

Aus der Universitätsklinik für
Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. G. Ziemer

**Wirkung des Erythropoetins
auf den neurologischen Status
nach hypothermem Kreislaufstillstand.
Eine Studie am Schweinemodell.**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Lydia Michaela Frauenlob, geb. Klein
aus
Backnang

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. M. Scheule

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Morgalla

Meinen Eltern Ruth und Martin Klein
in Liebe und Dankbarkeit
gewidmet.

I. Einleitung	1
II. Allgemeine Grundlagen.....	3
1. Erythropoetin (Epo)	3
1.1 Aufbau und therapeutischer Einsatz.....	3
1.2 Funktionen	3
1.2.1 Erythroide Funktion und Signalweg	3
1.2.2 Nicht-erythroide Funktionen.....	4
1.2.2.1 Neuroprotektive Wirkung des Erythropoetins	4
1.2.2.2 Epo und Blut-Hirn-Schranke.....	5
1.2.2.3 Ökonomische Aspekte der Epo-Therapie	6
2. Hypoxie	7
3. Apoptose	8
4. Caspase-3.....	11
5. TUNEL (Terminale desoxyribosyl-transferase mediated dUTP Nick End Labeling).....	11
6. Zielsetzung.....	12
III. Material und Methoden.....	13
1. Versuchsaufbau.....	13
1.1 Modelle	13
1.2 Präoperative Vorbereitung	14
1.3 Ablauf der Operation	14
1.4 Postoperatives Vorgehen und durchgeführte Messungen	16
2. Postoperatives Management der Tiere im Tierstall	16
3. Entscheidung über ein Studiendesign zugunsten der neurologischen Beurteilung	17
4. Neurologische Beurteilung.....	18
5. Elektive Tötung und Organentnahme	19
5.1 Perfusionsfixierung.....	19
5.2 Gehirnentnahme	20
5.3 Entnahme des Rückenmarks	21
5.4 Aufbewahrung der Organe	21
5.5 Besonderheiten hinsichtlich der Tiere	21
6. Histologische Aufarbeitung der Gewebe.....	21

6.1 Fixierung	21
6.2 Makroskopische Aufarbeitung der Gehirne und des Rückenmarks	22
6.3 Entwässern, Einbetten und Schneiden.....	23
6.4 Färbungen.....	23
6.4.1 Hämatoxylin&Eosin-Färbung (H&E).....	23
6.4.2 Klüver-Barrera	24
6.4.3 Immunhistochemie	24
6.4.3.1 Aktivierte Caspase-3	24
6.4.3.2 TUNEL (Terminale desoxyribosyl-transferase mediated dUTP Nick End Labeling).....	24
6.4.3.2.1 Methodik.....	24
6.4.3.2.2 Ablauf der TUNEL-Färbung (In Situ Cell Death Detection Kit, POD (TUNEL))	25
7. Kriterien der Auswertung	28
7.1 Bedingungen.....	28
7.2 Ausgewertete Region.....	28
7.3 H&E	29
7.3.1 Infarkte	29
7.3.2 Hypoxische Veränderung der Neurone.....	30
7.3.3 Auswertung der einzelnen Bereiche	31
7.4 TUNEL	33
7.4.1 Regionen der Auswertung	33
7.4.2 Kriterien TUNEL positiver Neurone.....	33
8. Serumkonzentration von Epo.....	33
8.1 Zeitpunkte der Epo-Bestimmung	33
8.2 Methodik der Epo-Bestimmung	34
9. Statistik.....	34
9.1 Statistische Auswertung hypoxisch veränderter Neurone.....	34
9.2 Programm und Tests der statistischen Auswertung.....	35
VI. Ergebnisse.....	36
1. Serum-Epo-Spiegel	36
2. Überleben und neurologischer Status.....	36
2.1 Überleben	36

2.2 Neurologie.....	37
2.2.1 Gesamtpunktzahlen.....	37
2.2.2 Bewusstsein, Appetenz und Motorik	38
2.2.2.1 Bewusstsein	39
2.2.2.2 Appetenz.....	39
2.2.2.3 Motorik	40
3. Organentnahme.....	41
3.1 Veränderungen des Körpergewichts im Verlauf der Beobachtungen..	41
3.2 Gehirngewichte	42
4. Färbungen	42
4.1 H&E	42
4.1.1 Infarkte	42
4.1.2 Hypoxische Veränderungen der Neurone	43
4.1.2.1 Hypoxische Veränderungen im gesamten ZNS der am Operationstag verstorbenen Tiere.....	43
4.1.2.2 Hypoxische Veränderungen im gesamten ZNS der überlebenden Tiere.....	43
4.1.2.3 Hypoxische Veränderungen der Neurone einzelner ZNS- Regionen der überlebenden Tiere.....	43
4.2 TUNEL-Färbung.....	44
4.3 Aktivierte Caspase-3	45
V. Diskussion	47
1. Erythropoetinspiegel im Serum.....	50
2. Neurologisches Outcome	50
3. Histopathologische Veränderungen	53
4. Schlussfolgerung	57
VI. Zusammenfassung	59
1. Ziel	59
2. Material und Methoden	59
3. Ergebnisse	60
4. Schlussfolgerung	60
VII. Anhang	61
1. Rechtliche Grundlagen und Tierschutz	61

2. Abbildungen	63
3. Diagramme	66
4. Tabellen.....	71
VIII. Literaturverzeichnis.....	77

Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BGBI.	Bundesgesetzblatt
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
DAB	3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride dihydrate
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
d. h.	das heißt
Diag.	Diagramm
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Desoxyribonucleic Acid)
DNAse	Enzym, das DNA zerschneidet
EKZ	extrakorporale Zirkulation
Epo	Erythropoetin
G	Gravidationskonstante
h	Stunde
HCA	hypothermer Kreislaufstillstand (engl. Hypothermic Circulatory Arrest)
HCL	Salzsäure
HGS	Hartgummischlauch
HIF	Hypoxie-induzierender-Faktor (engl. Hypoxia-Inducible-Factor)
HIV	engl. Human Immunodeficiency Virus
HLM	Herz-Lungen-Maschine
HPF	High-Power-Field
Hrsg.	Herausgeber
H&E	Hämatoxylin und Erythrosin (Standardfärbung)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxyd
ICR	Intercostalraum
IE	Internationale Einheit

Abkürzungsverzeichnis

Ig(G)	Immunglobulin (G)
i. m.	intramuskulär
IQ	Intelligenzquotient
i. v.	intravenös
Jak 2	Janus-Tyrosin-Kinase 2
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LF	Low-Flow-Technik
li	links
l/min	Liter pro Minute
M	Molar
min	Minute
mmol	Millimol(ar)
mmHg	mm Quecksilbersäule
n	Anzahl
NaCl	Kochsalzlösung
Ncl.	Nucleus
NEC	nekrotisierende Enterokolitis (engl. necrotizing enterocolitis)
o. b. B.	ohne besonderen Befund
p	p-Wert
PBS	Phosphate Buffered Saline
POD	Peroxidase
re	rechts
RM	Rückenmark
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
S.	Seite
s. c.	subkutan (lat. subcutan)
sek	Sekunde
Tab.	Tabelle
TdT	Terminale-desoxyribosyl-Transferase
TierSchG	Tierschutzgesetz

Abkürzungsverzeichnis

TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris-HCL	Tris-Salzsäure
TUNEL	Terminal desoxyribosyl-transferase mediated dUTP Nick End Labeling
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehung pro Minute
vgl.	vergleiche
Vol%	Volumenprozent
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

I. Einleitung

Für eine Familie steht die Geburt ihres Kindes kurz bevor. Die Schwangerschaft war unkompliziert, alle Vorsorgeuntersuchungen unauffällig.

Die Freude ist riesig, als die Eltern ihr ´gesundes Kind´ nach der Geburt im Arm halten.

Wenn in diese Hochstimmung die Diagnose „angeborener Herzfehler“ gestellt wird, bricht für die Eltern eine Welt zusammen.

Sie sind mit der neuen Situation völlig überfordert und unsicher, wie sie mit einem herzkranken Kind richtig umgehen sollen [Otto 2000/ Silas 2000/ Mentz 2001/ Mislin 2001/ Czuk 2003].

Noch in der heutigen Zeit sind Herzoperationen große Eingriffe mit nicht zu unterschätzenden Risiken.

Durch die Einführung der Herz-Lungen-Maschine (HLM) bzw. der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) 1953 [Zalaquett 2003] begann eine neue Epoche der Herzchirurgie.

Die HLM übernimmt während der Operation am offenen Herzen die Zirkulation und Oxygenierung des Blutes. Des Weiteren kann mit Hilfe eines an die HLM angeschlossenen Wärmeaustauschers die Körpertemperatur des Patienten für die Dauer der Operation abgekühlt und auf erniedrigter Temperatur gehalten werden. Dabei wird der Zellstoffwechsel herabgesetzt und der Sauerstoffverbrauch der einzelnen Zellen reduziert. Dadurch kann eine längere Ischämietoleranz der Gewebe erreicht werden.

Wenn nötig, kann man die Maschine abstellen, um diffizile Eingriffe im hypothermen Kreislaufstillstand (engl. Hypothermic Circulatory Arrest: HCA) zu ermöglichen. Ist die Korrektur am Herzen abgeschlossen, wird der Patient mit Hilfe der HLM wieder auf normale Körpertemperatur angewärmt.

Trotz aller positiven Eigenschaften ist der Einsatz der HLM auch mit einem gewissen Risiko behaftet. Daher konzentriert man sich seit die Sterblichkeit bei Herzoperationen im Kindesalter deutlich abgenommen hat [Hoogendoorn 1989/ Marino 2002] auf die Reduktion der Risiken und die bestmögliche Abstimmung der HLM-Technik auf die verschiedenen Einsatzgebiete (z. B. HCA).

Die Untersuchung des Gehirns ist dabei ein sensitiver Parameter, da sich dort (Mikro-) Embolien evaluieren lassen und Minderperfusion sehr früh zu detektierbaren Veränderungen führt.

Dazu kann, unter anderem, der postoperative neurologische Status (Outcome) der Patienten oder Versuchstiere evaluiert werden oder eine histopathologische Aufarbeitung des Gehirns nach Einsatz der HLM erfolgen.

Auch durch Forschung auf anderen Gebieten wird versucht, das Gehirn vor ischämischen bzw. degenerativen Schäden zu schützen.

Ein Ansatz ist, die Neurone so zu konditionieren, dass sie gegenüber Sauerstoffmangel toleranter werden. Dies wird z. B. durch ischämische Präkonditionierung [Prass et al. 2003/ Malhotra et al. 2006] oder medikamentös versucht.

Als neuroprotektives Medikament mit antiapoptotischer Wirkung wird das renale Hormon Erythropoetin (Epo) angesehen.

Die peri- und postischämische Gabe von Epo ist bereits Gegenstand der Forschung [Ehrenreich et al. 2002/ Romsis et al. 2002/ Sekiguchi et al. 2003].

Da in der Herzchirurgie die Möglichkeit einer Präkonditionierung des Gehirns vor elektiven Eingriffen besteht, stellt sich die Frage, ob eine zusätzliche Präkonditionierung mit Epo weitere Erfolge erbringen würde.

Wäre dies der Fall, könnte bei elektiven herzchirurgischen Eingriffen routinemäßig eine ausreichende Präkonditionierung erfolgen, die neben allen technischen Verbesserungen die Wahrscheinlichkeit für ein besseres neurologisches Outcome des Patienten weiter erhöhen würde.

II. Allgemeine Grundlagen

1. Erythropoetin (Epo)

1.1 Aufbau und therapeutischer Einsatz

Erythropoetin ist ein nicht artspezifisches, hitzestabiles Glycoprotein mit einem Molgewicht von 30400 Dalton und hoher Homologie zwischen verschiedenen Säugetieren und dem Menschen [Fu et al. 1993/ Wen et al. 1993/ Kearns et al. 2000/ Vilalta et al. 2001]. Es besteht aus 165 Aminosäuren und 40% Zucker [Weiss und Jelkmann 2000].

Beim Erwachsenen wird Epo hauptsächlich im distalen Tubulus der Niere von peritubulären Zellen (Fibroblasten [Schiebler et al. 1999]) gebildet [Mutschler 1996]. Kleine Mengen werden auch in der Leber synthetisiert, während die Erythropoetinproduktion beim Fötus vorwiegend hepatozytär erfolgt [Davis et al. 2003/ Fisher 2003].

Therapeutisch kommt humanes Erythropoetin in rekombinanter (gentechnisch hergestellter) Form zur Anwendung. Dies bietet den Vorteil, dass durch die medikamentöse Therapie keine Infektionen übertragen werden können und das Hormon in beliebiger Menge produziert werden kann.

Die Therapie mit rekombinantem humanem Epo wird von Patienten gut toleriert. [Siren und Ehrenreich 2001/ Ehrenreich et al. 2002/ Juul et al. 2004].

Im Tierversuch konnte bisher auch bei hohen Konzentrationen keine toxischen Effekte von Epo nachgewiesen werden [Weishaupt et al. 2004].

1.2 Funktionen

1.2.1 Erythroide Funktion und Signalweg

Bisher wurde als Hauptfunktion von Epo die Stimulation der Erythropoese durch Verhindern des programmierten Zelltodes von Vorläuferzellen der Erythrozyten im hämatopoetischen Gewebe angesehen [Kelley et al. 1993/ Jelkmann 1994/ Jelkmann und Wagner 2004/ Weishaupt et al. 2004].

Aufgrund seiner erythroiden Funktion hat rekombinantes Epo auch Bekanntheit als Dopingmittel bei Ausdauersportarten erlangt.

Seine Funktion vermittelt Epo durch Bindung an spezifische Rezeptoren in der Zellmembran, die zur Familie der Zytokinrezeptoren gehören [Siren und Ehrenreich 2001].

Dies führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und zur Phosphorylierung der zytoplasmatisch gebundenen Janus-Tyrosin-Kinase 2 (Jak 2). Über nachfolgende Signalwege (Phosphorylierung von Stat-5, PI(3)K-Akt/PKB, Ras-MAPK) werden antiapoptotische Faktoren (z. B. Mitglieder der Bcl-2-Familie [Dolznic et al. 2002/ Sattler et al. 2004]) hoch- und proapoptotische Caspasen (z. B. Caspase-3 [Weishaupt et al. 2004]) herunterreguliert [Siren und Ehrenreich 2001].

1.2.2 Nicht-erythroide Funktionen

Epo-Rezeptoren werden auch in vielen anderen Geweben, die nicht der Hämatopoese dienen, exprimiert. Dies spricht dafür, dass Epo weitere (nicht-erythroide) Funktionen im Körper erfüllt [Jelkmann und Wagner 2004].

Übersichtsarbeiten geben einen Hinweis auf die Fülle und den Nachweis dieser nicht-erythroiden Funktionen von Epo [Cerami 2001/ Gassman et al. 2003].

Als Beispiel haben Forschungen ergeben, dass Epo die Rate an nekrotisierender Enterocolitis (NEC) bei Kindern mit niedrigem Geburtsgewicht senken kann [Ledbetter und Juul 2000].

Auch wurde die Hypothese aufgestellt, dass Epo die HIV-Übertragung von infizierten Müttern auf das Kind via Muttermilch verhindern könnte [Miller et al. 2002].

1.2.2.1 Neuroprotektive Wirkung des Erythropoetins

Das Gehirn gehört zu den Geweben, in denen Epo und der Epo-Rezeptor unter hypoxischen Bedingungen exprimiert werden [Cerami 2001].

Besonders durch Studien zur ischämischen Präkonditionierung konnte diese Beobachtung verifiziert werden [Prass et al. 2003/ Malhotra et al. 2006].

Bereits bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems (ZNS) scheint Epo eine entscheidende Rolle zu spielen [Genc et al. 2004]. Juul et al. konnten in ihrer Studie an embryonalen und fetalen humanen Zellen zeigen, dass sowohl Epo, als auch der Epo-Rezeptor im ZNS exprimiert werden [Juul et al. 1998]. An neonatalen Rattengehirnen konnten Dzierko et al. neuroprotektive Funktionen von Epo nachweisen. Diese Neuroprotektion erfolgte durch Reduktion eines Apoptose-induzierenden Antagonisten des NMDA-Rezeptors [Dzierko et al. 2004].

Lewczuk et al. zeigten an Zellkulturen mit hippocampalen Neuronen von Ratten eine Reduktion des Hypoxie-bedingten Zelltodes durch simultane Epo-Gabe [Lewczuk et al. 2000].

In tierexperimentellen Studien konnte eine Reduktion der Infarktgröße und der Anzahl der Infarkte [Belayev et al. 2005] sowie ein deutlich besseres neurologisches Outcome [Demers et al. 2005] nach Gabe von Epo erreicht werden.

Ehrenreich et al. konnten in ihrer klinischen Studie ebenfalls eine Reduktion der Infarktgröße und ein verbessertes neurologisches Outcome bei Patienten nach Schlaganfall, die postischämisch Epo erhielten, zeigen [Ehrenreich et al. 2002]. Epo werden im Gehirn u. a. neuroprotektive, antiapoptotische, antientzündliche und antioxidative Eigenschaften zugeschrieben [Genc et al. 2004].

Bezüglich der Signaltransduktion zeigen die Ergebnisse der einzelnen Forschungsgruppen verschiedene Möglichkeiten auf:

1. Siddig et al. konnten einen neuroprotektiven Effekt durch Inhibition der Hypoxia-Inducible-Factor (HIF)-prolyl 4-Hydroxylase zeigen. Dies kann oxidativen Zelltod in vitro und ischämische Schädigung der Zellen in vivo verhindern [Siddig et al. 2005].
2. Eine andere Möglichkeit der Signaltransduktion besteht über die Phosphorylierung der Jak 2 mit nachfolgender Hochregulation antiapoptotischer Bcl-Faktoren [Sattler et al. 2004/ Kretz et al. 2005].

1.2.2.2 Epo und Blut-Hirn-Schranke

Immunhistochemische Studien konnten hydrophile Elemente des Hormons Epo aufzeigen [Sytkowski und Donahue 1987].

Aufgrund dieser Hydrophilie und seiner Größe von 30400 Dalton ist eine passive Diffusion von Epo über die Blut-Hirn-Schranke nahezu unmöglich [Schlote et al. 1999/2001/ Cerami 2001].

Jedoch scheint ein Übertritt von Epo aus dem Blut in den Liquor möglich zu sein [Ehrenreich et al. 2002/ Juul et al. 2004].

In vorhergehenden Studien wurde gezeigt, dass Epo-Rezeptoren nicht nur in Gliazellen und Neuronen, sondern auch im Endothel exprimiert werden. Dies könnte für einen aktiven Transport von Epo über die Blut-Hirn-Schranke (mit Hilfe dieser Rezeptoren) sprechen [Brines et al. 2000/ Cerami 2001/ Marti 2004].

Andere Forschungsgruppen propagieren einen extrazellulären Transport von Epo über die Blut-Hirn-Schranke [Banks 2004/ Banks et al. 2004].

Unter bestimmten Bedingungen (z. B. Hypoxie/Ischämie) erhöht sich die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke [Ironsides und Pickard 2002]. Dadurch nimmt die Selektivität ab und Stoffe, die die Blut-Hirn-Schranke normalerweise nicht passieren können, gelangen ins Gehirn.

Martinez-Estrada et al. fanden heraus, dass Epo die Blut-Hirn-Schranke vor ungewollter Durchlässigkeit schützt [Martinez-Estrada et al. 2003].

1.2.2.3 Ökonomische Aspekte der Epo-Therapie

Angenommen ein Patient soll nach dem therapeutischen Regimes unserer Studie behandelt werden (Präkonditionierung, peri- und postoperative Gabe von Epo), so würde er an drei aufeinanderfolgenden Tagen je 500 IE/kg Körpergewicht (KG) rekombinates Epo bekommen. Betrachtet man nun einen Patienten mit 75 kg KG, benötigt er 37500 IE Epo pro Tag. Dabei kommt man auf tägliche Therapiekosten von knapp 700 €. Die gesamte Therapiedauer von drei Tagen summiert (entspricht 112500 IE) ergeben Kosten um die 2000 € pro Patient [Rote Liste® 2002].

Angesichts dieser Zahlen muss der klinische Einsatz von Epo nicht nur im Blick auf Verträglichkeit und Nutzen am Patienten geprüft werden, sondern auch hinsichtlich ökonomischer Aspekte.

Obwohl Epo bereits im klinischen Alltag zum Einsatz kommt [Ehrenreich et al. 2002], ist es nötig, die Wirkung des Medikaments in neuen Einsatzgebieten genau zu evaluieren, um die Kosten einer Therapie zu rechtfertigen.

Ließe sich ein neuroprotektiver Effekt von Epo nach Präkonditionierung bei elektiven Eingriffen nachweisen, wäre die Therapie mit Epo ökonomisch gesehen sinnvoll, da die Behandlung perioperativ entstandener neurologischer Schäden deutlich mehr Kosten verursacht und für den Patienten mit einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität verbunden ist.

Diesen Aspekt habe ich nur kurz angerissen, da eine ausführliche Darstellung den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde.

2. Hypoxie

Hypoxie (eigentlich: Hypoxämie) ist definiert als Herabsetzung des Sauerstoffpartialdrucks im arteriellen Blut unter 70 mmHg, sowie einer Sauerstoffminderversorgung des gesamten Körpers oder einzelner Körperregionen [Pschyrembel 1998 a].

Die Empfindlichkeit eines Gewebes gegenüber Sauerstoffmangel bezeichnet man als Vulnerabilität. Aktive Zellen haben einen höheren Energiebedarf und sind daher vulnerabler als ruhende oder ausgekühlte Zellen. Auch Qualität und Quantität des Sauerstoffmangels (Hypoxämie/Ischämie) beeinflussen die Vulnerabilität [Riede et al. 1999/2001 b].

In der Zelle führt der Sauerstoffmangel zu einem Funktionszusammenbruch der Mitochondrien, aus dem ein Abfall des ATP-Gehaltes der Zelle resultiert. Durch vermehrte Glycogenolyse und anaerobe Glycolyse kann ATP für kurze Zeit weiter gebildet werden bis Laktat (Produkt der anaeroben Glycolyse) in der Zelle ansteigt. Dadurch werden pH und ATP-Spiegel der Zelle erniedrigt. Über ein Versagen der Ionenpumpen führt dies zum Zusammenbruch der Zellfunktionen.

Resultiert im Gehirn aus der Hypoxie der Zelltod eines einzelnen Neurons, entsteht das morphologische Bild einer Einzelzellnekrose bzw. bei Untergang eines Großteils der neuronalen Population das Bild der sogenannten „elektiven Parenchymnekrose“.

Gehen neben den Neuronen zusätzlich auch Gliazellen (Astrozyten, Oligodendrozyten) und Blutgefäße in Nekrose über, spricht man von einer panzellulären Nekrose. Ischämisch bedingte panzelluläre Nekrosen bezeichnet man als Infarkte. Diese können auch bei länger andauernder Hypoxie im Grenzgebiet zwischen den Versorgungsgebieten zweier Hirnarterien („letzte Wiese“) oder in Hypoxie-empfindlichen Rindenschichten III und V der Großhirnrinde (laminärer Rindeninfarkt) auftreten [Ellison et al. 2004].

In der Literatur werden Ischämie und Hypoxie häufig nur unsauber voneinander getrennt.

Im Gegensatz zur Hypoxie ist bei der Ischämie (Verminderung/Unterbrechung der arteriellen Blutversorgung [Riede et al. 1999/2000 c]) neben der Sauerstoffversorgung zusätzlich auch die Versorgung mit Glukose und der Abtransport von Stoffwechselprodukten vermindert bzw. aufgehoben.

Eine saubere Trennung der Begriffe ist jedoch nicht immer möglich, zumal in einem Patientenkollektiv häufig beide Pathophysiologien in variabler Ausprägung vorliegen.

In der Fachliteratur ist daher der Terminus „hypoxisch-ischämisch“ nicht unüblich.

In meiner Arbeit habe ich versucht, die Begriffe -soweit möglich- voneinander zu trennen. Bei Zitaten habe ich den in der Quelle verwendeten Begriff übernommen.

3. Apoptose

Unter Apoptose versteht man den programmierten Zelltod einer einzelnen Zelle [Anonymus A nach 1997]. Die Zelle löst dabei genetisch determiniert einen physiologischen Zelluntergang aus [Pschyrembel 1998 b].

Charakteristisch für die Apoptose ist das Auftreten in einzelnen Zellen, geschrumpftes Zytoplasma, kondensiertes Chromatin [Anonymus D vor 2005], eine erhaltene Zellmembran mit Abschnürung apoptotischer Vesikel [Anonymus C nach 1990] sowie DNA-Doppel- und Einzelstrangbrüche („nicks“) [Kerr et al. 1972/ Anonymus G 2004].

Durch Apoptose kann die Homöostase des Gewebes aufrecht erhalten werden. Somit wird erreicht, dass Auf- und Abbau des Gewebes im Gleichgewicht bleiben.

Daher ist dieser Mechanismus für den geregelten Ablauf der Embryogenese wichtig.

Durch Apoptose werden Gewebe vor unkontrollierter Neubildung geschützt und die Grundlage für ein funktionsfähiges Immunsystem ist gegeben [Pschyrembel 1998 b].

Als Auslöser für Apoptose kommen unter anderem ein bestimmtes Zellalter (z. B. 120 Tage bei Erythrozyten) oder der Kontakt mit gewissen Noxen (z. B. Sauerstoffradikale) in Betracht [Riede et al. 1999/2001 a].

