeabilität und eine Störung der oxidativen Phosphorylierung (Kristian et Siesjö, 1998).

Die Aktivierung solcher kataboler Enzymsysteme induziert den Untergang neuronaler, glialer und vaskulärer Membranen des Gehirns, woraus zwei verschiedene Formen des Zelluntergangs resultieren. Versagen primär alle metabolischen Prozesse bzw. kommt es zu einem Zusammenbruch der zellulären Energieversorgung, spricht man von einem akuten Zelltod (Nekrose). Aufgrund der schon beschriebenen erhöhten Membranpermeabilität imponiert die nekrotische Zelle morphologisch zuerst mit einer Zellschwellung. Daran schließt sich ein Auflösungsprozess mit einer Dekondensation des Chromatins und einer Freisetzung von Zellorganellen in den Extrazellulärraum an (Padosch et al., 2001). Kerr und Mitarbeiter prägten 1972 erstmals den Begriff Apoptose als eine Form des aktiven, energieverbrauchenden, programmierten Zelltod als Abgrenzung gegenüber dem schnellen nekrotischen Zelluntergang. Nach Stunden oder sogar Tagen erfolgt ein Abbau der Kernmembran in Verbindung mit einer Kondensation des Chromatins und einer Fragmentierung der DNA. Im Anschluß daran schnüren sich membranumschlossene Vesikel (apoptotic bodies) ab, welche von benachbarten Zellen phagozytiert werden, ohne eine inflammatorische Begleitreaktion auszulösen (Padosch et al., 2001).

2.6.3 Pathophysiologie der Reperfusionsphase

Innerhalb der ersten Studien ging die Mehrzahl der Autoren davon aus, dass mit dem Beginn der Reperfusion eine sofortige Funktionsaufnahme des Stoffwechsels und eine Regeneration des Gewebes auftritt. Diese Meinung konnte jedoch nur begrenzt bestätigt werden, in dem nach wenigen Reperfusionsminuten zwar die erwartete Erholung eintritt, welcher aber zur Enzymsynthese und deren Expression erst eine gewisse Anlaufzeit vorgeschaltet sein muß. Die erwartete Erholung setzt jedoch nicht so schnell ein wie zunächst angenommen, sondern benötigt zur Restitutio ad integrum meist mehr als 24 Stunden. Verschiedene Autoren stellen innerhalb der Reperfusion sogar eine

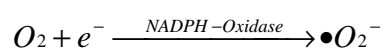
Vergrößerung des Infarktgebietes (Engler u. Gilpin, 1989) bzw. strukturelle Veränderungen bis hin zur Nekrose fest (Sato et al., 1993). Eine Zuordnung der verschiedenen zellulären Auswirkungen zur Ischämie- oder Reperfusionphase gestaltet sich als sehr schwierig, da sich eventuell einige ischämiebedingte Schäden erst in der Reperfusion manifestieren (Klein et al., 1996).

Aus pathophysiologischer Sicht wird mit dem Zeitpunkt der Reoxygenierung innerhalb der Reperfusion dem Kreislauf wieder Sauerstoff angeboten, welcher als Substrat für die enzymatischen Oxidationsreaktionen dient. Selbst unter normalen physiologischen Bedingungen wird eine geringe Menge (2-5%) an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gebildet (Chan, 1996), die über endogene antioxidative Mechanismen, sogenannte Radikalfänger [Superoxiddismutase (SOD), Katalase, Glutathion, Ascorbinsäure, Vitamin E, Katecholamine und β -Carotin] inaktiviert werden.

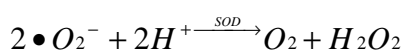
Zum Zeitpunkt der Reoxygenierung werden mehr ROS gebildet, da die antioxidative Kapazität der Radikalfänger überschritten wird. Eine Störung des Gleichgewichts zwischen Radikalbildung und Radikalentfernung im reperfundierten Gewebe, aufgrund einer verstärkten Radikalproduktion oder einem Mangel bzw. Defekt der endogenen und alimentären Schutzfaktoren, kann radikalbedingte Schäden an Membranen und DNA nach sich ziehen (Becker et al., 1993). An der Bildung von Superoxid-Radikalen und Wasserstoffperoxid in der Ischämiephase und zum großen Teil zu Beginn der Reoxygenierung sind neben den mitochondrialen Enzymen auch die Xanthinoxidase, die Monoaminoxidase und die NO-Synthetase (NOS) maßgebend beteiligt (Becker et al., 1993).

In verschiedenen Studien wurde bereits gezeigt, dass Peroxinitrit und Superoxidanionen einen primären Mediator für DNA-Strangbrüche darstellt, welche wiederum eine Aktivierung der Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) hervorrufen (Narasimhan et al., 2003; Soriano et al., 2001). PARP ist ein im Zellkern befindliches DNA-Reperaturenzym, welches in der Lage ist, an die Bruchstellen der DNA-Stränge zu binden und die Schäden zu korrigieren. Die Aktivierung von PARP führt jedoch zu einer Entleerung des NAD und ATP-Pools und resultiert somit in einem nekrotischen Zelltod durch Verlust der schon verminderten Energiereserven (Narasimhan et al., 2003).

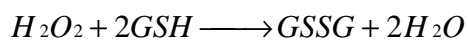
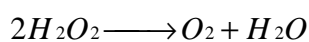
Bei der oxidativen „burst“-Reaktion aktivierter Monozyten und Granulozyten, welche zu den bedeutenden Quellen der ROS zählen, entsteht mit Hilfe des Enzyms NADPH-Oxidase lokal in hohen Konzentrationen Superoxid.



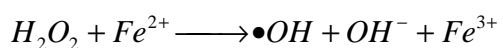
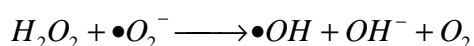
Die Konzentration der Superoxide wiederum ist abhängig von der Dauer der vorangegangenen Ischämiephase, wobei keine Superoxidproduktion während kompletter Ischämie, aufgrund des Sauerstoffmangels zu beobachten ist (Kontos, 2001). Unter dem Einfluss der Superoxiddismutase, die im Zytosol hauptsächlich als Kupfer-Zink-Superoxiddismutase (CuZnSOD) und innerhalb der Mitochondrienmatrix als Mangansuperoxiddismutase (MnSOD) vorkommt, wird Superoxid abgebaut. Vor allem die CuZnSOD trägt extensiv zur Reduktion der Gehirngewebsschäden bei (Chan, 1996). Es konnten sogar die Wirkung der SOD in Bezug auf die Lokalisation noch auf den CA1 Bereich im Hippocampus spezifiziert werden (Abe et al., 1995).



Der Abbau von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) kann zum einen unter dem Einfluss der Katalase zu Sauerstoff und Wasser (Kappus und Sies, 1981) und zum anderen durch die Reaktion mit Gluthation unter dem Einfluss der Gluthationperoxidase mit Selen als Coenzym zu oxidiertem Gluthation und Wasser erfolgen.



Zwei weitere Möglichkeiten zum Abbau des H_2O_2 bestehen in der Haber-Weiss-Reaktion und der Fenton-Reaktion, obwohl bei beiden Reaktionen H_2O_2 abgebaut wird, aber dafür das hochreaktive Hydroxylradikal entsteht (Chan, 1996).



Die Bildung freier Radikale und die Aktivierung der Phospholipasen resultiert in der Lipidperoxidation mit Zerstörung der Zellmembran (Bariskaner et al., 2002). Malondialdehyd (MDA) wird beim Zerfall der Endoperoxide während des letzten Schrittes der Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren der Zellmembran gebildet (Dib et al., 2002; Bariskaner et al., 2002), die chemisch instabil sind und in Aldehyde wie MDA zerfallen.

Obwohl, dass es für einige Zellen letal enden kann, ist eine zügige Reperfusion zum Überleben des gesamten Organismus elementar. Für die Langzeitprognose bedeutet

dies, dass eine schnelle und effektive Reperfusion zur Minimierung von Schäden beiträgt (Rohs et al., 1997).

Die Schädigung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) geht mit einer erhöhten Permeabilität für Plasmaproteine einher und bewirkt eine vasogene Ödembildung und einen Anstieg des intrakraniellen Druck (Kontos, 2001). Zuckermann und Mitarbeiter (1994) konnten in einer Studie an Schweinen mit einer 20-minütigen globalen zerebralen Ischämiephase und zwei Stunden Reperfusion schon Permeabilitätssteigerungen der BHS nachweisen. Anhand in vitro Studien verursacht möglicherweise die durch ROS induzierte Membran-Lipidperoxidation diese Barrieredysfunktion der BHS (Schröter, 1998).

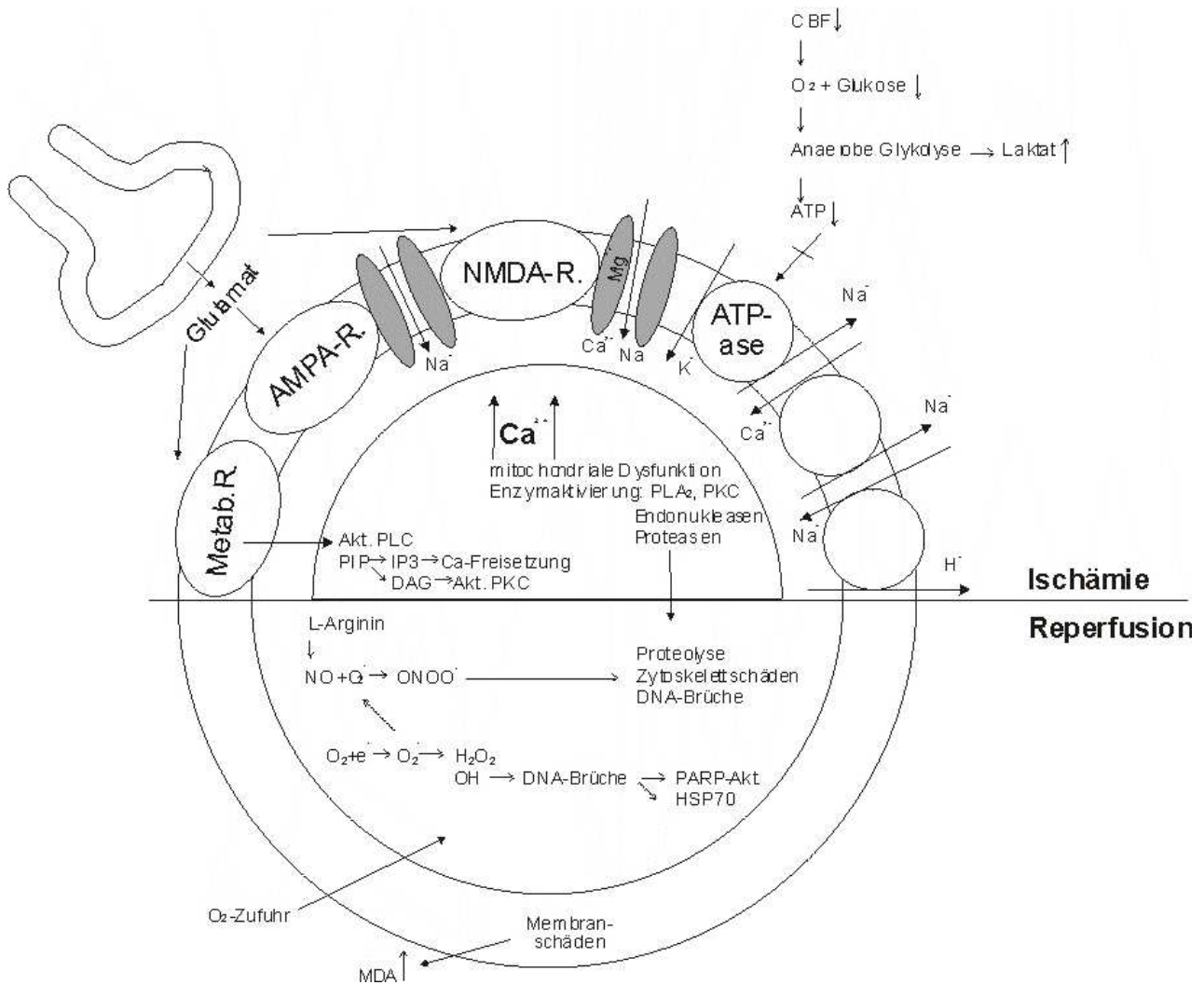


Abb. 1: Schematische Darstellung der pathophysiologischen Mechanismen in bzw. auf die Nervenzellen während Ischämie und Reperfusion

Nicht allein die BHS, sondern auch die Gehirnmorphologie zählt zu den späteren Ischämie- bzw. Reperfusionsschäden. Die globale Ischämie des Gehirns weist eine große Variationsbreite an Hirnveränderungen auf, die sich häufig als multifokal und symmetrisch darstellen. Zu den Prädilektionsstellen des Gehirns zählen Hippocampus, Kleinhirn, Thalamus und intermediäre Schicht des Kortex (Doerr et al., 1980).

Der Hippocampus als eine der Wasserscheidenregionen, also eine Region mit grenzwertiger Perfusion (Harrison, 2000) wird bei Blutflussreduktion mit einem verminderten Sauerstoffangebot versorgt, da er aufgrund der Architektur des Gefäßbettes zu den Endstromgebieten zählt. Pulsinelli und Mitarbeiter (1979) sowie Kirino und Kollegen (1984) konnten sogar die ischämische Vulnerabilität noch auf neocorticale Neurone der Schichten 3, 5, 6 die Pyramidenzellen des CA1 des Hippocampus, kleine bis mittelgroße Striatalneurone und zerebelläre Portinzellen eingrenzen.

Nicht nur die Gehirnanteile sondern auch die einzelnen Hirngewebssteile sind in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoffmangel unterschiedlich. Aufgrund der hohen Umsatzrate der Oxidationsprozesse reagieren Nervenzellen am empfindlichsten und am unempfindlichsten die mesenchymalen Gewebsanteile wie z.B. Mikroglia (Doerr et al., 1980).

Die lichtmikroskopisch typischen Nervenzellveränderungen in Form von Auflockerung der Nissl-Substanz und einer leichten Zellblähung beginnen bereits nach 20 min und gelten in einem Zeitraum von wenigen Stunden auch noch als reversibel (Doerr et al., 1980). Ultrastrukturell wird eine Verklumpung des Nervenzellchromatins sichtbar, woran sich eine Schrumpfung des Zytoplasmas und des Zellkerns anschließt und zu der charakteristischen Dreiecksform führt (Roggendorf, 1995). Bevor die Zellschrumpfung ihr Ausmaß erreicht hat, werden von der Zellperipherie her kleine Vakuolen sichtbar, die rasch auf den gesamten Zelleib übergreifen. Fessatidis et al. (1993) beschrieben innerhalb ihrer Studie ebenfalls eine Mikrovakuolenbildung im Zytoplasma der Purkinje Zellen des Kleinhirns. Anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen konnte sie zeigen, dass die Vakuolen dilatierte Zisternen und Vesikel des glatten und rauen endoplasmatischen Retikulums und geschwollene Mitochondrien repräsentieren (Fessatidis et al., 1993). Nach frühestens 7 Stunden treten eosinophile Zytoplasmaveränderungen auf. Conroy und Kollegen (2001) weisen in ihrer Studie noch auf histologische Veränderungen in Form von inflammatorischen Infiltraten (polynukleäre Zellen um die Gefäße, Mikroglia im Parenchym und Makrophagen), vaskuläre Proliferation oder Kavitation.

2.6.4 Chaperone als zelluläre Reparaturmechanismen

Der Begriff „chaperone“ wurde in den späten siebziger Jahren für die funktionelle Bedeutung von Nukleoplasmin bei der Reassoziaton von Nukleosomen geprägt und sollte zum Ausdruck bringen, dass die Aufgabe des Proteins darin besteht, unerwünschte oder schädigende Begegnungen eines zu schützenden, labilen oder entfalteten Proteins mit unpassenden Partnern zu verhindern (Laskey et al., 1978). Nach dem heutigen Kenntnisstand sind chaperone für Transkription, Translation, sowie Strukturerehalt von Zellen, Zytoskelett und Membran zuständig. (Aufricht et al., 1998; De Maio, 1999; Hartl, 1996) Chaperone können z.B. auch Proteine in geeignete Faltungszustände für transmembranöse Transporte bringen, wobei meist aber eine kontrollierte Entfaltung der Proteinstruktur notwendig ist (Burel et al, 1992; De Maio, 1999; Burston et al., 1995). Neben vielen noch unklaren Stimuli gibt es eine Vielzahl bekannter und schon erforschter pathologischer Reize zur Aktivierung von Chaperonen wie z.B. Hypoxie, mechanische

und metabolische Belastung der Zelle mit pH-Abfall, ATP-Abfall, Strukturverlust der Proteine, falsch aggregierte Proteine, Hyperthermie, bakterielle Infekte, NO-Erhöhung und Kalziumerhöhung.

2.6.4.1 Familie der Heat-shock-proteine (HSP)

Eine zelluläre Antwort auf Hitzeschock wurde erstmals 1962 aufgrund von Veränderungen in den „puff“ Mustern der Riesenchromosomen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt (Ritossa, 1962). Sie traten nach hitzebedingtem Stress auf und wurden daher als Hitzeschockproteine bezeichnet. Tissieres und Mitarbeiter (1974) beschreiben HSP in Fruchtfliegen, wobei bestimmte Proteine in der Fliegenlarve bei Hitzeschock überproduziert werden. Nach der heutigen Literatur führen Hitze, Ischämie, Schwermetalle, niedriger pH-Wert und Hypoglykämie zur Aktivierung von HSP (Lindquist, 1992; Brown, 1995; Morimoto et al., 1997; Welch und Gambetti, 1998), obwohl die Anwesenheit von denaturierten Proteinen den Hauptstimulus für die HSP Induktion darstellt (Ananthan et al., 1986).

Morimoto (1993) beschreibt eine HSP-Bildung aufgrund von Abwehrreaktionen auf plötzliche Milieu-Veränderungen, wie z.B. Sauerstoffmangel, Stoffwechseleränderungen oder toxische Chemikalien. Weiterhin zeigt sich, dass die ausgeschüttete Menge an Reparaturenzymen einen guten Hinweis auf das Ausmaß der Schädigung darstellt (Welch, 1987).

Hitzeschockproteine sind also eine Familie von Proteinen, die bei der intrazellulären Stressantwort exprimiert werden, ATP-abhängig sind und einen geregelten induzierbaren Abwehrmechanismus der Zelle darstellen. Sie sind als Begleitsubstanzen mit schlecht gefalteten Proteinen assoziiert (Hartl, 1996) und verhindern die Aggregation dieser Proteine zu größeren, schädigenden Komplexen (Dillmann u. Mestril, 1995). Anhand ihrer relativen Molekülmasse in kDa werden sie in fünf Hauptgruppen eingeteilt (Knowlton et al., 1991). Die leichtesten HSP wiegen 20-30 kDa, die übrigen Gruppen um die 50-60, 70, 90 und 100 kDa, wobei man von ungefähren Massen spricht, da gleich reagierende Proteine etwa gleichen Gewichts zusammengefasst werden.

2.6.4.2 HSP70-Familie

Die HSP70-Familie stellt die größte Gruppe mit den meisten Vertretern dar und ist nach der Vielzahl von Studien auch die am intensivsten untersuchte Gruppe. Es handelt sich bei diesen Proteinen um zytoplasmatische Dimere, welche in nahezu allen Organismen vorkommen und auch unter physiologischen Bedingungen in geringen Konzentrationen im Zytosol, ER und Zellkern nachgewiesen werden können (Yenari et al., 1999).

Die Hitzeschockproteine dieser Familie können wiederum in zwei Multigenfamilien (Proteine mit einem Molekulargewicht von 63-78 kDa) unterteilt werden, einmal in die eukaryotische, deren Vertreter im Zytosol und im Lumen des ER nachgewiesen wurden und eine verwandte Gruppe prokaryotischen Ursprungs, deren Vertreter in Chloroplasten und in der Mitochondrienmatrix vorkommen.

Aufgrund der Vielfältigkeit der HSP70-Familie und deren Interaktionen mit anderen Proteinen, wie z.B. HSP40, HSP35, HSP104 kann von einer essentiellen Funktion innerhalb der Zelle ausgegangen werden. Hierzu zählen Proteinfaltungs- und Translokationsprozesse (Buchau u. Horwich, 1998) in den Nukleus oder in die Mitochondrien (Schwarz und Neupert, 1994), die Auflösung von Aggregaten (Glover u. Lindquist, 1994), die Beteiligung an der Reorganisation des Zytoskeletts und an der Autoregulation der Aktivierung bei Hitzestress (Nover u. Scharf, 1997).

2.6.4.3 Regulation der HSP-Synthese

Unter physiologischen Bedingungen besitzt der Organismus für schnelle Reparaturvorgänge einen Pool an HSP. Gleichzeitig reagiert die Zelle mit einer de-novo Synthese auf spezifische und unspezifische Schädigungen (Curie et al., 1993). Eine durch Stress verursachte Proteindenaturierung führt zur Dissoziation des heat shock factor (HSF) vom gebundenen HSP innerhalb des Zytosols. Das freiwerdende HSP bindet über einen ATP-abhängigen Bindungsprozess an das denaturierte Protein. Drei phosphorylierte HSF verbinden sich zu einem Trimer, diffundieren in den Zellkern und können dann an das heat shock element (HSE) innerhalb des Promotors für verschiedene Hitzeschockgene binden. HSP70 selbst inhibiert den HSF im Sinne eines Feedback-Mechanismus und kann damit eine hohe HSP70 Konzentration vor dem eigentlichen Stimulus, wie z.B. Ischämie eine Synthese von HSP70 deutlich abschwächen (Yenari et al., 1999). Um im Zellkern eine Transkription zu initiieren, müssen außer der Bindung von HSF an HSE noch weitere, derzeit unbekannte regulatorische Faktoren eine Rolle spielen (Knowlton, 1994).

2.6.4.4 HSP70 und zerebrale Ischämie

Die Expression von HSP70 Genen ist in Neuronen, Glia und Endothelzellen entdeckt worden (Yenari et al., 1999; Sharp et al., 1993). Anhand einer Vielzahl von Untersuchungen konnte HSP70 in geringen Mengen im Kortex, im Hippocampus, im Thalamus (Simon et al., 1991; Bottiger et al., 1998) und im Kleinhirn (Massa et al., 1996) als Folge von Ischämie nachgewiesen werden.

Innerhalb des Hippocampus als Teil des mittleren Bogens des limbischen Systems und einer der komplexesten und vulnerabelsten Gehirnregionen expremiert die CA1 Region,

gefolgt von CA4 und CA3, als erstes HSP70 als Resultat eines ischämischen Insultes. Zusätzlich korreliert auch die Dauer der Ischämie mit regionaler und zellulärer Empfindlichkeit (Sharp et al., 1993), was darauf hindeutet, dass die Expression von HSP70 sensitiv und spezifisch zur Feststellung geschädigter Zellen dienen kann. Rajdev und Sharp (2000) konnten sogar eine Proportionalität zwischen dem Stressgrad, welchem die Zellen ausgesetzt waren und der Stärke der HSP70 Induktion zeigen. Die Induktion von HSP70 stellt das Ergebnis eines fortschreitenden Energieversagens dar und repräsentiert die Areale, in denen CBF und Sauerstoffzufuhr reduziert und somit ischämisch sind (Sharp et al., 2000).

Im zeitlichen Verlauf wird die HSP70mRNA schon innerhalb der ersten Reperfusionstunde exprimiert (Rajdev u. Sharp, 2000) und das Expressionsmaximum wird etwa 3 Stunden nach Ischämie erreicht (Hata et al., 2000) und sinkt mit dem Beginn des Neuronenunterganges (Yenari et al., 1999). Somit lässt sich auch erklären, dass die Induktion von HSP70 Proteinen in reversibel geschädigten Zellen stattfindet und HSP70 gefärbte Neurone deshalb, verglichen mit den degenerativen Neuronen, in denen kein HSP70 nachweisbar ist, morphologisch normal erscheinen (Massa et al., 1996).

2.7 Intraoperativ erfassbare Parameter

Um das Maß der Gehirnschädigung qualitativ zu bestimmen, wurden bereits die Veränderungen verschiedener Parameter innerhalb der unterschiedlichsten Versuchsabläufe untersucht.

2.7.1 Tissue oxygenation index

Die Nahinfrarot Spektroskopie (NIRS) stellt eine nicht invasive optische Monitoringmethode (Torella et al., 2002; Shinoka et al., 2000) zur Darstellung von Veränderungen des Oxyhämoglobins, Desoxyhämoglobins, des oxydierten Cytochromes aa3 (CytOx) und dem Verhältnis zwischen Oxyhämoglobin zu Gesamthämoglobin (TOI) im zeitlichen Verlauf des CPB dar. Somit reflektiert die NIRS die zerebrale Gewebeoxygenierung (Al-Rawi et al., 2001) und kann im Gegensatz zur venösen Sauerstoffsättigung sehr detaillierte Informationen über den Oxygenierungszustand eines ganz bestimmten Gehirnareals liefern (Nollert et al., 1995).

Nollert et al., 2000 konnten in einer experimentellen Studie an Ferkeln zeigen, dass die intraoperativen Messungen mittels der Nah-Infrarot-Spektroskopie wichtige Informationen über die Hirnoxygenierung liefern und mit dem histologischen Schäden der Neuronen korrelieren. Der TOI, der in der vorliegenden Arbeit als einer der wichtigsten Parameter in Bezug auf seine Aussagekraft bei der zerebralen Oxygenierung im Verlauf des CPB untersucht werden sollte, zeigte in anderen Studien bereits eine signifikante Korrelation

mit der Flussgeschwindigkeit (Al-Rawi et al., 2001; Sakamoto et al., 2001) und stellt nach diesen Studien einen nützlichen Indikator für die Hirnoxxygenierung während des CPB dar (Sakamoto et al., 2001).

2.7.2 Protein S100 β

Das Protein S100 β besitzt ein Molekulargewicht von 21000 Da (Martens et al., 1998). Seit 1987 wird S100 β als Indikator ischämischer Hirnschäden eingesetzt (Persson et al., 1987). Bestehend aus den zwei Untereinheiten α und β befindet es sich im Zytoplasma der Astrozyten (Adami et al., 2001), den Glia- und Schwann-Zellen (Aurell et al., 1991), wobei S100b ($\beta\beta$) in hohen Konzentrationen in Astrozyten und Schwannschen Zellen, S100a ($\alpha\beta$) in Gliazellen gefunden werden (Antilla et al., 2000).

S100 β gehört zu der multigenetischen Familie Ca^{2+} bindender Proteine, die Enzymaktivitäten, die Dynamik zytoskelettärer Komponenten, neuronale Differenzierung, Kalziumhomöostase, Förderung axonalen Wachstums (Donato, 2003), Zellkommunikation und intrazelluläre Signaltransduktion (Zimmer et al., 1995) beeinflussen. Das Protein stellt einen sensiblen und spezifischen Marker für zerebrale Schäden dar (Missler et al., 2002; Wong et al., 1999) und kommt im Blut und in der zerebrospinalen Flüssigkeit nach akuten Anfällen, Hirnschlägen, vorübergehenden ischämischen Anfällen, Blutungen und Koma infolge von Arrest vor.

Bei Ischämie kommt es zu einer Freisetzung von S100 β aufgrund des Zellunterganges nekrotischer Gliazellen und infolge einer gestörten Blut-Hirn-Schranke zu einem Anstieg von S100 β im Plasma (Buttner et al., 1997). S100 β Proteine können aber auch sezerniert werden und über Oberflächenrezeptoren die Funktion von Entzündungszellen, Neuronen, Astrozyten, Mikroglia und Endothelzellen regulieren (Donato, 2003; Adami et al., 2001). Verschiedenen Untersuchern war es sogar möglich, eine Korrelation des Protein S100 β mit dem Infarkt volumen und dem neurologischen Outcome nachzuweisen (Buttner et al., 1997; Missler et al., 1997, 2002). Usui und Mitarbeiter (1994) konnten anhand ihrer Studie nach einem 30-minütigen normothermen Arrest einen signifikanten und drastischen Anstieg von S100 β im zeitlichen Intervall von drei bis acht Stunden nach Reperfusionbeginn und ein Erreichen eines Plateaus mit 50-fach erhöhten Maximalwerten zeigen.

2.7.3 Neuronenspezifische Enolase

Das neuronale Isoenzym neuronenspezifische Enolase (NSE) ist vorwiegend in Neuronen lokalisiert (Martens et al., 1998) und wird aus drei immunologisch unterschiedlichen Untereinheiten (α , β , γ) gebildet (Kato et al., 1981). Die Untereinheiten

α und γ kommen im Gehirn und die Untereinheit β hauptsächlich im Herz und quergestreifter Muskulatur vor.

Der limitierende Faktor für den Einsatz von NSE als Ischämie marker ist das Vorhandensein von NSE in Erythrozyten und Thrombozyten. Eine Hämolyse als mögliche Folge eines CPB bewirkt somit ebenfalls einen Anstieg von NSE, welcher nicht von einem Anstieg aufgrund neuronaler Schädigung zu unterscheiden ist. Einige Autoren sind trotz allem der Ansicht, dass NSE nützliche prognostische Informationen über die globale Ischämie liefert (Karkela et al., 1993; Dauberschmidt et al., 1991; Roine et al., 1989; Martens, 1996). Verschiedene Untersucher haben sogar eine Korrelation zwischen NSE und neurologischen Defiziten festgestellt (Hermann et al., 2000; Rassmussen et al., 1999; Georgiadis et al., 2000; Westaby et al., 2000). Infolge eines Hirnschadens steigt NSE ein bis drei Stunden nach Reperfusionbeginn und erreicht sein Maximum nach 18 Stunden (Usui et al., 1994).

2.7.4 Gehirnisofom der Kreatinphosphokinase

Die Bestimmung von CPK-BB in der zerebrospinalen Flüssigkeit war eine der ersten Messungen in Bezug auf ischämisch bedingte Gehirnschädigungen. CPK-BB kann in Astrozyten, Neuronen und durch erhöhte Permeabilität der Bluthirnschranke auch im Serum gefunden werden.

Die maximale Kreatinkonzentration in der Zerebrospinalflüssigkeit infolge 30 Minuten Arrests tritt nach vier Stunden Reperfusion auf (Usui et al., 1994) und korreliert mit dem Schweregrad der Schädigung (Skogseid et al., 1992) bzw. mit dem klinischen Outcome (Delanghe et al., 1990). Ein limitierender Faktor für den Einsatz des Isoenzym ist die fehlende Spezifität für das Gehirn. Zum Beispiel wird CPK-BB auch in der glatten Muskulatur, im Herzgewebe und im Darm gefunden (Grocott et al., 2000), so dass eine Freisetzung von CPK-BB aus den genannten Organen bzw. Gewebe in die Blutbahn auch als Ursache eines erhöhten Serumspiegels an CPK-BB verantwortlich sein kann.

2.7.5 Laktat

Eine Beziehung zwischen inadäquater Gewebepfusion und erhöhten Laktatwerten wird in der derzeitigen Literatur von vielen Klinikern akzeptiert (Takala et al., 1996). Schurr (2002) kann sogar in seiner Studie eine Korrelation zwischen Gewebelaktat und dem Grad der ischämischen Hirnschädigung aufzeigen. Innerhalb von Sekunden steigt der Laktatspiegel nach einer zerebralen Ischämie im Hirngewebe um das 10-20-fache an, wogegen ein Anstieg im Liquor in geringerem Ausmaß und mit Verzögerung zu verzeichnen ist (Kriegelstein, 1990). Duffy konnte in seiner Studie ebenfalls einen Anstieg der intrazellulären Laktatkonzentration auf ein 11-faches des Normalwertes schon

innerhalb der ersten Stunden nach einer Hypoxie bei Hundewelpen beobachten (Duffy et al., 1982). Vaagenes et al. (1988) geht davon aus, dass Laktat bei der anaeroben Glykolyse entsteht und auf einen hypoxischen Zustand hinweist, aber keinen permanenten Zellschaden anzeigt. Unter anaeroben Bedingungen gelten Herz, Skelettmuskel und Gehirn zu den laktatproduzierenden Organen, wobei 50 % des Laktats von der Leber wieder extrahiert werden kann (Takala et al., 1996).

2.7.6 Jugularvenöse Sättigung

Die invasiven Messungen der venösen Sättigung in der Vena jugularis reflektieren die Balance zwischen zerebralen Sauerstoffangebot und Sauerstoffverbrauch (Clay, 2000). Die Sättigungskatheter können zwar die globale zerebrale Oxygenierung, aber nicht die regionale Oxygenierung erfassen und deren Messgenauigkeit ist abhängig von ihrer Lage innerhalb des Gefäßes, der Lichtintensität und der Kalibrierung (Clay, 2000). Trotz allem konnten Robertson et al. 1989 eine strenge Korrelation der Sättigung und des neurologischen Outcomes aufzeigen (Robertson et al., 1989). Perioden von einer erhöhten Extraktion in Bezug auf den Blutfluss und Sättigungen unter 54% sind assoziiert mit postoperativer kognitiver Dysfunktion (Croughwell et al., 1994).

2.7.7 Malondialdehyd

MDA ist eines der niedermolekularen Endprodukte der Lipidperoxidation (Janero, 1990) und wird am häufigsten zur Untersuchung der Lipidperoxidation verwendet (Kappus und Sies, 1981; Alessio, 1992). Es entsteht aufgrund des Zerfalls peroxidativ geschädigter, mehrfach ungesättigter Fettsäuren aus Lipoproteinen der Zellmembran (Leaf et al., 1997) und wird als Marker der oxidativen Stressantwort eingestuft (Urso et al., 2003). Außerdem wird MDA als Produkt der Cyclooxygenasereaktion innerhalb der Prostaglandinsynthese gebildet (Draper u. Hadley, 1990). In vivo stimulieren verschiedene Faktoren die Lipidperoxidation z.B. Ozon, NO, Akkumulation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, Vitamin E oder Selendefizit und erhöhen daher den MDA-Spiegel (Draper u. Hadley, 1990). Bariskaner und Mitarbeiter (2003) konnten zeigen, dass zerebrale Ischämie- und Reperfusionsschäden eine Erhöhung des MDA-Werte nach sich ziehen.

2.7.8 Zielparameter dieser Studie

Aufgrund dieser Ausführungen sollen in der vorliegenden Arbeit die Zielparameter: Laktat, HSP70, TOI und S_vO_2 als Indikatoren einer möglichen neuronalen Schädigung bestimmt werden. Die Messung der venösen Sauerstoffsättigung soll Aufschluss über die globale Körper- und Gehirnoxygenierung geben, wobei der Tissue oxygenation index

gezielte Informationen über die zerebrale Gewebeoxygenierung liefern soll und somit auf histologische Schäden der Neuronen hinweisen soll. Laktat wurde als Parameter gewählt, da unter hypoxischen Bedingungen der Laktatspiegel aufgrund von anaerober Glykolyse steigt und daher eine neuronale Schädigung anzeigen soll. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzdarstellung von HSP70 können die einzelnen geschädigten Zellen dargestellt werden und somit sollen gezieltere Aussagen über die lokale zerebrale Oxygenierung getroffen werden. S100 β und MDA wurden als zusätzliche Messparameter gewählt.

S100 β ist im Plasma nach Zelluntergang nachweisbar und deutet auf eine nicht intakte Blut-Hirn-Schranke hin und MDA, als Endprodukt der Lipidperoxidation, soll nochmal die Zellschädigung untermauern.

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Versuchsdurchführung

3.1.1 Versuchstiere und Gruppeneinteilung

Um die Frage zu beantworten, ob es nach einem kardiochirurgischen Eingriff mit extrakorporaler Zirkulation bei Tieren zu zerebralen Störungen kommen kann, wurde folgender Versuchsaufbau gewählt. Da die Hypothermie als neuroprotektives Verfahren etabliert ist, wurden drei Temperaturgruppen untersucht und diese mit drei verschiedenen HLM-Blutflüssen kombiniert, um der chirurgischen Notwendigkeit eines möglichst blutfreien OP-Situs Rechnung zu tragen. Somit ergaben sich $3 \times 3 = 9$ Versuchsgruppen (s. Tab. 3) und eine Kontrollgruppe ($n=4$) ohne kardiochirurgischen Eingriff. Um den Einfluss der operativen Interventionen mit Eröffnung des Thorax und dem Anschluss der HLM noch genauer darzustellen, wurden vier Ferkel der gleichen Gewichtsklasse anästhesiert und der Thorax nicht eröffnet, aber dafür alle Katheter für die notwendigen Parameter der vorliegenden Studie gelegt und die Messwerte über fünf Stunden (entspricht der Zeit für eine Stunde Ischämie und vier Stunden Reperfusion) aufgezeichnet.

