

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

und

der Klinik für Kinderkardiologie  
im Herzzentrum Leipzig der Medizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

**Untersuchung der protektiven Wirkung von Minocyclin und einem pulsatilen Blutfluss  
auf die Lunge unter Einfluss einer Herz-Lungen-Maschine im Ferkelmodell**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Wiebke Sophie Greimann**

Tierärztin aus Bielefeld

Berlin 2017

Journal-Nr.: 3966

Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Mahtab Bahramsoltani  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. Aida Salameh  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Christa Thöne-Reineke

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

piglets, animal models, minocycline, lungs, lung function, respiration, immuno-  
histochemistry, histology, antibodies, ATP, pulmonary alveoli (MeSH), apoptosis inducing  
factor (MeSH), hypoxia-inducible factor 1 (MeSH), tumor necrosis factor

Tag der Promotion: 14.07.2017

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht.....	3
2.1	Herz-Lungen-Maschine .....	3
2.1.1	Technik, Funktionsprinzip und Aufgaben der Herz-Lungen-Maschine .....	3
2.1.2	Indikation und Einsatzbereich für die Herz-Lungen-Maschine .....	8
2.1.3	Komplikationen und Auswirkungen der Herz-Lungen-Maschine .....	9
2.2	Möglichkeiten zur Protektion der Lunge.....	11
2.2.1	Medikamentöse Protektion der Lunge .....	11
2.2.2	Technische und perioperative Maßnahmen zur Protektion der Lunge .....	14
2.3	Durch eine HLM beeinflussbare Faktoren .....	16
2.3.1	Apoptose-induzierender Faktor (AIF).....	16
2.3.2	Hypoxie-induzierter Faktor 1 (HIF-1).....	17
2.3.3	Poly (ADP) Ribose (PAR) .....	17
2.3.4	Cleaved Caspase 3.....	18
2.3.5	Nitrotyrosin .....	19
2.3.6	Tumornekrosefaktor $\alpha$ (TNF $\alpha$ ).....	19
2.4	Das Schwein als Versuchsmodell für den Menschen.....	20
2.5	Das Ferkelmodell.....	22
2.5.1	Versuchsaufbau .....	22
3	Material und Methoden.....	30
3.1	Proben und Datenmaterial .....	30

3.2	Materialien.....	30
3.2.1	Geräte für die Probenbearbeitung.....	30
3.2.2	Primärantikörper für die Immunhistochemie .....	31
3.2.3	Sekundärantikörper für die Immunhistochemie .....	32
3.2.4	Gebrauchslösungen für die Immunhistochemie .....	33
3.2.5	Gebrauchslösungen für die Histologie .....	34
3.2.6	Chemikalien für die Histologie .....	34
3.2.7	Geräte für die Histologie .....	36
3.2.8	Materialien für die Histologie .....	37
3.2.9	Geräte zur Erstellung histologischer Aufnahmen .....	38
3.2.10	Programme zur Auswertung der histologischen Aufnahmen und zur Anfertigung der Statistik .....	38
3.3	Methoden.....	39
3.3.1	Berechnung des Quotienten: $p_{aO_2}/F_{iO_2}$ .....	39
3.3.2	Berechnung des Quotienten: $ATP/ADP + AMP$ .....	39
3.3.3	Histologie .....	40
3.3.4	Statistik.....	45
4	Ergebnisse .....	46
4.1	Sauerstoffparameter.....	46
4.2	Adenosintriphosphat/(Adenosindiphosphat+Adenosinmonophosphat) $ATP/(ADP+AMP)$ .....	48
4.3	Histologie.....	49
4.3.1	Durchmesser der Alveolarsepten .....	49

4.3.2	Apoptose-induzierender Faktor (AIF).....	53
4.3.3	Hypoxie-induzierter Faktor 1 (HIF-1).....	59
4.3.4	Poly (ADP) Ribose (PAR) .....	65
4.3.5	Cleaved Caspase 3.....	71
4.3.6	Nitrotyrosin .....	76
4.3.7	Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ ) .....	81
5	Diskussion.....	86
5.1	Einfluss der HLM auf die Lunge .....	87
5.2	Einfluss des pulsatilen Blutflusses während einer HLM auf die Lunge.....	92
5.3	Einfluss des Minocyclins während einer HLM auf die Lunge .....	98
6	Zusammenfassung.....	102
7	Summary .....	104
8	Literaturverzeichnis .....	106
9	Anhang.....	120
9.1	Färbeprotokoll Hämatoxylin Eosin Färbung .....	120
9.2	Färbeprotokoll HIF-1 $\alpha$ .....	121
9.3	Färbeprotokoll AIF .....	122
9.4	Färbeprotokoll PAR.....	123
9.5	Färbeprotokoll Cleaved Caspase 3 .....	124
9.6	Färbeprotokoll Nitrotyrosin .....	125
9.7	Färbeprotokoll TNF $\alpha$ .....	126

9.8	Ergebnisse der HPLC-Messung für ATP, ADP und AMP Noch nicht veröffentlichte Daten (DHEIN et al. (2015), SALAMEH et al. (2015 <sup>a,b</sup> )).....	127
10	Publikationsverzeichnis .....	128
11	Danksagung.....	129
12	Selbständigkeitserklärung .....	130

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
ADP	Adenosindiphosphat
AEC	3 Amino-9-Ethylcarbazol
AF	Atemfrequenz
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
AMP	Adenosinmonophosphat
APAD-1	Apoptose aktivierenden Faktor-1
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
CPPV	continual positive pressure ventilation
D	Deutschland
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
FiO <sub>2</sub>	inspiratorische Sauerstoffkonzentration
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCL	Salzsäure
HE	Hämatoxylin- Eosin
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor 1

HLM	Herz-Lungen-Maschine
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IL	Interleukin
iNOS	Stickstoffmonoxidsynthase
kg	Kilogramm
KM	Körpermasse
L	Liter
M	Molare Masse
MAP-Kinase	Mitogen aktivierte Protein Kinase
MAP	mittlerer arterieller Druck
Mbar	Millibar
mg	Milligramm
Mino	Minocyclin
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MW	Mittelwerte
NaCl	Natriumchlorid
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
NO	Stickstoffmonoxid
paO <sub>2</sub>	arteriellen Sauerstoffpartialdruck
PAR	Poly (ADP) Ribose

PARP	Poly (ADP) Ribose Polymerase
PEEP	positiver endexpiratorischer Druck
PIP	Inspirations-Spitzenndruck
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
ROIs	Region of Interest
ROS	freie Sauerstoffradikale
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SO <sub>2</sub>	Sauerstoffsättigung
TBS	TRIS gepufferte Kochsalzlösung
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TRIS	Trometamol

# 1 Einleitung

Operationen am Herzen mit Indikationen wie angeborenen Herzfehler, Herzklappendefekte, Transplantationen oder Bypass-Operationen benötigen den Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine (HLM) (HESSEL 2014). Der Einsatz einer HLM kann mit gewissen Komplikationen einhergehen (CARVALHO et al. 2008, BAEHNER et al. 2012). Es kann zu Entzündungen, Veränderung der Mikrozirkulation sowie zu Ischämie- und Reperfusionsschäden kommen (LIGUORI et al. 2014, FERRARI et al. 2015). Dies kann einen negativen Einfluss auf die Organe und deren Funktionen haben. In der Literatur wurden unter anderem HLM bedingte Lungenschäden beschrieben (FERRARI et al. 2015). Klinische Studien zeigen, dass zwischen 6,96% und 9,1% der Patienten nach einer HLM-Operation Funktionsstörungen der Lunge entwickelten (FILSOUFI et al. 2008, JI et al. 2013).

Zur Verhinderung dieser Schäden wurden verschiedene protektiv wirkende Maßnahmen entwickelt. Dabei wurde gezeigt, dass diverse technische und perioperative Maßnahmen sowie pharmakologische Präparate, die antiinflammatorisch oder vasodilatativ wirken, in der Lage sind, die Lungenfunktion am Menschen positiv zu beeinflussen (DAVOUDI et al. 2010, MACEDO et al. 2013, HUANG et al. 2003). Auch zahlreiche in Tiermodellen untersuchte Maßnahmen konnten positiven Einfluss auf das Lungengewebe nehmen (LIGUORI et al. 2014). Verschiedene humanmedizinische Studien untersuchten auf klinischer Ebene den möglichen organprotektiven Effekt eines pulsatilen Blutflusses auf die Lunge (BAYRAM et al. 2012, ENGELS et al. 2014, LIM et al. 2015). BAYRAM et al. (2012) und ENGELS et al. (2014) kamen zu dem Ergebnis, dass die Pulsation keinen Einfluss auf die Lungenfunktion hatte, wohingegen Lim et al. (2015) durch die Pulsation eine verbesserte postoperative Lungenfunktion erzielten. Der Einfluss der Pulsation auf die Morphologie des Lungengewebes wurde nur in wenigen tierexperimentellen Studien am Schwein untersucht (HERREROS et al. 2004, BRANDES et al. 2002, SCHLENSAK et al. 2002). Auf pharmakologischer Ebene wurde mit Minocyclin in einem Tiermodell am Schwein im Zusammenhang mit HLM bedingten Organschäden an Leber, Niere und Hippocampus eine protektive Wirkung erzielt (GERDOM 2014, DHEIN et al. 2015, SALAMEH et al. 2015<sup>a</sup>). Minocyclin ist ein Tetracyclin und entfaltet neben seiner bakteriostatischen Wirkung auch zellprotektive Effekte (JORDAN et al. 2007). Dabei wirkt Minocyclin zum einen durch die Hemmung der Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) antiinflammatorisch und antiapoptotisch und zum anderen durch die Bindung freier Sauerstoffradikale (ROS)

antioxidativ (ALANO et al. 2006, KRAUS et al. 2005). An der Lunge selbst zeigte bereits ein anderer PARP-Hemmer (INO 1001) eine organschonende Wirkung (DHEIN et al. 2008). Auch Doxycyclin, welches ebenso zur Gruppe der Tetracycline gehört, führte zu einer Verminderung von HLM-induzierten Schäden an der Lunge (ZHANG et al. 2014).

Das Ziel dieser Arbeit war es, die durch eine HLM beschriebenen Organschäden an der Lunge sowie einen möglichen protektiven Effekt eines pulsatilen Blutflusses und einer Minocyclingabe histologisch und immunhistochemisch zu untersuchen.

Hierfür wurden Proben aus einem Tierversuch verwendet, in welchem Ferkel an eine HLM-Maschine angeschlossen waren. Dabei wurde die HLM entweder mit laminarem oder pulsatilen Blutfluss gefahren. In diesem Versuch wurden zudem zur Prüfung der protektiven Wirkung von Minocyclin die Tiere in einer Versuchsgruppe an eine laminare HLM angeschlossen und erhielten zusätzlich das Antibiotikum Minocyclin (GERDOM 2014, DHEIN et al. 2015, SALAMEH et al. 2015<sup>a</sup>, SALAMEH et al. 2015<sup>b</sup>). Die nach Ablauf des Versuchs entnommenen Lungenbiopsien wurden in der hier vorliegenden Arbeit auf histologischer und immunhistochemischer Ebene untersucht.

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Herz-Lungen-Maschine**

In diesem Kapitel wird auf den Aufbau und die Funktionen sowie auf Einsatzbereiche der Herz-Lungen-Maschine (HLM) eingegangen. Des Weiteren werden Komplikationen, die beim Einsatz einer HLM auftreten können, beschrieben.

#### **2.1.1 Technik, Funktionsprinzip und Aufgaben der Herz-Lungen-Maschine**

Die Herz-Lungen-Maschine (Abbildung 2, Abbildung 3) spielt bei Herzoperationen eine wichtige Rolle. Sie ermöglicht es dem Chirurgen an einem bewegungslosen und blutleeren Herzen zu operieren. Dabei übernimmt die HLM die Pumpfunktion des Herzens sowie die Lungenfunktion, indem sie das Blut mit Sauerstoff anreichert und Kohlenstoffdioxid entfernt. Hinzukommend übernimmt sie die Aufgabe der Thermoregulation. Um diese Arbeiten erfüllen zu können, besteht die HLM aus verschiedenen Teilen.

Das Grundprinzip besteht darin das Herz sowie die Lunge vom restlichen Körperkreislauf zu trennen. Man will bezwecken, dass kein Blut mehr durch das Herz und die Lunge fließt. Dies wird durch zwei wichtige Mechanismen erreicht. Zum einen wird die Aorta abgeklemmt und zum anderen wird das venöse Blut direkt aus den Hohlvenen in die HLM abgeleitet. Somit kann kein venöses Blut über den rechten Vorhof in das Herzen gelangen, aber es kann auch kein arterielles Blut mehr über die Aorta in den Körperkreislauf fließen. Dabei übernehmen verschiedene Roller- oder Zentrifugalpumpen die Pumpfunktion des Herzens, indem sie das Blut aus der Vena cava superior und inferior in die HLM und zurück in den Körper befördern. Um eine Gerinnung des Blutes zu vermeiden, wird den Patienten Heparin verabreicht.

Über den rechten Vorhof werden die untere Hohlvene (V.cava superior) und die obere Hohlvene (V.cava inferior) kanüliert (Abbildung 1). Das Blut aus dieser venösen Kanüle fließt über einen Schlauch in ein venöses Reservoir (Abbildung 2).

Die Aorta wird zu Beginn der HLM mit Hilfe einer Aortenklemme (Abbildung 1) verschlossen. Dies sorgt dafür, dass das durch die HLM oxygenierte Blut, welches hinter der Aortenklemme über eine Aortenkanüle (Abbildung 1) dem Körperkreislauf wieder zugefügt wird, nicht zurück in die linke Herzkammer läuft. Die Lunge wird von der Vasa privata auch während der HLM weiterhin mit Blut, welches dann über die Lungenvenen in das linke Herz

fließt, versorgt. Zeitgleich hat das Abklemmen der Aorta aber zur Folge, dass dieses Blut aus der linken Herzkammer nicht mehr abfließen kann, wodurch die Gefahr besteht, dass die linke Herzkammer sich überdehnen könnte. Um dieses zu vermeiden, wird in die linke Herzkammer ein weiterer Sauger, der sogenannte Linksvent, eingebracht (BAEHNER et al. 2012). Dieser Linksvent (Abbildung 1) wird über den linken Vorhof im linken Ventrikel platziert. Über eine Pumpe wird das Blut des Linksvents in das venöse Reservoir befördert.

Eine weitere Pumpe fördert eine Kardioplegielösung. Diese Kardioplegielösung kann auch über eine Infusion zugeführt werden. Anders als die oben genannte Pumpe, führt die Pumpe der Kardioplegielösung die Flüssigkeit dem Herzen zu. Unter einer Kardioplegielösung versteht man eine Lösung, die zu einem diastolischen Herzstillstand führt. Dies wird durch eine Hyponatriämie verursacht (BAEHNER et al. 2012). Über einen sogenannten Needle-Vent (Abbildung 1), welcher in der Aorta ascendens auf der herznahen Seite der Aortenklammer platziert wird, läuft die Kardioplegielösung in die Herzkranzarterien. Ein weiterer Needle-Vent saugt nach Passieren des Herzens die Kardioplegielösung wieder ab. Im zeitlichen Geschehen wird umgehend nach Abklemmen der Aorta die Kardioplegielösung verabreicht und somit der Herzstillstand induziert.

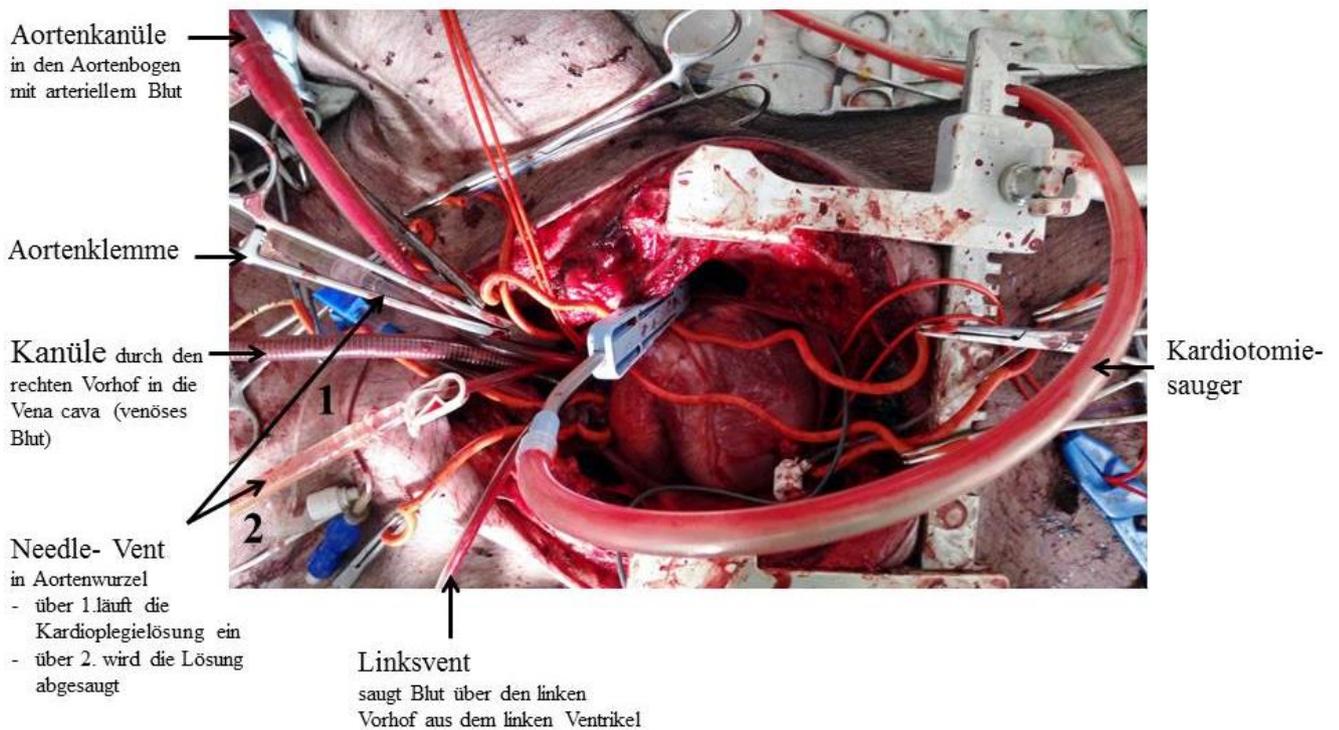
In das bereits beschriebene venöse Reservoir fließt ebenso über einen Schlauch das Blut eines Kardiotomiesaugers (Abbildung 1). Der Kardiotomiesauger saugt überflüssiges Blut aus dem Herzbeutel und dem Operationsfeld der Herzgegend.

Somit fließt zu Beginn der Herz-Lungen-Maschinennutzung das Blut aus den Hohlvenen, dem Sauger der linken Kammer und bei Bedarf aus dem Kardiotomiesauger über Schläuche in das venöse Blutreservoir. Aus dem venösen Reservoir wird das Blut dann über eine weitere Pumpe in einen Oxygenator weitergeleitet. Dieser eliminiert aus dem venösen Blut Kohlenstoffdioxid und reichert das Blut mit Sauerstoff an. Des Weiteren ist an dieser Stelle ein Wärmeaustauscher platziert, der die Thermoregulation des Blutes übernimmt. Es wird eine Hypothermie angestrebt, da dieser Zustand Stoffwechselfvorgänge und somit den Sauerstoffbedarf herunterreguliert. Dies soll das Auftreten von Ischämieschäden reduzieren (BAEHNER et al. 2012).

Nach Passieren dieses Wärmeaustauschers wird das nun gefilterte und oxygenierte Blut über Schläuche, durch arterielle Filter hindurch, zurück in die Aorta ascendens gepumpt. Das Blut

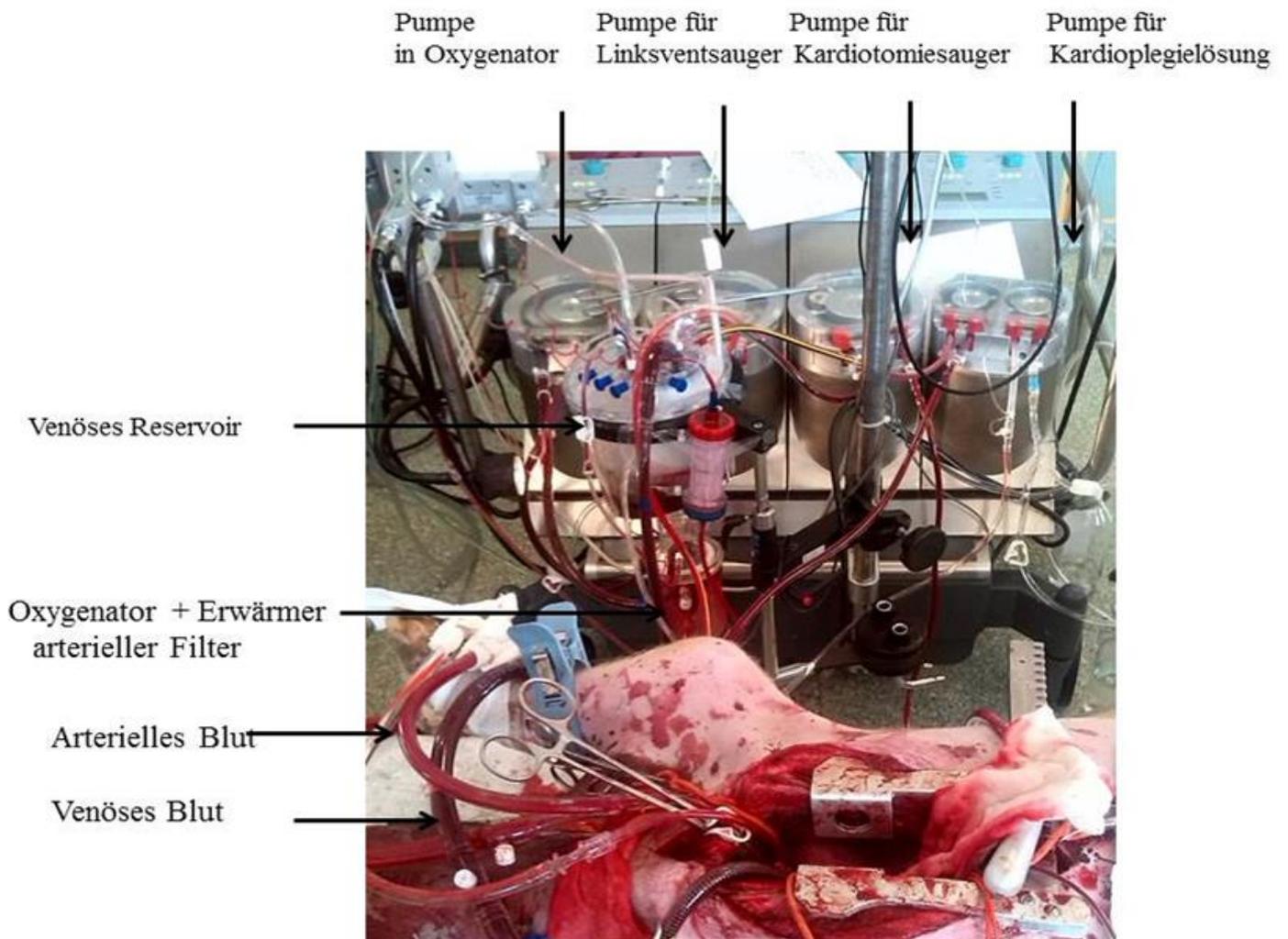
wird dem Körperkreislauf über die Aortenkanüle (Abbildung 1), welche auf der herzabgewandten Seite der Aortenklemme im Aortenbogen platziert wird, zugeführt.

Nach Beenden der Operation wird die Aortenklemme entfernt. Die extern übernommene Pumpleistung wird langsam heruntergefahren, bis das Herz von selbst spontan wieder die Arbeit aufnimmt. Die Wirkung des Heparins wird mit dem Antidot Protamin aufgehoben (BAEHNER et al. 2012).



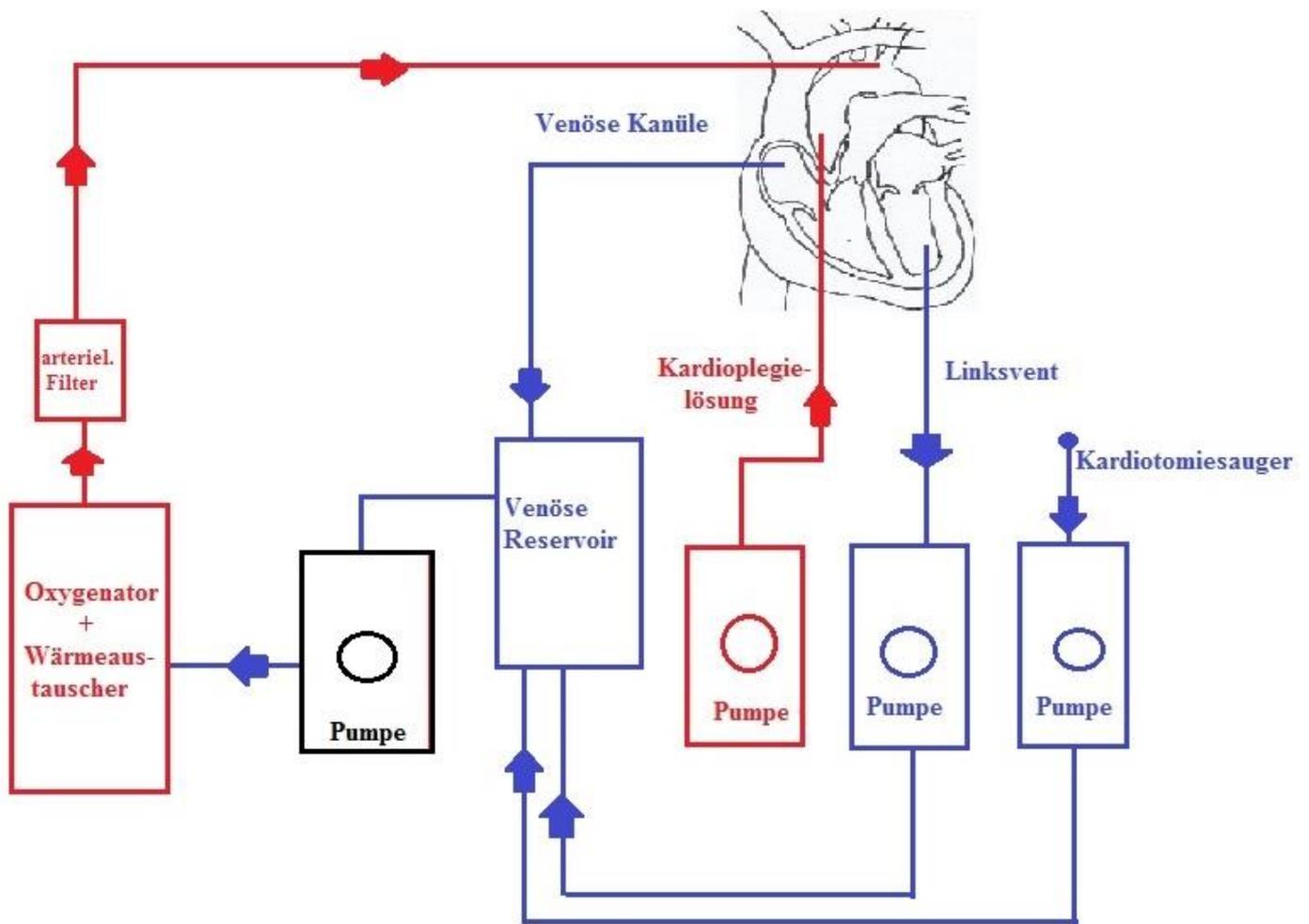
**Abbildung 1: Position der Zugänge für die Herz-Lungen-Maschine am Herzen eines Schweines.**

Diese Abbildung zeigt die chirurgischen Eingriffe am Herzen für den Anschluss einer Herz-Lungen-Maschine und die Position der dafür benötigten chirurgischen Instrumente. Nach Eröffnen des Brustkorbes wird dieser mit einem Rippenspreizer offen gehalten und das Herz kann wie unter 2.1.1 beschrieben mit der Herz-Lungen-Maschine verbunden werden.



**Abbildung 2: Aufbau der Herz-Lungen-Maschine und Anschluss an das Versuchstier.**

Diese Abbildung zeigt die einzelnen Bestandteile der Herz-Lungen-Maschine. Es sind die vier verschiedenen Pumpen, sowie das venöse Reservoir, der Oxygenator mit dem Wärmeaustauscher und dem arteriellen Filter zu erkennen. Des Weiteren sieht man die Schläuche für den Abtransport des venösen Blutes und den Schlauch für die Zufuhr von gefiltertem arteriellem Blut.



**Abbildung 3: Schematischer Aufbau der Herz-Lungen-Maschine.**

In dieser Abbildung wird schematisch der Aufbau einer Herz-Lungen-Maschine und die verschiedenen Flussrichtungen des Blutes veranschaulicht. Die Pfeile in roter Farbe stellen den Flussweg zum Herzen bzw. in den Körperkreislauf dar. Die blauen Pfeile zeigen den Blutfluss vom Herzen weg, in das Reservoir der Herz-Lungen-Maschine. Modifiziert nach BAEHNER et al. (2012).

## **2.1.2 Indikation und Einsatzbereich für die Herz-Lungen-Maschine**

### **2.1.2.1 Geschichte und Indikationen der HLM in der Humanmedizin**

HESSEL (2014) beschrieb die Geschichte der HLM von Beginn an, als Dr. Gibbon 1930 die Idee zur Entwicklung einer HLM hatte. Diese Idee kam ihm aufgrund einer misslungenen Behandlung einer zyanotischen Patientin. 9 Jahre später war die Entwicklung seiner HLM abgeschlossen und er konnte den ersten Test an einer Katze durchführen. Erst 22 Jahre später war die HLM soweit ausgereift, dass er sie an einem Menschen einsetzte und erfolgreich einen Atriumseptumdefekt operierte. Nach einer Weiterentwicklung von C. Walton Lillehei und der Universität Minnesota, wurde die HLM erst ab 1955 offiziell für die Korrektur angeborener Herzfehler, wie dem Ventrikelseptumdefekt, dem atrioventrikulären Septumdefekt und der Fallot'schen Tetralogien, verwendet. Ab den 60er Jahren war es dann aufgrund der Etablierung der Hypothermie auch möglich, Säuglinge und Kleinkinder zu operieren. Die HLM wurde ab da für Herztransplantationen und den Koronararterienbypass verwendet. Außerdem konnten auch erworbene Herzerkrankungen, beispielsweise durch die Erfindung und den Einsatz von synthetischen Herzklappen, behandelt werden. In den 70er Jahren ermöglichten neue Operationsmethoden noch bessere Voraussetzungen für die Operationen von Säuglingen mit einem persistierenden Ductus arteriosus oder mit einer Transposition der großen Gefäße. 1982 fand die erste Transplantation eines künstlichen Herzens statt. Der Patient überlebte den operativen Eingriff, verstarb jedoch später. In den darauf folgenden Jahren wurde die HLM auch für Eingriffe an der Aorta, für den Austausch von Aortenklappen und zur Behandlung von Mitralklappeninsuffizienzen bzw. deren Rekonstruktionen verwendet (HESSEL 2014). Ein weiterer Einsatzbereich der HLM ist die Transplantation von Lungen (MOHITE et al. 2016).

### **2.1.2.2 Indikation der HLM in der Tiermedizin**

In der Veterinärmedizin ist die Heilung von angeborenen Herzfehlern, besonders bei Haustieren wie Hund und Katze, von Interesse. PELOSI et al. (2013) hoben hervor, dass die Variabilität der Rassen und deren extreme Größenunterschiede den Gebrauch einer HLM erschweren. Die vielen anatomischen Unterschiede stellen eine Herausforderung dar. Die bei Hunden am häufigsten auftretenden operablen Herzerkrankungen sind Mitralklappenerkrankung und Ventrikelseptumdefekte (SHIMAMURA et al. 2006). Seltener hingegen sind ein zweikammeriger rechter Ventrikel (MARTIN et al. 2002) und die

Fallot'sche Tetralogie (ORTON et al. 2001). 80% der Hunde mit einer Mitralklappeninsuffizienz können medikamentös nicht ausreichend behandelt werden, sodass ein chirurgischer Eingriff zum Ersatz oder zur Rekonstruktion der Mitralklappen von Nöten ist (UECHI 2012). Bei Hunden, die an einer Mitralklappeninsuffizienz leiden, kann durch eine Operation mit einer HLM ein kongestives Herzversagen behoben und die Mitralklappeninsuffizienz erfolgreich therapiert werden (GRIFFITHS et al. 2004, UECHI et al. 2012). YAMANO et al. (2011) und SHIMAMURA et al. (2006) operierten mit Hilfe einer HLM erfolgreich Ventrikelseptumdefekte, Mitral- und Triskuspidalklappeninsuffizienzen. ORTON et al. (2001) hoben hervor, dass eine erfolgreiche Operation mit Einsatz einer HLM die Defekte der Fallot'schen Tetralogien therapieren und eine klinische Verbesserung erzielen kann. Ebenso kann eine Operation des rechten Doppelausstromventrikels bei Hunden zu einer klinischen Verbesserung führen (MARTIN et al. 2002). Auch bei einer Katze konnte gezeigt werden, dass eine Vorhofscheidewanddefekt-Operation unter Verwendung einer HLM postoperativ zu einer klinischen Verbesserung und zu einem Leben ohne Medikamente führen kann (UECHI et al. 2011).

### **2.1.3 Komplikationen und Auswirkungen der Herz-Lungen-Maschine**

Im Zusammenhang mit HLM-Operationen kann es zu systemischen Entzündungsreaktionen sowie zu Ischämie- und Reperfusionsschäden kommen. Diese haben häufig eine postoperative Fehlfunktion der Lunge oder gar ein Lungenversagen zur Folge. In einer retrospektiven Studie mit 5798 Patienten, die auf Komplikationen nach HLM-Einsatz untersucht wurden, erlitten 9,1% der Patienten ein respiratorisches Versagen mit einer sich daraus entwickelten Mortalität von 15,5 % (FILSOUFI et al. 2008). JI et al. (2013) postulierten hingegen, dass in einer Studie mit 2056 Patienten nur 6,96% postoperative Lungenkomplikationen entwickelten. Diese Komplikationen führten aber nicht zum Tod. ALWAQFI et al. (2012) zeigten in einer retrospektiven Studie mit 1046 Patienten, dass 3,6% der Patienten nach einer HLM an einer Pneumonie erkrankten. CARVALHO et al. (2008) unterteilten mögliche Ursachen für die Fehlfunktionen der Lunge in HLM-bedingte und HLM-unabhängige Faktoren. Zu den HLM-unabhängigen Ursachen gehören das Eröffnen des Brustkorbes und der Pleura. Zu den HLM-bedingten Ursachen werden der Kontakt des Blutes mit körperfremden Oberflächen, die Hypothermie, die Ischämie, die Gabe von Heparin und Protamin sowie die fehlende

Ventilation der Lunge gezählt. Die durch die HLM verursachte Ischämie der Lunge und des Herzens führt zu einem Energiemangel. Es kommt intrazellulär zu einem Mangel an ATP, dabei fallen Iontentransporter aus und Ödeme können entstehen. Dies kann zum Platzen von Zellen führen und den Zelltod einleiten. Durch den Ausfall der Iontentransporter steigt auch Kalzium intrazellulär an. Dies kann eine Umwandlung der Xanthindehydrogenase zu Xanthinoxidase zur Folge haben. Kommt es zu einer Reperfusion des Gewebes, metabolisiert die Xanthinoxidase unter Freigabe von Sauerstoff Hypoxanthin, dabei entstehen freie Sauerstoffradikale (ROS). Die ROS induzieren Zellschäden und machen die Gefäße permeabel. Es entstehen sogenannte Ischämie- und Reperfusionsschäden und folglich können Nekrosen und Apoptosen des Lungengewebes auftreten (FERRARI et al. 2015). Die Fehlfunktionen der Lunge spiegeln sich in einem verminderten Gasaustausch und einer verschlechterten Lungenmechanik wieder. Es kommt zu einer erhöhten Alveolo-arteriellen Sauerstoffdruckdifferenz und zu einer Zunahme an intrapulmonalen Shunts. Hierbei fließt das Blut durch die Alveolarwände, wird aber aufgrund fehlender Ventilation nicht oxygeniert. Alveolen kollabieren und Sekrete werden nicht mehr aus der Lunge abtransportiert. Auftretende Entzündungsgeschehen führen zu permeablen Gefäßen, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und entzündungsfördernde Zytokine werden frei. Histologisch kann man ein vermehrtes Auftreten von neutrophilen Granulozyten, Erythrozyten und ein generelles Entzündungsgeschehen verzeichnen. Dies begünstigt die Entstehung von Lungenödemen. Die Compliance der Lunge nimmt ab und der pulmonale Gefäßwiderstand steigt an. Bei Neugeborenen kann es zu einer Veränderung der Surfactantfunktion kommen. (NG et al. 2002, YOUNG 2014, CARVALHO et al. 2008, TAPURIA et al. 2008).

Zu Beginn einer HLM muss das Schlauchsystem mit einer Elektrolytlösung gefüllt werden. Kleine Mengen werden toleriert, zu große Mengen können zur Blutverdünnung und Anämie führen und damit Organschäden induzieren (ESPER et al. 2014). Auf der einen Seite können die Pumpen der HLM die Blutbestandteile schädigen und eine Hämolyse mit sich ziehen, auf der anderen Seite kann durch den Kontakt des Blutes mit künstlichen Oberflächen das Gerinnungssystem aktiviert werden, das Blut koaguliert und Thromben können entstehen (BAEHNER et al. 2012).

## **2.2 Möglichkeiten zur Protektion der Lunge**

Im Folgenden werden verschiedene auf das Lungengewebe protektiv wirkende Maßnahmen während einer HLM näher betrachtet. Diese lassen sich in pharmakologische, technische und perioperative Maßnahmen unterteilen.

### **2.2.1 Medikamentöse Protektion der Lunge**

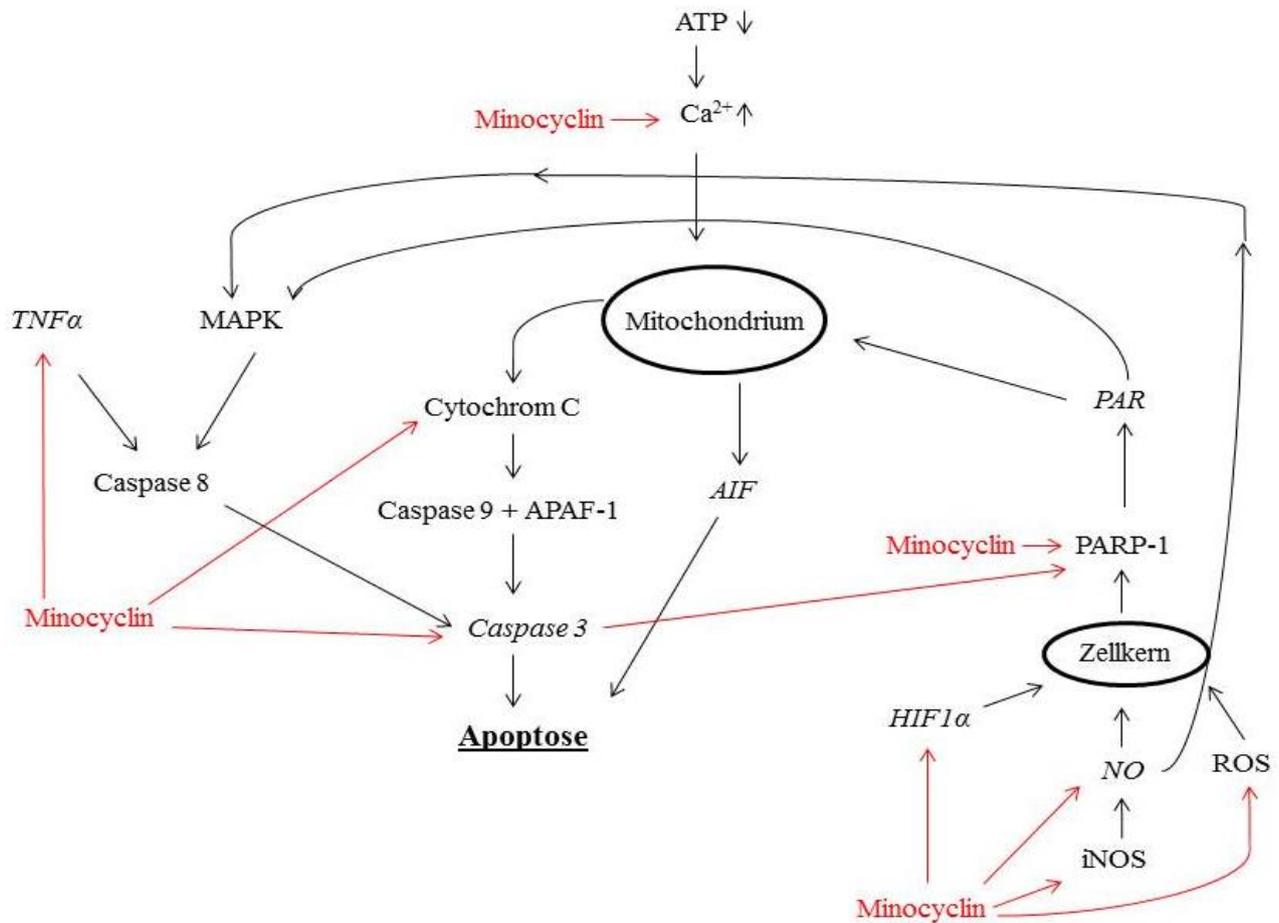
#### **2.2.1.1 Minocyclin**

Minocyclin ist ein bakteriostatisch wirkendes, halbsynthetisches Breitbandantibiotikum. Es handelt sich um ein Tetracyclin der 2. Generation (ULGEN et al. 2011, JORDAN et al. 2007). Es ist in der Lage eine intakte Blut-Hirnschranke zu passieren (COLOVIC et al. 2003). Seine bis zu 24-stündige Halbwertszeit ermöglicht ein langes Verweilen im Körper (FAGAN et al. 2010). Es wird als Antibiotikum für verschiedene Infektionskrankheiten, wie Akne, Harnröhrenentzündung und Geschlechtskrankheiten eingesetzt (JORDAN et al. 2007). Minocyclin kann nicht nur als Antibiotikum bakteriostatisch wirken, sondern durch verschiedene Mechanismen auch zellprotektive Wirkungen entfalten.

Minocyclin wirkt antiinflammatorisch, indem es die Produktion von entzündungsfördernden Mediatoren wie Prostaglandin E2 und Cyclooxygenase-2 verringert (KIM et al. 2004). Minocyclin hat antioxidative Wirkungen, indem es mit Hilfe seines Phenolringes freie Sauerstoffradikale bindet und somit Zellschäden verhindern kann (KRAUS et al. 2005). Minocyclin schützt die Zellmembranen, indem es den Abbau von extrazellulärer Matrix durch die Hemmung von Matrixmetalloproteinasen (MMP) verhindert. Die MMPs werden nicht aktiviert, weil Minocyclin in der Lage ist, das zur MMP-Aktivierung benötigte Zink zu binden (MACHADO et al. 2006).

Eine weitere wichtige Eigenschaft des Minocyclins ist seine antiapoptotische Wirkung. Diese ist in Abbildung 4 aufgeführt. Zytotoxisch wirkende Nitritoxide aktivieren die Phosphorylierung von MAP-Kinase (MAPK). Diese wiederum induzieren eine Apoptosekaskade. Minocyclin ist durch die Hemmung der Stickstoffmonoxide (NO) und durch die Hemmung der Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) zum einen in der Lage die Induktion der Apoptosekaskade zu verhindern, zum anderen kann es zu einer Abnahme der zytotoxisch wirkenden Stickstoffmonoxide führen (LIN et al. 2001, KIM et al. 2004; LEE et

al. 2004). Generell können Stickstoffmonoxide auch protektiv wirken, da sie bei Inhalation die GefäÙe der Lunge dilatieren und die Oxygenierung verbessern (COSA und COSTA 2016).



**Abbildung 4: Wirkungsmechanismen von Minocyclin.** Schwarze Pfeile demonstrieren eine Aktivierung, rote Pfeile zeigen eine Hemmung. Die Stellen, an denen die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wirken, sind in kursiv geschrieben.

DNA-Schäden, beispielsweise durch NO oder ROS verursacht, aktivieren die Zelltod- und Entzündung-induzierende Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP). Die PARP-Aktivität kann durch Minocyclin direkt blockiert werden. Auf diese Art und Weise wirkt Minocyclin sowohl antiinflammatorisch als auch antiapoptotisch (ALANO et al. 2006). Weiterhin hemmt Minocyclin die Apoptose-induzierende Cytochrom C-Freisetzung aus dem Mitochondrium ins Zytosol und die direkt apoptotisch wirkende Caspase 3-Aktivierung (ZHU et al. 2002). Apoptosen können auch aufgrund eines Energiemangels einer Zelle ausgelöst werden. Ein Mangel an ATP hat einen intrazellulären Calciumanstieg zur Folge. Dieser Calciumanstieg führt aufgrund einer Aktivierung von Proteasen zu Apoptose-induzierenden Zellschäden

(LIPTON 1999). Minocyclin blockiert im Gehirn diese Calciumionenkanäle und kann damit eine Calciumüberladung verhindern. Es entstehen keine Zellschäden und folglich wird keine Apoptoseeinleitung angeregt (GONZÁLEZ et al. 2007). Ein weiterer Mechanismus des Minocyclins um eine Apoptose zu verhindern, ist die Produktionshemmung von TNF $\alpha$  (HUANG et al. 2010, LEE et al.2004).

Neuste Forschungsergebnisse zeigten, dass Minocyclin Einfluss auf die HIF-1 $\alpha$ -Expression hat. Minocyclin kann die HIF-1 $\alpha$ -Expression und die damit einhergehende Angiogenese in Ovarialtumoren vermindern und ist somit in der Lage ein Tumorwachstum zu minimieren (ATAIE-KACHOIE et al. 2015).

### **2.2.1.2 Pharmakologische Alternativen zu Minocyclin**

LIGUORI et al. (2014) teilten protektiv wirkende Medikamente in Verbindung mit der HLM in 3 Gruppen auf. An der Lunge zeigten die gefäßaktiven und die antiinflammatorisch wirkenden Medikamente einen Einfluss. Die dritte Gruppe der Koagulation-beeinflussenden Medikamente, zeigten keinen direkten Einfluss auf die Lunge.

Zu den an vasodilatatorisch wirkenden Medikamenten zählte Sildenafil, Prostacyclin und Milrinon. Sildenafil war in der Lage eine Erhöhung des Druckes in der Pulmonalarterie und eine Fehlfunktion des Lungenendothels zu verhindern, den Blutfluss sowie die Sauerstoffanreicherung des Gewebes nach der HLM zu verbessern (AUBIN et al. 2008). Die prophylaktische Inhalation von Prostacyclin kann ebenfalls Fehlfunktionen des Lungenendothels reduzieren und damit eine HLM-induzierte pulmonale Hypertension verhindern (FORTIER et al. 2004). Auch Milrinone hat eine protektive Wirkung auf das pulmonale Endothel. Es relaxiert die Pulmonalarterien und führt zu einer verbesserten Sauerstoffanreicherung nach HLM (LAMARCHE et al. 2005).

Antiinflammatorische und antiapoptotische Wirkung zeigte die Inhalation von Kohlenmonoxid. TNF $\alpha$ , Interleukin 6 und die Caspase 3-Aktivitäten wurden gehemmt. Eine Kombination von einer Kohlenmonoxidinhalation mit einer Perfusion der Lunge kann ein Entzündungs- und Apoptosegeschehen vermeiden (GOEBEL et al. 2008). WAKAYAMA et al. (2007) und ANDO et al. (2008) zeigten, dass Sivelestat, ein neutrophiler Elastasehemmer, die Oxygenierung und den Blutstrom der Lunge sichert. Es reduziert histopathologisch sichtbare Lungenschäden und führt zu einer Abnahme von ödematösen Alveolarsepten und zu

einer geringeren neutrophilen Granulozyten Infiltration. RAHMAN et al. (2000) konnte zeigen, dass Aprotinin Reperfusionsschäden an der Lunge nach HLM-Einsatz reduzierte, indem es die Leukozytenaktivität herabsetzte und die durch Zytokin induzierte Entzündung verminderte.

