

**Aus der Klinik für Anaesthesiologie der Technischen Universität München  
(Direktor : Univ.-Prof. Dr. med., Dipl. Phys. E. Kochs)  
und aus dem Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der  
Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher)**

**angefertigt unter der Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. M. Blobner**

**Vorgelegt über den  
Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde, Tierhygiene und Tierhaltung  
des Veterinärwissenschaftlichen Departments der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. M. Erhard)**

**Beeinflusst die perioperative Gabe von Moxifloxazin die zerebrale  
inflammatorische Reaktion und das neurokognitive Outcome  
14 Tage nach extrakorporaler Zirkulation mit  
tief- hypothermem Kreislaufstillstand  
bei der Ratte ?**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München**

**von  
Simone Gerlinde Denzler  
aus  
Röbersdorf**

**München 2010**

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun**

**Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Erhard**

**Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Göbel**

**Tag der Promotion: 13. Februar 2010**

**Den besten und liebsten Menschen, die es gibt,  
meiner Familie**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Schrifttum .....</b>	<b>3</b>
2.1	Kognition.....	3
2.1.1	Neurokognition.....	3
2.1.1.1	Gedächtnis .....	3
2.1.1.2	Gedächtnis im anatomischen Zusammenhang .....	8
2.1.1.3	Vergleichende kognitive Funktionen bei Mensch und Nagetier .....	9
2.1.2	Untersuchung der Neurokognition .....	11
2.2	Extrakorporale Zirkulation (EKZ).....	18
2.2.1	Anwendung der EKZ.....	18
2.2.2	Pathophysiologische Aspekte und Defizite nach EKZ.....	19
2.3	EKZ mit tief- hypothermem Kreislaufstillstand.....	25
2.4	Zerebrale Inflammation .....	27
2.4.1	Allgemeines.....	27
2.4.2	Systemische und zerebrale Inflammation.....	28
2.4.3	Inflamationsparameter.....	31
2.4.3.1	Zyklooxygenase (COX) .....	31
2.4.3.2	Tumornekrosefaktor $\alpha$ (TNF $\alpha$ ).....	32
2.4.3.3	Nukleärer Faktor kappa B (NF $\kappa$ B) .....	33
2.5	Moxifloxazin .....	35
2.5.1	Allgemeines.....	35
2.5.2	Wirkungsweise .....	36
2.5.2.1	Pharmakokinetik.....	37
2.5.2.2	Pharmakodynamik.....	39
2.5.2.3	Toxizität und Wirkung auf verschiedene Organsysteme.....	41
<b>3</b>	<b>Eigene Untersuchungen .....</b>	<b>44</b>
3.1	Zielvorstellung.....	44
3.2	Material und Methoden .....	45
3.2.1	Versuchsplanung .....	45
3.2.2	Versuchsdurchführung .....	49
3.2.2.1	Durchführung der EKZ mit DHCA.....	49
3.2.2.2	Untersuchung der neurologischen Funktion.....	55
3.2.2.3	Untersuchung der neurokognitiven Funktion mit Hilfe des modifizierten Zylinder- Hole- Board- Tests (ZHBT) .....	62
3.2.2.4	Entnahme und Präparation des Gehirns .....	73
3.2.2.5	Histologie .....	73
3.2.2.6	Statistische Bewertung der Befunde.....	77
3.3	Ergebnisse .....	78
3.3.1	Physiologische Parameter der operativen Phase .....	78
3.3.2	Neurologische Parameter .....	81
3.3.2.1	Körpergewicht .....	81
3.3.2.2	Motorik.....	82
3.3.3	Neurokognitive Parameter des Zylinder- Hole- Board- Tests (ZHBT).....	85
3.3.3.1	Kognitive Parameter .....	85
3.3.3.2	Verhaltensparameter.....	86
3.3.4	Histologie .....	88
3.3.4.1	HE- Färbung .....	89
3.3.4.2	Immunhistochemische Färbung .....	90

<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>93</b>
4.1	Diskussion der Methoden.....	93
4.1.1	Das Modell des tief- hypothermen Kreislaufstillstandes .....	93
4.1.2	Neurologische Untersuchung .....	95
4.1.3	Der modifizierte Zylinder- Hole- Board- Test (ZHBT) .....	97
4.1.4	Histologie .....	99
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	101
4.2.1	Physiologische Parameter während des operativen Eingriffs .....	101
4.2.2	Neurologisch- motorische Parameter .....	105
4.2.3	Neurokognitive Parameter .....	110
4.2.4	Histologie .....	115
4.3	Abschließende Betrachtung und Ausblick .....	122
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>124</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>126</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>128</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>151</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>152</b>
<b>10</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>154</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>157</b>

# 1 Einleitung

Die herzchirurgische Versorgung unterliegt stetiger Verbesserung und Innovation, die die Mortalität als Folgen dieser Eingriffe deutlich haben sinken lassen. Trotz oder vielleicht gerade wegen dieser höheren Überlebenschance sind postoperative neurologische und neurokognitive Defizite vor allem nach extrakorporaler Zirkulation (EKZ) und tief- hypothermem Kreislaufstillstand (deep hypothermic circulatory arrest, DHCA) als schwerwiegende Komplikationen ins Zentrum des Interesses gerückt. Die Inzidenz solcher postoperativer kognitiver Defizite liegt fünf Jahre nach herzchirurgischen Operationen auch heute noch bei rund 42 % (NEWMAN et al., 2001). Obwohl die Ursachen für ihre Entstehung viel und intensiv beforscht sind und werden, sind die ätiologischen und pathophysiologischen Mechanismen bisher nicht genau bekannt (GROCOTT et al., 2005). Die Vermutung liegt nahe, dass eine Reihe von Faktoren, wie beispielsweise zerebrale Embolien, eine globale zerebrale Hypoperfusion, sowie eine systemische und zerebrale Entzündungsreaktion eine Rolle spielen (MATHEW et al., 2003; GROCOTT et al., 2005). Inwieweit aber z. B. die zerebrale Inflammation während und nach EKZ die Ursache oder eher ein Epiphänomen darstellt, ist bisher unbekannt. Bekannt ist, dass die EKZ über den Kontakt des Blutes mit den Fremdoberflächen des extrakorporalen Kreislaufs zu einer systemischen Inflammationsreaktion führt (BRIX-CHRISTENSEN, 2001). Einen Zusammenhang zwischen dieser systemischen und einer zerebralen Inflammationsreaktion konnten HINDMAN et al. (2001) zeigen, als sie in einem Rattenmodell der EKZ einen Anstieg systemischen Interleukin-6 und gleichzeitig eine verstärkte Expression zerebraler Zyklusloxygenase-2 mRNA nach EKZ nachweisen konnten. Ein möglicher Ansatzpunkt zur Verbesserung der neurologischen bzw. neurokognitiven Funktion könnte demnach eine Verringerung der Inflammationsantwort (systemisch und zerebral) auf diese Art Eingriff sein. So zeigten beispielsweise MEISEL et al. (2004), dass in einem Schlaganfall-Modell in der Maus eine präventive Moxifloxazin (MXF)-Gabe die Größe des Infarkts reduzieren und die neurologische Funktion verbessern kann. In einer Vorgängerstudie konnte bereits gezeigt werden, dass eine perioperative MXF- Gabe 24 Stunden nach EKZ mit DHCA an der Ratte einen günstigen Effekt auf die Neurone des Hippokampus hat. Die Expression zerebraler Entzündungsmediatoren wie Zyklusloxygenase-2 (COX-2) oder der Nukleäre Faktor kappa B (NFκB) waren bei Tieren, die Moxifloxazin erhalten hatten, deutlich reduziert (STÜCKLE, Medizinische Dissertation in Vorbereitung). Die hier vorliegende Studie soll nun untersuchen, ob eine perioperative MXF- Gabe einen

möglichen Langzeiteffekt auf die neurologische und neurokognitive Funktion nach EKZ mit DHCA hat. Zusätzlich soll der Einfluss des MXF auf das histologische Ergebnis nach EKZ mit DHCA untersucht werden.

## 2 Schrifttum

### 2.1 Kognition

#### 2.1.1 Neurokognition

Seit einigen Jahren konnten wichtige Erkenntnisse aus Untersuchungen zu Gedächtnis, Lernprozessen und kognitiven Funktionen gewonnen werden (EICHENBAUM et al., 1989). Unter dem Begriff Kognition (lat. cognoscere „das Erkennen“, „Kennenlernen“) versteht man Prozesse und Strukturen, die mit dem Wahrnehmen und Erkennen zusammenhängen, wie beispielsweise Denken, Erinnern, Gedächtnis, Lernen, Planen usw. (BROCKHAUSEN-ZYKLOPÄDIE, 1998).

Das Gedächtnis als wichtiger Informationsspeicher besteht aus mehreren Systemen, die in unterschiedlichen Hirnregionen lokalisiert sind (SQUIRE, 1992; ZOLA-MORGAN und SQUIRE, 1993). Im Folgenden werden Lern- und Gedächtnisprozesse näher beschrieben.

##### 2.1.1.1 Gedächtnis

Das Gedächtnis lässt sich nach verschiedenen Kriterien differenzieren: auf chronologischer Ebene unterscheidet man zwischen Kurzzeit- und Langzeitgedächtnis, sowie zwischen anterogradem („Neugedächtnis“) und retrogradem („Altgedächtnis“) Gedächtnis. Hierbei bezieht sich das anterograde Gedächtnis auf erfolgreiches Einspeichern und Ablegen neuer Daten und Fakten. Das wiederholte Abrufen schon erfolgreich abgelegter Informationen charakterisiert demnach Funktionen des retrograden Gedächtnisses (CALABRESE und MARKOWITSCH, 2003).

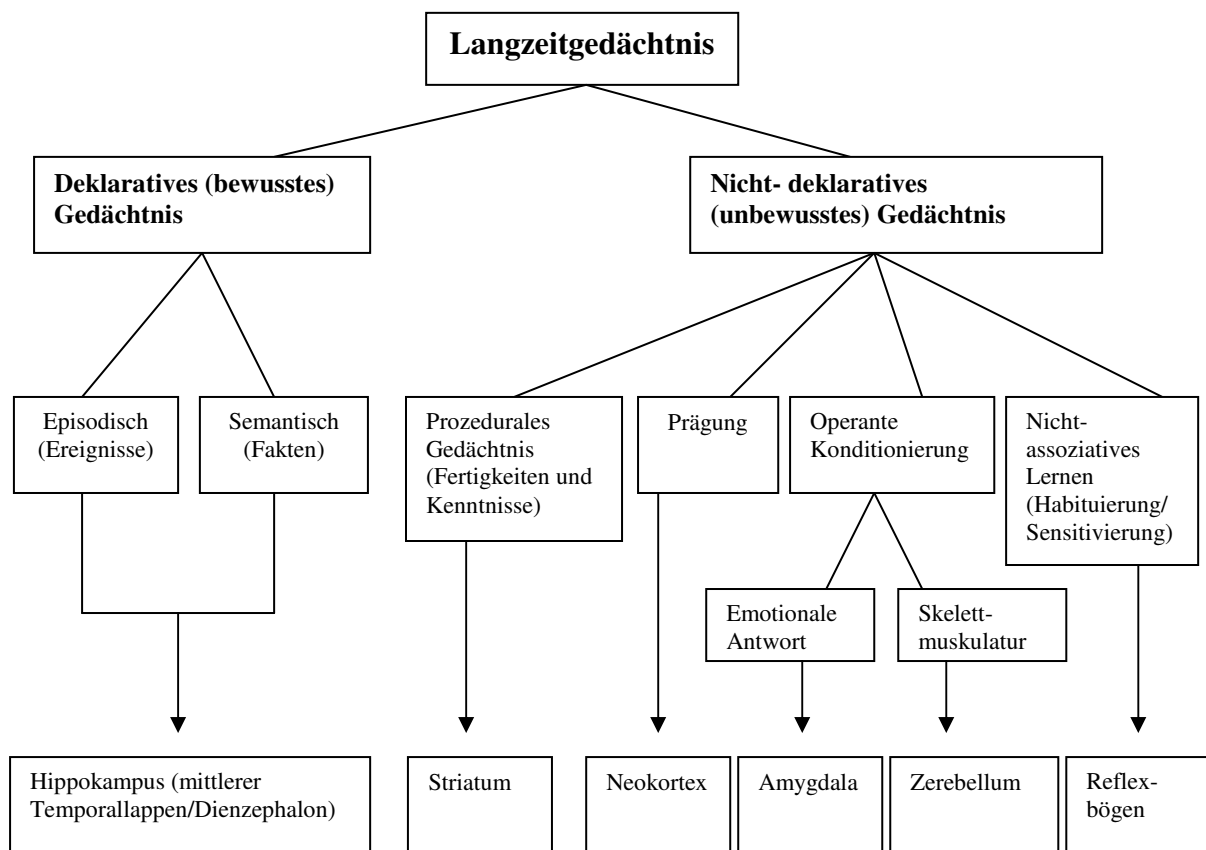
##### Langzeitgedächtnis

Das Langzeitgedächtnis lässt sich nach CALABRESE und MARKOWITSCH (2003) inhaltlich in fünf Gedächtnissysteme untergliedern (siehe Abb. 01): das episodische Gedächtnis, welches Ereignisse speichert, das semantische System, welches Tatsachenwissen enthält, das



prozedurale Gedächtnis, welches Fertigkeiten und Kenntnisse umfasst, die sog. „Priming-Form“, die auch als Prägung bezeichnet wird, sowie das perzeptuelle Gedächtnis, welches die operante Konditionierung und das nicht- assoziative Lernen beinhaltet.

Eine Zuordnung dieser fünf Grundsysteme zu Oberbegriffen bezüglich bewusster oder unbewusster Wahrnehmung wurde bereits 1992 von SQUIRE vorgenommen. Demnach lässt sich das Langzeitgedächtnis inhaltlich in das deklarative und nicht- deklarative Gedächtnis untergliedern (SQUIRE, 1992). Diese Funktionszuordnung basiert auf Ergebnissen neuropsychologischer Studien an Patienten, die an Amnesie leiden.



**Abbildung 01:** Taxonomie des Langzeitgedächtnisses mit beteiligten Gedächtnisstrukturen (modifiziert nach SQUIRE, 1998).

## Deklaratives Gedächtnis

Das deklarative, bewusste Gedächtnis übernimmt die Funktion der bewussten Wahrnehmung von Ereignissen und Tatsachen (ZOLA-MORGAN und SQUIRE, 1993) und kann in zwei Subsysteme untergliedert werden: das episodische (Ereignisse) und das semantische (Wissen und Fakten) Gedächtnis (SQUIRE und ZOLA, 1998; TULVING und MARKOWITSCH, 1998; CALABRESE und MARKOWITSCH, 2003). Das deklarative Gedächtnis ist v. a. im

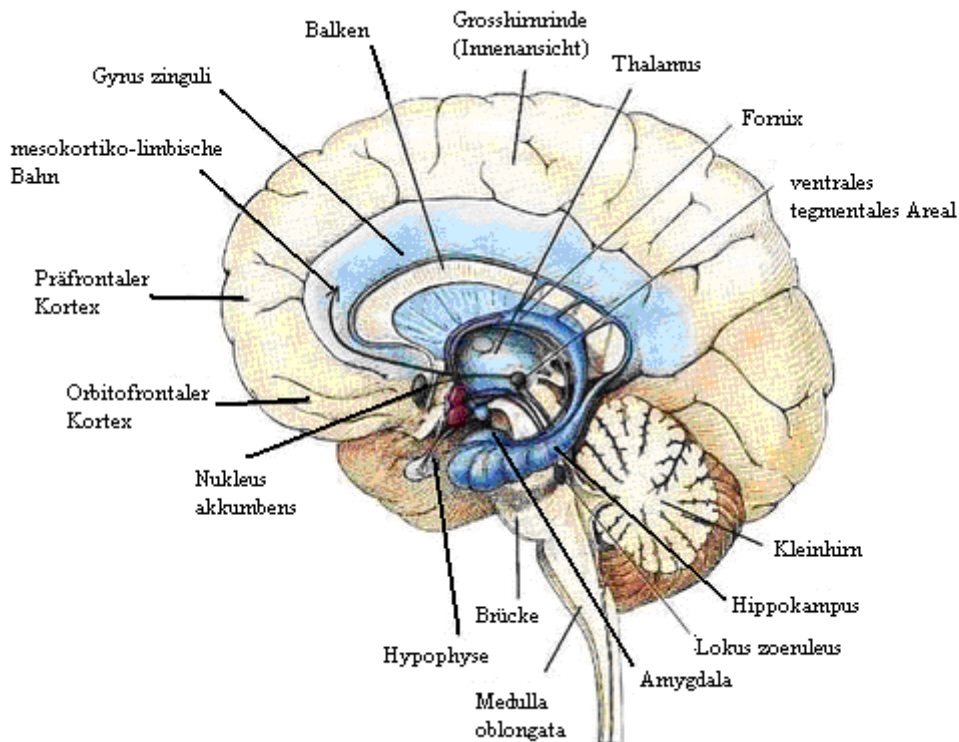
Hippokampus und in anatomisch dem Hippokampus benachbarten, kortikalen Bereichen im mittleren Temporallappen lokalisiert, findet sich aber auch im Diencephalon (EICHENBAUM, 2003).

Die hippocampale Formation und ihre angrenzenden kortikalen Strukturen sind sehr wichtig für Lern- und Gedächtnisprozesse. Nach dem Erlernen werden gespeicherte Informationen von dort in das Langzeitgedächtnis transferiert, welches unabhängig vom Hippokampus existiert. Die permanente Speicherung erfolgt dann im Neokortex (KESNER et al., 1987; ZOLA-MORGAN und SQUIRE, 1990).

### **Nicht- deklaratives Gedächtnis**

Das nicht- deklarative, unbewusste Gedächtnis setzt sich aus unterschiedlichen Gedächtnisformen zusammen (SQUIRE, 1998) (siehe Abb. 01) und umfasst alle unbewusst wahrgenommenen Lernprozesse.

Motorische Fertigkeiten und Kenntnisse werden im prozeduralen Gedächtnis abgespeichert. Typischerweise erwirbt man diese Fähigkeiten schrittweise, ohne bewusste Erinnerungen daran zu haben (SQUIRE, 1992). „Priming“ oder Prägung als Gedächtnissystem bezeichnet eine höhere Wahrscheinlichkeit, Reize wieder zu erkennen, denen man zu einem früheren Zeitpunkt unbewusst begegnet ist (CALABRESE und MARKOWITSCH, 2003). Zum perzeptuellen Gedächtnis zählt man zum einen das nicht- assoziative Lernen (Habituation und Sensitivierung) und zum anderen die operante Konditionierung, bei der im Gegensatz zur klassischen Konditionierung (assoziatives Lernen) ein ursprünglich spontanes Verhalten durch Belohnung oder Bestrafung bestärkt oder vermieden wird.



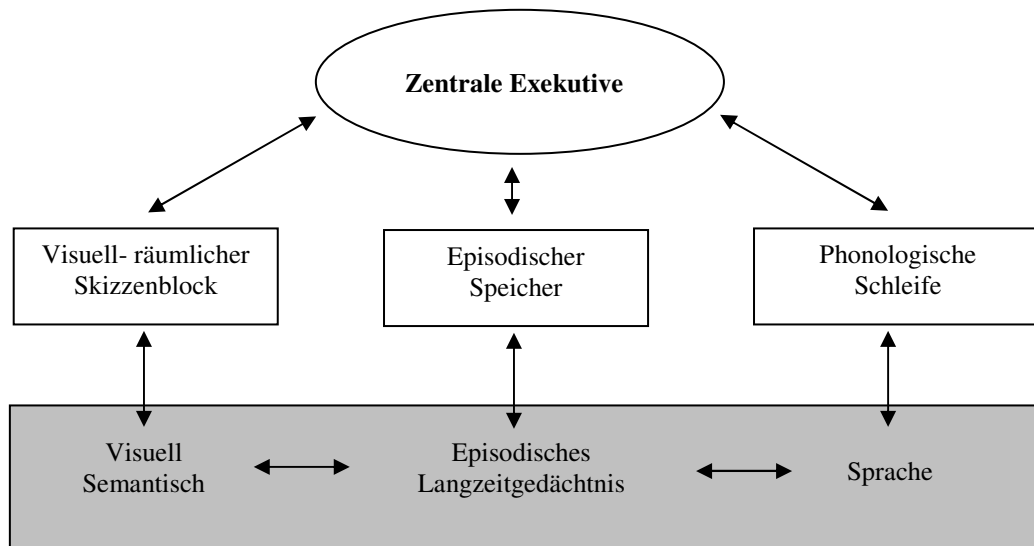
**Abbildung 02:** Längsschnitt des menschlichen Gehirns  
 (WWW.NEUROPSYCHOANALYSE.BLOGSPOT.COM, Abfrage am 08.07.2008).

### Arbeitsgedächtnis

Im Jahre 1958 wurde erstmals die Existenz eines temporären Kurzzeitgedächtnisses angenommen (BROWN, 1958). Zehn Jahre später stellten ATKINSON und SHIFFRIN (1968) ein Zwei- Komponenten- Modell vor. Dabei konnten Informationen über ein temporäres Kurzzeitspeichersystem, das als „Vorkammer“ bezeichnet wurde, letztendlich im permanenten Langzeitgedächtnis abgespeichert werden (ATKINSON und SHIFFRIN, 1968). Schließlich wurde dieses temporäre Kurzzeitspeichersystem zum Drei- Komponenten- Modell (BADDELEY und HITCH, 1974) weiterentwickelt, welches aus dem visuell- räumlichen Skizzenblock, der phonologischen Schleife und dem übergeordneten Kontrollsystem, der zentralen Exekutive, besteht (BADDELEY, 1998). Nach heutigem Erkenntnisstand komplettiert eine vierte Komponente, der episodische Speicher, das Modell des Arbeitsgedächtnisses (BADDELEY, 2000).

Im Allgemeinen lässt sich das Arbeitsgedächtnis (siehe Abb. 03) als Medium mit einer begrenzten Speicherkapazität charakterisieren (BADDELEY, 1996). Zunächst müssen Informationen selektiv gefiltert werden, um anschließend reflektiert werden zu können

(BADDELEY, 1998). Zur Untersuchung des Arbeitsgedächtnisses im Tiermodell mit komplexen Aufgabenstellungen wie Verstehen, Lernen und logisches Denken, ist es daher essenziell, mehrere Versuchsdurchläufe pro Tag durchzuführen (BADDELEY, 2000).



**Abbildung 03:** Darstellung des aktuellen Multikomponentenmodells des Arbeitsgedächtnisses (modifiziert nach BADDELEY, 2000).

Die **zentrale Exekutive** ist im Lobus frontalis lokalisiert und übernimmt als obere Schaltzentrale des Arbeitsgedächtnisses koordinierende Aufgaben (BADDELEY, 1998).

Der sog. **visuell- räumliche Skizzenblock**, der hauptsächlich in der rechten Hirnhemisphäre aktiv ist, speichert visuelle Informationen, z. B. Form und Farbe, in einer bestimmten Region des Lobus okzipitalis, während räumliche Informationen eher innerhalb des Lobus frontalis verarbeitet werden (BADDELEY, 1998). Auch das Erfassen kinästhetischer Daten erfolgt über den visuell- räumlichen Skizzenblock (BADDELEY, 2000).

Die Funktion der sog. **Phonologischen Schleife** wurde sehr intensiv an Patienten mit Defiziten im Kurzzeitgedächtnis erforscht. Die phonologische Schleife verwendet einen temporären Speicher, in dem akustische oder sprachbasierte Informationen verarbeitet werden können. Tritt innerhalb von zwei oder drei Sekunden keine erneute Wiederholung dieser Information auf, lassen die Erinnerungen spontan nach (BADDELEY, 1996).

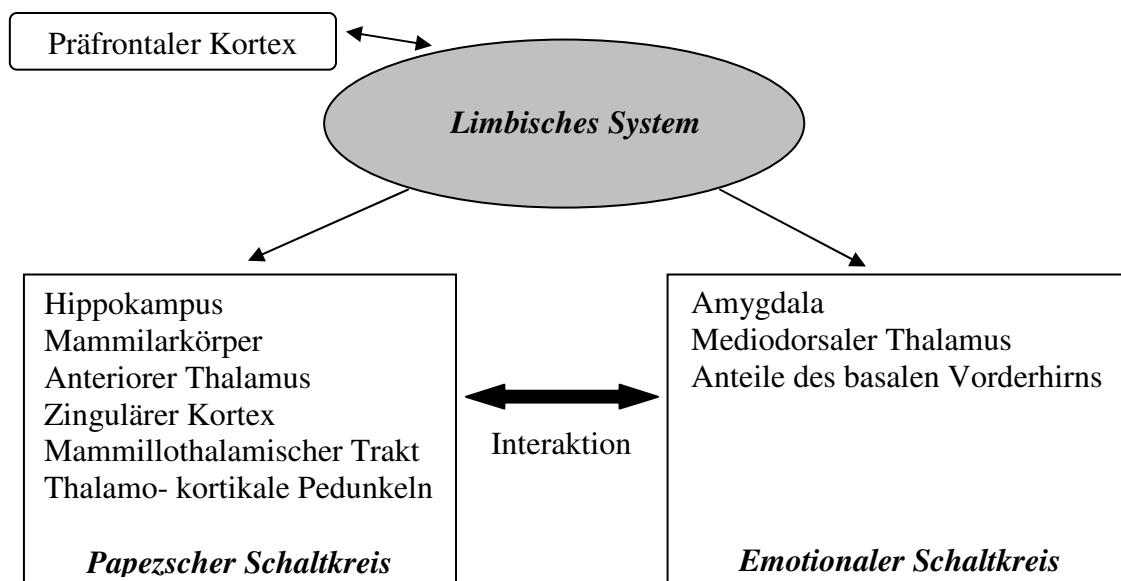
Der **episodische Speicher** besitzt eine begrenzte Kapazität für Informationen und ist in der Lage, Daten unterschiedlicher Herkunft zu verknüpfen. Außerdem agiert er als wichtige

Verbindung zwischen Kurzzeitgedächtnis und episodischem Langzeitgedächtnis (BADDELEY, 2000).

### 2.1.1.2 Gedächtnis im anatomischen Zusammenhang

Neuronale Korrelate für die verschiedenen Gedächtnisformen konnten anhand hirngesunder und hirngeschädigter Individuen identifiziert werden. Man nimmt an, dass Strukturen des limbischen Systems, eine ringförmige Ansammlung neuronaler Geflechte unterhalb der Großhirnrinde, relevant für die Informationsspeicherung und deren Übertragung in das Langzeitgedächtnis sind (CALABRESE und MARKOWITSCH, 2003).

Man unterscheidet im limbischen System zwei Schaltkreise, die untereinander verbunden sind, und während des Einspeicherungsprozesses interagieren (siehe Abb. 04). Zum klassischen sog. „Papezschen“ Schaltkreis zählen folgende Strukturen: Hippokampus, Mammilarkörper, anteriorer Thalamus, zingulärer Kortex, mammillothalamischer Trakt, sowie die thalamo- kortikalen Pedunkeln. Der zweite Schaltkreis besteht aus Amygdala, mediodorsalem Thalamus und Anteilen des basalen Vorderhirns und beschreibt emotionale Aspekte. Die hippokampalen Anteile koordinieren die Übertragung der Information vom Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis (CALABRESE und MARKOWITSCH, 2003).



**Abbildung 04:** Schematische Zeichnung des limbischen Systems mit Darstellung des Papezschen und emotionalen Schaltkreises, sowie des präfrontalen Kortex (modifiziert nach CALABRESE und MARKOWITSCH, 2003).

Eng mit dem limbischen System ist auch der in der Hirnrinde liegende präfrontale Kortex verbunden (siehe Abb. 04), der als funktionell inhomogene Struktur mit dem Temporallappen interagiert (OLTON, 1989). Der präfrontale Kortex ist in verschiedene Prozesse, wie z. B. Aufmerksamkeits- und Anpassungsprozesse involviert und übernimmt wichtige Funktionen im Arbeits- und Kurzzeitgedächtnis (SANCHEZ-SANTED et al., 1997).

### **2.1.1.3 Vergleichende kognitive Funktionen bei Mensch und Nagetier**

Um kognitive Dysfunktionen beim Menschen charakterisieren zu können, setzt man in der Forschung am häufigsten Nagetiere ein (STECKLER und MUIR, 1996). Jedoch gibt es kontroverse Meinungen zur Fragestellung, ob bei Mensch und Nagetier überhaupt gleiche anatomische Hirnstrukturen oder neurochemische Wege, die z. B. verantwortlich für Amnesie und Demenz sind, vorliegen. Grund dieser umstrittenen Einstellung ist die Verwendung vieler gleicher Verhaltensparadigmen zur Evaluierung der Kognition bei Mensch und Nager, die aber eigentlich unterschiedliche Aspekte der Kognition bewerten (STECKLER und MUIR, 1996).

Um kognitive Fähigkeiten bei Mensch und Nager nun vergleichen zu können, müssen zunächst verschiedene psychologische Prozesse, die die Aufgabenstellung betreffen, identifiziert werden. Zum anderen muss sichergestellt werden, dass beide Spezies in der Lage sind, analoge Paradigmen erfüllen zu können. Schließlich muss gewährleistet sein, dass neuronale Manipulationen vergleichbare Verhaltensänderungen verursachen und damit den Beweis für analoge Prozesse liefern können. Oftmals besteht aber eine klare Notwendigkeit, eine Anpassung einiger Variablen beider Spezies vorzunehmen, damit die kognitiven Paradigmen möglichst ähnlich sind (STECKLER und MUIR, 1996).

Auch im Hinblick auf die Komplexität einer Aufgabenstellung müssen häufig Modifikationen durchgeführt werden, da ähnliche Aufgaben bei Mensch und Ratte verschiedene Prozesskapazitäten erfordern. So kann man beispielsweise die Dauer oder Frequenz der Reizeinwirkung oder die Anzahl an Wahlmöglichkeiten der jeweiligen Spezies angleichen (STECKLER und MUIR, 1996).

Prinzipiell hängt die kognitive Leistungsfähigkeit von zwei Faktoren ab: von der neuronalen Effizienz, die die Präzision der Leistung bestimmt, und zum anderen von der Motivation und dem Erregungszustand, die als wichtige Parameter für Verhaltensweisen fungieren. Aussagen

über vergleichbare kognitive Prozesse bei Mensch und Ratte kann man aus diesem Grund nur treffen, wenn sich Motivation und Erregungszustand nicht verändern (STECKLER und MUIR, 1996). Studien von MCEWEN und SAPOLSKY (1995) zeigten, dass durch Stress kognitive Leistungen bei Mensch und Tier über zwei Wege beeinflusst werden: zunächst führt eine stress- induzierte, sehr schnelle Katecholaminfreisetzung zu emotionalen Gedächtnisverlusten (Amygdala). Bei einer langandauernden Stresssituation kommt es durch die Glukokortikoidwirkung zudem zu einer kognitiven Abschwächung des deklarativen Gedächtnisses durch einen irreversiblen Verlust von Neuronen v. a. im Hippokampus (MCEWEN und SAPOLSKY, 1995).

Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen den beiden Spezies ist die Fähigkeit des Menschen, sich über verbale Kommunikation zu verständigen. Eine Möglichkeit, den Einfluss verbaler Prozesse im interspezies- spezifischen Vergleich zu reduzieren, besteht darin, Aufgaben mit abstrakten Reizen zu gestalten, die zudem schwer zu verbalisieren sind (STECKLER und MUIR, 1996).

Es gibt aber auch einige Paradigmen, die eine Vergleichbarkeit der Gedächtnisprozesse zwischen Nagetier und Mensch zulassen. Die Funktion des Kurzzeitgedächtnisses wird beim Menschen häufig mit Hilfe eines Tests beurteilt, bei dem Begriffe erlernt und anschließend wiedererkannt und abgerufen werden können. Dabei erzielen die Probanden sowohl bei den ersten, als auch bei den letzten Begriffen bessere Leistungen. Dieses Phänomen bezeichnet man auch als „Primacy- und Recency- Effekt“ (KESNER, 1985). Ähnliche Ergebnisse konnten bei Ratten im „Radial- Acht- Arm- Maze“- Test erreicht werden. Hierbei wurden die Tiere, nachdem sie eine Futterbelohnung in einem der acht Arme gefunden haben, für eine Minute oder zwei Stunden aus der Versuchsanordnung genommen. Im anschließenden Wiederholungstest konnte beobachtet werden, dass die Ratten den zuletzt korrekt besuchten Arm bevorzugen (KESNER, 1985). In einer Studie von ROTHBLAT et al. (1993) wurde ein weiteres Paradigma für die interspezifische Vergleichbarkeit von Mensch und Nagetier beschrieben. Man konnte belegen, dass Ratten in der Lage sind, Objekte in einem räumlichen Testumfeld zu erfassen, zu erlernen und später wieder zu erkennen (ROTHBLAT et al., 1993).

Schließlich wird es möglich, durch Wahl eines geeigneten Tiermodells, das vergleichbar mit beim Menschen verwendeten kognitiven Tests ist, kognitive Dysfunktionen medikamentös zu beeinflussen (STECKLER und MUIR, 1996). In einer Vergleichsstudie zu Auswirkungen von Läsionen im frontalen Kortex bei Ratte, Affe und Mensch, konnte KOLB (1984) zeigen, dass

trotz enormer Unterschiede im relativen Volumen des frontalen Neokortex eine bemerkenswert vergleichbare funktionelle Einheit zwischen den drei Spezies besteht.

### **2.1.2 Untersuchung der Neurokognition**

Kognition ist der Kern menschlichen Verhaltens. Kognitive Fähigkeiten ermöglichen dem Menschen, tagtäglich Aktivitäten nachzugehen, Reize seiner Umwelt wahrzunehmen, zu verstehen, zu interpretieren und sein Verhalten durch vorherige Erfahrungen anzupassen, um letztendlich durch zielgerichtetes und planerisches Agieren im sozialen Umfeld zurecht zu kommen. Treten dennoch kognitive Defizite auf, wie z. B. in Folge von Schlaganfall oder nach herzchirurgischen Eingriffen (DECKER, 1995), schränken diese den Betroffenen in seinem Alltag ein, und führen so zu erheblichem Verlust von Lebensqualität.

Aus diesem Grund ist es unerlässlich, Studien vorwiegend am Tiermodell durchzuführen, um grundlegende Hirnstrukturen, elektrophysiologische und biochemische Mechanismen, sowie Lern- und Gedächtnisprozesse zu charakterisieren (DECKER, 1995).

#### **Tiermodelle der kognitiven Funktion**

Im Bereich der Erforschung kognitiver Defizite wurden in den letzten Jahren vielfältige Verhaltenstests etabliert. Dabei kommen häufig Labyrinthsysteme zur Anwendung, die in erster Linie konzipiert wurden, um Orts- Lernen und Gedächtnis zu untersuchen. Diese lassen sich anhand unterschiedlichster Kriterien einteilen. Man kann beispielsweise zwischen einfachen und hoch strukturierten Versuchssarenen oder zwischen vorhandenen oder fehlenden visuell- räumlichen, assoziativen oder sensorischen Hinweisen unterscheiden. Solche Testsysteme können hinsichtlich der Aufgabenstellung auch auf Basis spontaner Exploration oder komplexer Wahlmöglichkeiten beruhen. Zudem existieren Verhaltenstests, die, abhängig von der Motivation, zu Fluchtreaktionen (aversive Flucht), Rückzug oder Neugierverhalten bezüglich Futter oder neuen Objekten führen (HODGES, 1996). Im Folgenden wird eine Auswahl etablierter Verhaltenstests kurz beschrieben.



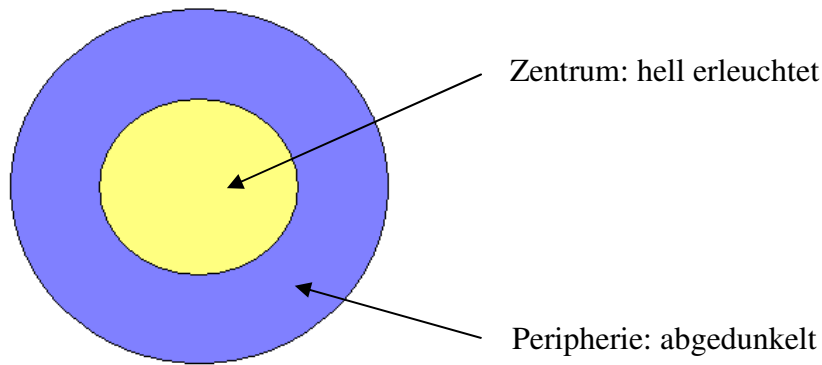
## **„Open- Field“- Test**

Zur Untersuchung des Angstverhaltens von Ratten wurde der sog. „Open- Field“ (offenes Feld)- Test erstmals 1934 von HALL beschrieben. Das „Open- Field“ besteht aus einer hell erleuchteten zirkulären Arena mit einem Durchmesser von 1,2 m und 0,45 m hohen Wänden (siehe Abb. 05). Nach Einsetzen der Ratte in den äußeren Bezirk der Arena findet eine Beobachtung über zwei Minuten statt. Tiere mit einem ausgeprägten Angstverhalten meiden die zentrale Fläche und zeigen zudem vermehrte Defäkation im Vergleich zu weniger ängstlichen Tieren (HALL, 1934).

Mittlerweile gibt es diverse Modifikationen dieses Testsystems, was die Form, nämlich rund, rechteckig oder quadratisch, die Größe, die Zeitdauer von zwei bis 20 Minuten, den Ort des Einsetzens der Ratte, etwa zentral oder peripher, die Beleuchtung oder Bereicherung der Testarena mit einer Plattform oder einem Tunnel betrifft (PRUT und BELZUNG, 2003). Im „Open- Field“ erfolgt eine erzwungene Konfrontation mit einer neuen Umgebung. Eine in ihrem Verhalten physiologische Ratte wird den zentralen Bereich meiden und sich im äußeren Areal der Testarena aufhalten. Diese Präferenz kann mit dem Begriff „Thigmotaxis“ umschrieben werden. Im Allgemeinen liefert der „Open- Field“- Test relevante Erkenntnisse zu angstbezogenem Verhalten (Thigmotaxis, gesteigerte Defäkations- und Putzfrequenz), lokomotorischer Aktivität (horizontale Lokomotion) und allgemeiner Exploration (Aufrichten auf die Hinterbeine) (CRABBE, 1986; CLEMENT et al., 1997; PRUT und BELZUNG, 2003).

Angstverhalten im „Open- Field“ kann durch folgende zwei Faktoren ausgelöst werden: einerseits durch die Testsituation an sich, in der das Tier von seinen Artgenossen separiert ist und andererseits durch die sog. „Agoraphobie“. Mit diesem Begriff bezeichnet man die Angst, die entsteht, wenn sich Mensch oder Tier in einer relativ weiträumigen Umgebung aufhalten, im Vergleich zum gewöhnlichen und begrenzten Lebensraum (PRUT und BELZUNG, 2003).