Als Versuchstiere wurden 58 Ferkel der Deutschen Landrasse mit einem Alter von 4-5 Wochen und mit einer Körpermasse zwischen 7-10 kg aus dem Lehr- und Versuchsgut Oberholz der Veterinärmedizinischen Universität Leipzig operiert. Da die Ferkel zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgesetzt waren, wurde auf eine Nahrungskarenz verzichtet.

Tab. 3: Überblick über die einzelnen Versuchsgruppen

| Fluss / Temperatur | 38 °C | 25 °C | 18 °C |
|--------------------|----------|----------|----------|
| 100 % | 6 Ferkel | 6 Ferkel | 6 Ferkel |
| 50 % | 6 Ferkel | 6 Ferkel | 6 Ferkel |
| 25 % | 6 Ferkel | 6 Ferkel | 6 Ferkel |

3.1.2 Anästhesie

Als Prämedikation für den Transport zum Herzzentrum wurden den Tieren 0,02 mg/kg KM Atropinsulfat und 2 mg/kg KM Azaperon (Stresnil®) intramuskulär injiziert. Im OP des Herzzentrums wurde den Ferkeln ein venöser Zugang im Ohr gelegt und 4mg/kg KM Thiopental (Trapanal®) intravenös appliziert. Im Anschluss wurde das Tier in Rückenlage verbracht und nach einer sorgfältigen Rasur und Desinfektion des Halses wurde eine subkutane Lokalanästhesie mit 5-7 ml Lidocain (Xylocitin®) 2 % zur Vorbereitung der Tracheotomie vorgenommen. Zusätzlich bekamen die Ferkel noch 1-2 ml Fentanyl intravenös zur Analgesie und die Intubation erfolgte mit einem 5,0 French Tubus. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Ferkel künstlich in einem halbgeschlossenen System mit Sauerstoff und Isofluran beatmet. Bis zum Anschluss an die Herz-Lungen-Maschine und nach dem Abgang von der HLM erfolgte die Beatmung mittels eines standardisierten Beatmungsgerätes (Cato, Fa. Dräger). Während des Kreislaufstillstands konnte die Beatmung auf ein Minimum reduziert werden, da die HLM in dieser Zeit die Sauerstoffversorgung komplett übernahm. An der HLM wurde die Inhalationsanästhesie durch eine Injektionsanästhesie, welche durch eine kontinuierliche Infusion über die rechte Jugularvene von 25 µg/kg KM/h Fentanyl, 0,2 mg/kg KM/h Midazolam (Dormicum®) und 0,2 mg/kg KM/h Pancuronium aufrechterhalten wurde, fortgeführt. (s. Tab. 4).

Tab. 4: Angewandte Medikamente während des Operationsverlaufes

| Wirkstoff | Präparatename Firma | Konzentration Applikationsart | Applikations- zeitpunkt |
|------------------------------|--|---|----------------------------|
| Atropinsulfat | Atropinsulfatlösung 0,5 mg/ml Fresenius Kabi, Bad Homburg, D | 0,02 mg/kg KM i.m. | Prämedikation |
| Azaperon | Stresnil Janssen-Cliag GmbH, Neuss, D | 2 mg/kg KM i.m. | Prämedikation |
| Trapanal | Trapanal Byk Gulden, Konstanz, D | 4 mg/kg KM i.v. | Narkoseeinleitung |
| Fentanyl | Fentanyl 0,5 mg Curamed Janssen-Cliag GmbH, Neuss, D | 1 ml i.v. | Intubation |
| Lidocainhydrochlorid | Lidocain 2 % WDT, Garbsen, D | 5-7 ml i.v. | Intubation |
| Fentanyl | Fentanyl 0,5 mg Curamed Janssen-Cliag GmbH, Neuss, D | 25 µg /kg KM/h i.v. Perfusor | Erhaltung/HLM |
| Midazolam | Dormicum Roche, Grenzach-Wyhlen, D | 0,2 mg/kg KM/h i.v. Perfusor | Erhaltung/HLM |
| Pancuroniumbromid | Pancuronium Curamed CuraMed Pharma GmbH, Karlsruhe, D | 0,2 mg/kg KM/h i.v. Perfusor | Erhaltung/HLM |
| Isofluran | Forene Abbott, Illinois, USA | Einleitung 2-4 Vol% Erhaltung 0,8-1 Vol% Inhalation | Erhaltung |
| Heparin-Na | Liquemin Roche, Grenzach-Wyhlen, D | 300 IE/kg KM i.v. | vor Kanülierung |
| Protaminsulfat | Protaminsulfat Leo Leo Pharma GmbH, Neu-Isenburg, D | 3 mg/kg KM i.v. | Abgang HLM |
| Dopaminhydrochlorid | Dopamin Fresenius Fresenius Kabi, Bad Homburg, D | 1-2 µg/kg KM/h i.v. Perfusor | Ende Ischämie |
| Methylprednisolon | Urbason Aventis Pharma GmbH, Frankfurt/M., D | 40 mg/kg KM i.v. | vor HLM |
| Natriumhydrogen- carbonat | Natriumhydrogencarbonat 8,4 % Infusionslösung B.Braun Melsungen AG, Melsungen, D | abhängig pH, BE i.v. | ab Ende Ischämie |
| Trometamol | Tris 36,34 % B.Braun Melsungen AG, Melsungen, D | abhängig pH, BE i.v. | ab Ende Ischämie |

Tab. 5: Anästhesiezubehör für Ferkel der Gewichtsklasse 7-10 kg KM

| Anästhesiezubehör | Gerätebezeichnung/Grösse | Firma |
|-----------------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| Venenverweilkanüle | 0,7/19 mm | Vygon, Aachen, D |
| Trachealtubus | 5,0 Fr | Portex, Kent, UK |
| Filter | antimikrobe Filter | Mallinckrodt, Mirandola, Italien |
| Beatmungsgerät | Cato | Dräger, Lübeck, D |
| Isofluranverdampfer | Vapor 19.3 | Dräger, Lübeck, D |
| 2 lumiger zentralvenöser Katheter | 4,0 Fr, 10 cm | Arrow, Erding, D |
| Bluttransfusionsbeutel | Fenwal PL146-CPDA-1 | Baxter, Deerfield, USA |

3.1.3 Versuchsablauf und operatives Vorgehen

Vor der Eröffnung des Thorax wurden alle Messsonden platziert, um die jeweiligen Ausgangswerte der Messparameter zu ermitteln. Zu Beginn erfolgte eine Rasur des Kopfes und die beiden Optoden des NIRO 300 wurden immer in gleicher paramedianer und frontotemporaler Position mit einem Interoptodenabstand von 3 cm auf der Stirn platziert. Im definierten Abstand von 0,5 cm von der rechten Optode wurde eine Titanhohlschraube über ein 5 mm Bohrloch in die Schädelkalotte eingeschraubt. Über diesen Zugang konnten die Gehirngewebetemperatur und der intrakranielle Druck gemessen werden. Das Messareal lag damit etwa 1-2 cm intrazerebral. Daran anschließend wurde das Ferkel wieder in Rückenlage gebracht und beidseits die Aa. femorales punktiert, wobei das Gefäß auf der rechten Seite für die online Blutgasmessung mit dem Trend Care benutzt wurde und das Gefäß der linken Hintergliedmasse der Druckmessung diente. In die linke Vena jugularis interna wurde eine Sonde zur Bestimmung der Sauerstoffsättigung platziert.

Ebenfalls auf der linken Körperseite wurde eine Flussmesssonde an die A. carotis communis angelegt. Nachdem alle Ausgangswerte aufgezeichnet worden waren, wurde das Tier median sternotomiert. Nach Eröffnung des Perikards erfolgte eine arterielle Kanülierung der Aorta ascendens und eine venöse Kanülierung des rechten Herzhohls zum Anschluss an die HLM. Zur Entlastung des linken Ventrikels wurde ein Vent in den linken Vorhof eingelegt. Zu diesem Zeitpunkt bekamen die Ferkel Heparin 300 IE/kg KM zur Antikoagulation während der extrakorporalen Zirkulation mit dem Ziel die ACT > 300 zu halten. Die Blutkardioplegie, die für den Stillstand des Herzens zuständig ist, wurde mittels einer Kardioplegiekanüle in die Aortenwurzel appliziert. Nachdem alle Kanülen platziert waren, erfolgte die Konnektierung dieser mit den Gelafundin gefüllten Schläuchen der HLM. Danach wurden die Tiere auf die gruppenspezifische Gehirntemperatur, intrazerebral über eine Mikrokathetersonde gemessen, abgekühlt und mit Erreichen dieser wurde die Aorta abgeklemmt, der gruppenspezifische Blutfluss

eingestellt und über die in der Aorta platzierte Kardioplegiekanüle Blutkardioplegie gegeben (s. Abb. 2). Zu diesem Zeitpunkt begann die 60 minütige Ischämiezeit. Am Ende der Ischämiezeit wurde die Aortenklemme gelöst, das Tier langsam auf seine normale Körperkerntemperatur, welche als Gehirntemperatur gemessen wurde, erwärmt und der Blutfluss wieder auf 100 % an der HLM eingestellt. Nach der Entwöhnung von der HLM bekamen die Ferkel Protamin intravenös injiziert und wurden noch für vier Stunden an der Beatmung belassen. Um dem Organismus einerseits genügend Zeit zu lassen für die Ausbildung der biochemischen oder eventuellen pathologischen Veränderungen und andererseits aber die Operationszeit nicht zu lang zu gestalten, wurde eine Reperfusion von vier Stunden gewählt (s. Abb. 3). Dieses Reperusionsintervall von vier Stunden begründet sich vor allem aus Literaturbefunden, die zeigen, dass nach Hirnischämie die mRNA der Hitzeschockproteine (Hsp70mRNA, HSP60mRNA) sowie das c-fos innerhalb von 3 Stunden heraufreguliert werden (Schmidt-Kastner et al., 2002), so dass zu vermuten ist, dass die entsprechenden Proteine mit geringer Verzögerung der mRNA folgen. Ebenso zeigt sich ein Anstieg des Cytokins Interleukin 6 (IL 6) nach 3-6 Stunden nach Ischämie (Burbridge und Parson, 2002). Schließlich wurde noch ein Anstieg der Calcineurin-Aktivität in der CA1-Region des Hippocampus gefunden, der vor allem in der 1.-6. Stunde vorhanden war, während danach nur noch eine geringe weitere Zunahme gefunden wurde (Siesjö et al., 2002). Wie unter 4.4 genauer dargestellt, war das Zeitfenster auch so bemessen, dass eine Anästhesie mit thorakalem Eingriff aber ohne HLM-Intervention keinen Effekt auf die untersuchten Parameter hatte.

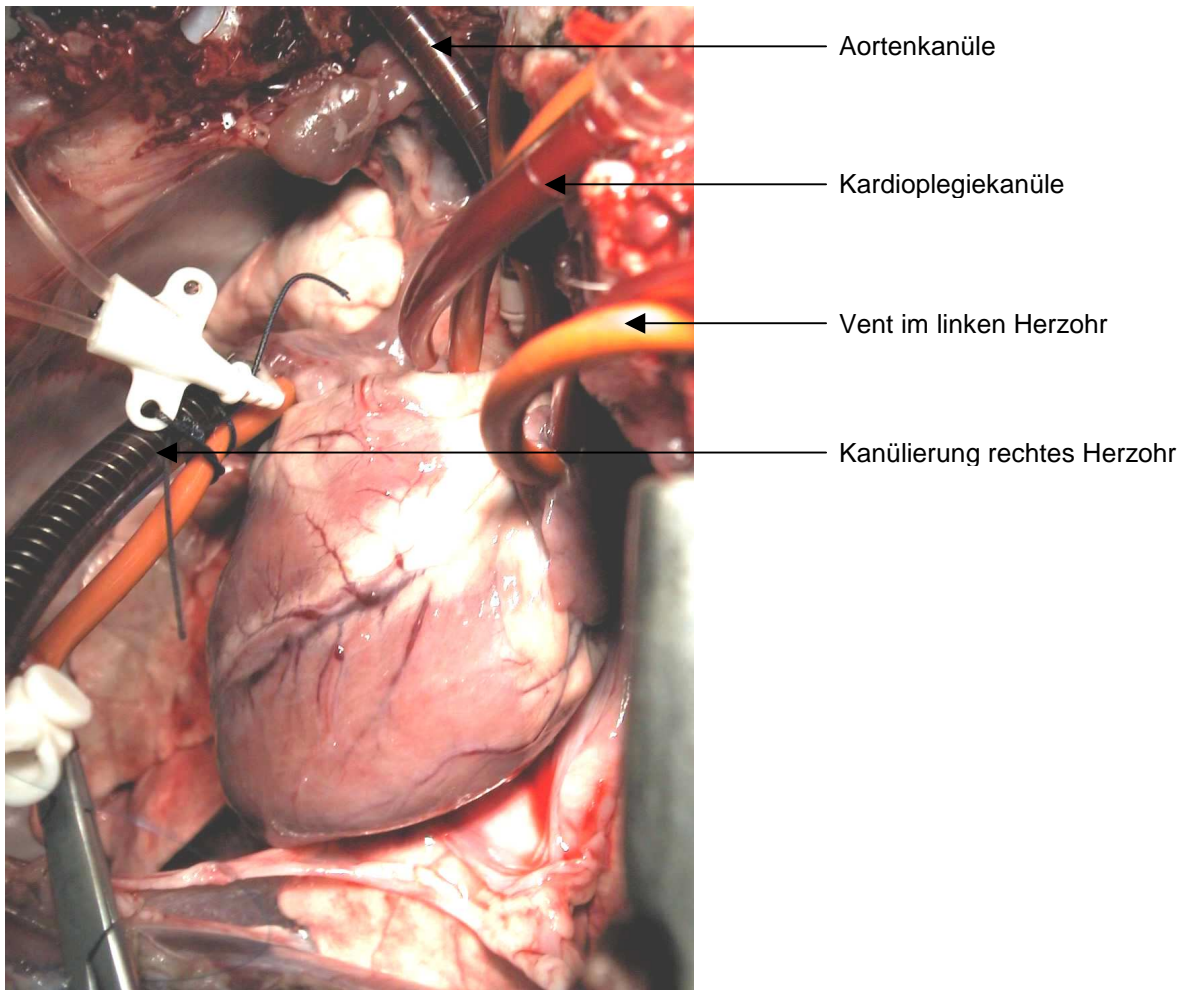


Abb. 2: Darstellung der Herzkanülierung zum Zeitpunkt des HLM-Anschlusses

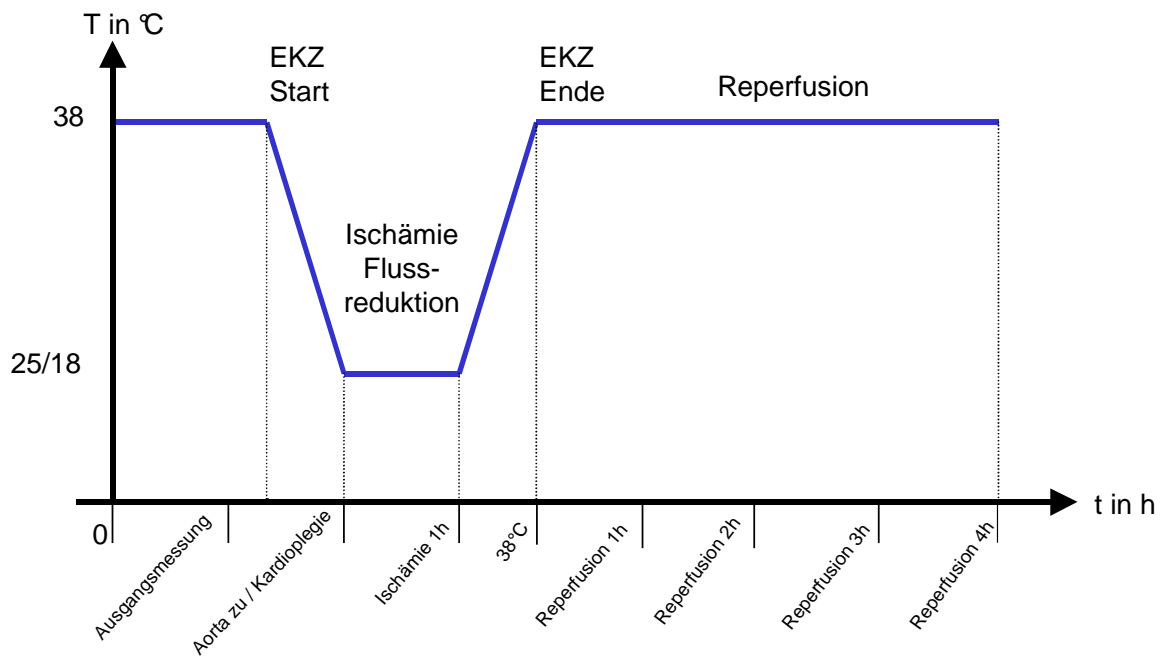


Abb. 3: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes mit Kennzeichnung der Ischämie- und Reperfusionsphase

3.1.4 Medikamentöse Interventionen während der OP

Vor der Kanülierung des Herzens erfolgte eine systemische Heparinisierung von 300 IE/kg KM als Grundlage für die Antikoagulation, welche nach Entwöhnung von der EKZ mit 6 mg/kg Protamin antagonisiert wurde. Ebenfalls vor Anschluss der HLM bekamen die Tiere (40 mg/kg KM) Methylprednisolon (Urbason®), um Reaktionen auf die Fremdoberfläche des HLM-Sets zu vermeiden und um eventuelle Kreuzreaktionen bzw. Unverträglichkeiten mit dem Transfusionsblut zu minimieren.

Nach Beendigung der Ischämiephase wurden die Tiere wieder auf ihre normale Körpertemperatur aufgewärmt und alle die Herzen, welche nicht während der Erwärmungsphase wieder in den Sinusrhythmus gelangten mittels Defibrillator mit 20-50 Volt stimuliert. Zusätzlich bekamen die Ferkel am Ende der einen Stunde Ischämie über einen Perfusor 1-2 µg/kg KM/min Dopamin zur Aktivierung des Herzens.

Sonstige Interventionen waren abhängig von der jeweiligen Kreislaufsituation. Dazu zählten das Flüssigkeitsmanagement in Verbindung mit der Stabilisierung des Blutdruckes und die Stabilisierung des Säure-Basen-Haushaltes.

3.1.5 Extrakorporale Zirkulation

In dieser Studie bestand die Herz-Lungen-Maschine aus einer Zentrifugalpumpe, welche die kinetische Energie direkt auf die Blutflüssigkeit überträgt und somit das Blut aus dem rechten Vorhof zum Oxygenator und über eine Perfusionskanüle in die Aorta ascendens zurückpumpt. Zum Variieren des zirkulierenden Volumens und zur Aufnahme des Saugerblutes aus dem Thorax besteht das HLM-Set aus einem Hartschalen-Kardiotomiereservoir mit integrierter Filtereinheit, dadurch soll eine Rezirkulation von Thromben und Gewebepartikel verhindert werden. Über einen integrierten Verbindungsschlauch zum venösen Schenkel der EKZ kann dieses Blut wieder in diesen geleitet werden und somit nach passieren des Oxygenators als oxygeniertes Blut in den Kreislauf des Ferkels zurückgepumpt werden. Als Oxygenator, welcher das vom Patienten kommende venöse Blut einem Gasaustausch, ähnlich der Lunge, unterzieht, wurde für diese Studie ein Kapillarmembranoxygenator ausgewählt. Blut und Gas sind durch eine mit Poren durchsetzte Membran voneinander getrennt und der Gasaustausch findet aufgrund des Konzentrationsgefälles zwischen Gas und Blut statt. Der Wärmeaustauscher erfüllt die Aufgabe das Blut auf die gewünschte Temperatur, gemessen im Gehirn, einzustellen und diese auch aufrechtzuerhalten. Der Wärmeaustausch erfolgt über dünne Rohre, in denen das Blut zirkuliert, und außen von einer definiert temperierten Menge Wasser umströmt wird.

Die einzelnen Elemente der HLM werden untereinander und mit dem Patienten mit einem Primingvolumen von 80 ml Gelafundin (56 ml für den Oxygenator, 8 ml für die Blutpumpe und der Rest für die Schläuche) gefüllt. Der Durchmesser der Schläuche ist wiederum von der Größe des Ferkels abhängig und somit kamen Schläuche mit einem Durchmesser von 1cm zum Einsatz (s. Abb. 4).

Zur Regelung des Säure-Basen-Haushaltes wurde eine Kombination aus α -stat (Kühlphase) und pH-stat Verfahren (Ischämie und Reperfusion) gewählt.

Tab. 6: Zubehör der Herz-Lungen-Maschine für Ferkel der Gewichtsklasse 7-10 kg KM

| HLM-Zubehör | Gerätebezeichnung/ Grösse | Firma |
|----------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| arterielle Kanüle | 3 mm | Stöckert, München, D |
| venöse Kanüle | 14 Fr gewinkelt | Medos AG, Langenselbold, D |
| left heart Vent | 10 Fr | Medtronic, Anaheim, CA |
| Kardioplegiekanüle | 4 Fr | Medtronic, Anaheim, CA |
| HLM-Sauger | 5 mm | Stöckert, München, D |
| Membranoxygenator | Safe Micro Oxygenator | Polystan, Vaerlose, DK |
| Hartschalenreservoir | Safe Micro Reservoir | Polystan, Vaerlose, DK |
| Zentrifugalpumpe | AB 180 | Cardiac Assist Inc., Pittsburgh, USA |
| Hypothermiegerät | Biocal | Medtronic, Anaheim, CA |

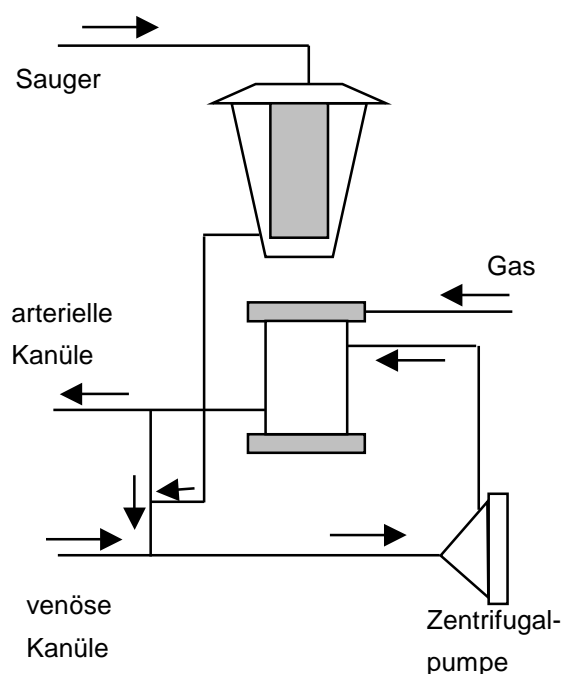


Abb. 4:
links: Schematische Darstellung der HLM mit Kennzeichnung der Blutflussrichtung
rechts: originalgetreuer Aufbau der HLM für alle Schweine dieser Studie

Als Sollwerte wurden der Fluss mit 800 ml/min, der Kardioplegiedruck mit 80 mmHg und die Sauerstoffbegasung mit 100 % definiert.

3.1.6 Kardioplegie

Standardverfahren bei herzchirurgischen Eingriffen ist die Verwendung eines kardioplegischen Herzstillstandes. Durch Infusion einer kardioplegischen Lösung direkt nach Abklemmung der Aorta kommt es zum diastolischen Herzstillstand. In dieser Studie wurde zur Protektion des Herzens eine Blutkardioplegie nach Calafiore mit 16 mmol/l Kalium bis zum Stillstand sowie nach je 20 min zur Erhaltung des Stillstandes 13 mmol/l Kalium eingesetzt.

3.1.7 Flüssigkeitsmanagement

Ein restriktives Flüssigkeitsmanagement war für den Erfolg der Versuche entscheidend. Durch ein geringes Primingvolumen der HLM von 80 ml Gelafundin (wobei 56 ml für das Befüllen des Oxygenator, 8 ml für Pumpe und der Rest für die Schläuche benötigt wurde) sowie ggf. Transfusion von Fremdblut konnte ein ausreichender Hämatokritwert von 25 % aufrechterhalten werden. Nur so konnten zerebrale Ischämien durch zu geringes Sauerstoffangebot verhindert werden.

3.1.8 Bluttransfusion

Aufgrund des Blutverlustes während der Kanülierung, der Verdünnung des Blutes durch das Primingvolumen, mit welchem die Schläuche der Herz-Lungen-Maschine vor deren Start gefüllt wurden und dem während der Zirkulation in den Schläuchen befindlichen Anteil des Blutes, bekamen die Ferkel innerhalb der Reperfusion eine Bluttransfusion. Die Menge war abhängig von der jeweiligen Kreislaufsituation des Tieres. Das Blut stammte von Schlachtschweinen und wurde zum Zeitpunkt des Einstichs in die Jugularvene mit einem Hohlmesser in einem gepufferten Bluttransfusionsbeutel (Fenwal, Baxter) aufgefangen. Diese Transfusionsbeutel wurden bei 0°C über maximal vier Tage aufbewahrt und mittels Blutgasmessgerät täglich auf pH, pO₂, pCO₂, Hkt, Hb, BE, K⁺, Laktat und Glukose überprüft. Ab einem Grenzwert von 8 mmol/l K⁺ oder/und einem Laktatwert von 10 mmol/l wurde die jeweilige Blutprobe verworfen. Jeder Transfusionsbeutel beinhaltete Natriumcitrat-Dihydrat, Glukose-Monohydrat, Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat. Vor jeder Transfusion fand ein Kreuztest mit dem Spender- und Empfängerblut auf dem Objektträger statt, um im Voraus eventuelle Unverträglichkeitsreaktionen ausschließen zu können.

Zur Probengewinnung wurde jeweils vom Spender- und Empfängerblut eine 5 %-ige Zellsuspension hergestellt (0,5 ml Erythrozyten + 9,5 ml isotonische Kochsalzlösung) und

diese bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss daran erfolgten zwei Kreuzproben und zwei Kontrollen. Als „große Probe“ (Majoritest) wurden 40 µl Zellsuspension-Donor mit 40 µl Rezipienten-Plasma versetzt und für die „kleine Probe“ (Minoritest) wurden 40 µl Zellsuspension-Rezipient mit 40 µl Donor-Plasma versetzt. Für die Kontrollbestimmungen wurden jeweils das Plasma und die Zellsuspension eines Tieres gekreuzt (Hartmann und Staufenberg, 1995).

3.2 Verlaufparameter unter EKZ

Die EKZ könnte gegebenenfalls durch zu geringe Sauerstoffversorgung des Gehirns zu zerebralen Schäden führen. Um der zentralen Fragestellung einer möglichen zerebralen Schädigung nachzugehen, wurden folgende Parameter rechnergestützt in Echtzeit erfasst: mittlerer arterieller Blutfluss (MAP), Blutfluss A. carotis (Q), intrakranialer Druck (ICP), Hirntemperatur, Sauerstoffsättigung in der V. jugularis (S_vO_2), Tissue Oxygenation Index (TOI), Tissue Hämoglobin Index (THI), p_aO_2 , p_aCO_2 und pH-Wert. Alle 30 Minuten wurden regelmäßig Blutproben aus der Vena jugularis interna zur Blutgasanalyse gewonnen. Die Parameter pO_2 , pCO_2 , S_vO_2 , Hämoglobingehalt (Hb), Hämatokrit (Hkt), Laktat (Lac), Glukose (Glu), Natrium (Na^+), Kalium (K^+), Kalzium (Ca^{2+}), Chlorid (Cl^-) wurden mit dem System Radiometer ABL 725 gemessen.

3.2.2 Messprinzipien

3.2.2.1 Blutfluss

Zur Einschätzung der dem Gehirn zugeführten Blutmenge wurde der Blutfluss der Arteria carotis über eine Ultraschall-Dopplermessung mit dem T206 der Firma Transsonic (s. Tab. 7) bestimmt. Dabei werden Schallwellen mit einem Ultraschallsender in Form eines Piezokristalls schräg in das zu untersuchende Gefäß eingestrahlt. Dieses ausgesendete Ultraschallsignal wird an der gegenüberliegenden Gefäßseite reflektiert und der Phasenshift ist abhängig von der Geschwindigkeit des Blutflusses.

3.2.2.2 Arterieller Blutdruck und intrakranialer Druck

Um den arteriellen Blutdruck zu messen, wurde die A. femoralis punktiert und mit einem externen Druckwandler von medex medical (s. Tab. 7) verbunden und es wurde ein dem Druckverlauf proportionales Spannungssignal abgebildet.

Da eine mögliche zerebrale Ischämie am Tier zu einem erhöhten Hirndruck durch Ödembildung führen kann, war es notwendig den intrakranialen Druck zu messen. Die

Messung des ICP erfolgt parenchymal mittels Camino Neurocare von Integra Neuro Science (s. Tab. 7).

3.2.2.3 Hirntemperatur

Um die gruppenspezifische Gehirntemperatur mit dem Hypothermiegerät über die Blutkühlung einstellen zu können, wurde über eine Temperatursonde der Firma Licox die Gehirntemperatur ermittelt.

3.2.2.4 Nah-Infrarot-Spektroskopie

Mit der Nah-Infrarot-Spektroskopie-Messung des NIRO300 der Firma Hamamatsu (s. Tab. 7) können die Verhältnisse von oxygenierten Hb und desoxygenierten Hb im intrakapillären Raum bestimmt werden und somit Aussagen über den Oxygenierungszustand des Gehirns getroffen werden. Die Nah-Infrarot-Spektroskopie wurde erstmals von Jöbsis im Jahre 1977 beschrieben. Da Licht im nahen Infrarotbereich die Eigenschaft besitzt Haut, Fett und Knochen fast ungehindert zu penetrieren, bietet sie die Möglichkeit nicht invasive Veränderungen von Chromophoren zu messen und somit Informationen zum regionalen Oxygenationszustand in bestimmten Gehirnarealen zu erfassen (Jöbsis, 1977). Die beiden biologisch relevanten Chromophore Hb und Cytochrom aa3 (Cytochromoxydase) haben in Abhängigkeit von ihrem Oxygenierungs- bzw. Oxidationsgrad verschiedene Absorptionsspektren. Das Cytochrom aa3, als endständiger Elektronenakzeptor der Atmungskette, erzeugt im oxydierten Zustand ein breites Absorptionsband um 840nm, wogegen es im reduzierten Zustand kaum Absorption zeigt. Daher kommt dieses Enzym ebenso wie das Hb als optischer Indikator für eine Aussage über die intrazelluläre Oxygenierung in Frage. Oxygeniertes und desoxygeniertes Hb haben ihre definierten Absorptionsmaxima bei 920 nm und 750 nm (s. Abb. 5).

Beide Chromophore absorbieren das von einem Nah-Infrarot-Spektroskopie-Messgerät emittierte Licht in Abhängigkeit von ihrer Konzentration und der Wellenlänge des Lichtes innerhalb des Gewebes. Dieses Verhältnis lässt sich durch eine modifizierte Lambert-Beer'sche Gleichung errechnen, wobei die Weglänge der Photonen über einen Weglängenfaktor mit diese Gleichung einbezogen werden muss (Bernett und Germon,1997).

$$\Delta A = \alpha \times d \times \Delta c \times DPF$$

ΔA Lichtabschwächung in optischer Dichte (OD)

α spezifischer Extinktionskoeffizient ($\mu\text{molar}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

d optische Weglänge (cm)

DPF differentieller Weglängenfaktor

Δc Absorberkonzentration (μmolar)

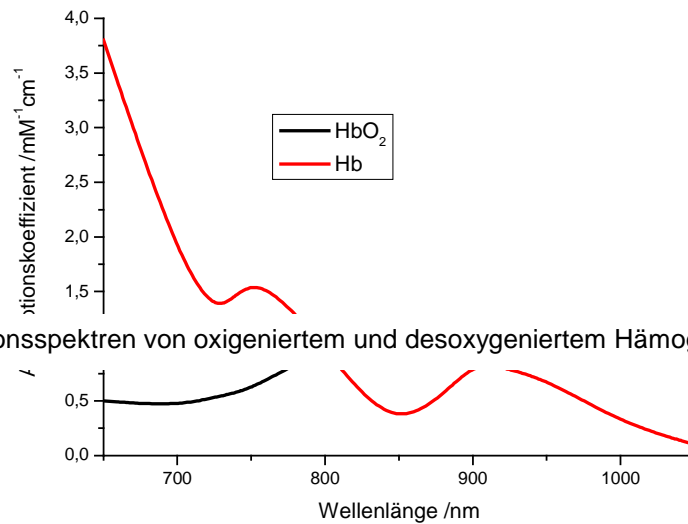


Abb. 5: Absorptionsspektren von oxigeniertem und desoxygeniertem Hämoglobin im Nahinfrarotbereich

Das Licht, welches das Gehirn passiert, verliert durch Streuung bzw. Absorption an Intensität. Dieser Verlust stellt in etwa eine optische Dichteeinheit pro cm (OD/cm) dar. Nachdem die ersten Intensitätsverluste durch die Streuung des beim Übertritt in das messbare Medium erfolgen, wird der Anteil der Absorption durch die Chromophore nach einigen Millimetern Lichtweg im Gewebe in Bezug auf die Lichtverluste immer bedeutsamer. Zur Quantifizierung der Chromophore ist es daher von Bedeutung die optische Weglänge des Lichtes innerhalb der einzelnen Gewebe zu kennen, da aufgrund der Streuung die Weglängen oft um ein Vielfaches größer sind als der eigentliche Optodenabstand. Mit Hilfe des differentiellen Weglängenfaktor (DPF) kann somit die mittlere Weglänge aus dem Optodenabstand berechnet werden. Für verschiedene Gewebe wie z.B. für den Kopf von Frühgeborenen, Erwachsenen und für die Unterarmmuskulatur wurden bereits Weglängenfaktoren kalkuliert (Wyatt et al., 1990; Van der Zee et al., 1992), welche der Studie zu Grunde gelegt wurden. Die Optodenplatzierung am Schädel des Ferkels in der vorliegenden Studie ist in der Abb. 6 dargestellt.

Nollert und Mitarbeiter, 2000 konnten in einer experimentellen Studie an Ferkeln zeigen, dass die intraoperativen Messungen mittels der Nah-Infrarot-Spektroskopie wichtige Informationen über die Hirnoxxygenierung liefern und mit dem histologischen Schäden der Neuronen korrelieren.

3.2.2.5 Optische Sauerstoffsättigungsmessung

Um den Grad der zerebralen Oxygenierung einschätzen zu können, wurde ein fiberoptischer Katheter (5 Fr), retrograd in die Vena jugularis platziert. Der Katheter wurde mit dem Messgerät zur Sauerstoffmessung (Vigilance der Firma Baxter) konnektiert und ermöglichte somit eine repräsentative Aussage über die jugular-venöse Sauerstoffsättigung. Der Sensor des Katheters misst spektralphotometrisch die venöse Sauerstoffsättigung und Hämatokrit.

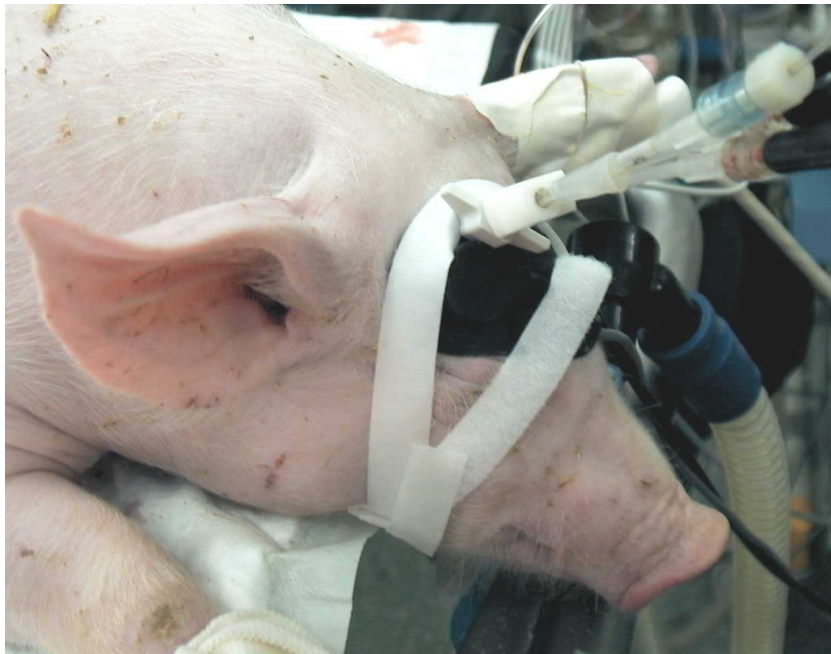


Abb. 6: Messapparatur (NIRO 300, LICOX-Sonden) am Schädel des Ferkels

3.2.2.6 Arterielle Blutgasmessung

Um eine Aussage über die arteriellen Blutgase p_aO_2 , p_aCO_2 und pH-Wert zu erhalten und darüber die Stoffwechsellage einschätzen zu können, werden die drei Parameter mit dem Paratrend 7 der Firma Phillips in der A. femoralis gemessen. Der Messkatheter des Paratrend beinhaltet eine Clark-Elektrode zur p_aO_2 Messung, je einen Lumineszenzsensor zur p_aCO_2 und pH-Wert-Messung und ein Thermoelement zur Temperaturbestimmung. Das Messprinzip basiert auf der polarographischen Methode, d.h. der durch die Membran diffundierende Sauerstoff wird an der Kathode reduziert und ändert dadurch den zwischen der Kathode und Anode bestehenden Polarisationsstrom. Diese Änderungen des Polarisationsstroms sind dabei proportional zum p_aO_2 .