Apoptose kann über drei Wege ausgelöst werden, die in der Regel in der Initiierung der Caspase-Kaskade münden:

1. Durch Binden von z. B. TNF (Tumor-Nekrose-Faktor) an einen Rezeptor („Todesrezeptor“) der Zellmembran wird eine Aktivierung der Caspasen-8 und -10 im Zytoplasma ausgelöst [Anonymus C nach 1990].
2. Nach Schädigung der Mitochondrien werden Cytochrom C und/oder AIF (mitochondrialer Apoptose-induzierender Faktor) frei [Riede et al. 1999/2001 a].
Im Zytoplasma wird aus Cytochrom C, Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor) und der Pro-Caspase-9 das Apoptosom gebildet. Dieses ist in der Lage, gemeinsam mit dATP die Caspase-9 zu aktivieren [Anonymus C nach 1990].
3. Seit kurzem ist ein dritter Signalweg bekannt.
Dieser wird durch Stress (Überlastung der Zelle [Hupfeld 2001]) ausgelöst. Hierbei wird die Caspase-12 durch Calcium aktiviert, das aus dem endoplasmatischen Retikulum freigesetzt wird [Anonymus C nach 1990].

Auch Caspase-unabhängige Wege wurden bereits nachgewiesen und diskutiert [Jaattela 2002/ Bourges et al. 2004/ Lorenzo und Susin 2004/ Takano et al. 2005]. Einer dieser Signalwege scheint vom Mitochondrium auszugehen, indem dort AIF freigesetzt wird. Dieses Protein induziert auch Caspase-unabhängig Apoptose [Susin et al. 1999].

Caspasen sind Proteasen, die zur Fragmentierung der DNA führen. Sie greifen Zytoskelett, Kernproteine und nukleäre Regulator- und Schutzproteine an. Über eine Aktivierung der Endonukleasen setzen sie den DNA-Reparaturmechanismus außer Kraft [Riede et al. 1999/2001 a/ Hupfeld 2001].

Der Apoptose folgt keine reaktive Begleitentzündung [Riede et al. 1999/2001 a], da die Plasmamembran funktionell erhalten bleibt [Anonymus C nach 1990] und somit keine (Entzündungs-) Mediatoren freigesetzt werden können.

Morphologisch entspricht die Apoptose einer Schrumpfnekrose. Diese ist charakterisiert durch meist halbmondförmige Chromatinverklumpungen im Kernmembranbereich, Blasenbildung des Zytoplasmas sowie Bildung von Apoptosekörpern (Abschnüren membranumschlossener Vesikel [Anonymus C nach 1990]) und Karyorrhexis (Zerfall der sterbenden Zelle) [Kerr et al. 1972/ Riede et al. 1999/2001 a].

Es sind auch Faktoren bekannt, die Apoptose verhindern können. Dazu gehört das Bcl-2 Protein [Koolman und Röhm 1998] (ein Protoonkogen [Riede et al. 1999/2001 a]), das mit Caspase-9 und Apaf-1 Komplexe bilden kann, und somit die Aktivierung der Caspase-Kaskade verhindern kann [Huret 1998].

Als weitere Aufgabe hemmt Bcl-2 die Freigabe von Cytochrom C und AIF [Riede et al. 1999/2001 a].

Diese antiapoptotische Eigenschaft machen sich manche Viren zunutze. Als Beispiel fördert das Epstein-Barr-Virus die Bcl-2 Produktion der Wirtszelle, was zu einem Ausbleiben der Apoptose führen kann. Dadurch sichern die Viren ihr eigenes Überleben [Anonymus C nach 1990].

Eine Zelle die viel Bcl-2 enthält kann länger leben, daher mehr Mutationen erfahren und somit zu einem hochmalignen Tumor entarten [Anonymus C nach 1990].

Zu unterscheiden ist die Apoptose von der Nekrose, die meist durch physikalische oder chemische Noxen herbeigeführt wird [Koolman und Röhm 1998].

Nekrose betrifft meist einen Zellverband (d. h. mehrere Zellen gleichzeitig) [Anonymus A nach 1997]. Die Schädigung bewirkt eine Kondensation der Kernsubstanz und Anschwellung der Zellorganellen. Dadurch wird die Plasmamembran geschädigt und die Zellen platzen. Durch Mediatoren, die aus dem Zytoplasma freigesetzt werden, wird im Rahmen des nekrotischen Zelltodes eine Entzündungsreaktion ausgelöst [Anonymus C nach 1990/ Koolman und Röhm 1998].

4. Caspase-3

Die Caspase-3 ist Teil der Caspase-Kaskade. Sie ist ein Schlüsselenzym bei der Vermittlung/Initiierung der Apoptose [Anonymus A nach 1997/ Anonymus B 2004], da bei ihr die Signalwege aus Mitochondrien und Zellkern zusammenlaufen [Anonymus E 2004]. Sie ist für die Spaltung wichtiger Zellproteine im apoptotischen Geschehen verantwortlich [Hupfeld 2001].

Der Nachweis aktivierter Caspase-3 gilt als wahrscheinlicher "point of no return" im apoptotischen Geschehen [Karahashi und Amano 1998/ Geske et al. 2000].

5. TUNEL (Terminale desoxyribosyl-transferase mediated dUTP Nick End Labeling)

Diese Färbung eignet sich zum lichtmikroskopischen Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen, die durch Fluoreszenz oder Immunhistochemie sichtbar gemacht werden können.

Im eigentlichen Sinne ist die TUNEL-Färbung kein spezifischer Nachweis von Apoptose, da DNA-Strangbrüche ihre Ursache sowohl in der Apoptose als auch in der Nekrose (besonders in Infarktregionen) haben können. Die TUNEL-

Färbung ist daher nicht geeignet, um zwischen einem nekrotischen und einem apoptotischen Zelluntergang zu unterscheiden [Grasl-Kraupp et al. 1995/ Blazey 2002]. In Kombination mit den oben genannten klassischen morphologischen Zellveränderungen bei Apoptose wird diese Färbung jedoch häufig als „Apoptosemarker“ verwendet.

6. Zielsetzung

Durch unsere tierexperimentelle Studie möchten wir zeigen, dass bei elektiv operativen Eingriffen, die mit Hypoxie der Neurone einhergehen, eine Präkonditionierung mittels Epo die Neuroprotektion erhöht. Dies soll sich klinisch in einer Verbesserung des neurologischen Outcomes und histologisch in einer geringeren Schädigung der Neurone des ZNS in Form von Infarkten und hypoxischen Neuronen zeigen. Da sich die peri- und postischämische Gabe von Epo in diversen humanen und tierexperimentellen Studien [Ehrenreich et al. 2002/ Romsis et al. 2002/ Sekiguchi et al. 2003] bereits als positiv erwiesen hat, wurde dieses Vorgehen in unserer Studie beibehalten.

III. Material und Methoden

Unserer Studie beschäftigt sich mit der neuroprotektiven Wirkung von Epo. Um diesen Effekt näher zu untersuchen, entwickelten wir ein Schweinemodell, um daran einen einstündigen Kreislaufstillstand durchzuführen. Anschließend wurden die Tiere über einen Beobachtungszeitraum von sechs Tagen neurologisch beurteilt und anschließend elektiv getötet. Wir entnahmen Gehirn und Rückenmark und arbeiteten es histologisch im Hinblick auf hypoxische/ischämische und apoptotische Neurone auf.

1. Versuchsaufbau

Um eine Verblindung der beteiligten Personen zu gewährleisten, wurden die Epo- bzw. NaCl-Spritzen so präpariert, dass der Inhalt nicht mehr erkennbar war. Dieser erste Schritt der Verblindung erfolgte durch die Person, die die HLM bediente, damit alle anderen Personen (Chirurg, Assistent, Narkoseleiter, Tierarzt) keinen bewussten Einfluss auf Behandlung und Beurteilung der Tiere entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit nehmen konnten. Zur histologischen Aufarbeitung und Auswertung von Gehirn und Rückenmark erfolgte ein zweiter Schritt der Verblindung. Jedem Tier war bei der Operation eine fortlaufende Nummer zugeteilt worden (S 1, S 2 etc.). Diese Nummer wurde im zweiten Schritt von einer bereits verblindeten Person in eine zufällige A-Nummer (z. B. S 4 wird zu A 13) umgeschrieben. Nach diesem Schritt waren alle an der Auswertung der Organe beteiligten Personen verblindet.

Der Versuch wurde unter standardisierten Bedingungen durchgeführt, wobei die Tiere auf die verschiedenen Gruppen (Ziel- und Kontrollgruppe) randomisiert wurden.

1.1 Modelle

Für unseren Überlebensversuch zur Beurteilung des neurologischen Outcomes und der Histopathologie bedienten wir uns des „chronic porcine model“. Dazu standen uns 34 weibliche Schweine der deutschen Landrasse zur Verfügung. Die Tiere waren zwei bis drei Monate alt und 42 kg (+/- 6 kg) schwer.

16 Tiere konnten in die Auswertung der Studie eingeschlossen werden.

Unser Versuch wurde nach den geltenden Richtlinien des Tierschutzes durchgeführt und vom Regierungspräsidium bewilligt. Eine kurze Übersicht dazu findet sich im Anhang (VII. 1.).

1.2 Präoperative Vorbereitung

Die Tiere wurden sieben Tage präoperativ in den Tierstall der Universität gebracht, um sich an die neue Umgebung zu adaptieren. Ihre Betreuung übernahm ein erfahrener Veterinär.

Die Epo-Behandlung erfolgte an drei aufeinander folgenden Tagen, beginnend mit der Präkonditionierung am Tag vor der Operation. Dazu bekamen die Tiere eine Injektion von 500 IE/kg KG Epo subkutan (s. c.) vom Tierarzt verabreicht.

Die Kontrollgruppe erhielt zum selben Zeitpunkt ebenfalls s. c. eine entsprechende Menge NaCl-Lösung.

1.3 Ablauf der Operation

Am Operationstag wurden die Tiere im Tierstall sediert (s. Schema zur Prämedikation unter III. 5.1) und gewogen. Anschließend wurden sie in den Operationssaal transportiert. Die Intubation und das Legen eines peripheren venösen-Zugangs wurde durch den Tierarzt vorgenommen. Nach ausreichender Analgesierung mittels Fentanyl und Beginn der Intubationsnarkose mit Isofluran, erfolgte die Hirnsondenimplantation durch den Chirurgen.

Um einen Ausgangswert für weitere Laborkontrollen zu haben, wurde den Tieren präoperativ Blut entnommen. Danach bekamen die Tiere die zweite Injektion Epo (500 IE/kg KG) intravenös (i. v.) verabreicht und wurden in Linksseitenlage verbracht.

Die einzelnen Operationsschritte erfolgten unter sterilen Kautelen, die ein steriles Abwaschen und Abdecken sowie steriles Operationsbesteck beinhalteten.

Zur perioperativen Kontrolle der Vitalparameter begann die Operation mit einer Freilegung der Leistengefäße links, um den Tieren einen arteriellen und

venösen Zugang in die Arteria und Vena femoralis sinistra zu legen. Zur kontrollierten Ausfuhr wurde ein suprapubischer Urinkatheter angelegt.

Der Thorax wurde mittels anterolateraler Thorakotomie im 3.-4. ICR eröffnet. Es folgte eine systemische Heparinisierung der Tiere mit 300 IE/kg KG i. v.

An der Aorta ascendens und dem rechten Vorhof wurden Nähte vorgelegt, so dass die Kanülierung der Aorta mittels einer 18 Fr. Kanüle und die Kanülierung des Vorhofs mittels einer Two-stage 28/32 Fr. Kanüle durchgeführt werden konnte.

Vor Beginn der EKZ wurden der Fluss in der Aorta und die Autoregulation des Gehirns mit Hilfe der Hirnperfusionssonde gemessen. Nachdem die HLM in Betrieb genommen worden war, wurde die Beatmung abgeschaltet.

Mit Hilfe der HLM wurden die Tiere innerhalb von 62 Minuten (+/- 28 Minuten) unter standardisierten Bedingungen auf eine rektale Stillstandstemperatur von 22,35°C (+/- 1,35°C) abgekühlt.

Zur Entlastung des Herzens wurde eine Ventkanüle in den linken Ventrikel platziert, um das kollateral einfließende Blut aus dem Herzen zu pumpen.

Bei Erreichen der Stillstandstemperatur wurden die Tiere noch für eine Minute weiter perfundiert, um eine ausreichende Kühlung aller Gewebe zu gewährleisten. Dann wurde die HLM abgestellt.

Zur Kardioprotektion im Stillstand wurde den Tieren systemisch 40 ml (entspricht 2 mmol) gekühlte Kaliumchlorid-Lösung über die arterielle Kanüle injiziert. Zusätzlich wurde steriles Eis in die Thoraxöffnung gegeben.

Die Tiere wurden mit einem sterilen Tuch großflächig abgedeckt um Abdomen, Thorax und Schädel mit Eissäcken kühlen zu können.

Nach einer Stunde Kreislaufstillstand wurden die Tiere mit Hilfe der HLM wieder angewärmt. Innerhalb von 83,5 Minuten (+/- 36,5 Minuten) erreichten sie ihre Ausgangstemperatur von 36°C wieder. Eine Defibrillation am offenen Herzen kam zum Einsatz, wenn sich selbsttätig keine regelmäßige Herzaktion einstellte.

Die Inhalationsnarkose wurde für die Dauer der EKZ auf eine totale intravenöse Narkose umgestellt, die mittels Ketamin und Dormicum geführt wurde. Fentanyl wurde über einen Perfusor während der gesamten Dauer der Operation verabreicht.

Die Beatmung wurde wieder aufgenommen und es erfolgte ein sukzessives Abgehen von der HLM durch Anstauen des venösen Rückflusses und Erhöhung der Füllungsdrücke. Bei ausreichender Hämodynamik und stabilem Kreislauf erfolgte der Abgang von der HLM. Zur Unterstützung der Kreislaufsituation erhielten manche Tiere Katecholamine. Zu diesem Zeitpunkt wurden erneut der Aortenfluss und die Autoregulation gemessen.

Nach ausgiebiger Blutstillung und Protamingabe erfolgte ein schichtweiser Wundverschluss nach Anlage einer Thoraxdrainage.

1.4 Postoperatives Vorgehen und durchgeführte Messungen

Narkose und Beatmung wurden für weitere sechs Stunden beibehalten, bis die gewünschte Körpertemperatur von 39°C erreicht war und die Tiere hämodynamisch und respiratorisch vollkommen stabil waren.

Während der Operation am offenen Herzen und der intensivmedizinischen Nachbeobachtung wurden die Vitalparameter und die Hirnsondenableitungen alle zehn Minuten notiert und viertelstündlich Blut-Gas-Analysen durchgeführt.

Nach Ablauf der sechs Stunden Beobachtungszeit wurde die Inhalationsnarkose ausgeschlichen. Sobald die Tiere adäquat auf Schmerzreize reagierten und selbstständig atmeten, wurden sie extubiert und je nach Bedarf mit Sauerstoff behandelt und ansediert.

Am Morgen des ersten postoperativen Tages erhielten die Tiere eine weitere Blutabnahme und die dritte Injektion Epo (500 IE/kg KG) s. c. und wurden noch sediert in den Tierstall gebracht.

2. Postoperatives Management der Tiere im Tierstall

Die postoperative Betreuung der Tiere wurde von einem Tierarzt in Zusammenarbeit mit einem Tierpfleger übernommen.

Bereits am ersten postoperativen Tag wurde den Tieren gewichtsadaptiert die normale Futtermenge angeboten:

35,0-39,5 kg Körpergewicht (KG)	1,6 kg Schweinemastmehl pro Tag
39,5-44,0 kg KG	1,8 kg Schweinemastmehl pro Tag
44,0-49,0 kg KG	2,0 kg Schweinemastmehl pro Tag

Wasser war für die Tiere stets ad libidum verfügbar.

Zur postoperativen Analgesie erhielten die Tiere am ersten und zweiten postoperativen Tag Buprenorphin intramuskulär (i. m.). Anschließend wurde überlappend und in Abhängigkeit vom klinischen Zustand des jeweiligen Tieres auf Carprofen umgestellt. Die Dosierung der Analgetika erfolgte nach folgendem Schema:

Buprenorphin	0,005-0,12 mg/kg KG i. m.; alle 12 h
Carprofen	0,5-4,0 mg/kg KG i. m.; alle 24 h

Zur antibiotischen Abdeckung der postoperativen Phase wurde als Breitbandpräparat mit Depotwirkung eine Penicillin-Streptomycin-Kombination gewählt. Die Dosierung betrug 3 ml/50 kg KG i. m. Insgesamt bekamen die Tiere die Antibiose zweimal im Abstand von zwei Tagen verabreicht.

3. Entscheidung über ein Studiendesign zugunsten der neurologischen Beurteilung

In der klinischen Praxis ist das Outcome eines Patienten (neben ökonomischen Aspekten) der wichtigste Parameter für eine etwaige Therapieentscheidung. Da das klinische (neurologische) Outcome generell nach längeren Überlebenszeiten eine höhere Relevanz besitzt als nach einer kurzen Überlebenszeit, entschlossen wir uns für einen relativ langen, aber noch praktikablen postoperativen Untersuchungszeitraum von sechs Tagen.

Andererseits ist in der Literatur für verschiedene Spezies beschrieben, dass ein Maximum an apoptotischen Zellen im ZNS nach Hypoxie/Ischämie bereits nach ein bis zwei Tagen vorliegt und dass deren Anzahl bereits nach vier bis sieben Tagen wieder stark abnimmt bzw. Basiswerte erreicht werden [Martin et al. 1997]. In Kenntnis dieser Problematik (längeres Überleben erlaubt bessere

Beurteilung des neurologischen Outcomes; kürzere postoperative Nachbeobachtung wäre sinnvoller zur Detektion von Apoptose) und der nur in begrenzter Anzahl zur Verfügung stehenden Versuchstiere (weswegen keine zusätzlichen Gruppen untersucht werden konnten), entschlossen wir uns für ein Studiendesign zugunsten einer optimalen neurologischen Nachbeobachtung.

4. Neurologische Beurteilung

Die neurologische Beurteilung der Tiere erfolgte durch den Tierarzt anhand eines eigens für diesen Versuch ausgearbeiteten Beurteilungsschlüssels:

	0	1	2	3
Bewußtsein	komatös	stuporös	verlangsamt	o. b. B. (ohne besonderen Befund)
Appetenz	keine Flüssigkeitsaufnahme	keine Futteraufnahme	reduzierte Futteraufnahme	o. b. B.
Motorik	standunfähig	gangunfähig	Schlottergang	o. b. B.

Die Beurteilung erfolgte an jedem Tag des Nachbeobachtungszeitraums.

Im Wesentlichen wurde das Spontanverhalten der Tiere bewertet.

Zur Beurteilung des Bewusstseins wurde die Reaktion der Tiere auf die Anwesenheit des Beobachters evaluiert. Nur wenn die Tiere keine Reaktion zeigten, versuchte der Tierarzt sich durch akustische Signale oder durch Berühren der Tiere bemerkbar zu machen.

Die Appetenz wurde analog beurteilt. Der Tierarzt beobachtete zuwartend, ob die Tiere Wasser und Futter zu sich nahmen. War dies nicht der Fall (z. B. weil ein Tier nicht aufstehen konnte), bekamen sie das Futter direkt vorgelegt.

Bei der Bewertung der Motorik wurde ebenfalls zuerst die spontane Aktivität beobachtet. Versuchten die Tiere nicht aufzustehen, stellte der Tierarzt sie auf und beobachtete die Reaktion und den Bewegungsablauf der Tiere.

Für jedes Kriterium war eine maximale Punktzahl von 3 (entspricht der besten Bewertung) zu erreichen. Summiert spiegelten die Zahlen den neurologischen

Zustand des jeweiligen postoperativen Untersuchungstages wieder (maximal erreichbare Punktzahl 9 (entspricht der Restitutio ad integrum)).

5. Elektive Tötung und Organentnahme

5.1 Perfusionsfixierung

Die Tiere wurden am siebten postoperativen Tag nach folgendem Schema prämediziert und zur Gehirnentnahme in den Operationssaal gebracht.

Prämedikation (in der Großtierhaltung der Universitätsklinik Tübingen)

Atropin	0,05 mg/kg KG i. m.
Azaperon	2,0 mg/kg KG i. m.
Diazepam	0,2 mg/kg KG i. m.
Ketamin	14 mg/kg KG i. m.

Der Tierpfleger wog die Tiere bevor sie den Stall verließen, um im Vergleich mit dem Operationstag die Entwicklung des Körpergewichts im Nachuntersuchungszeitraum beurteilen zu können.

Beim Eintreffen der Tiere im Operationssaal wurde ein peripher-venöser-Zugang gelegt und eine Blutabnahme vorgenommen. Zur Unterstützung der folgenden Entblutung erhielten die Tiere 10000 IE Heparin i. v.

Dann erfolgte analog zur Operationsvorbereitung die Intubation (durch den Chirurgen) und die Inhalationsnarkose mit Isofluran (1,5 Vol%).

Daraufhin wurden die Tiere in Linksseitenlage verbracht.

Die Eröffnung des Brustkorbes erfolgte über die ehemalige rechtslaterale Thorakotomie. Die Lungen wurden zur Seite gedrängt, um den rechten Vorhof und die Aorta darstellen zu können.

Zum Absaugen wurde ein einfacher Schlauch ohne besonderen Aufsatz benutzt, der durch eine einzelne Rollerpumpe angetrieben wurde.

Zur Perfusion und Fixierung wurde eine Einzelpumpe eingesetzt, die mit einer Geschwindigkeit von 50 U/min, das entspricht bei 3/8 Schläuchen einem Volumen von 1,5 l/min, lief.

Nach Vorlage einer Tabaksbeutelnaht am rechten Vorhof erfolgte die Stichinzision des rechten Vorhofs und die Kanülierung mit Vorschieben der Kanüle in die Vena cava superior und anschließendem Umschlingen dieses Gefäßes.

Die Tiere konnten nun über den venösen Schenkel entblutet werden. Das Blut wurde am Ende des Schlauches in einen Eimer aufgefangen.

Auch an der Aorta wurde eine Tabaksbeutelnaht vorgelegt und nach Stichinzision ein Ventkatheter, der schon mit dem arteriellen Schlauch verbunden war, in den Truncus brachiocephalicus (hieraus entspringen die Arteria subcalvia dextra und die Arteriae carotes communes [Wilkens und Münster 1976]) vorgeschoben.

Über diese Kanüle erfolgte die Hirnperfusion mit sechs bis zehn Litern physiologischer Kochsalzlösung, bis klare Flüssigkeit aus der Vena cava superior zurückfloss. Auch dieses Blut wurde in einen Eimer aufgefangen und verworfen. Danach begann die Fixierung des Gehirnes in situ. Dazu wurde das Gehirn mit frischem Paraformaldehyd (4%ig in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7.4)) perfundiert. Sobald über den venösen Schenkel Formalin zurückfloss wurde der Kreislauf geschlossen und das Gehirn für weitere zehn Minuten perfundiert.

5.2 Gehirnentnahme

In Anschluss an die Fixierung und das passive Auslaufen der Formalinlösung über die venöse Kanüle wurden die Kanülen entfernt.

Nach Abpräparation der Weichteile von der Schädelkalotte wurde der knöcherne Schädel mit einer oszillierenden Säge aufgesägt und mit Hilfe eines Eisenmeißels und eines Holzhammers vollständig eröffnet. Die Dura mater wurde durchtrennt und das Gehirn freipräpariert. Mit einem Holzspatel konnte man das Gehirn anheben und die Nervi olfactorii durchtrennen, so dass das Gehirn mobilisiert werden konnte. Es verblieb jedoch so lange in situ, bis das Rückenmark vollständig freipräpariert und mobilisiert war.

5.3 Entnahme des Rückenmarks

Zur Entnahme des Rückenmarks wurde zuerst die Haut mit dem Skalpell entlang der Processi spinales durchtrennt. Dann wurde die autochthone Rückenmuskulatur entfernt und die Wirbelsäule von dorsal her freigelegt.

Nun konnten die Wirbelbögen mit der oszillierenden Säge durchtrennt werden. Bei diesem Manöver blieb zwar das Rückenmark weitgehend unbeeinträchtigt, die Dura mater wurde jedoch an einigen Stellen eröffnet, so dass das Rückenmark frei lag und zum Schutz gegen Austrocknung mit in physiologischer Kochsalzlösung getränkten Papiertüchern bedeckt werden musste. Zuletzt wurden die Nervi spinales mit dem Skalpell durchtrennt. Das Rückenmark konnte am Stück mit dem Gehirn entnommen werden.

5.4 Aufbewahrung der Organe

Die entnommenen Gewebe wurden gekennzeichnet und in eine Plastikdose mit Verschluss verbracht, die mit frischem Paraformaldehyd gefüllt war.

5.5 Besonderheiten hinsichtlich der Tiere

Die elektiv getöteten Tiere durchliefen die Organentnahme wie in Kapitel III, Abschnitt 5.1-5.3 beschrieben. Bei den bereits am Operationstag gestorbenen Tieren wurden die Organe ebenfalls auf die beschriebene Weise entnommen, jedoch konnten die Tiere nicht mehr entblutet werden.

Bei den beiden im Tierstall verstorbenen Tieren konnte keine Organentnahme erfolgen.

6. Histologische Aufarbeitung der Gewebe

6.1 Fixierung

Die Gewebe blieben bis zur vollständigen Fixierung für weitere zwei bis sechs Wochen in 4%igem Paraformaldehyd.

6.2 Makroskopische Aufarbeitung der Gehirne und des Rückenmarks

Die makroskopische Aufarbeitung erfolgte ohne Kenntnis der Gruppenzuteilung der Tiere.

