

Aus der Abteilung Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie
(Prof. Dr. med. Dipl.-Phys. F. A. Schöndube)
im Zentrum Chirurgie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Einfluss der extrakorporalen Zirkulation
und systemischen Hypothermie
auf die Lebermorphologie neugeborener Schweine**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Julia Marilena Zwihehoff
aus Hagen

Göttingen 2012

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichtstatter: PD Dr. med. T. Tirilomis

II. Berichtstatter/in: Prof. Dr. med. A. Bräuer

III. Berichtstatter/in: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Klinischer Hintergrund	8
1.2	Unerwünschte Folgen nach Eingriffen am offenen Herzen.....	10
1.2.1	Low Cardiac Output Syndrom.....	10
1.2.2	Abdominelle Komplikationen	10
1.2.3	Zelluläre und subzelluläre Veränderungen	11
1.2.3.1	Systemische Inflammation	11
1.2.3.2	Ischämie-Reperfusionsschaden.....	12
1.2.3.3	Zelluläre Ödembildung.....	13
1.2.3.4	Apoptose.....	13
1.3	Einfluss auf die Leber	14
1.3.1	Morphologischer Aufbau der Leber	14
1.3.2	Postoperativer Leberschaden	16
1.4	Zielsetzung	17
2	Material und Methoden.....	18
2.1	Versuchstiere	18
2.2	Versuchsdurchführung.....	18
2.3	Aufbereitung der Proben.....	22
2.4	Auswertung der Proben	22
2.5	Statistik	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Unterschiede zwischen Portal- und Zentralfeld.....	35
3.1.1	Inflammation	35
3.1.2	Hepatozelluläres Ödem	36
3.1.3	Apoptose	37
3.2	Unterschiede zwischen den Gruppen	37
3.2.1	Inflammation	37
3.2.2	Hepatozelluläres Ödem	39
3.2.3	Apoptose	40
3.3	Gesamtbeurteilung	41

4 Diskussion	42
4.1 Zur Methodik.....	42
4.2 Vergleich der Lokalisationen: Portalfeld vs. Zentralfeld	44
4.3 Inflammation	44
4.4 Hepatozelluläres Ödem	47
4.5 Apoptose	48
4.6 Klinische Bedeutung und Ausblick.....	50
5 Zusammenfassung	52
6 Anhang	54
6.1 Anhang 1: Einbettung der Proben.....	54
6.2 Anhang 2: Hämatoxylin-Eosin-Färbung	55
7 Literaturverzeichnis.....	56
Lebenslauf.....	64

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
ACT	Activated Clotting Time
ANOVA	Analysis of Variance
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintri-phosphat
C3, C5	Komplementfaktor 3, Komplementfaktor 5
CPB	Cardiopulmonary Bypass (Kardiopulmonaler Bypass)
DHCA	Deep Hypothermic Circulatory Arrest (Totaler Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie)
DNA	Desoxyribonucleic Acid
EKZ	Extrakorporale Zirkulation
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLM	Herz-Lungen-Maschine
ICAM	Intercellular Adhesion Molecules
IFN	Interferon
IL	Interleukin
I/R	Ischämie/Reperfusionsschäden
LCOS	Low Cardiac Output Syndrome
NF-κB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
O ₂	Sauerstoff
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha

Tab.	Tabelle
V.	Vena
Vv.	Venae
ZVD	Zentraler Venendruck

1 Einleitung

1.1 Klinischer Hintergrund

Dank enormer Fortschritte sowohl im Bereich der Diagnostik als auch in der Behandlung angeborener Herzfehler in den letzten Jahrzehnten konnten Morbidität und Mortalität in der operativen Versorgung von Neugeborenen nach Korrekturoperationen deutlich verringert werden.

Maßgeblich zurückzuführen sind diese Fortschritte auf die Entwicklung der Herz-Lungen-Maschine (HLM) und auf die Anwendung systemischer Hypothermie. Infolge dieser Verbesserungen konnte insbesondere das chirurgische Anwendungsspektrum im Rahmen von Herzoperationen deutlich erweitert werden (Cooley 1997). Hypothermie bezeichnet eine Körperkerntemperatur von weniger als 36°C. Die Einteilung der Hypothermie ist auch heutzutage immer noch uneinheitlich; nach Jenkins et al (2001) ist die milde Hypothermie bei 34-36°C, die moderate bei 29-33°C und die tiefe bei 17-28°C anzusiedeln. In der Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie der Universität Göttingen wird die milde Hypothermie als Körperkerntemperatur mit nicht weniger als 32°C definiert, die moderate Hypothermie findet statt im Bereich zwischen 24-32°C und unter tiefer Hypothermie versteht man dort Körpertemperaturen unter 24°C. Zudem ist zu berücksichtigen, dass in der Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie Göttingen ein Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie bei 18°C Körpertemperatur durchgeführt wird.

Schon in den frühen 1950er Jahren wurden in zahlreichen tierexperimentellen Versuchen die Auswirkungen von Hypothermie genauer untersucht. So konnten zum Beispiel Bigelow und Mc Birnie (1953) in einem Experiment mit Affen (16-19°C Körpertemperatur) und Murmeltieren (3-5°C Körpertemperatur) belegen, dass mit zunehmender Hypothermie auch eine längere Ischämietoleranz des Herzens unter Ausschaltung des Körperkreislaufs geschaffen werden konnte. Auch im klinischen Alltag fand die therapeutische Hypothermie seit dieser Zeit zunehmend Anwendung. Die Entwicklung der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) erweiterte gleichzeitig das operative

Spektrum bei Patienten mit angeborenen Herzfehlern erheblich: Die offene operative Versorgung wurde ermöglicht. Dadurch konnte erstmalig im Jahr 1952 ein angeborener Herzfehler unter direkter Sicht in Kombination von extrakorporaler Zirkulation und Hypothermie mittels Oberflächenkühlung erfolgreich operiert werden (Lewis et al. 1955). Mit Fortschreiten der Entwicklung der Herz-Lungen-Maschine kam es immer mehr zum kombinierten Einsatz mit Hypothermie, bei dem das Absenken der Körpertemperatur über einen entsprechenden Wärmeaustauscher stattfand und nicht mehr wie bis dahin über Oberflächenkühlung des Patienten. Dies ermöglichte eine besser kontrollierbare Kühlung und Wiedererwärmung des Patienten.

Trotz der beschriebenen Erfolge war ein Eingriff in der Frühzeit der Hypothermie oft mit starken Nebenwirkungen (z.B. häufiges Auftreten von Kammerflimmern und Gerinnungsstörungen) behaftet (Pool und Kessler 1957). Die Anwendung von Hypothermie im Rahmen des HLM-Einsatzes für Korrekturoperationen wurde daher kritisch hinterfragt und in den heutigen Forschungsarbeiten wird auch immer wieder die Anwendung der Normothermie unter Hinweis auf eine kürzere Anwendungszeit der Herz-Lungen-Maschine bei guten hämodynamischen Verhältnissen postoperativ diskutiert (Durandy 2010).

Trotz mittlerweile zahlreicher, langjährig gesammelter Erfahrungen in der Herzchirurgie bezüglich der Behandlung in Hypothermie konnten sich bislang keine allgemeinverbindlichen Standards bezüglich ihrer Anwendung etablieren. So werden zur Senkung der Körpertemperatur bei Neugeborenen und älteren Kindern während herzchirurgischer Korrekturoperationen unterschiedliche Methoden angewandt. Dazu gehört das Operieren bei moderater Hypothermie mit Kardioplegie zur Myokardprotektion. In besonderen Fällen wird aber auch in tiefer Hypothermie bei totalem Kreislaufstillstand operiert.

1.2 Unerwünschte Folgen nach Eingriffen am offenen Herzen

Die Ursachen für das Auftreten unerwünschter Folgen nach Eingriffen in Hypothermie und HLM sind multifaktoriell und bis heute noch nicht vollständig geklärt.

1.2.1 Low Cardiac Output Syndrom

Das Low Cardiac Output Syndrom (LCOS) stellt mit einer Häufigkeit von 25% eine vielfach auftretende, von verschiedenen Faktoren abhängige (z.B. Myokardischämie, Rhythmusstörungen, Aktivierung der Immunreaktion, Hypovolämie, periphere Vasokonstriktion, Hypothermie, residuelle Defekte am Herzen) Komplikation bei Neugeborenen und Kindern nach herzchirurgischen Operationen dar. In den meisten Fällen wurde dies nach 6-8 Stunden postoperativ beobachtet (Hoffman et al. 2003). Es kommt zu einem Abfall des Herzzeitvolumens mit Blutdruckabfall, kompensatorischer Vasokonstriktion und Oligurie. Der arterielle Druck ist verringert, gleichzeitig steigt der zentrale Venendruck stark an. Im Extremfall tritt bei dem Patienten ein Herz-Kreislaufstillstand ein.

1.2.2 Abdominelle Komplikationen

Der Einsatz der extrakorporalen Zirkulation und systemischen Hypothermie kann Schäden verschiedener Organe induzieren. Dazu gehören neben den bereits zum Teil gut untersuchten cerebralen und kardialen Schädigungen auch Schäden der Nieren und des Gastrointestinaltraktes.

Das akute Nierenversagen ist mit einer Quote von 30% - 40% der mit Herz-Lungen-Maschine operierten Patienten ein häufig auftretendes Problem, das in 1% - 6% der Fälle sogar zur Dialysepflichtigkeit führen kann (Mariscalco et al. 2011).

Gastrointestinale Komplikationen sind bei Erwachsenen selten, dazu gehören:

- Gastrointestinale Blutungen
- Pankreatitis
- Paralytischer Ileus
- Leberschäden.

1.2.3 Zelluläre und subzelluläre Veränderungen

1.2.3.1 Systemische Inflammation

Infolge der Einführung der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) mit der Herz-Lungen-Maschine im Jahr 1953 durch John Gibbon konnte das operative Spektrum in der Herzchirurgie enorm erweitert werden (Cohn 2003), aber trotz Weiterentwicklung und Verbesserung der Herz-Lungen-Maschine bleibt ein Hauptproblem: Das *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) in der frühen postoperativen Phase. Dabei handelt es sich um eine nicht infektiösbedingte generalisierte Entzündungsreaktion (Sitniakowsky et al. 2011), bei der Organfunktionen (Leber, Niere, Herz, Gehirn und Lunge) schwer beeinträchtigt werden können. Zu den auslösenden Faktoren gehören der Kontakt des Blutes mit Fremdoberflächen der Herz-Lungen-Maschine (Oxygenator, Schlauchsystem), die Scherkräfte an Rollerpumpen, der intraoperative Blutverlust, das Absenken der Körpertemperatur sowie das chirurgische Trauma an sich.

Die Aktivierung der Immunabwehr kann auf unterschiedlichen Wegen ablaufen und es handelt sich um einen im Einzelnen sehr komplexen Prozess.

Durch den Kontakt mit den Kunststoffoberflächen kommt es zu einer Beschädigung der korpuskulären Blutbestandteile. Reperfusionsschäden der Organe nach Ischämie (u.a. an Leber, Herz, Gehirn) sowie die Ausschüttung von Endotoxinen (z.B. aus dem Darm nach Hypoperfusion im Splanchnikusgebiet) als Folge des Abklemmens der Aorta stellen häufig auftretende Probleme nach einem Einsatz der Herz-Lungen-Maschine dar (Laffey et al. 2002).

Diese Faktoren führen zu einer Aktivierung des Komplementsystems und einer massiven Freisetzung inflammatorischer Mediatoren im Körper des Patienten. Außerdem können durch eine disseminierte intravasale Gerinnung, eine Aktivierung der Gerinnungskaskade und Fibrinolyse, durch Flüssigkeitsverschiebungen und Mikrozirkulationsstörungen die Organfunktionen beeinträchtigt werden. Dadurch kann auch die Funktion der Leber gestört werden. Im Extremfall kann dies im Multiorganversagen und damit letztlich dem Tod des Patienten enden (Paparella et al. 2002, Levy und Tanaka 2003, Wan et al. 1997).

1.2.3.2 Ischämie-Reperfusionsschaden

Allgemein führt eine Unterbrechung und Wiederherstellung der Blutzirkulation zu Ischämie-Reperfusionsschäden. Bekannt sind solche Ischämie-Reperfusionsschäden (I/R) der Leber besonders aus den Bereichen der Lebertransplantation und Leberresektion. Neben der Ischämie, die vor allem eine Ödembildung der Hepatozyten hervorruft (Shibayama et al. 1991), kommt es durch die Reperfusion der Leber zunächst zur Aktivierung von Kupffer-Zellen (u.a. durch aktivierte Komplementfaktoren), den gewebespezifischen Makrophagen der Leber (Jaeschke 2003). Diese sind, neben den Granulozyten, hauptsächlich für die Produktion von Sauerstoffradikalen in der frühen Phase nach Reperfusion verantwortlich. In einer späteren Phase kommt es dann durch die Freisetzung von Zytokinen, v.a. $\text{TNF}\alpha$ aus den Kupffer-Zellen, zu einer Mobilisierung neutrophiler Granulozyten (Jaeschke 2003, Jaeschke und Farhood 1991, Jaeschke et al. 1991). $\text{TNF}\alpha$ nimmt eine zentrale Stellung im Rahmen von Ischämie/Reperfusionsschäden in der Leber (Helewski et al. 2011) ein und besitzt neben der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten zusätzlich auch noch die Funktion der Induktion einer vermehrten Expression des Transmembranproteins ICAM-1. Dadurch wird zusätzlich die Diapedese von neutrophilen Granulozyten verstärkt (Colletti et al. 1998). Diese Abläufe sind für den oxidativen Stress und eine Schädigung der Hepatozyten nach Reperfusion verantwortlich.

1.2.3.3 Zelluläre Ödembildung

Die zelluläre Ödembildung entsteht als Folge mehrerer Abläufe, die bei einem O_2 -Mangel in Gang gesetzt werden (Shibayama et al. 1991). Bei einem bestehenden Sauerstoffmangel im Blut und Gewebe nimmt die Konzentration des ATP-Gehalts aufgrund der fehlenden oxidativen Phosphorylierung in den betroffenen Zellen ab. Zur weiteren ATP-Gewinnung kommt es zum verstärkten Ablauf von Glykogenolyse und anaerober Glykolyse. Die anaerobe Glykolyse führt jedoch auch zu einer vermehrten Laktat-Konzentration mit konsekutivem pH- und ATP-Abfall in der Zelle. Dies wiederum führt zu einem Versagen der Ionenpumpen, sodass es folglich zum Ionen- (Natrium, Calcium, Chlorid) und Wassereinstrom in die Zelle und in die Zellkompartimente und zum Kaliumausstrom kommt. Hieraus resultiert eine hydropische Schwellung der betroffenen Zellen. Der gleichzeitig entstehende kolloidosmotische Druck verstärkt zudem noch die zelluläre Ödembildung. Besteht weiterhin ein O_2 -Mangel, kommt es zur irreversiblen Schädigung und zur Nekrose der Zelle (Arias et al. 2001, Riede et al. 2004).

1.2.3.4 Apoptose

Die Apoptose ist eine kontrollierte Form des programmierten Zelltodes. Dabei kommt es zur Lösung der Zelle aus dem Zellverband, zur Zellschrumpfung, Kondensation des Chromatins, zur DNA-Fragmentation sowie zur Bläschenbildung im Zytoplasma. Die Abschnürungen von Zellanteilen bei erhaltener Plasmamembran werden als apoptotische Körper sichtbar (Schmidt et al. 2005, Ghavami et al. 2005). Diese apoptotischen Körper werden dann im Falle der Leber von Kupferzellen erkannt und phagozytiert. Im Gegensatz zur Nekrose zieht die Apoptose keine begleitende Inflammation nach sich (Arias et al. 2001, Lüllmann-Rauch 2003).

1.3 Einfluss auf die Leber

1.3.1 Morphologischer Aufbau der Leber

Die Leber erfüllt als zentrales Stoffwechselorgan viele lebenswichtige Aufgaben. Dazu gehören die Entgiftung, die Synthese vieler Plasmaproteine und der Gallensäuren, die Resorption der über den Gastrointestinaltrakt aufgenommenen Nährstoffe, die Aufrechterhaltung des Aminosäure- und Glukosegleichgewichts im Körper. Die Leber besteht zum größten Teil aus Hepatozyten, Cholangiozyten und den Kupferzellen als Bestandteilen des Monozyten-Makrophagen-Systems (Löffler und Petrides 2003). Aufgrund der Teilungsfähigkeit der Hepatozyten besitzt die Leber eine hohe Regenerationsfähigkeit und kann daher viele schädigende Einflüsse zu einem hohen Maße kompensieren. Kommt es jedoch zu einem Ausfall der Leberfunktion, zieht dies drastische Konsequenzen nach sich.