3.2.2.7 Laktatmessung

Die Laktatmessung erfolgte mit Hilfe des Blutgasmessgerätes ABL 725 an 1 ml Vollblut der V. jugularis.

3.2.2.8 S100 β

Der Parameter S100 β wurde mit einem kommerziellen ELISA der Firma Sangtec im

Tab. 7: Messgeräte und dafür notwendige Verbrauchsmaterialien

| Messgerät | Gerätebezeichnung/Größe | Firma |
|-----------------------------------|-------------------------------|---|
| online/inline Blutgasmessgerät | Trend Care/Paratrend 7 | Phillips Medizintechnik, Böblingen, D |
| Nah-infrarot-Spektrophotometrie | NIRO 300 | Hamamatsu, Hamamatsu City, J |
| Flussmessung | T 206 | Transsonic, New York, USA |
| Hirntemperatur | Licox | GMS, Kiel, D |
| ICP Messung | Camino Neurocare | Integra Neuro Sciences, New Jersey, USA |
| optische Sauerstoffmessung | Vigilance | Baxter, Deerfield, USA |
| EKG Messgerät | Sirecust 1261 | Siemens, Erlangen, D |
| ACT Messgerät | ACTI | Medtronic, Anaheim, CA |
| BGA Messgerät | ABL 725 | Radiometer, Kopenhagen, DK |
| 2-lumiger zentralvenöser Katheter | 4 Fr, 8 cm | Arrow, Erding, D |
| Venenverweilkanüle | Biovalve 0,8 / 25 mm | Vygon GmbH & Co. KG, Aachen, D |
| arterieller Katheter | 0,9 mm / G 20 / 2,7 Fr / 8 cm | Arrow, Erding, D |
| Druckmessung | 2fach Druckmessset | medex medical, Ratingen, D |

Serum (1 ml) von jugularvenösen Blutproben gemessen.

3.3 Postoperative Untersuchungen

3.3.1 Gehirnexplantation/ Probenaufbereitung

Nach der vier stündigen Reperfusion wurden die Aufzeichnungen der Parameter beendet, alle Messsonden entfernt und das Ferkel in tiefer Narkose eingeschläfert. Im Anschluss daran wurde das Gehirn laut Sektionsanleitung des Instituts für Veterinärpathologie der Universität Leipzig über einen Querschnitt durch die Schädelkalotte in Höhe des lateralen Augenwinkels und je einen Längsschnitt, rechts und links, vom Foramen occipitale bis zu den Endpunkten der Querschnitte innerhalb von 5 min entfernt. Im Anschluss an die Explantation erfolgte eine makroskopische Untersuchung auf Farbe, Konsistenz des Hirnmantels, Blutungen, Schwellung mit Verstreichen der Sulci, Hyperämie der meningealen Gefäße, Feuchtigkeit und Farbabweichungen der Schnittflächen. Von jeder Gehirnhälfte wurden acht Gewebeproben (occipitaler Kortex, frontaler Kortex, temporaler Kortex, Hippocampus, Kleinhirn, Pons, Thalamus und Vierhügelplatte) genommen und die Proben der rechten Gehirnhälfte für zwei bis vier Tage in 3,7 % gepuffertes Formalin nach Lilie fixiert und

die Proben der linken Gehirnhälfte für 1 Minute in flüssigen Stickstoff schockgefroren und danach bei -80 °C bis zur Herstellung der Gefrierschnitte mittels Kryostat gelagert.

3.3.2 Histologie

3.3.2.1 Hämatoxilin-Eosin-Histologie

Zur Darstellung eventueller histomorphologischer Schäden wurden die Gehirnproben in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet, $2\text{ }\mu\text{m}$ Schnitte angefertigt und anschließend H.E. gefärbt (Romeis, 1989). Mit Hilfe der mikroskopischen Untersuchung sollten Veränderungen der Meningen, der Ganglienzellen, der Neuroglia (Astrozyten, Oligodendroglia und Mikroglia) und der Gefäße aufgezeigt werden. Die Ganglienzellen und die Neuroglia wurden hinsichtlich Zellform, Zellgröße, Zellkern (Form, Lage, Chromatingehalt), Zytoplasma (Menge, Färbung, Struktur, Vakuolisierung, Zellgrenzen) perizellulärer Ödeme und Proliferation untersucht. An den Meningen wurde auf Hyperämie, perivaskuläre Infiltrate, Farbveränderung, Verdickung der Meningen geachtet. An den Gefäßen wurden die Endothelzellen (Form, Zellkern, Vakuolisierung), die Wandstärke und das Gefäßlumen beurteilt.

3.3.2.2 Immunhistologie

3.3.2.2.1 Indirekte Immunfluoreszenz

In dieser Studie wurde zur Darstellung des Antigens HSP70, ein Reparaturenzym, welches durch Ischämie induziert wird (s. 2.6.4.4), die Technik der indirekten Immunfluoreszenz angewendet. Hierbei wird ein in der Maus hergestellter monoklonaler, spezifisch gegen das gesuchte Epitop reagierender Primärantikörper, monoklonaler Maus-anti-HSP70-Antikörper, mit dem Gehirngewebe inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde einmal ein Ziege-Anti-Maus-IgG-Antikörper verwendet, der an das Fluorochrom Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt ist, welches bei einer Wellenlänge von 495 nm im blauen Bereich des sichtbaren Lichtes angeregt und bei einer Wellenlänge von 525 nm im grünen Bereich emittiert wird und somit die Antigen-Antikörperbindung sichtbar gemacht wird. Andererseits wurde als weiterer Sekundärantikörper für die Paraffinschnitte ein Anti-Maus-IgG-POD-konjugierter Antikörper verwendet. Zuerst wurde an dem Gehirngewebe eine Verdünnungsreihe der jeweiligen Primärantikörper in den Konzentrationen von $1:50$, $1:100$, $1:200$ getestet. Die Verdünnung des Sekundärantikörpers erfolgte in den Konzentrationen von $1:100$, $1:200$ und $1:500$, um eine möglichst geringe Hintergrundfluoreszenz als Kontrast zur Darstellung des

Antigens zu erhalten. Aus dieser Verdünnungsreihe ergaben sich wie folgt die eingesetzten Konzentrationen der Antikörper in Form:

| | |
|---|-------------|
| Primärantikörper: Anti- HSP70- Maus-Antikörper | 1:200, 1:50 |
| Sekundärantikörper I: Ziege-Anti-Maus IgG-FITC konjugiert | 1:100 |
| Sekundärantikörper II: Anti-Maus-IgG-POD konjugiert | 1:200 |

3.3.2.2 Immunhistologische Protokolle

3.3.2.2.1 Immunfluoreszenzhistologie an Kryoschnitten zur Quantifizierung

Das Schneiden mit dem Kryostat erfolgte bei einer Temperatur von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und die Schnittdicke betrug $6\text{ }\mu\text{m}$. Die Schnitte wurden auf vorgewärmte Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet und 30 min in Methanol bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixiert. Im Anschluss an die Fixierung wurden die Gewebeschnitte nach folgendem Protokoll bei Raumtemperatur gefärbt (Ormerod und Imrie, 1992):

- 20 min Einlegen in $75\text{ }\mu\text{l}$ Triton X 100 (0,1 %)
- 20 min Einlegen in $75\text{ }\mu\text{l}$ 0,01 mol/l Phosphat gepufferte Saline (PBS) + 1 mg/ml Bovines Serumalbumin (BSA), pH-Wert: 7,4
- über Nacht Inkubation des Gewebeschnittes in der Färbekammer mit $75\text{ }\mu\text{l}$ verdünnten Primärantikörper (1:200) bei Raumtemperatur
- gründliches Spülen am nächsten Morgen mit 0,01 mol/l PBS
- 20 min Einlegen in $75\text{ }\mu\text{l}$ 0,01 mol/l PBS + BSA (1mg/ml)
- 1 h in der feuchter Färbekammer mit $75\text{ }\mu\text{l}$ Sekundärantikörper I (1:100) bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubieren
- gründliches Spülen mit 0,01 mol/l PBS
- 20 min Einlegen in $75\text{ }\mu\text{l}$ 0,01 mol/l PBS

Die Gewebeschnitte wurden aufgrund der Lichtempfindlichkeit des FITC nach der Applikation des Sekundärantikörpers abgedunkelt und alle nachfolgenden Schritte in dunkler Umgebung abgearbeitet. Nach dem Schritt 8 erfolgte das Eindeckeln mittels Dako-Fluoreszens Mountingmedium.

Zur Evaluierung der geeigneten Gehirnregion für die Immunfluoreszenzhistologie wurden von 20 Tieren alle Gehirnregionen immunhistologisch aufgearbeitet und ausgewertet. Anhand dieser Ergebnisse wurde der Hippocampus als Zielregion festgelegt und bei allen Ferkeln näher untersucht.

3.3.2.2.2 Immunhistologie an Paraffinschnitten zur Lokalisierung der Zellexpression

Anhand der Paraffinschnitte sollte herausgefunden werden, welche Gehirnzellen HSP70 exprimieren und ob eine Lokalisierung der HSP-Expression auf den Zellkern oder das Zytoplasma unterschieden werden kann.

Das folgende Protokoll zeigt die einzelnen durchgeführten Schritte der Immunhistologie auf:

- 3 x 10 min entparaffinieren
- waschen in absteigender Alkoholreihe: 1 x 10 min 100 % Ethanol
1 x 10 min 96 % Ethanol
1 x 10 min 76 % Ethanol
- 10 min trocknen
- 5 min in destillierten Wasser rehydrieren
- 10 min waschen in Tris gepufferter Saline (TBS)
- 30 min in Natriumcitrat (0,01 M) bei 800 Watt kochen
- 30 min abkühlen
- 10 min in TBS waschen
- 60 min mit 4 % Milch in TBS und 2 % Pferdeserum blocken
- 2 h mit 100 µl Primärantikörper (1:50) inkubieren bei 37 °C
- 3 x 5 min in TBS waschen
- 1 h mit 100 µl Sekundärantikörper II (1:200) bei Raumtemperatur inkubieren
- 2 x 5 min in TBS waschen
- 30 min mit ACE bei Raumtemperatur färben (s. Anhang)
- 5 min in destillierten Wasser waschen
- eindeckeln in Glycerol-Gelatine

Tab. 8: Eingesetzte Materialien für die Immunhistologie

| Name | Konzentration/Zusammensetzung | Firma |
|---|--|--|
| Triton X 100 | 0,10% | Sigma, Steinheim, D |
| Bovines Serumalbumin | Fraktion V | Sigma, Steinheim, D |
| Pferdeserum | 2% | Sigma, Steinheim, D |
| Ethanol | 100 %, 96 %, 76 % | Roth, Karlsruhe, D |
| tri-Natriumcitrat-Dihydrat | | Roth, Karlsruhe, D |
| Methanol | >99 % | Roth, Karlsruhe, D |
| PBS-Puffer (nach Dulbecco und Voigt, 1954) | NaCl : 8,0 g KCl : 0,2 g Na ₂ HPO ₄ : 0,91 g KH ₂ PO ₄ : 0,12 g Aqua bidest : ad 1000 ml pH:7,4 | Roth, Karlsruhe, D Merck, Darmstadt, D Merck, Darmstadt, D Roth, Karlsruhe, D |
| TBS-Puffer | Tris :2,42 g/l NaCl :29,22 g/l Aqua bidest :ad 1000 ml | Roth, Karlsruhe, D Merck, Darmstadt, D |
| ms-anti HSP70 | monoclonal, 1:200 SPA-810 | Stress Gen, Victoria, Canada |
| ziege-anti maus IgG | polyclonal, 1:100 F 4143 | Sigma, Steinheim, D |
| anti maus-IgG POD konjugiert | polyclonal, 1:200 A 9044 | Sigma, Steinheim, D |

3.3.3 Hochleistungschromatographie

Die Methode der Hochleistungschromatographie (HPLC) gehört zu den leistungsfähigen chromatographischen Trennverfahren, welche zur Analyse löslicher fester und flüssiger Substanzgemische in der Lage ist und diese Substanzgemische in ihre einzelnen Komponenten zerlegen kann. Zur Analyse der MDA-Werte wurde eine HPLC-Methode angewendet, die auf einem kommerziellen Essay der Firma Chromsystems (MDA im Plasma) beruht. Das Verfahren stellt eine isochromatische Trennung des MDA aus dem Plasma nach Derivatisierung mit Fluochrom dar. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine Proteinfällung von 100 µl Plasma mit 500 µl Präzipitationsreagenz durchgeführt. Im Anschluss daran erfolgte eine Zentrifugation bei 13000 U/min über fünf Minuten. Der resultierende Überstand wurde mit Fluochrom durch Zugabe von 100 µl Derivatisierungsreagenz derivatisiert. Um die chemische Reaktion durchzuführen wurde das Gemisch 60 min bei 95 °C inkubiert. Danach wurde die Probe auf Eis abgekühlt und mit 500 µl Neutralisationspuffer vermischt. Anschließend wurden je 20 µl auf die HPLC-Säule (RP18) mit einer Säulentemperatur von 25 °C injiziert und in einem isochromatischen Verfahren mit einer Flussrate von 1 ml/min getrennt. Zur Quantifizierung wurden den Proben ein interner Kalibrationsstandard zugesetzt, sowie nach jeder Messung eine externe Plasmakontrolle mit bekannter MDA-Konzentration vermessen. Zur Detektion wurde ein Fluoreszenzdetektor verwendet.

Der ausgewertete MDA-Peak erscheint bei 2,8 min, die Laufzeit insgesamt betrug pro Analysegang sechs Minuten. Zwischen den Analyseängen wurde die Säule mit einem Gemisch aus Wasser und Methanol (1:1) gespült und gelagert. Als HPLC wurde das System Gynkotek der Firma Dionex (Idstein, Deutschland) verwendet.

3.3.4 Bildauswertung

Zum Mikroskopieren stand ein Axiolab (Zeiss) und eine Nikon F4 Kamera (Nikon, Japan) mit zusätzlichem Okular (Phototubus), welches durch einen Lichtwegteiler geöffnet werden konnte und auf welchen die Kamera montiert wurde, zur Verfügung. Weiterhin wurde mit 200 ASA Agfa-Diafilmen gearbeitet. Zu Beginn wurde mit einer 400x Vergrößerung im Phasenkontrast ein typischer Bezirk des Gewebes herausgesucht und danach mit der 1000x Vergrößerung in der Immunfluoreszenz das Areal kurz durchgemustert und im Anschluss die repräsentativen Gebiete 20 sec belichtet. Von jedem dieser Gebiete wurde zusätzlich noch ein Phasenkontrastbild mit der Belichtungsautomatik der Kamera fotografiert. Über das Auswertungsprogramm KS 300 der Firma Zeiss wurde anhand der eingescannten Phasenkontrastdias die Gehirngesamtfläche in Bezug auf die gesamte Diafläche ermittelt. An den

immunhistologisch aufgearbeiteten Dias wurden die fluoreszierende Fläche und gleichzeitig der prozentuale Anteil der Fluoreszenz am Gesamtbild berechnet. Über die Formel

$$A_{\text{relativ}}^{\text{fluor}} = \frac{A_{\text{absolut}}^{\text{fluor}} \times 100}{A_{\text{gesamt}}}$$

ergibt sich der eigentliche prozentuale Anteil der Fluoreszenz, welcher als Vergleichswert zwischen allen Versuchsgruppen dient.

3.4 Statistik

Die Auswertung aller Versuchsreihen erfolgte unter Angabe des jeweiligen Mittelwertes und seines Standardfehlers (MW \pm SEM). Die Studie der hier vorgelegten Arbeit entsprach einem zweifaktoriellen Design mit Messwertwiederholung. Die Faktoren Temperatur und HLM-Fluss waren jeweils dreistufig. Entsprechend diesem Design wurde eine zweifaktorielle multivariante Varianzanalyse berechnet und für den Fall, dass statistisch signifikante Unterschiede detektiert wurden, schloss sich ein post hoc Tukey HSD für multiple Vergleiche an. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert $<0,05$ festgelegt. Um den Zusammenhang zwischen den Parametern zu untersuchen, erfolgte eine Berechnung mittels Pearson Korrelation auf dem gleichen Signifikanzniveau. Dies diente vor allem dazu, mögliche Prädiktoren der Ischämie wie MDA, Laktat, TOI und Q mit dem Ischämieparameter HSP70 zu korrelieren.

4 Ergebnisse

4.1 Versuchsdurchführung

4.1.1 Versuchsablauf

Alle Operationen verliefen wie geplant und wie im Methodenteil beschrieben. Die Gefäße konnten problemlos punktiert und die entsprechenden Katheter für die Messungen platziert werden. Die Präparation für die Kanülierung des Herzens entsprach der bei herzchirurgischen Eingriffen zur Korrektur angeborener Herzfehler angewandten Technik. Die üblichen Kanülengrößen (arterielle Kanüle: 3 mm, venöse Kanüle: 14 Fr) konnten auch beim Ferkel eingesetzt werden.

4.1.2 Anästhesie

Um einen gruppenspezifischen Einfluss der Beatmung ausschließen zu können, wurden alle Tiere möglichst mit den gleichen Beatmungsparametern vor, während und nach der Ischämiephase ventilert (s. Tab. 9). Innerhalb der Reperfusionphase musste nach Blutgasanalyse bei einigen Ferkeln situationsbedingt die Beatmungseinstellung am Narkosegerät variiert werden, obwohl dies meist nicht über eine Änderung der Atemfrequenz oder des prozentualen Sauerstoffangebots hinausging. Als Zielwerte der Blutgasanalyse galten: $p\text{CO}_2$: 35-42 mmHg

$p\text{O}_2 > 90$ mmHg

arterielle Sättigung > 95 %

Tab. 9: Beatmungsparameter während des Versuchsablaufs

| Beatmungsparameter | vor Ischämie | Ischämie | Reperfusion |
|--------------------|--------------|----------|-------------|
| Frequenz in 1/min | 12 | 6 | 12 |
| AZV in ml | 100-120 | 30 | 100-120 |
| AMV in l/min | 1,2 | 0,2 | 1,2 |
| PEEP in mmHg | 3 | 0 | 3 |

4.1.3 Flüssigkeitsmanagement

In den Vorversuchen an acht Ferkeln wurde der Behandlungsablauf zunächst standardisiert. Das Primingvolumen wurde durch Verkleinerung und Optimierung des HLM Sets auf 80 ml reduziert. Ferner wurde die Gabe von Gelafundin auf ein Minimum von etwa 100 ml reduziert und es wurde offensichtlich, dass sich ein ausreichender Hkt trotz aller Blutsparmaßnahmen nur durch Gabe von Fremdblut aufrecht erhalten ließ.

4.1.4 Bluttransfusion

Bei einigen Tieren war es nötig, weitere Maßnahmen zu ergreifen, um den Hkt innerhalb der physiologischen Grenzen zu halten. Hierfür stand das Schweineblut von Schlachtschweinen zur Verfügung, welches in den gepufferten Bluttransfusionsbeuteln bei 0 °C bis zu vier Tagen aufzubewahren war. Die transfundierte Blutmenge betrug jeweils zwischen 250 ml und 350 ml. Die Ferkel der Kontrollgruppe benötigten etwa 250 ml Blut im Vergleich zu den Tieren der 38 °C 25 % bzw. 50 % und der 25 °C 25 % Gruppen, welchen im Durchschnitt 350 ml Blut transfundiert wurde. Alle anderen Gruppen erhielten 300 ml, wobei die Bluttransfusionsmenge bei den Einzeltieren von der jeweiligen Kreislaufsituation abhängig war. Anhand der Kreuzproben vor der Bluttransfusion konnte eine mögliche Agglutinationsreaktion zwischen dem Spender- und Empfängerblut abgeschätzt werden. Die venösen Blutkaliumwerte der Ferkel innerhalb der Reperfusion lagen in allen Gruppen außer der 38 °C 25 % und 50 % Gruppe im physiologischen Bereich von 4,5-6,5 mmol/l (Plonait u. Bickhardt, 1988). In den HLM-flussreduzierten 38 °C Gruppen lagen die Blutkaliumwerte mit 7 bis 9 mmol/l deutlich über den für Schweine angegebenen Normalwerten.

Tab. 10: Vergleich der venösen Blutkaliumwerte während der Reperfusion zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (n=9)

| Gruppe | venöses Kalium 1 h Reperfusion | venöses Kalium 2 h Reperfusion | venöses Kalium 3 h Reperfusion | venöses Kalium 4 h Reperfusion |
|-------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 18 °C/25 % | 5,1 | 4,9 | 5,2 | 6 |
| 18 °C/50 % | 5 | 5,2 | 5,5 | 6,1 |
| 18 °C/100 % | 5 | 4,8 | 4,9 | 5,4 |
| 25 °C/25 % | 5,5 | 6 | 6,2 | 7,1 |
| 25 °C/50 % | 5,3 | 5,6 | 5,9 | 6,5 |
| 25 °C/100 % | 5,5 | 5,8 | 6 | 6,2 |
| 38 °C/25 % | 9,7 | 7,5 | 7,9 | 9 |
| 38 °C/50 % | 7,3 | 6,9 | 7,1 | 7,8 |
| 38 °C/100 % | 5,6 | 5,3 | 5,7 | 5,8 |

4.2 Veränderungen der Verlaufsparemeter

4.2.1 Parameterverläufe der am stärksten geschädigten Gruppe (38 °C 25 %)

Um den Einfluss der EKZ auf den Gesamtstoffwechsel und den damit verbundenen Parametern am deutlichsten darzustellen, soll der generelle Verlauf einiger Parameter am Beispiel der am stärksten geschädigten Gruppe, 38 °C 25 %, aufgezeigt werden (s. Abb. 7 und 8).

Aufgrund der Senkung des HLM-Flusses sank auch der Blutfluss innerhalb der Arteria carotis zu Beginn der Ischämiephase. Während der Ischämie blieb der Blutfluss im Minimumbereich und stieg am Ende der Ischämie an. Obwohl jedoch der HLM-Fluss wieder auf den Ausgangswert angehoben wurde, erreichte der Blutfluss innerhalb der Arteria carotis nicht seinen Ausgangswert sondern erreichte nur die Hälfte ca. 40 mmHg. Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP), und der Blutfluss nahmen aufgrund der Flussreduktion des Kreislaufs vor Ischämiebeginn ab. Der MAP erreichte auch innerhalb dieser Phase seinen Minimalwert und stieg am Ende der Ischämie wieder an, um nach der vier stündigen Reperfusion etwa die Hälfte des Ausgangswertes zu erlangen. Durch die Senkung des Blutflusses und der daraus resultierenden Reduktion des Sauerstoffangebots, in Vorbereitung auf die Ischämie, ähnelte der Kurvenverlauf des TOI dem des Blutflusses. Zum Ende der Ischämie wurde die Aorta wieder geöffnet und das Tier erhielt wieder 100 % Sauerstoff. Somit stieg der TOI innerhalb der Reperfusion an und blieb bis zum Ende der Reperfusion unterhalb seines Ausgangswertes.

Die Sauerstoffsättigung, gemessen in der Vena jugularis interna, sank auch mit der Reduktion des Blutflusses und erreichte ihren Tiefpunkt mit Verschluss der Aorta. Innerhalb der Ischämiephase blieb die venöse Sättigung durch die vermehrte Sauerstoffextraktion des Gehirns erniedrigt und stieg erst während der Reperfusion, in welcher 100 % Sauerstoff angeboten wurde, wieder an. Aber auch die Sättigung erlangte innerhalb der vier Stunden Reperfusion nicht wieder den Ausgangswert.

Infolge der verminderten Sauerstoffzufuhr bei vollkommen aufrecht erhaltenem Stoffwechsel, sank der pH-Wert zeitverzögert zum Abfall der Sättigung, im Zeitfenster zwischen Kardioplegiegabe und den ersten 30 Minuten Ischämie, in den azidotischen Bereich. Am Ende der Ischämie stieg er auch wieder an, blieb aber im sauren Bereich bis zum Ende der Reperusionsphase.

Der Kurvenverlauf des venös gemessenen Laktat glich einer stetig steigenden Geraden mit einem Maximum am Ende der vier Stunden Reperfusion, obwohl anhand des Kurvenverlaufs, trotz eventueller Verlängerung der Reperfusion, keine Absenkung zu

bermerken war. Wie auch bei der pH-Wert-Kurve wurde eine zeitliche Verzögerung des Anstiegs, im Gegensatz zu allen restlichen Kurven, deutlich.

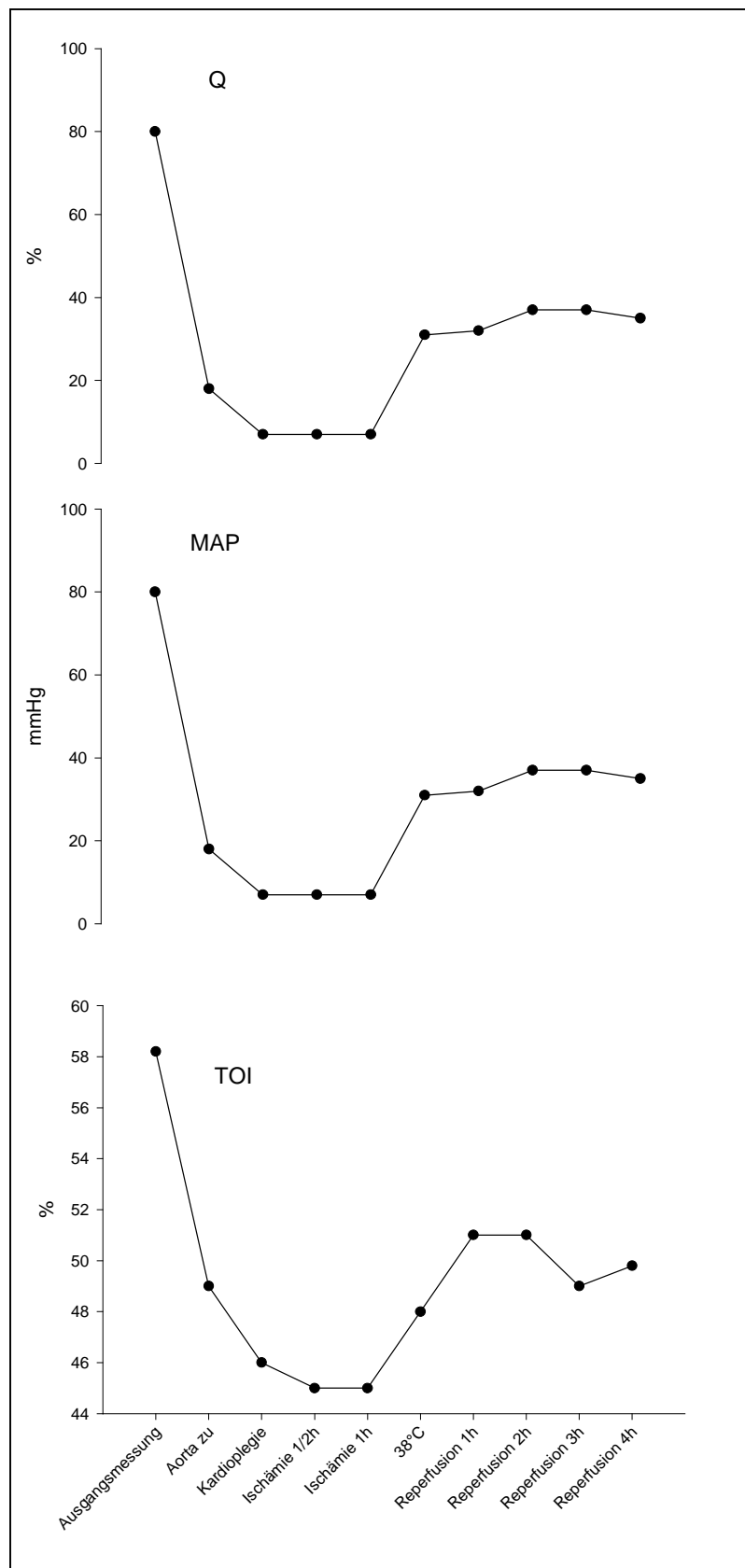


Abb. 7: Darstellung von Q, MAP, TOI eines Einzeltieres der 38 °C 25 % Gruppe über den gesamten Versuchszeitraum (Versuchsphasen vgl. Abb.3)

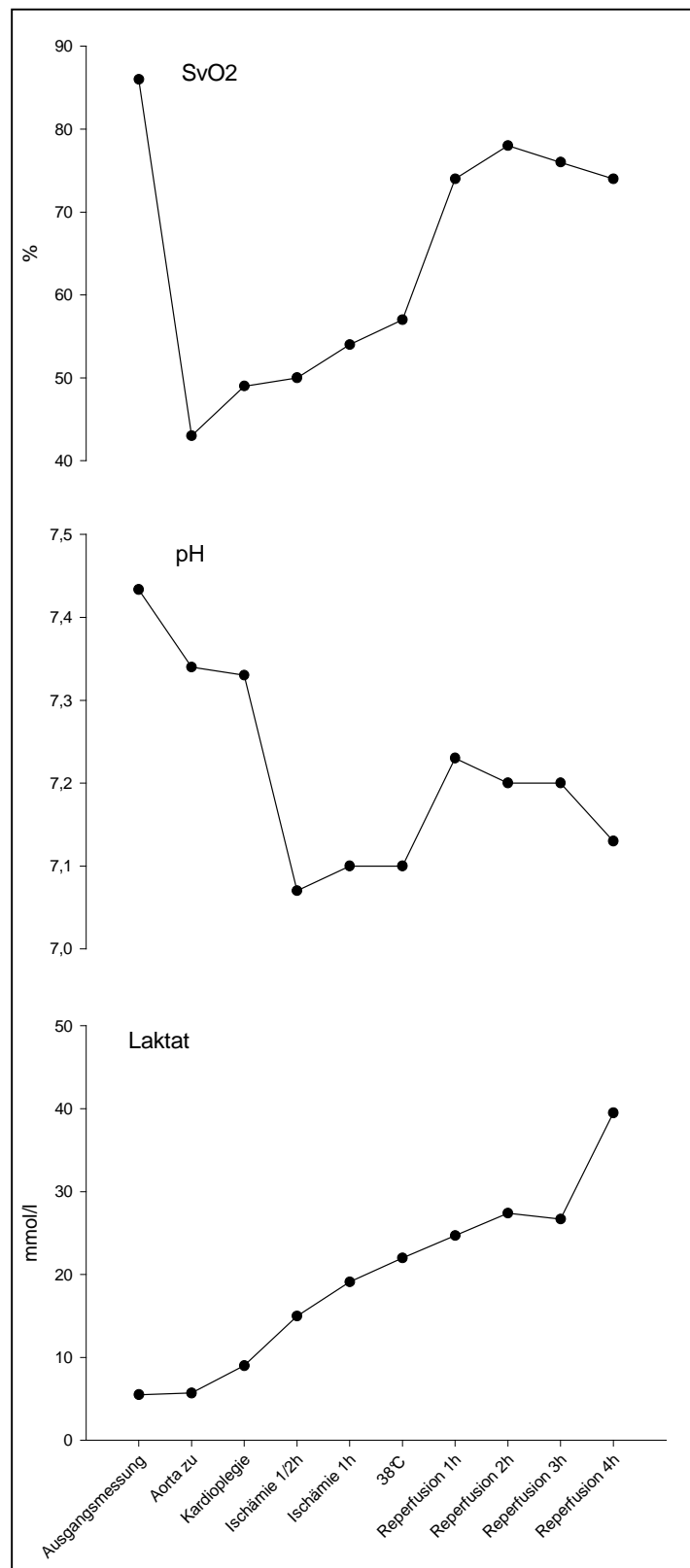


Abb. 8: Darstellung von S_{vO_2} , pH und Laktat eines Einzeltieres der 38 °C 25 % G ruppe über den gesamten Versuchszeitraum

4.2.2 Gruppenvergleich einzelnen Parameter

4.2.2.1 Blutfluss der Arteria carotis

Es konnte ein signifikanter Effekt der Temperatur ($p < 0,01$) und des HLM-Flusses ($p < 0,01$) auf den Blutfluss der A. carotis (Q) nachgewiesen werden. Innerhalb eines Versuches unterschied sich der Carotisfluß signifikant zwischen einer Stunde Ischämie und dem Ende der Reperfusion ($p < 0,01$). Dieser Unterschied wurde tendenziell durch die Temperatur beeinflusst ($p = 0,06$). Der vorgegebene HLM-Fluß hingegen hatte keinen Einfluss auf das Verhalten des Carotisflusses zwischen Ischämieende und dem Reperfusionseende.

Bei einer Absenkung der Temperatur auf 18 °C sank der Blutfluss in der Arteria carotis in allen Versuchsgruppen zum Verschluss der Aorta in gleichem Maß ab. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen traten erst ab dem Verschluss der Aorta und der prozentualen Flusseinstellung an der HLM auf. Die Blutflusskurven aller drei Versuchsgruppen verliefen annähernd parallel, obwohl im Verlauf der Ischämiephase sich der Einfluss des HLM-Flusses im Blutfluss der A. carotis widerspiegelte und die Versuchsgruppe mit dem niedrigsten HLM-Fluß auch die niedrigsten Blutflusswerte zeigte. Innerhalb der vier Stunden Reperfusion ist dieses Verhältnis nicht sichtbar und die Kurve der Versuchsgruppe mit 100 % HLM-Fluß verlief zeitweise unterhalb der anderen beiden Versuchsgruppen. Am Ende der vierstündigen Reperfusion erzielte der Blutfluss aller drei Gruppen Werte zwischen 50 und 55 ml/min, im Gegensatz zum Ausgangswert von 80 ml/min.

Im Vergleich zu den Versuchsgruppen mit einer Temperatur von 18 °C wurde in den 25 °C Gruppen eine unterschiedliche Absenkung des Blutflusses bei Verschluss der Aorta erkennbar. Während der Ischämiephase sank der Blutfluß der 25 °C 25 % Gruppe deutlicher unter den der 18 °C 25 % Gruppe, wobei wiederum die Blutflusswerte der 25 °C 50 % und 100 % über denen der 18 °C 50 % und 100 % lagen. Die Ischämiephase war im Gegensatz zu den 18 °C Gruppen in allen 25 °C Gruppen deutlicher erkennbar und am Ende der Ischämie bzw. bei Erwärmung auf die Körpertemperatur stieg der Blutfluss stark an und erreichte sein Maximum. Im Kurvenverlauf der Reperfusion zeigte sich wieder eine Differenzierung der einzelnen Versuchsgruppen in Abhängigkeit des HLM-Flusses. Die Blutflussendwerte lagen alle bei 55 ml/min.

Die drei Kurvenverläufe der 38 °C Gruppen waren nicht so homogen wie die der 18 °C und 25 °C Gruppen. In der eigentlichen Kontrollgruppe (38 °C 100 %) zeigte sich zwar auch eine Absenkung des Blutflusses zum Verschluss der Aorta, aber der Blutfluss erreichte in der Ischämiephase Werte zwischen 45-50 ml/min. Innerhalb der vier Stunden

Reperfusion lagen die Blutflusswerte stabil um 60 ml/min. Eine HLM-Flußreduktion auf 25 % bzw. 50 % bei voll erhaltenem Stoffwechsel führte zu einer Blutflussreduktion der A. carotis auf 10-15 ml/min in der Ischämiephase. Am Ende der vier Stunden Reperfusion beliefen sich die Mittelwerte der beiden HLM flussreduzierten Gruppen auf ca. 30 ml/min, und somit auf weniger als die Hälfte des Ausgangswertes. Daher wurde ersichtlich, dass eine Reduktion des HLM-Flusses in der 38 °C Gruppe größere Auswirkungen erzielte als in den beiden Hypothermiegruppen (s. Abb. 9).