### **2.2.2 Technische und perioperative Maßnahmen zur Protektion der Lunge**

Es gibt neben der medikamentösen Protektion verschiedene perioperative Mechanismen, die die Lunge während einer HLM-Operation schützen. Die Beatmung der Lunge während einer HLM kann Gewebeschäden minimieren. DAVOUDI et al. (2010) postulierten, dass eine Ventilation der Lunge mit einem geringen Atemzugvolumen die Sauerstoffversorgung und die Lungenmechanik verbesserte. REIS MIRANDA et al. (2005) konnten zeigen, dass eine druckkontrollierte Ventilation direkt nach Intubation zu einer Abnahme von IL-8 und IL-10 und damit zu einer Abnahme der Entzündungsreaktion führte. Ein Beatmungsmanagement der Lunge während einer HLM mit einem PEEP von 10 cmH<sub>2</sub>O, einem geringem Atemzugvolumen, hohen FiO<sub>2</sub>-Leveln und Recruitmentmanövern verbessert die Oxygenierung und reduziert Atelektasen (FERRANDO et al. 2015). Ein weiterer protektiver Mechanismus ist eine kontinuierliche Perfusion der Lunge mit oxygeniertem Blut oder antiinflammatorisch wirkenden Lösungen, wie Aprotinin oder Phosphatpuffern. Dabei fließen die Flüssigkeiten über eine Kanüle in die Pulmonalarterie (MACEDO et al. 2013, LIU et al. 2000). Dies kann Lungen- sowie Ischämie- und Reperfusionsschäden vorbeugen (CARVALHO et al. 2008). Eine Kombination von Ventilation und Perfusion der Lunge vermindert den pulmonalen Gefäßwiderstand, führt zu einer geringeren Mangel durchblutung und den damit einhergehenden Ischämie- und Reperfusionsschäden. Außerdem nehmen Lungenödeme und Atelektasen ab, es kommt zu einem verbesserten Gasaustausch und die Dehnbarkeit der Lunge bleibt erhalten (MACEDO et al. 2013).

APOSTOLAKIS et al. (2010) fassten verschiedene perioperative Schutzmaßnahmen der Lunge zusammen. Durch den Kontakt des Blutes mit künstlichen, nicht gefäßähnlichen Oberflächen kommt es zu einer Aktivierung von Entzündungsmediatoren und -kaskaden. Dies kann durch heparinbeschichtete Oberflächen vermieden werden. Es kommt zur Abnahme des pulmonalen Gefäßwiderstandes und zu einer verbesserten Lungenfunktion (VROEGE et al. 2004). Eine Ultrafiltration des Blutes führt zu einer Stabilisierung des Hämatokrits. Das sichert die Sauerstoffversorgung und verhindert Lungenödeme. Es eliminiert

Entzündungszellen, die Gefäße werden weniger permeabel und die Lungenfunktion bleibt erhalten (HUANG et al. 2003). SHEPPARD et al. (2004) zeigten, dass eine Leukozytendepletion den Erhalt der Lungenfunktion unterstützen konnte. Patienten, deren Blut einer Leukozytendepletion unterzogen wurde, hatten weniger Lungenwasser, zeigten eine bessere Oxygenierung und mussten nach der Operation kürzer beatmet werden. DE AMORIM et al. (2014) hingegen beschrieben, dass eine Leukozytendepletion zwar zu einer Abnahme des entzündungsvermittelnden Interleukins 10 (IL-10) führte, aber vor Lungenschäden nur kurzzeitig schützte.

Eine weitere protektiv wirkende Maßnahme ist, die HLM möglichst physiologischen Gegebenheiten anzupassen. Dafür wurde ein pulsatile Blutfluss, der dem Puls ähnlich sein soll, etabliert. O'NEIL et al. (2012) verglichen einen pulsatile Blutfluss mit einem nicht pulsatile Blutfluss während einer HLM. Die Ergebnisse zeigten, dass unter pulsatile Fluss die Mikrogefäße besser durchblutet wurden und die Leukozytenadhäsion sowie die Laktatwerte im Vergleich zur nicht pulsatile Gruppe geringer waren. Der pulsatile Blutfluss schonte die Mikrozirkulation und schwächte damit die systemische Entzündungsreaktion ab. VOSS et al. (2010) hingegen postulierten in ihrer Studie, dass es keine Vorteile durch einen pulsatile Blutfluss gab. Es konnten keine Verbesserungen in dem Entzündungsgeschehen festgestellt werden, sodass geschlussfolgert wurde, dass ein pulsatile Blutfluss bei kurzen HLM-Operationen unnötig sei. SIEPE et al. (2008) verglichen die Auswirkungen einer pulsatile und einer nicht pulsatile Perfusion an der Lunge. Die Perfusion wurde mit Hilfe einer Rollerpumpe, welche 20% des systemischen Blutflusses über eine Aortenkanüle in die Pulmonalarterie pumpte, durchgeführt. Dies führte zum Ergebnis, dass die pulsatile Perfusion der Lunge die Caspase 3-Aktivität, die Expression von IL-6 und die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren reduzierte. Generell kam es durch die Perfusion der Lunge während einer HLM zur Abnahme des Entzündungsgeschehens und zur Reduktion der Apoptose, bei pulsatile Blutfluss war dies jedoch besonders deutlich. Auch andere Organe, wie Niere und Gehirn, profitierten von einem pulsatile Blutfluss, da die Pulsation eine verbesserte Organdurchblutung erzielte und damit den Erhalt der Organfunktionen bewirkte (PRESTA et al. 2009, WANG et al. 2010, SALAMEH et al. 2015<sup>b</sup>). Generell konnte die Pulsation postoperativ verbesserte Operationsergebnisse erzielen (TEMAN et al. 2014).

## **2.3 Durch eine HLM beeinflussbare Faktoren**

Durch den Einsatz einer HLM kann es zu Ischämien und Apoptosen kommen. Diese können durch Hypoxie oder oxidativen Stress bedingt sein. AIF, PARP und die Caspase 3 können eine Apoptose induzieren (RAMLAWI et al. 2006). In dieser Arbeit war der apoptotische Einfluss der HLM auf das Lungengewebe von Interesse, sodass AIF, PAR und die Cleaved Caspase 3 als Indikatoren für ein apoptotisches Geschehen untersucht wurden. Weiter sollte untersucht werden, ob die HLM ein entzündliches Geschehen am Lungengewebe bedingt. GAO et al. (2015) beschrieben, dass TNF $\alpha$  nach HLM-Einsatz erhöht und bei HLM-induzierten Lungenentzündungen vermehrt präsent ist. Ein weiterer Fokus lag auf dem Einfluss der HLM auf die Sauerstoffversorgung des Lungengewebes. MEHLHORN et al. (2003) zeigten, dass Nitrotyrosin als ein Marker für oxidativen Stress verwendet werden kann. FANDREY (2007) hoben hervor, dass HIF-1 nur unter hypoxischen Bedingungen im Zellkern präsent ist. Aus diesen Gründen wurden auch TNF $\alpha$ , Nitrotyrosin und HIF-1 zur immunhistochemischen Untersuchung der Proben gewählt.

### **2.3.1 Apoptose-induzierender Faktor (AIF)**

Der Apoptose-induzierende Faktor (AIF) ist eine NADH-abhängige Oxidoreduktase, die in dem Intermembranraum des Mitochondriums lokalisiert ist. Unter physiologischen Bedingungen fungiert er als NADH-Oxidase im Mitochondrium und ist an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt (VIRAG et al. 2013, SEVRIOUKOVA 2011). Verschiedene apoptotische Stimuli lösen eine Reaktion des AIFs aus. Eine Theorie ist, dass DNA-Schäden PARP aktivieren PAR zu synthetisieren. PAR wird ins Zytoplasma entlassen und stimuliert die Freisetzung von AIF aus dem Mitochondrium (VIRAG et al. 2013). AIF wandert aus dem Intermembranraum des Mitochondriums aus und es folgt eine Akkumulation des AIFs im Zellkern. AIF leitet eine Caspase-unabhängige Apoptose ein, indem er im Zellkern eine Chromatinkondensation und einen DNA-Abbau auslöst (SEVRIOUKOVA 2011). RAMLAWI et al. (2006) zeigten, dass AIF nach Gebrauch der HLM aufgrund von Ischämie und Reperfusion ansteigt. In diesem Experiment dient AIF als Marker für den programmierten Zelltod auf Caspase-unabhängigem Weg.

### **2.3.2 Hypoxie-induzierter Faktor 1 (HIF-1)**

Der Hypoxie-induzierte Faktor-1 (HIF-1) ist ein Transkriptionsfaktor, welcher aus einer HIF-1  $\alpha$  und einer HIF-1  $\beta$  Einheit besteht und bei Hypoxie aktiv wird (HEINICKE 2002). HIF-1  $\alpha$  wird kontinuierlich produziert. Die Untereinheit HIF-1  $\alpha$  ist vom Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) abhängig, die  $\beta$ -Untereinheit hingegen nicht. Ist das Sauerstoffangebot hoch, so wird HIF-1  $\alpha$  durch Hydroxylierung von Prolinen abgebaut. Liegt eine Hypoxie und somit ein Sauerstoffmangel vor ist die Enzymaktivität der Hydroxylasen (3- Prolylhydroxylase und 1-Aspargininhydroxylase) gesenkt, sodass HIF-1  $\alpha$  nicht abgebaut wird. HIF-1  $\alpha$  ist nun in der Lage sich anzuhäufen und in den Zellkern einzuwandern (FANDREY 2007). Im Zellkern bildet sich ein Komplex aus der  $\alpha$  und  $\beta$ -Einheit und aktiviert zur Verbesserung der Sauerstoffversorgung den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor. Damit kommt es zur Angiogenese und Vaskularisierung. Außerdem wird die Erythropoese durch Aktivierung des Erythropoetins angeregt. Des Weiteren wird der Gefäßtonus verändert und die anaerobe Glykolyse angeregt (HEINICKE 2002). SHIMODA und SEMENZA (2011) fassten die Wirkung von HIF-1 an der Lunge zusammen. Sie führten auf, dass HIF-1 einen wichtigen Teil zur embryonalen Lungenentwicklung beiträgt. Es verbessert die Angiogenese in der Lunge sowie die Lungenverzweigung. Zusammenfassend kann man sagen, dass HIF-1 bei hypoxischen Zuständen als Startinitiator zu einer verbesserten Sauerstoffversorgung des Organismus führt. Da HIF-1 nur unter hypoxischen Zuständen im Zellkern nachweisbar ist, diente HIF-1 als Hypoxieindikator.

### **2.3.3 Poly (ADP) Ribose (PAR)**

Die Poly (ADP) Ribose (PAR) ist ein Endprodukt der Poly (ADP Ribose) Polymerase (PARP). PARP kann durch Sauerstoffradikale oder DNA-Schäden aktiviert werden. Bei leichten DNA-Schäden dient PARP als Reparaturprotein und beseitigt die DNA-Schäden (GARCIA und CONDE 2015, LOVE et al. 1999). VIRAG et al. (2013) beschreiben drei verschiedene Wege von PARP Apoptose und Nekroptose zu induzieren. Liegen starker oxidativer oder nitrosativer Stress sowie DNA-Strangbrüche vor, so synthetisiert PARP unter  $NAD^+$ -Verbrauch PAR. Bei zu hohem Stimulus von PARP durch massive DNA-Schäden kann es zur Überreaktion kommen. Dabei wird zu viel  $NAD^+$  bei der PAR-Synthese und zeitgleich zu viel ATP aufgrund der Neusynthese von  $NAD^+$  verbraucht. Dies führt aufgrund

eines Energiemangels zum Zelltod bzw. Nekrose der betroffenen Zelle. Als weiterer Weg wird das sogenannte „Parthanatos“ beschrieben. Hierbei verlässt das synthetisierte PAR den Zellkern, geht in das Cytoplasma und stimuliert am Mitochondrium die AIF Freisetzungen. AIF wandert in den Zellkern ein und leitet dort die Apoptose ein. Der dritte Weg geht über die Stimulation des programmierten Zelltods durch MAP-Kinasen und die Inhibierung von Überlebenskinasen. Somit spielt PARP und sein Syntheseprodukt PAR eine wichtige Rolle im programmierten Zelltod. PAR wird im Rahmen dieser Dissertation als Marker für den Zelltod, aber auch als Zeichen für DNA-Schäden sowie die eventuelle Präsenz von oxidativen bzw. nitrosativen Stress genutzt.

### **2.3.4 Cleaved Caspase 3**

Cleaved Caspase 3 ist eine Cystein-Protease, die den programmierten Zelltod initiiert (CAKIR et al. 2011). Die Caspase 3 kann auf verschiedenen Wegen aktiviert werden. Zum einen kann es durch die Abgabe von Cytochrom C aus dem Mitochondrium aktiviert werden. Cytochrom C wird beispielsweise bei Schäden am Mitochondrium in Form von Defekten an der Permeabilitäts-Transitions-Pore oder bei Verlust des Membranpotenzials frei (PORTER und JÄNICKE 1999). KURIBAYASHI et al. (2014) beschreiben diesen Weg als eine intrinsische Aktivierung. Cytochrom C aktiviert einen Komplex aus Caspase 9 und dem Apoptose-aktivierenden Faktor-1 (APAF-1), welcher wiederum die Caspase 3 aktiviert (PORTER und JÄNICKE 1999.) Zum anderen beschreiben KURIBAYASHI et al. (2014) und DEMEDTS et al. (2006) einen extrinsischen Weg, der Cytochrom C unabhängig ist. Hierbei aktiviert TNF $\alpha$  einen todinduzierenden Komplex, welcher zur Umwandlung der Pro-Caspase 8 zu Caspase 8 führt. Die Caspase 8 wiederum aktiviert dann die Caspase 3. DEMEDTS et al. (2006) schildern eine dritte Möglichkeit der Caspase 3-Aktivierung. Hierbei wird Caspase 3 direkt über Granzyme B und Perforine, welche von zytotoxischen T-Zellen freigegeben werden, aktiviert. Caspase 3 induziert direkt die Apoptose durch Chromatinkondensation und DNA-Fragmentation sowie durch Bläschenbildung in Zellen (PORTER und JÄNICKE 1999). Darüber hinaus spaltet es das DNA-Reparatur-Gen PARP (KURIBAYASHI et al. 2014). Die Caspase 3 dient in dieser Dissertation als Marker für den programmierten Zelltod.

### **2.3.5 Nitrotyrosin**

Nitrotyrosin ist ein Marker für nitrosativen Stress. Kommt es zur vermehrten Produktion von Stickstoffmonoxid (NO), reagiert dieses mit einem Superoxidanion zu Peroxinitrit. Das Nitrogendioxidradikal des Peroxinitrits wiederum reagiert mit dem Tyrosinrest der Aminosäure Tyrosin. Dabei entsteht Nitrotyrosin (SUGIURA und ICHINOSE 2011). Die Produktion von Nitrotyrosinrückständen dient als Marker für oxidativen Stress (GOW et al. 2004) und als Zeichen für die Produktion von Peryoxynitrit und anderen nitrosativen Stressoren (FRANCO und ESTÉVEZ 2014). Oxidative Schäden reichen um einen Zelltod bzw. Apoptose und Autophagie auszulösen. Nitrotyrosin kommt bei Entzündungen, aber auch bei Ischämie- und Reperfusionsschäden vor (FRANCO und ESTÉVEZ 2014). SUGIURA und ICHINOSE (2011) beschrieben, dass nitrosativer Stress zu Entzündungen und Veränderungen des Lungengewebes führen kann. Des Weiteren legten sie dar, dass Peryoxinitrit ein oxidierender Agens ist und zu Gewebsschäden und Apoptoseinduktion führt.

### **2.3.6 Tumornekrosefaktor $\alpha$ (TNF $\alpha$ )**

Bei dem Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) handelt es sich um ein Zytokin. Es ist beteiligt bei Entzündungen, bei der humoralen Immunantwort sowie bei der Organentwicklung von lymphoidem Gewebe. TNF $\alpha$  führt zur Differenzierung von T-Zellen und erhöht die Phagozytosefähigkeit von Makrophagen. Des Weiteren stimuliert es Chemokine und fungiert als Entzündungsmediator, indem es die Zytokinproduktion und die Expression von Adhäsionsmolekülen aktiviert (HEHLGANS et al. 2005). Eine weitere wichtige und für diese Studie bedeutende Eigenschaft von TNF $\alpha$  ist die Apoptoseinduktion. TNF $\alpha$  bindet an den Tumornekrosefaktorrezeptor 1. Dies setzt eine Spaltung von Caspase 8 in Gang, welche wiederum die Caspase 3 aktiviert. Die Caspase 3 induziert dann die Apoptose (DEMEDTS et al. 2006). TNF $\alpha$  dient als Marker für die Apoptose und die Entzündung.

## 2.4 Das Schwein als Versuchsmodell für den Menschen

Schweine werden immer häufiger als Versuchstiere eingesetzt. In der Nicht-Nager-Spezies ist das Schwein eine gute Alternative zu Hund und Affe. Dabei kann man zwischen konventionell gehaltenen Schweinen und apathogen gezüchteten Schweinen wählen. Minischweine werden aufgrund ihrer geringen Körpergröße und ihrem leichtem Handling häufig als Versuchstiere verwendet (SWINDLE et al. 2012). Schweine sind intelligente Tiere mit gutem Erinnerungsvermögen (SMITH et al. 2006). LIND et al. (2007) beschrieben, dass Schweine sich gut trainieren lassen und folglich leicht im Umgang sind. Daher werden sie gerne für neurowissenschaftliche Tests eingesetzt. Schweine werden auch in anderen Studien verwendet, da sie standardisiert gezüchtet werden können und ihr Gesundheitsstatus gut kontrollierbar ist (HEINING et al. 2016). Ein weiterer Vorteil der Spezies Schwein ist ihr Reproduktionszyklus. Sie werden früh geschlechtsreif, der Trächtigkeitszeitraum beträgt 116 Tage und sie können das ganze Jahr befruchtet werden. Dies führt in einer kurzen Zeit zu vielen Nachkommen. Diese Eigenschaft ist für embryonale und fetale Toxizitätsstudien von Nutzen (SWINDLE et al. 2012, MEURENS et al. 2012). Ihr gleichmäßiges Wachstum und ihre konstante Gewichtszunahme ermöglichen standardisierte Vergleiche der Tiere untereinander (HEINING et al. 2016). Der Hauptgrund, warum das Schwein gerne als Tiermodell verwendet wird, ist seine anatomische und physiologische Ähnlichkeit zum Menschen. GROENEN et al. (2012) fanden heraus, dass die menschliche Proteinsequenz dem Schwein ähnlich ist. Eine physiologische Gemeinsamkeit besteht darin, dass das Schwein, genau wie der Mensch, ein Monogastrier und ein Allesfresser ist (SWINDLE et al. 2012). Anatomische Ähnlichkeiten zeigen sich beispielsweise bei der kaum behaarten und unpigmentierten Haut, sodass das Schwein für dermatotoxikologische Studien verwendet werden kann (MAHL et al. 2006). Das Schwein ermöglicht aufgrund seiner Größe viele medizinische Eingriffe, wie die Katheterisierung, Herz-Operationen, Endoskopien und Bronchoskopien. Dieses ist bei anderen Tierarten aufgrund der Größenverhältnisse schwer zu verwirklichen (MEURENS et al. 2012). Das Handorf Minischwein eignet sich besonders gut für den menschlichen Vergleich, da es mit 6-8 Monaten die gleiche Organgröße wie ein erwachsener Mensch hat. Das Wachstum des kardiovaskulären Systems entspricht, von Geburt an bis zum 5. Monat, dem eines heranwachsenden Jugendlichen. Aus diesem Grund wird das Schwein oft für Implantationsstudien verwendet (SWINDLE et al. 2012). LELOVAS et al. (2014) verglich die Gemeinsamkeiten zwischen Schwein und Mensch am

Herzen. Die Mitralklappen von Schweinen ähneln der des Menschen in Bezug auf Größe, Klappensegel und Anordnung der Chordae tendineae (LOMHOLT et al. 2002). Weitere anatomische Ähnlichkeiten bestehen bei der Lunge. Die linke Seite der Lunge besteht genau wie beim Menschen aus einem cranialen und einem caudalen Lobus. Die rechte Seite besteht beim Menschen aus 3 Lobi, wohingegen es beim Schwein 4 Lobi sind (NAKAKUKI 1994, JUDGE et al. 2014). KOTOULAS et al. (2014) empfehlen das Schwein als ein ideales Tiermodell für bronchiale Zirkulationsstudien, da der Ursprung, der Verlauf und die Verzweigungen der Bronchialarterien der des Menschen entsprechen. Ein weiterer Vorteil für diese Zirkulationsstudien ist, dass die Arteria broncho-oesophagea beim Schwein leicht zu präparieren ist, da sie als ein einzelnes Gefäß der Aorta entspringt. ROGERS et al. (2008) beschrieben, dass Schweine deren Gene so verändert wurden, dass sie nach der Geburt eine zystische Fibrose entwickelten, die gleichen Organveränderungen wie Neugeborene zeigten. Damit wurde das Schwein als ein Versuchstiermodell für die Forschung an zystischer Fibrose etabliert.

## **2.5 Das Ferkelmodell**

Die in dieser Arbeit untersuchten Proben stammten aus einer Versuchsreihe, in der die protektiven Wirkungen einer Minocyclingabe und eines pulsatilen Blutflusses unter Einsatz einer HLM analysiert wurden. Das Regierungspräsidium Leipzig, Baustraße 2, 04013 Leipzig, Referat 24 genehmigte die Durchführung der Versuche am Herzzentrum Leipzig, Strümpellstr. 39 in 04289 Leipzig unter W 05/11 und W 05/12.

### **2.5.1 Versuchsaufbau**

Der Versuchsaufbau richtete sich nach GERDOM (2014), DHEIN et al. (2015), SALAMEH et al. (2015<sup>a</sup>) und nach SALAMEH et al. (2015<sup>b</sup>).

#### **2.5.1.1 Versuchsgruppen**

Es wurden insgesamt 39 vier Wochen alte Angler Sattelschweinerkel, die zwischen 8 und 15kg wogen, verwendet. In der Kontrolle+Minocyclin-Gruppe konnte ein Tier nicht ausgewertet werden, weil dieses durch eine Gefäßverletzung verstorben war. In der HLM-Gruppe wurden 9 Tiere aufgrund der Komplexität und Schwere der Operation verwendet. Die HLM+Minocyclin-Gruppe untersuchte das Verhalten von Minocyclin in der Primingflüssigkeit während der HLM. Da hier kein negativer Effekt gesehen wurde, sind aus Tierschutzgründen nur 6 Tiere verwendet worden. Damit ergab sich eine Gesamtzahl von 38 ausgewerteten Tieren. In Tabelle 1 ist die Aufteilung der Versuchsgruppen aufgelistet. Sie zeigt einen Überblick über die Anzahl der Schweine der jeweiligen Gruppen. Außerdem wird verdeutlicht, welche Gruppen Minocyclin erhalten haben und welche an die Herz-Lungen-Maschine mit normalen und welche an die Herz-Lungen-Maschine mit pulsatilen Blutfluss angeschlossen wurden.

**Tabelle 1: Übersicht über die Versuchsgruppen. Adaptiert von GERDOM (2014), DHEIN et al. (2015), SALAMEH et al. (2015<sup>a</sup>) und SALAMEH et al. (2015<sup>b</sup>).**

Gruppe	Anschluss an HLM	Gabe von Minocyclin	Blutfluss pulsatil	Anzahl ausgewerteter Schweine
1.Kontrolle				<b>8</b>
2.Kontrolle + Minocyclin		<b>X</b>		<b>7</b>
3.Herz-Lungen-Maschine	<b>X</b>			<b>9</b>
4.Herz-Lungen-Maschine + Minocyclin	<b>X</b>	<b>X</b>		<b>6</b>
5. Herz-Lungen-Maschine pulsatiler Blutfluss	<b>X</b>		<b>X</b>	<b>8</b>

### 2.5.1.2 Operationsverlauf

Der Operationsverlauf richtete sich nach GERDOM (2014), DHEIN et al. (2015), SALAMEH et al. (2015<sup>a</sup>) und nach SALAMEH et al. (2015<sup>b</sup>). In diesem Versuch gab es fünf verschiedene Gruppen von Ferkeln (Tabelle 1).

Die Kontroll-Gruppe bestand aus 8 Schweinen. Daneben gab es eine weitere Kontrollgruppe, die sog. „Kontrolle+Minocyclin-Gruppe“. Die Schweine der beiden Kontrollgruppen wurden 240 Minuten lang anästhesiert und thorakotomiert. Die Schweine der „Kontrolle+Minocyclin-Gruppe“ erhielten das Medikament Minocyclin zu Narkosebeginn und erneut nach weiteren 150 Minuten. Minocyclin wurde bei der ersten Injektion intravenös mit 4mg/kg in 10ml 0,9% Natriumchlorid (NaCl) gelöst, verabreicht. Bei der erneuten Gabe wurde das Minocyclin mit 2mg/kg, welches in 0,9% NaCl gelöst war, dosiert. Nach der 4-stündigen Narkose wurde diese vertieft und die Schweine wurden durch Entbluten getötet.

Die Narkoseprämedikation der Tiere erfolgte mit Midazolam (0,5mg/kg KM) intramuskulär und Atropinsulfat (0,03mg/kg KM) intramuskulär. Zur Narkoseeinleitung wurde Ketaminhydrochlorid (15-20mg/kg KM) intramuskulär appliziert. Zusätzlich wurde zur Analgesie Metamizol-Natrium (50mg/kg KM) intravenös verabreicht. Nach erfolgter Intubation erhielten die Tiere eine Inhalationsnarkose mit Isofluran. Isofluran wurde in der Anflutungsphase mit ca. 3 Volumenprozent dosiert und zum Narkoseerhalt auf 1,5 Volumenprozent reguliert. Während der 90 Minuten an der HLM wurde keine Inhalationsnarkose durchgeführt. Die Narkose wurde in diesem Zeitraum durch Propofol (25-35mg/kg KM/h) aufrechterhalten. Als Muskelrelaxans wurde Pancuronium (0,2 mg/kg KM) verwendet. Die Tiere wurden während des ganzen Versuches mit Sufentanil (0,5-2µg/kg KM) analgisiert.

Die drei weiteren Gruppen wurden alle an die Herz-Lungen-Maschine (HLM) angeschlossen. Eine „HLM-Gruppe“ mit 9 Schweinen wurde an eine Herz- Lungen- Maschine mit laminarem Blutfluss angeschlossen. Die „HLM+Minocyclin-Gruppe“ mit 6 Schweinen wurde ebenfalls an die Herz-Lungen-Maschine mit laminarem Blutfluss angeschlossen. Diese Gruppe erhielt zusätzlich das Medikament Minocyclin. Der zeitliche Operationsverlauf ist in Abbildung 5 zu sehen. Zu Versuchsbeginn erhielt die „HLM+Minocyclin-Gruppe“ die erste Dosis Minocyclin von 4mg/kg, gelöst in 10ml 0,9% NaCl. Die „HLM-Gruppe“ erhielt zeitgleich 10ml 0,9% NaCl. Die Tiere wurden narkotisiert und an die Herz-Lungen-Maschine angeschlossen. Nach

30 Minuten wurde die Aorta abgeklemmt. Es wurde eine Kardioplegielösung in die Koronararterien eingegeben und das Herz kam zum Stillstand. Die Herz-Lungen-Maschine wurde gestartet. Der Körper wurde mit Hilfe eines Wärmeaustauschers in einen hypothermen Zustand überführt und auf 28°C heruntergekühlt. Nach ca. 70 Minuten wurde die Körpertemperatur langsam wieder auf 37°C erhöht. Nach 90 Minuten an der Herz-Lungen-Maschine wurde die Aortenklemme entfernt, sodass erneut Blut in das Herz fließen konnte. Es folgte die Reperfusionzeit. Wenige Minuten nach Entfernung der Aortenklemme begann das Herz selbstständig zu schlagen. Nach weiteren 30 Minuten wurde die Herz-Lungen-Maschine abgestellt. Zu diesem Zeitpunkt erhielt die „HLM+Minocyclin-Gruppe“ eine weitere Minocyclingabe mit der Dosis von 2mg/kg in 10ml NaCl gelöst. Die „HLM-Gruppe“ erhielt erneut 10 ml 0,9% NaCl. Es folgte eine 90-minütige Rekonvaleszenzzeit. Nach insgesamt 240 Minuten wurden die Tiere durch Entbluten getötet.

Die fünfte Gruppe, bestehend aus 8 Schweinen, wurde an eine Herz-Lungen-Maschine angeschlossen, welche mit einem pulsatilen Blutfluss gefahren wurde. Die „Pulsatile-HLM-Gruppe“ unterlag dem gleichen zeitlichen Versuchsablauf wie die HLM-Gruppe. Dabei wurde ein Puls von 100 Schlägen pro Minute, eine Pulsbreite von 50%, ein Basisfluss von 30% und ein pulsatiler Fluss von 70% eingestellt.

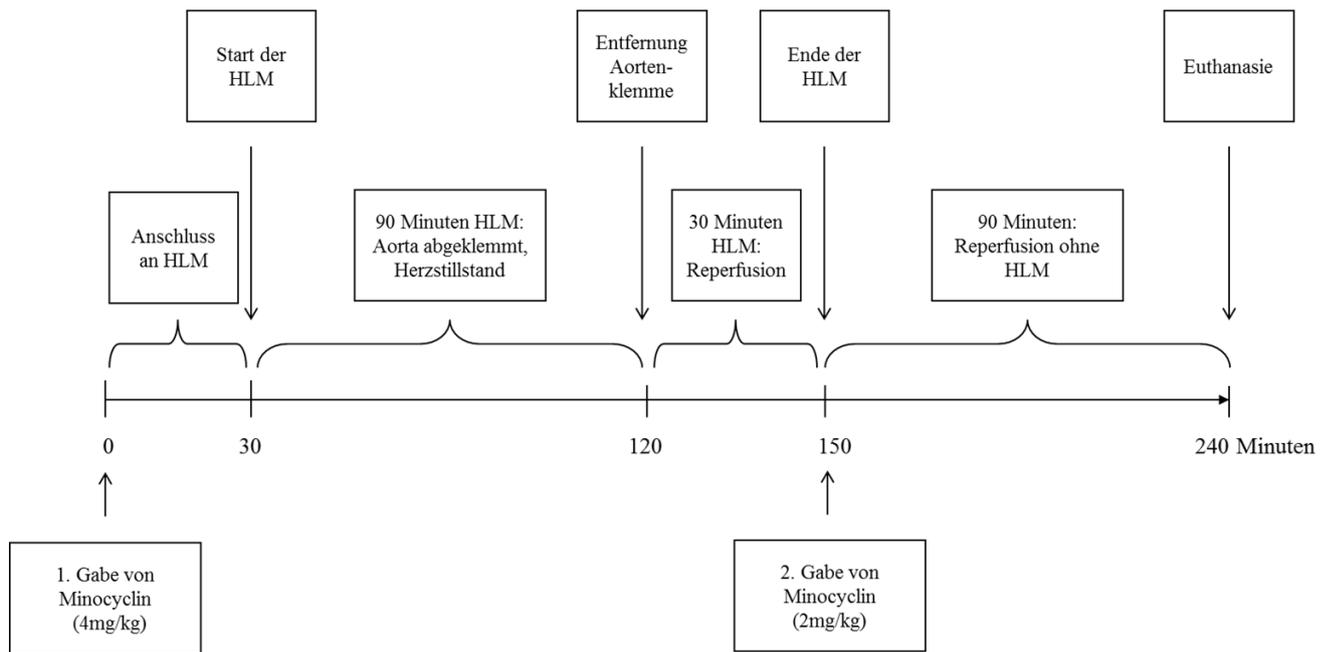


Abbildung 5: Zeitlicher Ablauf des Versuches. Modifiziert nach GERDOM (2014), DHEIN et al. (2015), SALAMEH et al. (2015<sup>a</sup>), SALAMEH et al. (2015<sup>b</sup>).

### **2.5.1.3 Beatmungsparameter**

Die Schweine aller Versuchsgruppen wurden mit dem Narkosegerät beatmet. Die Einstellung des Beatmungsgerätes orientierte sich an der Blutgasanalyse des expiratorischen CO<sub>2</sub>-Wertes. Dieser wurde immer zwischen 40 und 45mmHg gehalten. Die Beatmung wurde druckkontrolliert als kontinuierliche Überdruckbeatmung (CPPV: continual positive pressure ventilation) durchgeführt.

Aus den Narkoseprotokollen wurden folgende Werte für die Beatmungsparameter erhoben.

Das Verhältnis der Inspirationszeit zur Expirationszeit lag bei 1:1,5. Die Zufuhr der Luft wurde auf 1,5 Litern pro Minute und die Isofluranzufuhr auf 1,5 Volumenprozent reguliert. Der positive endexpiratorische Druck (PEEP) lag zwischen 2 und 4mbar. Der Inspirations-Spitzendruck (PIP) lag maximal bei 34mbar, im Mittelwert bei 22mbar. Die Atemfrequenz (AF) variierte je Schwein zwischen 16 und 33 Atemzüge pro Minute. Das Atemzugvolumen wurde mit 10ml/kg Körpermasse eingestellt. Die inspiratorische Sauerstoffkonzentration (FiO<sub>2</sub>) lag im Mittelwert bei 56%.

### **2.5.1.4 Probenentnahme und Probenbearbeitung**

Bei der Probenentnahme wurden Gewebeproben und Blutproben genommen. Die venösen Blutproben wurden zu Beginn des Versuches zum Zeitpunkt 0 sowie direkt nach dem Abklemmen der Aorta nach 90 Minuten entnommen. Die dritte Blutprobe wurde kurz vor dem Tod des Tieres in der 240. Minute gewonnen. Die Blutproben wurden mittels Blutgasanalyse untersucht. Direkt nach dem Tod wurden die Gewebeproben aus der Lunge entnommen und wie unter 3.3.3.1 beschrieben verarbeitet.

Die histologischen Proben wurden aus der rechten Lunge auf der ventralen Seite des Lobus medius und des Lobus caudalis dexter entnommen. Dabei wurden die Lungenbiopsien zuerst in 0,9% isotonischer Kochsalzlösung gewaschen und dann direkt in 4% Formalinlösung (nach Lillie) eingelegt. Anschließend kamen die Proben in Einbettungskassetten und über Nacht in den Einbettautomaten. Sie wurden von dort in eine Paraffinwanne überführt. Das Präparat wurde aus der Einbettungskassette genommen und in eine Edelstahlgießform gelegt. Diese wurde mit flüssigem Paraffin gefüllt und mit der Einbettungskassette verschlossen. Im Anschluss wurden die Präparate auf einer -14°C kalten Kühlplatte gekühlt.

## 2.5.1.5 Analyse von Parametern

### 2.5.1.5.1 Blutgasanalysen

Mit Hilfe eines Blutgasanalysegerätes wurde die Sauerstoffsättigung (SO<sub>2</sub>) ermittelt. Die Werte der arteriellen Sauerstoffsättigung sind aus einem bereits veröffentlichten Artikel der gemeinsamen Arbeitsgruppe (SALAMEH et al. 2015<sup>a</sup>). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben stammten von diesen Tieren. Die arterielle Sauerstoffsättigung zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Sie lag im Durchschnitt bei 99%.

**Tabelle 2: Ergebnisse der Blutgasanalyse für die arterielle Sauerstoffsättigung in % (SALAMEH et al. 2015<sup>a</sup>).**

<u>Gruppe</u>	<u>Zeitpunkt</u>	<u>Arterielle O<sub>2</sub> Sättigung (%)</u>
Kontrolle	0´	<b>99,3±0.3</b>
Kontrolle	240´	<b>99,1±0.5</b>
Kontrolle +Mino	0´	<b>99,9±0.1</b>
Kontrolle +Mino	240´	<b>99,0±0.3</b>
HLM	0´	<b>99,6±0.3</b>
HLM	240´	<b>97,5±0.7</b>
HLM +Mino	0´	<b>99,5±0.3</b>
HLM +Mino	240´	<b>99,0±0.5</b>

**Tabelle 3: Noch nicht veröffentlichte Ergebnisse der Blutgasanalyse für die arterielle Sauerstoffsättigung in % (SALAMEH et al. 2015<sup>a</sup>).**

Pulsatile HLM	0´	<b>98,2 ± 1,8</b>
Pulsatile HLM	240´	<b>99,7 ± 0,2</b>

### **2.5.1.5.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)**

Mit Hilfe einer HPLC werden einzelne Substanzen voneinander getrennt. So ermöglicht die HPLC beispielsweise aus Gewebeproben ATP-, ADP- und AMP-Werte zu ermitteln. Bei der HPLC unterscheidet man eine mobile und eine stationäre Phase. Die mobile Phase ist ein Laufmittel, in das 20µl der aufgearbeiteten Organlösungen gegeben wird. In diesem Experiment erfolgte die Herstellung der Organlösung, indem Organproben in 5ml 0,4M Perchlorsäure und danach in 0,8ml 0,2M Kaliumhydroxid bei 4°C mit 3000g 10 Minuten lang zentrifugiert wurden. Für die mobile Phase wurde Tetrabutylammoniumhydrogensulfat eingesetzt. Als stationäre Phase wurde Kieselgel verwendet. Die mobile Phase durchlief die stationäre Phase mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 1ml pro Minute. Als Retentionszeit bezeichnet man dabei die unterschiedliche Verweildauer der Substanzen in der stationären Phase. Diese Retentionszeit wurde für jede Substanz individuell gemessen. Es wurden Standardkurven angefertigt, anhand derer die Werte der HPLC ausgewertet wurden (GERDOM 2014). Durch dieses Verfahren wurden aus dem Lungengewebe ATP- ADP- und AMP-Werte ermittelt. Die Ergebnisse der HPLC-Untersuchung des Lungengewebes wurden zur Verfügung gestellt und sind im Anhang (vgl. 9.8) aufgelistet.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Proben und Datenmaterial

Die in dieser Arbeit untersuchten Proben stammten aus dem unter 2.5 beschriebenen Tierversuch von GERDOM (2014), DHEIN et al. (2015), SALAMEH et al. (2015<sup>a</sup>) und SALAMEH et al. (2015<sup>b</sup>). Bei dem Probenmaterial handelte es sich um in Paraffinblöcke eingebettete Biopsien der Lunge von der ventralen Seite des Lobus medius und Lobus caudalis dexter. Diese Lungenproben wurde von jedem Schwein aus den in Tabelle 1 beschriebenen Gruppen entnommen. Aus diesem Versuch wurden außerdem die Daten aus den Narkoseprotokollen für  $paO_2$ ,  $FiO_2$  und die Ergebnisse der HPLC-Untersuchung des Lungengewebes für ATP, ADP und AMP zur Verfügung gestellt.

### 3.2 Materialien

#### 3.2.1 Geräte für die Probenbearbeitung

Geräte	Hersteller
Kühlplatte COP 30	Medite GmbH, Burgdorf, D
Mikrotomklingen S22	Feather Safety Razor CO, Osaka, Japan
Objektträger	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim, D
Objektträgerhalter	Wagner& Munz, München, D
Paraffinstreckbad	Medax GmbH und Co. Kg, Kiel, D
Schlittenmikrotom HM 400	Microm International Walldorf GmbH, D
Trockenschrank Modell 400	Memmert GmbH und Co.Kg, Schwabach, D

### 3.2.2 Primärantikörper für die Immunhistochemie

Primärantikörper	Hersteller	Verdünnung
AIF (H-300) sc 5586 Lot # J1012 Rabbit polyclonal IgG 200µg/ml	Santa Cruz Biotechnology Inc. Heidelberg, D	1:50
Cleaved Caspase 3 D 175 Rabbit Antibody # 9661 L Lot. 43 Ref 10/2014	Cell Signaling Technology New England Biolabs GmbH Frankfurt am Main, D	1:200
HIF-1 $\alpha$ (H-206) sc- 10790 Lot # J3112 Rabbit polyclonal IgG 200µg/ml	Santa Cruz Biotechnology Inc. Heidelberg, D	1:100
Mouse anti Human Poly (ADP- Ribose) IgG ; MCA 1480 Monoclonaler Antikörper	BIO RAD Laboratories München, D	1:300
Anti Nitrotyrosin Cat. # 06- 284 Lot# 2154194 polyclonal Antibody	Millipore , Temecula Kalifornien USA	1:500
TNF $\alpha$ ( N-19) sc – 1350 Lot # C1615 goat polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc. Heidelberg, D	1:100

### 3.2.3 Sekundärantikörper für die Immunhistochemie

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
Goat Anti Rabbit IgG Peroxidase # A 0545	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, D	1:200 (HIF-1 $\alpha$ , AIF, Cleaved Caspase 3, Nitrotyrosin)
Goat Anti Mouse IgG # A 4416 Peroxidase Conjugate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, D	1:200 (PAR)
Rabbit Anti Goat IgG Peroxidase # A 5420	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, D	1:200 (TNF $\alpha$ )

### 3.2.4 Gebrauchslösungen für die Immunhistochemie

Zur Herstellung von:	Benötigte Chemikalien
0,01 M Natrium-Citrat (pH= 6,0)	1,47 g Natriumcitrat- Dihydrat (10 mM) + 500 ml destilliertes H <sub>2</sub> O
0,1 M HCL	0,83 ml rauchende HCL auf 100 ml destilliertes H <sub>2</sub> O
0,1 M NaOH	0,4g NaOH auf 100 ml destilliertes H <sub>2</sub> O
1 M HCL	8,3 ml rauchende HCL auf 100 ml destilliertes H <sub>2</sub> O
1 M NaOH	4g NaOH auf 100 ml destilliertes H <sub>2</sub> O
2% BSA in TBS	1g BSA auf 50 ml 1xTBS
4% Milchpulver in TBS	4g Milchpulver auf 100 ml 1xTBS
Methanolische Wasserstoffperoxid Lösung	60% Methanol + 40% 1x TBS + 240 µ 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Scottpuffer (pH= 8,0)	2g Natriumhydrogencarbonat+ 20 g Magnesiumsulfat- Heptahydrat auf 1 Liter destilliertes H <sub>2</sub> O
Tris Buffered Saline (TBS) 10-fach ( pH= 7,4)	1,5 M NaCl + 0,5 M Tris HCL + 1000ml destilliertes H <sub>2</sub> O
TRIS- EDTA (pH=9)	1,21 g Tris + 0,37 g EDTA auf 1000ml destilliertes H <sub>2</sub> O

### 3.2.5 Gebrauchslösungen für die Histologie

Zur Herstellung von:	Benötigte Chemikalien
100 ml 0,1% Salzsäure	0,82 ml 37% Salzsäure + 99,18 ml Wasser
500 ml Ethanol 96%:	480 ml Ethanol +20 ml Aqua dest.
500 ml Ethanol 70%:	350 ml Ethanol +150 ml Aqua dest.
500 ml Ethanol 50%	250 ml Ethanol +250 ml Aqua dest.
500 ml Eosin G, 0,25 %	0,15g Eosin G + 500ml dH <sub>2</sub> O

### 3.2.6 Chemikalien für die Histologie

Chemikalie	Hersteller
AEC+ High Sensitivity Substrate Chromogen	Dako, Carpinteria, CA USA
Bovines Serum Albumin	Cell Signaling Technology, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D
Destilliertes Wasser	Water purification System Millipore, Schwalbach, D
Entellan	Merck KGaA , Darmstadt, D
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	Carl Roth GmbH&Co.KG , Karlsruhe, D
Ethanol vergällt $\geq 99,8\%$ mit ca 1 % MEK	Carl Roth GmbH&Co.KG , Karlsruhe, D
Ethylenediamine-Tetraacetic Acid (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, D
Glycergel Mounting Medium	Dako, Carpinteria, CA USA

Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Dr.K. Hollborn & Söhne, Leipzig, D
Magnesiumsulfat- Heptahydrat	Merck KGaA , Darmstadt, D
Methanol $\geq 99\%$ , zur Synthese	Carl Roth GmbH&Co.KG , Karlsruhe, D
Magermilchpulver	Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell, D
Nagellack durchsichtig	Rival de Loop, Berlin, D
Natriumchlorid $\geq 99,5\%$ , p.a. ACS, ISO	Carl Roth GmbH&Co.KG , Karlsruhe, D
Natriumcitrat – Dihydrat $\geq 99\%$ , p.a., ACS	Carl Roth GmbH&Co.KG , Karlsruhe, D
Natriumhydrogencarbonat $\geq 99\%$ Ph.Eur., reinst	Carl Roth GmbH&Co.KG , Karlsruhe, D
Salzsäure rauchend 37 % ROTIPURAN® p.a., ACS, ISO	Carl Roth GmbH&Co.KG , Karlsruhe, D
TRIS PUFFERAN® $\geq 99\%$ , Ultra Qualität	Carl Roth GmbH&Co.KG , Karlsruhe, D
Tris-hydrochlorid PUFFERAN® $\geq 99\%$ , p.a	Carl Roth GmbH&Co.KG , Karlsruhe, D
Wasserstoffperoxid 30% Ph.Eur., stabilisiert	Carl Roth GmbH&Co.KG , Karlsruhe, D
Xylol (Isomere) $> 98\%$ , rein für die Histologie	Carl Roth GmbH&Co.KG , Karlsruhe, D

### 3.2.7 Geräte für die Histologie

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Destillierer	Water purification System Millipore Schwalbach, D
Digitalthermometer: Lab Thermometer IP 65 (LT 101)	TFA Dostmann Gmbh &Co. KG ,Wertheim, D
Food Steamer Multiquick (Dampfgarer)	Braun Household, Neu-Isenburg, D
Hotplate Stirrer Model L -81	Labinco, Breda, Niederlande
InoLab Labor-ph-Meter	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, D
Laborwaage	Faust Laborbedarf AG, Schaffhausen, D
Mini- Zentrifuge Sprout	Karl Hecht GmbH &Co.KG, Sondheim v.d.Rhön, D
Pipette 10	Eppendorf Research ,Hamburg, D
Pipette 2,5	Eppendorf Research, Hamburg, D
Pipette 200- 1000	Carl Roth GmbH&Co.KG , Karlsruhe, D
Pipette 50-200	Carl Roth GmbH&Co.KG , Karlsruhe, D

### 3.2.8 Materialien für die Histologie

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Auslageschale mit Deckel ( feuchte Kammer) Melamin 1402	Waca Kunststoffwarenfabrik, Halver, D
Deckgläser 18x18 mm	Heinz Herenz, Hamburg, Deutschland
Deckgläser 24x24 mm	Carl Roth GmbH&Co.KG , Karlsruhe, D
Eppendorf Tubes 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Hellendahl-Färbekasten für 8 Objektträger mit Deckel , Glas	Dr.Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig, D
Pap Pen (Fettstift)	Kister Biotech GmbH &Co.Kg, Steinfurt, D
Papierhandtücher	Kleenex + Kimberly Clark GmbH, Koblenz, D
Pipettenspitzen gelb Type E (1µl -200µl)	Dr.Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig, D
Pipettenspitzen blau Typ E (100 µl -1000 µl)	Dr.Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig, D
Pipettenspitzen kristall Typ lang (0,5 µl -20 µl)	Dr.Ilona Schubert Laborfachhandel, Leipzig, D
Reaktionsgefäß 0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Greiner Bio- One GmbH, Frickenhausen, D

### 3.2.9 Geräte zur Erstellung histologischer Aufnahmen

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Mikroskop Imager. M1	Carl Zeiss Microscopy GmbH Jena, D
Kamera AxioCam Mrc5	Carl Zeiss Microscopy GmbH Jena, D

### 3.2.10 Programme zur Auswertung der histologischen Aufnahmen und zur Anfertigung der Statistik

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Software Zen 2011 (blue edition)	Carl Zeiss Microscopy GmbH Jena, D
Image J	Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, Bethesda, USA
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Systat 13	Systat Software GmbH, Erkrath, D

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Berechnung des Quotienten: $\frac{paO_2}{FiO_2}$

Die Werte für  $paO_2$  und  $FiO_2$  wurden aus den Narkoseprotokollen (vgl. 2.5) übernommen.