Aufgrund der schnellen Durchführbarkeit und des geringen Aufwandes ist der „Open- Field“- Test als Verhaltensexperiment allgemein sehr beliebt (LISTER, 1990) und wird auch bei anderen Tierspezies wie z. B. Kalb, Schwein, Lamm, Kaninchen, Huhn, Primat oder Hummer angewendet (PRUT und BELZUNG, 2003).



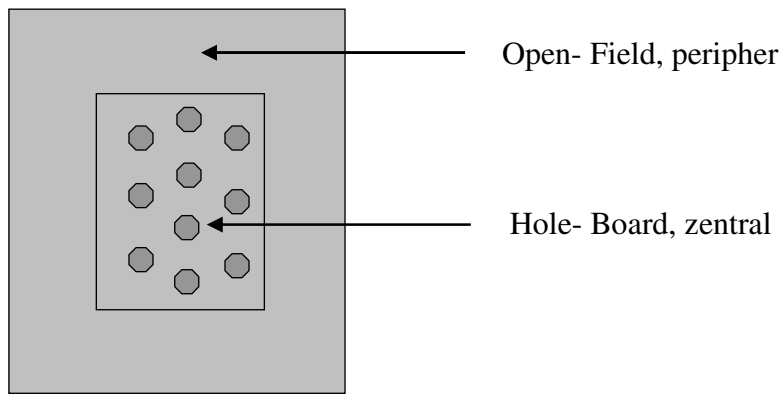
**Abbildung 05:** Schematische Zeichnung des „Open- Field“ mit zentralem und peripherem Bereich (modifiziert nach HALL, 1934).

### **Der klassische Hole- Board- Test**

Das von BOISSIER und SIMON (1962) entwickelte klassische Hole- Board (HB) (Lochplattensystem) wurde primär zur quantitativen Auswertung des Neugierverhaltens bei Mäusen, die einer neuen Umgebung ausgesetzt wurden, konzipiert und anschließend erweitert, um zusätzlich die Motilität zu erfassen (BOISSIER und SIMON, 1964; FILE und WARDILL, 1975; WEISCHER, 1976). Aufgrund steigenden Interesses wurde 1973 das klassische Hole- Board an die Ratte adaptiert (FILE, 1973; FILE und POPE, 1974).

### **Der modifizierte Hole- Board- Test**

Der modifizierte Hole- Board- Test (mHBT) vereint sowohl den „Open- Field“-, als auch den klassischen Hole- Board- Test in einem einzigen Test (siehe Abb. 06) und ermöglicht so, verschiedene Parameter, wie kognitive Fähigkeiten, Angstverhalten, Risikobewertung, allgemeine Erregung, Explorationsverhalten, lokomotorische Aktivität und soziale Affinität zu erfassen (OHL et al., 2001a; OHL et al., 2001b).



**Abbildung 06:** Schematischer Aufbau des modifizierten Hole- Board- Tests mit zentralem Hole- Board und peripherem Open- Field (modifiziert nach OHL, 2003).

Ursprünglich wurde das modifizierte Hole- Board- Paradigma von OHL et al. (1998) entwickelt, um Effekte von psychosozialen Stress auf das unconditionierte Verhalten, sowie kognitive Funktionen bei Tupaia (asiatische Spitzhörnchen) zu erforschen. Mögliche irritierende oder stressbehaftete Einflüsse, wie z. B. das Einsetzen in die neue Testumgebung, Futterentzug oder andere Zwänge, lassen sich vermeiden, indem man die Tiere in ihrem bekannten Käfig, dem sog. „Homecage“, testet (OHL et al., 1998). Drei Jahre später wurde schließlich der modifizierte Hole- Board- Test an die Ratte adaptiert (OHL et al., 2001b).

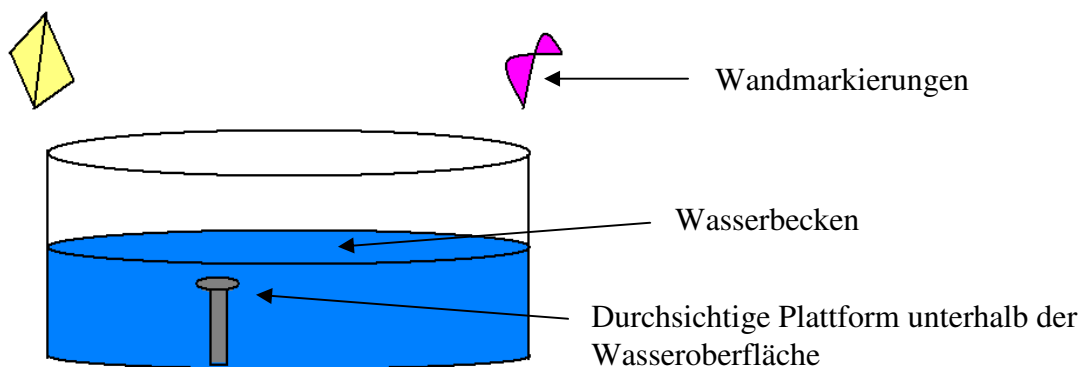
Der mHBT basiert auf dem Konzept, dass Nagetiere ihr vielfältiges Verhaltensrepertoire nur dann umfassend zeigen, wenn sie eine adäquat angereicherte Testumgebung vorfinden (OHL und KECK, 2003). Die Aufgabe der Ratte besteht nun darin, die Löcher auf dem modifizierten Hole- Board gezielt aufzusuchen, die markiert sind und eine Futterbelohnung enthalten. Auf diese Weise können komplexe kognitive Aussagen zu räumlichen oder visuell-räumlichen Funktionen getroffen werden (OHL et al., 1998).

Als Variante des modifizierten Hole- Boards (mHB) kann das Zylinderboard genannt werden, welches in der vorliegenden Studie verwendet wird. Es wurde bei Mäusen zur Erforschung kognitiver Funktionen, sowie bestimmter Verhaltensparameter eingesetzt (OHL et al., 2003). Oben offene Zylinder ersetzen hierbei die beweglichen Deckel des gewöhnlichen mHB. Dadurch wird die Testsituation im Schwierigkeitsgrad insgesamt leichter, was bei Tieren mit motorischen Defiziten von Vorteil sein kann.

## „Morris- Water- Maze“- Test

Zur Erforschung räumlicher kognitiver Funktionen entwickelte MORRIS 1981 den sog. „Morris- Water- Maze“- Test (MWM). Dieses Wasserlabyrinth besteht aus einem zirkulären Schwimmbecken (Durchmesser 2,14 m, Höhe 0,40 m), welches mit 26 °C warmem Wasser gefüllt ist (siehe Abb. 07). Einen Zentimeter unterhalb der Wasseroberfläche befindet sich eine für die Ratte unsichtbare, neun cm große und immer an derselben Stelle lokalisierte Plattform. Außerhalb der Versuchsanordnung dienen Markierungen im Raum zur Orientierung. Weiterhin erfolgt eine Aufteilung des Beckens in verschiedene Zonen, um zusätzlich angstbezogenes Verhalten untersuchen zu können. Ein längerer Aufenthalt im äußeren geschützten Bereich (Thigmotaxis) spricht demnach für ein verstärktes Angstverhalten (MORRIS, 1984).

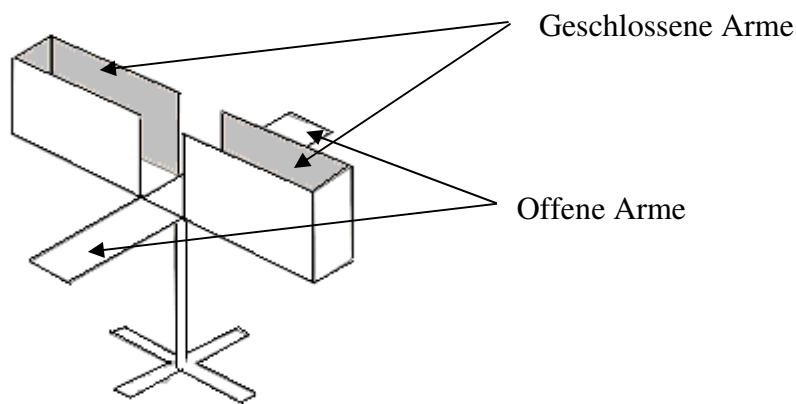
Im MWM bedient man sich des natürlichen Fluchtverhaltens aus dem Wasser auf eine „rettende“ Plattform. Die Aufgabe der Ratte besteht nun darin, nach Einsetzen in das Becken schwimmend die Plattform zu erreichen, wobei sich die Ratte anhand der Markierungen im Raum orientiert. Nach Erfassen der Thigmotaxis und der Schwimgeschwindigkeit können mit diesem Test Aussagen zu Angst und Motivation getroffen werden. Die ermittelte Versuchsdauer und zurückgelegte Schwimmstrecke kodieren hierbei Funktionen des Arbeitsgedächtnisses, sowie des visuell- räumlichen Gedächtnisses (HODGES, 1996).



**Abbildung 07:** Darstellung und Aufbau des „Morris- Water- Maze“ mit Plattform, Wasserpegel und Wandmarkierungen (modifiziert nach MORRIS, 1984).

## “Elevated- Plus- Maze”- Test

Einer der am häufigsten angewendeten Tests zur Beurteilung unkonditionierten Angstverhaltens stellt der sog. „Elevated- Plus- Maze“ (EPM)- Test dar, der von PELLOW et al. (1985) entwickelt wurde (siehe Abb. 08). Die Versuchsanordnung besteht aus einem erhöhten Ganglabyrinth mit vier Armen (Plus- Form), wobei zwei gegenüberliegende Arme durch Wände geschlossen und zwei Arme offen sind (PELLOW et al., 1985; OHL, 2003). Prinzipiell wird die Ratte zentral in das EPM gesetzt und für fünf Minuten observiert. Dieser Test basiert auf Beobachtungen von MONTGOMERY und MONKMAN (1955), wonach Nagetiere erhöhte ungeschützte Flächen meiden. Dabei stehen die Tiere in einem ständigen Konflikt zwischen Neugierde auf und Angst vor Novitäten. Beurteilt werden die Zeitdauer, die das Tier in dem jeweiligen offenen oder geschlossenen Arm verbringt und die Anzahl der Besuche (WALF und FRYE, 2007). Mit diesem Test können zusätzlich die lokomotorische Aktivität (OHL, 2003), aber auch Gehirnstrukturen (limbisches System, Hippokampus, Amygdala), die das Verhalten beeinflussen, analysiert werden (WALF und FRYE, 2007).

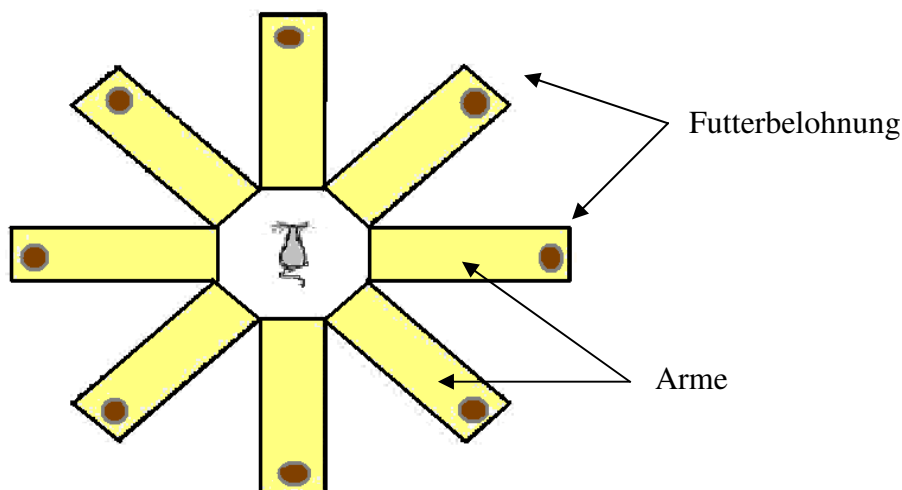


**Abbildung 08:** Skizzierte Darstellung des „Elevated- Plus- Maze“- Tests mit offenen und geschlossenen Armen (modifiziert nach WALF und FRYE, 2007).

## “Radial- Arm- Maze”- Test

Der sog. „Radial- Arm- Maze“ (RAM)- Test wurde 1976 von OLTON und SAMUELSON entwickelt und ursprünglich zur Untersuchung räumlicher Lern- und Gedächtnisprozesse bei Ratten eingesetzt. Das RAM (siehe Abb. 09) besteht aus einer zentralen Plattform mit meist acht strahlenförmig angelegten Armen, Varianten von vier bis 17 Armen sind möglich. Am Ende eines jeden Armes findet die Ratte eine Futterbelohnung. Aufgabe des Tieres ist es nun, alle Arme hintereinander zu besuchen, die Futterbelohnung zu fressen, und sich im weiteren Verlauf zu erinnern, welche Arme sie schon besucht hat (CRUSIO und SCHWEGLER, 2005).

Der RAM- Test erlaubt es, Aussagen zum räumlichen Gedächtnis, sowie zum Arbeitsgedächtnis zu treffen. Durch Modifizierungen des Tests, z. B. nur partiell vorhandene Futterbelohnungen, kann zusätzlich das Langzeitgedächtnis untersucht werden (HODGES, 1996).



**Abbildung 09:** Schematische Darstellung des „Radial- Arm- Maze“ mit Anordnung der Arme und Futterbelohnung, zentrales Einsetzen der Ratte (modifiziert nach CRUSIO und SCHWEGLER, 2005).

## 2.2 Extrakorporale Zirkulation (EKZ)

### 2.2.1 Anwendung der EKZ

Die extrakorporale Zirkulation (EKZ) mit Hilfe der Herz- Lungen- Maschine (HLM) wurde erstmals zu Beginn der 50er Jahre des letzten Jahrhunderts von den Pionieren DENNIS et al. (1951) und GIBBON (1954) angewendet. Durch Korrektur eines kongenitalen interatriellen Septumdefekts gelang es GIBBON 1953 als erstem, erfolgreich einen herzchirurgischen Eingriff mit EKZ am Menschen durchzuführen (KIRKLIN et al., 1956).

Generell findet bei der EKZ eine Umleitung des Blutkreislaufes außerhalb des Körpers statt, um so zentrale Herz- oder Gefäßabschnitte während entsprechender chirurgischer Eingriffe stillzulegen. Die EKZ findet des Weiteren Anwendung bei Eingriffen an größeren Arterien, in diesem Fall als arterioarterieller Shunt ohne Pumpfunktion nach Abklemmen des erkrankten Abschnitts. Überwiegend setzt man die EKZ allerdings als venoarterielle Umleitung des gesamten Kreislaufs mit Hilfe der HLM, dem sog. „kardiopulmonalen Bypass“ (cardiopulmonary bypass, CPB), ein (ROCHE-LEXIKON, 2003).

Durch jahrelange technische Weiterentwicklung der EKZ und verbesserte Anästhesie, konnte die Morbidität signifikant reduziert und die Mortalitätsrate für die meisten der durchgeführten herzchirurgischen Eingriffe deutlich gesenkt werden (TAYLOR, 1998). So beträgt in der Kinderherzchirurgie die Mortalitätsrate nach Korrektur kongenitaler Herzerkrankungen nur noch ca. 5 % (BISSONNETTE et al., 2000). Trotzdem bleiben neurologische und kognitive Defizite, die eine gravierende postoperative Morbidität bedingen, präsent (ARROWSMITH et al., 2000). So leiden bis zu 25 % der Kinder nach herzchirurgischen Eingriffen unter postoperativen neurologischen Defiziten (BISSONNETTE et al., 2000). Generell steigt die Inzidenz neurologischer Dysfunktionen nach herzchirurgischen Eingriffen auf das 12,5-fache an, im Vergleich zu Operationen am peripheren Gefäßsystem oder Brustkorb (SMITH et al., 1986).

Während in Deutschland jährlich ca. 96.000 Herzoperationen mit EKZ stattfinden (WWW.BRUCKENBERGER.DE, Abfrage am 22.07.2008), werden in Nordamerika jedes Jahr mehr als 500.000 operative Eingriffe mit EKZ durchgeführt. In Relation zur Bevölkerungsdichte beträgt demnach die Inzidenz operativer Eingriffe mit EKZ sowohl in Nordamerika, als auch in Deutschland 0,001 %. Als neurologische und kognitive

Komplikationen können dabei Schlaganfall, postoperatives Delirium sowie Störungen des Kurz- und Langzeitgedächtnisses auftreten. Solche postoperativen kognitiven Defizite (postoperative cognitive deficits, POCD) mindern die Lebensqualität der Betroffenen und stellen eine große Belastung für die Gesellschaft dar, wenn etwa ältere Patienten ihre Unabhängigkeit verlieren. Häufig sind damit auch verlängerte Klinikaufenthalte und Einweisungen in Pflegeheime oder andere betreute Einrichtungen verbunden (GAO et al., 2005). Bei geschätzten weltweit 800.000 Patienten mit Koronararterien- Bypassoperationen pro Jahr, belaufen sich die zusätzlichen jährlichen Klinikkosten auf annähernd 400 Millionen US \$ (ROACH et al., 1996).

Als Komplikationen einer EKZ treten postoperative kognitive Defizite mit einer hohen Inzidenz von 60 % bis acht Tage nach der Operation auf. Nach acht Wochen und zwölf Monaten beträgt die Inzidenz immer noch 25 bis 30 %. Schlaganfälle kommen insgesamt mit einer Inzidenz von 2 bis 3 % vor, wobei ältere Menschen einem erhöhten Risiko ausgesetzt sind (TAYLOR, 1998). Das Schlaganfallrisiko nach herzchirurgischen Eingriffen erhöht sich demnach bei über 75-jährigen Patienten von 3 % auf mehr als 6 % (DIELEMAN et al., 2006). Studien zu Koronararterien- Bypassoperationen konnten zeigen, dass kognitive Defizite bei Entlassung aus der Klinik bei 53 % der Patienten vorliegen. Die Inzidenz sinkt nach sechs Wochen auf 36 % und nach sechs Monaten auf 24 %. Allerdings steigt dieser Studie zufolge innerhalb von fünf Jahren nach Operation die Inzidenz für kognitive Defizite von 24 % wieder auf 42 % an (NEWMAN et al., 2001).

## **2.2.2 Pathophysiologische Aspekte und Defizite nach EKZ**

### **Zerebraler Blutfluss**

Die physiologische Blutflussrate beim Mensch beträgt 3 bis 3,2 l/m<sup>2</sup>/min. Unter der EKZ erfolgt üblicherweise eine Reduzierung auf 2,2 bis 2,4 l/m<sup>2</sup>/min (TAYLOR, 1998). Mit fortschreitendem Temperaturabfall während der EKZ mit DHCA nimmt der Sauerstoffbedarf und -verbrauch des Gewebes stufenweise ab. Beträgt der Sauerstoffverbrauch des gesamten Körpers bei 37 °C noch 0,12 l/m<sup>2</sup>/min unter einem Blutfluss von 2,4 l/m<sup>2</sup>/min, so sinkt der Sauerstoffverbrauch bei 20 °C auf 0,033 l/m<sup>2</sup>/min ab. Es konnte in Studien gezeigt werden, dass es möglich ist, die Blutflussrate bei einer Kerntemperatur von 28 °C sicher auf 1,6 l/m<sup>2</sup> und bei einer Kerntemperatur von 20 °C auf immer noch adäquate 1,2 l/m<sup>2</sup> zu reduzieren (FOX et al., 1982).



In Bezug auf die Reduktion des zerebralen Blutflusses unter normothermer EKZ scheint das Gehirn relativ resistent zu sein. Erst bei einem Abfall des Blutflusses unter 0,01 l/100g/min oder weniger als 20 % der normalen Werte tritt ischämischer Zelltod auf. Unter hypothermer EKZ liegt der Schwellenwert für Zellschädigung noch niedriger (ASTRUP et al., 1977).

Faktoren, die die zerebrale Hämodynamik und den Metabolismus während einer EKZ beeinflussen, können extrinsischer Herkunft sein, wie z. B. Verlust der Pulsatilität, geringer oder fehlender Blutfluss, Hypothermie oder Embolien. Als intrinsischen Faktor bezeichnet man beispielsweise eine Störung in der Autoregulation des zerebralen Blutflusses (DUPLESSIS, 1997). DERNEVIK et al. (1985) führten Studien zum zerebralen Blutfluss zu Beginn einer nicht- pulsatilen EKZ im Tiermodell an Hunden durch. Hierbei sank der zerebrale Blutfluss auf Werte von 9 bis 30 % ab (DERNEVIK et al., 1985). In einer weiteren Untersuchung konnte belegt werden, dass mit Beginn einer normothermen EKZ ein gleichzeitiges Absinken des zerebralen Blutflusses und der zerebralen metabolischen Rate für Sauerstoff um 30 % beobachtet werden kann (MURKIN et al., 1987).

### **Ätiologie kognitiver Defizite nach EKZ**

Die Ätiologie kognitiver Defizite nach EKZ scheint multifaktoriell, wobei folgende Ursachen eine wichtige Rolle zu spielen scheinen: zerebrale Mikroembolien, globale zerebrale Hypoperfusion, systemische und zerebrale Inflammation, zerebrale Ödeme, zerebrale Temperaturschwankungen, Permeabilität der Blut- Hirn- Schranke oder genetische Prädisposition (GROCOTT et al., 2005).

### **Zerebrale Mikroembolien**

Während einer EKZ können mehrere zehntausende Emboli entstehen: exogen durch Interaktion des Blutes mit der fremden Oberfläche der EKZ und der daraus resultierenden Aktivierung der Blutgerinnungskaskade, andererseits endogen durch Ablösung atheromatösen Materials bzw. Verschleppung von Luft aus dem Operationsgebiet. Man unterscheidet dabei strukturell zwischen gasförmigen und korpuskulären Emboli (GROCOTT et al., 2005), sowie der Größe nach zwischen Makro- und Mikroemboli (ARROWSMITH et al., 2000). Während Mikroembolien eher in kleinen Arterien, Arteriolen und Kapillaren auftreten, beeinträchtigen Makroembolien den Blutfluss in Arterien mit einem Durchmesser von mindestens 200 µm (ARROWSMITH et al., 2000).

Die genaue Zusammensetzung zerebraler Mikroembolien ist noch nicht vollständig geklärt. Es konnte aber gezeigt werden, dass Emboli größtenteils gasförmig sind. Die Schädigung durch diese Art Mikroembolien erfolgt auf unterschiedliche Art und Weise. Sehr kleine Luftblasen können enge Arteriolen verschließen und damit direkt eine Ischämie auslösen. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass diese Luftblasen Thrombozyten, Leukozyten, sowie die Komplementkaskade aktivieren, was zusätzlich zu einer lokalen Schädigung des betroffenen Gewebes und einer Verschlimmerung des ischämischen Insults führt (BORGER et al., 2001).

Korpuskuläre Emboli können zum einen aus biologischen Partikeln, wie beispielsweise Aggregaten aus Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten, denaturiertem Protein oder Fibrin, sowie aus Fett, Haaren, Atheromen, Klappendebris oder Muskelfragmenten bestehen. Zum anderen können sie auch nicht- biologisches Material enthalten, so z. B. Polyvinylchlorid, Silikon, Wattestäbchenfasern oder Staub (ARROWSMITH et al., 2000).

Die Anzahl zerebraler Embolien korreliert auch mit atheromatösen Ablagerungen im aufsteigenden Ast der Aorta und im Aortenbogen (MACKENSEN et al., 2003). Bei einer mäßigen bis schwerwiegenden proximalen Atherosklerose der Aorta steigt dabei, im Gegensatz zu Patienten ohne signifikante Plaques, das Risiko eines zerebralen Schadens auf das vierfache an (ROACH et al., 1996).

### **Globale zerebrale Hypoperfusion**

Als weiterer Faktor bei der Entstehung neurokognitiver Defizite wird die globale zerebrale Hypoperfusion während der EKZ diskutiert, welche sehr häufig mit einer verlängerten systemischen Hypotension assoziiert ist (GROCOTT et al., 2005). Besonders schwerwiegende neurologische Schäden treten hier bei hypotensiven Patienten mit ausgeprägter atheromatöser Aorta auf (GOLD et al., 1995). Wird ein Gefäß durch einen atheromatösen Embolus verschlossen, besteht die Möglichkeit, dass auch die kollaterale Perfusion durch die systemische Hypotension reduziert ist (SILLESEN et al., 1988).

### **Einfluss der Temperatur**

Experimentell konnte gezeigt werden, dass Temperatur ein Modulator zerebraler Schäden ist. Hypothermie während der EKZ schützt das Gehirn und wirkt auf Grund des reduzierten Sauerstoffverbrauchs neuroprotektiv. Somit kann die EKZ zeitlich verlängert werden (COOK, 2001). Zusätzlich führt die Hypothermie zerebral zu einem Anstieg energiereicher Phosphate

aufgrund des geringeren Verbrauchs, und erhöht damit den intrazellulären pH- Wert, sodass die Resistenz gegenüber Ischämie potentiell erhöht wird (AOKI et al., 1993).

Einer retrospektiven Studie über die Abkühlungsrate zufolge ist es von bedeutender Relevanz, eine langsame Abkühlung bei einer EKZ durchzuführen, da man in einer längeren Abkühlungsphase homogenere Gehirntemperaturen erreicht. Wird schneller abgekühlt, besteht die Möglichkeit, dass sich die metabolische Aktivität nur ungleichmäßig reduziert (BELLINGER et al., 1991). Die zerebralen hämodynamischen und metabolischen Effekte der Hypothermie korrelieren mit der Tiefe der Abkühlung. Die Beziehung zwischen zerebraler metabolischer Rate von Sauerstoff ( $O_2$ ) und Hypothermie kann mit der van't Hoff'schen Konstante,  $Q_{10}$ , beschrieben werden. Diese Konstante legt die Relation der gemessenen zerebralen metabolischen Raten von  $O_2$  vor und nach einem zehn Grad Celsius Abfall der Temperatur dar: Während der zerebrale Blutfluss mit sinkender Temperatur linear abnimmt, verringert sich die zerebrale metabolische Rate von  $O_2$  exponentiell zur abfallenden Temperatur. Bei einer Temperatur von 28 °C reduziert sich demnach der Sauerstoffverbrauch des Gesamtkörpers um 50 bis 60 %, sowie bei einer Temperatur von 18 °C um 85 bis 90 % (GREELEY et al., 1991).

Während der Wiedererwärmungsphase nach der EKZ kann es jedoch durch eine zu schnelle Erwärmung zu einem starken Anstieg der zerebralen Temperatur kommen (GROCOTT et al., 2005), da Wärme größtenteils zunächst an hoch perfundierte Organe, wie das Gehirn, abgegeben wird. Hyperthermie kann zerebrale Ischämien verstärken und damit das Risiko für neurologische und kognitive Defizite erhöhen (COOK, 2001). Unter dieser Prämisse konnten GROCOTT et al. (2002) eine Korrelation zwischen der maximalen Temperatur 24 Stunden postoperativ und kognitiven Defiziten sechs Wochen nach EKZ aufzeigen.

Nach Erhöhung der Temperatur im Anschluss an eine Ischämie von 35 auf 39 °C, steigt die Anzahl geschädigter zerebraler Neurone von 20 auf 75 %. Hyperthermie verursacht dabei eine Ausweitung der zerebralen Ischämie über mehrere Mechanismen, beispielsweise verstärkte Freisetzung von Neurotransmittern, wie Glutamat, Gamma-Aminobuttersäure (GABA) und Glyzin, erhöhte Radikalproduktion, gesteigerte Permeabilität der Blut- Hirn- Schranke, erhöhte Anzahl ischämischer Depolarisationen, beeinträchtigte Erholungsphase des Energiemetabolismus, verstärkte Hemmung der Proteinkinase, sowie Verstärkung der zytoskeletalen Proteolyse (GINSBERG und BUSTO, 1998). Zudem besteht eine Verbindung zwischen Hyperthermie und Entwicklung ischämischer Nekrosen. Klinische Studien haben gezeigt, dass Kinder, die postoperativ deutlicher unter den Folgen postoperativer kognitiver Defizite

leiden, tendenziell viel schneller eine postoperative Hyperthermie entwickelt haben. Die Gründe sind hierfür allerdings unklar (COOK, 2001).

### **Hämodilution**

Hypothermie beeinflusst die rheologischen Eigenschaften des zirkulierenden Blutes und beeinträchtigt damit den zerebralen Blutfluss durch die nun höhere Viskosität. Um die Fließeigenschaften des Blutes während der hypothermen EKZ zu verbessern, führt man aus diesem Grund häufig eine Hämodilution durch, wobei überwiegend ein Hämatokrit zwischen 20 und 25 % angestrebt wird. Durch die Hämodilution erhöht sich der zerebrale Blutfluss, ohne dabei die metabolische Sauerstoffrate im Gehirn zu beeinflussen (DU PLESSIS, 1997).

### **Zerebrale Inflammation**

Man weiß, dass durch Interaktion des Blutes mit Fremdoberflächen (Schlauchsystem, Membranoxygenator), wie sie während der EKZ besteht, durch Leukozytenaktivierung nach Reperfusion ischämischen Gewebes, durch Endotoxinfreisetzung aus dem Darm und nicht zuletzt durch das operative Trauma selbst eine inflammatorische Reaktion ausgelöst werden kann (PINTAR und COLLARD, 2003). HINDMAN et al. (2001) konnten nach EKZ an Ratten zeigen, dass z. B. eine Hochregulierung zerebraler Zykllooxygenase-2 (COX-2) mRNA- Expression stattfindet. Es ist aber nicht vollständig geklärt, ob diese Genexpression durch die Inflammation per se verursacht wird.

Zudem können zerebrale inflammatorische Reaktionen durch eine Endotoxämie verursacht werden. Während der EKZ kommt es zu einer Hypoperfusion und Vasokonstriktion der Darmmukosa. In Folge dessen können bakterielle Endotoxine aus der geschädigten Darmmukosa in das zirkulierende Blut gelangen und so inflammatorische Zellen aktivieren. Endotoxine bestehen aus Lipopolysacchariden (LPS), die den Zellwänden der zugrunde gegangenen gramnegativen Bakterien entstammen. LPS aktivieren die Koagulationskaskade, das Komplementsystem, die Freisetzung von Sauerstoffradikalen aus neutrophilen Zellen und verstärken deren Adhäsion an vaskuläre endotheliale Zellen (DOHERTY et al., 1989). MATHEW et al. (2003) konnten in diesem Zusammenhang nachweisen, dass ein geschwächtes Immunsystem bzw. eine niedrige präoperative Konzentration an Immunglobulin M mit einem erhöhten Risiko postoperativer kognitiver Defizite korreliert.

Ferner kann es als Ergebnis einer systemischen Entzündung zu einer zerebralen Hyperthermie kommen. Senken ließe sich dieses postoperative Fieber, welches oft durch inflammatorische

Mediatoren nach der EKZ ausgelöst wird, mit Hilfe einer Hoch- Volumen- Hämofiltration innerhalb der ersten 24 Stunden nach Operation (JOURNOIS et al., 1996).

Es gibt allerdings keine klinischen Beweise, sondern lediglich Vermutungen, inwieweit inflammatorische Reaktionen mit zerebralen Schäden nach herzchirurgischen Eingriffen in Verbindung gebracht werden können (GROCOTT et al., 2005). Die Zusammenhänge zwischen systemischer und zerebraler Inflammation werden unter 2.4 (siehe Seite 27) detailliert behandelt.

### **Zerebrales Ödem**

Nach Beenden einer normo- oder hypothermen EKZ kann eine postoperative Hirnschwellung mit Hilfe der Magnetresonanztomographie sehr bald festgestellt werden. Es besteht allerdings noch Unklarheit, inwiefern neurologische Defizite mit zerebralen Ödemen in Verbindung gebracht werden können und welche Mechanismen dabei eine Rolle spielen (HARRIS et al., 1998). Möglicherweise werden zerebrale Ödeme durch Hyponatriämie induziert, oder treten sekundär nach globaler zerebraler Hypoperfusion als zytotoxisches Ödem auf (GROCOTT et al., 2005). Eine gesteigerte Permeabilität der Blut- Hirn- Schranke führt vermutlich ebenfalls zu zerebralen Ödemen. Eine Beurteilung, ob Veränderungen der Blut- Hirn- Schranken- Permeabilität primär oder sekundär als Resultat anderer Prozesse wie Ischämie durch Mikroembolien oder zerebrale Inflammation entstehen, bleibt jedoch aufgrund kontroverser Studienergebnisse problematisch (GROCOTT et al., 2005).

### **Genetische Prädisposition**

Genetische Komponenten spielen ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese einer POCD, im Hinblick auf den Grad der Hirnschädigung und der Fähigkeit des Gehirns zur Rekonvaleszenz (GAO et al., 2005; GROCOTT et al., 2005).

Der Mensch exprimiert das Apolipoprotein E (ApoE), ein 34 Kilodalton (kD) großes glykosyliertes Lipid- bindendes Protein, in Gestalt dreier Isoformen ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  oder  $\epsilon 4$ ) (ARROWSMITH et al., 2000). Man weiß, dass die Präsenz des  $\epsilon 4$ - Allels im ApoE- Gen das Risiko für das Vorkommen sporadischer oder spät- auftretender Formen der Alzheimer- Erkrankung erhöht (GAO et al., 2005; GROCOTT et al., 2005). Interessanterweise können fortschreitende atheromatöse Erkrankungen der Aorta und frühe Re- Stenosen nach koronarer Angioplastik auch mit dem  $\epsilon 4$ - Allel im ApoE- Gen assoziiert werden (HIXSON, 1991).

Es besteht ferner eine Verbindung zwischen dem  $\epsilon 4$ - Allel im ApoE- Gen und einer funktionell schlechteren Leistungsfähigkeit nach subarachnoidalen Blutungen (ARROWSMITH et al., 2000). JORDAN et al. (1997) erbrachten den Beweis, dass bei Boxern, die chronisch durch Gehirntraumen gefährdet sind, ein erhöhtes Risiko für schwerwiegende neurologische Defizite vorliegt, wenn das  $\epsilon 4$ - Allel im ApoE- Gen exprimiert wurde. Auf genetischer Ebene scheint zudem der Polymorphismus des Thrombozyten- Integrinrezeptors eine wichtige Rolle bezüglich der Ätiologie akuter Herzinfarkt- Syndrome, sowie anderen thrombotischen Erkrankungen zu spielen (GROCOTT et al., 2005).

### 2.3 EKZ mit tief- hypothermem Kreislaufstillstand

Die EKZ mit tief- hypothermem Kreislaufstillstand (deep hypothermic circulatory arrest, DHCA) findet breite Anwendung bei herzchirurgischen Eingriffen zur Behandlung beispielsweise der Fallot'schen Tetralogie, Transposition großer Arterien und Defekten des Ventrikelseptums (EHYAI et al., 1984; OATES et al., 1995). 1953 wurde erstmalig der erfolgreiche Verschluss eines Ventrikelseptumdefekts unter Hypothermie während eines 5 ½ Minuten andauernden Kreislaufstillstands von LEWIS und TAUFIC (1953) durchgeführt. In den späten 60er Jahren des letzten Jahrhunderts konnte der technisch weiterentwickelte DHCA als wichtige Erweiterung der standardisierten EKZ verwendet werden (EHYAI et al., 1984). Mit Hilfe des DHCA werden optimale Operationsbedingungen für den Chirurgen, wie beispielsweise ein blutleeres Operationsfeld mit einem relaxierten und bewegungslosen Herz, geschaffen (OATES et al., 1995).

Obwohl die Mortalitätsrate nach herzchirurgischen Korrekturen gerade bei Kindern deutlich gesunken ist, hat man eine Zunahme neurologischer Defizite und Verzögerungen in der Entwicklung der betroffenen Kinder beobachtet (BELLINGER et al., 1991). Nach herzchirurgischen Eingriffen kommen neurologische Defizite laut FERRY (1990) bei 25 % der Kinder vor. Nach komplexen palliativen Eingriffen zur Behandlung des hypoplastischen Linksherzsyndroms, welches zu den schwerwiegendsten angeborenen Herzfehlern zählt, muss bei 45 % der jungen Patienten mit neurologischen Defiziten gerechnet werden. Kinder mit solch gravierenden kongenitalen Herzfehlern leiden häufig schon präoperativ unter hämodynamischen Dysfunktionen, wie beispielsweise Hypoxie, Hyperkapnie, Azidose, Hypotonie und/oder Hypo- bzw. Hyperglykämie. Diese Vorerkrankungen können zu hyp-

oxisch-ischämischen Läsionen und intrazerebralen Hämorrhagien bereits vor den korrektiven Eingriffen führen (GLAUSER et al., 1990). Als mögliche postoperative Folgen nach EKZ mit DHCA treten Bewusstseinsveränderungen, Krämpfe, generalisierte oder multifokale Schlaganfälle, Hypotonie, Ataxie, abnormaler Muskeltonus, (Hemi-) Paresen, Dyskinesien, Rigidität und Beeinträchtigungen des Intellekts auf (BRUNBERG et al., 1974).

WELLS et al. (1983) konnten bei Kindern zeigen, dass herzchirurgische Eingriffe mit EKZ und DHCA zu einer Abnahme des Intelligenzquotienten (IQ) führen. Dabei besteht eine direkte Korrelation zur Dauer des DHCA (WELLS et al., 1983). Die Assoziation zwischen DHCA-Dauer und IQ konnten WYPIJ et al. (2003) nach D-Transposition großer Arterien bei Kindern bestätigen. Je länger der DHCA, umso stärker sind demnach der IQ, die Feinmotorik, sowie die Sprachentwicklung beeinträchtigt (WYPIJ et al., 2003). Einer anderen Studie zufolge, die sich ebenfalls mit kognitiven Fähigkeiten nach Transposition der großen Arterien bei Kindern beschäftigte, liegen die Ursachen für einen reduzierten IQ nicht nur an der Dauer des DHCA, sondern auch an der Abkühlungsrate. Es konnte eine Verknüpfung zwischen geringerer Abkühlungszeit und einer verzögerten Entwicklung der Kinder hergestellt werden (BELLINGER et al., 1991). Wird der DHCA um jeweils zehn Minuten verlängert, verschlechtert sich dabei das IQ-Ergebnis um drei bis vier Punkte (OATES et al., 1995).

BELLINGER et al. (1999) untersuchten in einer weiteren Studie die Entwicklung und neurologische Fähigkeiten vierjähriger Kinder, bei denen ebenfalls eine D-Transposition der großen Arterien mit DHCA durchgeführt wurde. Anhand diverser Tests konnte belegt werden, dass deutliche Defizite in der Grob- und Feinmotorik, sowie in der Sprachentwicklung auftreten. Diese Kinder hatten auch Schwierigkeiten, oromotorische und faziale Bewegungen auszuführen, sowie greifen und gehen zu können. Im Gegensatz zur neurologischen Funktion waren die kognitiven Fähigkeiten jedoch überraschenderweise mit der Gruppe, die keinem DHCA unterzogen wurde, vergleichbar (BELLINGER et al., 1999).

