

**Aus der Klinik für Kinderkardiologie und angeborene Herzfehler
Deutsches Herzzentrum Berlin**

DISSERTATION

**Veränderung des regionalen Blutflusses und Effekt
von Methylprednisolon auf den regionalen Blutfluss
im Gehirn nach kardiopulmonalem Bypass und
Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von
Majed Kanaan
geb. in
Sahlé, Libanon

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H. Abdul-Khaliq
2. Priv.-Doz. Dr. med. M. Gutberlet
3. Prof. Dr. med. S. Vogt

Datum der Promotion: 14.03.2008

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	8
1.1. Angeborene Herzfehler	8
1.2. Kardiopulmonaler Bypass (CPB) und Hypothermie	9
1.3. Störung der Mikrozirkulation	10
1.4. Strategien zur Verbesserung der Mikrozirkulation und zur Neuroprotektion.....	11
1.4.1. Hypothermie.....	12
1.4.2. Hämodilution.....	13
1.4.3. Regulation des Säure-Basen-Haushaltes	13
1.4.4. Heparin-coated circuit.....	14
1.4.5. Retrograde zerebrale Perfusion	15
1.4.6. Steroide	15
1.5. Methoden zur Messung der Organdurchblutung.....	17
1.6. Hypothese, Fragestellung und Ziel der Arbeit	19
2. MATERIAL UND METHODIK	20
2.1. Operationstechnik	20
2.1.1. Vorbereitung und Einteilung der Versuchstiere	20
2.1.2. Anästhesie	21
2.1.3. Monitoring	21
2.1.4. Herz-Lungen-Maschine (HLM)	22
2.1.5. Thorakotomie und Anschluss des CPB.....	24
2.1.6. Kühlung	25
2.1.7. Reperfusion.....	25
2.1.8. Mikrosphären	26
2.1.8.1. Auswahl der Mikrosphären	26
2.1.8.2. Vorbereitung und Injektion der Mikrosphären	28
2.1.9. Ende der operativen Phase.....	28
2.2. Messung der Organperfusion mittels Mikrosphären.....	29
2.2.1. Aufbereitung der Organproben	29
2.2.2. Aufbereitung der Blutproben.....	31
2.2.3. Fluoreszenz.....	31
2.2.4. Fluoreszenzspektrometer	33
2.3. Untersuchung der morphologischen Veränderungen im Gehirn.....	34
2.4. Statistische Auswertung.....	35
3. ERGEBNISSE	36
3.1. Messung des regionalen Blutflusses.....	36
3.2. Regionaler Blutfluss in den peripheren Organen vor und nach DHCA ...	36
3.2.1. Niere.....	38
3.3. Veränderung des regionalen Blutflusses im ZNS.....	39
3.3.1. Basalganglien	41
3.3.2. Kleinhirn	41
3.3.3. Medulla	42
3.3.4. Parietallappen	42
3.3.5. Frontallappen	43
3.3.6. Okzipitallappen	43
3.4. Einfluss der Vorbehandlung mit Steroiden auf die regionale zerebrale Perfusion und die regionale Hirnzellschädigung	44

3.4.1. Versuchsgruppen	44
3.4.2. Hämodynamische Daten	44
3.4.3. Oxygenation	45
3.4.4. Elektrolyte und Glukose-Metabolismus.....	46
3.4.5. Zerebrales Ödem	46
3.4.6. Neuronale Nekrose im Hippocampus	47
3.4.7. Neuronale Nekrose im Neokortex (Gyrus cinguli)	48
3.4.8. Regionale Perfusion, Einfluss der Vorbehandlung mit Methylprednisolon.....	49
3.5. Zusammenhang zwischen der regionalen Perfusion und der zerebralen Zellschädigung	51
3.5.1. Kortex	52
3.5.2. Gyrus cinguli.....	53
3.5.3. Hippocampus	54
3.5.4. Nekrose und Perfusion in den drei Gruppen.....	55
4. DISKUSSION	57
4.1. Diskussion der Methode	57
4.1.1. Messung der Organperfusion.....	57
4.1.2. Fluoreszierende Mikrosphären.....	59
4.2. Diskussion der Ergebnisse.....	60
4.2.1. Pathomechanismus der Gewebep erfusionsstörung nach CPB und Kühlung	60
4.2.2. Veränderung der regionalen Perfusion in den peripheren Organen..	62
4.2.3. Veränderung der regionalen Hirnperfusion und Korrelation mit Hirnzellschädigung.....	65
4.2.4. Einfluss von Steroiden auf die Hirnperfusion	67
4.2.5. Vergleich der drei Versuchsgruppen	68
4.2.6. Veränderung der Perfusion im ZNS	69
4.2.7. Morphologische Veränderungen im ZNS, Nekrose	70
5. ZUSAMMENFASSUNG	72
REFERENZEN	74
LEBENS LAUF	83
PUBLIKATIONEN/KURZFASSUNGEN.....	84
DANKSAGUNG	85
EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG.....	86
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	6

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BGA	Blutgasanalyse
CPB	kardiopulmonaler Bypass
DHCA	Deep hypothermic circulatory arrest (Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie)
HF	Herzfrequenz
HLM	Herz-Lungen-Maschine
IL	Interleukin
MAD	Arterieller Mitteldruck
MP	Methylprednisolon
MPintra	Gruppe mit intrathekal appliziertem Methylprednisolon
MPsyst	Gruppe mit systemisch appliziertem Methylprednisolon
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck in BGA
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck in BGA
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
ZVD	Zentralvenöser Druck

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Formel 1.1	Fick'sche Gleichung.....	17
Formel 1.2	Bestimmung des regionalen Blutflusses bei fluoreszierenden Mikrosphären.....	36
Abbildung 2.1	Oxygenator und Pumpenköpfe der Herz-Lungen-Maschinen....	23
Abbildung 2.2	Versuchsaufbau mit Herz-Lungen-Maschine.....	24
Abbildung 2.3	Zeitlicher Verlauf der Operation.....	26
Abbildung 2.4	Mixtur von Mikrosphärenpartikeln.....	27
Abbildung 2.5	Vakuumpumpe zur Filtration und Trennung der Mikrosphärenpartikel von der Verdauungslösung.....	30
Abbildung 2.6	Exzitations- und Emissionsmaxima der in unserem Versuch verwendeten Mikrosphären.....	32
Abbildung 2.7	Prinzip eines Photomultipliers.....	33
Abbildung 2.8	Fluoreszenzspektrometer (LS50B) zur Messung der Extinktionsspektren der fluoreszierenden Mikrosphären.....	34
Abbildung 3.1	Graphische Darstellung des regionalen Blutflusses in den peripheren Organen im Direktvergleich vor und nach DHCA....	37
Abbildung 3.2	Graphische Darstellung des regionalen Blutflusses in der Niere.....	38
Abbildung 3.3	Graphische Darstellung der Blutflusswerte in den ZNS-Arealen im Direktvergleich.....	40
Abbildung 3.4	Graphische Darstellung des Blutflusses in den Basalganglien..	41
Abbildung 3.5	Graphische Darstellung des Blutflusses im Kleinhirn.....	41
Abbildung 3.6	Graphische Darstellung des Blutflusses in der Medulla.....	42
Abbildung 3.7	Graphische Darstellung des Blutflusses im Parietallappen.....	42
Abbildung 3.8	Graphische Darstellung des Blutflusses im Frontallappen.....	43
Abbildung 3.9	Graphische Darstellung des Blutflusses im Okzipitallappen.....	43
Abbildung 3.10	Hämodynamische Daten.....	44
Abbildung 3.11	Arterielle Blutgasanalysen.....	45
Abbildung 3.12	Repräsentative histologische Schnitte aller drei Gruppen im Hippocampus.....	47
Abbildung 3.13	Nekrose im Hippocampus (in Prozent).....	48
Abbildung 3.14	Nekrose im Gyrus cinguli (in Prozent).....	49

Abbildung 3.15	Vergleich der drei Gruppen am Ende der Reperfusionphase...50
Abbildung 3.16	Prozentualwerte der Perfusion am Ende der Reperfusionphase in Prozent des Ausgangswertes vor der Kühlung.....51
Abbildung 3.17	Zusammenhang zwischen der regionalen Perfusion in den Kortexarealen in der Reperfusionphase und dem Ausmaß der Schädigung im Kortex.....52
Abbildung 3.18	Zusammenhang zwischen dem Blutfluss in den Kortexarealen am Ende der Reperfusionphase und dem Ausmaß der Schädigung im Gyrus cinguli.....54
Abbildung 3.19	Zusammenhang zwischen dem Blutfluss im Frontallappen in der Reperfusionphase und dem Ausmaß der Schädigung im Hippocampus.....55
Abbildung 3.20	Vergleich der drei Gruppen.....56

1.EINLEITUNG

1.1.Aangeborene Herzfehler

Unter dem Begriff „angeborene Herzfehler“ fasst man verschiedene Erkrankungen zusammen, die durch eine embryonale Störung bei der Entwicklung des Herzens zustande kommen. Angeborene Herzfehler sind mit einer Inzidenz von 0,7–0,8 % bei allen Lebendgeborenen die häufigsten angeborenen Erkrankungen.

Jedes Jahr werden in Deutschland rund 6.000 Kinder mit einem Herzfehler geboren. Über 90 Prozent der kleinen Patienten erreichen heute durch die Fortschritte in der Diagnostik und Behandlung im Bereich der Kinderkardiologie, Herzchirurgie und Anästhesie das Erwachsenenalter.

Von den diagnostizierten angeborenen Herzfehlern können heute etwa 80 % durch Operation oder interventionelle Therapie korrigiert bzw. palliativ behandelt werden, während bei den übrigen 20 % entweder eine spontane Heilung eintritt oder diese inoperabel sind, wie Ventrikelseptumdefekte mit pulmonalerarterieller Hypertension, und daher mit einer eingeschränkten Lebenserwartung verbunden sind. Ohne operative bzw. interventionelle Therapie ist in Abhängigkeit von der Schwere bzw. Komplexität des Herzfehlers die Lebenserwartung im Spontanverlauf sehr unterschiedlich. Sie liegt zwischen wenigen Tagen bis zu einer fast normalen Lebenszeit.

Bei der operativen Korrektur der angeborenen Herzfehler ist die extrakorporale Zirkulation durch den Einsatz des kardiopulmonalen Bypasses (CPB) zu einem unentbehrlichen Hilfsmittel geworden, so dass auch komplexe, schwerwiegende Malformationen des Herzens und der herznahen Gefäße mittlerweile im frühen Kindesalter gut operabel sind. Erste Ansätze der heutzutage in vielen Kliniken weltweit routinemäßig eingesetzten extrakorporalen Zirkulation fanden sich bereits zu Beginn des 19. Jahrhunderts. So vermuteten schon LeGallois et al., dass ein vom Herz-Kreislaufsystem abgeschnittenes „Kompartiment“ des Körpers durch entsprechende artifizielle Perfusion seine Funktion aufrechterhalten kann (1).

1.2. Kardiopulmonaler Bypass (CPB) und Hypothermie

Mit dem ersten Einsatz des CPB im Jahre 1953 durch Gibbon in Philadelphia erweiterte sich das operative Spektrum erheblich. Eingriffe am offenen, stillstehenden Herzen wurden möglich. Der Einsatz des CPB hat einen entscheidenden Vorteil. Er ermöglicht dem Chirurgen das Operieren am stillstehenden Herzen, was -bei solchen komplexen Eingriffen- zu nicht unerheblichen Reduzierung des Verletzungsrisikos anderer Myokardbereiche gegenüber dem Operieren am schlagenden Herzen führt.

Die Entwicklung der Korrekturoperationen der angeborenen Herzfehler wurde neben dem Einsatz des CPB auch durch den Einsatz des Kreislaufstillstandes mit systemischer Hypothermie optimiert. Stillstandphasen von bis zu 60 Minuten werden dabei durchgeführt. Sie bieten dem Chirurgen den Vorteil eines möglichst blutfreien Operationsfeldes, was gerade bei Korrektur komplexer Malformationen z.B. im Aortenbogenbereich sowie beim hypoplastischen Linksherzsyndrom und bei anderen Fehlbildungen von Bedeutung ist. Eine Operation am offenen Herzen kann mit Hilfe des CPB, mit oder ohne hypotherme Perfusion und Kreislaufstillstand, zur Organprotektion durchgeführt werden (2, 3, 4, 5).

Doch der Einsatz des CPB sowohl mit als auch ohne Kreislaufstillstand ist nicht risikofrei. Eine der wesentlichen Komplikationen bei solchen Eingriffen ist das Auftreten eines postoperativen systemischen Entzündungsreaktions-Syndroms (SIRS) hervorgerufen sowohl durch das operative Trauma als auch durch den Einsatz des CPB. Der Blutkontakt mit dieser großen, fremden Kunststoffoberfläche (Oxygenator, Schlauchsystem) ist ein großes Risiko für eine generalisierte inflammatorische Reaktion. Diese Reaktion führt zu einer massiven Freisetzung inflammatorischer Mediatoren und zu einer Aktivierung des Komplementsystems (6). Interleukine (IL-6, IL-8) und andere biochemische Marker dienen als Indikator dieser Entzündungsreaktion, wobei Patienten nach Kreislaufstillstand höhere Werte für IL-6 und IL-8 aufwiesen, als die, die nur einem CPB ausgesetzt waren (7).

Eine der wichtigsten Komplikationen nach herzchirurgischen Eingriffen ist weiterhin die zerebrale Schädigung. Ähnlich den Funktionsstörungen vieler Organe werden Beeinträchtigungen der neurozerebralen Funktion erst in der postoperativen Phase

bzw. in der späteren Entwicklung evident (8). Diese beinhalten ein weites Spektrum von verminderter kognitiver Leistungsfähigkeit und Retardierung in der Entwicklung im Sinne eines „minimal brain dysfunction syndrome“ bis zu schweren Defiziten wie spastischen zerebralen Lähmungen und Choreoathetosen (9, 10, 11). Viele dieser neurologischen Probleme werden mit den Auswirkungen des CPB und der tiefen Hypothermie mit und ohne Kreislaufstillstand assoziiert (9).

Eine andere gehäuft aufgetretene Komplikation nach kardiochirurgischen Eingriffen mit CPB und Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie (DHCA) stellt das akute Nierenversagen dar. Die Entwicklung eines postoperativen Nierenversagens mit der Notwendigkeit einer Hämodialyse ist mit einer erhöhten Hospitalization und Mortalität verbunden (12). Bei älteren Patienten (13) und bei Säuglingen (14) scheint dieser Einsatz eine unabhängige Variable für das Risiko einer postoperativen Nierenschädigung zu sein, wobei eine Studie wohl die Anwendung, nicht aber die Dauer des hypothermen Kreislaufstillstandes als Risikofaktor identifizierte (15).

Der Pathomechanismus dieser Organdysfunktionen nach herzchirurgischen Eingriffen bei Kindern ist multifaktoriell und von vielen prä-, intra-, und postoperativen Gegebenheiten abhängig. Diese sind u.a. Faktoren, die in der Methodik der extrakorporalen Zirkulation selbst liegen und daher zwangsläufig mitdiskutiert werden müssen, z.B. die Entscheidung über normo- oder hypotherme Perfusion, die Einleitung eines transienten Kreislaufstillstandes, die Perfusionsgeschwindigkeit und -druckverhältnisse während des CPB, die Dauer des CPB und/oder des Kreislaufstillstandes, die pH-Veränderung, aber auch pathophysiologische Veränderungen, v.a. inflammatorische Reaktionen (SIRS) nach CPB.

1.3. Störung der Mikrozirkulation

Die Störung der Mikrozirkulation durch den Einsatz des CPB spielt eine Schlüsselrolle in der pathologischen Kaskade. Der Kontakt mit der fremden Oberfläche kann bei den Erythrozyten zu Verlust der Verformbarkeit sowie zu Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion führen, dadurch kommt es einerseits zur Gerinnungsstörung und andererseits zur Aktivierung von Komplementfaktoren mit

Endothelschädigung. In Folge kommt es zu Thrombosen mit Lumenverlegung sowie zum Flüssigkeitsaustritt ins Gewebe (16). Der Anstieg des mikrovaskulären Filtrationsdruckes sowie die Verringerung des kolloidosmotischen Druckes führen zum Anstieg des extravasalen Lungenwassers und zum Myokardödem (17, 18).

Die treibende Kraft für den Flüssigkeitsaustausch in der Mikrozirkulation ist die Differenz des transvaskulären hydrostatischen und kolloidosmotischen bzw. onkotischen Druckes. Der effektive Filtrationsdruck ergibt sich somit aus dem mikrovaskulären Druck und dem hydrostatischen Druck, sowie dem onkotischen Druck des Plasmas und der interstitiellen Flüssigkeit (19).

Neben der regionalen Endothelschädigung in den Kapillaren verschiedener Organe spielt die gestörte Perfusion durch andere hämodynamische Faktoren, wie ein niedriges Herzzeitvolumen und ein gestörter System- und Lungenwiderstand, eine zusätzliche Rolle. Die frühe postoperative Phase nach CPB ist durch die Einschränkung der linksventrikulären Funktion, die Erhöhung des pulmonalen Gefäßwiderstandes und des pulmonalarteriellen Druckes gekennzeichnet. So kommen in dieser Situation der intravaskulär niedrige onkotische und der erhöhte hydrostatische Druck zusammen und erhöhen den effektiven kapillären Filtrationsdruck innerhalb der Mikrozirkulation der Lunge. Die vermehrte interstitielle Flüssigkeitsansammlung kann somit zur Funktionseinschränkung der Lunge bis hin zum Lungenödem führen (17, 20).

Zur Verbesserung der Organperfusion und zum Schutz der Organe während des CPB wurden in den letzten Jahren verschiedene hämodynamische und pharmakologische Maßnahmen anhand klinischer und tierexperimenteller Untersuchungen erprobt.

1.4. Strategien zur Verbesserung der Mikrozirkulation und zur Neuroprotektion

Es besteht bei Risikokindern mit einer geplanten Operation am offenen Herzen mit DHCA, neben komplettem Monitoring der zerebralen Oxygenation und Perfusion, zusätzlich die Möglichkeit, durch Vorbehandlung mit bestimmten Pharmaka der Entstehung möglicher zerebraler Schäden präoperativ entscheidend

entgegenzuwirken (21). Weiterhin werden zusätzliche Pharmaka, wie Milrinone, NO, NO-Präparate (Nitroglycerin, Nitroprussid) und Ilomedin, zur Beeinflussung der Gefäßreagibilität und Verbesserung der Organperfusion eingesetzt.

1.4.1. Hypothermie

Bei der Reduktion der systemischen Körpertemperatur unterscheidet man zwischen einer milden Hypothermie (Temperaturen von 35 bis 30 °C), einer moderaten Hypothermie (Temperaturen von 29 bis 25 °C) und einer tiefen Hypothermie (Temperaturen von 25 bis 15 °C).

Milde Hypothermie beeinflusst immunologische Reaktionen. Die durch den CPB initiierte Komplementaktivierung wird deutlich abgeschwächt und die zelluläre Antwort der neutrophilen Granulozyten reduziert (22). Hypothermie verzögert die ansteigende Expression von neutrophilen CD11b- und CD11c-positiven Granulozyten (23).

Hypothermie trägt zur Aufrechterhaltung der Kapillarperfusion bei und inhibiert eine Steigerung der Interaktion zwischen Leukozyten und Gefäßwand (24). Es wurde andererseits beobachtet, dass im Rahmen der Wiedererwärmung und Reperfusion nach Hypothermie eine verstärkte Komplementaktivierung stattfindet (24). Diese Komplementaktivierung könnte zu einer verstärkten, Komplement-induzierten, Granulozytenaggregation führen, was zu einer globalen Entzündungsreaktion und zur Bildung von Mikroembolien führt. Dies führt zu einer Störung der Mikrozirkulation und der Gewebepfusion mit verminderter Toleranz für Ischämie.

Das menschliche Gehirn kann einen normothermen Kreislaufstillstand für 3 bis 5 Minuten ohne dauerhaften Schaden überstehen. Diese Ischämie-Toleranz des Gehirns verlängert sich bei 28° bis 30°C auf 8 bis 10 Minuten und bei einer systemischen Körpertemperatur unter 20°C auf bis zu 40 Minuten (25). Bei Stillstandphasen über 60 bis 70 Minuten scheint die allein durch Kühlung bedingte protektive Wirkung der tiefen Hypothermie an die Grenzen ihrer Wirksamkeit zu treten (26, 27).

1.4.2. Hämodilution

Eine Protektion durch Hämodilution (Erniedrigung des Hämatokritwertes unter 25%) während CPB und DHCA ist umstritten. Eine Hämodilution sollte vor allem die Fließgeschwindigkeit im Kapillarbett verbessern und das Sludge-Phänomen (reversible Aggregation der Erythrozyten mit Strömungsbehinderung des Blutes) verhindern. Studien haben belegt, dass die Erniedrigung des Hämatokrits die zerebrale Perfusion zwar verbessert, aber es trat eine Verschlechterung der Oxygenation ein (28). Eine Hämodilution bedeutet eine Verringerung des Sauerstoffangebotes. Dieses führt im Gehirn zu einer reaktiven Hyperperfusion durch Dilatation der Blutgefäße. Die Hyperperfusion wurde in einigen Studien als Zeichen einer zerebralen Protektion gewertet (28, 29). Diese reaktive Fähigkeit durch die Hämodilution ist jedoch limitiert: Hämatokritwerte unter 15% zeigten eine deutliche Verschlechterung des Sauerstoffangebotes (30). Ein ausreichendes Angebot an intravaskulär verfügbarem Sauerstoff durch Optimierung des Hämatokritwertes sollte während der Operationsphasen immer im Vordergrund stehen. Zahlreiche Studien haben auf den protektiven Effekt höherer Hämatokritwerte, besonders in dieser Phase, hingewiesen (31).

1.4.3. Regulation des Säure-Basen-Haushaltes

Eine weitere wichtige Rolle bei der Entstehung von zerebraler Hypoperfusion spielt auch die Wahl des intraoperativen pH-Managements. Bei Verwendung des pH-stat-Protokolls soll der arterielle pH-Wert konstant gehalten werden, ungeachtet der herrschenden Körperkerntemperatur. Da der Blut-pH aber mit sinkender Körpertemperatur progressiv ansteigt, muss der CO₂-Gehalt der Zuluft zum Oxygenator des CPB erhöht werden, um den pH-Wert konstant zu halten. Umgekehrt wird bei Verwendung des Alpha-stat-Protokolls das Verhältnis dissoziierter zu undissoziierter α -Imidazolgruppen im Histidin-Puffersystem, dessen Dissoziationskonstante parallel zu der vom Wasser verläuft, konstant gehalten. Dies hat den Vorteil, dass die Autoregulation der zerebralen Perfusion sogar bei sehr niedrigem mittlerem arteriellem Blutdruck (MAD) während nicht temperaturkorrigiertem (alpha-stat) pH-Management völlig erhalten bleibt. Im Gegensatz dazu

wird durch temperaturkorrigiertes pH-Management (pH-stat) die zerebrale Perfusion linear abhängig gegenüber dem MAD. Dies hat eine wesentliche Erhöhung der zerebralen Perfusion zur Folge, wodurch aber auch die embolische Belastung gesteigert wird (32).

Eine entscheidende Verbesserung im Sinne einer neuroprotektiven Strategie ließ sich jedoch allein durch Veränderung des Säure-Basen-Haushaltes nicht erreichen (33). Ein protektiver Effekt ließe sich möglicherweise durch Kombination beider Methoden, nämlich dem Einsatz der Alpha-stat-Methode während der Kühlung und der pH-stat-Methode während der Erwärmung, erzielen. Klinische oder experimentelle Daten diesbezüglich sind nicht vorhanden.

1.4.4. Heparin-coated circuit

Eine zentrale Bedeutung für die Fortschritte der extrakorporalen Zirkulation war die Entdeckung des Heparins aus Leberextrakten durch McLean im Jahr 1916. Howell und Holl erkannten 1918 die Bedeutung dieser Substanz und gaben ihr nach dem Ursprungsorgan den Namen Heparin. Die gerinnungshemmende Substanz wurde aus der Leber isoliert und ist auch in Lungen-, Herz- und Muskelgewebe sowie in Dünndarmmukosa, basophilen Granulozyten und in Mastzellen zu finden.

Heparine sind negativ geladene sulfatierte Glukosaminoglykane. Heparin entfaltet seine antikoagulatorische Wirkung, indem es Komplexe mit ATIII bildet. Diese Komplexe beschleunigen die Gerinnungshemmung durch ATIII um das 1000fache (34, 35).