Aus den erhobenen Sauerstoffpartialdruckparametern und den  $FiO_2$ -Werten wurde folgender Quotient berechnet:  $\frac{paO_2}{FiO_2}$ .

#### 3.3.2 Berechnung des Quotienten: $\frac{ATP}{ADP+AMP}$

Aus den zur Verfügung gestellten und noch nicht veröffentlichten Daten der HPLC-Untersuchung (vgl. 2.5.1.5.2 und 9.8) wurden die Ergebnisse für ATP, ADP und AMP ermittelt und folgender Quotient errechnet:  $\frac{ATP}{ADP+AMP}$ .

### **3.3.3 Histologie**

#### **3.3.3.1 Vorbereitung der Proben für die Histologie**

Zum Anfertigen der histologischen Schnitte wurden die ausgehärteten Paraffinblöcke auf eine -14°C kalte Kühlplatte gelegt. Aus den Paraffinblöcken wurde mit Hilfe des Schlittenmikrotoms 2µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden in ein Paraffinstreckbad gelegt und auf einen Objektträger gezogen. Die Objektträger wurden dann in einem Objektträgerhalter für ca. 2 Stunden bei 60°C in einen Trockenschrank gestellt.

#### **3.3.3.2 Hämalaun-Eosin-Färbung**

Es wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung zur Untersuchung der Alveolarsepten sowie zum Nachweis von neutrophilen Granulozyten angefertigt. Hämatoxylin färbt Nukleinsäuren und somit die Zellkerne blau an. Eosin hingegen färbt Proteine im Zytoplasma, sowie extrazelluläre Substanzen pink an (FISCHER et al. 2008).

Zur Entparaffinierung der Gewebeproben wurden die Objektträger einmal 10 Minuten und einmal 3 Minuten in Xylol gestellt. Danach kamen die Proben für jeweils 3 Minuten in eine absteigende Ethanolreihe, beginnend mit 100% Ethanol und anschließend, 96%, 70% und 50% Ethanol. Danach wurden sie 2 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Die Kernfärbung fand 10 Minuten lang im Hämalaun nach Mayer statt. Zum Bläuen der Kerne wurden die Proben 15 Minuten lang in Leitungswasser gewaschen. Anschließend wurden sie 10 Minuten lang in 0,1% Salzsäure gespült. Die Färbung des Zytoplasmas erfolgte 10 Minuten lang in 0,25% Eosin G. Danach wurden die Proben 1 Minute in destilliertem Wasser gewaschen und es folgte die Dehydratation der Schnitte mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 96%, 100%). Abschließend wurden die Schnitte zweimal jeweils 3 Minuten in Xylol gereinigt. Die Proben wurden mit Hilfe von Entellan eingedeckelt und die überflüssigen Entellanreste wurden mit Xylol entfernt.

### **3.3.3.3 Immunhistochemie**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sechs verschiedene immunhistochemische Färbungen angefertigt. Die einzelnen verwendeten Antikörper sind unter 2.3 näher beschrieben.

Der Apoptose-induzierende Faktor (AIF) dient als Marker für den programmierten Zelltod auf Caspase-unabhängigem Weg. AIF ist im Zellkern nachweisbar. Die Antikörper-positiven Zellkerne färben sich unter AEC Einsatz rot an. Auch der Hypoxie-induzierte Faktor 1 (HIF-1) ist unter hypoxischen Zuständen im Zellkern lokalisiert und dient somit als Hypoxieindikator. Die Poly (ADP) Ribose (PAR) wird als Marker für den Zelltod, aber auch als Zeichen für DNA-Schäden sowie die eventuelle Präsenz von oxidativen bzw. nitrosativen Stress genutzt. PAR ist im Zellkern und im Zytoplasma lokalisiert. Die Cleaved Caspase 3 ist ebenfalls im Zellkern nachweisbar und dient als Indikator für den programmierten Zelltod. Bei dem Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) handelt es sich um ein Apoptose-induzierendes Zytokin, welches sich bei Präsenz im Zytoplasma rot anfärbt. Nitrotyrosin, welches im Zytoplasma lokalisiert ist, ist ein Marker für nitrosativen Stress.

#### **3.3.3.3.1 Durchführung der Protokolle von AIF, HIF-1, PAR, Cleaved Caspase 3**

Als erstes wurden die Proben mit Hilfe von Xylol dreimal 10 Minuten lang entparaffiniert. Anschließend wurden sie in einer absteigenden Alkoholreihe mit den Konzentrationen von 100%, 96% und 70% rehydriert und danach 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Dann wurden die Proben 10 Minuten lang in eine TRIS-gepufferte Kochsalzlösung (TBS) überführt. Diese hatte den pH von 7,4. Bei der AIF-, HIF-1- und PAR-Färbung erfolgte die Demaskierung der Antigene durch die Weiterverarbeitung der Proben in 0,01M Natriumcitrat. Der Natriumcitratpuffer wurde mit einem pH von 6 in einem Dampfgerar auf die Temperatur von 98°C erhitzt. Die Objektträger kamen dann 30 Minuten in die im Dampfgerar stehende Küvette. Mit Hilfe eines Thermometers wurde kontrolliert, dass die Temperatur konstant über 98°C war. Dann wurden sie noch weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Bei der Cleaved Caspase 3-Färbung wurde ein TRIS-EDTA-Puffer mit einem pH von 9 verwendet. Die Kochzeit sowie die Dauer des Abkühlens betragen hierbei je 30 Minuten. Anschließend wurden die Proben erneut dreimal für je 5 Minuten in TBS gewaschen. Das Blocken der endogenen Peroxidase wurde 60 Minuten lang mit einer Lösung aus 60% Methanol, 40%

TBS und 0,1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durchgeführt. Die Proben wurden anschließend wieder dreimal für je 5 Minuten in TBS gewaschen. Mit Hilfe eines Fettstiftes wurden die Proben umrandet, sodass 2% Bovines Serum Albumin (BSA), welches in TBS gelöst war, auf die Proben aufgetragen werden konnte. Bei Raumtemperatur wirkte dies in einer feuchten Kammer 1 Stunde ein. Nach dem Einwirken und dem damit einhergehenden Blocken von unspezifischen Bindungsstellen wurde der Primärantikörper aufgebracht. Dieser wurde in einer 2% BSA in TBS Lösung verdünnt und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Die Konzentrationen der Primärantikörper sind in 3.2.2 aufgeführt.

Am nächsten Tag wurde die feuchte Kammer 30 Minuten lang bei Raumtemperatur erwärmt. Die Proben wurden dann dreimal 5 Minuten lang in TBS gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde in 2% BSA in TBS verdünnt und für 60 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer aufgetragen. Die jeweiligen Konzentrationen sind in 3.2.3 zusammengefasst. Anschließend wurden die Proben dreimal 5 Minuten lang in TBS gewaschen. Danach wurde eine 3 Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)-Lösung zum Anfärben der markierten Proteine aufgetragen. Bei den AIF-, HIF-1-, PAR- und Cleaved Caspase 3-Färbungen betrug die Einwirkungszeit ca. 20 Minuten. Zwei weitere Waschungen mit je 5 Minuten, bei der Cleaved Caspase 3-Färbung mit je 3 Minuten, in TBS folgten. Dann erfolgte eine Kerngegenfärbung mithilfe von Hämalaun nach Mayer. Diese Kerngegenfärbung wurde bei den AIF, HIF-1- und Cleaved Caspase 3-Färbungen 2 Sekunden lang durchgeführt. Bei der PAR-Färbung betrug die Einwirkungszeit eine Minute. Die Proben wurden in einen Scottpuffer (pH 8) überführt und für 5 Minuten gebläut. Bei der AIF- Färbung erfolgte dieser Schritt 3 Minuten lang unter fließendem Leitungswasser. Der Fettstift wurde mit einem Zellstoff entfernt und die Proben mit Glycerolgelatine eingedeckelt. Zur längeren Haltbarkeit der Schnitte wurden diese mit einem Nagellack umrandet.

### **3.3.3.3.2 Durchführung der Protokolle von TNF $\alpha$ und Nitrotyrosin**

Als erstes wurden die Proben mit Hilfe von Xylol dreimal 10 Minuten lang entparaffiniert. Anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe mit den Konzentrationen 100%, 96% und 70% rehydriert und danach 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Dann wurden die Proben 10 Minuten lang in TBS überführt. Diese hatte den pH von 7,6. Danach wurden die Proben mithilfe eines Dampfgeräts 30 Minuten lang in einem Tris-EDTA Puffer (pH 9) auf die Temperatur von 98°C erhitzt. Anschließend wurde die erhitzte Küvette noch weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Dann wurden die Proben erneut dreimal für je 5 Minuten in TBS gewaschen. Das Blocken der endogenen Peroxidase wurde 60 Minuten lang mit einer Lösung aus 60% Methanol, 40% TBS und 0,1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durchgeführt. Die Proben wurden anschließend wieder dreimal für je 5 Minuten in TBS gewaschen. Mit Hilfe eines Fettstiftes wurden die Proben umrandet, sodass bei der Nitrotyrosinfärbung 4% getrocknetes Milchpulver, welches in TBS gelöst war, auf die Proben aufgetragen werden konnte. Bei der TNF $\alpha$ -Färbung wurde BSA verwendet. Bei Raumtemperatur wirkte dies in einer feuchten Kammer eine Stunde ein. Nach dem Einwirken und dem damit einhergehenden Blocken von unspezifischen Bindungsstellen wurde der Primärantikörper aufgebracht. Dieser wurde in einer 2% BSA in TBS Lösung verdünnt und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Die Konzentrationen des Primärantikörpers sind in 3.2.2 zu finden.

Am Folgetag wurden die Proben 30 Minuten bei Raumtemperatur erwärmt. Die Objektträger wurden dreimal je 5 Minuten in TBS gewaschen. Der Sekundärantikörper (3.2.3) wurde für 60 Minuten aufgetragen. Anschließend wurden die Proben erneut dreimal je 5 Minuten lang in TBS gewaschen. Eine Farbreaktion erfolgte mit Hilfe des AECs, welches bei der Nitrotyrosin- und der TNF $\alpha$ - Färbung 10 Minuten einwirkte. Dann wurden die Proben zweimal je 3 Minuten in TBS gewaschen. Der Fettstift wurde mit einem Zellstoff entfernt und die Proben wurden mit Glycerolgelatine eingedeckelt. Abschließend wurden die überschüssigen Glycerolgelatinestereste mit warmem Wasser entfernt und die Deckgläser mit Nagellack umrandet.

#### **3.3.3.4 Dokumentation der histologischen Präparate**

Die angefertigten histologischen Färbungen wurden mit dem Mikroskop lichtmikroskopisch untersucht und mit Hilfe einer Kamera abfotografiert. Es wurde das Objektiv EC Plan N 80 Fluar 40X/0,75 verwendet. Zur Erstellung und Bearbeitung der Bilder sowie das Einfügen der Maßbalken wurde die Software Zen 2011 verwendet.

Die „Regions of Interest“ (ROIs) wurden an 15 verschiedenen, über das ganze Präparat verteilten Lokalisationen gewählt. Es wurden nur Bereiche fotografiert, in denen ganze und aufgespannte Alveolen zu erkennen waren. Alle Bilder wurden in der Vergrößerung 400 x erstellt.

Bei der HE-Färbung wurden von jedem Schwein jeweils 15 Fotos von den Alveolen erstellt. Es wurde pro Gruppe eine Anzahl von durchschnittlich 200 Alveolen ausgemessen.

Bei den immunhistochemischen Färbungen (AIF, HIF-1, PAR, Cleaved Caspase 3, TNF $\alpha$ , Nitrotyrosin) wurden pro Schwein jeweils 15 Fotos von den Alveolen und jeweils 6 Fotos von den Gefäßen und Bronchien angefertigt. Insgesamt wurden pro Schwein mindestens 1000 Zellen ausgezählt.

#### **3.3.3.5 Morphometrische Untersuchung der histologischen Präparate**

Die HE-gefärbten Präparate wurden mit dem Programm Zen 2011 ausgewertet. Dabei wurde die Funktion Grafik „Linie“ benutzt um die Dicke der Alveolarsepten zu messen. Die Messung wurde an der jeweiligen Alveole immer an der dünnsten Stelle durchgeführt. Außerdem wurden bei dieser Färbung die neutrophilen Granulozyten in den Alveolarsepten gezählt. Eine Alveole wurde durch sich angrenzende Alveolarsepten definiert. Das Kriterium zur Auswahl der Alveolen bestand darin eine doppelte Auswertung eines einzelnen Septums zu vermeiden. Folglich wurden keine benachbarten Alveolen ausgezählt.

AIF, HIF-1, Cleaved Caspase 3 und PAR sind im Zellkern lokalisiert. Diese Färbungen wurden mit dem Programm Image J ausgewertet. Mit Hilfe des Cell Counters wurden jeweils die rot angefärbten immunopositiven und die blau angefärbten immunonegativen Zellkerne pro Alveole gezählt. Diese Zählung wurde ebenso pro Bronchus und Bronchiolus am Epithel sowie pro Blutgefäß am Endothel durchgeführt. Die Anzahl der immunopositiven Zellkerne wurde ins Verhältnis zu den immunonegativen Zellkernen gestellt und prozentual angegeben.

Nitrotyrosin und TNF $\alpha$  sind im Zytoplasma lokalisiert. Für diese Färbungen wurde ebenfalls das Programm Image J verwendet. Die Auswertung wurde über das Errechnen von rot angefärbten (=immunopositiven) Flächen und deren Farbintensität ermittelt.

### **3.3.4 Statistik**

Alle Ergebnisse wurden in dem Programm „Microsoft Excel 2010“ dokumentiert. Es wurden das arithmetische Mittel und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ermittelt.

Die Statistik wurde mit Hilfe des Programmes „Systat 13“ errechnet. Dieses Programm untersuchte die Ergebnisse auf Normalverteilung. Lag eine Normalverteilung vor, so wurde der Test „ANOVA“ zur Berechnung der Signifikanz verwendet. Der „Post-Hoc-Test / Tukey HSD“ diente zum Vergleich der einzelnen Gruppen miteinander. Der Students gepaarte t-Test wurde bei PaO<sub>2</sub> /FiO<sub>2</sub> und PaO<sub>2</sub> bei den Zeitpunkten 0. Minute und 240. Minute, zum Vergleich beider Gruppen miteinander, verwendet. Bei den Ergebnissen von ATP/ADP+AMP lag keine Normalverteilung vor. Diese Ergebnisse wurden mit dem nicht parametrischen Kruskal-Wallis-Test ausgewertet. Das Signifikanzniveau wurde bei  $p < 0,05$  festgelegt.

Das Programm „Sigma Plot 12.5“ wurde zur Erstellung von Graphen und Diagrammen verwendet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Sauerstoffparameter

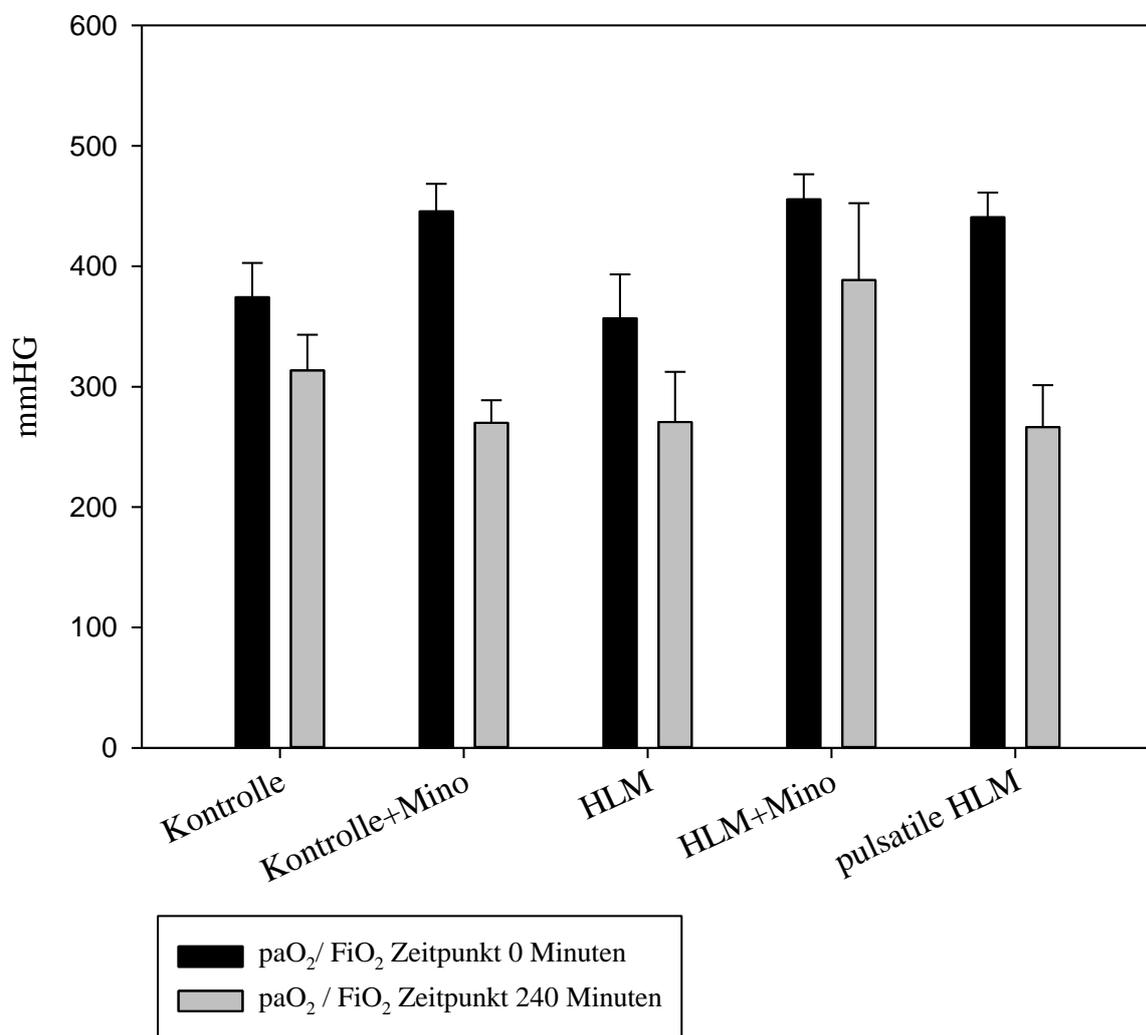
Der arterielle Sauerstoffpartialdruck ( $\text{paO}_2$ ) lag zum Zeitpunkt 240. Minute signifikant ( $p < 0,05$ ) unter dem Wert Minute 0 und nahm somit im Versuchsverlauf signifikant ( $p < 0,05$ ) ab.

**Tabelle 4: Arterieller Sauerstoffpartialdruck ( $\text{paO}_2$ ) in mmHg**

<u>Gruppe</u>	<u>Zeitpunkt</u>	<u><math>\text{paO}_2</math> (mmHG)</u>
Kontrolle	0´	<b>209,88±18,5</b>
Kontrolle	240´	<b>179,76±18,5</b>
Kontrolle +Mino	0´	<b>239,2±28,2</b>
Kontrolle +Mino	240´	<b>171,4±28,9</b>
HLM	0´	<b>202,2±19,2</b>
HLM	240´	<b>160,6±17,5</b>
HLM +Mino	0´	<b>241,8±14,3</b>
HLM +Mino	240´	<b>215,4±30,3</b>
Pulsatile HLM	0´	<b>243,7±8,7</b>
Pulsatile HLM	240´	<b>175,2±17</b>

Der Quotient aus dem arteriellen Sauerstoffpartialdruck ( $paO_2$ ) geteilt durch die inspiratorische Sauerstoffkonzentration ( $FiO_2$ ) zeigte in allen Versuchsgruppen zu den Zeitpunkten Minute 0 und 240. Minute keine signifikanten Unterschiede.

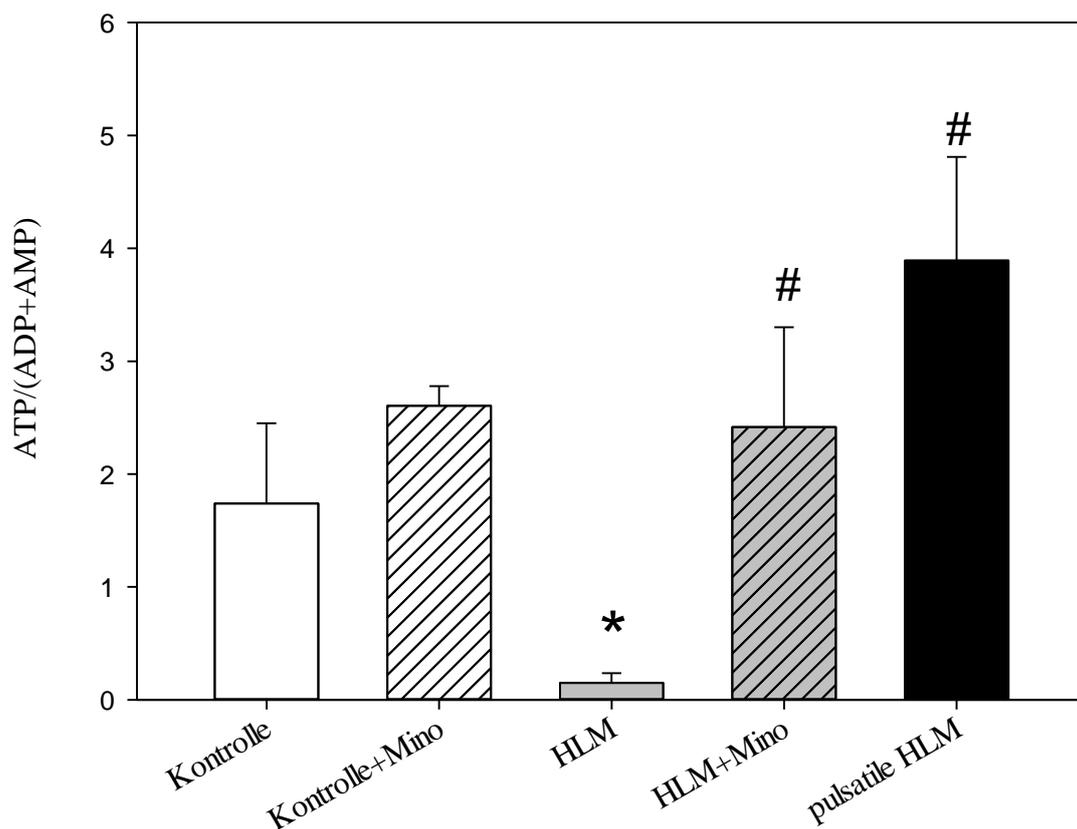
Der gepaarte t-Test zeigte, dass der  $paO_2 / FiO_2$ -Wert zum Ende des Versuches signifikant ( $p < 0,05$ ) niedriger als zu Beginn des Versuches war. Der pulsatile Blutfluss nahm keinen Einfluss auf den  $paO_2 / FiO_2$ -Wert. Minocyclin erhöhte während der HLM den  $paO_2 / FiO_2$ -Wert geringgradig. Das Signifikanzniveau wurde aber nicht erreicht.



**Abbildung 6:** Der Quotient aus dem arteriellen Sauerstoffpartialdruck ( $paO_2$ ) geteilt durch die inspiratorische Sauerstoffkonzentration ( $FiO_2$ ).

## 4.2 Adenosintriphosphat/(Adenosindiphosphat+Adenosinmonophosphat) ATP/(ADP+AMP).

Die HLM führte zu einer Abnahme des ATP/(ADP+AMP)-Gehalt, da die HLM-Gruppe einen signifikant ( $p < 0,05$ ) niedrigen ATP/(ADP+AMP)-Gehalt als die Kontroll-Gruppe hatte. Durch die Gabe von Minocyclin konnte dieser Abfall verhindert werden. Auch der pulsatile Blutfluss der HLM zeigte einen positiven Einfluss: der ATP/(ADP+AMP) Wert lag in der Pulsatilen-HLM-Gruppe im Vergleich zur HLM-Gruppe signifikant ( $p < 0,05$ ) höher. Der pulsatile Blutfluss und die Minocyclingabe führten zu einem signifikanten Anstieg des ATP/(ADP+AMP)-Wertes im Vergleich zur HLM-Gruppe.

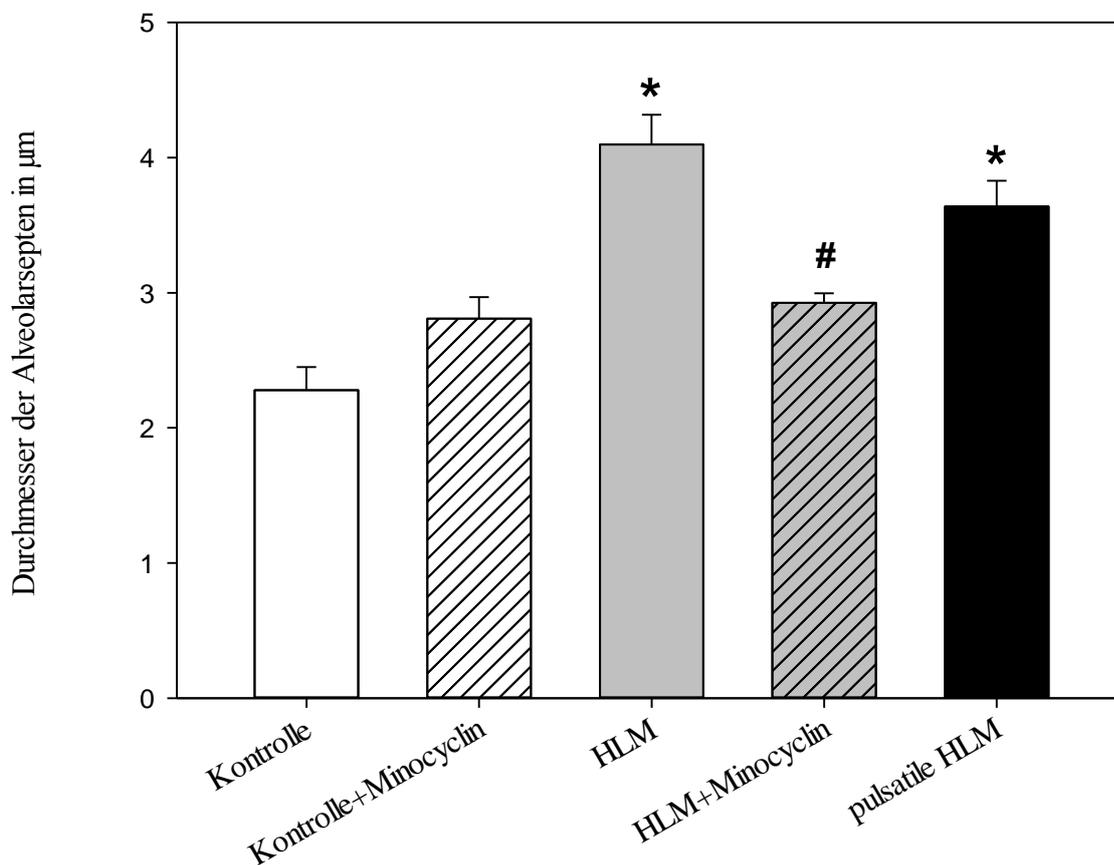


**Abbildung 7: ATP/(ADP+AMP).** \* Signifikanz gegenüber der Kontroll-Gruppe ( $p < 0,05$ ) # Signifikanz gegenüber Herz-Lungen-Maschine-Gruppe ( $p < 0,05$ )

## 4.3 Histologie

### 4.3.1 Durchmesser der Alveolarsepten

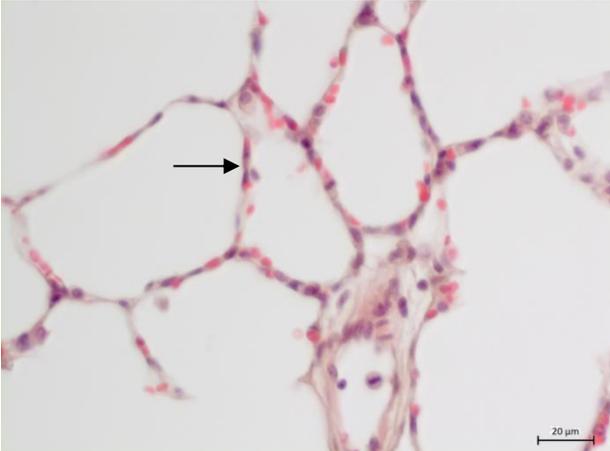
Die Dicke der Alveolarsepten wurde in den HE-gefärbten Präparaten gemessen. Die HLM führte zu einer Zunahme der Alveolarseptendicke. Es gab, verglichen mit der Kontroll-Gruppe, in der HLM-Gruppe eine signifikante Zunahme ( $p < 0,05$ ) der Alveolarseptendicke. Auch in der Pulsatilen-HLM-Gruppe wies die Lunge signifikant ( $p < 0,05$ ) dickere Alveolarsepten auf als in der Kontroll-Gruppe. Die Minocyclingabe hingegen führte in der HLM+Minocyclin-Gruppe, im Vergleich zur HLM-Gruppe, zu signifikant ( $p < 0,05$ ) dünneren Alveolarsepten.



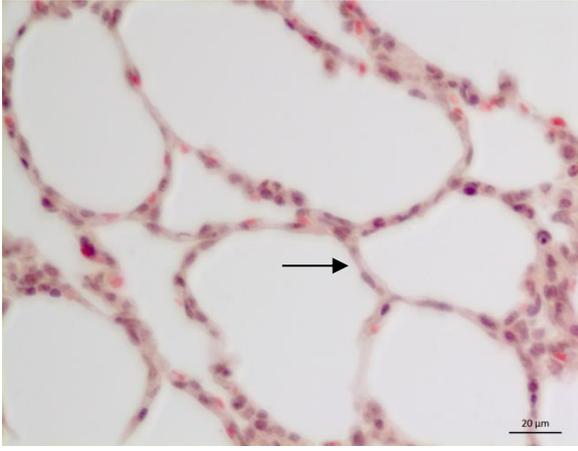
**Abbildung 8: Durchmesser der Alveolarsepten in den verschiedenen Versuchsgruppen.**

\* Signifikanz gegenüber der Kontroll-Gruppe ( $p < 0,05$ ) # Signifikanz gegenüber Herz-Lungen-Maschine-Gruppe ( $p < 0,05$ )

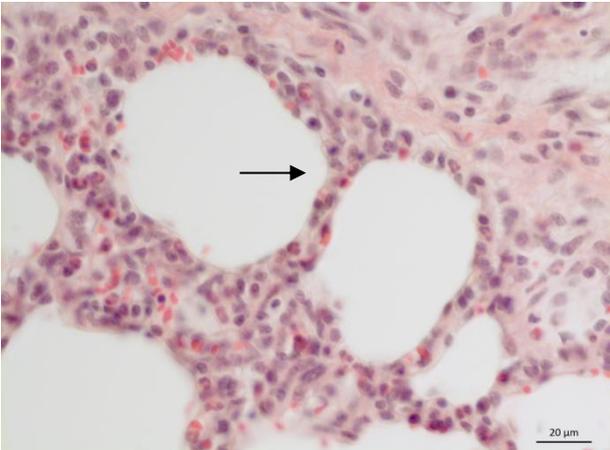
**Abbildung 9: Histologische Darstellung des Lungengewebes in den verschiedenen Versuchsgruppen. Ein Beispiel für ein Alveolarseptum, das vermessen wurde, ist mit einem Pfeil markiert. HE-Färbung.**



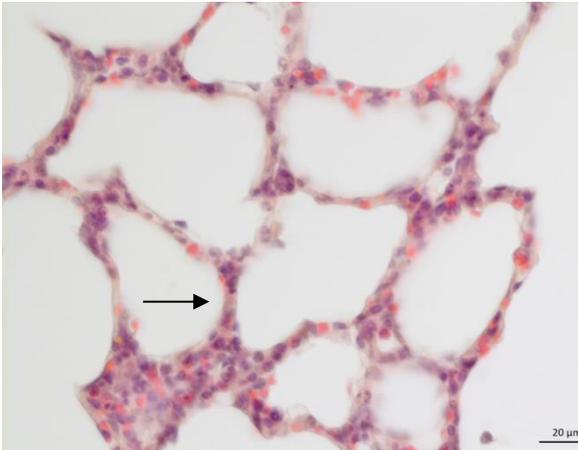
**Kontrolle**



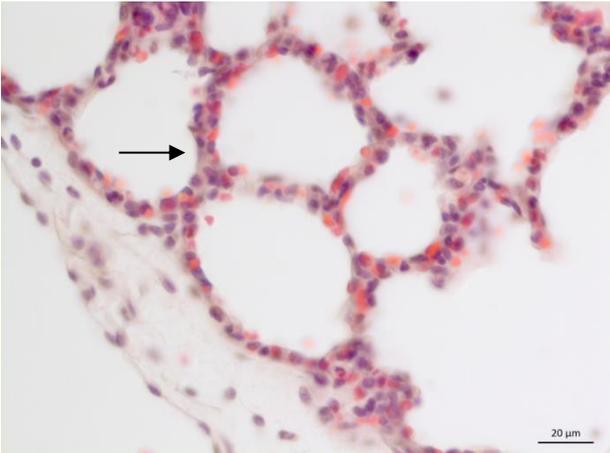
**Kontrolle + Minocyclin**



**HLM**



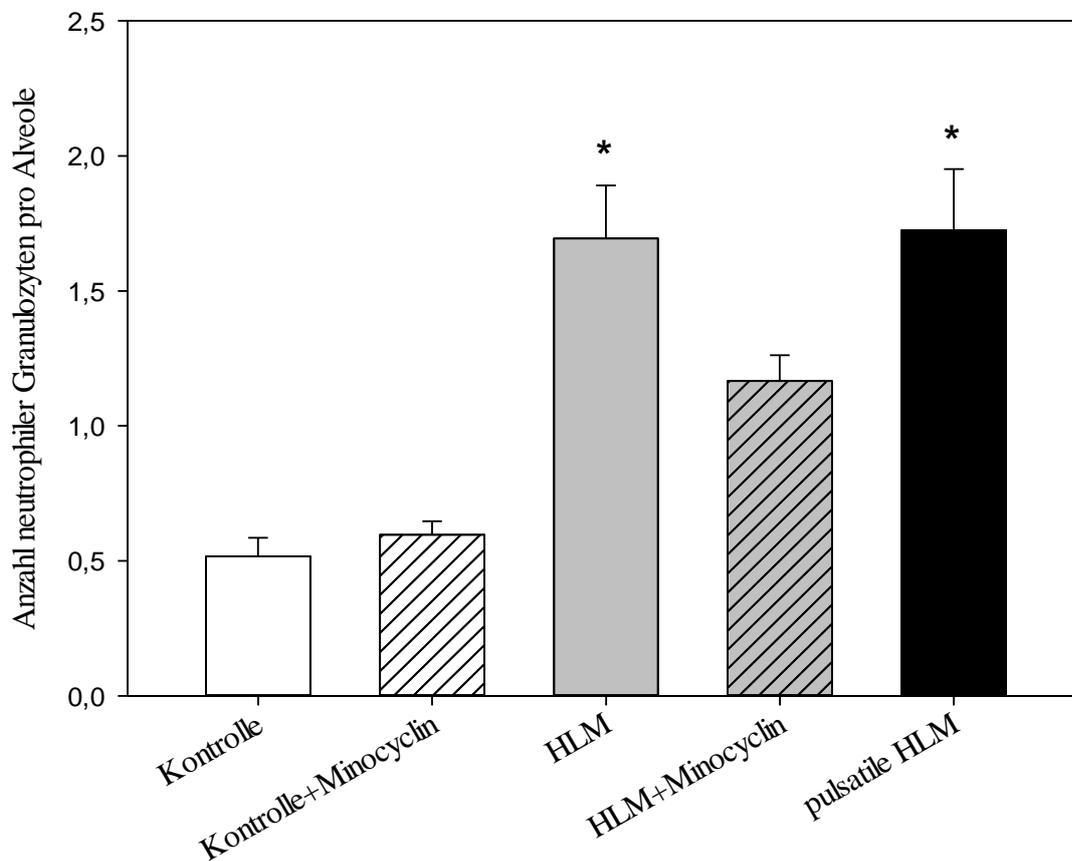
**HLM + Minocyclin**



**pulsatile HLM**

### 4.3.1.1 Neutrophile Granulozyten

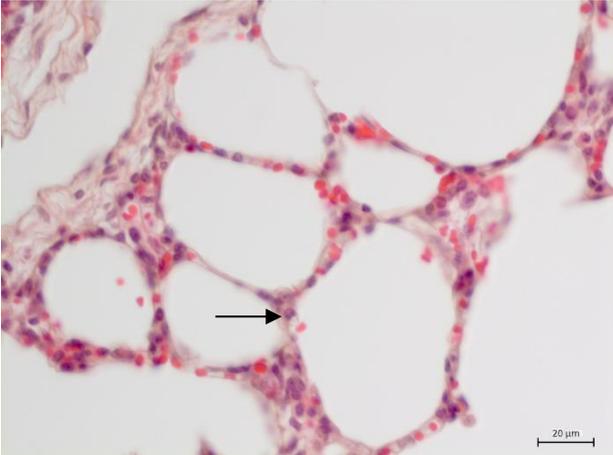
In den HE-gefärbten Präparaten wurde die Anzahl der neutrophilen Granulozyten ermittelt. In der HLM-Gruppe waren eine signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere Anzahl an neutrophilen Granulozyten nachweisbar als in der Kontroll-Gruppe. Auch die Pulsatile-HLM-Gruppe wies im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe eine signifikant ( $p < 0,05$ ) höherer Anzahl an neutrophilen Granulozyten auf, sodass es durch den pulsatilem Blutfluss zur keiner Abnahme kam. Durch die Gabe von Minocyclin war die Anzahl der neutrophilen Granulozyten vermindert. Das Signifikanzniveau ( $p < 0,05$ ) wurde aber nicht erreicht.



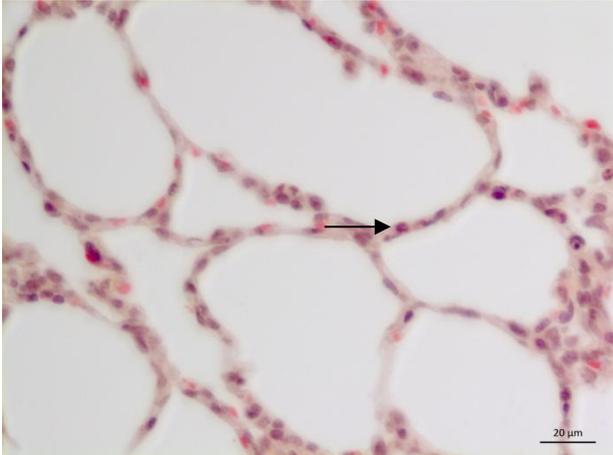
**Abbildung 10: Anzahl neutrophiler Granulozyten pro Alveole in den verschiedenen Versuchsgruppen.**

\* Signifikanz gegenüber der Kontroll-Gruppe ( $p < 0,05$ )

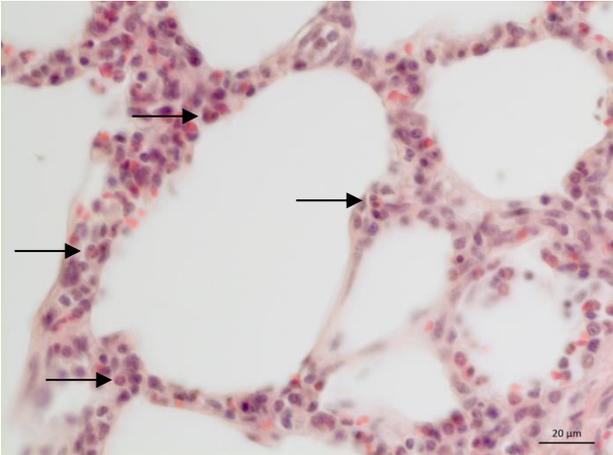
**Abbildung 11: Histologische Darstellung des Lungengewebes in den verschiedenen Versuchsgruppen. Ein Beispiel für einen ausgezählten neutrophilen Granulozyten ist mit einem Pfeil markiert. HE-Färbung.**



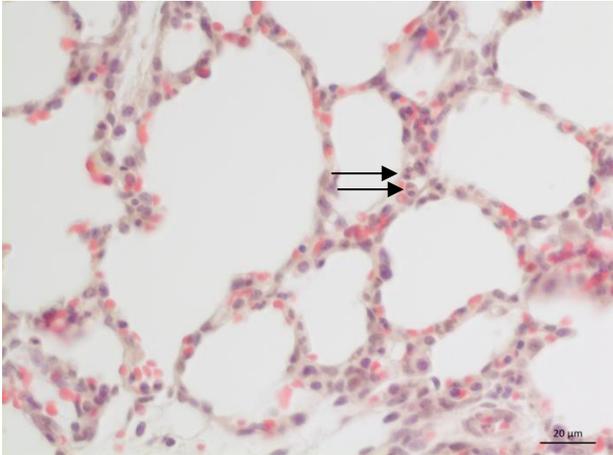
**Kontrolle**



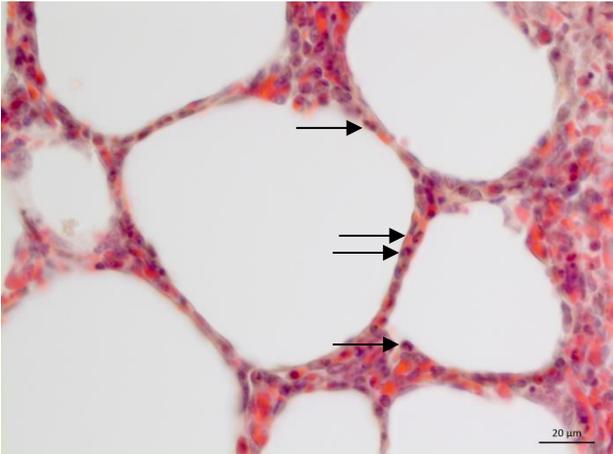
**Kontrolle + Minocyclin**



**HLM**



**HLM + Minocyclin**



**pulsatile HLM**

### 4.3.2 Apoptose-induzierender Faktor (AIF)

Der Apoptose-induzierende Faktor (AIF) wurde in diesem Experiment als Marker für den programmierten Zelltod auf Caspase-unabhängigem Weg genutzt (vgl. 2.3.1). Es wurden alle rot angefärbten Zellkerne als positiv, alle blau angefärbten Zellkerne als negativ gewertet.

#### 4.3.2.1 AIF in den Alveolen

Der Anteil der AIF-positiven Zellkerne in den Alveolarsepten war in allen Gruppen signifikant ( $p < 0,05$ ) höher als in der Kontroll-Gruppe. Minocyclin und der pulsatile Blutfluss hatten im Vergleich zur HLM-Gruppe keinen Einfluss auf die Anzahl der AIF-positiven Zellkerne. Allerdings erhöhte Minocyclin unter Kontrollbedingungen signifikant den Anteil AIF positiver Zellkerne.