### **Pathologische Aspekte der EKZ mit DHCA**

Als ausschlaggebende schädigende Mechanismen während des DHCA gelten die durch Hypoxie ausgelöste Ischämie, sowie Reperfusionsschäden (DU PLESSIS, 1997). In einer Autopsiestudie an Kindern im Alter von einem Tag bis zu vier Jahren, die an kongenitalen Herzdefekten litten, konnten kortikale laminare Nekrosen, periventrikuläre Leukomalazien, parasagittale Schäden und fokale Infarkte aufgezeigt werden (BOZOKY et al., 1984).

Während unter normothermem Kreislaufstillstand v. a. das Striatum negativ beeinträchtigt wird, scheint unter DHCA eine maximale Schädigung in den Basalganglien, vorwiegend im Globus pallidus, vorzukommen. Ob der Hippokampus durch Hypoxie- Ischämie und Reperfusion geschädigt wird, kann aufgrund kontroverser Untersuchungen nicht eindeutig bestätigt werden (REDMOND et al., 1994).

Das Ausmaß globaler zerebraler Ischämie kann anhand des neuronalen Zellschadens bestimmt werden. Sechs Stunden nach DHCA ist bei Ratten eine Degeneration der Neurone im Nukleus reticularis thalami erkennbar und findet ihren Höhepunkt am postoperativen Tag drei. Im Gegensatz dazu tritt der neuronale Schaden in der CA1- Region des Hippokampus verzögert auf, mit Beginn am Tag drei und einem Anstieg bis Tag sieben. Die CA1- Region des Hippokampus stellt ein bestimmtes Neuronenzellband im Ammonshorn (Kornu ammonis, CA) dar (BOTTIGER et al., 1998).

Im Gegensatz zum normothermen Kreislaufstillstand scheint die Entwicklung postoperativ auftretender Hypoxie- Ischämie- und Reperfusionsschäden durch postischämische Hypothermie verzögert zu werden. Zudem werden CA1- Neurone des Hippokampus signifikant durch postischämische Hypothermie vor Degeneration geschützt (DIETRICH et al., 1993; REDMOND et al., 1994). Klinisch zeigt sich dies durch eine erhöhte Latenz bis zum Auftreten postoperativer Komplikationen, wie beispielsweise Schlaganfall (DU PLESSIS, 1995).

## 2.4 Zerebrale Inflammation

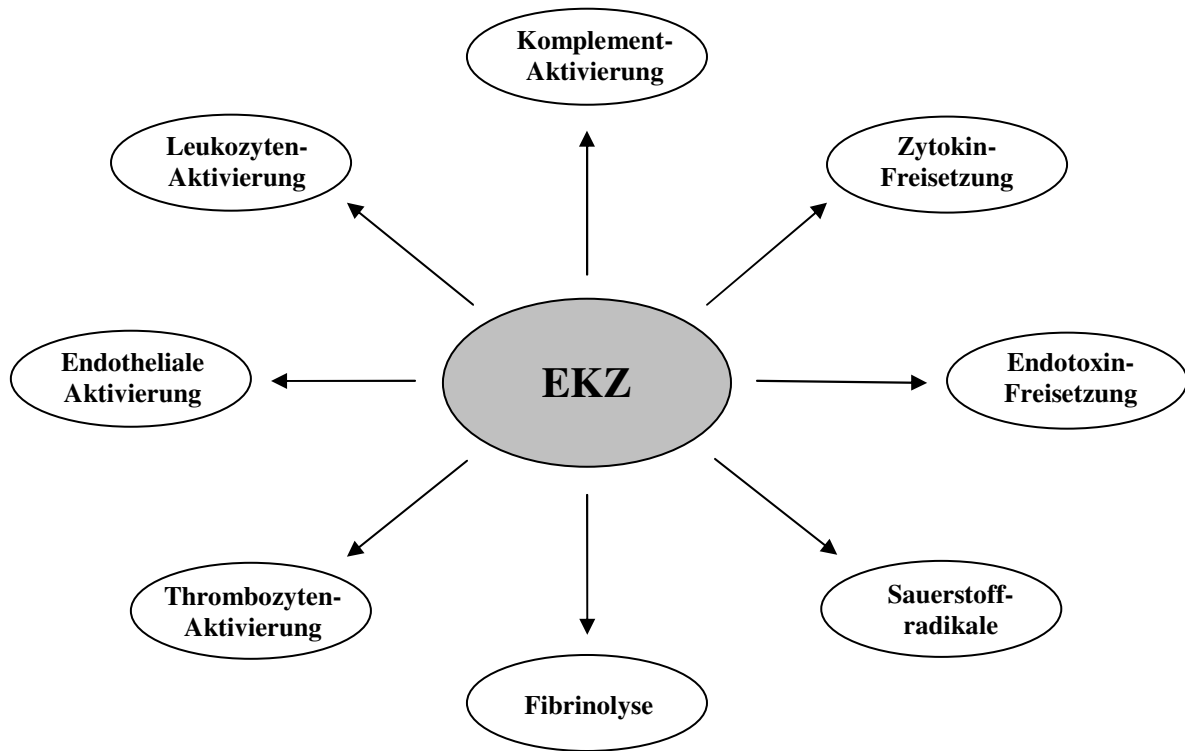
### 2.4.1 Allgemeines

Es ist bekannt, dass herzchirurgische Eingriffe eine komplexe systemische inflammatorische Reaktion auslösen. Dabei scheinen der Kontakt des Blutes mit den Fremdoberflächen der EKZ, ein intraoperativ auftretender Blutverlust, das chirurgische Trauma selbst oder Transfusionen während der EKZ eine Rolle bei der Entstehung einer systemischen Inflammation zu spielen (BUTLER et al., 1993). Eine systemische Entzündung, wie sie nach einer EKZ auftritt, wird durch die nachfolgend beschriebenen drei pathophysiologischen Mechanismen ausgelöst: (1) **direkte** Kontaktaktivierung des Immunsystems nach Interaktion des zirkulierenden Blutes mit der Fremdoberfläche des EKZ- Kreislaufs, (2) **indirekte** Aktivierung des Immunsystems durch Ischämie- Reperfusionsschäden in Gehirn, Herz, Lunge, Leber



und Niere (LAFHEY et al., 2002; GAO et al., 2005), sowie (3) **indirekte** Aktivierung der inflammatorischen Kaskade durch eine Endotoxämie (LAFHEY et al., 2002).

#### 2.4.2 Systemische und zerebrale Inflammation



**Abbildung 10:** Übersicht über die verschiedenen proinflammatorischen Ereignisse, die während und nach einer EKZ auftreten (modifiziert nach PINTAR und COLLARD, 2003).

Als Schlüsselkomponente jeder inflammatorischen Antwort kann die Aktivierung der Komplement- und Zytokinkaskade durch zahlreiche Immunmediatoren gelten, die innerhalb von Minuten nach dem Setzen des Primärschadens freigesetzt werden (siehe Abb. 10). Nach einer EKZ erfolgt als Reaktion auf ischämische Prozesse und Mikroembolien eine Temperatur- abhängige Produktion und Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren bzw. Zytokine, die wiederum endogene Entzündungszellen aktivieren. Je niedriger die Temperatur während der EKZ ist, desto geringer fällt die Entzündungsantwort aus (GAO et al., 2005).

Zu den Zytokinen zählen u. a. Lymphozyten- aktivierende Mediatoren, sowie Lymphokine. In physiologischen und pathophysiologischen Immunprozessen übernehmen Zytokine als Transmitter wichtige Aufgaben bei sog. „Zell- zu- Zell“ Verbindungen. Hierbei sind sie in extrem niedrigen Konzentrationen von  $10^{-10}$  bis  $10^{-15}$  Molar (M) aktiv und können dabei aufgrund ihrer hoch affinen spezifischen Rezeptoren an viele Zellen binden (BENDTZEN, 1988). Im

Allgemeinen werden die systemische Entzündungsantwort und die möglicherweise daraus resultierenden postoperativen Defizite von der jeweiligen Dominanz pro- oder anti-inflammatorischer Mediatoren bestimmt (MCBRIDE et al., 1996).

### **Proinflammatorische Zytokine**

Makrophagen können als sog. „Fresszellen“ fremde Mikroorganismen oder Produkte von diesen, wie z. B. Endotoxine (LPS) durch Phagozytose aufnehmen. Anschließend kommt es zu einer Synthese und Freisetzung u. a. folgender proinflammatorischer Zytokine: Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) (BENDTZEN, 1988). Diese Zytokine sind Bestandteil einer kleinen Gruppe von Polypeptiden mit einem Molekulargewicht von 8 bis 24 kD und stellen potente endogene Pyrogene dar. Neben Makrophagen sind auch sog. „Natürliche Killerzellen“ (Natural Killer-Zellen, NK-Zellen) und B-Lymphozyten in der Lage, IL-1 zu produzieren. IL-1 ist wiederum notwendig, um aktivierte T-Lymphozyten zu induzieren (BENDTZEN, 1989). IL-6 wird zudem auch von Fibroblasten synthetisiert. Prinzipiell sind jedoch alle Zellen mit einem Zellkern befähigt, solche Peptide in geringem Ausmaß herzustellen (BENDTZEN, 1988).

TNF  $\alpha$  verursacht generell eine disseminierte intravasale Koagulopathie durch Leukozyten-Endothel-Interaktionen und ist häufig für allgemeine Schocksymptome und Freisetzung von Sauerstoffradikalen aus polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) verantwortlich (BENDTZEN, 1988; BRIX-CHRISTENSEN, 2001).

IL-6 wird v. a. unter Einfluss von IL-1 und TNF  $\alpha$  in Fibroblasten und endothelialen Zellen produziert und kann aus diesem Grund auch als sekundärer Mediator bezeichnet werden (VAN DAMME et al., 1987). Die Freisetzung dieses Peptidhormons spiegelt das Ausmaß des Gewebeschadens wieder, kann demnach Hinweise auf postoperative Komplikationen geben (OKA et al., 1992) und ist im Serum nach einer EKZ in der Regel noch erhöht vorhanden (ASHRAF et al., 1999). Ob nun das chirurgische Vorgehen allein, die EKZ, oder die Kombination aus beidem für den Anstieg von IL-6 verantwortlich ist, scheint noch nicht vollständig geklärt zu sein (TARNOK et al., 1999). Des Weiteren kann IL-8 als proinflammatorisches Zytokin betrachtet werden. Es besitzt eine chemotaktische Potenz für PMN und kann im Tiermodell nach Applikation aufgrund der Akkumulation von PMN Lungenschäden verursachen (ROT, 1991).

## **Antiinflammatorische Zytokine**

Neben der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine kommen als antiinflammatorische Parameter die beiden Zytokine IL-10- und IL-1- Rezeptor- Antagonist (IL-10RA, IL-1RA), die während und nach herzchirurgischen Eingriffen mit EKZ an Kindern und Erwachsenen produziert werden, am häufigsten vor (MCBRIDE et al., 1996; DUVAL et al., 1999). Das sog. C-reaktive Protein (CRP), ein Akute- Phase- Protein, besitzt ebenfalls antiinflammatorische Eigenschaften: es hemmt die Chemotaxis der PMN und moduliert somit einen möglichen Endotoxinschock (MORTENSEN und ZHONG, 2000). Klinisch setzt man CRP sehr häufig auch als unspezifischen Marker für Infektionen ein, wobei dessen Plasmakonzentration mit dem Ausmaß des chirurgischen Traumas korreliert (BRIX-CHRISTENSEN, 2001).

## **Weitere Inflammationsparameter**

Als weitere systemische Entzündungsparameter können die beiden Enzyme Elastase und Myeloperoxidase genannt werden. Beide werden in neutrophilen Granulozyten exprimiert und fungieren als Marker für degranulierte PMN. Diese Enzyme lassen sich im peripheren Blut während und nach herzchirurgischen Eingriffen mit EKZ, sowie im Vergleich zum Erwachsenen in einer höheren Konzentration bei Kindern nachweisen (LARSON et al., 1996).

## **Zerebrale Inflammation**

Systemisch vorkommende proinflammatorische Zytokine während und nach der EKZ, wie beispielsweise IL-1, IL-6 und TNF  $\alpha$ , führen zu extensiven Veränderungen im Genexpressionsmuster des Gehirns, in der Neurochemie, im neuroendokrinen Status, in der Thermoregulation und in kognitiven Funktionen, was mit Verhaltensbeeinträchtigungen einhergeht (HINDMAN et al., 2001). Solche inflammatorischen Prozesse initiieren darüber hinaus zusätzlich die Hochregulierung endothelialer und leukozytärer Adhäsionsmoleküle und verstärken somit die Akkumulation von Leukozyten im geschädigten Hirngewebe (UTAGAWA et al., 2008).

Endotoxine und proinflammatorische Zytokine induzieren die Expression von Zyklooxygenase-2 (COX-2) und induzierbarer Nitroxidsynthase (iNOS) in der zerebralen Vaskulatur oder benachbarten perivaskulären Mikrogliazellen. In einer Studie konnte eine signifikant

erhöhte zerebrale Expression von COX-2 mRNA bei EKZ- Tieren im Vergleich zu scheinoperierten Tieren festgestellt werden (HINDMAN et al., 2001).

Durch die Produktion von COX-2 und iNOS im Gehirn kann es zu einer zerebralen Vasodilatation mit gesteigerter Permeabilität der Blut- Hirn- Schranke kommen (MAYHAN, 1998), zudem wird die Hypothalamus- Hypophysen- Nebennieren- Achse als Antwort auf die systemische Entzündung mit Fieber und Sekretion von Kortisol und adrenokortikotropen Hormonen moduliert (HINDMAN et al., 2001).

Auch die Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  wird sehr schnell im geschädigten Hirnbereich induziert und dort von aktivierten Astrozyten und Mikrogliazellen freigesetzt. UTAGAWA et al. (2008) zeigten in einer Studie, dass IL-1 $\beta$  Matrix- Metalloproteinase stimuliert, die ebenfalls die vaskuläre Permeabilität verändern und so zu extravasalen Blutungen in die graue und weiße Substanz des Rückenmarks führen können. IL-1 $\beta$  hat zudem die Fähigkeit, die Aktivität der Neurone zu beeinflussen. Demnach führt eine neuronal regulierte, erhöhte Glukokortikoidkonzentration im Blutplasma zu einer potenten Immunsuppression und einer Aktivierung hepatischer Akute- Phase- Proteine (LACROIX und RIVEST, 1998).

### **2.4.3 Inflammationsparameter**

#### **2.4.3.1 Zyklooxygenase (COX)**

Anfang der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts wurden inflammatorisch wirkende Enzyme, sog. Zyklooxygenasen (COX), erstmals beschrieben. Es konnte damals gezeigt werden, dass nicht- steroidale Antiphlogistika (NSAIDs) in der Lage sind, die Aktivität dieser Zyklooxygenasen, und damit verbunden die Prostaglandinsynthese, zu hemmen (MINGHETTI, 2004). COX- Proteine, auch als Prostaglandin H<sub>2</sub>- Synthasen bezeichnet, spielen eine wichtige Rolle im katalytischen Schritt der Prostaglandinsynthese. COX- Enzyme induzieren zunächst eine Oxidation der Arachidonsäure zum instabilen Prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) und anschließend eine Reduktion des PGG<sub>2</sub> zum stabilen Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) mit Hilfe einer Peroxidase- vermittelten Reaktion. Aus PGH<sub>2</sub> entstehen letztendlich durch andere Enzyme verschiedene Unterformen der Prostaglandine wie beispielsweise Thromboxan A<sub>2</sub> und B<sub>2</sub>, Prostazyklin und die Prostaglandine D<sub>2</sub>, E<sub>2</sub> und F<sub>2</sub> (MINGHETTI, 2004; SIMMONS et al.,

2004). Die ca. 73 kD großen COX- Proteine kommen in drei verschiedenen Isoformen vor: COX-1, -2 und -3.

COX- Proteine, die im Allgemeinen zur Gruppe der langkettigen Fettsäure- Oxygenasen und damit zu den Pathogen- induzierbaren Oxygenasen zählen, sind in den Lumina von Zellkernhülle und endoplasmatischem Retikulum lokalisiert (GILROY und COLVILLE-NASH, 2000). Unter physiologischen Bedingungen werden die beiden Isoformen COX-1 und -2 in niedriger Konzentration v. a. in Gehirn, Hoden, sowie den Makula densa- Zellen der Niere exprimiert (SMITH et al., 1996; GILROY und COLVILLE-NASH, 2000).

Als Antwort auf proinflammatorische Moleküle, Zytokine und Wachstumsfaktoren nach akuten und chronischen Entzündungsprozessen erfolgt eine schnelle COX-2 Expression in exzitatorischen Neuronen des Hippokampus, der Amygdala und des Neo- und Allokokortex (KAUFMANN et al., 1996). Dabei zeigen COX-2 Enzyme ambivalente Eigenschaften: während sie unter physiologischen Bedingungen an normalen neuronalen Funktionen beteiligt sind, können sie nach Überexpression in Folge von Hypoxie, Ischämie und Krämpfen jedoch neurotoxisch reagieren (MINGHETTI, 2004). Zudem scheint die COX-2 Expression im Gehirn auch von Bedeutung für fundamentale Hirnfunktionen wie z. B. synaptische Plastizität oder Gedächtnis- und Lernprozesse zu sein (MINGHETTI, 2004).

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

TNF, ein potentes proinflammatorisches Zytokin, das in den frühen 80er Jahren des letzten Jahrhunderts isoliert wurde, übernimmt wichtige Funktionen in Bezug auf Immunität und Entzündung, sowie in der Kontrolle der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose (BAUD und KARIN, 2001).

TNF mit einer Größe von 17 kD umfasst die beiden genetisch und strukturell vergleichbaren Unterformen TNF  $\alpha$  und TNF  $\beta$ , ein von T-Lymphozyten abgeleitetes sog. „Lymphotoxin“ (BENDTZEN, 1989). Der inflammatorische Mediator Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), der ehemals als Kachektin bezeichnet wurde, wird zum großen Teil von aktivierten Makrophagen freigesetzt, die durch LPS stimuliert wurden. LPS bzw. Endotoxine besitzen daher die größte Potenz, TNF zu induzieren. Zudem werden durch TNF die Zytokine IL-1 und IL-6 (TONNESEN et al., 1996), sowie der Nukleäre Transkriptionsfaktor kappa B (NF $\kappa$ B) hochreguliert (MEYER et al., 1991).

In Bezug auf das zentrale Nervensystem geht man davon aus, dass das Protein TNF  $\alpha$  aus der systemischen Zirkulation nicht direkt über die Blut- Hirn- Schranke in das Gehirn übertreten kann. Vielmehr interagiert TNF  $\alpha$  mit Zellen im sog. „Organum vaskulosum der Lamina terminalis“, einem zirkumventrikulären Organ, das sich rostral des Hypothalamus befindet und keine Blut- Hirn- Schranke besitzt. Von dort aus wird die Synthese von TNF  $\alpha$  in den Neuronen des ZNS gesteuert (BREDEDER et al., 1993).

Im Gehirn befindet sich auch ein eigenständiges zentrales Makrophagen- und Zytokinsystem (LIEBERMAN et al., 1989). Unter physiologischen Bedingungen scheinen die Zytokin-Rezeptoren im „Organum vaskulosum der Lamina terminalis“ vorwiegend mit solchen Zytokinen zu interagieren, die aus Axonenden freigesetzt wurden (BREDEDER et al., 1993). Vor Kurzem hat man aber auch Neurone identifiziert, die eine COX- Immunreaktivität aufweisen. Diese Neurone scheinen zu Beginn einer Prostaglandinantwort mit zirkulierenden Zytokinen in Verbindung zu stehen. Da Prostaglandine klein und lipophil sind, können sie kurze Strecken im zentralen Nervensystem diffundieren und stellen somit eine kritische Verbindung zwischen Neuronen im „Organum vaskulosum“ mit dem zerebralen Zytokinsystem und dem zentralen Zytokinsystem her (BREDEDER et al., 1993).

#### **2.4.3.3 Nukleärer Faktor kappa B (NF $\kappa$ B)**

Der Transkriptionsfaktor Nukleärer Faktor kappa B (NF $\kappa$ B) mit einer Größe von 51 kD (MEYER et al., 1991) übernimmt wichtige regulatorische Funktionen in der Immun- und Inflammationsantwort. Zudem scheint NF $\kappa$ B in die Reaktivität und Replikation vieler Viren, in der embryonalen Entwicklung, in der Zellproliferation und Kontrolle der Apoptose, der neuronalen Entwicklung und Neurodegeneration involviert zu sein (BAEUERLE und BALTIMORE, 1996). Unterschiedliche Zelltypen, wie beispielsweise T- und B-Zellen, sowie die Zytokine IL-1 und TNF  $\alpha$ , aber auch Endotoxine, sind in der Lage, die Synthese von NF $\kappa$ B als Antwort auf intra- und extrazellulären Stress zu aktivieren (BOWIE und O'NEILL, 2000).

NF $\kappa$ B befindet sich als inaktive Form im Zytoplasma unstimulierter Zellen. Diese inaktive Form besteht aus einem aktiven Dimer, an dem ein inhibitorisches Protein, das sog. „Inhibitorische Protein kappa B“ (I $\kappa$ B), gebunden vorliegt. Die in vielen Zellen überwiegend vorherrschende inaktive Form des NF $\kappa$ B besitzt ein Dimer mit den Untereinheiten p50/p65, welches mit I $\kappa$ B $\alpha$  assoziiert ist und so NF $\kappa$ B im Zytosol der Zelle hält. Alle NF $\kappa$ B-

Untereinheiten verfügen über eine homologe Region von 300 Aminosäuren, die auch als sog. „Rel- Domäne“ bezeichnet wird (BAEUERLE und BAICHWAL, 1997). Neben der hauptsächlich hemmenden Komponente I $\kappa$ B $\alpha$  existieren noch die weiteren inhibitorischen Untereinheiten I $\kappa$ B $\beta$  und I $\kappa$ B $\epsilon$  (WHITESIDE und ISRAEL, 1997).

Oxidativer Stress, wie z. B. eine hohe intrazelluläre Konzentration an Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Superoxid oder Hydroxylradikalen, sowie ein Kalzium- bzw. Glutamatüberschuss führen zu einer zellspezifischen Aktivierung von NF $\kappa$ B. Dabei stimulieren IL-1 und TNF  $\alpha$  als wichtige NF $\kappa$ B- induzierende Zytokine die beiden phosphorylierten I $\kappa$ B- Kinasen, IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  (BOWIE und O'NEILL, 2000). Die phosphorylierten I $\kappa$ B- Kinasen sind Bestandteil eines großen Multiproteinkomplexes, zu dem auch das sog. „IKK Complex- Associated Protein“ (IKAP) und der sog. „NF $\kappa$ B essential modulator“ (NEMO) gehören. In Folge dessen dissoziiert NF $\kappa$ B von I $\kappa$ B ab und transloziert als p50/p65- Dimer vom Zytoplasma in den Zellkern, wo letztlich die Gentranskription stattfindet (CLEMENS et al., 1997).

In einem Rattenmodell mit zweistündiger mittlerer Zerebralarterienokklusion (middle cerebral artery occlusion, MCAO) konnten Erkenntnisse zu NF $\kappa$ B gewonnen werden. Während der Ischämie und Reperfusion des Hirngewebes erfolgt eine Hochregulierung der interzellulären Adhäsionsmoleküle-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) auf der luminalen Oberfläche des zerebralen mikrovaskulären Endothels, was schließlich zu einer endothelialen Adhäsion und Transmigration von neutrophilen Zellen führt (MATSUO et al., 1994). Zusätzlich werden IL-1, IL-6, IL-8, TNF  $\alpha$ , TNF  $\beta$  und iNOS während der Reperfusion verstärkt synthetisiert, die alle über spezielle NF $\kappa$ B- Bindungssequenzen verfügen. In dieser Studie konnte bereits 15 Minuten nach Beginn der Reperfusion eine Aktivierung von NF $\kappa$ B festgestellt werden. Eine Stunde nach Reperfusion wurden jedoch wieder basale Ausgangswerte erreicht (CARROLL et al., 1998).

CLEMENS et al. (1997) zeigten ebenfalls die Aktivierung von NF $\kappa$ B, hier jedoch nach transienter globaler Ischämie des Vorderhirns. In intakten Neuronen konnte eine nur vorübergehende Stimulation von NF $\kappa$ B festgestellt werden. In diesem Zusammenhang könnte NF $\kappa$ B eine protektive Rolle übernehmen. Es ist bekannt, dass NF $\kappa$ B die Synthese des Mediators TNF  $\alpha$  in B-Zellen und Makrophagen anregt. TNF  $\alpha$  wiederum ist fähig, Neurone in der CA1- Region des Hippokampus (Zellkultur) zu schützen (BAEUERLE und HENKEL, 1994). Andererseits konnte eine persistente Aktivierung von NF $\kappa$ B in Ischämie- geschädigten Neuronen im Hippokampus bestätigt werden. Aus diesem Grund besteht die Annahme, dass NF $\kappa$ B am programmierten Zelltod im Hippokampus beteiligt sein könnte. Eine NF $\kappa$ B-

Aktivierung bei scheinoperierten Tieren wurde dagegen nicht beobachtet (CLEMENS et al., 1997).

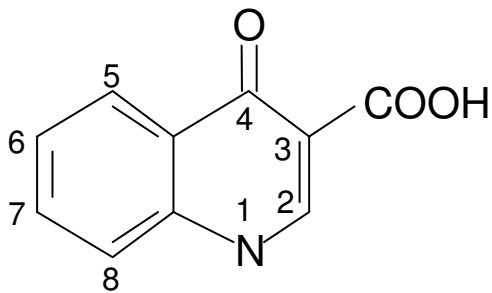
Durch die Verwendung antioxidativer Substanzen, wie beispielsweise N- Azetylcystein, das die intrazelluläre Glutathionkonzentration erhöht (BOWIE und O'NEILL, 2000), kann die NFκB- Aktivierung blockiert und somit eine signifikante Reduktion des Infarktausmaßes um 49 % nach 48 Stunden post operationem erreicht werden (CLEMENS et al., 1997). Auch weitere Antioxidantien, wie Vitamin E- Derivate und α-Liponsäure, können die NFκB- Aktivierung unterbinden (BOWIE und O'NEILL, 2000).

## 2.5 Moxifloxazin

### 2.5.1 Allgemeines

Moxifloxazin (MXF) ist ein Antibiotikum aus der Klasse der fluorierten Chinolone, auch als Gyrase- Hemmer bezeichnet, die sich generell in vier chemische Gruppen einteilen lassen: Chinolone, Cinnoline, Naphthyridine und Pyridopyrimidine. Hauptangriffspunkt aller Chinolone sind die beiden bakteriellen Enzyme, Topoisomerase II und IV, die eine wichtige Stellung bei der Synthese intakter bakterieller DNA einnehmen. Die Aufgabe der Adenosin- triphosphat- (ATP-) abhängigen Topoisomerase II, die sog. DNA- Gyrase, besteht darin, DNA- Doppelstränge zu spalten und durch Schleifenbildung wieder zu verdrillen. Die Topoisomerase IV ist dagegen maßgebend an der Trennung der replizierten DNA- Doppelstränge beteiligt. Die Fähigkeit der Chinolone, an diese Topoisomerasen zu binden, bedingt letztendlich die Hemmung der DNA- Synthese, Replikation, Transkription und Rekombination der bakteriellen DNA (FORTH et al., 2004).





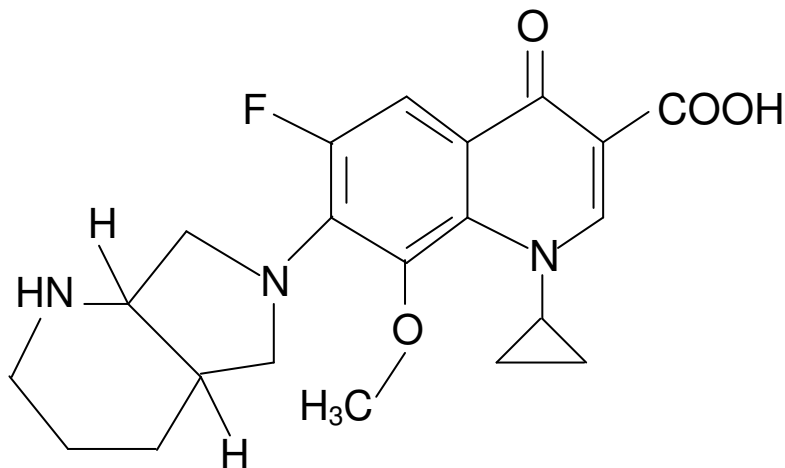
**Abbildung 11:** Allgemeines Grundgerüst der Chinolone als Schema (modifiziert nach BAUERNFEIND, 1997).

Als Ausgangssubstanz zur Herstellung dieser synthetischen Wirkstoffklasse (siehe Abb. 11) verwendete man 1962 erstmals Nalidixinsäure. 20 Jahre später wurde dann Norfloxazin, das erste an Position 6 fluorierte Chinolonderivat, welches zur Behandlung von bakteriellen Infektionen eingesetzt wurde, publik (FORTH et al., 2004).

MXF als Vertreter aus der Gruppe IV der Fluorchinolone wurde erstmalig 1999 von der Firma Bayer AG (Wuppertal) zur oralen Behandlung von Atemwegs- und Weichteilinfektionen mit dem Handelsnamen „Avalox ®“ neu zugelassen. Im Jahre 2002 wurde die Zulassung für „Avalox ®“ als Infusionslösung zur Behandlung ambulant erworbener Pneumonien, sowie 2005 zur Behandlung komplizierter Haut- und Weichteilinfektionen erweitert. Seit März 2009 besteht zudem die Möglichkeit, MXF als Monotherapie bei Infektionen des oberen weiblichen Genitaltraktes einzusetzen (FORSCHUNGSWERKSTATT MOXIFLOXACIN, 2005; WWW.ZCT-BERLIN.DE/NEUEINFUEHRUNGEN/MOXIFLOXACIN.HTML; WWW.PHARMAZEUTISCHE-ZEITUNG.DE/INDEX.PHP?ID=29451, Archiv 03/2009; Abfragen am 11.08.2009).

### 2.5.2 Wirkungsweise

MXF Hydrochlorid (BAY 12-8039) mit der ausführlichen chemischen Formel 1-Zyklopropyl-6-Fluor-8-Methoxy-7-[(4aS,7aS)-Oktahydro-6H-Pyrrolo[3,4-b]pyridin-6-yl]-4-Oxo-1,4-Dihydrochinolin-3-Karbonsäure und der Summenformel  $C_{21}H_{24}FN_3O_4$  ist ein Breitbandantibiotikum mit guter bakterizider Wirkung.



**Abbildung 12:** Strukturformel von Moxifloxazin (modifiziert nach STASS und KUBITZA, 1999).

Charakteristisch für die Struktur dieses Antibiotikums sind folgende Substitutionen am Molekül (siehe Abb. 12): Der Zyklopropylrest an Position 1 erhöht die antibakterielle Aktivität besonders gegen gramnegative Mikroorganismen, die Substitution mit Fluor an Position 6 verbessert den antibakteriellen Effekt um das 10 bis 100-fache und die für MXF spezifische Methoxygruppe an Position 8 optimiert die Bioverfügbarkeit und potenziert die Aktivität gegenüber anaeroben Bakterien (FORTH et al., 2004).

### 2.5.2.1 Pharmakokinetik

Mit einer breiten antibakteriellen Aktivität ist MXF gegen grampositive, gramnegative, sowie anaerobe Bakterien, aber auch gegen atypische Organismen wie Mykoplasmen, Legionellen und Chlamydien wirksam. MXF hat im Vergleich zu älteren Fluorchinolonen der ersten Generation einen weitaus größeren Effekt besonders im grampositiven Bereich und wirkt dosis- und konzentrationsabhängig gegen grampositive und gramnegative Bakterien (DALHOFF, 1999). SIEFERT et al. (1999) führten Studien zu pharmakokinetischen Eigenschaften von MXF beim Menschen, sowie anderen Säugetierspezies durch. Demnach wird MXF nach oraler Gabe primär über Duodenum und Jejunum innerhalb von zwei Stunden mit einer guten oralen Bioverfügbarkeit von 52 bis 91 % (Affe < Minischwein < Maus < Ratte < Hund, Mensch 82 %) schnell resorbiert (SIEFERT et al., 1999). STASS et al. (2001) konnten zeigen, dass eine gleichzeitige Gabe von Ranitidin oder Milchprodukten zu

MXF keine negativen Auswirkungen nach sich zieht, bzw. nur eine geringe Verzögerung in der Wirkung nach der Gabe am Ende einer fettreichen und hochkalorischen Mahlzeit auftritt (STASS et al., 2001). Die gleichzeitige Einnahme von Antazida oder Eisenpräparaten mit MXF reduziert allerdings dessen Absorption (MUIJSERS und JARVIS, 2002). Bei gesunden Probanden konnte nach einer oralen Einzeldosis von 400 mg eine maximale Blutplasmakonzentration von 4,4 mg/l ermittelt werden (HEINZL, 1999). Auch nach intravenöser Applikation erfolgt eine schnelle Verteilung aus dem Blutstrom hin zu peripheren Organen und Geweben. MULLER et al. (1999) zeigten, dass die Konzentration von MXF nach oraler Einzeldosis (400 mg) oder Infusionslösung (400 mg) über einen Zeitraum von einer Stunde im Speichel sowie im kapillären Blut ähnlich hoch ist wie im venösen Blutplasma (3,2 bis 3,7 µg MXF pro ml).

Als weitere markante Eigenschaft von MXF ist die hohe und freie Konzentration im Blutplasma aufgrund der schwachen Proteinbindungsfähigkeit (30 bis 42 %) zu nennen, die zu einer raschen Verteilung in den extra- und intrazellulären Raum führt und damit eine gute bakterizide Wirkung erzielt. Hierbei erfolgt die reversible Bindung hauptsächlich an das Plasmaprotein Albumin. Beachtenswert sind außerdem die gute Membran- und Gewebegängigkeit z. B. in Knochen oder entzündetes Gewebe (KALTEIS et al., 2006) sowie die Fähigkeit, sich in Makrophagen, Phagozyten und PMN trotz dort herrschendem, saurem intrazellulärem pH- Wert in hohen Konzentrationen anzureichern.

MXF durchläuft eine Phase- II Biotransformation und wird hepatisch und renal als unveränderte Substanz, sowie in Form inaktiver konjugierter Metabolite ausgeschieden. Nach oraler Gabe wird MXF über 96 % und nach intravenöser Applikation über 98 % aus dem menschlichen Körper eliminiert. Eine Phase- I Biotransformation unter Beteiligung des Zytochrom P450- Systems scheint bei MXF nicht statt zu finden (MUIJSERS und JARVIS, 2002). Es handelt sich bei den beiden inaktiven Metabolisierungsprodukten um N- Sulfo- und Azy- Glukuronid- konjugierte Metaboliten.

Mit einer langen Halbwertszeit von 12 bis 14 Stunden wird deshalb allgemein empfohlen, MXF als orale Einzeldosis (400 mg pro Tag) bzw. als Infusion (400 mg pro Tag) über einen Zeitraum von insgesamt einer Stunde, einmal täglich zu applizieren (STASS et al., 2001).

### **2.5.2.2 Pharmakodynamik**

BOSWELL et al. (1999) lieferten wichtige Erkenntnisse zu Abtötungszeiten von Bakterien und postantibiotischen MXF- Effekten folgender Bakterienstämme: Streptokokkus pneumoniae, Streptokokkus pyogenes, Hämophilus influenzae, Staphylokokkus aureus und Escherichia coli. MXF mit seiner bakteriziden Wirkung gegen sowohl grampositive, als auch gramnegative Bakterien, hat aber den weitaus größten Effekt gegen Staphylokokkus aureus und Escherichia coli. Außerdem besteht eine positive Korrelation zwischen MXF-Konzentration und postantibiotischen Effekten. Die Beurteilung dieser Effekte erfolgt durch Erfassung der Wachstumssuppression der mikrobiellen Organismen nach Kurzzeitexposition mit dem Antibiotikum MXF (BOSWELL et al., 1999).

#### **Intrazelluläre Aktivität**

MXF mit einer breit gefächerten antimikrobiellen Aktivität hat die Eigenschaft, sich intrazellulär in hohen Konzentrationen anzureichern. PASCUAL et al. (1999) führten Studien durch, um die Aufnahme und intrazelluläre Aktivität von MXF in humanen PMN (bestehend aus Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten) zu erforschen. MXF penetriert schnell in PMN- Zellen, bindet reversibel, erreicht eine mehr als neun mal höhere intrazelluläre Konzentration im Vergleich zur extrazellulären Konzentration und bleibt jederzeit intrazellulär aktiv (PASCUAL et al., 1999).

Weiterhin ist MXF bei Konzentrationen von ein bis 50 mg/l nicht sättigbar. Bei einer Temperatur von vier Grad Celsius (im Vergleich zu 37 °C) und pH- Werten von 3, 4, 10 und 13 kann jedoch eine Abschwächung in der intrazellulären Aufnahme beobachtet werden. Ursache dafür scheinen das bityklische Amin und der Methoxysubstituent an den Positionen 7 und 8 zu sein (PASCUAL et al., 1999).

In einigen Studien hat man den Mechanismus, wie aktivierte neutrophile Granulozyten und Monozyten Fluorchinolone intrazellulär anhäufen können, näher beleuchtet (WALTERS et al., 1999; BOUNDS et al., 2000). So sind zwei sättigbare, Natrium- und Temperatur-abhängige, sowie pH- sensitive Transportsysteme an der Fluorchinolon- Aufnahme beteiligt. Während das eine der Transportsysteme zwar eine geringe, dafür aber kontinuierliche Affinität zeigt, ist das zweite System, aktiviert z. B. durch Proteinkinase C, für Fluorchinolone hochaffin. Die Aufnahme von Fluorchinolonen in die neutrophilen Zellen scheint dabei so effektiv zu sein, dass die intrazelluläre Fluorchinolon- Konzentration um ein

vielfaches höher ist als die Plasmakonzentration (WALTERS et al., 1999; BOUNDS et al., 2000).

### **Immunmodulation, Hämatopoese und antiinflammatorische Effekte**

Chinolone haben in der Regel keine Wirkung auf intakte und unstimulierte Zellen (SHALIT et al., 2002). Neben antimikrobiellen Eigenschaften zeigt MXF auch immunmodulatorische Aktivitäten. In vitro, in humanen peripheren Lymphozyten, sowie in immunsupprimierten Tieren (subletale Bestrahlung, sowie Zyklophosphamid- induzierte Neutropenie im Mausmodell) führt MXF zu einer erhöhten Zytokin- Produktion. IL-2, IL-3, Granulozyten-Makrophagen Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) und Interferon- $\gamma$  werden hierbei vermehrt exprimiert. Diese immunmodulatorische Fähigkeit ist allerdings nur solchen Chinolonen vorbehalten, die an Position 1 einen Zyklopropyl- Rest aufweisen.