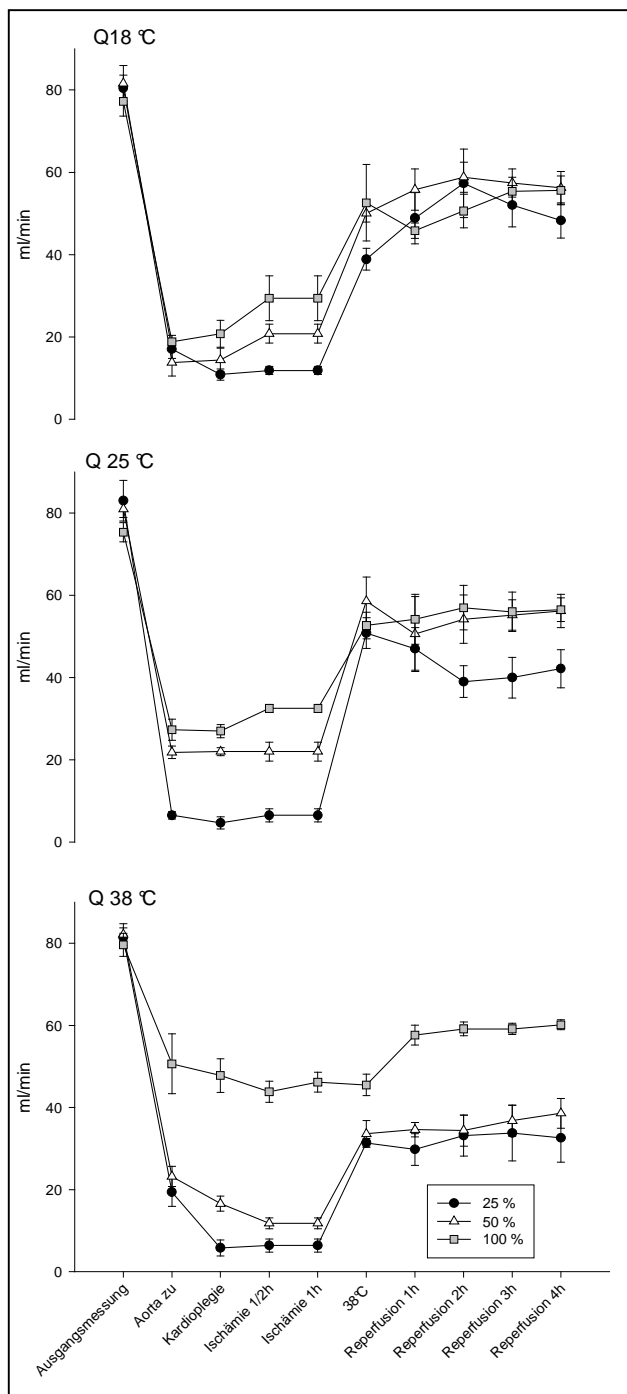


Abb. 9: Vergleichende Darstellung der Veränderungen des Blutflusses (Q in ml/min) an der A. carotis der Schweine aller Versuchsgruppen (n=6 pro Gruppe) im Verlauf des Experimentes

4.2.2.2 Mittlerer arterieller Blutdruck und intrakranialer Druck

Wie auf Abb. 10 zu erkennen ist, sank der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) in allen 18 °C Gruppen während der Ischämiephase in Abhängigkeit von dem jeweiligem HLM-Fluß, so dass die 18 °C 25 % Gruppe die niedrigsten Werte während der Ischämie erreichte. Der MAP der 18 °C 100 % Tiere sank um 10 mmHg bei Verschluss der Aorta und behielt diesen Wert im weiteren Versuchsablauf bei. In der Zeit der Reperfusion lagen jedoch die MAP-Werte aller Gruppen im Bereich um die 40 mmHg. Auch bei dem Parameter MAP war die Differenzierung der Kurvenverläufe in Abhängigkeit des HLM-Flusses innerhalb der Ischämiephase sichtbar. Im Gegensatz zur deutlichen Trennung der Versuchsgruppen während der Ischämiephase verliefen die Kurven innerhalb der Reperfusionsephase sehr nahe beieinander und die MAP-Werte beliefen sich auf 40 mmHg. Somit ergab sich am Ende der Reperfusion kein Unterschied zur 18 °C Gruppe. Im Vergleich zur 18 °C Gruppe sanken die MAP-Werte dieser Gruppe innerhalb der Ischämiephase jedoch stärker ab. Die Kurvenverläufe der 38 °C Gruppen variierten von den beiden Hypothermiegruppen in der Art, dass sich einerseits die Ischämiephase nicht deutlich abgrenzbar darstellte und andererseits auch innerhalb der Reperfusionsephase die MAP-Werte nur langsam steigen. Die Kurvenendwerte nach vier Stunden Reperfusion lagen bei den 25 % und 50 % HLM-Flussgruppen etwa bei 25-30 mmHg. Der Kurvenverlauf der 38 °C 100 % Gruppe zeigte nur geringe Änderungen gegenüber dem Ausgangswert, und der MAP sank nur um 10 mmHg in der Ischämiephase und der Reperfusionsephasesendwert lag bei 45 mmHg.

Der Ausgangswert des intrakraniellen Druckes (ICP) aller Tiere lag im Bereich zwischen 12-18 mmHg, was zu vergleichen ist mit einem ICP unter Normalbedingungen bei erwachsenen Menschen von 7,5-15 mmHg. Im Verlauf des Versuches sank der ICP geringgradig innerhalb der Ischämiephase und stieg in der Reperfusion noch über den Ausgangswert an. Allein in den flussreduzierten Normothermiegruppen ist der ICP am Ende der Reperfusion leicht erhöht.

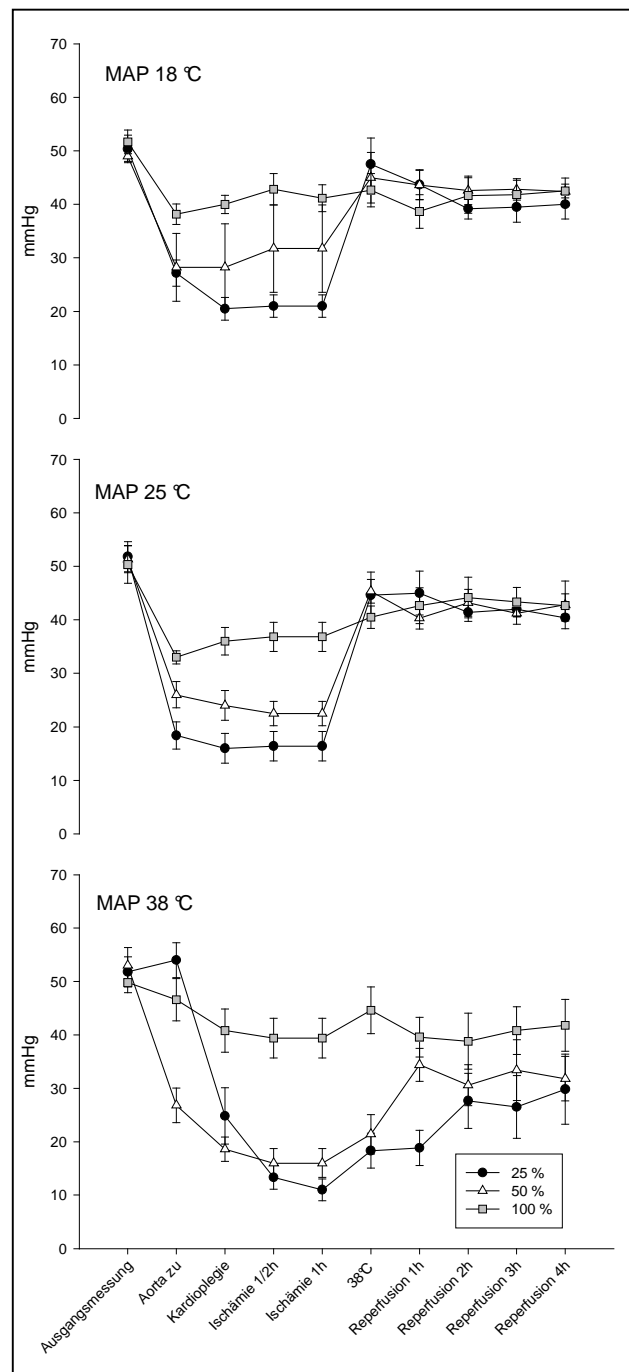


Abb. 10: Vergleichende Darstellung der Veränderungen des mittleren arteriellen Druckes (MAP in mmHg) in der A. femoralis der Schweine aller Versuchsgruppen (n=6 pro Gruppe) im Verlauf des Experimentes

Tab. 11: Darstellung der Veränderungen des intrakraniellen Druckes (ICP in mmHg) der Schweine aller Versuchsgruppen (n=6 pro Gruppe) im Verlauf des Experimentes

| ICP | 18 °C/100 % | 18 °C/50 % | 18 °C/25 % |
|--------------------------|-------------|------------|------------|
| Ausgangsmessung | 13+/-3 | 17+/-2 | 18+/-1 |
| Aorta zu | 12+/-3 | 15+/-2 | 12+/-2 |
| Ende Kardioplegie | 11+/-3 | 15+/-3 | 10+/-2 |
| Ischämie 1/2 h | 12+/-4 | 15+/-3 | 9+/-2 |
| Ischämie 1 h | 13+/-4 | 13+/-1 | 11+/-1 |
| 38 °C | 13+/-3 | 15+/-4 | 11+/-2 |
| Reperfusion 1 h | 16+/-3 | 15+/-3 | 15+/-3 |
| Reperfusion 2 h | 17+/-3 | 18+/-3 | 14+/-4 |
| Reperfusion 3 h | 18+/-3 | 19+/-3 | 17+/-3 |
| Reperfusion 4 h | 17+/-2 | 18+/-3 | 17+/-4 |

| ICP | 25 °C/100 % | 25 °C/50 % | 25 °C/25 % |
|--------------------------|-------------|------------|------------|
| Ausgangsmessung | 11+/-4 | 12+/-2 | 16+/-5 |
| Aorta zu | 9+/-5 | 9+/-2 | 13+/-7 |
| Ende Kardioplegie | 12+/-4 | 8+/-2 | 13+/-7 |
| Ischämie 1/2 h | 12+/-5 | 8+/-2 | 12+/-7 |
| Ischämie 1 h | 12+/-3 | 8+/-2 | 11+/-5 |
| 38 °C | 17+/-3 | 11+/-2 | 14+/-4 |
| Reperfusion 1 h | 21+/-4 | 15+/-2 | 18+/-4 |
| Reperfusion 2 h | 19+/-7 | 17+/-4 | 15+/-4 |
| Reperfusion 3 h | 18+/-3 | 19+/-4 | 19+/-3 |
| Reperfusion 4 h | 18+/-3 | 19+/-5 | 19+/-4 |

| ICP | 38 °C/100 % | 38 °C/50 % | 38 °C/25 % |
|--------------------------|-------------|------------|------------|
| Ausgangsmessung | 18+/-4 | 15+/-2 | 14+/-3 |
| Aorta zu | 18+/-5 | 11+/-3 | 11+/-2 |
| Ende Kardioplegie | 15+/-5 | 10+/-2 | 10+/-3 |
| Ischämie 1/2 h | 15+/-5 | 10+/-1 | 8+/-3 |
| Ischämie 1 h | 19+/-1 | 11+/-3 | 9+/-4 |
| 38 °C | 19+/-1 | 11+/-3 | 17+/-4 |
| Reperfusion 1 h | 20+/-5 | 15+/-4 | 23+/-3 |
| Reperfusion 2 h | 20+/-4 | 21+/-5 | 24+/-4 |
| Reperfusion 3 h | 20+/-3 | 22+/-3 | 25+/-3 |
| Reperfusion 4 h | 20+/-3 | 22+/-3 | 25+/-4 |

4.2.2.3 Tissue oxygenation index und Tissue hemoglobin index

Anhand der statistischen Analyse konnte ein signifikanter Effekt der Temperatur auf den TOI nachgewiesen werden ($p < 0,01$). Darüber hinaus beeinflusste die Temperatur auch die Veränderung des TOI zwischen den Versuchszeitpunkten (eine Stunde Ischämie und Reperfusionsende) mit ($p < 0,01$).

Der TOI, das Verhältnis von oxygeniertem Hämoglobin zum gesamten Hämoglobin ist aus der Abb. 11 zu entnehmen. Bis auf die Verdünnung am Anfang des Versuches (Priming: 80ml) und eine eventuelle Bluttransfusion während der Reperfusion kann das Gesamthämoglobin vernachlässigt werden und der TOI beschreibt vorwiegend das oxygenierte Hb des Gehirns. Aufgrund des verminderten Sauerstoffangebotes vor allem in der 18 °C 25 % Gruppe sank der TOI, also das oxygenierte Hb, in der Ischämiephase und erneut in der Reperfusion auf Werte um die 50 %. Während der Ischämie war keine sinkende Tendenz innerhalb der 50 % und 100 % Gruppen sichtbar. In der Erwärmungsphase sank der TOI in allen Gruppen auf 52-54 % und stieg in der Reperfusion in den 50 % und 100 % Flussgruppen auf annähernd den Ausgangswert.

Die Verläufe der 25 °C Gruppen zeigten keine signifikante Änderung über den gesamten Versuchszeitraum. Anhand der Mittelwerte der 25 % Gruppe war eine geringe Absenkung des TOI innerhalb der Ischämiephase sichtbar. Die 25 % Gruppe hebt sich durch niedrigere Werte im gesamten Versuchsablauf inklusive Ausgangsmessung von den anderen beiden Gruppen ab.

Der Verlauf der 38 °C 100 % Gruppe zeigte im Vergleich zu der 25 % und 50 % Gruppe eine unterschiedliche Tendenz in der Absenkung während der Ischämiephase. In den beiden reduzierten HLM-Flussgruppen war eine Absenkung des TOI in der Ischämiephase erkennbar und ein kleiner Anstieg am Anfang der Reperfusion, wobei sich ein Unterschied von 5-10 % zwischen Ausgangswert und Endwert darstellte. In der 100 % Gruppe sank der Kurvenverlauf gering bis zum Ende der Ischämie ab und stieg zum Versuchsende langsam wieder in den Bereich des Ausgangswertes an. Insgesamt war bei den flussreduzierten Gruppen unter Normothermie eine stärkere Absenkung des TOI im Gegensatz zu allen anderen Versuchsgruppen erkennbar. Die Tabelle 11 beschreibt die THI Verläufe während des gesamten Versuchszeitraumes. In allen 9 Versuchsgruppen sank der THI, also das Gesamthämoglobin, während der Ischämiephase leicht ab und erreichte auch bis auf Ausnahmen die Ausgangswerte.

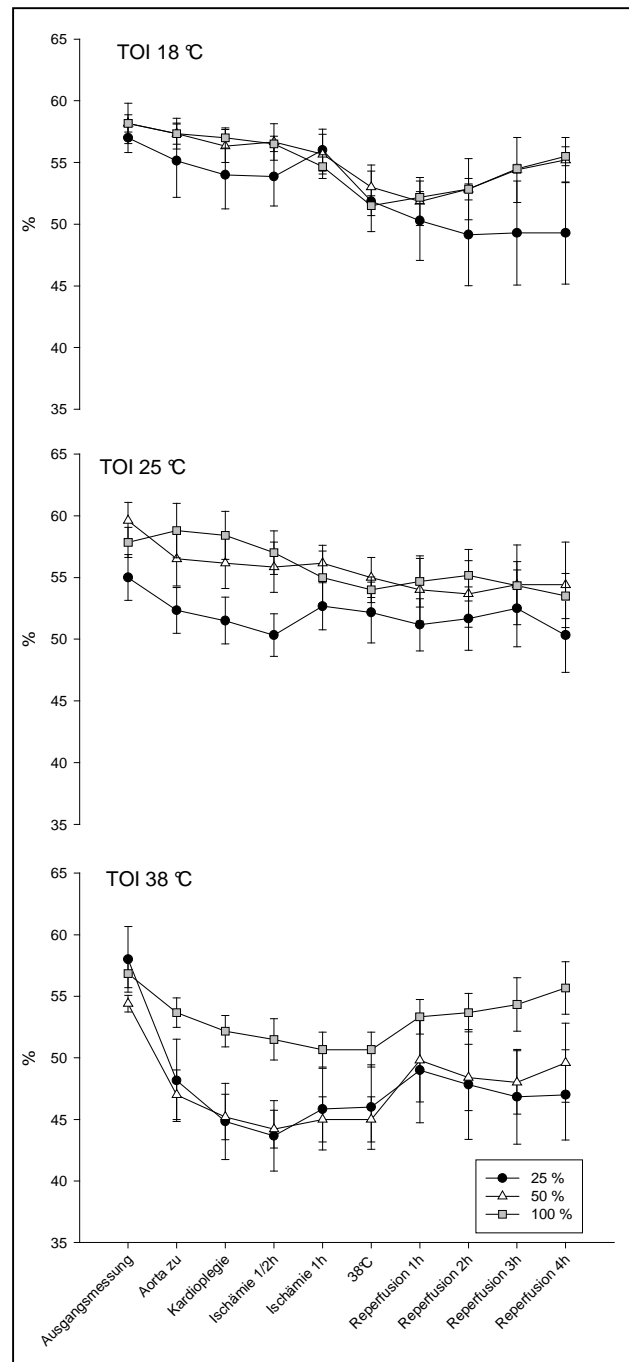


Abb. 11: Vergleichende Darstellung der Veränderungen des Tissue oxygenation index (TOI in %) der Schweine aller Versuchsgruppen (n=6 pro Gruppe) im Verlauf des Experimentes

Tab.12: Darstellung der Veränderungen des Tissue hemoglobin index (THI in %) der Schweine aller Versuchsgruppen (n=6 pro Gruppe) im Verlauf des Experimentes

| THI | 18 °C/100 % | 18 °C/50 % | 18 °C/25 % |
|--------------------------|-------------|------------|------------|
| Ausgangsmessung | 65+/-10 | 64+/-6 | 74+/-7 |
| Aorta zu | 58+/-10 | 62+/-5 | 65+/-7 |
| Ende Kardioplegie | 58+/-10 | 62+/-5 | 64+/-7 |
| Ischämie 1/2 h | 57+/-10 | 59+/-5 | 65+/-8 |
| Ischämie 1 h | 57+/-10 | 58+/-5 | 65+/-8 |
| 38 °C | 61+/-11 | 59+/-5 | 75+/-11 |
| Reperfusion 1 h | 67+/-13 | 58+/-6 | 74+/-9 |
| Reperfusion 2 h | 69+/-12 | 59+/-6 | 76+/-9 |
| Reperfusion 3 h | 69+/-12 | 59+/-7 | 75+/-8 |
| Reperfusion 4 h | 68+/-12 | 59+/-7 | 75+/-8 |

| THI | 25 °C/100 % | 25 °C/50 % | 25 °C/25 % |
|--------------------------|-------------|------------|------------|
| Ausgangsmessung | 54+/-4 | 62+/-4 | 59+/-6 |
| Aorta zu | 55+/-5 | 54+/-4 | 54+/-6 |
| Ende Kardioplegie | 54+/-5 | 53+/-4 | 53+/-6 |
| Ischämie 1/2 h | 53+/-6 | 51+/-4 | 51+/-5 |
| Ischämie 1 h | 51+/-5 | 51+/-4 | 53+/-6 |
| 38 °C | 54+/-4 | 52+/-4 | 56+/-6 |
| Reperfusion 1 h | 54+/-5 | 51+/-3 | 57+/-6 |
| Reperfusion 2 h | 55+/-4 | 51+/-2 | 59+/-6 |
| Reperfusion 3 h | 54+/-4 | 53+/-2 | 60+/-6 |
| Reperfusion 4 h | 54+/-4 | 52+/-4 | 59+/-5 |

| THI | 38 °C/100 % | 38 °C/50 % | 38 °C/25 % |
|--------------------------|-------------|------------|------------|
| Ausgangsmessung | 68+/-7 | 56+/-11 | 55+/-3 |
| Aorta zu | 65+/-6 | 51+/-9 | 46+/-2 |
| Ende Kardioplegie | 63+/-6 | 50+/-8 | 44+/-2 |
| Ischämie 1/2 h | 62+/-6 | 50+/-8 | 41+/-3 |
| Ischämie 1 h | 58+/-6 | 53+/-8 | 43+/-4 |
| 38 °C | 58+/-6 | 54+/-8 | 43+/-4 |
| Reperfusion 1 h | 59+/-5 | 59+/-8 | 48+/-6 |
| Reperfusion 2 h | 61+/-7 | 61+/-7 | 49+/-5 |
| Reperfusion 3 h | 66+/-8 | 63+/-5 | 50+/-4 |
| Reperfusion 4 h | 71+/-8 | 65+/-5 | 50+/-5 |

4.2.2.4 Sauerstoffsättigung im jugularvenösen Blut

Nach den Informationen über den zerebralen Sauerstoffhaushalt in Form von oxygenierten Hb im Gehirn stellte sich die Frage, wie stark die Sauerstoffextraktion des Gehirns und somit die Sauerstoffsättigung des Hb im Vergleich zwischen allen Versuchsgruppen war. Wie aus Abb. 12 hervorgeht, sank in allen 18 °C Gruppen die Sättigung geringfügig zum Ende der einen Stunde Ischämie hin und in den 18 °C 25 % und 50 % Flussgruppen deutlich in der Erwärmungsphase. Hatten die Schweine ihre normale Körpertemperatur erreicht, stieg die Sättigung wieder auf Werte um die 80 %. Der Verlauf der 100 % Gruppe zeigte zum Ende der Ischämie eine sinkende Tendenz und in den letzten zwei Stunden Reperfusion erreichte die Sättigung sogar Werte oberhalb des Ausgangswertes.

Die Sättigungswerte aller drei Versuchsgruppen mit einer Temperatur von 25 °C verliefen als Gruppe homogener als die 18 °C Gruppen. Die Mittelwerte der Sättigung zeigten eine geringe Absenkung im Zeitfenster 30 Minuten Ischämie bis Erwärmung auf 38 °C. Die Endwerte differierten in allen Gruppen nur sehr gering von den Ausgangswerten. Innerhalb der ersten Reperfusionstunde stieg die Sättigung in der 50 % und 100 % Gruppe, wobei der Anstieg der Sättigung in der 100 % Gruppe auch in der zweiten Reperfusionstunde noch anhielt. Die Absenkung der Sättigung innerhalb der Erwärmungsphase war im Gegensatz zu den 18 °C Gruppen nicht so deutlich zu sehen. Der Kurvenverlauf der 38 °C 100 % Gruppe blieb relativ konstant. Bei reduziertem Fluss sank die Sättigung während der Ischämie auf Werte um 40 % und 50 %, teilweise mehr als die Hälfte des Ausgangswertes, so dass bei voll aufrechterhaltenem Stoffwechsel die Extraktion des Gehirns deutlich sichtbar wurde. Am Ende des Versuchs stieg die Sättigung in beiden Gruppen wieder auf 73 %. Die Verringerung um 20 % im Vergleich zum Ausgangswert, als Auswirkung der Ischämie, war nach vier Stunden Reperfusion sichtbar.

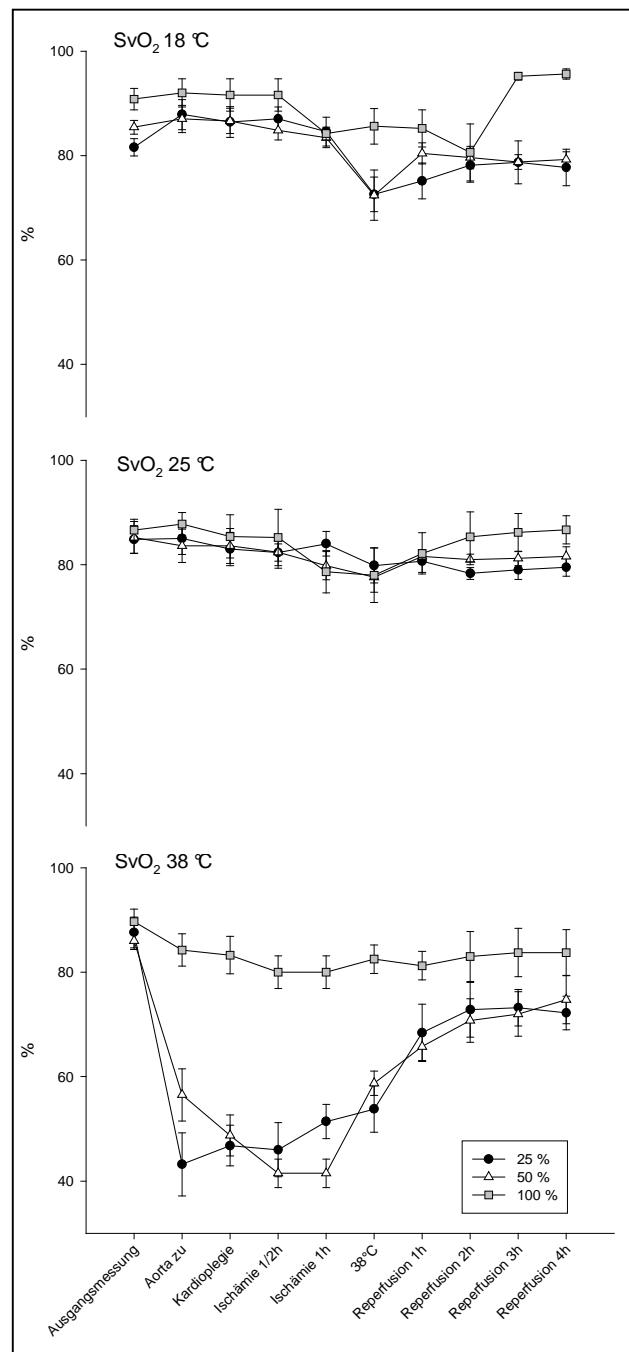


Abb. 12: Vergleichende Darstellung der Veränderungen der Sauerstoffsättigung (SvO₂ in %) in der V. jugularis der Schweine aller Versuchsgruppen (n=6 pro Gruppe) im Verlauf des Experimentes

Tab. 13: Darstellung der Veränderungen des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes (p_aO_2 in mmHg) der A. femoralis der Schweine aller Versuchsgruppen (n=6 pro Gruppe) im Verlauf des Experimentes

| p_aO_2 | 18 °C/100 % | 18 °C/50 % | 18 °C/25 % |
|--------------------------|-------------|------------|------------|
| Ausgangsmessung | 365+/-40 | 392+/-50 | 400+/-28 |
| Aorta zu | 327+/-25 | 374+/-47 | 251+/-47 |
| Ende Kardioplegie | 337+/-29 | 360+/-37 | 264+/-46 |
| Ischämie 1/2 h | 316+/-28 | 340+/-49 | 269+/-42 |
| Ischämie 1 h | 251+/-44 | 322+/-50 | 234+/-39 |
| 38 °C | 220+/-50 | 386+/-64 | 281+/-32 |
| Reperfusion 1 h | 380+/-34 | 440+/-53 | 299+/-50 |
| Reperfusion 2 h | 424+/-12 | 440+/-68 | 296+/-48 |
| Reperfusion 3 h | 396+/-29 | 443+/-77 | 339+/-49 |
| Reperfusion 4 h | 364+/-37 | 442+/-51 | 316+/-35 |

| p_aO_2 | 25 °C/100 % | 25 °C/50 % | 25 °C/25 % |
|--------------------------|-------------|------------|------------|
| Ausgangsmessung | 373+/-77 | 438+/-60 | 409+/-37 |
| Aorta zu | 364+/-69 | 357+/-76 | 401+/-58 |
| Ende Kardioplegie | 360+/-74 | 317+/-51 | 411+/-71 |
| Ischämie 1/2 h | 341+/-61 | 270+/-42 | 409+/-63 |
| Ischämie 1 h | 343+/-63 | 289+/-32 | 296+/-79 |
| 38 °C | 441+/-59 | 380+/-35 | 344+/-38 |
| Reperfusion 1 h | 410+/-47 | 392+/-60 | 387+/-48 |
| Reperfusion 2 h | 430+/-52 | 466+/-48 | 438+/-60 |
| Reperfusion 3 h | 430+/-62 | 450+/-72 | 415+/-56 |
| Reperfusion 4 h | 420+/-66 | 439+/-72 | 379+/-41 |

| p_aO_2 | 38 °C/100 % | 38 °C/50 % | 38 °C/25 % |
|--------------------------|-------------|------------|------------|
| Ausgangsmessung | 421+/-57 | 428+/-85 | 423+/-60 |
| Aorta zu | 404+/-83 | 401+/-92 | 360+/-54 |
| Ende Kardioplegie | 338+/-80 | 407+/-89 | 379+/-35 |
| Ischämie 1/2 h | 333+/-96 | 353+/-15 | 402+/-44 |
| Ischämie 1 h | 311+/-63 | 328+/-36 | 349+/-56 |
| 38 °C | 314+/-61 | 324+/-39 | 330+/-64 |
| Reperfusion 1 h | 460+/-29 | 289+/-16 | 446+/-68 |
| Reperfusion 2 h | 463+/-25 | 339+/-37 | 385+/-52 |
| Reperfusion 3 h | 460+/-43 | 355+/-57 | 353+/-60 |
| Reperfusion 4 h | 458+/-60 | 371+/-50 | 341+/-72 |

Tab. 14: Darstellung der Veränderungen des arteriellen Kohlendioxidpartialdruck ($p_a\text{CO}_2$ in mmHg) der A. femoralis der Schweine aller Versuchsgruppen (n=6 pro Gruppe) im Verlauf des Experimentes

| $p_a\text{CO}_2$ | 18 °C/100 % | 18 °C/50 % | 18 °C/25 % |
|--------------------------|--------------|--------------|--------------|
| Ausgangsmessung | 36,8 +/- 1,6 | 36,5 +/- 1,2 | 36,6 +/- 1,4 |
| Aorta zu | 37,0 +/- 1,7 | 37,8 +/- 3,0 | 33,1 +/- 2,7 |
| Ende Kardioplegie | 34,8 +/- 1,6 | 35,3 +/- 2,6 | 31,6 +/- 2,3 |
| Ischämie 1/2 h | 32,0 +/- 2,2 | 33,7 +/- 2,2 | 30,9 +/- 1,8 |
| Ischämie 1 h | 31,3 +/- 2,7 | 31,2 +/- 2,5 | 31,9 +/- 1,5 |
| 38 °C | 30,8 +/- 3,4 | 31,5 +/- 2,7 | 35,6 +/- 0,6 |
| Reperfusion 1 h | 35,3 +/- 3,6 | 32,3 +/- 2,1 | 35,1 +/- 1,0 |
| Reperfusion 2 h | 36,0 +/- 3,8 | 39,8 +/- 2,5 | 36,7 +/- 0,8 |
| Reperfusion 3 h | 36,8 +/- 3,8 | 38,6 +/- 1,7 | 36,7 +/- 1,4 |
| Reperfusion 4 h | 36,0 +/- 3,6 | 37,0 +/- 1,8 | 36,3 +/- 1,2 |

| $p_a\text{CO}_2$ | 25 °C/100 % | 25 °C/50 % | 25 °C/25 % |
|--------------------------|--------------|--------------|--------------|
| Ausgangsmessung | 37,4 +/- 2,9 | 37,0 +/- 3,5 | 37,0 +/- 4,8 |
| Aorta zu | 32,4 +/- 3,2 | 33,6 +/- 3,0 | 31,2 +/- 4,3 |
| Ende Kardioplegie | 32,0 +/- 4,0 | 31,8 +/- 2,3 | 30,4 +/- 2,6 |
| Ischämie 1/2 h | 31,7 +/- 2,8 | 32,6 +/- 2,6 | 30,6 +/- 1,7 |
| Ischämie 1 h | 30,8 +/- 3,5 | 31,8 +/- 2,7 | 33,5 +/- 2,4 |
| 38 °C | 30,5 +/- 3,2 | 31,0 +/- 1,7 | 31,7 +/- 3,1 |
| Reperfusion 1 h | 32,2 +/- 3,5 | 35,2 +/- 2,1 | 35,5 +/- 3,8 |
| Reperfusion 2 h | 38,0 +/- 2,9 | 36,2 +/- 3,2 | 35,7 +/- 3,0 |
| Reperfusion 3 h | 38,5 +/- 2,1 | 36,4 +/- 4,0 | 36,7 +/- 2,4 |
| Reperfusion 4 h | 38,4 +/- 2,6 | 37,2 +/- 2,6 | 36,7 +/- 1,7 |

| $p_a\text{CO}_2$ | 38 °C/100 % | 38 °C/50 % | 38 °C/25 % |
|--------------------------|--------------|---------------|--------------|
| Ausgangsmessung | 37,6 +/- 5,4 | 36,8 +/- 1,2 | 37,8 +/- 4,2 |
| Aorta zu | 38,8 +/- 4,8 | 36,8 +/- 1,1 | 37,4 +/- 5,3 |
| Ende Kardioplegie | 36,2 +/- 3,8 | 39,0 +/- 2,1 | 36,5 +/- 6,5 |
| Ischämie 1/2 h | 37,8 +/- 3,8 | 44,8 +/- 14,4 | 42,5 +/- 7,4 |
| Ischämie 1 h | 37,0 +/- 5,9 | 42,3 +/- 8,0 | 43,6 +/- 4,8 |
| 38 °C | 36,6 +/- 5,8 | 43,0 +/- 7,8 | 43,8 +/- 5,3 |
| Reperfusion 1 h | 36,6 +/- 6,5 | 42,5 +/- 3,3 | 44,8 +/- 5,7 |
| Reperfusion 2 h | 36,0 +/- 6,1 | 42,8 +/- 6,5 | 43,7 +/- 7,0 |
| Reperfusion 3 h | 36,8 +/- 4,9 | 43,0 +/- 5,9 | 44,0 +/- 6,8 |
| Reperfusion 4 h | 38,6 +/- 4,1 | 44,5 +/- 11,0 | 45,0 +/- 7,0 |

4.2.2.5 arterieller Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck

Die Temperatur und der HLM-Fluß zeigten keinen signifikanten Einfluss auf den arteriellen Sauerstoffpartialdruck, wobei p_aO_2 am Ende der Reperfusion signifikant niedriger war als nach einer Stunde Ischämie ($p < 0,01$). Diese Abnahme wurde aber nicht durch den eingestellten Fluss oder die Temperatur beeinflusst ($p = 0,16$; $p = 0,28$), so dass andere Faktoren hierfür verantwortlich sein müssen. Die Einzelgruppen reagierten hinsichtlich p_aO_2 alle gleich.

Wie in Tab. 13 ersichtlich wird sanken die arteriellen Sauerstoffpartialdrücke zum Zeitpunkt der Abkühlung auf 18 °C oder 25 °C und erreichten ihre Minimalwerte nach einer Stunde Ischämie. Die p_aO_2 Werte stiegen in der Reperfusion außer in den 25 % Gruppen wieder auf die Ausgangswerte an und in der 18 °C 25 % Gruppe lagen die Endwerte um 20 % bzw. in der 25 °C 25 % Gruppe um 25 % niedriger als die Ausgangswerte.

Die p_aO_2 -Verläufe der 38 °C Gruppen ähnelten denen der beiden Hypothermiegruppen zumindest in der Absenkung des Parameters während der Ischämiephase und dem darauffolgendem Anstieg in der Reperfusionsphase. Jedoch war das Verhältnis zwischen Ausgangswert und Reperfusionseiwerte zu Ungunsten der Endwerte verschoben, so dass in der 50 % Gruppe eine Erniedrigung um 20 % und in der 25 % Gruppe eine Erniedrigung um 35 % sichtbar wurde.

Der Kohlendioxidpartialdruck, dargestellt in Tab. 14, aller 18 °C und 25 °C Gruppen sinkt während der Ischämiephase und steigt innerhalb der Reperfusionsphase wieder in annähernde Bereiche der Ausgangswerte. In der 38 °C 100 % Gruppe ist die Absenkung in der Ischämie und der darauffolgende Anstieg in der Reperfusion nicht so deutlich zu erkennen. Im Gegensatz dazu steigen die p_aCO_2 -Werte der Gruppen 38 °C 50 % und 100 % innerhalb der Ischämiephase und weisen am Ende der Reperfusionsphase deutlich höhere Werte im Vergleich zu den Ausgangsmessungen auf.

4.2.2.6 pH-Wert

Zur Kontrolle eines Säure-Basen-Haushaltes wurde der pH-Wert in den einzelnen Gruppen ermittelt. Wie aus Abb. 13 zu ersehen ist, zeigte der pH-Wert in den 18 °C Gruppen eine gering steigende Tendenz zum Ende der Ischämie. Innerhalb der Erwärmungsphase bzw. in der ersten Reperfusionstunde sanken die Kurvenverläufe wieder und die Mittelwerte variierten insgesamt zwischen 7,4 und 7,5.