Für die nachfolgenden histopathologischen Untersuchungen wurden vorab geeignete Hirnregionen ausgewählt. Um das ZNS möglichst umfassend beurteilen zu können, wurden 25 Regionen ausgewählt, die ausgewertet werden sollten. Diese Regionen wurden in insgesamt elf Paraffinblöcken eingebettet (vgl. Tab. 1).

Das genaue Procedere gestaltete sich folgendermaßen:

Die Gewebe wurden aus dem Formalin genommen und unter fließend kaltem Wasser abgespült.

Zuerst wurde das Rückenmark am Übergang zur Medulla oblongata abgetrennt. Dann ließ man das Formalin abtropfen und wog die Gehirne.

Um das Rhombencephalon (Pons, Medulla oblongata und Cerebellum) vom restlichen Gehirn abzutrennen wurde ein transversaler Mittelhirnschnitt durchgeführt. Anschließend wurden die Pedunkuli cerebellares beidseitig durchtrennt und das Kleinhirn vom Hirnstamm abgehoben.

Das Grosshirn wurde in coronaren Schnitten in 7 bis 8 mm dicke Hirnscheiben von rostral nach kaudal aufgearbeitet (vgl. Abb. 1). Nun wurden die geeigneten Hirnscheiben zur Entnahme der Regionen ausgewählt. Die Gewebe wurden in einer Größe von max. 1,5 cm mal 1,0 cm (Fläche) mal 0,2 cm (Dicke) für die Blöcke 1, 2, 3, 4 und 11 (vgl. Tab. 1) entnommen. Pons und Medulla sowie das Rückenmark wurden in Transversalschnitten aufgearbeitet und hiervon jeweils komplette Querschnitte eingebettet. Das Kleinhirn wurde ausgehend von einem Sagittalschnitt in der Medianebene in radiären Schnitten fächerförmig aufgearbeitet. Dann suchte man den Schnitt (links- oder rechtshemisphärisch), auf dem der Nucleus dentatus am besten zu identifizieren war, für die Einbettung. Dazu kam noch eine Gewebeprobe aus dem Kleinhirnoberwurm.

Vom Rückenmark wurden jeweils mehrere Schnittebenen aus insgesamt vier Höhen entnommen (vgl. Tab. 1).

Lagen makroskopische Auffälligkeiten außerhalb der bisher aufgelisteten Regionen vor, so wurden diese zusätzlich für die histologische Beurteilung entnommen (vgl. Tab. 1, Block 12).

6.3 Entwässern, Einbetten und Schneiden

Die Gewebestücke wurden für die Routine-Einbettung in Paraffin in Einbettkassetten verpackt und beschriftet.

Zur Entwässerung durchliefen sie ein 28 Stunden und 50 Minuten dauerndes Programm in der Entwässerungsmaschine.

Die entwässerten Gewebe wurden in flüssigem Paraffin aufbewahrt und anschließend eingebettet.

Um die Blöcke mit dem Mikrotom schneiden zu können, wurden sie für 20 Minuten in den Gefrierschrank bei -20°C gelegt. Danach wurden ca. $4\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Diese kamen zum Trocknen für 30 Minuten in den Wärmeschrank bei $60\ ^{\circ}\text{C}$.

Danach wurden sie zur Aufbewahrung in Mappen einsortiert.

6.4 Färbungen

Vor der Färbung mit Hämatoxylin und Erythrosin (H&E) mussten die Schnitte entparaffiniert werden.

Dazu durchliefen sie eine 30minütige Xylolreihe (drei Küvetten Xylol) und anschließend eine 20minütige absteigende Alkoholreihe (je 5 min 100%, 100%, 96% und 70% Ethanol).

6.4.1 Hämatoxylin&Eosin-Färbung (H&E)

Alle zu untersuchenden Gewebeproben wurden zunächst mit der histologischen Standardfärbung (H&E) gefärbt. Anhand dieser Färbung ist eine gute neuropathologische Beurteilung hinsichtlich hypoxischer Veränderungen ebenso möglich, wie die zuverlässige Identifikation von Infarkten und etwaigen anderen pathologischen Veränderungen (z. B. Entzündungen, Blutungen).

6.4.2 Klüver-Barrera

Für eine bessere topographische Orientierung innerhalb einer Gewebeprobe wurde von manchen Regionen zusätzlich eine Markscheidenfärbung angefertigt.

Dies betraf folgende Regionen: Insehrinde, Nucleus caudatus und Nucleus lentiformis rechts und links (vgl. Tab. 1, Blöcke 3 und 4).

6.4.3 Immunhistochemie

6.4.3.1 Aktivierte Caspase-3

Beim Versuch der Etablierung einer immunhistochemischen Detektion von aktivierter Caspase-3 im porcinen ZNS kamen drei Primärantikörper zum Einsatz.

Als Positivkontrollgewebe diente Schweinethymus und ein humanes Lymphom, da diese Gewebe einem hohen Zellumsatz unterliegen und daher viele apoptotische Zellen enthalten.

Für die Etablierung an porcinem ZNS-Gewebe testeten wir als erstes einen monoklonalen Hasen-Antikörper von Cell Signalling.

Danach kamen polyklonale Hasen-Antikörper von Cell Signalling und R&D Systems zum Einsatz.

Zusätzlich wurden zwei unterschiedliche Sekundärantikörper verwendet. Ein monoklonaler Anti-Hasen-Antikörper (Sigma) und ein zweiter Anti-Hasen-Antikörper (IgG; Cell Signalling).

Des Weiteren wurde für einzelne Färbungen der Primärantikörper vor der Applikation auf den Gewebeschnitt mit Hirnhomogenat für 1 Stunde auf Eis präinkubiert, um eine unspezifische Antikörperbindung (möglicherweise aber auch die spezifische Bindung) zu reduzieren.

6.4.3.2 TUNEL (Terminale desoxyribosyl-transferase mediated dUTP Nick End Labeling)

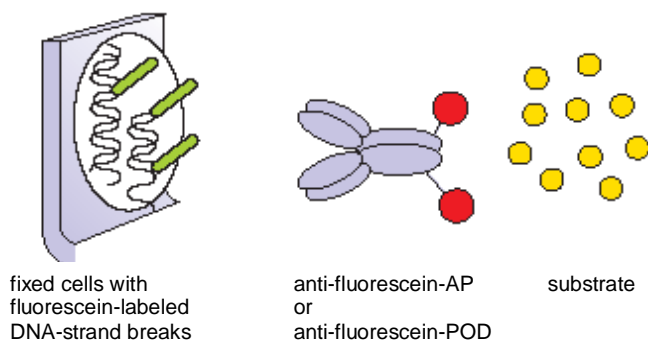
6.4.3.2.1 Methodik

Methodisch werden drei Schritte unterschieden:

1. DNA-Strangbrüche werden durch die Terminale-desoxyribosyl-Transferase (TdT), die Fluorescein enthält, markiert. Die TdT katalysiert matrizenunabhängig die Polymerisation der markierten Nukleotide am 3'-Ende.
2. Fluorescein wird von Anti-Fluorescein-Antikörpern markiert. Diese sind mit einer Peroxidase (POD) konjugiert.
3. Nach Farbreaktion mittels eines Substrates für die POD, z. B. 3,3'-Diaminobenzidine (DAB), können TUNEL positive Zellen detektiert werden.

[Anonymus F 2004]

Schematische Darstellung der Methodik der TUNEL-Färbung [Anonymus F 2004]:



Copyright Roche Diagnostics

Zur Etablierung der Färbung mussten wir die Vorbehandlung und die Dauer bis zur Farbreaktion (DAB-Entwicklungdauer) variieren.

6.4.3.2.2 Ablauf der TUNEL-Färbung (In Situ Cell Death Detection Kit, POD (TUNEL))

Modifiziert nach Portera-Cailliau et al. [Portera-Cailliau et al. 1994] und der Anleitung zur TUNEL-Färbung aus dem „Instruction manual“ des In situ cell detection kit, POD von Roche.

1. Entparaffinierung

- Chloroform 30 min
- 100% Ethanol 2 min
- 100% Ethanol 2 min
- 96% Ethanol 2 min
- 70% Ethanol 2 min

2. Waschen

- Aqua dest. 2 mal 2 min

3. Aufbrechen der Fixierung mit Proteinase K

- 20 $\mu\text{g/ml}$ in 10 mM Tris-HCL (pH 8,0) für 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubieren
- je 100 μl pro Schnitt

4. Waschen

- Aqua dest. 4 mal 2 min

5. Blockierung

- 3% H_2O_2 in PBS (Zusammensetzung PBS s. Tab. 2) für 5 min bei RT

6. Waschen

- Aqua dest. 3 mal 2 min

7. Positivkontrolle

- DNase Behandlung 20 min bei RT

8. Waschen

- Aqua dest. 3 mal 2 min

9. Blockierung

- 0,1 M Tris-HCL (pH 7,5) und 3% BSA und 20% Schweineserum für 30 min bei RT
- je 100 μ l pro Schnitt

10. Waschen

- PBS 2 mal 2 min

11. TUNEL-Mix

- 50 μ l pro Schnitt auftragen, 60 min bei 37 °C in feuchter Kammer und Dunkelheit inkubieren

12. Waschen

- PBS 3 mal 5 min

13. Converter-POD

- 50 μ l pro Schnitt auftragen, 30 min bei 37 °C in feuchter Kammer inkubieren

14. Waschen

- PBS 3 mal 2 min

15. DAB-Entwicklung (Zusammensetzung DAB s. Tab. 2)

- 50 sek lang

16. Gegenfärbung

- Hämalan 3 mal kurz durchziehen
- Leitungswasser 2 mal kurz durchziehen
- HCL-Alkohol 2 mal kurz durchziehen
- Bläuen für 6 min

17. Eindecken

- 70% Ethanol 2 min
- 96% Ethanol 2 min
- 100% Ethanol 2 min
- 100% Ethanol 2 min
- kurz durch erstes Xylokästchen ziehen
- Xylol 5 min
- Eindecken

7. Kriterien der Auswertung

7.1 Bedingungen

Es wurde an zwei verschiedenen Arbeitsplätzen ausgewertet (zwei Mikroskope, zwei unterschiedliche Rasterokulare). Zum einen an einem Olympus BX50-Mikroskop mit 10er Okular und 20er Objektiv sowie an einem Reichert-Jung Polyvar-Mikroskop mit einem 10er Okular und einem 25er Objektiv. An beiden Mikroskopen entsprach die Rasterfläche der Zähllokulare bei den angegebenen Vergrößerungen jeweils $0,5 \text{ mm} \times 0,5 \text{ mm} = 0,25 \text{ mm}^2$, so dass keine Umrechnung der Daten erforderlich war. Die Kantenlänge eines Rasterfeldes wurde dabei an beiden Mikroskopen mittels einer mikroskopischen Eichskala überprüft. Diese Fläche ($0,25 \text{ mm}^2$) wird im Folgenden als High-Power-Field (HPF) bezeichnet.

7.2 Ausgewertete Region

Folgende 25 Regionen des ZNS wurden histologisch untersucht und ausgewertet: frontaler Cortex (links und rechts), entorhinaler Cortex (links und rechts), Hippocampus CA 1 (links und rechts), Hippocampus CA 2-4 (links und rechts), Inselrinde (links und rechts), Ncl. caudatus (links und rechts), Ncl. lentiformis (links und rechts), Pons, Medulla oblongata, Kleinhirnoberwurm, Kleinhirnhemisphäre und Ncl. dentatus (links oder rechts), Rückenmark Höhe C5, Rückenmark Höhe Th5, Rückenmark Höhe L3, Rückenmark Höhe Th11, Thalamus (links und rechts) (vgl. Tab. 1).

Es wurden mindestens zehn HPFs ($2,5 \text{ mm}^2$) und mindestens 100 (Summe aus hypoxischen und unauffälligen) Neurone gezählt. Beide Kriterien mussten jeweils erfüllt sein.

Nur in Bereichen, in denen auf Grund anatomischer Verhältnisse die auszuwertenden Regionen kleiner als zehn HPFs waren bzw. weniger als 100 Neurone im Gewebe vorhanden waren wurde von dieser Vorgabe abgewichen (Ncl. dentatus, Vorderhörner aller Rückenmarksschnitte). In diesen Regionen wurden dann alle vorhandenen Neurone in der gesamten erfassten Region ausgewertet.

7.3 H&E

Um die topographische Zuordnung einer Region im Gewebeschnitt treffen zu können und um Neurone von Gliazellen unterscheiden zu können, wurde ich von einem Neuropathologen eingelernt. Das erste Kriterium für das Vorliegen eines Neurons war die Lokalisation in der grauen Substanz. Als Weiteres kam die typische Kernmorphologie (rund-ovaler Kern mit glatter Begrenzung und lockerem Kernchromatin mit abgrenzbarem Nukleolus) dazu. Zusätzlich musste das Zytoplasma, soweit abgrenzbar, leicht eosinophil erscheinen.

7.3.1 Infarkte

Als Infarkt wurden diejenigen Regionen gewertet, in denen eine panzelluläre Nekrose vorlag. In diesen Arealen war zumeist eine beginnende Makrophagenabräumreaktion zu erkennen sowie am Infarkttrand eine Proliferation von Blutgefäßen und eine beginnende reaktive Astrogliose [Kalimo et al. 2002/ Mennander et al. 2002] (vgl. Abb. 2 und Abb. 3). In den Infarktregionen war aufgrund des Zelluntergangs eine morphologische Zuordnung der zugrundegegangenen Zellen nicht mehr möglich, so dass hier keine Auszählung von Neuronen erfolgen konnte.

Bei Tieren die in einer der auszuwertenden Regionen einen Infarkt aufwiesen wurde daher wie folgt ausgewertet:

- bei Infarkten mit einer Größe von mindestens 10 HPF wurde ein kompletter Verlust der neuronalen Population zugrundegelegt. Um für die

statistische Auswertung einen Datensatz für diese Region zu erhalten (Gesamtzahl an Neuronen in der auszuwertenden Fläche; Anzahl an Gliazellen), wurde entweder das unmittelbar benachbarte nicht-nekrotische Gewebe ohne Zeichen einer Zellreaktion (keine Astrogliose) der jeweiligen Region oder die korrespondierende kontralaterale Region ausgezählt.

- bei Infarkten mit einer Größe von weniger als 10 HPF (z. B. Infarktgröße = 7 HPF) wurde ebenfalls für den nekrotischen Bereich ein kompletter Verlust an Neuronen zugrundegelegt. Für diese Fläche wurden die Daten in gleicher Weise erhoben wie oben erläutert.

Die Differenz in der Fläche zwischen Infarktgröße und Zielgröße der auszuwertenden Fläche von 10 HPF (im Beispiel 3 HPF) wurde in unmittelbarer Nachbarschaft des Infarkts ausgezählt und somit der Datensatz für diese Region vervollständigt.

7.3.2 Hypoxische Veränderung der Neurone

Typische morphologische hypoxiebedingte Veränderungen von Neuronen sind eine Kernschrumpfung mit Kondensierung des Kernchromatins (pyknotische Kerne) sowie Schrumpfung und vermehrte Eosinophilie des Zytoplasmas [Auer und Sutherland 2004]. Neurone mit pyknotischen Kernen wiesen auch bereits ein geschrumpftes, eosinophiles Zytoplasma auf. Andererseits können Neurone ein eosinophiles Zytoplasma aufweisen, obgleich die Kernmorphologie noch völlig intakt ist. Als Kriterien für hypoxische Veränderungen der Neurone gelten daher insbesondere pyknotische Kerne [Fessatidis et al. 1993].

In dieser Studie wurden daher nur Neurone mit pyknotischen Kernen als hypoxisch geschädigt gewertet (vgl. Abb. 4).

In einigen Tieren fanden sich in ein bis acht verschiedenen Regionen herdförmig Neurone mit intrazytoplasmatischen Verkalkungen (inkrustierte Neurone). War eine Zelle eosinophil gefärbt (verkalkt), aber kein Kern abgrenzbar, konnte sie nicht gewertet werden. Aufgrund der Inkrustation konnte bei diesen Neuronen die Kernmorphologie in der H&E-Färbung nicht beurteilt werden. Daher wurden diese Neurone -entsprechend unseren

Auswertekriterien- nicht als hypoxisch gewertet, obgleich eine Inkrustation von Neuronen durchaus als Folge einer Hypoxie auftreten kann [Ramonet et al. 2002/ Auer und Sutherland 2004/ Ellison et al. 2004].

7.3.3 Auswertung der einzelnen Bereiche

Zuerst wurde überprüft, ob in den eingebetteten Gewebeproben alle zu untersuchenden Regionen mit erfasst waren. War eine Region bei einem Tier nicht suffizient im Gewebeschnitt repräsentiert, so wurde hiervon erneut Gewebe eingebettet.

Dann wurde das Gewebe der einzelnen zu untersuchenden Regionen komplett auf hypoxische Veränderungen durchsucht und anschließend der Bereich einer Region für die exakte Auszählung ausgewählt, der am meisten hypoxische Neurone beinhaltete (hot-spot).

Für die Auszählung hypoxischer und unauffälliger Neurone wurden im frontalen Cortex, im entorhinalen Cortex und der Inselrinde jeweils die Rindenschichten II bis VI (Lamina granularis externa, Lamina pyramidalis externa, Lamina granularis interna, Lamina pyramidalis interna, Lamina multiformis), mittels benachbarter Felder mit dem Rasterokular ausgewertet. Dabei wurde beginnend bei Rindenschicht II senkrecht zur Hirnoberfläche markwärts gezählt, bei Erreichen der Rinden-Mark-Grenze dann seitwärts verschoben rindenwärts gezählt, bis insgesamt 10 HPFs erreicht waren. Es wurde darauf geachtet, dass alle Rindenschichten in gleicher Anzahl vertreten waren. Meist wurden 2,5-3 Raster pro Bahn, also 3-4 parallele Bahnen durch den Cortex ausgewertet und jeweils hypoxische Neurone, unauffällige Neurone und Gliazellen getrennt gezählt.

Bei der Auswertung des Pyramidenzellbandes des Hippocampus wurde zwischen dem besonders Hypoxie-empfindlichen Sektor CA1 (Sommer'scher Sektor) und den Sektoren CA2-4 unterschieden [Auer und Sutherland 2004/ Ellison et al. 2004]. Da zwischen dem Pyramidenzellband des Hippocampus und benachbarter weißer Substanz keine scharfe Trennung besteht, können hier einerseits am Randbereich lokalisierte Gliazellen nicht eindeutig der grauen oder weißen Substanz zugeordnet werden und andererseits keine exakte Angabe über die ausgewertete Fläche (Anzahl der HPFs) gemacht werden. Es

wurden hier folglich nur Neurone (hypoxische und unauffällige) gezählt, wobei das gesamte Pyramidenzellband ausgezählt wurde.

Im Nucleus lentiformis und Nucleus caudatus wurden jeweils 10 HPFs ausgezählt, wobei hypoxische Neurone, unauffällige Neurone und Gliazellen getrennt erfasst wurden. Alle bisher genannten Regionen wurden sowohl links als auch rechts getrennt untersucht und ausgezählt.

In Pons, Medulla oblongata und Thalamus wurden je 10 benachbarte HPFs ausgezählt.

Im Nucleus dentatus wurden, wenn möglich 10 HPFs, ansonsten die volle Größe des Nucleus dentatus gewertet. Dabei wurden hypoxische Neurone, unauffällige Neurone und Gliazellen getrennt gezählt.

Im Kleinhirnoberwurm und in der Kleinhirnrinde wurde das Stratum purkinjense ausgezählt, wobei hypoxische und unauffällige Neurone getrennt gewertet wurden, bis die Anzahl von 100 Neuronen erreicht war.

Im Rückenmark wurden nur die Vorderhörner ausgewertet. Dazu wurde aus mehreren aufeinander folgenden Schnittebenen pro ausgewähltem Segment der beste Schnitt gewählt. Bei der Auswertung wurden hypoxische Neurone, unauffällige Neurone und Gliazellen getrennt gezählt.

Die Regionen des Parietallappens, in denen makroskopisch Besonderheiten auffielen, wurden nicht hinsichtlich hypoxischer Nervenzellveränderungen ausgezählt, da sich nach unseren Kriterien im Parietallappen keine auszuwertende Region befand. Die hier erfassten Infarkte wurden jedoch dokumentiert und sind in die weitere Auswertung eingegangen.

Alle Präparate wurden auch von einem erfahrenen Neuropathologen hinsichtlich des ausgewählten hot-spots in den einzelnen Regionen sowie hinsichtlich des Vorliegens von Infarkten oder verkalkter Neurone durchgemustert. Stichprobenartig wurden wiederholt Präparate vom betreuenden Neuropathologen ausgezählt, der die bereits erhobenen Daten bestätigen konnte. Die mikroskopische Auswertung erfolgte ohne Kenntnis der Gruppenzuteilung der Tiere.

7.4 TUNEL

7.4.1 Regionen der Auswertung

Es wurde jeweils der gleiche Abschnitt einer Region zur Auswertung herangezogen, der auch in der H&E-Färbung ausgezählt wurde (hot-spot). Zusätzlich erfolgte eine Durchmusterung des gesamten Schnittpräparats auf TUNEL positive Zellen. Konnten an Stellen außerhalb der in der H&E-Färbung ausgewählten hot-spots TUNEL positive Zellen gefunden werden, wurde zum Vergleich erneut der H&E-Schnitt an der betreffenden Stelle durchmustert.

7.4.2 Kriterien TUNEL positiver Neurone

Als TUNEL positiv werden streng genommen Neurone mit kräftiger, gleichmäßig brauner Kernfärbung (Zytoplasma blande) und apoptotischer Kernmorphologie (abgeschnürter chromatinverdichteter Kern) gewertet.

Da in unseren Gewebeproben bereits histologisch (in der H&E-Färbung) kaum Neurone mit apoptotischer Morphologie zu identifizieren waren, sind für die Auswertung der TUNEL-Färbung hier auch Neurone ohne typisch apoptotische Morphologie als „TUNEL positiv“ gewertet worden, wenn sie eine kräftige, gleichmäßig braune Kernfärbung, und einen gegenüber dem Zytoplasma deutlich stärker gefärbten Kern aufwiesen (vgl. Abb. 5).

Neurone, bei denen nur das Zytoplasma braun gefärbt war, wurden nicht als TUNEL positiv gewertet [Blazey 2002].

8. Serumkonzentration von Epo

8.1 Zeitpunkte der Epo-Bestimmung

Der Epo-Spiegel im Blut wurde zu folgenden Zeitpunkten bestimmt:

1. Vor Beginn der Operation; 16 Stunden nach der ersten Injektion.
2. Direkt postoperativ; sieben Stunden nach Gabe der zweiten Injektion.
3. Am Morgen des ersten postoperativen Tages; 22 Stunden nach Gabe der zweiten Injektion.
4. Am Tag der Organentnahme; sieben Tage postoperativ.

Die korpuskulären Anteile des Blutes wurden bei 2637 G (3600 U/min) sieben Minuten lang abzentrifugiert und verworfen. Bis zur Auswertung wurden die Blutseren bei -25°C gelagert.

8.2 Methodik der Epo-Bestimmung

Zur quantitativen Bestimmung des Erythropoetins im Serum wurde ein Immunoassay (Nichols Advantage®) durchgeführt.

9. Statistik

Als Signifikanzniveau wurde ein Level von 5% gewählt.

9.1 Statistische Auswertung hypoxisch veränderter Neurone

Statistisch ausgewertet wurde der Quotient, der sich aus den ausgezählten hypoxischen Neuronen und der Summe aller gezählten Neurone (hypoxische und unauffällige Neurone summiert) der jeweiligen Region ergibt.

Da die gezählten Werte nicht normalverteilt waren, wurde vor der statistischen Auswertung der Zehner-Logarithmus der ermittelten Werte bestimmt.

Die gewerteten Regionen wurden in 13 Bereiche zusammengefasst:

1. Frontaler Cortex (rechts und links zusammengefasst)
2. Hippocampussegment CA1 (rechts und links zusammengefasst)
3. Hippocampussegment CA2-4 (rechts und links zusammengefasst)
4. Entorhinaler Cortex (rechts und links zusammengefasst)
5. Inselrinde (rechts und links zusammengefasst)
6. Nucleus caudatus (rechts und links zusammengefasst)
7. Nucleus lentiformis (rechts und links zusammengefasst)
8. Thalamus (rechts und links zusammengefasst)
9. Pons
10. Medulla oblongata
11. Kleinhirn (Hemisphäre und Kleinhirnoberwurm zusammengefasst)
12. Nucleus dentatus
13. Rückenmark (alle vier Segmente zusammengefasst)

9.2 Programm und Tests der statistischen Auswertung

Die statistischen Analysen erfolgten mittels Statistikprogramm JMP 3.16.

Für die statistische Evaluation des neurologischen Outcomes wurde die Summe der Punktwerte der einzelnen Kriterien (Bewusstsein, Appetenz, Motorik) aller Tiere aus der Epo-Gruppe und der Kontrollgruppe getrennt bestimmt und miteinander verglichen. Es erfolgte zusätzlich ein Vergleich der Summe der Gesamtneurologie zwischen den Gruppen. Zur statistischen Analyse wurde der Wilcoxon-Test angewandt.

Die Evaluation hypoxisch veränderter Neurone berücksichtigt die unter III. 9. 1 zusammengefassten Regionen.

Die Anzahl aller hypoxischen Neurone der pro Bereich zusammengefassten Regionen wurde summiert und durch die summierte Anzahl aller Neurone (hypoxische und unauffällige) dieser Regionen geteilt. Aus diesen Quotienten konnte der Unterschied zwischen den Gruppen mittels Wilcoxon-Test ermittelt werden.

Da die Werte der hypoxischen Veränderungen des gesamten ZNS große Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren zeigten, wurde als Überblick (Hypoxie des gesamten ZNS) der Median aller gezählten ZNS-Regionen eines Tieres ermittelt.