Eine weitere Studie von SHALIT et al. (2001) über immunmodulatorische Effekte von MXF bei Zyklophosphamid- induzierten, leukopenischen Mäusen berichtet ebenfalls von einer verbesserten Immunantwort. Das Zytostatikum Zyklophosphamid führt bei Mensch und Tier zu einer Neutropenie mit ausgeprägter Leukopenie (Höhepunkt an Tag vier nach Injektion). Es konnte gezeigt werden, dass bei immunsupprimierten Tieren sowohl das hämatopoetische System, als auch das Immunsystem durch MXF positiv beeinflusst wurden. Man konnte einerseits eine verstärkte Wanderung myeloider Vorläuferzellen (granulopoetische Vorläuferzellen, CFU-C) zwischen Knochenmark und Milz, sowie einen Anstieg weißer Blutkörperchen im peripheren Blut beobachten. Andererseits konnte eine verstärkte Produktion von Zytokinen, IL-3, IL-6 und GM-CSF, sowie eine erhöhte Colony-Stimulating-Activity (CSA) im Knochen, in der Milz, in der Lunge und in der Harnblase festgestellt werden (SHALIT et al., 2001).

Grundsätzlich aktivieren bei jedem Entzündungsprozess pathogene Bakterien oder andere infektiöse Agentien Makrophagen oder Monozyten, die eine Zytokinkaskade auslösen. Proinflammatorische Zytokine, wie z. B. IL-1, IL-6 oder TNF  $\alpha$  führen u. a. zu einer Freisetzung von Radikalen und hydrolytischen Enzymen, die letztendlich eine wichtige Rolle bei der Gewebeerstörung spielen (HALL et al., 2003).

MXF hemmt allerdings die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie z. B. IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF  $\alpha$  in stimulierten humanen Monozyten. So reicht eine Konzentration von 10 mg/l MXF aus, um TNF  $\alpha$  signifikant zu hemmen (ARAUJO et al., 2002).

Der zelluläre antiinflammatorische Effekt von MXF erfolgt in zwei Phasen über einen phagozytischen Mechanismus: Monozyten werden durch die Aufnahme von Bakterienbestandteilen stimuliert, so dass sie mit einer Freisetzung von zyklischem Adenosinmonophosphat (c-AMP) aus der Membran und mit einem Anstieg der Proteinkinase C- Aktivität reagieren. Freie Radikale, wie z.B. Nitritoxid (NO) oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> werden freigesetzt und führen zu einem Absinken des intrazellulären pH- Wertes innerhalb einer Stunde, während derer bereits proteolytische Enzyme aktiviert werden. Über eine Zeitspanne von ca. zwei Stunden wirkt MXF „nur“ bakteriostatisch durch Hemmung der Proteinsynthese. Durch den Anstieg und die Freisetzung von NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und N- Azetyl- Glukosamin wird das Bakterium aber schlussendlich entweder mit Hilfe der freien Radikale oder mittels „zidalem“ (selbsttötendem) Effekt abgetötet. Das Phänomen des phagozytischen Mechanismus kann man mit folgenden Substanzen unterbinden: Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl) verhindert die Phagosom- Lysosom-Fusion, Chlor-Kabonyl-Zyanid-Phenylhydrazon (CCCP) blockiert die Protonenpumpe für Lysosome und Natriumfluorid (NaF) hemmt den Sauerstoff- und Energiemetabolismus der Zelle (HALL et al., 2003).

### **2.5.2.3 Toxizität und Wirkung auf verschiedene Organsysteme**

#### **Toxizität**

VON KEUTZ und SCHLUTER (1999) führten zahlreiche Studien durch, um die Toxizität von MXF zu untersuchen. Nach oraler Einzeldosisgabe konnten demnach folgende mittlere letale Dosen (LD<sub>50</sub>) bestimmt werden: 1320 mg/kg Körpergewicht (KG) bei der Ratte, 435 bis 758 mg/kg KG bei der Maus und 1500 mg/kg KG beim Zynomolgus-Affen. Die LD<sub>50</sub> nach intravenöser Applikation beträgt 105 bis 130 mg/kg bei der Maus und 112 bis 146 mg/kg bei der Ratte. Die hohen toxischen Dosen beeinflussen hauptsächlich den Gastro- Intestinal-Trakt (Diarrhö, Hämorrhagien, Nekrosen) und das Zentrale Nervensystem (ZNS) mit Tremor und Konvulsionen. Eine MXF- induzierte Mortalität nach Mehrfachgaben (bis zu sechs Monaten) konnte aber nicht beobachtet werden (VON KEUTZ und SCHLUTER, 1999).

#### **Wirkung auf das ZNS**

Es besteht grundsätzlich die Möglichkeit, dass Chinolone für das Auftreten von Konvulsionen verantwortlich sind. Mit Hilfe von Elektroenzephalografie (EEG)- Untersuchungen an Rhesus-Affen, die vier Wochen lang oral MXF in einer Dosis von 150 mg/kg KG erhielten,

wurde bestätigt, dass MXF das Potential besitzt, die EEG- Aktivität im Vergleich zu anderen Chinolonen zu verändern (VON KEUTZ und SCHLUTER, 1999).

Die Inzidenz zentralnervöser Reaktionen nach Chinolonbehandlung beim Menschen wird mit 0,9 bis 2,1 % angegeben (SCHMUCK et al., 1998). Relativ selten auftretende konvulsive Anfälle kommen überwiegend bei älteren und vorberichtlich an Epilepsie, Hirnschäden oder Alkoholabusus leidenden Patienten vor. In einer in vitro- Studie von SCHMUCK et al. (1998) konnte der exzitatorische Effekt von Fluorchinolonen auf das ZNS intensiver analysiert werden. In diesem Zusammenhang erreichte die Konzentration des Fluorchinolons in der zerebrospinalen Flüssigkeit nur annähernd zehn Prozent im Vergleich zur Blutplasmakonzentration. Man konnte nachweisen, dass die durch Chinolone ausgelösten extrazellulären Feldpotentiale im Hippokampus über das Glutamat- System gesteuert werden. Grundsätzlich liegt im Ruhezustand der Glutamat- gesteuerte N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA)- Rezeptor mit Magnesiumionen ( $Mg^{2+}$ ) blockiert vor. Fluorchinolone aktivieren nun den NMDA- Rezeptor in den Neuronen der CA1- Region des Hippokampus, indem sie die Magnesiumionen aus dem Ionenkanal des NMDA- Rezeptors verdrängen und es folglich zu einer exzitatorischen Reaktion kommt (SCHMUCK et al., 1998). Eine vermutete Affinität der Chinolone zum inhibitorischen Neurotransmitter GABA im Hippokampus, als Gegenspieler zum exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat, konnte nicht bestätigt werden (SCHMUCK et al., 1998).

### **Wirkung auf das Herz- Kreislauf- System**

In einer Studie an Hunden (Beagle) konnte gezeigt werden, dass orale MXF- Dosen von 10, 30 oder 90 mg/kg/Tag weder einen Einfluss auf den Blutdruck, noch auf den Puls haben. Es besteht allerdings eine Tendenz zu einem verlängerten QT- Intervall im Elektrokardiogramm (EKG), das ca. zwei Stunden nach Antibiotikum- Gabe auftritt (VON KEUTZ und SCHLUTER, 1999). 2002 konstatierten RUBINSTEIN und CAMM gleichermaßen die mögliche Verlängerung des QT- Intervalls um fünf bis sechs ms, wobei Frauen und alte Menschen empfänglicher sind. Fluorchinolone blockieren die Kaliumkanäle am Herzen und können demnach eine Arrhythmie verursachen. Verantwortlich für die QT- Verlängerung ist das Proton an Position 5 im MXF- Molekül (RUBINSTEIN und CAMM, 2002).

### **Wirkung auf den Respirationstrakt**

WILSON et al. (2004) untersuchten in einer Vergleichsstudie Langzeit- und Kurzzeitwirkungen von MXF bei chronischer Bronchitis des Menschen. Als sehr häufig vorkommende pathogene Mikroorganismen waren *Hämophilus influenzae* mit 41,8 % und *Streptokokkus pneumoniae* mit 20,3 % vertreten. Es konnte bestätigt werden, dass MXF als Kurzzeittherapie (400 mg, einmal täglich über fünf Tage) mit einer schnellen Lungengewebspenetration hoch wirksam gegen Pathogene des Respirationstrakts, einschließlich Penizillin-resistenter Pneumokokken ist. Weiterhin dauerte es bis zu einem erneuten Auftreten einer chronischen Bronchitis nach MXF- Applikation im Durchschnitt 131 Tage im Vergleich zu anderen Antibiotika, bei denen durchschnittlich nach 103 Tagen erneut Bronchitis auftrat (WILSON et al., 2004).



## 3 Eigene Untersuchungen

### 3.1 Zielvorstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses einer perioperativen Gabe des Fluorchinolons Moxifloxazin (MXF) auf die neurologische und kognitive Funktion an der Ratte nach extrakorporaler Zirkulation (EKZ) mit 45 min tief- hypothermem Kreislaufstillstand (DHCA) über einen Beobachtungszeitraum von 14 Tagen. Zusätzlich soll geprüft werden, ob sich ein etwaiger histologischer Schaden nach EKZ mit DHCA durch MXF nach 14 Tagen verringert.

Das Modell der EKZ mit DHCA an der Ratte wurde bereits in vorangehenden Studien im eigenen Labor etabliert (JUNGWIRTH et al., 2006). In diesem Zusammenhang wurden in den letzten Jahren diverse Lang- und Kurzzeitstudien durchgeführt, die beispielsweise die systemische und zerebrale Inflammation 28 Tage nach EKZ mit DHCA (KELLERMANN et al., in Vorbereitung) oder den Einfluss der Wiedererwärmungsgeschwindigkeit nach EKZ mit DHCA auf die Neurologie und Histologie (DERTINGER, 2007) hin untersucht haben. Das Modell der EKZ mit DHCA scheint auch geeignet zu sein, um potentielle neuroprotektive Strategien präklinisch zu untersuchen. So wurde bereits der Einfluss des Antibiotikums Moxifloxazin auf die Neurologie und zerebrale Inflammation im Kurzzeitversuch über 24 Stunden nach EKZ mit DHCA untersucht (STÜCKLE, Medizinische Dissertation in Vorbereitung).

Die vorhergehende Studie von STÜCKLE konnte zeigen, dass 24 Stunden nach EKZ mit 45 min DHCA die Expression der zerebralen Entzündungsparameter COX-2, TNF  $\alpha$  und NF $\kappa$ B in der Hippokampus- Region bei MXF- behandelten Tieren geringer ausfällt. MXF zeigt dabei keinerlei Wirkung auf das postoperative neurologische Defizit, beide DHCA- Gruppen sind gleich schlecht im Vergleich zu den Sham- Gruppen sowie den präoperativ erhobenen Ausgangswerten (STÜCKLE, Medizinische Dissertation in Vorbereitung).

Basierend auf den Resultaten dieser vorangegangenen Studie sollen deshalb folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

(1) Verbessert die perioperative Gabe von MXF das neurologische und v. a. das neurokognitive Ergebnis nach EKZ mit DHCA innerhalb von 14 Tagen und

(2) wie verhält sich die Ausprägung des histologischen Schadens und der Nachweis des zerebralen Inflammationsparameters NFκB.

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (Tierschutzgesetz in der Fassung vom 18. Mai 2006, BGBl. I S. 1206, 1313, zuletzt geändert am 21. Dezember 2006, BGBl. I S. 3294) durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen: 55.2-1-54-2531-28-07).

## 3.2 Material und Methoden

### 3.2.1 Versuchsplanung

Die Eingriffe und Untersuchungen werden an 50 männlichen zehn bis zwölf Wochen alten Sprague- Dawley Ratten (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) mit einem durchschnittlichen Gewicht von 330 bis 400 g durchgeführt.

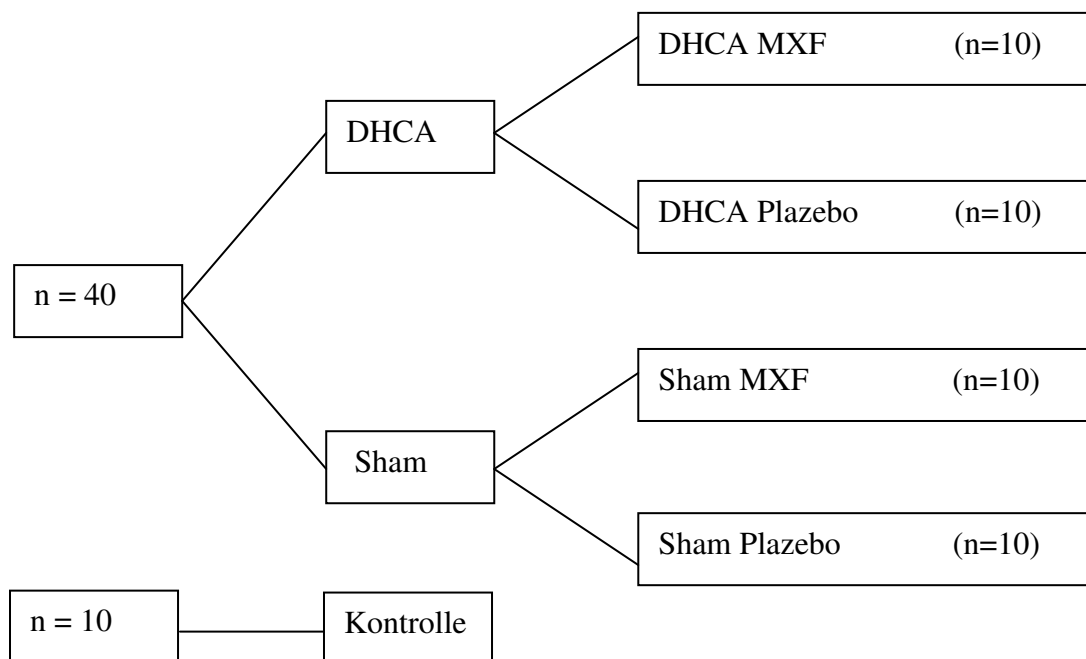
Vor dem eigentlichen Versuchsbeginn werden die Ratten zur Gewöhnung an ihre neue Umgebung in Gruppen von maximal vier Tieren in Makrolon Käfigen Typ IV (55 x 35 x 20 cm) über einen Zeitraum von mindestens neun Tagen gehalten. Anschließend setzt man die Ratten für die Dauer von elf Tagen in den speziell für die Verhaltensuntersuchungen entwickelten 80 x 60 x 50 cm großen Versuchskäfig (undurchsichtiges graues PVC, Fa. Josef Weiss Plastik GmbH, München) mit einer maximalen Gruppengröße von zehn Tieren ein.

Futter (Altromin 1324, spezialbehandeltes Haltungsfutter für Ratten, Altromin GmbH, Lage) und Wasser stehen den Tieren über Futterraufen und Nippeltränken ad libitum zur Verfügung. Als Einstreumaterial dient entstaubtes und entkeimtes Weichholzgranulat (Lignocel, J. Rettenmaier & Söhne, Rosenberg). Um die Haltungsumwelt anzureichern, wird den Ratten zusätzlich eine Hand voll entkeimtes Heu und eine Lage Zellstoff als Nestbau- und Beschäftigungsmaterial angeboten. An zwei festgelegten Tagen in der Woche findet ein kompletter Einstreuwechsel statt, sowie einmal wöchentlich ein Austausch der Trinkflaschen.

Die Unterbringung der Ratten erfolgt in einem fensterlosen, klimatisierten Tierstall mit einer durchschnittlichen Raumtemperatur von  $22 \pm 2$  °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von  $60 \pm 15$  %, sowie einem durch eine Zeitschaltuhr gesteuerten Hell/Dunkel- Rhythmus von jeweils 12 Stunden, mit der Hellphase von 02:00 bis 14:00 Uhr und der Dunkelphase von 14:00 bis 02:00 Uhr. Hierbei beträgt die Lichtintensität maximal 60 Lux im Käfig, gemäß den Vorschriften für Albinotiere (GV-SOLAS, 1988). Parallel zur Hellphase werden die Ratten mit leiser Radiomusik beschallt, um eine Gewöhnung an die menschliche Geräuschkulisse zu erreichen.

Der gesamte Versuch lässt sich generell in zwei Abschnitte untergliedern: der chirurgische Eingriff und die neurokognitive Testphase.

Für die operative Phase werden die Tiere randomisiert in fünf verschiedene Gruppen eingeteilt: DHCA Moxifloxazin, DHCA Plazebo, Sham Moxifloxazin, Sham Plazebo und Kontrolle (siehe Abb. 13).



**Abbildung 13:** Aufteilung und Darstellung der Versuchsgruppen (DHCA Moxifloxazin, DHCA Plazebo, Sham Moxifloxazin, Sham Plazebo und Kontrolle mit einer Gruppengröße von jeweils  $n = 10$ ).

Die Tiere der DHCA- Gruppen werden einer EKZ mit DHCA unterzogen. Jeweils eine Gruppe erhält perioperativ entweder alle zwei Stunden über zehn Stunden insgesamt 100

mg/kg Moxifloxazin oder dasselbe Volumen physiologische Kochsalzlösung (NaCl, 0,9 %). Die intraperitoneale Applikation beginnt mit der Narkoseeinleitung und erfolgt insgesamt sechs Mal im Abstand von jeweils zwei Stunden.

Die Tiere der Sham- Gruppen werden analog zu den Tieren der DHCA- Gruppen anästhesiert, kanüliert, jedoch nicht an die EKZ angeschlossen und keinem DHCA unterzogen. Die Gabe von MXF bzw. NaCl erfolgt nach dem gleichen Schema wie bei den DHCA- Gruppen.

Die sich postoperativ anschließende neurokognitive Testperiode umfasst die neurologische Untersuchung an den Tagen -2, -1, 1, 2, 3 und 14 und die kognitive Testphase vom vierten bis zum 13. Tag nach der Operation unter Verwendung des modifizierten Zylinder- Hole- Board- Tests (ZHBT). Die Tiere der Kontrollgruppe werden weder anästhesiert noch operiert, jedoch nach demselben Schema wie die Tiere der vier Versuchsgruppen neurologisch und neurokognitiv getestet.

Abschließend werden die Ratten am postoperativen Tag 14 in tiefer Isoflurannarkose entblutet. Das Gehirn wird zur weiteren histologischen Untersuchung entnommen, auf Trockeneis tiefgefroren und bei - 80 °C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

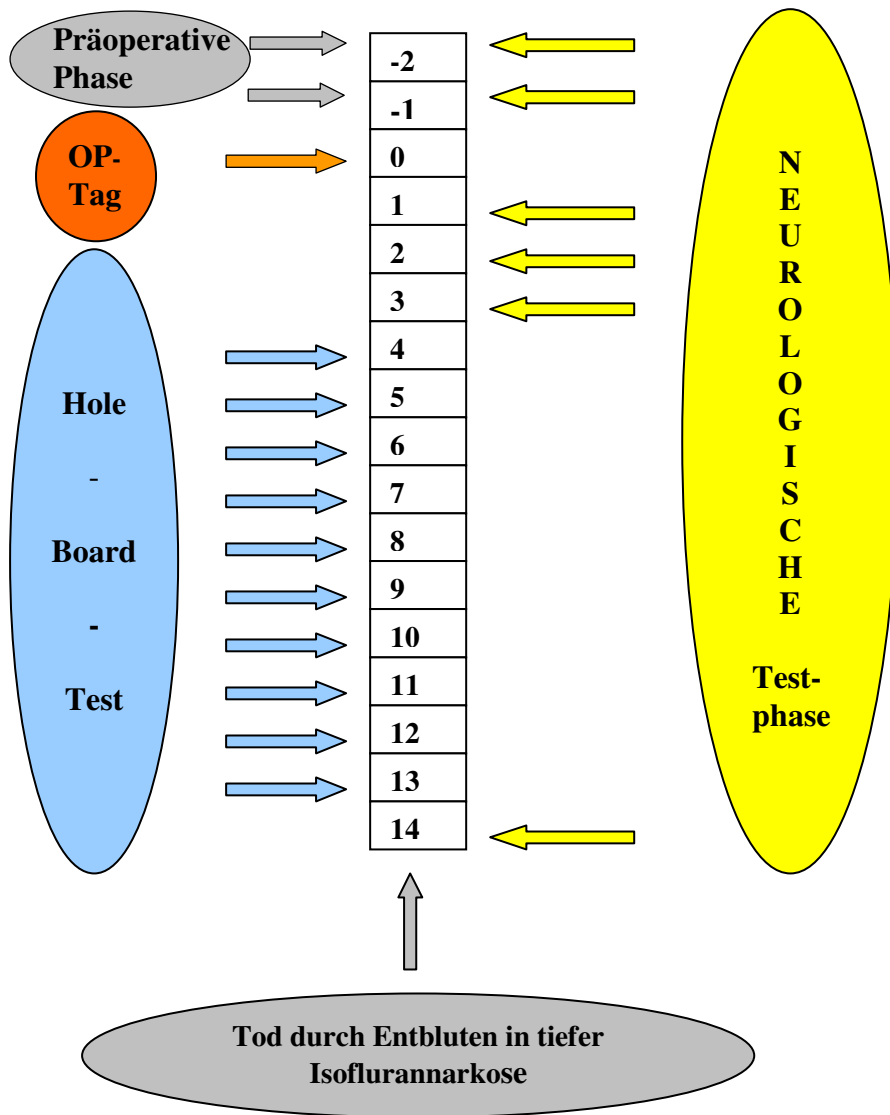


Abbildung 14: Schematischer Zeitverlauf des Versuchs (Überblick Tag -2 bis Tag 14).

## **3.2.2 Versuchsdurchführung**

### **3.2.2.1 Durchführung der EKZ mit DHCA**

#### Chirurgische Präparation und Kanülierung

Den Tieren steht bis zum Zeitpunkt der Operation Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung. Die chirurgischen Eingriffe werden stets von der gleichen Person durchgeführt. Vor der Operation erfolgt eine klinische Allgemeinuntersuchung der Tiere, um sicherzustellen, dass es sich um gesunde Tiere handelt.

Die Ratten werden zur Einleitung der Anästhesie in eine durchsichtige Plexiglasbox gesetzt, die mit 5,0 Vol % Isofluran (Forene®, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden) und Sauerstoff (6 l/min) geflutet wird. Sobald die gewünschte Anästhesietiefe mit Bewusstseinsverlust und Ausfall der Stellreflexe eingetreten ist, appliziert man je nach zugewiesener Gruppe intraperitoneal MXF oder NaCl. Anschließend rasiert man die Haut an den erforderlichen Inzisionsgebieten, mit Ausnahme des Schwanzbereiches. Nach endotrachealer Intubation mit einer 14-Gauge- Kanüle erfolgt die Ventilation über ein Kleintierbeatmungsgerät (Small Animal Ventilator KTR-4, Hugo Sachs Elektronik, March) im halboffenen System ohne Rückatmung mit konstanter Frischgaszufuhr von 0,8 l/min, vorgeschaltetem Präzisionsverdampfer (Abott GmbH & Co. KG, Wiesbaden) und Gasabsaugung. Die Tiere atmen dabei 2,0 bis 2,5 Vol % Isofluran in 40 % Sauerstoff, ca. 55 % Druckluft, mit einer Atemfrequenz von ca. 50 Atemzügen pro Minute und einem Beatmungsdruck von 11 bis 15 mmHg. Nach Anpassung der Beatmung wird der Kohlenstoffdioxid- Partialdruck (PaCO<sub>2</sub>) bei ca. 30 mmHg aufrechterhalten.

Um eine Austrocknung der Kornea zu verhindern, wird diese mit einer Salbe (Bepanthen®, Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital, Leverkusen) geschützt, sowie die Maulschleimhaut mit einem in physiologischer Kochsalzlösung getränkten Tupfer benetzt.

Von besonderer Relevanz ist bei diesem operativen Eingriff das Temperaturmanagement. Neben der rektalen Temperatur wird zusätzlich die perikranielle Temperatur überwacht, indem eine Temperatursonde (Newport® Hypodermic Needle Temperatur Probes, Hyp-1, Newport Electronics, Santa Ana, USA) im rechten Muskel temporalis platziert wird.

Prinzipiell erfordert das chirurgische Präparieren der Arteria sacralis mediana (A. sacralis mediana, Schwanzarterie), Arteria epigastrica cranialis superficialis (A. epigastrica cranialis superficialis) und Vena jugularis externa (V. jugularis externa) folgendes Vorgehen: zunächst erfolgt vor jeder Inzision eine Hautdesinfektion mit Cutasept® F (Fa. Bode, Hamburg), anschließend infiltrierte man mit dem Lokalanästhetikum Lidokainhydrochlorid (Xylokain 2 %, Astra Zeneca, Großbritannien) subkutan das Gewebe.

Nach dem Hautschnitt trennt man das subkutane Gewebe stumpf und stellt die Arterie bzw. Vene isoliert dar. Das jeweilige Gefäß wird dann distal abgebunden (4-0 PH-Seide, Ethicon®, Ethicon GmbH, Norderstedt) und proximal mit einer Ligatur nur locker umschlungen. Später kann dadurch der eingeführte Katheter fest mit der Gefäßwand verbunden werden. Im nächsten Schritt wird mit einer mikrochirurgischen Schere die Gefäßwand von oben vorsichtig eingeschnitten, um den mit heparinierter Vollelektrolytlösung (Thomaejoninlösung®, DeltaSelect GmbH, Pfullingen) gefüllten Katheter in das Gefäß einbringen zu können. Danach fixiert man den Katheter mit der Gefäßwand durch die vorgelegte Ligatur.

Als arterielles Zuflussgefäß während der EKZ dient die Schwanzarterie, die auf der Ventralseite des Schwanzes lokalisiert ist. Sie wird mit einem 20-Gauge großen Venenverweilkatheter (Insyte-W™, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) kanüliert. Da für die weitere Präparation ein vollheparinisiertes Tier notwendig ist, erhält die Ratte über diesen Katheter umgehend 150 I.E. Heparin Natrium (Liquemin® N 25000, Hoffmann - La Roche AG, Grenzach-Wyhlen). Zusätzlich versorgt man das Tier analgetisch repetitiv mit Gaben von Fentanyl (5µg- Boli).

Um den mittleren arteriellen Blutdruck („mean arterial blood pressure“, MAP) zu überwachen, platziert man einen angespitzten Polyethylen- Katheter (PE 10, Intramedic™, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) in der rechten A. epigastrica cranialis superficialis, der über einen Druckdom (MX 960, Fa. Medexmedical, Lancashire, Großbritannien) an einen Monitor (Eagle® 4000, GE Medical Systems Deutschland, Solingen) angeschlossen ist. Zusätzlich werden fortwährend Elektrokardiografie (EKG)- Ableitungen registriert, um die Herzaktivität zu überwachen (Eagle® 4000, GE Medical Systems Deutschland, Solingen).

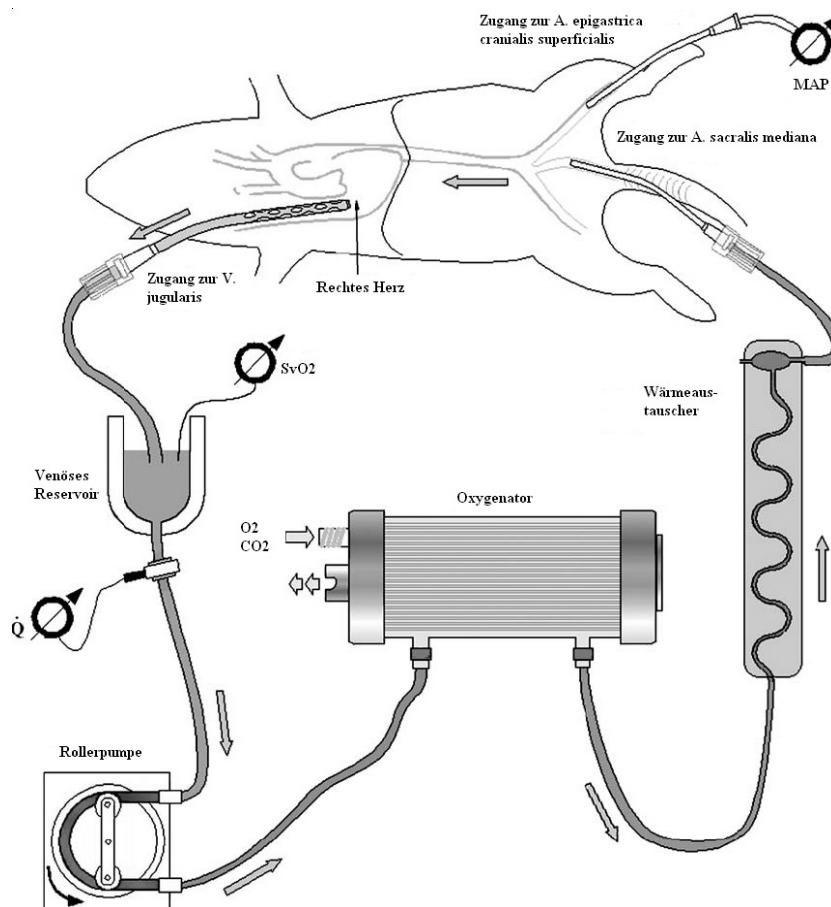
Zu genau definierten Zeitpunkten finden wiederholte Blutdruck-, Blutgas- und Blutglukosemessungen statt. Mit dem Blutgasanalysegerät (Rapidlab™ 860, Bayer Vital GmbH, Fernwald) werden folgende physiologische Parameter bestimmt: PaO<sub>2</sub> (arterieller Sauerstoffpartialdruck), BE (Basenabweichung) und Hämoglobin. Mit einem Schnelltestgerät

(Glucometer<sup>®</sup> Elite<sup>™</sup>, Bayer HealthCare AG, Diagnostics, USA) wird die Blutglukose-Konzentration gemessen.

Auf der kaudoventralen Halsseite präpariert man anschließend die paramedian gelegene rechte V. jugularis externa, in die ein 4,5 Fr großer, mehrfach perforierter Katheter (eigene Herstellung) bis in den rechten Vorhof vorgeschoben wird. Auf diese Weise ist die vollständige venöse Drainage des rechten Vorhofes, der rechten hinteren Hohlvene und der bei Ratten regelmäßig vorkommenden rechten und linken vorderen Hohlvene sichergestellt.

Um die Gefäße vor zu starker Austrocknung zu schützen, adaptiert man die Wundränder mit Einzelheften (4-0 Prolene<sup>™</sup>, Ethicon<sup>®</sup>, Ethicon GmbH, Norderstedt) aneinander.

#### Aufbau der EKZ und Abkühlungsphase



**Abbildung 15:** Schematische Darstellung der EKZ an der Ratte mit arteriellem und venösem Zugang, venösem Reservoir, Rollerpumpe, Oxygenator und Wärmetauscher (modifiziert nach DIELEMAN et al., 2006).



Nach dem Beenden der Präparation wird bei Tieren der DHCA- Gruppen die EKZ aufgebaut. Die Herz- Lungen- Maschine (HLM) setzt sich aus folgenden Segmenten zusammen: venöses Reservoir (Plexiglas®, Dipl. Ing. M. Humbs, Valley), Rollerpumpe (Masterflex®, Cole-Parmer Instrument Co., Illinois), ein speziell für Ratten entwickelter Membranoxygenator (Füllungsvolumen 4 ml) mit integriertem Wärmetauscher und eine im arteriellen Abschnitt befindliche Flusssonde (T 208, Transonic Volume Flowmeter, Transonic Systems Inc., Ithaca), die fortwährend die aktuelle Blutflussrate erfasst. Diese Komponenten werden durch ein Schlauchsystem aus Plastik verbunden (Innendurchmesser 1,6 mm, Tygon®, Cole-Parmer Instrument Co., Illinois). Der eigens für Ratten entwickelte Membranoxygenator besteht aus zwei 12,8 x 12,8 x 2,7 cm großen Plexiglasplatten, zwischen denen sich eine dreischichtige, übereinander kreuzweise geklebte Diffusionsmembran (Hohlfasermembran, Jostra AG, Hirrlingen) befindet. Durch diese Konstruktion wird eine Gasaustauschfläche von 558 cm<sup>2</sup> erzielt. Der Wärmeaustausch findet über ein temperaturgesteuertes Wasserbad (Polystat Control cc2, Peter Huber Kältemaschinenbau GmbH, Offenburg) statt, welches über ein Schlauchsystem an den Oxygenator angeschlossen und nur durch eine dünne Plexiglasscheibe vom vorbeiströmenden Blut getrennt ist.

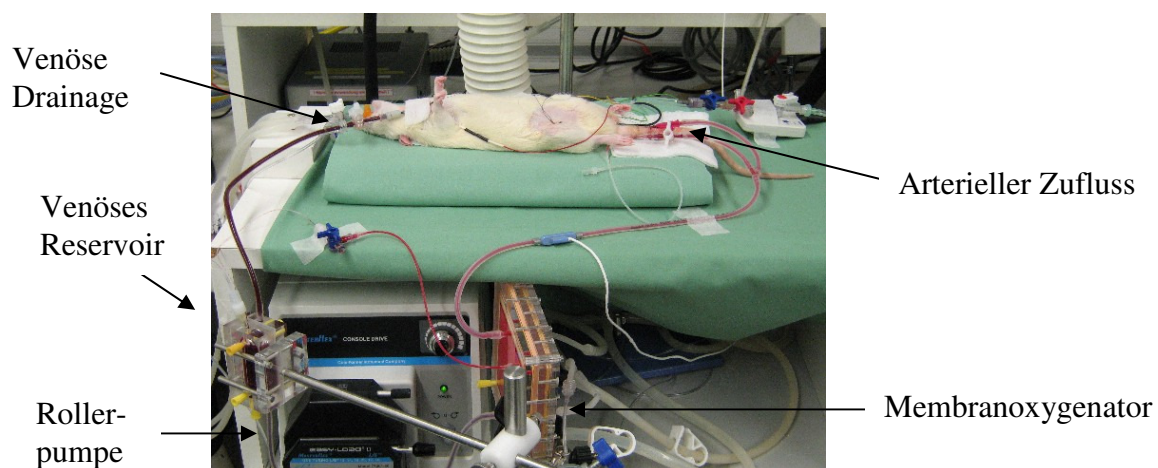
Vor Beginn der EKZ muss das System entlüftet werden. Dies erfolgt durch Füllen des Kreislaufs mit 10 ml 6 %iger Hydroxyethylstärke (HAES 60 mg/ml, Voluven®, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg). Dieser Vorgang des „Kreislauf- Auffüllens“ wird in der gebräuchlichen Fachsprache auch als „Priming“ bezeichnet.

Mit Beginn der EKZ erfolgt die Drainage des venösen Blutes aus dem rechten Vorhof in das venöse Reservoir. Von dort wird das Blut über die Rollerpumpe in den Oxygenator gepumpt, wo es über die Diffusionsmembran mit Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) und Isofluran versorgt wird. Schließlich wird das arterielle Blut über die Schwanzarterie in den Körperkreislauf zurückgeführt.

Anfangs beträgt die Blutflussrate 160 bis 180 ml/min/kg, welche dem physiologischen Herzzeitvolumen der Ratte entspricht. Im weiteren Verlauf der Abkühlungsphase drosselt man die Blutflussrate schrittweise auf 105 ml/min/kg. Das Tier wird dabei sowohl indirekt (Wärmetauscherfunktion des Oxygenators mit Hilfe des Wasserbades), als auch direkt (mit Eis gefüllte Handschuhe, Wärme- bzw. Kühlmatte) über insgesamt 30 min auf eine rektale Temperatur von 18 bis 15 °C herabgekühlt.

Während der Abkühlungsphase setzt man die Anästhesie mit 0,8 Vol % Isofluran und repetitiven Fentanyl- Gaben (5 µg- Boli) fort. Zusätzlich appliziert man als muskelrelaxierendes Präparat Zisatrakurium (1,6 mg/h, Nimbex®, GlaxoSmithKline GmbH & Co KG, München). Um präventiv Atelektasen in der Lunge zu verhindern, wird während der Abkühlungsphase an der EKZ ein positiver endexpiratorischer Druck (5 cm H<sub>2</sub>O) mit einem FiO<sub>2</sub> = 0,21 durch einen permanenten positiven Atemwegsdruck während der Beatmung beibehalten.

Zu verschiedenen, definierten Zeitpunkten werden die physiologischen Parameter wie rektale und perikranielle Temperatur, MAP, sowie Blutgase (temperaturkorrigiert, pH- stat) und Glukosekonzentration im Blut erhoben: zehn Minuten vor dem Beginn der EKZ, vor dem Beginn des DHCA, fünf Minuten nach Start der Wiedererwärmung, am Ende der Wiedererwärmung und eine Stunde nach Ende der EKZ.



**Abbildung 16:** Aufbau der EKZ mit Hilfe der HLM an der präparierten Ratte.

### DHCA

Sobald die Körpertemperatur auf 18 bis 15 °C gesunken ist, schaltet man die Herz- Lungen-Maschine (HLM) ab und lässt das Tier bei geschlossener arterieller Zuflusskanüle und offenem venösen Abfluss passiv in das venöse Reservoir entbluten. Zudem werden während des tief- hypothermen Kreislaufstillstandes Ventilation und Anästhesie eingestellt. Bedingt durch die tiefen Temperaturen kommt es ohne den Einsatz kardioplegischer Substanzen zum Sistieren des Herzschlages. Charakteristikum des DHCA sind Asystolie, sowie ein MAP von Null. Dieser Zustand wird für insgesamt 45 Minuten bei einer Körpertemperatur von 18 bis 15 °C aufrechterhalten.

### Wiedererwärmung an der EKZ

Unter Verwendung einer Heizmatte, eines Warmluftgebläses (WarmTouch ® 5200, Nellcor, USA), sowie der Wärmetauscherfunktion des Oxygenators wird das Tier sofort im Anschluss an den DHCA über einen Zeitraum von 40 Minuten auf eine Körpertemperatur von 35,5 °C an der EKZ wiedererwärmt. Beträgt die Blutflussrate anfänglich 105 ml/min/kg, steigert man diese sukzessive auf 120 ml/kg/min bei 20 °C und 150 ml/kg/min bei 30 °C. Am Ende der Wiedererwärmungsphase erreicht der Blutfluss die physiologischen Ausgangswerte von 160 bis 180 ml/kg/min.

Während der Wiedererwärmungsphase wird die Anästhesie identisch zur Abkühlungsphase mit 0,8 Vol % Isofluran in einer O<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>- Gasmischung mit variablen Konzentrationen von CO<sub>2</sub> (Kontrolle der arteriellen Blutgase nach pH- stat: PaCO<sub>2</sub> 31 - 40 mmHg, Temperatur- angepasst) und mit wiederholten Gaben von Fentanyl (5 µg- Boli), sowie Applikation von Zisatrakurium (1,6 mg/h) fortgesetzt. Auch ein positiver endexpiratorischer Druck von 5 cm H<sub>2</sub>O mit einem FiO<sub>2</sub> = 0,21 bei der Beatmung wird aufrechterhalten.

Mit steigenden Temperaturen fängt das Herz ohne Zugabe von Medikamenten nach vorherigem Kammerflattern und -flimmern an, selbständig zu arbeiten, bis sich im EKG nach ersten Ersatzrhythmen mit breiten QRS- Komplexen der ursprüngliche Sinusrhythmus einstellt.