Positive Eigenschaften in Bezug auf die Thrombogenität von heparinisierten Oberflächen wurden erstmals 1963 beschrieben (36). Die Heparinbeschichtung der Oxygenatoren führt zu einer geringen Adhäsion von Plasmaproteinen, was einerseits zu einer schnellen Bildung einer blutfreundlichen Sekundärmembran auf der Oberfläche führt und andererseits eine weitere Denaturierung und somit Aktivierung der adhären Proteine verhindert. Viele Studien haben gezeigt, dass die Heparinbeschichtung durch adsorption inflammatorischer Zytokine eine

überschießende Immunantwort verhindert und die Lungenfunktion während der extrakorporalen Zirkulation verbessert (37, 38).

1.4.5. Retrograde zerebrale Perfusion

Um die zerebrale Perfusion nicht komplett zu unterbinden, wird eine selektive Perfusion mit niedrigem Fluss bei Korrektur komplexer Herzvitien angewandt. Diese Methode, bei der über die in der oberen Hohlvene liegenden Kanülen eine retrograde Perfusion des Gehirns mit hypothermem oxygeniertem Perfusat durchgeführt wird (39), wird hinsichtlich der Verbesserung der regionalen Hirnperfusion und der Neuroprotektion kontrovers diskutiert (39, 40). Duebener et al. berichteten, dass die retrograde zerebrale Perfusion einen inadäquaten Blutfluss in den Kapillaren des Gehirns verursachen kann und eine prolongierte retrograde zerebrale Perfusion Hirnödeme hervorrufen kann (41). In wieweit eine homogene Perfusion der gesamten Hirnregionen damit erreicht wird, ist jedoch unklar.

1.4.6. Steroide

Die Rolle der Steroide zur Protektion neuronaler Schädigung sowie Vorbeugung und Behandlung von Permeabilitätsstörungen und Ödembildung nach einem traumatischen Eingriff im Gehirn wird seit langem kontrovers diskutiert (42, 43). Dabei werden auch unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf den Applikationszeitpunkt gefunden. Vor oder während des CPB ist die Vorbehandlung mit Steroiden eine routinemäßige Methode zur Prävention potentieller Hirnschwellung während Korrekturoperationen angeborener Herzfehler im Neugeborenenalter.

Die Wirkung von Steroiden beruht auf die Existenz von Steroidrezeptoren: Glucocorticoid- und Mineralcorticoidrezeptor. Beide Rezeptoren haben unterschiedliche zelluläre Wirkung und Affinität zu Steroiden. Der Glucocorticoidrezeptor hat z.B. eine hohe Affinität zu synthetischen Steroiden wie z.B. Dexamethason (44). Die Rezeptorenverteilung und -dichte spielt eine

entscheidende Rolle bei der Entfaltung der Steroidwirkung. Die Bindung von Steroiden an den Steroidrezeptoren führt zur Aktivierung dieser Rezeptoren mit Beeinflussung von intrazellulären und mitochondrialen Genen mit Beeinflussung der Proteinsynthese durch Transaktivierung oder Transrepression der Genexpression im Zellkern (44). Über den Mechanismus der Transaktivierung werden u.a. antiinflammatorische Proteine wie IL-10, IL-1-Antagonist und Lipocortin-1 vermehrt produziert (44). Die Transaktivierung führt aber auch zur Expression von metabolischen Genen, die unerwünschte Wirkungen haben, wie die Erhöhung der freien Fettsäuren und des Blutzuckerspiegels (45). Die Transrepression führt zur Hemmung der Genexpression und damit der Proteinsynthese, wie z.B. von proinflammatorischen Interleukinen.

Steroide werden in der Klinik oft zur Vorbeugung und Behandlung von entzündlich bedingten Zellveränderungen, zellulären Permeabilitätsstörungen und Ödembildung eingesetzt (46, 47). Die Reduktion von inflammatorischen Mediatoren durch Steroide wurde in vielen klinischen und experimentellen Studien nachgewiesen (45,48). Steroide können die Makrophagenfunktion hemmen und die Expression von inflammatorischen Zytokinen, wie TNF-Alpha und IL-6, sowie die Komplementaktivierung unterdrücken. Gleichzeitig führen sie zur Erhöhung von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 (49, 50). Es wurden für Steroide ödemreduzierende und antioxidative Effekte beschrieben (51, 52).

In einer weiteren experimentellen Studie haben Lodge et al über eine erhebliche Reduktion der Immunantwort nach der Vorbehandlung mit hochdosierten Steroiden 8 Stunden vor CPB im Vergleich zur Steroidapplikation in der Primärflüssigkeit berichtet. Die präoperative Applikation führte zu einer verbesserten Lungenfunktion durch verminderte Wasserablagerung in den Lungen (53). Durch Reduktion des perivaskulären Ödems mit Verbesserung der Perfusion kann ein ähnlicher Effekt in den anderen Organen, wie z.B. im Gehirn, vermutet werden.

Boscoe et al untersuchten den Effekt von Steroiden und vom pulsatilem Fluss auf die Komplementaktivierung während CPB. Beide Methoden zeigten keinen Einfluss auf die Komplementaktivierung im Vergleich zur Kontrollgruppe (54). Im Gegensatz dazu führte die einmalige Applikation von Steroiden in einer klinischen Studie von

Andersen et al zu einer Reduktion der Komplementaktivierung (55). Das klinische Outcome in der ersten postoperativen Woche blieb jedoch unbeeinflusst.

1.5. Methoden zur Messung der Organdurchblutung

Durch die Entdeckung des Lungenkreislaufs im 13.Jahrhundert durch den arabischen Wissenschaftler Ibn Al-Nafis wurde die Medizin seiner Zeit revolutioniert. Der zweite Schritt erfolgte durch die Entdeckung des Körperkreislaufs (W. Harvey, 1629). In der Entwicklung zur modernen Medizin sind eine Vielzahl von Entdeckungen und Erkenntnissen eng mit der Erforschung der Zirkulation des Blutes verbunden. Grundvoraussetzung ist hierbei, dass der Blutfluss quantifiziert werden kann. So entstand 1870 das Fick'sche Prinzip, das besagt, dass die pro Zeiteinheit von einem Organ aufgenommene Menge einer Substanz gleich dem Produkt aus arteriovenöser Konzentrationsdifferenz dieses Stoffes und Volumendurchfluss (pro Zeiteinheit) des Lösungsmittels (Blut) ist. Aus der aufgenommenen Substanzmenge und der arteriovenösen Differenz kann so der Blutfluss eines Organs bestimmt werden (z.B. als Herzminutenvolumen= HMV):

$$\text{HMV} = \frac{\text{O}_2\text{-Aufnahme (ml/min)} \cdot 100}{\text{art.-ven. O}_2\text{-Differenz (Vol.\%)}$$

Formel 1.1: *Fick'sche Gleichung*

Dieses Prinzip wurde dann 1970 von SWAN, GANZ et al. (56) mittels der Kathetertechnik des Herzens verbessert. Mit diesem nach den Erstbeschreibern benannten Katheter konnte nun die Makrohämodynamik in vivo repetitiv quantifiziert werden.

Schon seit langer Zeit beschäftigte sich die Wissenschaft mit der Bestimmung des Blutflusses im Körper. Zunächst wurde angenommen, dass die Durchblutung vieler Organe von deren Funktion abhängig ist. So injizierte man zur Bestimmung der Nierenfunktion para-Aminohippursäure (PAH) intravenös und bestimmte deren Funktion im Urin (57). PAH wird im proximalen Tubulus sezerniert und nicht wieder resorbiert. Ein Nachteil dieser Methode ist dass die Organdurchblutung nicht allein der bestimmende Faktor für die PAH-Ausscheidung ist, sondern es spielen auch andere Prozesse (toxische bzw. pathologische Veränderungen im Tubulus, Wechselwirkung mit anderen Substanzen) im Nierentubulus eine Rolle.

In den letzten Jahren wurden Methoden zur direkten Bestimmung des Blutflusses in den Blutgefäßen entwickelt. Ein Beispiel hierfür ist die Verwendung des Dopplereffektes, dabei wird ein Ultraschallimpuls (Welle) mit einer Ausgangsfrequenz ausgesendet und wieder empfangen. Wenn sich Sender und Empfänger relativ zueinander bewegen, wird eine von der Ausgangsfrequenz des Senders verschiedene Frequenz gemessen. Bewegen sich Sender und Empfänger aufeinander zu, so wird die Welle „zusammengedrückt“. Bewegen sie sich voneinander weg, wird die Welle „auseinander gezogen“.

Zur Messung der Organdurchblutung wurde in vielen tierexperimentellen Studien die Mikrosphärenmethode verwendet. Dabei werden Partikel (Mikrosphären) definierter Größe, die entweder radioaktiv markiert, gefärbt oder fluoreszierend sind, in die Blutgefäße injiziert. Diese Partikel verhalten sich annähernd wie Erythrozyten und verlassen den Blutstrom nicht (58, 59). Durch Erfassung der Anzahl der radioaktiven Zerfälle (bei radioaktiv markierten Mikrosphären) oder durch Bestimmung der Fluoreszenzintensität (bei Fluoreszenzmikrosphären) in einer Gewebeprobe kann man Rückschlüsse auf die Gewebepfusion zum Zeitpunkt der Mikrosphäreninjektion machen. Diese Mikrosphärentechnik kann zur Bestimmung des regionalen Blutflusses, zur Messung von Flussunterschieden im Körper und zur Messung der Auswurfleistung des Herzens verwendet werden (21).

1.6. Hypothese, Fragestellung und Ziel der Arbeit

Unter den extremen Bedingungen des CPB mit DHCA wird eine Störung der Gewebepерfusion angenommen. Die Störung der Gewebepерfusion, insbesondere im Gehirn, ist mit hypoxischer Zellschädigung verbunden. In der Niere kann die Störung der Gewebepерfusion zum Auftreten vom akuten Nierenversagen mit der Notwendigkeit einer Hämodialyse führen. Diese ist dann mit erhöhter Mortalität und verlängerter Hospitalization verbunden (12). Bei verbesserter Technik und deutlich verbessertem kardialem Outcome wird heute das Hauptaugenmerk auf die Detektion und vor allem Prävention von Alterationen der zerebralen Funktion und der Funktion anderer Organe, sowie auf die Vermeidung neurologischer Komplikationen gelegt. Für dieses Ziel werden in letzter Zeit zunehmend verschiedene Techniken und Pharmaka in tierexperimentellen Studien erprobt. Im Hinblick auf die Protektion neuronaler Schädigung werden Steroide seit langem kontrovers diskutiert.

Ziel dieser Arbeit war die Erfassung der Perfusionsveränderungen in der Niere und in anderen peripheren Organen sowie im ZNS unter den extremen Bedingungen des CPB in tiefer Hypothermie und nach verlängertem Kreislaufstillstand. Es wurde weiterhin untersucht, in wieweit die zerebrale Zellschädigung mit den zerebralen Perfusionsveränderungen korreliert. Zusätzlich wurden die regionalen Perfusionsveränderungen im ZNS nach Gabe von Steroiden (Methylprednisolon, intrathekal und systemisch appliziert) analysiert. Zur Erfassung der Gewebepерfusion wurden fluoreszierende Mikrosphären verwendet. Die Zellschädigung wurde in ausgewählten ZNS-Regionen quantitativ untersucht.

Als Versuchstiere wurden neugeborene Schweine gewählt. Unter Berücksichtigung eines möglichst nahen klinischen Bezugs wurden die Tiere an den CPB angeschlossen und einem standardisierten Perfusionsprotokoll mit tiefer Hypothermie und Kreislaufstillstand unterzogen.

2. MATERIAL UND METHODIK

Für die Versuche galten die entsprechenden Vorschriften der Tierschutzverordnung des Landesamtes für Gesundheit und Soziales in Berlin mit der Genehmigungsnummer G0146/98. Die Tierhaltung und der Versuchsablauf wurden entsprechend dem geltenden Tierschutzgesetz in aktueller Fassung und den Bestimmungen der „Principles of laboratory animal care“ (NIH publication No. 86-23, revised 1985) durchgeführt.

2.1. Operationstechnik

2.1.1. Vorbereitung und Einteilung der Versuchstiere

Für die Versuche wurden neugeborene Ferkel der Rasse „Deutsches Landschwein“ aus Brandenburg mit einem mittleren Gewicht von 2200 ± 500 g und im Alter von 5 bis 10 Tagen verwendet. Die Tiere wurden bis zum Versuchstag in einer für Tierversuche zugelassenen Zuchtstätte beim Muttertier belassen. Vor Beginn des Versuches wurde der Allgemeinzustand durch Inspektion, Palpation, Perkussion und Labordaten erfasst sowie die Narkosefähigkeit der Tiere geprüft. Auf einen längeren präanästhetischen Futterentzug wurde wegen der potentiellen Gefahr einer Hypoglykämie und Azidose bewusst verzichtet.

Alle Tiere wurden einem CPB mit 120 Minuten Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie unterzogen, mit anschließender Erwärmung und Reperfusion und einer postoperativen Überwachungsphase von 6 Stunden. 12 Tiere dienten als Kontrolltiere und wurden nach standardisierter Anästhesie ohne weitere Vorbehandlung dem CPB unterzogen. 12 Tieren wurde Methylprednisolon (7 Tiere systemisch und 5 Tiere intrathekal) verabreicht. Bei den systemisch vorbehandelten Tieren wurden jeweils 4-6 Stunden vor Beginn des CPB 30 mg/kg Methylprednisolon (Urbason solubile 32, Methylprednisolone-21-hydrogen Succinate, Hoechst, Frankfurt) intravenös per Kurzinfusion verabreicht. Den Tieren der Intrathekalgruppe wurden jeweils, nach einer Lumbalpunktion mit einer Spinalnadel (Terumo Spinal

Needle, Japan), 30 mg/kg Methylprednisolon (Urbason soluble 32, Hoechst, Frankfurt) in den intrathekalen Raum injiziert.

2.1.2. Anästhesie

Zur Ausschaltung von Einflüssen der Narkosetechnik auf die Hämodynamik wurde bei allen Versuchstieren ein standardisiertes Anästhesieverfahren verwendet. Zur Einleitung der Narkose wurden die Tiere mit einer intramuskulären Injektion von 50 µg/kg KG Ketaminhydrochlorid (Ketanest, Parke-Davis GmbH, Berlin) und Midazolam (Dormicum, 2 mg/kg KG) prämediziert. Zur intravenösen Narkoseeinleitung, Infusionstherapie und medikamentösen Substitution wurden zwei periphere Ohrrendvenen mit einer Venenverweilkanüle (Jelco-W, 22G, Fa. Johnson & Johnson Medical, Inc.) transkutan punktiert und fixiert. Die Fortführung der Narkose erfolgte dann intravenös mit Fentanyl (50 µg/kg/h) (Curamed, Pharma GmbH, Karlsruhe) und Midazolam (0.2 mg/kg/h) über einen Perfusor (BRAUN segura FT). Zur Relaxierung und Sicherung einer guten chirurgischen Toleranz wurde Pancuronium (0.2 mg/kgKG) (Curamed, Pharma GmbH, Karlsruhe) bedarfsorientiert verabreicht. Die kontrollierte Beatmung erfolgt nach endotrachealer Intubation mit einem Sauerstoff-Luft-Gemisch (Baby-Log Ventilator, Dräger, Lübeck) mit einem Druck von 15-20 mmHg, einer Frequenz von 20-30/min und einer O₂-Konzentration von 21-30%.

2.1.3. Monitoring

Ein Elektrokardiogramm (EKG) wurde zur Beurteilung der Herztätigkeit mit Standard-Extremitätenableitungen angeschlossen. Zur kontinuierlichen Temperaturmessung dienten Temperatursonden, die ösophageal, nasopharyngeal und rektal platziert wurden. Über einen Patientenmonitor mit Trendschreiber (HP CMS-Patientenmonitor, Hewlett-Packard) erfolgte die Überwachung und Registrierung der Vitaldaten (Herzfrequenz (HF), zentralvenöser Druck (ZVD), Sauerstoffsättigung, Puls, Druckwerte der Arteria femoralis, Druck im Bulbus jugularis, EtCO₂ und Temperatur). Zur kontinuierlichen Messung des systemischen arteriellen (systolischen, mittleren und diastolischen) Blutdruckes und Abnahme von Blutproben

(Blutgasanalyse) wurde die Arteria femoralis nach Präparation punktiert. Nach Anlage einer Fadenligatur wurde die Arterie mit einer Vialon™-Verweilkanüle (Insyte, 24G oder 26G, Fa. Becton-Dickinson) punktiert und über ein Druckaufnehmersystem mit integriertem Dauerspülsystem (Gabarith-Druckwandlersystem Viggo-Spectramed, Fa. Ohmeda) an den Überwachungsmonitor angeschlossen. Für die Dauer des Versuches wurde die Hautwunde mit Einzelheften verschlossen. Über die V. subclavia wurde ein zentralvenöser Katheter (Bi- oder Trilumen-Katheter, 4 Fr Care Flow, Fa. Arrow International, Inc.) mittels Seldinger-Technik in die obere Hohlvene für Infusionen und Medikamente eingeführt. Nach chirurgischer Freilegung und Punktion der rechten V. jugularis interna wurde ein Katheter (24 G, Becton Dickinson) retrograd in den Bulbus V. jugularis zur Entnahme von zerebrovenösen Blutproben und zur Messung des jugularvenösen Druckes vorgeschoben. Während des Versuches erfolgte eine kontinuierliche Überwachung und Registrierung der Blutgase und der Elektrolyte mit Blutgasanalysen (BGA) durch ABL (RADIOMETER Kopenhagen) und Messungen des Hämoglobins und Hämatokrits durch Hämoximeter OSM3 (RADIOMETER Kopenhagen). Die Werte wurden jeweils simultan für das arterielle und venöse Blut, sowie für das Blut des zerebralen Rückstromes (Vena jugularis int.) bestimmt. Außerdem erfolgte eine Blutzucker-Überwachung mit Haemo Glukotest 20 - 800 R (BOEHRINGER). Zur Überwachung der Ausscheidung und Urinmenge wurde ein suprapubischer Blasenkatheter gelegt und mit einem Flowmeter verbunden. Zur Regulierung der Körpertemperatur wurden eine Wärmelampe (HAERAUS:SOLLUX 500) oberhalb des Tieres und eine Wärmematte (THERMOMAQUET) auf dem OP-Tisch unterhalb des Tieres nach Bedarf während des Experimentes ein- oder ausgeschaltet.

2.1.4. Herz-Lungen-Maschine (HLM)

Die verwendete HLM ist eine nicht-pulsatile Multiflow Rollerpumpe (STÖCKERT/SHILEY, Deutschland) mit dem dazugehörigen Wärmeaustauscher für Normo- und Hypothermie (STÖCKERT, Deutschland). Daran waren ein Air-Oxygen-Mixer (SECHRIST) und ein ¼ Zoll Polytrode-Sensor mit Messgerät (POLYSTAN, Vaerlose, Dänemark) für die Messung der Sättigung und Temperatur in der arteriellen Linie angeschlossen. Zusätzlich wurde an die HLM eine arterielle

Druckmessung (TELOS MEDICAL CORP) mit automatischer Pumpenabschaltung bei hohem Druck installiert. Als Pumpenschlauch diente ein Silikonschlauch (1/4 x 3/32 Zoll Pumpensegment WIPAK MEDICAL) und eine 1/4 Zoll PVC-Tischlinie (MEDOS, Stolberg) mit jeweils angeschlossenen 8 FR arterieller Kanüle (JOSTRA, Hirrlingen) und 14 FR venöser Kanüle (MEDTRONIC, USA). Zusätzlich wurde ein 40 µm arterieller Filter für Neugeborene (DIDECO, Miranduly, Italy) und als Oxygenator ein Safe-Micro-Neugeborenen-Oxygenator (POLYSTAN, Vaerlose Dänemark) mit integriertem 40 µm Kardiotomie-Sauger Reservoir verwendet.

Das Priming der Maschine wurde mit ca. 400 ml Vollblut (Spenderblut von einem Tier der gleichen Rasse, aufbewahrt in einem Bluttransfusionsbeutel -BIOTRANS, Dreireich- mit Gerinnungshemmung durch Na-Citrat) und mit einer prophylaktischen Antibiotika-Gabe von Cefotiamhydrochlorid (Spizef, Takeda Pharma GmbH, Aachen in einer Dosierung von 100 mg/kg KG) durchgeführt. Zusätzlich wurden 30-50 ml HAES 10%ig (FRESENIUS), 2500 IU/L Heparin (BRAUN), 20 ml isotonische Kochsalzlösung (BRAUN) und bei Bedarf Natriumbikarbonat dem Blut zugemischt. Der Hämoglobingehalt dieses Gemisches war bei ca. 9.0 ± 1.0 g/dl, der pH-Wert lag bei 7.40 ± 0.05 .

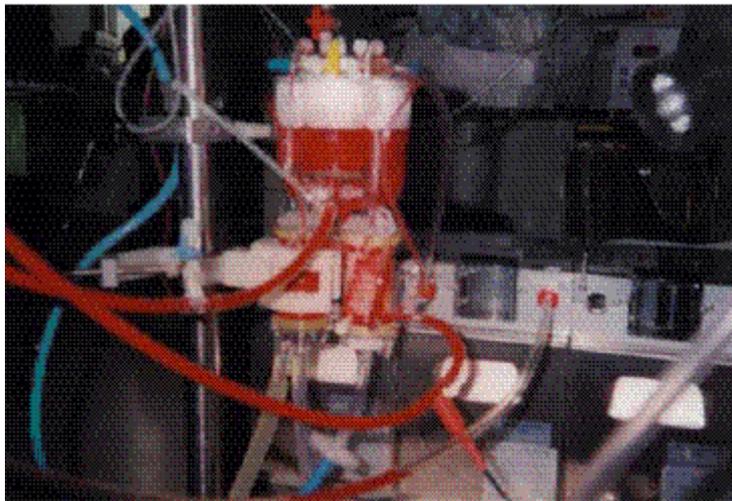


Abbildung 2.1: Oxygenator und Pumpenköpfe der Herz-Lungen-Maschine.

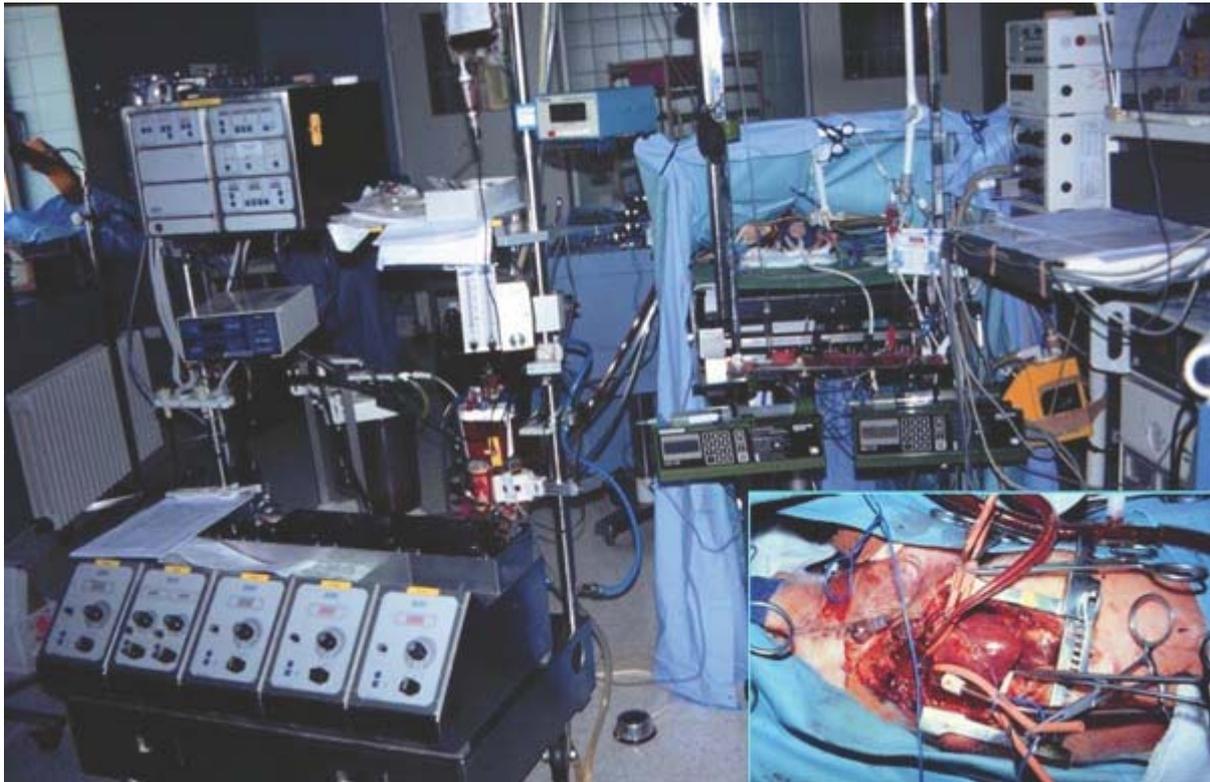


Abbildung 2.2: Versuchsaufbau mit Herz-Lungen-Maschine. Im unteren Bild sind die arterielle und venöse Kanülierung eines 2,5 kg schweren Ferkels dargestellt.

