

Klinik für Anaesthesiologie  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ. - Prof. Dr. E. Kochs)

**Beeinflusst die perioperative Gabe von Moxifloxazin die  
zerebrale Inflammation und das neurologische Outcome  
24 Stunden nach extrakorporaler Zirkulation mit tief  
hypothermem Kreislaufstillstand an der Ratte?**

Johannes Carl Stückle

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Medizin**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation:	1. Univ.-Prof. Dr. E. Kochs
	2. Priv.-Doz. Dr. K. J. Wagner

Die Dissertation wurde am 30.11.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 20.07.2011 angenommen.

Meinem Großvater

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>5</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Extrakorporale Zirkulation (EKZ) .....</b>	<b>6</b>
1.1.1 Anwendung der EKZ .....	6
1.1.2 Komplikationen der EKZ und ihre Auswirkungen .....	7
1.1.3 Ätiologie und Pathogenese neurokognitiver Defizite nach EKZ .....	7
1.1.4 EKZ mit tief hypothermem Kreislaufstillstand.....	11
<b>1.2 Inflammation .....</b>	<b>14</b>
<b>1.3 Moxifloxazin .....</b>	<b>23</b>
<b>2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....</b>	<b>26</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODIK .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Versuchstiere, Haltungsbedingungen und Akklimation.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2 Tiermodell.....</b>	<b>27</b>
<b>3.3 Versuchsdurchführung.....</b>	<b>29</b>
<b>3.4 Dekapitation, Entnahme und Präparation des Gehirns.....</b>	<b>35</b>
<b>3.5 Aufbereitung des Gehirns.....</b>	<b>35</b>
<b>3.6 Konzentrationsbestimmung von Moxifloxazin in Gehirn und Serum .....</b>	<b>35</b>
<b>3.7 Histologie und molekularbiologische Untersuchungen .....</b>	<b>36</b>
3.7.1 Histologie .....	36
3.7.2 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	39
<b>3.8 Neurologische Untersuchung .....</b>	<b>42</b>
<b>3.9 Statistik.....</b>	<b>43</b>
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1 Physiologie.....</b>	<b>44</b>
<b>4.2 Moxifloxazingehalt in Gehirn und Serum .....</b>	<b>46</b>
<b>4.3 Histologie.....</b>	<b>47</b>
4.3.1 Immunhistochemische Einfach- und Doppelfärbung.....	47
4.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	52
<b>4.4 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....</b>	<b>53</b>

<b>4.5</b>	<b>Neurologische Untersuchung .....</b>	<b>55</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>77</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>78</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ATP:	Adenosin-Triphosphat
BE:	Basenüberschuss (base excess)
CABG:	coronary artery bypass graft
COX:	Zyklooxygenase
CPB:	cardiopulmonary bypass
DHCA:	deep hypothermic circulatory arrest
EKZ:	Extrakorporale Zirkulation
HAES:	Hydroxyethylstärke
Hb:	Hämoglobin
HLM:	Herz-Lungen-Maschine
IL:	Interleukin
KG:	Körpergewicht
LPS:	Lipopolysaccharid
MAP:	mittlerer arterieller Blutdruck
MCAO:	middle cerebral artery occlusion
MXF:	Moxifloxazin
NF $\kappa$ B:	Nukleärer Faktor $\kappa$ B
PaO <sub>2</sub> :	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PaCO <sub>2</sub> :	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PBS:	phosphate bufferes saline
SIRS:	systemic inflammatory response syndrome
TNF $\alpha$ :	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$

# **1 Einleitung**

## **1.1 Extrakorporale Zirkulation (EKZ)**

Unter dem Begriff extrakorporale Zirkulation (EKZ) wird zunächst eine Teilverlagerung des Blutkreislaufes aus dem körpereigenen Gefäßsystem verstanden. Das Blut verlässt über einen im Gefäß platzierten Katheter den Körper, wird über ein geschlossenes Schlauchsystem geleitet und über einen zweiten Katheter an einer anderen Stelle ins Gefäßsystem reinfundiert. Innerhalb dieser Umleitung können auf vielfältige Weise der Blutfluss oder die Beschaffenheit des Blutes verändert werden. Gase wie Sauerstoff (O<sub>2</sub>) oder Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) können zu- und abgeführt werden, harnpflichtige Substanzen herausgefiltert werden. Dieses Prinzip findet in der modernen Medizin vielseitigen Einsatz, wie z.B. bei der Blutreinigung (sog. Hämodialyse). Werden Herz und Lunge vom regulären Kreislauf ausgeschlossen, wie es in der Kardiochirurgie häufig bei Operationen am offenen Herzen praktiziert wird, spricht man von einem kardiopulmonalen Bypass (cardiopulmonary bypass, CPB). Der Oxygenator der Herz-Lungen-Maschine (HLM) übernimmt dabei als künstliche Lunge den Gasaustausch. Rollerpumpen halten einen kontinuierlichen, nichtpulsatilen Blutfluss aufrecht. In diesem Fall findet eine venoarterielle Umleitung des kompletten Kreislaufes statt (Roche Lexikon 2002, S. 1051). Ziel dieser EKZ ist ein blut- und bewegungsarmes Operationsfeld am Herzen, was nicht nur eine enorme Verbesserung für die chirurgische Präparation bedeutet, sondern viele Herzoperationen erst möglich macht (Mack 2003, S. 2241).

### **1.1.1 Anwendung der EKZ**

Die erste erfolgreiche Anwendung der EKZ mit einer HLM fand durch Gibbon im Jahr 1953 statt (Gibbon 1954, S. 171). Auf diese Weise konnte zum ersten Mal ein Patient mit kongenitalem Septumdefekt operativ versorgt werden. Diese neuartige Technik brachte rasche Fortschritte in der Kardiochirurgie, nicht zuletzt weil sie Eingriffe am nicht schlagenden Herzen in einem blutarmen Operationsfeld ermöglicht (Amir 2005, S. 1955). Vor allem im Bereich Herzklappenersatz und aortokoronarer Bypass (coronary artery bypass graft, CABG) findet die EKZ ihren Einsatz. Oftmals kann durch diese Operationen eine Symptomreduzierung bei Herzpatienten erreicht werden (Gill 1996, S. 91).

### **1.1.2 Komplikationen der EKZ und ihre Auswirkungen**

Trotz stetig sinkender Mortalität bringt die Anwendung der EKZ ein breites Spektrum an Komplikationen mit sich, wie beispielsweise Massenblutungen, systemische Inflammationsreaktion sowie Nieren-, Herz- und Lungenversagen. Besonders problematisch sind jedoch die postoperativen neurologischen und neurokognitiven Defizite. Bei insgesamt gesunkener Gesamtmortalität nach EKZ stieg der Anteil der Todesfälle verursacht durch neurologische Schädigung von 7,2 auf 19,6 % (Investigators 1994, S. 559ff). Dabei spielen u. a. Schlaganfälle eine bedeutende Rolle, die mit einer Inzidenz von 2,5 % eine der häufigen Komplikationen nach EKZ ausmachen und eine höherer Mortalität, verlängerten Krankenhausaufenthalt und erhöhten Pflegeaufwand nach sich ziehen (Pua 1998, S. 961; Roach 1996, S.1859).

In einer Metaanalyse von CABG-Patienten beschreiben Newman und Kollegen neurokognitive Dysfunktionen wie Konzentrationsschwäche und nachlassende Gedächtnisleistung als die häufigste Komplikation nach EKZ, die sich bei 50 bis 80 % der Patienten feststellen lässt. Nach sechs Monaten sind immer noch bis zu 30 % betroffen (Newman 2001a, S. 398; Hogue 2006, S. 21). Diese lang anhaltenden Defizite wirken sich nachweislich negativ auf die Lebensqualität der Patienten aus und verschlechtern deren soziale und finanzielle Situation (Newman 2001b, S. 2877).

### **1.1.3 Ätiologie und Pathogenese neurokognitiver Defizite nach EKZ**

Die genaue Ätiologie und Pathogenese neurokognitiver Dysfunktion nach EKZ ist nicht bekannt. Grocott und Kollegen vermuten ein multifaktorielles Entstehen, für das u.a. folgende Ereignisse eine Rolle spielen (Grocott 2005, S. 123):

- Zerebrale Embolien
- Globale zerebrale Hypoperfusion
- Systemische und zerebrale Inflammation
- Intraoperative und postoperative zerebrale Hyperthermie
- Hirnödem und Störungen der Blut-Hirn-Schranke
- Genetische Prädisposition

Besonders betroffen von postoperativen neurokognitiven Defiziten sind ältere Menschen, weibliche Patienten und Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Schlaganfall in der Vorgeschichte und Atherosklerose der aufsteigenden Aorta (Hogue 2006, S. 21f).

### Zerebrale Embolien

Zerebrale Embolien, verstärkt durch Hypoperfusion und globale Ischämie, scheinen der Hauptgrund für die perioperative Schädigung des Gehirns zu sein (Barbut 1994, S. 2401). Anhand histologischer Hirnschnitte wird die Zahl der Embolien während einer EKZ auf mehrere Millionen geschätzt (Moody 1995, S. 1305). Zwar ist das gesamte Zentralnervensystem gefährdet, Regionen wie die Ammonshorn- (Cornu Ammonis-, CA-) Region 1 des Hippokampus reagieren jedoch in besonderem Maße empfindlich auf eine Ischämie, die dort zum Zelltod führt (Winkelheide 2008, S. 398f).

Anhand der Größe können Mikroembolien ( $< 200\mu\text{m}$ ) von den größeren Makroembolien unterschieden werden. Sie bestehen typischerweise aus atheromatösem Material aus der Aorta und verschließen auf Grund ihres Durchmessers bevorzugt Arteriolen. (Blauth 1992, S. 1104f). Die kleineren Mikroemboli bestehen entweder aus korpuskulärem oder gasförmigen Material, das beispielsweise aus dem Operationsfeld der eröffneten, herznahen Gefäße oder aus unzureichend entlüfteten Schlauchsystemen stammt (Grocott 2005, S. 123ff). Diese zerebralen Embolien führen zu einer Minderversorgung des Gehirngewebes mit Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) und Nährstoffen, sowie einem fehlenden Abtransport schädlicher Stoffwechselprodukte. Hogue und Kollegen vermuten dabei, dass weniger die absolute Anzahl der Mikroembolien als vielmehr ihre Zusammensetzung über das Ausmaß der Schädigung im Gehirn entscheiden (Hogue 2006, S. 22).

### Globale zerebrale Hypoperfusion

Eine weitere wichtige Rolle bei der Entstehung postoperativer kognitiver Defizite spielt die globale zerebrale Hypoperfusion (Grocott 2005, S. 123). Vor allem bei Patienten mit atheromatöser Aorta treten unter hypotensiven Bedingungen neurologische Schädigungen auf (Gold 1995, S. 1305f). Dabei potenzieren sich die schädigenden Effekte von Makroembolien und Hypoperfusion: Der Embolus verschließt eine Arterie oder Arteriole und führt damit zur Ischämie des von ihr versorgten Gewebes. Die ausreichende Versorgung über Kollateralen

kann wegen der Hypotension und der daraus resultierenden Hypoperfusion nicht gewährleistet werden (Sillesen 1988, S. 61f).

Von zerebraler Hypoperfusion besonders betroffen sind Patienten mit fortgeschrittenen zerebrovaskulären Erkrankungen und vorangegangenen Schlaganfällen (Hogue 2006, S.22).

### Systemische und zerebrale Inflammation

Der Einsatz der EKZ führt zur Aktivierung des Immunsystems und einer damit verbundenen Inflammationsreaktion im gesamten Organismus. Ob ein Zusammenhang zwischen systemischer und zerebraler Inflammation besteht ist bisher nicht endgültig geklärt (Grocott 2005, S. 126).

So konnten Hindman und Kollegen zwar eine Hochregulation der mRNA des Enzyms Zyklooxygenase 2 (COX-2) und damit Anzeichen einer zerebralen Entzündungsreaktion im Gehirn der Ratte nachweisen (Hindman 2002, S. 1384). Jedoch ist die Pathogenese dabei nicht geklärt. Zwei Möglichkeiten kommen dabei in Frage:

Erstens könnte die systemische Inflammation zu primären Schädigungen im Gehirn führen. Bei Krankheitsbildern wie der Sepsis-bedingten Enzephalopathie scheint dies eine Rolle zu spielen. Auch der im Rahmen der EKZ regelmäßig erhöhte Endotoxinspiegel führt bei Mangel an entsprechenden Antikörpern zu einer überschießenden Immunreaktion, die häufig von einem schlechteren neurologischen Outcome begleitet wird (Mathew 2003, S. 511).

Zweitens könnten ischämische Hirnschädigungen, wie beispielsweise Embolien, direkt ursächlich sein für die nachfolgende zerebrale Inflammation. Beide Mechanismen sind unter EKZ denkbar (Grocott 2005, S. 126).

### Intraoperative und postoperative zerebrale Hyperthermie

Eine zerebrale Hyperthermie kann während oder nach kardiochirurgischen Eingriffen stattfinden. Zu aggressives Erwärmen nach EKZ mit tief hypothermem Kreislaufstillstand (deep hypothermic circulatory arrest, DHCA) kann postoperativ im Gehirn die Normaltemperatur übersteigen und zu einer Hyperthermie führen. An stark perfundierten Organen, wie z.B. dem Gehirn, wird die Wärme besonders intensiv abgegeben und gespeichert (Cook 2001, S. 179).

Alternativ kann es auch durch eine ischämische Schädigung des Temperaturregulationszentrums im Hypothalamus zu einer postoperativen Hyperthermie, also eines zentralen Fiebers, kommen. Als weitere Möglichkeit für einen postoperativen Temperaturanstieg können inflammatorische Prozesse verantwortlich sein (Grocott 2005, S. 125).

### Hirnödem und Störungen der Blut-Hirn-Schranke

Viele Patienten entwickeln nach EKZ ein Hirnödem (Harris 1998, S. 340ff). Als Ursachen hierfür werden Hyponatriämie, globale zerebrale Hypoperfusion oder venöse Stauung z.B. durch fehlplazierte EKZ-Kanülen diskutiert. Bierbach und Kollegen sehen in den zerebralen Embolien die Hauptursache für die Ödembildung im Gehirn (Bierbach 2008, S. 217).

Störungen der Blut-Hirn-Schranke können zum Übertritt intravasaler Flüssigkeit in den extravasalen Raum führen und so ein Hirnödem verursachen. Auf Grund kontroverser Studienergebnisse ist jedoch nicht ersichtlich, ob oder in wie weit die Blut-Hirn-Schranke durch die EKZ in Mitleidenschaft gezogen wird (Gillinov 1992, S. 1110ff; Bokesch 2002, S. 890). Kommt es jedoch nach EKZ zur Entstehung eines Hirnödems, wird durch die damit verbundene intrakranielle Druckerhöhung gesundes und bereits geschädigtes Gewebe weiter in Mitleidenschaft gezogen (Grocott 2005, S. 126).

### Genetische Prädisposition

Genetische Faktoren können sowohl das Ausmaß als auch die Rekonvaleszenz der zerebralen Schädigung beeinflussen. Dabei spielt vor allem Apolipoprotein E eine zentrale Rolle: Ein Polymorphismus des  $\epsilon 4$  - Allels dieses Proteins ist ausschlaggebend für die Entwicklung der sporadischen und der spätauftretenden Form der Alzheimer-Erkrankung (Saunders 1993, S. 1467ff). Darüber hinaus beschreiben Tardiff und Kollegen bei Trägern dieses Allels eine höhere Empfänglichkeit für kognitive Defizite nach EKZ (Tardiff 1997, S. 719). Dieser Zusammenhang konnte in einer aktuellen Studie jedoch nicht belegt werden (Silbert 2008, S. 841ff) Bei Kindern scheint ein Polymorphismus im  $\epsilon 2$ -Allel ein schlechteres Abschneiden in neurokognitiven Tests ein Jahr nach EKZ zu bedingen (Gaynor 2003, S. 1741).

#### **1.1.4 EKZ mit tief hypothermem Kreislaufstillstand**

Erstmalig beschreiben Lewis und Taufic im Jahr 1953 die erfolgreiche Durchführung eines hypothermen Kreislaufstillstandes. Mittels Oberflächenkühlung wurde damals ein 5-jähriger Patient in einen 5 ½ minütigen Kreislaufstillstand versetzt um einen angeborenen Vorhofseptumdefekt zu reparieren (Lewis 1953, S. 52ff).

Mit der Weiterentwicklung der EKZ fand der tief hypotherme Kreislaufstillstand (deep hypothermic circulatory arrest, DHCA) zunehmend Anwendung in der Herzchirurgie bei angeborenen Herzfehlern bei Kindern wie Ventrikelseptumdefekt, Fallot'sche Tetralogie oder Transposition der großen Arterien (Oates 1995, S. 787), die bisher nicht operativ therapiert werden konnten. Inzwischen nutzt man den DHCA auch um Eingriffe an der thorakalen Aorta bei Erwachsenen durchzuführen (Immer 2002, S. 422ff).

##### **1.1.4.1 Vorteile des DHCA**

###### Bessere Übersicht im OP-Feld

Die für die EKZ angelegten Perfusionskanülen können für die Zeitdauer des Kreislaufstillstandes entfernt werden. Dadurch wird eine verbesserte Übersicht im weitgehend blutleeren und bewegungsarmen Operationsfeld erreicht, die dem Chirurgen unter anderem die präzise anatomische Rekonstruktion angeborener Herzfehler erlaubt (Amir 2005, S. 1955).

###### Neuroprotektion durch reduzierten Hirnstoffwechsel

Ein weiterer Vorteil des DHCA besteht in der verbesserten Ischämietoleranz des Gehirns im Vergleich zu normothermem Gewebe. Als bisher einziges Neuroprotektivum wird es in der Klinik erfolgreich eingesetzt. Hypothermie reduziert sowohl den Verbrauch von Sauerstoff und Glukose als auch die Produktion von Laktat (Yenari 2008, S. 2910). Der Verbrauch energiereicher Phosphate (Adenosin-Triphosphat, ATP) soll ebenfalls reduziert sein. Einige Studien kommen allerdings zu dem Schluss, dass der zerebrale Metabolismus in der Hypothermie dem während Normothermie in seiner Intensität durchaus nahe kommt. Daher ist eine Veränderung im Hirnstoffwechsel vermutlich nicht der alleinige Grund für die neuroprotektive Wirkung der Hypothermie (Yenari 2008, S. 2911).

### Neuroprotektion durch einen verbesserten Energiestatus der Zelle

Als weiterer neuroprotektiver Faktor wird die reduzierte Freisetzung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat diskutiert. Tritt im Rahmen einer ischämischen Schädigung ein Verlust an ATP im neuronalen Gewebe auf, führt dies zum Versagen der ATP-abhängigen Natrium-Kalium-Pumpe in der Nervenzellmembran. Es folgt eine pathologische Verschiebung im Elektrolythaushalt der Zelle: Während Kalium austritt, strömen Natrium- und Kalziumionen ein. Das dadurch veränderte Membranpotenzial und der Kalzium-Einstrom führen zu einer massiven, exzitotoxischen Ausschüttung von Glutamat mit neurotoxischer Wirkung. Die Hypothermie reduziert den intrazellulären Verbrauch von ATP und wirkt dadurch dieser neurotoxischen Glutamatausschüttung entgegen (Yenari 2008, S. 2911).

### Inaktivierte Metalloproteasen fördern den Erhalt der extrazellulären Matrix

In experimentellen Schlaganfallstudien haben Heo und Kollegen einen Anstieg von Metalloproteasen als Folge der Ischämie festgestellt. Diese Enzyme bauen Proteine der extrazellulären Matrix ab, und beeinträchtigen so den Zusammenhalt des Zellverbandes und die Zellkommunikation (Heo 1999, S. 624-633). Da diese Matrixproteine im ischämischen Gewebe ohnehin vermindert exprimiert werden, kommt es durch die Aktivierung der Metalloproteasen zu einem zusätzlichen Verlust extrazellulärer Matrix (Wagner 1997, S. 858ff).

Eine milde Hypothermie von 33 °C inhibiert die Metalloproteasen und schützt so die Proteine der extrazellulären Matrix (Yenari 2008, S. 2911).

### Neuroprotektion durch veränderte Genregulation

Eine Beeinflussung der nach zerebraler Ischämie veränderten Genexpression durch Hypothermie konnte kürzlich beobachtet werden (Yenari 2008, S. 2911). Die hochregulierten proinflammatorischen und proapoptotischen Gene werden in ihrer Expression und Aktivität abgeschwächt, wie es z.B. beim Transkriptionsfaktor Nukleärer Faktor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) der Fall ist. Zugleich werden Gene zur Aufrechterhaltung des Zellüberlebens vermehrt ausgebildet (Ohta 2007, S. 431f; Han 2003, S. 2498ff). Die Gründe für die unterschiedliche Genexpression in der Hypothermie sind nicht vollständig geklärt. Es gibt Hinweise, dass temperaturabhängige Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen (Yenari 2008, S. 2911).

#### **1.1.4.2 Nachteile des DHCA**

Neben den beschriebenen positiven Effekten führt der DHCA aber auch zu unerwünschten Komplikationen. So können vielfältige Defizite und Dysfunktionen auftreten, wobei neurologische Funktionsstörungen die schwerwiegendsten und meist gefürchteten Komplikationen vor allem nach herzchirurgischen Eingriffen bei Kindern darstellen (Amir 2005, S. 1957). Diese Problematik ist in erster Linie auf die Ischämie selbst oder auf nachfolgende Reperfusionsschäden zurückzuführen (Bellinger 1999, S. 526). Die chirurgischen Fortschritte haben zu einer reduzierten Mortalität bei den betroffenen Kindern geführt. Allerdings entwickeln überlebende Kinder nach Operation am offenen Herzen zum Teil schwerwiegende grob- und feinmotorische Defizite (Bellinger 1999, S.527f) oder auch generalisierte und multifokale Krampfanfälle (Miller 1995, S. 764ff). Wypij und Kollegen brachten einen reduzierten Intelligenzquotient (IQ), eine verzögerte Sprachentwicklung und eine eingeschränkte Feinmotorik mit dem DHCA in Zusammenhang (Wypij 2003, S.1399ff). Kinder, die einem DHCA unterzogen wurden, zeigten auch im Alter von einem Jahr eine höhere Prävalenz von Störungen in Neurologie und Motorik (Bellinger 1995, S. 551f). Zu Beginn des Kleinkindalters mit vier Jahren sind überdies vermehrt grobmotorische, feinmotorische und Sprechstörungen vorhanden (Bellinger 1999, S. 529).

Auch Erwachsene zeigen nach kardiovaskulären Eingriffen unter Einsatz von EKZ mit DHCA neurologische und neurokognitive Defizite. Bei Operationen an der thorakalen Aorta treten besonders psychopathologische Syndrome auf, wie postoperative Verwirrtheit, Delir, Agitiertheit und Parkinsonismus, zwar ohne erkennbare strukturelle Veränderungen im Gehirn (Ergin 1994, S. 788ff), aber häufig mit einer Einschränkung in der Lebensqualität einhergehend (Immer 2002, S. 422ff). Für das Ausmaß und die Häufigkeit dieser Defizite ist neben dem Patientenalter vor allem die Dauer des DHCA von Bedeutung (Reich 1999, S. 156ff).

## **1.2 Inflammation**

### Allgemeines

Jeglicher Art Gewebsverletzung folgt eine akute Inflammationsantwort, deren Ziel es ist eingedrungene Krankheitserreger zu beseitigen, Gewebeschädigungen zu begrenzen und zu reparieren. Diese akute Inflammationsantwort wird über die Aktivierung vieler verschiedener zellgebundener und humoraler Systeme reguliert, zu denen neben Zytokinen auch Hormone, Gewebemediatoren und Immunzellen wie die neutrophilen Granulozyten gehören. Hauptwirkorte dieser unspezifischen sog. Akute Phase-Reaktion sind Zellen des Bindegewebes, Endothelien der Blutgefäße und Zellen des Immunsystems.