Sobald die rektale Temperatur mindestens 30 °C und die Blutflussrate mindestens 150 ml/kg/min betragen, bekommt das Tier bei Bedarf 20 µg/ml Norepinephrinhydrochlorid (Arterenol® 1 ml, Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt am Main) in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, um den MAP bei Werten über 45 mmHg zu halten. Falls sich eine Hypoglykämie abzeichnet, werden 0,1 bis 0,2 ml einer 50 %igen Glukose- lösung (DeltaSelect GmbH, Pfullingen) verabreicht. Um den Blut- pH konstant zu halten bzw. azidotische Verschiebungen auszugleichen, appliziert man Natriumhydrogenkarbonat 84 mg/ml (DeltaSelect GmbH, Pfullingen) nach der Formel Bikarbonat = -BE x 0,3 x kg KG. Weiterhin prüft man die Kalziumkonzentration und kompensiert gegebenenfalls ein Absinken der Kalziumkonzentration unter 1 mmol/l mit 0,1 ml einer 10 %igen Kalziumglukonat Lösung (Calcium Braun 10 %, B. Braun Melsungen AG, Melsungen). Die Wirkung der durch Heparin induzierten Antikoagulation klingt ohne Gabe eines Heparinantagonisten, wie z.B. Protamin, ab.

### Nachbeatmungsphase

Nach Erreichen einer rektalen Körpertemperatur von 35,5 °C wird die EKZ beendet, indem man den venösen Ab- und den arteriellen Zufluss abklemmt und die Rollerpumpe stoppt. Das sich noch in der HLM befindliche Blut wird gesammelt und zentrifugiert (2000 Umdrehungen pro Minute/10 Minuten). Anschließend wird das so gewonnene Erythrozytenkonzentrat mit HAES (6 %) und Kalzium verdünnt und sehr langsam über die Schwanzarterie retransfundiert, um den Hämatokrit auf Werte über 30 % anzuheben. Für den Zeitraum von einer Stunde bleibt die Ratte mit 1,0 bis 1,5 Vol % Isofluran anästhesiert, intubiert und kontrolliert beatmet. Zudem wird besonders auf eine Erhöhung der Rektaltemperatur auf 36,5 °C geachtet. Bevor man die Katheter am Ende der Nachbeatmungsphase alle entfernt, führt man eine abschließende Blutgasanalyse durch.

Danach werden die Katheter entfernt, die Gefäße ligiert und die Hautwunden mit Einzelheften verschlossen. Dann wird die Ratte zum Aufwachen in eine mit Sauerstoff angereicherte Box verbracht und extubiert, sobald sich das Tier eigenständig umdreht.

### Postoperative Überwachung

Nach Ende der Narkose steht das Tier noch für etwa vier Stunden unter ständiger Beobachtung durch den Operateur in einer durchsichtigen Plexiglasbox. Für ca. 18 Stunden, bis zum nächsten Morgen, verbleibt das Tier bei freiem Zugang zu Wasser und Futter in dieser mit Sauerstoff angereicherten Box.

Tiere, die nach der Operation ersichtliche schwerwiegende neurologische Dysfunktionen aufweisen oder deren Allgemeinbefinden nachhaltig gestört erscheint (Dyspnoe, zyanotische Veränderungen), werden unmittelbar euthanasiert. Alle anderen Tiere werden am ersten postoperativen Tag in ihre vertraute Umgebung zurückgebracht.

#### **3.2.2.2 Untersuchung der neurologischen Funktion**

Anhand vielfältiger Testsysteme können neurologische und motorische Parameter erfasst werden. Während man einige Verhaltensweisen (z. B. Bewusstsein, Pflegeverhalten und Laufen) bereits passiv durch Beobachtung der Tiere im bekannten Wohnkäfig, dem sog. „Homecage“, beurteilen kann, schaffen aktive Tests die Möglichkeit, weitergehende Er-

kenntnisse über neurologische und motorische Defizite zu gewinnen (COMBS und D'ALECY, 1987).

Zu diesem Zweck wurden spezielle Punkteschemata entworfen, um pathologische Abweichungen motorischer und kognitiver Funktionen, sowie im Verhalten zu detektieren (siehe Seite 61, 70 und 72). Demnach liegt der Normalwert bei Null bzw. von Null bis drei und Defizite spiegeln sich in einer höheren Gesamtpunktzahl wider.

Aussagen über den Gleichgewichtssinn lassen sich über die Balkentests („Beam- Walking“ und „Beam- Balance“) treffen. Das Greif- und Haltevermögen kann über den Drahtgitter- und Greif- Zug- Test („Rotating- Grid“ und „Prehensile- Traction“) ermittelt werden. Zu- und Abnahmen des Körpergewichts erfasst man durch Gewichtskontrolle.

### **Versuchsplan**

Die neurologisch- motorischen Tests beginnen am präoperativen Tag -2 und werden am präoperativen Tag -1, sowie den postoperativen Tagen 1, 2, 3 und 14 fortgesetzt. Um die Ratten an die neuen Bewegungsabläufe zu gewöhnen, sowie Ausgangswerte zu erheben, erfolgen neurologisch- motorische Untersuchungen (NU) bereits an den präoperativen Tagen -2 und -1. Alle Testergebnisse ab Tag -1 werden in eine Exceltabelle übertragen. Die Reihenfolge der Tests findet stets nach einem für alle Ratten identisch festgelegtem Schema statt. Zudem muss man darauf achten, dass die Tiere zwischen den einzelnen Testbausteinen ausreichend Zeit zur Erholung finden.

### **Übersicht über benötigte Hilfsmittel**

- Zwei Seitenstützen aus Holz: Höhe 53 cm
- Schaumstoffmatte: Höhe 5 cm, mit schwarzer Plastikfolie umsäumt
- Balken aus unbehandeltem Holz: 130 x 2,5 x 2,5 cm
- Balken aus unbehandeltem Holz: 130 x 1,5 x 1,5 cm
- Drahtgitter: 57 x 49 cm, Lochgitterabstand 0,8 cm, Drahtsteg 1 mm
- Drahtseil: 62 x 0,3 x 0,3 cm

- Timer: Hanhart-Labor Timer, Labor 3, Berlin
- Digitale Waage: Kern & Sohn GmbH, Balingen

## **Versuchsdurchführung**

### **Bewusstsein**

Während sich die Ratte noch in ihrem Wohnabteil befindet, beurteilt man bereits Wahrnehmungsreaktionen auf ihre Umwelt, ihre Artgenossen und auf den Beobachter. Man erhält hiermit erste Hinweise auf den allgemeinen Gesundheitszustand der Ratte. In ihrem Verhalten unauffällige Tiere sind demnach neugierig, erkunden ihre Umgebung und sind ihrem Gruppenverband zugehörig. Dagegen sondern sich in ihrem normalen Verhalten beeinträchtigte Ratten von ihren Artgenossen ab und zeigen wenig bis keinerlei Interesse an ihrer Umwelt. Immer wiederkehrende ruhelose Bewegungen (Stereotypien) sprechen gleichermaßen für eine Bewusstseinsstörung.

### **Pflegeverhalten**

Das Allgemeinbefinden kann anhand des Putz- und Pflegeverhaltens durch Adspektion bewertet werden. Putzt sich die Ratte nicht mehr, so erscheint das Fell struppig und ungepflegt, rötliches Sekret aus den Harderschen Drüsen in den Augenwinkeln sammelt sich an und kann die Augenregion verkleben. Ebenso können Verschmutzungen am Anus auf mangelndes Putzverhalten und somit auf eine Störung des Gesundheitszustandes hindeuten.

### **Laufen/Bewegung**

Hierbei überprüft man, ob die Ratte Einschränkungen in der Bewegung zeigt (z. B. Lahmheiten, Paralysen, Im- Kreis- Laufen oder Stehufähigkeit). Zeigt das Tier ein normales Laufverhalten, wird dies entsprechend des Punkteschemas (siehe Tab. 01, S. 61) mit null Punkten bewertet. Eine erste Betrachtung erfolgt bereits im Wohnabteil, sowie auch im Zylinder- Hole- Board- Test (ZHBT). Dieser Test gibt allgemeine Informationen über Motorik, Stellreflexe und Gleichgewicht.

### **Laufen auf dem Balken/Beam- Walking**

Für diesen Test benötigt man zwei Holzgestelle, die als Seitenwände fungieren, sowie einen unbehandelten Holzbalken (130 x 2,5 x 2,5 cm), der zwischen den beiden Holzgestellen in einer Höhe von ca. 55 cm befestigt wird. Eine Bodenmatte aus Schaumstoff sorgt für eine gute Abfederung, sollte das Tier stürzen.

Die Ratte muss dreimal eine Strecke von jeweils 100 cm auf dem Balken entlanglaufen (siehe Abb. 17). Dabei wird die Fähigkeit, auf dem Balken laufen zu können, beurteilt. Fehlritte der Vorder- und Hinterbeine werden als Fußfehler gezählt und gemäß dem Punkteschema mit null bis maximal vier Punkten bewertet (siehe Tab. 01, S. 61). Der Beam- Walking- Test (FEENEY et al., 1982; KOLB und WHISHAW, 1985) erlaubt es, Aussagen zu Bewegungsstörungen, Gleichgewichtssinn, Stellreflexen und Haltungsasymmetrien zu treffen.



*Abbildung 17: Ratte beim Überqueren des 2,5 cm breiten Balkens im Beam- Walking- Test.*

### **Drahtgitter- Test/Rotating- Grid**

Der Drahtgitter- Test entspricht einer Modifikation des „Screen- Tests“ von COMBS und D’ALECY (1987). Die Ratte wird auf ein horizontales (0°) Drahtgitter gesetzt, welches in eine vertikale (90°) und anschließend in eine umgekehrt horizontale Position (180°) gedreht wird. Für fünf Sekunden (s) muss sich das nun kopfüber hängende Tier am Drahtgitter festhalten (siehe Abb. 18). Die Bewertung erfolgt entsprechend der Tabelle 01. Mit diesem Test lassen sich Muskelkraft und Gleichgewichtssinn beurteilen.



*Abbildung 18: Ratte, die sich am Drahtgitter beim Rotating- Grid- Test mit allen vier Pfoten festhält.*

### **Greif- Zug- Test/Prehensile- Traction**

Als weiteren Test zur Erfassung des Greif- und Haltevermögens, sowie der allgemeinen Muskelkraft wendet man den sog. Greif- Zug- Test an (siehe Abb. 19). Die Ratte muss mit ihren Vorderpfoten ein in ca. 53 cm Höhe gespanntes Drahtseil ergreifen und sich mindestens 15 Sekunden daran halten können. Gesunde Ratten greifen mit beiden Vorderpfoten gleich stark und symmetrisch das Drahtseil, geschädigte Tiere weisen dagegen häufig Defizite auf (ein- oder beidseitig reduzierte Muskelkraft in den Vorderpfoten). Protokolliert wird sowohl die Zeitdauer des Festhaltens in s, als auch die Symmetrie der Vorderpfoten in der Greif- und Haltephase. Die Bewertung erfolgt entsprechend dem Punkteschema (siehe Tab. 01, S. 61).



*Abbildung 19: Ratte, die das Drahtseil mit beiden Vorderpfoten ergreift.*



### **Balken- Gleichgewichts- Test/Beam- Balance**

Zur Untersuchung von Muskelkraft und Gleichgewicht setzt man die Ratte beim Beam-Balance- Test mittig auf einen Holzbalken (130 x 1,5 x 1,5 cm), der sich in einer Höhe von ca. 55 cm befindet (siehe Abb. 20). Für 60 s soll die Ratte das Gleichgewicht halten. Mit einem jeweiligen Zeitabstand von 60 s wird dieser Test insgesamt dreimal durchgeführt. Die Zeit in s bzw. die Unfähigkeit der Ratte, sich festzuhalten, dokumentiert und bewertet man entsprechend der Tabelle 01.



*Abbildung 20: Ratte beim Balancieren auf dem 1,5 cm breiten Holzstab beim Beam- Balance- Test.*

### **Gewichtskontrolle**

Durch Gewichtskontrolle können Zu- und Abnahmen des Körpergewichts erfasst werden.

Die Bewertung der vorangehend beschriebenen Tests erfolgt anhand des folgenden Punkteschemas:

**Tabelle 01: Punkteschema zur Beurteilung der motorischen Funktion**

Kategorie	Grad der Beeinträchtigung							Punkte	Normal
	0	1	2	3	4	5	6		
<b>Laufen</b>	normal	Ataxie	Kreis- be- wegung	/	/	/	/	<b>0-2</b>	<b>0</b>
<b>Koordina- tion im Beam- Walking- Test</b>	1-3 Fehlritte	4-10	11-20	> 20	nicht fähig	/	/	<b>0-4</b>	<b>0</b>
<b>Kraft im Drahtgitter - Test</b>	> 5 s bei 180°	< 5 s bei 180°	nur bei 90°	nicht fähig	/	/	/	<b>0-3</b>	<b>0</b>
<b>Kraft im Greif- Zug- Test</b>	11-15 s	6-10 s	1-5 s	nicht fähig	/	/	/	<b>0-3</b>	<b>0</b>
<b>Gleichge- wicht im Beam- Balance- Test</b>	50-60 s	30-49 s	10-29 s	1-10 s	nicht fähig	/	/	<b>0-4</b>	<b>0-1</b>
<b>Symmetrie der Bewegung</b>	Sym- metrie	einseitige Schwäche	Asym- metrie	/	/	/	/	<b>0-2</b>	<b>0</b>
<b>Fein- motorik als Fresszeit (ZHBT)</b>	< 5 s	< 7 s	< 9 s	> 9 s	/	/	/	<b>0-3</b>	<b>0</b>
<b>Geschick- lichkeit als Anzahl frustranter Loch- besuche (ZHBT)</b>	0	1	2	> 2	/	/	/	<b>0-3</b>	<b>0</b>
<b>Totaler Motorik- Score</b>								<b>0-24</b>	<b>0-1</b>

### 3.2.2.3 Untersuchung der neurokognitiven Funktion mit Hilfe des modifizierten Zylinder- Hole- Board- Tests (ZHBT)

#### Versuchskäfig

Voraussetzung für die neurokognitive Testphase ist eine möglichst stressarme Umgebung, in der die sehr sozial lebenden Ratten ihre natürlichen Verhaltensweisen aufzeigen können. Ein speziell konzipierter Versuchstierkäfig, auch „Homecage“ genannt, vereint sowohl Tierabteil als auch Versuchsarena in einem. Für einen Zeitraum von elf Tagen nutzen die Tiere zunächst den gesamten mit Weichholzgranulat eingestreuten Homecage als Wohnraum.

Der 80 x 60 x 50 cm große Versuchstierkäfig stellt eine nach oben offene Kiste dar, die aus grauen PVC- Platten (eigene Herstellung, Fa. Weiss, München) mit einer Dicke von 1 cm gefertigt ist. Ein Abdeckgitter aus Metall (82 x 61 cm, Quadratlochung 1 x 1 cm) hindert die Tiere am Herausklettern, sorgt aber zugleich für einen ausreichenden Lichteinfall.

Eine durchsichtige und mit Löchern versehene Trennwand (59 x 1 x 50 cm, Durchmesser der Löcher 1,5 cm, Lochabstand 5 cm), die einen Tag vor dem operativen Eingriff eingesetzt wird, teilt den Homecage in Versuchsarena und Tierabteil auf. Hierfür sind zwei PVC-U- Profilschienen (13 x 15 x 1,5 mm, Länge je 50 cm) notwendig. Die Trennwand ermöglicht so der Ratte während der Testphase, visuell und olfaktorisch Kontakt zu ihren Artgenossen aufzunehmen. An der Außenlängsseite des Tierabteils sind Futterraufen sowie Nippeltränken befestigt, die den Tieren über geeignete Löcher in der PVC- Wand zugänglich sind.



**Abbildung 21:** Linkes Bild: Darstellung des Arbeitsplatzes mit PC, Weichtastatur, Testutensilien, Videokamera sowie Homecage mit Futter und Wasserzugang; Bild in der Mitte: Aufsicht von oben in den Homecage mit eingezogener Trennwand zur Separierung von Wohnabteil und Versuchsarena; rechtes Bild: Aufsicht von oben auf Wohnabteil und Versuchsarena, Besuch eines Zylinders.

## **Testprinzip**

Das visuell- räumliche Testprinzip des ZHBT erlaubt es, in nur einem einzigen Test kognitive, emotionale und motorische Parameter parallel zu untersuchen. Neben Lern- und Gedächtnisprozessen lassen sich zudem Verhaltensweisen analysieren, die mit Angst, Exploration, Erregung und sozialer Affinität in Verbindung stehen. Des Weiteren gewinnt man Erkenntnisse über die lokomotorische Aktivität, sowie die motorische Geschicklichkeit der Ratten.

Grundlage des Tests ist die Verwendung einer Futterbelohnung in Form von Mandelstückchen (Mandeln, blanchiert gehobelt, Märsch-Import, Ulm). Von insgesamt zehn Lochvertiefungen, die alle mit aufgesteckten, nach oben hin offenen Zylindern versehen sind, werden lediglich drei Löcher mit einer Futterbelohnung, die für die Ratte erreichbar ist, gefüllt. Zusätzlich markiert man die aufgesteckten Zylinder dieser drei gefüllten Lochvertiefungen mit weißem Klebestreifen. Die übrigen sieben nicht markierten Löcher sind leer.

Die Ratte soll hierbei lernen, die optisch markierten Zylinder mit darin befindlichem Futter in Verbindung zu bringen, und diese gezielt aufzusuchen. Zudem muss sie sich daran erinnern, welche Futterbelohnungen sie bereits gefressen hat.

## **Modifiziertes Zylinder- Hole- Board (ZHB)**

Das modifizierte Zylinder- Hole- Board (ZHB) (siehe Abb. 22) ist ein 40 x 25 x 1 cm großes Brett, welches aus dunkelgrauem PVC hergestellt wurde. Auf diesem Board befinden sich zehn Lochvertiefungen, die in drei Reihen zueinander versetzt angeordnet sind. Jede Lochvertiefung (Durchmesser von 5 cm) weist zwei unterschiedliche Stanztiefen auf (peripher 0,3 cm mit einem Durchmesser von 5 cm, zentral 0,6 cm mit einem Durchmesser von 3,5 cm). Nun werden alle zehn Löcher mit jeweils drei Mandelstückchen befüllt und mit einem Drahtgitter (Durchmesser ca. 4,8 cm, Quadratlochung 2 mm) abgedeckt. Dann steckt man entsprechend dunkelgraue PVC- Zylinder (Durchmesser 5 cm, Höhe 5 cm, Randbreite 2 mm) auf die jeweiligen Lochvertiefungen auf. Drei dieser Zylinder markiert man sichtbar am oberen äußeren Rand mit weißem Klebestreifen (Tesa Isolierband, Tesa AG, Hamburg). Anschließend legt man jeweils ein Mandelstückchen oben auf das Drahtgitter der drei gekennzeichneten Zylinder.



*Abbildung 22: Aufsicht auf das ZHB mit Nummerierung der zehn Löcher.*

### **Übersicht über benötigte Hilfsmittel**

- Futterbelohnung: Mandeln, blanchiert gehobelt, Märsch-Import, Ulm
- Johannisbeeraromalösung: Blackcurrant Flavouring Liquid, Th. Geyer, Friedrichsthal, zur Verdünnung 0,012 ml auf 30 ml Leitungswasser
- Wattestäbchen: Noba, Wetter
- Tesa Isolierband (weiß): Tesa AG, Hamburg
- PC-Desktop Vectra Hewlett Packard, Monitor Samsung SyncMaster 151BM, Weichtastatur Foldable Keyboard (Fold-2000, Taiwan), Beobachtungsprogramm: The Observer® Version 5,0 (Noldus Information Technology bv, Wageningen, The Netherlands, ©2003)
- Kamera: Digital-Camcorder-Videokamera (GR-DV 1800, JVC, Japan) mit Stativ und Aufnahmekassette DV 60/TDK
- Anatomische Pinzette: Aesculap AG & Co. Kg, Tuttlingen

## Allgemeiner Versuchsablauf

Zur Gewöhnung an den Untersucher und die Futterbelohnung bekommen die Ratten vor dem Operationstag vier Tage lang Mandeln angeboten. Am Tag vor der Operation wird die durchsichtige Trennwand in den Versuchskäfig eingezogen und die Versuchsarena von Einstreu und Verschmutzungen befreit. Um im Verhaltenstest die lokomotorische Aktivität erfassen zu können, werden mit weißem Klebestreifen vier Markierungen für Linien-Überquerungen („Line Crossings“) auf dem Boden der Versuchsarena angebracht. Zudem erfolgt die Kennzeichnung dreier Zylinder mit weißem Klebestreifen an deren oberem äußeren Rand. Anschließend legt man das so vorbereitete ZHB zentral in die Versuchsarena ein.

Nach der operativen Phase beginnt am Tag vier die kognitive Testphase mit dem ZHBT, die bis Tag 13 dauert. Grundsätzlich finden pro Tag vier Durchläufe mit einer maximalen Zeitspanne von jeweils fünf Minuten statt. Die Lochkombinationen des ZHB wechseln jeden Tag randomisiert.

*Tabelle 02: Randomisierte Lochkombinationen in der Lernphase*

<b>Tag</b>	<b>Lochkombination</b>
4. Tag	4, 6, 9
5. Tag	1, 5, 7
6. Tag	2, 3, 9
7. Tag	1, 7, 10
8. Tag	3, 5, 7
9. Tag	2, 5, 8
10. Tag	7, 9, 10
11. Tag	3, 6, 9
12. Tag	1, 3, 8
13. Tag	6, 8, 9

## Versuchsdurchführung

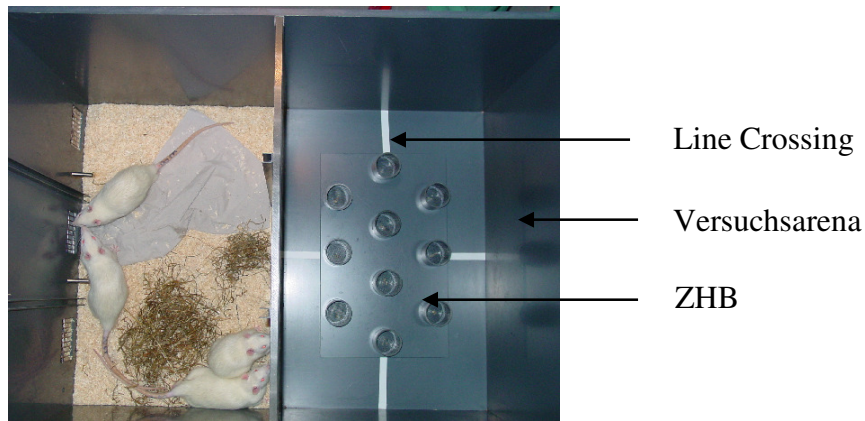
Um so nah wie möglich an der Aktivitätsphase der dämmerungs- und nachtaktiven Ratten zu arbeiten, führt man die Versuche in der späten Helligkeitsphase von acht bis zwölf Uhr durch. Zutritt zum Tierstall haben nur die zuständigen Untersucher, die bereits während der Eingewöhnungszeit die tägliche Pflege und Kontrolle der Tiere übernommen haben. Neben dem Tragen von Schutzkleidung (grüne OP- Kleidung, Haarnetz, Atemschutzmaske, raumeigene Schuhe) ist es gleichermaßen wichtig, auf starke Geruchsreize für die Tiere (z. B. intensives

Deodorant, Kosmetika, Knoblauch, Kaffee) zu verzichten, um gleichbleibende Bedingungen für die Testsituation zu schaffen.

Nachdem man das Metallgitter vom Homecage abgenommen hat, beurteilt man zu Beginn das Allgemeinbefinden der Ratten. Kranke Tiere weisen häufig ein stumpfes struppiges Fell auf, sind ungeputzt oder sondern sich von der Gruppe ab. Anschließend nimmt man das ZHB aus der Versuchsarena und reinigt dieses, sowie die Versuchsarena mit Zellstoff und gegebenenfalls Wasser, um Einstreureste und Schmutzpartikel zu entfernen.

Vor Testbeginn füllt man mit der Pinzette die zehn Vertiefungen mit jeweils drei Mandelstückchen, deckt sie mit dem Drahtgitter ab und fügt alles mit den aufgesteckten Zylindern zum kompletten ZHB zusammen. Damit alle Löcher einen einheitlichen Geruch aufweisen und zugleich die Appetenz der Ratten gesteigert wird, streicht man den oberen, inneren Rand aller zehn Zylinder mit einem in Johannisbeerlösung getränkten Wattestäbchen aus. Mit der Pinzette legt man nun in die drei markierten Zylinder jeweils ein Mandelstückchen mittig ein. Das vorbereitete Board setzt man dann in das Zentrum der Versuchsarena ein. Der Untersucher gibt in das PC- Beobachtungsprogramm Tiernummer, Versuchstag, Name des Untersuchers und Zuordnung des Tieres (Kontrolle, Operation) ein. Eine Kamera an der Längsseite der Versuchsarena zeichnet die Beobachtungen auf.

Die Ratte wird vorsichtig mit einem gezielten Griff unter Brust und Bauch aus ihrem Wohnabteil gehoben und in den unteren rechten Quadranten der Versuchsarena, mit dem Schwanz zur Trennwand gerichtet, eingesetzt. Gleichzeitig startet man das Beobachtungsprogramm mit der freien Hand. Da die ganze Aufmerksamkeit nun der Ratte gilt, gibt der Untersucher seine Beobachtungen über jeweilige Tastenkombinationen, die ein bestimmtes Verhalten kodieren, ohne auf die Tastatur zu sehen, geräuschlos ein. Das Computer-Programm erfasst die Eingaben, transformiert und speichert die erhobenen Daten für die spätere Auswertung in einer Exceltabelle. Um das Tier in seinem natürlichen Verhaltensmuster nicht zu stören, achtet man besonders während des Durchlaufs auf eine ruhige Umgebung.



**Abbildung 23:** Aufsicht auf die Versuchsarena mit Line Crossing- Markierungen und eingelegtem ZHB.

Ein Durchlauf dauert maximal fünf Minuten (300 s). Hat die Ratte vor Ablauf der Zeit alle drei Futterbelohnungen gefunden und gefressen, beendet man den Durchlauf manuell und setzt die Ratte wieder zu ihren Artgenossen zurück. Die Vorgehensweise bei den nachfolgenden Tieren ist identisch. Haben alle Ratten den ersten Durchlauf beendet, ändert man jeweils in den folgenden Durchläufen die Reihenfolge der Tiere.

Während die Tiere an Tag 13 die ersten drei Durchläufe, wie vorangegangen beschrieben, mit der Lochkombination 6, 8, 9 absolvieren, ersetzt man im vierten und somit letzten Durchlauf die gekennzeichneten Zylinder durch unmarkierte Zylinder, die schon zuvor in den vorhergehenden Durchläufen verwendet wurden. Zudem verzichtet man auf die Futterbelohnung auf dem Gitter. Der vierte Durchlauf ist beendet, wenn alle drei Löcher (6, 8, 9) trotz fehlender Markierung und Mandelstückchen besucht wurden, oder die maximale Zeit erreicht wurde.



*Tabelle 03: Überblick über Aktionen, Tastenbelegungen und Definitionen im ZHBT*

<b>Aktion</b>	<b>Tastenbelegung</b>	<b>Definition</b>
Beginn des Durchlaufs	Mausklick auf „Go“/Enter	Loslassen des Tieres aus der Hand
Schnuppern an der Trennwand, Beginn „Group Contact“= GC	z	Durchstecken der Nase durch ein Loch in der Trennwand
Schnuppern an der Trennwand, Ende = OFF	j	Abwenden von der Trennwand oder andere Aktion
Betretten des Boards = Board	r	Zielgerichtetes Betretten des Boards mit zwei Pfoten oder mit Pfote und Schnauze
Verlassen des Boards = Box	v	Zielgerichtetes Verlassen des Boards mit zwei Vorderpfoten
Loch 1/2/3 (CHV, Correct Hole Visit 1/2/3)	f, g, h	Aktives Aufsuchen eines markierten Loches
Motor skill, Beginn	d	Nase befindet sich unterhalb der Ebene
Motor skill, Ende	j	Tier wendet sich ohne zu fressen vom Loch ab
Fressen Beginn = Food intake on (FI ON (BOX))	x	Tier beginnt in der Box zu fressen
Fressen Beginn = Food intake on (FI ON (BOARD))	c	Tier beginnt auf dem Board zu fressen
Fressen Ende = OFF	j	Kauvorgang beendet
Falsches Loch = Wrong Choice, WC	k	Besuch eines falschen, nicht markierten Loches
Wiederholungsbesuch = Repeated Choice, RC	l	Aktives Aufsuchen eines Loches nach vorherigem Besuch mit Futteraufnahme
„Männchen machen“ = Rearing	t	Erheben auf die Hinterbeine
Groom (Box), Beginn	u	Putzen, Kratzen in der Box
Groom (Board), Beginn	5	Putzen, Kratzen auf dem Board
Groom (Box/Board), Ende	j	Putzen beendet
Immobilität (Box), Beginn	i	Keine Aktivität ab 3-5 s stillen Sitzens in der Box
Immobilität (Board), Beginn	6	Keine Aktivität ab 3-5 s stillen Sitzens in der Box
Immobilität Ende = OFF	j	Bewegung, Aktion
Hole Visit	f, g, h ohne FI ON, aber mit Motor skill	Besuch eines korrekten Loches ohne Futteraufnahme
Line Crossing, LC	e	Übertreten der Linie mit beiden Vorderpfoten
Kotbällchen, Boli	b	Kotabsatz

## **Erhobene Parameter**

Die im ZHBT ermittelten Parameter lassen sich Gedächtnissystemen (kognitive Parameter), Verhaltensweisen (Verhaltensparameter) (OHL et al., 2001a; OHL et al., 2001b), sowie motorischen Fähigkeiten (motorische Parameter) zuordnen. Die Evaluierung kognitiver Parameter erfolgt dabei unter Zuhilfenahme eines speziell hierfür entworfenen Punkteschemas (siehe Tab. 04, S. 70). Analog zur NU spricht demnach eine hohe Gesamtpunktzahl für eine verminderte kognitive Leistung. Die Werte normaler Tiere liegen zwischen 0 und 3.

## **Kognitive Parameter**

Über den ZHBT kann die Lernleistung, die sich über die Gesamtzeit des Durchlaufes („Time Complete“, TC) definiert, ermittelt und verglichen werden. Die Funktion des deklarativen Gedächtnisses (Hippokampus) wird über die Anzahl an falsch besuchten Löchern („Wrong Choices“, WC), sowie die Anzahl an nicht besuchten, markierten Löchern („Omission Errors“, OE, Auffindungsfehler) bestimmt und evaluiert. Als Indikator des Arbeitsgedächtnisses (Präfrontaler Kortex) gilt die Anzahl wiederholt besuchter, geleerter Löcher („Repeated Choices“, RC) (siehe Tab. 04).

**Tabelle 04: Punkteschema zur Bewertung der kognitiven Funktion im ZHBT**

Kategorie	Grad der Beeinträchtigung							Punkte	Normal
	0	1	2	3	4	5	6		
<b>Lernleistung:</b> <i>Gesamtzeit des Durchlaufes</i>	< 25 s	25- 49 s	50- 74 s	75- 99 s	100- 124 s	125- 249 s	> 250 s	<b>0-6</b>	<b>0-1</b>
<b>Deklaratives Gedächtnis:</b> <i>falsch besuchte Löcher</i>	0	2	4	6	8	10	> 10	<b>0-6</b>	<b>0-1</b>
<i>nicht besuchte, markierte Löcher</i>	0	1	2	3	4	5	> 5	<b>0-6</b>	<b>0</b>
<b>Arbeitsgedächtnis:</b> <i>wiederholt besuchte Löcher</i>	0	1	2	4	5	7	> 7	<b>0-6</b>	<b>0-1</b>
<b>Totaler Kognitions-Score</b>								<b>0-24</b>	<b>0-3</b>

### Motorische Parameter

Motorische Fähigkeiten werden in erster Linie anhand der NU bewertet. Der ZHBT bietet darüberhinaus die Möglichkeit, Erkenntnisse über Geschicklichkeit, sowie feinmotorische Fertigkeiten zu gewinnen (siehe Tab. 01, S. 61). Als Indikator der Feinmotorik gilt die Fresszeit („Time per Food Intake“), die die Ratte für das Fressen der Futterbelohnung benötigt. Die Beurteilung der Geschicklichkeit erfolgt über die Anzahl frustraner Besuche eines gefüllten Loches im ZHBT (siehe Tab. 01, S. 61).

### Verhaltensparameter

Anhand der Verhaltensparameter lassen sich verschiedene Verhaltensmuster differenzieren: Angstverhalten, Allgemeinbefinden, soziale Affinität, Erregung, gerichtete und ungerichtete Exploration und Bewegungsaktivität (siehe Tab. 05, S. 72). Die auf dem Board verbrachte Gesamtzeit („Time on Board“), die Latenz bis zum ersten Boardbesuch („Latency First Entry on Board“), sowie die Anzahl der Boardbesuche („Number of Board Entries“) gelten als

Indikatoren für Angstverhalten. Die Dauer der Inaktivitätsphase an der Gesamtzeit („Immobility“) spiegelt das Allgemeinbefinden wider. Die soziale Affinität kann über den Kontakt zu den Artgenossen über die Trennwand („Group Contact“) ermittelt werden. Die Latenz bis zum ersten Lochbesuch („Latency First Hole Visit“) und die Anzahl aller besuchten Löcher („Number of Holes Visits“) liefern Erkenntnisse über die gerichtete Exploration, wohingegen das Aufrichten auf die Hinterbeine („Rearings“) als ungerichtete Exploration gewertet wird. Als Indikator der Erregung zählen die Gesamtzeit der Putzphasen („Grooming“) und die Anzahl an Kotbällchen („Boli“). Die allgemeine Bewegungsaktivität bestimmt man im ZHBT mit der Anzahl an Linienüberquerungen („Line Crossings“).

**Tabelle 05: Punkteschema zur Bewertung des Verhaltens im ZHBT**

Kategorie	Grad der Beeinträchtigung							Punkte	Normal
	0	1	2	3	4	5	6		
<b>Angstverhalten:</b> <i>Gesamtzeit auf dem ZHB</i>	> 15%	6-15%	< 6%	/	/	/	/	<b>0-2</b>	<b>0-1</b>
<i>Latenz erster ZHB-Besuch</i>	< 10 s	> 10 s	/	/	/	/	/	<b>0-1</b>	<b>0</b>
<i>Anzahl ZHB-Besuche</i>	> 1	keine	/	/	/	/	/	<b>0-1</b>	<b>0</b>
<b>Allgemeinbefinden:</b> <i>Immobilität</i>	< 5 %	5-10 %	10-30 %	> 30 %	/	/	/	<b>0-3</b>	<b>0</b>
<b>Soziale Affinität:</b> <i>Kontakt mit der Gruppe</i>	< 4	4-6	6-8	> 8	/	/	/	<b>0-3</b>	<b>0</b>
<b>Gerichtete Exploration:</b> <i>Latenz erster Lochbesuch</i>	< 30 s	> 30 s	/	/	/	/	/	<b>0-1</b>	<b>0</b>
<i>Besuchte Löcher</i>	> 2	< 2	/	/	/	/	/	<b>0-1</b>	<b>0</b>
<b>Ungerichtete Exploration:</b> <i>Aufrichten auf die Hinterbeine</i>	< 3	3-5	5-10	> 10	/	/	/	<b>0-3</b>	<b>0</b>
<b>Erregung:</b> <i>Putzphasen</i>	< 2	2-3	3-4	> 4	/	/	/	<b>0-3</b>	<b>0-1</b>
<i>Kotbällchen</i>	keine	> 1	/	/	/	/	/	<b>0-1</b>	<b>0</b>
<b>Lokomotion:</b> <i>Linienüberquerung</i>	< 3	3-4	4-5	> 5	/	/	/	<b>0-3</b>	<b>0</b>
<b>Totaler Verhaltens-Score</b>								<b>0-22</b>	<b>0-2</b>

### **3.2.2.4 Entnahme und Präparation des Gehirns**

Nach Ende der 14 Tage dauernden postoperativen kognitiven und neurologischen Testphase werden die Ratten in tiefer Isoflurannarkose (5 Vol %) entblutet und durch Dekapitation getötet. Das Gehirn wird in toto entnommen und mit der Unterseite auf einem Metallplättchen auf Trockeneis tiefgefroren. Sobald das Gehirn komplett durchgefroren ist, lagert man es in einem aus Aluminiumfolie hergestellten Röhrchen bis zur weiteren Bearbeitung im Gefrierschrank bei - 80 °C.

Um für die histologischen Untersuchungen Schnitte anzufertigen, friert man das tiefgefrorene Gehirn auf dem Objektisch des Kryostat Mikrotoms (HM 355, Microm International GmbH) mit Hilfe von Einfriermedium (Tissue Freezing Medium®, Jung, Leica Instruments, Nussloch) auf. Nach einer Äquilibrierungszeit von 30 min auf eine Temperatur von - 20 °C werden von rostral beginnend sog. Trimmschnitte durchgeführt. Unter Zuhilfenahme des Hirnatlas der Ratte von PAXINOS und WATSON (1998) fertigt man von zwei definierten Ebenen koronare Schnitte an (-0,3 und -3,3 mm kaudal des Bregma): Bei einer Objekttemperatur von - 20 bis - 18 °C werden von beiden Ebenen Schnitte mit einer Dicke von 7 µm erstellt und dabei jeweils zwei Schnitte auf einen Superfrost-Objektträger (Super Frost® Plus, Menzel Gläser, Braunschweig) aufgezogen. Die fertigen Schnitte, sowie das übrige Gehirn werden zur späteren Bearbeitung im Gefrierschrank bei - 80 °C aufbewahrt.

### **3.2.2.5 Histologie**

#### **Hämatoxylin- Eosin- Färbung (HE- Färbung)**

Zur Bestimmung des neuronalen Zellschadens färbt man die Schnitte nach der Hämatoxylin-Eosin- Methode. Die Hirnschnitte werden aus dem - 80 °C- Gefrierschrank entnommen und in 100 % Ethanol fixiert, bevor sie in einer absteigenden Alkoholreihe (96 %, 70 % Ethanol, Fa. Merck, Darmstadt) hydriert werden. Anschließend wäscht man die Schnitte kurz in destilliertem Wasser. Danach erfolgt die Hämalau- Färbung nach Mayer (hausinterne Apotheke) für 1 bis 3 min. Nach 10-minütigem Spülen unter Leitungswasser färbt man die Schnitte für ca. 40 s in Eosin (wässrige Eosin-Dinatrium Lösung, hausinterne Apotheke). Nach einem weiteren Spülvorgang mit destilliertem Wasser und der Rehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 % Ethanol) belässt man die Schnitte für 2 min in Roti- Histol (Fa. Roth, Karlsruhe). Schließlich deckt man diese unter Verwendung von

Roti- Histokitt (Fa. Roth, Karlsruhe) ein, lässt sie trocknen und bewahrt diese zur weiteren Auswertung in einem Objektträgerkasten bei Zimmertemperatur auf.