Innerhalb der beiden Gruppen wurde daraus der Median errechnet, der dann zum Vergleich der Gruppen herangezogen wurde.

Die Häufigkeit von histologisch gesicherten Infarkten in den beiden Gruppen wurde mit Hilfe des zweiseitigen Fischer Exakt Tests ausgewertet.

VI. Ergebnisse

1. Serum-Epo-Spiegel

Bei der Epo-Gruppe ergab die Erythropoetin-Bestimmung im Serum folgende Ergebnisse:

Die Werte der ersten Abnahme (16 Stunden nach Gabe der ersten Spritze) ergaben einen Mittelwert von 327,57 IE/l (im Bereich 172-512 IE/l, Anzahl n=7). Der Median lag bei 399 IE/l.

Die zweite Messung (sieben Stunden nach Gabe der zweiten Injektion) ergab einen Mittelwert von 5986,43 IE/l (3476-10250 IE/l, n=7). Der Median lag bei 5058 IE/l.

Bei der dritten Messung (22 Stunden nach Gabe der zweiten Spritze) zeigte sich ein Mittelwert von 1182 IE/l (525-1586 IE/l, n=7). Der Median lag bei 1353 IE/l.

Die vierte Abnahme (am Tag der Gehirnentnahme) ergab einen Mittelwert von 6,38 IE/l (3-11 IE/l, n=5). Der Median lag bei 7,3 IE/l.

In der Kontrollgruppe konnten folgende Ergebnisse evaluiert werden (die Abnahmezeitpunkte entsprechen denen der Epo- Gruppe):

Bei der ersten Abnahme ergab sich ein Mittelwert und Median von 3,15 IE/l (3 und 3,3 IE/l, n=2). Die Werte der zweiten Abnahme zeigten einen Mittelwert und Median von 3 IE/l (3 und 3 IE/l, n=2).

Die dritte Messung ergab den Wert 3,7 IE/l (n=1). Bei der vierten Messung konnte ein Mittelwert und Median von 4,95 IE/l (3 und 6,9 IE/l, n=2) ermittelt werden.

2. Überleben und neurologischer Status

2.1 Überleben

Das Überleben in der Epo- und in der Kontrollgruppe betrug jeweils 60%. Genauer aufgeschlüsselt ergab sich Folgendes:

Von den 16 ausgewerteten Tieren starben zwei bereits unmittelbar im Anschluss an die Operation (2 h 8 min und 2 h 43 min nach Stillstandsende).

Dabei handelte es sich um ein Epo-Tier und eines aus der Kontrollgruppe. Wiederum jeweils ein Tier aus jeder Gruppe starb am Abend des Operationstages (9 h und 10 h nach Stillstandsende). Ein weiteres Vergleichspaar starb im Tierstall (ca. 36 h und >20 h nach Stillstandsende). Zehn Tiere überlebten die gesamte Beobachtungszeit und wurden elektiv getötet.

Die übrigen Tiere konnten aus folgenden Gründen nicht in die Studie eingeschlossen werden:

Zur Etablierung der Methoden (Operation, Medikationsschema und nachfolgende postoperative Behandlung der Tiere) waren acht Tiere erforderlich.

Ein Tier verstarb bereits präoperativ, da eine Anomalie des Larynx die Intubation unmöglich machte.

Um die Schädigung der Neurone vergleichen zu können, mussten wir die Tiere, die vor der elektiven Tötung gestorben waren, zu Vergleichspaaren je eines Tieres aus der Epo-Gruppe und aus der Kontrollgruppe zusammenfügen. Das war nur dann möglich, wenn die Tiere annähernd zum gleichen Zeitpunkt nach Stillstandsende verstorben waren. Dies war lediglich bei den 16 ausgewerteten Tieren der Fall. Aus diesen Gründen konnten die verbliebenen neun Tiere nicht in die Studie eingeschlossen werden.

2.2 Neurologie

Es ist jeweils der Mittelwert der erreichten Punktzahl (0-9) und in Klammer der Bereich der ermittelten Werte (Minimum-Maximum) sowie die Anzahl der beobachteten Tiere n angegeben.

2.2.1 Gesamtpunktzahlen

Der maximal erreichbare Punktwert für ein Tier betrug 9.

In der Epo-Gruppe zeigte sich ein stetiger Anstieg der erreichten Punktwerte bis zum fünften postoperativen Tag. Dabei stieg sowohl die Gesamtpunktzahl als auch der minimale erreichte Punktwert stetig mit einem Mittelwert von 3 (0-6; n=5) am ersten postoperativen Tag, 5,4 (1-9; n=5) am zweiten, 5,8 (2-9; n=5) am dritten, 7,0 (4-9; n=5) am vierten und 7,4 (5-9; n=5) am fünften postoperativen Tag an. Am sechsten postoperativen Tag blieb der Mittelwert bei unverändertem Minimalwert gleich bei 7,4 (5-9; n=5).

In der Kontrollgruppe zeichnete sich ein stetiger Anstieg der Gesamtpunktzahlen bis zum sechsten postoperativen Tag ab. Beginnend mit einem Mittelwert von 2,4 (1-4; n=5) am ersten postoperativen Tag, ergab sich ein Mittelwert von 3,6 (3-5; n=5) am zweiten, 4 (3-5; n=5) am dritten, 5,4 (4-7; n=5) am vierten und 6 (5-8; n=5) am fünften postoperativen Tag. Am sechsten postoperativen Tag ergab die neurologische Beurteilung einen Mittelwert von 6,2 (4-8; n=5).

Die maximale Punktzahl von 9 konnte im Beobachtungszeitraum bei keinem Tier der Kontrollgruppe evaluiert werden.

Am ersten postoperativen Tag ergab sich ein p-Wert von 0,751. Am zweiten postoperativen Tag konnte ein p-Wert von 0,594 ermittelt werden. Am dritten postoperativen Tag ergab sich ein p-Wert von 0,597. Der p-Wert des vierten postoperativen Tages betrug 0,287. Am fünften postoperativen Tag konnte ein p-Wert von 0,238 ermittelt werden. Am sechsten postoperativen Tag ergab sich noch ein p-Wert von 0,338. Es konnte keine statistische Signifikanz erreicht werden.

Zur Übersicht der Verlaufskurven der einzelnen Tiere s. Diag. 1 und Diag. 2.

2.2.2 Bewusstsein, Appetenz und Motorik

Der maximal erreichbare Punktwert für ein Tier betrug 3.

2.2.2.1 Bewusstsein

In der Epo-Gruppe konnte bei der Beurteilung des Bewusstseins ein rascher Anstieg der Punktzahlen der Tiere im Gesamten bis zum fünften postoperativen Tag beobachtet werden. Auch der minimal erreichte Punktwert stieg im Beobachtungszeitraum an. Es ergab sich am ersten postoperativen Tag ein Mittelwert von 1,6 (0-3; n=5). Der Wert 2,2 (1-3; n=5) konnte am zweiten, 2,4 (1-3; n=5) am dritten, 2,8 (2-3; n=5) am vierten und fünften postoperativen Tag ermittelt werden. Am sechsten postoperativen Tag ergab sich keine Änderung zu den Werten des Vortages. Der Mittelwert lag weiterhin bei 2,8 (2-3; n=5).

Die Tiere der Kontrollgruppe stiegen mit einem Mittelwert von 2 (1-3; n=5) am ersten postoperativen Tag in die Beurteilung des Bewusstseins ein. Am zweiten und dritten postoperativen Tag ergab sich ein Mittelwert von 2,4 (2-3; n=5). Am vierten und fünften postoperativen Tag konnte ein Wert von 2,8 (2-3; n=5) verzeichnet werden, der sich auch am sechsten postoperativen Tag erneut evaluiert lies.

Der p-Wert des ersten postoperativen Tages betrug 0,574. Am zweiten postoperativen Tag konnte ein p-Wert von 0,909 ermittelt werden. Am dritten postoperativen Tag ergab sich ein p-Wert von 0,817. Am vierten, fünften und sechsten postoperativen Tag wurde ein p-Wert von 1,0 ermittelt. Auch hier konnte keine statistische Signifikanz erreicht werden.

Zur Übersicht der Verlaufskurven der einzelnen Tiere s. Diag. 3 und Diag. 4.

2.2.2.2 Appetenz

In der Epo-Gruppe konnte ein Anstieg der Gesamtpunktzahlen und der minimal erreichbaren Punktzahlen evaluiert werden. Beginnend mit einem Mittelwert von 0,6 (0-2; n=5) am ersten postoperativen Tag, ergab sich ein Wert von 1,6 (0-3; n=5) am zweiten, 1,8 (0-3; n=5) am dritten, 2,4 (1-3; n=5) am vierten und 2,4 (1-3; n=5) am fünften postoperativen Tag. Bei der Evaluation der Tiere am sechsten postoperativen Tag konnte erneut ein Mittelwert von 2,4 (1-3) (n=5) ermittelt werden.

Auch bei der Kontrollgruppe konnte ein Anstieg sowohl der Gesamtwerte als auch der minimal erreichbaren Punktzahlen evaluiert werden. Der erste postoperative Tag ergab dabei einen Mittelwert von 0,2 (0-1; n=5). An den weiteren Beobachtungstagen konnte ein Wert von 0,8 (0-1; n=5) am zweiten, 1,0 (0-2; n=5) am dritten und 2 (1-3; n=5) am vierten und am fünften postoperativen Tag ermittelt werden. Die Daten vom sechsten postoperativen Tag erbrachten einen Mittelwert von 2,2 (1-3; n=5).

Der p-Wert des ersten postoperativen Tages ergab 0,438. Am zweiten postoperativen Tag konnte ein p-Wert von 0,443 ermittelt werden. Am dritten postoperativen Tag ergab sich ein p-Wert von 0,276. Der p-Wert des vierten und fünften postoperativen Tages betrug 0,371. Am sechsten postoperativen Tag konnte noch ein p-Wert von 0,65 ermittelt werden. Wieder konnte keine statistische Signifikanz erreicht werden.

Zur Übersicht der Verlaufskurven der einzelnen Tiere s. Diag. 5 und Diag. 6.

2.2.2.3 Motorik

Bei der Epo-Gruppe konnte ein langsamer Anstieg der Gesamtpunktzahlen sowie der minimal erreichbaren Punktzahlen, beginnend mit einem Mittelwert von 0,8 (0-2; n=5) am ersten postoperativen Tag, beobachtet werden. Am zweiten und dritten postoperativen Tag ergab sich ein Wert von 1,6 (0-3; n=5), am vierten 1,8 (0-3; n=5) und am fünften postoperativen Tag 2,2 (1-3; n=5). Am sechsten postoperativen Tag wurde wiederholt ein Mittelwert von 2,2 (1-3; n=5) beobachtet.

In der Kontrollgruppe zeigte sich ebenfalls ein langsamer Anstieg der Gesamtpunktzahlen. Der minimal erreichbare Punktwert zeigte über den gesamten Beobachtungszeitraum keinen Anstieg. Der Mittelwert des ersten postoperativen Tages ergab 0,2 (0-1; n=5). Am zweiten Tag konnte ein Wert von 0,4 (0-2; n=5), gefolgt von 0,6 (0-2; n=5) am dritten und vierten und 1,2 (0-3; n=5) am fünften und sechsten postoperativen Tag ermittelt werden.

Der p-Wert des ersten postoperativen Tages ergab 0,366. Am zweiten postoperativen Tag konnte ein p-Wert von 0,154 ermittelt werden. Am dritten postoperativen Tage ergab sich ein p-Wert von 0,261. Der p-Wert des vierten postoperativen Tages betrug 0,127. Am fünften und sechsten postoperativen Tag konnte ein p-Wert von 0,188 ermittelt werden. Es konnte keine statistische Signifikanz erreicht werden.

Zur Übersicht der Verlaufskurven der einzelnen Tiere s. Diag. 7 und Diag. 8.

3. Organentnahme

Von 14 Tieren konnten Gehirn und Rückenmark entnommen werden.

3.1 Veränderungen des Körpergewichts im Verlauf der Beobachtungen

Am Operationstag betrug das Gewicht aller überlebenden Tiere im Durchschnitt 41,3 kg (36,0-43,0 kg; n=10). Am Tag der Organentnahme ergab sich ein mittleres Gewicht von 39,8 kg (30,0-47,0 kg; n=10).

Drei Tiere hatten im Beobachtungszeitraum im Schnitt 2,0 kg (1,0-3,0 kg) zugenommen. Vier Tiere hatten in diesem Zeitraum im Mittel 3,3 kg (1,0-6,0 kg) abgenommen.

Die beiden Gruppen getrennt betrachtet ergab sich am Operationstag in der Epo-Gruppe ein mittleres Körpergewicht von 40,4 kg (36,0-43,0 kg; n=5). Am Tag der Organentnahme wogen die Tiere im Schnitt 39,0 kg (30,0-44,0 kg; n=4).

Davon hatten zwei Tiere zugenommen (2,0 kg und 3,0 kg). Ein Tier hatte abgenommen (6,0 kg).

In der Kontrollgruppe ergab sich am Operationstag ein mittleres Gewicht von 42,2 kg (36,0-46,0 kg; n=5). Am Organentnahmetag betrug das Gewicht im Durchschnitt 40,5 kg (33,0-47,0 kg; n=4).

Im Beobachtungszeitraum hatte ein Tier zugenommen (1,0 kg), drei Tiere hatten abgenommen (1,0 kg und zwei Tiere je 3,0 kg).

IV. Ergebnisse

Bei den nicht näher erwähnten Tieren blieb das Gewicht im Beobachtungszeitraum konstant.

3.2 Gehirngewichte

In der Epo-Gruppe betrug das mittlere Gehirngewicht aller Tiere 91,37 g (82,8-102,1 g; n=7). Nur die Gehirne der überlebenden Tiere genommen, ergab sich ein mittleres Gehirngewicht von 88,2 g (82,8-98,1 g; n=5).

In der Kontrollgruppe ergab sich ein mittleres Gehirngewicht von 98,83 g (90,2-114,0 g; n=7). Das mittlere Gehirngewicht der überlebenden Tiere ergab einen Wert von 93,72 g (90,2-100,4 g; n=5).

4. Färbungen

4.1 H&E

4.1.1 Infarkte

Alle Infarkte waren in sogenannten Grenzstromgebieten lokalisiert und besaßen einen maximalen Durchmesser von 0,3 cm. Histologisch gesicherte Infarkte wurden nur bei Tieren gefunden, die den Beobachtungszeitraum überlebt hatten. Diese Gebiete zeigten ein histologisches Infarktalter (Infarktstadium II mit beginnender Abräumreaktion) entsprechend der postoperativen Überlebenszeit.

Am häufigsten traten Infarkte im frontalen Cortex auf (links n=7, rechts n=4). Weitere Regionen, die Infarkte aufwiesen, waren die Inselrinde (links n=2, rechts n=2), der Nucleus lentiformis (links n=1, rechts n=1) und der Parietallappen (n=2) (vgl. Tab. 1).

In der Epo-Gruppe fanden sich Infarkte nur bei zwei Tieren. Ein Tier hatte dabei vier Infarktgebiete (frontaler Cortex links und rechts, Inselrinde links und rechts). Das andere hatte zwei Infarkte (frontaler Cortex links und rechts).

Alle Tiere der Kontrollgruppe hatten Infarkte. Ein Tier hatte fünf Infarktgebiete (frontaler Cortex links und rechts, Inselrinde links und rechts, Parietallappen). Ein weiteres Tier hatte vier Infarkte (frontaler Cortex links, Nucleus lentiformis links und rechts, Parietallappen). Ein Tier hatte zwei Gebiete mit Infarkten (frontaler Cortex links und rechts). Zwei Tiere hatten je einen Infarkt (beide frontaler Cortex links).

Der p-Wert zwischen den Gruppen hinsichtlich der Häufigkeit von Infarkten betrug 0,166.

4.1.2 Hypoxische Veränderungen der Neurone

Der Unterschied zwischen hypoxischen und blanden Neuronen war in der H&E-Färbung gut darzustellen (vgl. Abb. 6 und Abb.7).

4.1.2.1 Hypoxische Veränderungen im gesamten ZNS der am Operationstag verstorbenen Tiere

Der Median bezogen auf die Hypoxie des gesamten ZNS betrug bei den Epo-Tieren (n=2) 0,064. Bei den Tieren der Kontrollgruppe (n=2) ergab sich ein Wert von 0,092.

4.1.2.2 Hypoxische Veränderungen im gesamten ZNS der überlebenden Tiere

Bei der Betrachtung der hypoxischen Neurone aller untersuchten ZNS-Regionen ergab sich in der Epo-Gruppe (n=5) ein Median von 0,053. In der Kontrollgruppe (n=5) konnte ein Median von 0,034 ermittelt werden.

4.1.2.3 Hypoxische Veränderungen der Neurone einzelner ZNS-Regionen der überlebenden Tiere

Es konnten zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten p-Werte für einzelne Regionen ermittelt werden.

Es soll nun eine Gegenüberstellung der Mediane von Epo-Gruppe (n=5) versus Kontrollgruppe (n=5) erfolgen:

Im frontalen Cortex ($p=0,597$), Hippocampussegment CA1 ($p=0,916$), Hippocampussegment CA2-4 ($p=0,916$), entorhinalen Cortex ($p\text{-Wert}=0,916$), Nucleus lentiformis ($p=0,597$), Nucleus caudatus ($p=0,577$), Medulla oblongata ($p=0,464$), Nucleus dentatus ($p=0,25$) und im Rückenmark ($p=0,753$) war der Median in der Kontrollgruppe höher als in der Epo-Gruppe.

In der Inselrinde ($p=0,601$), Pons ($p=0,675$), Kleinhirn ($p=0,402$) und im Thalamus ($p=0,464$) war der Median der Epo-Gruppe höher als der der Kontrollgruppe.

Zur Übersicht der Verteilung hypoxischer Neurone der einzelnen Regionen s. Diag. 9 und Diag. 10.

4.2 TUNEL-Färbung

Bei drei Tieren (eines aus der Epo-, zwei aus der Kontrollgruppe) konnten TUNEL positive Zellen detektiert werden.

Alle TUNEL positiven Zellen lagen außerhalb der in der H&E-Färbung zur Auswertung ausgewählten Bereiche (hot-spots) und entsprachen dort verkalkten (inkrustierten) Neuronen (vgl. Abb. 8).

Somit ergaben sich getrennte Stellen an denen hypoxische und TUNEL positive Neurone ausgezählt wurden, da verkalkte Neurone aufgrund der bereits beschriebenen Gründe (s. III. 7.3.2.) aus der Wertung für hypoxische Neurone ausgenommen waren.

Retrospektiv erfolgte keine Verlegung der gewerteten hot-spots in der H&E-Färbung, da diese primär gewählten hot-spots auch rückblickend die deutlichsten hypoxischen Veränderungen aufwiesen. Zudem zeigten die inkrustierten Neurone in immunhistochemischen Färbungen (die den Kalk nicht darstellen) meist eine unauffällige Kernmorphologie.

Das einzige Tier der Epo-Gruppe, bei dem TUNEL positive Zellen detektiert werden konnten, verstarb 9 Stunden nach Stillstandsende. Es konnten in der Inselrinde rechts 5, in der Pons 42 und in der Medulla oblongata 10 Zellen

gefunden werden, die sich in der TUNEL-Färbung anfärbten (TUNEL positiv), jedoch keine typische apoptotische Morphologie aufwiesen.

Ein Tier der Kontrollgruppe, das 2 Stunden und 8 Minuten nach Stillstandsende verstorben war, hatte in der Inselrinde links 26, in der Inselrinde rechts 12 und im Thalamus rechts 2 TUNEL positive Zellen ohne typische apoptotische Morphologie.

Ein weiteres Tier der Kontrollgruppe, das am siebten postoperativen Tag elektiv getötet wurde, wies im Thalamus rechts 4 TUNEL positive Zellen auf, die keine typische apoptotische Morphologie zeigten.

4.3 Aktivierte Caspase-3

In beiden Kontrollgeweben (Schweinethymus und humanes Lymphom) konnte mit allen drei verwendeten Primärantikörpern eine gute immunhistochemische Färbung (intensive Färbung apoptotischer Zellen bei minimaler Hintergrundreaktion) erreicht werden (vgl. Abb. 9 und Abb. 10).

An den porcinen Hirnschnitten ergab sich für alle drei verwendeten Antikörper nach mehrfacher Modifikation des Färbeprotokolls und an mehreren Gewebeproben eine unspezifische Färbung. Dabei zeigte sich eine im ZNS weit verbreitete Anfärbung von zahlreichen Neuronen, Oligodendrozyten, Astrozyten, Ependymzellen, Epithelien des Plexus choroideus und der Leptomeningen. Diese Zelltypen wurden insbesondere auch in histologisch völlig unauffälligen Geweben (keine hypoxischen Nervenzellen, keine Infarkte) massenhaft angefärbt, so dass diese Färbung nicht als spezifisch gewertet werden konnte.

Auch der Wechsel des Sekundärantikörpers sowie eine Präinkubation des Primärantikörpers mit Hirnhomogenat ergaben keine wesentliche Änderung im Färbeergebnis.

Die Negativkontrollen waren jeweils blande (zeigten keine Immunfärbung), so dass wir davon ausgehen konnten, dass die unspezifische Färbung auf Grund der Primärantikörper erfolgte.

IV. Ergebnisse

Durch Variieren der Vorbehandlung stellten wir fest, dass sich tendenziell ein besseres Resultat durch Behandlung der Schnitte mit Mikrowelle und Bovinem-Serum-Albumin erzielen lies.

V. Diskussion

Jährlich werden weltweit etwa eine Million herzchirurgische Eingriffe vorgenommen [Grünenfelder 2005]. 80% davon sind aortokoronare Bypassoperationen und bei 20% ist eine Eröffnung der Herzhöhlen bzw. der Aorta thoracalis notwendig.

Nach aortokoronaren Bypassoperationen in Kombination mit intrakardialen Eingriffen treten in bis zu 8,4% der Fälle schwere neurologische Alterationen auf [Wimmer-Greinecker et al. 2003].

Bei alleinigen aortokoronaren Bypassoperationen konnten bei 6,1% der Patienten neurologische Komplikationen aufgezeigt werden [Roach et al. 1996]. Intrakardiale Eingriffe, bei denen die Herzhöhlen eröffnet werden, sind in bis zu 15,8% der Fälle mit neurologischen Alterationen verbunden [Wolman et al. 1999].

Nach herzchirurgischen Eingriffen an Kindern konnten neu entstandene neurologische Veränderungen bei 6,25% der Patienten beobachtet werden [Trittenwein et al. 2003].

Viele herzchirurgische Eingriffe machen den Einsatz der HLM notwendig.

Durch Studien zur „Sicherheit“ der HLM [Svensson et al. 1993/ Kouchoukos et al. 2001] konnten die technischen Bedingungen der HLM besser an die Patienten angepasst werden [Kirkham 1998].

Trotz aller positiven Eigenschaften der HLM ist ihr Einsatz auch mit einem gewissen Risiko behaftet. So muss das Blut des Patienten auf Grund der koagulatorisch wirkenden Eigenschaften des Schlauchsystems der HLM für die Dauer der Operation durch systemische Applikation von Heparin ungerinnbar gemacht werden.

Ischämische Veränderungen können perioperativ durch Mikroembolien (Gas oder Thromben) hervorgerufen werden [Moody et al. 1990/ Utley 1996/ Abu-Omar et al. 2004/ Groom 2005].

Dies kann zu neurologischen Veränderungen führen, die sich in postoperativen neurologischen Komplikationen wie periventrikulärer Leukomalazie [Dent et al. 2005], Choreatetose [Ferry 1990], Krampfanfällen [Ferry 1990/ Clancy et al.

2005], Schlaganfällen [Ferry 1990], späterem Defizit in der Schule oder vermindertem Intelligenzquotienten (IQ) [Bellinger et al. 1999] manifestieren können.

Um die Auswirkung dieser Schäden zu erfassen, wurde in klinischen Studien das neurologische Outcome (postoperativer neurologischer Status des Patienten) evaluiert [Bellinger et al. 1991/ Wong et al. 1992/ Jonas et al. 1993/ Kurth et al. 1995/ Walsh et al. 1995/ Jonas 1996/ Lawton et al. 1998/ Bellinger et al. 1999/ Forbess et al. 2002].

Abgesehen von schweren neurologischen Ausfällen (z. B. Schlaganfälle), muss bezüglich der Quantifizierung perioperativ entstandener Schäden gesagt werden, dass es sich meist um diffizile Veränderungen handelt, die nur durch sensitive Methoden erfasst und beurteilt werden können.

Einen wichtigen Parameter stellen neurologische Tests (Intelligenz- und Entwicklungstests) dar. Dabei werden z. B. Kinder nach HCA und Kinder aus Kontrollgruppen miteinander verglichen [Newburger et al. 1993/ Sharma et al. 2000/ Wypij et al. 2003].

Um auch im heimischen Umfeld eine grob orientierende Evaluation der Patienten zu ermöglichen, werden Eltern beauftragt, auf jegliche Anzeichen eines Krampfanfalls zu achten [Sharma et al. 2000].

Weitere Messmethoden, die Aufschluss über das neurologische Outcome der Patienten geben sollen, sind elektroenzephalographische Ableitungen [Ferry 1990/ Newburger et al. 1993/ Mezrow et al. 1995/ Limperopoulos et al. 2001/ Luft et al. 2002], das Messen verschiedener, zu prognostischen Zwecken geeigneter Substanzen im Gehirn [Newburger et al. 1993/ Ashwal et al. 1996/ Schultz et al. 2004] sowie bildgebende Verfahren [Ferry 1990/ Ashwal et al. 1996/ Sharma et al. 2000/ Mahle et al. 2002].