Während kleine Verletzungen und Infektionen auf eine lokale Entzündungsreaktion begrenzt bleiben, wirken sich größere Gewebetraumen, wie sie im Rahmen chirurgischer Eingriffe stattfinden, häufig systemisch aus. Je nach Schweregrad können sie mit Temperaturerhöhungen und Nachweis von systemischen Entzündungsparametern wie C-reaktives Protein (CRP) einhergehen. Im schlimmsten Falle kann es zu einer exzessiven Ausschüttung von Zytokinen kommen, die die bisher gut regulierte Inflammationsantwort in ein sogenanntes systemisches Inflammationsantwortsyndrom (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) mit hoher Mortalität überführt. Charakteristisch für SIRS ist das Vorliegen von mindestens zwei der folgenden Merkmale: (1) Hyper- oder Hypothermie, (2) Tachykardie, (3) Tachypnoe oder Hyperventilation oder (4) Leukozytose oder Leukopenie (Bone 1992, S. 1646). Schwerwiegende Komplikationen des SIRS wie eine verschlechterte Hämodynamik, Lungen- und Nierenfunktionsstörungen (Brix-Christensen 2002, S. 670ff) bis hin zum letalen Multiorganversagen (Paparella 2002, S. 232) machen die klinische Bedeutung dieses Krankheitsbildes deutlich.

### **1.2.1. Akute Phase-Reaktion**

Die Akute Phase-Reaktion ist eine stets gleichförmig ablaufende, inflammatorische Reaktion. Trotz unterschiedlicher Auslöser wie Trauma, Operation oder Infektion zeigt sie in ihrem Ablauf sowohl klinisch als auch biochemisch ein einheitliches Bild. Die Synthese von Akute Phase-Proteinen wie CRP in der Leber ist gesteigert und es kommt zu einer Komplementaktivierung mit Leukozytose und Lymphopenie. Diese Faktoren sowie die insgesamt katabole Stoffwechsellage führen zu einem klinischen Bild geprägt von allgemeinem Unwohlsein mit Fieber, Benommenheit und Appetitlosigkeit. Sinn dieser

physiologischen, selbstlimitierenden Reaktion ist die Eingrenzung der Gewebeschädigung, die Beseitigung von pathogenen Keimen sowie anfallender Zelltrümmer und die Wiederherstellung des ursprünglichen Zustandes.

Je nach Ausmaß und Dauer der Schädigung kann diese Akute Phase-Reaktion durch eine überschießende Aktivierung klinisch in einem SIRS münden und dabei oben genannte schwere und lebensbedrohliche Komplikationen bis hin zum Multiorganversagen bewirken. Die Akute Phase-Reaktion wird auch durch die EKZ aktiviert und führt zu einer systemischen Inflammation (Paparella 2002, S. 232ff).

### **1.2.1. Systemische Inflammation nach kardiochirurgischen Eingriffen und EKZ**

Der Kontakt von Blut mit den Fremdoberflächen des kardiopulmonalen Bypasssystems löst verschiedene hämatologische und immunologische Prozesse aus: Komplementsystem, Blutgerinnung, Fibrinolyse, Kallikrein-Kaskade und Leukozyten werden aktiviert, die Funktion der Thrombozyten ist beeinträchtigt. Die Synthese und Ausschüttung von Zytokinen wie Tumor Nekrose Faktor alpha ( $TNF\alpha$ ) oder Interleukin 1 (IL-1) ist gesteigert. In den während der EKZ nicht perfundierten Organen Myokard und Lunge fallen ebenfalls Zytokine und Stoffwechselendprodukte an (Murphy 2004, S. 484f), die dann während der Reperfusion in den systemischen Kreislauf gelangen und dort wirksam werden. Neutrophile Granulozyten werden aktiviert und wandern in das geschädigte Gewebe ein. Durch Degranulieren werden ihre zytotoxischen Stoffe wie Elastase und freie Radikale ausgeschüttet, die als ein Hauptstimulator der inflammatorischen Reaktion gelten (Paparella 2002, S. 235).

Die eingeschränkte Perfusion des Splanchnikusgebietes evoziert ein Übertreten von Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS) aus gramnegativen Bakterien des Darmlumens in das Blut. Gebunden an das körpereigene Lipopolysaccharid Binding Protein (LPB) stimuliert es nachhaltig bei Makrophagen die Sekretion von Tumor Nekrose Faktor (TNF), einem der frühesten und wichtigsten Mediatoren der Inflammation (Hall 1997, S. 767). Ohki und Kollegen konnten in einem Modell am Schwein zeigen, dass eine Elimination von Endotoxin die durch die EKZ verursachte Inflammation abmildert. Die kardiale und pulmonale Funktion bleibt dadurch auf einem besseren Niveau (Ohki 2008, S. 76f).

Eine überschießende Aktivierung von und durch Zytokine scheint – zusammen mit vielen weiteren bekannten und unbekanntem Faktoren – eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von inflammationsbedingten Komplikationen nach EKZ zu spielen und im schlimmsten Fall im SIRS zu enden (Paparella 2002, S. 233). SIRS kann entweder als Sepsis im Rahmen einer

Infektion oder als Folge nichtinfektiöser, schwerer Erkrankungen (z.B. Pankreatitis) oder Verletzungen, auch Operationen, auftreten (Bone 1992, S. 1645). Mögliche Ursachen für eine systemische Inflammation nach herzchirurgischer Intervention mit EKZ können dabei sein: Kontakt von Blutbestandteilen mit den Fremdoberflächen des extrakorporalen Kreislaufs, Ischämie- und Reperfusionsschäden, Endotoxämie oder das chirurgische Trauma selbst.

Über die inflammatorischen Prozesse der Akute Phase-Reaktion des SIRS tragen diese Ursachen zur Entwicklung postoperativer Komplikationen wie myokardiale Dysfunktion, Nieren-, Leber- und Lungenfunktionsstörungen, verschlechtertes neurologisches Outcome, Störungen der Blutgerinnung bei, die letztlich bis zum Multiorganversagen führen können (Paparella 2002, S. 232).

### **1.2.2.1. Zytokine**

Bei den Zytokinen handelt es sich um interzelluläre Botenstoffe des Immunsystems, die in der Pathogenese des SIRS und letztlich des Multiorganversagens eine entscheidende Rolle spielen. Proinflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$  und Interleukin (IL)-1 $\beta$  sind wichtige Mediatoren der schweren Sepsis. Mit einem Gewicht von 16 bis 25 kDa gehören sie zur Gruppe der niedermolekularen Proteinen, die vor allem von Makrophagen und Monozyten, aber auch von Thrombozyten, Endothelzellen (Paparella 2002, S. 232) und sogar von Neuronen und Gliazellen (Lakhan 2009, S. 5) gebildet und sezerniert werden. Ihre Produktion wird dabei von Transkriptionsfaktoren wie NF $\kappa$ B gesteuert; die Sekretion unterliegt einer strengen Regulation. Alle Zytokine wirken über hochspezifische Rezeptoren an der Oberfläche einer Vielzahl von Zellen und zeigen häufig pleiotrope Effekte. In geringen physiologischen Konzentrationen sind sie essentiell für eine funktionierende Immunabwehr und unterstützen die lokale Blutgerinnung. Schweres Trauma, Schock oder Sepsis dagegen provozieren eine exzessive, systemische Ausschüttung, die dem Organismus sogar gefährlicher werden kann als der ursprüngliche Auslöser selbst. Dieser in der Literatur häufig als „Zytokinsturm“ bezeichnete Zustand wird getragen von einem positiven Feedback-Mechanismus zwischen Zellen des Immunsystems und Zytokinen (Matsuda 2006, S. 190f).

Bei Hirnschädigung wie beispielsweise beim Schlaganfall kommt es zu einer Hochregulation der Zytokinexpression im betroffenen Gewebe und somit zur zerebralen Inflammation (Lakhan 2009, S. 5). Aber auch die Sekretion der Botenstoffe aus Zellen des peripheren Immunsystems könnte einen Beitrag zur Entzündungsreaktion im Zentralnervensystem leisten (Ferrarese 1999, S. 1004ff).

Im folgenden werden die wichtigsten Zytokine näher betrachtet:

### Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF $\alpha$ )

Das 17 kDa große TNF $\alpha$  ist ein pleiotropes Zytokin, das von vielen Zellen in der Frühphase des akuten Entzündungsprozesses gebildet wird. Produktionsort sind vor allem Zellen des Immunsystems, vor allem Makrophagen, B- und T-Zellen und Mastzellen (Tracey 1993, S. 320). Die Hauptfunktion von TNF $\alpha$  liegt in der Regulation des Inflammationsprozesses. So stimuliert es über hochspezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche die Sekretion von Akute Phase-Proteinen, aktiviert die Synthese und Freisetzung von IL-1, IL-6 und Interferon-gamma (IFN $\gamma$ ) und führt damit zu einer Aktivierung von Leukozyten und Lymphozyten. Auch beeinflusst es die Zellproliferation und -differenzierung und kann als Vermittler der Apoptose wirken. Einen besonderen Stellenwert nimmt TNF $\alpha$  im pathophysiologischen Prozess des septischen Schocks ein, da es vermutlich als Hauptauslöser der Schocksymptomatik fungiert. Verschiedene Studien zeigen, dass die alleinige Gabe von TNF $\alpha$  bei gesunden Wirbeltieren eine Schocksymptomatik auslösen kann. Zudem zeigt es pyretische und zur Kachexie führende Eigenschaften. Endotoxin scheint einer der stärksten Stimulatoren für die Produktion von TNF $\alpha$  zu sein, neben anderen Faktoren wie Plättchen-aktivierender Faktor oder IFN $\gamma$  (Tracey 1993, S. 317ff).

Im zentralen Nervensystem kann TNF $\alpha$  von Makrophagen, Astrozyten und Mikroglia synthetisiert werden und hat sowohl schädigende als auch protektive Einflüsse auf das neuronale Gewebe. Eine Wirkung ist dabei die Apoptoseeinleitung bei Neuronen (Lucas 2006, S. 234).

An Schlaganfallstudien im Tiermodell konnte ein rascher Anstieg von TNF $\alpha$  nach Okklusion der mittleren Zerebralarterie (middle cerebral artery occlusion, MCAO) in Neuronen beobachtet werden. Die gleichzeitige Invasion von Immunzellen in die Infarktzone deutet auf die enge Verknüpfung von zellulärer Immunantwort und TNF $\alpha$  hin. Interessanterweise kann die Applikation von TNF $\alpha$  vor MCAO ein größeres Infarktareal provozieren, während die Gabe von TNF $\alpha$ -Antagonisten diesen Effekt ins Gegenteil umkehrt. Möglicherweise werden die kapillären Endothelien durch TNF $\alpha$  in der Weise vorbereitet, dass Immunzellen wie z.B. Makrophagen leichter anhaften und aus dem Blutstrom in das Gewebe übertreten können. Diese Reaktion kann einerseits dem Abräumen von Zelltrümmern und zur erwünschten RepARATION des Infarktareals dienen, andererseits kann eine vermehrte Aktivität der Abwehrzellen nur leicht verletzte oder gar gesunde Nervenzellen in Mitleidenschaft ziehen.

Dadurch kann die neuronale Schädigung durch die Zellen des Immunsystems verstärkt werden (Arvin 1996, S. 447f).

Systemisch sind hohe TNF $\alpha$ -Spiegel nicht nur bei septischen Verläufen festzustellen, sondern treten auch nach kardiochirurgischen Eingriffen mit EKZ auf. Hier führen sie zu einem schlechteren Outcome der Patienten, zur Kardiodepression sowie Einschränkungen der Lungen- und Nierenfunktion durch TNF $\alpha$  (Paparella 2002, S.234).

Eine hohe TNF $\alpha$ -Aktivität wurde im Hippokampus von Ratten festgestellt, die einer normothermen EKZ unterzogen wurden. Bereits vier Stunden nach der Operation konnte eine kurzzeitige Zunahme auf mRNA-Ebene und eine längerwirkende Aktivität von TNF $\alpha$ -Protein bis zu zehn Tage danach beobachtet werden, die allerdings in gleichem Maße in nicht-EKZ-unterzogenen Sham-Tieren festzustellen war (Jungwirth 2009, S. 1004f).

Die nachgewiesene Erhöhung nach vier Stunden bildet anscheinend den Beginn der Inflammationsreaktion in den Neuronen (Jungwirth 2009, S. 1005), der seinen Höhepunkt nach 12 bis 36 Stunden nach zerebraler Ischämie erreicht (Lambertsen 2005, S. 130).

Auch in einem Mausmodell konnte kürzlich eine exzessive TNF $\alpha$ -mRNA-Produktion im Hippokampus nach systemischer Inflammation durch Lipopolysaccharid- (LPS-) Applikation nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt drei Stunden nach LPS-Gabe ist die TNF $\alpha$ -Expression auf Genomebene am stärksten (Czapski 2010, S. 87).

### Weitere proinflammatorische Zytokine

Neben TNF $\alpha$  spielen vor allem die proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und IL-8 eine herausragende Rolle bei der zellvermittelten Immunantwort. Ihnen allen gemeinsam ist ihre Pyrogenität; im Ort der Herstellung bzw. in der Wirkung zeigen sie jedoch geringe Unterschiede:

### Interleukin 1 (IL-1)

IL-1 existiert in den zwei Formen IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . Ähnlich zu TNF $\alpha$  kann auch IL-1 Fieber, Schock und allgemeine Schwäche auslösen. IL-1 aktiviert dabei die Immunantwort über eine Hochregulation verschiedenster proinflammatorischer Proteine wie induzierbare Nitritoxid-Synthase (iNOS), Prostaglandine, Akute Phase-Proteine, andere Zytokine sowie NF $\kappa$ B. Seine frühzeitige Ausschüttung, die hauptsächlich aus Makrophagen und Endothelzellen erfolgt,

wird besonders durch Endotoxine und  $\text{TNF}\alpha$  angeregt (Matsuda 2006, S. 192). Im Rahmen von kardiochirurgischen Eingriffen mit EKZ ist dieser wichtige Parameter der Inflammationsantwort regelmäßig erhöht. Unklar ist allerdings, ob diese Aktivierung von IL-1 durch das chirurgische Trauma an sich oder die EKZ bedingt ist (Hall 1997, S. 770).

### Interleukin 6 (IL-6)

IL-6 reguliert neben den Akute Phase-Proteinen auch die Zelldifferenzierung sowie die Sekretion von Immunglobulinen aus B-Zellen. Zudem ist IL-6 in der Lage T-Zellen zu aktivieren. Ausgeschüttet wird IL-6 vorrangig von Makrophagen und Endothelzellen auf Stimulation von Endotoxin,  $\text{TNF}\alpha$  und IL- $1\beta$  hin. Im Verlauf einer inflammatorischen Reaktion tritt IL-6 später auf als IL-1 mit einem Maximum ca. vier bis sechs Stunden nach Schädigung. Seine Serumkonzentration ist nach herzchirurgischen Eingriffen konstant reproduzierbar (Hall 1997, S. 771).

### Interleukin 8 (IL-8)

Die Hauptaufgabe von IL-8 liegt in der Regulierung der polymorphkernigen Zellen, zu denen auch die neutrophilen Granulozyten gehören, die in der systemischen Antwort des Immunsystems auf die EKZ eine wichtige Rolle spielen. So ist IL-8 an Chemotaxis sowie der transendothelialen Migration der Neutrophilen ins geschädigte Gewebe maßgeblich beteiligt. Stimuliert durch  $\text{TNF}\alpha$ , ist sein Konzentrationsverlauf ähnlich zu IL-6. Als temperaturabhängiges Zytokin steigt es besonders nach Hypothermie mit anschließender Wiedererwärmung an und erreicht dabei höhere Werte als bei normothermer EKZ (Hall 1997, S. 771).

### Antiinflammatorische Zytokine

Im Rahmen inflammatorischer Prozesse treten neben den bereits aufgeführten proinflammatorischen auch antiinflammatorische Enzyme auf, zu denen vor allem IL-10 zählt. Produziert von T-Helfer-Zellen, Monozyten und neoplastischen B-Zellen reguliert es Bindegewebs- und mononukleäre Zellen und inhibiert die Wirkung von IL-1, IL-6 und IL-8 (Hall 1997, S. 775).  $\text{TNF}\alpha$  wird ebenfalls von IL-10 inhibiert; in gleicher Weise führt es zu einer Hemmung der Expression und Aktivierung von Zytokinrezeptoren. Dieser negative

Feedback-Mechanismus kann neuroprotektiv wirken, was im Schlaganfallmodell an der Ratte durch Gabe von IL-10 gezeigt werden konnte. So reduzierte sich die Hirninfarktgröße bei diesen Tieren signifikant (Lakhan 2009, S. 6).

### Zytokine und zerebrale Inflammation

Neben diesen systemischen Effekten spielen die Zytokine auch im Gehirn eine bedeutende Rolle. Schlaganfallmodelle an der Ratte konnten eine Aktivierung der Mikroglia zeigen, die als hirneigene Makrophagen große Bedeutung für zerebralinflammatorische Prozesse haben (Ekdahl 2009, S. 1021ff). So produzieren diese Zellen in der postischämischen Phase einerseits neuroprotektiv wirkende Substanzen, wozu unter anderem der sog. brain-derived neurotrophic factor (BDNF) und der insuline-like growth factor (IGF-1) gehören. Die Mikroglia reguliert aber ebenso die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 sowie anderer zytotoxischer Substanzen und auch Prostaglandine. Diese Prozesse können letztlich in einem Untergang von Nervengewebe mit erhöhter Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke und Hirnödemen enden. Die Blockade der Prostaglandinsynthese könnte ein therapeutischer Ansatz sein in der Verbesserung des neurologischen Outcome der Patienten (Ekdahl 2009, S. 1021ff; Lucas 2006, S. 234; Lakhan 2009, S. 8).

Die systemisch während eines herzchirurgischen Eingriffs mit EKZ freigesetzten Zytokine und Endotoxine können die Expression von zerebraler COX-2-mRNA stimulieren, die wiederum neurotoxisch wirksame Prostaglandine im neuronalen Gewebe freisetzt. Diesen Zusammenhang zwischen erhöhten IL-6 Serumwerten und einer verstärkten Expression von COX-2-mRNA im Gehirn konnten Hindman und Kollegen im Tiermodell an der Ratte zeigen. Zum Messzeitpunkt vier Stunden nach EKZ wiesen sie eine zerebralinflammatorische Reaktion durch die systemische Immunantwort nach (Hindman 2001, S. 1385).

Auch durch die intraperitoneale Gabe von Endotoxin bei Mäusen konnte kürzlich eine systemische Inflammation provoziert werden, die zu einer Zunahme der Expression proinflammatorischer Gene wie z.B. COX-2 und TNF $\alpha$  und weiter zum Untergang von Neuronen im Hippokampus durch Apoptose und Nekrose geführt haben (Czapski 2010, S. 86).

### **1.2.2.2. Inflammatorischer Transkriptionsfaktor Nukleärer Faktor kappa B (NFκB)**

Als ubiquitär vorkommender und induzierbarer Transkriptionsfaktor reguliert NFκB auf Genomebene die Expression einer Vielzahl proinflammatorischer Proteine. Seine Aktivierung erfolgt durch unterschiedliche Faktoren wie z.B. IL-1, TNFα, LPS, UV-Strahlen, Wachstumsfaktoren, freie Radikale oder virale Infektionen (Pahl 1999, S. 6854f).

Unter normalen Bedingungen liegt NFκB im Zytoplasma der unstimulierten Zelle an Inhibitorisches Protein kappa B (IκB) gebunden vor und ist damit inaktiv. Erfolgt eine Stimulation wird dieser NFκB-IκB-Komplex durch zwei spezifische Enzyme (IκB-Kinase 1, IKK1, und IκB-Kinase 2, IKK2) phosphoryliert. NFκB dissoziiert daraufhin ab und gelangt in den Zellkern. Dort bindet es an spezifische DNA-Abschnitte und induziert die Expression verschiedener inflammatorischer Mediatoren, wie beispielweise proinflammatorische Zytokine IL-1, COX-2, iNOS und weitere, für die Regulierung der Immunreaktion wichtige Adhäsionsmoleküle (cellular adhesion molecules, CAM) (Paparella 2002, S. 234).

Interessanterweise werden NFκB sowohl pro- als auch antiapoptotische Eigenschaften auch an Neuronen zugesprochen. So konnten Clemens und Kollegen in einem Ischämiemodell an der Ratte eine vorübergehende Aktivierung von NFκB zwar in den meisten hippocampalen Neuronen beobachten. Jedoch bildete sie sich in den meisten Fällen zurück, ohne eine nachweisbare Schädigung an den Neuronen zu hinterlassen. In den wenigen apoptotischen Nervenzellen war eine persistierend erhöhte NFκB-Aktivität nachweisbar, was auf eine Beteiligung von NFκB am programmierten Zelltod der Nervenzellen schließen lässt. Möglicherweise ist die neurotoxische Wirkung von NFκB auf eine erhöhte Produktion von Eikosanoiden zurückzuführen. Gleichzeitig kann über die Aktivierung von TNFα eine Neuroprotektion an hippocampalen Neuronen in der Zellkultur erreicht werden (Clemens 1997, S. 194).

Carroll und Kollegen untersuchten die Aktivierung von NFκB und weiterer Inflamationsparameter in einem Ischämie-Reperusionsmodell an der Ratte. Bereits 15 Minuten nach Beginn der Reperfusion wurde vermehrt NFκB nachgewiesen. Außerdem konnten erhöhte Werte der proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6, IL-8 und TNFα, die direkt durch NFκB stimuliert werden, bereits während der Reperfusion nachgewiesen werden. Eine Stunde nach Ende der Reperfusion war NFκB wieder im Bereich der basalen Ausgangswerte. (Carroll 1998, S. 186ff). Im Zusammenhang mit DHCA haben Kellermann und Kollegen den zeitlichen Verlauf der zerebralen NFκB-Expression an der Ratte untersucht.

Der Höhepunkt der NFκB-Expression zeigte sich dabei am ersten postoperativen Tag im Hippokampus. Drei Tage nach DHCA lag die zerebrale NFκB-Expression wieder im Bereich der unbehandelten Kontrolle. Interessanterweise war die gesteigerte NFκB-Expression im Hippokampus unabhängig von einer Erhöhung der systemischen Inflammationsparameter IL-6 und TNFα (Kellermann 2009, S. 432).

Eine Aktivierung von NFκB scheint darüber hinaus temperaturabhängig zu sein. Sowohl die Translokation als auch die Bindungsaktivität von NFκB nehmen in der Hypothermie ab; die Menge an iNOS und TNFα sind dabei ebenso reduziert. Somit scheint eine reduzierte NFκB-Aktivität ein Teil der neuroprotektiven Wirkung der Hypothermie zu sein (Yenari 2006, S. 164ff).

### **1.2.2.3. Inflammation-regulierendes Enzym Zyklusogenase (COX)**

Die Zyklusogenasen, auch bekannt als Prostaglandin H – Synthasen, katalysieren den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zu Beginn der Synthese der Prostaglandine aus Arachidonsäure. Dabei spielen sie eine zentrale, regulierende Rolle bei akuten und chronischen Entzündungen.

Die Hauptaufgabe der Zyklusogenasen besteht aus der Katalyse von Arachidonsäure zur stabilen Prostaglandinform PGH<sub>2</sub> in zwei Schritten. Ausgehend von diesem Molekül können alle Unterformen der Prostaglandine sowie Prostazyklin und Thromboxane synthetisiert werden (Minghetti 2004, S. 901ff).