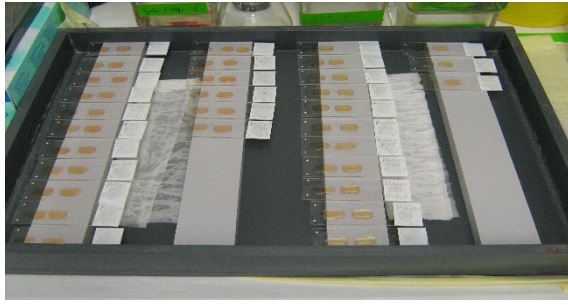
Mit dem Lichtmikroskop (Axiolab, Fa. Zeiss, Jena) ermittelt ein gegenüber den Versuchsgruppen geblindeter Untersucher den neuronalen Zellschaden durch manuelles Auszählen (Vergrößerung 400-fach). Es werden zwei unterschiedliche Gehirnareale untersucht: Frontaler Kortex (motorisches Gebiet, Motorkortex) und Hippokampus. Die Auswertung des Frontalen Kortex erfolgt beidseits jeweils mit Hilfe fünf hoch vergrößerter Felder („High Power Field“).

In der HE- Färbung können vitale und geschädigte Neurone klar differenziert werden. Während intakte Neurone eine runde Form, bläulichfarbendes Zytoplasma, einen deutlich erkennbaren Nucleus mit Nucleolus aufweisen, sind geschädigte Neurone durch eine dreieckige bzw. unregelmäßige Form, das eosinophile, kräftig pinke Zytoplasma, den kondensierten dunkel gefärbten Zellkern und den meist nicht mehr erkennbaren Nucleolus gekennzeichnet. Sogenannte „Dark Neurons“, mit einem hochgradig basophilen Zytoplasma, pyknotischem Zellkern sowie ohne erkennbaren Nucleolus zählt man ebenfalls zu den geschädigten Neuronen.

### **Immunhistochemische Untersuchung**

#### *Doppelfärbung zur Detektion NFκB- positiver Neurone*

Die Gefrierschnitte werden bei Raumtemperatur für 10 min in ein Fixierungsbad aus 4 %igem Paraformaldehyd (eigene Herstellung) getaucht und anschließend einem Waschgang mit Phosphat- gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline, PBS) unterzogen. Durch Anwendung eines 3 %igen Wasserstoffperoxid- Methanol- Gemisches blockiert man die endogene Peroxidase. Danach werden die Schnitte erneut gewaschen. Um im weiteren Verlauf die Bindung des Primärantikörpers an unspezifische Bindungsstellen zu verhindern, behandelt man die Schnitte 20 min mit einer Proteinblockierungsreagenz („Protein Block Serum-Free“ der Firma DAKO (DakoCytomation, Denmark A/S, Glostrup Denmark)) in einer feuchten Kammer.



**Abbildung 24:** Inkubation der histologischen Schnitte in der feuchten Kammer.

Zur Detektion des gesuchten Proteins NFκB trägt man im ersten Schritt der Doppelfärbung zunächst den entsprechenden Primär- Antikörper (Polyclonal Antibody to Rabbit NFκB p65, Abcam, Cambridge, Großbritannien) in entsprechender Verdünnung (1:50) auf. Zuvor umrandet man das Gehirngewebe mit einem Fettstift (Liquid Blocker, Super PapPen, Japan), um ein Abfließen der aufzutragenden Substanzen zu verhindern. Nach einer Inkubationszeit von 60 min wäscht man erneut und bringt dann den Sekundär- Antikörper (ECL Anti-rabbit IgG, peroxidase-linked species-specific whole antibody; Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) 1:200 verdünnt, auf. Nach einem weiteren Waschgang fügt man Horseradish Peroxidase konjugiertes Streptavidin (R.T.U. Horseradish Peroxidase Streptavidin; Vector Laboratories, Inc., California, USA) hinzu und nachfolgend den Farbstoff Diaminobenzidin von der Firma DAKO (DakoCytomation, Denmark A/S, Glostrup Denmark). Peroxidase ist in der Lage, den Farbstoff Diaminobenzidin in ein braunes und unlösliches Produkt umzusetzen. Nach 10 min Inkubation entfernt man verbliebene Diaminobenzidin- Farbstoffreste mit einem Spülgang in destilliertem Wasser.

Im zweiten Schritt der Doppelfärbung werden nun die Hirnschnitte mit einem Primärantikörper (Mouse anti-neuronal nuclei (NeuN) Monoclonal antibody; Chemicon International Inc., Temecula, California, USA) gegen das neuronale Strukturprotein NeuN in einer Verdünnung von 1:1000 inkubiert. Nach einem Waschdurchgang in PBS erfolgt das Aufbringen und Inkubieren des 1:200 verdünnten und biotinylierten anti-mouse Sekundär-Antikörpers (ECL Anti-mouse IgG, peroxidase-linked species-specific whole antibody, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg). Anschließend fügt man mit alkalischer Phosphatase konjugiertes Streptavidin (Alkaline Phosphatase Streptavidin; Vector Laboratories, Inc., California, USA) in der Verdünnung 1:200 hinzu. Danach trägt man den roten Farbstoff Vector Red (Vector® Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I; Vector Laboratories, Inc., California, USA) auf die Gehirnschnitte auf. Nach 30 min Inkubation



wäscht man erneut mit PBS und Leitungswasser, bevor die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe in Roti- Histol (Fa. Roth, Karlsruhe) überführt und anschließend mit Roti-Histokitt (Fa. Roth, Karlsruhe) eingedeckt werden.

Unter dem Lichtmikroskop ermittelt ein geblinderter Untersucher durch manuelles Auszählen in Hippokampus und Motorkortex (Vergrößerung 400-fach) die Anzahl doppelgefärbter Neurone. Diese sind rot (NeuN) und braun (das gesuchte Protein NFκB) angefärbt.

### **Beurteilung des neuronalen Zellschadens**

Mit Hilfe der HE- Färbung, sowie der immunhistochemischen Doppelfärbung ist es möglich, das Ausmaß des neuronalen Zellschadens in Hippokampus und Motorkortex zu bewerten. Hierzu bedient man sich, wie schon bei der Bewertung der neurologischen und der neurokognitiven Parameter, eines speziell entworfenen histologischen Punkteschemas (siehe Tab. 06), sowie eines immunhistochemischen Punkteschemas (siehe Tab. 07). Je höher dabei jeweils die Gesamtpunktzahl, umso weitreichender der neuronale Zellschaden. Desweiteren werden die HE- Schnitte zusätzlich fotografiert (Evolution MP Color-Kamera, Media Cybernetics Inc., Gleichen), um mit einer speziellen Software (Image Pro® Express, Version 4.5.1.3., Media Cybernetics Inc., Gleichen) die Anzahl der Infarkte und die Größe der Infarktfläche in mm<sup>2</sup> bestimmen zu können (siehe Tab. 06).

***Tabelle 06: Histologisches Punkteschema zur Bewertung des neuronalen Zellschadens in Hippokampus und Motorkortex***

Kategorie	Grad des neuronalen Zellschadens				Punkte	Normal
	0	1	2	3		
<b><i>Intakte Neurone im Hippokampus</i></b>	100 %	99 - 90 %	89 - 70 %	< 70 %	<b>0-3</b>	<b>0</b>
<b><i>Intakte Neurone im Motorkortex</i></b>	100 %	99 - 45 %	44 - 30 %	< 30 %	<b>0-3</b>	<b>0</b>
<b><i>Infarktfläche</i></b>	0 mm <sup>2</sup>	1 - 5 mm <sup>2</sup>	6 - 10 mm <sup>2</sup>	> 10 mm <sup>2</sup>	<b>0-3</b>	<b>0</b>
<b><i>Anzahl der Infarkte</i></b>	0	1	2	> 2	<b>0-3</b>	<b>0</b>
<b><i>Totaler Histologie- Score</i></b>					<b>0-12</b>	<b>0</b>

**Tabelle 07: Immunhistochemisches Punkteschema zur Bewertung des neuronalen Zellschadens in Hippokampus und Motorkortex**

Kategorie	Grad des neuronalen Zellschadens				Punkte	Normal
	0	1	2	3		
<i>NFκB- positive Neurone im Hippokampus</i>	0 - 1 %	2 - 4 %	5 - 7 %	> 7 %	<b>0-3</b>	<b>0</b>
<i>NFκB- positive Neurone im Motorkortex</i>	0 - 1 %	2 - 4 %	5 - 7 %	> 7 %	<b>0-3</b>	<b>0</b>
<i>Totaler NFκB- Score</i>					<b>0-6</b>	<b>0</b>

### 3.2.2.6 Statistische Bewertung der Befunde

Die statistische Bewertung der physiologischen Parameter und des Körpergewichts erfolgt mit allgemeinen linearen Modellen. Beurteilt werden der Zwischensubjektfaktor „Gruppe“ (DHCA MXF, DHCA Plazebo, Sham MXF, Sham Plazebo und unbehandelte Kontrolle) und der Innersubjektfaktor „Zeit“, sowie diverse Wechselwirkungsbeziehungen oder deren Interaktionen (Zeit (t) x Gruppe). Der Faktor Zeit wird für die physiologischen Parameter quadratisch ( $t^2$ ) ausgewertet. Nach Bildung der jeweiligen Punktwerte, werden die motorische sowie die kognitive Funktion, das Verhalten und das histologische und immunhistochemische Ergebnis mit einem Kruskal- Wallis Test ausgewertet. Ergeben sich zwischen den Gruppen Signifikanzen, schließen sich post hoc Mann Whitney Tests an ( $p < 0,05$ ).

### 3.3 Ergebnisse

#### 3.3.1 Physiologische Parameter der operativen Phase

Während des operativen Eingriffs werden folgende physiologische Parameter erhoben und zu bestimmten Messzeitpunkten dokumentiert: mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), Hämoglobin (Hb), arterieller Sauerstoffpartialdruck ( $\text{PaO}_2$ ), Basenüberschuss (BE), sowie die Blutglukose. Die Messungen erfolgen zu fünf unterschiedlichen Zeitpunkten: zehn Minuten vor Beginn der EKZ (Prä-EKZ), vor dem Beginn des DHCA (Prä-DHCA), fünf Minuten nach Start der Wiedererwärmung (Post-DHCA), fünf Minuten vor Abgang von der EKZ (EKZ-Ende) und eine Stunde nach Ende der EKZ (Post-EKZ) (siehe Tab. 08).

**Tabelle 08: Physiologische Parameter aller vier Gruppen während des operativen Eingriffs zu den definierten Messzeitpunkten**

Parameter	Gruppe	Prä-EKZ	Prä-DHCA	Post-DHCA	EKZ-Ende	Post-EKZ	Zeit <sup>2</sup> x Gruppe	Zeit <sup>2</sup>	Gruppe
MAP (mmHg)	DHCA MXF	91 ±4	68 ±8	55 ±5	1)	81 ±5	n.s.	<0,001	<0,001
	DHCA Plazebo	91 ±6	59 ±6	56 ±7		90 ±6			
	Sham MXF	83 ±3	77 ±3	77 ±4		75 ±3			
	Sham Plazebo	100 ±3	84 ±6	91 ±5		90 ±2			
Hb (g/dl)	DHCA MXF	15,3 ±0,3	8,1 ±0,2	7,8 ±0,1	8,1 ±0,2	11,3 ±0,2	<0,001	<0,001	<0,001
	DHCA Plazebo	15,1 ±0,3	8,3 ±0,2	7,9 ±0,2	8,1 ±0,2	11,5 ±0,2			
	Sham MXF	15,8 ±0,3	15,4 ±0,3	14,6 ±0,2	14,2 ±0,3	13,8 ±0,2			
	Sham Plazebo	14,7 ±0,3	14,6 ±0,2	14,0 ±0,3	13,6 ±0,4	12,9 ±0,3			
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	DHCA MXF	179 ±10	545 ±12	444 ±12	320 ±20	136 ±10	<0,001	<0,001	<0,001
	DHCA Plazebo	159 ±12	559 ±9	435 ±7	331 ±20	140 ±9			
	Sham MXF	165 ±12	162 ±9	175 ±6	187 ±7	179 ±10			
	Sham Plazebo	155 ±10	151 ±11	170 ±10	176 ±9	173 ±11			
BE (mmol pro l)	DHCA MXF	2,3 ±0,7	-1,1 ±0,7	-4,7 ±0,7	2)	2)	<0,001	<0,001	<0,001
	DHCA Plazebo	4,3 ±0,5	1,1 ±0,4	-2,5 ±0,7					
	Sham MXF	2,8 ±0,8	3,2 ±0,6	2,1 ±0,7					
	Sham Plazebo	4,3 ±0,4	4,0 ±0,4	2,7 ±0,5					
Glukose (mg/dl)	DHCA MXF	121 ±6	159 ±11	260 ±25	277 ±29	136 ±9	<0,001	<0,001	<0,001
	DHCA Plazebo	136 ±4	170 ±11	272 ±12	375 ±17	173 ±9			
	Sham MXF	127 ±8	136 ±7	153 ±8	143 ±11	142 ±8			
	Sham Plazebo	170 ±10	148 ±11	189 ±18	164 ±14	158 ±13			

Tabellarische Darstellung der Mittelwerte (MW) und Standardfehler (±SEM) des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) in mmHg, des Hämoglobins (Hb) in g/dl, des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks (PaO<sub>2</sub>) in mmHg, des Basenüberschusses (BE) in mmol/l und der Blutglukose in mg/dl. Die Erfassung der Parameter erfolgt zu den fünf definierten Zeitpunkten der vier Gruppen DHCA MXF, DHCA Plazebo, Sham MXF und Sham Plazebo. 1) Der MAP wird mit Norepinephringabe über 45 mmHg gehalten. 2) Der BE wird ab Beendigung des DHCA und eine Stunde nach EKZ kontrolliert und in physiologischen Grenzen gehalten. Die

*Signifikanzen werden mit  $p < 0,001$  beschrieben, n.s. bedeutet nicht signifikant. Die Bezeichnung  $\text{Zeit}^2 \times \text{Gruppe}$  beschreibt den Einfluss der Gruppen auf die einzelnen Parameter. Bei allen Parametern (exklusive MAP) ist ein statistisch signifikanter Einfluss der Gruppe feststellbar. Im Zeitverlauf ( $\text{Zeit}^2$ ) weisen die Parameter MAP, Hb, PaO<sub>2</sub>, BE und Glukose auf statistisch signifikante Veränderungen hin. Der alleinige Faktor Gruppe erreicht ebenfalls bei allen Parametern Signifikanzniveau.*

Der **mittlere arterielle Blutdruck (MAP)** bleibt im Verlauf der operativen Phase in beiden Sham- Gruppen mit geringfügigen Abweichungen weitgehend konstant. Während der EKZ zeigen beide DHCA- Gruppen deutlich niedrigere MAP- Werte, die jedoch eine Stunde nach EKZ wieder Basiswerte erzielen (siehe Tab. 08).

Während die **Hämoglobinkonzentration (Hb)** in beiden Sham- Gruppen im Verlauf der operativen Phase nur geringgradig absinkt, zeigen beide DHCA- Gruppen von Beginn bis zum Ende der EKZ deutlich erniedrigte Hb- Konzentrationen. Bis zu einer Stunde nach EKZ steigen die Werte wieder leicht an, erreichen aber die anfänglichen Ausgangswerte nicht (siehe Tab. 08).

Nach vergleichbaren Ausgangswerten steigt der **arterielle Sauerstoffpartialdruck (PaO<sub>2</sub>)** protokollbedingt während der EKZ in beiden DHCA- Gruppen signifikant an. Alle vier Gruppen erreichen eine Stunde nach EKZ respektive Dauer der Sham- Operation mit den Ausgangswerten vergleichbare PaO<sub>2</sub>- Werte (siehe Tab. 08).

Während beide Sham- Gruppen bis zum Beginn der Wiedererwärmung einen nur geringgradig erniedrigten **Basenüberschuss (BE)** aufweisen, sinken die Werte der beiden DHCA- Gruppen deutlich in den Minusbereich ab (siehe Tab. 08).

In beiden Sham- Gruppen bleibt die **Blutglukosekonzentration** im gesamten operativen Verlauf mit geringen Schwankungen auf einem konstanten Niveau. In beiden DHCA- Gruppen zeigt sich dagegen ein kontinuierlicher Anstieg der Blutglukose bis zum Ende der EKZ. Bis zu einer Stunde nach EKZ sinkt die Blutglukose wieder auf vergleichbare Ausgangswerte ab (siehe Tab. 08).

### 3.3.2 Neurologische Parameter

In die statistische Auswertung gehen die neurologisch- motorischen Untersuchungsergebnisse (prä- und postoperativ) der DHCA MXF-, DHCA Plazebo-, Sham MXF- und Sham Plazebo-Gruppe, sowie der Kontrolle mit ein. Die präoperativ ermittelten Werte der neurologischen Untersuchung dienen als Ausgangswert (sog. „Baseline“), um diesen dann mit den postoperativ erhobenen Messwerten der postoperativen Tage 1, 2, 3 und 14 vergleichen zu können. Es wird hierdurch ermöglicht, eine Aussage über den Einfluss von DHCA und/oder MXF hinsichtlich Körpergewicht und Motorik in den verschiedenen Gruppen zu treffen.

#### 3.3.2.1 Körpergewicht

Das Körpergewicht in Gramm (g) wird bei allen Tieren der DHCA- und Sham- Gruppen, sowie der Kontrolle prä-, peri- und postoperativ an den Tagen -1, 0, 1, 2, 3, 4 und 14 einmal täglich bestimmt und dokumentiert. In der folgenden Tabelle (siehe Tab. 09) und Abbildung (siehe Abb. 25) sind die Mittelwerte (MW) und Standardfehler ( $\pm$ SEM) dargestellt.

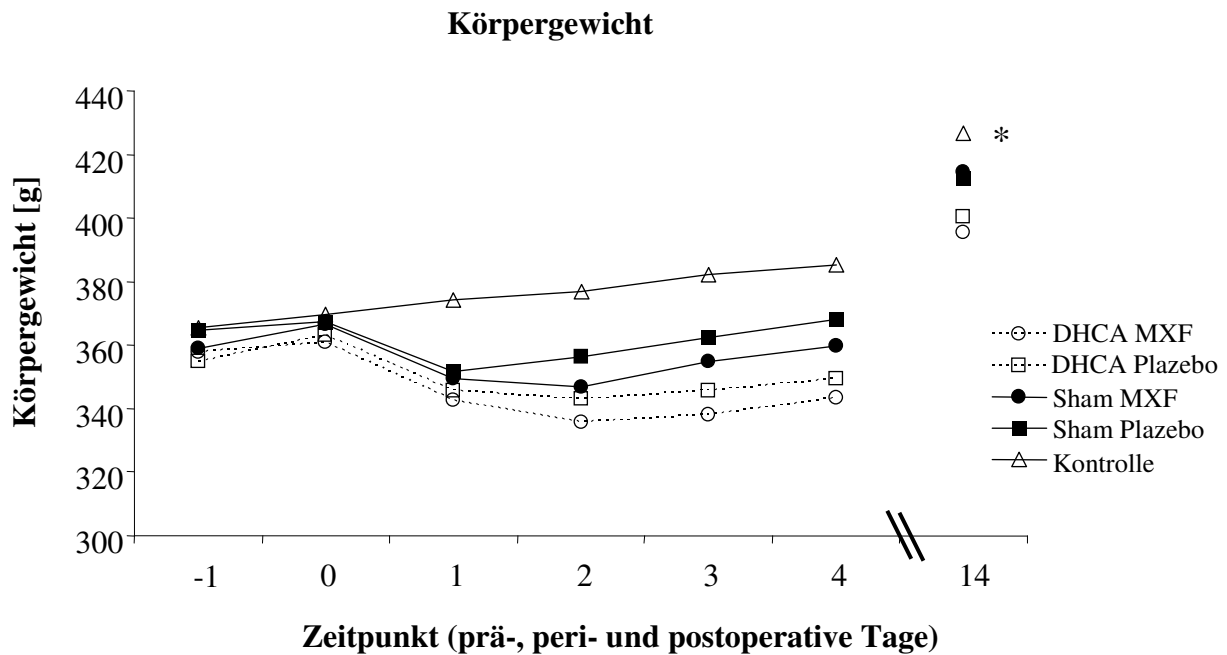
**Tabelle 09: Körpergewicht (g) aller fünf Gruppen im prä-, peri- und postoperativen Verlauf**

T a g	DHCA MXF (n=10)	DHCA Plazebo (n=10)	Sham MXF (n=10)	Sham Plazebo (n=10)	Kontrolle (n=10)
-1	357,8 $\pm$ 4,0	354,6 $\pm$ 3,1	358,9 $\pm$ 6,3	364,7 $\pm$ 2,6	365,5 $\pm$ 10,2
0	360,7 $\pm$ 3,5	363,1 $\pm$ 4,0	366,5 $\pm$ 6,5	367,4 $\pm$ 4,0	369,7 $\pm$ 9,9
1	342,5 $\pm$ 3,8	345,7 $\pm$ 3,8	349,6 $\pm$ 5,6	351,7 $\pm$ 2,8	374,2 $\pm$ 10,6
2	335,6 $\pm$ 4,0	342,8 $\pm$ 4,5	346,9 $\pm$ 5,0	356,3 $\pm$ 3,1	377,0 $\pm$ 11,6
3	338,0 $\pm$ 5,6	345,7 $\pm$ 6,2	354,7 $\pm$ 5,1	362,5 $\pm$ 3,8	382,3 $\pm$ 11,9
4	343,2 $\pm$ 6,8	349,5 $\pm$ 5,6	359,8 $\pm$ 5,2	368,0 $\pm$ 4,1	385,4 $\pm$ 11,9
14	395,3 $\pm$ 8,3	400,3 $\pm$ 6,0	414,3 $\pm$ 8,0	412,7 $\pm$ 4,2	426,6 $\pm$ 16,0

*Tabellarische Darstellung der Mittelwerte (MW) und Standardfehler ( $\pm$ SEM) des Körpergewichts (g) der fünf Gruppen DHCA MXF, DHCA Plazebo, Sham MXF, Sham Plazebo und Kontrolle zu den definierten Untersuchungstagen -1, 0, 1, 2, 3, 4 und 14.*

Am ersten postoperativen Tag zeigt sich in den beiden Sham- sowie den beiden DHCA-Gruppen eine Reduktion des Körpergewichts im Vergleich zum präoperativen Ausgangsgewicht und der Kontroll- Gruppe. Während die Werte der Sham Plazebo- Gruppe bereits

ihren niedrigsten Wert an Tag 1 erreichen, sinkt das Körpergewicht in beiden DHCA-Gruppen und der Sham MXF- Gruppe bis zum Tag 2 weiter ab. Das Körpergewicht der Sham Plazebo- Gruppe steigt bereits ab Tag 2 kontinuierlich an, während eine Zunahme in den übrigen drei Gruppen erst ab Tag 3 zu erkennen ist (siehe Tab. 09 und Abb. 25). So betragen die allgemeinen Gewichtszunahmen von Tag 4 bis zum Tag 14 in allen Gruppen etwa 41,2 g (Kontrolle) bis 54,5 g (Sham MXF).



**Abbildung 25:** Grafische Darstellung der MW  $\pm$ SEM des Körpergewichts (g) der fünf Gruppen DHCA MXF, DHCA Plazebo, Sham MXF, Sham Plazebo und Kontrolle zu den definierten Untersuchungszeitpunkten.  $p < 0,001$  Zeit  $\times$  Gruppe;  $p < 0,05$  \* gg. DHCA MXF

### 3.3.2.2 Motorik

Die durchgeführten neurologisch- motorischen Untersuchungen zur Bewertung des Laufvermögens, der Bewegungssymmetrie, der Koordination im Beam- Walking- Test, des Gleichgewichts im Beam- Balance- Test, sowie des Greif- und Haltevermögens im Rotating- Grid- und Prehensile- Traction- Test, erlauben eine Detektion postoperativer motorischer Defizite. Zudem fließen auch motorische Aspekte aus dem ZHBT in die Beurteilung der motorischen Funktion mit ein. Hierbei richtet sich der Fokus auf die Feinmotorik (Fresszeit) und Geschicklichkeit (Anzahl frustraner Lochbesuche).

Zur Ergebnisfindung werden die in den Untersuchungen erhobenen Beobachtungen anhand eines Schemas (siehe Tab. 01, S. 61) nach dem Grad der Beeinträchtigung mit entsprechenden

Punkten gewertet. Die Summe all dieser Einzelpunkte bildet schließlich den Motorik- Score, der alle motorischen Aspekte vereint und somit einen zusammenfassenden Überblick über die neurologisch- motorische Gesamtsituation der Versuchstiere gibt. Entsprechend liegt der Gesamtwert für ein neurologisch- motorisch gesundes Tier bei 0, der maximal erreichbare Score bei 24.

In der folgenden Tabelle (siehe Tab. 10) und Abbildung (siehe Abb. 26) sind die Mediane, sowie obere und untere Quartile angegeben bzw. grafisch dargestellt.

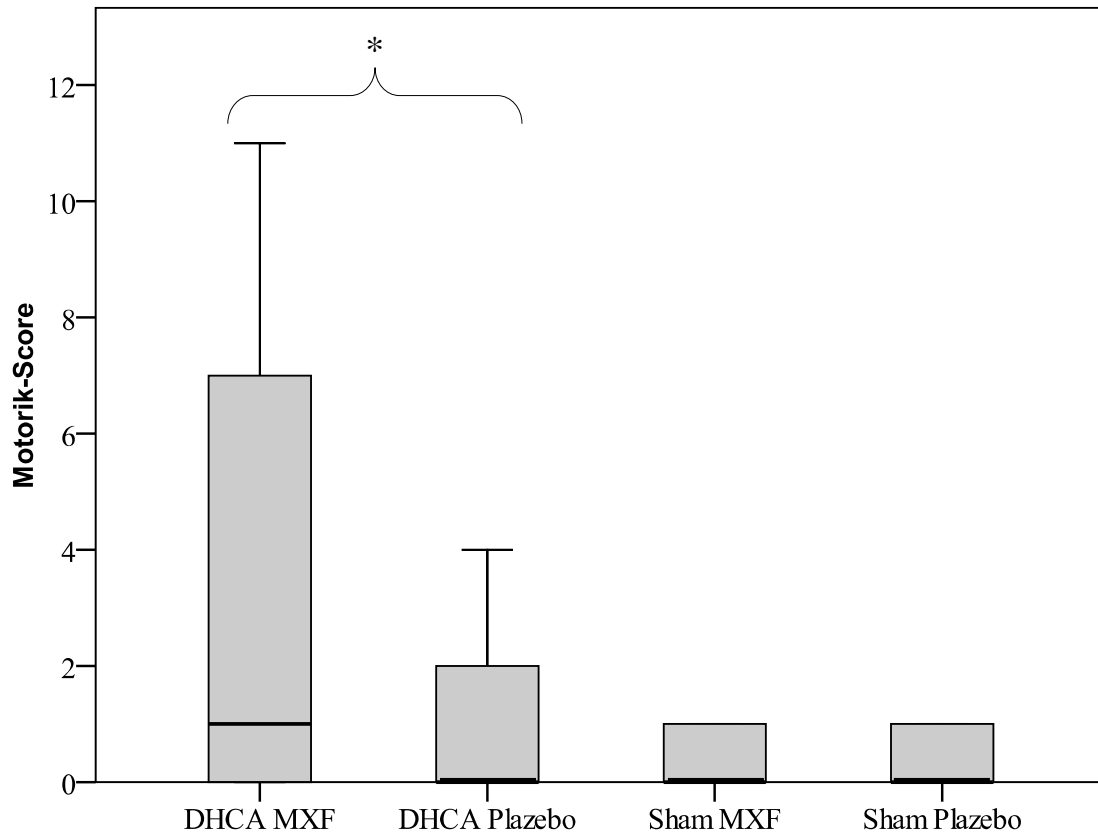
***Tabelle 10: Motorischer Gesamtscore der fünf Untersuchungsgruppen***

	<b>DHCA MXF (n=10)</b>	<b>DHCA Plazebo (n=10)</b>	<b>Sham MXF (n=10)</b>	<b>Sham Plazebo (n=10)</b>	<b>Kontrolle (n=10)</b>
<b>Oberes Quartil</b>	5,5	1,75	1	1	0
<b>Median</b>	<b>1 *</b>	<b>0 *</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Unteres Quartil</b>	0	0	0	0	0

*Median, oberes und unteres Quartil des Motorik - Scores der fünf Untersuchungsgruppen DHCA MXF, DHCA Plazebo, Sham MXF, Sham Plazebo und Kontrolle. Signifikanz:  $p < 0,05$ ; \* gg. Sham*

Während der Median der DHCA MXF- Gruppe auf einem erhöhten Level liegt, befinden sich dagegen die Werte des Motorik- Scores bei allen anderen Gruppen im Bereich der unbehandelten Kontrolle. Zwischen den Tieren der DHCA- und Sham- Gruppen bestehen Signifikanzen.





**Abbildung 26:** Vergleichende grafische Darstellung (Mediane, sowie 25 % und 75 % Perzentile) des Motorik- Scores der einzelnen Untersuchungsgruppen DHCA MXF, DHCA Plazebo, Sham MXF und Sham Plazebo. Der Motorik- Scorewert der unbehandelten Kontrolle liegt bei Null und wird deshalb nicht gesondert dargestellt.  $p < 0,05$ ; \* gg. Sham

### 3.3.3 Neurokognitive Parameter des Zylinder- Hole- Board- Tests (ZHBT)

#### 3.3.3.1 Kognitive Parameter

Zur Beurteilung der kognitiven Leistungsfähigkeit werden die gemittelten Einzelscorewerte folgender Parameter anhand der Punktetabelle (siehe Tab. 04, S. 70) summiert: Gesamtzeit eines Durchlaufes, Anzahl falsch besuchter Löcher, Anzahl nicht besuchter, markierter Löcher, Anzahl wiederholt besuchter, geleerter Löcher. Der sich daraus ergebende Kognitions- Score gewährt einen umfassenden Einblick in die kognitiven Fähigkeiten der verschiedenen Untersuchungsgruppen.

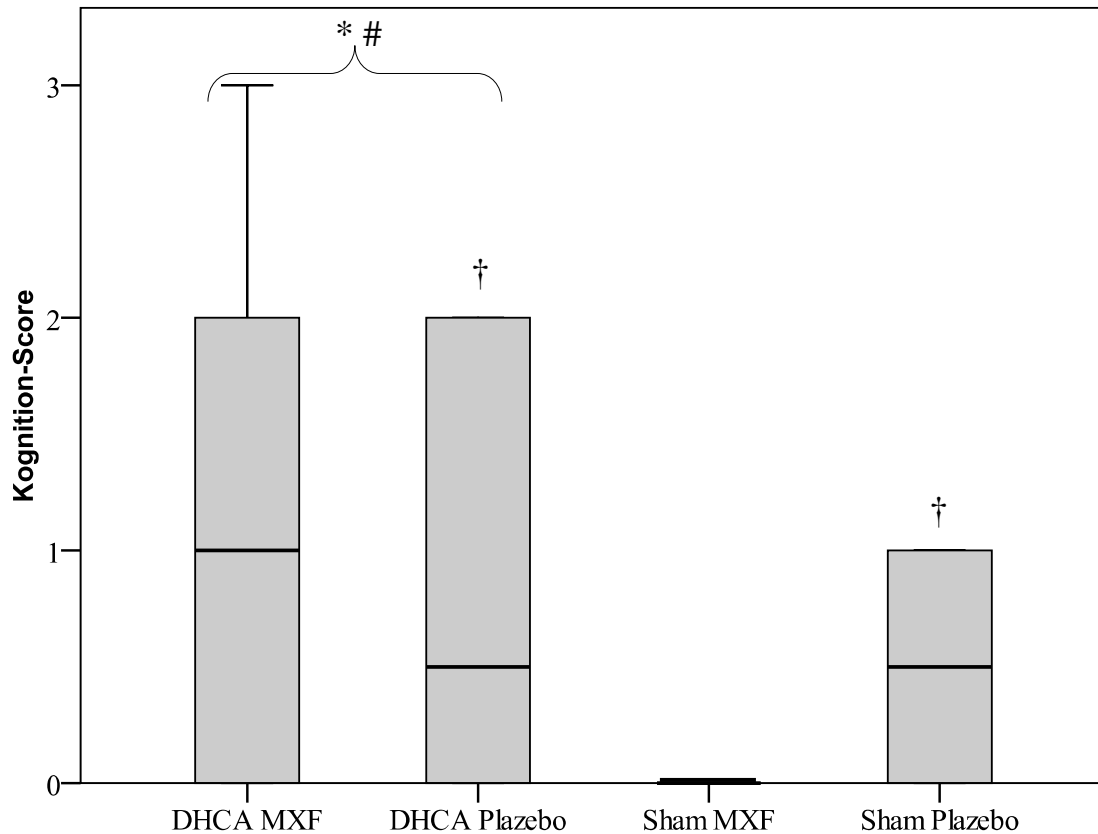
Die Ergebnisse aller kognitiven Parameter des ZHBT werden in der nachstehenden Tabelle 11 und Abbildung 27 angeführt bzw. grafisch dargestellt.

*Tabelle 11: Kognitions- Score der fünf Untersuchungsgruppen*

	<b>DHCA MXF (n=10)</b>	<b>DHCA Plazebo (n=10)</b>	<b>Sham MXF (n=10)</b>	<b>Sham Plazebo (n=10)</b>	<b>Kontrolle (n=10)</b>
<b>Oberes Quartil</b>	1,75	1,75	0	1	0
<b>Median</b>	<b>1 * # †</b>	<b>1 * #</b>	<b>0</b>	<b>1 †</b>	<b>0</b>
<b>Unteres Quartil</b>	0	0	0	0	0

*Median, oberes und unteres Quartil des Kognitions- Scores der fünf Untersuchungsgruppen DHCA MXF, DHCA Plazebo, Sham MXF, Sham Plazebo und Kontrolle. Signifikanz:  $p < 0,05$ ; \* gg. Sham, † gg. Sham MXF, # gg. Kontrolle*

Die Mediane beider DHCA-, sowie der Sham Plazebo- Gruppe liegen auf gleichem Niveau mit einem Wert von 1. Demzufolge zeichnen sich diese Untersuchungsgruppen im Vergleich zu den Sham MXF- Tieren durch eine reduzierte kognitive Leistungsfähigkeit aus. DHCA schneidet dabei insgesamt signifikant schlechter ab im Vergleich zu Sham und der Kontrollgruppe. Zudem unterscheidet sich der Kognitions- Score der DHCA MXF-, sowie der Sham Plazebo- Gruppe signifikant zu jenem der Sham MXF- Gruppe.



**Abbildung 27:** Vergleichende grafische Darstellung (Mediane, sowie 25 % und 75 % Perzentile) der Punktesumme kognitiver Ergebnisse der einzelnen Untersuchungsgruppen DHCA MXF, DHCA Plazebo, Sham MXF und Sham Plazebo. Der Median der unbehandelten Kontrolle liegt bei Null und wird deshalb nicht gesondert dargestellt.  $p < 0,05$ ; \* gg. Sham, † gg. Sham MXF, # gg. Kontrolle

### 3.3.3.2 Verhaltensparameter

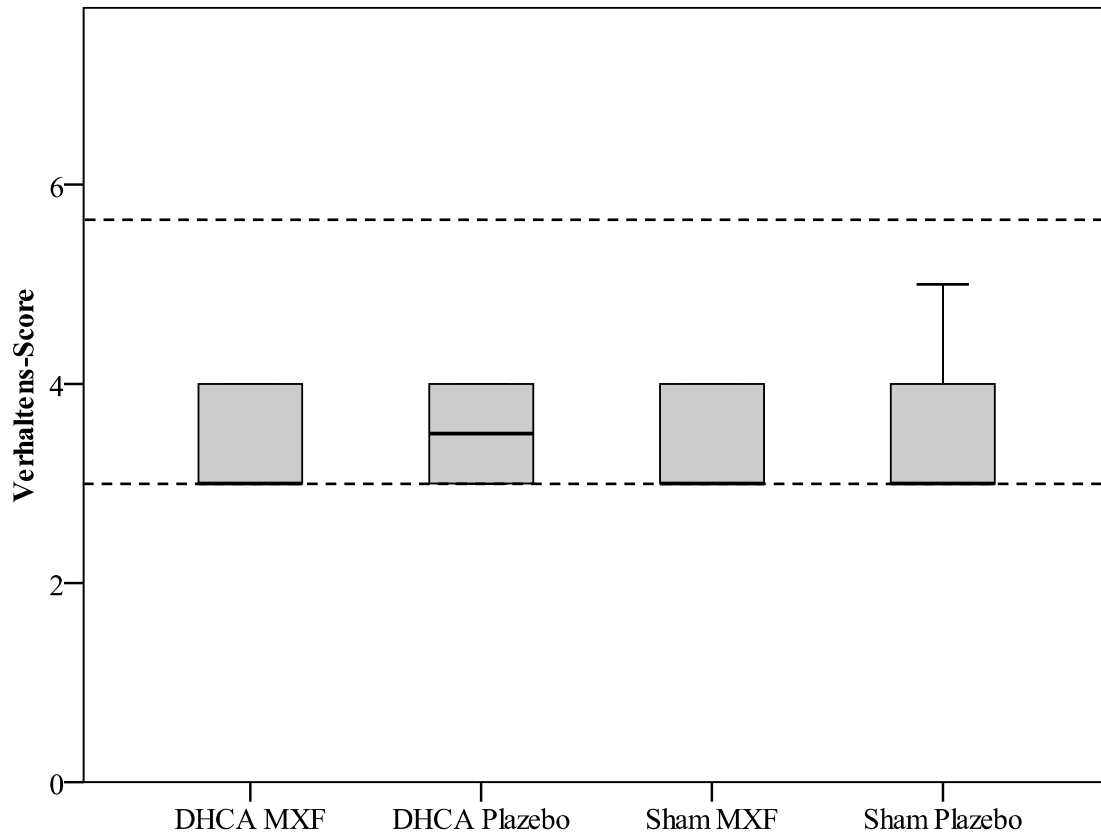
Die Bewertung des Verhaltens erfolgt anhand eines Schemas (siehe Tab. 05, S. 72). Die Zusammenfassung aller Einzelpunkte bildet schließlich den Verhaltens-Score, der im Folgenden tabellarisch und grafisch dargestellt wird.

**Tabelle 12: Verhaltens- Score der fünf Untersuchungsgruppen**

	<b>DHCA MXF (n=10)</b>	<b>DHCA Plazebo (n=10)</b>	<b>Sham MXF (n=10)</b>	<b>Sham Plazebo (n=10)</b>	<b>Kontrolle (n=10)</b>
<b>Oberes Quartil</b>	4	4	3,75	3,75	5,75
<b>Median</b>	<b>3</b>	<b>3,5</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3,5</b>
<b>Unteres Quartil</b>	3	3	3	3	3

*Median, oberes und unteres Quartil des Verhaltens- Scores der fünf Untersuchungsgruppen DHCA MXF, DHCA Plazebo, Sham MXF, Sham Plazebo und Kontrolle.*

Die Mittelwerte des Verhaltens- Scores liegen bei allen Gruppen im Bereich der unbehandelten Kontrolle. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.