Die histopathologische Aufarbeitung einzelner Gehirnregionen ist besonders im Hinblick auf Infarkte und hypoxische Schädigung einzelner Neurone sehr aufschlussreich [Glauser et al. 1990/ Moody et al. 1990/ Filgueiras et al. 1996/ Luft et al. 2002/ Aharon et al. 2004].

In jüngster Zeit wurden verschiedene Einsatzgebiete der HLM untersucht, deren Veränderung einen positiven Effekt auf das Outcome haben soll.

Besonders der HCA ist ein risikoreicher Bestandteil vieler Herzoperationen. Da er jedoch nicht in allen Operationen zu umgehen ist, konzentrieren sich zahlreiche Forschungsansätze darauf, den HCA sicherer zu gestalten.

Wong et al. fanden ein besseres Outcome bei Patienten, die mit milder Hypothermie behandelt wurden, als bei jenen, die in tiefer Hypothermie behandelt wurden [Wong et al. 1992].

Andere Arbeitsgruppen konnten eine Korrelation zwischen länger dauerndem HCA und schlechterem Outcome feststellen [Bellinger et al. 1999/ Pigula et al. 2000/ Wypij et al. 2003].

Weitere Arbeitsgruppen propagieren einen Vorteil der sogenannten Low-Flow Technik (LF), bei der der Kreislauf mittels einer minimalen Perfusion aufrecht erhalten bleibt, gegenüber der gängigen Methode des HCA [Newburger et al. 1993/ Bellinger et al. 1999/ Pigula et al. 2000].

Auch der neuroprotektive Effekt von Epo ist momentan Gegenstand der Forschung und wurde von vielen Arbeitsgruppen in vitro und in vivo bereits untersucht [Siren et al. 2001/ Ehrenreich et al. 2002/ Ruscher et al. 2002/ Li et al. 2004/ Spandou et al. 2005].

Ehrenreich et al. konnten eine Reduktion der Infarktgröße bei Patienten nach Schlaganfall zeigen, die in den ersten drei Tagen nach Schlaganfall Epo intravenös injiziert bekamen [Ehrenreich et al. 2002].

Einige Arbeitsgruppen untersuchen tierexperimentell den neuroprotektiven Effekt von Epo im perioperativen Bereich [Romsis et al. 2002/ Sekiguchi et al. 2003], wobei eine Reduktion der hypoxischen und apoptotischen Veränderungen durch Epo dargestellt werden konnte.

Unsere tierexperimentelle Studie beschäftigte sich mit dem neuroprotektiven Effekt von Epo in vivo. Dabei haben wir besonders die zusätzliche Präkonditionierung mit Epo bei elektiv operativen Eingriffen untersucht. Unsere Auswertkriterien waren das neurologische Outcome der Tiere sowie die histopathologischen Veränderungen von Gehirn und Rückenmark.

1. Erythropoetinspiegel im Serum

Voraussetzung für eine objektive Untersuchung war ein deutlicher Anstieg des Epo-Serumspiegels im Blut nach den einzelnen Epo-Injektionen.

Diese Voraussetzung konnte erfüllt werden. In der Epo-Gruppe zeigte sich bereits bei der ersten Messung (16 Stunden nach Gabe der ersten Spritze) ein deutlicher Anstieg des Epo-Spiegels, der bei der zweiten Messung (sieben Stunden nach Gabe der zweiten Spritze) ein Maximum erreichte und am Tag der elektiven Tötung der Versuchstiere nur noch etwas höher lag als in der Kontrollgruppe.

Man sieht den deutlichen Anstieg durch die Injektionen und das Angleichen an den normalen Serumspiegel im Beobachtungszeitraum, so dass nach sieben Tagen der Normalspiegel beinahe erreicht ist.

Romsi et al. konnten eine Erhöhung des Epo-Spiegels im Serum am Ende der Operation auf das 700fache darstellen. Dabei waren ihre Rahmenbedingungen den unsrigen sehr ähnlich, abgesehen von der Präkonditionierung am Vortag [Romsi et al. 2002].

Ihre Angabe liegt deutlich niedriger als unsere Messung, bei der sich ein 2000facher Anstieg nachweisen ließ. Man kann vermuten, dass die Präkonditionierung in unserer Studie ausschlaggebend für die wesentlich höhere Konzentration des Erythropoetins im Serum war.

2. Neurologisches Outcome

Der Effekt der Neuroprotektion kann am neurologischen Outcome der Patienten gemessen werden. Die Auswertung des neurologischen Status wird in Studien, die zur Verbesserung der HLM-Technik beitragen, allgemein als sehr aussagekräftig angesehen. Viele Arbeitsgruppen versuchen damit eine Quantifizierung neurologischer Veränderungen bei Patienten nach Herzoperationen zu ermöglichen [Newburger et al. 1993/ Oates et al. 1995/ Hovels-Gurich et al. 1997/ Sharma et al. 2000/ Wypij et al. 2003].

Auch in tierexperimentellen Studien ist eine neurologische Evaluation zur Erfassung der entstandenen Veränderungen möglich [Mezrow et al. 1995].

Bei unseren Tieren entschieden wir uns für die Beurteilung von drei grundlegenden Bereichen (Bewusstsein, Appetenz, Motorik), die summiert einen objektiven Eindruck der Gesamtneurologie darstellen.

Der Vergleich der Gesamtpunktzahlen (Summen der Punktwerte für die drei neurologischen Kriterien) ergab ein deutlich besseres Ergebnis für die Epo-Gruppe. Die Differenz der beiden Gruppen betrug dabei im Mittel 1,4 Punkte (0,6-1,8 Punkte).

Eine Restitutio ad integrum (Punktwert von 9) konnte bei drei der fünf (60%) überlebenden Tiere der Epo-Gruppe erreicht werden. In der Kontrollgruppe trat bei keinem Tier eine Restitutio ad integrum auf.

Ehrenreich et al. konnten in ihrer humanen Studie gleichartige Ergebnisse, die Signifikanz erreichten, darstellen. Die Patienten der Epo-Gruppe hatten signifikant weniger neurologische Alterationen als die Patienten der Kontrollgruppe [Ehrenreich et al. 2002].

Somit kann dieses Ergebnis als positiver Effekt der Epo-Gabe gewertet werden.

Bei der Beurteilung des Bewusstseins war in den ersten beiden Tagen ein besserer Punktwert in der Kontrollgruppe zu verzeichnen. Vom dritten Tag an waren keine Unterschiede zwischen den Epo-Tieren und denen der Kontrollgruppe zu evaluieren.

Die Tiere der Epo-Gruppe hatten direkt postoperativ größere Adaptationsprobleme. Ihre Fähigkeit zur Erholung war jedoch tendenziell etwas besser, so dass die Endergebnisse in beiden Gruppen gleich waren.

Bei der Beurteilung der Appetenz sind durchgängig dezent höhere Werte in der Epo-Gruppe zu verzeichnen.

Diese Beobachtung über eine bessere Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme der Epo-Gruppe kann durch die Entwicklung des Körpergewichts während des Beobachtungszeitraumes gestützt werden. Die Tiere der Epo-Gruppe haben im Durchschnitt 3,5% ihres Körpergewichtes verloren, während die Reduktion des Körpergewichtes bei der Kontrollgruppe 4,0% betrug.

Den deutlichsten Unterschied konnten wir bei der Beurteilung der Motorik feststellen. Dabei schnitt die Epo-Gruppe täglich um ca. 1 Punkt (0,6-1,2 Punkte) besser ab als die Kontrollgruppe.

Dies spricht für einen positiven Einfluss von Epo, da motorische Fähigkeiten ein sensitiver Marker für die Darstellung des Ausmaßes der neurologischen Schädigung sind.

In humanen Studien stellten Bellinger et al. und Wypij et al. in den Gruppen, die das schonendere Operationsverfahren erhalten hatten, unter anderem bessere motorische Funktionen fest [Bellinger et al. 1999/ Wypij et al. 2003].

Einschränkend muss man sagen, dass wir die besseren neurologischen Ergebnisse der Tiere aus der Epo-Gruppe nur auf unseren Beobachtungszeitraum von sechs Tagen beziehen können. In diesem Zeitraum konnten, wie oben erwähnt, bei den Tieren der Epo-Gruppe insgesamt gesehen bessere neurologische Leistungen evaluiert werden. Dies wurde besonders im Hinblick auf eine Restitutio ad integrum deutlich, die nur in der Epo-Gruppe zu verzeichnen war. Ob sich auch im Langzeiteffekt ein Unterschied bezüglich der neurologischen Fähigkeiten zwischen den Gruppen zeigt oder ob die Tiere der Kontrollgruppe (verzögert) ebenfalls eine Restitutio ad integrum erreichen würden, kann unsere Studie nicht beurteilen.

Bezüglich der Gehirngewichte ist zu erwähnen, dass die vier Tiere mit den schwersten Gehirnen gute neurologische Gesamtpunktzahlen erzielten. Dies betraf je zwei Tiere aus jeder Gruppe.

Ein weiteres Tier der Epo-Gruppe mit einem sehr leichten Gehirn weist ebenfalls maximal erreichbare Punktwerte auf, während ein Tier der Kontrollgruppe mit schwerem Gehirn nur eine mäßig gute neurologische Beurteilung erhielt. Somit kann keine eindeutige Korrelation zwischen Gehirngewicht und neurologischem Outcome dargestellt werden.

Auch zwischen Körpergewicht und Gehirngewicht konnte keine Korrelation evaluiert werden.

3. Histopathologische Veränderungen

Mittels der H&E-Färbung konnte kein signifikanter Vorteil hinsichtlich hypoxischer Nervenzellveränderungen oder dem Auftreten von Infarkten durch Epo dargestellt werden.

Richtungsweisend kann man aufzeigen, dass nur zwei der fünf Epo-Tiere Infarkte aufwiesen, während bei allen fünf Tieren der Kontrollgruppe Infarkte zu finden waren.

Roms et al. konnten dieses Ergebnis nicht in dieser Deutlichkeit darstellen. In ihrer Studie hatten vier der sechs überlebenden Tiere der Epo-Gruppe und fünf der sieben überlebenden Tiere der Kontrollgruppe Infarkte [Roms et al. 2002].

Dabei könnte man argumentieren, dass unsere Kontrolltiere aus methodischen Gründen (z. B. unzureichende intra- oder postoperative Sauerstoffversorgung, zu schnelle oder zu langsame Abkühlung oder Erwärmung der Tiere) alle Infarkte aufwiesen.

Als Gegenargument kann gesagt werden, dass unsere Studie verblindet ablief und somit kein bewusster Einfluss auf die Behandlung der Tiere entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit genommen werden konnte. Davon ausgehend müsste sich statistisch gesehen, trotz kleiner Fallzahlen, das Auftreten von „methodisch-bedingten“ Infarkten gleichermaßen auf beide Gruppen verteilen. Da sich jedoch eine derart deutliche Verlagerung in die Kontrollgruppe zeigt, kann man vermuten, dass die geringere Infarktrate der Epo-Gruppe der neuroprotektiven Wirkung von Epo zuzuschreiben ist.

Gestützt wird diese Vermutung durch die Ergebnisse von Namiuchi et al. Sie konnten in ihrer humanen Studie zeigen, dass bei hohen Epo-Serumspiegeln die Infarktareale bei Patienten mit Myocardinfarkt kleiner waren [Namiuchi et al. 2005].

Auch Ehrenreich et al. konnten bei ihren Patienten einen deutlich positiven Effekt von Epo aufzeigen. Bei den Schlaganfallpatienten der Epo-Gruppe konnte mittels MRT eine stärkere Reduktion der Infarktgröße dargestellt werden [Ehrenreich et al. 2002].

Als klinischer Hinweis für einen neuroprotektiven Effekt von Epo ergaben sich in unserer Studie ein besseres motorisches Outcome und höhere Punktwerte bei

der Appetenz in der Epo-Gruppe. Dies könnte auch durch die geringere Anzahl Infarkt-betroffener Tiere erklärt werden.

Erwähnenswert ist auch der Vergleich der neurologischen Gesamtbewertung mit dem Auftreten von Infarkten.

In der Epo-Gruppe konnten bei zwei Tieren Infarkte nachgewiesen werden. Bei diesen beiden Tieren konnte keine Restitutio ad integrum verzeichnet werden, während alle anderen Tiere dieser Gruppe, die keine Infarkte aufwiesen, eine Restitutio ad integrum erreichten. Ein bereits makroskopisch detektierbarer Infarkt im Parietallappen konnte bei keinem Tier der Epo-Gruppe nachgewiesen werden.

Übereinstimmend mit dem bisher gesagten kann man aufführen, dass alle Tiere der Kontrollgruppe Infarkte aufwiesen und kein Tier eine Gesamtpunktzahl von 9, entsprechend einer Restitutio ad integrum, erreichte. Bei zwei Tieren fanden sich bereits makroskopisch sichtbare Infarktgebiete im Parietallappen. Weiterhin unterstützend kann gesagt werden, dass das neurologisch am schlechtesten bewertete Tier die meisten Infarktgebiete aufwies. Jedoch wurden bei dem neurologisch am besten bewerteten Tier vier Infarktgebiete gefunden, während neurologisch schlechter bewertete Tiere deutlich weniger Infarkte (zwischen ein und zwei Infarktgebieten) aufwiesen. Das Auftreten der Infarktgebiete in den verschiedenen Hirnregionen gibt dafür keine hinreichende Erklärung.

Beim Vergleich der gesamten ZNS-Regionen konnte bei den am Operationstag verstorbenen Tieren (zwei Tiere aus jeder Gruppe) ein niedrigerer Median der gesamthypoxischen Veränderungen in der Epo-Gruppe als in der Kontrollgruppe evaluiert werden.

Betrachtet man die hypoxischen Veränderungen im gesamten ZNS der überlebenden Tiere, konnte in der Epo-Gruppe ein höheres Maß an Hypoxie festgestellt werden als in der Kontrollgruppe.

Bei der Auszählung hypoxisch veränderter Neurone in den einzelnen Regionen des ZNS konnte eine Tendenz zu besseren Ergebnissen in der Epo-Gruppe

ermittelt werden. Jedoch sind auch hier keine signifikanten Unterschiede darzustellen.

In der Epo-Gruppe ergeben sich in neun von 13 Regionen niedrigere Mediane als in der Kontrollgruppe.

Darunter sind auch die Regionen CA1 und CA2-4 des Hippocampus. Die Neurone der CA1-Region gelten als besonders sensibel für Hypoxie-bedingte Schädigung [Auer und Sutherland 2004]. Daher werden sie auch als Marker für Hypoxie im Gehirn angegeben [Calapai et al. 2000/ Catania et al. 2002]. Die Tiere der Epo-Gruppe weisen gerade in diesen sensiblen Neuronen tendenziell bessere Ergebnisse auf.

Auch in den Stammganglien weisen die Tiere der Epo-Gruppe geringere hypoxische Veränderungen auf. Dies ist ein weiterer Faktor, der die besseren motorischen Fähigkeiten der Epo-Gruppe erklären könnte.

In der Kontrollgruppe ist nur in vier von 13 Regionen ein niedrigerer Median der hypoxisch veränderten Neurone zu evaluieren.

Die Ergebnisse der TUNEL-Färbung erbrachten keine statistisch auswertbaren Daten, da die Fallzahl TUNEL positiver Tiere (ein Tier aus der Epo- und zwei Tiere aus der Kontrollgruppe) zu gering für eine statistische Auswertung war.

Interessant war, dass alle TUNEL positiven Neurone in der H&E-Färbung verkalkten Neuronen entsprachen. Somit lagen diese, entsprechend unseren Auswertungskriterien, nie in den zur histologischen Auszählung der geschädigten Neurone ausgewerteten Bereichen. Dass die verkalkten Neurone in immunhistochemischen Färbungen eine unauffällige Kernmorphologie zeigten (keine pyknotischen Kerne), bestätigt die von uns angesetzten Auswertkriterien.

Der Umkehrschluss konnte nicht verifiziert werden, d. h. nicht alle in der H&E-Färbung als verkalkt identifizierten Neurone waren auch TUNEL positiv. Diese Beobachtung bestätigt ebenfalls unsere Auswertungskriterien in denen insbesondere auf die Kernmorphologie als Merkmal für hypoxische Zellschädigung Wert gelegt wurde [Fessatidis et al. 1993/ Blazey 2002].

Obwohl die Kriterien um eine Zelle als „TUNEL positiv“ zu werten in unserer Studie relativ niedrig gesetzt wurden (TUNEL-Färbung auch ohne apoptotische

Kernmorphologie), sind insgesamt nur relativ wenige hypoxisch veränderte Neurone als TUNEL positiv gewertet worden.

So konnte bei den überlebenden Tieren lediglich im Thalamus eines Tieres der Kontrollgruppe vier TUNEL positive Zellen nachgewiesen werden.

Die geringe Menge TUNEL positiver Neurone ist jedoch nicht ganz unerwartet.

In vorhergehenden Studien wurde die maximale Anzahl TUNEL positiv gefärbter Neurone am Schweinehirn zwischen 24 und 72 Stunden postischämisch nachgewiesen [Qi et al. 2004/ Wang et al. 2005], während nach 5-7 Tagen die Anzahl apoptotischer Zellen bereits wieder stark abnahm [Martin et al. 1997].

Somit kann man postulieren, dass der beste Zeitpunkt zum Nachweis apoptotisch veränderter Neurone ein bis drei Tage nach Hypoxie/Ischämie zu finden ist. Dieses zeitliche Limit war in unserer Studie zugunsten der ausführlichen neurologischen Nachbeobachtung längst überschritten.

Die beiden am Operationstag verstorbenen Tiere, die TUNEL positive Neurone aufwiesen, unterstützen die Theorie des zu langen Abstandes zum Ischämie stimulus, wenn man annimmt, dass die beiden anderen Tiere, die am Operationsstag verstarben und keine TUNEL positiven Neurone aufwiesen, auch tatsächlich keine apoptotischen Neurone im Gehirn hatten.

Andere Arbeitsgruppen berichten hingegen nach derselben (langen) Beobachtungsdauer noch gute Ergebnisse mittels TUNEL-Färbung [Kurth et al. 1999/ Romsis et al. 2002].

Dabei ist jedoch anzumerken, dass Romsis et al. nur Infarktregionen auf TUNEL positive Neurone untersuchten [Romsis et al. 2002].

Diese Regionen wurden in unserer Studie von der Auswertung ausgenommen, da definitionsgemäß in einem Infarkt (also in einer ischämischen Nekrose) ganz überwiegend, wenn nicht sogar ausschließlich, nekrotischer Zelluntergang zu erwarten ist. Nur am Rande eines Infarktes wären apoptotische Veränderungen zu erwarten. Da die TUNEL-Färbung sowohl DNA-Strangbrüche in Folge von Nekrose als auch in Folge von Apoptose darstellt, haben wir auf eine Auswertung TUNEL positiver Zellen in Infarkten verzichtet (s. auch [Grasl-Kraupp et al. 1995]).

Andere Forschungsgruppen konnten nachweisen, dass mehr als ein Drittel der TUNEL positiv gefärbten Zellen nekrotische Veränderungen aufweisen. Dies zeigt deutlich, dass eine exakte Differenzierung in apoptotische und nekrotische Zellen, besonders in Infarktregionen, als extrem schwierig anzusehen ist [Blazey 2002].

Eine weitere Schwierigkeit, beim Versuch neuronale Zellen in Infarktregionen nachzuweisen, besteht darin, dass nekrotische Zellen morphologisch nicht mehr einem bestimmten Zelltyp (Nervenzelle, Gliazelle) zugeordnet werden können.

Roms et al. begründen ihre Auswahl der Infarktgebiete damit, dass sie die morphologisch typischen apoptotischen Kernveränderungen als Kriterium einschließen [Roms et al. 2002]. Diese Kriterien sind an Hand der von ihnen angefügten Bilder jedoch nicht eindeutig zu identifizieren.

Die Spezifität der Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 konnte an Thymusgewebe der Schweine gezeigt werden. Das Fehlschlagen des spezifischen Nachweises aktivierter Caspase-3 im ZNS-Gewebe der Versuchstiere kann nur durch eine unspezifische Kreuzreaktion aller drei verwendeten Primärantikörper erklärt werden. Das für diese Kreuzreaktion verantwortliche Molekül ist nicht bekannt, kommt aber im ZNS des Schweins weit verbreitet (ubiquitär) und in verschiedenen Zelltypen vor.

Diese Beobachtung deckt sich mit mündlich berichteten Erfahrungen in anderen Laboratorien, die ebenfalls über Probleme mit unspezifischen Immunreaktionen im Schweinegewebe berichten.

4. Schlussfolgerung

Zusammenfassend kann man sagen, dass wir keine signifikanten Unterschiede zwischen der Epo-Gruppe und der Kontrollgruppe evaluieren konnten, die eine Verbesserung des postoperativen neurologischen und histopathologischen Status durch Epo belegen.

Betrachtet man unsere Ergebnisse genauer, werden jedoch Tendenzen deutlich, die für einen neuroprotektiven Effekt von Epo, besonders im Hinblick auf das klinisch-neurologische Outcome und die geringere Anzahl an Infarkten, sprechen.

Durch Folgestudien mit größeren Fallzahlen könnte es möglich sein, unsere Vermutungen statistisch haltbar zu machen.

Zusätzliche Untersuchungen mehrerer Untergruppen, z. B. unterschiedlich lange Zeiten des HCA, verschiedene Gabezeitpunkte der Epo-Injektionen oder Gruppen mit unterschiedlich langer Überlebensdauer, könnten zu einer Präzision der Ergebnisse führen.

Diese Präzision der Ergebnisse wäre vor einem routinemäßigen Einsatz von Epo bei elektiv operativen Eingriffen im klinischen Alltag sinnvoll, da einer Kosten-Nutzen-Abwägung bei den entstehenden Therapiekosten (s. II. 1.2.2.3) ebenfalls Rechnung getragen werden muss.

VI. Zusammenfassung

1. Ziel

Herzchirurgische Operationen sind mit einem hohen Risiko an neurologischen Komplikationen behaftet. Zur Ermittlung perioperativ entstandener Hirnschäden nach Herzoperationen wird der postoperative neurologische Status (Outcome) der Patienten herangezogen.

Der neuroprotektive Effekt von Erythropoetin ist momentan Gegenstand der Forschung und wurde in vielen vorhergehenden Studien bereits nachgewiesen. Auch durch histologische Aufarbeitung der Gehirne herzchirurgisch versorgter Patienten kann eine Quantifizierung des Schadens erfolgen.

Unsere Studie untersuchte die neuroprotektive Wirkung von systemisch appliziertem Erythropoetin, besonders im Hinblick auf eine Präkonditionierung vor elektiv operativen Eingriffen, im hypothermen Kreislaufstillstand in vivo. Dazu evaluierten wir in einem Großtiermodell den neurologischen Status und histologische Veränderungen in Gehirn und Rückenmark.

2. Material und Methoden

16 Schweine wurden auf zwei Gruppen randomisiert und bekamen am Tag vor der Operation, am Operationstag und am Tag nach der Operation je 500 IE/kg KG rekombinantes humanes Erythropoetin oder physiologische Kochsalzlösung injiziert.

Am Operationstag wurden alle Tiere mit Hilfe der Herz-Lungen-Maschine abgekühlt und durchliefen einen einstündigen Kreislaufstillstand bei einer durchschnittlichen rektalen Temperatur von 22,35°C.

Die Tiere wurden postoperativ über einen Zeitraum von sechs Tagen an Hand einer Verhaltensskala neurologisch evaluiert.

Insgesamt 25 Regionen des ZNS wurden histologisch und teils auch immunhistochemisch hinsichtlich hypoxischer, apoptotischer und ischämischer Veränderungen untersucht.

3. Ergebnisse

Bei den Tieren der Epo-Gruppe erreichte die Erythropoetinkonzentration im Serum sieben Stunden nach Gabe der zweiten Injektion ihr Maximum. Dabei konnte ein Anstieg auf das 2000fache verzeichnet werden, der sich am Tag der Organentnahme weitgehend normalisiert hatte.

Bei der Kontrollgruppe konnte keine Änderung des Erythropoetinspiegels festgestellt werden.

Das Überleben betrug in beiden Gruppen je 60%.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der neurologischen Evaluation dargestellt werden. Auch die Auszählung der hypoxisch veränderten Neurone und Infarkte im ZNS ergab keine signifikanten Unterschiede.

Eine Restitutio ad integrum des neurologischen Status wurde nur in der Epo-Gruppe (bei 60% der Tiere) erreicht.

Infarkte waren bei 40% der Epo-Tiere nachweisbar, während 100% der Kontrolltiere Infarkte aufwiesen.

4. Schlussfolgerung

Die für den Versuch notwendige deutliche Erhöhung der Erythropoetin-Konzentration im Serum war in unserer Studie gegeben.

Unsere Ergebnisse weisen auf einen neuroprotektiven Effekt von Erythropoetin hin, obwohl wir keine signifikanten Unterschiede bezüglich neurologischem Outcome und histomorphologischen Veränderungen im ZNS zwischen den Gruppen evaluieren konnten.

Eine mögliche Ursache könnte die kleine Fallzahl darstellen.

Da unsere Studie tendenziell bessere Werte in der Epo-Gruppe erkennen lässt, wäre eine Weiterführung ähnlicher Versuche wünschenswert. Diese könnten durch größere Fallzahlen und mehrere verschiedene Untergruppen die Ergebnisse statistisch haltbar machen.

VII. Anhang

1. Rechtliche Grundlagen und Tierschutz

Die rechtliche Grundlage unseres Versuches bildet Abschnitt 5 des Tierschutzgesetzes (TierSchG). Dieser Abschnitt befasst sich mit den rechtlichen Vorgaben und Regelungen von Tierversuchen.