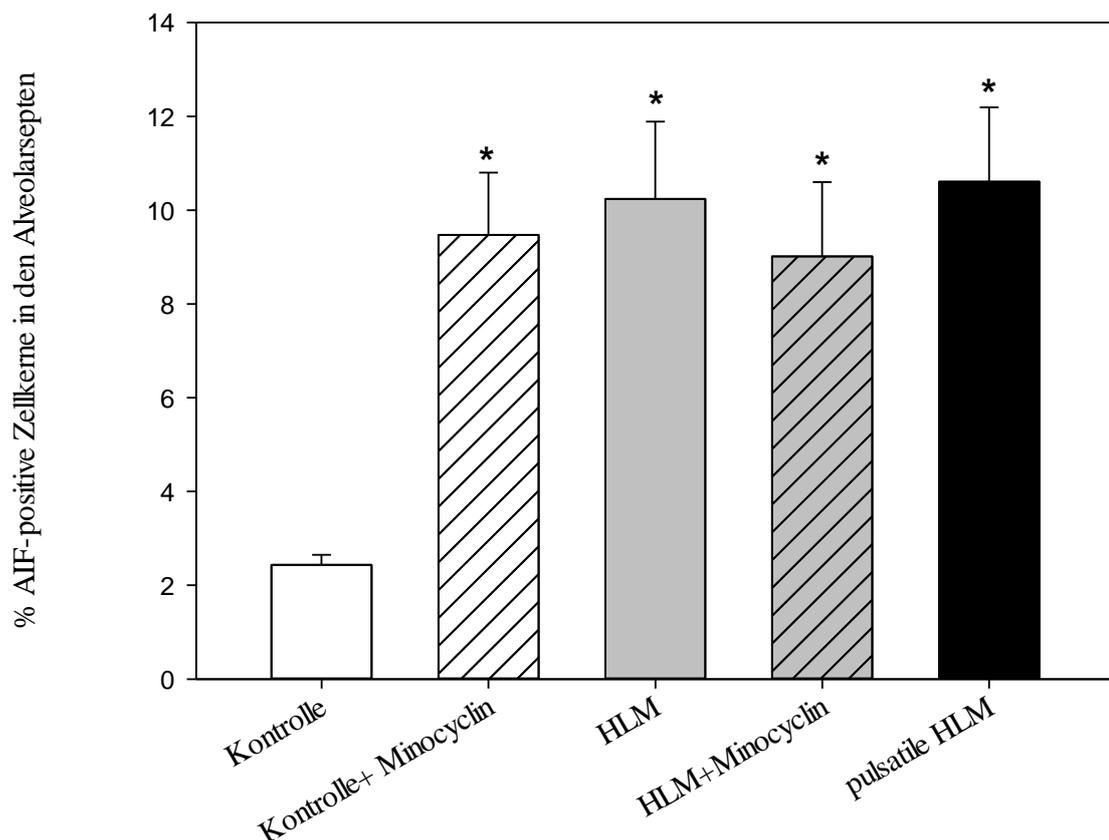
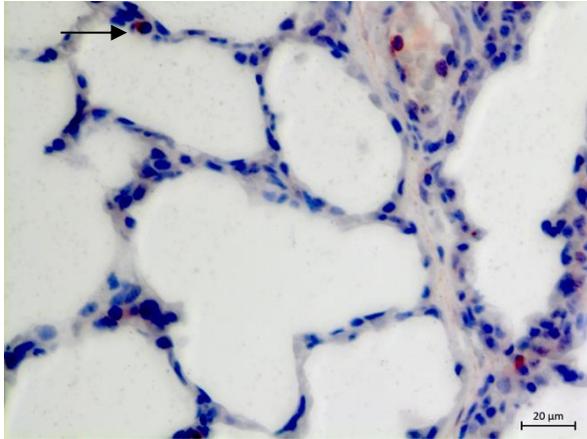
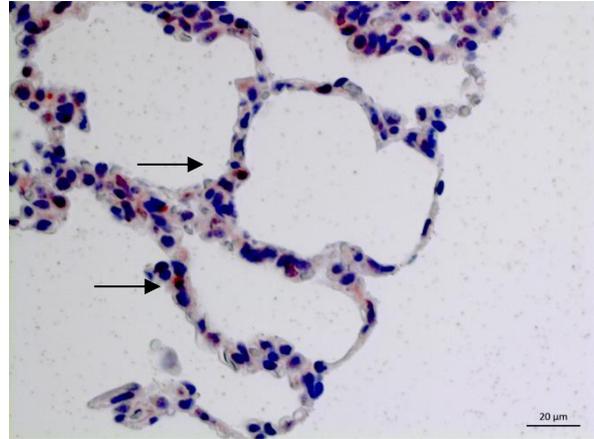


Abbildung 12: Apoptose-induzierender Faktor (AIF): Prozentualer Anteil an positiven Zellkernen in den Alveolarsepten in %. \* Signifikanz gegenüber der Kontroll-Gruppe ( $p < 0,05$ )

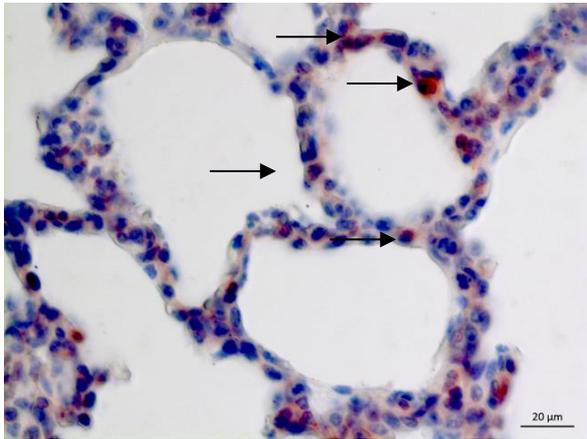
**Abbildung 13: Histologische Darstellung des Lungengewebes in den verschiedenen Versuchsgruppen. Ein Beispiel für ein Alveolareseptum mit einem AIF-positiven Zellkern ist mit einem Pfeil markiert. AIF-Färbung.**



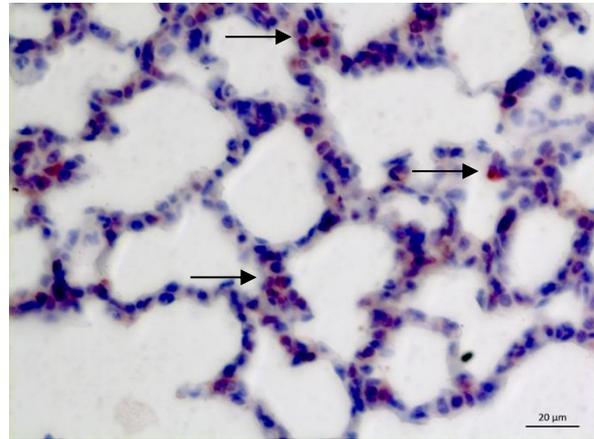
**Kontrolle**



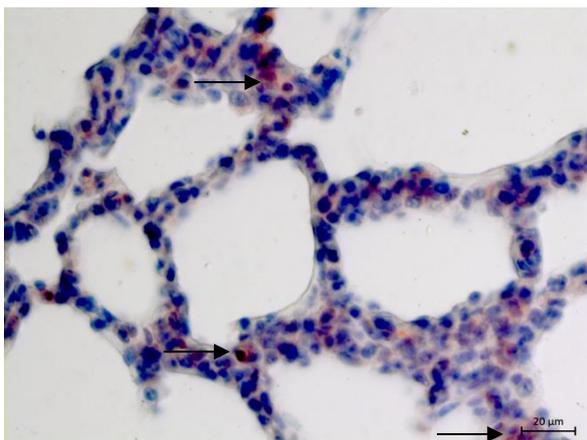
**Kontrolle + Minocyclin**



**HLM**



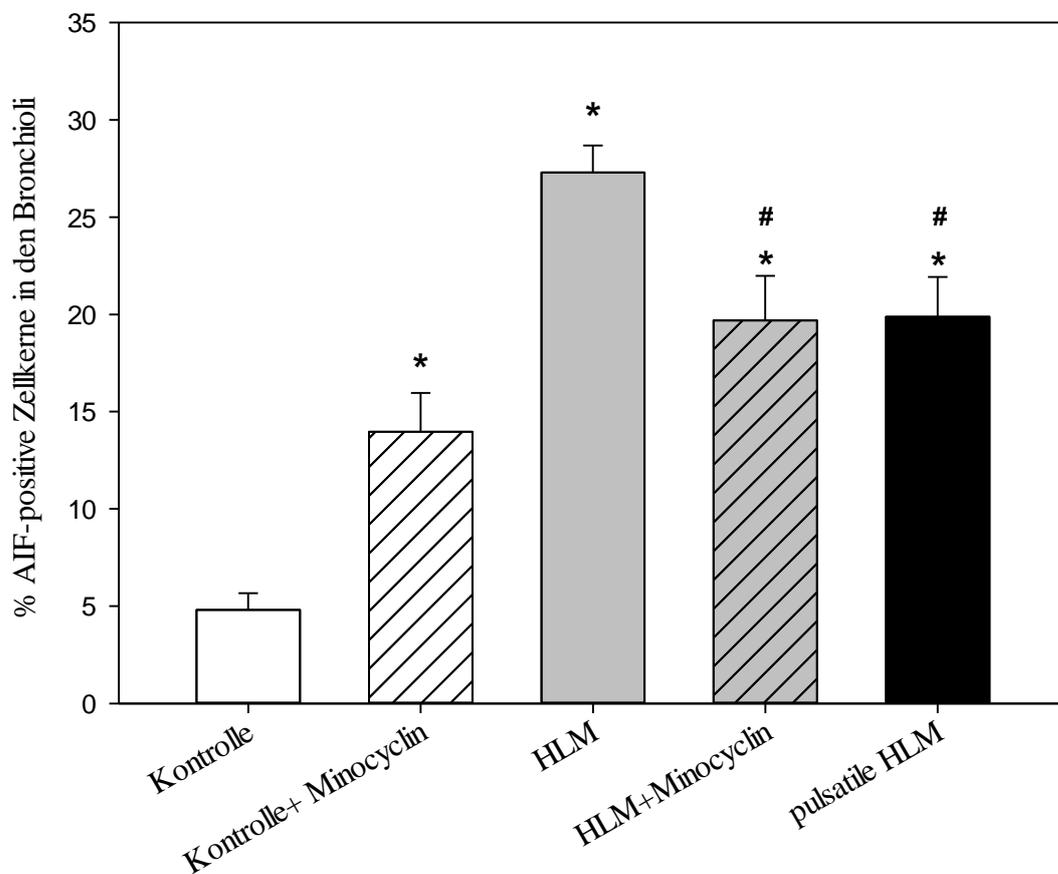
**HLM + Minocyclin**



**pulsatile HLM**

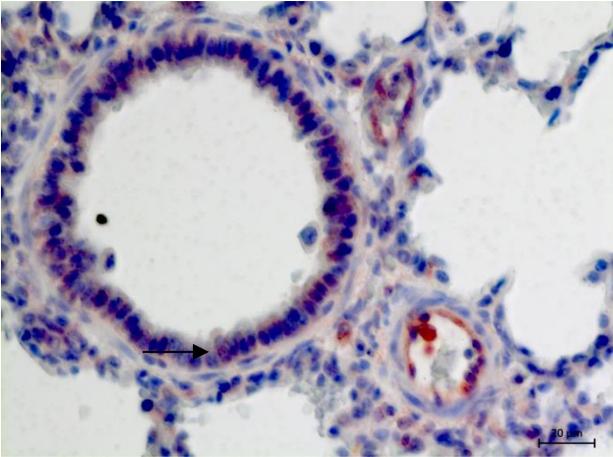
#### 4.3.2.2 AIF in den Bronchioli

Der Anteil der AIF-positiven Zellkerne im Epithel der Bronchioli war in allen Gruppen signifikant ( $p < 0,05$ ) höher als in der Kontroll-Gruppe. Minocyclin hatte schon unter Kontrollbedingungen einen signifikanten ( $p < 0,05$ ) Einfluss auf die Zunahme positiv angefarbter Zellkerne. Während der HLM führte Minocyclin hingegen zu einem signifikanten Abfall ( $p < 0,05$ ) der positiv angefarbten Zellkerne. Ebenso führte der pulsatile Blutfluss während der HLM zu einer signifikanten Abnahme ( $p < 0,05$ ) der AIF-positiven Zellkerne.

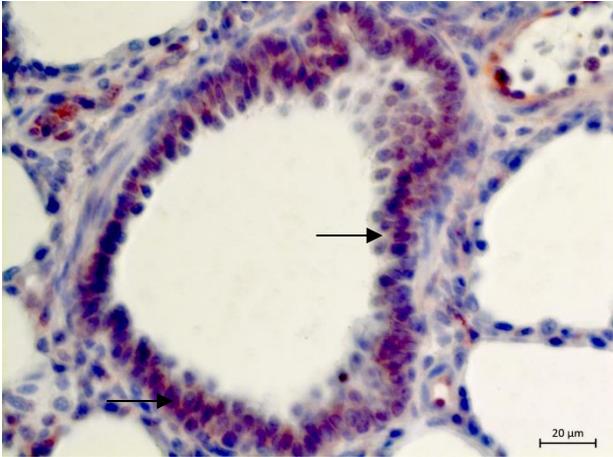


**Abbildung 14: Apoptose-induzierender Faktor (AIF): Prozentualer Anteil an positiven Zellkernen in den Bronchioli in %.** \* Signifikanz gegenüber der Kontroll-Gruppe ( $p < 0,05$ ) # Signifikanz gegenüber Herz-Lungen-Maschine-Gruppe ( $p < 0,05$ )

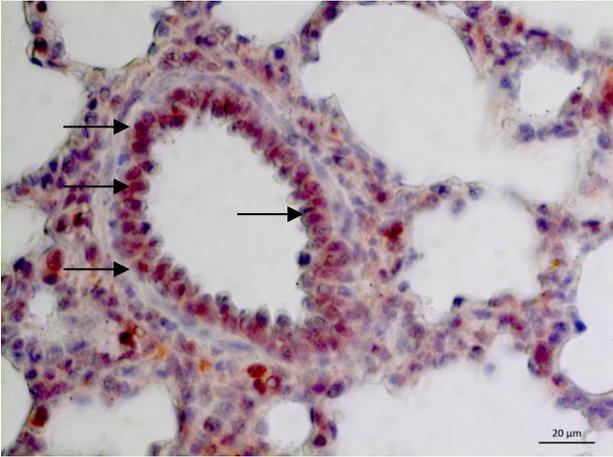
**Abbildung 15: Histologische Darstellung des Lungengewebes in den verschiedenen Versuchsgruppen. Ein Beispiel für einen Bronchiolus mit einem AIF-positiven Zellkern ist mit einem Pfeil markiert. AIF-Färbung.**



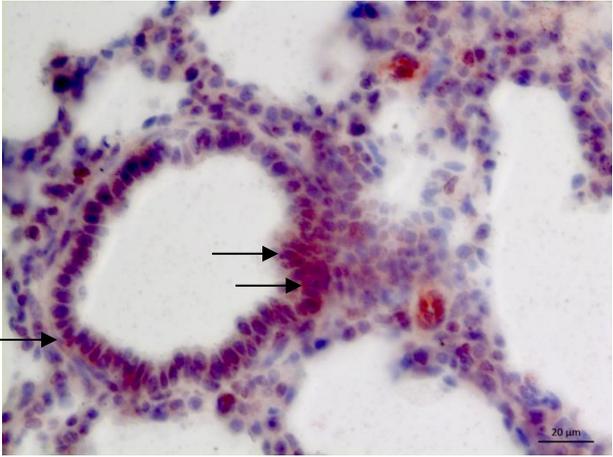
**Kontrolle**



**Kontrolle + Minocyclin**



**HLM**



**HLM + Minocyclin**



**pulsatile HLM**

### 4.3.2.3 AIF in den Gefäßen

Der Anteil AIF-positiver Endothelzellen war in der HLM+Minocyclin-Gruppe geringer als in der HLM-Gruppe. In der Pulsatilen-HLM-Gruppe zeigte sich eine Erhöhung der AIF-positiven Endothelzellen im Vergleich zur HLM-Gruppe. Diese Unterschiede wiesen keine statistische Relevanz auf.

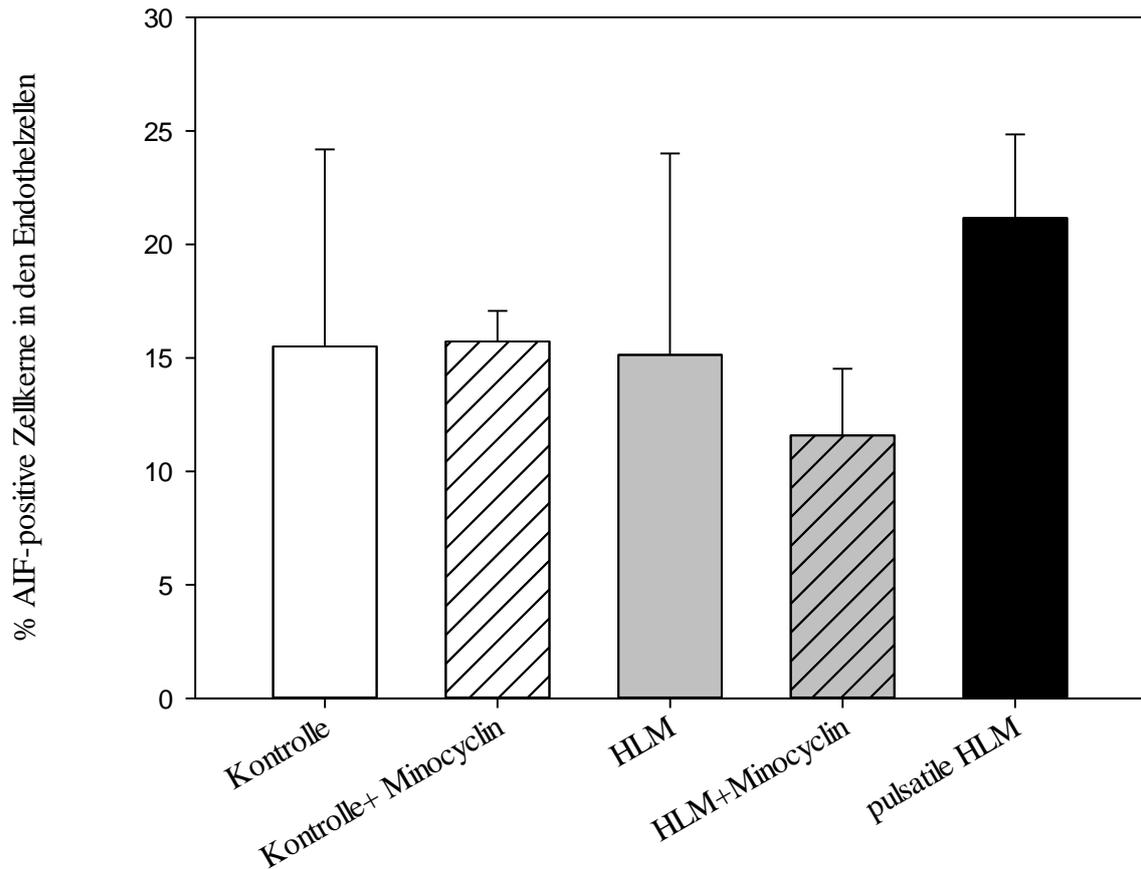
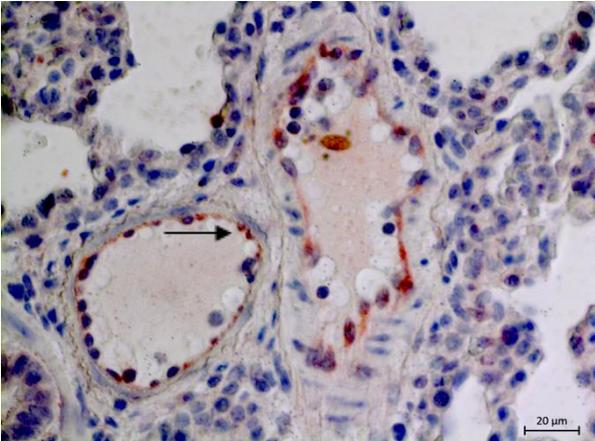
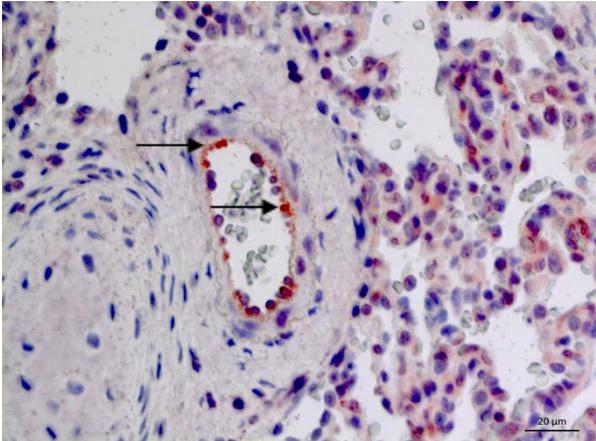


Abbildung 16: Apoptose-induzierender Faktor (AIF): Prozentualer Anteil an positiven Zellkernen in den Endothelzellen in %.

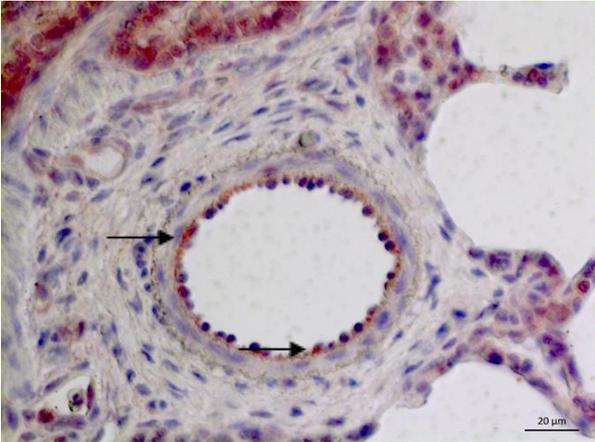
**Abbildung 17: Histologische Darstellung des Lungengewebes in den verschiedenen Versuchsgruppen. Ein Beispiel für ein Gefäß mit einem AIF-positiven Endothelzellkern ist mit einem Pfeil markiert. AIF-Färbung.**



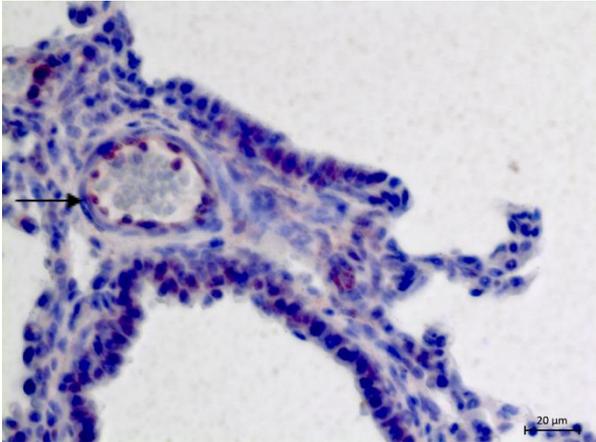
**Kontrolle**



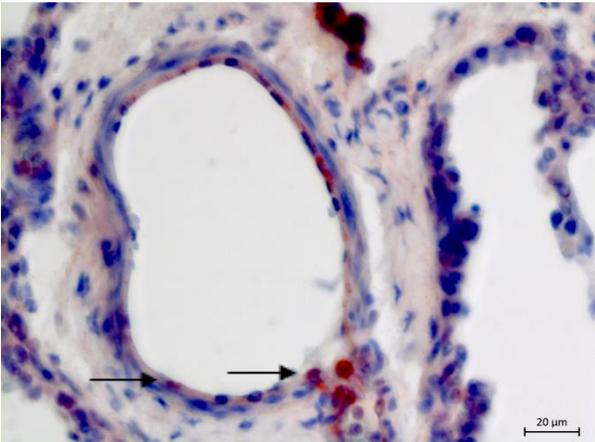
**Kontrolle + Minocyclin**



**HLM**



**HLM + Minocyclin**



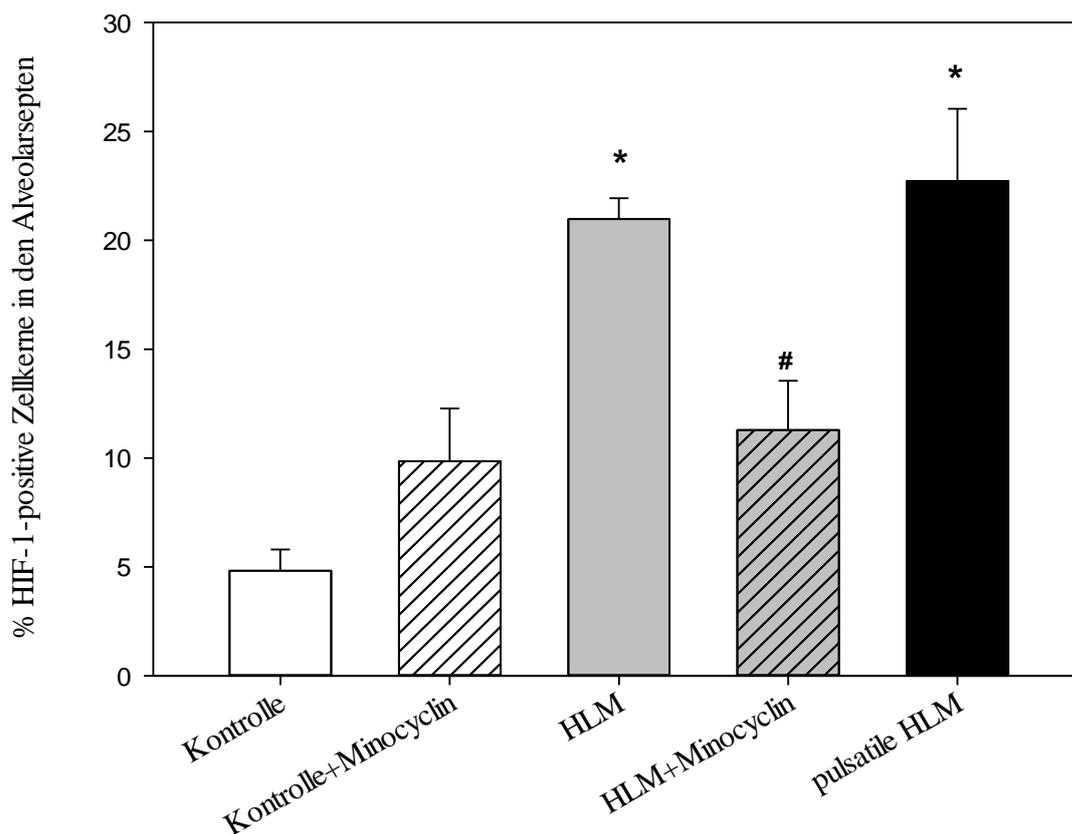
**pulsatile HLM**

### 4.3.3 Hypoxie-induzierter Faktor 1 (HIF-1)

Der Hypoxie-induzierte Faktor (HIF-1) ist bei Hypoxie aktiv und reguliert über eine Induktion der Angiogenese und Vaskularisierung die Sauerstoffversorgung des Organismus (vgl. 2.3.2). Die rot angefärbten Zellkerne wurden als HIF-1 positiv gezählt.

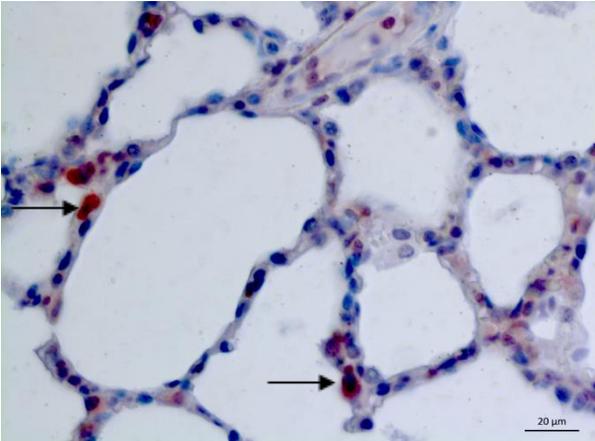
#### 4.3.3.1 HIF-1 in den Alveolen

Die HLM-Gruppe wies in den Alveolarsepten einen signifikant ( $p < 0,05$ ) höheren Anteil an HIF-1-positiven Zellkernen auf als die Kontroll-Gruppe. Im Vergleich zur Kontroll-Gruppe hatte auch die Pulsatile-HLM-Gruppe signifikant ( $p < 0,05$ ) mehr positiv angefärbte Zellkerne. Der pulsatile Blutfluss verminderte im Vergleich zur HLM-Gruppe den Prozentsatz der HIF-1-positiven Zellkerne nicht. Minocyclin hingegen führte während der HLM zu einer signifikanten ( $p < 0,05$ ) Verminderung der HIF-1-positiven Zellkerne.

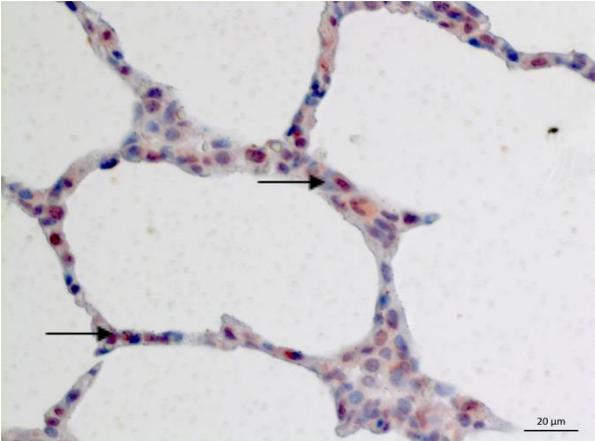


**Abbildung 18: Hypoxie-induzierter Faktor (HIF-1): Prozentualer Anteil an positiven Zellkernen in den Alveolarsepten in %.** \* Signifikanz gegenüber der Kontroll-Gruppe ( $p < 0,05$ ) # Signifikanz gegenüber Herz-Lungen-Maschine-Gruppe ( $p < 0,05$ )

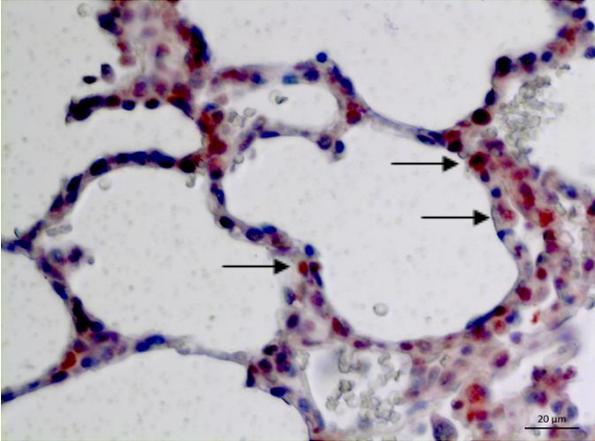
**Abbildung 19: Histologische Darstellung des Lungengewebes in den verschiedenen Versuchsgruppen. Ein Beispiel für ein Alveolarseptum mit einem HIF-1-positiven Zellkern ist mit einem Pfeil markiert. HIF-1-Färbung.**



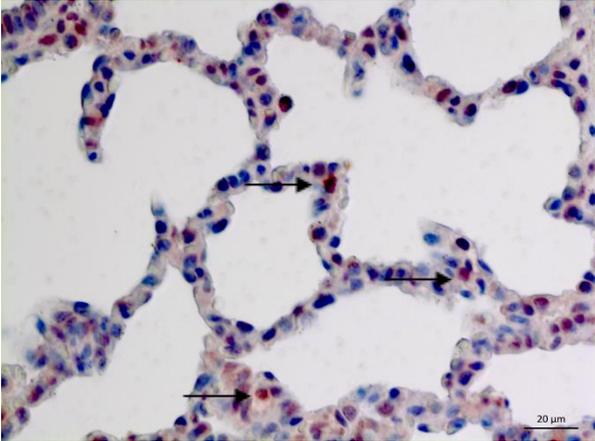
**Kontrolle**



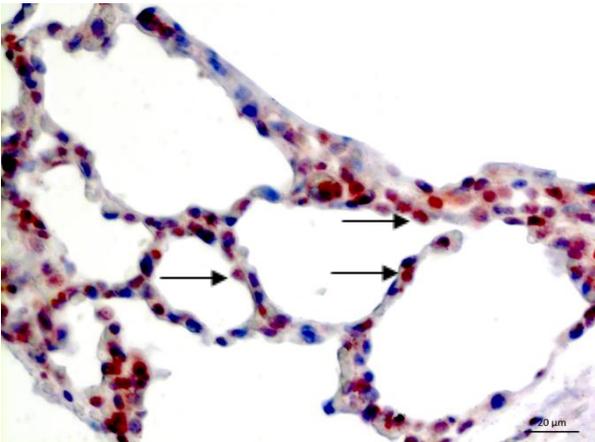
**Kontrolle + Minocyclin**



**HLM**



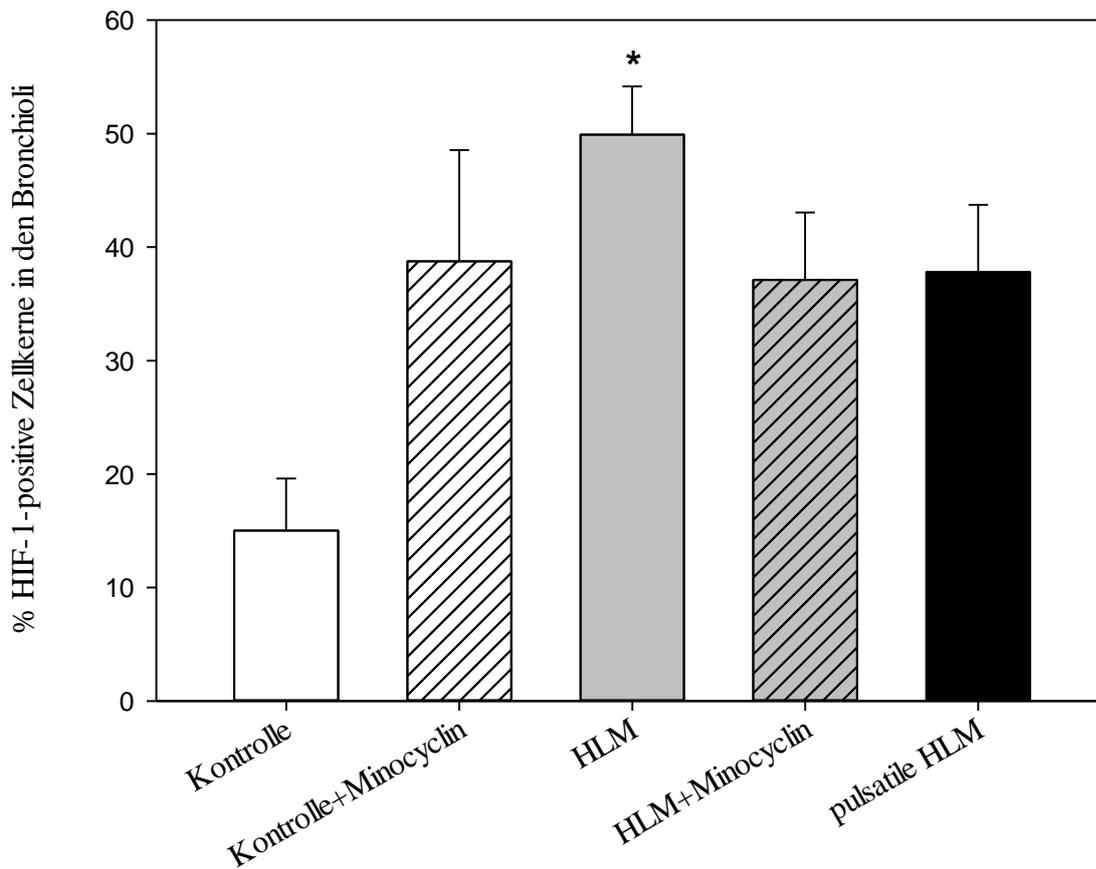
**HLM + Minocyclin**



**pulsatile HLM**

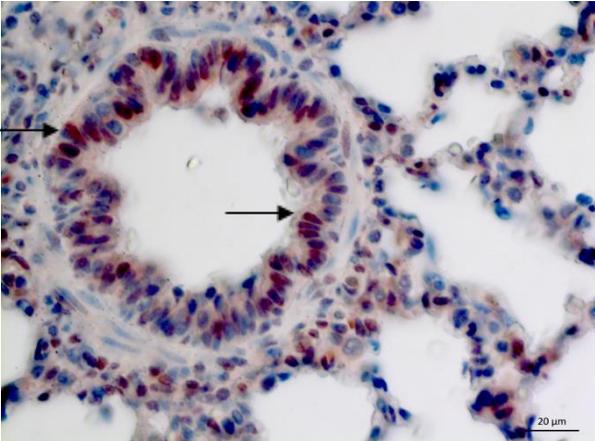
#### 4.3.3.2 HIF-1 in den Bronchioli

Das Epithel der Bronchioli der HLM-Gruppe zeigte eine signifikante Erhöhung ( $p < 0,05$ ) der HIF-1-positiv angefärbten Zellkerne gegenüber der Kontroll-Gruppe. Die anderen Gruppen zeigten Unterschiede zur Kontroll-Gruppe, welche allerdings nicht signifikant waren.

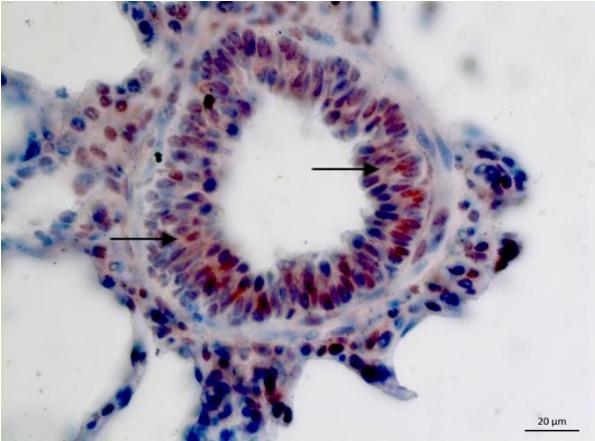


**Abbildung 20: Hypoxie-induzierte Faktor (HIF-1): Prozentualer Anteil an positiven Zellkernen in den Bronchioli in %.** \* Signifikanz gegenüber der Kontroll-Gruppe ( $p < 0,05$ )

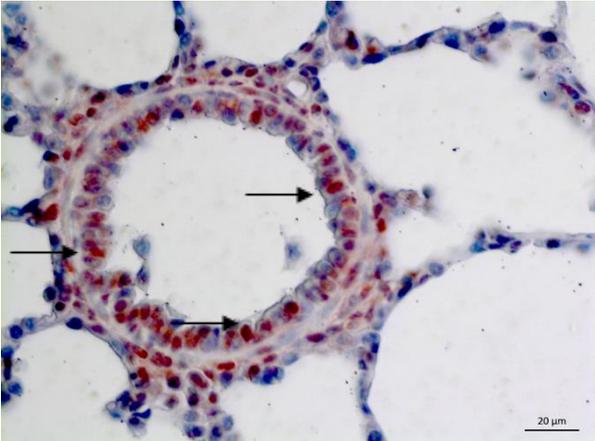
Abbildung 21: Histologische Darstellung des Lungengewebes in den verschiedenen Versuchsgruppen. Ein Beispiel für einen Bronchiolus mit einem HIF-1-positiven Zellkern ist mit einem Pfeil markiert. HIF-1-Färbung.



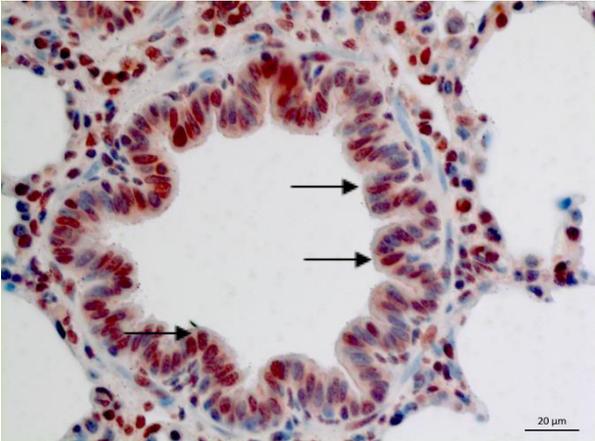
Kontrolle



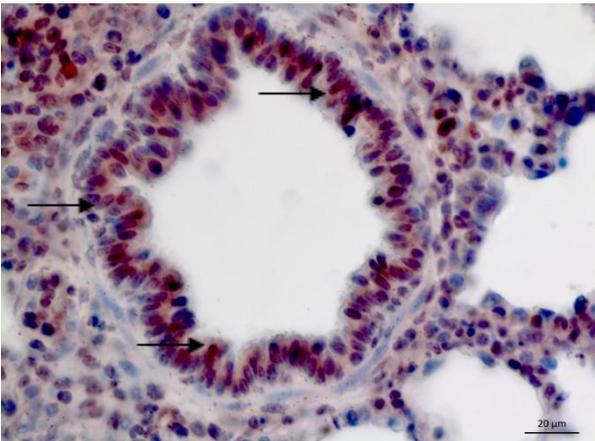
Kontrolle + Minocyclin



HLM



HLM + Minocyclin



pulsatile HLM

### 4.3.3.3 HIF-1 in den Gefäßen

Der Anteil HIF-1-positiver Zellkerne war in der HLM-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe erhöht. Minocyclin und der pulsatile Blutfluss führten zu einer geringen Abnahme der HIF-1-positiven Zellkerne im Vergleich zur HLM-Gruppe. Dabei wiesen diese Unterschiede keine statistische Relevanz auf.

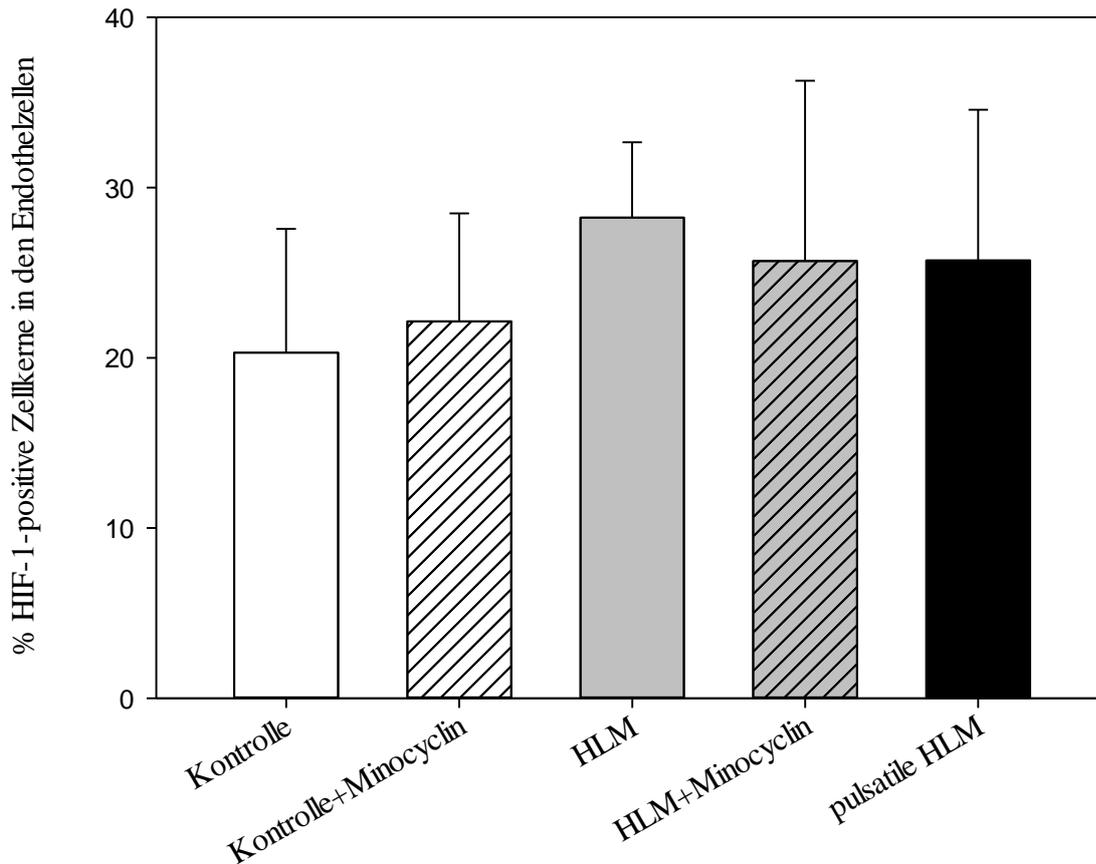
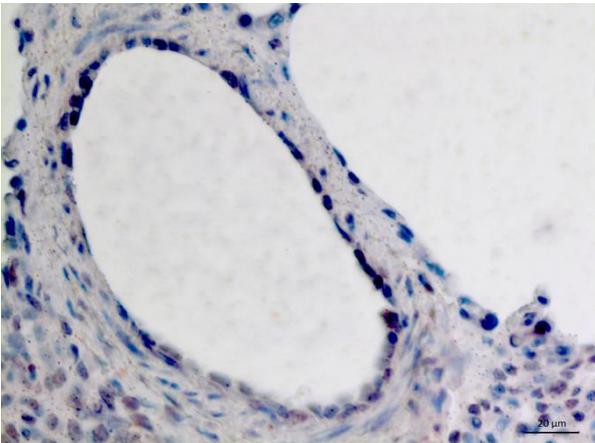
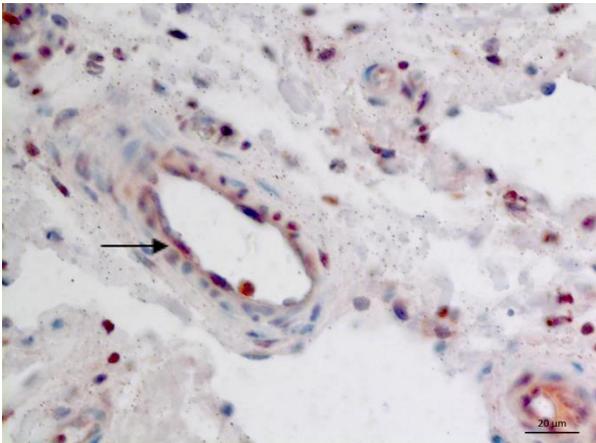


Abbildung 22: Hypoxie-induzierte Faktor (HIF-1): Prozentualer Anteil an positiven Zellkernen in den Endothelzellen in %.

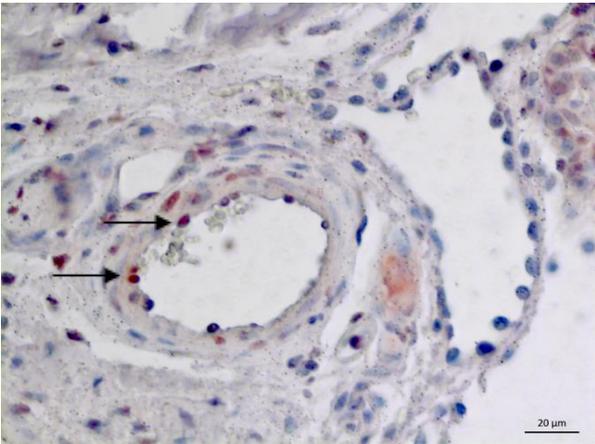
**Abbildung 23: Histologische Darstellung des Lungengewebes in den verschiedenen Versuchsgruppen. Ein Beispiel für ein Gefäß mit einem HIF-1-positiven Endothelzellkern ist mit einem Pfeil markiert. HIF-1-Färbung.**



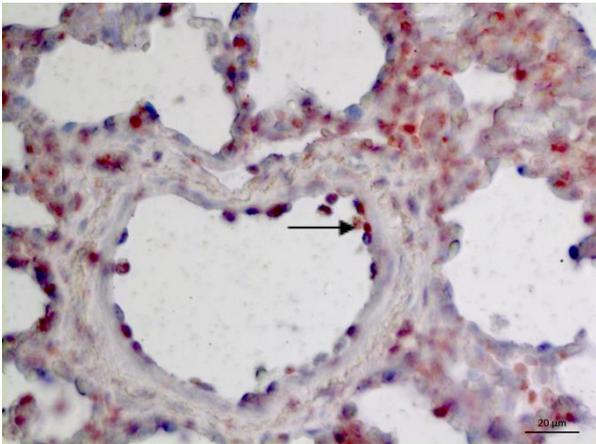
**Kontrolle**



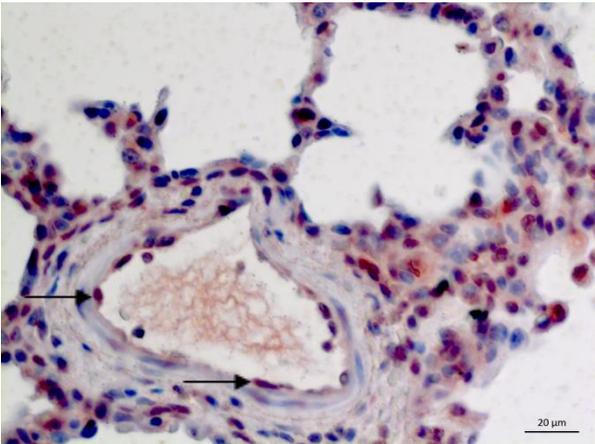
**Kontrolle + Minocyclin**



**HLM**



**HLM + Minocyclin**



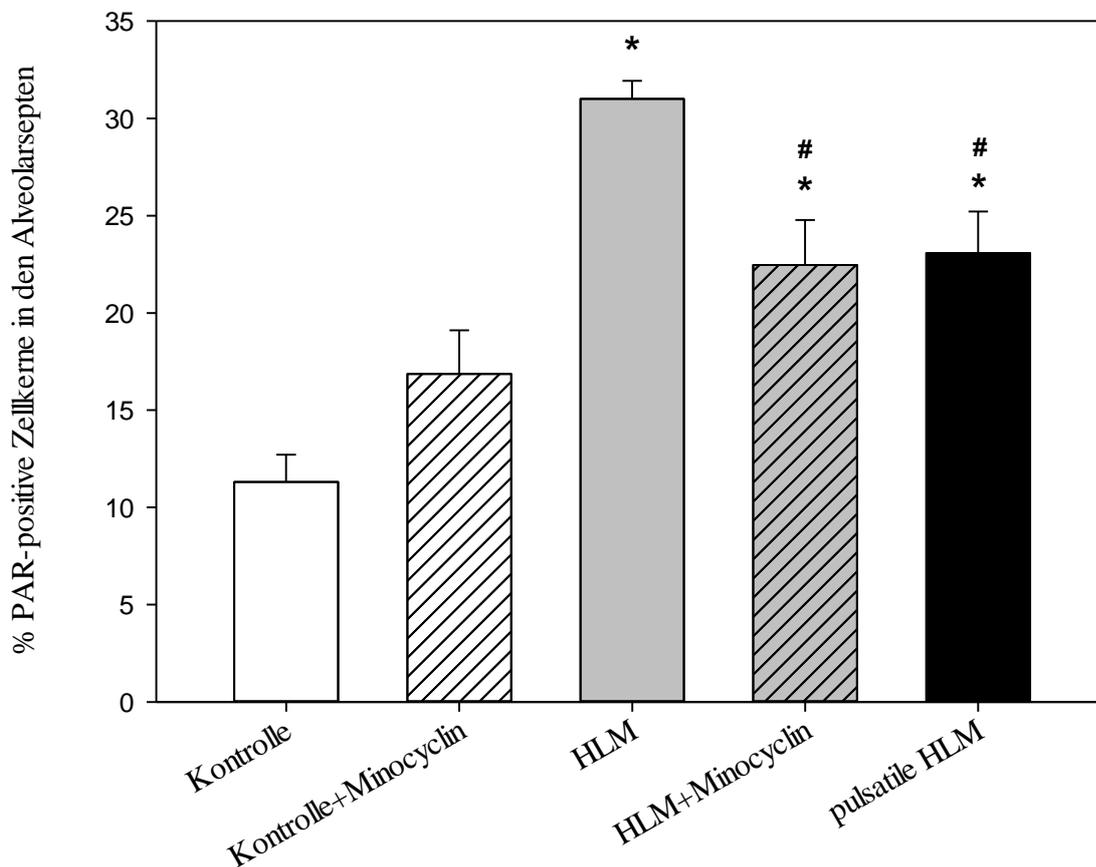
**pulsatile HLM**

#### 4.3.4 Poly (ADP) Ribose (PAR)

PAR ist ein Marker für die Aktivierung von PARP sowie die Präsenz von DNA-Strangbrüchen (vgl. 2.3.3). PAR-positive Zellkerne wiesen eine rote Kernfärbung auf.