**Abbildung 28:** Vergleichende grafische Darstellung (Mediane, sowie 25 % und 75 % Perzentile) des Verhaltens- Scores der einzelnen Untersuchungsgruppen DHCA MXF, DHCA Placebo, Sham MXF und Sham Placebo. Die gestrichelten Linien markieren die 25 % und 75 % Perzentile der unbehandelten Kontrolle.

### 3.3.4 Histologie

Die durch EKZ und DHCA verursachte zerebrale Ischämie führt zu neuronalen Zellschäden in Hippokampus und Motorkortex. In die Bewertung des histologischen Schadens gehen folgende Parameter mit ein: Anzahl eosinophiler Neurone in Hippokampus und Motorkortex, Anzahl und Größe der Infarkte, sowie NFκB- positive Neurone in Hippokampus und Motorkortex.

### 3.3.4.1 HE- Färbung

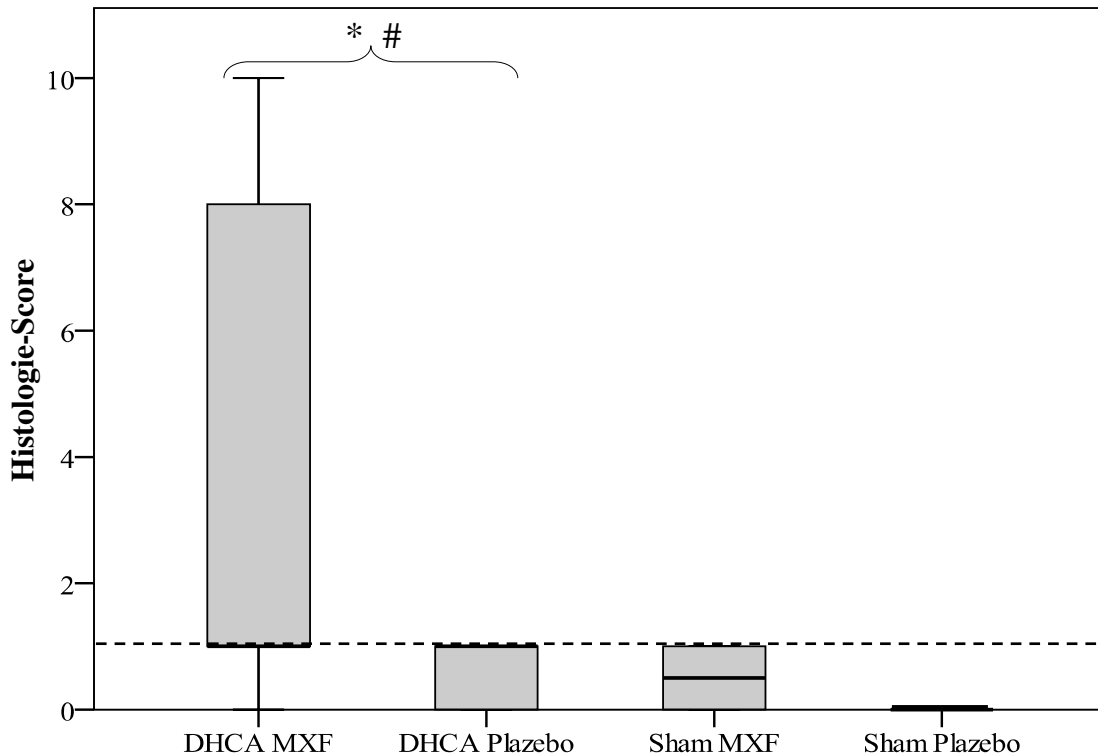
Das Ausmaß der histologischen Schädigung wird beurteilt anhand der histologisch nachweisbaren eosinophilen Neurone in Hippokampus und Motorkortex, sowie die Anzahl und Größe der Infarkte und mit einem Punkteschema bewertet (siehe Tab. 06, S. 76). Die Gesamtpunktzahl dieser histologisch erhobenen Ergebnisse bildet den umfassenden Histologie-Score, der in folgender Tabelle 13 bzw. Abbildung 29 dargestellt ist. Je höher der Wert dieses Histologie- Scores liegt, desto schwerwiegender sind die histologisch erkennbaren neuronalen Zellschäden.

**Tabelle 13: Histologie- Score der fünf Untersuchungsgruppen**

	<b>DHCA MXF (n=10)</b>	<b>DHCA Plazebo (n=10)</b>	<b>Sham MXF (n=10)</b>	<b>Sham Plazebo (n=10)</b>	<b>Kontrolle (n=10)</b>
<b>Oberes Quartil</b>	6,75	1	1	0	1
<b>Median</b>	<b>1 * #</b>	<b>1* #</b>	<b>0,5</b>	<b>0</b>	<b>0,5</b>
<b>Unteres Quartil</b>	1	0	0	0	0

*Median, oberes und unteres Quartil des Histologie- Scores der fünf Untersuchungsgruppen DHCA MXF, DHCA Plazebo, Sham MXF, Sham Plazebo und Kontrolle. Signifikanz:  $p < 0,05$ ; \* gg. Sham, # gg. Kontrolle*

Beide DHCA- Gruppen zeigen höhere Score- Werte im Vergleich zu den Sham- Gruppen. Zwischen MXF und Plazebo besteht dabei kein Unterschied. Auch in beiden Sham- Gruppen zeigt sich kein Unterschied zwischen MXF und Plazebo. Beide DHCA- Gruppen unterscheiden sich signifikant zu beiden Sham-, als auch zur Kontrollgruppe.



**Abbildung 29:** Vergleichende grafische Darstellung (Mediane, sowie 25 % und 75 % Perzentile) der histologischen Gesamtpunktzahl zur Beurteilung des histologischen Zellschadens der einzelnen Untersuchungsgruppen DHCA MXF, DHCA Plazebo, Sham MXF, Sham Plazebo; die gestrichelte Linie markiert das obere 90 % Perzentil der unbehandelten Kontrolle, das untere 10 % Perzentil der unbehandelten Kontrolle wurde nicht dargestellt.  $p < 0,05$ ; \* gg. Sham, # gg. Kontrolle

### 3.3.4.2 Immunhistochemische Färbung

Anhand des immunhistochemischen Punkteschemas (siehe Tab. 07, S. 77) ist eine Beurteilung der zerebralen Schädigung durch NFκB möglich. Die Gesamtpunktzahl dieser Ergebnisse bildet schließlich den umfassenden NFκB- Score, der in folgender Tabelle 14 und Abbildung 30 dargestellt wird. Je höher der NFκB- Scorewert, umso intensiver ist die neuronale NFκB- Expression.

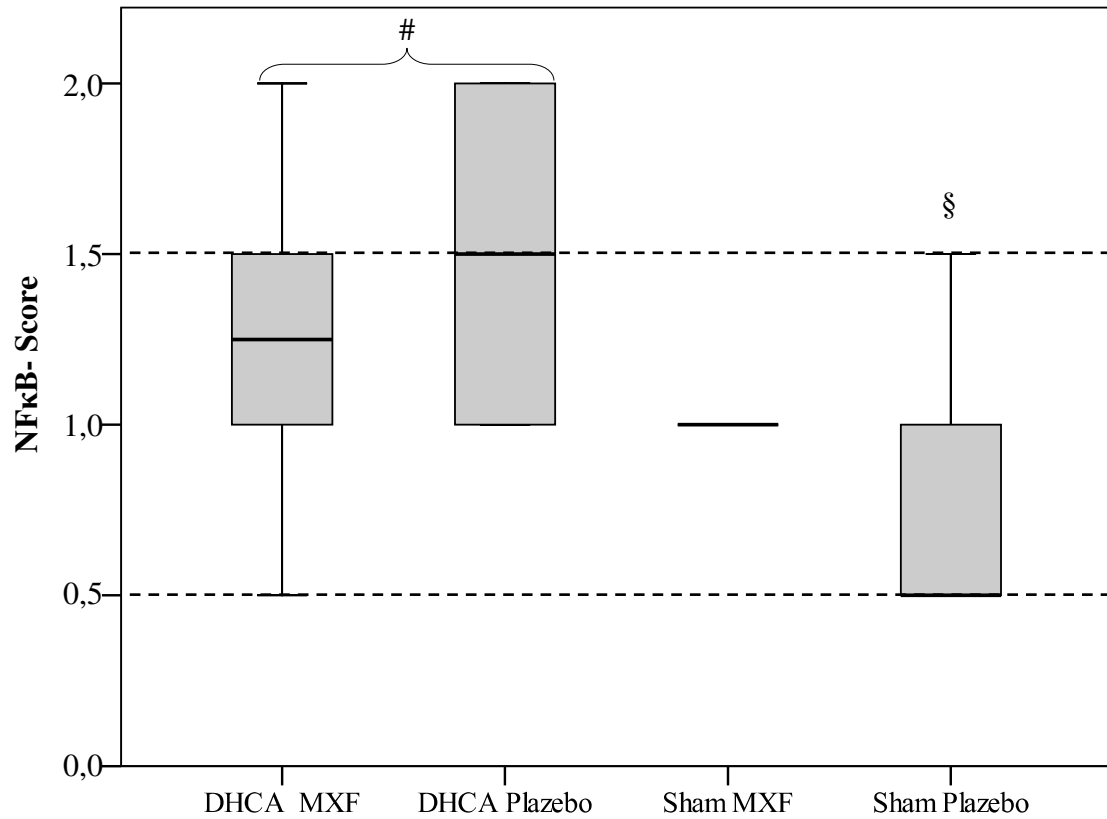
**Tabelle 14: NFκB- Score der fünf Untersuchungsgruppen**

	<b>DHCA MXF (n=10)</b>	<b>DHCA Plazebo (n=10)</b>	<b>Sham MXF (n=10)</b>	<b>Sham Plazebo (n=10)</b>	<b>Kontrolle (n=10)</b>
<b>Oberes Quartil</b>	1,5	2	1	1	1
<b>Median</b>	<b>1,25 #</b>	<b>1,5 #</b>	<b>1</b>	<b>0,5 §</b>	<b>0,5</b>
<b>Unteres Quartil</b>	1	1,125	1	0,5	0,5

*Median, oberes und unteres Quartil des NFκB- Scores der fünf Untersuchungsgruppen DHCA MXF, DHCA Plazebo, Sham MXF, Sham Plazebo und Kontrolle. Signifikanz:  $p < 0,05$ ; § gg. DHCA Plazebo, # gg. Kontrolle*

Beide DHCA- Gruppen weisen höhere Mediane im Vergleich zu beiden Sham- und den Kontrolltieren auf. Dabei ist ein signifikanter Unterschied zwischen beiden DHCA- Versuchsgruppen und der unbehandelten Kontrolle feststellbar. Zudem unterscheidet sich die Sham Plazebo- Gruppe signifikant zur DHCA Plazebo- Gruppe.





**Abbildung 30:** Vergleichende grafische Darstellung (Mediane, sowie 25 % und 75 % Perzentile) des NFκB- Scores zur Beurteilung des Zellschadens der einzelnen Untersuchungsgruppen DHCA MXF, DHCA Plazebo, Sham MXF und Sham Plazebo; die gestrichelten Linien markieren die 10 % und 90 % Perzentile der unbehandelten Kontrolle.  $p < 0,05$ ; § gg. DHCA Plazebo, # gg. Kontrolle

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde erstmals der Einfluss einer perioperativen Fluorchinolonegabe auf die postoperative neurologische und neurokognitive Funktion sowie den histologischen Schaden 14 Tage nach EKZ mit 45 min DHCA in einem Rattenmodell untersucht.

### 4.1 Diskussion der Methoden

#### 4.1.1 Das Modell des tief- hypothermen Kreislaufstillstandes

In den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts gelang es GIBBON (1954) erfolgreich einen herzchirurgischen Eingriff mit EKZ am Mensch durchzuführen. Durch die stetige technische Weiterentwicklung von EKZ und DHCA ist es mittlerweile möglich geworden, weitreichende angeborene Herzfehler wie Ventrikelseptumdefekte oder eine Transposition der großen Gefäße zu versorgen (OATES et al., 1995; ROACH et al., 1996). Die Zahl der in Deutschland jährlich durchgeführten herzchirurgischen Eingriffe mit EKZ beläuft sich auf derzeit ca. 96.000. Als Folgen dieser Eingriffe bleiben postoperativ neurologische und neurokognitive Defizite bei beispielsweise bis zu 25 % der operierten Kinder bestehen (FERRY, 1990). Da die Ursachen dem heutigen Kenntnisstand gemäß multifaktoriell sind und Studien im klinischen Bereich durch Patienten mit den unterschiedlichsten Vor- und Begleiterkrankungen erschwert werden, besteht die Notwendigkeit, die zugrunde liegenden Ursachen und pathophysiologischen Mechanismen in einem geeigneten Tiermodell zu untersuchen.

2006 wurde ein EKZ- Modell mit DHCA an der Ratte etabliert, welches mit dem langfristigen Überleben der Tiere vereinbar ist (JUNGWIRTH et al., 2006). In vorherigen Untersuchungen fanden Großtiermodelle (Hund, Kuh, Schaf, Schwein, Kaninchen) Anwendung, die allerdings mit zahlreichen Nachteilen und Limitierungen verbunden waren, wie z. B. höhere Anschaffungs- und Haltungskosten, lange Fortpflanzungsperioden, logistische Anforderungen und das Fehlen geeigneter standardisierter Tests für die neurologische und kognitive Untersuchung. Die Ratte erweist sich daher aus mehreren Gründen als geeignetes Versuchs-

tier. Aufgrund der geringen Größe der Tiere können die Anschaffungs- und Haltungskosten, sowie der Raum- und Medikamentenbedarf deutlich reduziert werden. Durch Inzucht ist zudem die Schaffung genetisch homogener Tiergruppen möglich, die vergleichbare zerebrovaskuläre anatomische und physiologische Verhältnisse aufweisen. Hinzu kommt die geringe Größe des Rattengehirns, woraus sich ein reduzierter Platzbedarf für die Lagerung des im Versuch gewonnenen Probenmaterials ergibt. Zudem werden in der Bevölkerung Tierversuche an Ratten im Vergleich zu anderen Spezies eher toleriert und als ethisch vertretbar angesehen (GINSBERG und BUSTO, 1989).

Seit den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts wird an der Etablierung von Tiermodellen der EKZ gearbeitet (GIBBON, 1937). 1966 erfolgte die erste EKZ an Ratten mit peripherer Kanülierung (POPOVIC et al., 1966). Eine Thorakotomie mit direkter Kanülierung kardialer Gefäße, wie sie standardmäßig beim Menschen am offenen Herzen durchgeführt wird, ist bei der Ratte nicht möglich, denn die Eröffnung des Thorax mit einer Durchtrennung der Pektoralismuskulatur führt zu Bewegungseinschränkungen und damit zu unzureichender Futteraufnahme. In den vergangenen Jahrzehnten waren deshalb Eingriffe mit EKZ an thorakotomierten Ratten nur mit kurzen postoperativen Überlebenszeiten vereinbar (TRIGGIANI et al., 1970; WEHBERG et al., 1996). Die Wahl der kanülierten Gefäße spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in Bezug auf die Regenerationsfähigkeit im Langzeitversuch. Während vor einigen Jahrzehnten die Katheterisierung der A. femoralis als arterielles Zuflussgefäß häufig zu einer Ischämie des betroffenen Beines führte und somit die Rekonvaleszenz verzögerte bzw. unmöglich wurde, kanüliert man stattdessen derzeit die Schwanzarterie, die einen direkten Zugang zur Aorta descendens darstellt (GROCOTT et al., 2001).

Das vor kurzem etablierte EKZ-Modell mit DHCA an der Ratte (JUNGWIRTH et al., 2006) eröffnet erstmals die Möglichkeit, postoperative neurologische, neurokognitive und histologische Defizite im Langzeitversuch zu untersuchen. In diesem Modell wird ein speziell für Ratten entwickelter Membranoxygenator verwendet, der mit einem Füllungsvolumen von 10 ml in Relation zum gesamten Blutvolumen von 25 ml bei der Ratte der Proportion beim Menschen mit 2 l Füllungs- und 5 l Blutvolumen gleicht. PROCTOR (1977) konnte bereits das Füllungsvolumen von bis zu 100 ml auf 20 bis 30 ml reduzieren, benötigte dabei aber immer noch Blut von Spendertieren, um den Kreislauf zu füllen. Mit dem derzeitigen EKZ-Modell mit einem Füllungsvolumen von 10 ml ist es möglich, die klinisch relevanten Hämatokritwerte von 18 bis 22 % an der HLM auch ohne Bluttransfusion durch Spendertiere aufrecht zu erhalten. Zudem erlaubt dieses Modell einen EKZ-Blutfluss, der dem normalen

Herzzeitvolumen der Ratte (160 bis 180 ml/kg/min) und klinisch gebräuchlichen EKZ- Blutflüssen (100 bis 150 ml/kg/min) entspricht, und dabei eine suffiziente Sauerstoffsättigung der nicht- beatmeten Tiere ermöglicht (JUNGWIRTH et al., 2006).

Eine direkte Übertragung dieses Tiermodells auf den Menschen muss natürlich kritisch betrachtet werden. So handelt es sich um junge und gesunde Tiere, wie sie in der vorliegenden Studie verwendet werden. Aus klinischer Sicht leiden aber viele Patienten unter den verschiedensten Vor- und Begleiterkrankungen. Zudem fehlt im Rattenmodell das chirurgische Trauma an sich, wie z. B. die Sternotomie mit direkter Kanülierung des offenen Herzens (JUNGWIRTH et al., 2006).

#### **4.1.2 Neurologische Untersuchung**

Neurologisch- motorische Tests stellen eine wichtige Grundlage dar, postoperative kognitive Defizite nach herzchirurgischen Eingriffen zu beurteilen. Aktive Tests schaffen die Möglichkeit, weitergehende Erkenntnisse über neurologische und motorische Defizite zu gewinnen, die durch passives Beobachten nicht festzustellen wären (COMBS und D'ALECY, 1987). Um subjektive Einflüsse soweit wie möglich zu reduzieren, wurden in den letzten Jahrzehnten mehrere Testsysteme entwickelt, die eine weitgehend objektive Beurteilung anhand von Bewertungsschemata erlauben (ZAUSINGER et al., 2000; GROCCOTT et al., 2001). Es bleibt jedoch schwierig, diese Testsysteme untereinander zu vergleichen, da Unterschiede in der Anzahl der verwendeten Testbausteine, sowie im Aufbau und der Durchführung der einzelnen Tests bestehen.

Die motorischen Tests in der vorliegenden Studie geben Aufschluss über Gleichgewicht im Balkentest (Beam- Walking- und Beam- Balance- Test), sowie allgemeine Muskelkraft und Greif- und Haltevermögen (Rotating- Grid- und Prehensile- Traction- Test).

Der Beam- Walking- Test wurde erstmals 1982 eingesetzt, um Schäden im Bereich des Motorkortex zu detektieren (FEENEY et al., 1982). Hierbei erfolgt eine Beurteilung von Gleichgewichtssinn und Koordinationsfähigkeit der Tiere in der Bewegung. Während die Ratte eine Strecke von drei mal 100 cm über einen Balken läuft, können Störungen in der Bewegung der Vorder- und Hintergliedmaßen durch die Anzahl der Fehltritte erfasst werden. Schwierigkeiten bei der Beurteilung ergeben sich, wenn sich das Tier beispielsweise aus Angst oder fehlender Motivation auf dem Balken nicht koordiniert bewegt. Um Stress

behaftete und somit Angst auslösende Einflüsse zu reduzieren, ist es wichtig, dass der Untersucher in ruhiger Art und Weise vorgeht und hektische Bewegungen vermeidet. Zudem achtet der Untersucher darauf, immer die gleichen Hilfsmittel wie z. B. Holzbalken und Seitenstützen zu verwenden, die die Ratte aus vorhergehenden Untersuchungen bereits kennt.

Der Beam- Balance- Test ist ein globaler Test, um die vestibulomotorische Funktion, den Gleichgewichtssinn sowie die Funktion des Kleinhirns zu beurteilen (FUJIMOTO et al., 2004). Gehirnläsionen, wie beispielsweise Hemiparesen, können anhand dieses Tests leicht erfasst werden, da betroffene Tiere zur geschädigten Seite hin vom Balken fallen. Dieser Test wird derzeit weitverbreitet angewendet und wurde bereits vor einigen Jahren zur Beurteilung der Defizite der vestibulomotorischen Funktion (COMBS und D'ALECY, 1987) in Modellen zerebellarer (TUPPER und WALLACE, 1980), traumatischer (DIXON et al., 1987), post-subarachnoidaler hämorrhagischer (GERMANO et al., 1994), globaler (COMBS und D'ALECY, 1987) und fokaler Hirnschädigungen (DEGRABA et al., 1994) eingesetzt. Die Tiere müssen auf einem schmalen Balken drei mal eine Dauer von jeweils 60 s balancierend ausharren. Etwaiges Unvermögen der Ratte, sich auf dem Balken zu halten, spricht demnach für eine Schwächung des Gleichgewichtssinnes und der Muskelkraft. Einige Ratten zeigen allerdings auf dem Balken spielerisches Verhalten und richten sich auf ihre Hinterbeine auf. Dabei können die Tiere möglicherweise aus Unachtsamkeit vom Balken stürzen. Dies gilt es bei der Testbewertung zu berücksichtigen.

Zur Beurteilung der allgemeinen Muskelkraft und des Gleichgewichtssinns ist der Rotating-Grid- Test geeignet. Als Modifizierung des sog. „Screen- Tests“ (COMBS und D'ALECY, 1987) wird dieser Test häufig in Verbindung mit zerebralen Ischämien v. a. des Vorderhirns eingesetzt. Bei der Durchführung des Tests muss eine gleich bleibende Rotationsgeschwindigkeit des Gitters ausgehend von der horizontalen Ebene zur 90°- und 180°- Ebene eingehalten werden, um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen. Wird das Drahtgitter zu langsam gekippt, versuchen die Tiere am Gitter empor zu klettern. Bei zu schnellem abruptem Drehen des Gitters können die Tiere aber vom Gitter herunterfallen, da sie in diesem Fall nicht mehr zeitkorreliert reagieren können. Zudem spielt die Motivation der einzelnen Tiere ebenfalls eine bedeutende Rolle. Durch die anfangs täglich durchgeführten Tests gewöhnen sich die Ratten an den Testaufbau und verlieren den Reiz des Neuen, so dass die Motivation, sich am Drahtgitter festzuhalten, nachlässt. So kann es vorkommen, dass sie sich bewusst fallen lassen. Somit muss auch dieser Test kritisch betrachtet werden.

Der Prehensile- Traction- Test dient ebenfalls der Erfassung der allgemeinen Muskelkraft und des Greif- und Haltevermögens und wird häufig nach Vorderhirn- und fokalen zerebralen Ischämien (COMBS und D'ALECY, 1987; DEGRABA et al., 1994) durchgeführt. Geschädigte Ratten zeigen beim Festhalten des Drahtseiles ein- oder beidseitige Defizite der Muskelkraft in den Vorderpfoten auf. Bei der Durchführung des Tests ist ein ausreichender Abstand zwischen gespanntem Drahtseil und Schaumstoffbodenmatte von Bedeutung. Berührt die Ratte mit ihrem Schwanz die Bodenmatte, kann sie den Abstand zum Boden einschätzen und infolgedessen loslassen. Auch bei ausreichendem Abstand lassen einige Tiere das Drahtseil einfach los. Sie haben gelernt, dass ein Sturz auf die weiche Bodenmatte für sie gefahr- und folgenlos ist. Dies gilt es bei der Beurteilung des Tests zu berücksichtigen.

In der vorliegenden Studie wurde eine weitgehende Standardisierung der neurologischen Untersuchung erreicht, indem die Tiergruppen von ein und derselben Person getestet und der Untersuchungsgang immer in der gleichen Reihenfolge mit den dazwischenliegenden angemessenen Erholungsphasen durchgeführt wurde. Um die Tiere mit der neurologischen Untersuchung vertraut zu machen und damit Stress zu minimieren, fanden diese Tests bereits an den präoperativen Tagen -2 und -1 statt. So erhielt man stabile Ausgangswerte, mit denen schließlich die postoperativ erhobenen Werte verglichen werden konnten. Als kritisch muss der Zeitpunkt der Testung unter Licht und somit in der eigentlichen Ruhephase der Ratten betrachtet werden. Da der Untersucher aber unter einer Testphase mit Dämmerlicht Schwierigkeiten hat, Ergebnisse richtig zu interpretieren, kann die Untersuchung am Ende der Ruhephase als Kompromiss verstanden werden.

#### **4.1.3 Der modifizierte Zylinder- Hole- Board- Test (ZHBT)**

Der modifizierte Hole- Board- Test nach OHL bietet als Alternative zu vielen anderen Tests den Vorteil, auf multiple Testbatterien verzichten und damit die Tieranzahl und den zeitlichen Aufwand reduzieren zu können. Dieser Test gewährt einen Einblick in die Funktion verschiedener Gedächtnissysteme durch Analyse kognitiver Parameter und gibt zudem Aufschluss über motorische Aktivität und Verhaltensweisen wie Angst, Exploration, soziale Affinität und Erregung (OHL et al., 2001a). Dabei können Lern- und Gedächtnisleistungen dem Hippokampus (deklaratives Gedächtnis) und dem präfrontalen Kortex (Arbeitsgedächtnis) zugeschrieben werden (OHL und FUCHS, 1999). Dieser Test basiert auf der Theorie, dass das Verhalten von Nagetieren abhängig vom Kontext ist, in dem sie sich

befinden (OHL et al., 2001b) und die Tiere ihr gesamtes Verhaltensrepertoire demnach nur in einer adäquat angereicherten Testumgebung aufzeigen können (OHL und KECK, 2003).

Um nun aussagekräftige Ergebnisse über kognitive Fähigkeiten zu erhalten, ist es notwendig, möglichst stressarme Tests wie beispielsweise den ZHBT einzusetzen. Denn OHL et al. (1998) konnten eine starke Beeinflussung der kognitiven Funktion durch Stress feststellen. Zudem besteht eine Korrelation zwischen angstbezogenem Verhalten und kognitiver Leistung (OHL et al., 2002). So gelten Isolation und Transport der Tiere, z. B. durch Verbringen in einen anderen Raum, bereits als Stress auslösend (OHL et al., 2001a). Dies vermeidet der ZHBT, indem die Tiere im bekannten, sog. Homecage, bei dem Wohnabteil und Versuchsarena nur über eine durchsichtige gelöcherte Trennwand voneinander separiert sind, visuell und olfaktorisch Kontakt zu ihren Artgenossen aufnehmen können. Diese spezielle Versuchsanordnung verzichtet dabei zudem auf stressauslösende Situationen, wie sie beispielsweise durch erzwungene Handlungen (Schwimmen im MWM) oder andere negative Stimuli (elektrische Reize im sog. „Vogel- Konflikt- Test“) verursacht werden.

Das Prinzip des ZHBT basiert auf einer Studie (OHL et al., 2003), die sich des natürlichen Erkundungs- und Futtersuchverhaltens von Mäusen bedient. Hierbei befindet sich in allen Löchern eine Futterbelohnung, aber nur das in den markierten Löchern liegende Futter ist für die Tiere auch erreichbar. Da Ratten eine ausgeprägte angeborene Abneigung gegen alles Neue besitzen, was sich auch im Fressverhalten widerspiegelt, werden sie in der vorliegenden Studie präoperativ vier Tage lang mit gehobelten Mandelspänen, die im Allgemeinen gut akzeptiert werden, angefütert. So werden sie mit der Futterbelohnung im ZHBT vertraut gemacht. Da Ratten zudem über ein hoch entwickeltes Geruchsorgan verfügen, ist es wichtig, olfaktorische Einflüsse im Test weitestgehend auszuschalten. Aus diesem Grund werden zur Geruchsneutralisierung alle Lochränder der Vertiefungen mit Johannisbeeraromalösung benetzt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass alle Löcher gleich intensiv nach Johannisbeeren riechen und die Tiere die Futterbelohnung nicht mit ihrem Geruchssinn wahrnehmen können. Weitere olfaktorische Einflüsse können zudem durch das Verwenden von Handschuhen, durch die bereits am Vortag angebrachten Markierungen, sowie durch das Reinigen des Lochbrettes während des Tests ausschließlich mit (klarem) Wasser vermieden werden.

Der hier verwendete Hole- Board- Test mit den Zylindern bietet den Vorteil, dass die kognitive Leistung bei motorisch defizienten Tieren weniger stark verfälscht werden kann.

Die Beurteilung der feinmotorischen Geschicklichkeit im ZHBT muss aber insgesamt als problematisch eingestuft werden. Für diesen Aspekt ist der modifizierte Hole- Board- Test mit Deckeln und Sprungfedern besser geeignet. Denn bei diesem Test werden anstelle der Zylinder bewegliche Deckel verwendet, die über einen entsprechenden Sprungfedermechanismus alle Löcher verschließen. Das Beiseiteschieben und Offenhalten der Deckel stellt dabei die größere Herausforderung an die Feinmotorik der Tiere dar. Auf dem Zylinderboard muss das Tier lediglich in das oben offene Loch hineinreichen, um an die Futterbelohnung zu gelangen.

Der modifizierte Hole- Board- Test mit Deckeln und Sprungfedern wurde als kognitiver Test zur Untersuchung der Neurokognition bereits von Arbeitsgruppen im eigenen Labor erfolgreich angewendet, um den Einfluss einer kompletten EKZ (SWIRCZEK, 2005), sowie einer EKZ mit DHCA (STARKER, 2005) auf die neurokognitive Leistung hin zu untersuchen. In Vorbereitung auf die vorliegende Studie haben Vorversuche mit dem HBT mit Deckeln, Sprungfedern, sowie einer ausschließlichen postoperativen Habituation aber gezeigt, dass dieser Test mit einigen Schwierigkeiten und Problemen behaftet ist. Zum einen sind motorisch eingeschränkte und geschwächte Tiere nicht in der Lage, den Mechanismus dieses Tests zu begreifen und die Deckel der Löcher mit eigener Muskelkraft zu öffnen. Zum anderen empfinden manche Tiere den in die Ausgangsposition zurückfedernden Deckel als Bedrohung, so dass sie infolgedessen aus Angst das Lochbrett und damit das Öffnen der Deckel meiden. Unter diesem Aspekt sind die kognitiven Ergebnisse dann kritisch zu bewerten. Aus diesem Grund fiel die Entscheidung in dieser Studie auf die Verwendung des im Allgemeinen leichter zu bewältigenden HBT mit oben offenen Zylindern.

#### **4.1.4 Histologie**

##### Hämatoxylin- Eosin- Färbung

Die HE- Färbung zählt zu den gebräuchlichsten Färbungen, um eine Übersicht über Zellkerne und zytoplasmatische Bestandteile sowie in unserem Fall über das Ausmaß einer neuronalen Schädigung, sowie der Verteilung dieser geschädigten Zellen zu bekommen. Ischämische Ereignisse während EKZ mit DHCA führen zu einem Sauerstoff- und Energiemangel der Zellen. Infolgedessen reichern sich saure Stoffwechselprodukte in den betroffenen Zellen an, die schließlich durch den azidophilen Farbstoff Eosin pink- rot angefärbt werden. Nicht in ihrem Stoffwechsel beeinträchtigte Zellen färben sich stattdessen mit Hämalaun basophil,



blauschwarz an. Eine Differenzierung der Zellen, ob es sich etwa bei den geschädigten Zellen um apoptotisch oder nekrotisch zugrundegehende Zellen handelt, oder ob sich diese Zellen regenerieren werden, ist nicht möglich, denn die HE-Färbung liefert lediglich eine Momentaufnahme des Geschehens. Zur weiteren Differenzierung apoptotisch oder nekrotisch zugrundegehender Zellen besteht die Möglichkeit, pro-apoptotische Proteine wie beispielsweise Kaspase-3 oder „BCL-associated protein X“ (Bax) nachzuweisen. Eine zweifelsfreie Bestimmung apoptotischer Zellen kann zudem mit dem Elektronenmikroskop anhand morphologischer Kriterien erfolgen. Hierbei erweist sich allerdings eine quantitative Untersuchung als sehr aufwendig, da in einem Schritt nur sehr kleine Areale untersucht werden können (STADELMANN und LASSMANN, 2000). Da aber der Schwerpunkt der vorliegenden Studie auf der Untersuchung des neurokognitiven Ergebnisses lag, hat man von einer weiteren, genaueren Differenzierung abgesehen.

Um mit dieser Methode aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, ist es wichtig, dass die Gehirnschnitte immer vom gleichen geblindeten Untersucher ausgewertet werden. Außerdem müssen Präparate mit Lufteinschlüssen oder zu schwacher bzw. zu starker Färbung von der Beurteilung ausgeschlossen werden.

### Immunhistochemische Doppelfärbung

Die immunhistochemische (Doppel-) Färbung ist eine gängige Methode, Proteine und Strukturen in situ auf histologischen Schnitten sichtbar zu machen. Um zu differenzieren, in welchen Zellen (Leukozyten, Glia oder Neurone) das inflammatorische Protein NFκB verstärkt exprimiert wird, bedient man sich des neuronalen Markers NeuN (Neuron-specific nuclear protein), ein Strukturprotein, das nur in voll ausgereiften Neuronen zu finden ist.

Bei der Durchführung der Doppelfärbung ist die Wahl geeigneter, qualitativ hochwertiger und hoch spezifischer Primärantikörper für zufriedenstellende Färbeargebnisse sehr wichtig. Um mögliche Fehlerquellen zu vermeiden, werden die verschiedenen Färbeschritte immer nach demselben Protokoll und immer durch die gleiche Person durchgeführt. Zusätzlich dienen jeweils eine Positiv- und Negativkontrolle zur Wahrung der Qualität der immunhistochemischen Methode. Die Auswertung unter dem Lichtmikroskop wird immer vom gleichen geblindeten Untersucher durchgeführt, um so aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.

Die vorhergehende Kurzzeitstudie hat gezeigt, dass die Parameter zerebrales COX-2, TNF  $\alpha$  und NFκB nach EKZ mit 45 min DHCA das gleiche Expressionsmuster zeigen, mit hochregulierter COX-2, TNF $\alpha$  und NFκB- Expression in der DHCA Placebo- Gruppe. Die

DHCA MXF- Gruppe zeigt dabei für diese Parameter Werte auf Niveau der Sham- Gruppen (STÜCKLE, Medizinische Dissertation in Vorbereitung). Aus diesem Grund und da der Schwerpunkt der Studie auf der Untersuchung der neurokognitiven Funktion liegt, wurde in der vorliegenden Langzeitstudie der histologisch nachweisbare Schaden ausschließlich über NFκB als zentralen Inflammationsparameter bestimmt. Zudem konnten ZHAO et al. (2007) eine Hochregulierung von COX-2 und NFκB bis zu sieben Tage nach einer intrazerebralen Hämorrhagie beobachten und eigenen Untersuchungen (KELLERMANN et al., in Vorbereitung) zufolge ist selbst am 28. postoperativen Tag nach einer EKZ mit DHCA NFκB zerebral noch immer nachweisbar.

In Zusammenhang mit zerebraler Ischämie weiß man auch, dass v. a. die Kombination der beiden Untereinheiten p50/p65 aus den insgesamt fünf Untereinheiten von NFκB maßgeblich an der Induktion pro- apoptotischer Faktoren beteiligt ist (SARNICO et al., 2009). Während dabei die p50- Untereinheit als isolierte Form inhibitorisch auf NFκB wirkt, erfolgt dagegen nach Bildung eines Dimers mit der Untereinheit p65 eine Aktivierung. Deswegen entschied man sich in der vorliegenden Studie für die Markierung der p65- Untereinheit von NFκB im Rahmen der immunhistochemischen Färbemethode.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

### 4.2.1 Physiologische Parameter während des operativen Eingriffs

Mehrfache Messungen zu immer den gleichen intraoperativen Zeitpunkten ermöglichen einen standardisierten Versuchsablauf und gewährleisten so eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse innerhalb eines Modells. Folgende Parameter wurden in regelmäßigen Abständen erhoben: mittlerer arterieller Blutdruck, Hämoglobin, Sauerstoffpartialdruck, Basenüberschuss und Blutglukose.

### **Mittlerer arterieller Blutdruck, MAP (mmHg)**

Vor Beginn der EKZ weisen alle Gruppen annähernd vergleichbare Werte auf. Der niedrige Blutdruck beider DHCA- Gruppen vor dem Beginn des DHCA und fünf Minuten nach Ende des DHCA ergibt sich Modell- bedingt aus der Drosselung der physiologischen zerebralen Blutflussrate von 160 bis 180 ml/min/kg zu Beginn der EKZ auf 80 bis 90 ml/min/kg am Ende der Abkühlungsphase bzw. resultiert aus dem Wiedereinsetzen der EKZ bei einer protokollbedingten Blutflussrate von 105 ml/min/kg zu Beginn der Wiedererwärmung, in Anlehnung an kliniknahe Standards. Die auftretende globale zerebrale Hypoperfusion kann jedoch zusätzlich eine systemische Hypotension bedingen (GROCOTT et al., 2005), weshalb während der Wiedererwärmungsphase der MAP mit Norepinephringabe über 45 mmHg gehalten wird. Da die beiden DHCA- Gruppen vergleichbare MAP- Werte aufweisen, ist davon auszugehen, dass MXF keinen Einfluss auf den Blutdruck nimmt. Diese Vermutung wird bestätigt durch eine Studie am Hund (Beagle), bei der die Tiere orale MXF- Dosen von 10, 30 oder 90 mg/kg/Tag erhielten, ohne dass ein Einfluss von MXF auf den Blutdruck beobachtet werden konnte (VON KEUTZ und SCHLUTER, 1999).