Nach § 7 Absatz 2 des TierSchG wird die Durchführung von Tierversuchen auf deren Unerlässlichkeit bei der Erzielung eines bestimmten Zwecks beschränkt.

Als Zwecke gelten:

- „1. Vorbeugung, Erkennen und Behandeln von Krankheiten, Leiden, Körperschäden oder körperlichen Beschwerden oder Erkennen oder Beeinflussen physiologischer Zustände oder Funktionen bei Mensch oder Tier,
2. Erkennen von Umweltgefährdungen,
3. Prüfung von Stoffen oder Produkten auf ihre Unbedenklichkeit für die Gesundheit von Mensch oder Tier oder auf ihre Wirksamkeit gegen tierische Schädlinge,
4. Grundlagenforschung.“

In unserer Studie kann als Zweck nach § 7 Absatz 2 TierSchG der erste und vierte Punkt angesehen werden.

Zudem dürfen Tierversuche nach § 7 Absatz 3 TierSchG nur dann durchgeführt werden, „wenn die zu erwartenden Schmerzen, Leiden oder Schäden der Versuchstiere im Hinblick auf den Versuchszweck ethisch vertretbar sind“.

Unsere Tiere wurden einer lateralen Thorakotomie unterzogen, die große postoperative Schmerzen nach sich zieht. Eine angemessene Analgesie bei starken Schmerzen dieser Art ist nur durch Opiate/Opioide zu erreichen. Da diese Pharmaka sowohl zentral als auch peripher wirken, wird das Bewusstsein -je nach gewähltem Pharmakon- beeinflusst, was in unserem Versuch unter Umständen zu einer Verfälschung des klinisch erhobenen neurologischen Status der Tiere hätte führen können. Andererseits hätte eine ungenügende postoperative Analgesie ebenso zu einer falschen klinischen Beurteilung geführt. Durch das vom Tierarzt vorgeschlagene und verwendete

Analgesieprotokoll (s. III. 2) wurde die Möglichkeit von Fehlinterpretationen der klinischen Befunde minimiert und eine adäquate Analgesie gewährleistet.

Die Genehmigung eines Tierversuches nach § 7 Absatz 2 TierSchG darf von der zuständigen Behörde nur dann erteilt werden, wenn durch den Antragssteller in schriftlicher Form wissenschaftlich dargelegt wurde, dass die oben genannten Bedingungen des § 7 Absatz 2 und 3 TierSchG erfüllt sind und „das angestrebte Versuchsergebnis trotz Ausschöpfung der zugänglichen Informationsmöglichkeiten nicht hinreichend bekannt ist oder die Überprüfung eines hinreichend bekannten Ergebnisses durch einen Doppel- oder Wiederholungsversuch unerlässlich ist.“

Zudem ist der Nachweis zu erbringen, dass sowohl der Leiter des Versuchsvorhabens als auch sein Stellvertreter die fachliche Eignung zur Durchführung von Tierversuchen nach § 9 Absatz 1 TierSchG (in unserer Studie beides Mediziner) besitzen.

Eine weitere Bedingung ist, dass Betreuung, medizinische Versorgung und artgerechte Unterbringung der Tiere gewährleistet sind.

Der Antrag auf Genehmigung eines Tierversuches nach § 8 TierSchG wird zuerst durch den Tierschutzbeauftragten der jeweiligen Institution geprüft. Nach dieser internen Prüfung wird der Antrag zusammen mit einer Stellungnahme des Tierschutzbeauftragten an das zuständige Regierungspräsidium weitergeleitet.

Unser Antrag wurde am 23.06.2003 unter der Kennnummer C5/03 vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt.

2. Abbildungen

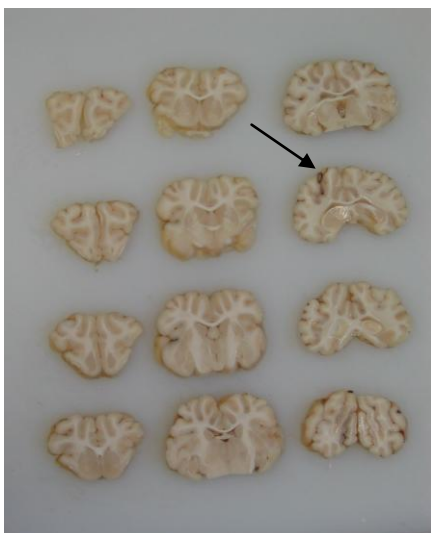


Abb.1: Makroskopische Aufarbeitung der Gehirne in coronaren Hirnscheiben. Nach Durchmusterung, Auswahl der histologisch auszuwertenden Regionen. Zu beachten ist der hämorrhagisch tingierte Stichkanal links postzentral (Pfeil).

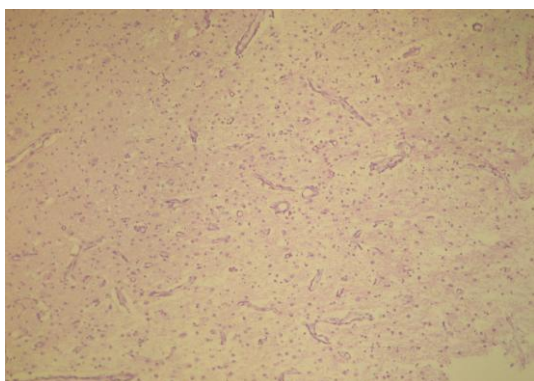


Abb. 2: Infarktregion (rechter Bildabschnitt) in der Inselrinde eines Kontrolltieres und angrenzendes reaktives ZNS-Gewebe (linker Bildabschnitt).
100fache Vergrößerung (H&E)

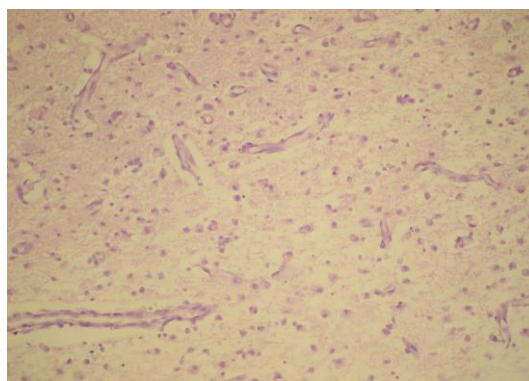


Abb. 3: Ausschnitt aus Abb. 2: Panzelluläre Nekrose mit beginnender Makrophagen-abräumreaktion (rechter Bildabschnitt), sowie Gefäßproliferation und beginnende reaktive Astroglie im angrenzenden reaktiven ZNS-Gewebe (linker Bildabschnitt).
200fache Vergrößerung (H&E)

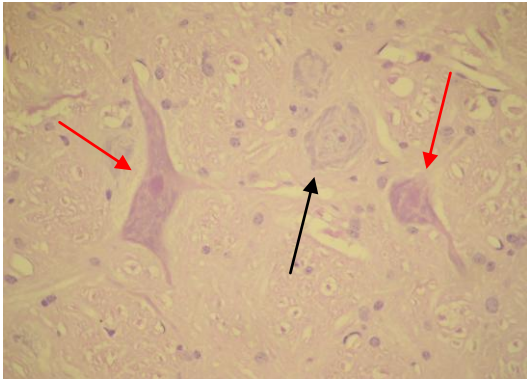


Abb. 4: Hypoxische Neurone (rote Pfeile) neben unauffälligem Neuron (schwarzer Pfeil) in der Medulla oblongata eines Kontrolltieres.
400fache Vergrößerung
(H&E)

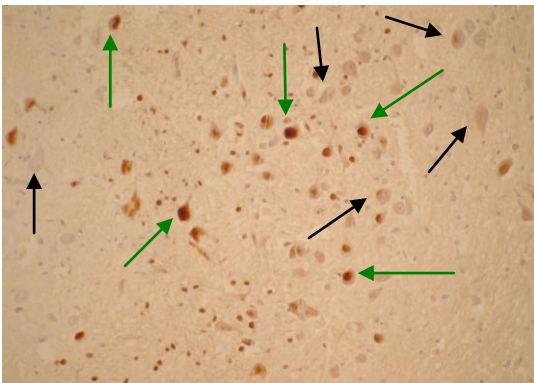


Abb. 5: TUNEL positive Neurone (grüne Pfeile) in der Pons eines Epo-Tieres. Daneben TUNEL negative Neurone (schwarze Pfeile).
200fache Vergrößerung
(TUNEL)

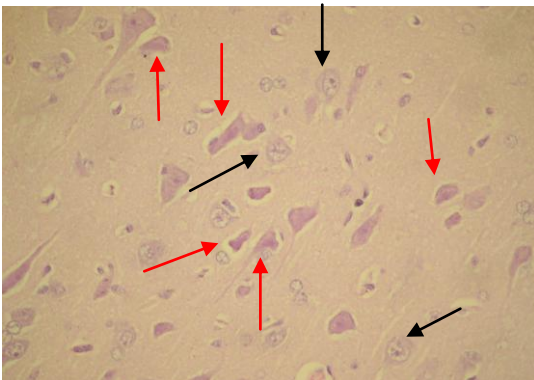


Abb. 6: Viele hypoxische Neurone (rote Pfeile) im frontalen Cortex eines Kontrolltieres. Dazwischen unauffällige Neurone (schwarze Pfeile).
400fache Vergrößerung
(H&E)

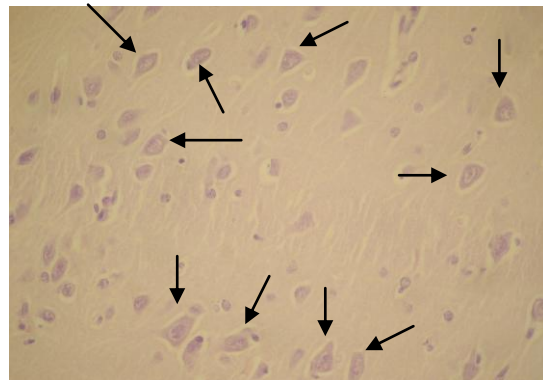


Abb. 7: Im Vergleich zu Abb. 6: unauffällige Neurone (Pfeile) mit leicht eosinophilem Zytoplasma aber erhaltener Kernmorphologie im frontalen Cortex eines Epo-Tieres.
400fache Vergrößerung
(H&E)

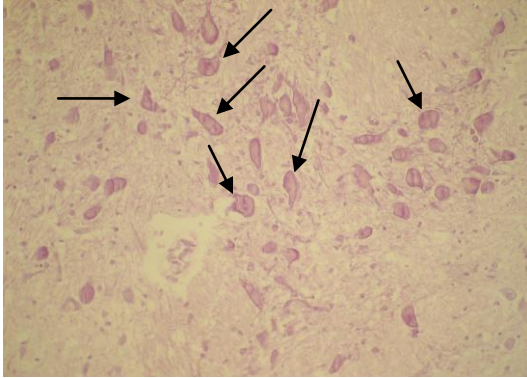


Abb. 8: Die TUNEL positiven Neurone aus Abb. 5 entsprechen in der hier dargestellten H&E-Färbung verkalkten Neuronen (Pfeile). 200fache Vergrößerung (H&E)

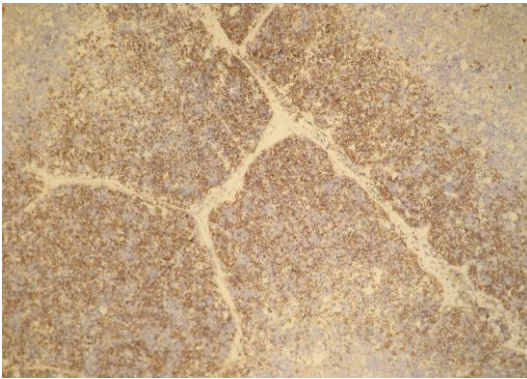


Abb. 9: Thymusgewebe eines Epo-Tieres. Immunhistochemische Färbung mit anti-aktivierter Caspase-3 (braunefärbte Zellen). 100fache Vergrößerung

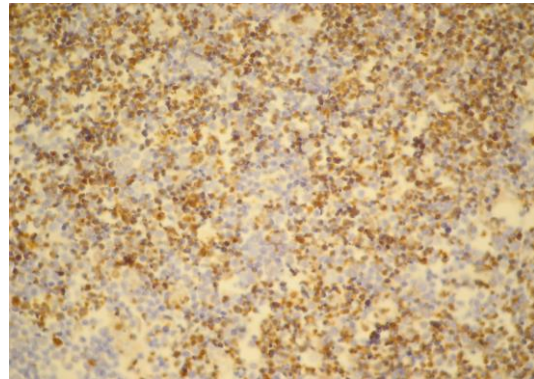
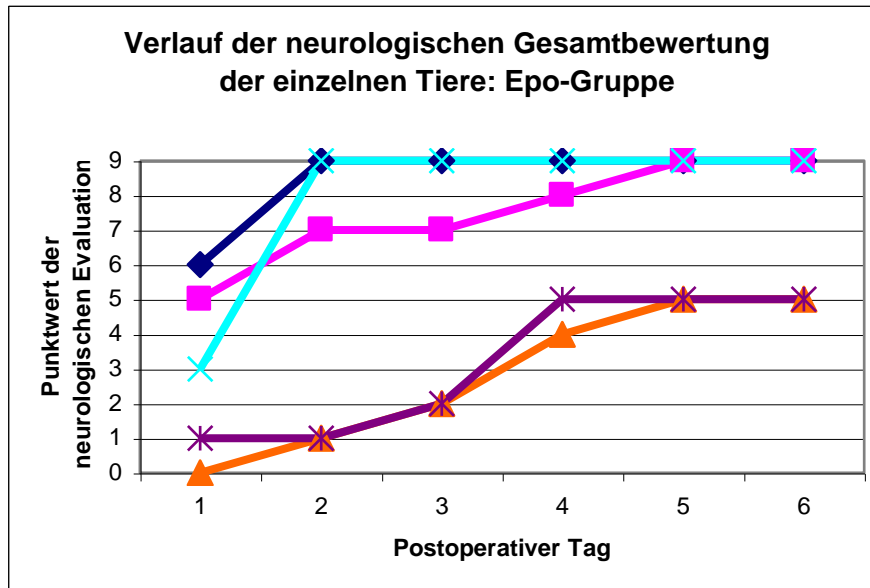


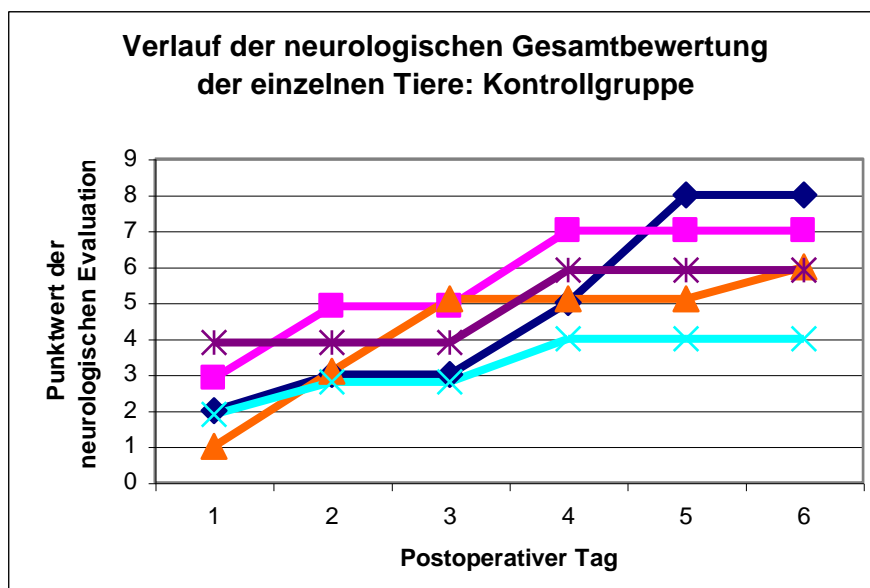
Abb. 10: Ausschnitt aus Abb. 9: Zahlreiche Zellen exprimieren aktivierte Caspase-3 (braunefärbte Zellen). 400fache Vergrößerung

3. Diagramme

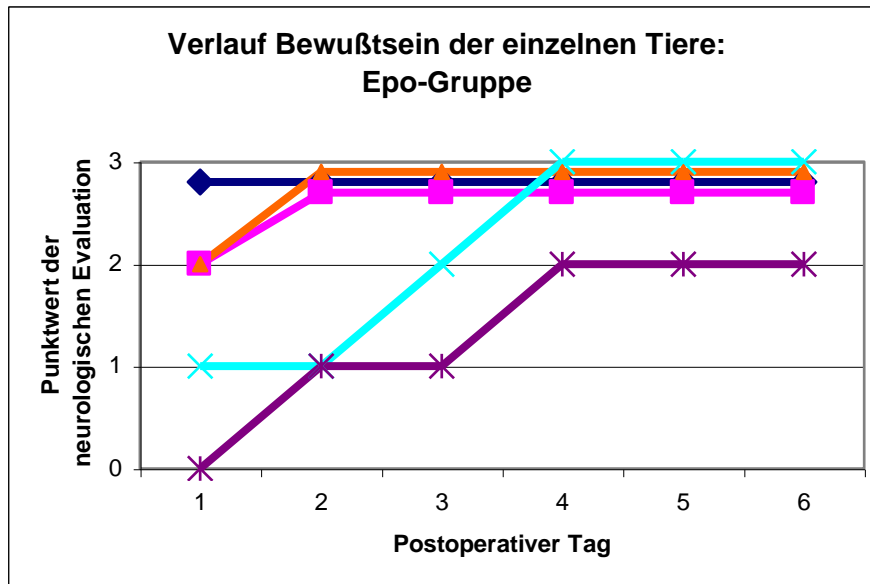
Diag. 1:



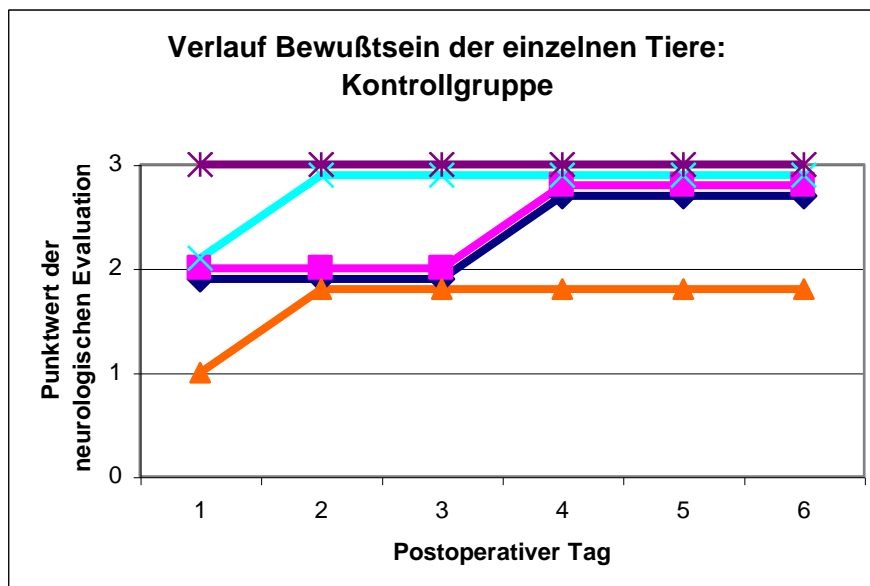
Diag. 2:



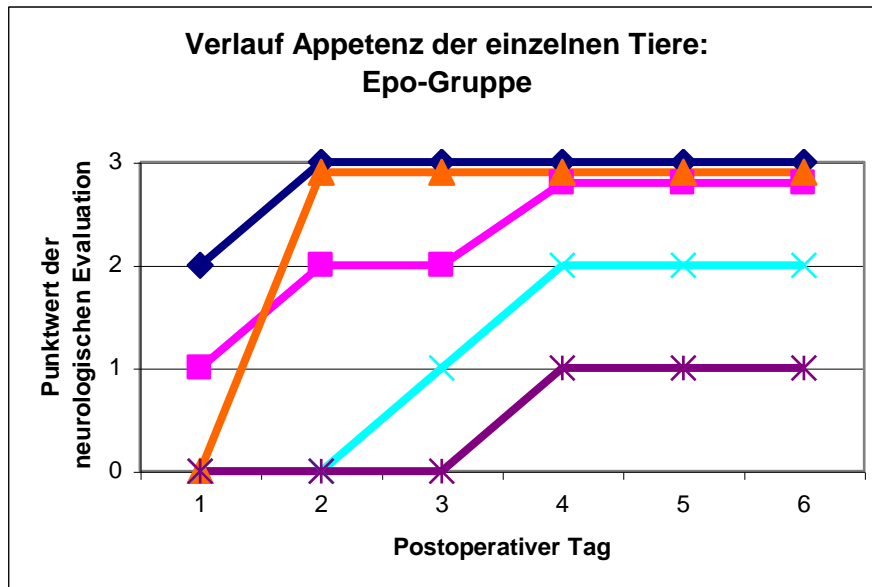
Diag. 3:



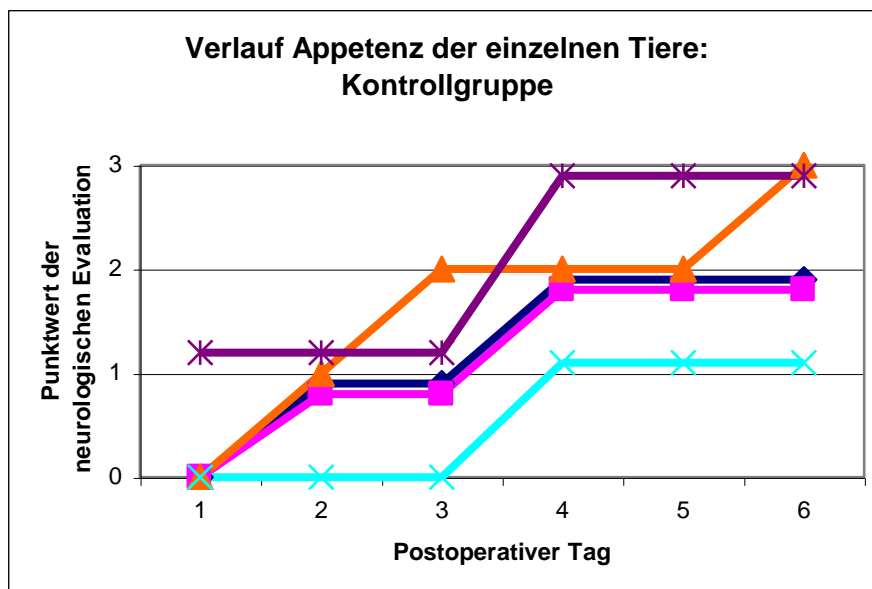
Diag. 4:



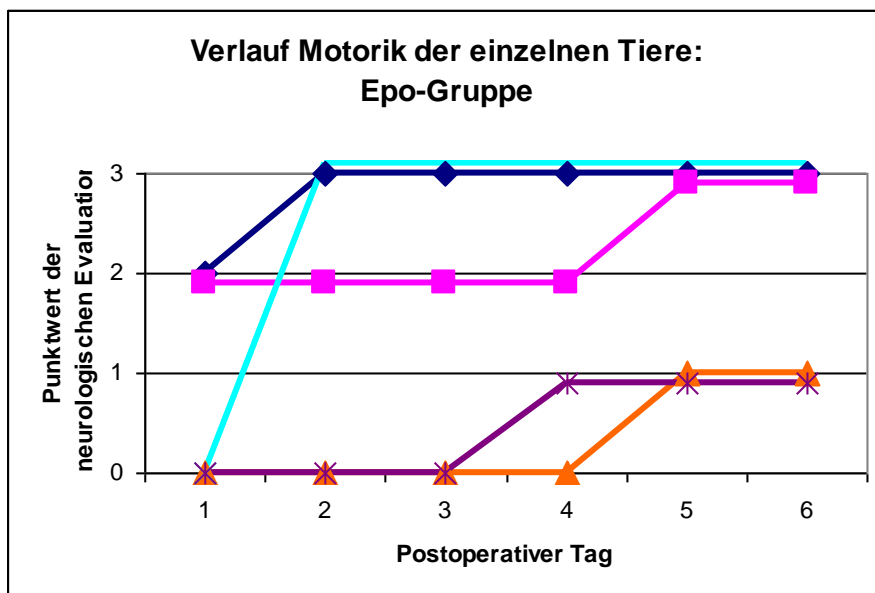
Diag. 5:



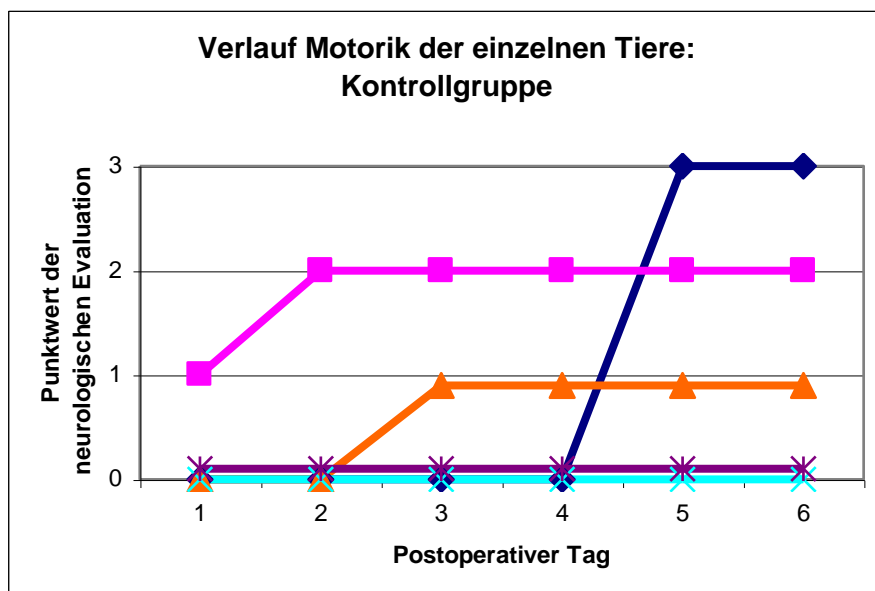
Diag 6:



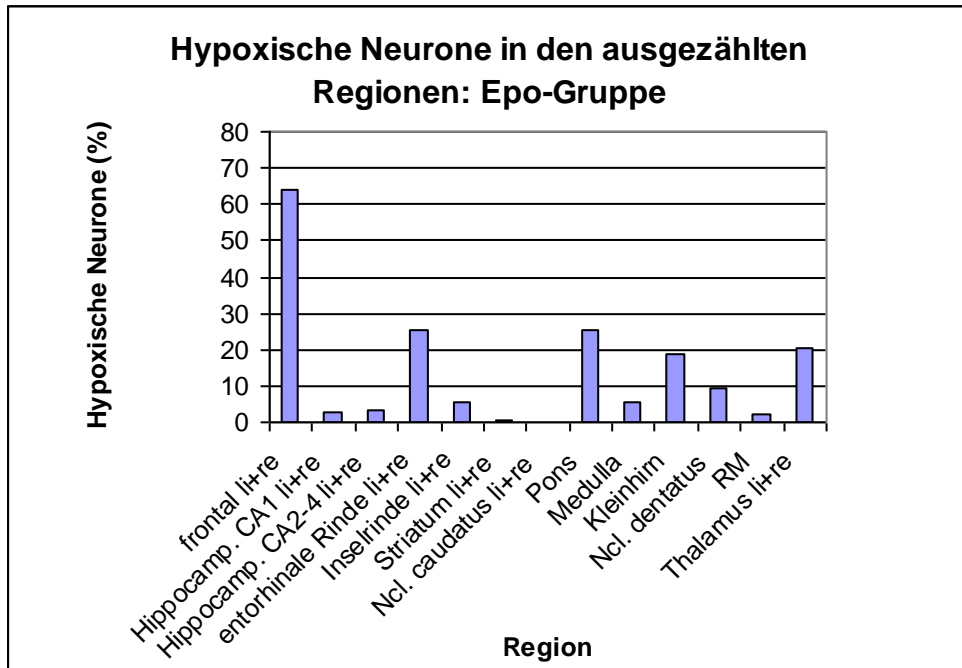
Diag. 7:



Diag. 8:

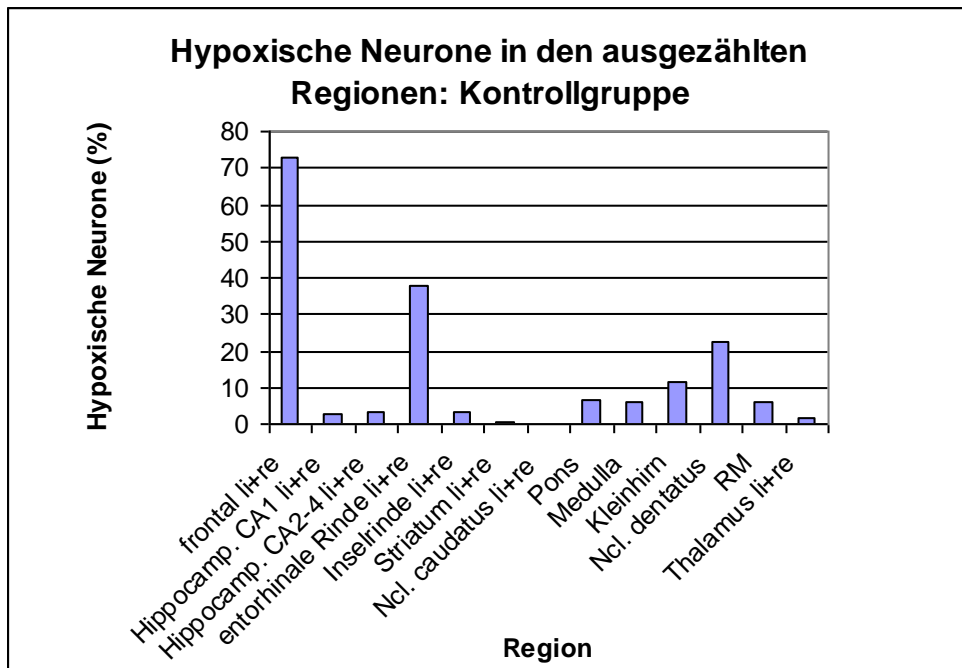


Diag. 9:



Die blauen Balken entsprechen den medianen Prozentsätzen aller Tiere der Gruppe (n=5).

Diag. 10:



Die blauen Balken entsprechen den medianen Prozentsätzen aller Tiere der Gruppe (n=5).

4. Tabellen

Tab. 1: Eingebettete ZNS-Regionen

Block	darin befindliche Regionen
1	Frontaler Cortex, Hippocampus CA1 und CA2-4, entorhinaler Cortex rechts
2	Frontaler Cortex, Hippocampus CA1 und CA2-4, entorhinaler Cortex links
3	Inselrinde, Nucleus caudatus und Nucleus lentiformis rechts
4	Inselrinde, Nucleus caudatus und Nucleus lentiformis links
5	Pons und Medulla oblongata
6	Kleinhirnoberwurm, Kleinhirnhemisphäre und Nucleus dentatus
7	Rückenmark (RM) cervical (Höhe C5)
8	Rückenmark thorakal (Höhe Th5)
9	Rückenmark lumbal (Höhe L3)
10	Rückenmark Th11 (Eintritt der Arteria radicularis magna (Adamkiewicz); diese Arterie tritt von links zwischen Th 8 und L2 in den Wirbelkanal ein [Lippert 2000])
11	Thalamus rechts und links
12	Besonderheiten (makroskopisch auffällige Gebiete im Parietallappen z. B. Infarktareale)

Tab. 2: Zusammensetzung benutzter Lösungen

PBS (Phosphate Buffered Saline); 0,1 M, pH 7,2	<ul style="list-style-type: none">- 10,9 g Na₂HPO₄- 3,2 g NaH₂PO₄- 90 g NaCl- 1000 ml Aqua dest. vor Gebrauch 1:10 verdünnen [Anonymus H 2005]
DAB	<ul style="list-style-type: none">- 96 mg DAB (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride dihydrate)- 150 ml Aqua dest.- 20 ml Substratpuffer (Zusammensetzung s. unten)- 66,6 µl H₂O₂ mit Aqua dest. auf 200 ml auffüllen, filtrieren und im Dunkeln aufbewahren
Substratpuffer	<ul style="list-style-type: none">- 21 g Zitronensäure Monohydrat- 34 g Imidazole- 29,2 g NaCl in 300 ml Aqua dest. lösen wenn ein pH von 7,0 erreicht ist, mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen

Tab. 3: Futter, Medikamente und Geräte

Erythropoetin	NeoRecormon® (Epoetin b) von Roche
Arterielle Kanüle	18 Fr. Kanüle von Jostra
Venöse Kanüle	Two-stage 28/32 Fr. Kanüle von Jostra
Schweinemastmehl	WLZ
Fentanyl	Fentanyl-ratiopharm® von Ratiopharm
Midazolam	Dormicum® von Hoffmann-La Roche
Buprenorphin	Temgesic® von Essex
Carprofen	Rimadyl® von Pfizer
Penicillin- Streptomycin- Kombination	Veracin compositum® von A. Albrecht GmbH&Co. KG, Aulendorf
Atropin	Atropinsulfat® 0,5 mg von B Braun Melsungen AG
Azaperon	Stresnil® von Janssen-Cilag GmbH Neuss
Diazepam	Diazepam®-Lipuro von B Braun Melsungen AG
Ketamin	Ketanest S® von Parke-Davis GmbH Berlin
peripher-venöse Kanüle	Abbotcath®-T Venisystems TM Abbot Ireland
Fixomull® stretch	BSN medical GmbH&Co. KG Hamburg
Leukoplast®	BSN medical GmbH&Co. KG Hamburg
Multi-Adapter für s-Monovette®	Sarstedt Aktiengesellschaft&Co. Nübrecht
s-Monovette®	Sarstedt Aktiengesellschaft& Co. Nübrecht
Propofol 1%	MCT Fresenius Kabi Deutschland GmbH
Tracheal-Tubus	Lo-Contour TM Magill Mallinckrodt Medical Athlone Ireland
Isofluran	Forene® von Abbott GmbH&Co. KG Wiesbaden
Beatmungsgerät	Sulla 800V Drägerwerk AG Lübeck
Operationstisch	Schmitz Wiekede-Ruhr
Heparin	Liquemin® von Roche
NaCl	Isotonische NaCl 10 l Fresenius Kabi Deutschland GmbH
Formalin	4% Formaldehydlösung von Otto Fischer GmbH&Co. KG Saarbrücken

VII. Anhang

Einmalskalpelle	Cutfix® surgical disposable scalpel von B Braun Aesculap Aesculap AG&Co. KG
Premilene®	B Braun Aesculap Aesculap AG&Co. KG
Silkam®	B Braun Aesculap Aesculap AG&Co. KG
Vicryl Ethicon®	Johnson-Johnson Intl.
Perfusionsset (mit Konnektoren selbst zusammengebaut):	
Saugerschlauch	88 cm Hartgummischlauch (HGS; Stärke: 3/8), 53 cm Silikon, 220 cm HGS
arterieller Schlauch	9 cm Stück einer arteriellen Kanüle (zur Konnektion der Ventkanüle), 254 cm HGS, 48 cm Silikon, 187 cm HGS
venöser Schlauch	240 cm HGS
arterielle Kanüle	14 Fr. Ventkanüle von Jostra
venöse Kanüle	one-stage 30 Fr. (HKV 47L) Kanüle von Jostra
2 einzelne Rollerpumpen	Cardiovascular equipment Sarns inc (Ann Arbor Michigan), Code 6013, 1. Seriennummer: 2729, Id: 16012 2. Seriennummer: 2730, Id: 13160
Knochensäge	Aesculap Oszillant, Typ G-6100-05
Plastikdose	Tupperware®
Einbettkassetten	Histosette® von Simport
Entwässerungs- maschine	Shandon GmbH Frankfurt am Main
Einbettgerät	von Leica, Modell Histoembedder
Paraffin	Histowax von HistoLab
Gefrierschrank	Privileg
Mikrotom	Microm HM 355s
Microtome blades	MB 35 Premier 35°/80 mm
Wärmebad	Bavimed
Wärmeschrank	Memmert
Objektträger	R. Langenbrinck
Einschlussmittel	HICO-MIC Mikroskopier-Einschlussmittel von Hirtz&Co. Köln

Deckgläser	IDL (Interessensgemeinschaft der Laborfachhändler GmbH&Co. KG)
Mikroskop 1	Reichert-Jung-Polyvar
Objektiv 1	25er Vergrößerung von Reichert-Jung
Mikroskop 2	Olympus BX 50
Objektiv 2	20ger Vergrößerung von Olympus
2 Rasterokulare	von Olympus und Zeiss
Mikroskopische Eichskala	Firma Zeiss, Jena, Deutschland
Zählgerät	Counter AC-8

Tab. 4: Reagentien und Antikörper

Alkohol	99,9% Ethanol aus Uni-Apotheke, der mit Aqua dest. auf gewünschte Konzentration verdünnt werden kann
Xylol	Isomergemisch von Fluka Chemie GmbH Ch-Buchs
Chloroform	von VWR Merck
Hämalaun	von VWR Merck
Erythrosin	Erythrosin-Pulver von Chroma, wird mit Aqua dest. auf 0,1% Lösung verdünnt; dann 0,1 ml Eisessig mit 100 ml Erythrosinlösung gegeben
Eisessig	VWR Merck
HCl-Alkohol	HCL von VWR Merck (100 ml 25% HCL auf 10 l 70% Ethanol)
Luxol fast blue	Serva
0,01% Natronlauge	VWR Merck
Kresylviolett	Certistain® von VWR Merck
TUNEL-Kit	Roche In Situ Cell Detection Kit, POD
Proteinase K	Sigma
Tris-HCl-Puffer	Carl Roth®
Na ₂ HPO ₄	VWR Merck
NaCl	Fluka Chemie GmbH Ch-Buchs
DNase	Sigma

VII. Anhang

BSA	VWR Merck
Schweineserum	C. C. Pro GmbH
DAB	Fluka Chemie GmbH Ch-Buchs
Zitronensäure Monohydrat	Carl Roth®
Imidazole	Fluka Chemie GmbH Ch-Buchs
H ₂ O ₂	VWR Merck
Antikörper der Caspase-Färbung:	
Primärantikörper	<ol style="list-style-type: none">1. Monoklonaler Hasen-Antikörper von Cell Signalling2. Polyklonaler Hasen-Antikörper von Cell Signalling3. Polyklonaler Hasen-Antikörper von R&D Systems
Sekundärantikörper	<ol style="list-style-type: none">1. Monoklonaler Anti-Hasen-Antikörper von Sigma2. Anti-Hasen-Antikörper (IgG) von Cell Signalling

VIII. Literaturverzeichnis

Abu-Omar, Y., A. Cifelli, P.M. Matthews und D.P. Taggart (2004). „The role of microembolisation in cerebral injury as defined by functional magnetic resonance imaging.“ Eur J Cardiothorac Surg **26**(3): 586-91.

Aharon, A.S., M.R. Mulloy, D.C. Drinkwater, Jr., O.B. Lao, M.D. Johnson, M. Thunder, C. Yu und P. Chang (2004). „Cerebral activation of mitogen-activated protein kinases after circulatory arrest and low flow cardiopulmonary bypass.“ Eur J Cardiothorac Surg **26**(5): 912-9.

Anonymus A (nach 1997) www.bioscience.org/news/scientis/caspase.htm gelesen am 6.6.2005.

Anonymus B (2004) www.ub.uni-konstanz.de/kops/volltexte/2004/1299/ gelesen am 6.6.2005.

Anonymus C (nach 1990)
www.ukammann.de/apoptose/Apoptose_historisch/apoptose_historisch.html
gelesen am 2.6.2005.

Anonymus D (vor 2005) www.biologie.de/Skripte/referate/html/apoptose.htm gelesen am 18.7.2005.

Anonymus E (2004) www.roche-applied-science.com/sis/apoptosis gelesen am 15.7.2005.

Anonymus F (2004) „Instructional manual“ des „In Situ Cell Death Detection Kit, POD“ von Roche: S. 5.

Anonymus G (2004) aus Roche_Cell Death&Apoptosis_Brochure.pdf: S. 14.

Anonymus H (2005) www.ihcworld.com/protocols/washing_buffers/pbs.htm gelesen am 1.6.2005.

Ashwal, S., B.A. Holshouser, D.B. Hinshaw, Jr., R.M. Schell und L. Bailey (1996). „Proton magnetic resonance spectroscopy in the evaluation of children with congenital heart disease and acute central nervous system injury.“ J Thorac Cardiovasc Surg **112**(2): 403-14.

Auer, R.N. und G.R. Sutherland „Hypoxia and related conditions“ in Graham D.I. und P. Lantos (Hrsg.) „Greenfields Neuropathology“, 7. Auflage; Arnold, London 2004: 233-281.

Banks, W.A. (2004). „Are the extracellular [correction of extracellular] pathways a conduit for the delivery of therapeutics to the brain?“ Curr Pharm Des **10**(12): 1365-70.

Banks, W.A., N.L. Jumbe, C.L. Farrell, M.L. Niehoff und A.C. Heatherington (2004). „Passage of erythropoietic agents across the blood-brain barrier: a comparison of human and murine erythropoietin and the analog darbepoetin alfa.“ Eur J Pharmacol **505**(1-3): 93-101.

Belayev, L., L. Khoutorova, W. Zhao, A. Vigdorchik, A. Belayev, R. Busto, E. Magal und M.D. Ginsberg (2005). „Neuroprotective effect of darbepoetin alfa, a novel recombinant erythropoietic protein, in focal cerebral ischemia in rats.“ Stroke **36**(5): 1071-6.

Bellinger, D.C., G. Wernovsky, L.A. Rappaport, J.E. Mayer, A.R. Castaneda, D.M. Farrel, D.L. Wessel, P. Lang, P.R. Hickey, R.A. Jonas und J.W. Newberger (1991). „Cognitive development of children following early repair of transposition of the great arteries using deep hypothermic circulatory arrest.“ Pediatrics **87**(5): 701-7.

Bellinger, D.C., D. Wypij, K.C.K. Kuban, L.A. Rappaport, P.R. Hickey, G. Wernovsky, R.A. Jonas und J.W. Newberger (1999). „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**(5): 526-32.

Blazey, B.A. (2002). „Darstellung apoptotischer und nekrotischer Rattenhepatozyten im Gewebeschnitt nach verschiedenen Fixierungsverfahren und mittels unterschiedlicher Nachweismethoden.“ Med. Dissertation, Universität Gießen.

Bourges, J.L., F. Valamanesh, A. Torriglia, J.C. Jeanny, M. Savoldelli, G. Renard, D. BenEzra, Y. de Kozak und F. Behar-Cohen (2004). „Cornea graft endothelial cells undergo apoptosis by way of an alternate (caspase-independent) pathway.“ Transplantation **78**(3): 316-23.

Brines, M.L., P. Ghezzi, S. Keenan, D. Agnello, N.C. de Lanerolle, C. Cerami, L.M. Itri und A. Cerami (2000). „Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury.“ Proc Natl Acad Sci U S A **97**(19): 10526-31.

Calapai, G., M.C. Marciano, F. Corica, A. Allegra, A. Parisi, N. Frisina, A.P. Caputi und M. Buemi (2000). „Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation.“ Eur J Pharmacol **401**(3): 349-56.

Catania, M.A., M.C. Marciano, A. Parisi, A. Sturiale, M. Buemi, G. Grasso, F. Squadrito, A.P. Caputi und G. Calapai (2002). „Erythropoietin prevents cognition impairment induced by transient brain ischemia in gerbils.“ Eur J Pharmacol **437**(3): 147-50.

Cerami, A. (2001). „Beyond erythropoiesis: novel applications for recombinant human erythropoietin.“ Semin Hematol **38**(Suppl 7): 33-39.

Clancy, R.R., U. Sharif, R. Ichord, T.L. Spray, S. Nicolson, S. Tabbutt, G. Wernovsky und J.W. Gaynor (2005). „Electrographic neonatal seizures after infant heart surgery.” Epilepsia **46**(1): 84-90.

Czuk, C. (2003) www.koeln.netsurf.de/~bernd.asselborn/forum/adrien.htm
gelesen am 24.6.2005.

Davis, L.E., J.A. Widness und R.A. Brace (2003). „Renal and placental secretion of erythropoietin during anemia or hypoxia in the ovine fetus.” Am J Obstet Gynecol **189**(6): 1764-70.

Demers, E.J., R.J. McPherson und S.E. Juul (2005). „Erythropoietin protects dopaminergic neurons and improves neurobehavioral outcomes in juvenile rats after neonatal hypoxia-ischemia.” Pediatr Res **58**(2): 297-301.

Dent, C.L., J.P. Spaeth, B.V. Jones, S.M. Schwartz, T.A. Glauser, B. Hallinan, J.M. Pearl, P.R. Khoury und C.D. Kurth (2005). „Brain magnetic resonance imaging abnormalities after the Norwood procedure using regional cerebral perfusion.” J Thorac Cardiovasc Surg **130**(6): 1523-30.

Dolznic, H., B. Habermann, K. Stangl, E.M. Deiner, R. Moriggl, H. Beug und E.W. Mullner (2002). „Apoptosis protection by the Epo target Bcl-X(L) allows factor-independent differentiation of primary erythroblasts.” Curr Biol **12**(13): 1076-85.

Dzietko, M., U. Felderhoff-Mueser, M. Sifringer, B. Krutz, P. Bittigau, F. Thor, R. Heumann, C. Buhner, C. Ikonomidou und H.H. Hansen (2004). „Erythropoietin protects the developing brain against N-methyl-D-aspartate receptor antagonist neurotoxicity.” Neurobiol Dis **15**(2): 177-87.

Ehrenreich, H., M. Hasselblatt, C. Dembowski, L. Cepek, P. Lewczuk, M. Stiefel, H.-H. Rustenbeck, N. Breiter, S. Jacob, F. Knerlich, M. Bohn, W. Poser, E. R ther, M. Kochen, O. Gefeller, C. Gleiter, T.C. Wessel, M. De Ryck, L. Itri, H. Prange, A. Cerami, M. Brines und A.-L. Siren (2002). „Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial.” Molecular Medicine **8**(8): 495-505.

Ellison, D., S. Love, L. Chimelli, B.N. Harding, J. Lowe und H.V. Vinters (Hrsg.) „Vascular disorders” in „Neuropathology”; Mosby, London 2004: 163-240.

Ferry, P.C. (1990). „Neurologic sequelae of open heart surgery in children. An 'irritating question'.” Am J Dis Child **144**(3): 369-73.

Fessatidis, I.T., V.L. Thomas, D.F. Shore, R.H. Hunt und R.O. Weller (1993). „Neuropathological features of profoundly hypothermic circulatory arrest: an experimental study in the pig.” Cardiovasc Surg **1**(2): 155-60.

Filgueiras, C.L., L. Ryner, J. Ye, L. Yang, M. Ede, J. Sun, P. Kozlowski, R. Summers, J.K. Saunders, T.A. Salerno und R. Deslauriers (1996). „Cerebral protection during moderate hypothermic circulatory arrest: histopathology and magnetic resonance spectroscopy of brain energetics and intracellular pH in pigs.“ J Thorac Cardiovasc Surg **112**(4): 1073-80.

Fisher, J.W. (2003). „Erythropoietin: physiology and pharmacology update.“ Exp Biol Med **228**(1): 1-14.

Forbess, J.M., K.J. Visconti, D.C. Bellinger, R.J. Howe und R.A. Bellinger (2002). „Neurodevelopmental outcomes after biventricular repair of congenital heart defects.“ J Thorac Cardiovasc Surg **123**(4): 631-9.

Fu, P., B. Evans, G.B. Lim, K. Moritz und E.M. Wintour (1993). „The sheep erythropoietin gene: molecular cloning and effect of hemorrhage on plasma erythropoietin and renal/liver messenger RNA in adult sheep.“ Mol Cell Endocrinol **93**(2): 107-16.

Gassman, M., K. Heinicke, J. Soliz, O.-O. Ogunshola, H.-H. Marti, T. Hofer, C. Grimm, I. Heinicke und B. Egli (2003). „Non-erythroid functions of erythropoietin.“ Adv Exp Med Biol **543**: 323-30.

Genc, S., T.F. Koroglu und K. Genk (2004). „Erythropoietin as a novel neuroprotectant.“ Restor Neurol Neurosci **22**(2): 105-19.

Geske, F.J., A.C. Nelson, R. Lieberman, R. Strange, T. Sun und L.E. Gerschenson (2000). „DNA repair is activated in early stages of p53-induced apoptosis.“ Cell Death Differ **7**(4): 393-401.

Glauser, T.A., L.B. Rorke, P.M. Weinberg und R.R. Clancy (1990). „Acquired neuropathologic lesions associated with the hypoplastic left heart syndrome.“ Pediatrics **85**(6): 991-1000.

Grasl-Kraupp, B., B. Ruttkay-Nedecky, H. Koudelka, K. Bukowska, W. Bursch und R. Schulte-Hermann (1995). „In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note.“ Hepatology **21**(5):1465-8.

Groom, R.C. (2005). „A systemic approach to the understanding and redesigning of cardiopulmonary bypass.“ Semin Cardiothorac Vasc Anesth **9**(2): 159-61.

Grünenfelder, J. (2005)
www.unipublic.unizh.ch/magazin/gesundheit/2005/1554.html gelesen am 28.7.2005.

Hoogendoorn, D. (1989). „Frequency and surgical mortality in surgery of the heart and intrathoracic large vessels. II. Operations other than direct coronary revascularisation.“ Ned Tijdschr Geneesk **133**(49): 2448-52.

Hovels-Gurich, H.H., M.C. Seghaye, S. Dabritz, B.J. Messmer und G. von Bernuth (1997). „Cognitive and motor development in preschool and school-aged children after neonatal arterial switch operation.“ J Thorac Cardiovasc Surg **114**(4): 578-85.

Hupfeld, H. (2001)
www.zum.de/Faecher/Materialien/hupfeld/index.htm?/Faecher/Materialien/hupfeld/Cytologie/Apoptose/apoptose.html
www.zum.de/Faecher/Materialien/hupfeld/index.htm?/Faecher/Materialien/hupfeld/Cytologie/Apoptose/apoptose.html
gelesen am 2.6.2005.

Huret, J.-L. (1998)
www.infobiogen.fr./services/chromcancer/Genes/BCL2ID49.html gelesen am 2.6.2005.

Ironside, J.W. und J.D. Pickard „Raised intracranial pressure, oedema, hydrocephalus“ in Graham D.I. und P.L. Lantos (Hrsg.) „Greenfield’s Neuropathology“, 7. Auflage; Arnold, London 2002: 193-231.

Jaattela, M. (2002). „Programmed cell death: many ways for cells to die decently.“ Ann Med **34**(6): 480-8.

Jelkmann, W. (1994). „Biology of erythropoietin.“ Clin Investiq **72**(6 Suppl): 3-10.

Jelkmann, W. und K. Wagner (2004). „Beneficial and ominous aspects of the pleiotropic action of erythropoietin.“ Ann Hematol **83**(11): 673-86.