Insgesamt sind drei Isoformen der COX bekannt, die sich in ihrer Struktur jeweils nur wenig, in ihrem Expressionsverhalten jedoch deutlich unterscheiden: COX-1 wird in den meisten Geweben konstitutiv exprimiert. Es reguliert unter physiologischen Bedingungen zahlreiche Zellvorgänge. Dazu gehören u. a. der Säureschutz der Magenschleimhaut, die vaskuläre Hämostase, die Thrombozytenaggregation und die Hämodynamik der Niere.

Die Expression von COX-2 dagegen ist induzierbar und nimmt im Gegensatz zu COX-1 eine Schlüsselrolle in der Entzündungsreaktion ein. Wichtigste Auslöser einer COX-2-Expression sind Endotoxine und proinflammatorische Zytokine. Konstitutive Expression findet nur in wenigen Geweben statt. Als wichtiger Ort sind hier sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte die exzitatorischen Glutamat-Neuronen des Hippokampus zu nennen. Auch im Neokortex wird COX-2 konstitutiv exprimiert. Zu einer gesteigerten Expression führen hier in erster Linie exzitotoxische Krampfanfälle mit exzessiver Glutamatausschüttung oder auch

hirnischämische Ereignisse. In diesen Fällen wird COX-2 eine neurotoxische Wirkung zugesprochen (Minghetti 2004, S. 901ff; Candelario-Jalil 2008, S. 1401ff).

Die Funktion von COX-2 im Gehirn ist noch nicht hinreichend geklärt, jedoch konnte eine tragende Rolle bei der synaptischen Aktivität sowie bei der Bildung von Gedächtnis und Lernprozessen gezeigt werden. Desweiteren wurde ein Effekt der Arachidonsäureprodukte auf die fokale Verteilung des zerebralen Blutflusses beobachtet. Auf diese Weise kann durch COX-2, je nach neuronaler Aktivität, die Zufuhr von Blut in bestimmte Bereiche des Neokortex gesteuert werden. Zusammengefasst nimmt COX-2 also sowohl eine wichtige Funktion in physiologischen Prozessen als auch in der Inflammation im Gehirn wahr (Candelario-Jalil 2008, S. 1401ff).

Neben den beiden Isoformen COX-1 und COX-2 ist eine dritte Form, COX-3, bekannt. Während ihr Vorkommen in großen Mengen im Gehirn und im Herz nachgewiesen ist, bleibt ihre Funktion noch weitgehend unklar. Bisherige Studienergebnisse zeigen, dass es sich bei der COX-3 lediglich um eine sog. Splicingvariante der COX-1 handelt (Chandrasekharan 2002, S. 13929ff).

Die Aktivität der COX lässt sich mit verschiedenen Substanzen beeinflussen. Dazu gehören Arzneimittel aus der Gruppe der nicht-steroidalen Antiphlogistika, COX-Hemmer, Glukokortikoide und Paracetamol. Diese Medikamente blockieren die Aktivität der Zyklooxygenasen, vermindern damit die Synthese der proinflammatorisch wirksamen Prostaglandine und führen letztlich zur Abschwächung der Entzündungsreaktion (Minghetti 2004, S. 901ff).

### **1.3 Moxifloxazin**

#### Allgemeines

Moxifloxazin (MXF) ist ein Antibiotikum aus der Gruppe IV der Fluorchinolone, das unter dem Handelsnamen Avalox® von der Firma Bayer AG, Leverkusen, synthetisiert und vertrieben wird.

Die heutigen Fluorchinolone, oder auch Gyrase-Hemmer, entfalten ihre Wirkung nicht nur an der bakteriellen Gyrase, sondern auch an anderen bakteriellen Enzymen. Hauptangriffspunkte von MXF sind neben der bakteriellen Topoisomerase II (DNA-Gyrase) die Topoisomerase IV. Diese Enzyme sind essentiell für die Synthese, Replikation, Transkription und

Rekombination der bakteriellen DNA. Durch die Inhibition dieser Enzyme entfalten die Fluorchinolone ihre rasche, bakterizide Wirkung (Hawkey 2003, S. 29ff).

Neben diesen antiinfektiven Eigenschaften werden den Fluorchinolonen auch immunmodulatorische Eigenschaften zugeschrieben. So konnte neben der antimikrobiellen Wirkung eine stimulierende Wirkung von MXF auf hämatopoetische und inflammatorische Zellen gezeigt werden (Shalit 2001, S. 289). Immunsupprimierte, leukopenische Mäuse zeigten unter MXF-Gabe eine raschere Normalisierung der Leukozyten sowie höhere Serumwerte an Zytokinen wie IL-6 und Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor (granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF). Dieser direkte Einfluss auf die Leukozyten deutet auf eine immunmodulatorische Wirkung von MXF hin (Shalit 2001, S. 293ff).

MXF zeichnet sich aus durch eine gute Wirksamkeit gegen grampositive, gramnegative und anaerobe Keime. Außerdem zeigt es eine verstärkte Aktivität gegen Erreger atypischer Atemwegsinfektionen wie Mykoplasmen, Chlamydien und Legionellen. Aus diesem Grund wird MXF in erster Linie zur antibiotischen Therapie von ambulant erworbenen Pneumonien („community acquired pneumonia“, CAP) eingesetzt (Caeiro 2003, S. 363ff).

Eine pharmakokinetische Besonderheit des Fluorchinolons MXF ist die exzellente Gewebegängigkeit und intensive intrazelluläre Anreicherung. Durch dieses hohe Verteilungsvolumen können auch in schwer erreichbaren Kompartimenten wie Knochen oder Prostata hohe Wirkkonzentrationen erreicht werden (Siefert 1999, S. 63). Bei oraler Gabe wird MXF mit über 90 % gut resorbiert. Auch eine parenterale Gabe ist problemlos möglich. Mit einer Halbwertszeit von 13 Stunden wird MXF überwiegend hepatisch eliminiert (Aktories 2005, S. 836).

### Moxifloxazin und seine Rolle bei ischämischen Ereignissen im Gehirn

Infektionen und Hyperthermie sind häufige und ernst zu nehmende Komplikationen des Schlaganfalles. Ihre Prävalenz ist bei dieser Patientengruppe höher als beispielsweise bei chirurgischen Patienten oder anderen Gründen des Krankenhausaufenthaltes (Prass 2003, S. 725). Eine aktuelle Studie deutet daraufhin, dass ein Immundefizit ursächlich für die erhöhte Infektionsgefahr nach Apoplex in Betracht zu ziehen ist. Dieses Schlaganfall-induzierte Immundepressionssyndrom (stroke-induced immunodepression syndrome, SIDS) ist durch eine schnell einsetzende und andauernde Unterdrückung der zellulären Immunantwort gekennzeichnet, die sich vor allem in einer gestörten Aktivität der natürlichen Killerzellen und

der T-Zellen zeigt (Prass 2003, S. 731). Diese Beeinträchtigung des Immunsystems stellt eine günstige Ausgangslage für bakterielle Infektionen dar, die letztlich in Pneumonien mit Bakteriämien und Septikämien münden können (Meisel 2004, S. 2). Als Folge bakterieller Sekundärinfektionen erhöhen Fieber und ein arterieller Hypotonus, wie sie beide im Rahmen Infektionen zu erwarten sind, das Risiko für ein schlechtes Outcome der Patienten (Hajat 2000, S. 412f).

Meisel und Kollegen zeigten in einem ischämischen Schlaganfallmodell bei der Maus, dass eine präventive Antibiose mit MXF nicht nur die Mortalität der behandelten Tiere signifikant reduziert, sondern auch das Infarktareal deutlich verkleinert. Vor allem im Zeitraum ab dem fünften Tag bleibt die Sterberate bei den MXF-behandelten Tieren konstant auf einem niedrigen Niveau, also genau in einer durch schwere Infektionen wie Pneumonien gekennzeichnete Phase. Zusätzlich zu der niederen Mortalitätsrate ist das neurologische Outcome der Apoplextiere signifikant besser als das der unbehandelten Kontrollgruppe. (Meisel 2004, S. 3ff).

Die neuroprotektive Wirkung von MXF ist nicht eindeutig geklärt. Zum einen könnte ein indirekter Einfluss über die Verhinderung bakterieller Infektionen bestehen und das Outcome dadurch verbessern. Zum anderen sind aber auch direkte Wirkmechanismen von MXF außer des antibakteriellen Effekts denkbar (Dalhoff 2005, S. 58; Meisel 2004, S. 6).

## **2 Zielsetzung der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses einer perioperativen Gabe von Moxifloxazin auf die zerebrale Inflammation im Hippokampus und das neurologische Outcome zum Zeitpunkt 24 Stunden nach extrakorporaler Zirkulation mit tief hypothermem Kreislaufstillstand an der Ratte.

### **3 Material und Methodik**

#### **3.1 Versuchstiere, Haltungsbedingungen und Akklimatisation**

Die Eingriffe und Untersuchungen wurden an 50 männlichen zehn bis zwölf Wochen alten Sprague-Dawley Ratten (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) mit einem durchschnittlichen Gewicht von 350 bis 400 g durchgeführt.

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß §8 des deutschen Tierschutzgesetzes durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen: 55.2-1-54-2531-28-07).

Zur Akklimatisation wurden die Ratten drei Wochen vor Versuchsbeginn in Gruppen von maximal vier Tieren in Makrolon Käfige Typ IV (55 x 35 x 20 cm) eingesetzt.

Futter (Altromin 1324, Haltungsfutter für Ratten, Altromin GmbH, Lage) und Wasser standen den Tieren über Futterraufen und Nippeltränken ad libitum zur Verfügung. Als Einstreumaterial diente entstaubtes und entkeimtes Weichholzgranulat (Lignocel, J. Rettenmaier & Söhne, Rosenberg). Um die Haltungsumwelt anzureichern, erhielten die Ratten zusätzlich täglich eine Hand voll entkeimtes Heu und eine Lage Zellstoff als Nestbau- und Beschäftigungsmaterial angeboten.

Die Unterbringung der Tiere erfolgte in einem fensterlosen, klimatisierten Tierstall mit einer durchschnittlichen Raumtemperatur von  $22 \pm 2$  °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von  $60 \pm 15$  %, sowie einem durch eine Zeitschaltuhr gesteuerten Hell/Dunkel-Rhythmus von jeweils zwölf Stunden. Hierbei betrug die Lichtintensität maximal 60 Lux im Käfig, gemäß den Vorschriften für Albinotiere (GV-SOLAS, 2004). Parallel zur Hellphase wurden die Ratten mit leiser Radiomusik beschallt (Radio GX, Panasonic), um eine Gewöhnung an die menschliche Geräuschkulisse zu erreichen.

#### **3.2 Tiermodell**

Die Tiere wurden randomisiert in fünf Gruppen zu je zehn Tieren aufgeteilt: DHCA-Moxifloxazin (DHCA-MXF), DHCA-Plazebo, Sham-Moxifloxazin (Sham-MXF), Sham-Plazebo sowie eine unbehandelte Kontrollgruppe (s. Abb. 1). Die Durchführung der Operation erfolgte nach einem eigens für Ratten entwickelten Modell der extrakorporalen Zirkulation mit DHCA (Jungwirth 2006, S. 805ff).

Tiere der DHCA-Gruppen wurden anästhesiert, intubiert, kanüliert und anschließend einer extrakorporalen Zirkulation (EKZ) mit tief hypothermem Kreislaufstillstand (deep hypothermic circulatory arrest, DHCA) unterzogen. Sham-Tiere wurden ebenfalls anästhesiert, intubiert, und kanüliert, jedoch keiner EKZ mit DHCA ausgesetzt.

Ratten aus den beiden MXF-Gruppen erhielten die MXF-Lösung mit Narkoseeinleitung und weitere fünf Mal alle zwei Stunden intraperitoneal verabreicht. Die Injektionslösung besteht aus 100 mg/kg Körpergewicht (KG) Moxifloxazin, physiologischer Kochsalzlösung (NaCl, 0,9 %) und 1 M Salzsäure (HCl), die mit Natronlauge (NaOH) auf einen pH-Wert von 7,4 titriert wurde. Die Plazebo-Gruppen erhielten das gleiche Volumen einer reinen, isotonen Kochsalzlösung.

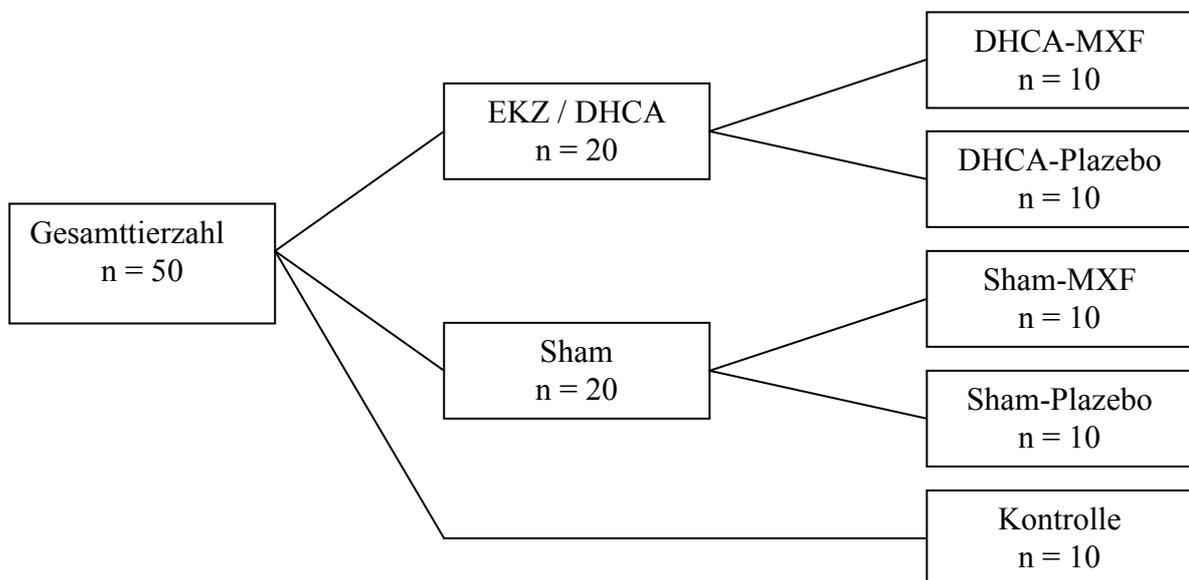


Abb. 1: Gruppenschema zur Einteilung der Tiere in die Versuchsgruppen mit jeweiliger Tieranzahl.

Am Tag -1 vor der Operation sowie am Tag +1 nach der Operation wurden alle Ratten einer neurologischen Untersuchung unterzogen. Im Anschluss an die neurologische Untersuchung am ersten postoperativen Tag wurden die Tiere in eine tiefe Isoflurannarkose versetzt. Nach der intrakardialen Blutentnahme zur Serumgewinnung wurde die Ratte durch Dekapitation euthanasiert. Zu histologischen und molekularbiologischen Untersuchungen wurde das Gehirn entnommen, auf Trockeneis schockgefroren und schließlich bei -80 °C gelagert.

Die Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe erfuhren keinerlei Anästhesie, chirurgische Präparation oder Injektion. Sie wurden nach der Akklimatisationsphase lediglich der neurologischen Untersuchung unterzogen und anschließend euthanasiert. Mit Gehirn und Serum wurde ebenso verfahren wie bei den Studientieren.

### **3.3 Versuchsdurchführung**

#### Chirurgische Präparation und Kanülierung

Nach der Randomisierung wurden die Tiere der DHCA- und der Sham-Gruppen alle von derselben Person operiert. Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere klinisch untersucht.

Zur Anästhesieeinleitung wurde die Ratte in eine durchsichtige Narkosebox aus Plexiglas gesetzt. Ein eingeleitetes Gasgemisch aus 5,0 Vol % Isofluran (Forene<sup>®</sup>, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden) und Sauerstoff (6 l/min) führte zu raschem Bewusstseinsverlust und einer Aufhebung der Stellreflexe. Je nach Gruppeneinteilung erhielten die Tiere nun nach Erreichen der gewünschten Anästhesietiefe die erste Dosis MXF (100 mg/kg KG) bzw. das gleiche Volumen NaCl 0,9 %. Die Bereiche der Inzisionsstellen (rechte Leiste, rechter Hals- und Thoraxbereich) wurden rasiert. Mit Hilfe eines modifizierten Nasenspekulums mit integrierter Fiberglasoptik und einer Taschenlampe als Sichthilfe erfolgte die endotracheale Intubation in Rückenlage mit einer modifizierten Venenverweilkanüle (14 GA, Vasofix<sup>®</sup> Safety, Fa. Braun Meisungen AG, Meisungen) als Tubus. Ein Kleintierbeatmungsgerät (Small Animal Ventilator KTR-4, Hugo Sachs Elektronik, March) im halboffenen System ohne Rückatmung mit konstanter Frischgaszufuhr von 0,8 l/min, vorgeschaltetem Präzisionsverdampfer (Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden) und angeschlossener Gasabsaugung ventilierte das Tier druck- und volumenkontrolliert für die Dauer der Operation mit Ausnahme der EKZ und DHCA. Mit Hilfe eines Atemgasmonitors (Capnomac, Fa. Datex, Helsinki, Finnland) wurden die endexpiratorischen Gaskonzentrationen von CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> und Isofluran sowie die Atemfrequenz und der Beatmungsdruck überwacht. Dabei atmeten die Tiere während der Präparation 2,0 bis 2,5 Vol % Isofluran in 40 % Sauerstoff und 55 % Druckluft, mit einer Atemfrequenz von ca. 50 Atemzügen pro Minute und einem Beatmungsdruck von 11 bis 15 mmHg. Die Beatmung wurde so angepasst, dass ein Kohlenstoffdioxid-Partialdruck (PaCO<sub>2</sub>) zwischen 30 und 40 mmHg gewährleistet war.

Eine Pflegesalbe (Bepanthen<sup>®</sup>, Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital, Leverkusen) wurde auf die Kornea aufgetragen, um diese vor Austrocknung zu schützen. Ebenso beugte ein mit

physiologischer Kochsalzlösung getränkter Wattebausch der Austrocknung der Maulschleimhaut vor.

Temperatursonden (Newport® Hypodermic Needle Temperatur Probes, Hyp-1, Newport Electronics, Santa Ana, USA) wurden im rechten M. temporalis und rektal platziert um sowohl die perikranielle als auch die Körperkerntemperatur zu messen.

Für die Präparation der Gefäßzugänge (A. sacralis mediana, A. epigastrica superficialis der rechten Leistengegend und rechte V. jugularis externa) wurde die Haut zunächst mit Cutasept® F (Fa. Bode, Hamburg) desinfiziert. Durch subkutane Infiltration mit Lidocainhydrochlorid (Xylocain 2 %, Astra Zeneca, Großbritannien) wurde das betroffene Gewebe lokal anästhesiert. Nach der Hautinzision und einer stumpfen Trennung des darunter liegenden subkutanen Gewebes wurde das zu kanülierende Gefäß isoliert dargestellt. Mit einem Faden (4-0 PH-Seide, Ethicon®, Ethicon GmbH, Norderstedt) bandt man den distalen Abschnitt des Gefäßes ab und umschlingte mit einem zweiten Faden proximal das Gefäß um später den Katheter darin zu fixieren. Nach vorsichtiger Inzision der Gefäßwand mit einer mikrochirurgischen Schere wurde der mit heparinisierte Vollelektrolytlösung (Thomaejoninlösung®, DeltaSelect GmbH, Pfullingen) gefüllte Katheter in das Gefäß eingebracht. Anschließend wurde die Schlinge zugezogen, verknotet und so der Katheter im Gefäß fixiert.

Die Schwanzarterie diente während der EKZ als arterieller Zufluss. Als Zuflusskanüle fand ein Venenverweilkatheter (20 GA, Insyte-W™, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) Verwendung, über den mit 150 IE Heparin Natrium (Liquemin® N 25000, Hoffmann - La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) vollheparinisiert wurde. Zusätzlich erfolgte die repetitive Gabe von Fentanyl in 5 µl-Boli zur Analgesie über diesen Katheter.

Um die invasive Blutdruckmessung während der EKZ zu sichern wurde in der rechten A. epigastrica cranialis superficialis ein angespitzter Polyethylen-Katheter (PE 10, Intramedic™, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) platziert. Verbunden mit einem Monitor (Eagle® 4000, GE Medical Systems Deutschland, Solingen) über einen Druckdom (MX 960, Fa. Medexmedical, Lancashire, Großbritannien) wurden damit systolischer, diastolischer sowie mittlerer arterieller Druck (mean arterial blood pressure, MAP) gemessen.

Für das Intensivmonitoring während der Operation wurden neben Blutdruck- und Temperaturmessung Parameter aus Blutgasanalysen und Elektrokardiographie erhoben.

Um während der EKZ die venöse Drainage zu ermöglichen wurde über die rechte V. jugularis externa an der kaudoventralen Halsseite ein 4,5 Fr großer, mehrfach perforierter Katheter

(Dipl. Ing. M. Humbs, Valley) bis in den rechten Vorhof vorgeschoben. Auf diese Weise wurde nicht nur der rechte Vorhof, sondern auch die V. cava caudalis und die bei Ratten regelmäßig vorkommenden rechten und linken V. cava cranialis vollständig drainiert.

Um das Wundgebiet vor Austrocknung zu schützen, wurden die Wundränder mit einer Einzelnaht (4-0 Prolene<sup>TM</sup>, Ethicon®, Ethicon GmbH, Norderstedt) adaptiert und mit einem in physiologischer Kochsalzlösung getränkten Tupfer feucht gehalten.

### Aufbau der EKZ

Im Anschluss an die Präparation und Kanülierung wurden die Tiere der DHCA-Gruppe an die EKZ angeschlossen. Diese wurde ermöglicht durch eine Herz-Lungen-Maschine (HLM) und Schlauchsysteme aus Kunststoff (Innendurchmesser 1,6 mm, Tygon®, Cole-Parmer Instrument Co., Illinois). Der speziell an die Ratte adaptierte Membranoxygenator benötigte bei einem Volumen von nur 4 ml kein zusätzliches Fremdblut zum Befüllen. Der Oxygenator bestand aus zwei 12,8 x 12,8 x 2,7 cm großen Plexiglasplatten mit einer dazwischenliegenden Diffusionsmembran (Hohlfasermembran, Jostra AG, Hirrlingen), die eine Gasaustauschfläche von 558 cm<sup>2</sup> besaß. Aus einem temperaturregulierbaren Wasserbad (Polystat Control cc2, Peter Huber Kältemaschinenbau GmbH, Offenburg) wurde zum Wärmeaustausch Wasser im Oxygenator am Blutkreislauf vorbeigepumpt. Weitere Elemente der HLM sind ein venöses Reservoir (Plexiglas®, Dipl. Ing. M. Humbs, Valley), eine Rollerpumpe (Masterflex®, Cole-Parmer Instrument Co., Illinois) und ein Flowmeter (T 208, Transonic Volume Flowmeter, Transonic Systems Inc., Ithaca ) zur kontinuierlichen Erfassung der arteriellen Zuflussrate.

Das Schlauchsystem wurde mit 10 ml Hydroxyethylstärke (HAES 60 mg/ml, Voluven®, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg) gefüllt und entlüftet. Dieser Vorgang wird in der Fachsprache als „Priming“ bezeichnet.