2.1.5. Thorakotomie und Anschluss des CPB

Der Zugang erfolgte mit medianer Sternotomie und Thymektomie. Nach Präparation von Perikard, Pleura und den großen Gefäßen wurden die Aorta ascendens (8F Kanüle) und der rechte Vorhof (14F Kanüle) nach Gabe von 500 IE/kg KG Heparin in die Aortenwurzel über zuvor gelegte doppelte Tabakbeutelnähte (Prolene 6-0, Fa. Ethicon) kanüliert und das Tier an CPB angeschlossen.

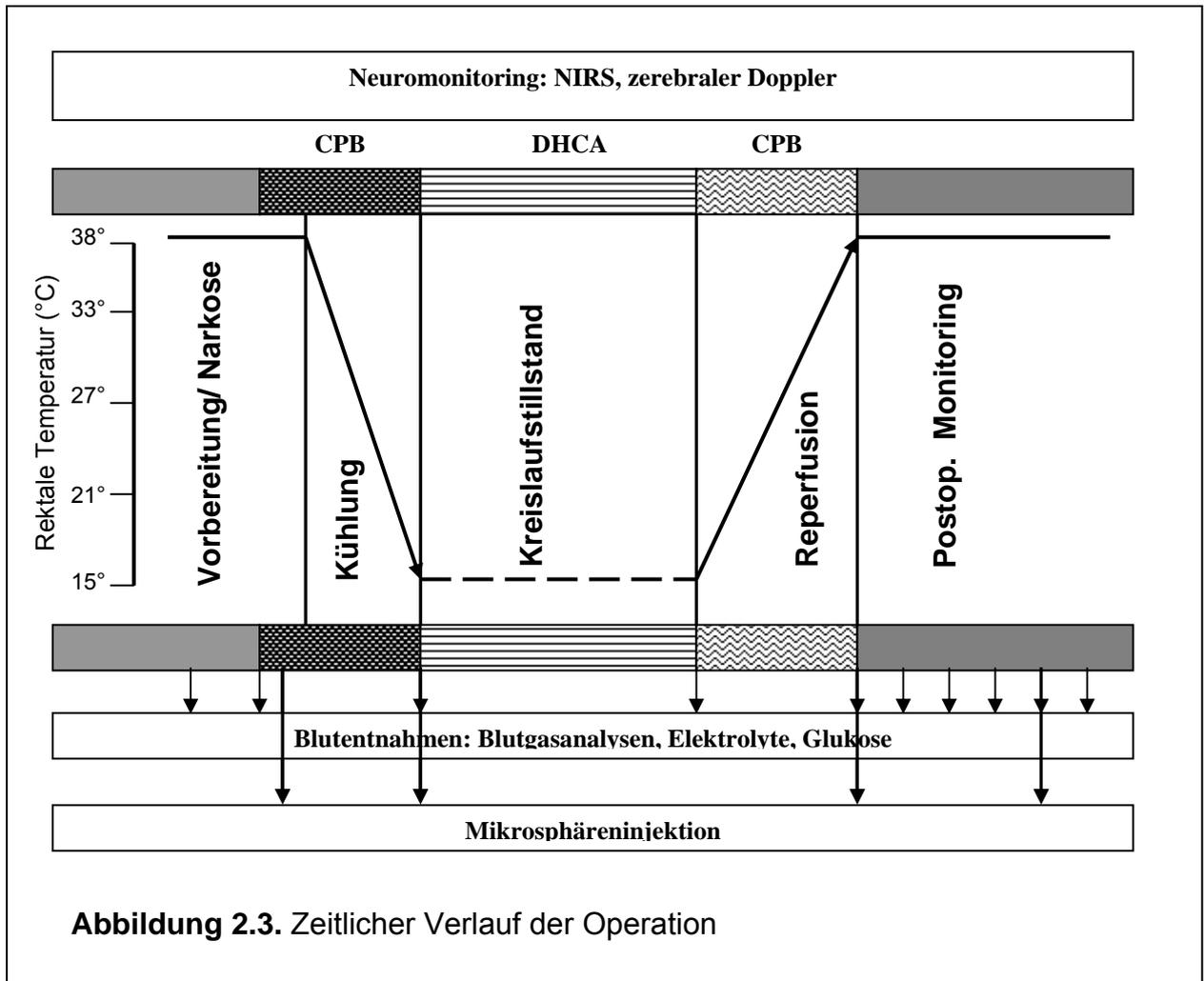
Die Perfusionsflussrate betrug 180-220 ml/kg/min und die Blutgase wurden nach dem Alpha-stat-Verfahren, d.h. nicht temperaturkorrigiert, bei 37 °C gemessen, eingestellt.

2.1.6. Kühlung

Die Kühlungsphase erstreckte sich über 30 Minuten, mit einem Temperaturgradienten von maximal $9,0 \pm 0,8$ °C zwischen Bluttemperatur und Oxygenator, bis zum kälteinduzierten Herzstillstand (Nulllinie im EKG) bei $15 \pm 0,5$ °C myokardialer Temperatur. Es folgte dann, bei einer rektalen Temperatur von 15° und einer peripheren Temperatur von 16 °C, eine 120 minütige Phase vom totalen Kreislaufstillstand. Ein sogenanntes Sludge-Eiswasser haben wir zur oberflächlichen Myokard-Kühlung während des totalen Kreislaufstillstandes verwendet, um die myokardiale Temperatur bei 15 °C während dieser Phase zu halten.

2.1.7. Reperfusion

Nach 2 Stunden Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie (15°) wurden die Tiere zunächst mit einem geringen Perfusionsfluss, bei einem Temperaturgradienten von 9°C am Oxygenator, erwärmt. Der geringe Perfusionsfluss wurde bis zum Erreichen einer Temperatur von 20 °C gehalten. Danach wurde der Perfusionsfluss stetig gesteigert bis der volle CPB-Fluss von 250 ml/kg erreicht wurde. Der MAD wurde im Bereich von 60 ± 10 mmHg gehalten, der ZVD bei 5 ± 1 mmHg. Die Erwärmungsphase dauerte bis zum Erreichen der physiologischen Temperatur von 38 ± 1 °C ca. 50 Minuten. Anschließend wurde der CPB entfernt. Es folgte eine 6-stündige postoperative Phase mit intensivmedizinischer Überwachung. Die Tiere blieben dabei beatmet und narkotisiert. Dabei wurden alle Parameter im physiologischen Bereich gehalten. Die Beatmung erfolgte bedarfsadaptiert und druckkontrolliert mit Beatmungsfrequenzen von 25-35/min, Atemzugvolumina von 30 bis 50 ml/kg, einem PEEP von 5-10 cmH₂O und Beatmungsdrücken von 30-40 mmHg. Die Heparinisierung wurde mit Protamin antagonisiert, wobei 1ml Protamin 1000 IE Heparin neutralisiert.



2.1.8. Mikrosphären

Zur späteren Bestimmung der Organperfusion wurden in verschiedenen Phasen der Operation (vor Kühlung, kurz vor der Kreislaufstillstandphase, am Ende der Reperfusionsphase und 4 Stunden nach der Reperfusionsphase) fluoreszierende Mikrosphären mit einer bestimmten Farbe injiziert.

2.1.8.1 Auswahl der Mikrosphären

Mikrosphären sind kleine runde Partikel (Durchmesser: 9-15 µm) aus Polystyren. Sie besitzen eine Dichte von 1,05 g/ml und entsprechen in dieser Eigenschaft in etwa den Blutzellen (Dichte 1,10 g/ml; Durchmesser~7,5 µm). Kleinere Größen von

Mikrosphären würden durch die Kapillaren hindurchfließen. Größere Durchmesser könnten die Mikrohämodynamik in vorgeschalteten Arteriolen verändern. Nach intraaortaler Gabe werden die Mikrosphären mit dem Blutstrom bis in das Kapillarnetz getragen und bleiben dort aufgrund ihrer Größe stecken (60). Diese Art der Mikroembolisation wird bei den im Versuch verabreichten Mengen strömungstechnisch nicht relevant, macht es jedoch möglich, nach Entnahme des Organs die Mikrosphärenanzahl pro Volumeneinheit Gewebe zu ermitteln. Diese spiegelt die regionale Durchblutung zum Applikationszeitpunkt wider.

Es gibt verschiedene Arten von Mikrosphären, nämlich radioaktiv markierte, gefärbte und fluoreszierende Mikrosphären. Da sie kein Gesundheitsrisiko verbergen und kostengünstiger sind, verglichen mit radioaktiv markierten Mikrosphären, sowie höhere Empfindlichkeit besitzen und bessere Beurteilung bieten, verglichen mit gefärbten Mikrosphären, verwendeten wir in unseren Experimenten fluoreszierende Mikrosphären. Es existieren wiederum für die fluoreszierenden Mikrosphären unterschiedliche Fluoreszenzfarben. Um eine Überlappung von Spektren verschiedener Farben zu vermeiden, wurden Farben verwendet, deren Spektralmaxima weit voneinander liegen. Diese sind: blue (blau), bluegreen (blaugrün), yellowgreen (gelb-grün), und orange (orange).

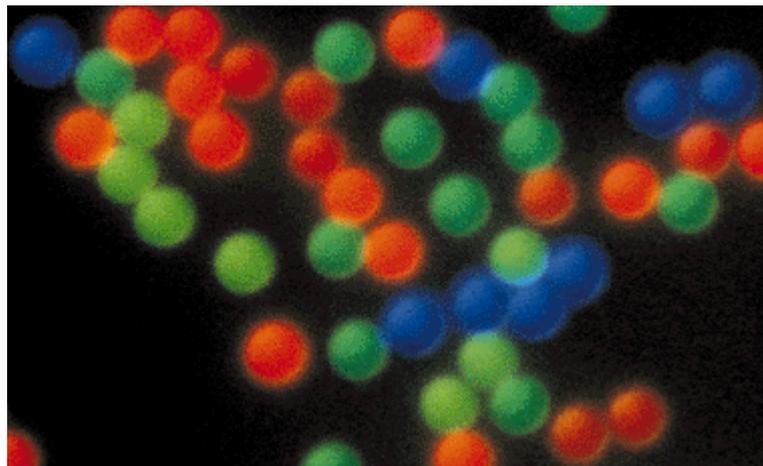


Abbildung 2.4: Mixtur von Mikrosphärenpartikeln

2.1.8.2. Vorbereitung und Injektion der Mikrosphären

Die Mikrosphären wurden in 0,15 molarer NaCl-Lösung mit 0,02-0,05% Tween[®]80 und 0,02% Thimerosal aufbewahrt. Zur Injektion wird 1 ml dieser Suspension auf 1 ml NaCl-Lösung aufgezogen. Vier unterschiedlich fluoreszierende Mikrosphären (FluoSpheres, Molecular Probes Inc., Leiden, Holland) wurden im vorliegenden Fall zur quantitativen Evaluierung der regionalen Organperfusion in den Hauptphasen der Operation eingesetzt. Hierzu wurden zunächst die Aufbewahrungsgefäße für die jeweiligen Mikrosphären in einem Vortex (Genie 2, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) drei Minuten lang mechanisch geschüttelt. Danach wurden die Gefäße fünf Minuten lang mit Hilfe eines Ultraschallbads (Sonorex, Bandelin, Berlin, Deutschland) sonikiert. Hierdurch sollen aneinanderhaftende Mikrosphären voneinander separiert werden.

Die vorbereitete Mikrosphärensuspension wurde dann in die aortale Kanüle über 30 Sekunden injiziert. Gleichzeitig wurde eine Blutprobe zur Bestimmung der Referenzwerte der Mikrosphären im arteriellen Blut mit Hilfe einer Absaugpumpe mit einem konstanten Fluss von 2 ml/min über zwei Minuten entnommen.

Diese Prozedur wurde 4 Mal wiederholt: Vor Beginn der Kühlungsphase, kurz vor dem Kreislaufstillstand, am Ende der Reperfusionphase sowie 4 Stunden nach der Reperfusionphase.

2.1.9. Ende der operativen Phase

Nach Versuche unter stabilen hämodynamischen und metabolischen Bedingungen erfolgte der Exitus unter Narkose durch Entnahme des Herzens. Innerhalb von 5 Minuten wurde der Schädelknochen medial gespalten, das Gehirn entnommen und das Hirngewicht ermittelt. Anschließend wurden Proben aus Gyrus Cinguli und Hippocampus zur weiteren histologischen Beurteilung entnommen.

Zur späteren Messung der Perfusion mittels Mikrosphären wurden verschiedenen Organen und ZNS-Regionen Proben zur Bestimmung des regionalen Blutflusses

entnommen. Die Proben wurden beschriftet und in Spezialgefäßen bis zum Zeitpunkt der Aufarbeitung tiefgefroren bei -75 °C konserviert.

2.2. Messung der Organperfusion mittels Mikrosphären

2.2.1. Aufbereitung der Organproben

Die in Spezialgefäßen befindlichen tiefgekühlten Proben wurden aufgetaut (mit Handwärme) und gewogen. Danach wurde jede Probe in ein mit einem Gemisch aus KOH (Kaliumlauge) und Tween[®]80 gefülltes Reagenzglas (Neolab, Heidelberg, Deutschland) gegeben. Das Gemisch dient der Verdauung und besteht aus 4 M KOH und Tween[®]80. Zur Vorbereitung dieser Verdauungslösung werden 224,44 g Kaliumlauge (Baker, Deventer, Holland) in 1000 ml H₂O gelöst und mit 10 ml 10% Tween[®]80 gemischt.

Das Reagenzglas mit seinem Inhalt (Verdauungslösung + Organprobe) wird dann für 48 Stunden in einem Hybridofen bei 37 °C inkubiert. Der Hybridofen gewährt eine Hitzeverteilung auf alle darin befindlichen Reagenzgläser. Durch Auflösung des Gewebes bildet sich dann eine filtrierbare Suspension. Nach 48 Stunden Inkubation ist das organische Material vollständig aufgelöst und schwimmt aufgrund seiner Dichte auf der Oberfläche der Verdauungslösung.

Mit Hilfe einer Millipore-Vakuum-Pumpe (Millipore Corporation, Irland) und unter Verwendung von Filterpapier wird die Probe filtriert und das organische Material von der Verdauungslösung getrennt. Das Filterpapier (Miltex MEMBRANE Filters, Millipore, Irland) besteht aus einem monophilen Polyamid-Faden, die Porengröße beträgt $10\text{ }\mu\text{m}$ (die verwendeten Mikrosphären haben eine Größe von $15\text{ }\mu\text{m}$). Dabei wird beachtet, dass das Reagenzglas, in dem sich die Probe befand, keine Rückstände enthält.



Abbildung 2.5: Vakuumpumpe zur Filtration und Trennung der Mikrosphärenpartikel von der Verdauungslösung.

Das sphärentragende Filterpapier wird vorsichtig zweimal in der Mitte gefaltet, so dass die Mikrosphären innen liegen, und in ein konisch zulaufendes Reagenzröhrchen (Greiner-Bio One, Frickenhausen, Deutschland) gegeben. Die Röhrchen werden dann in einem Trockenschrank bei 50 °C 15 Min. lang getrocknet. Dieser Schritt ist zur Befreiung der Sphärentragenden Filterpapiere von der Verdauungsflüssigkeit nötig.

Die Lösung des Farbstoffes aus den Mikrosphären erfolgt mit einem organischen Lösungsmittel. Geeignet dafür sind zwei Lösungen: 2-Ethoxyäthyl-Acetat und 2-2-Ethoxy-Ethoxyäthyl-Acetat. 2-2-Ethoxy-Ethoxyäthyl-Acetat hat zwar von beiden Flüssigkeiten einen höheren Verdampfungspunkt, diese Lösung kann aber nicht für alle Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden. Daher wurde 2-Ethoxyäthyl-Acetat verwendet. Auf jedes Filterpapier wird dann gleichmäßig 2 ml 2-Ethoxyäthyl-Acetat gegeben. Dieser Vorgang erfolgt in 2 Schritten: Im ersten Schritt wird 1ml des

Lösungsmittels zugegeben und das Reagenzglas für 20 Sekunden in einem Vortexgerät geschüttelt. Im zweiten Schritt wird der zweite Milliliter hinzugefügt und das Reagenzglas nochmals für 20 Sekunden im Vortexgerät geschüttelt. Danach wird der gesamte Inhalt fünf Minuten lang bei 2000 U/min zentrifugiert und der Überstand in ein Reagenzglas abpipettiert. Um sicherzugehen, dass die Lösung aus Farbstoff und Lösungsmittel gänzlich von Partikeln befreit wird, zentrifugiert man noch einmal drei Minuten lang bei einer Beschleunigung von 2000 g. Der Überstand mit den gelösten Farbstoffen wird nochmals abpipettiert und das Extinktionsspektrum der Flüssigkeit im Spektrometer gemessen.

2.2.2. Aufbereitung der Blutproben

Zur Messung des regionalen Blutflusses mit der Mikrosphärenmethode wird eine arterielle Referenzblutprobe gewonnen. Um eine Gerinnung des Blutes zu verhindern wird der Referenzblutprobe bei der Abnahme CPD (Citrate-Phosphate-Dextrose) in einem Verhältnis von 4 zu 100 zugesetzt. Das Abnahmesystem wird mit Tweenlösung gespült, um an den Wänden der Plastikteile anhaftende Mikrosphären abzulösen. Die Verarbeitung der Blutproben zur Gewinnung der Farbstoffe erfolgt dann wie unter 2.2.1. beschrieben.

2.2.3. Fluoreszenz

Fluoreszenz ist ein physikalisches Phänomen, bei dem ein Photon bestimmter Wellenlänge auf das Elektron eines Atoms trifft, dadurch wird die Energie dieses Photons auf das Elektron übertragen und hebt dieses von ihrem Ausgangsenergieniveau auf ein höheres Energieniveau. Die für jeden Fluoreszenzfarbstoff spezifische Anregungs-Wellenlänge nennt man Exzitationswellenlänge. Da das Ausgangsenergieniveau stabiler ist als der angeregte Zustand, fällt das angeregte Elektron nach kurzer Zeit auf sein Ausgangsenergieniveau zurück. Dabei sendet es wiederum ein Photon aus. Die Wellenlänge dieses Photons nennt man Emissionswellenlänge, wobei diese Emissionswellenlänge langwelliger, und damit energieärmer ist als die

Exzitationswellenlänge. Die Emissionswellenlänge ist wiederum für jeden Fluoreszenzfarbstoff spezifisch. Die Differenz zwischen der Exzitations- und der Emissionswellenlänge nennt man Stokes Shift.

Damit ein Photon von dem betreffenden Molekül absorbiert werden kann, müssen einige Bedingungen erfüllt sein. Eine dieser Bedingungen ist, dass Photonen jeweils nur ihre gesamte Energie übertragen können, also können nur diejenigen absorbiert werden, deren Energie genau der Energiedifferenz zwischen dem Ausgangszustand und einem angeregten Zustand entspricht (Bohr'sche Frequenzbedingung). Das hat zur Folge, dass jeder Fluoreszenzfarbstoff nur von einem sehr engen Lichtspektrum angeregt wird und emittiert auch nur ein sehr schmales Spektrum. Dies ist auch bei den fluoreszierenden Mikrosphären der Fall.

<i>Farbe</i>	<i>Exzitations- wellenlänge (nm)</i>	<i>Emissions- wellenlänge (nm)</i>
Blue	360	423
Blue-Green	430	467
Yellow-Green	485	506
Orange	534	552

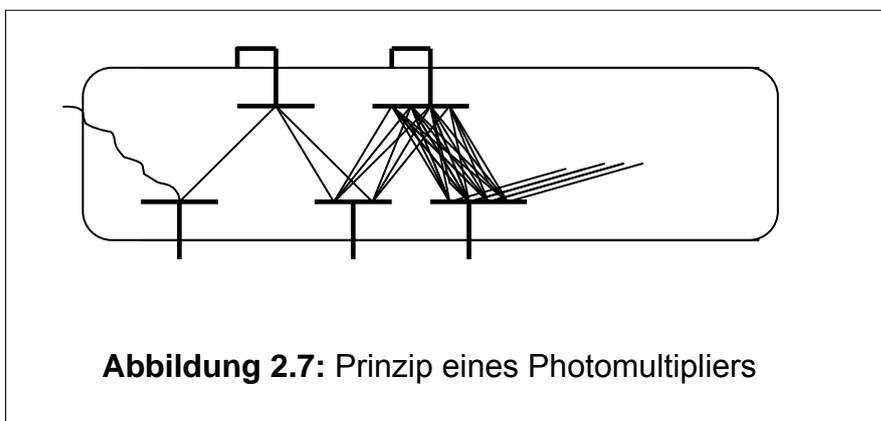
Abbildung 2.6. Exzitations- und Emissionsmaxima der in unserem Experiment verwendeten Mikrosphären.

2.2.4. Fluoreszenzspektrometer

Das Fluoreszenzspektrometer besteht aus einer Lichtquelle, einem Monochromator, einem optischen Filter, einem Strahlenleiter und einem Photomultiplier. Ein Polarisator wird je nach Bedarf (zur Messung der Anisotropie eines Stoffes, was in unserem Experiment nicht nötig war) installiert.

Der Monochromator ist ein Prisma bzw. ein Beugungsgitter, das nur Licht einer bestimmten Wellenlänge durchlässt. Optische Filter können Streulicht absorbieren, das die Messung verfälschen könnte. In einem Photomultiplier (Sekundär-Elektronenvervielfacher) werden Elektronen an einer Photokathode durch die auftreffenden Photonen herausgeschlagen. Diese Elektronen werden durch ein elektrisches Feld beschleunigt und treffen jetzt energiereicher auf Dynoden, wo pro Elektron weitere Elektronen herausgeschlagen werden, die ihrerseits wiederum durch ein elektrisches Feld auf die nächste Dynode beschleunigt werden. Auf diese Weise wird das Lichtsignal verstärkt und in ein elektronisches Signal transformiert. Dieses Signal kann dann z.B. mit Computern weiter aufbereitet werden.

Zur Messung der Extinktionsspektren von fluoreszierenden Mikrosphären kann nahezu jedes Fluoreszenzspektrometer verwendet werden, das im Wellenlängenbereich von 350 – 750 nm misst. Wir verwendeten das Lumineszenz-Spektrometer LS 50 B (Perkin Elmer). Als Lichtquelle wird hier eine Xenon-Lampe eingesetzt, die pulsatil ein kontinuierliches Spektrum von 200 bis 900 nm aussendet.



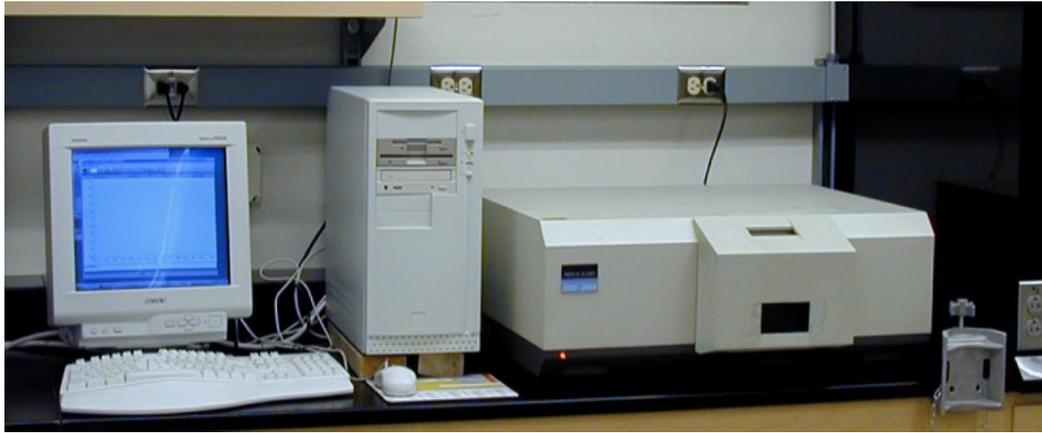


Abbildung 2.8. Fluoreszenzspektrometer (LS50B) zur Messung der Extinktionsspektren der fluoreszierenden Mikrosphären.

Bei der Messung erhält man aus den verschiedenen einzelnen Spektren der in der Organprobe enthaltenen Mikrosphären ein zusammengesetztes Spektrum (Composit-Spektrum). In dem von uns genutzten Gerät wurde ein Softwareprogramm installiert, das ein Composit-Spektrum in die einzelnen Spektren aufgliedern kann.