Das morphologische Grundelement der Leber ist das polygonale Leberläppchen. Mehrere Leberläppchen sind durch Bindegewebssepten voneinander getrennt. In den Bereichen der Bindegewebssepten befinden sich die Portalfelder, in denen je ein Ast der Portalvene, ein Ast der A. hepatica und ein Gallengang verlaufen (= Glisson-Trias). Im Zentrum des Leberläppchens befindet sich die Zentralvene. Zwischen den Portalfeldern und der Zentralvene befinden sich die Lebersinusoide, umgeben von den in einer Balkenstruktur angelegten Hepatozyten (Abb.1.1).

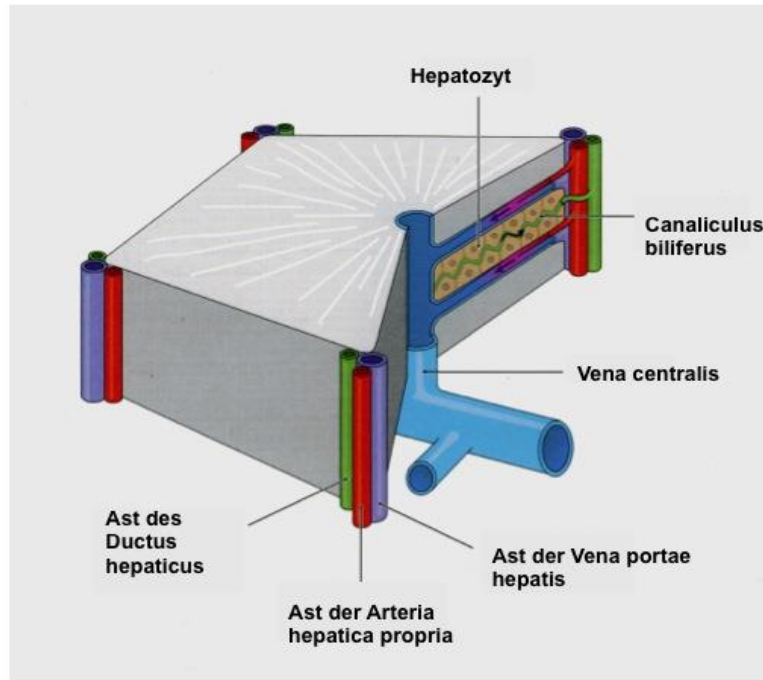


Abbildung 1.1 Schematischer Aufbau eines Leberläppchens (modifiziert nach Schönke et al. 2006, S. 209). Die Strömungsrichtung des Blutes verläuft über die Äste der V. portae hepatis und die A. hepatica propria zur Zentralvene.

Um die pathologische Morphologie der Leber richtig verstehen zu können, ist die genaue Kenntnis des Blutflusses von großer Bedeutung. Die Äste der A. hepatica und der V. portae hepatis teilen sich in die Aa. und Vv. interlobulares auf und geben das Blut am Leberläppchenrand weiter über Kapillaren in die Sinusoide bis zur Zentralvene. Von dort aus wird das Blut dann weiter in die Vv. hepaticae und somit wieder aus der Leber herausgeleitet.

Funktionell wird die Leber in 3 Zonen nach Rappaport (1973) eingeteilt. Periportal befindet sich Zone 1, mit einem hohen Sauerstoff- und Substratgehalt im Blut. Hier findet zum größten Teil die Glukoneogenese statt. Es schließt sich Zone 2 an, in der dieses Angebot bereits reduziert ist. Zone 3 liegt im Bereich der Zentralvene mit dem geringsten Sauerstoff- und Substratgehalt. Hier finden hauptsächlich Glykolyse und Liponeogenese statt. Aus diesem Grund sind Hepatozyten im Bereich der Zentralvene für Nährstoffmangel und ischämische Schäden am vulnerabelsten.

1.3.2 Postoperativer Leberschaden

Leberschäden und akutes Leberversagen nach Operationen mit extrakorporaler Zirkulation und Hypothermie sind ein selten auftretendes, beim Neugeborenen jedoch schwer zu diagnostizierendes Problem mit äußerst schlechter Prognose. Bei Erwachsenen hat das Leberversagen mit einer Häufigkeit von 80% die höchste Mortalitätsrate (11,4%) unter den gastrointestinalen Komplikationen bei Erwachsenen (Zacharias et al. 2000, Michalopoulos et al. 1997). Diese können entweder durch den direkten Einfluss der EKZ und Hypothermie, oder sekundär nach Komplikationen wie beispielsweise durch das *Low Cardiac Output Syndrome* entstehen.

Für Neugeborene und Kinder stellt das akute Leberversagen nach Korrekturoperation mit Herz-Lungen-Maschine und Herabsetzen der Körpertemperatur eine nennenswerte, aber kaum erforschte Komplikation dar. Bisherige Forschungsarbeiten wählten den Schwerpunkt in der Analyse funktioneller Veränderungen älterer Kinder, vor allem die Entwicklung der Transaminasen und der Gerinnungsparameter (Shteyer et al. 2011, Seghaye et al. 1993). Diese Erkenntnisse können jedoch nicht einfach auf Neugeborene übertragen werden.

Forschungen über morphologische Veränderungen der Leber speziell von Neugeborenen, die Aufschluss über einen direkten Einfluss der Herz-Lungen-Maschine und Hypothermie geben könnten, wurden bisher kaum durchgeführt.

1.4 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit ist Teil einer ersten systematischen Analyse von Auswirkungen der Herz-Lungen-Maschine und Hypothermie auf unterschiedliche Organe eines neugeborenen Organismus bei zuvor klar definierter Operation mit extrakorporaler Zirkulation und systemischer Hypothermie. Da Biopsien bei Neugeborenen zur Klärung wissenschaftlicher Fragen ethisch nicht zu vertreten sind, wurde das hier vorgestellte tierexperimentelle Modell aufgebaut und im Rahmen dieser Studien wurden Biopsien von Leber, Gehirn, Herz, Lunge und Niere entnommen.

Die vorliegende Arbeit bezieht sich auf die postoperative Untersuchung zur Lebermorphologie. Dabei wurden die inflammatorische Reaktion, das hepatozelluläre Ödem und die hepatozelluläre Apoptose bewertet. Das Ziel der Untersuchung besteht darin, folgende Fragen zu beantworten:

1. Welchen Einfluss hat die extrakorporale Zirkulation speziell auf die Inflammation, das hepatozelluläre Ödem und die Apoptose der Hepatozyten?
2. Besitzt die tiefe Hypothermie einen protektiven Effekt auf das neonatale Lebergewebe?
3. Ruft allein das chirurgische Trauma morphologische Veränderungen in der Leber hervor?
4. Kann anhand der postoperativen morphologischen Befunde ein Vorteil für eines der Verfahren ermittelt werden?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit erfolgten an insgesamt 21 neugeborenen Ferkeln. Die Tiere waren maximal 7 Tage alt, das Körpergewicht betrug $2,9 \pm 0,4$ kg. Die Tiere wurden erst am Tag der Versuchsdurchführung vom Versuchsgut Relliehausen der Fakultät für Agrarwissenschaften der Georg-August-Universität Göttingen in das Tierexperimentelle Forschungsinstitut der Universitätsmedizin Göttingen gebracht. Alle Tiere wurden unter Berücksichtigung der deutschen und europäischen Rechtsgrundlagen und Tierschutzbestimmungen behandelt.

Die Versuche erfolgten nach Zustimmung der Tierschutzkommission der Georg-August-Universität Göttingen und der Bezirksregierung Braunschweig (Genehmigung 509.42502-01-27.04).

2.2 Versuchsdurchführung

Die Anästhesieeinleitung erfolgte durch intramuskulär verabreichte Gabe von Azaperon (4mg/kg) und Ketamin (10mg/kg).

Nach Punktion einer Ohrvene mittels Venenverweilkanülen wurde die intravenöse Narkose begonnen, welche über den gesamten Versuchs- und Beobachtungszeitraum aufrechterhalten wurde.

Eine kontinuierliche Messung der Körpertemperatur erfolgte simultan über rektal und ösophageal eingeführte Sonden. Es folgte die Rückenlagerung und sterile Abdeckung.

Nach Tracheotomie erfolgte die Intubation und maschinelle Beatmung (Atemzugvolumen 300–400ml/kgKG bei einer Beatmungsfrequenz von 25–40 Zügen/Min.) der Schweine mit einem Luft/Sauerstoff/Isolfluran-Gemisch (Flow 2l/Min., Fa. Dräger Ventilog 2, Lübeck).

Zur Aufrechterhaltung der Narkose mit Pentobarbital (5-10mg/kg/h) und Ketamin (6-9mg/kg/h perfusorgeschützt), zur Messung des ZVD sowie der Blutgasparameter und zum Flüssigkeitsersatz wurde die V. jugularis interna rechts im lateralen Halsdreieck freigelegt und punktiert. Isofluran wurde inhalativ verabreicht.

Ein Zugang über die rechte A. femoralis wurde zur Messung des mittleren arteriellen Druckes geschaffen.

Über eine mediane Sternotomie und anschließende Eröffnung und Aufspannung des Perikards wurde der Zugang zum Herzen ermöglicht. Nach systemischer Antikoagulation mit Heparin (300 U/kg, ACT>400s) folgte eine apikale Inzision und die Platzierung einer Druckmesssonde im linken Ventrikel. Zur Messung der regionalen Kontraktilität wurden Ultraschallkristalle in der Wand des linken Ventrikels platziert.

Zum Anschluss an die Herz-Lungen-Maschine wurden Aorta ascendens und rechtes Atrium kanüliert. Anfallendes Blut aus den Lungenvenen wurde mittels Sauger drainiert.

Das weitere Vorgehen erfolgte je nach Einteilung der Tiere in der jeweiligen Gruppe (Abb. 2.1):

1. In der Gruppe **CPB** [Extrakorporale Zirkulation und Kardioplegie bei moderater Hypothermie (32°C)] wurde über den Wärmeaustauscher der Herz-Lungen-Maschine die Körpertemperatur der Tiere auf 32°C abgesenkt. Nach 30 Minuten folgte die Abklemmung der Aorta. Zur Myokardprotektion wurde gekühlte Bretschneider-Kardioplegielösung (4°C, 30ml/kg) antegrad gegeben. Die Reperfusion und Einstellung der Normothermie erfolgten nach 90 Minuten, nachdem die Aortenklemme wieder eröffnet wurde. Die Körperperfusion wurde für den gesamten Zeitraum mit 2,5l/min/m² aufrechterhalten. Nach 60 Minuten erfolgte der Abgang von der Herz-Lungen-Maschine. Nach Entfernung der Kanülen erfolgte die Aufhebung der Antikoagulation mit 1:1 Protaminsulfat.

2. In der Gruppe **DHCA** [Totaler Kreislaufstillstand und protektive Kardioplegie in tiefer Hypothermie (18°C)] wurde die Körpertemperatur mit dem Wärmeaustauscher der Herz-Lungen-Maschine auf 18°C gesenkt. Die Abklemmung der Aorta erfolgte ebenfalls nach 30 Minuten, allerdings wurde an dieser Stelle ein kompletter Kreislaufstillstand durch Anhalten der Herz-

Lungen-Maschine herbeigeführt. Auch hier wurde die Myokardprotektion durch eine Bretschneider-Kardioplegielösung (4°C, 30ml/kg) durchgeführt. Dieser Kreislaufstillstand wurde für 90 Minuten beibehalten. Es folgte die 60-minütige Reperfusion und Einstellung der Normothermie mit anschließendem Abgang von der Herz-Lungen-Maschine. Auch hier erfolgte nach Entfernung der Kanülen die Aufhebung der Antikoagulation mit 1:1-Protaminsulfat.

3. Zusätzlich wurde eine sogenannte **Sham-Gruppe** [Simulation] untersucht. In dieser Gruppe entsprechen die Vorbereitungsschritte denen der Gruppen CPB und DHCA, allerdings mit dem Unterschied, dass in dieser Gruppe keine Herz-Lungen-Maschine angeschlossen wurde. Stattdessen wurden diese Versuchstiere für den Zeitraum von insgesamt 180 Minuten, die für die Einleitung der Hypothermie und den Einsatz der Herz-Lungen-Maschine in den beiden anderen Gruppen benötigt wurden, auf dem Operationstisch unbehandelt belassen.

4. Als **Kontrollgruppe** dienten die (Spender-)Tiere des jeweils gleichen Wurfes, von welchen das Blut zum Befüllen der Herz-Lungen-Maschine genutzt wurde. Nach der Blutspende wurden von diesen Tieren die Organe entnommen (darunter auch Leberbiopsien), um diese nach deren Aufbereitung als Basiswerte für die morphologische Auswertung zur Verfügung zu haben.

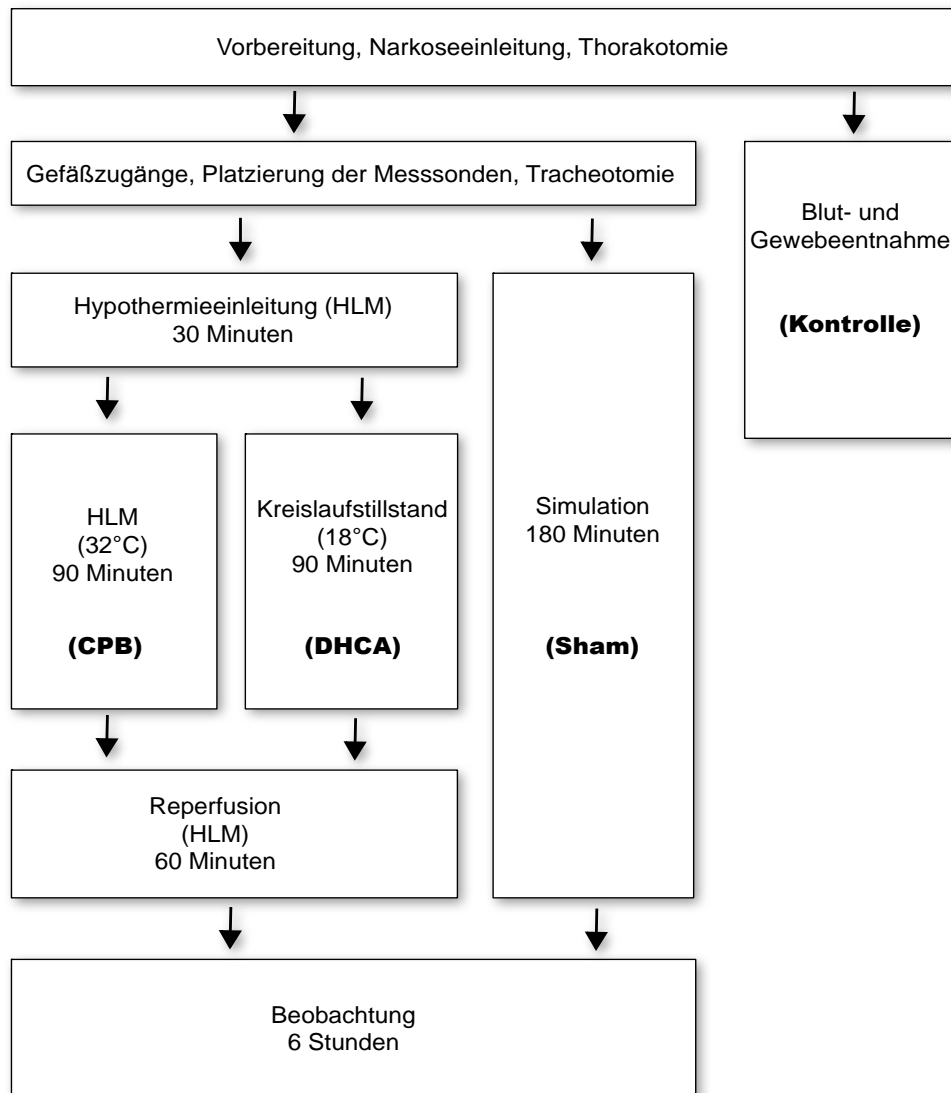


Abbildung 2.1 Schematische Übersicht über Versuchsaufbau und Gruppeneinteilung

Die Tiere der ersten drei Gruppen wurden anschließend für einen Zeitraum von bis zu 6 Stunden postoperativ nachbeobachtet. Tiere, die den kompletten Zeitraum von 6 Stunden überlebt hatten, wurden ohne Wiedererwachen mit einer Überdosis Pentobarbital getötet. In die Untersuchungen dieser Arbeit wurden nur diese Tiere, welche den Beobachtungszeitraum von 6 Stunden überstanden hatten, mit einbezogen: Aus der CPB-Gruppe waren es 4 Tiere, aus der DHCA-Gruppe 5 Tiere und aus der Sham-Gruppe 3 Tiere. Die Kontrollgruppe bestand aus 9 Tieren.