In den 25 °C Gruppen war eine Differenzierung vorwiegend in der Ischämiephase zwischen der 100 % und der 25 % bzw. 50 % Gruppe zu erkennen. Die Kurve der 100 %-Gruppe verlief bis zur Reperfusion um Werte von 7,5 und sank erst während der Reperfusion auf 7,45. Die Flussreduktionsgruppen schwankten zwischen 7,4 und 7,45 mit einer sinkenden Tendenz in der Ischämie und einer etwas steigenden Tendenz am Ende der Ischämie.

In den 38 °C 25 % und 50 % Gruppen wurde eine drastische Reduktion des pH-Wertes bei stabilen pCO₂ ab dem Verschluss der Aorta bis zu 30 Minuten Ischämie deutlich und die pH-Werte sanken auf 7,1 bei den Schweinen der 25 % Gruppe und auf 7,15 bei den Schweinen der 50 % Gruppe. Innerhalb der ersten Stunde Reperfusion stieg der pH-Wert auf etwa 7,2 an, aber z.B. in der 25 % Gruppe fiel er nach 4 Stunden Reperfusion wieder auf 7,1 und somit blieb der pH-Wert dieser beiden Gruppen azidotisch. Der Verlauf der Kontrollgruppe zeigte eine geringe Verminderung des pH-Wertes zum Zeitpunkt der Kardioplegiegabe und blieb dann bis zum Versuchsende relativ konstant.

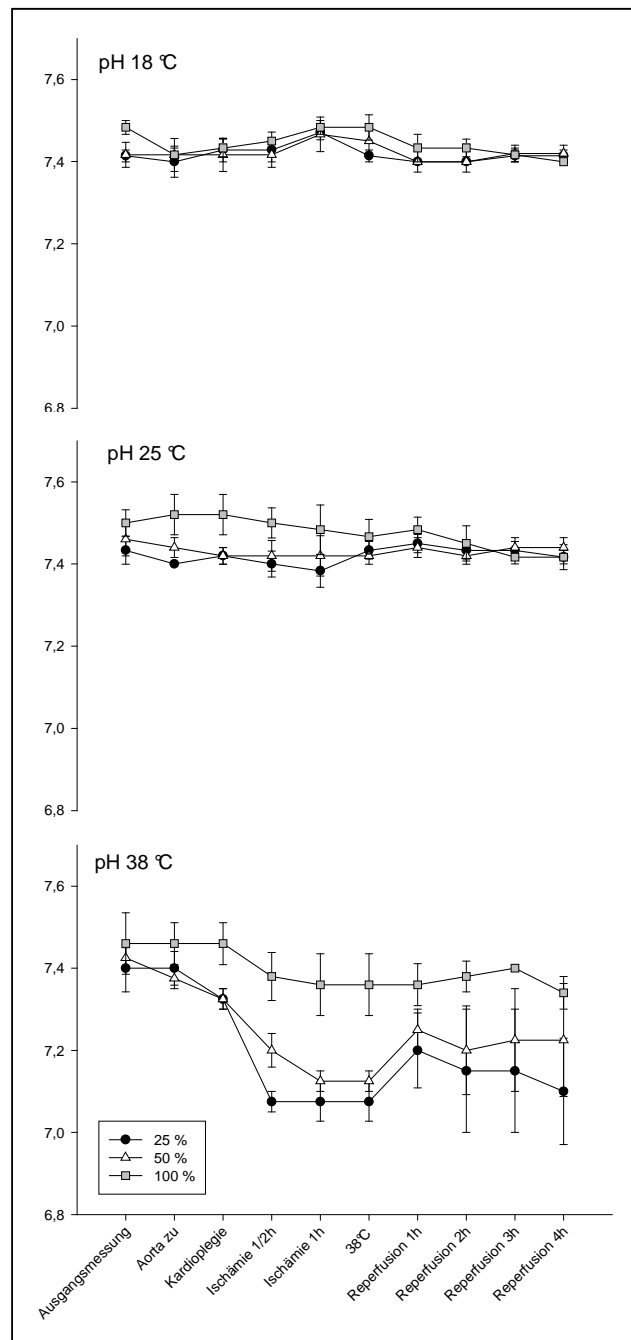


Abb. 13: Vergleichende Darstellung der Veränderungen des pH-Wertes in der A. femoralis der Schweine aller Versuchsgruppen (n=6 pro Gruppe) im Verlauf des Experimentes

4.2.2.7 Laktat

Das Laktat wurde signifikant durch die Temperatur ($p=0,01$) und grenzwertig signifikant durch den Fluss ($p=0,05$) beeinflusst. Zwischen den Versuchspunkten Ischämie- und Reperfusionseende lässt sich kein signifikanter Unterschied erkennen.

Wie aus Abb. 14 ersichtlich, blieben die Laktatwerte der 18 °C Gruppen relativ konstant in einem Bereich zwischen 3 und 5 mmol/l. Die beiden 25 % und 50 % Gruppen zeigten einen geringen Anstieg in der Erwärmungsphase.

In den 25 °C Gruppen werden die flussabhängigen Unterschiede in Bezug auf das venös gemessene Laktat nach der Ischämiephase deutlich. Zum Zeitpunkt der Erwärmung auf 38 °C erreichten die Kurvenverläufe ihre Maxima und verliefen mit sinkender Tendenz in der Reperfusionphase parallel zueinander und der Laktatendwert der 25 % Gruppe lag bei 6 mmol/l im Gegensatz zur 100 % Gruppe mit 3 mmol/l.

Die 38 °C Gruppen zeigen bis zu einer halben Stunde Ischämie fast keine Differenzierung zwischen den drei Versuchsgruppen. Der Verlauf der 38 °C 100 % Gruppe ähnelte denen der Hypothermiegruppen, da ein leichter Anstieg bis zum Ende der Ischämie und eine Absenkung der Laktatwerte zum Ende der Reperfusion zu verzeichnen war. Ab einer halben Stunde Ischämie war eine Trennung zwischen den Flussgruppen sichtbar und die beiden flussreduzierten Gruppen stiegen bis zu einer Stunde Ischämie bis auf 13-15 mmol/l an. Auch in der Reperfusion verlief die Kurve der 50 % Tiere weiter auf diesem Level. Die Laktatwerte der 25 % Gruppe stiegen jedoch auch in der Reperfusion stetig an, das erweckte den Eindruck, dass der Maximalwert auch nach 4 Stunden Reperfusion noch nicht erreicht worden war.

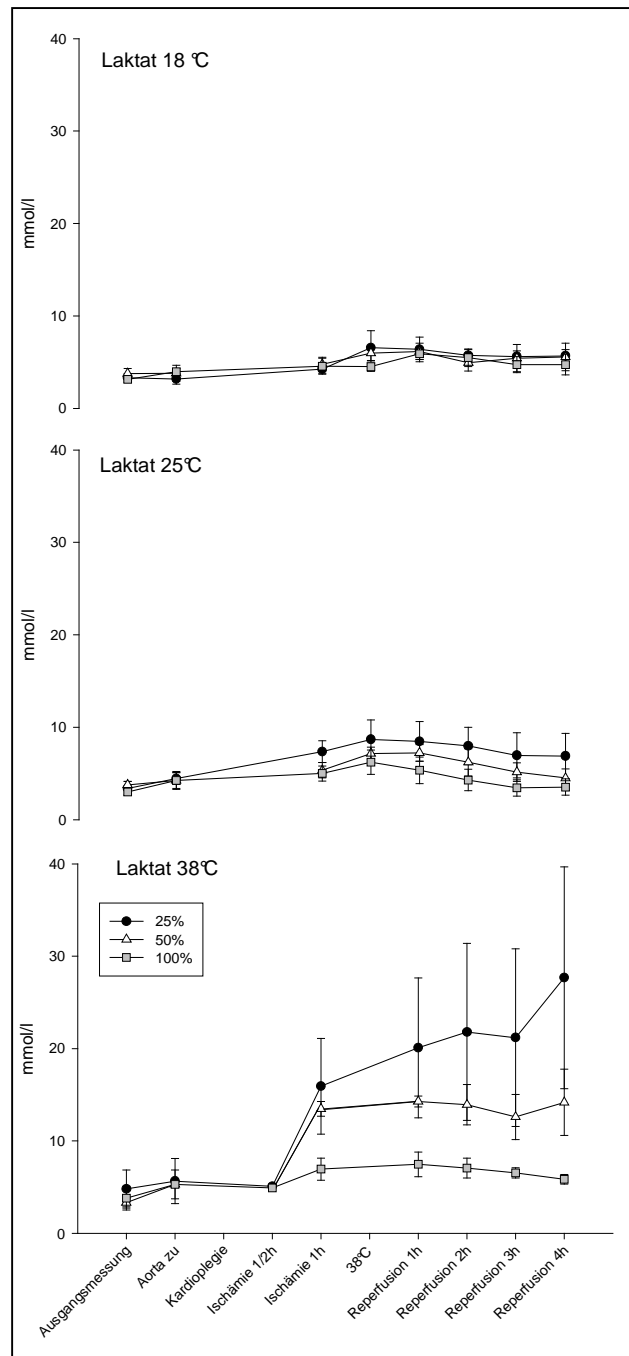


Abb. 14: Vergleichende Darstellung der Veränderungen des venösen Laktats in mmol/l der Schweine aller Versuchsgruppen (n=6 pro Gruppe) im Verlauf des Experimentes

4.2.2.8 Protein S100 β

Wie aus Abb. 15 hervorgeht zeigte sich in den hypothermen Gruppen keine signifikante Änderung des Parameters S100 β im Verlauf des Versuches.

Die Kurvenverläufe der 38 °C Gruppen zeigten eine signifikante Differenzierung der einzelnen Flussgruppen. Der Verlauf der 38 °C 100 % Gruppe blieb relativ konstant. Die S100 β -Werte der beiden flussreduzierten Gruppen stiegen ab einer Stunde Ischämie an und erreichten in der 50 % HLM-Flussgruppe 2,8 $\mu\text{g/l}$ und in der 25 % HLM-Flußgruppe 3,6 $\mu\text{g/l}$.

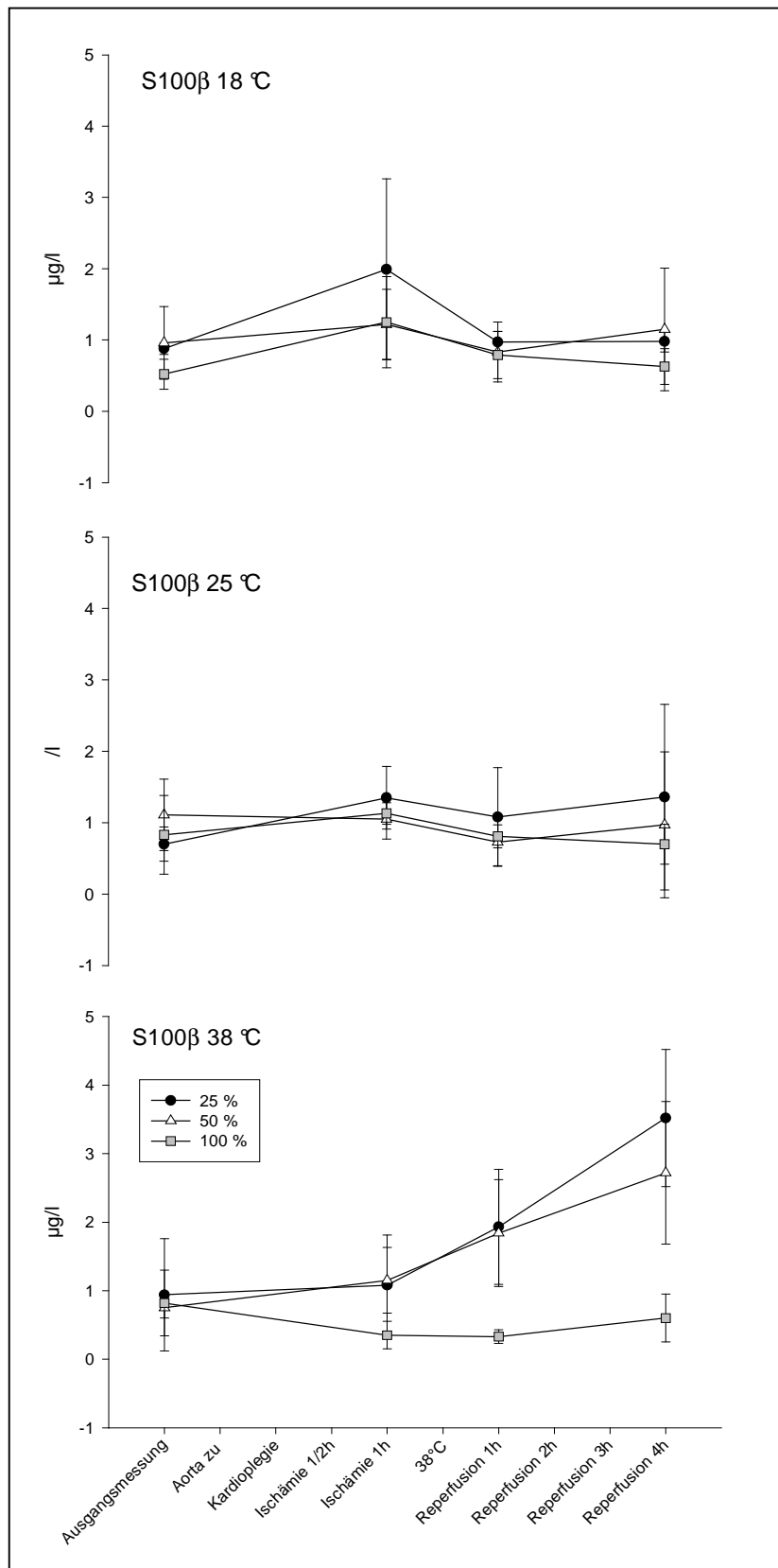


Abb.15: Vergleichende Darstellung der Veränderungen von S100β in µg/l der Schweine aller Versuchsgruppen (n=6 pro Gruppe) im Verlauf des Experimentes

4.3 postoperative Untersuchungsergebnisse

4.3.1 Gehirnexplantation und Probenaufbereitung

Die Explantation des Gehirns erfolgte über einen Querschnitt durch die Schädelkalotte in Höhe des lateralen Augenwinkels und je einen Längsschnitt, rechts und links, vom Foramen occipitale bis zu den Endpunkten des Querschnitts, in Höhe des lateralen Augenwinkels, innerhalb von 5 min. Bei der makroskopischen Untersuchung in Bezug auf Schwellungszustände, Feuchtigkeit und Farbabweichungen der Schnittflächen konnten keinerlei Veränderungen festgestellt werden. Subarachnoidalblutungen Auffällig war eine weichere Konsistenz des Gehirns bei allen Ferkeln der 38 °C 25 % Gruppe, im Vergleich zu allen anderen Gruppen.

4.3.2 Histologie

Alle acht Gewebeproben (occipitaler Kortex, frontaler Kortex, temporaler Kortex, Hippocampus, Kleinhirn, Pons und Thalamus) wurden jeweils für die H.E. Histologie und die Immunhistologie aufgearbeitet. Anhand von immunhistologischen Untersuchungen auf den Parameter HSP70 hin, konnte die sensitivste Region in Bezug auf globale Gehirnschämie herausgefunden werden. Wie aus Tab. 15 ersichtlich ist, reagierte der Hippocampus am sensibelsten auf eine Reduktion des Blutflusses und damit des Sauerstoffangebots, infolge dessen wurde der Hippocampus als Zielregion in dieser Studie ausgewählt.

Tab. 15: Semiquantitative Darstellung des Sensibilitätsgrades der einzelnen Gehirnareale anhand der HSP70 Expression mittels Immunfluoreszenz

| Gehirnregion | 18 °C/25 % | 18 °C/100 % | 38 °C/25 % | 38 °C/10 0 % |
|--------------------|------------|-------------|------------|--------------|
| Hippocampus | + | - | +++ | - |
| Thalamus | - | - | + | - |
| Pons | - | - | - | - |
| Cortex | - | - | - | - |
| Cerebellum | - | - | + | - |

Die Hippocampusformation bestehend aus dem Hippocampus mit CA1-CA4, dem Gyrus parahippocampalis, dem Gyrus dentatus, den Fimbria hippocampi und dem Fornix ist anhand des Querschnittes in Abb. 16 dargestellt. Als Hauptuntersuchungsregion für die histologische und immunhistologische Beurteilung in diesem Versuch ist die am vulnerabelsten auf ischämische Insulte reagierende CA1 Region festgelegt worden. Dies entspricht den Ergebnissen von (Kirino u. Sano,1984; Smith et al., 1984).

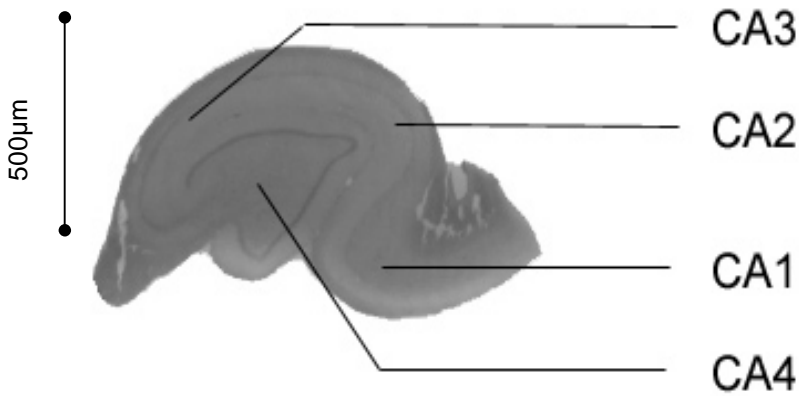
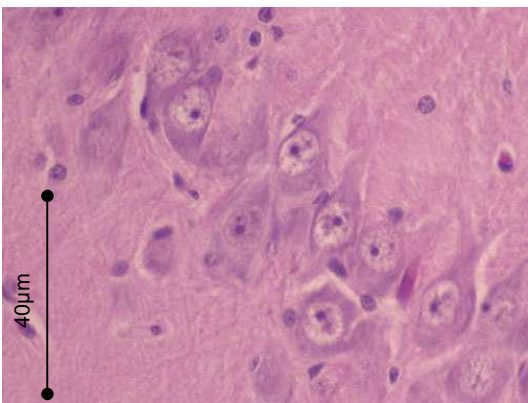


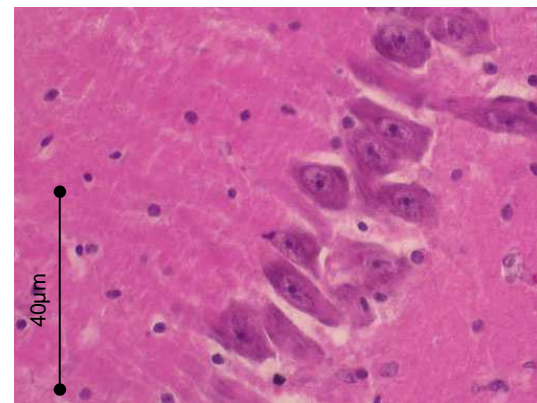
Abb. 16: Einteilung der verschiedenen Hippocampusabschnitte (CA1-CA4) am Hippocampusquerschnitt eines Schweines dieser Studie

4.3.2.1 H.E. Histologie

Eine Stunde EKZ mit reduzierter Sauerstoffversorgung des Gehirns verursachte keine scholligen Veränderungen des Chromatins, keine Veränderung der Kernstruktur und keine Auflösung der Nissl-Substanz an den H.E. gefärbten Hippocampuschnitten. In den flussreduzierten Normothermiegruppen zeigten sich geringfügige perizelluläre Ödeme (s. Abb. 17). In allen Gruppen traten über den gesamten Hippocampus ganz vereinzelt Pyramidenzellen mit zunehmender Eosinophilie und Schrumpfungerscheinungen auf. Ob diese Veränderungen als Folge einer Ischämie oder als Artefakte zu werten ist, konnte anhand der Untersuchungen in dieser Studie nicht eindeutig geklärt werden, da auch in der 38 °C 100 % Gruppe diese Zellveränderungen auftreten.



38 °C 100 %



38 °C 25 %

Abb. 17: Darstellung der H.E. Histologie der CA1 Region des Hippocampus von jeweils einem repräsentativen Schwein der Versuchsgruppen 38 °C 100 % und 38 °C 25 %

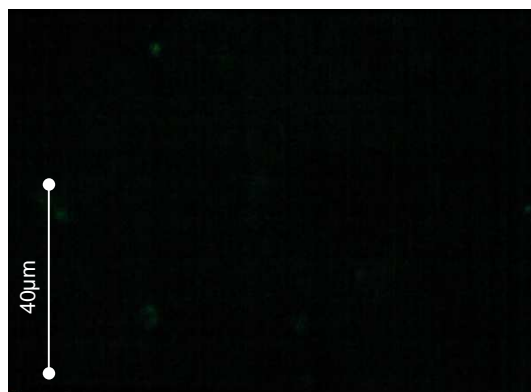
4.3.2 Immunhistologie mittels HSP70

4.3.2.2.1. Immunfluoreszenz am Kryoschnitt

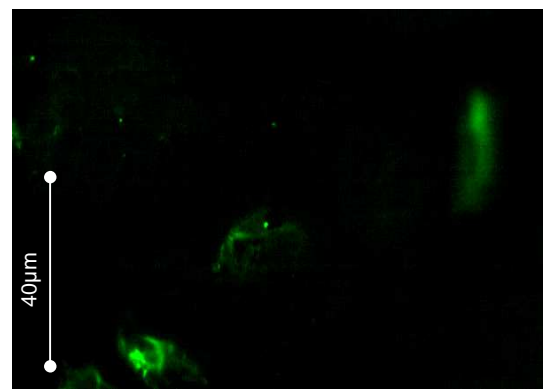
Um eine mögliche frühe zerebrale Schädigung dennoch erfassen zu können, wurde die indirekte Immunfluoreszenz zur Darstellung des Reparaturenzyms HSP70 angewandt. Mittels eines FITC konjugierten Sekundärantikörpers konnte die Antigen-Antikörper-Bindung sichtbar gemacht werden (s. Abb. 18) und anhand der fluoreszierenden Zellen über das Auswertungsprogramm ks300 der prozentuale Anteil der immunfluoreszierenden Fläche in Bezug auf die Gehirngesamtfläche errechnet werden. Die Ergebnisse dieser Berechnung sind der Tab. 16 zu entnehmen und es ist ersichtlich, dass HSP70, wie auch Laktat, mit Absenkung des HLM-Flußes ansteigt und in der 38 °C 25 % Gruppe den Maximalwert erreicht.

Tab. 16: Berechneter prozentualer Anteil der HSP70 positiven Fluoreszenz mittels ks300

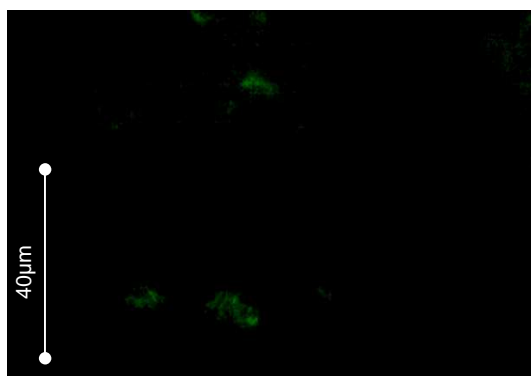
| Gruppe | HSP70 in % | Gruppe | HSP70 in % | Gruppe | HSP70 in % |
|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| 18 °C/25 % | 2,4 | 25 °C/25 % | 1,1 | 38 °C/25 % | 4,3 |
| 18 °C /50 % | 0,7 | 25 °C/50 % | 0,6 | 38 °C/50 % | 3,2 |
| 18 °C/100 % | 0,3 | 25 °C/100 % | 0,3 | 38 °C/100 % | 0,2 |



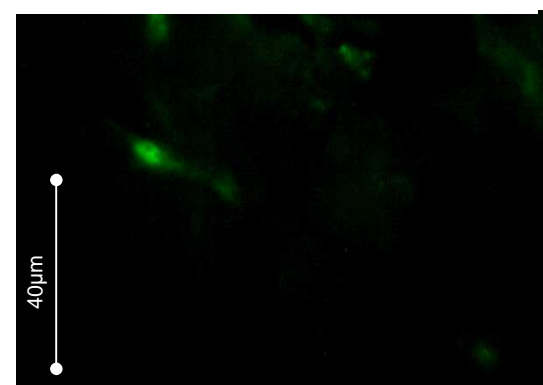
38 °C 100 %



38 °C 25 %



25 °C 25 %



18 °C 25 %

Abb. 18: Immunfluoreszenzdarstellung der CA1-Region des Hippocampus von jeweils einem repräsentativen Schwein der Versuchsgruppen 38 °C 100 %, 38 °C 25 %, 25 °C 25 % und 18 °C 25 %

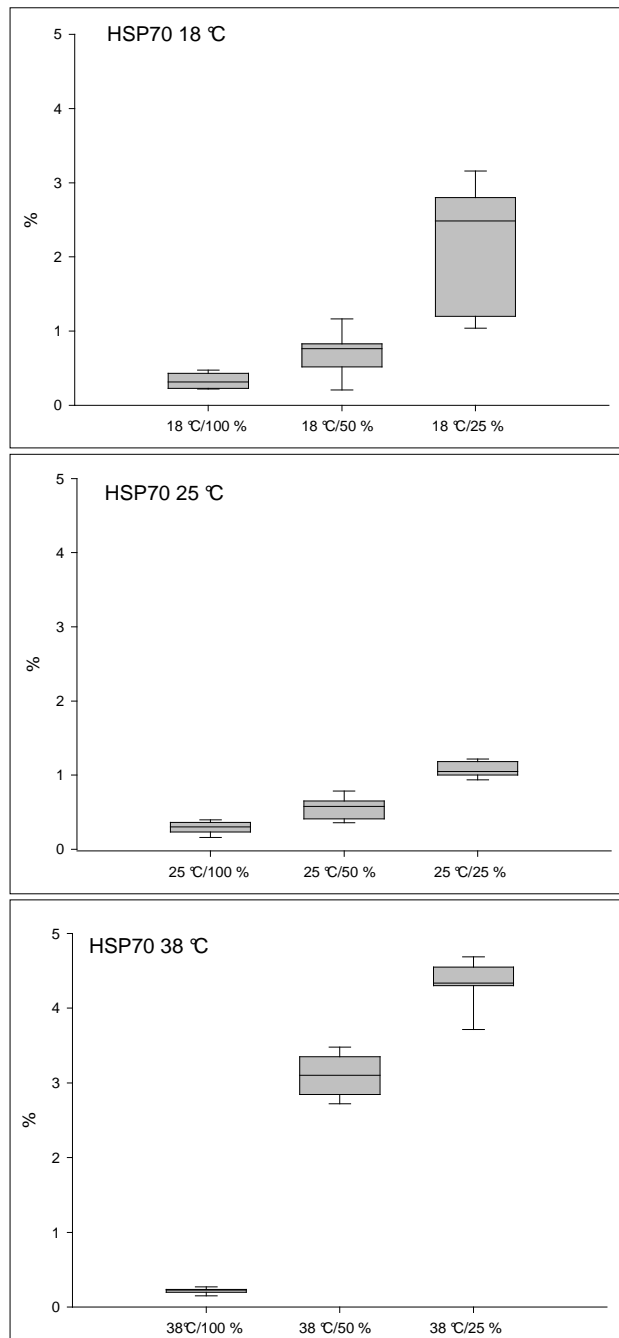


Abb. 19: Vergleichende Darstellung der HSP70 positiven Immunfluoreszenz der Schweine aller Versuchsgruppen (n=6 pro Gruppe) im Verlauf des Experimentes

Die Temperatur und der HLM-Fluß zeigten beide einen hoch signifikanten Effekt auf den Zielparameter HSP70 ($p < 0,01$; $p < 0,01$). Der Flusseffekt wurde zusätzlich noch signifikant durch die Temperatur beeinflusst ($p < 0,01$).

In Abb. 19 ist die prozentuale HSP70 Verteilung mittels Box plots dargestellt. In den 25 °C Gruppen war nur ein geringer Anstieg des HSP70 mit Reduktion des Blutflusses ersichtlich. Im Gegensatz dazu stieg der Medianwert des HSP70 in der 18 °C 25 % Gruppe um das siebenfache im Vergleich zur 100 % Gruppe an. Der HSP70 Mittelwert erhöhte sich in der 38 °C 50 % Gruppe um das 16-fache und in der 38 °C 25 % Gruppe um das 20-fache der Kontrollgruppe. In der Kontrollgruppe war ein ganz geringer Anteil des HSP70 mit 0,2 % sichtbar.

Bei dem Parameter HSP70 war zwar eine steigende Tendenz der Medianwerte mit abnehmendem Blutfluss bei gleicher Temperatur zu erkennen, aber die Werte von HSP70 in der 18 °C Gruppe mit reduziertem Blutfluss auf 25 % lagen über denen der 25 °C 25 % Gruppe.

4.3.2.2 Immunhistologie am Paraffinschnitt

Anhand der Immunhistologie der Paraffinschnitte konnte gezeigt werden, dass HSP70 im Zytoplasma der Pyramidenzellen in unterschiedlich starker Ausprägung und geringgradig auch in den Gliazellen exprimiert wurde. Weiterhin war zu erkennen, dass vorwiegend die Pyramidenzellen mit perizellulärem Ödem HSP70 exprimieren. Wahrscheinlich nicht geschädigte Zellen wiesen auch keine Anfärbarkeit des Zytoplasma auf (s. Abb. 20).

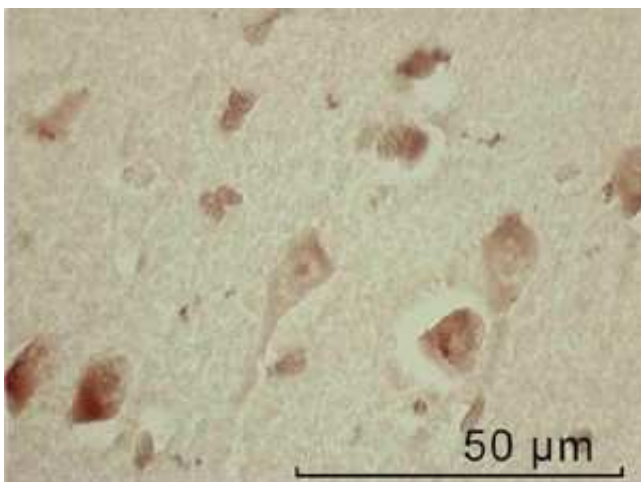


Abb. 20: Peroxidase-gekoppelte immunhistologische Färbung der CA1-Region des Hippocampus eines Schweines der 38 °C 25 % Gruppe

4.3.3 Malondialdehyd

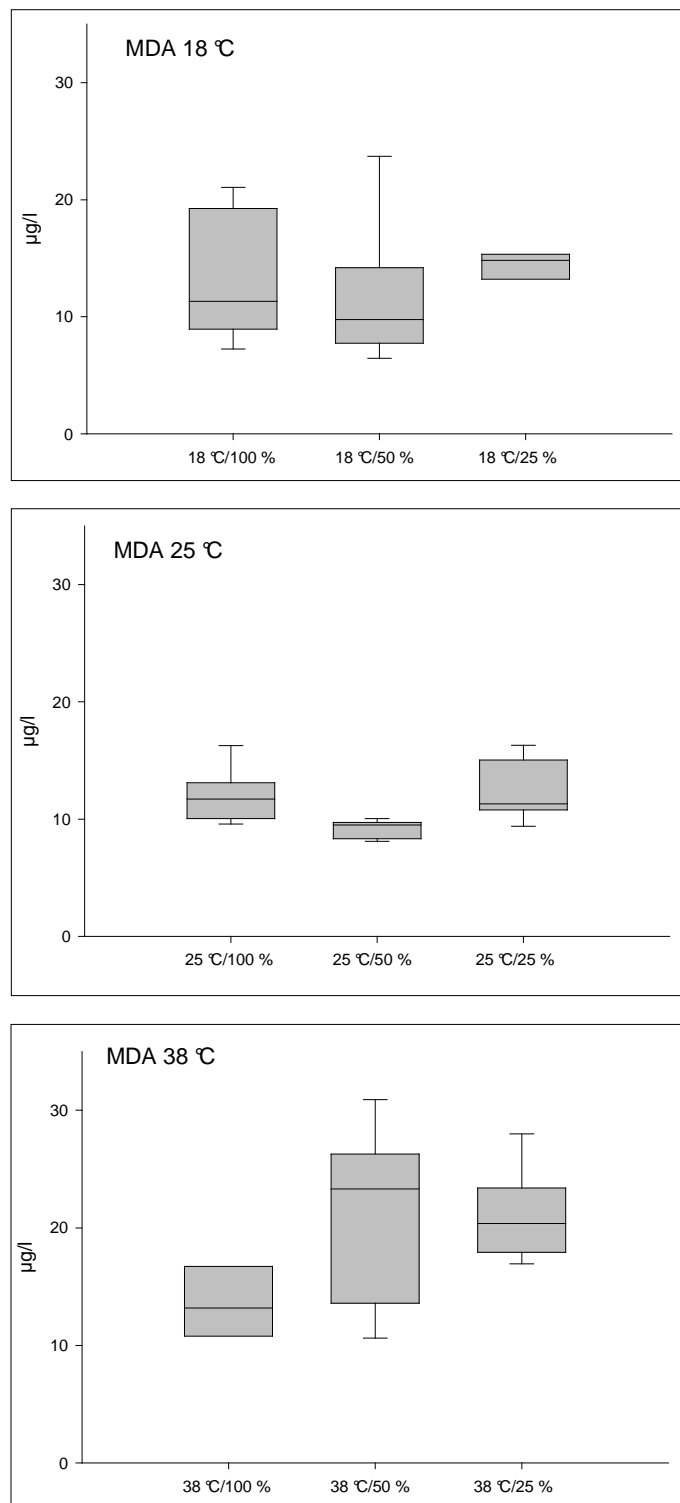


Abb. 21: Vergleichende Darstellung der Malondialdehydenwerte in µg/l der Schweine aller Versuchsgruppen (n=6 pro Gruppe) im Verlauf des Experimentes

Für den Parameter MDA bestand ein signifikanter Effekt ($p < 0,01$) der Temperatur aber nicht des Flusses über alle Gruppen. Im Gruppenvergleich war dieser Temperatureffekt vorwiegend zwischen den Temperaturgruppen 38 °C und 25 °C ($p = 0,03$) sichtbar.

Wie aus Abb. 21 und Abb. 22 ersichtlich, war weder eine steigende noch sinkende Tendenz des Parameters Malondialdehyd in den 18 °C und 25 °C Gruppen zu erkennen. Die Medianwerte aller sechs Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe 38 °C 100 %, gemessen mittels HPLC, lagen um 10 µg/l. Ein signifikanter Anstieg des Malondialdehyd war erst in den flussreduzierten 38 °C Gruppen zu beobachten, wobei der Mittelwert der 50 % Gruppe bei 23 µg/l und der Mittelwert der 25 % Gruppe nur bei 20 µg/l lag.