2.3. Untersuchung der morphologischen Veränderungen im Gehirn

Die lichtmikroskopische Untersuchung erfolgte standardisiert und blind für die jeweiligen Versuchsgruppen in der neuropathologischen Abteilung der Freien Universität Berlin. Die Färbung erfolgte mit Hämatoxylin und Eosin (HE)-Färbung und „Luxol fast blue“ (Marscheidenfärbung). Für die lichtmikroskopische Untersuchung wurde ein Olympus-Mikroskop eingesetzt und die photographische und digitale Dokumentation erfolgte mit einem LEICA Photomikroskop.

Nach einer Durchfixierung von mindestens 5 Tagen in Somogyi-Fixativ wurden von den Proben weitere standardisierte Koronarschnitte gefertigt, so dass mit insgesamt 8-9 Schnitten die entsprechenden Hirnregionen, Gyrus cinguli und Hippocampus, in mindestens zwei Schnittebenen beurteilt werden konnten. Die Proben wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Paraffin gebettet. Anschließend

wurden an 6 mm dünnen Paraffinschnitten nach laborüblicher Methode Färbungen mit HE (Hämatoxilin-Eosin) durchgeführt.

Es wurden nekrotisch veränderte Zellen der verschiedenen Hirnregionen quantitativ erfasst. Als nekrotisch galten nach den klassischen morphologischen Charakteristika geschwollene Zellen mit eosinophilem Zytoplasma und Zellkernveränderungen in Form von Schrumpfung (Kernpyknose) und Basophilie, sowie ggf. perineuraler Ödembildung.

Die standardisierte histologische Auswertung erfolgte blind für alle Gruppen mittels lichtmikroskopischer computergestützter Quantifizierung. Zur genauen Quantifizierung wurden die verschiedenen Regionen mit spezieller Software für morphometrische Messungen („Computer Assisted Morphometry of Muscle“, Laboratory of Neuropathology, U.C.L.-ANPG Brussels, 1994) ausgezählt. Es wurden bei 10-facher Vergrößerung jeweils mindestens 500-600 Zellen ausgezählt und der prozentuale Anteil der nekrotischen Neuronen berechnet

2.4. Statistische Auswertung

Bei jedem definierten Messzeitpunkt wurden die entsprechenden Parameter bestimmt. Aus allen Einzelwerten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die so gewonnenen Werte wurden dann mit Hilfe des Statview-Statistik-Programms (Statview®) in Diagramme dargestellt. Die Signifikanzwerte wurden mit Hilfe von Wilcoxon-Vorzeichen-Rang (Unterschiede in derselben Gruppe) und Mann-Whitney-Test (Vergleich der Gruppen untereinander) berechnet.

3. ERGEBNISSE

3.1. Messung des regionalen Blutflusses

Nach Ermittlung der Extinktionswerte der Proben wurde der regionale Blutfluss nach der Formel 1.2. berechnet:

$$F = \frac{I_M * R}{I_B * m}$$

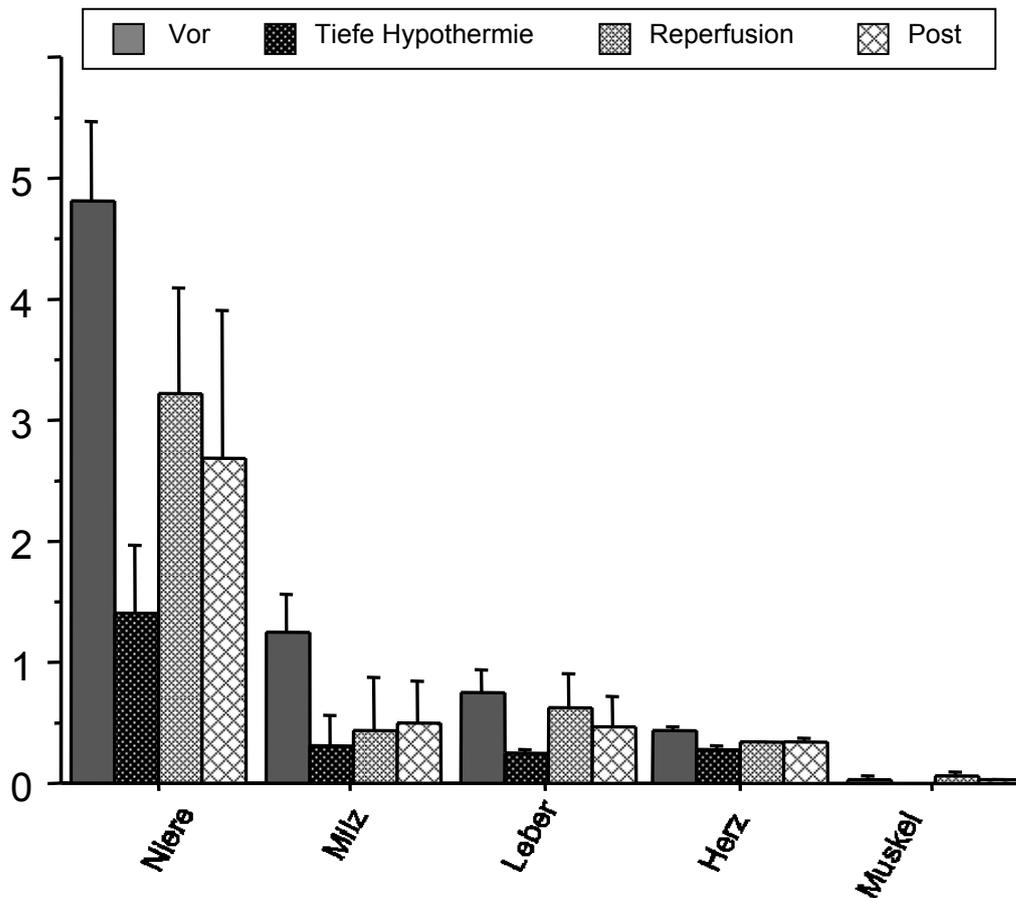
Formel 1.2. Bestimmung des regionalen Blutflusses bei fluoreszierenden Mikrosphären: F= Blutfluss, I_M = Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes, R= Absaug-Rate, I_B = Intensität der arteriellen Referenzprobe, m= Gewicht der Gewebeprobe.

Wobei R= 2 ml/min (Absaug-Rate) und m= Gewicht der Probe in g sind. Man erhält dann einen in ml/min/g gemessenen Fluss.

3.2. Regionale Perfusion in den peripheren Organen vor und nach DHCA

Alle peripheren Organe erfuhren eine Abnahme der regionalen Perfusion in tiefer Hypothermie. Diese Abnahme war nicht in allen Organen gleich stark ausgeprägt. Die regionale Perfusion der Niere war am stärksten von dieser Abnahme betroffen (P=0,01). Nur die Abnahme der regionalen Perfusion der Skelettmuskulatur (P=0,1) war nicht signifikant (Abbildung 3.1).

In der Reperfusionphase stieg die regionale Perfusion in allen Organen wieder an. Dieser Anstieg war ebenfalls vom Organ zu Organ unterschiedlich. Während die regionale Perfusion im Skelettmuskel signifikant höhere Werte in der Wiedererwärmungsphase als der Ausgangswert erreichte (p=0,04), stiegen diese Werte in den anderen Organen nur leicht an und blieben deutlich unter den Ausgangswerten.



Niere: Vor vs. tiefe Hypothermie: $p=0,01$
 Milz: Vor vs. tiefe Hypothermie: $p=0,05$
 Leber: Vor vs. tiefe Hypothermie: $p=0,03$
 Herz: Vor vs. tiefe Hypothermie: $p=0,04$
 Muskel: Vor vs. tiefe Hypothermie: $p=0,1$

Abbildung 3.1. Graphische Darstellung des regionalen Blutflusses in den peripheren Organen im Direktvergleich vor und nach DHCA. Angaben in $ml/min/g$. Vor: Blutfluss vor Beginn der Kühlung; Tiefe Hypothermie: Blutfluss in tiefer Hypothermie; Reperfusion: Blutfluss am Ende der Reperfusionsphase. Post: Blutfluss 4 Stunden nach Reperfusion.

3.2.1. Niere

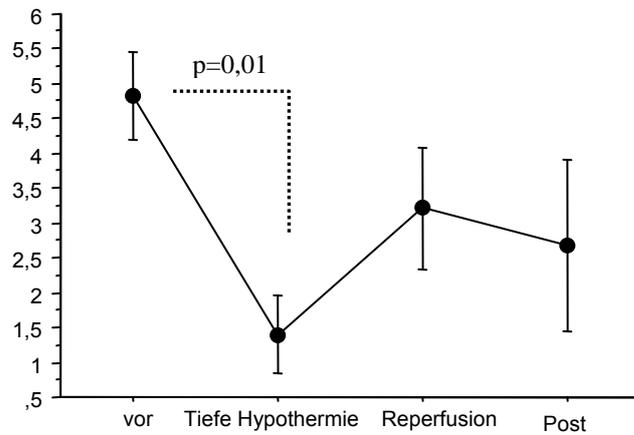


Abbildung 3.2. Graphische Darstellung des regionalen Blutflusses in der Niere.

Vor: Blutfluss vor Beginn der Kühlung; Tiefe Hypothermie: Blutfluss in tiefer Hypothermie; Reperfusion: Blutfluss am Ende der Reperusionsphase. Post: Blutfluss 4 Stunden nach Reperfusion. Angaben in *ml/min/g*

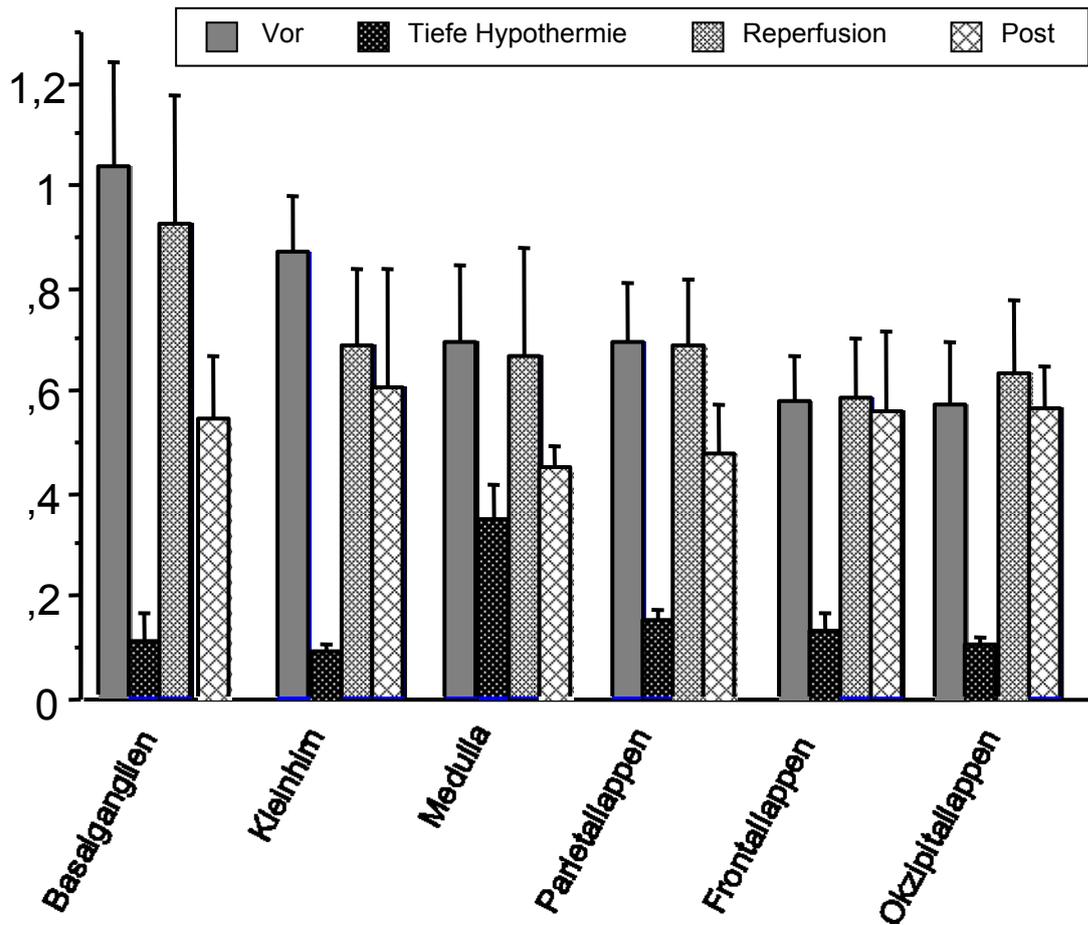
Die Niere zeigte eine deutliche Abnahme des Blutflusses in der Kühlungsphase gegenüber dem Ausgangswert. Der Anstieg des Blutflusses fiel in der Reperusionsphase gering aus und war nicht signifikant.

3.3. Veränderung der regionalen Perfusion im ZNS

Die globale zerebrale Perfusion nahm während der hypothermen Phase deutlich ab (um 80% des Ausgangswertes). Die regionale Perfusion nahm in den Kortexregionen und im Kleinhirn deutlicher ab als in den anderen Gebieten (Basalganglien und Medulla) (Abb. 3.3).

In den untersuchten Kortexarealen (Frontal-, Parietal- und Okzipitallappen) nahm die regionale Perfusion in der Kühlungsphase signifikant ab. In der Reperfusionphase stieg die regionale Perfusion in diesen Arealen gegenüber der Kühlungsphase signifikant an (Abb. 3.3).

Die regionale Perfusion der Medulla erfuhr auch eine Abnahme in tiefer Hypothermie und einen Anstieg in der Reperfusionphase. Diese Veränderungen waren allerdings nicht signifikant.



	p1	p2
	Vor vs. tiefe Hypothermie	tiefe Hypothermie vs. Reperfusion
Basalganglien	0,04	0,04
Kleinhirn	0,002	0,007
Medulla	0,09	0,1
Parietallappen	0,005	0,005
Frontallappen	0,001	0,003
Okzipitallappen	0,007	0,007

Abbildung 3.3. Graphische Darstellung der regionalen Perfusion in den ZNS-Arealen im Direktvergleich. Angaben in ml/min/g.

Vor: Blutfluss vor Beginn der Kühlung; Tiefe Hypothermie: Blutfluss in tiefer Hypothermie; Reperfusion: Blutfluss am Ende der Reperfusionsphase. Post: Blutfluss 4 Stunden nach Reperfusion.

Alle ZNS-Areale zeigen eine signifikante Abnahme der Perfusion am Ende der Kühlungsphase ($p \leq 0,05$) bis auf Medulla. Auch die Perfusion dieser Areale stieg gegenüber der Perfusion in tiefer Hypothermie signifikant an.

3.3.1. Basalganglien

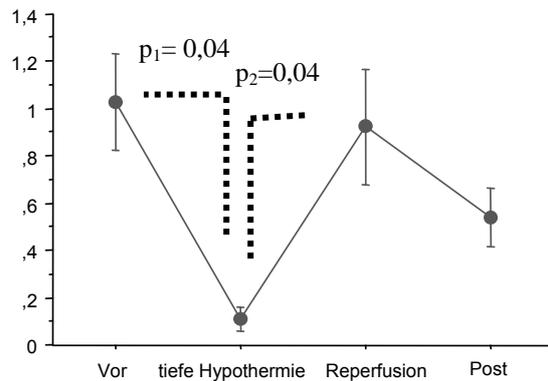


Abbildung 3.4. Graphische Darstellung des Blutflusses in den Basalganglien. Vor: Blutfluss vor Beginn der Kühlung; Tiefe Hypothermie: Blutfluss in tiefer Hypothermie; Reperfusion: Blutfluss am Ende der Reperfusionsphase. Post: Blutfluss 4 Stunden nach Reperfusion. Angaben in ml/min/g. Es bestand eine signifikante Abnahme des Blutflusses am Ende der Kühlungsphase ($p_1=0,04$) sowie eine signifikante Zunahme des Blutflusses am Ende der Erwärmungsphase ($p_2=0,04$).

3.3.2. Kleinhirn

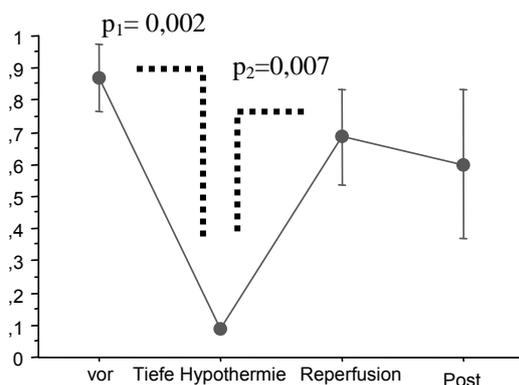


Abbildung 3.5. Graphische Darstellung des Blutflusses im Kleinhirn. Vor: Blutfluss vor Beginn der Kühlung; Tiefe Hypothermie: Blutfluss in tiefer Hypothermie; Reperfusion: Blutfluss am Ende der Reperfusionsphase. Post: Blutfluss 4 Stunden nach Reperfusion. Angaben in ml/min/g. Es bestand eine signifikante Abnahme des Blutflusses am Ende der Kühlungsphase ($p_1=0,002$) sowie eine signifikante Zunahme des Blutflusses am Ende der Erwärmungsphase. ($p_2=0,007$).

3.3.3. Medulla

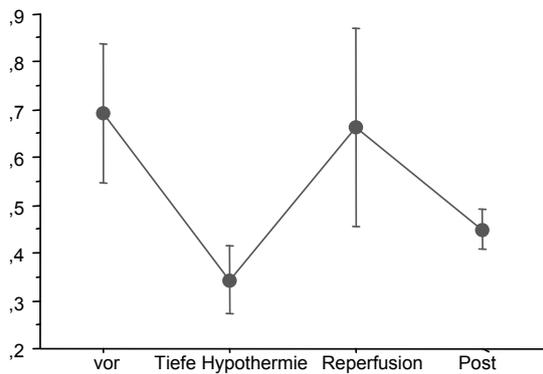


Abbildung 3.6. Graphische Darstellung des Blutflusses in der Medulla. Vor: Blutfluss vor Beginn der Kühlung; Tiefe Hypothermie: Blutfluss in tiefer Hypothermie; Reperfusion: Blutfluss am Ende der Reperfusionsphase. Post: Blutfluss 4 Stunden nach Reperfusion. Angaben in ml/min/g.

Die Abnahme des Blutflusses am Ende der Kühlungsphase in Medulla war, im Gegensatz zu den anderen Hirnregionen, nicht signifikant ($p_1=0,09$). Auch die Reperfusionsphase zeigte keinen signifikanten Anstieg des Blutflusses ($p_2=0,1$).

3.3.4. Parietallappen

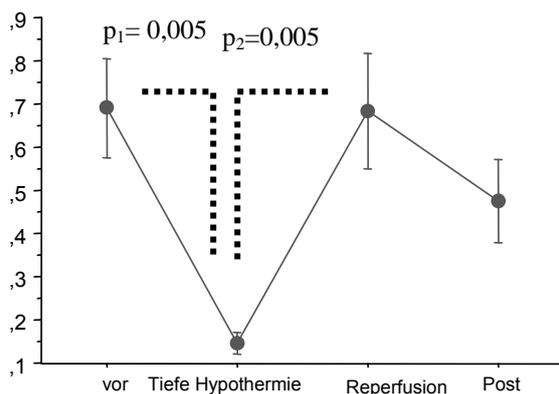


Abbildung 3.7. Graphische Darstellung des Blutflusses im Parietallappen. Vor: Blutfluss vor Beginn der Kühlung; Tiefe Hypothermie: Blutfluss in tiefer Hypothermie; Reperfusion: Blutfluss am Ende der Reperfusionsphase. Post: Blutfluss 4 Stunden nach Reperfusion. Angaben in ml/min/g.

Es bestand eine signifikante Abnahme des Blutflusses am Ende der Kühlungsphase ($p_1= 0,005$) sowie eine signifikante Zunahme des Blutflusses am Ende der Erwärmungsphase ($p_2= 0,005$).

3.3.5. Frontallappen

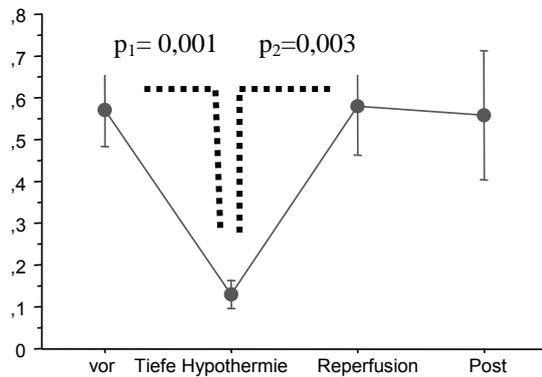


Abbildung 3.8. Graphische Darstellung des Blutflusses im Frontallappen. Vor: Blutfluss vor Beginn der Kühlung; Tiefe Hypothermie: Blutfluss in tiefer Hypothermie; Reperfusion: Blutfluss am Ende der Reperfusionsphase. Post: Blutfluss 4 Stunden nach Reperfusion. Angaben in ml/min/g.

Es bestand eine deutlich signifikante Abnahme des Blutflusses am Ende der Kühlungsphase ($p_1= 0,001$) sowie eine signifikante Zunahme des Blutflusses am Ende der Erwärmungsphase ($p_2= 0,003$).

3.3.6. Okzipitallappen

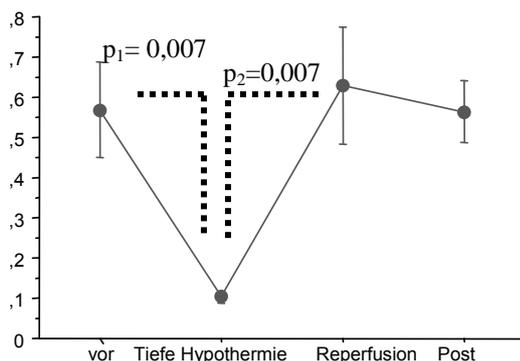


Abbildung 3.9. Graphische Darstellung des Blutflusses im Okzipitallappen. Vor: Blutfluss vor Beginn der Kühlung; Tiefe Hypothermie: Blutfluss in tiefer Hypothermie; Reperfusion: Blutfluss am Ende der Reperfusionsphase. Post: Blutfluss 4 Stunden nach Reperfusion. Angaben in ml/min/g.

Es bestand eine signifikante Abnahme des Blutflusses am Ende der Kühlungsphase ($p_1= 0,0077$) sowie eine signifikante Zunahme des Blutflusses am Ende der Erwärmungsphase ($p_2= 0,0077$).

3.4. Einfluss der Vorbehandlung mit Steroiden auf die regionale zerebrale Perfusion und die regionale Hirnzellschädigung

Die zerebrale Perfusion und die morphologischen Veränderungen wurden bei allen 3 Gruppen (Kontrollgruppe, MPsys, MPintra) untersucht.

3.4.1. Versuchsgruppen

Alle eingeschlossenen Tiere der drei Versuchsgruppen waren 5 bis 10 Tage alt. Präoperativ lag kein signifikanter Unterschied bezüglich Gewicht und Größe vor.

	Kontrolle	MP systemisch	MP intrathekal
Anzahl	12	7	5
Gewicht	2378 ± 147	2393 ± 143	2344 ± 137

3.4.2. Hämodynamische Daten

Während der Tierexperimente wurden die hämodynamischen und respiratorischen Werte der Versuchstiere ständig überwacht und dokumentiert. Alle drei Gruppen zeigten vergleichbare hämodynamische Werte ohne signifikante Unterschiede während des gesamten Versuchsablaufs.

	Prä- operativ	CPB 37°	CPB 15°	Reperfusion 37°	Postoperative Stunden			
					1h	2h	4h	6h
HF (min ⁻¹)								
Kontrolle	159±26	162±30	0	208±13	212±10	197±5	249±23	260±8
MPsystem.	175±15	205±17	0	195±18	210±6	230±15	223±17	223±2
MPintrath.	190±30	227±16	0	224±4	230±13	235±17	211±16	222±13
MAD (mmHg)								
Kontrolle	63±15	62±8	62±5	85±7	74±14	62±2	66±7	70±2
MPsystem.	77±15	64±9	64±6	76±8	73±22	81±8	68±8	63±7
MPintrath.	81±3	77±9	61±5.4	79±9	71±22	84±8	84±4	77±4
ZVD (mmHg)								
Kontrolle	5.4±1.2	5±1.4	6±1.2	5±0.5	9±1.3	8±1.5	6.5±1	8±1.5
MPsystem.	4±2.2	5.5±2.2	5±1	9±1.4	9±2	8±2.5	8.5±3	7.5±2.5
MPintrath.	4±2	4±1.5	5±1.2	4.5±1.1	7±2.5	9±3	9±3.5	8±2

Abbildung 3.10. Hämodynamische Daten

3.4.3. Oxygenation

Vor dem totalen Kreislaufstillstand lagen die pH-Werte mit $7,4 \pm 0,05$ im Normbereich. Nach der Phase des totalen Kreislaufstillstandes lagen diese Werte zwischen 7,21 und 7,50. Die Sauerstoffpartialdrücke lagen in einem Bereich zwischen 180 und 326 mmHg.