2.3 Aufbereitung der Proben

Direkt nach der Tötung der Tiere wurde die Leber explantiert und es wurden Biopsien stets aus dem gleichen Leberlappen entnommen. Die Gewebeentnahmen wurden auf eine Größe von maximal 1,0 x 1,0 x 0,5cm zugeschnitten und sodann umgehend für mindestens 24 Stunden in 10% gepuffertem Formalin (Firma Sigma Diagnostics St. Louis, MO, USA) fixiert. Die Proben wurden makroskopisch beschrieben und anschließend beschriftet. Danach wurden die Präparate in den Universal-Einbettkasten gelegt, etwa für 1 Stunde in Leitungswasser gewässert und zuletzt mit Aqua dest. gespült.

Daraufhin wurden die Proben in den Einbettautomaten (TP 1020, Firma Leica, Bensheim) eingehängt. Die Beschickung des Einbettautomaten erfolgte in aufsteigender Alkoholreihe mit anschließender Einbettung in Paraffin (s. Anhang 1)

Die Paraffin-Blöcke wurden in der Ausgieß-Station (Firma Leica, Bensheim) mit Paraplast Plus (65°C) gegossen und für mindestens 15 Minuten auf der Kühlplatte (KUNZ-CP4, Firma Leica, Bensheim) abgekühlt.

Die nun abgekühlten Blöcke wurden im Schlittenmikrotom (SM 2000R, Firma Leica, Nußloch) auf die Größe von 1 µm zugeschnitten (Microtome Blades S35, Firma Feather, Osaka, Japan) und im Wasser bei einer Wassertemperatur von 45°C gestreckt.

Nach Aufziehen auf gereinigte Objektträger wurden die Schnitte über Nacht getrocknet und so für die anschließende laborübliche Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (s. Anhang 2) vorbereitet.

2.4 Auswertung der Proben

Für die Beurteilung der Präparate wurden am Lichtmikroskop unterschiedliche Vergrößerungen (25-fach und 100-fach) eingestellt und digital dokumentiert

(Digitalkamera C-4040 Zoom, Mikroskop BH2 Firma Olympus, Hamburg, analySIS, Soft Imaging System GmbH, Münster).

Jedes Präparat erhielt jeweils 3 Übersichtsaufnahmen in 25-facher Vergrößerung aus unterschiedlichen Regionen des Präparates. In jeder dieser Übersichtsaufnahmen kam mindestens ein Portalfeld mit zugehörigem Zentralfeld zur Darstellung (Abb. 2.2).

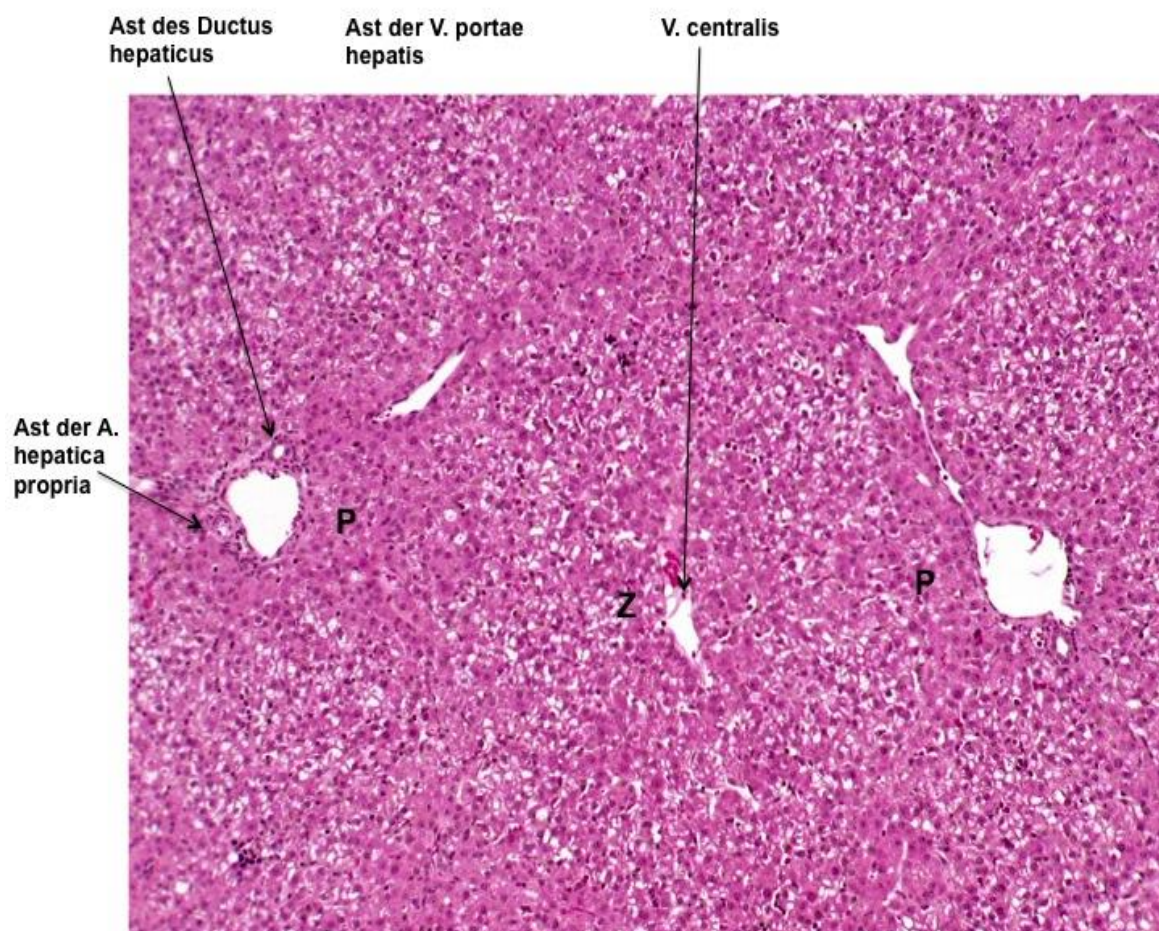


Abbildung 2.2 Beispiel eines Übersichtspräparates der Leber (25-fach vergrößert, HE-Färbung); Portalfeld (P) und Zentralfeld (Z) sind entsprechend markiert

Zur morphologischen Auswertung wurden für jede Übersichtsaufnahme jeweils 3 Aufnahmen im Bereich des Portalfeldes (Abb. 2.3) und 3 Aufnahmen im Bereich des Zentralfeldes (Abb. 2.4) in 100-facher Vergrößerung erstellt.

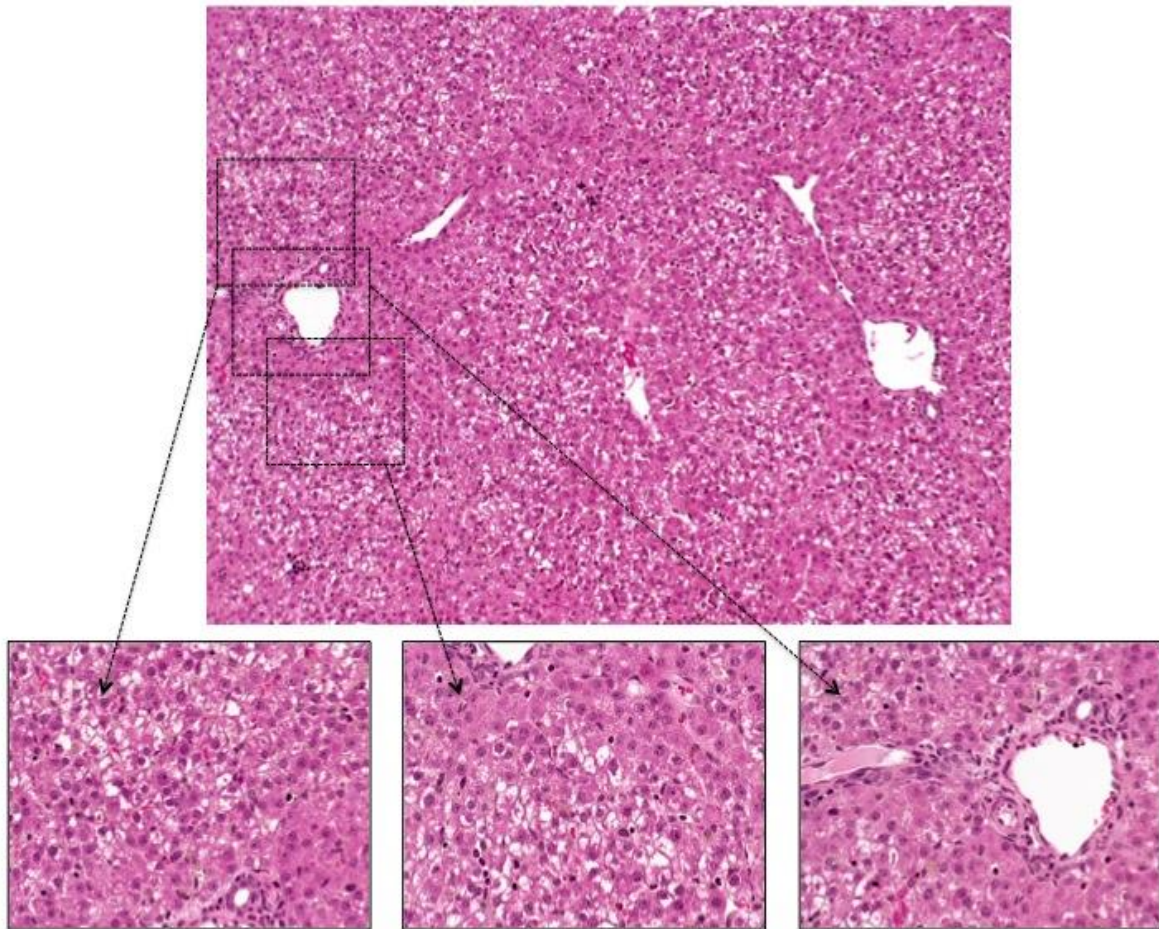


Abbildung 2.3 *Beispiel für 3 Portalfeldvergrößerungen eines Übersichtspräparates (100-fach vergrößert, HE-Färbung). Im Übersichtspräparat wurden die Bereiche, aus denen die jeweiligen Vergrößerungen stammen, entsprechend markiert.*

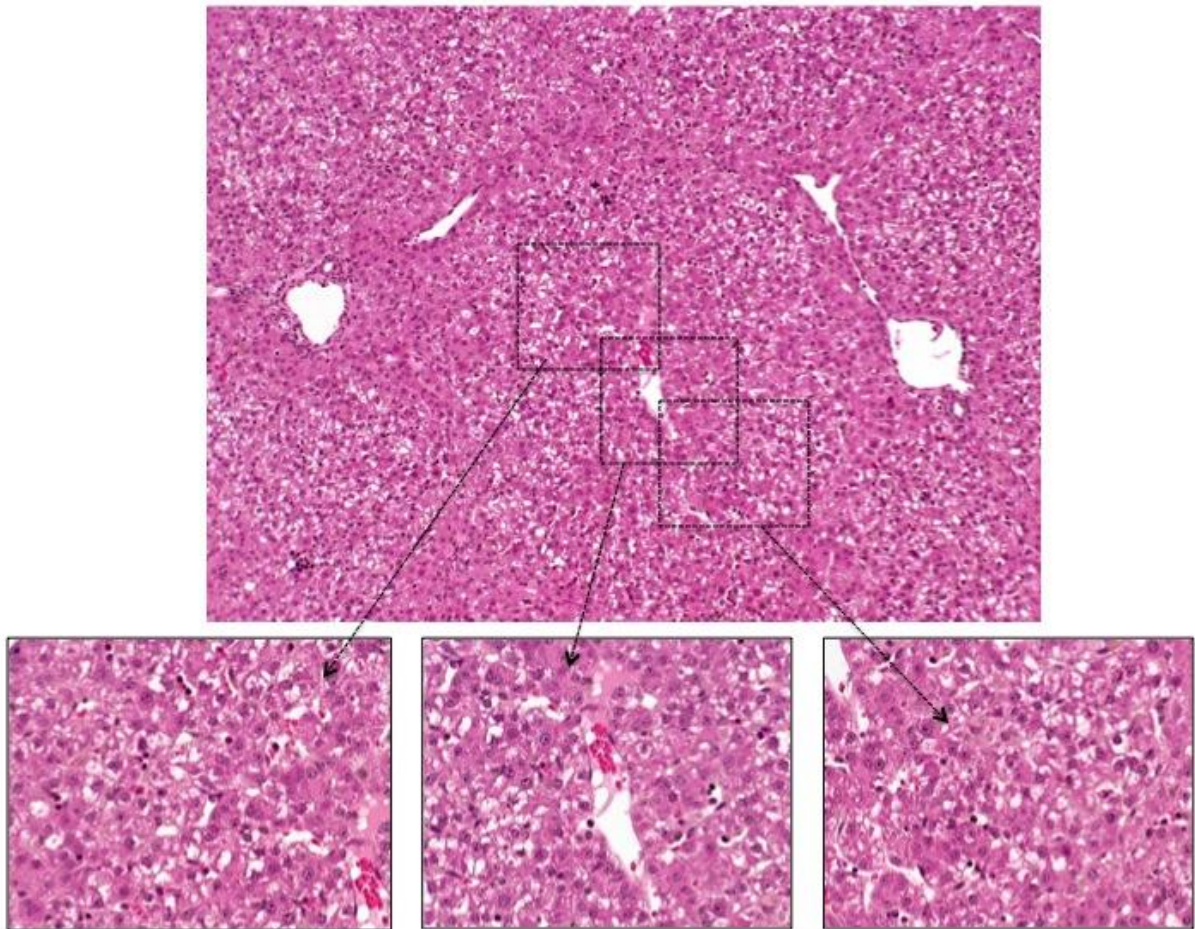


Abbildung 2.4 Beispiel für 3 Zentralfeldvergrößerungen (100-fach vergrößert, HE-Färbung). Die Bereiche, aus denen die Vergrößerungen stammen, wurden im Übersichtspräparat entsprechend markiert.

Insgesamt wurden somit pro Präparat 18 Gesichtsfelder ausgewertet (Abb. 2.5).

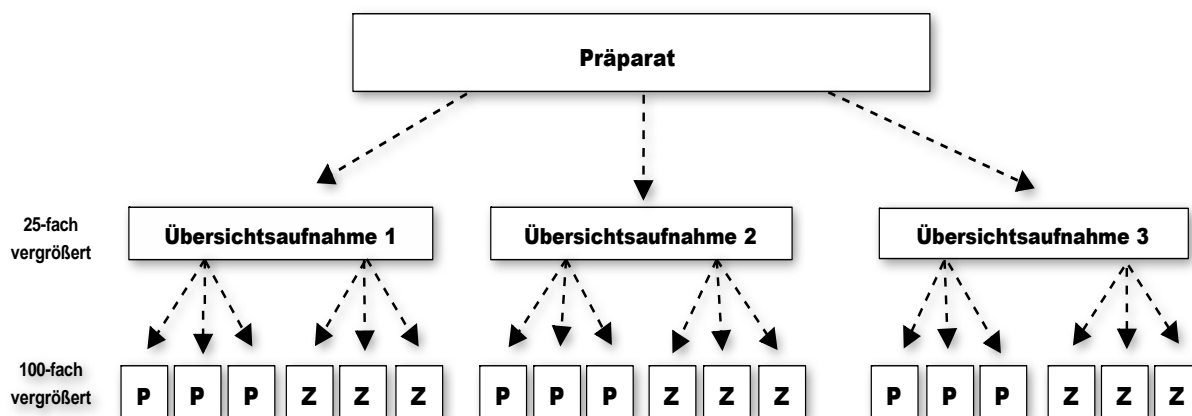


Abbildung 2.5 Schematische Übersicht über die Auswertung eines Präparates. Die Übersichtsaufnahmen wurden in 25-facher Vergrößerung angefertigt, die Auswertung erfolgte in 100-facher Vergrößerung getrennt nach Portalfeld und Zentralfeld (P=Portalfeld, Z=Zentralfeld).

Mit Hilfe eines für diese Studie entwickelten Score-Systems von 0 bis maximal 3 Punkten wurden für jedes Bild die Scores für Leukozyteninfiltration als Marker zur Gewebereaktion (Inflammation) und hepatozellulären Destruktion (Ödem) ermittelt, wobei 0 für einen normalen Befund steht, 1 für eine leichtgradige Veränderung, 2 für moderate Veränderungen und 3 für schwere Veränderungen.