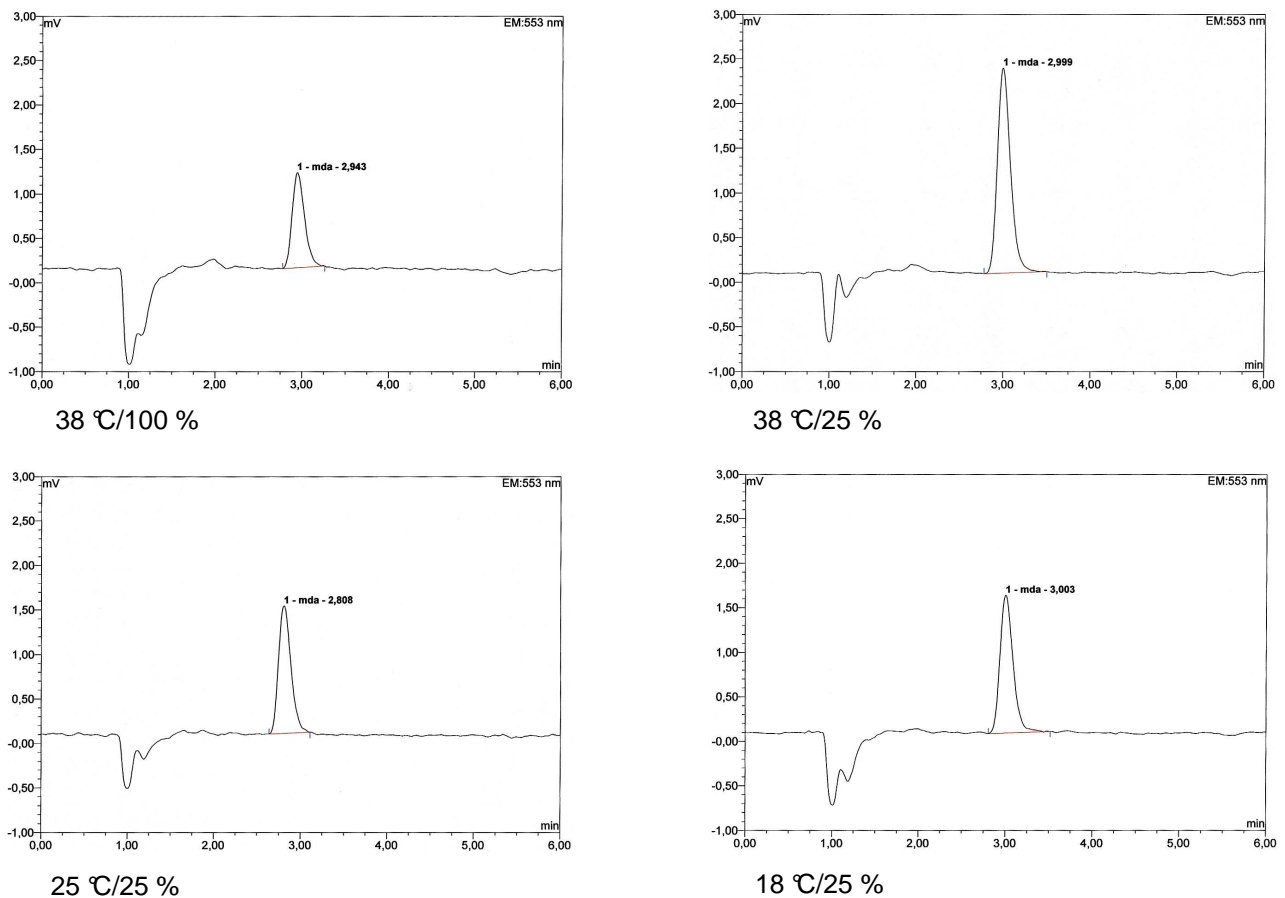


Abb. 22 Originalregistrierungen der HPLC für den Nachweis von Malondialdehyd von jeweils einem repräsentativen Schwein der Versuchsgruppen am Ende der Reperfusion. Nach dem Injektionspeak erkennt man zum Zeitpunkt 3,00 min der HPLC den MDA-Peak

4.4 Ergebnisse der Kontrollgruppe ohne HLM-Intervention

Die einzelnen Parameter Q, MAP, TOI, THI, S_vO_2 , p_aCO_2 , p_aO_2 , pH-Wert, Laktat, S100 β und MDA wurden zu den festgelegten Zeitpunkten ausgewertet (s. Anhang) und zeigten keinerlei signifikante Änderungen im Verlauf der fünfstündigen Anästhesie. Die immunhistologisch aufgearbeiteten Hippocampi der Tiere ohne HLM-Intervention zeigten eine basale HSP70 Expression von 0,15% vergleichbar mit den 100 % Gruppen der vorliegenden Arbeit (vgl. Tab. 16).

4.5 Prädiktiver Wert der Parameter

Um den prädiktiven Wert von Parametern, die während der OP registriert werden können auf eine mögliche zerebrale Ischämie zu untersuchen, wurde eine Pearson Korrelation berechnet. Die Ischämie wurde hierzu durch HSP70 erfasst und dieser Parameter mit den zu untersuchenden korreliert (TOI, S_vO_2 , Q, Laktat, MDA).

Im Einzelnen zeigte sich, dass eine signifikante Korrelation zwischen der HSP70 Induktion und dem TOI-Wert am Ende der Ischämiephase ($p < 0,01$) und dem TOI-Wert zum Ende der Reperfusionphase ($p = 0,03$) bestand. Auch die jugularvenöse Sättigung zeigte einen signifikanten Zusammenhang mit der HSP70-Expression am Ende der Ischämiephase ($p < 0,01$). Des Weiteren fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der HSP70 Induktion und der Laktatkonzentration sowohl zum Ischämieende ($p < 0,01$), als auch zum Reperfusionsende ($p = 0,01$). Ebenso war der Laktatanstieg (Differenz zwischen den Laktatwerten von Ischämie- und Reperfusionsende) signifikant mit der Induktion von HSP70 korreliert ($p = 0,04$). Auch der Parameter MDA wies einen signifikanten Zusammenhang mit der HSP70 Induktion am Ende der Reperfusion ($p < 0,01$) auf. Ein weiterer prädiktiver Faktor, der signifikant mit der HSP70 Induktion korreliert war der Carotisfluß Q ($p < 0,01$) zum Zeitpunkt am Ende der Ischämiephase. Es zeigte sich zusammenfassend eine klare Korrelation zwischen dem Ischämieparameter HSP70 und den intraoperativ erfassbaren Parametern MDA, TOI (Ende Ischämie), Laktat und der Absenkung des Carotisflusses.

5 Diskussion

Um kongenitale Herzerkrankungen chirurgisch zu therapieren, ist eine zumindest teilweise Reduktion des HLM-Flusses unter das Herzminutenvolumen notwendig, was wiederum zu einer partiellen Ischämie führt. Um die entstehenden ischämischen Schäden zu begrenzen, besteht die Möglichkeit des Einsatzes der Hypothermie. Somit ergeben sich die beiden wesentlichen Einflussfaktoren: HLM-Fluß und Temperatur, die in der vorliegenden Arbeit systematisch untersucht wurden. Sie sollen zunächst einzeln und danach zusammenhängend betrachtet werden. Bevor auf beide Hauptfaktoren eingegangen wird, sollen das verwendete Modell und die für die Betrachtung herangezogenen Parameter kurz diskutiert werden.

Um ein geeignetes EKZ-Modell zu erschließen, fanden in der Vorbereitungsphase der Studie verschiedenste Punkte Beachtung. Einen wichtigen Faktor stellte die Auswahl der geeigneten Tierart, in diesem Fall das Schwein bzw. Ferkel, dar. Diese Entscheidung beruht auf operationstechnischen Gründen, den Erfahrungen anderer Untersucher in der Humanmedizin und somit der Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit anderen Studien.

Zum Nachstellen der Operationssituation eines kongenitalen Herzfehlers, kam für diese Arbeit nur die Verwendung der HLM in Frage. Um einen möglichen ischämischen Schaden erfassen zu können, wurde als Zielorgan das Gehirn definiert, aufgrund seiner besonderen Ischämieempfindlichkeit und den Erfahrungen anderer Studien in Bezug auf Hirnschäden durch den Einsatz der HLM (s. 2.4).

Im Literaturvergleich muss bei der Interpretation der Evaluierung eines Hirnschadens beachtet werden, dass eine Vielzahl der Studien auf der Okklusion der A. cerebri media basiert und es sich dabei um einen kompletten Stillstand des Blutflusses in diesem Gefäß handelt und nicht um einen reduzierten Blutfluss („Niedrig-Fluß-Globalischämie“) im gesamten Körperkreislauf wie unter Verwendung der HLM.

Die Frage, ob der Einsatz einer HLM am Tier mit einer Gewichtsklasse von 7-10 kg KM unter Verwendung der derzeit existierenden HLM-Sets für Kinder überhaupt möglich ist, sollte als nächstes beantwortet werden. Anhand der Vorversuche mit den gängigen HLM-Sets wurde schnell deutlich, dass ein für Ferkel der Gewichtsklasse 7-10 kg KM optimiertes Setup mit sehr geringem Primingvolumen entwickelt werden muss. Die Entwicklung dieses HLM-Setup (s. 3.1.5) ermöglicht der Veterinärmedizin den sicheren Einsatz der HLM bei kleinen Tieren zur chirurgischen Behandlung verschiedenster Herzerkrankungen. Aufgrund dieser Neuentwicklung bestand überhaupt die Möglichkeit, den Hämatokrit der Tiere auf Werte um 20% zu halten, ohne das Blutvolumen des Tieres komplett durch Transfusionsblut zu ersetzen. Im Gegensatz zu den Versuchen von Lew und Mitarbeitern (1997) an Hunden, deren prozentuales Verhältnis von Blutvolumen zu

Primingvolumen 1:1 bestand, führte in dieser Studie ein Verhältnis von 9:1 zu optimalen Bedingungen für den Blutkreislauf. Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die indirekte Bluttransfusion mittels Natriumcitrat konservierten Blutproben den Hämatokrit und somit die Sauerstofftransportkapazität verbessert.

Mit Hilfe der Ergebnisse dieser Studie in Bezug auf die Optimierung des Operationsverlaufes und der Bewertung der einzelnen intraoperativ messbaren Parameter bleibt zu hoffen, dass trotz der noch hohen Kosten in Zukunft vermehrt Herzfehler bei Hunden operativ behandelt werden können. Die Prognose aus rein operativer und anästhesiologischer Sicht ist beim Hund im Vergleich zum Schwein unter Voraussetzung eines erfahrenen OP-Teams sogar noch günstiger einzustufen.

Ein weiterer Vorteil dieses Modells besteht darin, dass es in vielen Punkten auch auf die operativen Korrektur angeborener Herzfehler bei Kindern übertragbar ist. Gleichzeitig kann mit Hilfe dieses Modells die intraoperative Strategie im Hinblick auf Folgeschäden nach herzchirurgischen Eingriffen unter Einsatz der EKZ weiterentwickelt werden. Um die Auswirkungen der HLM und der Faktoren Fluss und Temperatur bewerten zu können, musste ein Zielorgan definiert werden und ein Parameterkatalog, der eventuelle ischämische Schäden aufzeigt, erstellt werden. Als empfindlichstes Organ, das am sensibelsten auf ischämische Schäden nach herzchirurgischen Eingriffen unter Einsatz der EKZ reagiert, wurde das Gehirn definiert (s. 2.4).

Von besonderem Interesse in dieser Studie war die Frage, ob anhand der Expression von HSP 70 beim Schwein die zerebralen Auswirkungen der Ischämie nachweisbar sind. Eine Induktion von HSP70mRNA und nachfolgender Proteinexpression als zelluläre Reaktion auf ischämische Schädigungen werden in verschiedenen Ischämie- und Reperfusionmodellen beschrieben, obwohl sich diese vorwiegend auf Untersuchungen an Gerbil, Ratten, Mäusen beziehen (Tanaka et al., 2002; Wagstaff et al., 1996; Simon et al., 1991; Gray et al., 2001; Tomimoto et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass HSP70 einen repräsentativen Indikator für zerebrale Ischämie- und Reperfusionsschäden darstellt und aufgrund der Assoziation des HSP70 mit Neuronenschädigungen im Laufe der Ischämie und Reperfusion kann der Grad der HSP70 Expression als Maß für den ischämischen Stimulus herangezogen werden (Hess u. Kurkeja, 1995). Ein weiterer Parameter, aus dem eine ischämische Situation abgeleitet werden kann, ist der Gewebeoxygenierungsindex (TOI). Der TOI beschreibt das oxygenierte Hb bezogen auf das gesamte Hb im intrakapillären Raum des Gehirns und da, wie bereits beschrieben, die Schwankungen des THI relativ gering einzustufen sind, gibt der TOI hauptsächlich den Prozentsatz des oxygenierten Hb an. Die S_vO_2 hingegen stellt die noch verbleibende Aufsättigung des Hb mit Sauerstoff in der vom Kopf

abführenden Vene dar. Die enge Beziehung zwischen TOI und S_vO_2 wird durch ein Signifikanzniveau von $p < 0,01$ in der Pearson-Korrelation deutlich untermauert.

Um einen ersten Eindruck über den Schädigungsgrad der Zellen zu erhalten, wurde auch in dieser Studie zunächst eine histologische Untersuchung durchgeführt. In Anlehnung an die Erfahrungen anderer Autoren, welche innerhalb der CA1-Region des Hippocampus die stärksten morphologischen Nervenzellschäden identifiziert haben (Nurse u. Corbett, 1994), wurde auch in der vorliegenden Arbeit die CA1-Region des Hippocampus als Zielregion im Gehirn definiert.

Die genaue Funktion des Hippocampus bezüglich des Gedächtnisses ist in Teilen noch strittig, wobei bereits bewiesen werden konnte, dass er für die sprachliche Informationsverarbeitung, für räumliche Erinnerung und das Gedächtnis verantwortlich ist. Schädigungen des Hippocampus beim Menschen bewirken ein Fehlen von deutlichen vegetativen Furchtreaktionen auf äußere Reize.

5.1 Einfluss des HLM-Flusses

Grundsätzlich zeigte sich erwartungsgemäß, dass mit abnehmendem Fluss die ischämischen Schäden deutlicher werden. Dennoch fällt auf, dass auch in den Gruppen mit 100 % HLM-Fluß der Blutfluss in der Arteria carotis sinkt. Der HLM-Fluss wurde in der vorliegenden Studie anhand der Erfahrungen aus der Humanmedizin und der Studie von Mohr und Kollegen (1996) an Ferkeln auf ca. 100 ml/min eingestellt und innerhalb der Versuchsgruppen als 100 %iger HLM-Fluss angesehen. In der vorliegenden Arbeit sinkt der gemessene Blutflusswert in der Arteria carotis bei den Tieren der Kontrollgruppe mit 38 °C Körpertemperatur und 100 % HLM Fluss von 80 ml/min auf 50 ml/min. Angesichts dieser Absenkung erscheint der ermittelte HMV-Wert für die Ferkel zu niedrig zu sein. Zur Vergleichbarkeit der Gruppen untereinander wurde dieser abgeschätzte Aortenfluss trotzdem als fester Wert für alle Tiere verwendet. Für den realen zukünftigen Einsatz der EKZ beim Tier müsste der HLM-Fluss individuell für jedes Tier erneut ermittelt werden. Ein weiterer Erklärungsansatz für diesen Rückgang zum Zeitpunkt des Verschlusses der Aorta kann auf der Umstellung des pulsatilen Flusses unter normalen Körperkreislaufbedingungen auf einen nicht pulsatilen Blutfluss in Verbindung mit einem verminderten Perfusionsdruck durch die HLM basieren. Konform mit dieser Theorie beschreibt Ündar eine Verbesserung des regionalen und globalen CBF unter pulsatiler Perfusion (Ündar et al., 1999). Verschiedene Autoren konnten unter Verwendung von nicht pulsatilem Blutfluss einen Zusammenhang zur mikrozirkulatorischen Dysfunktion herstellen (Matsumoto et al., 1971) sowie Sludge in den Kapillaren und einen niedrigeren pH-Wert (Ündar et al., 1999) aufzeigen.

Bei der Betrachtung der Einzelgruppen fällt auf, dass zwischen 50 % und 25 % HLM-Fluss nur ein verhältnismäßig geringer Unterschied im Blutfluss der A. carotis besteht. Dies könnte auf die durch die Flussreduktion fehlende Autoregulation der Hirnperfusion zurückzuführen sein (zu den Effekten der Hypothermie vgl. 5.2). Eine weitere Auffälligkeit ist, dass die Ausgangswerte in keiner der Gruppen wieder erreicht werden. Als Erklärung dafür bietet sich an, dass aus dem induzierten Herzstillstand eine kardiale Ischämie mit verminderter Ejektionsfraktion resultiert, die sich auch in der Katecholaminpflichtigkeit während der Reperfusionphase widerspiegelt.

Bei den Gruppen mit 38 °C 25 % und 50 % HLM-Fluss liegen die Werte für den Fluss innerhalb der A. carotis noch niedriger, was damit zusammenhängen kann, dass in diesen Fällen die Entwöhnung von der HLM gar nicht möglich war und somit trotz des normalisierten HLM-Flusses (100 %) noch immer die nicht-pulsatilen Verhältnisse weiterbestanden. So wurde vermutet, dass die pulsatile Perfusion mit einer verbesserten viszeralen Mikrozirkulation, einem besseren zerebralen Blutfluss, einem höheren pH, einer besseren Sauerstoffzufuhr und einem besseren zerebralen Schutz im Vergleich zur nicht pulsatilen Perfusion verbunden ist (Ündar et al., 1999). Ebenso kann eine eventuelle Mikrozirkulationsstörung diesen niedrigen Blutfluss mit verursachen.

Mit der Reduktion des HLM-Flusses innerhalb der Ischämiephase verhält sich der MAP ähnlich dem Blutfluss der A. carotis. Die fehlende Wiedererholung des MAP in der Reperfusion spricht für die Hypothese einer kardialen Störung in Form einer postoperativen myokardialen Dysfunktion, die sich hämodynamisch in einem Abfall des Cardiac Index oder der Ejektionsfraktion äußert (Roberts et al., 1981; Leung, 1993) und bei einstündigem Herzstillstand nicht selten ist.

Ein weiterer Parameter, dessen Bezug zur Reduktion des HLM-Flusses diskutiert werden muss, ist die venöse Sauerstoffsättigung. In Abhängigkeit von der Reduktion des Carotisflusses, die wiederum ein stark vermindertes Sauerstoffangebot nach sich zieht, sinkt in den Gruppen mit reduziertem HLM-Fluss die Sättigung drastisch und erreicht auch innerhalb der Reperfusionphase nicht wieder den Bereich der Ausgangswerte. Die minimalen Sättigungswerte von 40 % sprechen für eine nicht komplette Ischämie, da der Körper den Sauerstoff noch nicht vollständig extrahiert. Dennoch konnten mittels HSP70 als Zielparameter der vorliegenden Arbeit ischämische Schäden in einzelnen Arealen des Hippocampus immunhistologisch aufgezeigt werden. Die Sättigung hingegen stellt ein integrales Maß der gesamten Schäden des Körpers, inklusive des Gehirns, dar und beinhaltet somit Sättigungswerte in stark geschädigten Arealen und Werte von weniger sensiblen Regionen. In der Anfangsphase der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Gehirnareale auf ihre Sensitivität im Hinblick auf ischämische Schäden untersucht und es konnte anhand der Immunhistologie eine Differenzierung in Bezug auf geschädigte Zellen

einzelner Areale vorgenommen werden. Dabei stellte sich heraus, dass der Hippocampus eine der Wasserscheidenregionen des Gehirns darstellt, in denen die Endstrombahnen zweier arterieller Versorgungsbereiche aneinander grenzen. Gerade in solchen Bereichen besteht ein niedriger Perfusionsdruck und ein geringerer Sauerstoffüberschuss, so dass bei einer Flussabsenkung vor allem in diesen Bereichen die Sauerstoffversorgung kritisch wird. Auf diese Weise entsteht das inhomogene patchartige Schädigungsmuster der immunhistologisch aufgearbeiteten CA1-Region, welches auch in der vorliegenden Arbeit gesehen wurde. Folglich besteht in einzelnen Gehirnarealen trotz unvollständiger Sauerstoffextraktion in der V. jugularis bereits eine Ischämie.

Der TOI zeigte eine deutliche Korrelation zu den Veränderungen der S_vO_2 ($p < 0,01 / r^2 = 0,61$). Um zu prüfen, ob der TOI oder S_vO_2 Rückschlüsse auf eine eventuelle zerebrale Schädigung zulassen, wurden TOI und S_vO_2 mit dem Zielparameter ischämischer Schädigung HSP70 korreliert. Anhand der Regressionsanalyse ergab sich für HSP70 und TOI ein $r^2 = 0,43$ und für Hsp70 und S_vO_2 ein $r^2 = 0,72$, so dass mittels dieser beiden Parameter zumindest bedingt auf eine zerebrale Schädigung geschlossen werden kann (s. Abb. 23), so dass diese Parameter intraoperativ als Prädiktoren eingesetzt werden könnten.

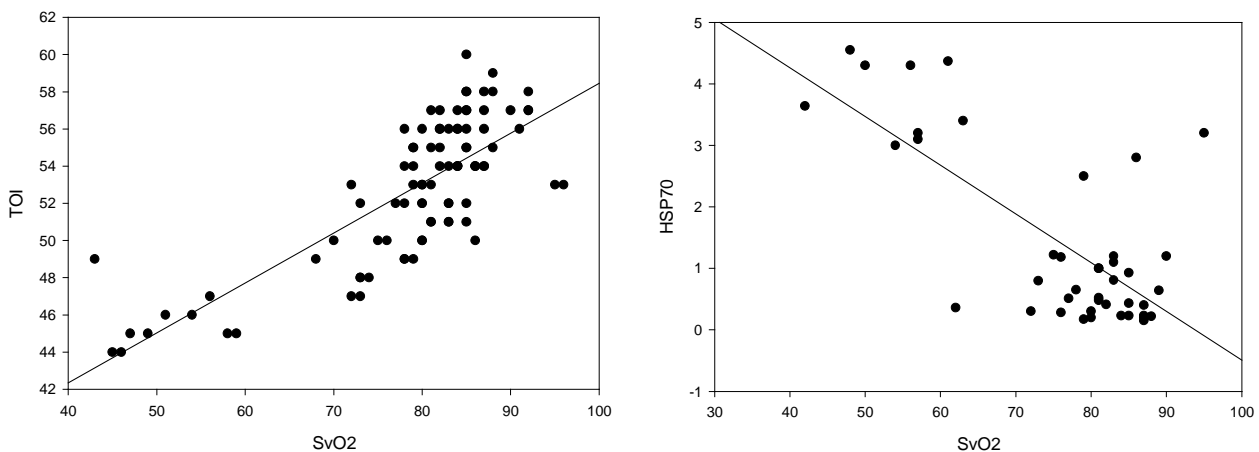


Abb. 23 Korrelationen von TOI ~ S_vO_2 ($r^2 = 0,61$) und HSP70 ~ S_vO_2 ($r^2 = 0,72$)

Im Zeitfenster der Ischämie sinkt der pH-Wert, woraus auf einen azidotisch-hypoxischen Hirnschaden gefolgert werden kann. Ausgehend von diesem Schaden müsste es zu Stoffwechselveränderungen gekommen sein, zu deren Überprüfung in der vorliegenden Arbeit Laktat und MDA bestimmt wurden.

Der Parameter Laktat liefert einen Hinweis auf den anaeroben Stoffwechsel während des CPB und den damit verbundenen metabolischen Veränderungen für das Gehirn und den

Körper. Anhand des Messareals stellt die jugularvenöse Laktatkonzentration die Summe von Gehirnlaktat und Körperlaktat dar. Der zentrale Befund für den Parameter Laktat war ein Anstieg in den Gruppen 38 °C 25 % und 38 °C 50 %. Innerhalb des Gehirns wird bei diesen Normothermiegruppen ein gleichstarker Schaden gesetzt, da die gleiche Flussreduktion bezogen auf den Blutfluss in der A. carotis, aufgrund fehlender Autoregulation bei 38 °C, zu beobachten war. Die Reduktion der Sauerstoffsättigung ist ebenso für 25 % und 50 % gleich, was in Verbindung mit ähnlicher HSP70-Expression auf eine gleichstarke zerebrale Schädigung hindeutet.

Die unterschiedliche Laktatkonzentration innerhalb der Reperfusionphase zwischen den beiden Gruppen mit reduzierten Blutfluss kann somit allein auf ein unterschiedliches Körperlaktat in Verbindung mit einem kardialen Versagen zurückgeführt werden. Ein pulmonales Versagen kann aufgrund der nicht veränderten Werte für p_aO_2 und p_aCO_2 ausgeschlossen werden.

Der Parameter MDA als Marker für freie Sauerstoffradikale, die durch Lipidperoxidation induziert werden (Civelek et al., 2003), steigt ebenfalls in den Gruppen 38 °C 50 % und 38 °C 25 % deutet somit auf eine erhöhte Lipidperoxidation verbunden mit Membranschädigungen insbesondere während der Reoxygenierung (Dede et al., 2001) hin.

Da eine zerebrale Ischämie oft von einem Hirnödem durch Mikrozirkulationsstörungen begleitet wird (Candelario-Jalil et al., 2001), stellt eine Erhöhung des Parameters ICP eine der Hauptkomplikationen bei ischämischen Hirnschädigungen dar und korreliert mit dem postoperativen Outcome. Die ischämiebedingten Mikrozirkulationsstörungen bewirken eine Erhöhung der Kapillarpermeabilität mit darauffolgender Ödembildung. Bauer et al. (2000) berichten bei etwa 60 % der Patienten mit Hirnschädigungen über einen Anstieg des ICP, hauptsächlich als Ergebnis einer Gehirnschwellung. Der erhöhte ICP führt wiederum zu einer Kompression verschiedener Kapillare und verstärkt die Ischämie. Unter Berücksichtigung dieser Theorie kann auch der geringe Anstieg des ICP in den flussreduzierten Normothermiegruppen in der vorliegenden Arbeit (s. Tab.11) als Folge der mittels H.E. Histologie beobachteten perizellulären Ödeme gewertet werden.

5.2 Einfluss der Temperatur

Ein weiterer Einflussfaktor der vorliegenden Arbeit war die Temperatur. Statistisch zeigte sich in der MANOVA ein signifikanter Einfluss des Faktors Temperatur auf die Zielparameter ischämischer Schädigung (HSP70, MDA, Laktat). Dabei war im allgemeinen ersichtlich, dass bei Hypothermie die Ischämie- und Reperfusionsschäden so wie sie sich anhand von HSP70 darstellen, reduziert sind. Dies kann in einem ersten Ansatz mit Hilfe der van t'Hoff'schen Regel erklärt werden. Demzufolge halbiert sich die

Stoffwechselrate und somit der Sauerstoffverbrauch bei einer Temperatursenkung um 10 °C ausgehend von der normalen Körpertemperatur (Werner, 1997). Auf dem Hintergrund dieser Stoffwechselreduktion kann auch die geringe Laktatproduktion bzw. Laktatazidose unter Hypothermie erklärt werden (Takala et al., 1996).

Vergleicht man die Versuchsgruppen mit einer HLM-Flussreduktion von 25 % in Bezug auf die unterschiedlichen Temperaturen, so fällt auf, dass die Hypothermieprotektion, betrachtet an dem Zielparameter HSP70, nicht bei 18 °C, sondern bei 25 °C am stärksten ausgeprägt ist. Dieser zunächst überraschende Befund könnte auf der fehlenden Autoregulation, der Viskositätsänderung als verstärkendem Faktor und der Linksverschiebung der Sauerstoffbindungskurve basieren.

Die zerebrale Autoregulation ist einer der Hauptfaktoren, die für die Hirnprotektion verantwortlich sind und somit kommt es bei Störungen dieser folglich zu Schädigungen des Gehirns (Czosnyka et al., 2001). Ein Fehlen der Autoregulation in der vorliegenden Arbeit, vor allem in den 18 °C Gruppen, lässt sich anhand des Blutflusses in der A. carotis mit graduell abnehmenden Blutfluss von 38 °C bis zu 18 °C vermuten. Taylor und Mitarbeiter (1992) untersuchten den zerebralen Blutfluss und Perfusionsdruck bei hypothermen CPB mit und ohne low flow bei 25 Neonaten und Kindern und fanden heraus, dass unter 20 °C die zerebrale Autoregulation verloren geht.

Unter hypothermen Bedingungen steigt die Viskosität und darauf aufbauend sinkt die Perfusion und wie auch in dieser Studie ersichtlich der Carotisblutfluss. Zu beachten ist, dass die hypothermiebedingte Viskositätssteigerung nur einen verstärkenden Effekt zur Autoregulation darstellt, da sie nur einfach und nicht wie der Gefäßradius in vierter Potenz in das Hagen-Poiseuille'sche Gesetz eingeht.

Ein weiterer Aspekt der Hypothermie ist die Linksverschiebung der Sauerstoffbindungskurve basierend auf einer erhöhten Affinität des Hb für Sauerstoff. Infolge der Erwärmung wird im Gegensatz dazu die Affinität reduziert und das Blut kann den Sauerstoff besser an das Gewebe abgeben, wodurch die S_vO_2 , vorwiegend der 18 °C Gruppen, in dieser Phase absinken (s. Abb.12). Während der Ischämie sinkt der TOI und somit die Oxygenierung im intrakapillären Raum aufgrund geringem Angebot durch verminderten Blutfluss und erhöhte Extraktion der Zellen. Bei der Wiedererwärmung sinkt die Oxygenierung im intrakapillären Raum (TOI), da trotz 100 % Blutfluß die Sauerstoffextraktion erhöht ist und die Zellen vermehrt Sauerstoff aufnehmen. Wie schon bei der Sauerstoffsättigung beschrieben, sinkt der TOI in der Wiedererwärmungsphase in den 18 °C Gruppen aufgrund der Linksverschiebung stärker als in den 25 °C Gruppen. Diese kurzzeitige Absenkung des TOI kann die Ursache für die vermehrte HSP70 Expression in der 18 °C 25 % Gruppe im Vergleich zu r 25 °C 25 % Gruppe sein.

Innerhalb der Ischämiephase könnten vereinzelte Neurone geschädigt werden, die in Bereichen mit besonders geringer Perfusion z.B. den Wasserscheidenregionen liegen (s. 2.6.3). Diese Regionen könnten wiederum die patchartigen, vereinzelt immunfluoreszierenden Areale im Hippocampus darstellen.

5.3 Interaktion zwischen Fluss und Temperatur

Entsprechend den vergangenen Abschnitten wurde ein signifikanter Einfluss des Faktors HLM-Fluß und des Faktors Temperatur auf den Zielparameter HSP70 sowie zahlreiche weitere Parameter (SvO_2 , $S100\beta$) festgestellt. Im folgenden Abschnitt soll nun diskutiert werden, inwieweit der Effekt des HLM-Flusses durch die Temperatur, im Sinne einer statistischen, positiv signifikanten Interaktion, moduliert wird. Eine solche signifikante Interaktion zwischen Fluss und Temperatur fand sich bei dem Zielparameter HSP70, bei SvO_2 zum Zeitpunkt eine Stunde Ischämie, sowie bei $S100\beta$ nach einer Stunde Reperfusion.

Die durch den HLM-Fluss induzierte Expression von HSP70 wurde durch die Temperaturreduktion signifikant von 100 % auf 25 % vermindert. Der steigende HLM-Flußeffekt wird durch die Hypothermie noch vermindert. Dies resultiert wahrscheinlich aus der hypothermiebedingten Stoffwechselreduktion, da ein geringerer Schaden auf der Basis eines reduzierten Sauerstoffverbrauches des Gehirns anzunehmen ist. Es kann allerdings nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die HSP70 Expression der Zellen bei niedrigen Temperaturen vermindert ist. Dagegen spricht aber, dass die Hypothermiephase nur während der einen Stunde Ischämie vorlag, die HSP70-Expression in der vorliegenden Arbeit aber erst vier Stunden nach Wiedererwärmung ansteigt.

Für den Parameter SvO_2 besteht die Interaktion zwischen HLM-Fluss und Temperatur zum Zeitpunkt eine Stunde Ischämie. Die Hypothermie hebt somit den reduzierenden Effekt der HLM-Flussreduktion in Bezug auf die Sättigung auf, was für einen reduzierten Stoffwechsel unter Hypothermiebedingungen spricht.

Eine weitere Interaktion zwischen HLM-Fluss und Temperatur fand sich bei $S100\beta$ zum Zeitpunkt eine Stunde Reperfusion. Dabei fällt auf, dass mit abnehmender Temperatur die HLM-Fluss-induzierte Freisetzung von $S100\beta$ (vor allem in den 25 % Gruppen) geringer wird. Die Freisetzung von $S100\beta$, die an einen Zelluntergang gekoppelt ist (Herrmann et al., 2000), ist ein Zeichen, dass durch Hypothermie der ischämische Schaden vermindert wird.

5.4 Ischämische Reaktionen des Gehirns

Nachfolgend soll auf der Basis der in der vorliegenden Arbeit gemessenen Parameter die Pathophysiologie des ischämischen Hirnschadens aufgezeigt werden. Unter den ischämischen Bedingungen werden das Sauerstoff- und Substratangebot im Körper und insbesondere im Gehirn reduziert, was unter anderem zu einer anaeroben Glykolyse mit ATP-Verbrauch, einem Laktatanstieg und zu einer mitochondrialen Azidose führt. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten unter hypothermen Ischämiebedingungen eine verminderte Azidose (Berntman et al., 1981; Chopp et al., 1989; Natale u. Dalecy, 1989), eine langsamere Entleerung des ATP-Pools (Sutton et al., 1991) und einen geringeren Laktatanstieg (Takala et al., 1996) aufzeigen. Wegen der fehlenden Möglichkeit, Gehirnproben zu entnehmen, ohne die Schädeldecke weiter zu eröffnen, wurde in der vorliegenden Arbeit im Versuchsverlauf auf die ATP-Messung verzichtet.

Unsere Ergebnisse gehen aber in Bezug auf die verminderte Azidose und auf den geringeren Laktatanstieg in den Hypothermiegruppen mit den Ergebnissen der bereits erwähnten Autoren konform. In der vorliegenden Arbeit kommt es in den normothermen flussreduzierten Gruppen, wie schon von Ballinger und Kollegen (1961) sowie von Carden und Mitarbeitern (1989) beschrieben, zu einem Laktatanstieg und zu einem Abfall des pH-Wertes. Infolge des ATP-Mangels versagen die an ATPasen gekoppelten Ionentransporte (Na^+/K^+ -ATPase) und das intrazelluläre Na^+ steigt an (Kuroda und Siesjö, 1997). Über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher wird intrazelluläres Na^+ gegen extrazelluläres Ca^{2+} ausgetauscht, was wiederum eine Verschiebung des Ionengleichgewicht nach sich zieht (Kristian und Siesjö, 1998). Diese Verschiebung bewirkt einen verstärkten Wassereinstrom mit daraus resultierender Ödembildung (Rehncrona, 1985).

In der vorliegenden Arbeit konnten anhand der H.E. Histologie der CA1-Region des Hippocampus vor allem in den flussreduzierten Normothermiegruppen außer geringgradiger perizellulärer Ödeme keine sonstigen ischämietypischen Nervenzelländerungen gefunden werden. Dieser Befund kann auf die inkomplette und reversible Ischämie, die in ihrem Ausmaß keine Nekrose hervorruft und das relativ kurze Zeitfenster von vier Stunden Reperfusion zurückgeführt werden, da die Entstehung einer histologisch sichtbaren Nekrose inform von eosinophiler Zytoplasmaveränderung und Schrumpfung des Zytoplasmas und des Zellkerns bis zu der häufig beschriebenen Dreiecksform frühestens nach 7 Stunden gewöhnlich aber erst nach 12-18 Stunden auftritt (Pfeiffer, 1984).

In Verbindung mit der Entstehung eines Hirnödems stünde die Erhöhung des ICP, welche in der vorliegenden Arbeit auch tatsächlich in den Gruppen 38 °C 25 % und 38 °C 50 % aufgezeigt werden konnte (vgl. 5.1).

Die Verschiebung des Ionengleichgewichtes, die über das erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} (s.o.) getriggert wird, führt nach heutigem Kenntnisstand zu einem Zusammenbruch des Membranpotentials mit anschließender Zelldepolarisation. Aufgrund dieser Depolarisation wird vermehrt Glutamat freigesetzt (Hamann, 1997), das über die Aktivierung der AMPA-, NMDA- und metabotropen Rezeptoren einen Einstrom von Na^+ und vor allem Ca^{2+} verursacht (Crow et al., 2002). Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration steigt rasch auf einen für die Nervenzellen toxischen Wert, der zu einer Störung der oxidativen Phosphorylierung (Crow et al., 2002) und somit zu einer mitochondrialen Dysfunktion führt. Ob es in dieser Arbeit unter dem Einsatz der HLM in einzelnen Gruppen zu einer eventuellen mitochondrialen Veränderung wie z.B. zu einer Schwellung gekommen ist, könnte nur mit Hilfe der Elektronenmikroskopie herausgefunden werden und wäre Ansatzpunkt einer Folgestudie.