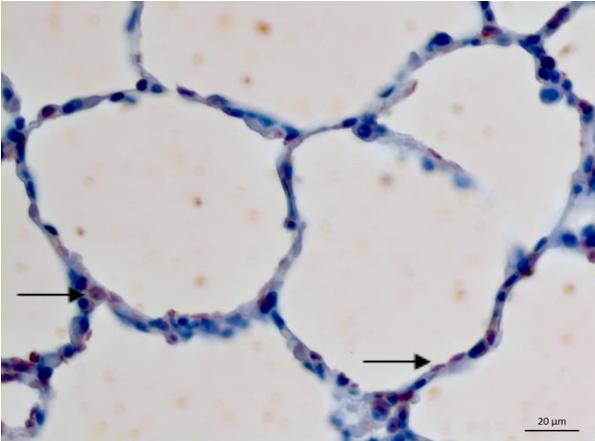
##### 4.3.4.1 PAR in den Alveolen

Die HLM-, die HLM+Minocyclin- und die Pulsatile-HLM-Gruppe in den Alveolarsepten zeigten einen signifikant ( $p < 0,05$ ) höheren Anteil an PAR-positiven Zellkernen als die Kontroll-Gruppe. Während der HLM führte Minocyclin und der pulsatile Blutfluss, verglichen mit der HLM-Gruppe, zu einer signifikanten Abnahme ( $p < 0,05$ ) der PAR-positiven Zellkerne.

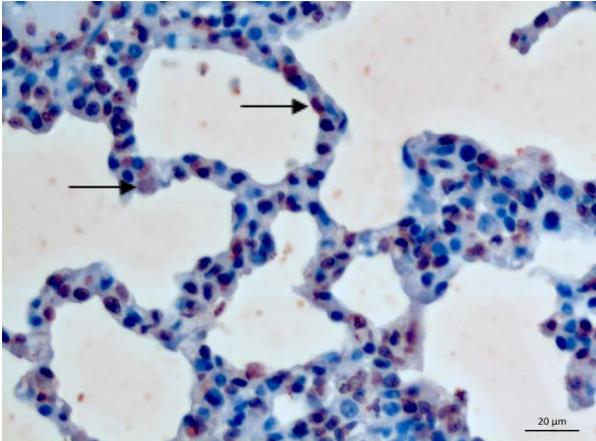


**Abbildung 24: Poly (ADP) Ribose: Prozentualer Anteil an positiven Zellkernen in den Alveolarsepten in %.** \* Signifikanz gegenüber der Kontroll-Gruppe ( $p < 0,05$ ) # Signifikanz gegenüber Herz-Lungen-Maschine-Gruppe ( $p < 0,05$ )

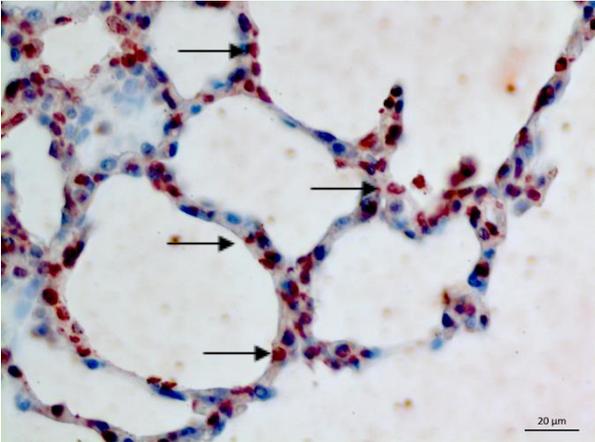
**Abbildung 25: Histologische Darstellung des Lungengewebes in den verschiedenen Versuchsgruppen. Ein Beispiel für ein Alveolarseptum mit einem PAR-positiven Zellkern ist mit einem Pfeil markiert. PAR-Färbung.**



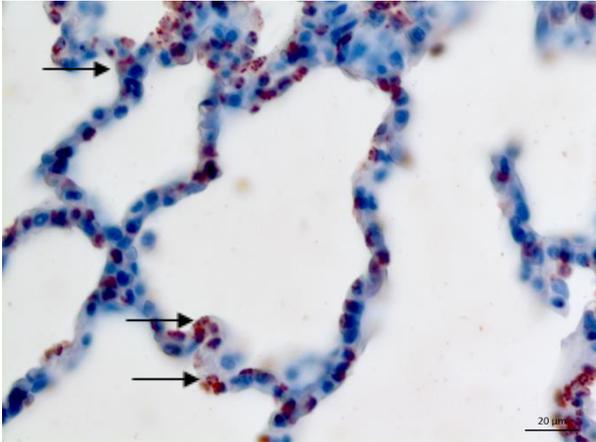
**Kontrolle**



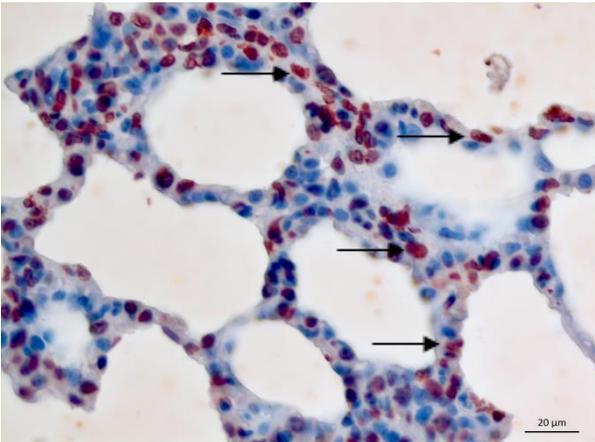
**Kontrolle + Minocyclin**



**HLM**



**HLM + Minocyclin**



**pulsatile HLM**

#### 4.3.4.2 PAR in den Bronchioli

In den Gruppen, die an die HLM angeschlossen waren, wies das Epithel der Bronchioli einen höheren Anteil PAR-positiver Zellkerne auf als bei der Kontroll-Gruppe. Minocyclin führte unter Kontrollbedingungen zu einem Anstieg der positiven Zellkerne. Diese Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant.

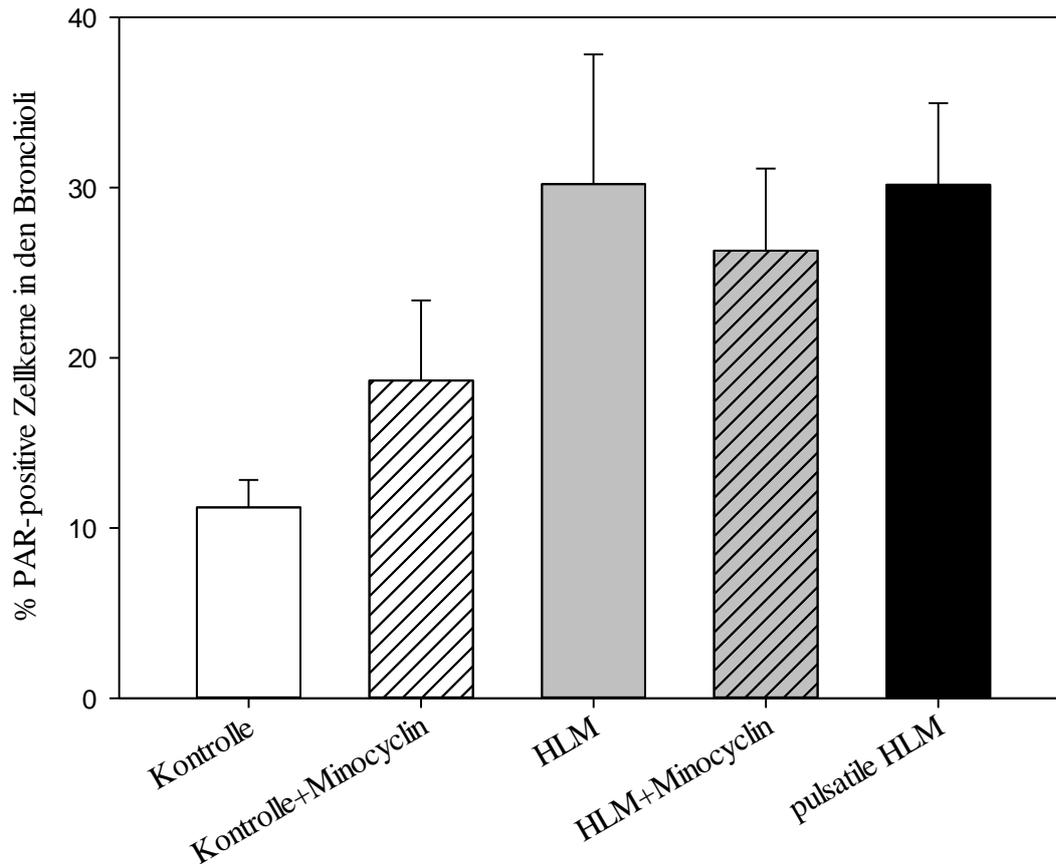
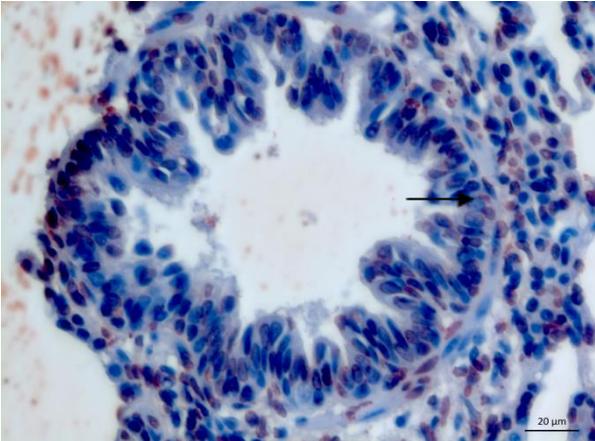
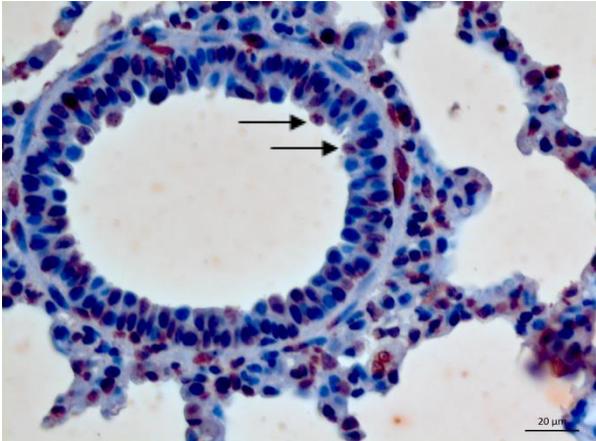


Abbildung 26: Poly (ADP) Ribose: Prozentualer Anteil an positiven Zellkernen in den Bronchioli in %.

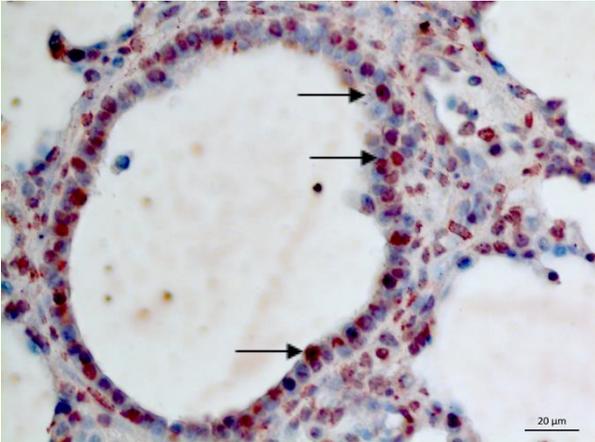
**Abbildung 27: Histologische Darstellung des Lungengewebes in den verschiedenen Versuchsgruppen. Ein Beispiel für einen Bronchiolus mit einem PAR-positiven Zellkern ist mit einem Pfeil markiert. PAR-Färbung.**



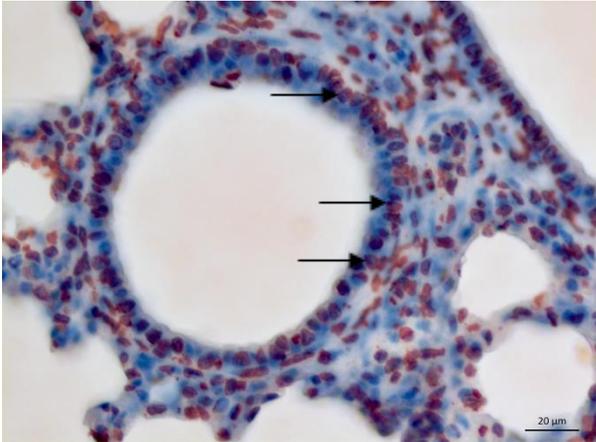
**Kontrolle**



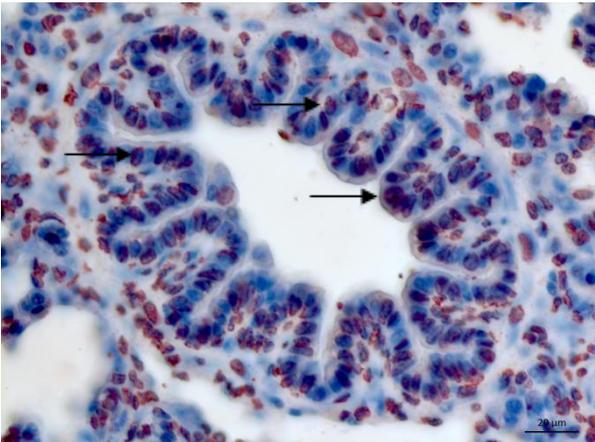
**Kontrolle + Minocyclin**



**HLM**



**HLM + Minocyclin**



**pulsatile HLM**

#### 4.3.4.3 PAR in den Gefäßen

Die HLM-Gruppe hatte mehr PAR-positive Zellkerne in den Endothelzellen als die Kontroll-Gruppe. In der HLM+Minocyclin-Gruppe kam es, verglichen zur HLM-Gruppe, zur Erhöhung der PAR-positiven Zellkerne im Endothelgewebe. Diese Unterschiede erreichten kein statistisches Signifikanzniveau. Der Anteil der PAR-positiven Zellkerne war in der Pulsatilen-HLM-Gruppe ähnlich der HLM-Gruppe.

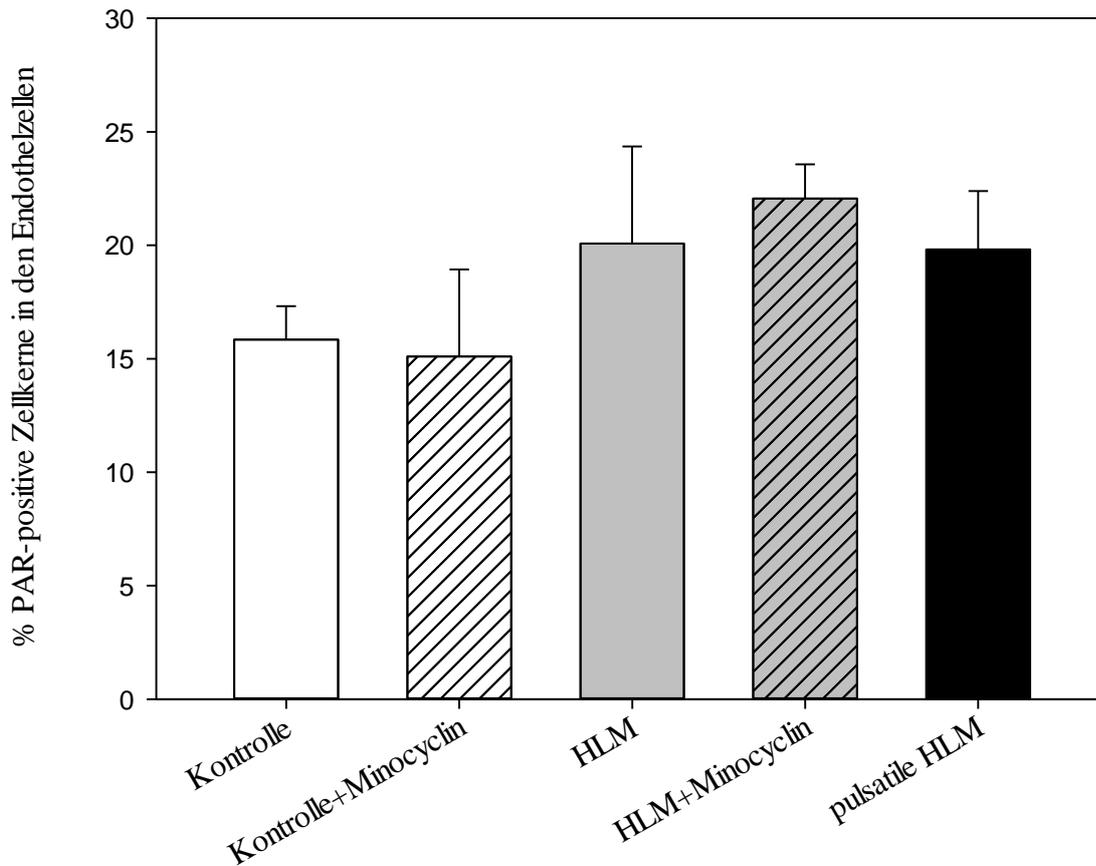
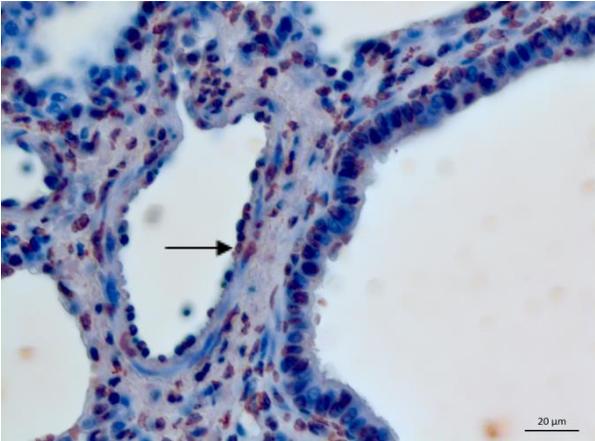
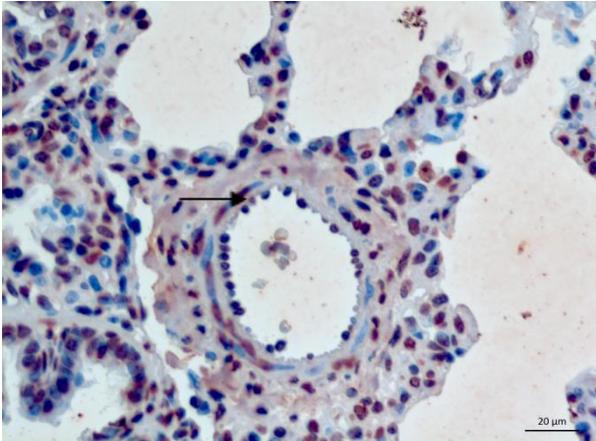


Abbildung 28: Poly(ADP)Ribose: Prozentualer Anteil an positiven Zellkernen in den Endothelzellen in %.

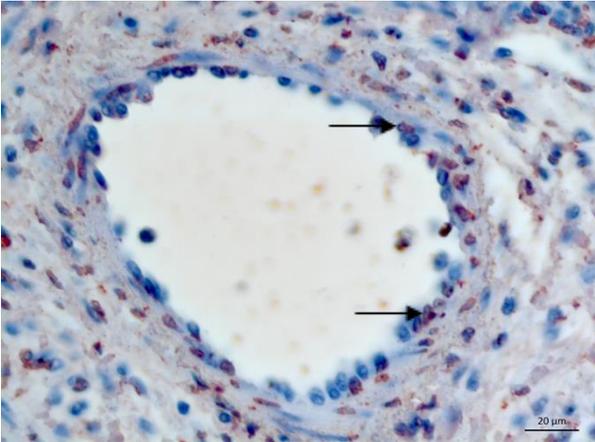
**Abbildung 29: Histologische Darstellung des Lungengewebes in den verschiedenen Versuchsgruppen. Ein Beispiel für ein Gefäß mit einem PAR-positiven Endothelzellkern ist mit einem Pfeil markiert. PAR-Färbung.**



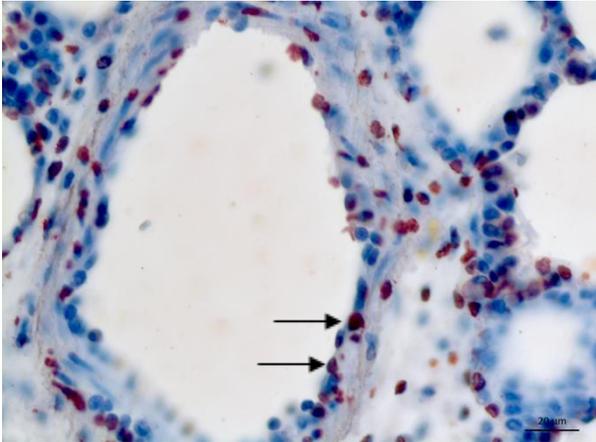
**Kontrolle**



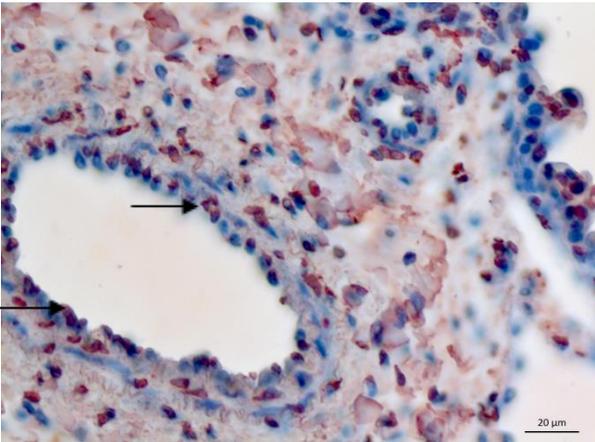
**Kontrolle + Minocyclin**



**HLM**



**HLM + Minocyclin**



**pulsatile HLM**

### 4.3.5 Cleaved Caspase 3

Die Cleaved Caspase 3 ist ein Marker für den programmierten Zelltod (vgl. 2.3.4). Rot angefärbte Zellkerne waren Cleaved Caspase 3 positiv, blau angefärbte Zellkerne waren negativ.

#### 4.3.5.1 Cleaved Caspase 3 in den Alveolen

Die HLM-, die HLM+Minocyclin- und die Pulsatile-HLM-Gruppe hatten signifikant ( $p < 0,05$ ) mehr Cleaved Caspase 3-positive Zellkerne als die Kontroll-Gruppe. Minocyclin konnte während der HLM, den Anteil Cleaved Caspase 3-positiver Zellkerne geringgradig, aber nicht signifikant, gegenüber der HLM-Gruppe senken. Der pulsatile Blutfluss hingegen führte im Vergleich zur HLM-Gruppe zu einem kleinen, nicht signifikanten Anstieg Cleaved Caspase 3-positiver Zellkerne. Unter Kontrollbedingungen zeigte sich eine geringgradige, aber nicht signifikante Erhöhung der Cleaved Caspase 3-positiven Zellkerne durch Minocyclin.

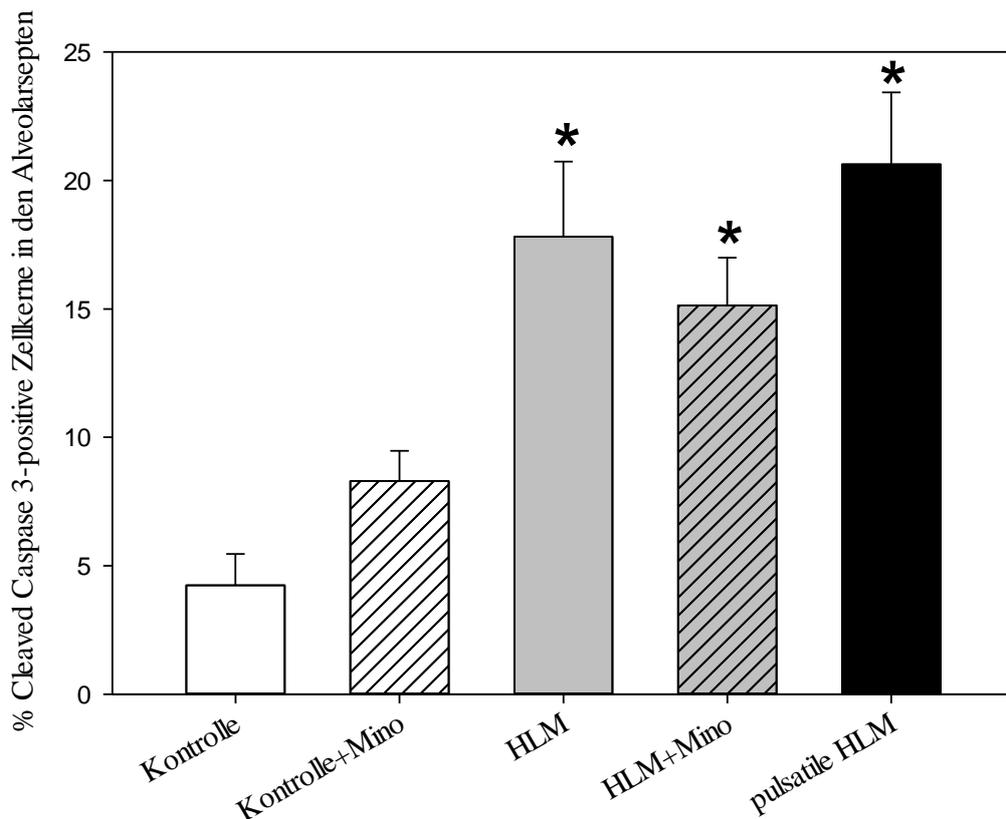
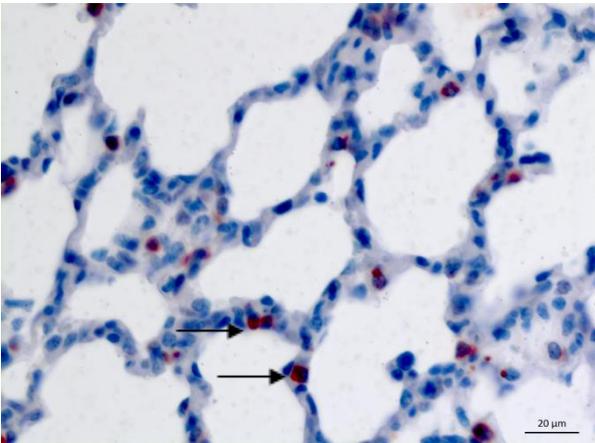


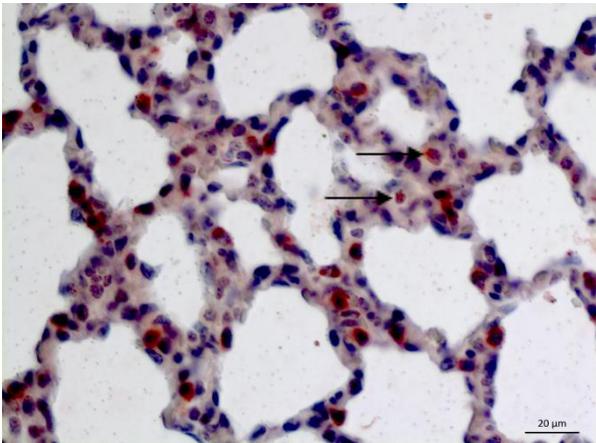
Abbildung 30: Cleaved Caspase 3: Prozentualer Anteil an positiven Zellkernen in den Alveolen in %.

\* Signifikanz gegenüber der Kontroll-Gruppe ( $p < 0,05$ )

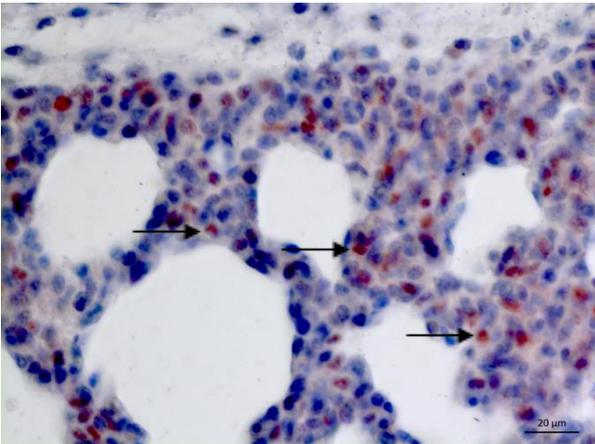
**Abbildung 31: Histologische Darstellung des Lungengewebes in den verschiedenen Versuchsgruppen. Ein Beispiel für ein Alveolareseptum mit einem Cleaved Caspase 3-positiven Zellkern ist mit einem Pfeil markiert. Cleaved Caspase 3-Färbung.**



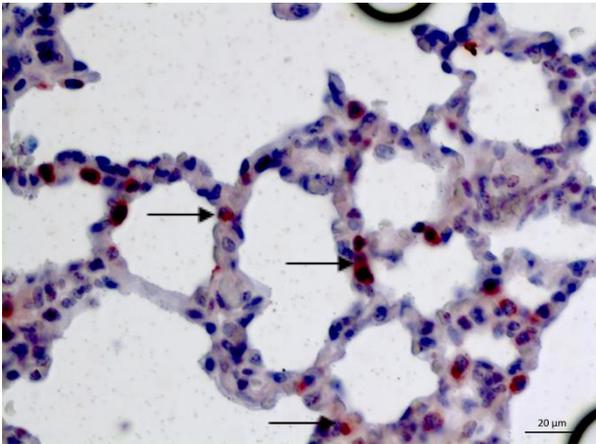
**Kontrolle**



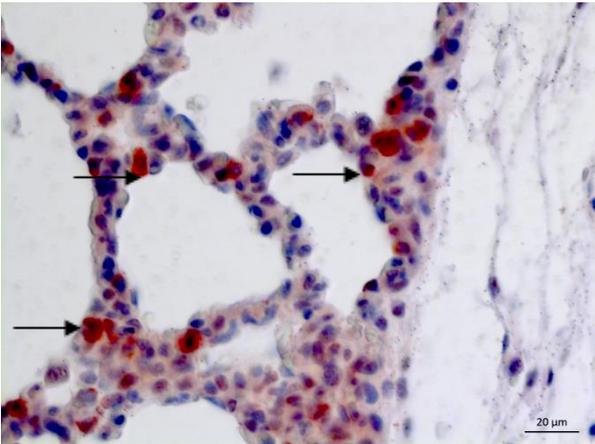
**Kontrolle + Minocyclin**



**HLM**



**HLM + Minocyclin**



**pulsatile HLM**

#### 4.3.5.2 Cleaved Caspase 3 in den Bronchioli

Der Anteil der Cleaved Caspase 3-positiven Zellkerne war in der Kontrolle+Minocyclin-, HLM-, HLM+Minocyclin- und der Pulsatilen-HLM-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe erhöht. Diese Unterschiede erreichten das statistische Signifikanzniveau nicht. Die HLM+Minocyclin- und die Pulsatile-HLM-Gruppe wiesen weniger Cleaved Caspase 3- positive Zellen als die HLM-Gruppe auf. Dies waren keine signifikanten Unterschiede.

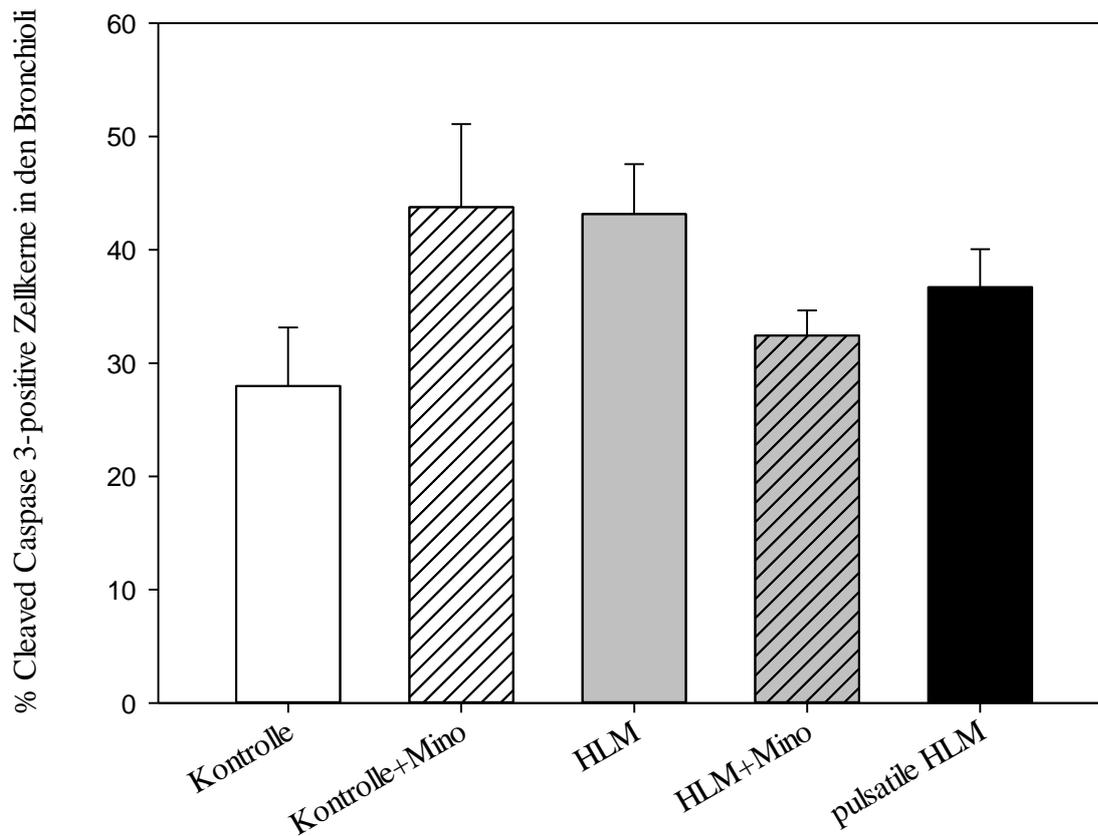
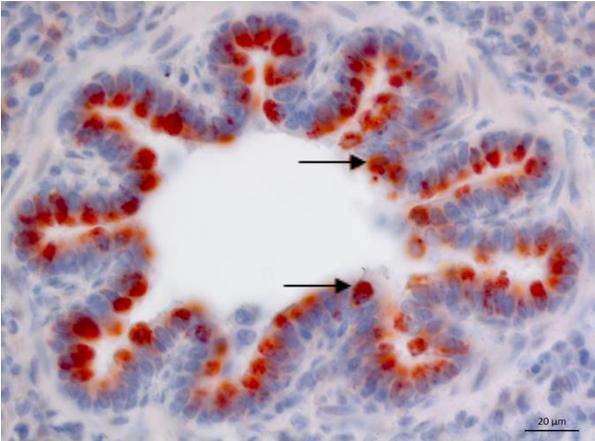
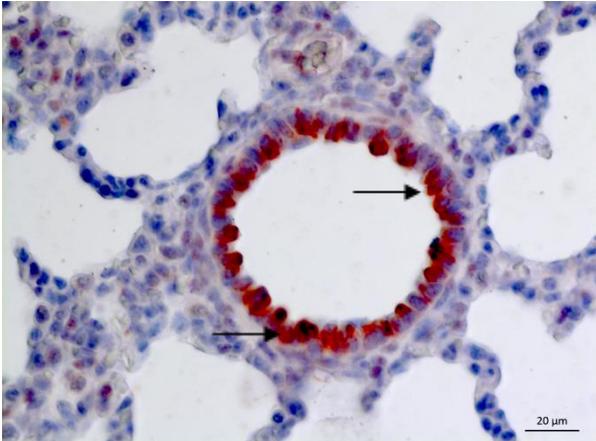


Abbildung 32: Cleaved Caspase 3: Prozentualer Anteil an positiven Zellkernen in den Bronchioli in %.

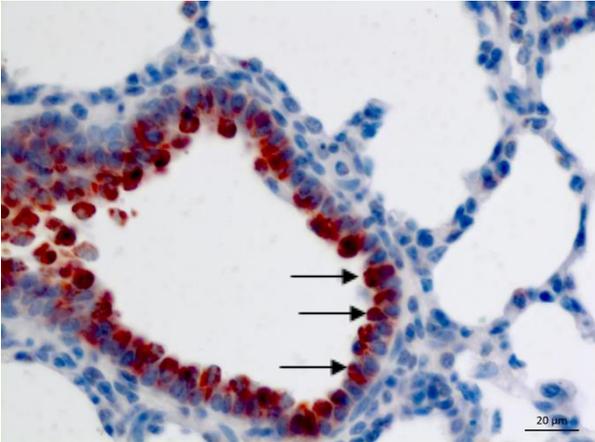
Abbildung 33: Histologische Darstellung des Lungengewebes in den verschiedenen Versuchsgruppen. Ein Beispiel für ein Bronchiolus mit einem Cleaved Caspase 3-positiven Zellkern ist mit einem Pfeil markiert. Cleaved Caspase 3-Färbung.



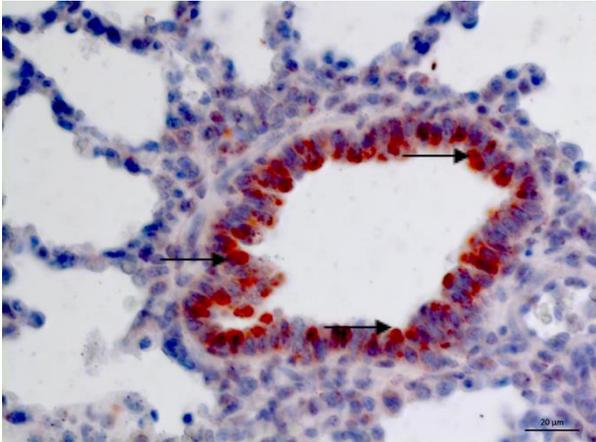
Kontrolle



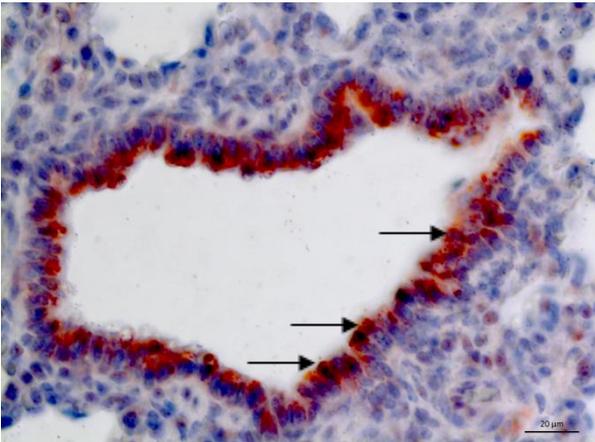
Kontrolle + Minocyclin



HLM



HLM + Minocyclin

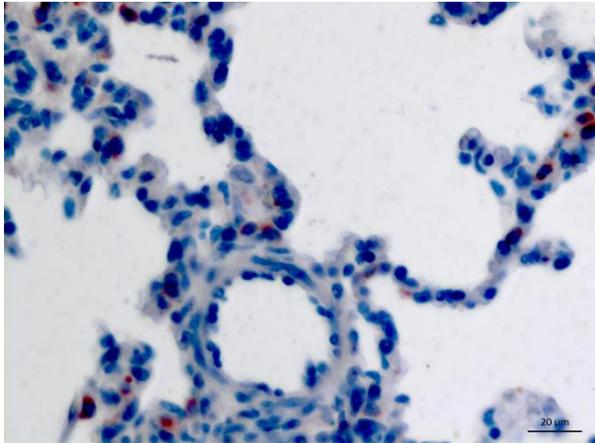


pulsatile HLM

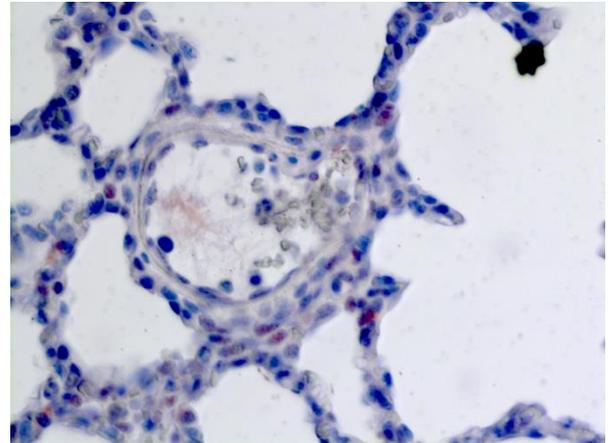
### 4.3.5.3 Cleaved Caspase 3 in den Gefäßen

Das Endothelgewebe war Cleaved Caspase 3 negativ.

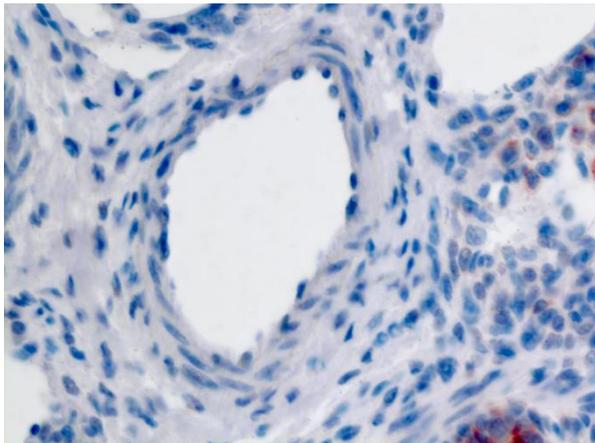
**Abbildung 34: Histologische Darstellung des Lungengewebes in den verschiedenen Versuchsgruppen. Im Endothelgewebe war keine Markierung für Cleaved Caspase 3 nachweisbar. Cleaved Caspase 3-Färbung.**



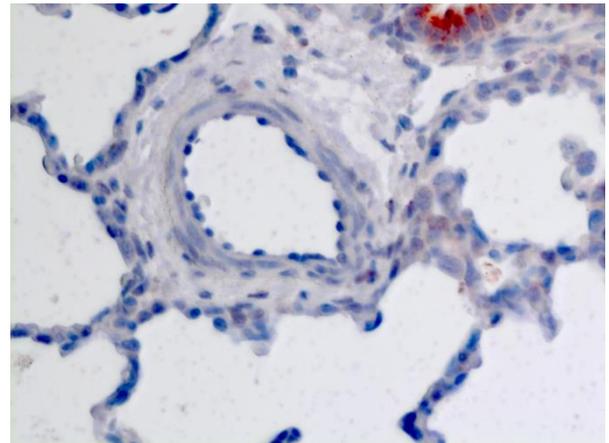
**Kontrolle**



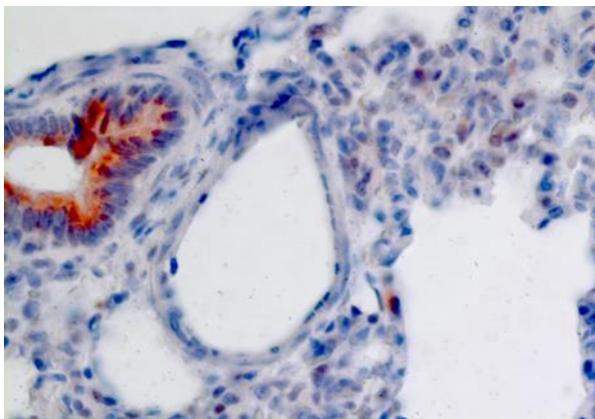
**Kontrolle + Minocyclin**



**HLM**



**HLM + Minocyclin**



**pulsatile HLM**

### 4.3.6 Nitrotyrosin

Nitrotyrosin diente als Marker für nitrosativen Stress (vgl. 2.3.5). Nitrotyrosin war im Zytoplasma lokalisiert und wurde durch das AEC intensiv dunkel rot angefärbt.

#### 4.3.6.1 Nitrotyrosin in den Alveolen

Der Anschluss an eine HLM führte zur Zunahme von Nitrotyrosin im Zytoplasma. Das Nitrotyrosin war von allen Gruppen bei der HLM-Gruppe am höchsten und signifikant ( $p < 0,05$ ) höher als bei der Kontroll-Gruppe. Die HLM+Minocyclin-Gruppe hatte signifikant ( $p < 0,05$ ) mehr positiv angefärbtes Zytoplasma als die Kontroll- und die Kontrolle+Minocyclin-Gruppe. Im Vergleich zur HLM-Gruppe führte Minocyclin signifikant ( $p < 0,05$ ) zur Abnahme des Nitrotyrosin-positiven Zytoplasmas. Die Pulsatile-HLM-Gruppe wies ebenso signifikant ( $p < 0,05$ ) mehr Nitrotyrosin-positive Zellen auf als die Kontroll-Gruppe, aber signifikant ( $p < 0,05$ ) weniger als die HLM-Gruppe. Der pulsatile Blutfluss führte zu einer Abnahme des Nitrotyrosin-positiven Zytoplasmas.

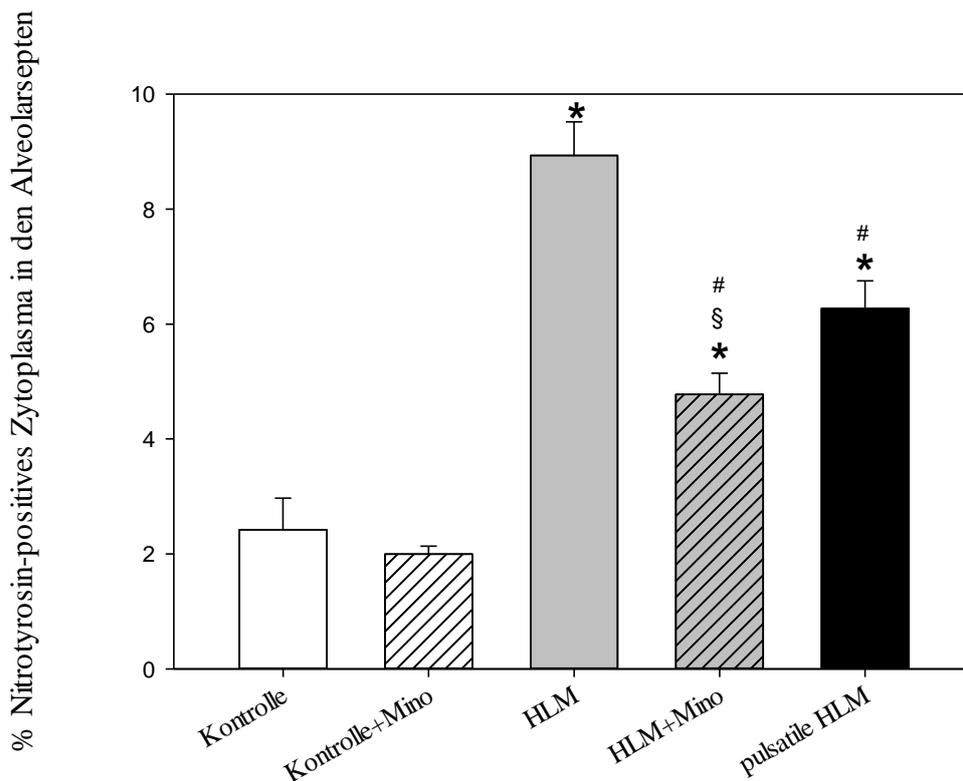
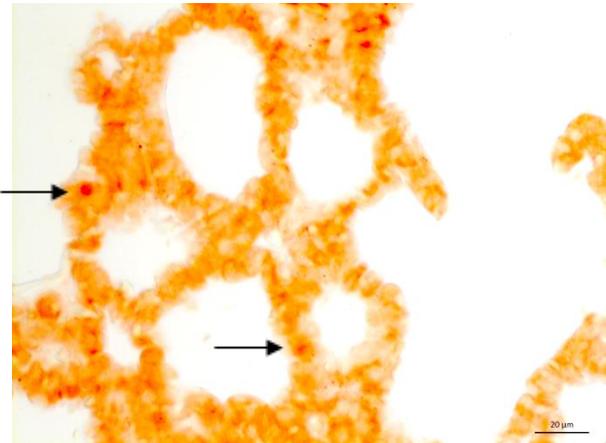


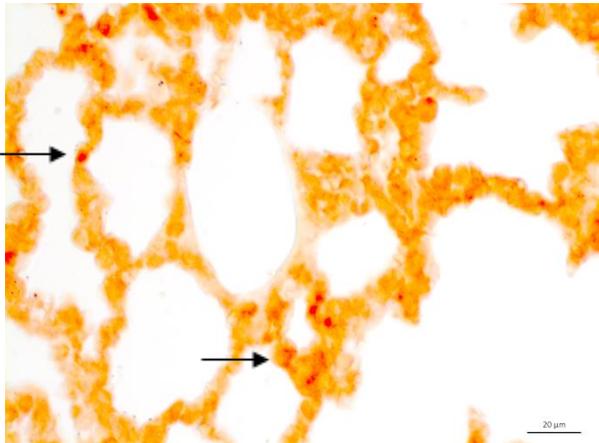
Abbildung 35: Nitrotyrosin: Prozentualer Anteil an positivem Zytoplasma in den Alveolen in %.