Die Punkteverteilung für die Inflammation geschah wie folgt:

- 0 Punkte: Klare Zellstruktur, klare Zellanordnung, gute Balkenstruktur
- 1 Punkt: <15 Inflammationszellen pro Gesichtsfeld (Granulozyten, Kupffer-Zellen, Lymphozyten vereinzelt oder in Gruppe)
- 2 Punkte: 15-50 Inflammationszellen pro Gesichtsfeld (Granulozyten, Kupffer-Zellen, Lymphozyten vereinzelt oder in Gruppe)
- 3 Punkte: > 50 Inflammationszellen pro Gesichtsfeld (Granulozyten, Kupffer-Zellen, Lymphozyten vereinzelt oder in Gruppe).

Ein Beispiel für eine gering ausgeprägte Inflammation ist in Abbildung 2.6 dargestellt. Ein Beispiel mit einem hohen Grad inflammatorischer Reaktion zeigt exemplarisch die Abbildung 2.7.

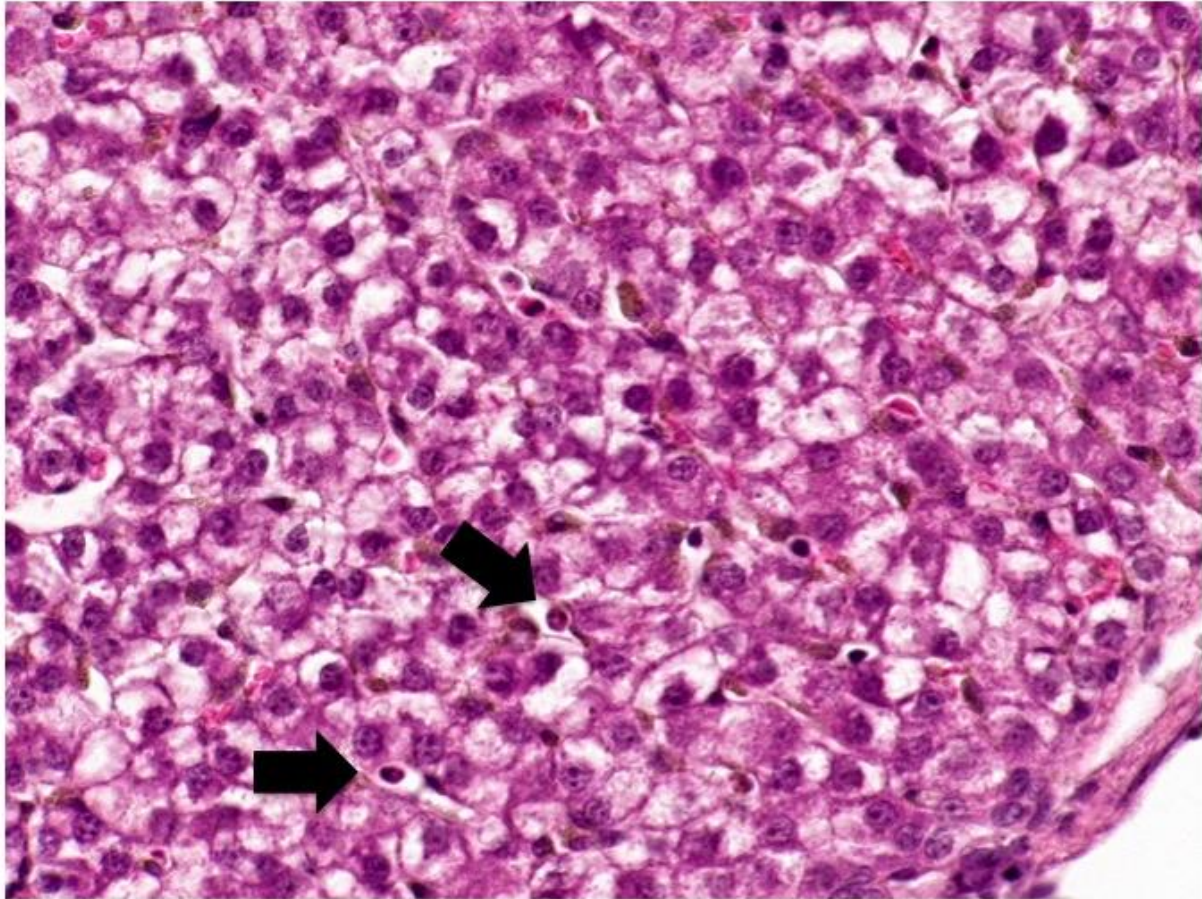


Abbildung 2.6 Beispiel eines Portalfeldes (100-fach vergrößert, HE-Färbung) mit einem Score von 0 Punkten für Inflammation aus der Gruppe Sham. In diesem Präparat sind nur vereinzelt inflammatorische Zellen zu erkennen. Exemplarisch wurden Granulozyten entsprechend mit einem Pfeil (→) markiert.

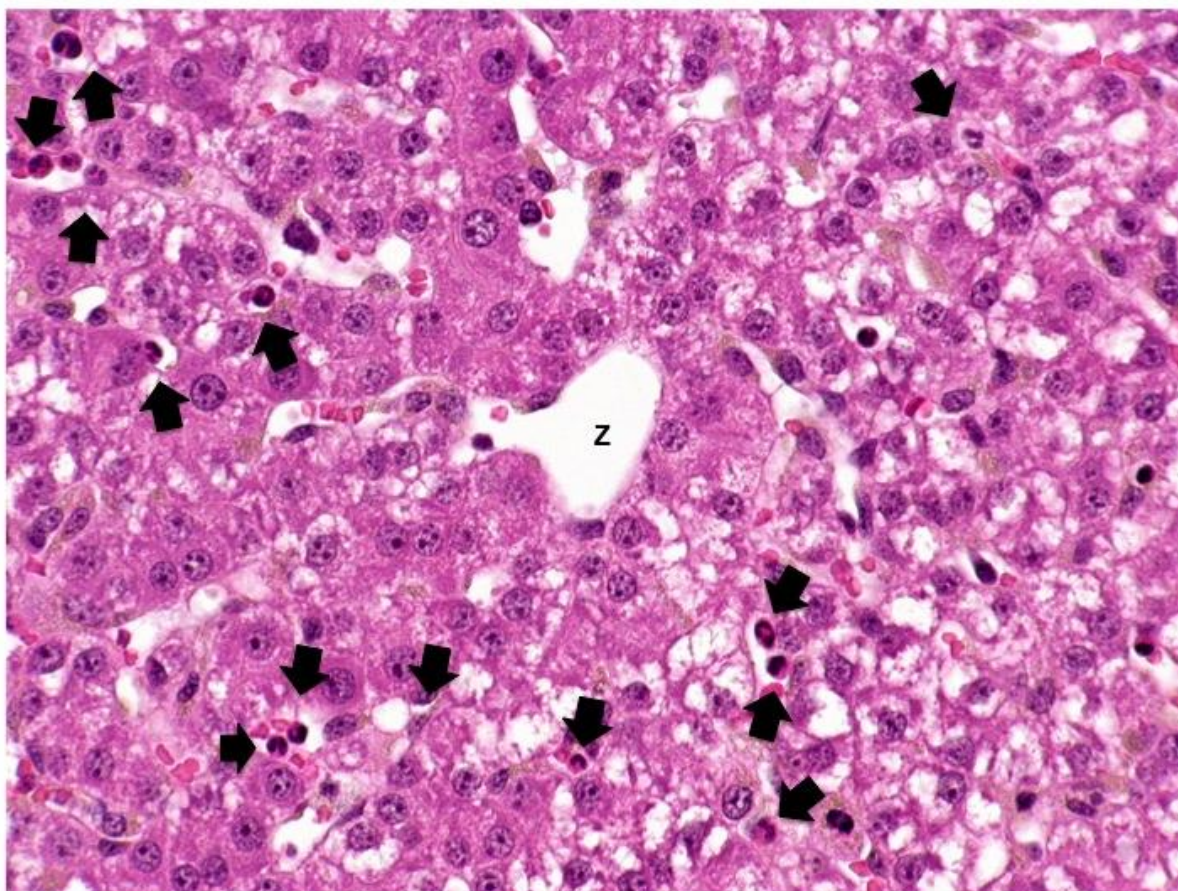


Abbildung 2.7 Beispiel für ein Präparat mit einem ausgeprägten inflammatorischen Geschehen. Dieses Präparat wurde mit 2 Punkten bewertet. Veranschaulichung durch vergrößerte Darstellung eines Zentralfeldes aus der Gruppe DHCA (100-fach vergrößert, HE-Färbung). Inflammatorische Zellen wurden exemplarisch entsprechend mit einem Pfeil (➔) markiert. Z=Zentralvene

Die Punkteverteilung für das hepatozelluläre Ödem erfolgte so:

- 0 Punkte: Klare Zellstruktur, klare Zellanordnung, gute Balkenstruktur
- 1 Punkt: Bis $\frac{1}{3}$ der Hepatozyten im Gesichtsfeld verändert
- 2 Punkte: Bis $\frac{1}{2}$ der Hepatozyten im Gesichtsfeld verändert
- 3 Punkte: Mehr als $\frac{1}{2}$ der Hepatozyten im Gesichtsfeld verändert.

Ein Beispiel für ein Präparat ohne hepatozelluläres Ödem mit guter Balkenstruktur, klarer Zellanordnung und guter Zellstruktur ist in Abbildung 2.8 dargestellt. Die

Abbildung 2.9 zeigt ein Gesichtsfeld mit stark ausgeprägter hepatozellulärer Ödembildung und Komprimierung der Sinusoide.

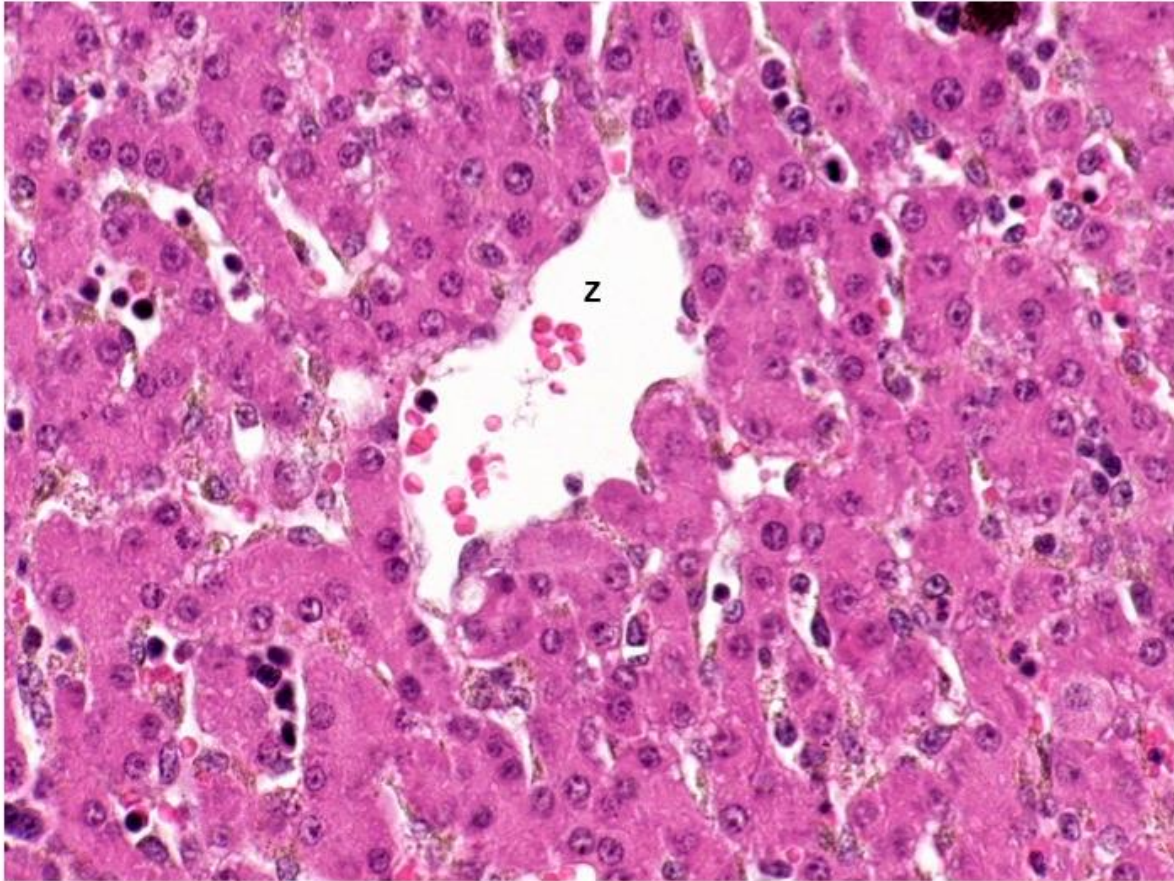


Abbildung 2.8 Beispiel für ein mit 0 Punkten gewertetes Präparat für hepatozelluläres Ödem. 100-fach vergrößerte Darstellung eines Zentralfeldes aus der Gruppe CPB. Gut zu erkennen ist die klare Zellstruktur, die klare Zellanordnung und regelrechte Balkenstruktur. Zentral im Bild ist die Zentralvene (**Z**) zu erkennen.

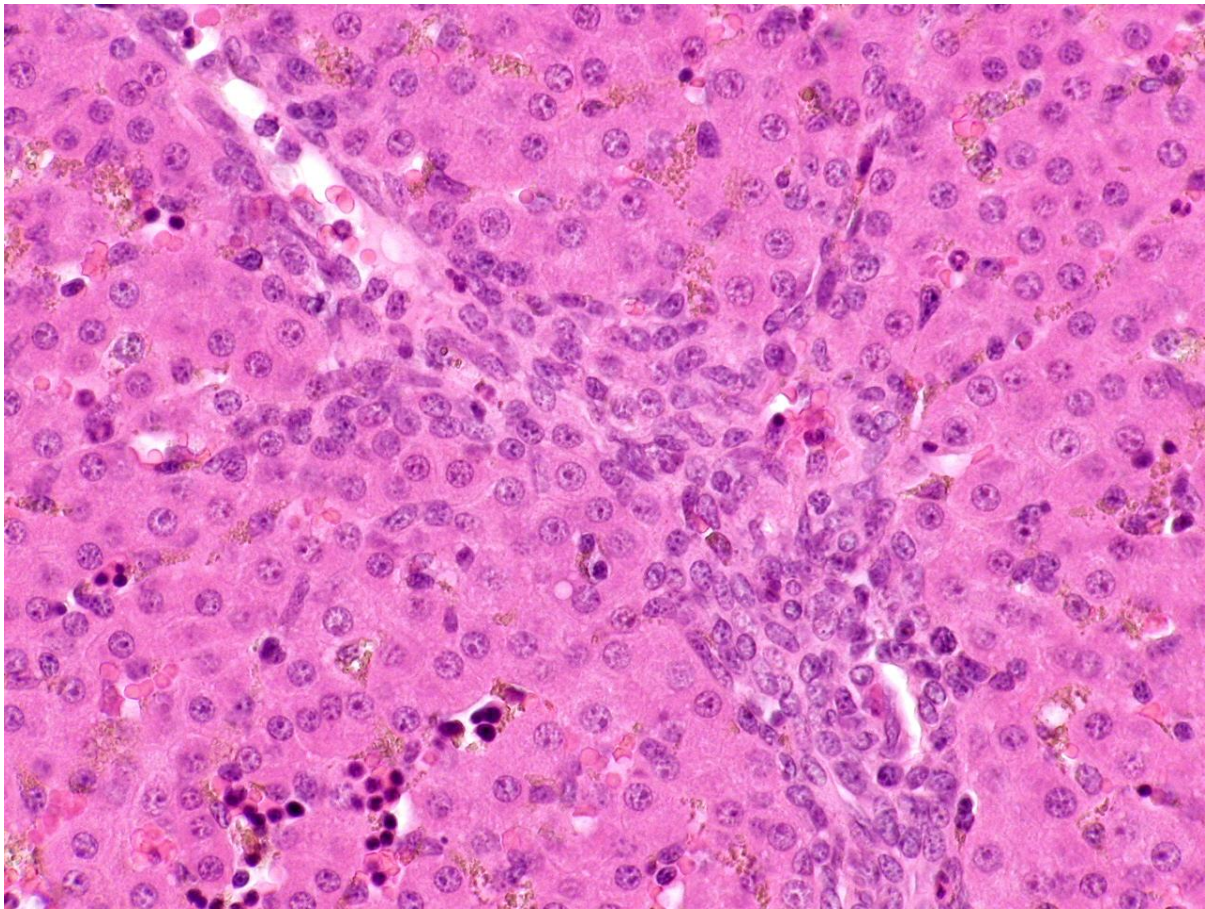


Abbildung 2.9 *Beispiel für hepatozelluläres Ödem mit einem Score von 2 Punkten. Darstellung eines 100-fach vergrößerten Bezirks in der Nähe eines Portalfelds aus der Gruppe DHCA. Die Sinusoide sind aufgrund des Zellödems weitestgehend komprimiert.*

Die Auswertung der apoptotischen Hepatozyten pro Gesichtsfeld erfolgte jeweils durch Auszählen (Abb. 2.10 und 2.11).