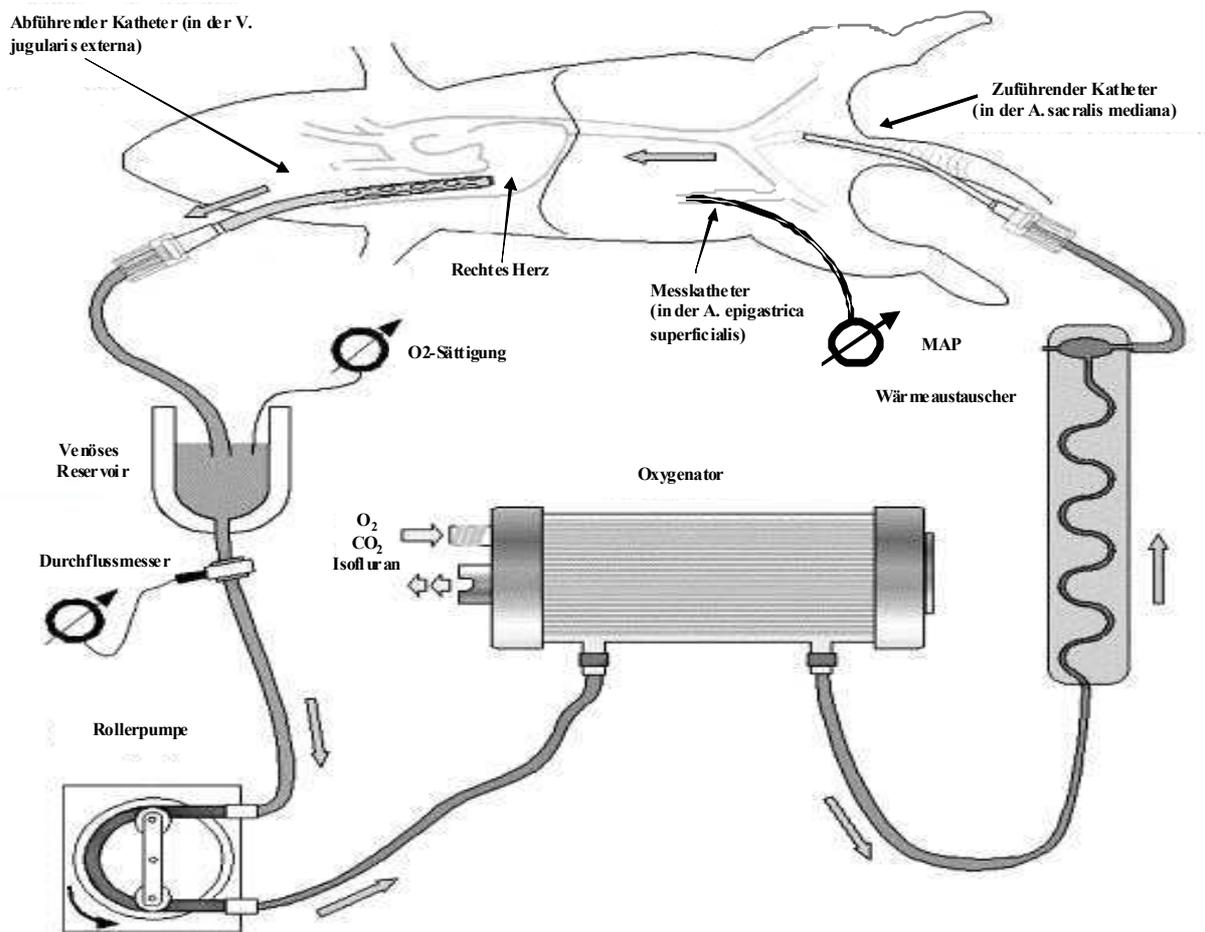


Abb. 2: Schematische Darstellung der EKZ an der Ratte (modifiziert nach Dielemann 2006, S. 553)

### Beginn der EKZ und Abkühlungsphase

Mit Beginn der EKZ wurde das venöse Blut aus dem rechten Vorhof über den Katheter in der Vena jugularis externa in das venöse Reservoir drainiert. Über die Rollerpumpe wurde es von hier aus in den Oxygenator gepumpt, wo der Gasaustausch mit O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> und die Versorgung mit Isofluran stattfinden. Im weiteren Verlauf gelangte das Blut über den arteriellen Zuflusskatheter in der Schwanzarterie retrograd in die Aorta und versorgte von dort aus den kompletten Organismus.

Da von hier an der Gasaustausch nicht mehr in den Lungen sondern im Oxygenator ablief, konnte die maschinelle Beatmung eingestellt werden.

Zu Beginn der Abkühlungsphase wurde eine Blutflussrate von 160 – 180 ml/min/kg KG gewählt um dem physiologischen Herzzeitvolumen der Ratte möglichst zu entsprechen. Im Verlauf der dreißigminütigen Abkühlungsphase wurde die Blutflussrate schrittweise auf die Hälfte reduziert. Das Tier wurde dabei sowohl indirekt (Wärmetauscherfunktion des Oxygenators mit Hilfe des Wasserbades), als auch direkt (mit Eis gefüllte Handschuhe, Wärme- bzw. Kühlmatte) auf eine rektale Temperatur von 15 bis 18 °C herabgekühlt.

Die Anästhesie wurde in der Abkühlungsphase mit 0,8 bis 1,0 Vol % Isofluran über den Oxygenator aufrechterhalten und zusätzlich das Muskelrelaxans Cisatracurium (1,6 mg/h, Nimbex®, GlaxoSmithKline GmbH & Co KG, München) über das Reservoir verabreicht.

### DHCA

Sobald das Tier nach 30 min Abkühlungsphase eine rektale Temperatur von 15 bis 18 °C erreicht hatte, began der 45 minütige DHCA. Dazu wurden EKZ und Anästhesie eingestellt, der arterielle Zufluss abgeklemmt und die Ratte passiv in das venöse Reservoir entblutet. Definitionsgemäß kommt es während des DHCA durch die tiefe Körpertemperatur zu einer Asystolie und einem MAP von 0. Kardioplegische Lösungen waren dazu nicht notwendig.

### Wiedereinsetzen der EKZ und Aufwärmphase

Direkt im Anschluss an den DHCA began die 40 minütige Aufwärmphase. Die EKZ setzte wieder ein, zunächst mit einer niedrigen Blutflussrate von 105 ml/min/kg KG, die ab 20 °C Körpertemperatur auf 120 ml/min/kg KG und ab 30 °C auf 150 ml/min/kg KG gesteigert wurde und am Ende der Abkühlungsphase wieder physiologische Werte erreichte ( 160 bis 180 ml/min/kg KG). Parallel dazu setzte auch die Anästhesie wieder ein. Das Tier wurde mit 0,8 Vol % Isofluran versorgt. Über das venöse Reservoir wurde erneut Cisatracurium (1,6 mg/h) zur Relaxierung gegeben.

Die Erwärmung erfolgte durch eine Heizmatte und ein Warmluftgebläse (WarmTouch ® 5200, Nellcor, USA) bis eine Körpertemperatur von 35,5 °C erreicht wurde. Während zunächst eine Wiedererwärmung von 0,6 bis 0,9 °C pro Minute angestrebt wurde, sank die Erwärmungsrate im späteren Verlauf auf 0,1 bis 0,2 °C pro Minute.

Die Herztätigkeit setzte bei steigender Temperatur ohne weitere äußere Einflüsse wieder ein, zuerst in Form von Kammerflimmern und -flattern, später als einzelne Ersatzrhythmen mit verbreiterten QRS-Komplexen, die schließlich in einen Sinusrhythmus übergingen.

Bei niedrigen MAP-Werten (unter 50 mmHg) konnte ab einer Blutflussrate von 150 ml/min/kg KG und einer Körpertemperatur von 30 °C 20 µg/ml Norepinephrinhydrochlorid (Arterenol® 1 ml, Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt / Main) in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt zur Kreislaufunterstützung verabreicht werden. Natriumhydrogenkarbonat (84 mg/ml, DeltaSelect GmbH, Pfullingen) nach der Formel  $\text{Bikarbonat} = -\text{BE} \times 0,3 \times \text{kg KG}$  fand Einsatz bei einem Basenexzess von mehr als - 5 um den Blut-pH-Wert konstant zu halten bzw. azidotische Verschiebungen auszugleichen.

### Nachbeatmungsphase

Mit Erreichen der rektalen Temperatur von 35,5 °C endete nach 40 min die EKZ. Die maschinelle Beatmung setzte wieder ein, venöser und arterieller Schenkel der EKZ wurden abgeklemmt und die Rollerpumpe abgeschaltet. Das Restblut aus dem Schlauchsystem wurde gesammelt und bei 2000 Umdrehungen pro Minute zehn Minuten min zentrifugiert, mit HAES (6 %) und Kalzium verdünnt und als Erythrozytenkonzentrat langsam über die Schwanzarterie reinfundiert. Auf diese Weise konnte der Hämatokrit wieder auf über 30 % angehoben werden. Das Tier blieb für eine weitere Stunde nach EKZ mit 0,8 Vol % Isofluran anästhesiert und kontrolliert beatmet, während die Temperatur auf 36,5 °C angehoben wurde. Es folgte eine letzte Blutgasanalyse bevor alle Katheter gezogen, die Gefäße ligiert und die Wundränder mit Einzelheften verschlossen wurden. Nun wurde das Tier von der maschinellen Beatmung und dem Monitoring genommen und in eine mit O<sub>2</sub> angereicherte Plexiglasbox gelegt, wo nach selbstständigem Umdrehen aus der Rücken- in die Bauchlage und Wiedererlangen des Bewusstseins die Extubation erfolgte.

### Postoperative Überwachung

Zur Überwachung verblieb die Ratte postoperativ bis zum nächsten Morgen in der Plexiglasbox mit freiem Zugang zu Wasser und Futter. Traten während der postoperativen Nachbeobachtung neurologische Dysfunktionen auf oder zeigten die Tiere Anzeichen eines Kreislaufversagens, wurden die betroffenen Tiere sofort euthanasiert.

### **3.4 Dekapitation, Entnahme und Präparation des Gehirns**

24 Stunden nach Ende des DHCA wurden die Tiere durch Dekapitation getötet. Nach Intubation wurde in tiefer Isoflurannarkose (4,8 bis 5,0 Vol %) Blut direkt aus dem linken Ventrikel für spätere serologische Untersuchungen entnommen. Nach Zentrifugieren für drei Minuten bei 12000 rpm wurde das Serum abpipettiert und bei – 80 °C gelagert.

Danach wurden die Tiere durch Scherenschlag dekapitiert.

Nun erfolgte das Freipräparieren des Gehirns, indem Teile der Schädelkalotte abgetragen und das Gehirn mit Hilfe eines Spatels von basal aus der Schädelbasis mobilisiert wurde. Das Gehirn wurde vorsichtig mit Einfriermedium (Tissue Freezing Medium, Jung Leica Instruments, Nussloch) in einen Aluminiumzylinder platziert, in 2-Methylbutan (Merck, Darmstadt) auf Trockeneis eingefroren und bei – 80 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

### **3.5 Aufbereitung des Gehirns**

Das Gehirn wurde mit einem Kryotom (Mikrotom – Kryostat, HM 500 QM, Microtom GmbH, Walldorf) bei – 23 °C Kammer- und – 18 bis – 20 °C Objekttemperatur geschnitten. In der Schnittebene Bregma – 0,3 (Motorkortex) und – 3,3 (Hippokampus) wurden frontale Hirnschnittpräparate von 7 µm Dicke hergestellt. Bregma bezeichnet dabei den Schnittpunkt nach Paxinos und Watson, an dem sich Kranz- und Scheitellaht treffen (Paxinos 1982, S. 10ff).

Nach Beenden des Schneidens wurden die Objektträger mit aufgebrauchten Schnitten bei – 80 °C bis zu den anstehenden Färbungen aufbewahrt.

### **3.6 Konzentrationsbestimmung von Moxifloxazin in Gehirn und Serum**

Die Konzentrationsbestimmung von Moxifloxazin wurde zum einen an Gehirnhomogenisat, zum anderen an Serumproben durchgeführt, die beide zum Zeitpunkt 24 Stunden nach DHCA gewonnen wurden. Zur Messung wurde die Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatografie gewählt mit fluorimetrischer Bestimmung bei einer Anregungswellenlänge von 396 nm und einer Emissionswellenlänge von 504 nm. Die Messgrenze für den Moxifloxazingehalt im Hirngewebe (Signal-Rausch-Verhältnis 10:1) lagen hier bei 20 ng/g bzw. bei 20 ng/ml im Serum (Beckmann 2007, S. 767ff).

## **3.7 Histologie und molekularbiologische Untersuchungen**

### **3.7.1 Histologie**

#### **3.7.1.1 Immunhistochemische Einfach- und Doppelfärbung**

Mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung wurden verschiedene zerebrale Inflammationsparameter (COX-2, NFκB, TNFα, Makrophagen) dargestellt. Um die Verteilung von COX-2, NFκB und TNFα nachzuweisen, wurden zunächst die gesuchten Proteine, in einem zweiten Färbedurchgang die Neurone angefärbt (Doppelfärbung). Eine Einzelfärbung wurde zum Nachweis des Oberflächenantigens CD68 auf Makrophagen angefertigt.

Alle Färbungen wurden nach einem standardisierten Protokoll vorgenommen:

- Entnahme der Hirnschnitte aus dem Gefrierschrank und sofortige Fixierung in Paraformaldehyd 4% für vier Minuten (eigene Herstellung)
- Waschen mit Phosphat-gepufferten physiologischer Kochsalzlösung (Phosphate buffered saline PBS, eigene Herstellung)
- Blockierung der endogenen Peroxidase mit Wasserstoffperoxid-Methanol 3 % (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Methanol, eigene Herstellung) für zehn Minuten
- Waschen in PBS
- Blockierung mit Proteinblockierungsreagenz DAKO Protein Block Serum-Free (DakoCytomation, Denmark A/S, Glostrup Denmark) für 20 Minuten
- Inkubation mit Primärantikörper (s. Tabelle 1) gegen das gewünschte Protein für eine Stunde

Protein	Verdünnung	Verwendete Primärantikörper
COX-2	1:300	Monoklonaler rabbit Anti-COX-2, Cell Signaling, Beverly, USA
CD68 (Makrophagen)	1:50	Monoklonaler mouse Anti-CD68-Human Macrophage Marker, USBiological, Swampscott, USA
NFκB	1:500	Polyklonaler rabbit Anti-NFκB, Abcam, Cambridge, Großbritannien
TNFα	1:500	Polyklonaler rabbit Anti-TNFα, Acris Antibodies, Hiddenhausen

Tabelle 1: verwendete Antikörper zur Detektion der gesuchten Inflammationsproteine

- Waschen in PBS
- Inkubation mit Sekundärantikörper (Biotinylated Anti-rabbit IgG, BA-1000, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) in einer Verdünnung von 1:100 für 45 Minuten
- Waschen in PBS
- Auftragen von Horseradish Peroxidase konjugiertem Streptavidin (R.T.U. Horseradish Peroxidase Streptavidin; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) für 30 Minuten
- Färbung mit Diaminobenzidin (DAB, DakoCytomation, Denmark A/S, Glostrup, Denmark)
- Waschen in fließendem Leitungswasser

Ab dieser Stelle wurden die Hirnpräparate für die Makrophagenfärbung nicht dem folgenden Prozedere unterzogen, sondern nach entsprechendem Protokoll der HE-Färbung mit Hämatoxylin gegengefärbt und anschließend eingedeckt. Für den COX-2-, NFκB- und TNFα-Nachweis wurde weiter nach folgendem Protokoll weiterverfahren:

- Inkubation mit Primärantikörper gegen das neuronale Strukturprotein NeuN mit Anti-Neuronal Nuclei (Mouse NeuN, Monoclonal antibody; Chemicon International Inc., Temecula, USA) in einer Verdünnung von 1:1000 für eine Stunde
- Waschen in PBS

- Inkubation mit Anti-Mouse-Sekundärantikörper (Biotinylated anti-mouse IgG, BA-2001, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) in einer Verdünnung von 1:100 für 45 Minuten
- Waschen in PBS
- Auftragen von mit alkalischer Phosphatase konjugiertem Streptavidin (Alkaline Phosphatase Streptavidin; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) in einer Verdünnung von 1:200 in einer eigens hergestellten Pufferlösung für 30 Minuten
- Färben mit Vector Red (Vector<sup>®</sup> Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) für 30 Minuten
- Waschen in PBS
- Entfärben in aufsteigender Alkoholreihe (jeweils eine Minute in Ethanol 70%, 96% und 100%)
- Fixierung in Roti-Histol für einmal zwei und einmal fünf Minuten
- Eindecken mit Roti-Histokitt auf Objektträger

Unter dem Lichtmikroskop ermittelte ein geblindeter Untersucher durch manuelles Auszählen (Vergrößerung 400fach) die Anzahl doppeltgefärbter Neurone im Hippokampus. Diese sind rot für NeuN und braun für das jeweils gesuchte Protein COX-2, NFκB, TNFα oder CD68 angefärbt (s. Abb. 3).

### **3.7.1.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Färbung erfolgte nach Standardprotokoll (Romeis 1989, S. 214). Nach Fixierung der Schnitte auf dem Objektträger in reinem Ethanol (Merck Kg A, Darmstadt) wurden mit Hämatoxylin nach Mayer (hausinterne Apotheke) basophile Strukturen angefärbt. Nach dem Bläuen in Leitungswasser erfolgte das Anfärben eosinophiler Zellstrukturen mit Eosin in wässriger Eosin-Dinatrium-Lösung (hausinterne Apotheke).

Ein den Versuchsgruppen gegenüber geblindeter Untersucher zählte anschließend unter dem Lichtmikroskop manuell die absolute Neuronenanzahl. Dabei wurde die größtmögliche

Vergrößerung gewählt (400fach), in der jeweils fünf Sichtfelder (high power field, HPF) im Hippokampus jeweils beider Hemisphären ausgezählt wurden. Gezählt wurden sowohl intakte als auch geschädigte Neurone. Vitale Neurone sind gekennzeichnet durch eine rundliche Form, basophiles Zytoplasma und einen basophilen Zellkern mit prominentem Nukleolus. Geschädigte Neurone sind dagegen stark eosinophil angefärbt und haben eine drei- bis mehreckige Form; Zellkern und Nukleolus sind meist nicht erkennbar (s. Abb. 8).

### **3.7.2 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)**

Die RT-PCR wurde als Verfahren zur semiquantitativen Bestimmung der Expression auf Genomebene benutzt. In unserer Studie wurde die Menge der transkribierten mRNA für die Inflammationsmarker COX-2 und TNF $\alpha$  bestimmt. Dazu wurde nach RNA-Extraktion mittels Reverser Transkriptase die vorhandene mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Diese wurde durch die PCR vervielfältigt und letztlich semiquantitativ bestimmt.

#### Gewebeaufbereitung mit RNA-Extraktion

- Zerkleinern des gefrorenen Hippokampus in flüssigem Stickstoff mittels Steinmörser
- Lösen der pulverisierten Hirnsubstanz in eisgekühlter Phenollösung (Trizol<sup>®</sup> Reagent, Fa. Invitrogen<sup>™</sup>, Carlsbad, USA)
- Zugabe von 350  $\mu$ l Chloroform
- Gut schütteln, anschließend Zentrifugieren bei 12000 rpm für 15 Minuten
- Abpipettieren des farblosen Überstandes und Zugabe von Isopropanol des gleichen Volumens
- Inkubieren bei Raumtemperatur für zehn Minuten, anschließend für 15 Minuten bei 12000 rpm zentrifugieren
- Überstand vollständig abpipettieren
- Waschen des zurückbleibenden Pellets in mindestens 300 $\mu$ l Ethanol 70%
- Trocknen des Pellets und anschließendes Lösen in 20  $\mu$ l sterilem H<sub>2</sub>O
- Einlagern bei – 80 °C im Gefrierschrank

### RNA-Konzentrationsbestimmung

Nach dem Auftauen wurde ein Teil der Probe mit sterilem Wasser auf 1:40 verdünnt und der RNA-Gehalt bestimmt. Dazu wurde die Adsorption (OD) der Lösung im Photometer bei 260 nm und 280 nm gemessen und der RNA-Gehalt der Probe nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{RNA-Gehalt (in } \mu\text{g}/\mu\text{l)} = \text{OD}_{260 \text{ nm}} \times 40 \times 37$$

### cDNA-Synthese mit Reverser Transkriptase

Anhand des gemessenen RNA-Gehalts wurde das benötigte Volumen der einzelnen Proben berechnet um für alle den gleichen RNA-Gehalt von 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  zu erhalten. Anschließend

- Mischen von RNA 2  $\mu\text{g}$  mit Primer (Random Hexamer Primer, Fermentas, St. Leon - Rot) 0,2 $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$  und sterilem Wasser 11 $\mu\text{l}$
- Inkubieren des Gemisches bei 70 °C für fünf Minuten
- Zugabe von Reaktionspuffer 4  $\mu\text{l}$ , Desoxyribonukleosidtriphosphate 2  $\mu\text{l}$  (dNTP, dNTP Mix, Ambion, Austin, USA) und Diethyldicarbonatwasser (DEPC-Wasser, eigener Herstellung)
- Inkubation bei 37 °C für fünf Minuten
- Zugabe von Reverser Transkriptase (M-MuLV Reverse Transcriptase, Fermentas, St. Leon-Rot) 2  $\mu\text{l}$
- Inkubation bei 25 °C für zehn Minuten, dann bei 37 °C für eine Stunde
- Stoppen der Reaktion durch Erhitzen auf 70 °C für zehn Minuten
- Lagerung bei – 20 °C

### PCR mit Taq-Polymerase

- Herstellungen eines 25  $\mu\text{l}$  Ansatzes „Master Mix“ aus H<sub>2</sub>O 16,25  $\mu\text{l}$ , Puffer 2,5  $\mu\text{l}$ , dNTP 4  $\mu\text{l}$ , Primer (vorwärts) und Primer (rückwärts) mit je 0,5  $\mu\text{l}$  (siehe Tab. 2) sowie Taq-Polymerase (TNF $\alpha$ -Nachweis: illustra<sup>TM</sup>, Taq DNA Polymerase, GE Healthcare UK Ltd, Little Chalfont, Großbritannien; COX-2-Nachweis: Taq DNA Polymerase, Fermentas, St. Leon-Rot).

	Primerbasensequenz	Accession Nr.	Produktlänge in Basenpaaren (bp)
COX-2	Fwd : 5'- TGATGACTGCCCAACTCCCATG -3' Rev: 5'- AATGTTGAAGGTGTCCGGCAGC -3'	RATCYLO2X L25925	723 bp
TNF $\alpha$	Fwd: 5'- CTCAAAAC TCGAGTGACAAGC -3' Rev: 5'- CCGTGATGTCTAAGTACTTGG -3'	TNFA_RAT NM_031144.2	203 bp

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Primerbasensequenzen zur DNA-Amplifizierung der Proteine COX-2 und TNF $\alpha$ .

- Mischen von Master Mix 24  $\mu$ l mit cDNA 1  $\mu$ l
- Installation der cDNA-Master-Mix-Mischung in Thermocycler (MyCycler<sup>TM</sup> Thermal Cycler, BioRad Laboratories, München) und Starten der PCR nach jeweiligem Cyclerprotokoll (s. Tabelle 3)

	COX-2			TNF $\alpha$	
	°C	min		°C	min
<b>Initial-Denaturierung</b>	94	4	} x40	94	4
<b>Denaturierung</b>	94	1		94	1
<b>Primer-Hybridisierung</b>	64	0,5		48,6	0,66
<b>Extension</b>	72	1		72	1
<b>Finale-Extension</b>	72	10		72	7
					} x35

Tabelle 3: Übersicht über die PCR-Thermocyclerprotokolle für COX-2 und TNF $\alpha$ .