Infolge der Stimulation des NMDA-Rezeptors wird die NO-generierende NOS aktiviert (Kontos, 2001; Traystman et al., 1991). Die NO-Überproduktion ist verbunden mit Zellschäden (Dawson et al., 1991). Darüber hinaus entstehen bei der Stimulation des AMPA-Rezeptors Superoxide und durch die Interaktion von ROS und NO entsteht Peroxynitrit als neurotoxische Substanz (Kontos, 2001). Als Index für die Peroxynitritproduktion wird die vorwiegend Nitrotyrosinbildung herangezogen (Parmentier-Batteur et al., 2000), die durch chronischen Stress induziert wird (Olivenza et al., 1999). Durch die intrazelluläre Kalziumakkumulation werden PL A_2 , Endonukleasen und Proteasen aktiviert (Crow et al., 2002). Die PL A_2 hydrolysiert Membranphospholipide und setzt Fettsäuren wie z.B. Arachidonsäure frei (Crow et al., 2002), die direkt mit der Dauer der Ischämie bzw. dem Gewebeschaden korrelieren (Traystman et al., 1991). Die Aktivierung der PLA_2 und die Bildung freier Radikale bei Zufuhr von Sauerstoff in der Reperfusionphase führen zur Lipidperoxidation (Hamann, 1997). Diese stellt einen wichtigen Mechanismus des Radikalschadens während der Reperfusion dar (Traystman et al., 1991). Als Maß dieser Lipidperoxidation wurde in der vorliegenden Arbeit der Parameter MDA bestimmt. Bariskaner und Mitarbeiter (2002) konnten aufzeigen, dass zerebrale Ischämie- und Reperfusionsschäden eine erhöhte Bildung von MDA bewirken und dass eine Korrelation zwischen Laktat, MDA und den EEG-Veränderungen besteht. Die Ergebnisse der Untersuchung von MDA in dieser Studie zeigen ebenfalls, dass es zu einem Anstieg der Lipidperoxidation und ihrem Hauptprodukt MDA in den ischämisch geschädigten Gruppen (38 °C 50 % und 38 °C 25 %) gekommen ist. Auch der Anstieg

des Parameters Laktat in dieser Arbeit korreliert, wenn auch schwach mit dem Anstieg des MDA ($r^2=0,45$, $p<0,01$).

Durch die über Kalzium aktivierten Proteasen und Endonukleasen entstehen Zytoskelettproteinschädigungen und DNA-Fragmentierung, in deren Folge es zu einer Aktivierung der PARP und zu einem Anstieg des Reparaturenzyms HSP70 kommt. Kofler und Mitarbeiter (2002) verglichen PARP negativen Knock-out Mäuse mit normalen Mäusen nach cardiac arrest und konnten aufzeigen, dass der Neuronenuntergang in der CA1-Region des Hippocampus der PARP negativen Knock out Mäuse signifikant geringer war. Diese Studie lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Aktivierung von PARP mit einer erhöhten Inzidenz von Zelluntergängen gekoppelt ist, was wahrscheinlich auf dem bei PARP-Aktivierung stark erhöhten ATP-Verbrauch beruht. (s. 2.6.3)

Bei der Expression von HSP70 handelt es sich um eine aktive Zelleistung von reversibel geschädigten Neuronen, die gestresst, aber nicht degeneriert sind. Anhand der Expression dieses Reparaturproteins können solche Neurone identifiziert werden. Diese Neuronen weisen zwar eine Schädigung auf, aber sie überleben den verursachten Stress (Rajdev und Sharp, 2000; Liu et al.,1993), im Gegensatz zu den irreversibel geschädigten Neuronen, die später nekrotisieren und keine transkriptionale Aktivität mehr zeigen.

Weiterhin stimmen unsere Ergebnisse mit denen von Schmidt-Kästner et al. (1998) in Bezug auf die Korrelation des HSP70 Expressionsgrades und der Reduktion des Blutflusses überein. Eine Erklärung hierfür wäre das verringerte Sauerstoffangebot bei reduziertem Blutfluss und dem somit erhöhten Stress für einzelne Zellen, die im Bereich des Endstromgebietes (z.B. Untersuchung Hippocampus) liegen.

Wie auch schon von Rajdev und Sharp (2000) beschrieben, zeigte die immunhistologische der CA1-Region des Hippocampus in der vorliegenden Studie keine homogen verteilte Fluoreszenz, sondern war patchartig über die CA1-Region verteilt. Diese Patches bestehen aus HSP70 immunopositiven Gliazellen in der Peripherie und HSP70 positiven Neuronen im Zentrum (Rajdev und Sharp, 2000). Das deutet darauf hin, dass HSP70 einen spezifischen und sensiblen Marker für einzelne Zellen und deren Stoffwechsel darstellt und nicht das komplette Gehirn betroffen ist, was mit der Architektur des Gefäßbettes zusammenhängen mag, die zu so genannten Wasserscheidenregionen mit eventuell grenzwertiger Perfusion wie z.B. die CA1-Region des Hippocampus führt.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine basale HSP70 Expression von 0,15 % in den Gehirnen der Tiere der Anästhesiegruppe.

5.5 Parameter zur Abschätzung des ischämischen Schadens

Für den praktischen Einsatz der hier vorgestellten Methode wäre es wünschenswert, einen intraoperativen Parameter zu haben, der es erlaubt abzuschätzen, ob mit einer zerebralen Ischämie gerechnet werden muss. In Anlehnung an die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können die einzelnen Parameter, anhand welcher der ischämische Schaden abgeschätzt werden kann, in intraoperative, postoperative und postoperativ ex vivo erfassbare Parameter eingeteilt werden. TOI, Laktat und S_vO_2 zählen zu den intraoperativen, $S100\beta$ und MDA zu den postoperativen und HSP70 stellt einen postoperativen ex vivo bestimmbaren Parameter dar.

Geht man davon aus, dass HSP70 als bester Parameter den Maßstab für den Schädigungsgrad des Gehirns darstellt, so können aufgrund der einzelnen Korrelationen von HSP70 mit TOI, Laktat, S_vO_2 , $S100\beta$ und MDA diese unter bestimmten Bedingungen für die Schadensvoraussage zum Zeitpunkt der OP herangezogen werden (s. Abb. 24).

Es zeigte sich z.B. ein signifikanter Zusammenhang zwischen der HSP70 Induktion und dem TOI-Wert am Ende der Ischämiephase ($p < 0,01$; $r^2 = 0,43$). Dies lässt den Schluss zu, dass der TOI als nicht invasiver, prädiktiver Parameter Aussagen zum zerebralen Sauerstoffmetabolismus (Hb , HbO_2) liefern kann. Als Voraussetzung hierfür muss jedoch auf eine penetrierbare Schädeldicke geachtet werden. Die Fähigkeit des infraroten Lichtes die Schädeldecke der Ferkel in der vorliegenden Arbeit zu penetrieren, lässt nicht den Rückschluss zu, dass die Anwendung des NIRO300 an ausgewachsenen Schweinen mit sehr dicker Schädeldecke ebenso vielversprechende Ergebnisse liefert.

Ebenso korreliert die Sättigung vorwiegend am Ende der Ischämiephase mit der Induktion von HSP70 ($p < 0,01$; $r^2 = 0,72$). Somit kann angenommen werden, dass ein vermindertes Sauerstoffangebot aufgrund verringerten Carotisflusses im Gehirn zur Expression von Reparaturenzymen führt, die auf zelluläre Schädigung hinweist.

Ein weiterer Parameter, der signifikant mit der HSP70 Induktion zu den Zeitpunkten Ischämie- und Reperfusionseende korreliert, ist das Laktat ($p < 0,01$; $r^2 = 0,42$) als Summe aus Gehirnlaktat und Körperlaktat. Da die Laktatkonzentration am Ende der Reperfusion vermehrt durch das Körperlaktat beeinflusst wird, muss man eigentlich von einer Korrelation des Körperlaktats und des HSP70 sprechen. Um genaue Aussagen über die Menge des im Gehirn gebildeten Laktats zu treffen, müsste in einer Folgestudie die arteriovenöse Laktatdifferenz (zwischen der A. carotis und der V. jugularis) errechnet werden. Anhand des Laktatanstiegs in den Gruppen 38 °C 50 % und 38 °C 25 % kann auf eine anaerobe Stoffwechsellage und damit verbundenen Zellschädigungen geschlossen werden.

Auch MDA als postoperativ einzusetzender Parameter korreliert signifikant mit der HSP70 Induktion ($p < 0,01$). Als Maß für die Lipidperoxidation kann dieser Parameter postoperativ als Marker zur Abschätzung des ischämischen Schadens herangezogen werden. Da der Anstieg erst in der Reoxygenierungsphase erfolgte, lässt sich MDA demzufolge nur postoperativ einsetzen.

S100 β als zytosolisches Protein, welches mittels ELISA mit einer Sensitivität von 0,02 $\mu\text{g/L}$ gemessen werden kann (Grocott et al., 2000), korreliert ebenfalls mit der Induktion von HSP70 ($p < 0,01$). Serumwerte über 0,2 $\mu\text{g/L}$ sind als pathologisch anzusehen (Grocott et al., 2000), obwohl in der vorliegenden Arbeit die S100 β Ausgangswerte im Bereich zwischen 0,7-0,9 $\mu\text{g/L}$ liegen. Dieser erhöhte Wert könnte vor allem auf die Thorakotomie und teilweise auf die Platzierung der einzelnen Katheter für die verschiedenen Messungen zurückgeführt werden. Im Gegensatz dazu sind die Serumwerte in der Ferkelgruppe, die nach Platzierung aller Katheter über fünf Stunden (entspricht einer Stunde Ischämie plus vier Stunden Reperfusion) mittels Isofluran in Narkose gehalten wurden, mit 0,3 $\mu\text{g/L}$ auch leicht erhöht. Der Vergleich dieser Ausgangswerte verdeutlicht, dass die Thorakotomie einen entscheidenden Einfluss auf den Anstieg von S100 β haben muss. Die Freisetzung von S100 β aus dem Zytosol in den extrazellulären Raum wird durch den Zelluntergang (Buttner et al., 1997) und auch dem Aufbrechen von Zellmembranen infolge von Ödemen hervorgerufen und ist mit dem neurologischen Schäden nach Herzoperationen mit CPB assoziiert (Herrmann et al., 2000). Nach einem apoplektischen Insult erreicht der S100 β -Wert erst nach etwa 2-3 Tagen seinen Spitzenwert (Buttner et al., 1997; Missler et al., 1997). Anhand des zeitlich versetzten Anstiegs von S100 β ist der Einsatz dieses Parameters nur postoperativ sinnvoll.

5.6 Schlussfolgerungen

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit kann für den künftigen Einsatz der HLM Folgendes abgeleitet werden. Der Einsatz der HLM zur operativen Korrektur verschiedener Herzerkrankungen bei Tieren ist anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unter bestimmten technischen und operativen Voraussetzungen möglich. Der Aufbau dieser Studie konnte so modifiziert werden, dass das Verhältnis von Blutvolumen : Primingvolumen zu 9:1 verschoben wurde, um die Hämodilution so gering wie möglich zu halten und somit die Überlebensraten zu erhöhen.

Weiterhin konnte der Reduktionseffekt der Faktoren Temperatur und HLM-Fluß anhand der Veränderungen der einzelnen Parameter der vorliegenden Studie (vor allem am Zielparameter HSP70) aufgezeigt werden. Die Hypothermie zeigte grundsätzlich einen positiven Effekt, wobei allerdings auffällig war, dass die tiefe Hypothermie mit 18 °C sich

als ungünstiger herausstellte als 25 °C. Dieser Effekt lässt sich auf die Verschiebung der Sauerstoffbindungskurve zurückführen. In der Abkühlungsphase wird das Blut relativ schnell auf z. B. 18 °C abgekühlt und gibt aufgrund der Linksverschiebung der Sauerstoffbindungskurve nur wenig Sauerstoff an das noch nicht so kalte Gehirn ab. Der Gehirnstoffwechsel hingegen ist in dieser Zeit noch nicht so stark reduziert, so dass das Sauerstoffangebot in der Abkühlungsphase zu gering ist. Dieser Effekt hat in den 18 °C Gruppen einen schwerwiegenderen Einfluss als in den 25 °C Gruppen.

Desweiteren geht die Autoregulation in den 18 °C Gruppen verloren, so dass die Reduktion des Flusses nicht mehr kompensiert werden kann. In den 25 °C Gruppen sinkt der Carotisfluß nicht so stark innerhalb der Ischämiephase ab, woraus geschlossen werden kann, dass in diesen Gruppen die Autoregulation eventuell nur gestört ist.

Zu bedenken ist, dass in tiefer Hypothermie eine vermehrte Tendenz zu Mikrozirkulationsstörungen besteht, die wiederum den Carotisfluß und somit das Sauerstoffangebot in den 18 °C Gruppen vermindern. Der HLM-Fluss sollte so hoch wie nötig sein, um den Sauerstoffbedarf zu decken und somit der Hirnprotektion Rechnung zu tragen, aber auch so niedrig wie möglich, um die Bluttraumatisierung zu minimieren und eine Übersichtlichkeit des OP-Feldes zu garantieren. Unnötig hohe Flüsse und Drücke fördern wiederum den Flüssigkeitsaustritt aus den Gefäßen und damit die Ödembildung.

Anhand der Daten der vorliegenden Studie erweist sich eine Kombination aus reduzierter Temperatur und reduziertem HLM-Fluss in Form von 25 °C 50 % als die günstigste Einstellung der HLM beim Tier in Bezug auf die allgemeine postoperative Kreislaufsituation und die zerebralen Auswirkungen der Ischämie und Reperfusion.

Das klassische Schädigungsmuster, welches mit den hier verwendeten Verfahren entsteht, ist jedoch nicht der Zelltod, welcher bei einem Stillstand der Blutzirkulation zu erwarten wäre, sondern die neuropsychologischen Schädigungen im Sinne von verschlechtertem Lernverhalten bzw. Gedächtnisverlust. Leider lässt sich anhand der vorliegenden Daten nur sehr schwierig beurteilen, ob auch klinisch eine zerebrale Dysfunktion manifest geworden ist. Diese Frage bleibt Gegenstand zukünftiger Forschung.

6 Zusammenfassung

Aufbau und Evaluierung eines Herz-Lungen-Maschinen-Verfahrens anhand eines Ferkelmodells

Katja Schneider

Klinik für Kleintiere der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Klinik für Herzchirurgie, Herzzentrum Leipzig der Universität Leipzig

Eingereicht im Juli 2005

(98 Seiten, 23 Abbildungen, 21 Tabellen, 255 Literaturangaben)

Schlüsselworte: Herz-Lungen-Maschine, Hippocampus, HSP70, Hypothermie, Hirnischämie

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die günstigste Kombination der Herz-Lungen-Maschinen-Einstellparameter Blutfluss und Temperatur in Bezug auf die Kreislaufsituation und vor allem das Gehirn als ischämieempfindlichstes Organ herausgefunden werden. Als aussagekräftigster Ischämieparameter wurde in der CA1-Region des Hippocampus immunhistologisch die Expression des Reparaturenzyms Hitzeschockprotein 70 (HSP70) bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von HSP70 als Maß für die ischämischen Schädigungen herangezogen werden kann. Die Hämatoxylin-Eosin gefärbten Hippocampusschnitte zeigten innerhalb des gewählten Zeitfensters von einer Stunde Ischämie und vier Stunden Reperfusion geringgradige perizelluläre Ödeme in den flussreduzierten Normothermiegruppen. Weiterhin konnte aufgezeigt werden, dass der Hirngewebeoxygenierungsindex (TOI), die Sauerstoffsättigung und das Laktat zu den intraoperativ erfassbaren Parametern zählen, an denen ein ischämischer Schaden schon frühzeitig abgeschätzt werden kann.

Die Ergebnisse von TOI als Gewebeoxygenierungsindex weisen darauf hin, dass dieser als nichtinvasiver Parameter an Schweinen mit einem Körpergewicht bis zu 10kg einsetzbar ist und Informationen über den zerebralen Sauerstoffmetabolismus liefert. Fraglich ist jedoch, ob die Nahinfrarotspektroskopie bei ausgewachsenen Schweinen mit entsprechend dicker Schädeldecke noch funktionsfähig ist.

Die Sauerstoffsättigung, welche zu den aussagekräftigen intraoperativ messbaren Parametern zählt, sinkt in den flussreduzierten Normothermiegruppen infolge des stark reduzierten Sauerstoffangebotes innerhalb der Ischämiephase, während der Körper den Sauerstoff in der Reperusionsphase nicht komplett extrahiert. Das spricht für eine inkomplette Ischämie, welche immunhistologisch durch die fleckförmigen HSP70 positiven Areale und histologisch durch das Fehlen morphologisch ischämietypischer Veränderungen sichtbar wird.

Ein weiterer Parameter, an dem intraoperativ ein ischämischer Schaden abgeschätzt werden kann, ist das venös gemessene Laktat. Anhand des Laktatanstiegs in Normothermiegruppen mit reduzierten Blutfluss kann auf eine anaerobe Stoffwechsellage und damit verbundenen Zellschädigungen geschlossen werden.

Als postoperativ einsetzbare Parameter zur ischämischen Schadensbestimmung können Malondialdehyd (MDA) als Maß für die Lipidperoxidation und das Protein S100 β , welches in Zusammenhang mit Zelluntergang steht, herangezogen werden.

Die günstigste Einstellung der Herz-Lungen-Maschine (HLM), die jetzt auch vermehrt bei Operationen zur Therapie angeborener Kinderherzerkrankungen im Herzzentrum Leipzig eingesetzt wird, erwies sich eine Kombination aus 50 % HLM-Fluss und 25 °C Körpertemperatur.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war in diesem Zusammenhang der Einsatz der Extrakorporalen Zirkulation (EKZ) in der Tiermedizin zur Behandlung von verschiedenen Herzerkrankungen bei kleinen Tieren unter 10 kg Körpermasse. Hierfür musste ein neues Setup der HLM entwickelt werden, um das Primingvolumen und den damit verbundenen Hämatokrit zu optimieren. Mit Hilfe dieser neuen HLM-Entwicklung konnte das Verhältnis von Blutvolumen : Primingvolumen zu 9:1 verschoben werden und somit wurde ein Grundstein zur Erhöhung der Überlebensrate der Tiere nach Operationen unter Einsatz des kardiopulmonalen Bypass gelegt.

Zur großen Freude aller an dieser Studie beteiligten Mitarbeiter des Herzzentrums werden die Ergebnisse der Neuentwicklung des Setups der HLM in Kürze bei Operationen an Kindern am Herzzentrum Leipzig Einzug halten.

7 Summary

Structure and evaluation of a heart lung machine operation based on a piglet model type

Katja Schneider

Department of Small Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Clinic for Heart Surgery, Heart Center Leipzig, University of Leipzig

Submitted in July 2005

(98 pages, 23 figures, 21 tables, 255 references)

Keywords : heart lung machine, hippocampus, HSP70, hypothermia, cerebral ischemia

In the present study, the best setting of the heart lung machine regarding blood flow and temperature should be determined in relation to circulation and the brain, since the brain is more sensitive to ischemia. As the most important parameter for ischemia, the expression of the repair enzyme heat shock protein 70 (HSP70) was determined in the seal one region of the hippocampus using immunohistology. It could be shown that HSP70 expression can be used as a measure for ischemic injury. Hematoxylin-eosin stained hippocampus sections exhibited slight pairy cellular edema in the flow reduced normothermic animals within the schedule in one hour ischemia and four hour reperfusion. Furthermore, it could be shown that the tissue oxygenation index, oxygene saturation and lactate belong to those parameters which can be assessed intraoperatively and which allow early estimation of ischemic damage. The results regarding tissue oxygenation index indicate that this noninvasive parameter can be used in piglets with body weights up to 10 kilograms and provides information about the serible saturation metabolism. However, it is questionable whether near infrared spectroscopy may work in pigs with the respective thickness of scedull. The oxygen saturation, which is among the most significant intraoperatively assessable parameters, decreases in the flow reduced normothermic animals due to the highly reduced oxygen supply during ischemia while a body those not completely extracts oxygene during reperfusion. That speaks for an incomplete ischemia which can be detected

immunohistologically by patchy HSP70 positive areas and histological by the leak of ischemia-specific morphological alterations.

A next parameter for the intraoperative estimation of ischemic damage is the venous lactate concentration. The increase in lactate in normothermic animals with reduced blood flow indicates an anaerobic metabolic situation and several damages related herewith. For postoperative assessment of ischemic damage useful parameter may be malondialdehyde.

The best settings for the heart lung machine were found to be the combination of 50% flow and 25°C body temperature. These settings are in augmented use during heart operations for congenital heart diseases at the Heart Center Leipzig.

Another aim of the study was to evaluate extracorporeal circulation in Veterinary medicine, especially for animals with a weight lower than 10. Settings had to be found to decrease the priming volume in order to minimize changes in the hematocrit. During this study the ratio of blood volume versus priming volume changed to 9:1. Herewith we hope to increase the survival rate of animals after cardiac surgery with extracorporeal circulation.

All collaborators of this study are delighted that the results of this study will be used for the pediatric patients in the Heart Center Leipzig.

8 Literaturverzeichnis

Abe K, Aoki M, Kawagoe J, Yoshida T, Hattori A, Kogure K, Itoyama Y. Ischemic delayed neuronal death. A mitochondrial hypothesis. *Stroke*. 1995;26:1478-89.

Adami C, Sorci G, Blasi E, Agneletti AL, Bistoni F, Donato R. S100B expression in and effects on microglia. *Glia*. 2001;2:131-42.

Alessio HM. Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc*. 1992;2:218-24.

AL Rawi PG, Smielewski P, Kirkpatrick PJ. Evaluation of a near-infrared spectrometer (NIRO 300) for detection of intracranial oxygenation changes in the adult human. *Stroke*. 2001;32:2492-500.

Anathan J, Goldberg AL, Voellmy R. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science*. 1986;232:522-4.

Antilla V, Rimpiläinen J, Pokela M, Kiviluoma K, Mäkiranta M, Jäntti V, Vainionpää V, Hirvonen J, Juvonen T. Lamotrigine improves cerebral outcome after hypothermic circulatory arrest: A study in a chronic porcine model. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000; 29:247-55.

Astrup J, Siesjö BK, Synon L. Thresholds in cerebral ischemia- the ischemic penumbra. *Stroke*. 1981;12:723-5.

Aufricht C, Lu E, Thulin G, Kashgarian M, Siegel NJ, Van Why SK. ATP releases HSP 72 from protein aggregates after renal ischemia. *Am J Physiol*. 1998;274:268-74.

Aurell A, Rosengren L, Karlsson B et al. Determination of S100 and glial fibrillary acidic concentrations in cerebrospinal fluid after brain infarction. *Stroke*. 1991;22:1254-8.

Baethmann A, Schurer L, Unterberg A, Wahl W, Staub F, Kempfski O. Mediator substances of brain edema in cerebral ischemia. *Arzneimittelforschung*. 1991;4:310-5.

Baiping L, Xiujuan T, Hongwei C, Qiming X, Quiling G. Effects of moderate hypothermia on lipid peroxidation in canine brain tissue after cardiac arrest and resuscitation. *Stroke*. 1994;25:147-52.

- Ballinger WF, Vollenweider H, Pierucci L, Templeton JY. Anaerobic metabolism and metabolic acidosis during cardiopulmonary bypass. *Ann Surg.* 1961;153:499-506.
- Bariskaner H, Ustun ME, Ak A, Yosunkaya A, Ulusoy HB, Gurbilek M. Effects of magnesium sulfate on tissue lactate and malondialdehyde levels after cerebral ischemia. *Pharmacology.* 2003;68:162-8.
- Barone F, Feuerstein G, White R. Brain cooling during transient focal ischemia provides complete neuroprotection. *Neurosci Biobehav Rev.* 1997;21:31-44.
- Bauer R, Fritz H, Walter B, Schlonski O, Jochum T, Hoyer D, Zwiener U, Reinhart K. Effect of mild hypothermia on cerebral oxygen uptake during gradual cerebral perfusion pressure decrease in piglets. *Crit Care Med.* 2000;4:1128-35.
- Becker BF, Massoudy P, Permanetter B, Raschke P, Zahler S. Possible significance of free radicals for reperfusion injury. *Z Kardiol.* 1993;82:49-58.
- Bellinger DC, Wypij D, Kuban KC, Rappaport LA, Hickey PR, Wernovsky G, Jonas RA, Newburger JW. Developmental and neurological status of children at 4 year age after heart surgery with hypothermic circulatory arrest low- flow cardiopulmonary bypass. *Circulation.* 1999;100:526-32.
- Benedum J. Die Entwicklung der Bluttransfusion. In: Müller-Eckhardt C (Hrsg.). *Transfusionmedizin.* Berlin:Springer-Verlag; 1988. 1-20.
- Berntman L, Welsh FA, Harp JR. Cerebral protective effect of low-grade hypothermia. *Anesth.* 1981;55:495-8.
- Böttger PF. Hypothermie. In: Tschaut RJ (Hrsg.). *Extrakorporale Zirkulation in Theorie und Praxis.* Berlin:Pabst Service Publishers; 1999. 245.
- Boggs LS, Dewan SJ, Ballard SE. Mitral valve reconstruction in a troy-breed dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1996;209:1872-6.
- Boldt J, King D, Scheld HH, Hempelmann G. Lung management during cardiopulmonary bypass: influence on extravascular lung water. *J Cardiothorac Anesth.* 1990;4:73-9.

Borghetti V, Piccin C, Luciani GB, Menon T, Mazzuco A. Postperfusionssyndrom – Auswirkungen auf andere Organe. In: Tschaut RJ (Hrsg.). Extrakorporale Zirkulation in Theorie und Praxis. Berlin:Pabst Science Publishers; 1999. 467-90.

Böttiger BW, Schmitz B, Wiessner C, Vogel P, Hossmann KA. Neuronal stress response and neuronal cell damage after cardiocirculatory arrest in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998;10:1077-87.

Breznock EM, Vasko JS, Hilwig RW, Bell RL, Hamlin RL. Surgical correction, using hypothermia, of an interventricular septal defect in the dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1971;158:1391-400.

Brierley JB, Surrey C, Meldrum BS, Brown AW. The threshold and neuropathology of cerebral “anoxic-ischemic” cell damage. *Arch Neurol.* 1973;6:367-74.

Brode P, Hausdorf G. Häufigkeit und Spontanverlauf von Herzfehlern. In: Keck EW, Hausdorf G (Hrsg.). Pädiatrische Kardiologie. München, Jena:Urban & Fischer Verlag; 2002.1-10.

Brown IR. The stress response. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1995;21:473-5.

Buchanan JW. Causes and prevalences of cardiovascular disease. In: Kirk-RW, Bounagura-JD (ed.). *Current Veterinary Therapy XI.* Philadelphia, London, New York:WB Saunders; 1992.647-63.

Buchanan JW. Prevalence of Cardiovascular Disorders. In: Fox PR, Sisson D, Moise NS (ed.). *Textbook of canine and feline Cardiology.* Philadelphia, London, New York:WB Saunders; 1999.457-535.

Buchau B, Horwich AL. The hsp70 and hsp60 chaperone machines. *Cell.* 1998;92:351-66.

Burbridge SA, Parson AA. Cytokine expression following brain injury. In: Kriegelstein J, Klumpp S (ed.). *Pharmacology of cerebral ischemia.* Stuttgart:Medpharm;2002.253-60.

Burel C, Mezger V, Pinto M, Rallu M, Trigon S, Morange M. Mammalian heat shock protein families. Expression and functions. *Experientia*. 1992;48:629-34.

Burston SG, Clarke AR. Molecular chaperones: physical and mechanistic properties. *Essays Biochem*. 1995;29:125-36.

Buttner T, Weyers S, Postert T, Sprengelmeyer R, Kuhn W. S-100 protein: serum marker of focal brain damage after ischemic territorial MCA infarction. *Stroke*. 1997;28:1961-5.

Candelario E, Mhadu NH, Al-Dalain SM, Martinez G, Leon OS. Time course of oxidative damage in different brain regions following transient cerebral ischemia in gerbils. *Neurosci Res*. 2001;41:233-41.

Carden DL, Martin GB, Nowak RM, Roreback CC, Tomlanovich MC. The effect of cardiopulmonary bypass resuscitation on cardiac arrest induced lactic acidosis in dogs. *Resuscitation*. 1989;17:153-61.

Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke*. 1996;27:1124-9.

Chiang J, Kowada M, Ames A 3rd, Wright RL, Majno G. Cerebral ischemia. Vascular changes. *Am J Pathol*. 1968;52:455-76.

Chopp M, Knight R, Tidwell CD, Helpert JA, Brown E, Welch KMA. The metabolic effects of mild hypothermia on global cerebral ischemia and recirculation in the cat: Comparison to normothermia and hyperthermia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1989;9:141-8.

Civilek A, Roth M, Lemke P, Klovekorn WP, Bauer EP. Leukocyte-depleted secondary blood cardioplegia attenuated reperfusion injury after myocardial ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;5:249-54.

Clay HD. Validity and reliability of the SjO₂ catheter in neurologically impaired patients: A critical review of the literature. *J Neurosci Nurs*. 2000;32:194-203.

Conroy BP, Grafe MR, Jenkins LW, Vela AH, Lin CY, Dewitt DS, Johnston WE. Histopathologic consequences of hyperglycemic cerebral ischemia during hypothermic cardiopulmonary bypass in pigs. *Ann Thorac Surg*. 2001;71:1325-34.

Croughwell ND, Newman MF, Blumenthal JA, White WD, Lewis WD, Lewis JB, Frasco PE, Smith LR, Thyrum EA, Hurwitz BJ, Leon BJ, Schell RM, Reves JG. Jugular bulb saturation and cognitive dysfunction after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 1994;58:1702-8.

Crow J, Barks JDE. Pathogenesis of hypoxic-ischemic cerebral injury in the term infant: current concepts. *Clin Perinatol.* 2002;29:585-602.

Currie RW, Tanguay RM, Kingma JG Jr. Heat-shock response and limitation of tissue necrosis during occlusion/reperfusion in rabbit hearts. *Circulation.* 1993;87:963-71.

Czosnyka M, Smielewski P, Piechnik S, Steiner LA, Pickard JD. Cerebral autoregulation following head injury. *J Neurosurg.* 2001;95:756-63.

Dauberschmidt R, Zinsmeyer J, Mrochen H, Meyer M. Changes of neuron-specific enolase concentration in plasma after cardiac arrest and resuscitation. *Mol Chem Neuropathol.* 1991;14:237-45.

Davies LK. Hypothermia: Physiology and clinical use. In: Gravlee GP, Davis RF, Utley JR (ed.). *Cardiopulmonary bypass. Principles and practice.* Baltimore:Williams & Wilkins; 1993.140-54.

Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Nat Acad Sci.* 1991;88:6368-71.

Dede S, Deger Y, Meral I. Effect of short-term hypothermia on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in rats. *J Vet Med.* 2001;49:286-8.

Delanghe JR, De Winter HA, De Buyzree ML, Camaret JJ, Matren FE, De Praeter C. Mass concentration measurements of creatine kinase BB isoenzyme as a index of brain tissue damage. *Clin Chim Acta.* 1990;193:125-35.

De Maio A. Heat shock proteins: facts, thoughts and dreams. *Schock.* 1999;11:1-12.

Detweiler DK, Patterson DF. Prevalence and types of cardiovascular disease in dogs. *Ann NY Acad Sci.* 1965;127:481-516.

Dib M, Garrel C, Favier A, Robin V, Desnuelle C. Can malondialdehyde be used as a biological marker of progression in neurodegenerative disease? *J Neurol.* 2002;249:367-74.

Dietz O und Nagel E. Gewinnung, Konservierung und Übertragung von Vollblut bei Pferd, Rind, Schwein und Hund. *Mh Vet Med.* 1959;14:649-59.

Dillmann WH, Mestral R. Heat shock proteins in myocardial stress. *Z Kardiol.* 1995;84:87-90.

Doerr W, Seifert G, Uehlinger E. Globale Ischämie In: ULE G (Hrsg.). *Pathologie des Nervensystems I, Durchblutungsstörungen und Gefäßerkrankungen des Zentralnervensystems.* Berlin:Springer Verlag; 1999.125-36.

Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech.* 2003;6:540-51.

Draper HH, Hadley M. A review of recent studies on the metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde. *Xenobiotica.* 1990;20:901-7.

Duffy TE, Cavzuti M, Cruz NF, Sokoloff L. Local cerebral glucose metabolism in newborn dogs: effects of hypoxia and halothane anesthesia. *Ann Neurol.* 1982;11:233-46.

Dulbecco R, Voigt M. Plaque formation and isolation of pure lines with polomyelitis virus. *J Exp Med.* 1954;99:167.

Eger EL, Saidman LJ, Branstater B. Temperature dependence of halothane and cyclopropane anesthesia in dogs: correlation with some theories of anesthetic action. *Anesthesiology.* 1976;26:764-70.

Engler R, Gilpin E. Can superoxide dismutase alter myocardial infarct size. *Circulation.* 1989;9:1137-42.

Ferry PC. Neurologic sequelae of cardiac surgery in children. *Am J Dis Child.* 1987; 141:309-12.

Fessatidis IT, Thomas VL, Shore DF, Hunt RH, Weller RO, Goodland F, Rowe D, Ventikou MV, Bloom SR. Assessment of neurological injury due to circulatory arrest during profound hypothermia. An experimental study in vertebrates. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1993a;7:465-73.

Fessatidis IT, Thomas VL, Shore DF, Hunt RH, Weller RO, Goodland F, Rowe D. Neuropathological features of profoundly hypothermic circulatory arrest: an experimental study in the pig. *Cardiovasc Surg.* 1993b;1:155-60.

Ferichs H. Schlauchsysteme. In: Tschaut RJ (Hrsg.). *Extrakorporale Zirkulation in Theorie und Praxis.* Berlin:Pabst Science Publishers; 1999. 317-22.

Georgiadis D, Berger A, Kowatschev E, Lauteschlager C, Borner A, Lindner A, Schulte-Mattler W, Zerkowski HR, Zierz S, Deufel T. Predictive value of S100 β and neuron-specific enolase serum levels for adverse neurologic outcome after cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001;119:138-47.

Glover JR, Lindquistl S. Hsp104, hsp70 and hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell.* 1994;94:73-82.

Govier AV, Reves JG, Mc Kay RD, Karp RB, Zorn GL, Morawetz RB, Smith LR, Adams M, Freeman AM. Factors and their influence on regional cerebral blood flow during nonpulsatile cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 1984;38:592-600.

Gray CC, Amrani M, Smolenski RT, Nakamura K, Yacoub MH. Cold cardioplegic arrest enhances heat shock protein 70 in the heat-shocked rat heart. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001;121:1130-6.

Greeley WJ, Ungerleider RM, Smith LR, Reves JG. The effects of deep hypothermic cardiopulmonary bypass and total circulatory arrest on cerebral blood flow in infants and children. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1989;97:737-45.

Greeley WJ, Ungerleider RM, Quill T, Baldwin B, Reves JG. The effect of hypothermic cardiopulmonary bypass and total circulatory arrest on cerebral metabolism in neonates, infants and children. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1991;101:783-94.

Grocott HP, Laskowitz DT, Newman MF. Markers of cerebral injury. In: Newman SP, Harrison MJG, Stump DA, Smith P, Taylor K (ed.). The brain and cardiac surgery. Amsterdam:Harwood Academic Publishers; 2000.113-42.

Hamann GF. Acute cerebral infarct: physiopathology and modern therapeutic concepts. Radiologe. 1997;37:843-52.

Harringer W. Kardiovaskuläre Chirurgie in tiefer Hypothermie und Kreislaufstillstand: klinische und experimentelle Untersuchungen zur globalen zerebralen Ischämie. Habilitation der Medizinischen Hochschule Hannover, Thorax- Herz- Gefäßchirurgie; 2000.

Harrison MJG, Sedal L, Arnold J, Russel RW. No reflow phenomenon in the cerebral circulation of the gerbil. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1975;12:1190-3.

Harrison MJG. Neurological complications of cardiac surgery. In: Newman SP, Harrison MJG, Stump DA, Smith P, Taylor K (ed.). The brain and cardiac surgery. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 2000.3-20.

Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature. 1996;381:571-9.

Hartmann H, Staufienbiel R (Hrsg.). Flüssigkeitstherapie bei Tieren. Jena, Stuttgart:Fischer Verlag; 1995.

Hata R, Maeda K, Hermann D, Mies G, Hossmann KA. Evolution of brain infarction after transient focal cerebral ischemia in mice. J Cereb Blood Flow Metab. 2000;20:937-46.

Heckmann JG, Erbguth FJ, Hilz MJ, Lang CJG, Neundörfer B. Die Hirndurchblutung aus klinischer Sicht. Med Klein. 2001;96:583-92.

Heiss WD. Acute cerebral ischemia: pathogenesis and therapy. Introduction to the theme. Arzneimittelforschung. 1991;41:282-3.

Heiss WD. Pathophysiologie des ischämischen Insults. Klinikarzt. 1997;11:288-92.

Hermann M, Ebert AD, Galzky I, Wunderlich MT, Kunz WS, Huth C. Neurobehavioral outcome prediction after cardiac surgery. Role of neurobiochemical markers of damage to neuronal and glial brain tissue. *Stroke*. 2000;31:645-50.

Hermann M, Vos P, Wunderlich MT, De Bruijn CHMM, Lamers KJB. Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke. A comparative analysis of serum concentrations of protein S-100B and glial fibrillary acidic protein. *Stroke*. 2000;31:2670-84.

Hess ML, Kurkeja RC. Free radicals, calcium homeostasis, heat shock proteins, and myocardial stunning. *Ann Thorac Surg*. 1995;60:760-6.