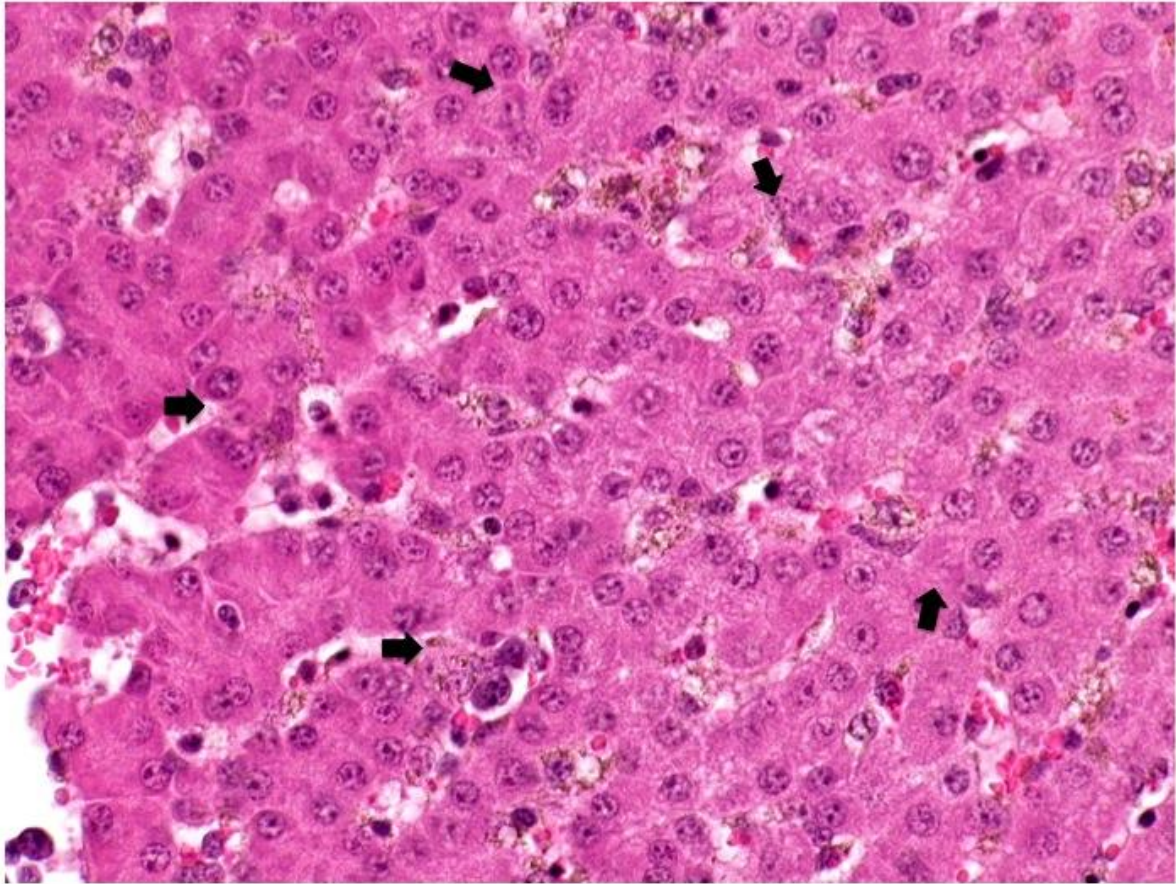


Abbildung 2.10 Exemplarisch wird hier aus der Gruppe DHCA im Bereich eines Zentralfeldes ein Gesichtsfeld mit geringer Apoptosenanzahl dargestellt. Apoptosen wurden entsprechend mit einem Pfeil gekennzeichnet. Erkennbar sind apoptotische Körnung und Lösung der Zelle aus dem Zellverband (→).

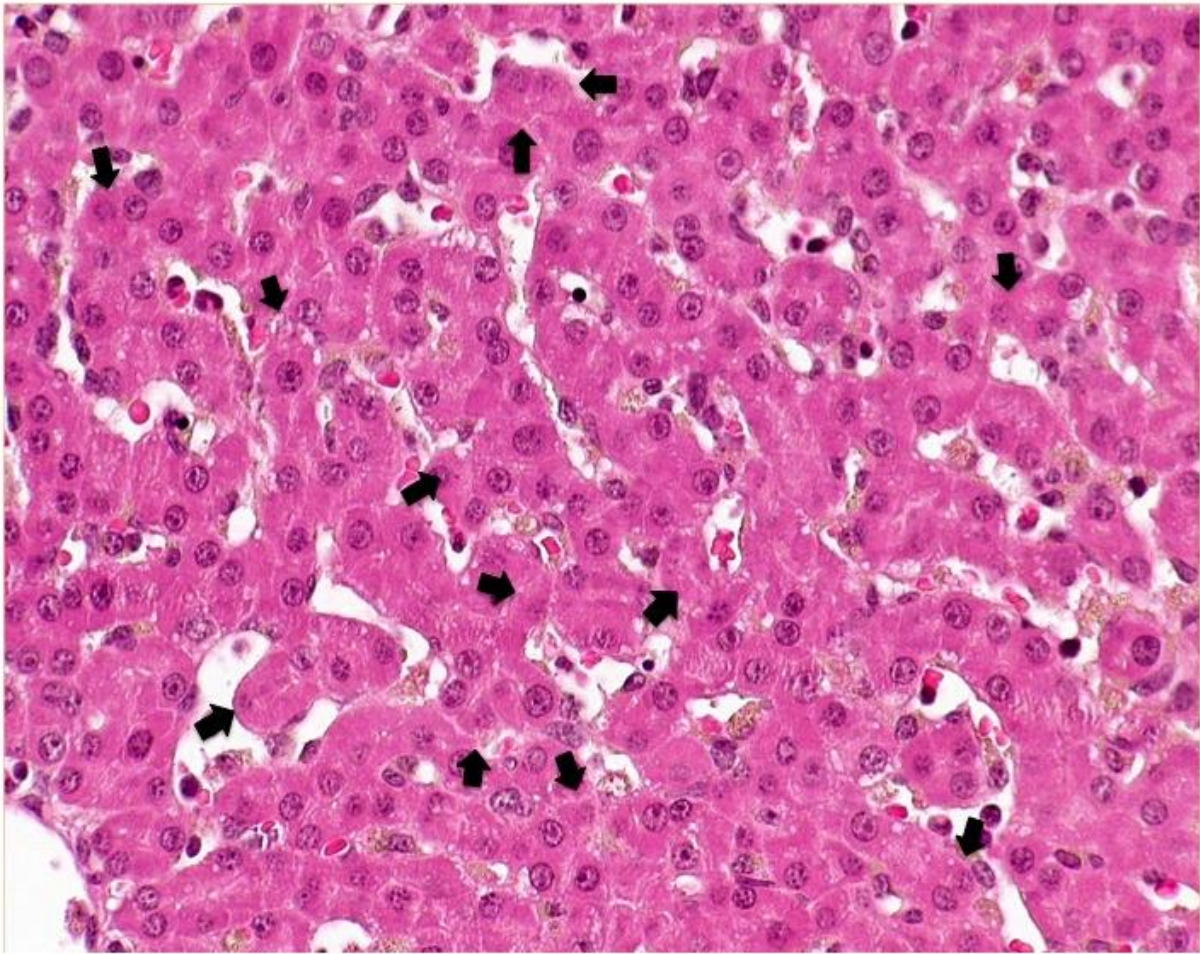


Abbildung 2.11 Gesichtsfeld eines Präparats der Gruppe DHCA mit einer hohen Anzahl apoptotischer Hepatozyten. Exemplarisch wurden zur Veranschaulichung einige der betroffenen Hepatozyten mit einem Pfeil (➔) markiert. Zu erkennen ist die Zellschrumpfung und Kondensation des Chromatins, sowie die Lösung der Zelle aus dem Zellverband.

Bei Auftreten von Nekrose oder sonstigen Veränderungen wurden diese gesondert dokumentiert.

Die lichtmikroskopische Untersuchung erfolgte geblendet bezüglich der Versuchsgruppen. Zuerst wurde dies durch einen Untersucher durchgeführt, im Anschluss erfolgte zur Qualitätskontrolle eine weitere Auswertung zusammen mit einem zweiten Untersucher.

2.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Abteilung Medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen. Zur Auswertung wurde eine *repeated-measure ANOVA (Analysis of variance)* durchgeführt. Für alle Analysen wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha=5\%$ festgelegt. In weiterführenden Paarvergleichen wurde mit Hilfe der Tukey-Methode adjustiert. Die Analysen wurden mit Hilfe der Software SAS Version 9.2 durchgeführt und Grafiken mit Statistica Version 9.1 erstellt. Werte von $p<0,05$ wurden als statistisch signifikant angenommen, Werte von $p<0,001$ wurden als hoch signifikant gewertet.

In dieser Arbeit liegt ein zwei-faktorielles Design vor. Als Faktoren wurden in diesem Modell die Gruppen (CPB, DHCA, Sham, Kontrolle) und die Lokalisationen (Portalfeld bzw. Zentralfeld) der Messung betrachtet. Nach Medianbildung hatte jedes Versuchstier somit zwei abhängige Werte. Bei metrischen Variablen (Apoptose) wurden Mittelwerte u. Standardabweichung der einzelnen Stufen berechnet, bei Scores wurden Häufigkeiten der einzelnen Kombinationen aufgeführt.

Die Daten werden als Mittelwerte mit einer Standardabweichung von 2 präsentiert.

Wenn keine Wechselwirkung im Hinblick auf unterschiedliche Verteilungen zwischen den Lokalisationen zu finden war, wurden unmittelbar Paarvergleiche zur Darstellung der Unterschiede zwischen den Gruppen (CPB, DHCA, Sham und Kontrolle) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Unterschiede zwischen Portal- und Zentralfeld

Zunächst wurde überprüft, ob möglicherweise Unterschiede zwischen den Lokalisationen Portalfeld und Zentralfeld für Inflammation, Ödem oder Apoptose vorliegen.

3.1.1 Inflammation

Bei Betrachtung der Verteilung von Inflammation bestanden zwischen den Lokalisationen Portalfeld und Zentralfeld keine statistisch signifikanten Unterschiede (Tab. 3.1).

Tabelle 3.1 Score-Verteilung von Inflammation im Vergleich zwischen Portalfeld und Zentralfeld (Darstellung als Mittelwerte \pm Standardabweichung).

	Portalfeld	Zentralfeld
CPB (n=4)	2,4 \pm 0,7	2,7 \pm 0,7
DHCA (n=5)	1,6 \pm 0,6	1,6 \pm 0,6
Sham (n=3)	1 \pm 0,8	1,3 \pm 0,8
Kontrolle (n=9)	0,5 \pm 0,5	0,3 \pm 0,4

3.1.2 Hepatozelluläres Ödem

Auch die Verteilung des Scores Ödem zeigte im Vergleich zwischen den beiden untersuchten Lokalisationen keine Signifikanz (Tab. 3.2)

Tabelle 3.2 Score-Verteilung des hepatozellulären Ödems im Vergleich zwischen den Lokalisationen Portalfeld und Zentralfeld (Darstellung als Mittelwerte \pm Standardabweichung).

	Portalfeld	Zentralfeld
CPB (n=4)	0,8 \pm 0,7	0,5 \pm 0,7
DHCA (n=5)	2,1 \pm 0,6	1,9 \pm 0,6
Sham (n=3)	0,7 \pm 0,8	0,7 \pm 0,8
Kontrolle (n=9)	0,1 \pm 0,4	0,3 \pm 0,4

3.1.3 Apoptose

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Apoptoseverteilung werden in Tabelle 3.3 dargestellt. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Lokalisationen ergab sich dabei nicht.

Tabelle 2.3 Verteilung der Apoptose (Anzahl apoptotischer Zellen) im Vergleich der beiden Lokalisationen Portalfeld und Zentralfeld (Darstellung als Mittelwerte \pm Standardabweichung).

	Portalfeld	Zentralfeld
CPB (n=4)	8,4 \pm 5,4	9,3 \pm 5,4
DHCA (n=5)	18,8 \pm 4,9	18,5 \pm 4,9
Sham (n=3)	20,7 \pm 6,3	24 \pm 6,3
Kontrolle (n=9)	10,9 \pm 3,6	11,8 \pm 3,6

3.2 Unterschiede zwischen den Gruppen

3.2.1 Inflammation

Die stärkste Ausprägung des inflammatorischen Geschehens lag in der Versuchsgruppe CPB (2,5 \pm 0,5) vor, während die geringste Ausprägung in der Kontrollgruppe (0,4 \pm 0,34) bestand (Abb. 3.1).

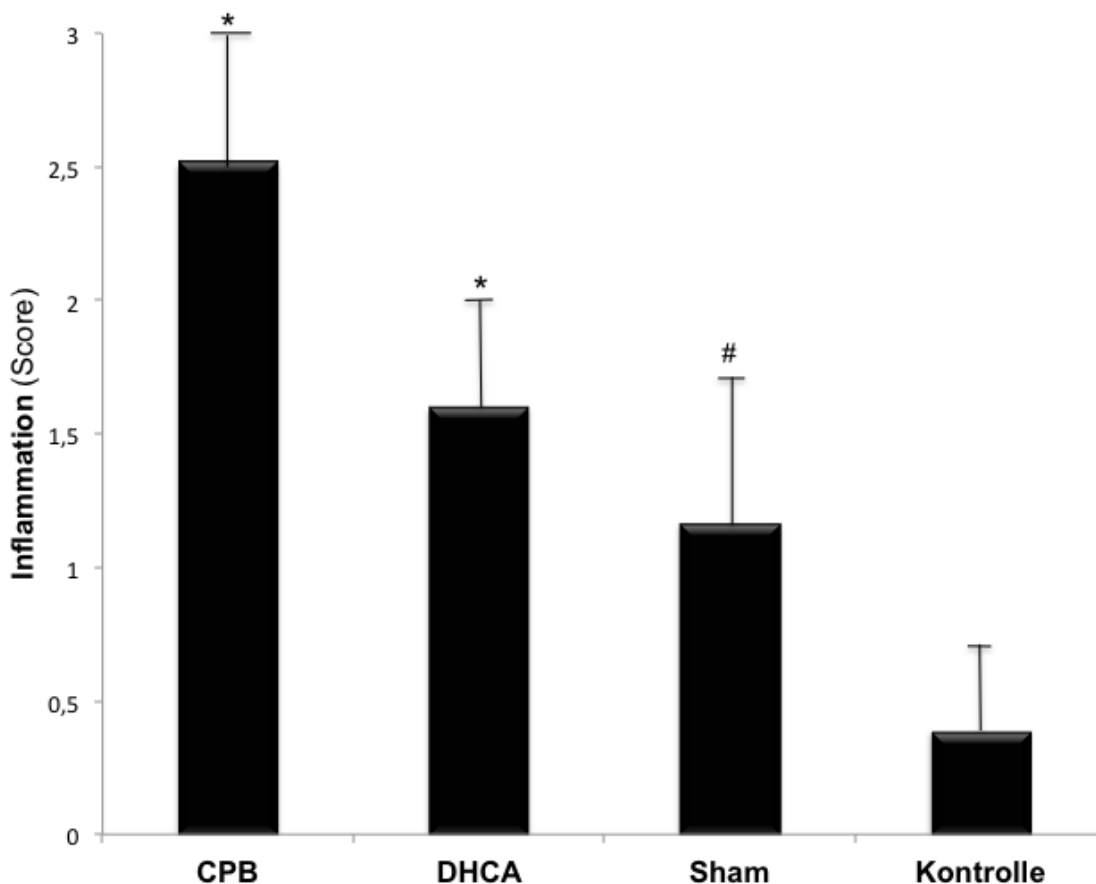


Abbildung 3.1 Darstellung des Scores Inflammation im Vergleich der Gruppen CPB, DHCA, Sham und Kontrolle pro Gesichtsfeld (Darstellung als Mittelwerte \pm Standardabweichung). * $p < 0,001$ vs. Kontrolle, # $p < 0,05$ vs. Kontrolle

Hoch signifikant ($p < 0,001$) war der Vergleich zwischen den Versuchsgruppen CPB ($2,5 \pm 0,5$) bzw. DHCA ($1,6 \pm 0,4$) und Kontrollgruppe ($0,4 \pm 0,3$). Deutlich höher ist somit die inflammatorische Reaktion in der Gruppe CPB bzw. DHCA im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Mittelwert der Scores in der Gruppe Sham lag bei $1,2 \pm 0,6$ (vs. $0,4 \pm 0,3$ in der Kontrollgruppe), dabei zeigte sich ein weiterer statistischer Unterschied ($p < 0,043$) im Vergleich der Gruppen Sham und Kontrolle (Abb. 3.1).