Der postoperativ erhöhte Sauerstoffbedarf wurde durch Intensivierung der Beatmung gewährleistet. Entsprechend lagen die CO₂-Partialdrücke im unteren Normbereich zwischen 28 und 45 mmHg, um einem erhöhten pulmonalen Widerstand mit eingeschränkter Lungenmechanik nach dem totalen Kreislaufstillstand entgegenzuwirken. Die Hämoglobinwerte lagen in einem Bereich zwischen 8 und 12 g/dl, entsprechend einem Hämatokritwert von 25 bis 40%.

	<i>Prä-</i>	<i>CPB</i>	<i>CPB</i>	<i>Reperfusion</i>	<i>Postoperative Stunden</i>			
	operativ	37°	15°	37°	1h	2h	4h	6h
Hb(mg/dl)								
Kontrolle	7.5±0.9	9.25±1.5	9.4±1.5	9±1.25	9.9±1.2	9.5±1	9.4±1.4	9.3±1.3
MPsystem.	7.85±0.6	9.9±0.8	9±0.5	8.4±1.3	8.5±1	8.9±1	8.8±1.7	8.8±2.5
MPintrath.	7.5±1	8.2±1.4	9±1	8.35±1	9±0.5	9.3±0.5	9.9±1	9.5±1.4
pH								
Kontrolle	7.45±0.04	7.45±0.04	7.42±0.02	7.23±0.05	7.36±0.03	7.37±0.04	7.45±0.03	7.40±0.04
MPsystem.	7.44±0.05	7.40±0.05	7.41±0.05	7.21±0.06	7.32±0.06	7.34±0.03	7.35±0.03	7.35±0.05
MPintrath.	7.38±0.06	7.34±0.05	7.38±0.05	7.22±0.04	7.39±0.03	7.35±0.04	7.32±0.04	7.33±0.03
pO₂(mmHg)								
Kontrolle	190±6	225±4	398±8.6	215±2.6	307±2.4	264±4	273±3.5	314±4
MPsystem.	180±6.4	228±4	368±9	182±2.3	217±2	250±2	221±2.6	298±6
MPintrath.	205±12.5	192±5	385±10	208±3	2082	245±3	224±3	274±6.5
pCO₂(mmHg)								
Kontrolle	31±1.5	38±2	39±2.3	35±2	28±1	33±1.2	24±1	33±2
MPsystem.	32±2	38±2.5	37±2	37±1.2	28±0.6	30±1	30±1.2	35±2
MPintrath.	33±2	37±2.4	38±1.5	36±2	30±1.3	33±1.2	33±1.2	31±3

Abbildung 3.11. Arterielle Blutgasanalysen

3.4.4. Elektrolyte und Glukose-Metabolismus

Die Natrium- und Kaliumwerte lagen präoperativ im Normbereich. Im weiteren Verlauf zeigte sich auch kein signifikanter Unterschied.

Der Kalziumstoffwechsel ist für Ischämie-Reperfusion von Bedeutung. Die mittleren Kalziumwerte lagen präoperativ in allen Gruppen mit $0,95 \pm 0,15$ mmol/l gleich. Mit Werten um $0,55 \pm 0,1$ mmol/l in der intrathekalen Steroidgruppe nach dem hypothermen Kreislaufstillstand waren die Kalziumwerte deutlich niedriger als in den beiden anderen Gruppen ($0,85 \pm 0,15$ mmol/l). In der postoperativen Phase ergaben sich deutliche Unterschiede, wobei die intrathekale Gruppe im arteriellen und zerebrovenösen Blut signifikant niedrigere Werte ($p=0,02$) als die beiden anderen Gruppen zeigte.

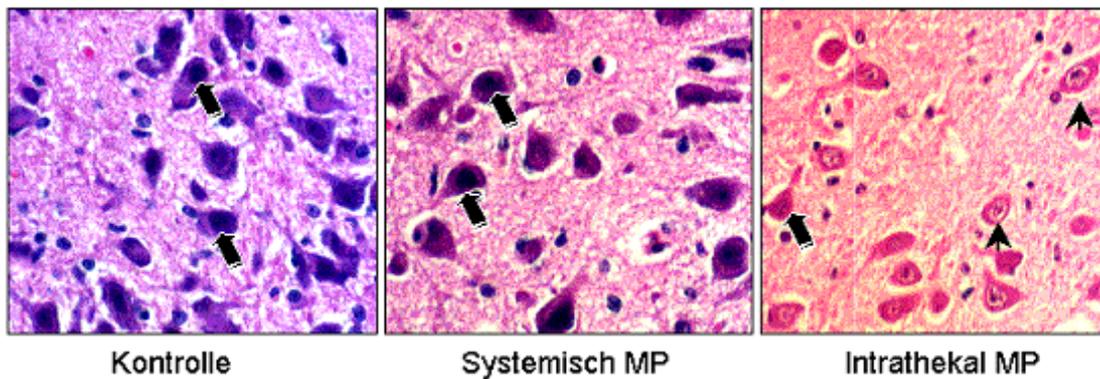
Nach der hypothermen Kreislaufstillstandphase wurden in den beiden Steroidgruppen deutlich höhere Blutzuckerwerte als präoperativ gemessen. Hier zeigten sich in der systemischen Gruppe signifikant höhere Werte als in der intrathekalen Gruppe. In der Kontrollgruppe blieben die Veränderungen der Blutzuckerwerte gering. Im weiteren Verlauf zeigte die intrathekale Gruppe einen Rückgang auf hochnormale Werte (200 mg/dl), in der systemischen Gruppe persistierten dagegen die signifikant höheren Werte (300-350 mg/dl, $p=0,001$).

3.4.5. Zerebrales Ödem

Das zerebrale Ödem wurde über den Anteil des Hirngewichts vom Körpergewicht semiquantitativ ermittelt. Hier zeigte sich auch ein Unterschied zwischen den Gruppen. Mit einem Hirngewichtsanteil von 1,37% zeigte auch hier die systemisch behandelte Steroidgruppe den niedrigste Wert mit einer Signifikanz ($p=0,01$) gegenüber der Kontrollgruppe (1,6%). Die intrathekale Gruppe zeigte zwar einen geringeren Hirngewichtsanteil (1,52%) als in der Kontrollgruppe, dieser Unterschied blieb aber nicht signifikant.

3.4.6. Neuronale Nekrose im Hippocampus

Während sich in der Kontrollgruppe eine neuronale Nekrose von 75,4% der Zellen im Hippocampus fand, verzeichnete sich in der systemisch behandelten Steroidgruppe eine höhere Nekrose (85,4%). Deutlich geringer fiel die Nekrose in der intrathekal behandelten Gruppe. Mit einem Anteil von 34,2% Nekrose führte die intrathekale Steroidapplikation zu einem signifikanten Schutz vor ischämischer Schädigung gegenüber den beiden anderen Gruppen. Die Zunahme der Nekrose in der systemisch behandelten Steroidgruppe zeigte gegenüber der Kontrollgruppe keine Signifikanz (Abb. 3.13).



Hypoxisches Neuron ➔
Normales Neuron ➔

Abbildung 3.12. Repräsentative histologische Schnitte aller drei Gruppen im Hippocampus: In der intrathekalen Gruppe zeigten sich signifikant weniger hypoxische Neuronen.

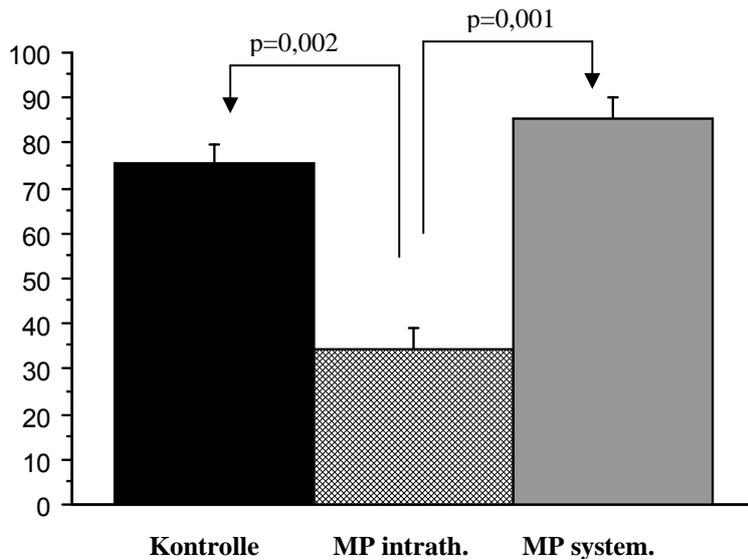


Abbildung 3.13. Nekrose im Hippocampus (in Prozent): Die intrathekale Steroidapplikation führte zu einem relevanten Schutz der Neuronen im Hippocampus gegenüber den beiden anderen Gruppen.

3.4.7. Neuronale Nekrose im Neokortex (Gyrus cinguli)

Der Gyrus cinguli wurde stellvertretend für den Neokortex untersucht und nach neuronaler Nekrose quantifiziert. Die Kontrollgruppe zeigte einen nekrotischen Anteil von 62%. Einen ähnlichen Wert zeigte auch die systemisch behandelte Steroidgruppe (60,5%). Die intrathekale Gruppe zeigte einen signifikanten Schutz der Neuronen im Gyrus cinguli. Mit einem nekrotischen Anteil von 32% in der intrathekalen Gruppe fand sich eine signifikante Reduktion der Nekrose gegenüber den beiden anderen Gruppen (Abb. 3.14).

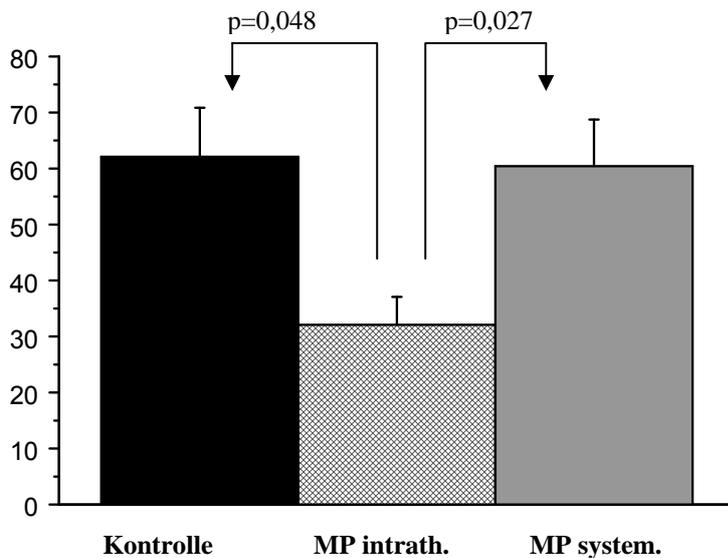
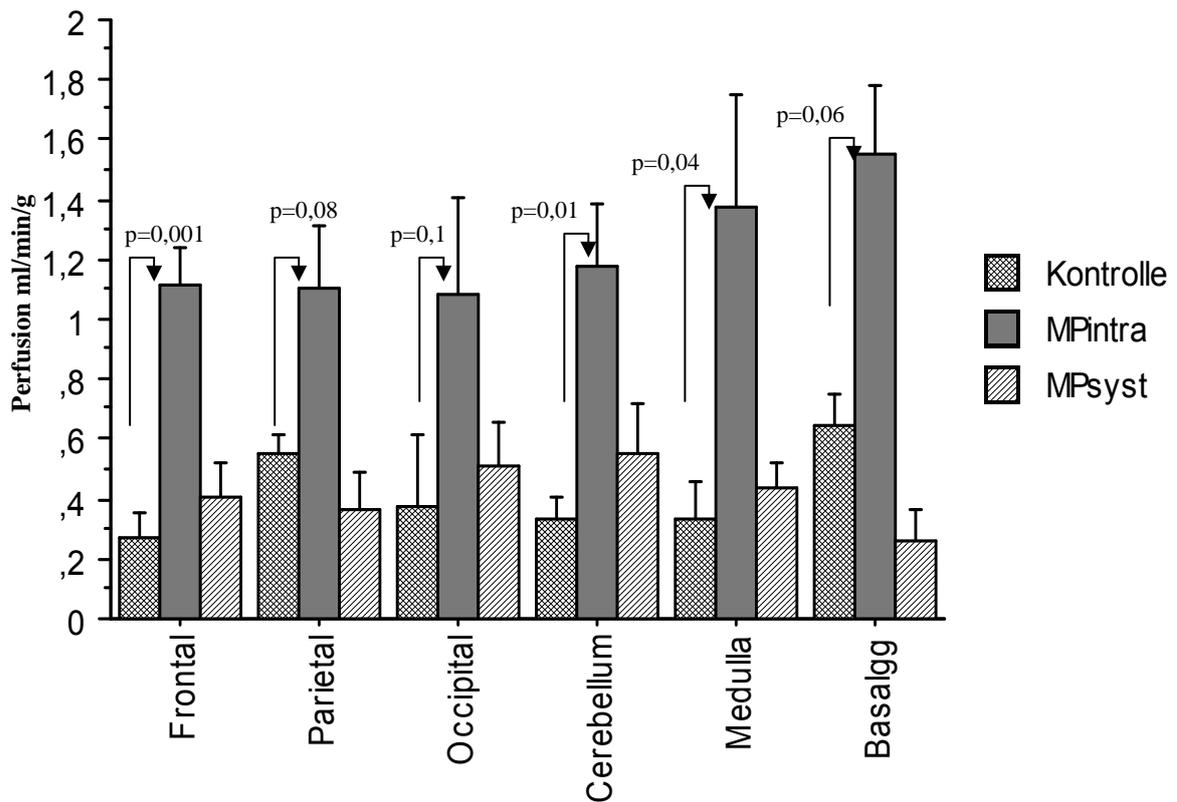


Abbildung 3.14. Nekrose im Gyrus cinguli (in Prozent): Die intrathekale Steroidapplikation führte zu einem relevanten Schutz der Neuronen im Gyrus cinguli gegenüber den beiden anderen Gruppen.

3.4.8. Regionale Perfusion, Einfluss der Vorbehandlung mit Methylprednisolon

Die systemische Applikation von Steroiden brachte keine Verbesserung der regionalen Perfusion. Der Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe, bei der Methylprednisolon systemisch appliziert wurde (MPsyst), zeigte keine relevanten Unterschiede in der regionalen Perfusion im Gehirn am Ende der Reperfusionphase (Abb. 3.15).

Im Gegensatz dazu waren die Perfusionswerte in der Gruppe, bei der Methylprednisolon intrathekal appliziert wurde (MPintra), signifikant höher im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Abb. 3.15).



Frontal: MPsys vs. MPintra: $p = 0,004$
 Parietal: MPsys vs. MPintra: $p = 0,02$
 Occipital: MPsys vs. MPintra: $p = 0,1$
 Cerebellum: MPsys vs. MPintra: $p = 0,08$
 Medulla: MPsys vs. MPintra: $p = 0,1$
 Basalgg: MPsys vs. MPintra: $p = 0,02$

Abbildung 3.15. Vergleich der drei Gruppen (Kontrollgruppe, Steroidgruppe intrathekal (MPintra) und Steroidgruppe Systemisch (MPsys)) am Ende der Reperfusionphase. *Frontal* = regionaler Blutfluss im Frontallappen am Ende der Reperfusionphase, *Kleinhirn* = regionaler Blutfluss im Kleinhirn, *Medulla* = regionaler Blutfluss in der Medulla, *Occipital* = regionaler Blutfluss im Okzipitallappen, *Parietal* = regionaler Blutfluss im Parietallappen, *Basalgg* = regionaler Blutfluss in den Basalganglien. Angaben in ml/min/g.

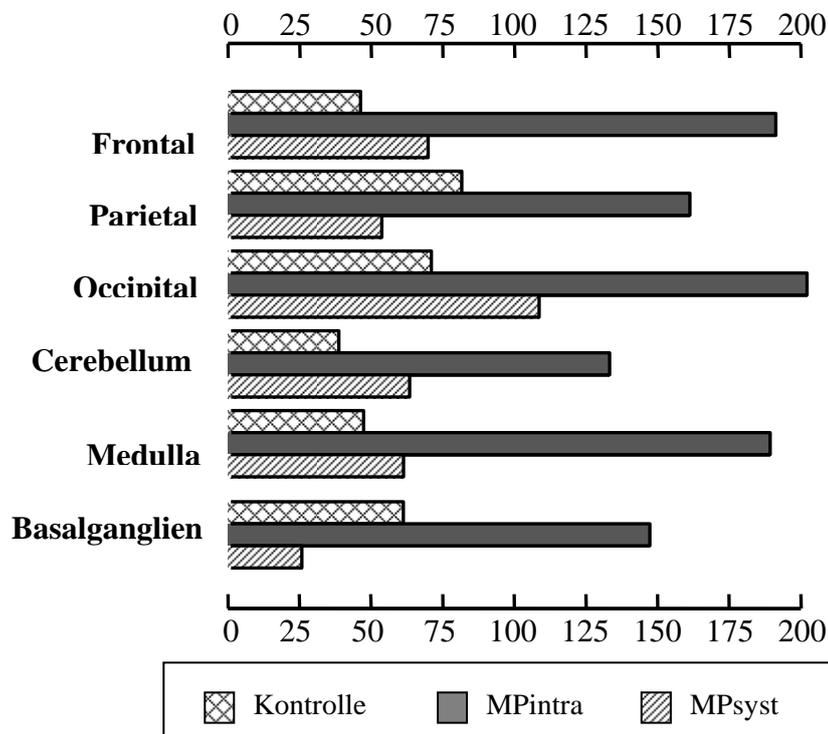


Abbildung 3.16. Prozentualwerte der Perfusion am Ende der Reperfusionphase in Prozent des Ausgangswertes vor der Kühlung. Im Gegensatz zu der systemischen Vorbehandlung führte die intrathekale Vorbehandlung mit Methylprednisolon zu einer signifikanten Erhöhung der regionalen Hirnperfusion am Ende der Reperfusionphase.

3.5. Zusammenhang zwischen der regionalen Perfusion und der zerebralen Zellschädigung

Der prozentuale Anteil nekrotischer Neuronen in den histologisch untersuchten Hirnarealen wurde in einem Regressionsdiagramm auf Korrelation mit den Perfusionswerten in den entsprechenden Bereichen untersucht. Da die Phase der Reperfusion nach DHCA die kritische Phase ist, wurden die Blutflusswerte (ml/min/g) in dieser Phase zur Korrelationsprüfung genommen.

3.5.1. Kortex

Den Tieren wurden Proben aus Gyrus cinguli und Hippocampus zur histologischen Untersuchung entnommen. Die Proben wurden histologisch untersucht und die Zellnekrose in Prozent ausgerechnet und dann den Mittelwert für jedes Tier ermittelt. Die Werte wurden in einer Regressionsanalyse mit der regionalen Perfusion im Kortex am Ende der Reperfusionphase korreliert (Abbildung 3.17).

Nekrose %	Regionale Perfusion in Kortex ml/min/g
70,73	0,11
80,15	0,35
50,33	0,19
79,77	0,49
83,48	0,30
57,33	0,26
48,48	0,647
79,88	0,24
82,37	0,198
82,03	0,35
61,43	0,47
63,78	0,43
75,2	0,41
33,35	0,59
34,74	0,54
35,87	1,08
28,68	0,46

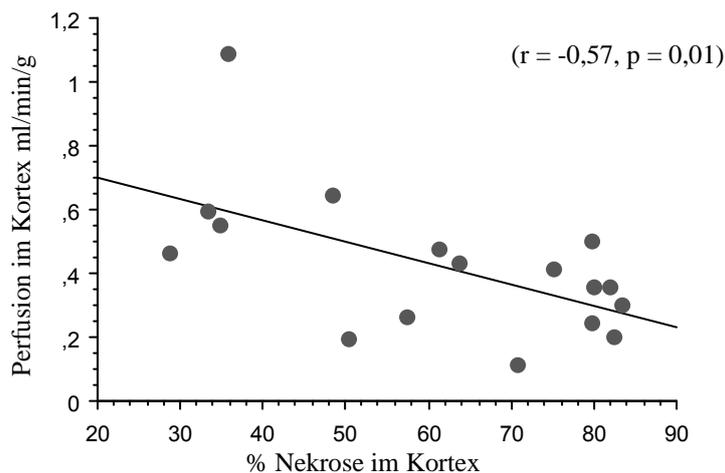
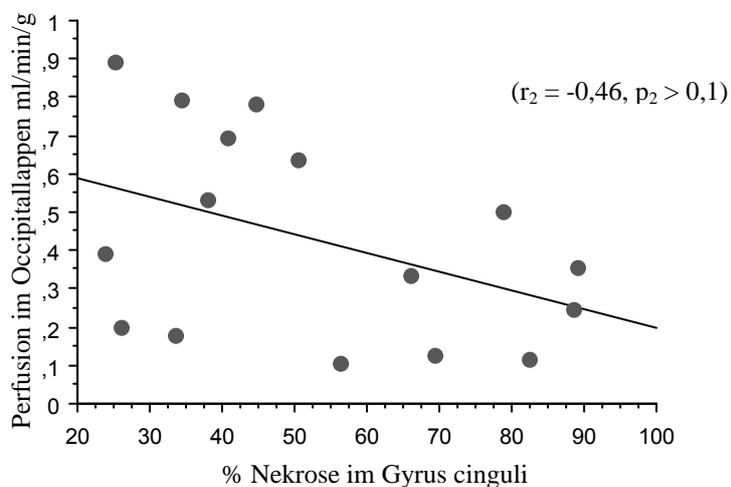
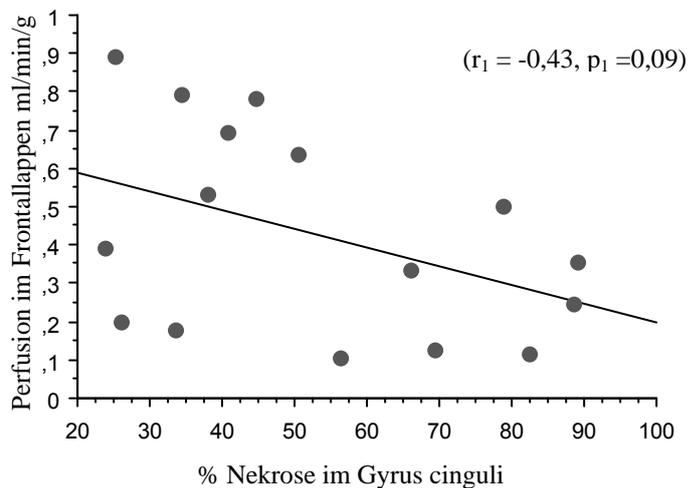


Abbildung 3.17. Zusammenhang zwischen der regionalen Perfusion in den Kortexarealen am Ende der Reperfusionphase und dem Ausmaß der Schädigung im Kortex: Die Grafik zeigt eine deutliche negative Korrelation, d.h. je niedriger der Blutfluss ist, desto höher ist die Anzahl der nekrotischen Zellen (p= 0,01).

3.5.2. Gyrus cinguli

Stellvertretend für Kortex wurde der Gyrus cinguli histologisch untersucht und die Zellnekrose in Prozent ausgerechnet. Diese Werte wurden in einer Regressionsanalyse mit der regionalen Perfusion in den Kortexarealen (Frontal-, Parietal- und Okzipitallappen) am Ende der Reperfusionsphase auf mögliche Korrelation geprüft (Abb. 3.18).

Alle drei Areale zeigten eine negative Korrelation, d.h. je schlechter die Perfusion ist, desto höher ist die Nekrose.



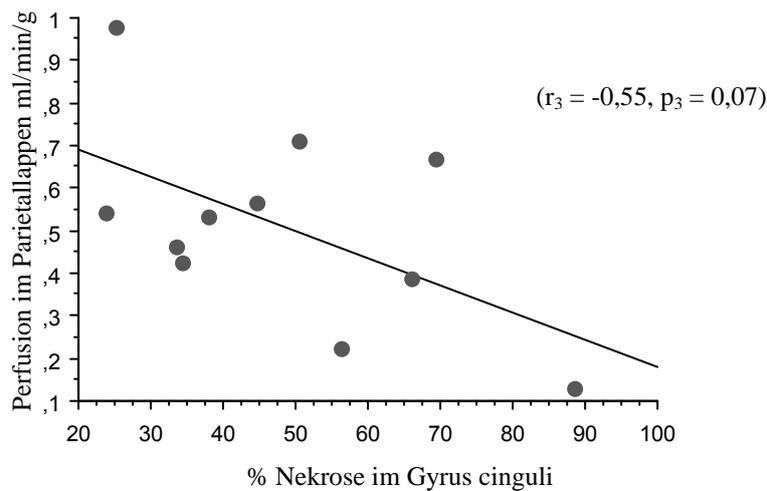


Abbildung 3.18. Zusammenhang zwischen der Perfusion in den Kortexarealen am Ende der Reperfuionsphase und dem Ausmaß der Schädigung im Gyrus cinguli: Alle drei Areale zeigten eine negative Korrelation (d.h. je niedriger der Blutfluss ist, desto höher ist die Anzahl der nekrotischen Zellen).