Hewer C, Lee J. Induced Hypothermia. In: *Recent Advances in Anaesthesia and Analgesia*. London:J&A Churchill Ltd.; 1957.162-171.

Hickey PR, Hansen DD. Temperature and blood gases: the clinical dilemma of acid-basemanagement for hypothermic cardiopulmonary bypass. In: Tinker JH (ed.). *Cardiopulmonary bypass: current concepts and controversies*. Philadelphia, London, New York:WB Saunders; 1989.1-20.

Hovels-Gurich HH, Seghaye MC, Schnitker R, Wiesner M, Huber W, Minkenberg R, Kotlarek F, Messmer BJ, Bernuth G. Long-term neurodevelopmental outcomes in school-aged children after neonatal arterial switch operation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002; 124:448-58.

Hunt GB, Pearson MRB, Bellenger CR, Malik R. Ventricular septal defect repair in a small dog using cross-circulation. *Aust Vet J*. 1995;72:379-82.

Hunt E et Moore S. Use of blood and blood products. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 1990;6:133-47.

Illevich UM, Zornow MH, Choi KT, Stat MA, Scheller MS. Effects of hypothermia or anesthetics on hippocampus glutamate and glycine concentrations after repeated transient global cerebral ischemia. *Anesth*. 1994;80:177-86.

Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biol Med*. 1990;9:515-40.

- Jobsis FF. Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. *Science*. 1977;198:1264-6.
- Jonas RA, Bellinger DC, Rappaport LA, Wernovsky G, Hickey PR, Farrell DM, Newburger JW. Relation of pH strategy and developmental outcome after hypothermic circulatory arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1993;106:362-8.
- Kalmar P, Irrgang E. Cardiac Surgery in Germany during 2002: A report by the german society for thoracic and cardiovascular surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;51:25-9.
- Kappus H, Sies H. Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: Redoxycling and lipid peroxidation. *Experimentia*. 1981;37:1233-40.
- Karibe H, Zarow GL, Graham SH, Weinstein PR. Mild intraischemic hypothermia reduces postischemic hyperperfusion, delayed hypoperfusion, blood-brain barrier disruption, brain edema, and neuronal damage volume after temporary focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1994;14:620-7.
- Karkela J, Book E, Kaukien S. CSF and serum brain-specific creatine kinase isoenzyme (CK-BB), neuron-specific enolase (NSE) and neural cell adhesion molecule (NCAM) as prognostic markers for hypoxic brain injury after cardiac arrest in man. *J Neurol Sci*. 1993;116:100-9.
- Kato K, Suzuki -F, Umeda Y. Highly sensitive immunoassay for three forms of rat enolase. *J Neurochem*. 1981;36:793-7.
- Kempinski OS. Models and basic principles. *Anaesthesist*. 1994;43:25-33.
- Kern FH, Greeley WJ. pH-stat management of blood gases is not preferable to alpha-stat in patients undergoing brain cooling for cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 1995;9:215-8.
- Kern FH, Schell RM, Greeley WJ. Cerebral monitoring during cardiopulmonary bypass in children. *J Neurosurg Anesthesiol*. 1993;5:213-7.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26:239-57.

Kirino T, Sano K. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. *Acta Neuropathol.* 1984;62:201-8.

Kirino T, Sano K. Fine structural nature of delayed neuronal death following ischemia in the gerbil hippocampus. *Acta Neuropathol.* 1984;62:209-18.

Klein HH, Pich S, Lindert-Heimberg S, Nebendahl K, Sprengel U, Müller HH, Schaper J. Ultrastructural Evaluation of postischemic cell death (lethal reperfusion injury) in porcine hearts. *J Thromb Thrombolysis.* 1996;3:361-6.

Klement P, Del Nido PJ, Mickleborough L, Mackay C, Klement G, Wilson GJ. Technique and postoperative management for successful cardiopulmonary bypass and open-heart surgery in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1987;190:869-73.

Klimm J, Bein T, Fröhlich D, Taeger K. Stickstoffmonoxid (NO)- physiologische und biochemische Bedeutung. *Anästhesiologie und Intensivmedizin.* 1992;5:115-22.

Knobl HJ, Dramburg W, Kind K, Breyman T, Körfer R. Perfusionsführung bei Korrekturoperationen kongenitaler Vitien. Theoretische Grundlagen und praktischen Ausführung. In: Lauterbach G (Hrsg.). *Handbuch der Kardiotechnik.* München, Jena:Urban & Fischer; 2002. 239-63.

Knowlton AA. Heat shock proteins, stress and the heart. *Ann NY Acad Sci.* 994;723:128-37.

Knowlton AA, Brecher P, Apstein CS. Rappid expression of heat shock protein in the rabbit after brief cardiac ischemia. *J Clin Invest.* 1991;87:139-47.

Kofler J, Sawada M, Hattori K, Dawson VL, Hurn PD, Traystman RJ. Brain injury after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation (CPR): Role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP). In: Kriegelstein J, Klumpp S (ed.). *Pharmacology of cerebral ischemia.* Stuttgart:Medpharm; 2002.397-403.

Kofstad J. Blood gases and hypothermia: some theoretical and practical considerations. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1996;224:21-6.

Kong RS, Smith P. Hypothermic and normothermic bypass. In: Newman P, Harrison MJG, Stump DA, Smith P, Taylor K (ed.). The brain and cardiac surgery. Amsterdam:Harwood Academic Publishers; 2000.209-30.

Kontos HE. Oxygen radicals in cerebral ischemia. Stroke. 2001;32:2712-6.

Kriegelstein J (Hrsg.). Hirnleistungsstörungen. Pharmakologie und Ansätze für die Therapie. Stuttgart:Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 1998.1-86.

Kristian T, Siesjö BK. Calcium in ischemic cell death. Stroke. 1998;29:705-18.

Kuroda S, Siesjö BK. Reperfusion damage following focal ischemia: pathophysiology and therapeutic windows. Clin Neurosci. 1997;4:199-212.

Kurth CD, Steven JM, Nicolson SC, Chance B, Delivoria-Papadopoulos M. Kinetics of cerebral deoxygenation during deep hypothermic circulatory arrest in neonates. Anesthesiology. 1992;77:656-61.

Larsen R. Herzchirurgie. In: Larsen R (Hrsg.). Anästhesie. München, Wien, Baltimore:Urban & Schwarzenberg; 1999.1151-98.

Laskey RA, Honda BM, Millis AD, Finch JT. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. Nature. 1978;275:416-20.

Laussen PC. Optimal blood gas management during deep hypothermic paediatric cardiac surgery: alpha-stat is easy, but pH-stat may be preferable. Paediatric Anaesthesia. 2002;12:199-204.

Lauterbach G. Herz-Lungen-Maschine. In: Lauterbach G (Hrsg.). Handbuch der Kardiotechnik. 4. Auflage. München, Jena:Urban & Fischer Verlag; 2002.181-4.

Lauterbach G. Oxygenatoren. In: Lauterbach G (Hrsg.). Handbuch der Kardiotechnik. 4. Auflage. München, Jena:Urban & Fischer Verlag; 2002.185-200.

Leaf DA, Kleinman MT, Hamilton M, Deitrick RW. The effect of exercise intensity on lipid peroxidation. Med Sci Sports Exerc. 1997;8:1036-9.

- Leung JM. Clinical evidence of myocardial stunning in patients undergoing CABG surgery. *Card Surg.* 1993;8:220-3.
- Levy DE, Brierley JB, Plum F. Ischemic brain damage in the gerbil in the absence of no-reflow. *J Neurol, Neurosurg, Psychiat.* 1975;38:1197-1205.
- Lew LJ, Fowler JD, Egger CM, Thomson DJ, Rosin MW, Pharr JW. Deep hypothermic low flow cardiopulmonary bypass in small dogs. *Vet Surg.* 1997;26:281-9.
- Lew LJ, Fowler JD, Mc Kay R, Egger CM, Rosin MW. Open-heart correction of tetralogy of Fallot in an acyanotic dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1998;213:652-7.
- Liebetrau M, Staufer B, Auerswalda EA, Gabrijelcic-Geiger D, Fritz H, Zimmermann C, Pfefferkorn T, Hamann GF. Increased intracellular calpain detection in experimental focal cerebral ischemia. *Neuroreport.* 1999;10:529-34.
- Lindquist S. Heat shock proteins and stress tolerance in microorganism. *Curr Opin Gent Dev.* 1999;2:748-55.
- Liu Y, Kato H, Nakata N, Kogure K. Temporal profile of heat shock protein 70 synthesis in ischemic tolerance induced by preconditioning ischemia in rat hippocampus. *Neuroscience.* 1993;56:921-7.
- Longo FM, Wang S, Narasimhan P, Zhang JS, Chen J, Massa SM, Sharp FR. cDNA cloning and expression of stress-inducible rat hsp70 in normal and injured rat brain. *J Neurosci Res.* 1993;36:325-35.
- Lorenz D, Erhardt G. Kanülen und Kanülierungsarten In: Lauterbach G (Hrsg.). *Handbuch der Karditechnik.* 4. Auflage. München, Jena:Urban & Fischer Verlag; 2002.214-20.
- Malan A, Wilson TL, Reeves RB. Intracellular pH in cold-blooded vertebrates as a function of body temperature. *Respir Physiol.* 1976;28:29-47.
- Marion DW, Obrist WD, Carlier PM, Penrod LE, Darby JM. The use of moderate therapeutiv hypothermia for patients with severe head injuries: a preliminary report. *J Neurosurg.* 1993;79:354-62.

Marion DW, Leonov Y, Ginsberg M, Katz LM, Kochanek PM, Lechleuthner A, Nemoto EM, Orbist R W, Safar P, Sterz F, Tisherman SA, White RJ, Xiao F, Zar H. Resuscitative hypothermia. *Crit Care Med.* 1996;24:81-9.

Martens P. Serum neuron-specific enolase as a prognostic marker for irreversible brain damage in comatose cardiac arrest survivors. *Acad Emerg Med.* 1996;3:126-31.

Martens P, Raabe A, Johnsson P. Serum S-100 and neuron-specific enolase for prediction of regaining consciousness after global cerebral ischemia. *Stroke.* 1998;29:2363-6.

Massa SM, Swanson RA, Sharp FR. The stress gene response in brain. *Cerebrovasc Brain Metabol Rev.* 1996;8:95-158.

Matsumoto T, Wolfert CC, Perlman MH. Effects of pulsatile and non-pulsatile perfusion upon cerebral and conjunctival microcirculation in the dog. *Am Surg.* 1971;37:61-4.

Mc Khann GM, Goldsborough MA, Borowicz LM. Cognitive outcome after coronary artery bypass. A one-year prospective study. *Ann Thorac Surg.* 1997;63:510-15.

Missler U, Wiesmann M, Friedrich C, Kaps M. S-100 protein and neuron-specific enolase concentration in blood as indicator of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. *Stroke.* 1997;28:1956-60.

Missler U, Orłowski N, Nötzold A, Dibbelt T, Steinmeier E, Wiesmann M. Early elevation of S-100B protein in blood after cardiac surgery is not a predictor of ischemic cerebral injury. *Clin Chim Acta.* 2002;321:29-33.

Mohr M, Vicol C, Mensing B, Schunck O, Barylei M, Dalichau H, Sonntag H. A technique for extracorporeal circulation in the goettingen minipig allowing recovery and long-term follow-up. *J Exp Anim Sci.* 1996;38:82-92.

Monnet E, Orton C, Gaynor JS, Boon J, Wagner A, Linn K, Eddleman LA, Brevard S. Open resection for subvalvular aortic stenosis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1996;209:1255-61.

Moosdorf R, Vogt S, Troitzsch D. Chirurgische Schnitfführung, Zugangswege und Kanülierungstechniken zum Anschluß der Herz-Lungen-Maschine. In: Tschaut RJ (Hrsg.). Extrakorporale Zirkulation in Theorie und Praxis. Berlin, Düsseldorf, Leipzig:Pabst Service Publishers; 1999.349-50.

Morimoto RI. Cells in stress. Transcriptional activation of heat shock genes. *Science*. 1993;259:1409-10.

Morimoto RI, Kline MP, Bimston DN, Cotto JJ. The heat shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. *Essays Biochem*. 1997; 32:17-29.

Murkin JM, Farrar JK, Tweed WA, Mc Kenzie FN, Guiraudon G. Cerebral autoregulation and flow/metabolism coupling during cardiopulmonary bypass: the influence of paCO₂. *Anesth Analog*. 1987;66:825-32.

Narasimhan P, Fujimura M, Noshita N, Chan PH. Role of superoxide in poly (ADP-ribose) polymerase upregulation after transient cerebral ischemia. *Brain Res Mol Brai Res*. 2003;13:28-36.

Natale JA, Dalecy LG. Protection from cerebral ischemia by brain cooling without reduced lactate accumulation in dogs. *Stroke*. 1989;20:770.

Nattie EE. The alpha-stat hypothesis in respiratory control and acid-base balance. *J Appl Physiol*. 1990;69:1201-7.

Neri E, Sassi C, Barabesi L, Masetti M, Pula G, Buklas D, Tassi R, Giomarellil P. Cerebral autoregulation after hypothermic circulatory arrest in operations on the aortic arch. *Ann Thorac Surg*. 2004;77:72-9.

Nevin M, Colchester AC, Adams S, Pepper JR. Evidence for involvement of hypocapnia and hypotension in aetiology of neurological deficit after cardiopulmonary bypass. *Lancet*. 1987;2:1493-5.

Newburger JW, Jonas RA, Wernovsky G, Wypij D, Hickey PR, Kuban KC, Farrell DM, Holmes GL, Helmers SL, Constantinou J, et al. A comparison of the perioperative

neurologic effects of hypothermic circulatory arrest versus low-flow cardiopulmonary bypass in infant heart surgery. *N Engl J Med.* 1993;329:1057-64.

Nollert G, Möhnle P, Tassani-Prell P, Reichart B. Determinants of cerebral oxygenation during cardiac surgery. *Circulation.* 1995;92:327-33.

Nollert G, Jonas RA, Reichart B. Optimizing cerebral oxygenation during cardiac surgery: a review of experimental and clinical investigations with near infrared spectrophotometry. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2000;48:247-53.

Nolte CH, Jungehülsing GJ, Villringer A. Durchblutungsmangel setzt Kaskade der Zerstörung in Gang. *Neurotransmitter.* 2002;1:2-5.

Nover L, Scharf KD. Heat stress proteins and transcription factors. *Cell Mol Life Sci.* 1997;53:80-103.

Nurse S, Corbett D. Direct measurement of brain temperature during and after intraischemic hypothermia: correlation with behavioral, physiological, and histological endpoints. *J Neurosci.* 1994;14:7726-34.

Oertel WH. Zerebrale Ischämie In: Siegenthaler W (Hrsg.). *Klinische Pathophysiologie.* 7. Auflage. Stuttgart, New York:Thieme Verlag; 2001.880-8.

Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Fernandez AP, Rodrigo J, Bosca L, Leza JC. Chronic stress induces the expression of inducible nitric oxide synthase in rat brain cortex. *J Neurochem.* 2000;74:785-91.

Ormerod MG, Imrie SF. Immunohistochemistry. In: Lacey AJ (ed.). *Light Microscopy in biology. A Practical Approach.* Oxford, New York, Tokyo:IRL Press; 1992.118-20.

Orton EC, Mama K, Helyer P, Hackett TB. Open surgical repair of tetralogy of Fallot in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2001;219:1089-93.

Padosch SA, Vogel P, Bottiger BW. Neuronal apoptosis following cerebral ischemia. Basis, physiopathology and treatment strategies. *Anaesthesist.* 2001;50:905-20.

- Parmentier-Batteur S, Bohme GA, Lerouet D, ZhouDing L, Beray V, Margail I, Plotkine M. Antisense oligodeoxynucleotide to inducible nitric oxide synthase protects against transient focal cerebral ischemia-induced brain injury. *J Cereb Blood Flow Metabol.* 2001; 21:15-21.
- Patel RL, Turtle MRJ, Chambers DJ, Newman S, Venn GE. Hyperperfusion and cerebral dysfunction. Effect of differing acid-base management during cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1993;7:457-64.
- Paulson OB, Strandgaard S, Edvinsson L. Cerebral autoregulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1990;2:161-92.
- Persson L, Hardmark HG, Gustafsson J, Rundstrom G, Mendel-Hartvig I, Esscher T, Pahlman S. S-100 protein and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and serum: markers of cell damage in human central nervous system. *Stroke.* 1987;5:911-8.
- Pfeiffer J. Neuropathologie. In: Remmele W, Pfeiffer J, Schröder JM (Hrsg.). *Pathologie 4: Neuropathologie, Sinnesorgane, Muskulatur, Angeborene Stoffwechselkrankheiten.* Berlin, Heidelberg, New York:Springer-Verlag; 1984.5-285.
- Plonait H, Bickhardt K. *Lehrbuch der Schweinekrankheiten.* Berlin, Hamburg:Paul Parey Verlag; 1988:1-620.
- Pua HL, Biissonnette B. Cerebral physiology in paediatric cardiopulmonary bypass. *Can J Anaesth.* 1998;45:960-78.
- Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke.* 1979;3:267-72.
- Rahn H. Body temperature and acid-base regulation. *Pneumonologie.* 1974;151:87-94.
- Rajdev S, Sharp FR. Stress proteins as molecular markers of neurotoxicity. *Toxicol pathol.* 2000;28:105-12.
- Rasmussen LS, Christiansen M, Hansen PB, Moller JT. Do blood levels of neuron-specific enolase and S-100 protein reflect cognitive dysfunction after coronary artery bypass? *Acta Anaesthesiol Scand.* 1999;43:494-500.

Rehncrona S. Brain Acidosis. *Ann Emerg Med.* 1985;14:770-6.

Reith J, Jorgensen H, Pedresen P, Nakayama H, Raasehou HO, Jeppesen LL, Olsen TS. Body temperature in acute stroke: relation to stroke severity, infarct size, mortality and outcome. *Lancet.* 1996;347:422-5.

Rittosa F. A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. *Experienta.* 1962;18:571--3

Roberts AJ, Spies SM, Sanders JH, Moran JM, Wilkinson CJ, Lichtenthal PR, White RL, Michaels LL. Serial assessment of left ventricular performance following coronary artery bypass grafting. *Thorac Cardiovasc Surg.* 1981;81:69-84.

Robertson CS, Narayan RK, Gokaslan ZL, Pahwa R, Grossman RG, Carman P, Allen E. Cerebral arteriovenous oxygen difference as an estimate of cerebral blood flow in comatose patients. *J Neurosurg.* 1989;70:222-30.

Roggendorf W. Kreislaufstörungen des zentralen Nervensystems. In: Remmele W, Pfeiffer J, Schröder JM (Hrsg.). *Pathologie Band 6: Neuropathologie, Skelettmuskulatur, Sinnesorgane.* 2. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York:Springer Verlag; 1995.62-106.

Rohs TJ, Benedict MB, Bolling SF. Reperfusion adequacy and functional recovery. *Chest.* 1997;112:1075-8.

Roiner R, Somer H, Kaste M, Vinikka L, Karonen SL. Neurological outcome after out-of-hospital cardiac arrest. Prediction by cerebrospinal fluid enzyme analysis. *Arch Neurol.* 1989;46:753-6.

Romeis B. *Mikroskopische Technik.* 17. Auflage. München:Urban & Schwarzenberg; 1989.1-695.

Rosomoff HL, Holaday DA. Cerebral blood flow and cerebral oxygen consumption during hypothermia. *Am J Physiol.* 1954;179:85-8.

Safar P. Cerebral resuscitation after cardiac arrest: research initiatives and future directions. *Ann Emerg Med.* 1993;22:324-49.

Sakamoto T, Jonas RA, Stock UA, Hatsuoka S, Cope M, Springett RJ, Nollert G. Utility and limitations of near-infrared spectroscopy during cardiopulmonary bypass in a piglet model. *Pediatr Res.* 2001;49:770-6.

Sakamoto T, Zurakowski D, Duebener LF, Hatsuoka S, Lidov HGW, Holmes GL, Stock UA, Laussen PC, Jonas RA. Combination of alpha-stat strategy and hemodilution exacerbates neurologic injury in a survival piglet model with deep hypothermic circulatory arrest. *Ann Thorac Surg.* 2002;73:810-9.

Sato H, Hori M, Kitakaze M, Iwai K, Takashima S, Kurihara H, Inoue M, Kamada T. Reperfusion after brief ischemia disrupts the microtubule network in canine hearts. *Circ Res.* 1993;72:361-75.

Savageau JA, Stanton BA, Jenkins CD, Klein MD. Neuropsychological dysfunction following elective cardiac operation. Early assessment. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1982;84:585-94.

Schelke H, Göritz S. Die EKZ beim Erwachsenen- Blutsparende Maßnahmen. In: Lauterbach G (Hrsg.). *Handbuch der Kardiotechnik.* München:Urban & Fischer Verlag; 2002. 223-8.

Schell RM, Kern FH, Greeley WJ, Schulman SR, Frasco PE, Croughwell ND, Newman M, Reves JG. Cerebral blood flow and metabolism during cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg.* 1993;76:849-65.

Schmidt-Kastner R, Zhao W, Trüttner J, Belayer L, Busto R, Ginsberg MD. Pixel-based image of HSP70, GADD45 and MAP2mRNA expression after focal cerebral ischemia: hemodynamic and histological correlates. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998;63:79-97.

Schmidt-Kastner R, Zhang BT, Belayer L, Khoutorova L, Busto R, Ginsberg MD. Gene expression in the rat cortex after focal brain ischemia studied by DANN microassays. In: Kriegstein J, Klumpp S (ed.). *Pharmacology of cerebral ischemia.* Stuttgart:Medpharm; 2002.3-12.

Schröter M. Das oxidative System der Blut-Hirn-Schranke – Einfluß von Astrozyten sowie Hypoxie/Reoxygenierung. *Dissertation der FU Berlin:Medizinische Fakultät;* 1998.

Schurr A. Lactate, glucose and energy metabolism in the ischemic brain. *Int J Mol Med.* 2002;10:131-6.

Schwarze E, Neupert W. Mitochondrial protein import: mechanism, compounds and energetics. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1187:270-4.

Sharp FR, Kinouchi H, Koistinaho J, Chan PH, Sagar SM. HSP70 heat shock gene regulation during ischemia. *Stroke.* 1993;24:172-5.

Shinoka T, Nollert G, Shum TIM-D, Du Plessis A, Jonas RA. Utility of near-infrared spectroscopic measurements during deep hypothermic circulatory arrest. *Ann Thorac Surg.* 2000;69:578-83.

Shiozaki T, Suigimoto H, Taneda M, Yoshida H, Iwai A, Yoshioka T, Sugimoto T. Effects of mild hypothermia on uncontrollable intracranial hypertension after severe head injury. *J Neurosurg.* 1993;79:363-8.

Siesjö BK. Acidosis and ischemic brain damage. *Neurochem Pathol.* 1988;9:31-88.

Siesjö BK, Carlsson C, Hagerdal M, Nordstrom CH. Brain metabolism in the critically ill. *Crit Care Med.* 1976;4:283-94.

Siesjö BK. Cerebral circulation and metabolism. *J Neurosurg.* 1984;60:883-908.

Siesjö BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg.* 1992;77:169-84.

Siesjö BK, Uchino H, Shibasaki F. Post-treatment in transient global and focal ischemia: new pharmacological avenues. In: Krieglstein J, Klumpp S (ed.). *Pharmacology of cerebral ischemia.* Stuttgart:Medpharm; 2002.325-42.

Simon RP, Cho H, Gwinn R, Lowenstein DH. The temporal profile of 72-kDa heat-shock protein expression following global ischemia. *J Neurosci.* 1991;3:881-9.

Skogseid IM, Nordby HK, Urdal P, Paus E, Lilleaas F. Increased serum creatine kinase BB and neurone specific enolase following head injury indicates brain damage. *Acta Neurochir.* 1992;115:106-11.

Sladen RN, Berkowitz DE. Cardiopulmonary bypass and the lung. In: Gravlee GP, Davis RF, Utley JR (ed.). *Cardiopulmonary bypass. Principles and practice*. Baltimore:Williams & Wilkins; 1993.467-87.

Slogoff S, Reul GJ, Keats AS et al. Role of perfusion pressure and flow in major organ dysfunction after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*. 1990;50:911-8.

Smith ML, Auer RN, Siesjö BK. The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia. *Acta Neuropathol*. 1984;64:319-32.

Soriano FG, Pacher P, Mabley J, Liaudet L, Szabo C. Rapide reversal of the diabetic endothelial dysfunction by pharmacological inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase. *Circ Res*. 2001;89:684-91.

Stephan H, Weyland A, Kazmair 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.

Stokhoff AA. Possibilities and status of heart surgery in dogs. *Tierärztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*. 1998;26:378-87.

Sutton LN, Clark BJ, Nordwood CR, Woodford EJ, Welsh FA. Global cerebral ischemia in piglets under conditions of mild and deep hypothermia. *Stroke*. 1991;22:1567-73.

Takala J, Uusaro A, Parvianen I, Ruokonen E. Lactate metabolism and regional lactate exchange after cardiac surgery. *New Horiz*. 1996;4:483-92.

Tanaka S, Kitagawa K, Ohitski T, Yagita Y, Takasawa K, Hori M, Matsumoto M. Synergistic Induction of HSP40 and HSC70 in the mouse hippocampal neurons after cerebral ischemia and ischemic tolerance in gerbil hippocampus. *J Neurosci Res*. 2002;67:37-47.

Taylor RH, Burrows FA, Bissonette B. Cerebral pressure-flow velocity relationship during hypothermic cardiopulmonary bypass in neonates and infants. *Anesth Analg.* 1992;74:636-42.

Tidholm A. Retrospective study of congenital heart defects in 151 dogs. *J Small Anim Pract.* 1997;38:94-8.

Tissiere A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*. Relation to chromosome puffs. *J Mol Biol.* 1974;84:389-98.

Tomimoto H, Takemoto O, Akiguchi I, Yanagihara T. Immunoelectron microscopic study of c-Fos, c-Jun and heat shock protein after transient cerebral ischemia in gerbils. *Acta Neuropathol.* 1999;97:22-30.

Torella F, Cowley RD, Thoniley MS, Mc Collum CN. Regional tissue oxygenation during hemorrhage: Can near infrared spectroscopy be used to monitor blood loss? *Schock.* 2002;18:440-4.

Townes BD, Bashein G, Hornbein TF, Coppel DB, Goldstein DE, Davis KB, Nessly ML, Bledsoe SW, Veith RC, Ivey TD et al. Neurobehavioral outcome in cardiac operations. A prospective controlled study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1989;98:774-82.

Traystman RJ, Kirsch J, Koehler RC. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol.* 1991;4:1185-95.

Treasure T, Smith PL, Newman S, Schneidau A, Joseph P, Ell P, Harrison MJ. Impairment of cerebral function following cardiac and other major surgery. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1989;3:216-21.

Treasure T. Neuropsychological consequences of circulatory arrest with hypothermia perfusion. In: Treasure T (ed.). *Cerebral protection in cerebrovascular and aortic surgery.* Berlin, Heidelberg, New York:Springer-Verlag; 1997.147-55.

Ündar A, Masai T, Yang SQ, Goddard-Finegold J, Frazier OH, Fraser CD. Effects of perfusion mode on regional and global organ blood flow in a neonatal piglet model. *Ann Thorac Surg.* 1999;68:1336-43.

Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*. 2003;189:41-54.

Usui A, Kato K, Murase M, Hotta T, Tanaka M, Takeuchi E, Abe K. Neural tissue-related proteins (NSE, G0 alpha, 28-kDa calbindin-D, S100b and CK-BB) in serum and cerebrospinal fluid after cardiac arrest. *J Neurol Sci*. 1994;123:134-9.

Utley JR. Renal function and fluid balance with cardiopulmonary bypass. In: Gravlee GP, Davis RF, Utley JR (ed.). *Cardiopulmonary bypass. Principles and practice*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1993.488-508.

Vaagenes P, Safar P, Diven W, Moossy J, Rao G, Cantadore R, Kelsey S. Brain enzyme levels in CSF after cardiac arrest and resuscitation in dogs: markers of damage and predictors of outcome. *J Cerebral Blood Flow Metabol*. 1988;8:262-75.

Van der Linden J, Astudillo R, Ekroth R, Scallan M, Lincoln C. Cerebral lactate release after circulatory arrest but not after low flow in pediatric heart operations. *Ann Thorac Surg*. 1993;56:1485-9.

Van der Zee P, Cope M, Arridge SR, Essenpreis M, Potter LA, Edwards AD, Wyatt JS, Mc Cormick DC, Roth SC, Reynolds EOR, Delpy DT. Experimentally measured optical pathlengths for the adult head, calf and forearm and the head of the newborn infant as a function of interoptode spacing. *Adv Exp Med Biol*. 1992;136:143-53.

Venn GE, Klinger L, Newman S, et al. The neuropsychological sequelae of bypass 12 months following coronary artery surgery. *Br Heart J*. 1987;57:565.

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

Vingerhoets G, Van Nooten G, Vermassen F, De Soete G, Jannes C. Short-term and long-term neuropsychological consequences of cardiac surgery with extracorporeal circulation. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1997;11:424-31.

Wagstaff MJ, Collaco-Moraes Y, Aspey BS, Coffin RS, Harrison MJ, Latchman DS, De Belleruche JS. Focal cerebral ischaemia increases the levels of several classes of heat

shock proteins and their corresponding mRNAs. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996;42:236-44.

Wass T, Lanier W. Glucose modulation of ischemic brain injury: review and clinical recommendations. *Mayo Clinic Proceedings*. 1996;71:801-12.

Weitkemper HH, Troitzsch D, Körfer R. Elemente und Funktionsprinzipien einer Herz-Lungen-Maschine (HLM). In: Tschaut RJ (Hrsg.). *Extrakorporale Zirkulation in Theorie und Praxis*. Berlin, Düsseldorf, Leipzig:Pabst Science Publishers; 1999.271-87.

Welch WJ. The mammalian heat shock (or stress) response: a cellular defense mechanism. *Adv Exp Med Biol*. 1987;225:287-304.

Welch WJ, Gambetti P. Chaperoning brain diseases. *Nature*. 1998;392:23-4.

Werner C. Mild and moderate hypothermia as a new therapy concept in treatment of cerebral ischemia and craniocerebral trauma. Pathophysiologic principles. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerztherapie*. 1997;32:210-8.

Westaby S, Saatvedt K, White S, Katsumata A T, Van Oevern W, Bhatnagar NK, Brown S, Halligan PW. Is there a relationship between serum S-100 β protein and neuropsychologic dysfunction after cardiopulmonary bypass? *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000;119:132-7.

White RN, Stepien RL, Hammond RA, Holden DJ, Torrington AM, Milner HR, Cobb MA, Hellens SH. Mitral valve replacement for the treatment of congenital mitral dysplasia in a bull terrier. *J Small Anim Pract*. 1995;36:407-10.

Willford DC, Moores WY, Ji SY, Chen ZT, Palencia A, Daily PO. Importance of acid-base strategy in reducing myocardial and whole body oxygen consumption during perfusion hypothermia. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1990;100:699-707.

Wong CH, Rooney SJ, Bonser RS. S-100beta release in hypothermic circulatory arrest and coronary artery surgery. *Ann Thorac Surg*. 1999;67:1911-4.

Wyatt JS, Cope M, Delpy DT, Van der Zee P, Arridge S, Edwards AD, Reynolds EOR. Measurement of optical path length for cerebral near-infrared spectroscopy in newborn infants. *Dev Neurosci*. 1990;12:140-4.

Yenari MA, Giffard RG, Sapolsky RM, Steinberg GK. The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70). *Mol Med Today*. 1999;5:525-31.

Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W. The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull*. 1995;4:417-29.

Zivin JA. Neue Ansätze zur Schlaganfall-Therapie. *Spektrum der Wissenschaft*. 1991;9:58-66.

Zuckermann SL, Mirro R, Armatead WM, Shibata M, Lefler CW. Indomethacin reduces ischemia-induced alteration of blood-brain barrier transport in piglets. *Am J Physiol*. 1994; 266:2198-203.

9 Anhang

Tab. 17: Q (ml/min) und MAP (mmHg) aller Versuchstiere (n=4) der anästhesierten Kontrollgruppe ohne EKZ zu den entsprechenden Zeitpunkten im Verlauf des Experiments

| Messzeitpunkt | Q |
|------------------------|--------|
| Ausgangsmessung | 78+/-2 |
| entspr. Ischämie 1h | 76+/-5 |
| entspr. Reperfusion 1h | 74+/-6 |
| entspr. Reperfusion 2h | 73+/-5 |
| entspr. Reperfusion 3h | 75+/-6 |
| entspr. Reperfusion 4h | 77+/-5 |

| Messzeitpunkt | MAP |
|------------------------|--------|
| Ausgangsmessung | 59+/-8 |
| entspr. Ischämie 1h | 59+/-7 |
| entspr. Reperfusion 1h | 60+/-8 |
| entspr. Reperfusion 2h | 58+/-8 |
| entspr. Reperfusion 3h | 58+/-7 |
| entspr. Reperfusion 4h | 57+/-6 |

Tab. 18: TOI (%) und THI (%) aller Versuchstiere (n=4) der anästhesierten Kontrollgruppe ohne EKZ zu den entsprechenden Zeitpunkten im Verlauf des Experiments

| Messzeitpunkt | TOI |
|------------------------|--------|
| Ausgangsmessung | 61+/-2 |
| entspr. Ischämie 1h | 62+/-3 |
| entspr. Reperfusion 1h | 62+/-2 |
| entspr. Reperfusion 2h | 63+/-2 |
| entspr. Reperfusion 3h | 63+/-3 |
| entspr. Reperfusion 4h | 63+/-2 |

| Messzeitpunkt | THI |
|------------------------|--------|
| Ausgangsmessung | 64+/-3 |
| entspr. Ischämie 1h | 63+/-6 |
| entspr. Reperfusion 1h | 61+/-9 |
| entspr. Reperfusion 2h | 59+/-8 |
| entspr. Reperfusion 3h | 62+/-7 |
| entspr. Reperfusion 4h | 62+/-6 |

Tab. 19: SvO₂ (%) und Laktat (mmol/l) aller Versuchstiere (n=4) der anästhesierten Kontrollgruppe ohne EKZ zu den entsprechenden Zeitpunkten im Verlauf des Experiments

| Messzeitpunkt | SvO ₂ |
|------------------------|------------------|
| Ausgangsmessung | 89+/-1,3 |
| entspr. Ischämie 1h | 88+/-3,3 |
| entspr. Reperfusion 1h | 88+/-1,8 |
| entspr. Reperfusion 2h | 90+/-0,5 |
| entspr. Reperfusion 3h | 89+/-0,5 |
| entspr. Reperfusion 4h | 89+/-1,8 |

| Messzeitpunkt | Laktat |
|------------------------|-----------|
| Ausgangsmessung | 2,4+/-0,4 |
| entspr. Ischämie 1h | 2,5+/-0,2 |
| entspr. Reperfusion 1h | 2,6+/-0,1 |
| entspr. Reperfusion 2h | 2,6+/-0,2 |
| entspr. Reperfusion 3h | 2,4+/-0,5 |
| entspr. Reperfusion 4h | 2,4+/-0,5 |

Tab. 20: paO₂ (mmHg), paCO₂ (mmHg) und pH aller Versuchstiere (n=4) der anästhesierten Kontrollgruppe ohne EKZ zu den entsprechenden Zeitpunkten im Verlauf des Experiments

| Messzeitpunkt | paO ₂ | paCO ₂ | pH |
|------------------------|------------------|-------------------|------------|
| Ausgangsmessung | 358+/-58 | 38+/-1,5 | 7,4+/-0,02 |
| entspr. Ischämie 1h | 381+/-83 | 37+/-0 | 7,4+/-0,02 |
| entspr. Reperfusion 1h | 389+/-52 | 37+/-1,5 | 7,4+/-0,03 |
| entspr. Reperfusion 2h | 402+/-75 | 37+/-0,6 | 7,4+/-0,02 |
| entspr. Reperfusion 3h | 401+/-54 | 38+/-0,6 | 7,4+/-0,03 |
| entspr. Reperfusion 4h | 381+/-44 | 37+/-1,2 | 7,4+/-0,02 |

Tab. 21: S100 β ($\mu\text{g/l}$) aller Versuchstiere (n=4) der anästhesierten Kontrollgruppe ohne EKZ zu den entsprechenden Zeitpunkten im Verlauf des Experiments

| Messzeitpunkt | S100 |
|------------------------|-------------|
| Ausgangsmessung | 0,29+/-0,01 |
| entspr. Ischämie 1h | 0,29+/-0,02 |
| entspr. Reperfusion 1h | 0,29+/-0,02 |
| entspr. Reperfusion 4h | 0,39+/-0,01 |