Lediglich ein Trend ($p = 0,056$) konnte im Gruppenvergleich zwischen DHCA und Sham ausgemacht werden. Keine signifikanten Unterschiede bestehen im Gruppenvergleich CPB und DHCA, sowie in DHCA und Sham.

3.2.2 Hepatozelluläres Ödem

Es stellte sich heraus, dass das größte Ausmaß eines hepatozellulären Ödems in der Versuchsgruppe DHCA ($2 \pm 0,4$) vorlag, wobei die geringste Schädigung in der Kontrollgruppe ($0,2 \pm 0,3$) zu finden war (Abb. 3.2).

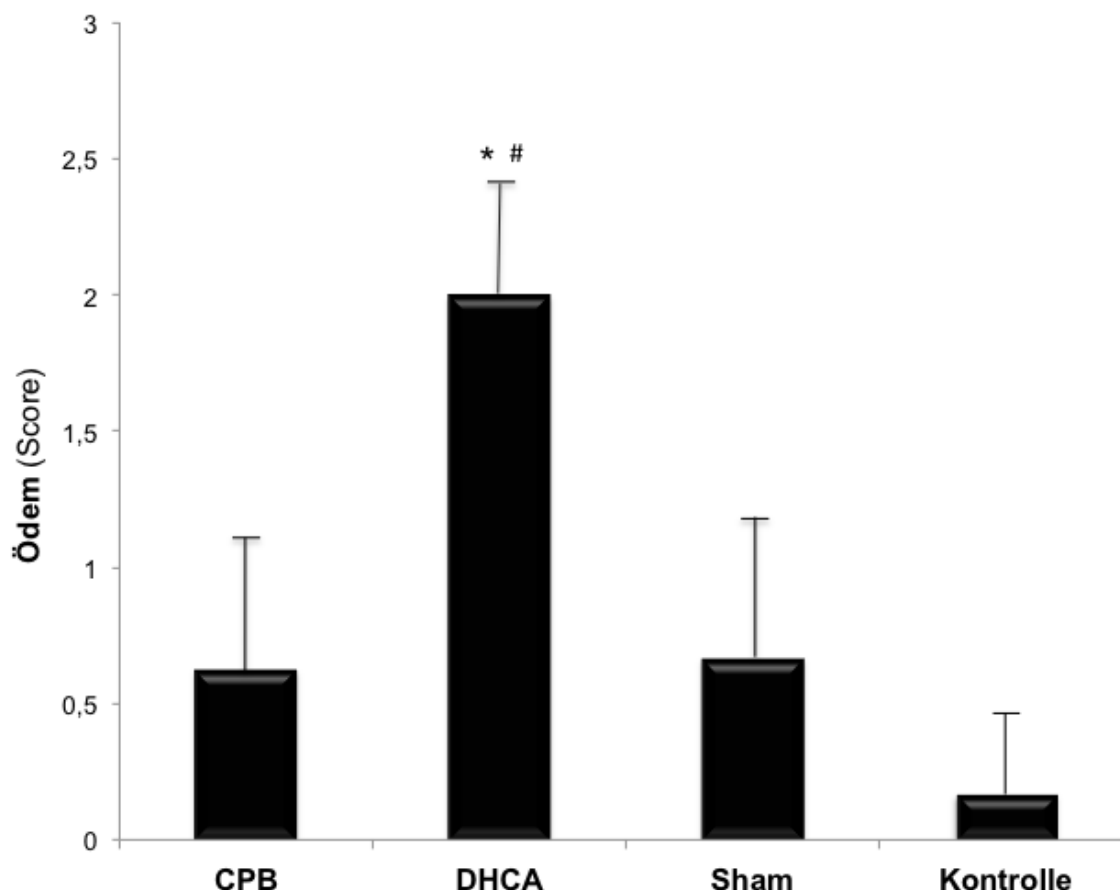


Abbildung 3.2 Vergleich der Gruppen CPB, DHCA, Sham und Kontrolle im Bezug auf die Verteilung des Scores Ödem pro Gesichtsfeld (Darstellung als Mittelwerte \pm Standardabweichung). * $p < 0,05$ vs. CPB, # $p < 0,001$ vs. Kontrolle

Statistisch hoch signifikant ($p < 0,001$) war der Paarvergleich zwischen Kontrolle und DHCA. Der Score lag für DHCA bei einem Mittelwert von $2 \pm 0,4$ (vs. $0,2 \pm 0,3$ in der Kontrollgruppe). Weiterhin stellte sich ein Unterschied ($p = 0,03$) zwischen den Gruppen CPB und DHCA heraus ($0,6 \pm 0,5$ CPB vs. $2 \pm 0,4$). In der Versuchsgruppe DHCA bestand somit ein deutlich stärker ausgeprägtes hepatozelluläres Ödem im Vergleich zur Gruppe CPB (Abb. 3.2).

Ein Trend lag zwischen den Gruppen DHCA und Sham ($2 \pm 0,4$ vs. $0,7 \pm 0,6$) vor ($p=0,08$). Kein Unterschied bestand zwischen den Versuchsgruppen moderate Hypothermie und Kontrolle ($p=0,52$), tiefe Hypothermie und Sham ($p=0,98$), sowie den Versuchsgruppen Kontrolle und Sham ($p=0,38$).

3.2.3 Apoptose

Die Gruppe Sham besaß die höchste Anzahl apoptotischer Zellen mit einem Mittelwert von $22,3 \pm 4,4$ Apoptosen/Gesichtsfeld. In der Gruppe CPB bestand hingegen die geringste Anzahl ($8,9 \pm 3,9$ Apoptosen/Gesichtsfeld).

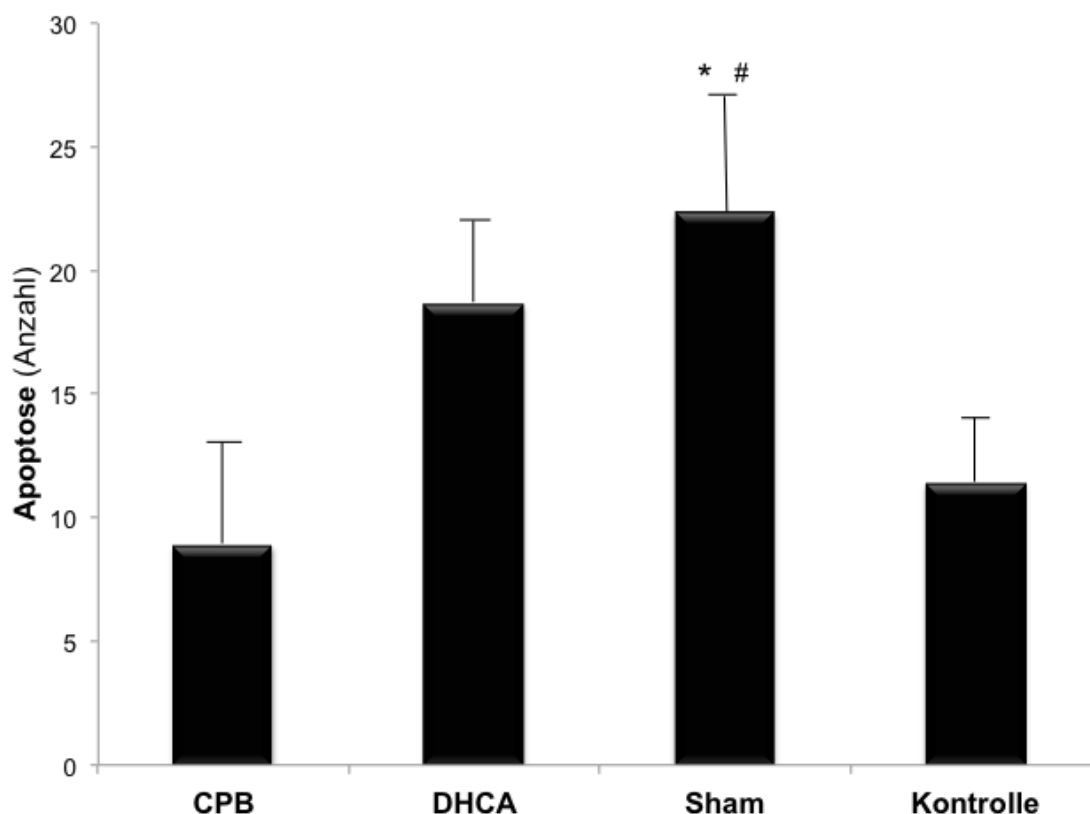


Abbildung 3.3 Darstellung der Verteilung der Anzahl apoptotischer Zellen pro Gesichtsfeld im Vergleich der Gruppen CPB, DHCA, Sham und Kontrolle (Darstellung als Mittelwerte \pm Standardabweichung). * $p < 0,05$ vs. CPB, # $p < 0,05$ vs. Kontrolle

Ein statistisch signifikanter Unterschied bestand im Vergleich zwischen den Gruppen CPB und Sham (9 ± 4 vs. 22 ± 4 , $p=0,02$), sowie zwischen den Gruppen Sham und Kontrolle (22 ± 4 vs. 11 ± 3 , $p=0,03$). Lediglich ein Trend lag zwischen den Versuchsgruppen DHCA und CPB ($18,6 \pm 3,4$ vs. $8,9 \pm 3,9$, $p=0,054$) vor (Abb. 3.3).

Kein Unterschied lag zwischen den Gruppen DHCA und Sham ($p=0,76$), DHCA und Kontrolle ($p=0,09$), sowie CPB und Kontrolle ($p=0,86$) vor.

3.3 Gesamtbeurteilung

Abschließend ist festzuhalten, dass in allen 3 Parametern Inflammation, hepatozelluläres Ödem und Apoptose die Betrachtung der Gruppen (CPB, DHCA, Sham und Kontrolle) global signifikant war. In den Gruppenvergleichen wurde die Signifikanz lokalisiert. Ein Effekt der Lokalisation (Portalfeld vs. Zentralfeld) bzw. eine Wechselwirkung zwischen Gruppe und Lokalisation konnte in allen Parametern nicht festgestellt werden.

4 Diskussion

Bei Korrekturoperationen Neugeborener mit angeborenen Herzfehlern gilt momentan die Anwendung der Hypothermie als Standardverfahren. Allerdings variieren die Wahl der Körpertemperatur und die Operationsmethode an sich sehr stark. Bisher gibt es keine Daten, welches Hypothermieoptimum (Tiefe, Dauer) das beste Langzeitoutcome garantiert.

Quing et al. (2001) untersuchten funktionelle Parameter wie Transaminasenanstieg und die morphologischen Organveränderungen an erwachsenen Schweinen in Abhängigkeit von der Körpertemperatur (in Normothermie, moderater und tiefer Hypothermie) und stellten dabei die geringste Leberschädigung bei moderater Hypothermie fest.

Speziell bei Neugeborenen liegen jedoch keine Daten zum direkten Einfluss der extrakorporalen Zirkulation auf die Lebermorphologie vor. Sofern eine Betrachtung der Leber stattfand, wurden funktionelle unspezifische Veränderungen (Verlauf des Anstiegs der Transaminasen und Veränderungen der Gerinnungsparameter) bei älteren Kindern untersucht; diese Faktoren unterliegen jedoch verschiedensten Einflüssen, z.B. Vorerkrankungen, Vorbehandlungen, Medikamente, oder auch vorausgegangener Diagnostik.

Eine tierexperimentelle Analyse über morphologische Veränderungen der Leber von neugeborenen Tieren wurde in der Literatur bisher nicht publiziert. In Anbetracht der Tatsache, dass Leberschäden und akutes Leberversagen eine lebensbedrohliche Komplikation darstellen können, ist die Kenntnis über direkte Einflüsse von HLM und Hypothermie auf die morphologischen Veränderungen zur Vermeidung solcher Komplikationen und zur Etablierung einer optimalen Körpertemperatur wichtig. Unsere Arbeit versucht dazu einen Beitrag zu leisten.

4.1 Zur Methodik

Tiefe Hypothermie mit Kreislaufstillstand (DHCA) ermöglicht dem Operateur die Durchführung von „speziellen Handgriffen“, insbesondere beim extrem kleinen Situs des neugeborenen Organismus. Die Unterbrechung des Blutflusses erleichtert nicht

nur den Eingriff für den Operateur erheblich, in speziellen Situationen kann auf den Einsatz der tiefen Hypothermie und den Kreislaufstillstand gar nicht verzichtet werden. Auch unter diesem Aspekt sollten zunächst die pathophysiologischen Vorgänge und der Einfluss unterschiedlicher Hypothermiestufen vollständig verstanden werden, bevor, wie bereits in einigen Studien in letzter Zeit erfolgt, ein Einfluss von Normothermie untersucht wird.

Forschungsarbeiten, welche sich mit dem Einfluss von extrakorporaler Zirkulation und Hypothermie beschäftigten, untersuchten dabei die Veränderungen in den meisten Fällen an älteren Kindern. Auch in tierexperimentellen Studien wurden meist keine neugeborenen Tiere verwendet. Per definitionem gilt ein Mensch in den ersten 30 Lebenstagen als Neugeborenes, ein Schwein hingegen gilt nur in den ersten 7 Lebenstagen als ein neugeborenes Tier. Dies wurde unter anderem an den unterschiedlichen Reife- und Entwicklungsstadien des Schweineherzens demonstriert (Penefsky et al 1985). Daher wurde für die Versuche der vorliegenden Arbeit bewusst eine Gruppe von Schweinen ausgewählt, deren Alter nicht mehr als 7 Tage betrug. Diese Grenze wurde in den meisten Studien nicht korrekt eingehalten. Neugeborene sollten jedoch getrennt von anderen Kindern betrachtet werden (Ashraf et al. 1997).

Die Art des Versuchstieres und die Wahl der Temperatur fielen in anderen Studien sehr unterschiedlich aus, sodass ein direkter Vergleich unserer Ergebnisse mit den Ergebnissen anderer Studien nur bedingt möglich ist. Die in dieser Studie gewählten Temperaturen in Hypothermie (z.B. 18°C bei DHCA und 32°C bei CPB) ergaben sich durch die klinische Anwendung in unserer Abteilung.

Um Störfaktoren auszuschließen (z.B. hämodynamische Instabilität), erfolgte der Ausschluss von Tieren, welche den 6-stündigen Beobachtungszeitraum nicht überlebten. Zum Ausschluss von Medikamenteninteraktionen und somit weiterer Störfaktoren wurde in allen Gruppen während des gesamten Versuchsablaufes als einziges Medikament nur das Narkosemittel verabreicht. Auf weitere Medikamentengabe wurde verzichtet. In allen Gruppen wurden durch ein standardisiertes Konzept vergleichbare Bedingungen geschaffen. Dazu gehört auch die Gabe der Kardioplegielösung in der Gruppe DHCA, was einen direkten Vergleich zwischen DHCA und CPB ermöglichte. Die Gruppe Sham hingegen erhielt keine

Kardioplegie und dadurch keine Hämodilution. Dieser Punkt könnte eine Limitierung dieser Arbeit darstellen.

4.2 Vergleich der Lokalisationen: Portalfeld vs. Zentralfeld

In der vorliegenden Arbeit ließen sich keine Unterschiede zwischen Portalfeld und Zentralfeld in Bezug auf Apoptose, Inflammation und Ödem feststellen. Aufgrund der anatomischen Verläufe der Blutversorgung im Leberläppchen hätten wir theoretisch einen Unterschied erwartet. Der Nährstoffgehalt des Blutes im Bereich der Zentralvene ist geringer als im Bereich der Portalfelder. Somit müsste, wie bereits von Lemasters et al. (1981) beschrieben, im Falle einer Hypoxie, einer Ischämie oder eines Nährstoffmangels eine Schädigung der Hepatozyten zuerst im Bereich der Zentralvene sichtbar werden. In Anbetracht unserer Ergebnisse scheint Hypoxie über den in dieser Studie gewählten Zeitraum keinen relevanten Einfluss auf die Leber der neugeborenen Schweine zu haben. Eine Erklärung könnte der Glykogengehalt der Leber sein, sodass im Falle der Hypoxie zunächst einmal für einen gewissen Zeitraum über den Weg der anaeroben Glykolyse Energie in Form von ATP gewonnen werden kann (Arias et al. 2001).

Die Leber verfügt über eine gute Regenerationsfähigkeit im Gegensatz zu anderen Organen (Mahli et al. 2006). Fraglich ist daher, ob im Rahmen dieser Studie bereits die Regeneration reversibler Schäden stattgefunden hat und aus diesem Grund keine Unterschiede mehr zwischen Portalfeld und Zentralfeld festgestellt werden konnten. Möglicherweise sind Neugeborene besser als ältere Tiere gegen Hypoxie geschützt, was auch an der physiologischen Toleranz gegen die peripartale Hypoxie erkennbar ist (Singer 1999).