### Elektrophorese der PCR-Produkte

Anschließend wurden 10 µl PCR-Produkte in einem mit Ethidiumbromid versetzten Agarosegel (1,8 % Roti®Garose, Fa. Roth, Karlsruhe) ihrer Länge nach im elektrischen Feld aufgeteilt (Spannung 80 V für 1,5 Stunden).

### Auflegen des Gels und Entwicklung in der Image Station

Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf die Image Station (Image Station 440 CF, Kodak ds digital science™, Eastman Kodak Company, Rochester, USA) aufgelgt um die Leuchtintensität der Banden semiquantitativ zu bestimmen. Bei Ultraviolet- (UV-) Beleuchtung der Wellenlänge 300 bis 400 nm wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente sichtbar gemacht. Über einen Zeitraum von 16 Minuten wurden insgesamt 32 Bilder angefertigt und anschließend mittels der Programmsoftware Kodak Image Station anhand der Graustufe ausgewertet. Eine Zuordnung der Banden erfolgte anhand eines mit auf das Gel aufgetragenen Markers (FastRuler™ Low Range, Fa. Fermentas, St. Leon-Roth), der definierte Fragmentlängen in Basenpaareinheiten (bp) vorgibt.

## **3.8 Neurologische Untersuchung**

Neurologische Defizite, die durch EKZ und DHCA verursacht werden, sollten anhand einer standardisierten Untersuchungsreihe aufgedeckt und in ihrem Schweregrad beurteilt werden. Herangezogen wurden Tests zu Bewusstsein, Gleichgewicht, Koordination, Muskelkraft sowie eine Beurteilung des Pflegeverhaltens.

Um einen Vergleich herstellen zu können, wurde eine erste Untersuchung am ersten präoperativen Tag durchgeführt und damit die Ausgangswerte (Baseline) erhoben. Die Untersuchung einen Tag nach DHCA diente dann der Erhebung postoperativer neurologischer Defizite. Bewertet wurden die Tiere anhand eines aufsteigenden Punkteschemas. Diese Werte aus den verschiedenen neurologischen Tests wurden addiert und ergaben einen sog. Motorscore. Unauffällige Tiere schnitten mit dem Score 0 ab, das Maximum des neurologischen Defizits stellte ein Score von 18 dar.

### 3.9 Statistik

Die statistische Bewertung der physiologischen Parameter erfolgte mit allgemeinen linearen Modellen. Beurteilt wurden der Zwischensubjektfaktor „Gruppe“ (DHCA-MXF, DHCA-Plazebo, Sham-MXF, Sham-Plazebo, unbehandelte Kontrolle) und der Innersubjektfaktor „Zeit“, sowie diverse Wechselwirkungsbeziehungen oder deren Interaktion (Zeit (t) x Gruppe). Der Faktor Zeit wurde für die physiologischen Parameter quadratisch ( $t^2$ ) ausgewertet. Die biochemischen, histologischen und funktionellen Ergebnisse wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test ausgewertet. Ergaben sich zwischen den Gruppen Signifikanzen, schließen sich post hoc Mann-Whitney-Tests an ( $p < 0,05$ ). Die statistischen Analysen wurden mit SPSS Version 16.0 für Windows (SPSS Inc., an IBM Company, Chicago, USA) ausgeführt.

## 4 Ergebnisse

Insgesamt mussten auf Grund technischer Probleme (Kanülierungsprobleme, unzureichender venöser Rückfluss) sieben Tiere ausgeschlossen werden. Um eine gleichbleibende Gruppengröße zu gewährleisten wurden diese Tiere ersetzt.

### 4.1 Physiologie

Vor Beginn der EKZ (Prä-EKZ), vor dem Beginn des DHCA (Prä-DHCA), fünf Minuten nach Einsetzen der Wiedererwärmung (Post-DHCA), fünf Minuten vor Ende der EKZ (EKZ-Ende) sowie eine Stunde nach EKZ (Post-EKZ) wurden folgende physiologischen Parameter gemessen: mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), Hämoglobin (Hb), arterieller Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ), arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck ( $paCO_2$ ), Basenüberschuss (BE) und Glukose im Vollblut.

Der MAP fiel bei allen Gruppen während der operativen Phase leicht ab, wobei die DHCA-MXF-Gruppe früher und deutlicher im Vergleich abfiel als die anderen Gruppen. Auch die DHCA-Plazebo-Gruppe zeigte zunächst einen deutlichen Abfall, war im Vergleich zur DHCA-MXF-Gruppe zum Zeitpunkt nach der EKZ jedoch erhöht.

Während die Hb-Konzentration bei beiden DHCA-Gruppen versuchsbedingt deutlich absank und am Ende der operativen Phase nur leicht wieder anstieg, sank die der beiden Sham-Gruppen nur geringfügig ab.

Die Werte des  $PaCO_2$  blieben während der gesamten Durchführung in allen Gruppen im Bereich der Norm.

Zu Beginn des Versuchs starteten alle Tiere mit einem  $PaO_2$  im physiologischen Bereich. Bei den beiden DHCA-Gruppen wurden während der EKZ versuchsbedingt hohe Werte ermittelt, die sich am Ende der operativen Phase wieder normalisierten.

Ein Verbrauch an Basen wurde in den beiden DHCA-Gruppen durch das Absinken des BE im Verlauf deutlich, während beide Sham-Gruppen einen BE im physiologischen Bereich aufwiesen.

Der Blutglukosespiegel bewegte sich bei den beiden Sham-Gruppen während der gesamten operativen Phase konstant in physiologischen Bereichen; dagegen stieg die Blutzuckerkonzentration der DHCA-Tiere bis an das Ende der EKZ kontinuierlich an und erreichte eine Stunde postoperativ wieder normale Werte (s. Tabelle 4).

Parameter	Gruppe	Prä-EKZ	Prä-DHCA	Post-DHCA	EKZ-Ende	Post-EKZ	Zeit <sup>2</sup> x Gruppe	Zeit <sup>2</sup>
MAP (mmHg)	Sham-Plazebo	86 ± 3	81 ± 3	71 ± 3	1)	71 ± 4	n.s.	p < 0,001
	Sham-MXF	82 ± 5	73 ± 5	63 ± 3		61 ± 3		
	DHCA-Plazebo	87 ± 3	64 ± 7	50 ± 6 §		76 ± 6 ‡		
	DHCA-MXF	74 ± 4	40 ± 2 *	35 ± 1 §		59 ± 3		
Hämoglobin (g/dl)	Sham-Plazebo	14,0 ± 0,2	13,4 ± 0,2	12,1 ± 0,4	12,3 ± 0,2	11,4 ± 0,2	p = 0,006	p < 0,001
	Sham-MXF	14,8 ± 0,3 #	13,9 ± 0,4	13,0 ± 0,3	12,5 ± 0,3	12,2 ± 0,3		
	DHCA-Plazebo	14,0 ± 0,2	6,9 ± 0,1 §	6,2 ± 0,2 §	6,0 ± 0,1 §	10,2 ± 0,3 §		
	DHCA-MXF	15,0 ± 0,2 #	7,3 ± 0,1 §	6,8 ± 0,1 §	6,7 ± 0,2 §	10,9 ± 0,3 §		
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	Sham-Plazebo	36 ± 1	34 ± 1	33 ± 1	34 ± 1	34 ± 0	n.s.	n.s.
	Sham-MXF	35 ± 1	35 ± 1	34 ± 1	34 ± 1	34 ± 1		
	DHCA-Plazebo	35 ± 1	34 ± 1	36 ± 2	35 ± 1	36 ± 1		
	DHCA-MXF	36 ± 1	36 ± 2	37 ± 2	37 ± 1	34 ± 1		
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	Sham-Plazebo	128 ± 7	139 ± 8	154 ± 7	173 ± 17	161 ± 7	n.s.	p = 0,027
	Sham-MXF	141 ± 9	139 ± 6	163 ± 11	157 ± 9	164 ± 10		
	DHCA-Plazebo	150 ± 15	523 ± 35 §	454 ± 21 §	425 ± 21 §	173 ± 21		
	DHCA-MXF	159 ± 5	493 ± 24 §	410 ± 23 §	375 ± 22 §	195 ± 18		
BE (mmol/l)	Sham-Plazebo	0,6 ± 1,6	0,2 ± 1,7	-0,89 ± 2,0	2)	2)	p < 0,001	p < 0,001
	Sham-MXF	0,1 ± 1,6	0,0 ± 2,3	-0,94 ± 1,6				
	DHCA-Plazebo	0,5 ± 2,2	-2,6 ± 1,5 §	-6,82 ± 1,5 §				
	DHCA-MXF	-0,5 ± 2,5	-3,7 ± 1,2 §	-6,91 ± 2,2 §				
Glukose (mg/dl)	Sham-Plazebo	138 ± 49	132 ± 39	146 ± 43	156 ± 36	145 ± 30	p = 0,009	p < 0,001
	Sham-MXF	139 ± 26	131 ± 21	145 ± 22	138 ± 30	123 ± 26		
	DHCA-Plazebo	140 ± 22	176 ± 30	259 ± 44 §	319 ± 107 §	193 ± 84		
	DHCA-MXF	146 ± 47	174 ± 63	273 ± 81 §	284 ± 138 §	162 ± 72		

\* DHCA-MXF vs. DHCA-Plazebo; § DHCA vs. Sham; ‡ DHCA-Plazebo vs. DHCA-MXF; # MXF vs. Plazebo

Tabelle 4: Tabellarische Darstellung der Mittelwerte (MW) und Standardfehler (±SEM) des mittleren arteriellen Druckes (MAP) in mmHg, des Hämoglobins (Hb) in g/dl, des arteriellen Kohlenstoffdioxidpartialdrucks (PaCO<sub>2</sub>) in mmHg, des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks (PaO<sub>2</sub>) in mmHg, des Basenüberschusses (BE) in mmol/l und der Glukose im Vollblut in mg/dl. Die Erfassung der Daten erfolgt zu den fünf definierten Zeitpunkten aller vier Gruppen (Sham-MXF, Sham-Plazebo, DHCA-MXF, DHCA-Plazebo).

Signifikanzen wurden mit p < 0,009 beschrieben, n.s. bedeutet nicht signifikant. Die Bezeichnung Zeit<sup>2</sup>xGruppe beschreibt den Einfluss der Gruppen auf die einzelnen Parameter, der statistisch signifikant bei Hb, BE und Glukose festzustellen ist. Im Zeitverlauf (Zeit<sup>2</sup>) zeigten alle erhobenen Parameter außer PaCO<sub>2</sub> versuchsbedingt statistisch signifikante Veränderungen. 1) Der MAP wurde durch Gabe von Norepinephrin auf über 45 mmHg gehalten. 2) Der BE wurde ab Beendigung des DHCA und eine Stunde nach EKZ kontrolliert und in physiologischen Grenzen gehalten.

## 4.2 Moxifloxazingehalt in Gehirn und Serum

Der Gehalt an Moxifloxazin in Gehirn und Serum wurde bei allen Tieren der MXF-Gruppen bestimmt. Dabei zeigte sich ein signifikant vermehrtes Vorkommen der Substanz 24 Stunden nach der Operation in der DHCA-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe sowohl im Gehirn als auch im Serum. Dabei zeigte in beiden Gruppen der Quotient aus den Serum-/ Gehirnwerten eine vierfach höhere Konzentration des Medikaments im Serum (s. Tab. 5).

	Moxifloxazingehalt im Gehirn (in ng/g)	Moxifloxazingehalt im Serum (in ng/ml)	Verteilungsquotient Serum / Gehirn
<b>DHCA-MXF</b>	1,52 ± 0,24 *	5,71 ± 0,93 *	3,76
<b>Sham-MXF</b>	0,28 ± 0,07	1,25 ± 0,03	4,46

\* p<0,05

Tab. 5: Moxifloxazingehalt in Serum und Gehirn im Vergleich der beiden MXF-Gruppen.

### 4.3 Histologie

Der durch die EKZ und die globale Ischämie verursachte neuronale Zellschaden ließ sich anhand histologischer Untersuchungen bestimmen. Verschiedene immunhistochemische Einfach- und Doppelfärbungen sowie die klassische HE-Färbung lieferten für die Region Hippokampus folgende Ergebnisse:

#### 4.3.1 Immunhistochemische Einfach- und Doppelfärbung

##### COX-2

In der immunhistochemischen Färbung erschienen die Neurone braun, die Inflammationsproteine, hier COX-2, exprimierten (s. Abb. 3).

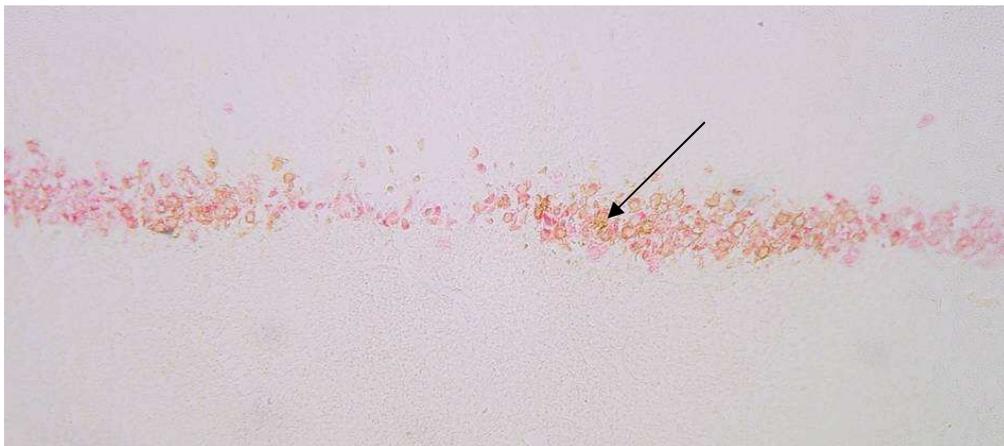
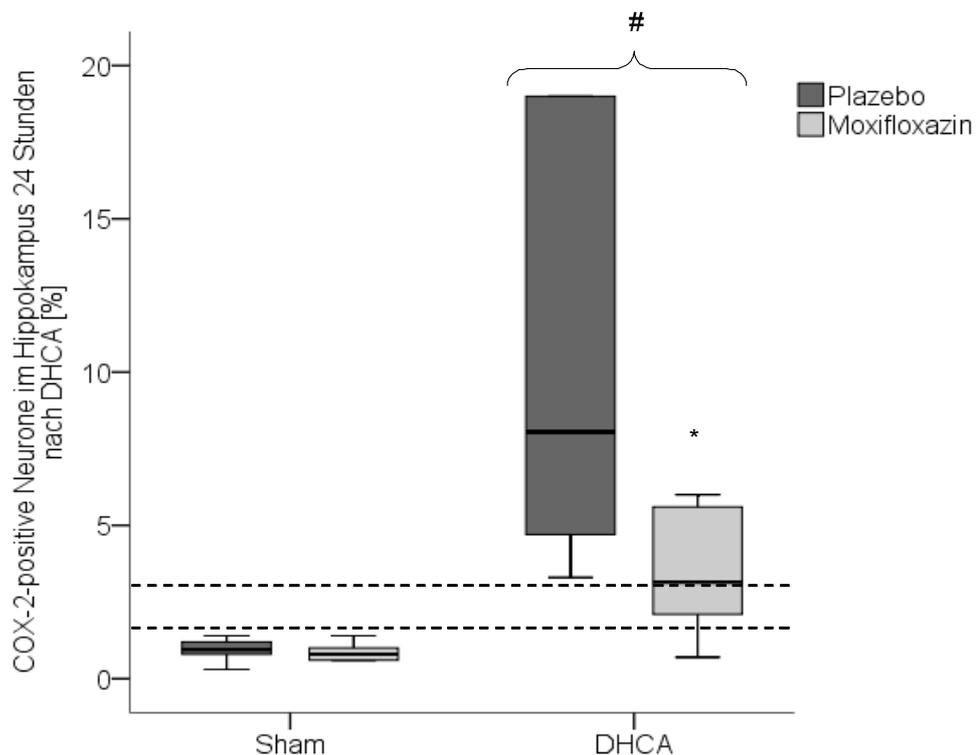


Abb. 3: Ausschnitt aus der immunhistochemischen Doppelfärbung der CA1-Region des Hippokampus. Neurone sind rot angefärbt. Die Inflammationsproteine, hier am Beispiel von COX-2, treten braun in Erscheinung (Pfeil). Vergrößerung 20fach.

Zusammengenommen zeigten beide DHCA-Gruppen im Vergleich zu den Sham-Gruppen ein größeres Vorkommen an Neuronen, die das inflammatorische Enzym COX-2 im Hippokampus exprimierten (#  $p < 0,001$ ).

In der DHCA-Plazebo-Gruppe fand sich von allen Gruppen die größte Anzahl an COX-2-positiven Neuronen. Eine signifikant niedrigere Zahl zeigte insbesondere die DHCA-MXF-Gruppe im Vergleich zur DHCA-Plazebo-Gruppe (\*  $p < 0,007$ ) (s. Abb. 4).



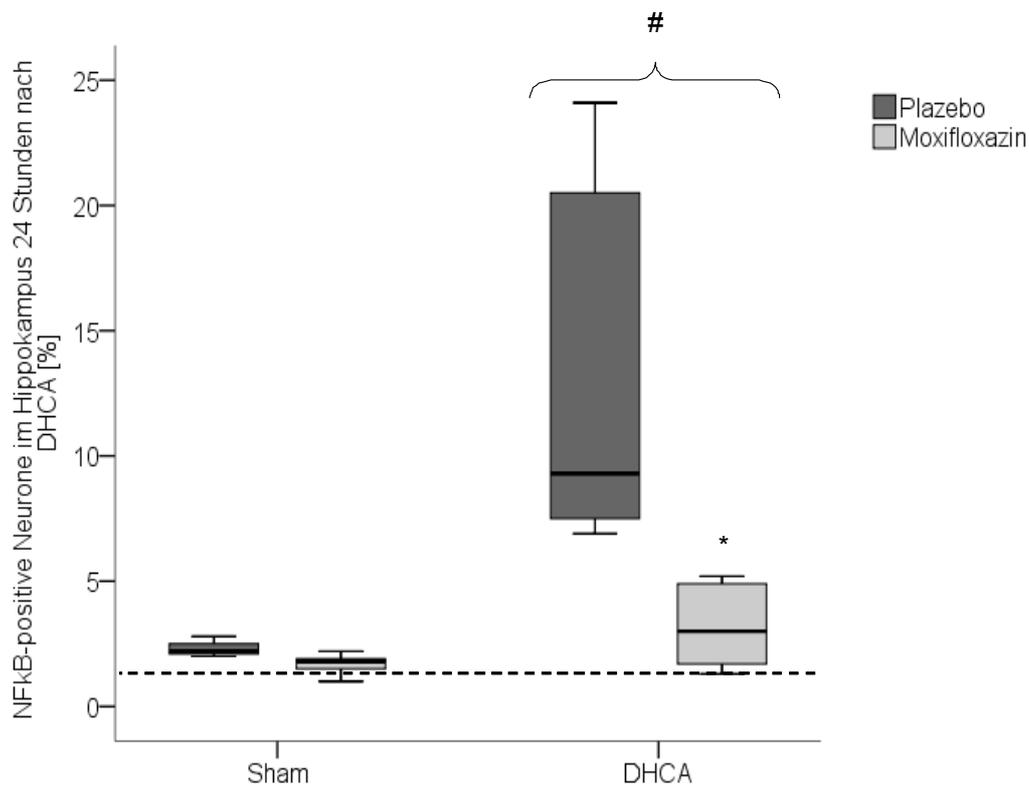
\*  $p < 0,007$  vs. DHCA-Plazebo

#  $p < 0,001$  vs. Sham

Abb. 4: Anteil der hippocampalen Neurone, die den Inflammationsparameter COX-2 exprimierten, jeweils aller Gruppen im Vergleich. Die gestrichelten Linien beschreiben die 10. und 90. Perzentile der unbehandelten Kontrollgruppe.

## NFκB

In den beiden DHCA-Gruppen war ein größeres Vorkommen an NFκB-positiven Neuronen nachweisbar im Vergleich zu den Sham-Gruppen (#  $p < 0,001$ ). Außerdem wurde der Inflammationsparameter NFκB in den Neuronen des Hippokampus in der DHCA-Plazebo-Gruppe am stärksten exprimiert. Eine signifikante Verminderung im Gegensatz zu dieser Gruppe zeigten die DHCA-MXF-Tiere (\*  $p < 0,001$ ) (s. Abb. 5).



\*  $p < 0,001$  vs. DHCA-Plazebo

#  $p < 0,001$  vs. Sham

Abb. 5: Anteil der hippocampalen Neurone, die den Inflammationsparameter NFκB exprimierten, jeweils aller Gruppen im Vergleich. Die gestrichelte Linie beschreibt die 90. Perzentile der unbehandelten Kontrollgruppe.

## TNF $\alpha$

Als zusätzlicher Marker konnte in den beiden DHCA-Gruppen eine größere Zahl TNF $\alpha$ -positiver Neurone nachgewiesen werden als in den Sham-Gruppe (# p<0,001). Die Anzahl TNF $\alpha$ -positiver Neurone im Hippokampus war in der DHCA-Plazebo-Gruppe im Vergleich zu allen anderen Gruppen am höchsten. Signifikant war die verminderte Zahl an Hippokampuszellen, die TNF $\alpha$  exprimierten, bei den DHCA-MXF-Tieren bezüglich der DHCA-Plazebo-Gruppe (\* p<0,001) (s. Abb. 6).