\* Signifikanz gegenüber der Kontroll-Gruppe ( $p < 0,05$ ) # Signifikanz gegenüber Herz-Lungen-Maschine-Gruppe ( $p < 0,05$ ) § Signifikanz gegenüber der Kontrolle+Minocyclin-Gruppe ( $p < 0,05$ )

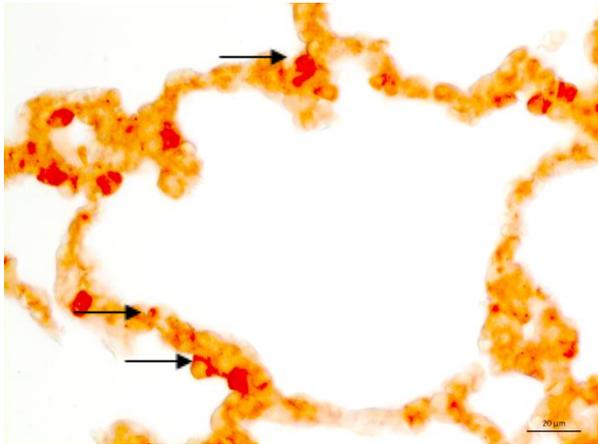
**Abbildung 36: Histologische Darstellung des Lungengewebes in den verschiedenen Versuchsgruppen. Ein Beispiel für ein Alveolareseptum mit einer Nitrotyrosin-positiven Zelle ist mit einem Pfeil markiert. Nitrotyrosin-Färbung.**



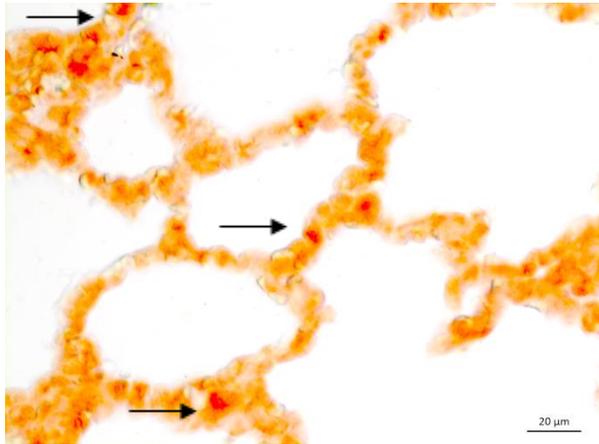
**Kontrolle**



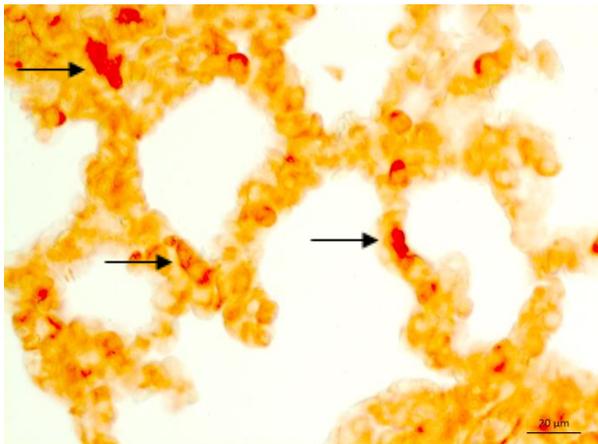
**Kontrolle+Minocyclin**



**HLM**



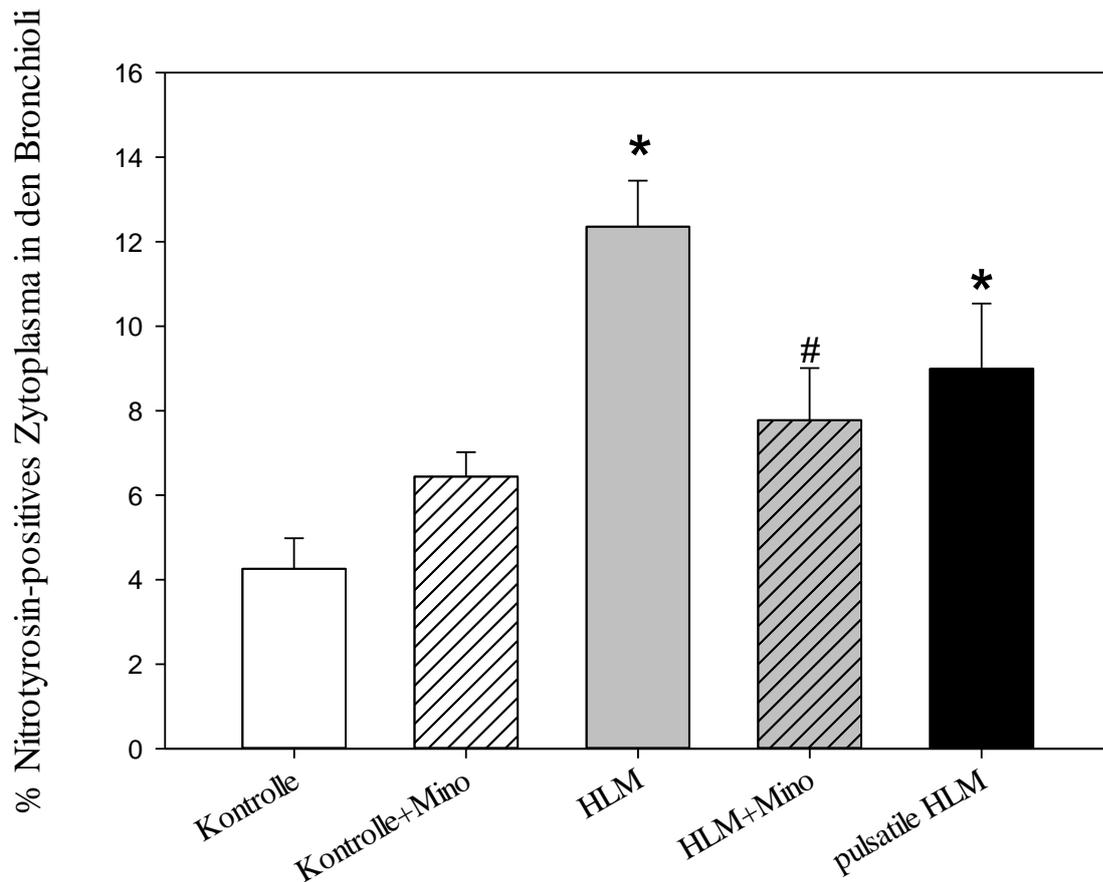
**HLM+Minocyclin**



**pulsatile HLM**

#### 4.3.6.2 Nitrotyrosin in den Bronchioli

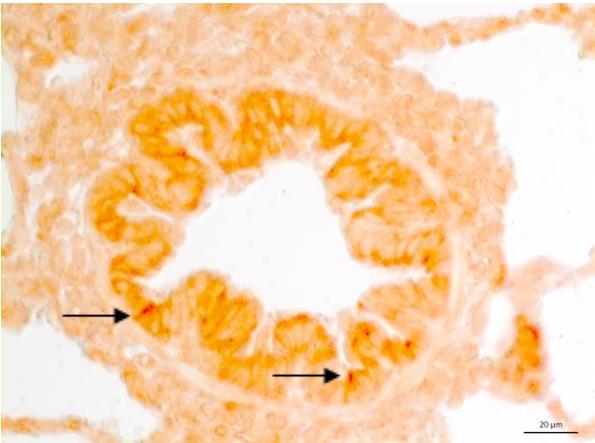
Der Anteil an Nitrotyrosin-positiven Zytoplasma war bei der HLM- und der Pulsatilen-HLM-Gruppe signifikant ( $p < 0,05$ ) höher als bei der Kontroll-Gruppe. Der signifikante Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen der HLM-Gruppe und der HLM+Minocyclin-Gruppe zeigte, dass Minocyclin den Anteil Nitrotyrosin-positiver Zellen verringerte.



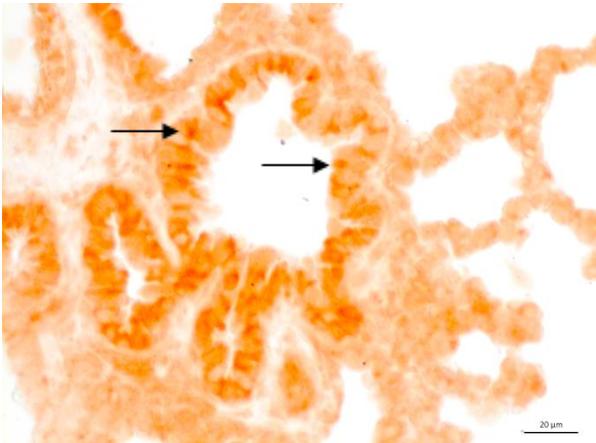
**Abbildung 37: Nitrotyrosin: Prozentualer Anteil an positiven Zytoplasma in den Bronchioli in %.**

\* Signifikanz gegenüber der Kontroll-Gruppe ( $p < 0,05$ ) # Signifikanz gegenüber Herz-Lungen-Maschine-Gruppe ( $p < 0,05$ )

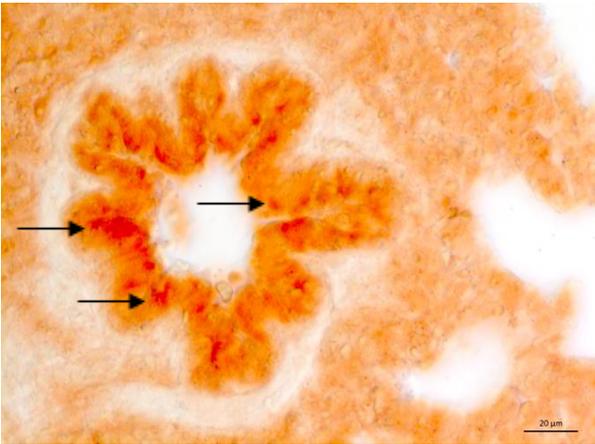
**Abbildung 38: Histologische Darstellung des Lungengewebes in den verschiedenen Versuchsgruppen. Ein Beispiel für ein Bronchiolus mit einer Nitrotyrosin-positiven Zelle ist mit einem Pfeil markiert. Nitrotyrosin-Färbung.**



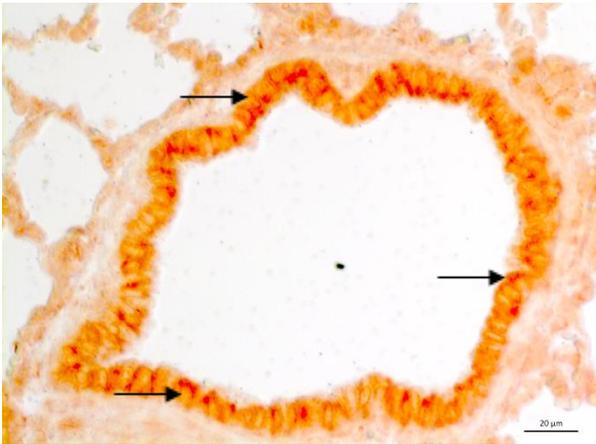
**Kontrolle**



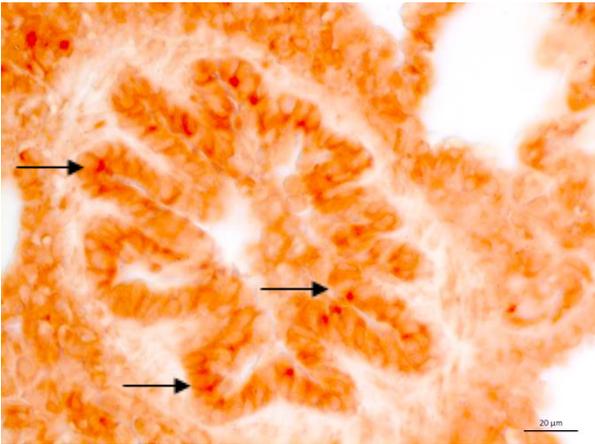
**Kontrolle + Minocyclin**



**HLM**



**HLM + Minocyclin**

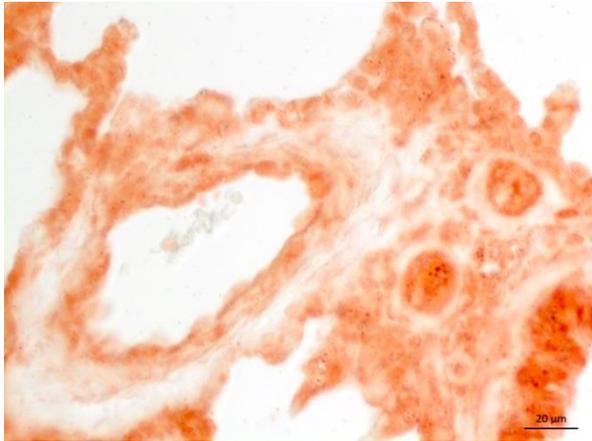


**pulsatile HLM**

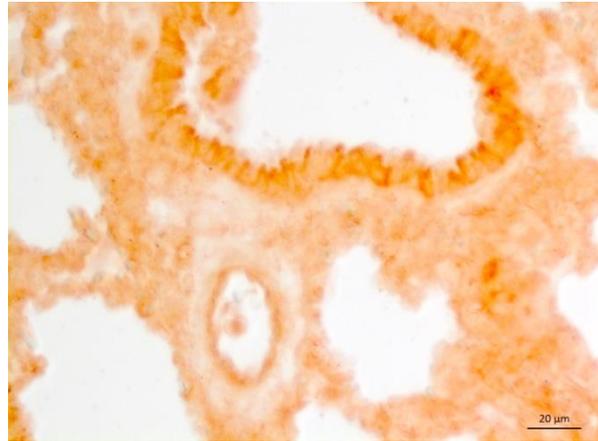
### 4.3.6.3 Nitrotyrosin in den Gefäßen

Das Endothelgewebe war Nitrotyrosin negativ.

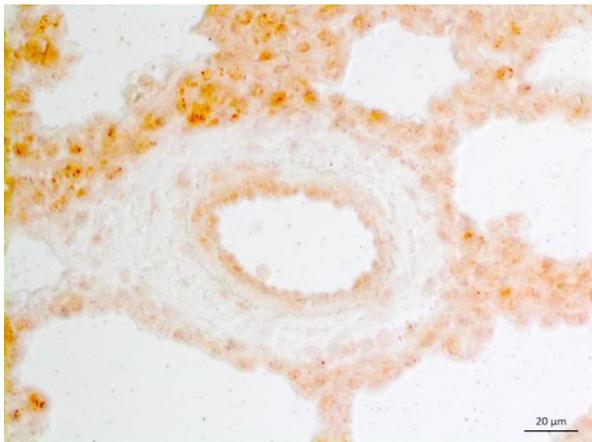
**Abbildung 39: Histologische Darstellung des Lungengewebes in den verschiedenen Versuchsgruppen. Im Endothelgewebe war keine Markierung für Nitrotyrosin nachweisbar. Nitrotyrosin Färbung.**



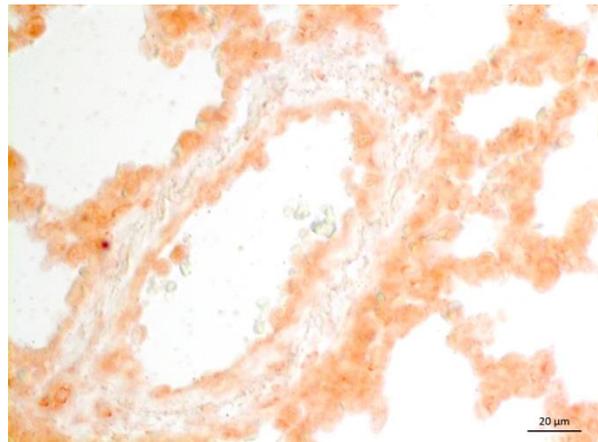
**Kontrolle**



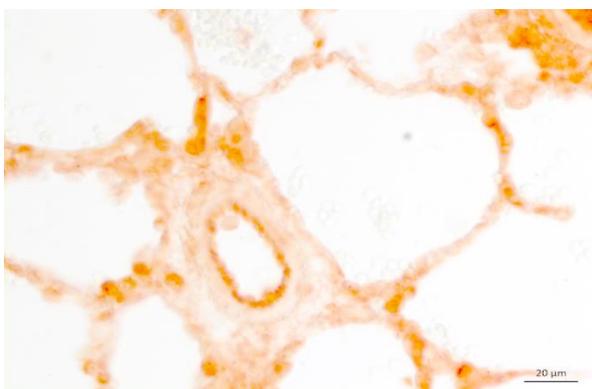
**Kontrolle + Minocyclin**



**HLM**



**HLM + Minocyclin**



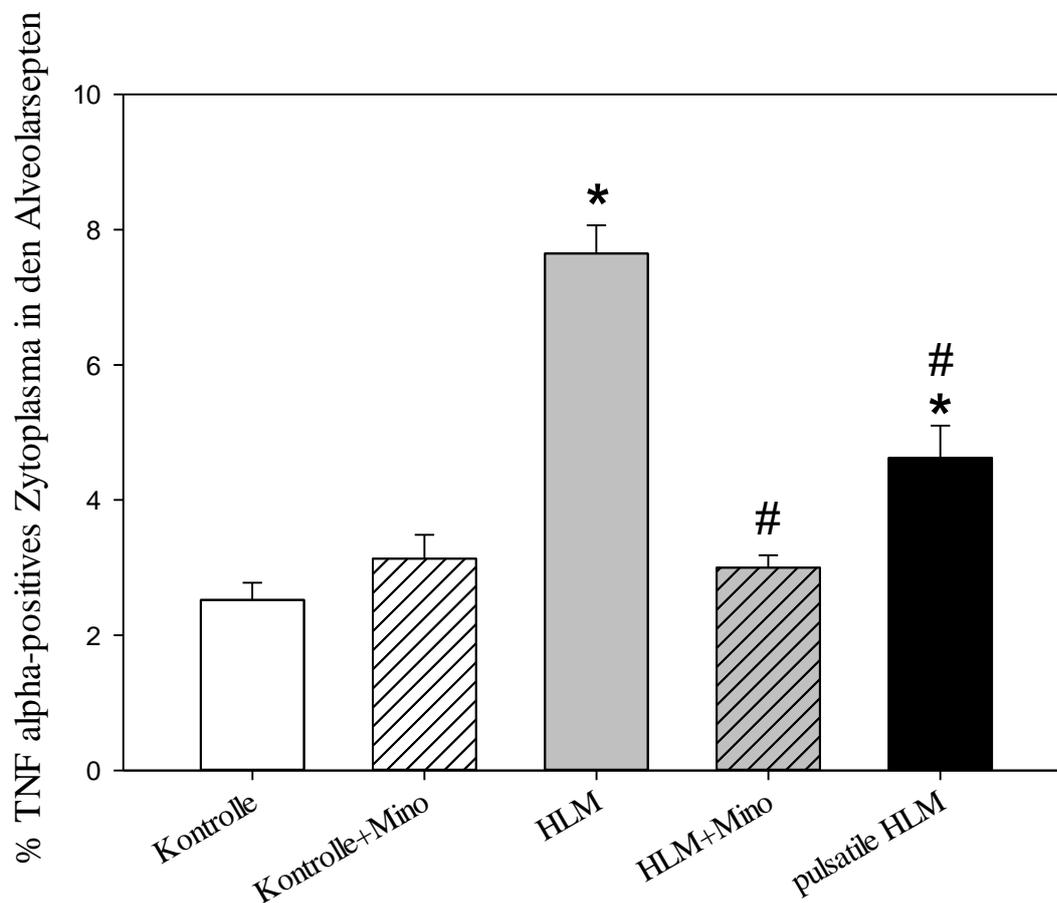
**pusatile HLM**

### 4.3.7 Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ )

TNF $\alpha$  ist ein Zytokin, das eine Apoptose induziert (vgl. 2.3.6). TNF $\alpha$  ist im Zytoplasma lokalisiert und wurde durch AEC intensiv dunkel rot angefärbt.

#### 4.3.7.1 TNF $\alpha$ in den Alveolen

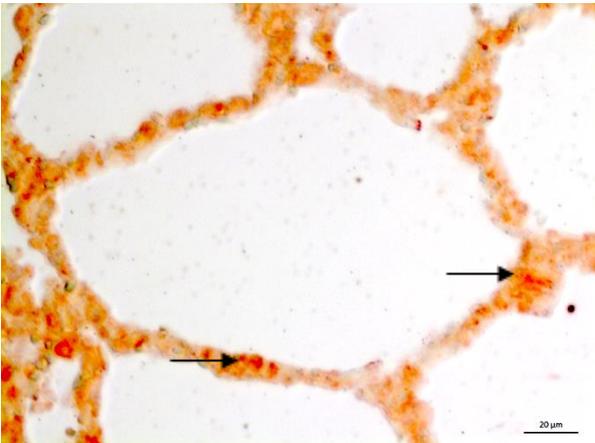
Die HLM- und die Pulsatile-HLM-Gruppe zeigten signifikant ( $p < 0,05$ ) mehr TNF $\alpha$  positive Areale als die Kontroll-Gruppe. Vergleicht man die HLM-Gruppe mit der HLM+Minocyclin-Gruppe, so fiel auf, dass es durch das Minocyclin signifikant ( $p < 0,05$ ) zu einer Abnahme der TNF $\alpha$ -positiven Fläche kam. Diesen signifikanten ( $p < 0,05$ ) Einfluss zeigte auch die Pulsatile-HLM-Gruppe gegenüber der HLM-Gruppe



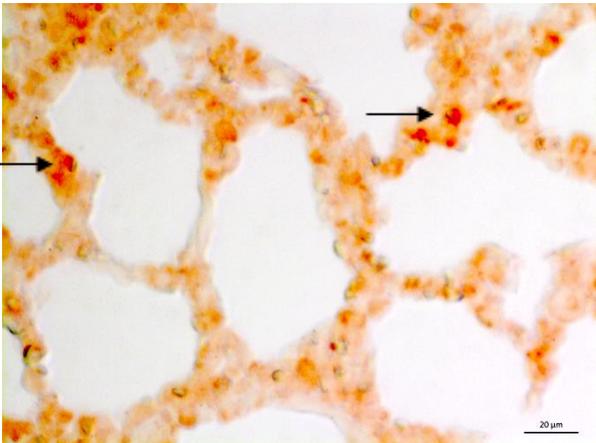
**Abbildung 40: TNF $\alpha$ : Prozentualer Anteil an positivem Zytoplasma in den Alveolen in %.**

\* Signifikanz gegenüber der Kontroll-Gruppe ( $p < 0,05$ ) # Signifikanz gegenüber Herz-Lungen-Maschine-Gruppe ( $p < 0,05$ )

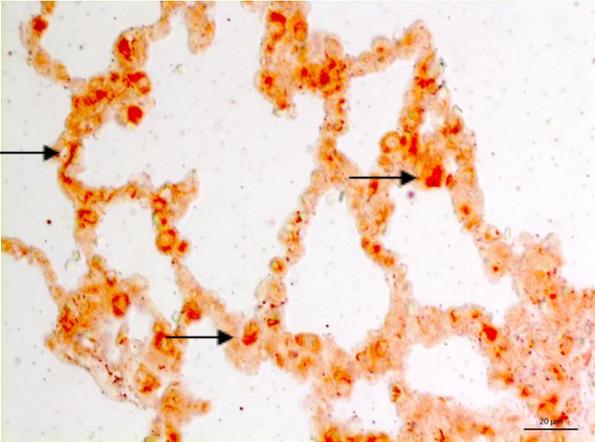
**Abbildung 41: Histologische Darstellung des Lungengewebes in den verschiedenen Versuchsgruppen. Ein Beispiel für ein Alveolarseptum mit einer TNF $\alpha$ -positiven Zelle ist mit einem Pfeil markiert. TNF $\alpha$  - Färbung.**



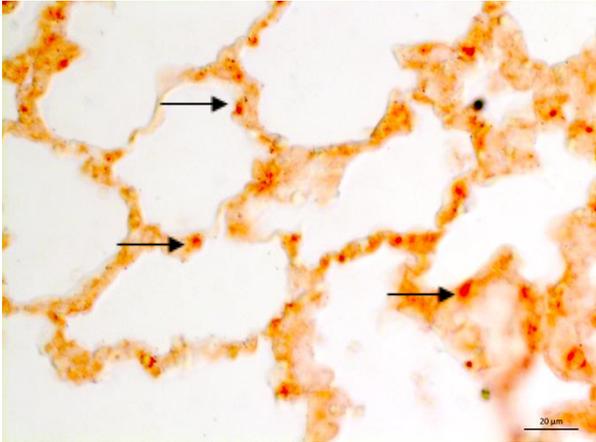
**Kontrolle**



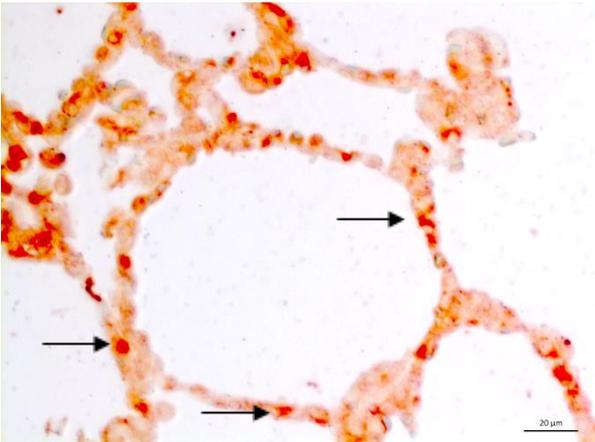
**Kontrolle + Minocyclin**



**HLM**



**HLM + Minocyclin**



**pulsatile HLM**

#### 4.3.7.2 TNF $\alpha$ in den Bronchioli

Der Anteil an positiven TNF $\alpha$  Flächen lag in der HLM- und in der Pulsatilen-HLM-Gruppe signifikant ( $p < 0,05$ ) höher als in der Kontroll-Gruppe. Das Minocyclin führte in der HLM+Minocyclin-Gruppe zu einer signifikanten Abnahme ( $p < 0,05$ ) der positiven Zellen gegenüber der HLM-Gruppe. Die Pulsation während der HLM bewirkte auch eine verminderte TNF $\alpha$ -Expression im Vergleich zur laminaren HLM, diese war jedoch nicht signifikant.

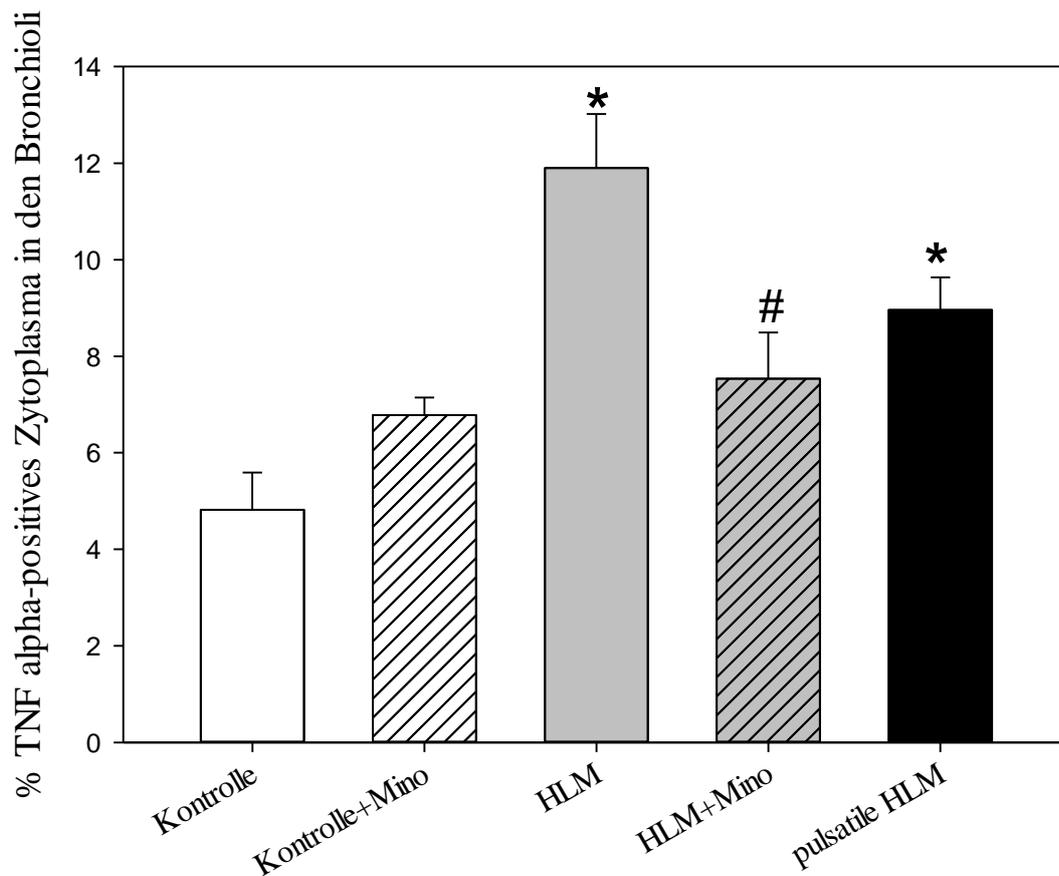
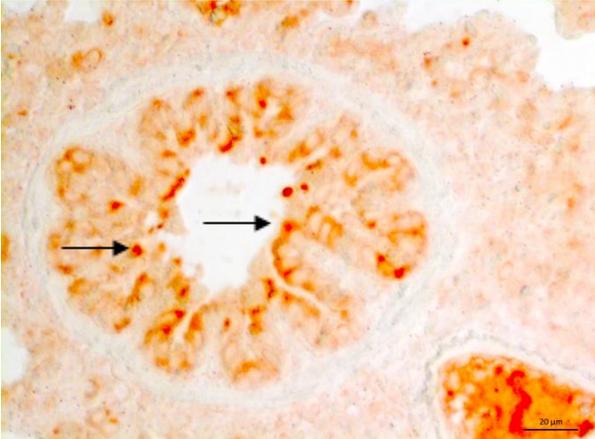


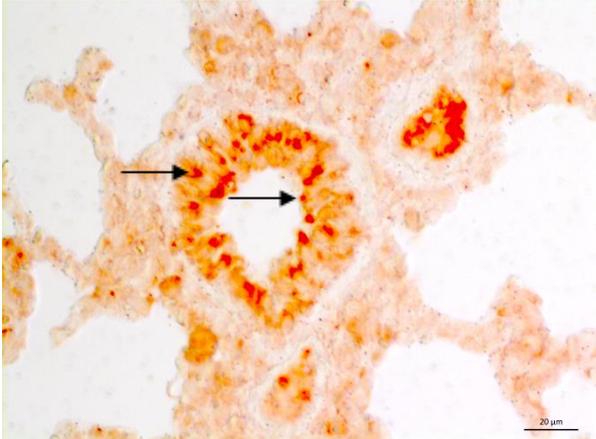
Abbildung 42: TNF $\alpha$ : Prozentualer Anteil an positiven Zytoplasma in den Bronchioli in %.

\* Signifikanz gegenüber der Kontroll-Gruppe ( $p < 0,05$ ) # Signifikanz gegenüber Herz-Lungen-Maschine-Gruppe ( $p < 0,05$ )

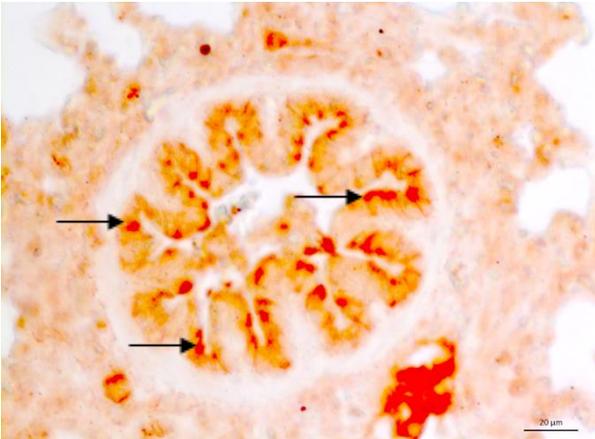
**Abbildung 43: Histologische Darstellung des Lungengewebes in den verschiedenen Versuchsgruppen. Ein Beispiel für ein Bronchiolus mit einer TNF $\alpha$ -positiven Zelle ist mit einem Pfeil markiert. TNF $\alpha$  -Färbung.**



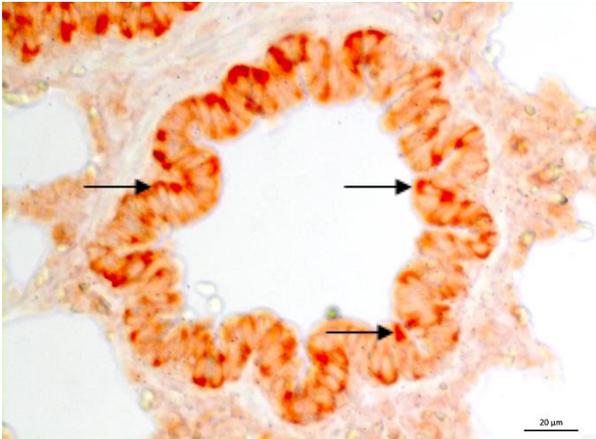
**Kontrolle**



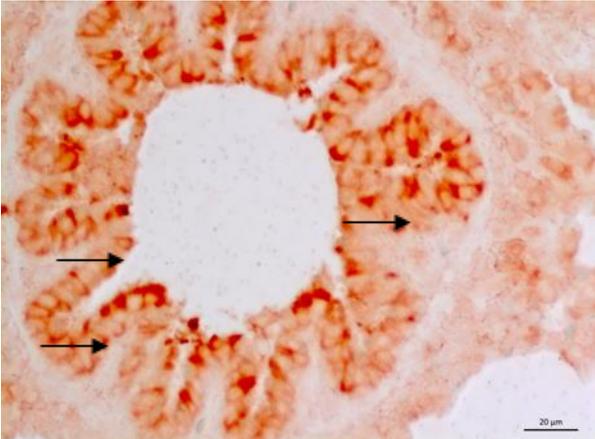
**Kontrolle + Minocyclin**



**HLM**



**HLM + Minocyclin**

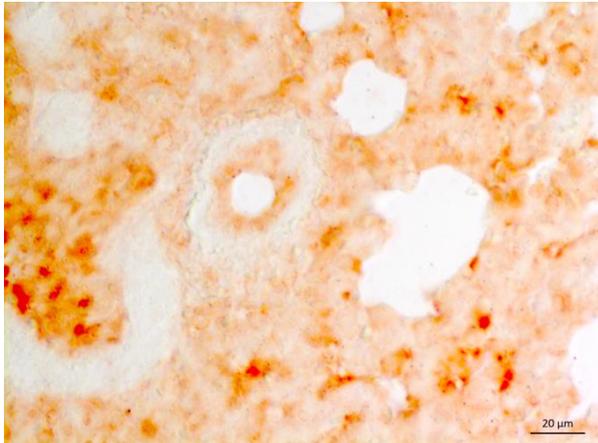


**pulsatile HLM**

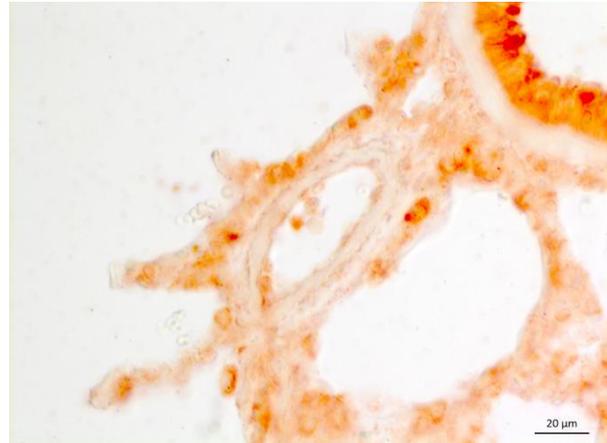
### 4.3.7.3 TNF $\alpha$ in den Gefäßen

Das Endothelzellzytoplasma war TNF $\alpha$  negativ.

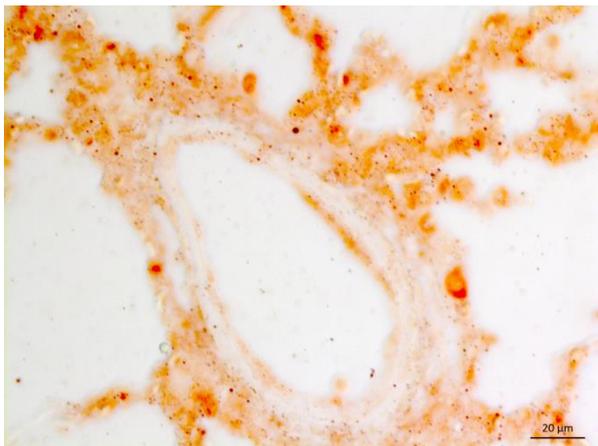
**Abbildung 44: Histologische Darstellung des Lungengewebes in den verschiedenen Versuchsgruppen. Im Endothelgewebe war keine Markierung für TNF $\alpha$  nachweisbar. TNF $\alpha$ -Färbung.**



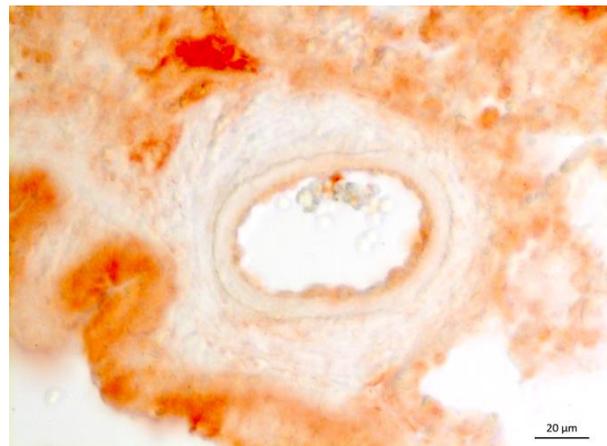
**Kontrolle**



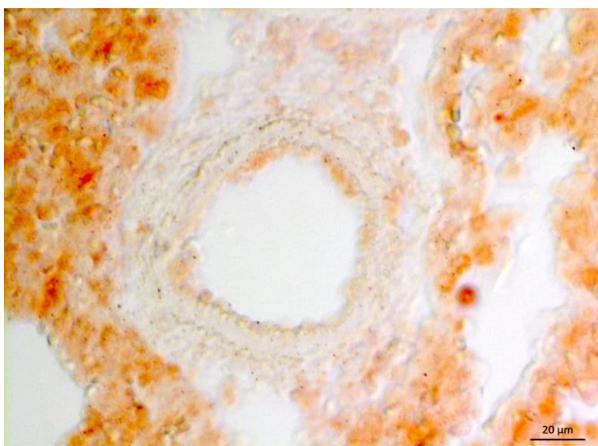
**Kontrolle + Minocyclin**



**HLM**



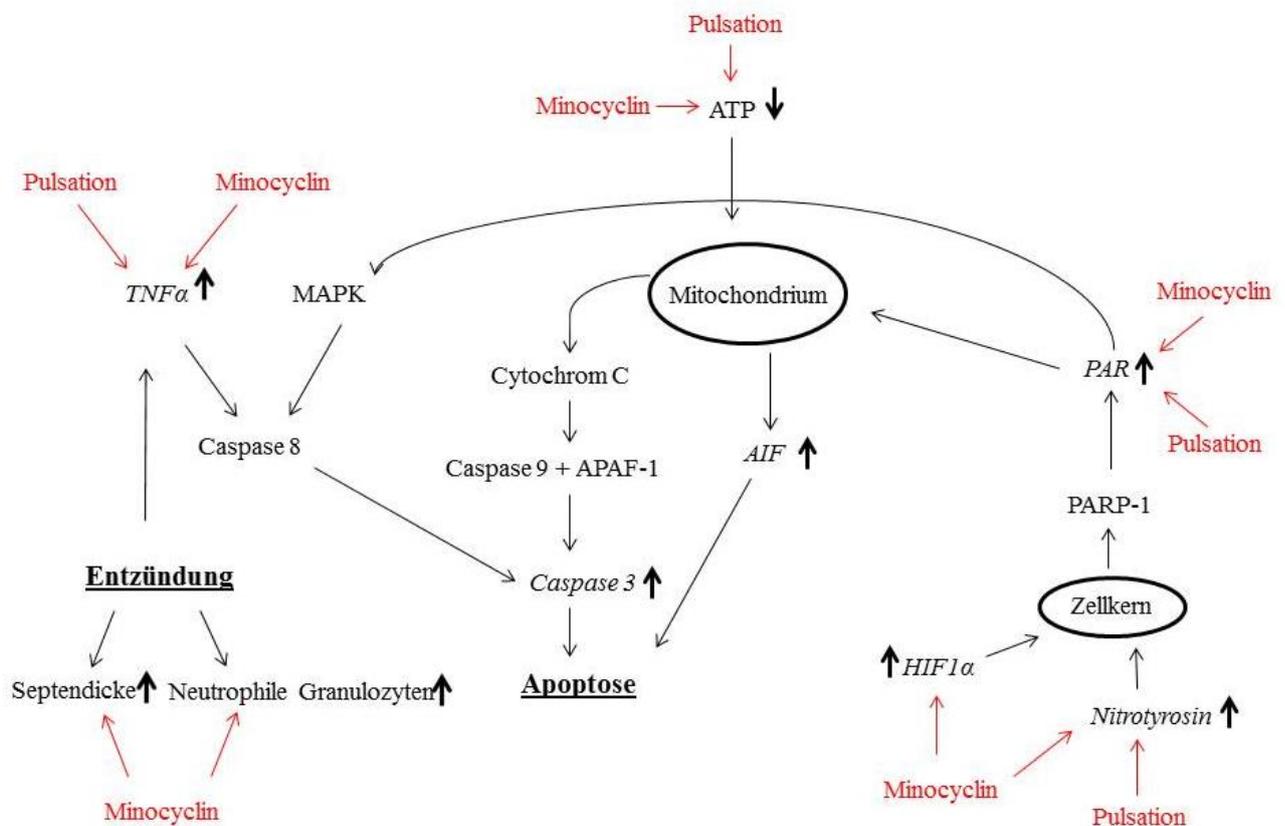
**HLM + Minocyclin**



**pulsatile HLM**

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Lungenbiopsien aus dem unter 2.5.1 beschriebenen Tierversuch histologisch (HE-Färbung) und immunhistochemisch (Nitrotyrosin, HIF-1, PAR, AIF, Cleaved Caspase 3, TNF $\alpha$ ) untersucht. Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob sich die in der Literatur beschriebenen Organschäden der Lunge, die beim Einsatz einer HLM entstehen, auf histologischer Ebene bestätigen lassen. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob ein pulsatile Blutfluss oder eine Gabe von Minocyclin in der Lage sind, diese Lungenschäden abzuschwächen, zu verringern oder gar zu verhindern. In dem Schema in der Abbildung 45 sind die Ergebnisse dieser Arbeit zusammenfassend dargestellt.



**Abbildung 45: Zusammenfassung der untersuchten Faktoren und Beeinflussung dieser durch die HLM, die Pulsation und das Minocyclin.** Der Einfluss der HLM auf die jeweiligen untersuchten Faktoren ist mit dicken schwarzen Pfeilen dargestellt. Die Faktoren, die von der Pulsation und dem Minocyclin positiv beeinflusst wurden, sind mit roten Pfeilen markiert.

## 5.1 Einfluss der HLM auf die Lunge

Die Ergebnisse zeigen, dass durch die HLM das Lungengewebe beschädigt wurde. Die Alveolen und die Bronchiolen waren besonders betroffen, wohingegen das Gefäßendothel nur gering beeinflusst wurde. Im Gefäßendothel gab es keine signifikanten Unterschiede in allen untersuchten Parametern zwischen der HLM-Gruppe und der Kontroll-Gruppe. Daraus lässt sich schließen, dass das Gefäßsystem der Lunge unempfindlicher gegenüber einer HLM ist als das Bronchial- und das Alveolarepithel.

Der Hypoxie-induzierte Faktor (HIF-1) ist unter normalen Sauerstoffbedingungen inaktiv (ELTZSCHIG et al. 2011). Kommt es zu einem hypoxischen Zustand, transferiert HIF-1 in den Zellkern (FANDREY 2007), sodass der Nachweis von HIF-1 im Zellkern als Indikator für eine Hypoxie gilt. In den Alveolen und den Bronchiolen war die Anzahl HIF-1-positiver Zellkerne in der HLM-Gruppe signifikant höher als in der Kontroll-Gruppe. Diese Ergebnisse zeigen, dass es während einer HLM zu hypoxischen Zuständen in der Lunge kam. Dies kann zum einen durch die fehlende Durchblutung der Lunge und zum anderen durch die fehlende Ventilation erklärt werden. SCHLENSAK et al. (2002) zeigten, dass eine HLM zu einer Abnahme der bronchialen Durchblutung führte. Als Ursache dafür wurde die fehlende Lungenventilation verantwortlich gemacht. Diese resultierte in einer Kohlenstoffdioxidanreicherung, was wiederum zu einer Vasokonstriktion der Bronchialarterien führte und die Lungendurchblutung einschränkte.