4.3 Inflammation

Der Einsatz der Herz-Lungen-Maschine löst ein systemisches Entzündungsgeschehen im Körper des Patienten aus (Brix-Christensen et al. 2001). Die Aktivierung des alternativen Komplementsystems, das die wesentliche Rolle in

diesem Zusammenhang spielt, geschieht durch den Kontakt des Blutes mit der Herz-Lungen-Maschine. Der C3-Inhibitor, der normalerweise im Endothel vorkommt, fehlt im System der Herz-Lungen-Maschine. Dadurch kommt es zu einer vermehrten Aktivierung von C3, was wiederum zur Bildung der Spaltprodukte C3a und C3b führt. Über C3b wird C5 zu C5a aktiviert. C3a und C5a dienen als chemotaktische Lockstoffe für Leukozyten, sorgen für eine Freisetzung von Entzündungsmediatoren (Histamin aus Mastzellen und basophilen Granulozyten) und aktivieren die Zytokinsynthese (TNF α und Interleukine aus aktivierten Leukozyten und Gewebsmakrophagen) (Paparella et al. 2002, Wan et al. 1997).

Neutrophile Granulozyten haben eine gesonderte Stellung im Ablauf des inflammatorischen Geschehens. Einerseits werden ihre Rezeptoren durch Zytokine, IFN- γ und Bestandteile der Komplementkaskade aktiviert, andererseits stammt ein Teil der Zytokinproduktion aus den neutrophilen Granulozyten selbst. Dies ermöglicht somit noch eine Verstärkung der Leukozytenaktivierung (Asimakopoulos 1999).

In einem nächsten Schritt kommt es zur Aktivierung von NF- κ B, einem Transkriptionsfaktor, der in inaktivierter Form im Zytoplasma nahezu aller Zelltypen vorliegt und eine wichtige Rolle in der Regulation einer inflammatorischen Reaktion spielt. Die Aktivierung erfolgt über hohe Konzentrationen folgender Mediatoren: Über freie Sauerstoffradikale, TNF α und IL-1 β als wesentliche Beteiligte aus der Gruppe der Zytokine und über die Anaphylatoxine C3a und C5a aus der Komplementkaskade (Collins et al. 1995, Christman et al. 1998). Die Aktivierung von NF- κ B bewirkt eine vermehrte Expression von Selektinen und Integrinen. Diese ermöglichen in drei Schritten (Rolling, Adhäsion und Diapedese) das Einwandern der Leukozyten in die Zelle. Selektine aktivieren Leukozyten und ermöglichen ihr Rolling entlang des Endothels.

Bei den Integrinen (v.a. ICAM-1) handelt es sich um Transmembranproteine an der Oberfläche von Endothelzellen, die eine feste Verbindung zwischen Leukozyten und dem Endothel der Gefäße herstellen. Es erfolgt die Migration der Leukozyten durch das Endothel (Diapedese) und Abgabe zytotoxischer Proteasen. In den meisten Fällen kommt es durch gesteigerte Gefäßpermeabilität zu Ödembildung und einem Absterben geschädigter Zellen (Albelda et al. 1994, Paparella et al. 2002). Dies kann wiederum postoperative Organfunktionsstörungen zur Folge haben (Laffey et al. 2002).

Der Einfluss der Körpertemperatur auf das Entstehen der Inflammation bei Kindern wird in zahlreichen Forschungsarbeiten kontrovers diskutiert (Eggum et al. 2008, Caputo et al. 2005, Tassani et al. 2002).

Caputo et al. (2005) verglichen tiefe Hypothermie und Normothermie miteinander und stellten dabei fest, dass bei den in Normothermie operierten Kindern sowohl ein geringerer oxidativer Stress als auch eine geringere systemische Inflammation nachweisbar waren. Keine Unterschiede in der inflammatorischen Antwort abhängig von der Körpertemperatur konnten Eggum et al. (2008) feststellen. Sie untersuchten inflammatorische Marker in milder und moderater Hypothermie. Stattdessen konnten sie aber eine Abhängigkeit zwischen der Dauer des Einsatzes der HLM und dem Abklemmen der Aorta feststellen.

Tassani et al. (2002) untersuchten in einer klinischen Studie bei älteren Kindern die induzierte systemische Inflammation bei tiefer Hypothermie. Dabei wurde ein Vergleich zwischen totalem Kreislaufstillstand (DHCA, 18°C) und *low-flow* CPB (24°C) mittels Messung proinflammatorischer Zytokine und dem Anaphylatoxin C3a aufgestellt. Alle untersuchten Parameter fielen in der Gruppe DHCA niedriger aus.

In unserer Studie zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe morphologisch in allen Gruppen eine Erhöhung des inflammatorischen Geschehens. Im Vergleich der Gruppen CPB, DHCA und Sham lag der höchste Score für Inflammation, im Gegensatz zu den erzielten Ergebnissen anderer Forschungsarbeiten, in der Gruppe CPB. In der Gruppe DHCA war er wiederum höher als in der Sham Gruppe.

Aufgrund der hohen Signifikanz zwischen CPB bzw. DHCA sowie der allgemein höheren Scorewerte aller Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe scheinen Hypothermie, der Einsatz der Herz-Lungen-Maschine und das chirurgische Trauma an sich einen entscheidenden direkten Einfluss auf die inflammatorische Reaktion der Leber zu haben.

Verschiedene Erklärungen können an dieser Stelle für eine Begründung des Unterschiedes zwischen CPB und DHCA herangezogen werden. Ein Grund könnte darin bestehen, dass tiefe Hypothermie, die in der DHCA-Gruppe zur Anwendung kam, einen protektiven Einfluss auf die Aktivierung der Inflammation haben könnte. Fraglich bleibt dabei jedoch, ob die Hypothermie hier die inflammatorische Antwort nur verzögert, oder tatsächlich verringert. Ein weiterer Aspekt ist die Dauer des Einsatzes der Herz-Lungen-Maschine. Aufgrund des totalen Kreislaufstillstandes in

der Gruppe DHCA kommt es im Vergleich zur CPB-Gruppe zu einem kürzeren Anwendungszeitraum der HLM. In der vorliegenden Studie betrug der Zeitraum an der HLM 180 Minuten in der Gruppe CPB und 90 Minuten (Kühlung und Wiedererwärmung) in der Gruppe DHCA. In der Gruppe Sham fiel der Score für Inflammation geringer als in den Gruppen CPB und DHCA aus. Auch der beobachtete Unterschied zwischen DHCA und Sham (zwar nicht signifikant, aber mit erzieltm Trend) unterstützt die Vermutung, dass das inflammatorische Geschehen sich in Entsprechung mit der Zunahme der HLM-Zeit ebenfalls ausweitet. Der verkürzte Einsatz der HLM scheint, wie auch von Tassani et al. (2002) postuliert, das Entstehen einer systemischen Inflammation zu reduzieren.

Weiterhin zeigen unsere Daten, dass allein das chirurgische Trauma (wahrscheinlich durch die Mediatoren des Postaggressionsstoffwechsels) zum Entstehen einer inflammatorischen Reaktion ausreicht.

4.4 Hepatozelluläres Ödem

Bezüglich des hepatozellulären Ödems zeigt sich in der Gruppe DHCA die höchste hepatozelluläre Schädigung. Damit ist davon auszugehen, dass der hauptsächlichste Faktor für die Entstehung hepatozellulärer Ödembildung die Dauer des Kreislaufstillstandes und somit die Ischämie ist.

Ein großer Teil vorangegangener Forschungsarbeiten untersuchte bisher den Einfluss von Ischämie auf die Leber unter dem Aspekt der Lebertransplantation oder Leberresektion. Dass die Leber eine Ischämiephase über einen gewissen Zeitraum gut toleriert, konnten Harris et al (1981) in einem Versuch an jungen Schweinen sowohl funktionell als auch morphologisch nachweisen.

Die gewonnenen Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit können mit den Ergebnissen von Shibayama et al. (1991) verglichen werden. Obwohl ihre Studie an Ratten durchgeführt wurde, stellten sie ebenfalls fest, dass eine temporäre Ischämie der Leber primär eine ödematöse Veränderung der Hepatozyten hervorruft. Diese Schwellung der Hepatozyten ruft wiederum eine Verengung des Lumens und Verminderung des Blutflusses innerhalb der Sinusoide hervor (Clemens et al. 1985), wodurch das Einwandern von Granulozyten in der Reperusionsphase verzögert

werden kann (Jaeschke und Farhood 1991). Dies ist, neben der Dauer des HLM-Einsatzes, eine Begründung für eine geringere Ausprägung der Inflammation in der DHCA-Gruppe als in der Gruppe CPB.

Nicht nur die Ischämie, sondern auch die Hypothermie selbst kann einen schädigenden Effekt auf die Hepatozyten haben. Bei inkubierten Hepatozyten von Ratten in Hypothermie (5°C) konnten Marsh et al. (1989) u.a. eine direkte Korrelation zwischen einem durch Hypothermie induzierten hepatozellulären Ödem und Zelltod feststellen.

Der Einsatz der Herz-Lungen-Maschine an sich zeigt keinen wesentlichen Einfluss zur Bildung ödematöser Veränderung der Hepatozyten. Dies steht im Gegensatz zur inflammatorischen Reaktion, die hauptsächlich von der Dauer des HLM-Einsatzes abhängig war. Es zeigt sich aber auch, dass in diesem Kontext das chirurgische Trauma selbst einen nennenswerten Einfluss auf die Schädigung der Hepatozyten ausübt.

Dass es in dieser Studie nur zum sehr vereinzelt Auftreten von Nekrosen als mögliche Folge der Ödembildung kam, kann zwei Gründe haben: Einerseits könnte der postoperative Beobachtungszeitraum von 6 Stunden nicht ausreichend für das Entstehen von Nekrose gewesen sein (auch in der Literatur gibt es bisher keine Hinweise dazu, wann eine maximale Leberschädigung bei Neugeborenen zu erwarten wäre). Andererseits gewinnt in der Leber neben der Nekrose zunehmend auch die Apoptose als Ursache des Absterbens von Hepatozyten im Rahmen von Ischämie/Reperfusionsschäden an Bedeutung (Kohli et al. 1999). Welche dieser beiden Formen die größere Rolle spielt, wird aktuell kontrovers diskutiert.

4.5 Apoptose

Die Apoptose ist ein programmierter, genvermittelter Zelltod, der ohne reaktive Inflammation einhergeht. Ein schneller, massiver Anstieg der Apoptose in der Leber kann ein akutes Leberversagen zur Folge haben. Fibrose und maligne Entartungen dagegen kommen eher durch eine gesteigerte Apoptosenzahl über einen länger bestehenden Zeitraum zustande (Guicciardi und Gores 2010).

Apoptose ist im Gegensatz zur Nekrose auch unter physiologischen Bedingungen zu finden. Sie findet zum Beispiel während der embryonalen Entwicklung statt und dient außerdem der Anpassung an wechselnde Anforderungen und der Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts zwischen Zellproliferation und Zellabbau in Organen mit hohem Zellumsatz. Dabei werden beschädigte, pathologisch veränderte und alte Zellen durch den programmierten Zelltod entfernt. Die Induktion der Apoptose erfolgt über die Aktivierung von Caspasen (Schuchmann und Galle 2001). Unter normalen Bedingungen sind nur wenige apoptotische Zellen gleichzeitig zu finden, eine hohe Rate von Apoptosen weist auf ein pathologisches Geschehen hin.

Bei Betrachtung unserer Ergebnisse hinsichtlich der Verteilung von Apoptose in den Hepatozyten zeigt sich, wie bereits auch unter den Aspekten Inflammation und hepatozelluläres Ödem, dass das chirurgische Trauma allein schon einen wesentlichen Einfluss auf das Entstehen hepatozellulärer Apoptose besitzt. In diesem Fall scheint das chirurgische Trauma sogar der stärkste Trigger für die Apoptose zu sein.

Unterschiedliche Meinungen existieren in der Hinsicht, ob Hypothermie eine Protektion gegen Apoptose ermöglicht. In einer Studie von Rauen et al. (1999) wurde eine durch Kälte verstärkt hervorgerufene Apoptose nach Wiedererwärmung in kultivierten Hepatozyten festgestellt. Einen protektiven Effekt in moderater Hypothermie konnten Fu et al. (2004) feststellen. Im Vergleich mit den Ergebnissen unserer Studie konnte auch die Protektion der Hepatozyten gegen Apoptose beobachtet werden. Erkennbar war dies an dem signifikanten Unterschied zwischen Sham und CPB. Zusätzlich erhärtet wird diese Vermutung bei Betrachtung der Gruppe DHCA. Es liegt zwar kein signifikanter Unterschied zwischen Sham und DHCA vor, dennoch ist die Zahl der Apoptosen in der Gruppe DHCA geringer. Unter dem Aspekt der kälteinduzierten Apoptose in Hepatozyten ist ein Vergleich mit anderen Forschungsergebnissen nur bedingt möglich. Häufig wurden Studien an kultivierten Hepatozyten vorgenommen und gleichzeitig deutlich geringere Temperaturen gewählt. Dies fand sich auch in der Studie von Rauen et al. (1999). Hier wurden Hepatozyten von Ratten kultiviert und bei 4°C über einen Zeitraum von 24 Stunden inkubiert. Erkennbar ist an dieser Stelle auch ein weiteres Problem. Viele Versuche erfolgten an Ratten, was eine Vergleichbarkeit zusätzlich einschränkt.

Die Unterschiede zwischen DHCA und CPB weisen aber auch auf eine durch Ischämie und Reperfusion vermehrt induzierte Apoptosebildung hin. Apoptose gewinnt zunehmend an Bedeutung im Rahmen von Ischämie/Reperfusionsschäden und nimmt in diesem Zusammenhang inzwischen eine wichtige Rolle ein (Lopez-Neblina 2005, Rüdiger et al. 2003).

4.6 Klinische Bedeutung und Ausblick

Insgesamt ist nur wenig bezüglich der Lebermorphologie nach kardiochirurgischen Eingriffen bekannt. Noch weniger Informationen existieren bei Neugeborenen. Nach wie vor ist unbekannt, ob die Leber Neugeborener resistenter oder doch sensibler gegenüber externen Einflüssen wie beispielsweise Hypoxie oder Hypothermie ist.

In Zusammenschau aller in dieser vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse kann zunächst einmal festgehalten werden, dass allein das operative Trauma erhebliche schädigende Einflüsse auf die Hepatozyten besitzt. Das chirurgische Trauma stellt einen nur schwer beeinflussbaren, auch in Zukunft relevanten Faktor dar. Es kommt zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren, zur Ausschüttung kataboler Hormone mit der Folge eines Postaggressionsstoffwechsels bzw. einer Insulinresistenz und einer allgemeinen Sympathikus-Aktivierung (Kehlet 1997). Weniger invasive chirurgische Techniken können eventuell diese Veränderungen verringern, aber dennoch nicht vollständig eliminieren.

Das Ausmaß der inflammatorischen Reaktion ist abhängig von dem Anwendungszeitraum der Herz-Lungen-Maschine. Hypothermie besitzt allgemein betrachtet eine protektive Rolle im Rahmen hepatozellulärer Schädigungen, ausgenommen bei der Entstehung der hepatozellulären Ödembildung. Das Ödem ist bei tiefer Hypothermie ausgeprägter. Offen bleibt jedoch die Frage, welche Temperatur zwischen 32°C und 18°C die optimale Temperatur ist. An dieser Stelle müssen weitere Forschungsarbeiten zur Vertiefung angeschlossen werden mit dem Ziel, einen Schnittpunkt zwischen einer optimalen Dauer des HLM-Einsatzes und der optimalen Temperatur zu ermitteln. Weiterführende Studien mit Bestimmung von Mediatoren im Lebergewebe (z.B. TNF- α , Caspasen), eventuell zu einem späteren Zeitpunkt nach dem Eingriff, sind zu empfehlen.

Die Untersuchungen zur Lebermorphologie sind ein erster Schritt in dieser sehr komplexen Problematik der Folgen der EKZ und der systemischen Hypothermie. Wichtig ist auch die Betrachtung im Kontext mit anderen Organsystemen. Dies ermöglicht den Entwurf eines optimalen Konzepts zur Reduktion der Komplikationsrate bei Neugeborenen nach herzchirurgischen Operationen.

5 Zusammenfassung

Abdominelle Komplikationen, zu denen auch das akute Leberversagen nach Einsatz der Herz-Lungen-Maschine und systemischer Hypothermie nach herzchirurgischen Korrekturoperationen neugeborener Patienten zählt, sind seltene, aber dennoch ernst zu nehmende unerwünschte Folgen. In der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen einer systematischen Analyse sowohl der Einfluss der extrakorporalen Zirkulation als auch der tiefen Hypothermie auf das Lebergewebe neugeborener Schweine morphologisch untersucht.