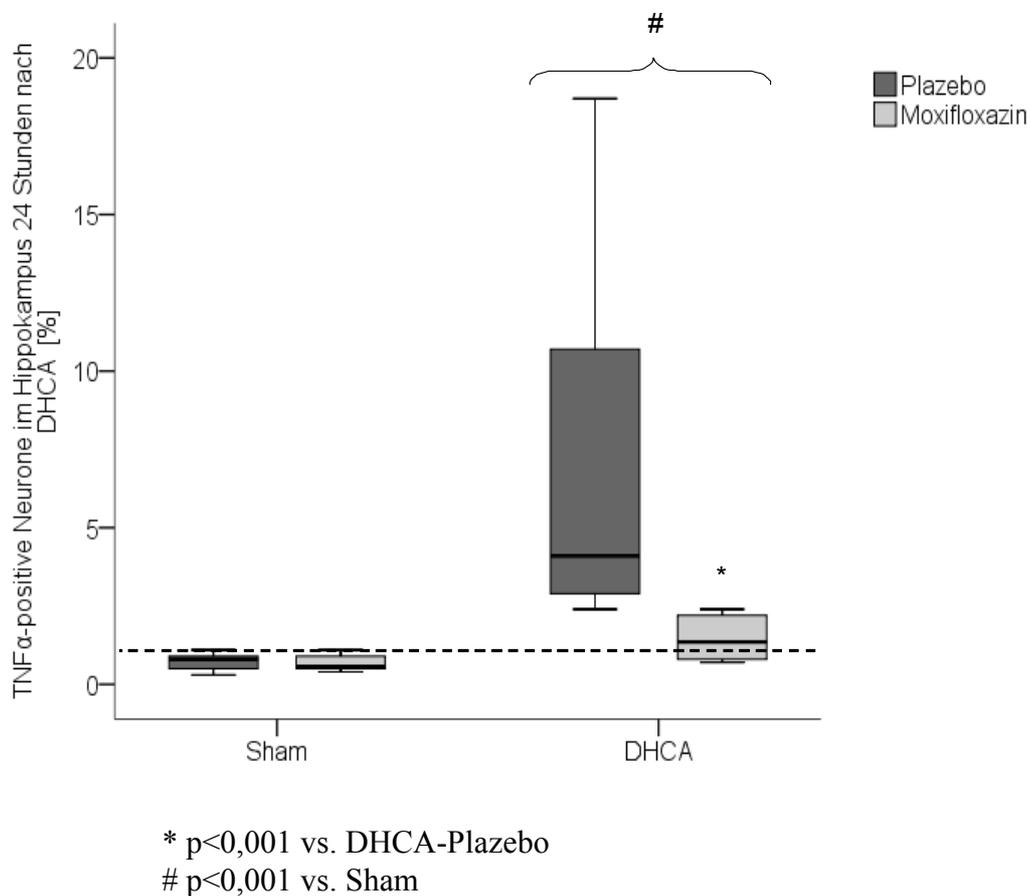
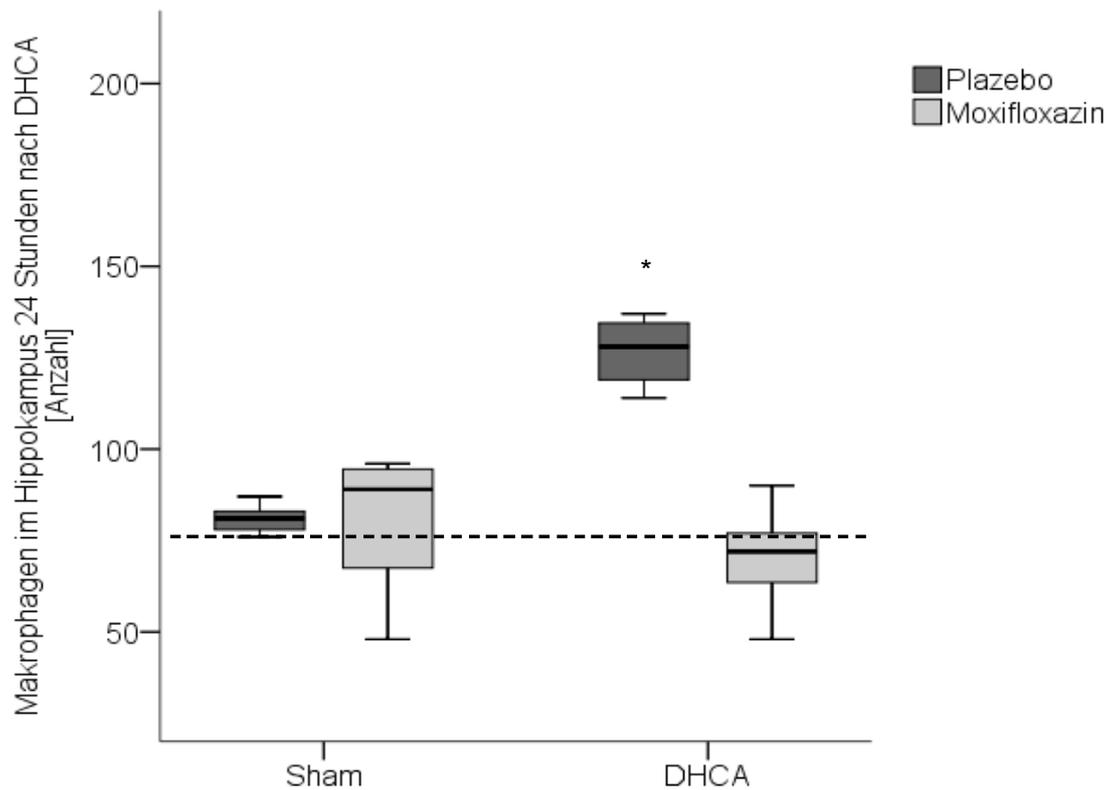


Abb. 6: Anteil der hippokampalen Neurone, die den Inflammationsparameter TNF $\alpha$  exprimierten, jeweils aller Gruppen im Vergleich. Die gestrichelte Linie beschreibt die 90. Perzentile der unbehandelten Kontrollgruppe.

## Makrophagen

Eine signifikant vermehrtes Vorkommen an Makrophagen war im Hippokampus der DHCA-Plazebo-Tiere nachweisbar im Vergleich zu allen anderen Gruppen (\*  $p < 0,001$ ) (s. Abb. 7).



\*  $p < 0,001$  vs. alle andere Gruppen

Abb. 7: Anzahl der Makrophagen im Hippokampus jeweils aller Gruppen im Vergleich. Die gestrichelte Linie beschreibt die 90. Perzentile der unbehandelten Kontrollgruppe.

### 4.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Durch manuelles Auszählen wurde die absolute Anzahl der geschädigten, rot angefärbten (eosinophilen) Neurone erhoben und ergab in Relation zur Anzahl der intakten Neurone den prozentualen Anteil an geschädigten Nervenzellen im Hippokampus (s. Abb. 8).

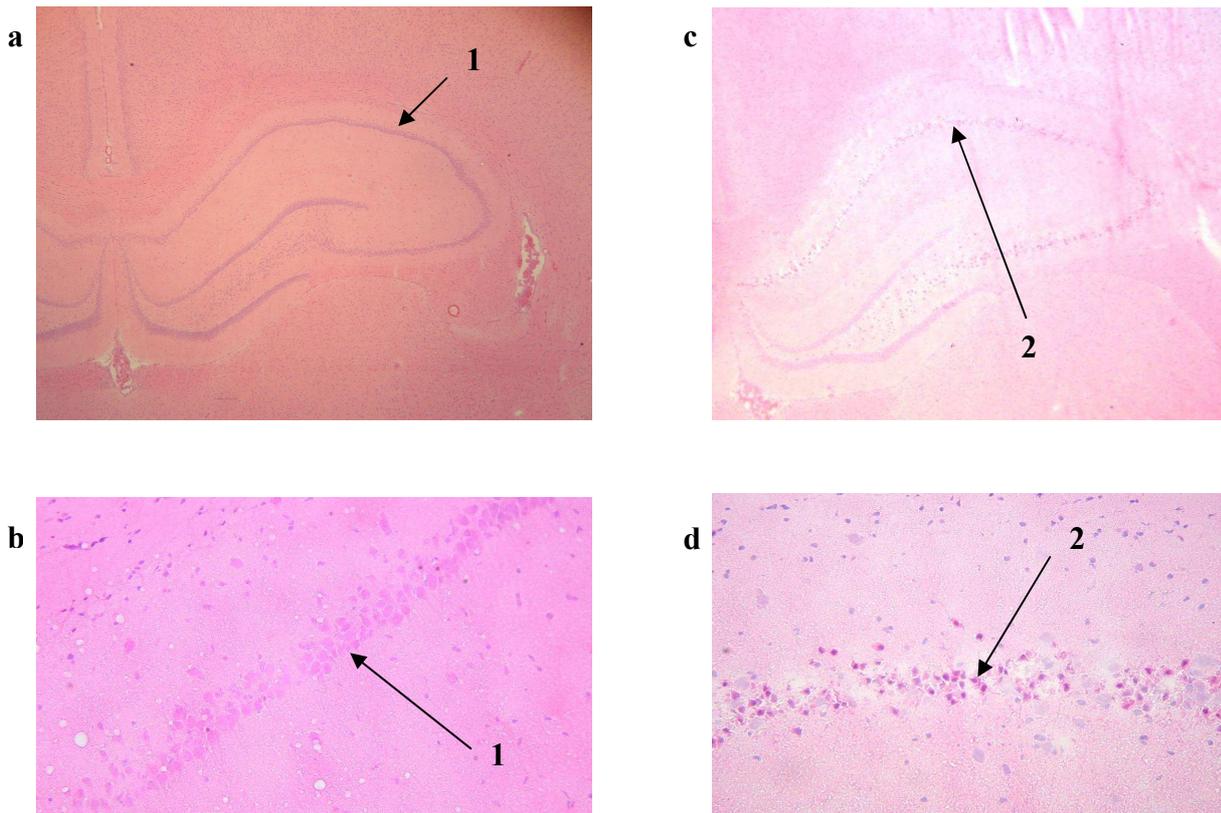


Abb. 8: HE-Färbung des Hippokampus bei Sham- (**a + b**) und DHCA-Tieren (**c + d**) in 2,5facher Vergrößerung (**a + c**) bzw. in 20facher Vergrößerung (**b + d**). Hervorgehoben durch Pfeile sind die normalen Neurone (**1**) bzw. die eosinophilen Neurone (**2**).

Der Anteil der geschädigten Neurone war in beiden DHCA-Gruppen signifikant höher als bei den Sham-Gruppen (\*  $p < 0,001$ ) (s. Abb. 9).

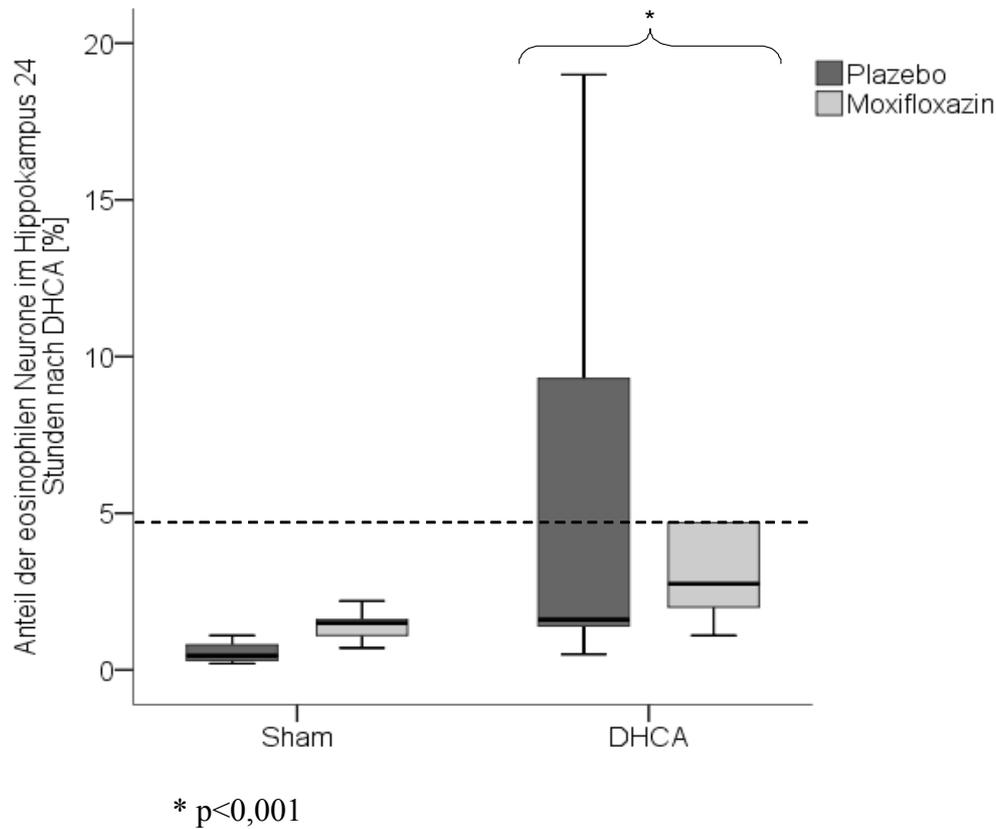


Abb. 9: Anteil der geschädigten Neurone an der Gesamtzahl der Neurone im Hippokampus jeweils aller Gruppen im Vergleich; die gestrichelte Linie beschreibt die 90. Perzentile der unbehandelten Kontrollgruppe.

#### 4.4 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Auf mRNA-Ebene konnten 24 Stunden nach DHCA keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachgewiesen werden. Die semiquantitative Bestimmung zeigte ein nur tendenziell vermehrtes Vorkommen von COX-2- und TNF $\alpha$ -mRNA in den beiden DHCA-Gruppen im Vergleich zu den Sham-Gruppen. Ein Einfluss von Moxifloxazin auf die mRNA-Expression war demnach nicht erkennbar (s. Abb. 10 a+b).

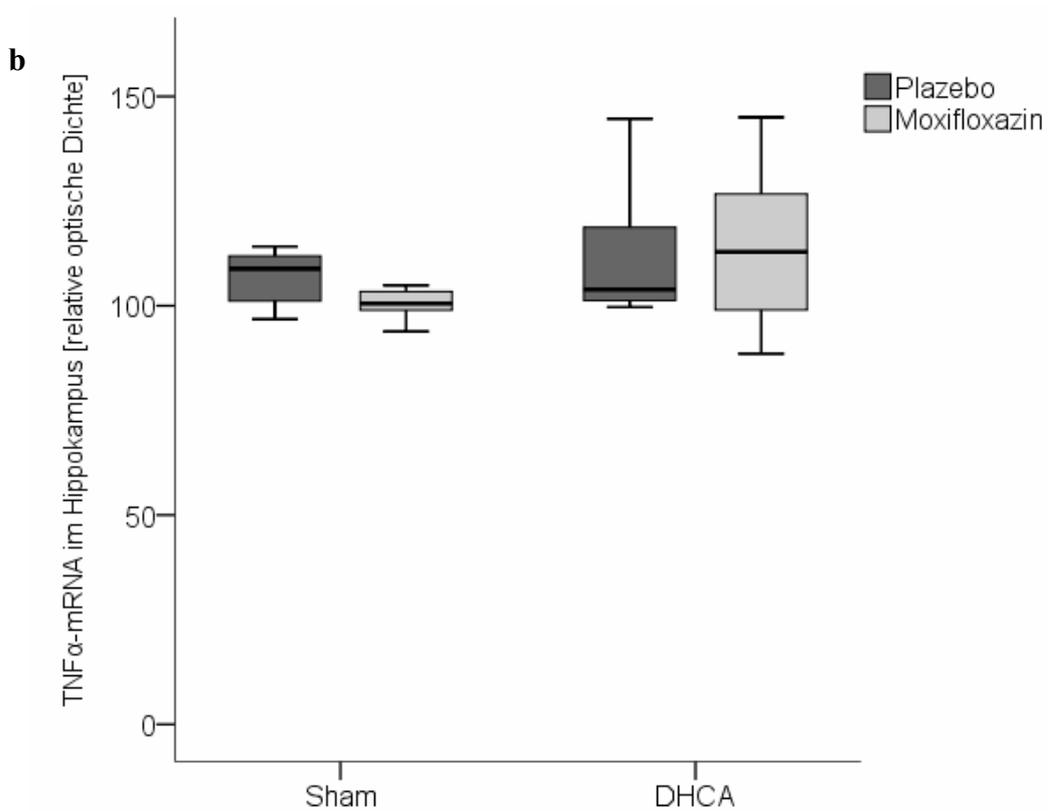
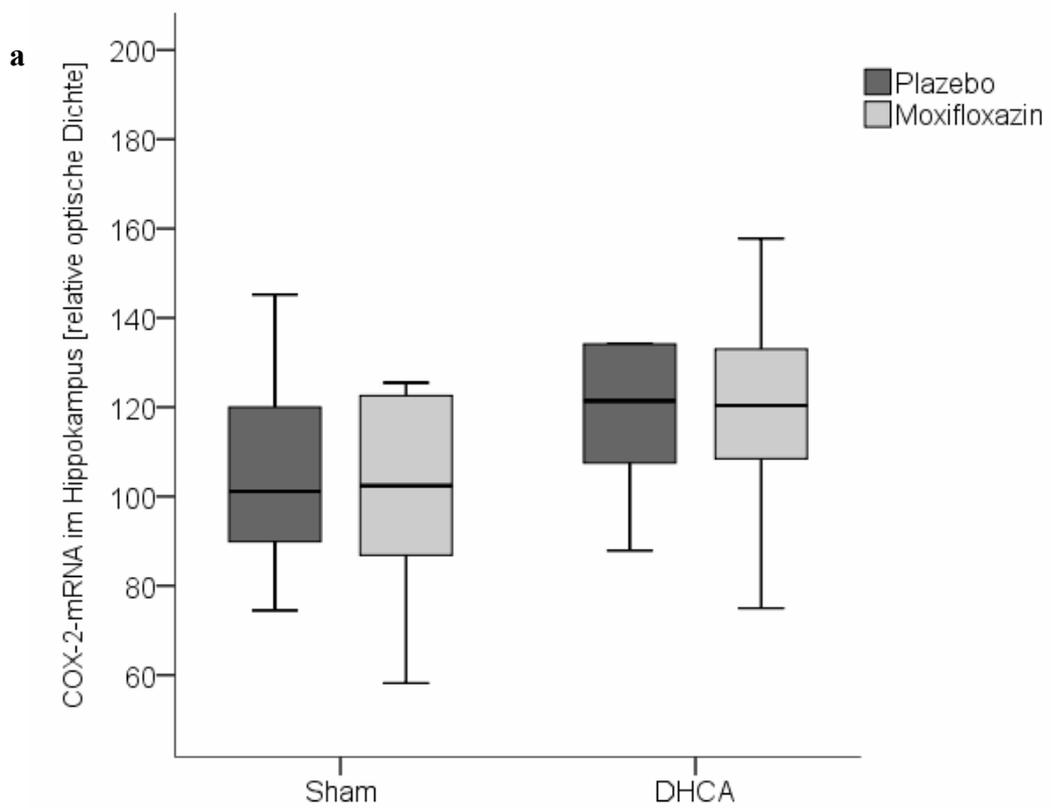


Abb. 10: Menge des mRNA-Gehalts im Hippokampus der beiden inflammatorischen Proteine COX-2 (**a**) und TNF $\alpha$  (**b**) anhand ihrer relativen optischen Dichte.

## 4.5 Neurologische Untersuchung

Beide DHCA-Gruppen zeigten eine signifikante Verschlechterung der neurologischen Leistungsfähigkeit am ersten postoperativen Tag im Vergleich zu beiden Sham-Gruppen. Ein Einfluss von Moxifloxazin war nicht erkennbar (s. Abb. 11).

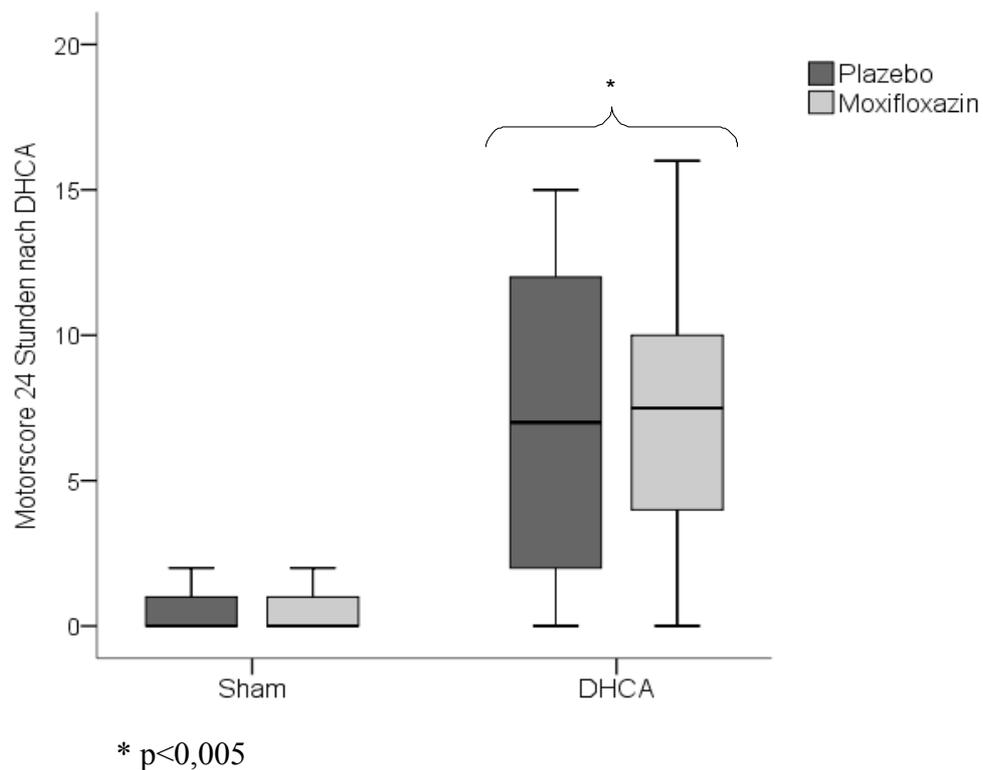


Abb.11: Postoperative neurologische Leistungsfähigkeit aller Gruppen im Vergleich.

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Studie konnten wir nachweisen, dass Moxifloxazin die zerebrale Inflammation 24 Stunden nach EKZ mit DHCA an der Ratte signifikant reduziert. Jedoch waren dabei die postoperative neurologische Leistungsfähigkeit und das Ausmaß der Zellschädigung vergleichbar zwischen der DHCA-Plazebo- und der DHCA-Moxifloxazin-Gruppe.

Um die neuroprotektive Wirkung von Moxifloxazin zu untersuchen, wurde in dieser Studie ein Tiermodell der extrakorporalen Zirkulation verwendet, das durch die globale Ischämie des 45 minütigen DHCA klinisch messbare postoperative neurologische Defizite verursacht (Jungwirth 2006, S. 807ff). Zusätzlich führte dieses Modell vor allem in der frühen postoperativen Phase zu einer ausgeprägten zerebralen Inflammationsreaktion (Kellermann 2009, S. 431f). Diese zerebrale Inflammation zeigte sich sehr deutlich in der Gruppe der DHCA-Plazebo-Tiere: Im Hippokampus der lediglich mit Plazebo behandelten Tiere waren deutlich mehr Neurone nachweisbar, die die Inflammationsparameter COX-2, NF $\kappa$ B und TNF $\alpha$  exprimierten. Zusätzlich zeigte diese Gruppe auch die höchste Aktivität an Makrophagen im Gehirn.

Deutliche Unterschiede zeigten die einzelnen Gruppen teilweise in den Messwerten der physiologischen Parameter während der Operation. Diese Abweichungen waren jedoch modellbedingt und kongruent zu Ergebnissen aus vorhergehenden Studien (Jungwirth 2006, S. 809). So trat beispielsweise der deutliche Abfall des MAP während des Versuchs bei den DHCA-Tieren versuchsbedingt auf: In dem kliniknah gehaltenen Modell der extrakorporalen Zirkulation wurde der physiologische Blutfluss der Ratte von 160 bis 180 ml/min/kg bis auf 80 bis 90 ml/min/kg kurz vor dem DHCA reduziert. Zu Beginn der Aufwärmphase betrug die Flussrate 105 ml/min/kg, die dann vor Ende der extrakorporalen Zirkulation wieder die ursprüngliche Flussrate von 160 bis 180 ml/min/kg erreichte. Diese Blutdruckschwankungen entsprechen ungefähr dem klinischen Standard (Jungwirth 2006, S. 809f). Warum jedoch der MAP der DHCA-MXF-Gruppe früher und stärker absank, ist ungeklärt. Ein Einfluss von MXF auf den Blutdruck ist in der Literatur bisher nicht beschrieben (Von Keutz 1999, S. 91ff) und auch unsere Sham-MXF-Gruppe zeigte keine ausgeprägte Abnahme des MAP.

Eine weitere versuchsbedingte Veränderung war der erwartungsgemäß deutlich niedrigere Hämoglobinwert der DHCA-Gruppen. Er erklärte sich durch die Hämodilution nach Füllen des Schlauchsystems der extrakorporalen Zirkulation mit HAES. Der auch bei den Sham-

Tieren erkennbare leichte Blutverlust ist im Wesentlichen auf die chirurgische Präparation zurückzuführen (Jungwirth 2006, S. 806).

Ebenfalls versuchsbedingt kam es während der EKZ zu einem Anstieg des PaO<sub>2</sub>. Die Sauerstoffaustauschkapazität des Oxygenators war anfangs so effektiv, dass sie zu einer unphysiologisch hohen Sauerstoffspannung des Blutes führte. Typischerweise geht dieser Effekt gegen Ende der EKZ verloren, was den PaO<sub>2</sub> wieder auf den Bereich der Prä-EKZ-Baseline absinken ließ.