3.5.3. Hippocampus

Die Analyse der Korrelation zwischen der regionalen Perfusion in den Kortexarealen und dem Ausmaß der Zellschädigung im Hippocampus zeigte ein ähnliches Ergebnis wie oben. Alle drei Areale zeigten wieder eine negative Korrelation, d.h. je höher die Perfusion ist, desto niedriger ist die Nekrose. Die Perfusion im Frontallappen zeigte eine signifikant negative Korrelation ($p=0,01$) mit dem Ausmaß der Nekrose im Hippocampus (Abb. 3.19).

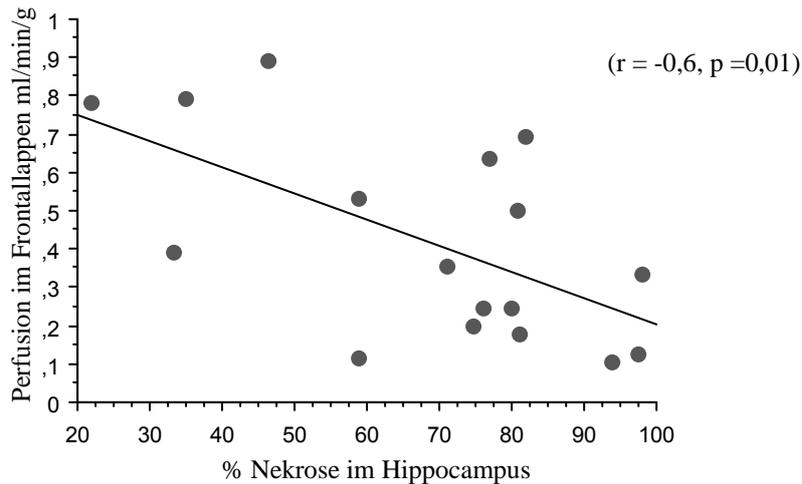


Abbildung 3.19. Zusammenhang zwischen dem Blutfluss im Frontallappen am Ende der Reperfusionphase und dem Ausmaß der Schädigung im Hippocampus: Es zeigte sich hier ebenfalls eine negative Korrelation, d.h. je niedriger der Blutfluss ist, desto höher ist die Nekrose ($p=0,01$).

3.5.4. Nekrose und Perfusion in den drei Gruppen

Ein Vergleich der drei untersuchten Gruppen (Kontrollgruppe, MP intrathekal und MP systemisch) hinsichtlich der Korrelation zwischen Perfusion (im Kortex) und dem Ausmaß der Nekrose zeigt ein deutliches Trend zugunsten der Intrathekalgruppe. Diese Gruppe zeigt eine höhere Gewebepfusion und gleichzeitig eine deutlich niedrigere Nekroserate in den untersuchten Arealen, während die beiden anderen Gruppen (Kontrollgruppe und Gruppe der systemischen Applikation von Methylprednisolon) schlechtere Perfusionswerte und gleichzeitig höhere Nekroserate zeigen (Abb. 3.20).

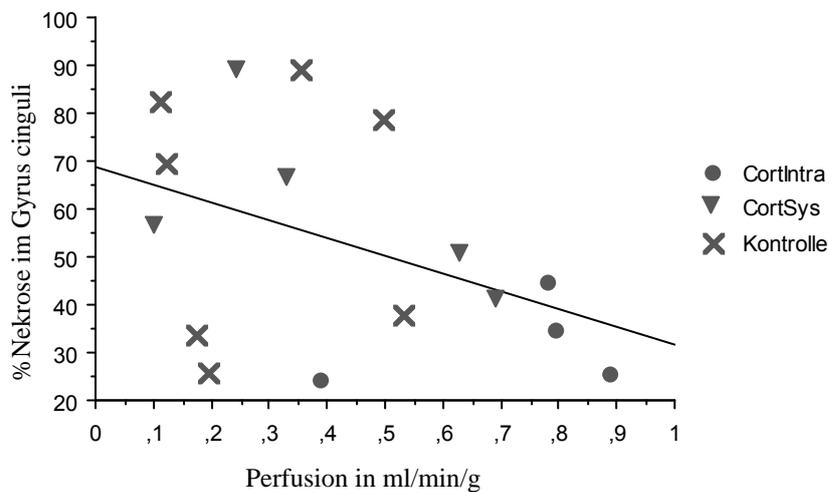
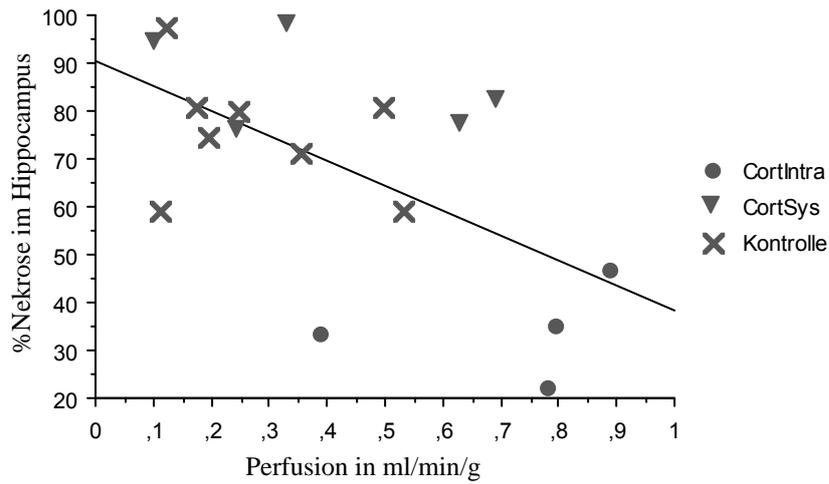


Abbildung 3.20. Vergleich der drei Gruppen (CortIntra = Methylprednisolon intrathekal, CortSys= MP systemisch, Kontrolle= Kontrollgruppe): Zusammenhang zwischen dem Blutfluss in den Kortexarealen in der Reperfusionphase und dem Ausmaß der Schädigung im Hippocampus (oben) und im Gyrus cinguli (unten): In beiden Graphiken zeigt sich ein deutliches Trend zugunsten der intrathekalen Gruppe.

4. DISKUSSION

4.1. Diskussion der Methode

4.1.1. Messung der Organperfusion

Zur Analyse der Blutversorgung der einzelnen Organe werden unterschiedliche Methoden angewendet. So kann die Gefäßperfusion z. B. *elektromagnetisch* gemessen werden. Hierbei liegt das operativ freigelegte Gefäß mit seiner Längsachse zwischen den Polen eines elektromagnetischen Feldes. Die Passage des Blutes induziert eine senkrecht zur Strömungsrichtung liegende Spannung, die durch entsprechend angeordnete Elektroden an der Außenseite des Gefäßes abgegriffen wird. Beim *Ultraschall-Doppler-Verfahren* kann die Strömungsgeschwindigkeit in oberflächlichen Gefäßen durch kontinuierliche Aussendung eines Ultraschalls transkutan gemessen werden. Bei *Venenverschlussplethysmographie* wird die bei der Unterbrechung des venösen Abflusses auftretende Volumenzunahme einer Extremität bzw. einzelner Abschnitte zur Ermittlung der arteriellen Stromstärke benutzt. Diese Methoden eignen sich jedoch nur zur Perfusionsmessung in den großen Gefäßen und nicht zur Erfassung der regionalen Perfusion in den verschiedenen Organen.

Bei der *Clearance*-Methode wird eine inerte, gut diffusible radioaktive Substanz in die Blutbahn eingebracht. Dies führt zu einer Aufnahme ins Gewebe und danach zu einer Abgabe aus dem Gewebe. Aufnahme und Abgabe sind durchblutungsabhängig. Der Aktivitätsverlauf im Gewebe ist damit ein Maß für die Durchblutung. Eine weitere Methode ist die *Farbstoffverdünnungsmethode*, bei der Substanzen, die im Zielorgan nicht verstoffwechselt werden, bis zum Erreichen der Steady-state in die zum Organ zuführende Blutgefäße infundiert werden. Diese Methoden sind aufwendig und eignen sich nicht für die Messung der regionalen Perfusion in allen Organen. Ein weiterer Nachteil ist die große Anzahl von Kathetern, die nötig sind, um die Konzentration der Indikatorsubstanz vor und nach dem Zielorgan messen zu können, was bei z.B. ZNS-Arealen nicht möglich ist.

SMITS et al. (61) entwickelten 1986 ein Laser-Doppler-Velocimeter (Fließgeschwindigkeitsmessgerät) und nutzten so die Eigenschaft des Lichtes als Welle. Ein Laserstrahl wird unter einem flachen Winkel auf ein Gefäß gerichtet: Durch die Reflexion des Strahles an den Erythrozyten entsteht eine Phasenverschiebung des reflektierten Lichtes, so konnte man die Blutflussgeschwindigkeit berechnen (62). Ein Nachteil dieser Methode ist, dass der Blutfluss nur in einzelnen Arterien bestimmt werden kann.

Für eine höhere Auflösung bei der Untersuchung der Organe ist eine Messung „vor Ort“ notwendig. Geeignet hierfür sind Partikel oder Substanzen, die in die Blutbahn injiziert werden, sich dann im Körper verteilen und in den Organen nachweisbar sind. Die Konzentration dieser Substanzen pro Messregion lässt dann auf die Organperfusion rückschließen.

SAPIRSTEIN et al. (63) injizierten 1956 radioaktives Kalium (K_{42}) und bestimmten dann die Anzahl der radioaktiven Zerfälle in den Organproben. In einem ähnlichen Experiment verwendete MESCHIA 1967 (64) nicht einen radioaktiven Stoff sondern Antipyrin. Bei der Verwendung dieser Stoffe ist allerdings nur eine einzelne Injektion möglich und somit ist die Bestimmung des regionalen Blutflusses zu verschiedenen Zeitpunkten des Experimentes nicht möglich.

Die Verwendung der Mikrosphären zur Messung der Organperfusion geht auf das Jahr 1967 zurück. Damals verwendeten Rudolf und Heymann (65) radioaktiv markierte Polystyrenkügelchen zur Messung des regionalen Blutflusses bei fetalen Lämmern. Die Verwendung der radioaktiv markierten Mikrosphären hat jedoch viele Nachteile, wie z.B. die Strahlenexposition und die kurze Haltbarkeit. In den letzten 20 Jahren wurden viele Experimente zur Messung der Organperfusion mit Farbmikrosphären bzw. mit fluoreszierenden Mikrosphären durchgeführt und validiert (66, 67, 68, 69).

Die Bestimmung des Blutflusses bei den radioaktiv markierten Mikrosphären erfolgt durch Messung der Anzahl der radioaktiven Zerfälle in den jeweiligen Organregionen. Bei den fluoreszierenden Mikrosphären kann man nach dem Fick'schen Prinzip aus der Absaug-Rate (R), der Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes (I_M), der Intensität der

arteriellen Referenzprobe (I_B) und dem Gewicht der Gewebeprobe (m) den regionalen Blutfluss (F) bestimmen (Formel 1.2).

4.1.2. Fluoreszierende Mikrosphären

Für die Benutzung der radioaktiv markierten Mikrosphären gelten besondere Schutzmaßnahmen aufgrund der Strahlungsrisiken. Außerdem dürfen sie nur in bestimmten Laboren eingesetzt werden. Die Farbmikrosphären besitzen keine scharfen Spektren und sind deswegen in einer Farbstoffmischung sehr schwierig voneinander zu trennen (Spillover-Effekt = Überlappung der Spektralkurven verschiedener Farben). Außerdem eignen sich zur Farbstoffauslösung nur stark toxische und kanzerogene Lösungsmittel, was die Verarbeitung der Proben wegen strenger Arbeitsvorrichtungen erschwert. Aus diesen Gründen fiel unsere Wahl auf die fluoreszierenden Mikrosphären zur Messung der Organperfusion in dieser experimentellen Arbeit.

Bei der Benutzung der Mikrosphärenmethode müssen verschiedene Punkte beachtet werden. Eine Grundvoraussetzung ist die homogene Verteilung der Mikrosphären. Die histologische Aufarbeitung von Gewebeproben nach wiederholter Injektion von fluoreszierenden Mikrosphären verschiedener Farben zeigte Blutgefäße mit mehreren Mikrosphären verschiedener Farben. Diese waren wie an einer Kette aufgereiht. Es fanden sich sehr selten Mikrosphären der gleichen Farbe hintereinander (70). Dieses Phänomen ist ein indirekter Hinweis auf eine homogene Verteilung im Blut, außerdem zeigt es, dass die Mikrosphärenembolisation die Blutgefäße nicht vollständig verlegt. Ein anderer positiver Aspekt bei der Verwendung von Mikrosphären zur Messung des Blutflusses ist, dass sie in den Blutgefäßen bleiben und den Blutstrom nicht verlassen. Dies ist durch die physikalische Dichte (1,05 g/ml) und die Größe der Mikrosphären möglich. Es ist auch wichtig, dass die verwendeten Mikrosphären die Hämodynamik der Blutgefäße nicht verändern und damit die Ergebnisse der Experimente nicht verfälschen. Hierzu ist wichtig zu wissen, ab welcher Mikrosphärenmenge die Hämodynamik beeinflusst wird. Dieser Frage gingen Kaihara et al. (71) sowie Wagner et al. (72) nach. Beide Gruppen injizierten

Mikrosphärenmengen, wie sie in Experimenten sinnvoll erscheinen. Beide Gruppen konnten keine Grenzdosis finden.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden experimentellen Arbeit zeigte sich eine signifikante Abnahme der Organperfusion in allen untersuchten Organen und Hirnarealen nach systemischer Kühlung mit extrakorporaler Zirkulation trotz konstanter Erhaltung des Flusses durch den CPB.

Die Abnahme der regionalen Perfusion in den Hirnregionen war auch mit einer signifikanten Vermehrung der hypoxämisch bedingten Zellschädigung assoziiert. Somit zeigte diese Arbeit die Notwendigkeit einer separaten Überwachung der zerebralen Perfusion sowie der Erhaltung einer homogenen Organperfusion vor und nach diesem unphysiologischen Zustand.

4.2.1. Pathomechanismus der Gewebepfusionsstörung nach CPB und Kühlung

Die Tatsache, dass es zu einem signifikanten Abfall der Gewebepfusions durch die systemische Kühlung am CPB trotz konstanter Flussrate gekommen ist, zeigt, dass es zu einer funktionellen bzw. morphologischen Störung an den Endkapillaren gekommen ist. Dabei könnten mehrere inflammatorische oder physikalische Faktoren bei möglicher Schädigung, vor allem der Endothelzellen als regulatorisches Organ für die Mikrozirkulation, eine Rolle spielen.

Der Blutkontakt mit der unphysiologischen Oberfläche des CPB ist eine mögliche Ursache für die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren während der extrakorporalen Zirkulation (73, 74, 75). Kontaktaktivierungssysteme werden durch die Fremdoberfläche in Gang gesetzt (76), Faktor XII wird stimuliert, der wiederum die intrinsische Gerinnungskaskade und die Fibrinolyse aktiviert. Sauerstoffradikale und proteolytische Enzyme werden durch Aktivierung von neutrophilen Granulozyten

freigesetzt. Die Komplementaktivierung führt zur Freisetzung von Zytokinen und vasoaktiven, immunregulatorischen und zytolytischen Stoffen. Thrombinbildung wird stimuliert. Diese führt zur Störung der Mikrozirkulation.

Die Mediatorenfreisetzung kann zu einer systemischen inflammatorischen Entzündungsreaktion und zu Störungen in vielen Organen führen (64). Endotoxin stimuliert die Freisetzung von TNF α (Tumor-Nekrose-Faktor α) und führt zu erhöhten Spiegeln von Interleukin-1, -6 (IL-1, IL-6) und Prostaglandin E₂ (PGE₂) (107). Klinische Zeichen eines SIRS wurden vermehrt bei koronarchirurgischen Eingriffen mit postoperativ erhöhten Werten von IL-6 und TNF α gefunden (77). TNF α , IL-1 und IL-6 bewirken in der Leber eine Erhöhung der Synthese der Akute-Phase-Proteine, u.a. CRP (C-reaktives Protein), das seinerseits die alternative Komplementaktivierung bewirkt.

Ein weiterer wesentlicher Punkt bei den hämodynamischen Veränderungen während des Einsatzes vom CPB ist die Störung der Mikrozirkulation. Das Kapillarendothel spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Mikrozirkulation. Der CPB führt durch Störung der Endothelfunktion zur Störung der Mikrozirkulation. Die extrakorporale Zirkulation kann zu Alterationen der zellulären Blutbestandteile führen. Durch Blutkontakt mit der großen Oberfläche des CPB kann es zur Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion kommen. Thrombozytenadhäsion führt zur Thrombozytendysfunktion mit Bildung von Mikroaggregaten, die zur Lumenverlegung mit Perfusionsausfall führen (78). Gerinnungsstörungen können auch durch Abfall der Thrombozytenzahl infolge Hämodilution, Zerstörung durch Kardiotomie-Sauger oder Filter beobachtet werden (78).

Die Leukozytenadhäsion an der fremden Oberfläche des CPB führt zur Leukozytenaktivierung und zur Schädigung des Gefäßendothels mit Veränderung der Permeabilität. Es kommt zum vermehrten Flüssigkeitsaustritt ins Interstitium (79). Nach der Leukozytenaktivierung nimmt der Durchmesser der Leukozyten um 20-30% zu und die Rigidität steigt bis um das 100-fache an (80). Dies kann wiederum zur Leukozytenaggregation und Retention in den Kapillaren mit Beeinträchtigung der nutritiven Blutversorgung führen (79).

Veränderungen der Erythrozyteneigenschaften, hervorgerufen durch den CPB, können ebenfalls zur Störung der Mikrozirkulation beitragen (81). Zudem kann es zur Hämolyse durch Exposition der Erythrozyten an unphysiologischen Scherkräften des CPB und zur Schädigung durch den Kardiotomie-Sauger kommen (78).

Hypothermie ist definiert als eine Körpertemperatur unter 35°. Da Hypothermie zur Reduktion des Stoffwechsels führt, wird sie in den herzchirurgischen Eingriffen eingesetzt, um den Körper vor Ischämieschäden zu schützen (82). Doch Hypothermie besitzt neben ihrem protektiven Effekt auch ungünstige Effekte. In einem Zellkultur-Modell konnte unsere Arbeitsgruppe neben dem protektiven Effekt der Hypothermie eine signifikante Induktion einer inflammatorischen Antwort in den Hirnzellen nachweisen (83). Ein ähnlicher Effekt der Hypothermie in den Endothelzellen ist nicht auszuschließen. Neben der Thrombozytenfunktionsstörung und der damit verbundenen Störung der Mikrozirkulation kann die Hypothermie zur Reduzierung des Anteils an ionisiertem Kalzium im Serum und dadurch zu Herzrhythmusstörungen bis hin zu Kammerflimmern führen (84). Die vasoaktiven Substanzen (ADH, Angiotensin II, Thromboxan A₂ und B₂ und Adrenalin), die durch den Kontakt mit dem hypothermen Bypass freigesetzt werden, können zur Störung der regionalen Perfusion führen.

4.2.2. Veränderung der regionalen Perfusion in den peripheren Organen

Eine der wichtigsten Komplikationen am CPB ist die Störung der Organfunktion, die durch die Veränderung des Blutkreislaufes während der Operation hervorgerufen werden kann. Während der Operation, vor allem in der CPB-Phase, erfolgt eine Umverteilung des Blutflusses in der Peripherie und im Splanchnikusgebiet (85). Die durch lange Vorbereitung, Vasokonstriktion, Zentralisation und möglicherweise auch durch Hypothermie hervorgerufene Minderperfusion der Peripherie und des Splanchnikusgebietes könnte zu schwerwiegenden Komplikationen in den betroffenen Organen führen (85).

In unserm Tiermodell zeigten alle untersuchten Organe und ZNS-Areale eine Abnahme des regionalen Blutflusses in tiefer Hypothermie. Diese Abnahme war nicht

in allen peripheren Organen gleich stark ausgeprägt. Bis auf die Skelettmuskulatur ($p=0,1$) war diese Abnahme in allen untersuchten Organen signifikant ($p\leq 0,05$). In der Niere verzeichnete sich eine deutliche Abnahme des regionalen Blutflusses ($p=0,01$) in der Phase der tiefen Hypothermie.

Nach der Reperfusion zeigte das Skelettmuskelgewebe eine höhere Perfusion als der Ausgangswert. Diese Phase verzeichnete auch eine Zunahme der Perfusion der anderen Organe im Vergleich zu den Werten in tiefer Hypothermie, allerdings blieben diese Werte deutlich unter dem Ausgangswert. Diese Ergebnisse könnten bei der Optimierung der kardiovaskulären Zirkulation mit den üblichen Medikamenten nach hypothermer Perfusion von Bedeutung sein. Unter Kontrolle der peripheren Temperatur und unter Beachtung der kardialen Pumpfunktion könnte der zusätzliche Einsatz von Arterenol oder Vasopressin zur Erhöhung des Perfusionsdruckes in den wichtigsten Organen wie Gehirn und Myokard hilfreich sein.

Tveita et al. (86) untersuchten in einem Experiment u. a. die Veränderung der regionalen Perfusion in tiefer Hypothermie bei Ratten. Ähnlich unserem Tiermodell zeigte sich hier eine starke Abnahme der Gewebepfusion in tiefer Hypothermie. Nach der Wiedererwärmung nahm die Perfusion des Muskelgewebes deutlich zu und war mit dem Ausgangswert vergleichbar. Die Perfusion der anderen Organe blieb in der Wiedererwärmungsphase deutlich unter dem Ausgangswert.

Rudy et al. (87) untersuchten bei Rhesusaffen die Durchblutung von Niere, Herz, Skelettmuskel, sowie Magen und Darm mit radioaktiv markierten Mikrosphären am CPB. Die Ergebnisse zeigten am Ende der Reperfusionsphase eine Umverteilung des Blutflusses zugunsten der Skelettmuskulatur bei vermindertem Fluss zu den übrigen Organen.

Mittels Doppler-Fluss-Technik untersuchten Lazenby et al. (88) den regionalen Blutfluss während hypothermer extrakorporaler Zirkulation bei Hunden. In der initialen normothermen Bypassphase blieben die Flusswerte in der Arteria mesenterica superior, der Arteria renalis und der Arteria femoralis unverändert. Unter hypothermen Temperaturen verringerten sich die Flüsse in der Arteria mesenterica superior und der Arteria renalis, während sich der Fluss in der Arteria femoralis

erhöhte. Daraus wurde geschlossen, dass während der Hypothermie-Phase eine Blutumverteilung zugunsten der Skelettmuskulatur erfolgt.

In einem Tiermodell haben Su et al. (89) den Einfluss der Oberflächenkühlung mit Kreislaufstillstand auf den regionalen Blutfluss untersucht. Zur Messung der Perfusion wurden radioaktive Mikrosphären benutzt. Die Studie zeigte eine Abnahme der Gewebepfusion unter Hypothermie. Während der Reperfusionsphase stieg die regionale Nierenperfusion höher als die der anderen Organe, allerdings blieb die Nierenperfusion am Ende der Reperfusionsphase unter der Perfusion der anderen Organe. Am Ende der Reperfusionsphase beobachtete man eine Umverteilung des Blutflusses zugunsten vom Myokardgewebe.

Klinische Untersuchungen mittels Galaktose-Clearance-Technik zeigten eine Verminderung des effektiven Blutflusses in der Leber in der Phase der extrakorporalen Zirkulation während Hypothermie (90).

Die deutlichste Veränderung in der Organperfusion außerhalb des ZNS wurde in der Niere festgestellt. Störung der Nierenfunktion stellt auch Eine der wichtigsten Komplikationen nach Korrektur angeborener Herzfehler dar. Intensive diuretische Therapie unmittelbar nach der Operation ist obligat. Neben der Störung der systemischen Organperfusion durch low cardiac output stellt eine Störung der renalen Mikrozirkulation nach hypothermer Perfusion ein Risiko dar.