Nitrotyrosin spiegelt die Produktion von nitrosativen Stressoren wieder (FRANCO und ESTÉVEZ 2014) und ist ein Marker für oxidativen Stress (GOW et al. 2004). Dabei dient Nitrotyrosin als ein Indikator für Peroxinitrit vermittelte Gewebsschäden (FISCHER et al. 2003, MEHLHORN et al. 2003). Nitrotyrosin entsteht durch eine Reaktion eines Peroxinitritradikals mit der Aminosäure Tyrosin. Das Peroxinitrit selbst entsteht bei einer Reaktion von Stickstoffmonoxid mit einem Superoxidanion (SUGIURA und ICHINOSE 2011). Der Anteil des Nitrotyrosin-positiven Zytoplasmas war in der HLM-Gruppe signifikant höher als in der Kontroll-Gruppe. Dies war sowohl im Alveolarepithel als auch im Bronchialepithel zu sehen. Diese Ergebnisse zeigen daher, dass es während der HLM zu einer vermehrten Produktion von Stickstoffmonoxiden und Radikalen im Alveolar- und Bronchialepithel kam. MEHLHORN et al. (2003) stellten in ihrer Untersuchung ebenfalls fest, dass es nach einer HLM zu einem Anstieg der Stickstoffmonoxidsynthese in den

Myozyten des Herzens kam. Sie postulierten, dass ein Ischämie- und Reperfusionsschaden im Herzen mit einem Anstieg von Nitrotyrosin einhergeht, wobei Peroxynitrit und ROS als Ursache der Schäden benannt wurden. Auch FISCHER et al. (2003) untersuchten das Myokard immunhistochemisch und stellten fest, dass es bedingt durch die HLM zu einem Anstieg von Nitrotyrosin kam. Sie beschrieben, dass es möglich sei, dass ROS und Peroxynitrit zu einer Aktivierung der Cleaved Caspase 3 führten. FISCHER et al. (2003) zeigten, dass die Aktivierung der Cleaved Caspase 3 nicht nur durch ROS und Nitrotyrosin induziert wurde, da nur 42% der Cleaved Caspase 3 positiven Herzen Nitrotyrosin enthielten und nur 58% 8-Isoprostaglandin-F2 $\alpha$ , welches ein Marker für ROS-induzierte Peroxidation ist. HAN et al. (2008) beschrieben ebenso eine Zunahme Nitrotyrosin positiver Zellkerne im Hippocampus nach Einsatz einer HLM. Die Nitrierung von Proteinen ging mit Störungen im Energiehaushalt und Signalkaskaden einher und wurde mit neurologischen Störungen in Zusammenhang gebracht. Auch in den Untersuchungen von SALAMEH et al. (2015<sup>a</sup>) und DHEIN et al. (2015) wurde ein Anstieg von Nitrotyrosin im Hippocampus, in der Leber und in der Niere in der HLM-Gruppe nachgewiesen. Die Zunahme des Nitrotyrosins wurde in diesen Studien als ein Zeichen für die vermehrte Produktion von ROS betrachtet, welche zu DNA-Strangbrüchen führte und PARP aktivierte (GARCIA und CONDE 2015, LOVE 1999). VIRAG et al. (2013) beschrieben, dass PARP auf verschiedenen Wegen eine Apoptose induzieren kann. Eine Möglichkeit ist die verstärkte Aktivierung von PARP, welches die Synthese von PAR unter hohem NAD<sup>+</sup>- und damit einhergehendem ATP-Verbrauch zur Folge hat. Dieser hohe Energieverlust kann die Einleitung des programmierten Zelltods hervorrufen. In der hier vorliegenden Studie war der Anteil PAR-positiver Zellkerne in der HLM-Gruppe im Alveolarepithel signifikant erhöht. Auch im Bronchialepithel zeigte sich in der HLM-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe eine Erhöhung des PAR-positiven Anteils, jedoch wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht. Der ATP-Gehalt des Lungengewebes war in der HLM-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe signifikant erniedrigt. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine PARP-Aktivierung vorlag und verstärkt PAR unter ATP-Verbrauch synthetisiert wurde. Zusätzlich wurde unter dem Einsatz der HLM aufgrund der fehlenden Lungendurchblutung kein ATP nachgeliefert. Zu diesem Ergebnis kamen auch KASPER et al. (2016), die in ihrer Arbeit zeigten, dass es im Lungengewebe nach Einsatz der HLM zu einem Anstieg von PAR kam. KHAN et al. (2003) und YEH et al. (2006) stellten ebenfalls einen Anstieg von PAR und PARP im Herzen fest und führten dies auf die durch die HLM-induzierte Ischämie und Reperfusion sowie die

Aktivierung von Peroxynitriten und ROS zurück. DHEIN et al. (2015), SALAMEH et al. (2015<sup>a</sup>) und HAN et al. (2008) wiesen dieses Phänomen ebenfalls in Leber, Niere und Hippocampus nach. Diese Ergebnisse wurden von RAMLAWI et al. (2006) nicht bestätigt. Sie stellten in ihrer Untersuchung an 6 menschlichen Patienten im Herzen keinen Anstieg von PAR nach der HLM fest und führten dies darauf zurück, dass PARP erst spät auf apoptotische Stimuli reagiere und somit die in ihrem Versuch verwendete Reperfusiondauer zu kurz war. Allerdings kam es in dieser Studie auch zu keinem Anstieg des Nitrotyrosins nach der HLM, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die auf PARP stimulierende Wirkung des Nitrotyrosins fehlte. Auch FISCHER et al. (2003) bemerkten in ihrer Studie nach Einsatz der HLM im Herzen keinen Anstieg von PARP und führten dies ebenfalls auf die kurze Versuchsdauer zurück.

Eine weitere von VIRAG et al. (2013) beschriebene Möglichkeit der Apoptoseeinleitung ist die PAR-induzierte Freisetzung von AIF aus dem Mitochondrium. AIF wandert aus dem Mitochondrium in den Zellkern ein und löst auf Caspase-unabhängigem Weg eine Apoptose aus (SEVRIOUKOVA 2011). Die Anzahl AIF-positiver Zellkerne in der HLM-Gruppe war sowohl in den Alveolen als auch im Bronchialepithel signifikant erhöht, sodass sich die von VIRAG et al. (2013) beschriebene Aktivierung von AIF durch PAR mit den Ergebnissen in dieser Arbeit bestätigen lässt. Zu diesem Ergebnis kamen auch RAMLAWI et al. (2006) am menschlichem Myokard. Sie beschrieben, dass AIF früh durch Chromatinkondensation und DNA-Teilung zur Apoptose führte. Weiterhin zeigten sie, dass es am Myokard durch den HLM-induzierten Ischämie- und Reperfusionsschaden sowohl zur Caspase-unabhängigen Apoptose, durch den Nachweis von AIF, aber auch zu einer Erhöhung der Cleaved Caspase 3 und damit zur Caspase-abhängigen Apoptose kam. Durch den Nachweis der Cleaved Caspase 3 wurde auch in dieser Arbeit die Apoptose auf Caspase-abhängigem Weg untersucht. Hierbei wurden die am Myokard erhobenen Ergebnisse von RAMLAWI et al. (2006) auch im Lungengewebe bestätigt.

Auch TNF $\alpha$  kann zur Aktivierung der Cleaved Caspase 3 und damit zur Einleitung einer Apoptose führen (DEMEDTS et al. 2006). In der HLM-Gruppe war der Anteil TNF $\alpha$ -positiver Zellkerne in den Alveolen und Bronchiolen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe signifikant erhöht. TNF $\alpha$  hat neben den Apoptose-einleitenden Eigenschaften auch eine entzündungsfördernde Wirkung durch die Fähigkeit der Chemokinstimulation und Zytokinproduktion. (HEHLGANS et al. 2005). Damit spielt es auch eine wichtige Rolle für

die HLM-induzierte Entzündung an der Lunge (GAO et al. 2015, QI et al. 2013). QI et al. (2013) zeigten, dass TNF $\alpha$  nach Einsatz der HLM sowohl im Blut als auch im Lungengewebe anstieg. Dabei induzierte TNF $\alpha$  Apoptosen und führte zu Entzündungen und Ödemen im Lungengewebe. WORRALL et al. (1997) fanden in einem Versuch an Ratten heraus, dass TNF $\alpha$  die Gefäße permeabel machte und es zu einer Ödembildung im Lungengewebe kam. KOTANI et al. (2000) zeigten in ihrer Studie, dass es zu einem Anstieg von TNF $\alpha$  nach HLM kam. Dabei war die Entzündungsreaktion in den Alveolen stärker als die systemische Reaktion, da die Alveolarmakrophagen mehr TNF $\alpha$  produzierten als andere Makrophagen. QI et al. (2013) zeigten in ihrer Studie, dass der Anstieg von TNF $\alpha$  im Lungengewebe nach dem Einsatz der HLM durch die Verwendung eines Antikörpers gegen TNF $\alpha$  gesenkt werden konnte. Da durch den Einsatz des TNF $\alpha$ -Antikörpers auch die Anzahl der neutrophilen Granulozyten sank, kann davon ausgegangen werden, dass die Präsenz von TNF $\alpha$  mit dem Vorhandensein von neutrophilen Granulozyten korreliert. Dies bestätigen auch die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Zählung der neutrophilen Granulozyten. In der HLM-Gruppe gab es signifikant mehr neutrophile Granulozyten als in der Kontroll-Gruppe. QI et al. (2013) zeigten in ihrer Studie ebenfalls eine Zunahme neutrophiler Granulozyten im Lungengewebe mit daraus resultierenden Funktionsstörungen der Lunge, welche durch die aus Granulozyten sezernierten Entzündungsmediatoren hervorgerufen wurden. BAYRAM et al. (2012) nahmen als Ursache für die Zunahme von neutrophilen Granulozyten und TNF $\alpha$  nach HLM den Kontakt des Blutes mit künstlichen Oberflächen an. Ein anderer Grund für die Erhöhung der Anzahl der neutrophilen Granulozyten könnte der Anstieg der Anzahl apoptotischer Zellen sein. So wurden in einer Studie an COPD-Erkrankten vermehrt neutrophile Granulozyten im Lungengewebe nachgewiesen (DEMEDTS et al. 2006). Als Ursache für die Präsenz der vielen neutrophilen Granulozyten im Lungengewebe wurde die begrenzte Kapazität der Alveolarmakrophagen gesehen, die bei einer COPD-Erkrankung hohe Menge an apoptotischen Zellen phagozytieren. Somit zeigten sich zeitgleich apoptotische und inflammatorische Ereignisse. Auch während des Einsatzes der HLM zeigte sich durch den Anstieg apoptotischer Faktoren wie AIF und PAR ein apoptotisches und durch die Zunahme von neutrophilen Granulozyten ein entzündliches Geschehen.

Auf ein solches Entzündungsgeschehen könnte auch die Zunahme des Durchmessers der Alveolarsepten zurückzuführen sein. So war die Dicke der Alveolarsepten in der HLM-Gruppe signifikant höher als in der Kontroll-Gruppe. Darüber hinaus könnte die Zunahme des

Durchmessers der Alveolarepten auch aus der Entstehung von Ödemen, die im Zuge der HLM auftreten können, resultieren. ELTZSCHIG et al. (2011) beschrieben, dass es während einer Ischämie zum Anstieg von Zytokinen komme. Diese Zytokine sind in der Lage eine Entzündung auszulösen, Gefäße damit durchlässiger zu machen und die Ödembildung voranzubringen (BAYRAM et al. 2012). Sowohl diese Ödeme als auch die ungenügende Ventilation der Lunge können zudem eine Kollabierung der Alveolen zur Folge haben, welche auch zu einer Zunahme der Dicke der Alveolarepten führen würde. Auch in anderen Studien kam es zu einer Zunahme des Wassergehaltes im Lungengewebe nach dem Einsatz der HLM (QI et al. 2013). BRANDES et al. (2002) untersuchten die Lunge in einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung auf morphologische Veränderungen und beobachteten ebenfalls die Präsenz von Leukozyten und Ödemen. FERRARI et al. (2015) beschrieben als Ursache der Ödeme, dass es während einer Hypoxie zur anaeroben Glykolyse komme. Dabei könne nicht ausreichend ATP gebildet werden, um den Ionentransport aufrechtzuerhalten und Ödeme seien die Folge. Da in dieser Arbeit der ATP-Gehalt im Lungengewebe nach HLM vermindert war, lässt sich diese Erklärung unterstützen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es durch den Einsatz der HLM auf Caspase-abhängigen und -unabhängigen Wegen zu einer Apoptoseinduktion kommt. Diese Apoptosen können zum einen Ursache zum anderen aber auch Folge des Entzündungsgeschehens in der Lunge sein. Die Präsenz der Entzündung nach HLM wurde durch die vermehrte Anzahl der neutrophilen Granulozyten und den verdickten Alveolarepten gezeigt.

## **5.2 Einfluss des pulsatilen Blutflusses während einer HLM auf die Lunge**

Der Einfluss eines pulsatilen Blutflusses während des Einsatzes der HLM auf die Lunge wurde bisher häufig auf klinischer Ebene untersucht und zeigte kontroverse Ergebnisse. Dabei wurden verschiedene Lungenfunktionstests, Blutuntersuchungen, Vital- und Atemparameter am Menschen nach HLM-Operationen genauer betrachtet (BAYRAM et al. 2012, ENGELS et al. 2014, LIM et al. 2015). BAYRAM et al. (2012) und ENGELS et al. (2014) konnten keine Vorteile für die Lunge durch einen pulsatilen Blutfluss erkennen, wohingegen LIM et al. (2015) die Pulsation befürworteten. Wenige Studien am Schweinmodell untersuchten das Lungengewebe auf morphologische Veränderungen nach dem Einsatz der HLM (HERREROS et al. 2004, BRANDES et al. 2002, SCHLENSAK et al. 2002). Der Einfluss eines pulsatilen Blutflusses auf die Lunge wurde in der Literatur in Bezug auf immunhistochemische Untersuchungen bisher noch nicht beschrieben. In dieser Arbeit wurde die Expression von HIF-1, AIF, Cleaved Caspase 3, PAR und TNF $\alpha$  im Lungengewebe immunhistochemisch untersucht. Hierbei wurden das Alveolarepithel, Bronchialepithel und die Endothelzellen getrennt voneinander ausgewertet.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl das Gefäßendothel als auch das Bronchialepithel von der Pulsation überwiegend unbeeinflusst blieben. So waren bei den verschiedenen untersuchten Faktoren, mit Ausnahme des AIF, keine signifikanten Unterschiede zwischen der HLM-Gruppe und der Pulsatilen-HLM-Gruppe im Bronchialepithel und den Endothelzellen der Gefäße zu erkennen. Die Expression von AIF war in der Pulsatilen-HLM-Gruppe signifikant niedriger als in der nicht pulsatilen HLM-Gruppe, allerdings immer noch signifikant höher als in der Kontroll-Gruppe. Dies lässt darauf schließen, dass die Pulsation nur im geringen Maße HLM-induzierte Schäden abmildern konnte. Somit kann davon ausgegangen werden, dass ein protektiver Einfluss eines pulsatilen Blutflusses auf das Bronchialepithel und das Gefäßendothel vernachlässigbar ist.

An dem Alveolarepithel hingegen zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen untersuchten Faktoren. Der Anteil HIF-1 positiver Zellkerne war in der Pulsatilen-HLM-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe signifikant erhöht, aber im Vergleich zur nicht pulsatilen HLM-Gruppe gleich geblieben. Dies deutet darauf hin, dass der pulsatile Blutfluss während einer HLM-Operation den hypoxischen Zuständen in der Lunge nicht entgegen wirkte. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass der pulsatile Blutfluss die Lunge kaum

erreicht hat, da die Lunge während der HLM-Operation nicht durchblutet wurde. Die Aorta und die großen Hohlvenen waren abgeklemmt und ließen kein Blut in das Herz und die Lunge. SERRAINO et al. (2012) beschrieben, dass die Lunge geringfügig über die Arteriae bronchiales mit Blut versorgt wird und postulierten, dass ein pulsatile Blutfluss über diesen Weg eine verbesserte Lungenperfusion und damit eine verbesserte Sauerstoffversorgung des Gewebes erreichen könnte. Diese Vermutung lässt sich mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen nicht bestätigen. Bei einer Hypoxie kann es zur Zunahme von ROS kommen, welche ein Entzündungsgeschehen induzieren und Zellschäden verursachen (ARANEDA und TUESTA 2012). Auch in diesem Versuch gab es Anzeichen für ein Entzündungsgeschehen, welches durch die Zählung der neutrophilen Granulozyten in den Alveolarsepten, untersucht wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass die Anzahl neutrophiler Granulozyten in der Pulsatilen-HLM-Gruppe signifikant über der Kontroll-Gruppe lag. Dabei führte die Pulsation im Vergleich zur nicht pulsatilen HLM zur keiner Abnahme der neutrophilen Granulozyten. Dies deutet somit daraufhin, dass ein Entzündungsgeschehen während einer HLM mit pulsatilem Blutfluss vorlag. Diese Ergebnisse stimmen mit den von BRANDES et al. (2002) überein. BRANDES et al. (2002) untersuchten in einem Ferkelmodell die Anzahl von Leukozyten in der Lunge und kamen zu dem Ergebnis, dass es keine Unterschiede zwischen der pulsatilen und nicht pulsatilen Gruppe gab. ENGELS et al. (2014) untersuchten in ihrer Studie das Blut von menschlichen Patienten nach einer HLM-Operation. Das Blut wurde auf die neutrophile Elastase, ein Marker für eine Leukozytenaktivierung, untersucht. Dabei fanden ENGELS et al. (2014) keinen Unterschied zwischen den Gruppen des pulsatilen Blutflusses und nicht pulsatilen Blutflusses.

Die Ergebnisse der Alveolarseptendicken-Messung in dieser Arbeit ließen ein entzündliches Geschehen und eine Ödembildung in der Lunge vermuten. Die Septen der Pulsatilen-HLM-Gruppe waren signifikant dicker als die Septen der Kontroll-Gruppe. Der pulsatile Blutfluss war nicht in der Lage die Septendicke, verglichen mit der HLM-Gruppe, zu minimieren. BRANDES et al. (2002) stellten in ihrer Studie ebenfalls fest, dass ein pulsatile Blutfluss zu keiner Abnahme von Ödemen in der Lunge führte.

Neben der Entzündung spielte auch die Apoptose eine wichtige Rolle in diesem Versuch. Die Untersuchung von AIF als Marker für den programmierten Zelltod auf Caspase-unabhängigem Weg zeigte, dass in der Pulsatilen-HLM-Gruppe die Anzahl AIF-positiver Zellkerne signifikant höher als in der Kontroll-Gruppe, im Vergleich zur nicht pulsatilen

HLM-Gruppe jedoch gleich geblieben war. Das zeigt, dass der pulsatile Blutfluss das Apoptosegeschehen in der Lunge nicht minimierte. RAMLAWI et al. (2006) bestätigten diese Ergebnisse, indem sie feststellten, dass AIF im Myokard nach Gebrauch der HLM aufgrund von Ischämie und Reperfusion anstieg. Eine mögliche Ursache für den Anstieg von AIF und der damit einhergehenden Apoptoseeinleitung können zum einen die hypoxischen Zustände im Lungengewebe und zum anderen aber auch freie Radikale sein. ROS können am Mitochondrium als Apoptose-einleitende Stimuli wirken. Dabei wird das Mitochondrium stimuliert, AIF freizugeben. AIF wandert aus dem Intermembranraum des Mitochondriums aus und es folgt eine Akkumulation des AIFs im Zellkern, wo durch AIF die Apoptose eingeleitet wird (SEVRIOUKOVA 2011). YAKES und VAN HOUTEN (1997) zeigten, dass die Präsenz von ROS, wie dies bei einem Ischämie-/Reperfusionsschaden der Fall war, zu mitochondrialen DNA-Schäden führte. Diese waren schwerwiegender und traten schneller auf als Schäden an der DNA von Zellkernen. Daraus resultierte ein Funktionsverlust des Mitochondriums und es kam vermehrt zu Apoptosen. Somit kann man zusammenfassen, dass die Pulsation möglicherweise nicht zu einer Abnahme des AIF-positiven Anteils führen konnte, weil auch während der pulsatilen HLM hypoxische Bedingungen vorlagen. Diese resultierten in vermehrter ROS Produktion und führten zu mitochondrialen Schäden und einer AIF-Aktivierung.

Ein weiterer Marker, der in dieser Arbeit untersucht wurde, ist die Cleaved Caspase 3, welche einen programmierten Zelltod initiiert (CAKIR et al. 2011). Die Ergebnisse der Experimente hoben hervor, dass die Pulsatile-HLM-Gruppe einen signifikant höheren Anteil an Cleaved Caspase 3-positiven Zellkernen hatte als die Kontroll-Gruppe. Dabei zeigte die pulsatile HLM im Vergleich zur nicht pulsatilen HLM keine Veränderungen. PORTER und JÄNICKE (1999) beschrieben, dass bei Schäden am Mitochondrium, beispielsweise durch Defekte der Permeabilitäts-Transitions-Pore, Cytochrom C freigegeben wird. Cytochrom C aktiviert dann die Cleaved Caspase 3 und es kommt zu einem programmierten Zelltod. Der Anstieg der Cleaved Caspase 3 lässt sich möglicherweise mit der bereits erwähnten Theorie untermauern, dass es aufgrund der Hypoxie zur vermehrten ROS-Bildung kommt, wodurch mitochondriale Schäden induziert werden.

Im Alveolarepithel waren bei einigen der untersuchten Faktoren jedoch auch signifikante Unterschiede zwischen der HLM-Gruppe und der Pulsatilen-HLM-Gruppe zu beobachten. So induzierte die Pulsation eine signifikante Abnahme von PAR. Zur Aktivierung der PARP und

damit vermehrten Synthese von PAR kommt es, wenn es beispielsweise durch DNA-Strangbrüche oder durch ROS-induzierte Zellschäden stimuliert wurde (GARCIA und CONDE 2015, LOVE et al. 1999). Allerdings wird PARP erst zu einem späteren Zeitpunkt in der Apoptoseeinleitung aktiv (RAMLAWI et al. 2006). Eine Hypothese ist, dass die Cleaved Caspase 3 in der Lage ist, PARP zu spalten (KURIBAYASHI et al. 2014). Dies könnte die Ursache dafür sein, dass nur wenige PAR-positive Zellkerne nachweisbar waren. SALAMEH et al. (2015<sup>b</sup>) beschrieben, dass PARP-aktivierende DNA-Strangbrüche durch Peroxynitrit verursacht werden können. Peroxynitrit nitrolysiert Tyrosinreste, wobei Nitrotyrosin entsteht. Nitrotyrosin wird mit einer Zelltodeinleitung in Verbindung gebracht (FRANCO und ESTÉVEZ 2014). In dieser Arbeit war der Anteil von Nitrotyrosin-positiven Zellkernen bei der Pulsatilen-HLM-Gruppe geringer als bei der nicht pulsatilen HLM. Der verminderte Nitrotyrosinanteil korreliert mit einer geringeren Peroxynitritaktivierung, wodurch es möglich wäre, dass weniger DNA-Schäden induziert wurden und es dadurch zu geringerer PARP-Aktivierung kam. SALAMEH et al. (2015<sup>b</sup>) beobachteten an der Niere aufgrund einer Pulsation ebenfalls eine Abnahme von Nitrotyrosin und vermuteten, dass dies eine Folge von besserer Durchmischung von Blutbestandteilen sei. Diese ging mit einer verbesserten Sauerstoffversorgung und einem vermindertem ATP-Verbrauch des Gewebes einher.

Die ATP-Reserven des Lungengewebes konnten in der hier vorliegenden Arbeit durch die Pulsation signifikant höher gehalten werden als bei der nicht pulsatilen HLM. Dies kann durch die von SERRAINO et al. (2012) beschriebene verbesserte Perfusion der Lunge über die Arteriae bronchiales zustande gekommen sein. Möglich wäre damit auch, dass eine verbesserte Durchmischung der Blutbestandteile durch die Pulsation einen positiven Effekt auf die ATP-Reserven hatte (SALAMEH et al. 2015<sup>b</sup>). SIEPE et al. (2008) perfundierten in ihrem Schweinemodell die Lunge während der gesamten HLM-Operation kontinuierlich über die Pulmonalarterie. Diese Studie zeigte, dass es schon aufgrund der direkten Perfusion zu einer Reduktion der Apoptose und der Entzündung kam. Dieser positive Einfluss auf das Lungengewebe konnte durch einen pulsatilen Blutfluss noch intensiviert werden. Eine weitere Hypothese, wie es zum Erhalt der ATP-Reserven durch die Pulsation kam, könnte die Fähigkeit der Cleaved Caspase 3 sein, PARP abzubauen (KURIBAYASHI et al. 2014). Bei einer Aktivierung von PARP kommt es unter ATP-Verbrauch zur Synthese von PAR (VIRAG et al. 2013). Da in dieser Arbeit die Aktivität der Cleaved Caspase 3 während der Pulsation hoch war, wurde möglicherweise ein Anteil von PARP abgebaut. Es kam zu einer

geringeren Synthese von PAR durch PARP, sodass ATP nicht vermehrt verbraucht wurde und sich anhäufen konnte.

TNF $\alpha$ , als ein Marker für Entzündungsgeschehen, wurde durch den pulsatilen Blutfluss vermindert. Der TNF $\alpha$ -Wert der Pulsatilen-HLM-Gruppe lag signifikant unter dem Wert der HLM-Gruppe. Verschiedene Studien beschreiben, dass Alveolarmakrophagen für das Entfernen von Pathogenen aus der Lunge zuständig sind. Dafür produzieren sie Zytokine wie TNF $\alpha$  (GWYER FINDLAY et al. 2012). KOTANI et al. (2000) diskutierten in ihrer Studie, dass die Alveolarmakrophagen empfindlicher auf den Einfluss einer HLM reagierten und mehr TNF $\alpha$  produzierten als die Makrophagen im Plasma. Dabei kam es in den Alveolen im Vergleich zum Plasma zur vermehrten TNF $\alpha$ -Expression. Sie zeigten, dass TNF $\alpha$  unter dem Einsatz einer HLM durch den Kontakt des Blutes mit einer synthetischen Maschine anstieg. Transferiert man diese Erkenntnis auf die in dieser Studie erhobenen Ergebnisse, so könnte die pulsatile HLM, aufgrund der Abnahme von TNF $\alpha$ , die entzündliche Reaktion auf ein synthetisches System verringern und damit zu geringeren Schäden an Blutbestandteilen führen. KANG et al. (2010) und GU et al. (2005) fanden heraus, dass es keinen Unterschied zwischen einem pulsatilen und einem nicht pulsatilen Blutfluss im Hinblick auf die Hämolyse und Blutzellschäden gab. UNDAR et al. (1999) hingegen schilderten geringe Bluttrauma durch einen pulsatilen Blutfluss. Nimmt man nun an, dass die Pulsation mit geringem Bluttrauma einhergeht, würde daraus folgen, dass es weniger geschädigte Blutbestandteile gab, die von Makrophagen hätten entfernt werden müssen. Somit könnte die verminderte Makrophagenaktivität mit einer verminderten Ausschüttung von TNF $\alpha$  einhergehen. O'NEIL et al. (2012) zeigten in ihrer Studie, dass die Pulsation mit einer verbesserten Mikrozirkulation einherging und dies eine Abschwächung des Entzündungsgeschehen mit sich brachte. SIEPE et al. (2008) zeigten in ihrer Studie, bei der während einer HLM eine pulsatile Perfusion über die Pulmonalarterie mit einer nicht pulsatilen Perfusion verglichen wurde, dass es zu einer Abnahme von TNF $\alpha$  und der damit einhergehenden Entzündungsreaktionen kam. Dabei spekulierten SIEPE et al. (2008), dass ein entzündliches Geschehen nicht durch die HLM selbst ausgelöst wurde, sondern durch die Veränderungen in der Perfusion. Sie vermuteten, dass die pulsatile Perfusion vorteilhaft sei, da sie der natürlichen Perfusion der Lunge am ähnlichsten sei.

Interessant ist, dass die untersuchten Faktoren, die mit dem Mitochondrium (AIF und Cleaved Caspase 3) in Verbindung stehen, durch die Pulsation nicht beeinflusst wurden. Hingegen

wurde bei den untersuchten Faktoren, die nicht aus dem Mitochondrium stammten (PAR und Nitrotyrosin), durch die Pulsation eine Verbesserung erzielt. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die mitochondriale DNA im Gegensatz zur nuklearen DNA 50-mal empfindlicher gegenüber oxidativen Schäden ist. Es wird vermutet, dass dies an den beschränkten Reparaturmöglichkeiten der mitochondrialen DNA liegt. Während einer Entzündung entstehen durch ROS und Stickstoffspezies Schäden am Mitochondrium (SCHUMACKER et al. 2014). Geschädigte mitochondriale DNA kann ins Zytosol freigegeben werden und aktiviert dort Inflammasomen, sodass es zu einer weiteren Entzündungsreaktion kommt (YUE und YAO 2016). Diese Entzündungsreaktion spiegelt sich in diesem Experiment in der Anzahl der neutrophilen Granulozyten und den verdickten Alveolarepten wieder.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ein pulsatiler Blutfluss Zellschäden im Alveolarepithel, die durch PAR, TNF $\alpha$  oder nitrosativen Stress induziert wurden, verringern kann. Die Hypoxie (HIF-1 erhöht) und die Apoptose (AIF und Cleaved Caspase 3 erhöht), genauso wie die Verdickung der Septen und die Infiltration von Neutrophilen als Zeichen für ein Entzündungsgeschehen, wurden nicht positiv beeinflusst. Diese Kontroversität lässt sich auch in der Literatur wiederfinden. Aus diesen Gründen sollte es weitere Untersuchungen mit einem standardisierten Protokoll geben. Es sollte eine einheitliche Empfehlung über die Verfahrensweisen zur Verwendung der Pumpenart oder der Anzahl der Schläge pro Minute, mit denen sich die physiologischen Gegebenheiten am besten reproduzieren lassen, herausgegeben werden. Es sollten weitere Untersuchungen zur zusätzlichen Perfusion der Lunge mit einem pulsatilen Blutfluss über die Arteriae pulmonales, wie SIEPE et al. (2008) sie vorstellten, durchgeführt werden.

### **5.3 Einfluss des Minocyclins während einer HLM auf die Lunge**

Minocyclin ist ein Tetracyclin, welches neben seiner bakteriostatischen auch zellprotektive Wirkungen hat (ULGEN et al. 2011, JORDAN et al. 2007). Der Einfluss von Minocyclin während Ischämie- und Reperfusionsschäden wurde bereits an verschiedenen Organen untersucht (ULGEN et al. 2011, JORDAN et al. 2007, THIND et al. 2015, HUANG et al. 2010, SALAMEH et al. 2015<sup>a,c</sup>, DHEIN et al. 2015). In dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern Minocyclin auch in der Lunge HLM-induzierten Schäden entgegenwirken kann.

Minocyclin verringerte nicht die HLM-bedingte erhöhte Expression von AIF und Cleaved Caspase 3. Hinsichtlich der Cleaved Caspase 3-Expression führte Minocyclin sowohl im Alveolarepithel als auch im Bronchialepithel zu keiner Verringerung der Expression. Die HLM+Minocyclin-Gruppe hatte signifikant mehr Cleaved Caspase 3-positive Zellen im Alveolarepithel als die Kontroll-Gruppe. Das lässt darauf schließen, dass Minocyclin keine antiapoptotische Wirkung auf Caspase 3-abhängigem Weg entwickeln konnte.

Weiterhin wurde durch Minocyclin in dieser Arbeit die AIF-Expression im Alveolarepithel nicht verringert. AIF war im Alveolarepithel in der Kontrolle+Minocyclin-Gruppe und in der HLM+Minocyclin-Gruppe signifikant höher als in der Kontroll-Gruppe. Entscheidend ist hierbei, dass die Faktoren AIF und Cleaved Caspase 3, die auf apoptotische Reize hin vom Mitochondrium freigegeben werden, sich durch Minocyclin nicht beeinflussen ließen. Daraus lässt sich ableiten, dass Minocyclin während der HLM keine Wirkung auf das Mitochondrium hatte.

Eine teilweise protektive Wirkung auf das Lungengewebe wurde durch Minocyclin hingegen im Hinblick auf AIF im Bronchialepithel, Nitrotyrosin im Bronchial- und Alveolarepithel, PAR im Alveolarepithel sowie der Anzahl der neutrophilen Granulozyten erzielt. Im Bronchialepithel ließ sich unter Kontrollbedingungen durch das Minocyclin ein signifikanter Anstieg der AIF-positiven Zellkerne vermerken. Dennoch führte Minocyclin zur signifikanten Verringerung der AIF-Expression während der HLM. Im Bronchialepithel zeigte Minocyclin somit eine protektive Wirkung durch Abmilderung der Apoptoseinduktion des AIFs. Diese Eigenschaft zeigte Minocyclin auch in Untersuchungen an Kaninchenherzen und am Hippocampus und den Nieren von Schweinen (SALAMEH et al. 2015<sup>a,c</sup>, DHEIN et al. 2015). In Bezug auf die PAR-positiven Zellen führte Minocyclin im Alveolarepithel zu einem positiven Effekt. In der HLM+Minocyclin-Gruppe war PAR signifikant niedriger als in der

HLM-Gruppe, aber dennoch signifikant höher als in der Kontroll-Gruppe. Im Bronchialepithel und im Gefäßendothel zeigte Minocyclin keinen protektiven Effekt. Diese Eigenschaft beobachteten auch ALANO et al. (2006), die beschrieben, dass Minocyclin PARP direkt hemmen kann und auf diese Weise neuroprotektiv und antiinflammatorisch wirkt. In einer Studie von TAO et al. (2010) wurde ebenfalls eine direkte Hemmung von PARP durch Minocyclin im Rattenherzen festgestellt. Durch die Hemmung von PARP wurde durch Abnahme von offenen mitochondrialen Permeabilitätsporen und einem geringeren  $\text{NAD}^+$ -Verbrauch ein Zellsterben verhindert. Bei einer Aktivierung von PARP wird PAR unter  $\text{NAD}^+$ - und ATP-Verbrauch synthetisiert (VIRAG et al. 2013). In der hier vorliegenden Arbeit korrelierte die Minocyclin-bedingte PAR-Hemmung während der HLM mit den Ergebnissen der ATP-Messungen. Minocyclin erhöhte den ATP-Gehalt des Lungengewebes signifikant gegenüber der HLM-Gruppe, wodurch sich die von VIRAG et al. (2013) beschriebene Verbindung von ATP und PARP bestätigen ließ. Minocyclin führte im Alveolarepithel zu einer Verringerung Nitrotyrosin-positiver Zellen während der HLM. Zwar lagen die Werte in der HLM+Minocyclin-Gruppe signifikant höher als in der Kontroll- und der Kontrolle+Minocyclin-Gruppe, aber dennoch signifikant niedriger als in der HLM-Gruppe. Im Bronchialepithel verminderte Minocyclin ebenfalls im Vergleich zur HLM-Gruppe den Anteil Nitrotyrosin-positiver Zellen signifikant. Somit führte die Minocyclingabe während der HLM zu einer signifikanten Abnahme der Nitrotyrosin-positiven Zellen. Dieses Ergebnis zeigte sich auch in der Niere und wurde mit einem antioxidativen Effekt in Zusammenhang gebracht (DHEIN et al. 2015). Da Nitrotyrosin ein Marker für oxidativen Stress und Peroxinitrit-vermittelte Gewebsschäden ist (GOW et al. 2004, FISCHER et al. 2003, MEHLHORN et al. 2003), lässt die beobachtete Hemmung des Nitrotyrosin annehmen, dass Minocyclin eine antioxidative Wirkung hat. KRAUS et al. (2005) stellten in einem neuronalen Rattenmodell fest, dass Minocyclin neuroprotektiv agiert und einen Zelltod verhindert, indem es über seinen Phenolring als Antioxidans und Radikalfänger agiert. Nitrotyrosin kann entstehen, indem Tyrosin mit einem Peroxinitritradikal, welches selbst durch eine Verbindung von Stickstoffmonoxid mit einem Superoxidanion entsteht, reagiert (SUGIURA und ICHINOSE 2011). LIN et al. (2001) entdeckten in einer Untersuchung an Rattenneuronen, dass durch Stickstoffmonoxidradikale-induzierte neuronale Schäden durch Minocyclin verhindert werden können. Minocyclin hemmt dabei die durch Radikale aktivierte p38 MAPKinase. Dies zeigt, dass Minocyclin neben seiner direkt antioxidativen Wirkung noch weitere protektive Wirkungen gegenüber Stickstoffmonoxidradikal-vermittelten

Zellschäden entwickelt. Durch diese Radikal-vermittelten Schäden können unter anderem Entzündungen entstehen. Betrachtet man die Anzahl neutrophiler Granulozyten als Marker für die Entzündungsreaktion, so war Minocyclin, verglichen zur HLM ohne Medikamenteneinsatz, in der Lage die Anzahl neutrophiler Granulozyten zu senken. Das Signifikanz- und Kontrollniveau wurde hierbei jedoch nicht erreicht. Das lässt darauf schließen, dass Minocyclin fähig war, die Entzündungsreaktion im Lungengewebe zu minimieren, aber nicht vollständig zu verhindern.

Durch Minocyclin wurde in dieser Arbeit die Alveolarseptendicke sowie die Anzahl TNF $\alpha$ - und HIF-1-positiver Zellen, trotz HLM, auf Kontrollniveau gehalten. Die Gruppe der Schweine, die mit Minocyclin behandelt wurden, zeigten signifikant dünnere Alveolarsepten als die HLM-Gruppe. Die Septendicke der HLM+Minocyclin-Gruppe war nur geringgradig dicker als die Septen der Kontrolle+Minocyclin-Gruppe. Dies legt nahe, dass Minocyclin die Entzündungsreaktion in der Lunge und die damit einhergehende Ödembildung verhindern konnte. In einer Untersuchung von SALAMEH et al. (2015<sup>a</sup>) am Schwein kam es im Hippocampus durch die Gabe von Minocyclin ebenfalls zur Ödemabnahme.

Diese antiinflammatorische Wirkung von Minocyclin zeigte sich auch im Zusammenhang mit TNF $\alpha$ . Die TNF $\alpha$ -positiven Zellen waren in der HLM+Minocyclin-Gruppe sowohl im Alveolarepithel als auch im Bronchialepithel signifikant niedriger als in der HLM-Gruppe. Minocyclin konnte unter dem Einsatz der HLM die TNF $\alpha$ -positiven Zellen in den Alveolen auf Kontrollniveau halten und somit einer Entzündungsreaktion im Lungengewebe entgegenwirken. Diese entzündungshemmende Wirkung des Minocyclins untersuchten auch HUANG et al. (2010) in Neuronen und Mikrogliazellen. Dabei wurde die schädliche Wirkung von TNF $\alpha$  während ischämischer Zustände durch das Minocyclin in den Mikrogliazellen gehemmt. Minocyclin minimierte neben seiner antiinflammatorischen Wirkung in dieser Studie auch die hypoxischen Zustände in der Lunge. Das Alveolarepithel zeigte weniger Hypoxie-bedingte Schäden nach Gabe von Minocyclin, da die HLM+Minocyclin-Gruppe signifikant weniger HIF-1-positive Zellkerne aufwies als die HLM-Gruppe. Dabei sank in der HLM+Minocyclin-Gruppe der Wert nahezu auf Kontrollniveau. In einer Studie von ATAIE-KACHOIE et al. (2015), die an Ovarumoren den Einfluss von Minocyclin testeten, hemmte Minocyclin die Hypoxie-induzierte HIF-1-Expression signifikant. Sie vermuteten, dass Minocyclin die HIF-1-Expression hemmt, indem es die Stabilität von HIF-1 verringert. Dies begründeten sie darin, dass die HIF-1-Halbwertszeit unter der Präsenz des Minocyclins kürzer

war. Auch vermuteten sie, dass Minocyclin die Signalkaskade der MAPK hemmt und damit über diesen Weg die Bildung von HIF-1 begrenzte.

In dieser Arbeit zeigte sich, dass Minocyclin während einer HLM den Abfall von ATP sowie die Ödembildung signifikant verminderte. Auch kam es zur signifikanten Abnahme der positiven Zellen für AIF, Nitrotyrosin und TNF $\alpha$  in den Bronchiolen sowie HIF-1, PAR, Nitrotyrosin und TNF $\alpha$  im Alveolarepithel. Damit zeigte sich durch die Abnahme von TNF $\alpha$ , Ödemen und neutrophilen Granulozyten unter HLM-Bedingungen die antiinflammatorische Wirkung von Minocyclin in der Lunge. Ebenso erwies sich durch den ATP-Erhalt eine den Energiehaushalt der Zelle erhaltende Wirkung des Minocyclins. Zusätzlich führte Minocyclin zu einer Hemmung der HIF-1-Translokation. Die Apoptoseinduktion wurde in dieser Arbeit durch Minocyclin auf AIF- und Cleaved Caspase 3-abhängigem Weg nicht verhindert, wohl aber auf PAR-abhängigem Weg. HUANG et al. (2010) beschrieben den Einfluss von Minocyclin auf einige Faktoren in verschiedenen Zelltypen, wobei dieser Einfluss in den verschiedenen Zelltypen unterschiedlich war. So hemmte Minocyclin die TNF $\alpha$ -Expression in Mikrogliazellen aber nicht in Neuronen. Dieser Gedanke könnte eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Reaktionen auf das Minocyclin im Alveolarepithel, Bronchialepithel und Gefäßendothel sein. Dennoch führen die Ergebnisse dieser Arbeit zu dem Schluss, den Einsatz von Minocyclin während einer HLM-Operation als lungen-protective Maßnahme zu empfehlen.

## 6 Zusammenfassung

### **Untersuchung der protektiven Wirkung von Minocyclin und einem pulsatilen Blutfluss auf die Lunge unter Einfluss einer Herz-Lungen-Maschine im Ferkelmodell**

Kinder mit angeborenen Herzfehlern benötigen häufig chirurgische Korrekturen dieser komplexen Fehlbildungen. Um eine Herzoperation mit hoher Qualität durchführen zu können, gehört zum heutigen Standard die Nutzung einer Herz-Lungen-Maschine (HLM). Dabei übernimmt die HLM die Atemfunktion der Lunge und die Pumpfunktion des Herzens. Es ist bekannt, dass durch die Anwendung der HLM Ischämie- und Reperfusionsschäden entstehen können. Diese können zum Teil zu schwerwiegenden Organschäden und Funktionsstörungen führen. Da die Lunge während der HLM kaum durchblutet wird, können Ödeme, Entzündungen und Atelektasen entstehen, welche ein respiratorisches Versagen zur Folge haben können. Aufgrund dieser Begleitschäden ist es von großem Interesse, protektive Maßnahmen zum Erhalt der Lungenfunktion zu entwickeln. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit folgenden Fragestellungen nachgegangen: 1.) Welchen Einfluss hat die HLM auf das Lungengewebe? 2.) Können HLM-induzierte Lungenschäden durch die Gabe von Minocyclin reduziert werden? 3.) Können HLM-induzierte Lungenschäden durch eine HLM mit pulsatilem Blutfluss minimiert werden?

Zur Klärung dieser Fragestellung wurde durch GERDOM (2014), DHEIN et al. (2015) und SALAMEH et al. (2015<sup>a,b</sup>) bei 4-Wochen alten Angler-Sattel-Schweinen (8-15kg) der Effekt von Minocyclin und eines pulsatilen Blutflusses unter Einsatz der HLM getestet. Hierfür wurden die Tiere in fünf Versuchsgruppen eingeteilt: Kontrolle, Kontrolle+Minocyclin, HLM, HLM+Minocyclin, Pulsatile-HLM. Die Gruppen, die Minocyclin erhielten, bekamen 4mg/kg Minocyclin vor und 2 mg/kg Minocyclin nach HLM. Der pulsatile Blutfluss wurde mit 70% Pulsation und 100 Schlägen/Minute gefahren. Nach Versuchsende wurden die Tiere euthanasiert und Lungenbiopsien wurden entnommen. Diese wurden in der hier vorliegenden Arbeit histologisch (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) und immunhistochemisch (Apoptose-induzierender Faktor (AIF), Hypoxie-induzierter Faktor (HIF), Poly (ADP) Ribose (PAR), Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ ), Nitrotyrosin und Cleaved Caspase 3) untersucht. Außerdem wurde der ATP-Gehalt des Lungengewebes errechnet. Die Ergebnisse zeigen, dass die Alveolen und die Bronchiolen besonders empfindlich gegenüber der HLM reagierten, wohingegen das Gefäßendothel am wenigsten beschädigt wurde. Minocyclin und der pulsatile Blutfluss waren am Bronchialepithel und Gefäßendothel weniger wirksam. Die HLM führte

am Lungengewebe zu oxidativen und nitrosativen Stress sowie zu hypoxischen Bedingungen (Nitrotyrosin und HIF-1 waren nach HLM signifikant erhöht). Am Alveolarepithel minimierten Minocyclin und der pulsatile Blutfluss den nitrosativen Stress signifikant. Minocyclin konnte zusätzlich noch die hypoxischen Schäden signifikant abmildern. Die hypoxischen Bedingungen während der HLM können zur Radikalbildung und damit einhergehenden Zellschäden, wie Apoptosen und Entzündungen führen. PAR, als ein Marker der Apoptoseinduktion, war nach HLM signifikant erhöht. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass bei apoptotischen Stimuli PAR unter ATP-Verbrauch produziert wird. Die Synthese von PAR und der ATP-Verbrauch wurden sowohl durch Minocyclin als auch durch den pulsatilen Blutfluss signifikant reduziert. PAR ist in der Lage, das Mitochondrium zu stimulieren und AIF freizugeben. Die Untersuchungen zeigten, dass es unter HLM-Bedingung zur signifikant vermehrten AIF-Freigabe kam. AIF selbst kann direkt zu einer Apoptose führen oder über eine Cytochrom C-Stimulation die Cleaved Caspase 3 aktivieren. Auch diese war nach HLM signifikant erhöht. Die HLM führte somit auf Caspase-abhängigen und -unabhängigen Wegen zur Induktion einer Apoptose. Weiterhin kam es während der HLM zu entzündlichen Prozessen am Lungengewebe. Der Durchmesser der Alveolarsepten und die Anzahl neutrophiler Granulozyten waren nach HLM signifikant erhöht. Minocyclin führte zur Abnahme beider Parameter. Die TNF $\alpha$ -Expression, als weiterer Entzündungsmarker, war während der HLM signifikant erhöht und wurde durch einen pulsatilen Blutfluss und einer Minocyclingabe signifikant verringert.

Zusammenfassend können die Fragestellungen wie folgt beantwortet werden: Die HLM führte am Lungengewebe zu oxidativem Stress, welcher mit Apoptosen und Entzündungen einherging. Durch Minocyclin wurden die hypoxischen Bedingungen, die PAR-Stimulation, der ATP-Verbrauch und die Entzündungsreaktion abmildert. Die Pulsation beeinflusste den ATP-Verbrauch, die Nitrotyrosin, PAR und TNF $\alpha$ -Expression. Somit wurde gezeigt, dass der pulsatile Blutfluss und Minocyclin in der Lage waren, Schäden abzumildern, die den Zellkern betrafen. Faktoren, die aus dem Mitochondrium stammten (Cleaved Caspase 3, AIF) wurden nicht beeinflusst. Dies könnte an der höheren Empfindlichkeit der mitochondrialen DNA liegen, was in folgenden Studien untersucht werden müsste. Während des Versuches wurde keine zusätzliche Lungenperfusion über die Arteriae pulmonales durchgeführt. Die zusätzliche Perfusion könnte zu einer verbesserten Protektion der Lunge führen. Die

Ergebnisse dieser Arbeit eröffnen in der kardialen Kinderchirurgie neue Perspektiven im Hinblick auf die Unterstützung der Lungenfunktion während einer HLM-Operation.

## 7 Summary

### **Analysis of the protective effect of minocycline and pulsatile blood flow on the lung tissue under influence of cardiopulmonary bypass in a piglet model**

Children with congenital heart diseases often need corrective surgery. It is necessary to use a cardiopulmonary bypass (CPB) to guarantee a high standard surgery. The CPB replaces the respiratory function of the lung and the pump function of the heart. Although the application of CPB has become indispensable, negative side effects such as ischemia reperfusion injuries can appear. The lung is not perfused with blood and not ventilated during CPB. Due to this missing perfusion edema, inflammation and atelectasis can appear and can lead to pulmonary dysfunction or acute respiratory distress syndrome. Based on this issue, there is a huge interest in lung protective strategies. Therefore the aim of this study was to evaluate possible lung injuries after CPB and to assess whether different flow modalities (pulsatile vs. non-pulsatile flow) or application of the antibiotic minocycline might be of advantage.