Der negative BE nach Ende des DHCA beruhte auf der vermehrten Produktion und dem während des DHCA sistierenden Abtransport saurer Stoffwechselprodukte im anaeroben Stoffwechsel. Im Versuchsverlauf erschöpfte das Säure-Basen-Puffersystem zunehmend und wurde deshalb durch die Gabe von Natriumbikarbonat nach der EKZ im physiologischen Bereich gehalten.

Die gemessenen erhöhten Blutglukosewerte werden als Stressreaktion des Körpers auf das chirurgische Trauma und die Hypoxie gewertet. So schüttete der Körper als Stressantwort vermehrt Katecholamine wie Adrenalin und Noradrenalin aus, die antiinsulinerg wirken. Zusätzlich kam es durch die Hypoperfusion des Pankreas zu einer verminderten Insulinsekretion während des DHCA (Feerick 1995, S. 512ff). Das Resultat daraus war eine Hyperglykämie.

Neben diesen Unterschieden bei den physiologischen Parametern zwischen Sham und DHCA ergaben sich bei den mit MXF-behandelten Tieren auch Unterschiede bei der in Gehirngewebe und Serum messbaren MXF-Konzentrationen. Dabei zeigte die DHCA-Gruppe sowohl im Gehirngewebe als auch im Serum eine vierfach höhere Anreicherung im Vergleich zu den Tieren der Sham-Gruppe. Als Ursache für diese höheren MXF-Konzentrationen kommt sehr wahrscheinlich eine verlängerte Halbwertszeit der Substanz in Frage. Ein insgesamt reduzierter Metabolismus während des DHCA führt zu einer verlangsamten Verstoffwechslung in der DHCA-Gruppe verglichen mit der Sham-Gruppe. Allerdings ist bei insgesamt höheren MXF-Konzentrationen in Gehirngewebe und Serum der DHCA-Tiere das Verhältnis von Serum- zu Gehirnkonzentration in beiden Gruppen gleich. Eine Mehranreicherung im Gehirn der Tiere, die einem DHCA ausgesetzt waren, ist damit nicht zu beobachten.

Diese zerebral nachgewiesene, klinisch relevante Menge MXF zeigte eine Wirkung auf die inflammatorische Aktivität im Hippokampus: So ist die Anzahl der Makrophagen stark

reduziert und gleichzeitig die Expression der Inflammationsparameter COX-2, NFκB und TNFα deutlich verringert. Dieser antiinflammatorische Wirkmechanismus von Moxifloxazin ist in der Literatur bereits beschrieben. So stellten Werber und Kollegen fest, dass eine Gabe von MXF die IL-1β vermittelte Aktivierung und Translokation von NFκB in den Zellkern verhindern kann (Werber 2005, S. 297). Diese reduzierte Aktivierung von NFκB kann nachfolgend die deutlich verringerte Expression der beiden weiteren Inflammationsparameter COX-2 und TNFα und damit eine Einschränkung der Inflammationsreaktion nach sich ziehen (Kellermann 2009, S. 433). Auch bei anderen Fluorchinolonen, wie z.B. Trovifloxazin ist ein hemmender Effekt auf Zellen des Immunsystems und die Zytokinkaskade bekannt (Purswani 2000, S. 927f).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Immunhistochemie zeigten auf mRNA-Ebene alle Gruppen 24 Stunden nach DHCA eine vergleichbare Expression von COX-2 und TNFα. Möglicherweise sind 24 Stunden nach DHCA bereits zu spät, um noch eine erhöhte mRNA-Expression nachzuweisen. So haben z.B. Hindman und Kollegen in einem ähnlichen Modell der extrakorporalen Zirkulation eine vermehrte Expression von COX-2-mRNA vier Stunden nach EKZ nachweisen können (Hindman 2001, S. 1384). Ebenfalls vier Stunden nach extrakorporaler Zirkulation zeigte auch die Expression von TNFα-mRNA im Hippokampus einen Anstieg (Jungwirth 2009, S. 1005).

Eine weitere Erklärung für die Unterschiede zwischen Protein- und mRNA-Expression könnte in der verwendeten Nachweismethode zu finden sein. Erfolgt der Proteinnachweis mit Hilfe der Immunhistochemie in situ unmittelbar in den betroffenen Neuronen selbst, wird die mRNA vor ihrem Nachweis aus einem größeren Block Hippokampusgewebe inklusiver nichtneuronaler Strukturen isoliert. Dabei ist möglicherweise diese semiquantitative Mengenbestimmung der mRNA nicht aussagekräftig genug. Außerdem ließe sich der mRNA-Gehalt mit Hilfe der präziseren real-time RT-PCR genauer untersuchen (Bustin 2000, S. 170ff). Da wir allerdings davon ausgehen, dass letztlich das Protein der Effektor in der Inflammationsreaktion ist, verzichteten wir auf die präzisere Untersuchung der mRNA.

Trotz der im Hippokampus nachweisbar reduzierten Inflammationsantwort bei den DHCA-MXF-Tieren zeigte sich rein histologisch im Vergleich zu den DHCA-Plazebo-Tieren kein Unterschied. Auch hinsichtlich der postoperativen neurologischen Funktion glichen sich beide Gruppen. Damit milderte MXF zwar die inflammatorische Reaktion im Hippokampus ab, zeigte aber auf das funktionelle und histologische Outcome 24 Stunden nach DHCA keinen

Einfluss. Unklar ist, weshalb die verminderte Makrophagenaktivität und die reduzierte Menge an COX-2, NF $\kappa$ B und TNF $\alpha$  keine Verbesserung in der Histologie und in der neurologischen Funktion bewirken.

Betrachtet man diese Ergebnisse, stellt sich die Frage, weshalb Meisel und Kollegen in ihrem Schlaganfallmodell bei der Maus für MXF-behandelte Tiere eine verbesserte neurologische Funktion zeigen konnten (Meisel 2004, S. 4). Die Antwort findet sich in den grundlegenden Modellunterschieden: Führt das von Meisel und Kollegen verwendete MCAO- Modell zu einer lokal begrenzten Ischämie, kommt es im Rahmen des DHCA zu einer globalen Ischämie. Diese betrifft den gesamten Organismus und geht einher mit einem systemischen Sauerstoffmangel, während der Schlaganfall lediglich zu einer Mangelversorgung eines begrenzten Hirnareals führt. Dieser globale Schaden ist um ein vielfaches größer, so dass möglicherweise die für das Mausmodell von Meisel und Kollegen entwickelte und auf unser Modell übertragene Applikationsdauer und -dosis nicht ausreichten. Zudem lassen Ergebnisse aus einer Studie an Alveolarzellkulturen den Verdacht aufkommen (Shalit 2002, S. 2442ff), dass der von uns festgelegte Zeitpunkt für die erste Applikation möglicherweise zu spät gewählt war. Diese kultivierten Zellen wurden mit MXF vorbehandelt und später mit *Candida albicans* infiziert, gegen das MXF erwiesenermaßen nicht wirkt. Diese Infektion führte zwar zu einem Anstieg an proinflammatorischen Zytokinen in diesen Zellen, der durch MXF jedoch sehr viel geringer ausfiel als in den nichtbehandelten Zellen (Shalit 2002, S. 2443ff). Eine präventive Gabe von MXF vor Eintritt des schädigenden Stimulus zeigte also einen antiinflammatorischen Effekt ohne dabei antibiotisch zu wirken. Ob dies auch auf Neurone in einem lebenden Organismus anwendbar ist, bleibt zu untersuchen.

Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Modellen liegt in der Schädigung an sich: Schlaganfälle führen zu einer Suppression des Immunsystems und damit zu vermehrt auftretenden Infektionen (Meisel 2005, S. 775ff). Eine besondere Stellung nehmen dabei Pneumonien ein, die eine beträchtliche Mortalität und Morbidität verursachen (Emsley 2008, S. 341ff). Die präventive Gabe von MXF kann in diesem Schlaganfallmodell solche Infektionen verhindern und damit verantwortlich für das bessere neurologische Ergebnis sein (Meisel 2004, S. 5). Jedoch zeigte eine klinische Studie, dass mit MXF präventiv behandelte Schlaganfallpatienten zwar ein höheres Gesamtüberleben aufwiesen, ein wesentlicher Effekt auf das neurologische Outcome aber ausblieb (Harms 2008, S. 10).

Im Gegensatz zum Schlaganfall verursacht die EKZ mit DHCA lediglich eine inflammatorische Reaktion ohne Infektion (Jungwirth 2010, S. 312ff). Die antibakterielle

Wirkung von MXF spielte in unserer Studie folglich keine Rolle. Ein immunmodulatorischer Effekt auf die zerebrale Inflammation war zwar 24 Stunden nach DHCA nachweisbar, führte jedoch nicht zu einer verbesserten neurologischen Funktion der Tiere.

Möglicherweise hat die Inflammationsreaktion einen weniger großen Einfluss auf die neuronale Zellschädigung als bisher angenommen, sodass die histologisch sichtbare Zellschädigung durch andere Mechanismen als durch Inflammation entsteht. In Frage kommen beispielsweise Luftembolien, die im Rahmen der EKZ ins Gehirn gelangen und dort Infarkte verursachen. Dabei spielt die Menge an eingebrachter Luft eine große Rolle (Jungwirth 2007, S. 768ff). Da wir das Vorkommen von Luftembolien in unserer Studie nicht sicher ausschließen können, kommen sie als Verursacher für die untergegangenen Neuronen des Hippokampus in Frage. Zumal auch rein histologisch 24 Stunden nach DHCA noch keine Demarkierung eventuell infarzierter Bereiche nachweisbar ist. Aus klinischen Studien ist außerdem bekannt, dass Embolien aus biologischem Material, wie beispielsweise aus atheromatösen Plaques, aus den Karotiden fortgespült werden und Zerebralarterien verschließen können (Barnett 2000, S. 1433). Auch Gewebe- und Zellteile können diesen Verschluss der Hirngefäße hervorrufen und damit zum Infarkt führen (Rapp 2008, S. 199). Da unser Modell aber abgesehen von den oberflächlichen Gefäßpräparationen kein mit der Klinik vergleichbares, großes chirurgisches Trauma beinhaltet, schließen wir diese Art der Embolisierung als Ursache für die neuronale Schädigung weitgehend aus. Auch waren die verwendeten Ratten junge, gesunde Tiere, bei denen nicht von einem Vorhandensein von atherosklerotischen Erkrankungen ausgegangen werden kann.

Einen weiteren Faktor bei der Entstehung von Infarkten stellte eine ausgeprägte Blutverdünnung unter der EKZ dar. Im kombinierten EKZ- Ischämiemodell mit MCAO an der Ratte konnten Homi und Kollegen eine Vergrößerung des Infarktvolumens und ein verschlechtertes neurologisches Outcome bei exzessiver Hämodilution feststellen. Dies betraf vor allem die Tiere, die während der EKZ mit MCAO einer Hb-Konzentration von 6 g/dl ausgesetzt waren (Homi 2004, S. 977). In unserer Studie erreichten die Tiere beider DHCA-Gruppen während der EKZ Hb-Werte von unter 7,0 g/dl. Sie wurden zwar keiner fokalen zerebralen Ischämie ausgesetzt, jedoch besteht trotzdem die Möglichkeit, dass beispielsweise kleine Luftembolien eine solche Okklusion kleiner arterieller Gefäße hervorrufen. Demnach können wir eine Beeinflussung des histologischen und neurologischen Ergebnisses durch die ausgeprägte Hämodilution nicht sicher ausschließen.

Möglicherweise spielt aber auch die zerebrale Inflammation, wie sie nach DHCA auftritt, keine so wichtige Rolle bei der Entstehung postoperativer neurologischer Defizite. So konnte bereits eine andere Studie zeigen, dass 21 Tage nach EKZ mit 45min DHCA eine erhöhte hippokampale Expression von NFκB nicht begleitet war von einem neurokognitiven Defizit (Jungwirth 2010, S. 312ff). In ähnlichen Langzeitstudien, jedoch ohne DHCA, führte die EKZ einige Wochen später ebenfalls nicht zu einem neurokognitiven Defizit weder bei gesunden Ratten (Dieleman 2006, S. 555), noch bei alten oder an Diabetes vorerkrankten Tieren (de Lange 2007, S. 180). Ein histologischer Schaden oder Neuronenverluste im Hippokampus waren drei Monate nach EKZ ebenso wenig nachweisbar (Dieleman 2006, S. 555). Mackensen und Kollegen zeigten dagegen neurologische oder neurokognitive Einschränkungen nach EKZ, jedoch ohne Aufweisen eines signifikanten histologischen Schadens im Hippokampus (Mackensen 2001, S. 1485ff). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass sich die neurologische Funktion unabhängig von der histologischen oder zerebralinflammatorischen Reaktion entwickeln kann. Demnach spielt die zerebrale Inflammation als entscheidende Ursache für neurologische Defizite weniger eine Rolle als bisher angenommen. Weitere klinische und tierexperimentelle Studien bezüglich kognitiver Defizite nach EKZ stellen die zerebrale Inflammation als Hauptursache bei der Entstehung postoperativer Defizite zunehmend in Frage.

Während Newman und Kollegen im Jahr 2001 noch die EKZ als Ursache für ein schlechteres Abschneiden ihrer untersuchten Patienten sehen (Newman 2001a, S. 401), zeigen neuere Studien keinen Hinweis auf einen Zusammenhang. So konnten Van Dijk und Kollegen zeigen, dass es keinen signifikanten Unterschied in der neurokognitiven Leistungsfähigkeit von CABG-Patienten mit EKZ und einer Gruppe alterskorrelierter Personen aus der Allgemeinbevölkerung gibt, die keinerlei chirurgischem Eingriff ausgesetzt waren (Van Dijk 2008, S. 60ff). Auch eine systemische Inflammationsantwort durch EKZ ist nicht für kognitive Defizite verantwortlich (Westaby 2001, S.260; Gessler 2009, S. 304). Als entscheidende Faktoren für auftretende neurokognitive Einschränkungen werden deshalb im Moment der natürliche Alterungsprozess sowie verschiedene zerebrovaskuläre Erkrankungen beschrieben (Breteler 1994, S. 1607; Stewart 2002, S. 152ff).

Betrachtet man die Ergebnisse der aktuellen experimentellen und klinischen Studien, liegt der Schluss nahe, dass die inflammatorische Reaktion durch die EKZ nicht unmittelbar in Zusammenhang mit einem schlechteren neurokognitiven Outcome zu bringen ist. Zu diesem Schluss kommen auch Nussmeier und Searles in einem kürzlich erschienenen Editorial. Sie sehen den Grund der Problematik nicht in der EKZ sondern in vorliegenden physischen und

mentalen Einschränkungen der Patienten. Damit stellen sie den Zusammenhang von EKZ, Inflammation und negativem postoperativen Outcome gänzlich in Frage (Nussmeier 2010, S. 289). Die Ergebnisse dieser Studie stützen diese Annahme: Denn obwohl die mit MXF behandelte DHCA-Gruppe eine deutlich reduzierte zerebrale Inflammation zeigt, gibt es keinen Unterschied zu Plazebo-behandelten DHCA-Tieren was die histologische und neurologische Schädigung angeht.

Obwohl das von uns verwendete Tiermodell (Jungwirth 2006, S. 805ff) möglichst kliniknah gehalten ist, kann es nicht eins zu eins auf die klinische Situation übertragen werden. So wurde auf eine in der Herzchirurgie übliche mediane Sternotomie, direkte Kanülierung des Herzens oder eine chirurgische Präparation am Herzen verzichtet, um das postoperative Überleben der Tiere sicherzustellen. Diese Faktoren können zusätzlich eine wichtige Rolle spielen in der Entstehung postoperativer neurologischer Defizite (Mackensen 2001, S. 1490). Ein weiterer Unterschied zur klinischen Anwendung ist die Tatsache, dass es sich bei unseren Versuchstieren um junge, gesunde Ratten ohne Komorbiditäten wie Diabetes mellitus oder arteriosklerotische Veränderungen der Gefäße bzw. Vorerkrankungen wie zyanotische Herzfehler handelt. Viele herzchirurgische Patienten leiden an einer oder mehreren solcher Vorerkrankungen, die das Risiko für postoperative neurologische und neurokognitive Defizite erhöhen (Karimi 2008, S. 891f).

Zusammenfassend beschreibt diese Studie erstmals eine Untersuchung des Einflusses der perioperativen Gabe von MXF 24 Stunden nach EKZ mit DHCA auf die zerebrale Inflammation und das neurologische Outcome an der Ratte. MXF passiert die Blut-Hirn Schranke während EKZ mit DHCA und reduziert die zerebrale Inflammation im Hippokampus 24 Stunden nach DHCA deutlich. Diese reduzierte inflammatorische Reaktion hat jedoch keinen Einfluss auf die postoperative neurologische Funktion.

Diese Studie liefert zusätzlich zu den Ergebnissen anderer tierexperimenteller und klinischer Untersuchungen einen weiteren Hinweis dafür, dass die Inflammation nach EKZ eher ein Begleitphänomen darstellt, als die Hauptursache für die Entstehung postoperativer neurologischer Defizite. So bleibt die Suche nach möglichen Ursachen dieser funktionellen Störungen weiterhin Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen.

## 6 Zusammenfassung

**Hintergrund:** Die extrakorporale Zirkulation und der tief hypotherme Kreislaufstillstand ermöglichen heute eine Vielzahl von Operationen am offenen Herzen. Die betroffenen Patienten leiden aber als Folge dieser Eingriffe häufig an postoperativen neurologischen und neurokognitiven Defiziten, die zum Teil auf inflammatorische Prozesse zurückgeführt werden. Das Antibiotikum Moxifloxazin besitzt neben seinem antibiotischen Effekt auch antiinflammatorische Wirkung und führt im Schlaganfallmodell an der Maus zu einer Verbesserung des neurologischen Outcomes. Inwieweit Moxifloxazin einen Einfluss auf die zerebrale Inflammation und das neurologische Outcome 24 Stunden nach extrakorporaler Zirkulation mit tief hypothermem Kreislaufstillstand an der Ratte hat, ist Gegenstand dieser Untersuchung.

**Methoden:** Nach Genehmigung durch die Tierschutzkommission wurden 40 Ratten randomisiert drei Gruppen zugeteilt: „Tief hypothermer Kreislaufstillstand (DHCA)“ (n=20), „Sham“ (n=20) und unbehandelte Kontrolle (n=10). Die DHCA- und Sham-Gruppen wurden jeweils in zwei gleich große Untergruppen unterteilt, die entweder mit Moxifloxazin oder Placebo behandelt wurden (6 x 100 mg/kg Moxifloxacin oder NaCl alle 2 Stunden intraperitoneal).

Zum Zeitpunkt 24 Stunden nach DHCA wurden die Inflamationsparameter Zykllooxygenase 2 (COX-2), Nukleärer Faktor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) und Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), sowie die Makrophagen im Hippokampus immunhistochemisch untersucht. Mittels Polymerasekettenreaktion konnte COX-2 und TNF  $\alpha$  zusätzlich auf mRNA-Ebene quantifiziert werden. Histologische Untersuchungen wurden mit Hämatoxylin-Eosin-Färbungen durchgeführt. Standardisierte Tests bestimmten die neurologische Funktion prä- und 24 Stunden postoperativ.

**Ergebnisse:** Tiere der Sham- und der unbehandelte Kontroll-Gruppe zeigten keine zerebrale Inflammation. Auch die Ergebnisse der histologischen und neurologischen Untersuchung waren vergleichbar zwischen Sham- und Kontrolltieren. Die Inflamationsparameter COX-2, NF $\kappa$ B, TNF  $\alpha$  sowie die Makrophagen im Hippokampus waren in der mit Moxifloxazin behandelten DHCA-Gruppe signifikant niedriger als in der entsprechenden Placebo-Gruppe. In der histologischen und neurologischen Untersuchung zeigten beide DHCA-Gruppen vergleichbare Ergebnisse. Die nachgewiesene Menge an COX-2 und TNF  $\alpha$  -mRNA war in allen Gruppen ähnlich.