Die Niere stellt unter physiologischen Bedingungen ein stark perfundiertes Organ dar und scheint durch diese Veränderung während des CPB am meisten betroffen zu sein (91, 92). Studien belegten für Patienten nach Operationen am CPB die häufige Komorbidität des akuten Nierenversagens mit Verlängerung der Intensivbehandlung und möglicher Beeinträchtigung der Gesamtprognose nach herzchirurgischen Eingriffen (93, 94). Die Länge der extrakorporalen Zirkulation ist ein weiterer Risikofaktor für die Entwicklung renaler Komplikationen nach kardiochirurgischen Eingriffen (95). Weitere Ursachen für ein akutes Nierenversagen nach einer Operation am CPB sind renale Perfusionsstörungen basierend auf der postoperativ eingeschränkten Herzfunktion (96, 97, 98). Des Weiteren wurde die chronische

Zyanose vor Korrekturoperationen angeborener Herzfehler als zusätzlicher Risikofaktor angesehen (94).

Die DHCA ist ein weiterer Risikofaktor für die Organe. Trotz der tiefen Hypothermie stellt die totale Perfusionsunterbrechung für die optimal perfundierte Niere eine hypotherme Ischämiephase mit u.a. mangelnder Sauerstoffzufuhr und möglicher anaerober Glykolyse dar. Während der Reperfusionsphase ist die Entwicklung von freien Sauerstoffradikalen durch Peroxidationsreaktion mit möglicher Schädigung der renalen Endothelzellen nicht auszuschließen (91).

4.2.3. Veränderung der regionalen Hirnperfusion und Korrelation mit Hirnzellschädigung

Eine verlängerte Kreislaufstillstandphase in tiefer Hypothermie (120 Minuten) mit einer Temperatur von 15° wurde gewählt, um Schädigungen auf zerebraler Ebene histologisch sichtbar zu machen. Anhand des detektierten Schädigungsmusters kann der Einfluss einer medikamentösen Vorbehandlung (in diesem Fall mit Methylprednisolon) auf die Prävention oder Verminderung einer neuronalen Schädigung quantitativ überprüft werden. Diese Methode mit dem prolongierten Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie (90-120 Minuten) wurde in vielen experimentellen Studien zur Erforschung zerebraler Schädigung eingesetzt (99, 100). Temperaturen von 15° werden oft bei Korrektur komplexer Herzvitien wie z.B. bei Hypoplastischem Linksherzsyndrom eingesetzt.

Der Einfluss der Hypothermie auf die zerebrale Perfusion war sehr deutlich. In unserem Experiment verzeichnete die globale Hirnperfusion eine starke Abnahme unter tiefer Hypothermie. Die regionale Perfusion des Gehirns zeigte auch eine deutliche Abnahme unter Hypothermie trotz konstanter Flussrate am CPB. Das Ausmaß der Abnahme der regionalen Perfusion im ZNS war regionenspezifisch. Die Abnahme der regionalen Perfusion war weniger in der Medulla als in den anderen Arealen ausgeprägt.

Diese Ergebnisse deuten auf eine regional-spezifische Reaktion des Gehirns auf Hypothermie hin. Diese physiologische Reaktion hängt sicherlich mit vielen strukturellen und funktionellen Faktoren der jeweiligen Hirnregion zusammen. Die selektive retrograde Hirnperfusion ist unter diesen Bedingungen möglicherweise mit inhomogener Perfusion verbunden. Trotz Full-Flow am CPB zeigten sich weiterhin eine Inhomogenität und eine verminderte Perfusion im Gehirn.

In einem ähnlichen Tiermodell untersuchten Undar et al. (101) den Einfluss des hypothermen Bypasses auf die Blutviskosität sowie auf den globalen und regionalen Blutfluss im Gehirn. Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Abnahme des globalen und regionalen Blutflusses am Ende des Kreislaufstillstandes und einen geringen Anstieg am Ende der Reperfusionphase. Am Ende der Kreislaufstillstandphase wurde eine starke Abnahme der Blutviskosität registriert. Sie schlussfolgerten, dass die Veränderung der Blutviskosität eine signifikante Wirkung auf den Blutfluss, besonders im Gehirn, haben könnte.

In einem Experiment zur Untersuchung des regionalen Blutflusses im Gehirn bei CPB und milder Hypothermie (32°) fanden Okubo et al. (102) zwar wie in unserem Experiment eine Abnahme des Blutflusses in allen Hirnregionen, jedoch war hier im Gegensatz zu unseren Ergebnissen die Medulla von der Abnahme am stärksten betroffen. Ihre Schlussfolgerung war, dass eine systemische Kühlung bei Kindern mit Asphyxie gefährlich sein kann, da in der Kühlungsphase der Blutfluss am stärksten im Medullabereich abnimmt. Dieses Experiment erfolgte im Gegensatz zu unserem Experiment in milder Hypothermie (32°) und ohne Kreislaufstillstand.

Langley et al. (103) untersuchten den Einfluss von Leukozytenfiltern auf die Veränderung des Blutflusses im Gehirn und in der Niere. 16 Tiere wurden einem CPB in tiefer Hypothermie (18°) und Kreislaufstillstand für 60 Minuten unterzogen. Bei 8 Tieren wurden Leukozytenfilter im Bypass eingebaut. Die anderen Tiere dienten als Kontrollgruppe. Ähnlich unseren Ergebnissen verzeichnete sich in der Kontrollgruppe eine signifikante Abnahme der Perfusion in allen Hirnregionen ($p < 0,05$) und in der Niere ($p=0,02$) in tiefer Hypothermie. Auch in der Studiengruppe wurde eine vergleichbare Abnahme der regionalen Perfusion registriert.

Die Abnahme des regionalen Blutflusses im Gehirn am hypothermen Bypass wurde von vielen tierexperimentellen Studien dokumentiert (101, 102, 104, 105). Greeley et al. (106) zeigten in einer Studie eine deutliche Abnahme des zerebralen Blutflusses nach Kreislaufstillstand mit tiefhypothermem Bypass, der zerebrale Blutfluss blieb auch nach der Reperfusionphase unter dem Ausgangswert. Als Grund dafür wurde der Verlust der zerebralen Autoregulation nach tiefer Hypothermie angenommen. Zusätzlich zur Abnahme des zerebralen Blutflusses war auch eine signifikante Reduktion des Metabolismus zu verzeichnen (25).

Die Störung der Gewebepfusion trotz unveränderter Flussrate des CPB weist auf eine signifikante Abnahme der Gewebepfusion bereits während der Kühlungsphase hin. Die folgende Stillstandphase war sicherlich mit einer signifikanten Zellschädigung verbunden. Unter dieser Bedingung sollte die Rolle unterschiedlicher Perfusion bei resultierender Zellschädigung evaluiert werden.

Unter den gleichen Bedingungen der Perfusion und des Kühlungsmusters waren Veränderungen in der Gewebepfusion zu beobachten. Je niedriger die Hirnperfusion war, desto ausgeprägter war das Ausmaß der zerebralen Zellschädigung. Obwohl aus technischen Gründen nicht genau die gleichen Regionen histologisch untersucht werden konnten, fand sich eine akzeptable Korrelation zwischen den unterschiedlichen Methoden. Diese Ergebnisse weisen auf die Notwendigkeit einer Verbesserung der regionalen Hirnperfusion durch Gabe von Medikamenten hin, die die Gewebepfusion während und nach solchen unphysiologischen Phasen verbessern könnten.

4.2.4. Einfluss von Steroiden auf die Hirnperfusion

Schon seit 1966 werden Steroide in der Herzchirurgie eingesetzt, mit dem ursprünglichen Ziel, eine reaktive Vasokonstriktion und eine kardiale Dysfunktion zu beeinflussen. Die Annahme, dass neuronale Schädigung durch Entzündungsreaktionen am CPB hervorgerufen wird, führte dazu, die durch Steroide bedingte Entzündungshemmung als ein möglicher neuroprotektiver Effekt zu interpretieren. So fand man in einer Studie mit CPB und DHCA, dass eine Vorbehandlung mit

systemischen Steroiden (Methylprednisolon) zu einer signifikanten Reduzierung von Ödemen und Gefäßpermeabilitätsstörungen führt (107). Diese Ergebnisse wurden als ein möglicher neuroprotektiver Effekt von Steroiden gedeutet. In den letzten Jahrzehnten wurden Steroide vermehrt zur Neuroprotektion unter verschiedenen zerebral hypoxischen Zuständen eingesetzt, da sie einen inhibitorischen Einfluss auf die Induktion inflammatorischer Reaktionen und die Entstehung eines generalisierten Ödems nach zerebraler Ischämie und Reperfusion haben sollen. In diesem Zusammenhang wird ein neuroprotektiver Effekt von Steroiden, wie z.B. Methylprednisolon, in vielen Studien kontrovers diskutiert (108, 109).

Steroide wurden in erster Linie eingesetzt, um eine durch inflammatorische Mediatoren hervorgerufene Zellschädigung sowie zelluläre und interstitielle Ödeme zu vermeiden. Steroide führen zu einer geringeren Komplementaktivierung durch Hemmung der Stimulation pro-inflammatorischer Zytokine TNF α , IL-6 und IL-8, gleichzeitig erhöht sich die Konzentration anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 (110, 111). In einer klinischen Studie zur Untersuchung des Effektes von Steroiden (Methylprednisolon) auf entzündliche Reaktionen bei herzchirurgischen Eingriffen mit kardiopulmonalem Bypass wurden zwar bei der Methylprednisolongruppe im Vergleich zu der Placebo-Gruppe signifikant erhöhte Werte von dem anti-inflammatorischen Zytokin IL-10 und erniedrigte Werte von dem pro-inflammatorischen Zytokin IL-6 gefunden, es konnte jedoch keinen signifikanten Unterschied in der klinischen Symptomatik zwischen beiden Gruppen festgestellt werden (112). In einer anderen Studie konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die systemische Vorbehandlung mit Methylprednisolon keine Abnahme der nekrotischen ischämischen Zellschädigung bewirkte (113). Im Gegenteil, es wurde eine vermehrte Apoptose der Neuronen im Hipocampus beobachtet.

4.2.5. Vergleich der drei Versuchsgruppen

Aufgrund der sehr komplizierten Durchführung der Versuche bei sehr kleinen Tieren waren die Versuchsgruppen relativ klein. Die strengen Ausschlusskriterien führten dazu, dass eine große Anzahl von Tieren aufgrund intra- und postoperativer Komplikationen mit hämodynamischer Bedeutung ausgeschlossen wurde. Einen

signifikanten Unterschied in den allgemeinen Parametern wie Gewicht, Alter oder Größe gab es zwischen den Gruppen nicht.

4.2.6. Veränderung der Perfusion im ZNS

Nach Aufarbeitung der ZNS-Proben aus den verschiedenen Arealen der drei Versuchsgruppen (Kontrolle (K), Methylprednisolon systemisch (MPsyst) und Methylprednisolon intrathekal (MPintra)) und Ermittlung des regionalen Blutflusses wurden die drei Versuchsgruppen am Ende der Reperfusionphase miteinander verglichen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Langley et al. (114) brachte die systemische Steroidapplikation keinen signifikanten Unterschied zu der Kontrollgruppe, während die intrathekale Steroidapplikation eine verbesserte Hirnperfusion zeigte.

Shum-Tim et al. haben in einer tierexperimentellen Studie mit kardiopulmonalem Bypass und Kreislaufstillstand herausgefunden, dass der Applikationszeitpunkt der Steroide eine wichtige Rolle bei der Suppression der Immunantwort spielt (107). Sie fanden heraus, dass eine Steroidgabe in die Prime-Flüssigkeit der Herz-Lungen-Maschine keine signifikant besseren Ergebnisse in der Hemmung der Immunantwort im Vergleich zu der Gruppe ohne Steroide bringt, während eine systemische Steroidapplikation 4 Stunden vor dem operativen Eingriff eine systemische Manifestation der Immunantwort verhindert. Ähnliche Ergebnisse hatten Lodge et al. (53) bei Steroidapplikation 8 Stunden vor der Operation. Eine intraoperative Gabe haben Lodge et al. zwar als vorteilhaft bezeichnet, ist aber weniger effektiv.

Langley et al. (114) untersuchten in einem ähnlichen Modell den Einfluss der Vorbehandlung mit Steroiden in gleicher Dosierung auf die zerebrale Perfusion und Oxygenation. Dabei fanden sie eine verbesserte regionale und globale Perfusion bei den vorbehandelten Tieren. Aufgrund dieser Ergebnisse schlussfolgerten sie einen protektiven Effekt, ohne jedoch eine histologische Untersuchung des Gehirns durchzuführen. Die Steroidapplikation erfolgte nur intramuskulär, die Messung des Blutflusses erfolgte durch radioaktiv markierte Mikrosphären. Die Steroidapplikation erfolgte 8 Stunden und 2 Stunden vor Anästhesiebeginn.

Eine intrathekale Gabe von Methylprednisolon bedeutet die Umgehung der Blut-Hirnschranke und damit eine bessere Wirkungsentfaltung und Bioverfügbarkeit auf zerebraler Ebene. Dies ist bei der systemischen Gabe nicht der Fall. Systemisch verabreichte Steroide werden an spezifischen Steroidrezeptoren auf der Endothelseite der Blut-Hirnschranke gebunden und können nur in geringen Mengen die Blut-Hirnschranke passieren (18). Diese limitiert die Steroidkonzentration und kann das Erreichen einer ausreichenden Steroidkonzentration auf zerebraler Ebene verhindern.

4.2.7. Morphologische Veränderungen im ZNS, Nekrose

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die systemische Steroidapplikation die neuronale Schädigung nicht verbessern konnte. Dagegen konnte durch die intrathekale Steroidapplikation eine signifikante Reduktion der neuronalen Nekrose beobachtet werden. Für die Überprüfung eines möglichen protektiven Effektes im ZNS war es notwendig, die zerebralen Veränderungen nach CPB und DHCA zu untersuchen. Die Kontrollgruppe zeigte nach 120 Minuten Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie ein Schädigungsmuster aus deutlichen und quantifizierbaren morphologischen Veränderungen im Sinne neuronaler Nekrose im ZNS. Das Erreichen einer postoperativen Überlebenszeit von 6 Stunden war bei dieser experimentellen Studie wichtig. In einer tierexperimentellen Studie zeigte sich ein Maximum der sichtbaren morphologischen Veränderungen nach 6 postoperativen Stunden (115).

Die Ergebnisse unserer Studie zeigten, dass ein verlängerter Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie zur Entstehung von neuronaler Nekrose führt. Diese neuronale Nekrose wird durch Störung der Mitochondrienfunktion mit exzessivem Kalziumeinstrom und Toxizität durch verschiedene Metaboliten, wie z.B. Glutamat, hervorgerufen. Es kommt dadurch zu einer Reduktion der notwendigen zellulären Energieproduktion mit Energiemangel (116, 117). Eine Hyperglykämie kann auch die Entstehung neuronaler Nekrose begünstigen (118). Trotz der neuroprotektiven Wirkung der Hypothermie kommt es bei längeren Kreislaufstillstandphasen mit mehr als 60 Minuten zu einer möglichen Limitation der protektiven Wirkung.

Die Vorbehandlung mit Methylprednisolon 4-6 Stunden präoperativ sollte eine mögliche molekulare Induktion spezifischer Steroid-induzierter Mechanismen hervorrufen und damit vor dem eigentlichen ischämischen Ereignis eine verbesserte Zellprotektion bewirken. Verglichen mit der intravenösen Gabe ist das Erreichen höherer Konzentration durch die intrathekale Gabe wahrscheinlich (119). Ein Übertritt von Methylprednisolon aus dem Liquor in das Hirngewebe wurde in der Literatur dokumentiert (120). Bei systemischer Applikation erreicht die Konzentration von Methylprednisolon im Liquor nur 1/10 der Serumkonzentration (121). Diese Unterschiede in der lokalen Verteilung im ZNS, abhängig vom Applikationsort, können die Ergebnisse unserer Studie mit signifikanter Reduktion neuronaler Nekrose und erhöhten Perfusionswerten bei der intrathekalen Applikation im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur mit MP systemisch behandelten Gruppe erklären.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Einleitung: Der Einsatz des kardiopulmonalen Bypasses mit Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie ist bei der Korrektur angeborener Herzfehler ein wichtiges Hilfsmittel geworden. Dieser Einsatz birgt viele Komplikationen, wie z.B. die Entwicklung des akuten Nierenversagens sowie die Beeinträchtigung der neurologischen und psychomotorischen Entwicklung der operierten Kinder. Wir untersuchten die Perfusionsveränderungen in der Niere und in anderen peripheren Organen sowie die Perfusionsveränderung und Zellschädigung im Gehirn nach kardiopulmonalem Bypass (CPB) mit Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie (DHCA) in einem neonatalen Tiermodell. Zusätzlich evaluierten wir den Einfluss von Steroiden (systemisch und intrathekal appliziert) auf die Veränderung des regionalen Blutflusses auf zerebraler Ebene.

Material und Methodik: 24 neugeborene Ferkel (Alter: 5-10 Tage, Gewicht: $2,2 \pm 0,5$ kg) wurden mittels eines CPB bei $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ rektaler Temperatur einem totalen Kreislaufstillstand (DHCA) von 120 Min. ausgesetzt. Nach einer Reperfusionphase von ca. 50 Min. wurden die Tiere vom CPB entwöhnt und 6 Stunden überwacht. 12 Tiere ohne Intervention dienten als Kontrollgruppe. 7 weiteren Tieren wurde Methylprednisolon (MP) 4 bis 6 Stunden präoperativ injiziert (MPsys-Gruppe). Bei 5 weiteren Tieren erfolgte die MP-Gabe in den intrathekalen Raum (MPintra-Gruppe). Die Messung des regionalen Blutflusses erfolgte mit fluoreszierenden Mikrosphären. Die Mikrosphäreninjektion erfolgte zu 4 Zeitpunkten: vor Beginn der Kühlungsphase, kurz vor dem Kreislaufstillstand, am Ende der Reperfusionphase sowie 4 Stunden nach der Reperfusionphase. Am Ende der Operation wurden Proben aus Frontallappen, Parietallappen, Okzipitallappen, Medulla oblongata und Basalganglien entnommen. Der Kontrollgruppe wurden zusätzlich Proben aus Myokard, Niere, Leber, Milz und Skelettmuskel entnommen. Weiterhin wurden Proben aus Gyrus cinguli und Hippocampus zur histologischen Untersuchung entnommen. Nach Aufbereitung der Proben und Extraktion der Mikrosphären erfolgte die Ermittlung der Extinktionswerte der verschiedenen Mikrosphärenfarben. Daraus wurde der regionale Blutfluss zum Zeitpunkt der Mikrosphäreninjektion berechnet.

Ergebnisse: *1. Kontrollgruppe:* Periphere Organe: Alle untersuchten Organe, bis auf Muskelgewebe ($p > 0,05$), zeigten eine signifikante Abnahme der Perfusion ($p \leq 0,05$) in tiefer Hypothermie. Die Niere verzeichnete die größte Abnahme ($p = 0,01$) der

Gewebeperfusion in tiefer Hypothermie. Am Ende der Reperfusionphase zeigte sich in allen Organen ein Anstieg des regionalen Blutflusses im Vergleich zur Kühlungsphase, diese Werte blieben jedoch unterhalb der Ausgangswerte. *ZNS*: In allen untersuchten Gehirnarealen, bis auf die Medulla oblongata, zeigte sich eine signifikante Abnahme ($p < 0,05$) der Perfusion in tiefer Hypothermie sowie ein signifikanter Anstieg der Perfusion in der Reperfusionphase. In der morphologischen Auswertung konnte eine deutliche Neuronenzellschädigung sowohl im Hippocampus (74,5% der Neuronen) als auch im Gyrus cinguli (62%) nach DHCA gesehen werden. Die neuronale Schädigung und die regionale Perfusion im Gehirn zeigten eine negative Korrelation: je niedriger die Perfusion war, desto höher war die Zellschädigung.

2. Steroidgruppen: Der Einfluss der Vorbehandlung mit MP auf die regionale Hirnperfusion und die Verminderung der Zellschädigung wurde untersucht. Der Vergleich der Blutflusswerte in den Gehirnarealen aller drei Gruppen erfolgte am Ende der Reperfusionphase. Die intrathekale MP-Applikation führte zu signifikant höheren Perfusionswerten in allen Gehirnarealen im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. Auch histologisch zeigte sich eine signifikante Verbesserung des Schädigungsmusters nur in der Intrathekalgruppe im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe zeigte die systemische MP-Applikation keinen wesentlichen Einfluss sowohl auf den regionalen Blutfluss als auch auf die Zellschädigung im Gehirn, im Hippocampus nahm die Zahl der nekrotisch veränderten Zellen in dieser Gruppe sogar zu.

Schlussfolgerung: Die Niere war am deutlichsten von der Abnahme der Perfusion in tiefer Hypothermie betroffen, auch nach Reperfusion stieg die Perfusion der Niere nicht genügend an. Dies könnte eine mögliche Ursache für das postoperativ häufig aufgetretene Nierenversagen sein.

Die klinisch häufig eingesetzte systemische Vorbehandlung mit Methylprednisolon zeigte keinen neuroprotektiven Effekt und sollte kritisch überdacht werden. Die Ergebnisse in dieser Arbeit unterstreichen die Notwendigkeit der Entwicklung weiterer neuroprotektiver Strategien zur Verbesserung der regionalen Hirnperfusion und Vermeidung zerebraler Hirnzellschädigung nach chirurgischen Eingriffen unter tiefhypothermen Temperaturen mit Kreislaufstillstand. Weitere präventive Maßnahmen vor und während der herzchirurgischen Eingriffe im frühen Kindesalter sollten detailliert klinisch und experimentell untersucht werden.