Die Untersuchungen erfolgten an 21 neugeborenen Schweinen (maximal 7 Tage alt, durchschnittliches Körpergewicht $2,9 \pm 0,4$ kg), die in 4 Gruppen eingeteilt wurden: Eine Gruppe wurde mit extrakorporaler Zirkulation in moderater Hypothermie (32°C) operiert (CPB), die zweite Gruppe wurde in tiefer Hypothermie (18°C) und totalem Kreislaufstillstand operiert (DHCA). In der dritten Gruppe (Sham Gruppe) erfolgte die Instrumentation nach Sternotomie und ohne Einsatz der Herz-Lungen-Maschine in Normothermie (Zeitsimulation). Die Tiere der vierten Gruppe waren unbehandelte Kontrolltiere und dienten primär als Blutspender. Postoperativ erfolgte die Beobachtung der Tiere der drei behandelten Gruppen über 6 Stunden. Nach Terminierung der Versuche erfolgte die Organentnahme.

Die Leberpräparate wurden aufbereitet und morphologisch bezüglich Inflammationszeichen, hepatozellulärer Ödembildung, sowie Apoptose und Nekrose ausgewertet. Die Ergebnisse zeigen, dass das Entstehen der Inflammation wesentlich abhängig von der Anwendungsdauer der extrakorporalen Zirkulation ist: Je länger der Zeitraum des Einsatzes der Herz-Lungen-Maschine ist, umso stärker ist die inflammatorische Reaktion im Lebergewebe ausgeprägt. Tiefe systemische Hypothermie (18°C) scheint einen protektiven Effekt auf die Inflammation und Apoptose zu haben. Im Gegensatz dazu verursacht tief-hypothermer Kreislaufstillstand (DHCA) vermehrt die Bildung eines hepatozellulären Ödems. Besonders erwähnenswert ist die Rolle des chirurgischen Traumas: Bei allen untersuchten Aspekten (Inflammation, hepatozelluläres Ödem und Apoptose) zeigt sich deutlich, dass der operative Eingriff selbst ein deutliches Maß an morphologischen Veränderungen an der Leber hervorruft. Insbesondere für das Auftreten von Apoptose ist das chirurgische Trauma von größter Bedeutung.

Weiterführende und vertiefende Untersuchungen (z.B. immunchemisch und histologisch) sind erforderlich, um die genauen zu Grunde liegenden subzellulären Mechanismen zu klären.

6 Anhang

6.1 Anhang 1: Einbettung der Proben

Beschickung des Einbettautomats :

60%-Alkohol	1-3 Stunden
70%-Alkohol	1 Stunde
80%-Alkohol	1 Stunde 30 Minuten
90%-Alkohol	1 Stunde 15 Minuten
100%-Alkohol	1 Stunde 15 Minuten
100%-Alkohol	1 Stunde 30 Minuten
100%-Alkohol	1 Stunde 30 Minuten
Chloroform	1 Stunde 15 Minuten
Chloroform	1 Stunde 30 Minuten
Paraplast Plus (Firma Sherwood Medical Co, St. Louis, MO, USA)	1 Stunde (65°C)
Paraplast Plus	1 Stunde (65°C)
Paraplast Plus	1 Stunde (65°C)

6.2 Anhang 2: Hämatoxylin-Eosin-Färbung

a) Hämalun-Lösung nach Mayer

- 1g Hämatoxylin krist.
- in 750ml Aqua dest. schütteln
- 0,2g Na-Iodat zur Reifung
- 50g Kalialun
- 50g Chloralhydrat
- 1g Zitronensäure
- alles in Lösung bringen und auf 1000ml Aqua dest. auffüllen

b) Eosinlösung

- 1g Eosin G (gelblich)
- in 100ml Aqua dest. lösen
- 1 Tropfen Eisessig

(Sämtliche Zugaben stammen von der Fa. Merck)

7 Literaturverzeichnis

Albelda SM, Smith CW, Ward PA (1994): Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J* 8; 504-512

Arias IM, Boyer JL, Chisari FV, Fausto N, Schachter D, Shafritz DA: *The Liver: Biology and Pathobiology*, 4. Auflage Lippincott Williams and Wilkins Verlag, Philadelphia 2001

Ashraf SS, Tian Y, Zacharrias S, Cowan D, Martin P, Watterson K (1997): Effects of cardiopulmonary bypass on neonatal and paediatric inflammatory profiles. *Eur J Cardiothorac Surg* 12; 862-868

Asimakopoulos G (1999): Mechanisms of the systemic inflammatory response. *Perfusion* 14; 269-277

Bigelow WG, McBirnie JE (1953): Further experiences with Hypothermia for intracardiac surgery in monkeys and groundhogs. *Ann Surg* 137; 361-365

Brix-Christensen V, Petersen TK, Ravn HB, Hjortdal VE, Andersen NT, Tønnesen E (2001): Cardiopulmonary bypass elicits a pro- and anti-inflammatory cytokine response and impaired neutrophil chemotaxis in neonatal pigs. *Acta Anaesthesiol Scand* 45; 407-413

Caputo M, Bays S, Rogers CA, Pawade A, Parry AJ, Suleiman S, Angelini GD (2005): Randomized Comparison Between Normothermic and Hypothermic Cardiopulmonary Bypass in Pediatric Open-Heart Surgery. *Ann Thorac Surg* 80; 982-988

Christman JW, Lancaster LH, Blackwell TS (1998): Nuclear factor κ B: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome. *Intensive Care Med* 24; 1131-1138

Clemens MG, McDonagh PF, Chaudry ICH, Baue AE (1985): Hepatic microcirculatory failure after ischemia and reperfusion: improvement with ATP-MgCl₂ treatment. *Prog Clin Biol Res* 299; 19-31

Cohn LH (2003): Fifty Years of Open-Heart Surgery. *Circulation* 107; 2168-2170

Colletti LM, Cortis A, Lukacs N, Kunkel SL, Green M, Strieter RM (1998): Tumor Necrosis Factor Up-Regulates Intercellular Adhesion Molecule 1, Which is important In The Neutrophil-Dependent Lung And Liver Injury Associates With Hepatic Ischemia And Reperfusion In The Rat. *Shock* 10; 182-191

Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T (1995): Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- κ B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 9; 899-909

Cooley DA (1997): Early Development of Congenital Heart Surgery: Open Heart Procedures. *Ann Thorac Surg* 64; 1544-1548

Durandy Y (2010): Warm Pediatric Cardiac Surgery: European Experience. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 18; 386-395

Eggum R, Ueland T, Mollnes TE, Videm V, Aukrust P, Fiane AE, Lindberg H (2008): Effect of Perfusion Temperature on the Inflammatory Response During Pediatric Cardiac Surgery. *Ann Thorac Surg* 85; 611-617

Fu T, Blei AT, Takamura N, Lin T, Guo D, Li H, Gorman MRO, Soriano HE (2004): Hypothermia Inhibits Fas-Mediated Apoptosis of Primary Mouse Hepatocytes in Culture. *Cell Transplant* 13; 667-676

Ghavami S, Hashemi M, Kadkhoda K, Alavian SM, Bay GH, Los M (2005): Apoptosis in liver diseases – detection and therapeutic applications. *Med Sci Monit* 11; 337-345

Guicciardi ME, Gores GJ (2010): Apoptosis as a Mechanism for Liver Disease Progression. *Semin Liver Dis.* 30; 402-410

Harris KA, Wallace AC, Wall WJ (1981): Tolerance of the Liver to Ischemia in the Pig. *J Surg Res* 33; 524-530

Helewski K, Kowalczyk-Ziomek G, Czecior E, Wyrobiec G, Harabin-Slowinska M, Juszko-Piekut M, Brackowska B, Josko J (2011): Protective effect of intermittent clamping of the portal triad in the rat liver on liver ischemia-reperfusion injury. *Hepat Mon* 11; 445-451

Hoffman TM, Wernovsky G, Atz AM, Kulik TJ, Nelson DP, Chang AC, Bailey JM, Akbary A, Kocsis JF, Kaczmarek R, Spray TL, Wessel DL (2003): Efficacy and Safety of Milrinone in Preventing Low Cardiac Output Syndrome in Infants and Children After Corrective Surgery for Congenital Heart Disease. *Circulation* 107; 996-1002

Jaeschke H (2003): Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284; 15-26

Jaeschke H, Farhood A (1991): Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 260; 355-362

Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ (1991): Superoxide Generation By Kupffer Cells And Priming Of Neutrophils During Reperfusion After Hepatic Ischemia. *Free Radic Res* 15; 277-284

Jenkins LW, DeWitt DS, Johnston WE, Davis KL, Prough DS (2001): Intraischemic mild hypothermia increases hippocampal CA1 blood flow during forebrain ischemia. *Brain Res* 890; 1-10

Kehlet H (1997): Multimodal approach to control postoperative pathophysiology and rehabilitation. *Br J Anaesth* 78; 606-617

Kohli VK, Selzner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA (1999): Endothelial Cell And Hepatocyte Death Occurs By Apoptosis After Ischemia-Reperfusion Injury in The Rat Liver. *Transplantation* 67; 1099-1105

Laffey JG, Boylan JF, Cheng DCH (2002): The Systemic Inflammatory Response to Cardiac Surgery, Implications for the Anesthesiologist. *Anesthesiology* 97; 215-252

Lemasters JJ, Ji S, Thurman RG (1981): Centrilobular injury following hypoxia in isolated, perfused rat liver. *Science* 213; 661-663

Levy JH, Tanaka KA (2003): Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 75; 715-720

Lewis FJ, Taufic M, Varco RL, Niazi S (1955): The Surgical Anatomy of Atrial Septal Defects: Experiences with Repair Under Direct Vision. *Ann Surg* 142; 401-415

Lopez-Neblina F, Toledo AH, Toledo-Pereyra (2005): Molecular Biology of Apoptosis in Ischemia and Reperfusion. *J Invest Surg* 18; 335-350

Löffler G, Petrides EP: Biochemie und Pathobiochemie, 7. Auflage Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2003

Lüllmann-Rauch R: Histologie, Verstehen – Lernen – Nachschlagen, 1. Auflage; Georg Thieme Verlag; Stuttgart 2003

Mahli H, Gores GJ, Lemasters J (2006): Apoptosis and Necrosis in the Liver: A Tale of Two Deaths? *Hepatology* 43(Suppl.1); 31-44

Mariscalco G, Lorusso R, Dominici C, Renzulli A, Sala A (2011): Acute Kidney Injury: A Relevant Complication After Cardiac Surgery. *Ann Thorac Surg* 92; 1539-1547

Marsh DC, Lindell SL, Fox LE, Belzer FO, Southard JH (1989): Hypothermic Preservation of Hepatocytes I. Role of Cell Swelling. *Cryobiology* 26; 524-534

Michalopoulos A, Alivizatos P, Geroulanos S (1997): Hepatic dysfunction following cardiac surgery: Determinants and consequences. *Hepatogastroenterology* 15; 779-783

Paparella D, Yau TM, Young E (2002): Cardiopulmonary bypass induces inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur J Cardiothorac Surg* 21; 232-244

Penefsky ZJ, Buckley NM, Robinson TF, Sorensen AL (1985): Mechanical properties of developing swine myocardium. *Comp Biochem Physiol* 80; 399-409

Pool JL, Kessler LA (1957): Mechanism and control of centrally induced cardiac irregularities during Hypothermia, Part I clinical observations. *J Neurosurg* 15; 52-64

Quing M, Vazquez-Jimenez JF, Klosterhalfen B, Sigler M, Schumacher K, Duchateau J, Messmer BJ, von Bernuth G, Seghaye MC (2001): Influence of temperature during cardiopulmonary bypass on leukocyte activation, cytokine balance, and post-operative organ damage. *Shock* 15; 372-377

Rappaport AM (1973): The Microcirculatory Hepatic Unit. *Microvasc Res* 6; 212-228

Rauen U, Polzar B, Stephan H, Mannherz HG, DeGroot H (1999): Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J* 13; 155-168

Riede UN, Werner M, Schäfer HE: *Allgemeine und spezielle Pathologie*, 5. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2004

Rüdiger HA, Graf R, Clavien PA (2003): Liver Ischemia: Apoptosis as a Central Mechanism of Injury. *J Invest Surg* 16; 149-159

Schmidt RF, Lang F, Thews G: *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*, 29. Auflage; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2005

Schuchmann M, Galle PR (2001): Apoptosis in liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13; 785-790

Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Woll M, Wesker K: *Prometheus LernAtlas der Anatomie, Hals und Innere Organe*, 1. Auflage Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2005

Seghaye MC, Engelhardt W, Grabitz RG, Faymonville ME, Hörnchen H, Messmer BJ, von Bernuth G (1993): Multiple System Organ Failure after Open Heart Surgery in Infants and Children. *Thorac Cardiovasc Surg* 41; 49-53

Shibayama Y, Asaka S, Nishijima A (1991): Mechanism of Liver Injury following Ischemia. *Exp Mol Pathol* 55; 251-260

Shteyer E, Yatsiv I, Sharkia M, Milgarter E, Granot E (2011): Serum transaminases as a prognostic factor in children post cardiac surgery. *Pediatr Int* 53; 725-728

Singer D (1999): Neonatal tolerance to hypoxia: a comparative-physiological approach. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 123; 221-234

Sitniakowsky LS, Later AFL, van de Watering LMG, Bogaerts M, Brand A, Klautz RJM, Smit NPM, Hilten JA (2011): The effect of RBC transfusions on cytokine gene expression after cardiac surgery in patients developing post-operative multiple organ failure. *Transfus Med* 21; 236-246

Tassani P, Barankay A, Haas F, Paek SU, Heulmaier M, Hess J, Lange R, Richter JA (2002): Cardiac surgery with deep hypothermic circulatory arrest produces less systemic inflammatory response than low-flow cardiopulmonary bypass in newborns. *J Thorac Cardiovasc Surg* 123; 648-654

Wan S, LeClerc JL, Vincent JL (1997): Inflammatory Response to Cardiopulmonary Bypass: Mechanisms Involved and Possible Therapeutic Strategies. *Chest* 112; 676-692

Zacharias A, Schwann TA, Parenteau G, Riordan CJ, Durham SJ, Engoren M, Fenn-Buderer N, Habib R (2000): Predictors of Gastrointestinal Complications in Cardiac Surgery. *Tex Heart Inst J* 27; 93-99

Danksagung

Bedanken möchte ich mich außerordentlich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. T. Tirilomis für die Überlassung des Themas meiner Dissertation und seine engagierte Unterstützung.

Mein besonderer Dank ist an Frau R. Waldmann-Beushausen für die intensive Zusammenarbeit im Labor der Abteilung für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie in Göttingen gerichtet.

Für die statistische Betreuung bedanke ich mich bei Herrn Simon Schneider aus der Abteilung Medizinische Statistik der Universität Göttingen.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei meinen Eltern und meiner Schwester Laura für die permanente Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Geboren wurde ich, Julia Marilena Zwiehoff, am 01.11.1984 als Tochter von Wolfgang Zwiehoff und Prof. Dr. Gabriele Zwiehoff in Hagen.

Meine Schullaufbahn verlief von 1991-2004. Die allgemeine Hochschulreife erlangte ich im Juni 2004 an der Hildegardisschule Hagen, Gymnasium des Erzbistums Paderborn.

In der Zeit von Juli 2004 bis Februar 2005 absolvierte ich ein 8-monatiges Pflegepraktikum in der internistischen Abteilung im Gemeinschaftskrankenhaus Herdecke.

Zum Sommersemester 2005 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen auf. Die ärztliche Vorprüfung bestand ich im März 2007. Bis zum Ende des klinischen Abschnitts studierte ich an der Georg-August-Universität Göttingen und setzte mein Studium zu Beginn des Praktischen Jahres an der Ruhr-Universität Bochum fort. Das erste Tertial meines Praktischen Jahres leistete ich von Februar bis Juni 2010 im Spital Davos in der Schweiz ab. Die beiden restlichen Tertiale absolvierte ich am Knappschaftskrankenhaus Bochum-Langendreer zunächst in der Radiologie von Juni bis Oktober 2010 und anschließend in der Chirurgie von Oktober 2010 bis Januar 2011. Während der gesamten Zeit meines Studiums arbeitete ich, soweit es mir zeitlich möglich war, als studentische Aushilfe in der Pflege am Gemeinschaftskrankenhaus Herdecke.

Die ärztliche Approbation erhielt ich am 18.06.2011.

Seit November 2011 bin ich als Assistenzärztin in der Internistischen Abteilung der Augusta-Kranken-Anstalt in Bochum tätig.