Jonas, R.A., D.C. Bellinger, L.A. Rappaport, G. Wernovsky, P.R. Hickey, D.M. Farrell und J.W. Newburger (1993). „Relation of pH strategy and developmental outcome after hypothermic circulatory arrest.“ J Thorac Cardiovasc Surg **106**(2): 362-68.

Jonas, R.A. (1996). „Hypothermia, circulatory arrest, and the pediatric brain.“ J Cardiothorac Vasc Anesth **10**(1): 66-74.

Juul, S.E., D.K. Anderson, Y. Li und R.D. Christensen (1998). „Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system.“ Pediatr Res **43**(1): 40-9.

Juul, S.E., R.J. McPherson, F.X. Farrell, L. Jolliffe, D.J. Ness und C.A. Gleason (2004). „Erythropoietin concentrations in cerebrospinal fluid of nonhuman primates and fetal sheep following high-dose recombinant erythropoietin.“ Biol Neonate **85**(2): 138-44.

Kalimo H., M. Kaste und M. Haltia „Vascular diseases“ in Graham D.I. und P. Lantos (Hrsg.) „Greenfields Neuropathology“, 7. Auflage; Arnold, London 2002: 281-485.

Karahashi, H. und F. Amano (1998). „Apoptotic changes preceding necrosis in lipopolysaccharide-treated macrophages in the presence of cycloheximide.“ Exp Cell Res **241**(2): 373-83.

Kearns, C.F., J.A. Lenhart und K.H. McKeever (2000). „Cross reactivity between human erythropoietin antibody and horse erythropoietin.“ Electrophoresis **21**(8): 1454-7.

Kelley, L.L., M.J. Koury, M.C. Bondurant, S.T. Koury, S.T. Sawyer und A. Wickrema (1993). „Survival or death of individual proerythroblasts results from differing erythropoietin sensitivities: a mechanism for controlled rates of erythrocyte production.“ Blood **82**(8): 2340-52.

Kerr, J.F., A.H. Wyllie und A.R. Currie (1972). „Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.“ Br-J-Cancer **26**(4): 239-57.

Kirkham, F.J. (1998). „Recognition and prevention of neurological complications in pediatric cardiac surgery.“ Pediatr Cardiol **19**(4): 331-345.

Koolman, J. und K.-H. Röhm (Hrsg.) „Taschenatlas der Biochemie“, 2. überarbeitete und erweiterte Auflage; Thieme Stuttgart New York Verlag 1998: 372-385.

Kouchoukos, N.T., P. Masetti, C.K. Rokkas, S.F. Murphy und E.H. Blackstone (2001). „Safety and efficacy of hypothermic cardiopulmonary bypass and circulatory arrest for operations on the descending thoracic and thoracoabdominal aorta.“ Ann Thorac Surg **72**(3): 699-707.

Kretz, A., C.J. Happold, J.K. Marticke und S. Isenmann (2005). „Erythropoietin promotes regeneration of adult CNS neurons via Jak2/Stat3 and PI3K/AKT pathway activation.“ Mol Cell Neurosci **29**(4): 569-79.

Kurth, C.D., J.M. Steven und S.C. Nicolson (1995). „Cerebral oxygenation during pediatric cardiac surgery using deep hypothermic circulatory arrest.“ Anesthesiology **82**(1): 74-82.

Kurth, C.D., M. Priestley, J. Golden, J. McCann und R. Raghupathi (1999). „Regional patterns of neuronal death after deep hypothermic circulatory arrest in newborn pigs.“ J Thorac Cardiovasc Surg **118**(6): 1068-77.

Lawton, M.T., P.A. Raudzens, J.M. Zabramski und R.F. Spetzler (1998). „Hypothermic circulatory arrest in neurovascular surgery: evolving indications and predictors of patient outcome.“ Neurosurgery **43**(1): 10-21.

Ledbetter, D.J. und S.E. Juul (2000). „Erythropoietin and the incidence of necrotizing enterocolitis in infants with very low birth weight.“ J Pediatr Surg **35**(2): 178-81.

Lewczuk, P., M. Hasselblatt, H. Kamrowski-Kruck, A. Heyer, C. Unzicker, A.-L. Siren und H. Ehrenreich (2000). „Survival of hippocampal neurons in culture upon hypoxia: effect of erythropoietin.” Neuroreport **11**(16): 3485-8.

Li, W., Y. Maeda, R.R. Yuan, S. Elkabes, S. Cook und P. Dowling (2004). „Beneficial effect of erythropoietin on experimental allergic encephalomyelitis.” Ann Neurol **56**(6): 767-77.

Limperopoulos, C., A. Majnemer, B. Rosenblatt, M.I. Shevell, C. Rohlicek, C. Tchervenkov und R. Gottesman (2001). „Association between electroencephalographic findings and neurologic status in infants with congenital heart defects.” J Child Neurol **16**(7): 471-6.

Lippert, H. (Hrsg.) „Lehrbuch Anatomie”, 5. völlig neu überarbeitete Auflage; Urban und Fischer Verlag München-Jena 2000: 105-182.

Lorenzo, H.K. und S.A. Susin (2004). „Mitochondrial effectors in caspase-independent cell death.” FEBS Lett **557**(1-3): 14-20.

Luft, A.R., M.M. Buitrago, J.S. Paul, J. Hagan, M.C. Ding, N. Thakor und D.F. Hanley (2002). „Early restitution of electrocorticogram predicts subsequent behavioral recovery from cardiac arrest.” J Clin Neurophysiol **19**(6): 540-6.

Mahle, W.T., F. Tavani, R.A. Zimmerman, S.C. Nicolson, K.K. Galli, J.W. Gaynor, R.R. Clancy, L.M. Montenegro, T.L. Spray, R.M. Chiavacci, G. Wernovsky und C.D. Kurth (2002). „An MRI study of neurological injury and after congenital heart surgery.” Circulation **106**(12 Suppl 1): 1109-14.

Malhotra, S., S.I. Savitz, L. Ocava und D.M. Rosenbaum (2006). „Ischemic preconditioning is mediated by erythropoietin through PI-3 kinase signaling in an animal model of transient ischemic attack.” J Neurosci Res **83**(1): 19-27.

Marino, B.S. (2002). „Outcomes after the Fontan procedure.” Curr Opin Pediatr **14**(5): 620-6.

Marti, H.-H. (2004). „Erythropoietin and the hypoxic brain.” J Exp Biol **207** (Pt 18): 3233-42.

Martin, L.J., A.M. Brambrink, C. Lehmann, C. Portera-Cailliau, R. Koehler, J. Rothstein und R.J. Traystman (1997). „Hypoxia-ischemia causes abnormalities in glutamate transporters and death of astroglia and neurons in newborn striatum.” Ann Neurol **42**(3): 335-48.

Martinez-Estrada, O.M., E. Rodriguez-Millan, E. Gonzalez-De Vicente, M. Reina, S. Vilaro und M. Fabre (2003). „Erythropoietin protects the in vitro blood-brain barrier against VEGF-induced permeability.” Eur J Neurosci **18**(9): 2538-44.

Mennander, A., P. Paakko, J. Hirvonen, V. Anttila, J. Rimpilainen, M. Poleka, V. Vainionpaa, K. Kiviluoma, P. Romsis, F. Biancari und T. Juvonen (2002). „Apoptotic activity is increased in brain cortex infarct after hypothermic circulatory arrest in a porcine model.“ Scand Cardiovasc J **36**(4): 247-9.

Mentz, S. (2001) www.koeln.netsurf.de/~bernd.asselborn/forum/jannik.htm gelesen am 24.6.2005.

Mezrow, C.K., A. Gandsas, A.M. Sadeghi, P.S. Midulla, H.H. Shiang, R. Green, I.R. Holzman und R.B. Griep (1995). „Metabolic correlates of neurologic and behavioral injury after prolonged hypothermic circulatory arrest.“ J Thorac Cardiovasc Surg **109**(5): 959-75.

Miller, M., P. Iloff, R.J. Stoltzfus und J. Humphrey (2002) „Breastmilk erythropoietin and mother-to-child HIV transmission through breastmilk.“ Lancet **360**(9341): 1246-8.

Mislin, S. (2001) www.koeln.netsurf.de/~bernd.asselborn/forum/leatamar.htm gelesen am 24.6.2005.

Moody, M.D., M.A. Bell, V.R. Challa, W.E. Johnston und D.S. Prough (1990). „Brain microemboli during cardiac surgery or aortography.“ Ann Neurol **28**(4): 477-486.

Mutschler, E. (Hrsg.) „Arzneimittelwirkungen“, 7. völlig neu bearbeitete und erweiterte Auflage; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1996: 401-439.

Namiuchi, S., Y. Kagaya, J. Ohta, N. Shiba, M. Sugi, M. Oikawa, H. Kunii, H. Yamao, N. Komatsu, M. Yui, H. Tada, M. Sakuma, J. Watanabe, T. Ichihara und K. Shirato (2005). „High serum erythropoietin level is associated with smaller infarct size in patients with acute myocardial infarction who undergo successful primary percutaneous coronary intervention.“ J Am Coll Cardiol **45**(9): 1406-12.

Newburger, J.W., R.A. Jonas, G. Wernovsky, D. Wypij, P.R. Hickey, K.C.K. Kuban, D.M. Farrel, G.L. Holmes, S.L. Helmers, J. Constantinou, E. Carrazana, J.K. Barlow, A.Z. Walsh, K.C. Lucius, J.C. Share, D.L. Wessel, F.L. Hanley, J.E. Mayer, Jr., A.R. Castaneda und J.H. Ware (1993). „A comparison of the perioperative neurologic effects of hypothermic circulatory arrest versus low-flow cardiopulmonary bypass in infant heart surgery.“ N Engl J Med **329**(15): 1057-64.

Oates, R.K., J.M. Simpson, J.A. Turnbull und T.B. Cartmill (1995). „The relationship between intelligence and duration of circulatory arrest with deep hypothermia.“ J Thorac Cardiovasc Surg **110**(3): 786-92.

Otto (2000) www.koeln.netsurf.de/~bernd.asselborn/forum/daniel.htm gelesen am 24.6.2005.

Pigula, F.A., E.M. Nemoto, B.P. Griffith und R.D. Siewers (2000). „Regional low-flow perfusion provides cerebral circulatory support during neonatal aortic arch reconstruction.“ J Thorac Cardiovasc Surg **119**(2): 331-9.

Portera-Cailliau, C., C.H. Sung, J. Nathans und R. Adler (1994). „Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa.“ Proc Natl Acad Sci **91**(3): 974-8.

Prass, K., A. Scharff, K. Ruscher, D. Löwl, C. Muselmann, I. Victorov, K. Kapinya, U. Dirnagl und A. Meisel (2003). „Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin.“ Stroke **34**: 1981-86.

Pschyrembel, 258. neu bearbeitete Auflage; Walter de Gruyter Verlag Berlin New York 1998 a: „Hypoxie“: S. 732.

Pschyrembel, 258. neu bearbeitete Auflage; Walter de Gruyter Verlag Berlin New York 1998 b: „Apoptose“: S. 100.

Qi, J.P., A.P. Wu, D.S. Wang, L.F. Wang, S.X. Li und F.L. Xu (2004). „Correlation between neuronal injury and Caspase-3 after focal ischemia in human hippocampus.“ Chin Med J (Engl) **117**(10): 1507-12.

Ramonet, D., M. Pugliese, M.J. Rodriguez, L. de Yebra, C. Andrade, R. Adroer, T. Ribalta, J. Mascort und N. Mahy (2002). „Calcium precipitation in acute and chronic brain diseases.“ J Physiol Paris **96**(3-4) : 307-12.

Riede, U.-N., L. Füzesi und H.J. Radzun „Störungen der Reizbeantwortung“ in Riede, U.-S. und H.-E. Schaefer (Hrsg.) „Allgemeine und spezielle Pathologie“, 4. Auflage, aktualisierter Nachdruck; Thieme Verlag Stuttgart New York 1999/2001 a: 127-167.

Riede, U.-N., H.-E. Schaefer und R. Rohrbach „Störungen des Stoffwechsels“ in Riede, U.-S. und H.-E. Schaefer (Hrsg.) „Allgemeine und spezielle Pathologie“, 4. Auflage, aktualisierter Nachdruck; Thieme Verlag Stuttgart New York 1999/2001 b: 77-126.

Riede, U.-N., H.-E. Schaefer, E. Kaiserling und C. Mittermayer „Störung des Stofftransports“ in Riede, U.-S. und H.-E. Schaefer (Hrsg.) „Allgemeine und spezielle Pathologie“, 4. Auflage, aktualisierter Nachdruck; Thieme Verlag Stuttgart New York 1999/2001 c: 393-433.

Roach, G.W., M. Kanchuger, C.M. Mangano, M. Newman, N. Nussmeier, R. Wolman, A. Aggarwal, K. Marschall, S.H. Graham und C. Ley (1996). „Advers 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**(25): 1857-63.

Romsi, P., E. Rönkä, K. Kiviluoma, V. Vainionpää, J. Hirvonen, A. Mennander, M. Pokela, F. Biancari, J. Rimpiläinen und T. Juvonen (2002). „Potential neuroprotective benefits of erythropoietin during experimental hypothermic circulatory arrest.“ J Thorac Cardiovasc Surg **124**(4): 714-23.

Rote Liste®, Arzneimittelverzeichnis für Deutschland, Rote Liste® Service GmbH, Frankfurt a. M.; Editio Cantor Verlag für Medizin und Naturwissenschaften GmbH Aulendorf 2002: „NeoRecormon“: s. 08 049.

Ruscher, K., D. Freyer, M. Karsch, N. Isaev, D. Megow, B. Sawitzki, J. Priller, U. Dirnagl und A. Meisel (2002). „Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model.“ J Neurosci **22**(23): 10291-301.

Sattler, M.B., D. Merkler, K. Maier, C. Stadelmann, H. Ehrenreich, M. Bahr und R. Diem (2004). „Neuroprotective effects and intracellular signaling pathways of erythropoietin in a rat model of multiple sclerosis.“ Cell Death Differ **11**(Suppl 2): 181-92.

Schiebler, T.H., W. Schmidt und K. Zilles (Hrsg.) „Anatomie“, 8. vollständig überarbeitete und aktualisierte Auflage; Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 1999: 545-611.

Schlote, W., U.-N. Riede und O.D. Wiestler „Nervensystem“ in Riede, U.-S. und H.-E. Schaefer (Hrsg.) „Allgemeine und spezielle Pathologie“, 4. Auflage, aktualisierter Nachdruck; Thieme Verlag Stuttgart New York 1999/2001: 1021-1094.

Schultz, S., J. Creed, G. Schears, T. Zaitseva, W. Greeley, D.F. Wilson und A. Pastuszko (2004). „Comparison of low-flow cardiopulmonary bypass and circulatory arrest on brain oxygen and metabolism.“ Ann Thorac Surg **77**(6): 2138-43.

Sekiguchi, Y., S. Kikuchi, R.-R. Myers und W.-M. Campana (2003). „Erythropoietin inhibits spinal neuronal apoptosis and pain following nerve root crush.“ Spine **28**(23): 2577-84.

Sharma, R., S.K. Choudhary, M.R. Mohan, M.V. Padma, S. Jain, M. Bhardwaj, A. Bhan, U. Kiran, N. Saxena und P. Venugopal (2000). „Neurological evaluation and intelligence testing in the child with operated congenital heart disease.“ Ann Thorac Surg **70**(2): 575-81.

Siddig, A., I.A. Ayoub, J.C. Chavez, L. Aminova, S. Shah, J.C. Lamanna, S.M. Patton, J.R. Connor, R.A. Cherny, I. Volitakis, A. Bush, I. Langsetmo, T. Seeley, V. Gunzler und R.R. Ratan (2005). “Hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase inhibition. A target for neuroprotection in the central nervous system.“ J Biol Chem **280**(50): 41732-43.

Silas (2000) www.koeln.netsurf.de/~bernd.asselborn/forum/silas.htm gelesen am 24.6.2005.

Siren , A.-L., M. Fratelli, M. Brines, C. Goemans, S. Casagrande, P. Lewczuk, S. Keenan, C. Gleiter, C. Pasquali, A. Capobianco, T. Mennini, R. Heumann, A. Cerami, H. Ehrenreich und P. Ghezzi (2001). „Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress.“ Proc Natl Acad Sci **98**(7): 4044-9.

Siren, A.-L. und H. Ehrenreich (2001). „Erythropoietin-a novel concept for neuroprotection.“ Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci **251**(4): 179-84.

Spandou, E., Z. Papadopoulou, V. Soubasi, G. Karkavelas, C. Simeonidou, A. Pazaiti und O. Guiba-Tziampiri (2005). „Erythropoietin prevents long-term sensorimotor deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats.“ Brain Res **1045**(1-2): 22-30.

Susin, S.A., H.K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B.E. Snow, G.M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D.R. Goodlett, R. Aebersold, D.P. Siderovski, J.M. Penninger und G. Kroemer (1999). „Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor.“ Nature **397**(6718): 441-6.

Svensson, L.G., E.S. Crawford, K.R. Hess, J.S. Coselli, S. Rashkin, S.A. Shenaq und H.J. Safi (1993). „Deep hypothermia with circulatory arrest. Determinants of stroke and early mortality in 656 patients.“ J Thorac Cardiovasc Surg **106**(1): 19-28.

Sytkowski, A.J. und K.A. Donahue (1987). „Immunochemical studies of human erythropoietin using site-specific anti-peptide antibodies. Identification of a functional domain.“ J Biol Chem **262**(3): 1161-5.

Takano, J., M. Tomioka, S. Tsubuki, M. Higuchi, N. Iwata, S. Itohara, M. Maki und T.C. Saido (2005). „Calpain mediates excitotoxic DNA fragmentation via mitochondrial pathways in adult brains: evidence from calpastin mutant mice.“ J Biol Chem **280**(16): 16175-84.

Tierschutzgesetz in der Neufassung vom 25.05.1998 (BGBl. I S. 1105) - TierSchG.

Trittenwein, G., A. Nardi, H. Pansi, J. Golej, G. Burda, M. Hermon, H. Boigner, G. Wollenek und der Verein zur Durchführung wissenschaftlicher Forschung auf dem Gebiet der Neonatologie und pädiatrischen Intensivmedizin (2003). „Early postoperative prediction of cerebral damage after pediatric cardiac surgery.“ Ann Thorac Surg **76**(2): 576-80.

Utley, J.R. (1996). „Techniques for avoiding neurologic injury during adult cardiac surgery.“ J Cardiothorac Vasc Anesth **10**(1): 38-43.

Vilalta, A., D. Wu, M. Margalith und P. Hobart (2001). „Rabbit EPO gene and cDNA: expression of rabbit EPO after intramuscular injection of pDNA.“ Biochem Biophys Res Commun **284**(3): 823-7.

Walsh, A.Z., D.F. Morrow und R.A. Jonas (1995). „Neurologic and developmental outcomes following pediatric cardiac surgery.“ Nurs Clin North Am **30**(2): 347-64.

Wang, X.J., K.M. Kong, W.L. Qi, W.L. Ye und P.S. Song (2005). „Interleukin-1 beta induction of neuron apoptosis depends on p38 mitogen-activated protein kinase activity after spinal cord injury.“ Acta Pharmacol Sin **26**(8): 934-42.

Weishaupt, J.-H., G. Rohde, E. Polking, A.-L. Siren, H. Ehrenreich und M. Bahr (2004). „Effect of erythropoietin axotomy-induced apoptosis in rat retinal ganglion cells.“ Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(5): 1514-22.

Weiss, C. und W. Jelkmann „Funktionen des Blutes“ in Schmidt, R.F., G. Thews und F. Lang (Hrsg.) „Physiologie des Menschen“, 28. korrigierte und aktualisierte Auflage; Springer Verlag Berlin Heidelberg Stuttgart New York 2000: 411-447.

Wen, D., J.P. Boissel, T.E. Tracy, R.H. Gruninger, L.S. Mulcahy, J. Czelusiak, M. Goodman und H.F. Bunn (1993). „Erythropoietin structure-function relationships: high degree of sequence homology among mammals.“ Blood **82**(5):1507-16.

Wilkens, H. und W. Münster „Arterien, Arteriae“ in Nickel, R., A. Schummer und E. Seiferle (Hrsg.) „Lehrbuch der Anatomie der Haustiere III“; Paul Parey Verlag Berlin und Hamburg 1976: 76-189.

Wimmer-Greinecker, G. und die International council of emboli management (ICEM) study group (2003). „Reduction of neurologic complications by intra-aortic filtration in patients undergoing combined intracardiac and CABG procedures.“ Eur J Cardiothorac Surg **23**(2): 159-64.

Wolman, R.L., N.A. Nussmeier, A. Aggarwal, M.S. Kanchuger, G.W. Roach, M.F. Newman, C.M. Mangano, K.E. Marschall, C. Ley, D.M. Boisvert, G.M. Ozanne, A. Herskowitz, S.H. Graham und D.T. Mangano (1999). „Cerebral injury after cardiac surgery: identification of a group at extraordinary risk. Multicenter study of Perioperative Ischemia Research Group (McSPI) and the Ischemia Research Education Foundation (IREF) Investigators.“ Stroke **30**(3): 514-22.

Wong, B.I., R.F. McLean, C.D. Naylor, W.G. Snow, E.M. Harrington, M.J. Gawel, R.B. Woods und S.E. Fremes (1992). „Central-nervous-system dysfunction after warm or hypothermic cardiopulmonary bypass.“ Lancet **339**(8806): 1383-84.

Wypij, D., J.W. Newburger, L.A. Rappaport, A.J. duPlessis, R.A. Jonas, G. Wernovsky, M. Lin und D.C. Bellinger (2003). „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**(5): 1397-403.

Zalaquett, R. (2003). „Fifty years of the heart-lung machine. Report on the pioneers and heroes and about the circumstances that led to the great invention, which allowed the treatment, and in many cases, the cure of heart illnesses.” Rev Med Chil **131**(11): 1337-44.

Mein Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Scheule für die freundliche Überlassung des Themas, die guten Ratschläge während der Zusammenarbeit sowie seine schnellen, hilfreichen Korrekturen und Antworten.

Herrn Dr. Givehchian für die Betreuung und die Zusammenarbeit, besonders während der Operationen. Dank seiner Vorbereitung waren viele Türen für mich bereits geöffnet, so dass es trotz interdisziplinärem Arbeiten keine größeren Hindernisse gab.

dem Team der Kardiotechnik der Universitätsklinik Tübingen für die nette Einarbeitung in Verständnis und Bedienung der Herz-Lungen-Maschine.

dem Team des Tierlabors.

In besonderer Weise möchte ich Angelika Gräßle für das Mitwirken bei allen Operationen, das Überlassen des Operationssaales bei Nacht und die Bereitstellung aller wichtigen Instrumente danken.

Desgleichen Bernd Neumann, der uns bei allen Operationen und technischen Fragen hilfreich zur Seite stand.

den Tierärzten der Universität Tübingen.

Mein besonderer Dank gilt Tim Greiner, der unsere Tiere während des Versuchs betreute, die neurologische Evaluation der Tiere durchführte und uns in die intensivmedizinische Betreuung der Tiere einwies.

Auch Herrn Dr. Scheuerlen möchte ich für sein Engagement danken.

den Tierpflegern des Tierstalls der Universität Tübingen für das Bereitstellen eines Raumes zur Gehirnentnahme und die Versorgung unserer Tiere.

dem Institut für Hirnforschung der Universität Tübingen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Rudi Beschorner bedanken. Er investierte viel Zeit, um meine Fragen zu beantworten und half mir neue Möglichkeiten zu suchen, wenn es nicht so funktionierte, wie geplant. Seine Korrekturen und Verbesserungsvorschläge waren mir stets eine große Hilfe.

Allen Mitarbeitern im Labor möchte ich für die vielen Versuche zur Etablierung der Färbungen, das Einlernen in neue Färbemethoden und das Bereitstellen aller nötigen Geräte und Chemikalien danken.

Herrn Dr. Martin Eichner für die statistische Planung und Auswertung meiner Daten.

ganz besonders auch meinem Studien- und Doktorarbeitskollegen Cornelius Ehmann. Das gemeinsame Arbeiten hat mir sehr viel Spaß gemacht und in den schwierigen Phasen war er immer ein guter Ansprechpartner, der mich zum Durchhalten motiviert hat.

meinem Mann Tobias, meiner Mitbewohnerin, meinen Eltern und meinem Bruder für die moralische Unterstützung während der Arbeit. Danke, dass ihr mir immer wieder so geduldig zugehört habt, mich auf den Boden zurückgebracht habt und in der ganzen Zeit zu mir gestanden seid.

soli Deo gloria!

LYDIA FRAUENLOB

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum: 12.06.1980
Geburtsort: Backnang
Eltern: Ruth (geb. Heubach) und Martin Klein
Familienstand: verheiratet mit Tobias Frauenlob seit September 2005

SCHULISCHE AUSBILDUNG

1987-1991 Grundschule Hertmannsweiler
1991-2000 Lessing-Gymnasium Winnenden

STUDIUM

WS 2000/2001 Beginn des Medizinstudiums an der Eberhard Karls Universität Tübingen
SS 2002 Ärztliche Vorprüfung
SS 2003 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
WS 2005/2006 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
WS 2006/2007
(10.04.2007) Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

FAMULATUREN

März/April 2003 Famulatur im Orthopädischen Spital Speising in Wien
Sept./Okt. 2003 Famulatur in der chirurgischen Endoskopie der Universitätsklinik Tübingen
August 2004 Praxisfamulatur beim medizinischen Dienst Albanien/Pogradec in Albanien
September 2004 Famulatur in der neurologischen Abteilung des Bürgerhospitals Stuttgart
März 2005 Famulatur in der Abteilung für Pädiatrie des Klinikums Nord in Hamburg