**Schlussfolgerung:** Die extrakorporale Zirkulation mit tief hypothermem Kreislaufstillstand verursacht eine zerebrale Inflammation und postoperative neurologische Defizite. Moxifloxazin kann diese inflammatorische Reaktion im Hippokampus reduzieren, jedoch ohne einen Einfluss auf das histologische oder neurologische Outcome zu zeigen. Diese Ergebnisse lassen einen geringeren als bisher angenommenen Einfluss der zerebralen Inflammation auf die postoperative neurologische Funktion vermuten.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Aktories K., Förstermann U., Hofmann F., Starke K. Antibiotika und Chemotherapeutika. In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; Urban und Fischer, München, Jena; 9. Auflage; 2005; S. 836
2. Amir G., Ramamoorthy C., Riemer R.K., Reddy V.M., Hanley F.L.: Neonatal brain protection and deep hypothermic circulatory arrest: pathophysiology of ischemic neuronal injury and protective strategies. *Ann Thorac Surg* 80 (2005): 1955-1964
3. Arvin B., Neville L.F., Barone F.C., Feuerstein G.Z.: The role of inflammation and cytokines in brain injury. *Neurosci Biobehav Rev* 20 (1996): 445-452
4. Barbut D., Hinton R.B., Szatrowski T.P., Hartman G.S., Bruefach M., Williams-Russo P., Charlson M.E., Gold J.P.: Cerebral emboli detected during bypass surgery are associated with clamp removal. *Stroke* 25 (1994): 2398-402
5. Barnett H.J., Gunton R.W., Eliasziw M., Fleming L., Sharpe B., Gates P., Meldrum H.: Causes and severity of ischemic stroke in patients with internal carotid artery stenosis. *JAMA* 283 (2000): 1429-1436
6. Beckmann J., Kees F., Schaumburger J., Kalteis T., Lehn N., Grifka J., Lerch K.: Tissue concentrations of vancomycin and Moxifloxacin in periprosthetic infection in rats. *Acta Orthop* 78 (2007): 766-773
7. Bellinger D.C., Jonas R.A., Rappaport L.A., Wypij D., Wernovsky G., Kuban K.C., Barnes P.D., Holmes G.L., Hickey P.R., Strand R.D., et al.: Developmental and neurologic status of children after heart surgery with hypothermic circulatory arrest or low-flow cardiopulmonary bypass. *N Engl J Med* 332 (1995): 549-555
8. Bellinger D.C., Wypij D., Kuban K.C., Rappaport L.A., Hickey P.R., Wernovsky G., Jonas R.A., Newburger J.W.: Developmental and neurological status of children at 4 years of age after heart surgery with hypothermic circulatory arrest or low-flow cardiopulmonary bypass. *Circulation*. 100 (1999): 526-532

9. Bierbach B., Meier M., Kasper-König W., Heimann A., Alessandri B., Horstick G., Oelert H., Kempinski O.: Emboli formation rather than inflammatory mediators are responsible for increased cerebral water content after conventional and assisted beating-heart myocardial revascularization in a porcine model. *Stroke* 39 (2008): 213-219
10. Blauth C.I., Cosgrove D.M., Webb B.W., Ratliff N.B., Boylan M., Piedmonte M.R., Lytle B.W., Loop F.D.: Atheroembolism from the ascending aorta. An emerging problem in cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 103 (1992): 1104-1111
11. Bokesch P.M., Appachi E., Cavaglia M., Mossad E., Mee R.B.: A glial-derived protein, S100B, in neonates and infants with congenital heart disease: evidence for preexisting neurologic injury. *Anesth Analg* 95 (2002): 889-892
12. Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B., Dellinger R.P., Fein A.M., Knaus W.A., Schein R.M., Sibbald W.J.; ACCP/SCCM Consensus Conference Committee: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine 1992. *Chest* 101 (1992): 1644-1655
13. Breteler M.M., Claus J.J., Grobbee D.E., Hofman A.: Cardiovascular disease and distribution of cognitive function in elderly people: the Rotterdam Study. *BMJ* 308 (1994): 1604-1608
14. Brix-Christensen V., Tønnesen E., Hjortdal V.E., Chew M., Flø C., Marqvorsen J., Hansen J.F., Andersen N.T., Ravn H.B.: Neutrophils and platelets accumulate in the heart, lungs, and kidneys after cardiopulmonary bypass in neonatal pigs. *Crit Care Med* 30 (2002): 670-676
15. Bustin S.A.: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25 (2000): 169-193
16. Caeiro J.P., Iannini P.B.: Moxifloxacin (Avelox): a novel fluoroquinolone with a broad spectrum of activity. *Expert Rev Anti Infect Ther* 3 (2003): 363-370
17. Candelario-Jalil E., Fiebich B.L.: Cyclooxygenase inhibition in ischemic brain injury. *Curr Pharm Des* 14 (2008): 1401-1418

18. Carroll J.E., Howard E.F., Hess D.C., Wakade C.G., Chen Q., Cheng C.: Nuclear factor-kappa B activation during cerebral reperfusion: effect of attenuation with N-acetylcysteine treatment. *Brain Res Mol Brain Res* 56 (1998): 186-191
19. Chandrasekharan N.V., Dai H., Roos K.L., Evanson N.K., Tomsik J., Elton T.S., Simmons D.L.: COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99 (2002): 13926-13931
20. Clemens J.A., Stephenson D.T., Dixon E.P., Smalstig E.B., Mincy R.E., Rash K.S., Little S.P.: Global cerebral ischemia activates nuclear factor-kappa B prior to evidence of DNA fragmentation. *Brain Res Mol Brain Res* 48 (1997): 187-196
21. Czapski G.A., Gajkowska B., Strosznajder J.B.: Systemic administration of lipopolysaccharide induces molecular and morphological alterations in the hippocampus. *Brain Res* 14 (2010): 85-94
22. Dalhoff A.: Immunomodulatory activities of fluoroquinolones. *Infection* 33 (2005): 55-70
23. De Lange F., Dieleman J.M., Jungwirth B., Kalkman C.J.: Effects of cardiopulmonary bypass on neurocognitive performance and cytokine release in old and diabetic rats. *Br J Anaesth* 99 (2007): 177-183
24. Dieleman J.M., de Lange F., Houston R.J., Biessels G.J., Bär P.R., Mackensen G.B., Grocott H.P., Kalkman C.J.: Cardiopulmonary bypass and long-term neurocognitive dysfunction in the rat. *Life Sci* 79 (2006): 551-558
25. Ekdahl C.T., Kokaia Z., Lindvall O.: Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience* 158 (2009): 1021-1029
26. Emsley H.C., Hopkins S.J.: Acute ischaemic stroke and infection: recent and emerging concepts. *Lancet Neurol* 7 (2008): 341-353
27. Ergin M.A., Galla J.D., Lansman L., Quintana C., Bodian C., Griep R.B.: Hypothermic circulatory arrest in operations on the thoracic aorta. Determinants of operative mortality and neurologic outcome. *J Thorac Cardiovasc Surg* 107 (1994): 788-797

28. Feerick A.E., Johnston W.E., Jenkins L.W., Lin C.Y., Mackay J.H., Prough D.S.: Hyperglycemia during hypothermic canine cardiopulmonary bypass increases cerebral lactate. *Anesthesiology* 82 (1995): 512-520
29. Ferrarese C., Mascarucci P., Zoia C., Cavarretta R., Frigo M., Begni B., Sarinella F., Frattola L., De Simoni M.G.: Increased cytokine release from peripheral blood cells after acute stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 19 (1999): 1004-1009
30. Gaynor J.W., Gerdes M., Zackai E.H., Bernbaum J., Wernovsky G., Clancy R.R., Newman M.F., Saunders A.M., Heagerty P.J., D'Agostino J.A., McDonald-McGinn D., Nicolson S.C., Spray T.L., Jarvik G.P.: Apolipoprotein E genotype and neurodevelopmental sequelae of infant cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 126 (2003): 1736-1745
31. Gessler P., Schmitt B., Prêtre R., Latal B.: Inflammatory response and neurodevelopmental outcome after open-heart surgery in children. *Pediatr Cardiol* 30 (2009): 301-305
32. Gibbon J.H. Jr.: Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery. *Minn Med* 37 (1954): 171-185
33. Gill R., Murkin J.M.: Neuropsychologic dysfunction after cardiac surgery: what is the problem? *J Cardiothorac Vasc Anesth* 10 (1996): 91-98
34. Gillinov A.M., Davis E.A., Curtis W.E., Schleien C.L., Koehler R.C., Gardner T.J., Traystman R.J., Cameron D.E.: Cardiopulmonary bypass and the blood-brain barrier. An experimental study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 104 (1992): 1110-1115
35. Gold J.P., Charlson M.E., Williams-Russo P., Szatrowski T.P., Peterson J.C., Pirraglia P.A., Hartman G.S., Yao F.S., Hollenberg J.P., Barbut D., Hayes J.G., Thomas S.J., Purcell M.H., Mattis S., Gorkin L., Post M., Krieger K.H., Isom O.W.: Improvement of outcomes after coronary artery bypass. A randomized trial comparing intraoperative high versus low mean arterial pressure. *J Thorac Cardiovasc Surg* 110 (1995): 1302-1311
36. Grocott H.P., Mackensen G.B., Grigore A.M., Mathew J., Reves J.G., Phillips-Bute B., Smith P.K., Newman M.F.; Neurologic Outcome Research Group (NORG); Cardiothoracic Anesthesiology Research Endeavors (CARE) Investigators' of the Duke Heart Center:

Postoperative hyperthermia is associated with cognitive dysfunction after coronary artery bypass graft surgery. *Stroke* 33 (2002): 537-541

37. Grocott H.P., Homi H.M., Puskas F.: Cognitive dysfunction after cardiac surgery: revisiting etiology. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 9 (2005): 123-129

38. Hajat C., Hajat S., Sharma P.: Effects of poststroke pyrexia on stroke outcome : a meta-analysis of studies in patients. *Stroke* 31 (2000): 410-414

39. Hall R.I., Smith M.S., Rocker G.: The systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass: pathophysiological, therapeutic, and pharmacological considerations. *Anesth Analg*. 85 (1997): 766-772

40. Han H.S., Karabiyikoglu M., Kelly S., Sobel R.A., Yenari M.A.: Mild hypothermia inhibits nuclear factor-kappaB translocation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 23 (2003): 589-598

41. Harms H., Prass K., Meisel C., Klehmet J., Rogge W., Drenckhahn C., Göhler J., Bereswill S., Göbel U., Wernecke K.D., Wolf T., Arnold G., Halle E., Volk H.D., Dirnagl U., Meisel A.: Preventive antibacterial therapy in acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *PLoS One* 14 (2008): e2158, 1-12

42. Harris D.N., Oatridge A., Dob D., Smith P.L., Taylor K.M., Bydder G.M.: Cerebral swelling after normothermic cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 88 (1998): 340-345

43. Hawkey P.M.: Mechanisms of quinolone action and microbial response. *J Antimicrob Chemother* 51 (2003): 29-35

44. Heo J.H., Lucero J., Abumiya T., Koziol J.A., Copeland B.R., del Zoppo G.J.: Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 19 (1999): 624-633

45. Hindman B.J., Moore S.A., Cutkomp J., Smith T., Ross-Barta S.E., Dexter F., Brian J.E. Jr.: Brain expression of inducible cyclooxygenase 2 messenger RNA in rats undergoing cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 95 (2001):1380-1388

46. Hogue C.W. Jr., Palin C.A., Arrowsmith J.E.: Cardiopulmonary bypass management and neurologic outcomes: an evidence-based appraisal of current practices. *Anesth Analg* 103 (2006): 21-37
47. Homi H.M., Yang H., Pearlstein R.D., Grocott H.P.: Hemodilution during cardiopulmonary bypass increases cerebral infarct volume after middle cerebral artery occlusion in rats. *Anesth Analg* 99 (2004): 974-981
48. Immer F.F., Barmettler H., Berdat P.A., Immer-Bansi A.S., Englberger L., Krähenbühl E.S., Carrel T.P.: Effects of deep hypothermic circulatory arrest on outcome after resection of ascending aortic aneurysm. *Ann Thorac Surg* 74 (2002): 422-425
49. Investigators, The warm Heart: Randomised trial of normothermic versus hypothermic coronary bypass surgery. The Warm Heart Investigators. *Lancet* 343 (1994): 559-563
50. Jungwirth B., Mackensen G.B., Blobner M., Neff F., Reichart B., Kochs E.F., Nollert G.: Neurologic outcome after cardiopulmonary bypass with deep hypothermic circulatory arrest in rats: description of a new model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 131 (2006): 805-812
51. Jungwirth B., Kellermann K., Blobner M., Schmehl W., Kochs E.F., Mackensen G.B.: Cerebral air emboli differentially alter outcome after cardiopulmonary bypass in rats compared with normal circulation. *Anesthesiology* 107 (2007): 768-775
52. Jungwirth B., Kellermann K., Qing M., Mackensen G.B., Blobner M., Kochs E.F.: Cerebral tumor necrosis factor alpha expression and long-term neurocognitive performance after cardiopulmonary bypass in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 138 (2009): 1002-1007
53. Jungwirth B., Eckel B., Blobner M., Kellermann K., Kochs E.F., Mackensen G.B.: The impact of cardiopulmonary bypass on systemic interleukin-6 release, cerebral nuclear factor-kappa B expression, and neurocognitive outcome in rats. *Anesth Analg* 110 (2010): 312-320
54. Karimi A., Ahmadi H., Davoodi S., Movahedi N., Marzban M., Abbasi K., Omran A.S., Sadeghian S., Yazdanifard P., Abbasi S.H., Fallah N.: Factors affecting postoperative morbidity and mortality in isolated coronary artery bypass graft surgery. *Surg Today* 38 (2008): 890-898

55. Kellermann K., Gordan M.L., Nollert G., Blobner M., Kochs E.F., Jungwirth B.: Long-term assessment of NFkappaB expression in the brain and neurologic outcome following deep hypothermic circulatory arrest in rats. *Perfusion* 24 (2009): 429-436
56. Lakhan S.E., Kirchgessner A., Hofer M.: Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med* 17 (2009); 7:97
57. Lambertsen K.L., Meldgaard M., Ladeby R., Finsen B.: A quantitative study of microglial-macrophage synthesis of tumor necrosis factor during acute and late focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 25 (2005): 119-135
58. Lewis F.J., Taufic M.: Closure of atrial septal defects with the aid of hypothermia; experimental accomplishments and the report of one successful case. *Surgery* 33 (1953): 52-59
59. Lucas S.M., Rothwell N.J., Gibson R.M.: The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol* 147 (2006): 232-240
60. Mack M.J.: Advances in the treatment of coronary artery disease. *Ann Thorac Surg* 76 (2003): 2240-2245
61. Mackensen G.B., Sato Y., Nellgård B., Pineda J., Newman M.F., Warner D.S., Grocott H.P.: Cardiopulmonary bypass induces neurologic and neurocognitive dysfunction in the rat. *Anesthesiology* 95 (2001): 1485-1491
62. Mathew J.P., Grocott H.P., Phillips-Bute B., Stafford-Smith M., Laskowitz D.T., Rossignol D., Blumenthal J.A., Newman M.F.; Neurologic Outcome Research Group of the Duke Heart Center; Cardiothoracic Anesthesiology Research Endeavors Investigators of the Duke Heart Center. Lower endotoxin immunity predicts increased cognitive dysfunction in elderly patients after cardiac surgery. *Stroke* 34 (2003): 508-513
63. Matsuda N., Hattori Y.: Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy. *J Pharmacol Sci* 101 (2006): 189-198
64. Meisel C., Prass K., Braun J., Victorov I., Wolf T., Megow D., Halle E., Volk H.D., Dirnagl U., Meisel A.: Preventive antibacterial treatment improves the general medical and neurological outcome in a mouse model of stroke. *Stroke* 35 (2004): 2-6

65. Meisel C., Schwab J.M., Prass K., Meisel A., Dirnagl U.: Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci* 6 (2005): 775-786
66. Miller G., Egli K.D., Contant C., Baylen B.G., Myers J.L.: Postoperative neurologic complications after open heart surgery on young infants. *Arch Pediatr Adolesc Med* 149 (1995): 764-768
67. Minghetti L.: Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 63 (2004): 901-910
68. Moody D.M., Brown W.R., Challa V.R., Stump D.A., Reboussin D.M., Legault C.: Brain microemboli associated with cardiopulmonary bypass: a histologic and magnetic resonance imaging study. *Ann Thorac Surg* 59 (1995): 1304-1307
69. Murphy G.J., Angelini G.D.: Side effects of cardiopulmonary bypass: what is the reality? *J Card Surg* 19 (2004): 481-488
70. Newman M.F., Kirchner J.L., Phillips-Bute B., Gaver V., Grocott H., Jones R.H., Mark D.B., Reves J.G., Blumenthal J.A.; Neurological Outcome Research Group and the Cardiothoracic Anesthesiology Research Endeavors Investigators: Longitudinal assessment of neurocognitive function after coronary-artery bypass surgery. *N Engl J Med* 344 (2001): 395-402 (a)
71. Newman M.F., Grocott H.P., Mathew J.P., White W.D., Landolfo K., Reves J.G., Laskowitz D.T., Mark D.B., Blumenthal J.A.; Neurologic Outcome Research Group and the Cardiothoracic Anesthesia Research Endeavors (CARE) Investigators of the Duke Heart Center: Report of the substudy assessing the impact of neurocognitive function on quality of life 5 years after cardiac surgery. *Stroke* 32 (2001): 2874-2881 (b)
72. Nussmeier N.A., Searles B.E.: Inflammatory brain injury after cardiopulmonary bypass: is it real? *Anesth Analg* 110 (2010): 288-290
73. Oates R.K., Simpson J.M., Turnbull J.A., Cartmill T.B.: The relationship between intelligence and duration of circulatory arrest with deep hypothermia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 110 (1995): 786-792

74. Ohki S., Oshima K., Takeyoshi I., Matsumoto K., Morishita Y.: Endotoxin removal with a polymyxin B-immobilized hemoperfusion cartridge improves cardiopulmonary function after cardiopulmonary bypass. *J Surg Res* 145 (2008): 74-79
75. Ohta H., Terao Y., Shintani Y., Kiyota Y.: Therapeutic time window of post-ischemic mild hypothermia and the gene expression associated with the neuroprotection in rat focal cerebral ischemia. *Neurosci Res* 57 (2007): 424-433
76. Pahl H.L.: Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18 (1999): 6853-6866
77. Paparella D., Yau T.M., Young E.: Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur J Cardiothorac Surg* 21 (2002): 232-244
78. Paxinos G, Watson C.: *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press; Sydney; 1982; S. 10-12
79. Prass K., Meisel C., Höflich C., Braun J., Halle E., Wolf T., Ruscher K., Victorov I.V., Priller J., Dirnagl U., Volk H.D., Meisel A.: Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. *J Exp Med* 198 (2003): 725-736
80. Prondzinsky R., Müller-Werdan U., Pilz G., Witthaut R., Stabenow I., Werdan K., Zerkowski H.R.: Systemic inflammatory reactions to extracorporeal therapy measures (II): Cardiopulmonary bypass. *Wien Klin Wochenschr* 109 (1997): 346-353
81. Pua H.L., Bissonnette B.: Cerebral physiology in paediatric cardiopulmonary bypass. *Can J Anaesth* 45 (1998): 960-978
82. Purswani M., Eckert S., Arora H., Johann-Liang R., Noel G.J.: The effect of three broad-spectrum antimicrobials on mononuclear cell responses to encapsulated bacteria: evidence for down-regulation of cytokine mRNA transcription by trovafloxacin. *J Antimicrob Chemother.* 46 (2000): 921-929
83. Rapp J.H., Hollenbeck K., Pan X.M.: An experimental model of lacunar infarction: embolization of microthrombi. *J Vasc Surg* 48 (2008): 196-200

84. Reich D.L., Uysal S., Sliwinski M., Ergin M.A., Kahn R.A., Konstadt S.N., McCullough J., Hibbard M.R., Gordon W.A., Griep R.B.: Neuropsychologic outcome after deep hypothermic circulatory arrest in adults. *J Thorac Cardiovasc Surg* 117 (1999): 156-163
85. Roach G.W., Kanchuger M., Mangano C.M., Newman M., Nussmeier N., Wolman R., Aggarwal A., Marschall K., Graham S.H., Ley C.: Adverse cerebral outcomes after coronary bypass surgery. Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group and the Ischemia Research and Education Foundation Investigators. *N Engl J Med* 335 (1996): 1857-1863
86. Roche Lexikon Medizin; In: Roche Lexikon Medizin; Urban & Fischer; München; 5. Edition; 2003, S. 1051
87. Romeis B. Färben der Schnitte. In: Mikroskopische Technik. Böck P. (Hrsg.); Urban und Schwarzenberg; München, Wien, Baltimore; 1989; 17. Auflage, S. 179-249
88. Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D., George-Hyslop P.H., Pericak-Vance M.A., Joo S.H., Rosi B.L., Gusella J.F., Crapper-MacLachlan D.R., Alberts M.J., et al.: Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43 (1993): 1467-1472
89. Shalit I., Kletter Y., Halperin D., Waldman D., Vasserman E., Nagler A., Fabian I.: Immunomodulatory effects of moxifloxacin in comparison to ciprofloxacin and G-CSF in a murine model of cyclophosphamide-induced leukopenia. *Eur J Haematol* 66 (2001): 287-296
90. Shalit I., Horev-Azaria L., Fabian I., Blau H., Kariv N., Shechtman I., Alteraz H., Kletter Y.: Immunomodulatory and protective effects of moxifloxacin against *Candida albicans*-induced bronchopneumonia in mice injected with cyclophosphamide. *Antimicrob Agents Chemother* 46 (2002): 2442-2449
91. Siefert H.M., Kohlsdorfer C., Steinke W., Witt A.: Pharmacokinetics of the 8-methoxyquinolone, moxifloxacin: tissue distribution in male rats. *J Antimicrob Chemother.* 43 (1999): 61-67
92. Silbert B.S., Evered L.A., Scott D.A., Cowie T.F.: The apolipoprotein E epsilon4 allele is not associated with cognitive dysfunction in cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 86 (2008): 841-847

93. Sillesen H., Nedergaard M., Schroeder T., Buchardt Hansen H.J.: Middle cerebral artery occlusion in presence of low perfusion pressure increases infarct size in rats. *Neurol Res* 10 (1988): 61-63
94. Stewart R.: Vascular dementia: a diagnosis running out of time. *Br J Psychiatry* 180 (2002): 152-156
95. Tardiff B.E., Newman M.F., Saunders A.M., Strittmatter W.J., Blumenthal J.A., White W.D., Croughwell N.D., Davis R.D., Roses A.D., Reves J.G.: Preliminary report of a genetic basis for cognitive decline after cardiac operations. *Ann Thorac Surg* 64 (1997):715–720
96. Tracey K.J., Cerami A.: Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu Rev Cell Biol* 9 (1993): 317-343
97. Van Dijk D., Moons K.G., Nathoe H.M., van Aarnhem E.H., Borst C., Keizer A.M., Kalkman C.J., Hijman R.; Octopus Study Group: Cognitive outcomes five years after not undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Ann Thorac Surg* 85 (2008): 60-64
98. Von Keutz E., Schlüter G.: Preclinical safety evaluation of moxifloxacin, a novel fluoroquinolone. *J Antimicrob Chemother* 43 (1999): 91-100
99. Wagner S., Tagaya M., Koziol J.A., Quaranta V., del Zoppo G.J.: Rapid disruption of an astrocyte interaction with the extracellular matrix mediated by integrin alpha 6 beta 4 during focal cerebral ischemia/reperfusion. *Stroke* 28 (1997): 858-865
100. Werber S., Shalit I., Fabian I., Steuer G., Weiss T., Blau H.: Moxifloxacin inhibits cytokine-induced MAP kinase and NF-kappaB activation as well as nitric oxide synthesis in a human respiratory epithelial cell line. *J Antimicrob Chemother* 55 (2005): 293-300
101. Westaby S., Saatvedt K., White S., Katsumata T., van Oeveren W., Halligan P.W.: Is there a relationship between cognitive dysfunction and systemic inflammatory response after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 71 (2001): 667-672
102. Winkelheide U., Engelhard K., Kaepfel B., Winkler J., Hutzler P., Werner C., Kochs E.: Cerebral ischemia and neurogenesis: a two-time comparison. *Neurocrit Care* 9 (2008): 387-393

103. Wypij D., Newburger J.W., Rappaport L.A., duPlessis A.J., Jonas R.A., Wernovsky G., Lin M., Bellinger D.C.: The effect of duration of deep hypothermic circulatory arrest in infant heart surgery on late neurodevelopment: the Boston Circulatory Arrest Trial. *J Thorac Cardiovasc Surg* 126 (2003): 1397-1403
104. Yenari M.A., Han H.S.: Influence of hypothermia on post-ischemic inflammation: role of nuclear factor kappa B (NFkappaB). *Neurochem Int* 49 (2006): 164-169
105. Yenari M., Kitagawa K., Lyden P., Perez-Pinzon M.: Metabolic downregulation: a key to successful neuroprotection? *Stroke* 39 (2008): 2910-2917

## **8 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Eberhard Kochs für die Übernahme meiner Doktorarbeit und für die Möglichkeit, diese wissenschaftliche Arbeit an der Klinik für Anaesthesiologie der Technischen Universität München durchführen zu können, bedanken.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Manfred Blobner für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Unterstützung in dieser Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Dr. Kristine Kellermann für die intensive Betreuung während der gesamten Zeit danken. Die Einarbeitung in die Methodik, die Hilfe bei aufgetretenen Problemen während der Durchführung der Versuche sowie zuletzt das schnelle und intensive Korrigieren waren eine große Stütze.

Ebenso danke ich Frau Dr. Bettina Jungwirth für die Betreuung zu Beginn meiner Arbeit und die prompte Hilfe bei allen organisatorischen Fragen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Nadja Dertinger, Herrn Dr. Christian Kramer sowie bei meinen Mitstreitern Frau Dr. Simone Denzler und Herrn Alexander Kretschmer für die stets angenehme und nette Zusammenarbeit im Labor.

Vor allem aber möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium und diese Dissertation erst ermöglicht haben und immer für mich da waren und an mich geglaubt haben.

## 9 Lebenslauf

### Johannes Carl Stückle

#### **Persönliche Daten:**

Geburtsdatum: 31. August 1982  
Geburtsort: Mutlangen  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

#### **Schulbildung:**

08/1989 – 07/1993 Grundschule Kreuzäcker in Schwäbisch Hall  
09/993 – 06/2002 Gymnasium bei St. Michael in Schwäbisch Hall mit Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

#### **Hochschulausbildung:**

10/2003 – 08/2005 Studium der Humanmedizin (Vorklinik) an der Ludwig-Maximilians-Universität München  
08/2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
10/2005 – 06/2010 Studium der Humanmedizin (Klinik und Praktischer Jahr) an der Technischen Universität München  
06/2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
07/2010 Approbation als Arzt

#### **Beruf:**

Seit 01/2011 Weiterbildung zum Facharzt für Innere Medizin,  
III. Medizinische Klinik, Zentralklinikum Augsburg