REFERENZEN

1. LeGallois JJC, Nancrede NC, Nancrede JC. Trans. experiments of the principle of Life. Philadelphia: MThomas; 1813.
2. Castaneda AR, Jonas RA, Mayer JE, Hanley FL (eds). Cardiac Surgery of the Neonate and Infant. Philadelphia, PA, USA: W. B. Saunders, 1994
3. Elliott MJ, Jonas RA (eds.). Cardiopulmonary Bypass in Neonates, Infants and Young Children. Newton, Boston, Oxford, Melbourne, Singapore, Toronto: Butterworth-Heinemann, 1994
4. Jacobs ML, Norwood WI (eds.). Pediatric Cardiac Surgery: Current Issues. Newton, Boston, Oxford, Melbourne, Singapore, Toronto: Butterworth-Heinemann, 1992
5. Kirklin JW, Barratt-Boyes BG. Hypothermia, circulatory arrest, and cardiopulmonary bypass. In: Barratt-Boyes BG, ed. Cardiac Surgery. New York: John Wiley and Sons, Inc., 1986; 30-75
6. Du Plessis AJ. Mechanisms of brain injury during infant cardiac surgery. *Semin Pediatr Neurol.*1999;6:32-47.
7. Ashraf S, Bhattacharya K, Tian Y, Watterson K. Cytokine and S100B levels in paediatric patients undergoing corrective cardiac surgery with or without total circulatory arrest. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1999;16:32-7
8. Jonas RA, Newburger JW, Volpe JJ (eds.). Brain Injury and Pediatric Cardiac Surgery. Newton, Boston, Oxford, Melbourne, Singapore, Toronto: Butterworth Heinemann, 1996
9. Del Nido PJ. Developmental and neurologic outcomes late after neonatal corrective surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 124:425-427
10. Du Plessis AJ. Neurologic complications of cardiac disease in the newborn. *Clin Perinatol*1997; 24:807-826
11. Du Plessis AJ. Cerebral hemodynamics and metabolism during infant cardiac surgery. Mechanisms of injury and strategies for protection. *J Child Neurol* 1997; 12:285-300 35
12. Conlon PJ, Stafford-Smith M, White W D. Acute renal failure following cardiac surgery. *Nephrol Dial Transplant* (1999) 14: 1158-1162.
13. Zanardo G, Michielon P et al. (1994). Acute renal failure in the patient undergoing cardiac operation. Prevalence, mortality rate and main risk factors. *JThoracic Cardiovasc Surg*, 107: 1489-1495

14. Clancy RR, McGaurn SA, Wernovsky G. et al. (2000). "Preoperative risk-of-death prediction model in heart surgery with deep hypothermic circulatory arrest in the neonate." *J Thorac Cardiovasc Surg*, 119: 347-357)
15. Asfour B, Bruker B, Kehl HG et al.: (1996). "Renal insufficiency in neonates after cardiac surgery." *Clin Nephrol*, 46: 59-63.
16. Boyle EM Jr, Canty TG Jr, Morgan EN, Yun W, Pohlman TH, Verrier ED. Treating myocardial ischemia-reperfusion injury by targeting endothelial cell transcription. *Ann Thorac Surg*. 1999 Nov;68(5):1949-53.
17. Boldt J, von Bormann B, Kling D, Borner U, Mulch J, Hempelmann G [Colloid osmotic pressure and extravascular lung water following extracorporeal circulation]. *Herz*. 10 (1985) 366-375.
18. Simard M, Couldwell WT, Zhang W, Song H, Liu S, Cotrina ML, Goldman S, Nedergaard M. Glucocorticoids-potent modulators of astrocytic calcium signaling. *Glia*. 1999;28:1-12.
19. Schad H. Physiologie der Lymphbildung und der Lymphströmung. *Pneumonol. (1996)* 25:213-221
20. Foreman KE, Vaporciyan AA, Bonish BK, Jones ML et al. C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. *J Clin Invest*. 94 (1994) 1147-1155.
21. Abdul-Khaliq H, Kanaan M, Schubert S et al. Untersuchungen zur Entwicklung neuroprotektiver Strategien bei operativer Behandlung angeborener Herzfehler.
22. Moore FD Jr, Warner KG, Assousa S, Valeri CR, Khuri SF. The effects of complement activation during cardiopulmonary bypass. Attenuation by hypothermia, heparin, and hemodilution. *Ann Surg*. 1988;208:95-103.
23. Le Deist F, Menasche P, Kucharski C, Bel A, Piwnica A, Bloch G. Hypothermia during cardiopulmonary bypass delays but does not prevent neutrophil-endothelial cell adhesion. A clinical study. *Circulation*. 1995 Nov 1;92(9 Suppl):II354-8.
24. Bastiaanse J, Slaaf DW, Oude Egbrink MG. Effect of hypothermia and HTK on the microcirculation in the rat cremaster muscle after ischemia. *Clin Sci (Lond)*. 2004 Dec 21.
25. Greeley WJ, Kern FH, Ungerleider RM, Boyd JLD, Quill T, Smith LR, Baldwin Reves JG. The effect of hypothermic cardiopulmonary bypass and total circulatory arrest on cerebral metabolism in neonates, infants, and children. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1991;101:783-94.
26. Treasure T. The safe duration of total circulatory arrest with profound hypothermia. *Ann R Coll Surg Engl*. 1984;66:235-40.
27. Bokesch PM, Marchand J, Seirafi PA, Deiss JM, et al. Immediate-early gene expression in ovine brain after cardiopulmonary bypass and hypothermic circulatory arrest. *Anesthesiology*. 1996;85:1439-46

28. Cook DJ, Orszulak TA, Daly RC. Minimum hematocrit at differing cardiopulmonary bypass temperatures in dogs. *Circulation*. 1998;98:II170-4; discussion II175
29. Langley SM, Chai PJ, Jagers JJ, Ungerleider RM. Preoperative high dose methylprednisolone attenuates the cerebral response to deep hypothermic circulatory arrest. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2000;17:279-86
30. Cook DJ, Orszulak TA, Daly RC, MacVeigh I. Minimum hematocrit for normothermic cardio-pulmonary bypass in dogs. *Circulation*. 1997;96:II-200-4.
31. Shin'oka T, Shum-Tim D, Jonas RA, et al. Higher he-matocrit improves cerebral outcome after deep hypothermic circulatory arrest. *J Thorac Cardio-vasc Surg*. 1996;112:1610-20; discussion 1620-1.
32. Taylor KM. Brain damage during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1998a; 65:S20-6; discussion S7-8.
33. Hindman BJ, Dexter F, Enomoto S, Subieta A. Recovery of evoked potential amplitude after cerebral arterial air embolism in the rabbit a comparison of the effect of cardiopulmonary bypass with normal circulation; *Anesthesiology*; 1998; 88; 696-707.
34. Rosenberg RD (1983):Biochemische Grundlagen und Funktion des AT III als Serin Protease Inhibitor und Heparin Cofaktor. In: Wenzel, E., Neuhaus, K., Rosenberg, R. D.: Antithrombin III, Biochemie, Funktion, Nachweis und klinische Bedeutung; *Ann.Univ. Sarav. Med. Suppl.* 3, 11-13.
35. Travis J, Salvesen G (1983a): Control of coagulation and fibrinolysis by plasma proteinase inhibitors. *Behring Inst. Mitt.* 73, 56-65.
36. Gott VL, Whiffen JD, Dutton RC. (1963): Heparin bonding on colloidal graphite surfaces. *Science* 142, 1297-1298.
37. Hamada Y, Kawachi K, Nakata T, Kohtani T. Antiinflammatory Effect of Heparin-Coated Circuits with Leukocyte-Depleting Filters in Coronary Bypass: *Artificial Organs*, December 2001, vol. 25, no. 12, pp. 1004-1008(5)
38. De Vroege R, van Oeveren W, van Klarenbosch J. The Impact of Heparin-Coated Cardiopulmonary Bypass Circuits on Pulmonary Function and the Release of Inflammatory Mediators. *Cardiovascular Anesthesia*.
39. Deeb GM, Jenkins E, Bolling SF. Retrograde cerebral perfusion during hypothermic circulatory arrest reduces neurologic morbidity; *J Thorac Cardiovasc Surg*; 1995; 109; 259-68.
40. Coselli JS; Retrograde cerebral perfusion is an effective means of neural support during deep hypothermic circulatory arrest; *Ann Thorac Surg*; 1997; 64; 908-12.

41. Ye J, Ryner LN, Kozlowski P. cerebral perfusion results in flow distribution abnormalities and neuronal damage. A magnetic resonance imaging and histopathological study in pigs. *Circulation*. 1998 Nov 10;98(19 Suppl):II313-8.
42. Tassani P, Richter JA, Barankay A, Braun SL, et al. Does high-dose methylprednisolone in aprotinin-treated patients attenuate the systemic inflammatory response during coronary artery bypass grafting procedures. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 1999 Apr; 13(2): 165-72.
43. Abdul-Khaliq H, Kanaan M, Schubert S, Stoltenburg-Didinger G. Neuroprotective effects of pre-treatment with systemic steroids in a neonatal piglet model of cardiopulmonary bypass with deep hypothermic circulatory arrest. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2000 Dec; 18(6): 729-31.
44. Reul JM, de Kloet ER. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117:2505-2511.
45. Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)*. 1998;94:557-72.
46. Hall ED. Neuroprotective actions of glucocorticoid and nonglucocorticoid steroids in acute neuronal injury. *Cell Mol Neurobiol*. 1993;13:415-32.
47. Liu D, McAdoo DJ. Methylprednisolone reduces excitatory amino acid release following experimental spinal cord injury. *Brain Res*. 1993;609:293-7.
48. Cronstein BN, Kimmel SC, Levin RI, Martiniuk F, Weissmann G. Corticosteroids are transcriptional regulators of acute inflammation. *Trans Assoc Am Physicians*. 1992;105:25-35.
49. Tabardel Y, Duchateau J, Schmartz D, Marecaux G, Shahla M, Barvais L, Leclerc JL, Vincent JL. Corticosteroids increase blood interleukin-10 levels during cardiopulmonary bypass in men. *Surgery*. 1996;119:76-80.
50. Buttini M, Mir A, Appel K, Wiederhold KH, Limonta S, Gebicke-Haerter PJ, Boddeke HW. Lipopolysaccharide induces expression of tumour necrosis factor alpha in rat brain: inhibition by methylprednisolone and by rolipram. *Br J Pharmacol*. 1997;122:1483-9.
51. Jamshidi J, Yoshimine T, Ushio Y, Hayakawa T. Effects of glucocorticoid and chemotherapy on the peritumoral edema and astrocytic reaction in experimental brain tumor. *J Neurooncol*. 1992;12:197-204.
52. Marzatico F, Gaetani P, Buratti E, Messina AL, Ferlenga P, Rodriguez y Baena R. Effects of high-dose methylprednisolone on Na⁺-K⁺-ATPase and lipid peroxidation after experimental subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurol Scand*. 1990;82:263-70.
53. Lodge AJ, Chai PJ, Daggett CW, Ungerleider RM, Jaggars J. Methylprednisolone reduces the inflammatory response to cardiopulmonary bypass in neonatal piglets: timing of dose is important. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1999 Mar;117(3):515-22.

54. Boscoe MJ, Yewdall VM, Thompson MA, Cameron JS. Complement activation during cardiopulmonary bypass: quantitative study of effects of methylprednisolone and pulsatile flow. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1983;287:1747-50.
55. Andersen LW, Baek L, Thomsen BS, Rasmussen JP. Effect of methylprednisolone on endotoxemia and complement activation during cardiac surgery. *J Cardiothorac Anesth*. 1989;3:544-9.
56. Swan HJ, Ganz W, Forrester J, Marcus H, Diamond G, Chonette D. Catheterization of the heart in man with use of a flow-directed balloon tipped catheter. *N Engl J Med*; 283: 447-51, 1970
57. Gans JH, Wakefield D, Kilsheimer G. In vitro distribution of inulin and PAH in dog and sheep kidney cortex and medullary slices. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1966 Jun;122(2):624-6.
58. Ofjord ES, Clausen G, Aukland K. Skimming of microspheres in vitro: implications for measurement of intrarenal blood flow. *Am J Physiol*. 241: H342-7, 1981.
59. Ofjord ES, Clausen G. Intrarenal flow of microspheres and red blood cells: skimming in slit and tube models. *Am J Physiol*. 245: H429-36, 1983.
60. Archie JP, Fixler DE, Ulliyott DJ et al. Measurement of cardiac output with and organ trapping of radioactive microspheres. *J. Appl. Physiol*. 35: 148-154, 1973.
61. Smits GJ, Roman RJ, Lombard JH. Evaluation of laser-Doppler flowmetry as a measure of tissue blood flow. *J. Appl. Physiol*. 61: 666-672, 1986
62. Neutze J.M., Wyler F., Rudolph A.M. Use of radioactive microspheres to assess distribution of cardiac output in rabbits. *Am. J. Physiol*. 215: 486-495, 1968
63. Sapirstein LA. Fractionation of the cardiac output of rats with isotopic potassium. *Circ. Res*. 4: 689, 1956
64. Meschia G., Cotter JR, Makowski EL, Baron DH. Simultaneous measurements of uterine and umbilical blood flows and oxygen uptake. *Quart. J. Exp. Physiol*52: 1, 1967.
65. Rudolph AM, Heymann MA. The circulation of the fetus in utero. Methods for studying distribution of blood flow, cardiac output and organ blood flow. *Circ Res*. 21:163-84, 1967.
66. Glenn RW, Bernard S, Brinkley M. Validation of fluorescent-labeled microspheres for measurement of regional organ perfusion. *J Appl Physiol*. 74:2585-97, 1993.
67. Prinzen FW, Glenn RW. Developments in non-radioactive microsphere techniques for blood flow measurement. *Cardiovasc Res*. 28:1467-75, 1994.

68. Van Oosterhout MF, Willigers HM, Reneman RS, Prinzen FW. Fluorescent microspheres to measure organ perfusion: validation of a simplified sample processing technique. *Am J Physiol.* 269:H725-33, 1995.
69. Van Oosterhout MF, Prinzen FW. The fluorescent microsphere method for determination of organ blood flow. *FASEB J.* 8:A854, 1994.
70. Glenny RW, Bernard S, Brinkly M. Validation of fluorescent-labeled microspheres for measurement of regional organ perfusion. *J. Appl. Physiol.* 74: 2585-2597, 1993.
71. Kaihara S, Van Heerden PD, Migita T, Wagner HN. Measurement of distribution of cardiac output. *J. Appl. Physiol.* 25: 696-700, 1968
72. Wagner HN, Rhodes BA, Sasaki Y, Ryan JP. Studies of the circulation with radioactive microspheres. *Invest. Radiol.* 4: 374-386, 1969
73. Cremer J, Martin M, Redl H, Bahrami S et al. Systemic Inflammatory Response Syndrome after cardiac operations. *Ann Thorac Surg* 1996; 61: 1714-1720
74. Butler J, Rocker GM, Westaby S. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1993; 55: 552-559
75. Chenoweth DE, Cooper SW, Hugli TE, Stewart RW, Blackstone EH, Kirklin JW. Complement activation during cardiopulmonary bypass. *N Engl J Med* 1981; 304: 497-503
76. Royston D. Systemic inflammatory responses to surgery with cardiopulmonary bypass. *Perfusion* 1996; 11: 177-189.
77. Oudemans-van Straaten HM, Jansen PGM, te Felthuis H, Beenackers ICM et al. Increased oxygen consumption after cardiac surgery is associated with the inflammatory response to endotoxemia. *Intensive Care Med* 1996; 22: 294-300.
78. Hensley FA, Martin DE: *A practical Approach to Cardiac Anaesthesia.* 1995.
79. Boyle EM Jr, Pohlman TH, Cornejo CJ, Verrier ED. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: ischemia-reperfusion. *Ann Thorac Surg.* 1996 Dec;62(6):1868-75.
80. Worthen GS, Schwab B. Mechanics of stimulated neutrophils. *Science* 1989; 245: 183-6.
81. Smith EE, Naftel DC, Blackstone EH, Kirklin JW. Microvascular permeability after cardiopulmonary bypass. An experimental study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1987 Aug;94(2):225-33.
82. Norwood WI, Norwood CR. Influence of hypothermia on intracellular pH during anoxia. *Am J Physiol* 1982; 243: C62-C65
83. Schmitt KR, Kern C, Berger F, Ullrich O, Hendrix S, Abdul-Khaliq H. Methylprednisolone attenuates hypothermia- and rewarming-induced cytotoxicity and

IL-6 release in isolated primary astrocytes, neurons and BV-2 microglia cells. *Neurosci Lett*. 2006 Sep 1;404(3):309-14. Epub 2006 Jul 24.

84. Mora CT. *Cardiopulmonary Bypass. Principles and techniques of extracorporeal circulation*. Springer-Verlag, New York, 1995; p 46

85. Huddy SP, Joyce WP, Pepper JR. Gastrointestinal complications in 4473 patients who underwent cardiopulmonary bypass surgery. *Br J Surg* 1991; 78: 293-96.

86. Tveita T, Ytrehus K, Skandfer M. Changes in blood flow distribution and capillary function after deep hypothermia in rat. *Can J Physiol Pharmacol*. 1996 Apr;74(4):376.

87. Rudy LW, Boucher JK, Edmunds LH. The effect of deep hypothermia and circulatory arrest on the distribution of systemic blood flow in rhesus monkeys. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1972; 64: 706-712.

88. Lazenby WD, Ko W, Zelano JA, Lebowitz N, Shin YT, Isom W, Krieger KH. Effects of temperature and flow rate on regional blood flow and metabolism during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1992; 53: 957-964.

89. Su JY, Amory DW, Sands MP, Mohri H. Effects of circulatory arrest and rewarming on regional blood flow during surface-induced hypothermia. *Am Heart J*. 1980 Sep;100(3):332-40.

90. Hampton WW, Townsend MC, Schirmer WJ, Haybron DM, Fry DE. Effective hepatic blood flow during cardiopulmonary bypass. *Arch Surg* 1989; 124: 458-459

91. Cooper WA, Duarte IG, Thourani VH, Nakamura M et al. Hypothermic circulatory arrest causes multisystem vascular endothelial dysfunction and apoptosis. *Ann Thorac Surg*. 2000 Mar;69(3):696-702; discussion 703.

92. Seghaye MC, Grabitz RG, Duchateau J, Busse S. Inflammatory reaction and capillary leak syndrome related to cardiopulmonary bypass in neonates undergoing cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1996 Sep;112(3):687-97.

93. Chertow GM, Levy EM et al. Independent association between acute renal failure and mortality following cardiac surgery. *Am J Med* 1998, 104: 343-348.

94. Dittrich, S, Kurschat, K, Dahnert, I. Renal function after cardiopulmonary bypass surgery in cyanotic congenital heart disease. *Int J Cardiol* 2000, 73: 173-179.

95. Suen WS, Mok CK, Chiu SW, Cheung KL, et al. Risk factors for development of acute renal failure (ARF) requiring dialysis in patients undergoing cardiac surgery. *Angiology*. 1998 Oct;49(10):789-800.

96. Frost L, Pedersen RS, Lund O et al. Prognosis and risk factors in acute, dialysis-requiring renal failure after open-heart surgery. *Scand J Thorac Cardiovasc Surg*, (1991).25: 161-166

97. Leurs PB, Mulder AW, Fiers HA et al.. Acute renal failure after cardiovascular surgery. Current concepts in pathophysiology, prevention and treatment. *Eur Heart J*, (1989)10 Suppl H: 38-42.
98. Playe E, Journois D, Safran D. (1997). The failing heart, the post-bypass heart and the hemofiltering artificial kidney. *Blood Purif*, 15: 382-387.
99. Baumgartner WA, Walinsky PL, Brock MV, Doty JR, Redmond JM, Blue ME, Johnston MV. Assessing the impact of cerebral injury after cardiac surgery: will determining the mechanism reduce this injury?. *Ann Thorac Surg*. 1999 Jun;67(6):1871-3; discussion 1891-4.
100. Sakamoto T, Zurakowski D, Duebener LF, et al. Combination of alpha-stat strategy and hemodilution exacerbates neurologic injury in a survival piglet model with deep hypothermic circulatory arrest. *Ann Thorac Surg*. 2002 Jan;73(1):180-9; discussion 189-90.
101. Undar A, Vaughn WK, Calhoun JH. The effects of cardiopulmonary bypass and deep hypothermic circulatory arrest on blood viscoelasticity and cerebral blood flow in a neonatal piglet model. *Perfusion*, 2000 Mar; 15(2): 121-8.
102. Okubo K, Itoh S, Isobe K, Kusaka T, Nagano K, Kondo M, Onishi S. Cerebral metabolism and regional cerebral blood flow during moderate systemic cooling in newborn piglets. *Pediatr Int*. 2001 Oct; 43(5): 496-501.
103. Langley SM, Chai PJ, Tsui SS, Jagers JJ, Ungerleider RM. The effects of a leukocyte-depleting filter on cerebral and renal recovery after deep hypothermic circulatory arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000 Jun;119(6):1262-9.
104. Palmer C, Vannucci RC, Christensen MA, Brucklacher RM. Regional cerebral blood flow and glucose utilization during hypothermia in newborn dogs. *Anesthesiology*. 1989 Nov; 71(5): 730-7.
105. Yager JY, Christensen MA, Vannucci RC. Regional cerebral blood flow following hypothermic circulatory arrest in newborn dogs *Brain Res*. 1993 Aug 20; 620(1): 122-6.
106. Greeley WJ, Ungerleider RM, Smith LR, Reves JG. The effects of deep hypothermic cardiopulmonary bypass and total circulatory arrest on cerebral blood flow in infants and children. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1989 May;97(5):737-45.
107. Shum-Tim D, Tchervenkov CI, Jamal AM, Nimeh T, et al. Systemic steroid pretreatment improves cerebral protection after circulatory arrest. *Ann Thorac Surg*. 2001 Nov; 72(5): 1465-71.
108. Uhler TA, Frim DM, Pakzaban P, Isacson O. The effects of megadose methylprednisolone and U-78517F on toxicity mediated by glutamate receptors in the rat neostriatum. *Neurosurgery*. 1994;34:122-7; discussion 127-8.
109. Joels M, Vreugdenhil E. Corticosteroids in the brain. Cellular and molecular actions. *Mol Neuro-biol*. 1998;17:87-108.

110. Wan S, LeClerc JL, Schmartz D, Barvais L et al. Hepatic release of interleukin-10 during cardiopulmonary bypass in steroid-pretreated patients. *Am Heart J*. 1997;133:335-9.
111. Schurr UP, Zund G, Hoerstrup SP, Grunenfelder J et al. Preoperative administration of steroids: influence on adhesion molecules and cytokines after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*. 2001;72:1316-20.
112. Fillinger MP, Rassias AJ, Guyre PM, Sanders JH et al. Glucocorticoid effects on the inflammatory and clinical responses to cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2002 Apr; 16(2): 163-9.
113. Schubert S, Kanaan M, Wehsack A, Huebler M, Redlin M, Lange PE, Abdul-Khaliq H. Large-dose pretreatment with methylprednisolone fails to attenuate neuronal injury after deep hypothermic circulatory arrest in a neonatal piglet model. *Anesth Analg*. 2005 Nov;101(5):1311-8.
114. Langley SM, Chai PJ, Jaggars JJ, Ungerleider RM; Preoperative high dose methylprednisolone attenuates the cerebral response to deep hypothermic circulatory arrest; *Eur J Cardiothorac Surg*; 2000; 17; 279-86.
115. Kurth CD, Priestley M, Golden J, McCann J, Raghupathi R. Regional patterns of neuronal death after deep hypothermic circulatory arrest in newborn pigs. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1999;118:1068-77.
116. Mc Conkey D. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett*. 1998;99:157-168.
117. Mujsce DJ, Towfighi J, Yager JY, Vannucci RC. Neuropathologic aspects of hypothermic circulatory arrest in newborn dogs. *Acta Neuropathol*. 1993;85:190-8.
118. Li PA, Kristian T, Shamloo M, Siesjo K. Effects of preischemic hyperglycemia on brain damage incurred by rats subjected to 2.5 or 5 minutes of for brain ischemia. *Stroke*. 1996;27:1592-601; discussion 1601-2.
119. Koszdin KL, Shen DD, Bernards CM. Spinal cord bioavailability of methylprednisolone after intravenous and intrathecal administration: the role of P-glycoprotein. *Anesthesiology*. 2000;92:156-63.
120. Lehrer GM, Maker HS, Weisbarth S. Brain uptake of methylprednisolone acetate from cerebrospinal fluid and systemic sites. *Arch. Neurol. (chic.)*. 1973;28:324-328.
121. Uete T, Nishimura S, Ohya H. Corticosteroid levels in blood and cerebrospinal fluid in various diseases. *J. clin. Endocr*. 1978;30:208-214.
122. Moelvig J, Baek L, Christensen P, Manogue KR et al. Endotoxin stimulated human monocyte secretion of interleukin-1, tumour necrosis factor alpha and prostaglandin E2 show stable interindividual differences. *Scand J Immunol* 1988; 27: 705-716

LEBENS LAUF

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

PUBLIKATIONEN/KURZFASSUNGEN

M. Kanaan, S. Schubert, A. Wehsack, B. Schmitt, W. Boettcher, P. E. Lange, F. Berger, H. Abdul-Khaliq. Renale und Organperfusion während und nach hypothermem Kreislaufstillstand in einem neonatalen Tiermodell. 38. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie (DGPK), Neu-Ulm 2006, *Kongressband*.

Schubert S, Abdul-Khaliq H, **Kanaan M**, Stoltenburg-Didinger G, Troitzsch D, Wehsack A, Jäckel B, Böttcher W, Lange PE. Auswirkungen der Vorbehandlung mit Steroiden auf die zerebrale Perfusion und die Hirnmorphologie nach Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie – Eine experimentelle Untersuchung. 50. Jahrestagung der Norddeutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde, Potsdam 2001, *Kongressband*. **(Ausgezeichnet mit dem 1 Posterpreis)**

M. Kanaan, S. Schubert, A. Wehsack, W. Böttcher, P. E. Lange, R. Hetzer, F. Berger, H. Abdul-Khaliq. Effekt von Methylprednisolon auf die regionale Hirnperfusion nach kardiopulmonalem Bypass und Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie. 39. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie (DGPK), Neu-Ulm 2007, *Kongressband*.

M. Kanaan, B. Stiller, M. Hübler, V. Alexi-Meskishvili, N. Nagdyman, R. Hetzer, F. Berger. Intensivmedizinische Risikofaktoren nach Operation mit Herzlungenmaschine bei älteren Erwachsenen mit zyanotischem angeborenem Herzfehler. 39. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie (DGPK), Neu-Ulm 2007, *Kongressband*.

DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei meinen Eltern, meinem Bruder Malek und dem Rest der Familie für die grenzenlose Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater Herrn PD Dr. Hashim Abdul-Khaliq, der mir jederzeit seine volle Unterstützung entgegenbrachte. Durch seinen ständigen Einsatz und seine grenzenlose Hilfe konnte er meine Begeisterung für dieses nicht ganz unkomplizierte Unternehmen aufrechterhalten.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Peter E. Lange, der mir die Möglichkeit dieser Promotion gegeben hat. Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Felix Berger für seine Unterstützung.

Ich bedanke mich bei allen Ärzten und Mitarbeitern des Herzzentrums für die volle Unterstützung, besonders bei Dr. Stephan Schubert, Dr. Mohammad Abdel-Rahman sowie bei Dr. Anke Wehsack, Dr. Boris Schmitt und Dr. Dirk Troitzsch.

Diese Arbeit ist meinem kleinen Neffen ALI gewidmet.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich, Majed Kanaan, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Veränderung des regionalen Blutflusses und Effekt von Methylprednisolon auf den regionalen Blutfluss im Gehirn nach kardiopulmonalem Bypass und Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Majed Kanaan