To answer this question GERDOM (2014), DHEIN et al. (2015) and SALAMEH et al. (2015<sup>a,b</sup>) investigated the effect of minocycline and pulsatile blood flow during CPB in 4 weeks old angler-saddle-pigs (8-15kg). Therefore they analyzed five experimental groups of piglets: control group, control group + minocycline, CPB (non-pulsatile flow), CPB (pulsatile flow), CPB + minocycline. The groups of minocycline received 4mg/kg minocycline before CPB and 2mg/ kg minocycline after CPB. The pulsatile blood flow was 70% pulsation and 100 beats per minute. The piglets were euthanized after surgery and lung biopsies were taken. Within this study the lung biopsies were analyzed histologically (hematoxylin eosin staining) and by immunohistochemistry for apoptosis inducing factor (AIF), hypoxia induced factor (HIF-1), poly (ADP) ribose (PAR), tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), nitrotyrosine and cleaved caspase 3. Additionally, the ATP concentration in lung tissue was calculated from provided data material.

The results showed that the alveolar and the bronchial tissue were very sensitive for CPB induced injuries. The blood vessels were less injured by CPB. Minocycline and pulsatile blood flow were less effective on the bronchial and vessel tissue compared to the alveolar tissue. CPB induced oxidative and nitrosative stress and hypoxic conditions on the lung tissue

as nitrotyrosine and HIF-1 were significantly increased after CPB. Minocycline and pulsatile flow were able to attenuate the nitrosative stress significantly on the alveolar tissue. Furthermore, minocycline attenuated the hypoxic injuries. Hypoxic conditions during CPB can lead to radical formation and cell damage such as apoptosis and inflammation. PAR is a marker of apoptosis and was significantly increased after CPB. Minocycline was able to decrease the PAR formation and the ATP depletion. PAR itself can stimulate the mitochondria to release AIF. The AIF expression after CPB was significantly increased. AIF can either directly induce apoptosis or stimulate the mitochondria to release cytochrome c. Cytochrome c in turn stimulates the cleaved caspase 3, which also induces apoptosis. The cleaved caspase 3 was significantly increased after CPB. In summary, the CPB induces apoptosis including caspase dependent and independent pathways. Furthermore CPB leads to inflammation of the lung tissue. The thickness of the alveolar septa and the amount of neutrophilic granulocyte were significantly increased after CPB and were attenuated by minocycline. TNF $\alpha$  as a marker of inflammation was significantly increased after CPB. Minocycline and pulsatile blood flow were able to attenuate the TNF $\alpha$  expression.

In conclusion CPB induced oxidative stress, apoptosis and inflammation. Minocycline decreased HIF-1 $\alpha$ , PAR, ATP depletion and inflammation. Pulsatile blood flow influenced the ATP depletion and the expression of nitrotyrosine, PAR and TNF $\alpha$ . This demonstrated that the pulsatile blood flow and minocycline were able to reduce cellular damage. Factors, which were located in mitochondria (Cleaved Caspase 3, AIF) were not affected. This might be due to the sensitivity of the mitochondrial DNA. These facts could be interesting for future experiments. The lung was not perfused during this experiment. The additional perfusion through the pulmonary arteries might be of advantage as another lung protective strategy and should be evaluated in more detail. The results of this work opened up new vistas for the pediatric cardiac surgery with regard to supporting lung function during CPB, as minocycline as well as the pulsatile blood flow demonstrated lung protective properties.

## 8 Literaturverzeichnis

Alano, C.C., Kauppinen, T.M., Valls, A.V., & Swanson, R.A. (2006). Minocycline inhibits poly(ADP-ribose) polymerase-1 at nanomolar concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(25), 9685–9690.

Alwaqfi, N.R., Khader, Y.S., Ibrahim, K.S., & Eqab, F.M. (2012). Coronary artery bypass grafting: 30-day operative morbidity analysis in 1046 patients. *Journal of clinical medicine research*, 4(4), 267–273.

Ando, M., Murai, T., & Takahashi, Y. (2008). The effect of sivelestat sodium on post-cardiopulmonary bypass acute lung injury in a neonatal piglet model. *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*, 7(5), 785–788.

Apostolakis, E.E., Koletsis, E.N., Baikoussis, N.G., Siminelakis, S.N., & Papadopoulos, G.S. (2010). Strategies to prevent intraoperative lung injury during cardiopulmonary bypass. *Journal of cardiothoracic surgery*, 5, 1.

Araneda, O.F., & Tuesta, M. (2012). Lung oxidative damage by hypoxia. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2012, 856918.

Ataie-Kachoie, P., Pourgholami, M.H., Bahrami-B, F., Badar, S., & Morris, D.L. (2015). Minocycline attenuates hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression correlated with modulation of p53 and AKT/mTOR/p70S6K/4E-BP1 pathway in ovarian cancer: in vitro and in vivo studies. *American journal of cancer research*, 5(2), 575–588.

Aubin, M.-C., Laurendeau, S., Mommerot, A., Lamarche, Y., Denault, A., Carrier, M., et al. (2008). Differential effects of inhaled and intravenous sildenafil in the prevention of the pulmonary endothelial dysfunction due to cardiopulmonary bypass. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 51(1), 11–17.

Baehner, T., Boehm, O., Probst, C., Poetzsch, B., Hoeft, A., Baumgarten, G., et al. (2012). Kardiopulmonaler Bypass in der Herzchirurgie Cardiopulmonary bypass in cardiac surgery. *Der Anaesthesist*, 61(10), 846.

Bayram, H., Erer, D., Iriz, E., Hakan Zor, M., Gulbahar, O., & Ozdogan, M.E. (2012). Comparison of the effects of pulsatile cardiopulmonary bypass, non-pulsatile

cardiopulmonary bypass and off-pump coronary artery bypass grafting on the respiratory system and serum carbonyl. *Perfusion*, 27(5), 378–385.

Brandes, H., Albes, J.M., Conzelmann, A., Wehrmann, M., & Ziemer, G. (2002). Comparison of pulsatile and nonpulsatile perfusion of the lung in an extracorporeal large animal model. *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales européennes*, 34(4), 321–329.

Cakir, E., Yilmaz, A., Demirag, F., Oguztuzun, S., Sahin, S., Yazici, U.E., et al. (2011). Prognostic significance of micropapillary pattern in lung adenocarcinoma and expression of apoptosis-related markers: caspase-3, bcl-2, and p53. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 119(9), 574–580.

Carvalho, Enisa M F, Gabriel, E.A., & Salerno, T.A. (2008). Pulmonary protection during cardiac surgery: systematic literature review. *Asian cardiovascular & thoracic annals*, 16(6), 503–507.

Colovic, M., & Caccia, S. (2003). Liquid chromatographic determination of minocycline in brain-to-plasma distribution studies in the rat. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 791(1-2), 337–343.

Cosa, N., & Costa, E. (2016). Inhaled pulmonary vasodilators for persistent pulmonary hypertension of the newborn: safety issues relating to drug administration and delivery devices. *Medical devices (Auckland, N.Z.)*, 9, 45–51.

Davoudi, M., Farhanchi, A., Moradi, A., Bakhshaei, M.H., & Safarpour, G. (2010). The Effect of Low Tidal Volume Ventilation during Cardiopulmonary Bypass on Postoperative Pulmonary Function. *The journal of Tehran Heart Center*, 5(3), 128–131.

De Amorim, Célio Gomes, Malbouisson, Luiz Marcelo Sá, da Silva, Francisco Costa, Fiorelli, A.I., Murakami, Caroline Kameio Fernandes, & Carmona, Maria José Carvalho (2014). Leukocyte depletion during CPB: effects on inflammation and lung function. *Inflammation*, 37(1), 196–204.

Demedts, I.K., Demoor, T., Bracke, K.R., Joos, G.F., & Brusselle, G.G. (2006). Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respiratory research*, 7, 53.

- Dhein, S., Krause, N., Ullmann, C., Flister, A., Lehmann, S., Muth, P., et al. (2008). Ischemic and inflammatory lung impairment by extracorporeal circulation: effect of PARP-inhibition by INO1001. *Pharmacological research*, 58(5-6), 332–339.
- Dhein, S., Grassl, M., Gerdom, M., Vollroth, M., Bakhtiary, F., Salisch, S. von, et al. (2015). Organ-protective effects on the liver and kidney by minocycline in small piglets undergoing cardiopulmonary bypass. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 388(6), 663–676.
- Eltzschig, H.K., & Carmeliet, P. (2011). Hypoxia and inflammation. *The New England journal of medicine*, 364(7), 656–665.
- Engels, G.E., Dodonov, M., Rakhorst, G., van Oeveren, W., Milano, A.D., Gu, Y.J., et al. (2014). The effect of pulsatile cardiopulmonary bypass on lung function in elderly patients. *The International journal of artificial organs*, 37(9), 679–687.
- Esper, S.A., Subramaniam, K., & Tanaka, K.A. (2014). Pathophysiology of Cardiopulmonary Bypass: Current Strategies for the Prevention and Treatment of Anemia, Coagulopathy, and Organ Dysfunction. *Seminars in cardiothoracic and vascular anesthesia*, 18(2), 161–176.
- Fagan, S.C., Waller, J.L., Nichols, F.T., Edwards, D.J., Pettigrew, L.C., Clark, W.M., et al. (2010). Minocycline to improve neurologic outcome in stroke (MINOS): a dose-finding study. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 41(10), 2283–2287.
- Fandrey, J. (2007). Regulation der Sauerstoffhomöostase durch Hypoxie-induzierbaren Faktor-1. *Biospektrum*, S. 26–28.
- Ferrando, C., Soro, M., & Belda, F.J. (2015). Protection strategies during cardiopulmonary bypass: ventilation, anesthetics and oxygen. *Current opinion in anaesthesiology*, 28(1), 73–80.
- Ferrari, R.S., & Andrade, C.F. (2015). Oxidative Stress and Lung Ischemia-Reperfusion Injury. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015, 590987.
- Filsoufi, F., Rahmanian, P.B., Castillo, J.G., Chikwe, J., & Adams, D.H. (2008). Predictors and early and late outcomes of respiratory failure in contemporary cardiac surgery. *Chest*, 133(3), 713–721.
- Fischer, A.H., Jacobson, K.A., Rose, J., & Zeller, R. (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH protocols*, 2008, pdb.prot4986.

Fischer, U. (2003). Cardioplegic arrest induces apoptosis signal-pathway in myocardial endothelial cells and cardiac myocytes. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 23(6), 984–990.

Fortier, S., DeMaria, R.G., Lamarche, Y., Malo, O., Denault, A., Desjardins, F., et al. (2004). Inhaled prostacyclin reduces cardiopulmonary bypass-induced pulmonary endothelial dysfunction via increased cyclic adenosine monophosphate levels. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 128(1), 109–116.

Franco, M.C., & Estévez, A.G. (2014). Tyrosine nitration as mediator of cell death. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 71(20), 3939–3950.

Gao, M., Xie, B., Gu, C., Li, H., Zhang, F., & Yu, Y. (2015). Targeting the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- $\alpha$  to alleviate cardiopulmonary bypass-induced lung injury (review). *Molecular medicine reports*, 11(4), 2373–2378.

García, S., & Conde, C. (2015). The Role of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 in Rheumatoid Arthritis. *Mediators of inflammation*, 2015, 837250.

Gerdom, M. (2014). Untersuchungen auf renoprotektive Effekte nach pulsatiler Perfusion beziehungsweise Minozyklingabe bei extrakorporaler Zirkulation mittels Herz-Lungen-Maschine im Ferkelmodell. Univ., Diss.--Leipzig, 2014.

Goebel, U., Siepe, M., Mecklenburg, A., Doenst, T., Beyersdorf, F., Loop, T., et al. (2008). Reduced pulmonary inflammatory response during cardiopulmonary bypass: effects of combined pulmonary perfusion and carbon monoxide inhalation. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*, 34(6), 1165–1172.

González, J.C., Egea, J., Del Carmen Godino, María, Fernandez-Gomez, F.J., Sánchez-Prieto, J., Gandía, L., et al. (2007). Neuroprotectant minocycline depresses glutamatergic neurotransmission and Ca(2+) signalling in hippocampal neurons. *The European journal of neuroscience*, 26(9), 2481–2495.

Gow, A.J., Farkouh, C.R., Munson, D.A., Posencheg, M.A., & Ischiropoulos, H. (2004). Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 287(2), L262-8.

- Griffiths, L.G., Orton, E.C., & Boon, J.A. (2004). Evaluation of techniques and outcomes of mitral valve repair in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 224(12), 1941–1945.
- Groenen, Martien A M, Archibald, A.L., Uenishi, H., Tuggle, C.K., Takeuchi, Y., Rothschild, M.F., et al. (2012). Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature*, 491(7424), 393–398.
- Gu, Y.J., De Kroon, T L, Elstrodt, J.M., van Oeveren, W., Boonstra, P.W., & Rakhorst, G. (2005). Augmentation of abdominal organ perfusion during cardiopulmonary bypass with a novel intra-aortic pulsatile catheter pump. *The International journal of artificial organs*, 28(1), 35–43.
- Gwyer Findlay, E., & Hussell, T. (2012). Macrophage-mediated inflammation and disease: a focus on the lung. *Mediators of inflammation*, 2012, 140937.
- Han, F., Drabek, T., Stezoski, J., Janesko-Feldman, K., Stezoski, S.W., Clark, Robert S B, et al. (2008). Protein nitration and poly-ADP-ribosylation in brain after rapid exsanguination cardiac arrest in a rat model of emergency preservation and resuscitation. *Resuscitation*, 79(2), 301–310.
- Hehlgans, T., & Pfeffer, K. (2005). The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*, 115(1), 1–20.
- Heinicke K. (2002). Die zelluläre Antwort auf Sauerstoffmangel: The cellular response to hypoxia. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, 53, Nr.10, 270–276.
- Heining, P., & Ruyschaert, T. (2016). The Use of Minipig in Drug Discovery and Development: Pros and Cons of Minipig Selection and Strategies to Use as a Preferred Nonrodent Species. *Toxicologic pathology*, 44(3), 467–473.
- Herreros, J., Berjano, E.J., Sola, J., Vlaanderen, W., Sales-Nebot, L., Más, P., et al. (2004). Injury in organs after cardiopulmonary bypass: a comparative experimental morphological study between a centrifugal and a new pulsatile pump. *Artificial organs*, 28(8), 738–742.

Hessel, E.A. (2014). A Brief History of Cardiopulmonary Bypass. *Seminars in cardiothoracic and vascular anesthesia*, 18(2), 87–100.

Huang, H., Yao, T., Wang, W., Zhu, D., Zhang, W., Chen, H., et al. (2003). Continuous ultrafiltration attenuates the pulmonary injury that follows open heart surgery with cardiopulmonary bypass. *The Annals of thoracic surgery*, 76(1), 136–140.

Huang, W.C., Qiao, Y., Xu, L., Kacimi, R., Sun, X., Giffard, R.G., et al. (2010). Direct protection of cultured neurons from ischemia-like injury by minocycline. *Anatomy & cell biology*, 43(4), 325–331.

Ji, Q., Mei, Y., Wang, X., Feng, J., Cai, J., & Ding, W. (2013). Risk factors for pulmonary complications following cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *International journal of medical sciences*, 10(11), 1578–1583.

Jordan, J., Fernandez-Gomez, F.J., Ramos, M., Ikuta, I., Aguirre, N., & Galindo, M.F. (2007). Minocycline and cytoprotection: shedding new light on a shadowy controversy. *Current drug delivery*, 4(3), 225–231.

Judge, E.P., Hughes, J M Lynne, Egan, J.J., Maguire, M., Molloy, E.L., & O'Dea, S. (2014). Anatomy and bronchoscopy of the porcine lung. A model for translational respiratory medicine. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 51(3), 334–343.

Kang, Y.J., Kim, M.G., Son, K.H., Lim, C.H., Son, H.S., Yoon, S.Y., et al. (2010). Experimental investigation of pulsatility effect on the deformability and hemolysis of blood cells. *Artificial organs*, 34(4), E103-9.

Kasper, B., Salameh, A., Krausch, M., Kiefer, P., Kostelka, M., Mohr, F.W., et al. (2016). Epigallocatechin gallate attenuates cardiopulmonary bypass-associated lung injury. *The Journal of surgical research*, 201(2), 313–325.

Khan, T.A., Ruel, M., Bianchi, C., Voisine, P., Komjáti, K., Szabo, C., et al. (2003). Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition improves postischemic myocardial function after cardioplegia-cardiopulmonary bypass. *Journal of the American College of Surgeons*, 197(2), 270–277.

- Kim, S.-S., Kong, P.-J., Kim, B.-S., Sheen, D.-H., Nam, S.-Y., & Chun, W. (2004). Inhibitory action of minocycline on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide and prostaglandin E2 in BV2 microglial cells. *Archives of pharmacal research*, 27(3), 314–318.
- Kotani, N., Hashimoto, H., Sessler, D.I., Muraoka, M., Wang, J.S., O'Connor, M.F., et al. (2000). Cardiopulmonary bypass produces greater pulmonary than systemic proinflammatory cytokines. *Anesthesia and analgesia*, 90(5), 1039–1045.
- Kotoulas, C., Panagiotou, I., Tsipas, P., Melachrinou, M., Alexopoulos, D., & Dougenis, D. (2014). Experimental studies in the bronchial circulation. Which is the ideal animal model? *Journal of thoracic disease*, 6(10), 1506–1512.
- Kraus, R.L., Pasieczny, R., Lariosa-Willingham, K., Turner, M.S., Jiang, A., & Trauger, J.W. (2005). Antioxidant properties of minocycline: neuroprotection in an oxidative stress assay and direct radical-scavenging activity. *Journal of neurochemistry*, 94(3), 819–827.
- Kuribayashi, K., Mayes, P.A., & El-Deiry, W.S. (2014). What are caspases 3 and 7 doing upstream of the mitochondria? *Cancer Biology & Therapy*, 5(7), 763–765.
- Lamarche, Y., Malo, O., Thorin, E., Denault, A., Carrier, M., Roy, J., et al. (2005). Inhaled but not intravenous milrinone prevents pulmonary endothelial dysfunction after cardiopulmonary bypass. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 130(1), 83–92.
- Lee, S.M., Yune, T.Y., Kim, S.J., Kim, Y.C., Oh, Y.J., Markelonis, G.J., et al. (2004). Minocycline inhibits apoptotic cell death via attenuation of TNF-alpha expression following iNOS/NO induction by lipopolysaccharide in neuron/glia co-cultures. *Journal of neurochemistry*, 91(3), 568–578.
- Lelovas, P.P., Kostomitsopoulos, N.G., & Xanthos, T.T. (2014). A comparative anatomic and physiologic overview of the porcine heart. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 53(5), 432–438.
- Liguori, G.R., Kanas, A.F., & Moreira, Luiz Felipe Pinho (2014). Managing the inflammatory response after cardiopulmonary bypass: review of the studies in animal models. *Revista brasileira de cirurgia cardiovascular : órgão oficial da Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, 29(1), 93–102.

- Lim, C.-H., Nam, M.-J., Lee, J.-S., Kim, H.-J., Kim, J.-Y., Shin, H.-W., et al. (2015). A meta-analysis of pulmonary function with pulsatile perfusion in cardiac surgery. *Artificial organs*, 39(2), 110–117.
- Lin, S., Zhang, Y., Dodel, R., Farlow, M.R., Paul, S.M., & Du, Y. (2001). Minocycline blocks nitric oxide-induced neurotoxicity by inhibition p38 MAP kinase in rat cerebellar granule neurons. *Neuroscience letters*, 315(1-2), 61–64.
- Lind, N.M., Moustgaard, A., Jelsing, J., Vajta, G., Cumming, P., & Hansen, A.K. (2007). The use of pigs in neuroscience: modeling brain disorders. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 31(5), 728–751.
- Lipton, P. (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological reviews*, 79(4), 1431–1568.
- Liu, Y., Wang, Q., Zhu, X., Liu, D., Pan, S., Ruan, Y., et al. (2000). Pulmonary artery perfusion with protective solution reduces lung injury after cardiopulmonary bypass. *The Annals of thoracic surgery*, 69(5), 1402–1407.
- Lomholt, M., Nielsen, S.L., Hansen, S.B., Andersen, N.T., & Hasenkam, J.M. (2002). Differential tension between secondary and primary mitral chordae in an acute in-vivo porcine model. *The Journal of heart valve disease*, 11(3), 337–345.
- Love, S., Barber, R., & Wilcock, G.K. (1999). Increased poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins in Alzheimer's disease. *Brain : a journal of neurology*, 122 (Pt 2), 247–253.
- Macedo, Francisco Igor B., Panos, A.L., Andreopoulos, F.M., Salerno, T.A., & Pham, S.M. (2013). Lung perfusion and ventilation during implantation of left ventricular assist device as a strategy to avoid postoperative pulmonary complications and right ventricular failure. *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*, 17(5), 764–766.
- Machado, L.S., Kozak, A., Ergul, A., Hess, D.C., Borlongan, C.V., & Fagan, S.C. (2006). Delayed minocycline inhibits ischemia-activated matrix metalloproteinases 2 and 9 after experimental stroke. *BMC neuroscience*, 7, 56.
- Mahl, J.A., Vogel, B.E., Court, M., Kolopp, M., Roman, D., & Nogués, V. (2006). The minipig in dermatotoxicology: methods and challenges. *Experimental and toxicologic*

pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie, 57(5-6), 341–345.

Martin, J.M., Orton, E.C., Boon, J.A., Mama, K.R., Gaynor, J.S., & Bright, J.M. (2002). Surgical correction of double-chambered right ventricle in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 220(6), 770-4, 768.

Mehlhorn, U., Krahwinkel, A., Geissler, H.J., LaRosee, K., Fischer, U.M., Klass, O., et al. (2003). Nitrotyrosine and 8-isoprostane formation indicate free radical-mediated injury in hearts of patients subjected to cardioplegia. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 125(1), 178–183.

Meurens, F., Summerfield, A., Nauwynck, H., Saif, L., & Gerdtts, V. (2012). The pig: a model for human infectious diseases. *Trends in microbiology*, 20(1), 50–57.

Mohite, P.N., Sabashnikov, A., Patil, N.P., Garcia-Saez, D., Zych, B., Zeriuoh, M., et al. (2016). The role of cardiopulmonary bypass in lung transplantation. *Clinical transplantation*, 30(3), 202–209.

Nakakuki, S. (1994). Bronchial tree, lobular division and blood vessels of the pig lung. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 56(4), 685–689.

Ng, Calvin S H, Wan, S., Yim, Anthony P C, & Arifi, A.A. (2002). Pulmonary dysfunction after cardiac surgery. *Chest*, 121(4), 1269–1277.

O'Neil, M.P., Fleming, J.C., Badhwar, A., & Guo, L.R. (2012). Pulsatile versus nonpulsatile flow during cardiopulmonary bypass: microcirculatory and systemic effects. *The Annals of thoracic surgery*, 94(6), 2046–2053.

Orton, E.C., Mama, K., Hellyer, P., & Hackett, T.B. (2001). Open surgical repair of tetralogy of Fallot in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 219(8), 1089-93, 1073.

Pelosi, A., Anderson, L.K., Paugh, J., Robinson, S., & Eyster, G.E. (2013). Challenges of cardiopulmonary bypass-a review of the veterinary literature. *Veterinary surgery : VS*, 42(2), 119–136.

Porter, A.G., & Jänicke, R.U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell death and differentiation*, 6(2), 99–104.

Presta, P., Onorati, F., Fuiano, L., Mastroroberto, P., Santarpino, G., Tozzo, C., et al. (2009). Can pulsatile cardiopulmonary bypass prevent perioperative renal dysfunction during myocardial revascularization in elderly patients? *Nephron. Clinical practice*, 111(4), c229-35.

Qi, D., Gao, M.-X., & Yu, Y. (2013). Intratracheal antitumor necrosis factor- $\alpha$  antibody attenuates lung tissue damage following cardiopulmonary bypass. *Artificial organs*, 37(2), 142–149.

Rahman, A., Ustünda, B., Burma, O., Ozercan, I.H., Cekirdekçi, A., & Bayar, M.K. (2000). Does aprotinin reduce lung reperfusion damage after cardiopulmonary bypass? *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*, 18(5), 583–588.

Ramlawi, B., Feng, J., Mieno, S., Szabo, C., Zsengeller, Z., Clements, R., et al. (2006). Indices of apoptosis activation after blood cardioplegia and cardiopulmonary bypass. *Circulation*, 114(1 Suppl), I257-63.

Reis Miranda, D., Gommers, D., Struijs, A., Dekker, R., Mekel, J., Feelders, R., et al. (2005). Ventilation according to the open lung concept attenuates pulmonary inflammatory response in cardiac surgery. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*, 28(6), 889–895.

Rogers, C.S., Stoltz, D.A., Meyerholz, D.K., Ostedgaard, L.S., Rokhlina, T., Taft, P.J., et al. (2008). Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5897), 1837–1841.

Salameh, A<sup>a</sup>, Eienkel, A., Kühne, L., Grassl, M., Salisch, S. von, Kiefer, P., et al. (2015). Hippocampal Neuroprotection by Minocycline and Epigallo-Catechin-3- Gallate Against Cardiopulmonary Bypass-Associated Injury. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 25(6), 733–742.

Salameh, A<sup>c</sup>, Halling, M., Seidel, T., & Dhein, S. (2015). Effects of minocycline on parameters of cardiovascular recovery after cardioplegic arrest in a rabbit Langendorff heart model. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 42(12), 1258–1265.

Salameh, A<sup>b</sup>, Kühne, L., Grassl, M., Gerdom, M., Salisch, S. von, Vollroth, M., et al. (2015). Protective effects of pulsatile flow during cardiopulmonary bypass. *The Annals of thoracic surgery*, 99(1), 192–199.

Schlensak, C., Doenst, T., Preußner, S., Wunderlich, M., Kleinschmidt, M., & Beyersdorf, F. (2002). Cardiopulmonary bypass reduction of bronchial blood flow: A potential mechanism for lung injury in a neonatal pig model. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 123(6), 1199–1205.

Schumacker, P.T., Gillespie, M.N., Nakahira, K., Choi, Augustine M K, Crouser, E.D., Piantadosi, C.A., et al. (2014). Mitochondria in lung biology and pathology: more than just a powerhouse. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 306(11), L962-74.

Serraino, G.F., Marsico, R., Musolino, G., Ventura, V., Gulletta, E., Santè, P., et al. (2012). Pulsatile Cardiopulmonary Bypass With Intra-Aortic Balloon Pump Improves Organ Function and Reduces Endothelial Activation. *Circulation Journal*, 76(5), 1121–1129.

Sevrioukova, I.F. (2011). Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation. *Antioxidants & redox signaling*, 14(12), 2545–2579.

Sheppard, S.V. (2004). Does leucocyte depletion during cardiopulmonary bypass improve oxygenation indices in patients with mild lung dysfunction? *British Journal of Anaesthesia*, 93(6), 789–792.

Shimamura, S., Kutsuna, H., Shimizu, M., Kobayashi, M., Hirao, H., Tanaka, R., et al. (2006). Comparison of right atrium incision and right ventricular outflow incision for surgical repair of membranous ventricular septal defect using cardiopulmonary bypass in dogs. *Veterinary surgery : VS*, 35(4), 382–387.

Shimoda, L.A., & Semenza, G.L. (2011). HIF and the lung: role of hypoxia-inducible factors in pulmonary development and disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 183(2), 152–156.

Siepe, M., Goebel, U., Mecklenburg, A., Doenst, T., Benk, C., Stein, P., et al. (2008). Pulsatile pulmonary perfusion during cardiopulmonary bypass reduces the pulmonary inflammatory response. *The Annals of thoracic surgery*, 86(1), 115–122.

Smith, A.C., & Swindle, M.M. (2006). Preparation of swine for the laboratory. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 47(4), 358–363.

Sugiura, H., & Ichinose, M. (2011). Nitrate stress in inflammatory lung diseases. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*, 25(2), 138–144.

Swindle, M.M., Makin, A., Herron, A.J., Clubb, F.J., & Frazier, K.S. (2012). Swine as models in biomedical research and toxicology testing. *Veterinary pathology*, 49(2), 344–356.

Tao, R., Kim, S.H., Honbo, N., Karliner, J.S., & Alano, C.C. (2010). Minocycline protects cardiac myocytes against simulated ischemia–reperfusion injury by inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 56(6), 659–668.

Tapuria, N., Kumar, Y., Habib, M.M., Abu Amara, M., Seifalian, A.M., & Davidson, B.R. (2008). Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury--a review. *The Journal of surgical research*, 150(2), 304–330.

Teman, N.R., Mazur, D.E., Toomasian, J., Jahangir, E., Alghanem, F., Goudie, M., et al. (2014). A novel rotary pulsatile flow pump for cardiopulmonary bypass. *ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs : 1992)*, 60(3), 322–328.

Thind, G.S., Agrawal, P.R., Hirsh, B., Saravolatz, L., Chen-Scarabelli, C., Narula, J., et al. (2015). Mechanisms of myocardial ischemia-reperfusion injury and the cytoprotective role of minocycline: Scope and limitations. *Future cardiology*, 11(1), 61–76.

Uechi, M. (2012). Mitral valve repair in dogs. *Journal of veterinary cardiology : the official journal of the European Society of Veterinary Cardiology*, 14(1), 185–192.

Uechi, M., Harada, K., Mizukoshi, T., Mizuno, T., Mizuno, M., Ebisawa, T., et al. (2011). Surgical closure of an atrial septal defect using cardiopulmonary bypass in a cat. *Veterinary surgery : VS*, 40(4), 413–417.

Uechi, M., Mizukoshi, T., Mizuno, T., Mizuno, M., Harada, K., Ebisawa, T., et al. (2012). Mitral valve repair under cardiopulmonary bypass in small-breed dogs: 48 cases (2006-2009). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 240(10), 1194–1201.

Ulgen, B.O., Field, M.G., Qureshi, W., Knight, R.A., Stephanou, A., Latchman, D.S., et al. (2011). The role of minocycline in ischemia-reperfusion injury: a comprehensive review of an

old drug with new implications. *Recent patents on cardiovascular drug discovery*, 6(2), 123–132.

Undar, A., Henderson, N., Thurston, G.B., Masai, T., Beyer, E.A., Frazier, O.H., et al. (1999). The effects of pulsatile versus nonpulsatile perfusion on blood viscoelasticity before and after deep hypothermic circulatory arrest in a neonatal piglet model. *Artificial organs*, 23(8), 717–721.

Virág, L., Robaszkiewicz, A., Rodriguez-Vargas, J.M., & Oliver, F.J. (2013). Poly(ADP-ribose) signaling in cell death. *Molecular aspects of medicine*, 34(6), 1153–1167.

Voss, B., Krane, M., Jung, C., Brockmann, G., Braun, S., Günther, T., et al. (2010). Cardiopulmonary bypass with physiological flow and pressure curves: pulse is unnecessary! *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*, 37(1), 223–232.

Vroege, R. de, van Oeveren, W., van Klarenbosch, J., Stooker, W., Huybregts, M A J M, Hack, C.E., et al. (2004). The impact of heparin-coated cardiopulmonary bypass circuits on pulmonary function and the release of inflammatory mediators. *Anesthesia and analgesia*, 98(6), 1586-94, table of contents.

Wakayama, F., Fukuda, I., Suzuki, Y., & Kondo, N. (2007). Neutrophil elastase inhibitor, sivelestat, attenuates acute lung injury after cardiopulmonary bypass in the rabbit endotoxemia model. *The Annals of thoracic surgery*, 83(1), 153–160.

Wang, W., Bai, S.-Y., Zhang, H.-B., Bai, J., Zhang, S.-J., & Zhu, D.-M. (2010). Pulsatile flow improves cerebral blood flow in pediatric cardiopulmonary bypass. *Artificial organs*, 34(11), 874–878.

Worrall, N.K., Chang, K., LeJeune, W.S., Misko, T.P., Sullivan, P.M., Ferguson, T.B., et al. (1997). TNF-alpha causes reversible in vivo systemic vascular barrier dysfunction via NO-dependent and -independent mechanisms. *The American journal of physiology*, 273(6 Pt 2), H2565-74.

Yakes, F.M., & van Houten, B. (1997). Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94(2), 514–519.

Yamano, S., Uechi, M., Tanaka, K., Hori, Y., Ebisawa, T., Harada, K., et al. (2011). Surgical repair of a complete endocardial cushion defect in a dog. *Veterinary surgery : VS*, 40(4), 408–412.

Yeh, C.-H., Chen, T.-P., Lee, C.-H., Wu, Y.-C., Lin, Y.-M., & Jing Lin, P. (2006). Inhibition of poly(adp-ribose) polymerase reduces cardiomyocytic apoptosis after global cardiac arrest under cardiopulmonary bypass. *Shock (Augusta, Ga.)*, 25(2), 168–175.

Young, R.W. (2014). Prevention of lung injury in cardiac surgery: a review. *The journal of extra-corporeal technology*, 46(2), 130–141.

Yue, L., & Yao, H. (2016). Mitochondrial dysfunction in inflammatory responses and cellular senescence: pathogenesis and pharmacological targets for chronic lung diseases. *British journal of pharmacology*.

Zhang, C., Gong, W., Liu, H., Guo, Z., & Ge, S. (2014). Inhibition of matrix metalloproteinase-9 with low-dose doxycycline reduces acute lung injury induced by cardiopulmonary bypass. *International journal of clinical and experimental medicine*, 7(12), 4975–4982.

Zhu, S., Stavrovskaya, I.G., Drozda, M., Kim, Betty Y S, Ona, V., Li, M., et al. (2002). Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature*, 417(6884), 74–78.

## 9 Anhang

### 9.1 Färbeprotokoll Hämatoxylin Eosin Färbung

---

1. Xylol	<b>10 Minuten</b>	Entparaffinisieren
2. Xylol	<b>3 Minuten</b>	Entparaffinisieren
3. Ethanol 100%	<b>3 Minuten</b>	Dehydrieren
4. Ethanol 96%	<b>3 Minuten</b>	Dehydrieren
5. Ethanol 70%	<b>3 Minuten</b>	Dehydrieren
6. Ethanol 50%	<b>3 Minuten</b>	Dehydrieren
7. Destilliertes Wasser	<b>2 Minuten</b>	Waschen
8. Hämalaun nach Mayer	<b>10 Minuten</b>	Kernfärbung
9. Leitungswasser	<b>15 Minuten</b>	Bläuen
10. 0,1 % Salzsäure	<b>ca. 10 Sekunden</b>	Spülen
11. 0,25 % Eosin G, wässrig	<b>5 Minuten</b>	Zytoplasmafärbung
12. Destilliertes Wasser	<b>1 Minuten</b>	Waschen
13. Ethanol 70%	<b>3 Minuten</b>	Dehydrieren
14. Ethanol 96%	<b>3 Minuten</b>	Dehydrieren
15. Ethanol 100%	<b>3 Minuten</b>	Dehydrieren
16. Xylol	<b>3 Minuten</b>	Reinigung
17. Xylol	<b>3 Minuten</b>	Reinigung
18. Eindeckeln mit Entellan		
19. Xylol zum Entfernen von Entellanresten		

## 9.2 Färbeprotokoll HIF-1 $\alpha$

Primärantikörper:

Santa Cruz Biotechnology HIF-1 $\alpha$  (H-206) sc- 10790 Lot # J3112

Rabbit polyclonal IgG 200 $\mu$ g/ml (Verdünnung: 1:100)

Sekundärantikörper:

Sigma- Aldrich Goat Anti Rabbit IgG # A 0545 (Verdünnung: 1:200)

Tag I

Xylol	3 x 10 Minuten	Entparaffinieren
EtOH 100% / 96% / 70%	3 x 5 Minuten	Waschen
dH <sub>2</sub> O	5 Minuten	Rehydrieren
TBS	10 Minuten	Waschen
0,01M Na Citrat	30 Minuten	98°C Permeabilisieren
	15 Minuten	Abkühlen
TBS	3 x 5 Minuten	Waschen
60% Methanol ; 40% TBS; 0,1 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	60 Minuten	endogene Peroxidase blocken
TBS	3 x 5 Minuten	Waschen
2% BSA in TBS	60 Minuten	Blocken unspezifischer Bindungsstellen
Primärantikörper in 2% BSA in TBS	über Nacht: feuchte Kammer, Kühlschrank 4°C	

Tag II

	30 Minuten	Bei Raumtemperatur erwärmen
TBS	3 x 5 Minuten	Waschen
Sekundärantikörper	60 Minuten	
TBS	3 x 5 Minuten	Waschen
AEC	20 Minuten	Färbung
TBS	2 x 5 Minuten	Waschen
Hämalaun	2 Sekunden	Kernfärbung
Scottpuffer	5 Minuten	Bläuen
Eindeckeln		
Nagellack		

### 9.3 Färbeprotokoll AIF

Primärantikörper:

Santa Cruz Biotechnology AIF (H-300) sc 5586 Lot # J1012

Rabbit polyclonal IgG 200µg/ml Verdünnung: 1:50

Sekundärantikörper:

Sigma- Aldrich Goat Anti Rabbit IgG # A 0545

Verdünnung: 1:200

Tag I

Xylol	3 x 10 Minuten	Entparaffinieren
EtOH 100% / 96% / 70%	3 x 5 Minuten	Waschen
dH <sub>2</sub> O	5 Minuten	Rehydrieren
TBS	10 Minuten	Waschen
0,01M Na Citrat	30 Minuten	98°C Permeabilisieren
	15 Minuten	Abkühlen
TBS	3 x 5 Minuten	Waschen
60% Methanol ; 40% TBS; 0,1 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	60 Minuten	endogene Peroxidase blocken
TBS	3 x 5 Minuten	Waschen
2% BSA in TBS	60 Minuten	Blocken unspezifischer Bindungsstellen
Primärantikörper in 2% BSA in TBS	über Nacht: feuchte Kammer, Kühlschrank 4°C	

Tag II

	30 Minuten	Bei Raumtemperatur erwärmen
TBS	3 x 5 Minuten	Waschen
Sekundärantikörper	60 Minuten	
TBS	3 x 5 Minuten	Waschen
AEC	20 Minuten	Färbung
TBS	2 x 5 Minuten	Waschen
Hämalaun	2 Sekunden	Kernfärbung
Leitungswasser	3 Minuten	Bläuen
Eindeckeln		
Nagellack		

## 9.4 Färbeprotokoll PAR

Primärantikörper:

BIO RAD Mouse anti Human Poly (ADP-Ribose) IgG

MCA 1480 ; Monoclonaler Antikörper (Verdünnung: 1:300)

Sekundärantikörper:

Sigma- Aldrich Goat Anti Mouse IgG # A 4416 Peroxidase Conjugate (Verdünnung: 1:200)

Tag I

Xylol	3 x10 Minuten	Entparaffinieren
EtOH 100% / 96% / 70%	3 x 5 Minuten	Waschen
dH <sub>2</sub> O	5 Minuten	Rehydrieren
TBS	10 Minuten	Waschen
0,01M Na Citrat	30 Minuten	98°C Permeabilisieren
	15 Minuten	Abkühlen
TBS	3 x 5 Minuten	Waschen
60% Methanol ; 40% TBS; 0,1 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	60 Minuten	endogene Peroxidase blocken
TBS	3 x 5 Minuten	Waschen
2% BSA in TBS	60 Minuten	Blocken unspezifischer Bindungsstellen
Primärantikörper in 2% BSA in TBS	über Nacht: feuchte Kammer, Kühlschrank 4°C	

Tag II

	30 Minuten	Bei Raumtemperatur erwärmen
TBS	3 x 5 Minuten	Waschen
Sekundärantikörper	60 Minuten	
TBS	3 x 5 Minuten	Waschen
AEC	20 Minuten	Färbung
TBS	2 x 5 Minuten	Waschen
Hämalaun	1 Minute	Kernfärbung
Scottpuffer	5 Minuten	Bläuen
Eindeckeln		
Nagellack		

## 9.5 Färbeprotokoll Cleaved Caspase 3

Primärantikörper:

Cell Signaling Technology Cleaved Caspase-3 D 175 Rabbit Antibody # 9661 L  
Lot. 43 Ref 10/2014 (Verdünnung: 1:200)

Sekundärantikörper:

Sigma- Aldrich Goat Anti Rabbit IgG- Peroxidase # A 0545 (Verdünnung: 1:200)

Tag I

Xylol	3 x 10 Minuten	Entparaffinieren
EtOH 100% / 96% / 70%	3 x 5 Minuten	Waschen
dH <sub>2</sub> O	5 Minuten	Rehydrieren
TBS	10 Minuten	Waschen
Tris-EDTA-Puffer	30 Minuten	98°C Permeabilisieren
	20 Minuten	Abkühlen
TBS	3 x 5 Minuten	Waschen
60% Methanol ; 40% TBS; 0,1 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	60 Minuten	endogene Peroxidase blocken
TBS	3 x 5 Minuten	Waschen
2% BSA in TBS	60 Minuten	Blocken unspezifischer Bindungsstellen
Primärantikörper in 2% BSA in TBS	über Nacht: feuchte Kammer, Kühlschrank 4°C	

Tag II

	30 Minuten	Bei Raumtemperatur erwärmen
TBS	3 x 5 Minuten	Waschen
Sekundärantikörper	60 Minuten	
TBS	3 x 5 Minuten	Waschen
AEC	20 Minuten	Färbung
TBS	2 x 5 Minuten	Waschen
Hämalaun	3 Sekunden	Kernfärbung
Scottpuffer	5 Minuten	Bläuen
Eindeckeln		
Nagellack		

## 9.6 Färbeprotokoll Nitrotyrosin

Primärantikörper:

Millipore Anti Nitrotyrosin ; Cat. # 06-284; Lot # 2154194 (Verdünnung: 1:500)

Sekundärantikörper:

Sigma- Aldrich Goat Anti Rabbit IgG # A 0545 (Verdünnung: 1:200)

Tag I

---

Xylol	3 x10 Minuten	Entparaffinieren
EtOH 100% / 96% / 70%	3 x 5 Minuten	Waschen
dH <sub>2</sub> O	5 Minuten	Rehydrieren
TBS	10 Minuten	Waschen
Tris-EDTA-Puffer	30 Minuten	98°C Permeabilisieren
	15 Minuten	Abkühlen
TBS	3 x 5 Minuten	Waschen
60% Methanol ; 40% TBS; 0,1 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	60 Minuten	endogene Peroxidase blocken
TBS	3 x 5 Minuten	Waschen
4% Milch in TBS	60 Minuten	Blocken unspezifischer Bindungsstellen
Primärantikörper in 2% BSA in TBS	über Nacht: feuchte Kammer, Kühlschrank 4°C	

Tag II

---

	30 Minuten	Bei Raumtemperatur erwärmen
TBS	3 x 5 Minuten	Waschen
Sekundärantikörper	60 Minuten	
TBS	3 x 5 Minuten	Waschen
AEC	10 Minuten	Färbung
TBS	2 x 3 Minuten	Waschen
Eindeckeln		
Nagellack		

## 9.7 Färbeprotokoll TNF $\alpha$

Primärantikörper:

Santa Cruz Biotechnology TNF $\alpha$  (N-19): sc- 1350 Lot # C 1615 (Verdünnung : 1:100)

Sekundärantikörper:

Sigma- Aldrich Rabbit Anti Goat IgG- Peroxidas # A 5420 8 (Verdünnung: 1:200)

Tag I

Xylol	3 x 10 Minuten	Entparaffinieren
EtOH 100% / 96% / 70%	3 x 5 Minuten	Waschen
dH <sub>2</sub> O	5 Minuten	Rehydrieren
TBS	10 Minuten	Waschen
Tris-EDTA-Puffer	30 Minuten	98°C Permeabilisieren
	15 Minuten	Abkühlen
TBS	3 x 5 Minuten	Waschen
60% Methanol ; 40% TBS; 0,1 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	60 Minuten	endogene Peroxidase blocken
TBS	3 x 5 Minuten	Waschen
2% BSA in TBS	60 Minuten	Blocken unspezifischer Bindungsstellen
Primärantikörper in 2% BSA in TBS	über Nacht: feuchte Kammer, Kühlschrank 4°C	

Tag II

	30 Minuten	Bei Raumtemperatur erwärmen
TBS	3 x 5 Minuten	Waschen
Sekundärantikörper	60 Minuten	
TBS	3 x 5 Minuten	Waschen
AEC	10 Minuten	Färbung
TBS	2 x 3 Minuten	Waschen
Eindeckeln		
Nagellack		

## 9.8 Ergebnisse der HPLC-Messung für ATP, ADP und AMP

Noch nicht veröffentlichte Daten (DHEIN et al. (2015), SALAMEH et al. (2015<sup>a,b</sup>))

Schwein	ATP	ADP	AMP
	µg/mg Gewebe		
<b>Kontrolle</b>			
	0,589	0,467	0,659
	0,820	0,401	0,731
	1,643	0,311	0,032
	1,069	0,254	0,016
	0,560	0,068	0,262
	0,122	0,055	0,691
	0,103	0,128	0,207
<b>Kontrolle+Minocyclin</b>			
	0,781	0,307	0,033
	0,432	0,218	0,037
	0,905	0,294	0,024
	0,813	0,286	0,022
	0,692	0,240	0,007
	0,789	0,210	0,062
	0,861	0,228	0,056
<b>HLM</b>			
	0,076	0,067	1,829
	0,024	0,058	0,434
	0,134	0,101	0,993
	0,024	0,069	0,392
	0,237	0,180	0,306
<b>Pulsatile HLM</b>			
	1,721	0,269	0,019
	1,155	0,323	0,024
	0,530	0,217	0,046
	1,602	0,168	0,021
	0,630	0,299	0,019
	1,132	0,298	0,060
	0,734	0,291	0,023
<b>HLM+Minocyclin</b>			
	0,888	0,119	0,012
	0,448	0,222	0,283
	0,838	0,127	0,300
	0,640	0,151	0,232
	0,761	0,175	0,268
	0,584	0,169	0,227

## 10 Publikationsverzeichnis

Greimann W, Salameh A, Vollroth M, Bahramsoltani M, Dähnert I (2017).

„Minocycline and pulsatile blood flow as a protective approach in cardiopulmonary bypass-induced lung injuries” The Thoracic and Cardiovascular Surgeon: 2017; 65(S02): 111-142

Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie und der deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Leipzig, 13.02.2017

A. Salameh, W. Greimann, M. Vollroth, S. Dhein, M. Bahramsoltani, I.Dähnert

„Lung protection in cardio-pulmonary bypass”

Journal of Physiology and Pharmacology: 2017 Feb; 68(1): 99-116

## 11 Danksagung

Meinen herzlichen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Ingo Dähnert für die finanzielle Unterstützung sowie die Bereitstellung der Materialien und Räumlichkeiten aussprechen.

Frau Prof. Dr. Aida Salameh möchte ich besonders für die Themenvergabe und ihre starke Unterstützung hinsichtlich ihrer intensiven Betreuung danken.

Auch Frau Prof. Dr. Mahtab Bahramsoltani gilt ein besonderer Dank für ihre Korrekturen und Ideen beim Schreiben dieser Arbeit.

Zudem danke ich Frau Prof. Dr. Aida Salameh und Frau Prof. Dr. Mahtab Bahramsoltani, dass sie mir zu jeder Tages- und Nachtzeit helfend zur Seite standen und mir stets offene Fragen beantworteten. Ich hätte mir keine besseren Betreuerinnen wünschen können und bin den beiden für ihre Hilfe unendlich dankbar!

Meinen Arbeitskollegen Bernhard Kasper, Kathleen Nieschke und Maren Keller möchte ich für die nette Zusammenarbeit danken.

Bei meiner Cousine Henrike Putzki möchte ich mich herzlichst bedanken, dass sie sich die Zeit genommen hat diese Arbeit Korrektur zu lesen.

Meinen Großeltern danke ich dafür, dass sie mich inspiriert haben Tiermedizin zu studieren und mir beigebracht haben, dass Bildung das höchste Gut ist.

Meinen Freund Johannes Walliser danke ich, dass er mich während dieser Arbeit ermutigt und motiviert hat und es täglich schaffte, mich auch in schwierigen Phasen immer wieder zum Lachen zu bringen.

Der größte Dank gilt meinen Eltern. Ihnen möchte ich von ganzen Herzen Danke sagen, weil sie immer für mich da sind, mich unterstützen und mir alles, wovon ich träume, ermöglichen. Ohne ihre Unterstützung wäre ich nicht dahin gekommen, wo ich jetzt bin.

Danke.

## **12 Selbständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 14.07.2017

Wiebke Greimann