### **Hämoglobinkonzentration, Hb (g/dl)**

Die anfangs gemessenen Hb- Werte befinden sich in allen Gruppen im physiologischen Normbereich (11 bis 18 g/dl) (WIJNBERGEN, 2005). Während die Hämoglobinkonzentration in beiden Sham- Gruppen bis zum Ende des operativen Eingriffs nur geringgradig abfällt, sinkt diese erwartungsgemäß in beiden DHCA- Gruppen bis zum Beginn des DHCA auf ca. die Hälfte ab. Ein kleiner Teil der Abnahme der Hb- Konzentration lässt sich in allen Gruppen durch die bei der Präparation entstandenen Blutverluste erklären. Vor Beginn der EKZ wird der (EKZ-) Kreislauf mit 6 %iger Hydroxyethylstärke (HAES) gefüllt, um das System der EKZ zu entlüften. Auf diese Weise entsteht eine Hämodilution, die aber die Viskosität des Blutes verringert, wodurch eine verbesserte Zirkulation des Blutes durch die HLM gewährleistet ist. Dies führt aber letztendlich dazu, dass die reduzierte Sauerstoffsättigung/ -kapazität ein Stück weit kompensiert wird (SAKAMOTO et al., 2004). Andererseits führt eine Hämodilution aber auch zu einer Absenkung der Hb- Konzentration. Um die Hb- Werte der DHCA- Gruppen zurück in den Normbereich zu heben, wird nach EKZ- Ende das in der HLM verbliebene Blut gesammelt, zentrifugiert und mit Kalzium und HAES versetzt, um den Hämatokrit auf > 30 % anzuheben. Das so erhaltene Erythrozytenkonzentrat wird dann langsam retransfundiert. Auch in der Humanmedizin ist seit einigen Jahren eine starke Tendenz dahingehend zu erkennen, bei herzchirurgischen Eingriffen auf

Fremdbluttransfusionen als möglichen Einflussfaktor zu verzichten. Dessen ungeachtet lieferten SAKAMOTO et al. (2004) in einer Studie mit EKZ und DHCA an Ferkeln den interessanten Hinweis, wonach höhere Hämatokritwerte mit einem höheren MAP (MAP > 70 mmHg) assoziiert werden können und letztendlich postoperativ eine bessere neurologische Leistungsfähigkeit bedingen (SAKAMOTO et al., 2004).

### **Arterieller Sauerstoffpartialdruck, PaO<sub>2</sub> (mmHg)**

Während der Präparationsphase erfolgt die ausreichende O<sub>2</sub>- Versorgung durch die kontrollierte Beatmung. Der arterielle Sauerstoffpartialdruck steigt während der EKZ nach vergleichbaren Ausgangswerten in beiden DHCA- Gruppen signifikant an. Während der EKZ wird eine ausreichende Sauerstoffspannung über den Membranoxygenator erzielt. Dieser gewährleistet eine überdurchschnittlich gute O<sub>2</sub>- Versorgung zu allen Zeiten des Versuchs. Die Abnahme der Sauerstoffsättigung auf immer noch ausreichende Werte gegen Ende der EKZ lässt sich mit einer nachlassenden Gaskundurchlässigkeit der Diffusionsmembranen begründen. Dieses Phänomen bezeichnet man auch als Plasma- Migration bzw. Plasma- Durchbruch. Mit fortschreitender Zeitdauer der EKZ findet ein Übertritt von Blutplasma über die Membranen in die Gaskompartimente statt, sodass es folglich durch den Verschluss der Lumina zu einer Einschränkung des O<sub>2</sub>- Gasaustausches kommt (WIEN, 2004).

### **Basenüberschuss, BE (mmol/l)**

Die während der EKZ mit DHCA notwendige Hypothermie verursacht eine Absenkung des zerebralen Metabolismus mit Reduktion des zerebralen Blutflusses und des zerebralen Sauerstoffverbrauchs (GREELEY et al., 1991). Infolgedessen kommt es aufgrund des geringeren Verbrauchs zu einem Anstieg zerebraler energiereicher Phosphate wie z. B. Adenosintriphosphat. Weiterhin läuft aufgrund der verminderten Gewebepfusion ein vorwiegend anaerober Metabolismus ab, welcher vermehrt Glukose in Laktat umgewandelt (SHINDE et al., 2005). Dadurch sinkt der Blut- pH, körpereigene Säure- Basen- Puffer- systeme geraten aus dem Gleichgewicht und bedingen so einen Abfall des BE- Wertes. Die beschriebenen Vorgänge bestätigen die Ergebnisse in der vorliegenden Studie. Während die Sham- Gruppen konstante BE- Werte aufweisen, fällt der Basenüberschuss in beiden DHCA- Gruppen gegen Ende der Abkühlungsphase, sowie verstärkt zu Beginn der Wieder- erwärmungsphase deutlich ab.

RANUCCI et al. (2006) zeigten in einer Studie, dass eine Azidose während der EKZ mit folgenden Faktoren in Verbindung gebracht werden kann: verlängerte erforderliche EKZ-Dauer, verminderte periphere Sauerstoffabgabe, Hyperglykämie sowie reduzierte postoperative Leistung bzw. höhere Mortalitätsrate (RANUCCI et al., 2006). Hohe Blutlaktatwerte ( $\geq 4,0$  mmol/L) während der EKZ stellen somit ein höheres Risiko für Patienten dar, an postoperativen kardialen, neurologischen, pulmonalen, digestiven, renalen oder infektiösen Komplikationen zu erkranken oder zu sterben (DEMERS et al., 2000; MUNOZ et al., 2000).

Um solche negativen Auswirkungen möglichst gering zu halten, wird der Basenüberschuss in der vorliegenden Studie nach dem Beenden des DHCA, sowie eine Stunde nach EKZ regelmäßig kontrolliert und mit Bikarbonat nach der Formel „Bikarbonat = - BE x 0,3 x kg KG“ in physiologischen Grenzen gehalten.

### **Blutglukose (mg/dl)**

Die Referenzwerte der Glukosekonzentration im Blut liegen bei der gesunden Ratte zwischen 50 und 135 mg/dl (WIJNBERGEN, 2005). Nach einem zerebralen Sauerstoffmangel können Veränderungen der Insulinsekretion und des Glukosestoffwechsels auftreten und zu einer Hyperglykämie führen (FEERICK et al., 1995). Erhöhte Glukosekonzentrationen konnten auch in der vorliegenden Studie beobachtet werden. In beiden DHCA- Gruppen zeigt sich ein kontinuierlicher Anstieg der Glukose bis zum Ende der EKZ. Bis zu einer Stunde nach EKZ sinkt dagegen die Konzentration wieder auf Werte ab, die nur noch geringgradig höher liegen als die Ausgangswerte. Ursachen dieser erhöhten Glukose- Werte in den DHCA- Gruppen sind das chirurgische Trauma an sich und/oder die zerebrale Hypoxie während des DHCA. Der Körper schüttet als Antwort auf Stress antiinsulinerge Hormone, wie die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin, Glukagon und Somatotropin aus, die wiederum eine Hyperglykämie auslösen. Zudem liegt bei einem DHCA eine Hypoperfusion des Pankreas vor, sodass nur eine reduzierte Insulinsekretion ermöglicht wird (FEERICK et al., 1995).

FEERICK et al. (1995) konnten in einer Studie (Hund) mit hypothermer EKZ bestätigen, dass eine präischämische Hyperglykämie zu einer regionalen Anhäufung von Laktat im Hirngewebe führt und somit für eine Verschlechterung des neurologischen Outcomes verantwortlich ist. Eine Untersuchung an Säuglingen und Kindern konstatierte zudem, dass hohe Blutglukosekonzentrationen nach einem DHCA in Verbindung mit ischämischem Insult den zerebralen Schaden zusätzlich erhöhen und letztendlich auch eine reduzierte neurologische Leistungsfähigkeit bedingen (PUA und BISSONNETTE, 1998).

## 4.2.2 Neurologisch- motorische Parameter

### Körpergewicht

Das Körpergewicht gilt als Indikator für das Allgemeinbefinden eines jeden Tieres. Zu- oder Abnahmen des Körpergewichts können diverse Gründe haben: Nahrungsangebot, Größe des Käfigs und damit die Bewegungsaktivität, sowie Umgebungstemperatur. Negativ auf die Gewichtszunahme wirkt sich beispielsweise Stress wie Transport der Tiere, operative Eingriffe oder Rangordnungskämpfe mit Verdrängung vom Futterplatz aus. Die Körpergewichtszunahme der Kontrolltiere liegt wie erwartet im physiologischen Bereich von ca. 4 bis 5 g pro Tier und Tag. Da bei den Kontrolltieren nur die NU und der ZHBT durchgeführt wurde, sind sie lediglich geringfügigem Stress ausgesetzt und nehmen entsprechend täglich zu. Der Körpergewichtsverlust aller vier operierten Gruppen beträgt dagegen am ersten postoperativen Tag knapp 5 % (16 bis 18 g), was durch den chirurgischen Eingriff an sich und dem damit verbundenen Stress zu erklären ist. Dazu kommt auch der Flüssigkeitsverlust während der OP. So entstehen während der Gefäßpräparation kleinere Blutungen, zudem werden Blutproben zur Bestimmung der physiologischen Parameter entnommen. Bei den DHCA- Gruppen bleibt zusätzlich geringfügig Blut im Oxygenator und den Verbindungsschläuchen zurück. Grundsätzlich muss auch berücksichtigt werden, dass eine mehrstündige Operation immer mit einer temporär eingestellten Futter- und Wasseraufnahme verbunden ist. Das weitere Absinken des Körpergewichts bei dem Großteil der operierten Tiere (außer Sham Plazebo- Gruppe) spricht für ein noch reduziertes Allgemeinbefinden bis zum zweiten postoperativen Tag. Tiere, die versuchsbedingte, motorische Einschränkungen zeigen, sind häufig in den ersten postoperativen Tagen nicht in der Lage, eine ausreichende Menge Futter aufzunehmen, was bei diesen Tieren die länger anhaltende Gewichtsreduktion bedingt. Zwischen den Gruppen ergeben sich aber keine signifikanten Unterschiede in ihrem Körpergewicht.

### Neurologisch- motorische Parameter

Durch jahrelange technische Weiterentwicklung der EKZ mit DHCA und verbesserte Anästhesie, konnte die Morbidität signifikant reduziert und die Mortalitätsrate für die meisten der durchgeführten herzchirurgischen Eingriffe deutlich gesenkt werden (TAYLOR, 1998). Trotzdem bleiben neurologische Defizite, die eine gravierende postoperative Morbidität bedingen, als limitierender Faktor bei dieser Art Eingriff präsent (ARROWSMITH et al., 2000). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen in beiden DHCA- Gruppen stärker ausgeprägte

neurologisch- motorische Defizite im Vergleich zu den Sham- Gruppen. Eine spezifische Wirkung von MXF kann aber weder in den DHCA-, noch in den Sham- Gruppen beobachtet werden.

Aus verschiedenen Studien weiß man bereits, dass die Durchführung (BELLINGER et al., 1995), sowie die Dauer eines DHCA (WYPIJ et al., 2003) als Risikofaktoren für postoperative neurologische Defizite gelten. In diesem Zusammenhang zeigen JUNGWIRTH und Kollegen (2006) eine positive Korrelation zwischen motorischer Dysfunktion und DHCA- Dauer in einem Rattenmodell. Es können aber auch neurologische Defizite bereits nach einer EKZ ohne DHCA, sowie nach einer Sham- Operation auftreten (MA et al., 2003).

Zur Erhebung des Motorik- Scores betrachtet man zum einen die neurologisch- motorischen Ergebnisse der postoperativen Tage 3 und 14 aus der NU und zum anderen die im ZHBT ermittelten motorischen Ergebnisse der postoperativen Tage 4 bis 7 („Time Complete“) bzw. 6 bis 7 („Frustrane Hole Visits“), sowie der Tage 10 bis 13. Den eigenen Ergebnissen zufolge lassen sich in der vorliegenden Studie neurologische Defizite nicht nur in den DHCA-, sondern auch in beiden Sham- Gruppen feststellen. Während sich dabei motorische Defizite der Sham- Gruppen postoperativ nur geringfügig und kurzfristig zeigen, bestehen dagegen die neurologischen Defizite der DHCA- Gruppen über mehrere Tage. Bis zum 14. postoperativen Tag nähern sich jedoch alle Gruppen in ihrer neurologischen Funktion an, was für eine sehr erfolgreiche Regeneration besonders in den DHCA- Gruppen nach einer solchen globalen Ischämie spricht. Die Tiere der Kontrollgruppe weisen erwartungsgemäß kein neurologisch auffälliges Verhalten auf, da diese Tiere weder anästhesiert noch operiert wurden. Auch andere Tiermodelle mit DHCA beobachteten neurologische Defizite, die hauptsächlich als Ataxie und Gleichgewichtsstörungen charakterisiert werden (KURTH et al., 1999; MYUNG et al., 2003). Diese Defizite sind allerdings transient, nur bis zum sechsten (MYUNG et al., 2003) oder siebten (KURTH et al., 1999) postoperativen Tag offensichtlich. Mit diesen transienten Defiziten im Tiermodell gestaltet sich ein Vergleich mit den bei Patienten auftretenden langfristigen neurologischen Defiziten schwierig. Denn nach Operationen mit DHCA lassen sich neurologische Dysfunktionen bei Patienten teilweise nach acht Jahren noch nachweisen (HOVELS-GURICH et al., 2002).

GIONET et al. (1991) berichten davon, dass neurologische Beeinträchtigungen als Folge zerebraler Ischämien (10 Minuten) bei Nagern am ersten postoperativen Tag am deutlichsten sichtbar sind. Langanhaltende neurologische Dysfunktionen kommen dagegen nur sehr selten vor, da Ratten sehr schnell regenerieren. Transiente Defizite klingen daher sehr schnell

zwischen zweitem und siebten postoperativen Tag ab (GIONET et al., 1991). Ein direkter Vergleich mit den vorliegenden Ergebnissen gestaltet sich aber schwierig, da zum einen Unterschiede in der chirurgischen Vorgehensweise bestehen, und zum anderen die Ischämiedauer -10 zu 45 Minuten- deutlich differiert. So dass man in Anbetracht der eigenen Studie deutlich längeren Ischämiezeit von 45 min eine stärkere und/oder länger anhaltende motorische Beeinträchtigung der Tiere erwarten würde.

DRABEK et al. (2007) untersuchen in einer Vergleichsstudie die Ausprägung der motorischen Funktion bei Ratten, die einer EKZ oder einer EKZ mit DHCA unterzogen wurden. Beide Gruppen weisen dabei annähernd identische neurologische Defizite auf, die aber vermutlich eher mit dem Ort der Kanülierung, als mit einem neurologischen Schaden in Verbindung stehen. Denn der in dieser Studie verwendete Zugang zur Femoralarterie und -vene verursacht sehr häufig eine Ischämie des Beines, bedingt durch das Abbinden der betroffenen Gefäße oder eine Verletzung des Nervus femoralis (DRABEK et al., 2007). In der vorliegenden Studie hat man sich für die V. jugularis als Abfluss- und die Schwanzarterie als Zuflussgefäß für die EKZ entschieden und überwacht den Blutdruck über einen Katheter in der A. epigastrica cranialis superficialis. Daher ist eine Ischämie des Beines als Ursache für die motorische Dysfunktion auszuschließen und es ist eine Schädigung des motorischen Kortex im Rahmen der EKZ mit DHCA, wie auch in der Literatur beschrieben, zu vermuten (SHIN'OKA et al., 1996).

Die eigenen Untersuchungen ergeben insgesamt, dass erwartungsgemäß beide DHCA-Gruppen im Vergleich zu den Sham- Gruppen ein schlechteres neurologisch- motorisches Gesamtergebnis erzielen. Während bei allen Tieren das Laufvermögen physiologisch und das Kraftvermögen im „Rotating- Grid- Test“ ebenfalls unbeeinträchtigt ist, zeigen beide DHCA-Gruppen neurologisch- motorische Defizite im „Beam- Walking- Test“, der die Koordination und das Gleichgewichtsvermögen untersucht. Die DHCA MXF- Gruppe zeigt zudem tendenziell eine beeinträchtigte Bewegungssymmetrie, Koordinationsschwierigkeiten auf dem Balken im „Beam- Balance- Test“ und Kraftverluste, die allerdings nie Signifikanzniveau erreichen. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen anderer präklinischer und klinischer Studien (PRIESTLEY et al., 2001; HOVELS-GURICH et al., 2002; JUNGWIRTH et al., 2006), die neurologisch- motorische Ausfälle nach EKZ mit DHCA beschreiben. Da die Untersuchungen von immer derselben, den Versuchsgruppen gegenüber geblindeten Person durchgeführt wurden, schließen wir einen Einfluss des Untersuchers auf die Ergebnisse der neurologischen Tests aus.



Zwei weitere Parameter aus dem ZHBT, die in den motorischen Gesamtscore mit einfließen, bewerten Feinmotorik und die Geschicklichkeit der Tiere. Die Zeit, die ein Tier zum Fressen einer Futterbelohnung („Time per Food Intake“) im ZHBT benötigt, liefert Hinweise zu feinmotorischem Geschick. Liegen Störungen in der Feinmotorik vor, verlängert sich die Fresszeit, da der eigentliche Fressvorgang über koordinative Vorgänge, wie Festhalten der Futterbelohnung, Führen der Futterbelohnung zum Maul und letztlich Kaubewegungen funktioniert. Eine verlängerte Fresszeit lässt Rückschlüsse auf die Funktion des Motorkortex zu. Läsionen des Motorkortex können demnach Störungen der Feinmotorik verursachen. In der vorliegenden Studie lassen sich in allen vier Versuchsgruppen feinmotorische Defizite feststellen. Diese feinmotorischen Defizite der DHCA- Gruppen passen zu den histologisch ermittelten Ergebnissen. Weshalb aber auch beide Sham- Gruppen geringgradige Störungen in der Feinmotorik zeigen, bleibt Spekulation. Da der Motorik- Score die neurologisch-motorische Funktion als Gesamtheit widerspiegelt, jedoch Verbesserungen bzw. Verschlechterungen im zeitlichen Verlauf nicht aufgezeigt werden, ist eine zusätzliche Betrachtung der Einzelergebnisse sinnvoll, um die Entwicklung der neurologisch-motorischen Funktion über die gesamte Versuchszeit zu verfolgen.

Denkbar wäre, dass alle Tiergruppen postoperativ feinmotorische Defizite zeigen, die Sham-Gruppen sich dann aber viel schneller vom chirurgischen Eingriff erholen als die DHCA-Gruppen mit zerebraler, ischämischer Schädigung. Die unerwartet ermittelten feinmotorischen Störungen beider Sham- Gruppen entsprechen aber den histologischen Ergebnissen. Denn die Sham- Gruppen weisen, wenn auch deutlich weniger, doch auch geschädigte neuronale Zellen im Motorkortex auf, die somit die feinmotorischen Defizite erklären könnten. Man nimmt an, dass das Inhalationsanästhetikum Isofluran dabei eine Rolle spielen könnte, da es zerebrale Apoptose und damit eine neuronale Degeneration zu induzieren vermag (XIE et al., 2008). WISE-FABEROWSKI et al. (2005) konnten dies in vitro anhand von Zellkulturen aus dem Hippokampus bestätigen. Ob jedoch Isofluran auch zu Zelluntergang im Motorkortex in vivo führt und damit als mögliche Ursache für feinmotorische Defizite tatsächlich in Frage kommt, bleibt Spekulation und ist Ziel weiterer Untersuchungen.

Bei der Beurteilung der Geschicklichkeit anhand der Anzahl frustraner Lochbesuche („Frustrane Hole Visits“) im ZHBT zeigen sich Abweichungen von der Norm in beiden DHCA- und in der Sham MXF- Gruppe. Die zahlreichen frustranen Lochbesuche der DHCA-Gruppen sind durchaus plausibel und entsprechen auch den histologischen Ergebnissen. Denn

man geht davon aus, dass Tiere mit ausgeprägten neuronalen Zellschäden und sichtbaren Hirninfarkten in ihrer motorischen Geschicklichkeit eingeschränkt sind und somit größere Probleme haben, den ZHBT zu erlernen. Weshalb die Sham MXF- Gruppe eine geringfügig erhöhte Anzahl frustraner Lochbesuche zeigt, bleibt Spekulation, mehrere Erklärungen sind hier möglich: Denkbar wäre ein Einfluss des Verhaltens der Sham MXF- Gruppe auf das Geschick. Obwohl alle Versuchstiere aus einer bestmöglich standardisierten Labortierzucht stammen, können die Tiere bedingt durch Unterschiede in der Betreuung oder im Transport entsprechend auch individuelle Unterschiede im Verhalten zeigen. So ist es möglich, dass manche Tiere der Sham MXF- Gruppe übermotiviert sind, verstärkt die Zylinder explorieren und dabei aber die Futterbelohnung außer Acht lassen. Auf der anderen Seite werden die Tiere randomisiert den Gruppen zugeteilt, so dass in jeder Gruppe aus jeder Lieferung Tiere enthalten sind, um eben den Einfluss unterschiedlicher Herkunft möglichst gleichmäßig zu verteilen. Darüber hinaus akklimatisieren sich die Tiere drei Wochen lang in ihrer neuen Umgebung, bevor sie in den Versuch gehen.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass das Verhalten bzw. die psychische Konstitution der Sham MXF- Tiere möglicherweise durch MXF beeinflusst wird. Denn Fluorchinolone verfügen über ein neurotoxisches Potential. Dabei zeigen sich ZNS- Nebenwirkungen wie beispielsweise Bewusstseinsstörungen, Veränderungen der kognitiven Funktion oder Ruhelosigkeit bzw. Hyperaktivität, mit einer allerdings nur sehr geringen Inzidenz (< 0,5 %) (STAHLMANN, 2002). Somit ließe sich die erhöhte Anzahl an frustranen Lochbesuchen der Sham MXF- Gruppe durch die Hyperaktivität bzw. Übermotivation als eine Wirkung von MXF erklären.

MEISEL et al. (2004) konnten eine Verbesserung der neurologischen Funktion nach perioperativer MXF- Gabe am Mausmodell mit einstündiger MCAO feststellen. Dabei bestand aber zunächst bis zum zweiten postoperativen Tag kein neurologisch- motorischer Unterschied zwischen den MXF- und Plazebo- behandelten Mäusen. Vom zweiten bis zum siebten postoperativen Tag regenerierten sich aber schließlich die MXF- behandelten Tiere signifikant schneller und besser (MEISEL et al., 2004). Eine signifikante MXF- Wirkung in der vorliegenden Studie konnte aber weder in den DHCA-, noch in den Sham- Gruppen beobachtet werden. Das Ausmaß bzw. die Art der Ischämie könnte in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle spielen. Während es sich bei MEISEL et al. (2004) um eine fokale Ischämie handelt, zeigt sich in der eigenen Studie nach EKZ mit DHCA eine globale Ischämie. Dieser Unterschied in der Art und Weise der Schädigung könnte der Grund sein,

weshalb in der vorliegenden Studie keine durchschlagende Wirkung des MXF auf die motorische Funktion zu sehen ist. Zusätzlich könnte der Spezies- Unterschied -Ratten in der eigenen Studie, Mäuse bei MEISEL et al. (2004)- diesen Wirkungsunterschied erklären.

Eventuell war auch für die hier angewandte Art der Schädigung die Applikationsdauer von MXF (sechs Mal mit einem Abstand von jeweils zwei Stunden, in Anlehnung an MEISEL et al. (2004)) nach einer solch globalen Ischämie zu kurz. So konnte in einer Untersuchung zur globalen Ischämie beim Menschen gezeigt werden, dass sich eine präventive fünftägige MXF- Gabe innerhalb von 9 bis 36 Stunden nach dem Beginn eines Schlaganfalls positiv auf die neurologische Leistungsfähigkeit nach sechs Monaten auswirkt (HARMS et al., 2008). Es wäre somit denkbar, dass auch in der eigenen Studie entweder eine präventive oder eine mehrtägige postoperative MXF- Applikation zu neurologischen Verbesserungen hätte führen können. Zudem wird spekuliert, inwieweit MXF nicht nur antiinflammatorisch, sondern auch immunmodulatorisch wirken kann. Präklinische Studien haben bereits diese immunmodulatorischen Eigenschaften von MXF bestätigt. MXF kann dabei beispielsweise die Bildung von Nitritoxid in humanen Alveolarepithelzellen, die zuvor mit Zytokinen stimuliert wurden, unterbinden (WERBER et al., 2005). Außerdem zeigt sich bei *Candida albicans*-infizierten Mäusen nach MXF- Gabe eine reduzierte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine im Lungengewebe, wobei *Candida albicans* erwiesenermaßen nicht in das Wirkungsspektrum von MXF fällt (SHALIT et al., 2002). So stellt sich die Frage, ob vielleicht der Applikationsbeginn von MXF in der vorliegenden Studie zu spät gewählt worden ist. Die Vermutung liegt nahe, dass für die volle Wirkung der immunmodulatorischen Eigenschaften des MXF unter Umständen eine präventiv, vor der Ischämie- bedingten Zytokinfreisetzung, durchgeführte MXF- Gabe notwendig gewesen wäre und damit zu einer Verbesserung der neurologisch- motorischen Funktion hätte führen können.

### **4.2.3 Neurokognitive Parameter**

#### *Kognitive Parameter*

Gedächtnisprozesse werden von verschiedenen -in der Regel intakten- neuronalen Netzwerken gesteuert. Der ZHBT erlaubt, Lernleistung anhand kognitiver Parameter zu beurteilen und dabei unterschiedliche Gedächtnisprozesse, wie sie im Arbeitsgedächtnis und/oder deklarativen Gedächtnis ablaufen, zu differenzieren. So können kognitive Fehlleistungen aus dem ZHBT Hinweise auf eine zerebrale Schädigung geben. Darüber hinaus lassen sich mit

dem ZHBT Verhaltensweisen wie beispielsweise Angst, Exploration, Erregung und soziale Affinität bewerten, die wiederum die kognitive Leistung beeinflussen können (BEUZEN und BELZUNG, 1995).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der eigenen Studie, dass zum einen die Kontrollgruppe den Test ohne Probleme erlernen und entsprechend absolvieren konnte. Der Kognitions- Score liegt bei diesen nicht- operierten, nicht- anästhesierten Tieren erwartungsgemäß bei Null. Zum anderen zeigen beide DHCA- Gruppen eine deutlich schlechtere kognitive Leistung. Diese Ergebnisse stimmen überein mit vorhergehenden Studien, in denen bereits nach EKZ alleine kognitive Störungen nachgewiesen werden (MA et al., 2003) bzw. nach EKZ mit DHCA kognitive Defizite auftreten (SCHRECKINGER et al., 2007). Allerdings nimmt die perioperative Gabe von MXF keinen Einfluss auf das neurokognitive Ergebnis in der eigenen Studie.

Diese beeinträchtigte allgemeine kognitive Leistungsfähigkeit der DHCA- Tiere passt zum histologischen Bild dieser Gruppen. Der 45-minütige tief- hypotherme Kreislaufstillstand führt demnach nicht nur zu einer Schädigung der Neurone in Motorkortex und Hippokampus, sondern ebenfalls zu postoperativen kognitiven Defiziten und neurologisch- motorischen Beeinträchtigungen. Defizite sind hier besonders im deklarativen Gedächtnis (gemessen über die Gesamtzeit eines Durchlaufs, „Time Complete“, TC) zu erwarten, da im Hippokampus aller DHCA- Tiere zahlreiche geschädigte und zugrunde gegangene Neurone feststellbar sind. Weshalb die DHCA MXF- Gruppe insgesamt mehr Zeit für einen Durchlauf des ZHBT benötigt, ist nicht eindeutig zu erklären. Es könnte sich hierbei womöglich um eine (Neben-)Wirkung des MXF handeln. Beim Menschen sind Nebenwirkungen von MXF bekannt, die neben diversen Organsystemen eben auch das ZNS betreffen. So können viele Patienten von häufig bis gelegentlich auftretenden MXF- Nebenwirkungen wie beispielsweise Benommenheit, Angstzustände und Verwirrtheit berichten. Ob aber derartige ZNS- Nebenwirkungen auch bei der Ratte eine Rolle spielen und somit die längeren Gesamtzeiten der DHCA MXF- Tiere bedingen, bleibt höchst spekulativ. Dagegen spricht die Halbwertszeit des MXF (zwölf bis 14 Stunden), da die Untersuchung der Kognition erst mit dem vierten postoperativen Tag beginnt, und zu diesem Zeitpunkt kein zerebrales MXF mehr vorhanden sein sollte, das zu ZNS- Nebenwirkungen führen könnte. Da die Sham MXF- Tiere im Vergleich zu den Sham Plazebo- Tieren ein besseres neurokognitives Ergebnis zeigen, kann die verlängerte TC nicht alleine an Nebenwirkungen des MXF liegen.

Eine Verlängerung der TC durch eine feinmotorische Beeinträchtigung und daraus folgend längere Fresszeiten können wir ebenfalls ausschließen, da in allen Gruppen vergleichbare feinmotorische Störungen erkennbar sind. Nager verfügen insgesamt über ein sehr effektives Regenerationsvermögen und erholen sich postoperativ sehr schnell. Demnach könnte der Beginn des ZHBT am vierten postoperativen Tag insgesamt zu spät gewählt sein. Dafür würde auch sprechen, dass das Maximum der neurologischen Schädigung am ersten postoperativen Tag zu sehen ist. Somit könnte es interessant sein, in einer weiteren Studie mit diesem Modell den ZHBT bereits am ersten postoperativen Tag beginnen zu lassen.

Man weiß, dass Lern- und Gedächtnisprozesse im Tiermodell mit visuell- räumlichen und assoziativen Mechanismen in Verbindung stehen (HODGES, 1996; OHL et al., 1998). Dabei übernimmt das **deklarative Gedächtnis**, das dem Hippokampus zugeschrieben wird, die Funktion der bewussten Wahrnehmung von Ereignissen und Tatsachen (ZOLA-MORGAN und SQUIRE, 1993). Der ZHBT integriert diese deklarativen Gedächtnisprozesse, indem die Tiere lernen, die markierten Zylinder mit der Futterbelohnung zu assoziieren. Entsprechend wertet man als Fehler des deklarativen Gedächtnisses die Anzahl falsch oder nicht besuchter, markierter Löcher in einem Durchlauf („Wrong Choices“, WC, respektive „Omission Errors“, OE, Auffindungsfehler) (OHL et al., 2003). Während keine der Gruppen Auffindungsfehler macht, besuchen v. a. Tiere der beiden DHCA- Gruppen verstärkt falsche Löcher (WC). Wir gehen dabei davon aus, dass beide DHCA- Gruppen aufgrund der zerebralen Schädigung nach EKZ mit DHCA unter kognitiven Defiziten leiden und dabei insgesamt mehr falsche Löcher, v. a. in den ersten Tagen des ZHBT, besuchen. Weshalb auch die Sham Plazebo- Gruppe, die keiner EKZ mit DHCA unterzogen wurde, einen schwächeren Lernerfolg zeigt, bleibt Spekulation. Einen Einfluss von zerebralem NFκB als Ursache für Defizite des deklarativen Gedächtnisses kann man dabei ausschließen, da die Sham Plazebo- Gruppe im Vergleich zu den Sham MXF- Tieren insgesamt niedrigere NFκB- Werte im Hippokampus aufweist.

Bei der Beurteilung der beiden Parameter OE und WC muss berücksichtigt werden, dass Angst im Test oder eine eingeschränkte Motorik dazu führen können, dass Tiere das Board erst gar nicht betreten und somit auch keine Fehler machen können. Da aber neben der Kognition auch eine Reihe von Verhaltensparametern (Angst, Exploration, Erregung, soziale Affinität) mit untersucht werden und auch die Motorik gesondert bewertet wird, kann man eine Fehlinterpretation der OE und WC Daten in dieser Richtung ausschließen.

Als Indikator des **Arbeitsgedächtnisses** gilt die Anzahl wiederholt besuchter, geleerter Löcher („Repeated Choices“, RC). Da das Arbeitsgedächtnis im Präfrontalen Kortex

lokalisiert ist (SANCHEZ-SANTED et al., 1997; BADDELEY et al., 2000), können Schäden im Bereich des Motorkortex auch zu Funktionsausfällen im Arbeitsgedächtnis führen und die zum Teil mangelnden Lernerfolge gerade bei den DHCA- Tieren erklären. Denn besucht ein Tier ein bereits geleertes Loch erneut, begeht es einen Wiederholungsfehler (RC), der wiederum Hinweise gibt auf Defizite im Arbeitsspeicher (OHL et al., 1998). Um den Test zu erlernen, müssen sich die Ratten die Sequenzen der markierten Löcher nicht nur in jedem einzelnen Durchlauf, sondern auch über mehrere Versuchsdurchläufe hinweg merken können. Durch das Absolvieren mehrerer Durchläufe pro Tag kann somit das Arbeitsgedächtnis mit komplexen Aufgabenstellungen wie Verstehen, Lernen und logischem Denken möglichst umfassend untersucht werden (BADDELEY, 2000). Da in der eigenen Studie zudem die Sequenzen der markierten Löcher täglich wechseln, kann man einen nicht- deklarativen, automatisierten Gedächtnisprozess zum Auffinden der markierten Löcher ausschließen. In den eigenen Untersuchungen zeigen sich in beiden DHCA- Gruppen besonders in den ersten vier Tagen des ZHBT Defizite im Arbeitsgedächtnis. Da die histologischen Ergebnisse in beiden DHCA- Gruppen ähnlich umfangreiche Neuronenverluste bis hin zu Gewebsnarben zeigen, war diese Art von kognitivem Defizit auch zu erwarten.

Insgesamt kommt man zu dem Ergebnis, dass ein globaler ischämischer Insult, wie ihn eine EKZ mit DHCA darstellt, neben neurologisch- motorischen Funktionseinbußen und einem auch nach 14 Tagen noch deutlich sichtbarem histologischen Schaden, ebenfalls postoperative kognitive Defizite bedingt.

Wie auch in der Neurologie und Histologie zeigt sich in der vorliegenden Studie auch kein Unterschied in der neurokognitiven Funktion zwischen den MXF- und den mit Plazebo-behandelten Tieren. Man vermutet, dass die antiinfektiven und nachweislich immun-modulatorischen Eigenschaften von MXF (SHALIT et al., 2006) bei dieser Art globalem Zellschaden nicht ausreichen, die kognitive Leistungsfähigkeit signifikant zu verbessern. Es stellt sich die Frage, ob eine kognitive Verbesserung am 14. postoperativen Tag messbar gewesen wäre, hätte man die perioperative MXF- Gabe ergänzt um entweder eine prä- oder eine zusätzliche postoperative und u. U. mehrtägige Applikation von MXF, oder Beides.

Im Rahmen des ersten Teils dieser Studie konnte 24 Stunden nach Operation eine Abnahme der zerebralen NFκB- Expression in der DHCA MXF- Gruppe beobachtet werden (STÜCKLE, Medizinische Dissertation in Vorbereitung). Aufgrund der reduzierten Inflamationsantwort von NFκB im ersten Teil der Kurzzeitstudie hätte man in der eigenen Langzeitstudie eigentlich eine niedrige oder nicht mehr vorhandene NFκB- Expression in den

mit MXF behandelten Tieren erwartet. Damit verbunden hätte man ebenfalls eine verbesserte kognitive Funktion 14 Tage nach dem operativen Eingriff erwartet. Die Ergebnisse können aber diese Hypothese nicht bestätigen.

Eine weitere Überlegung liefert die Diskussion der durchaus ambivalenten Eigenschaften von NFκB. Man weiß, dass postoperative Zytokine nicht nur an Entzündungsreaktionen, sondern auch an Regenerationsprozessen beteiligt sind und für jeden Heilungsprozess in gewissem Umfang auch eine Inflammationsreaktion notwendig ist (SCHONING et al., 1999). Würde allerdings die erhöhte Anzahl NFκB- exprimierter Neurone in den Placebo- Gruppen der ersten Studie (STÜCKLE, Medizinische Dissertation in Vorbereitung) für einen ablaufenden Regenerationsprozess stehen, hätte man in der eigenen Studie ein besseres funktionelles Outcome in den Placebo- behandelten Tieren sehen müssen.

Bei herzchirurgischen Eingriffen, die mit einer lang andauernden zerebralen Ischämie, wie sie typischerweise während einer EKZ mit DHCA auftritt, einhergehen, scheint nach heutigem Stand der Erkenntnisse die schädigende Rolle von NFκB zu überwiegen (RIDDER und SCHWANINGER, 2009).

### Verhaltensparameter

Verhaltensweisen im ZHBT, wie beispielsweise Angst, soziale Affinität, gerichtete und ungerichtete Exploration, Erregung und allgemeine Bewegungsaktivität können ebenfalls die kognitive Leistung beeinflussen (BEUZEN und BELZUNG, 1995). Insgesamt zeigen aber die das Verhalten betreffenden Ergebnisse, dass dabei kein ausgeprägter Unterschied zwischen den Gruppen besteht (Verhaltensscore zwischen 3 und 3,5). Alle Tiere zeigen hierbei ein gleiches angstassoziiertes Verhaltensmuster im ZHBT, wobei sie gleichermaßen das ungeschützte und offene Feld meiden, was mit dem Begriff der sog. „Thigmotaxis“ umschrieben werden kann (PRUT und BELZUNG, 2003). In der vorliegenden Studie schließt die ausgeprägte Aktivität der Ratten eine vermehrte Ängstlichkeit aus, was sich auch im Erkunden des Testumfelds zeigt. Gerichtetes (Latenz bis zum ersten Lochbesuch, Anzahl aller besuchten Löcher) und ungerichtetes exploratives Verhalten (Aufrichten auf die Hinterbeine) gehören zum natürlichen Verhaltensrepertoire von Nagern und ist für Ratten essenziell, um sich an neue veränderte Situationen anzupassen. Exploration ermöglicht somit einerseits das Aufsuchen neuer Futterquellen, andererseits aber auch die Erkenntnis von Fluchtwegen im Falle eines Beutegriffs (PERSCH, 1994). Da in der eigenen Studie alle Tiere gleichermaßen zielgerichtet und ungerichtet explorieren, geht man davon aus, dass alle Tiere gleich stark

motiviert sind. Die Ergebnisse lassen somit darauf schließen, dass die kognitive Leistung nicht durch eine gesunkene Motivation oder angstbezogenes Verhalten beeinträchtigt zu sein scheint, sondern ein reales Abbild der kognitiven Funktion der Tiere widerspiegelt.

#### **4.2.4 Histologie**

Auch in der Histologie (HE-, sowie immunhistochemische Färbung) zeigt sich, dass die Tiere beider DHCA- Gruppen, im Vergleich zu beiden Sham- Gruppen, 14 Tage nach EKZ mit DHCA einen ausgeprägten histologischen Zellschaden in Hippokampus und Motorkortex aufweisen. Ein Unterschied zwischen MXF- und Plazebo- behandelten Tieren besteht dabei nicht. Um nun die Aussagekraft der erhobenen Histologie- und NFκB- Scorewerte richtig deuten zu können, ist es notwendig, die histologischen Einzelergebnisse der verschiedenen Gruppen näher zu betrachten.

Da in der vorliegenden Studie vorwiegend die neurologische und neurokognitive Funktion interessiert, hat man sich bei der histologischen Untersuchung auf die zerebralen Areale beschränkt, die für die motorische bzw. kognitive Steuerung verantwortlich sind: zum einen der motorische Kortex (als Teil des Neokortex) sowie der Hippokampus, der als das neuronale Korrelat für Lernen und Gedächtnis angesehen wird. Zudem reagiert der Hippokampus äußerst sensitiv auf eine Ischämie (SCHMIDT-KASTNER und FREUND, 1991). So führten KURTH und Kollegen (1999) Untersuchungen zum neuronalen Zelltod nach 90-minütigem DHCA an neugeborenen Schweinen durch. In dieser Studie sind am siebten postoperativen Tag in der DHCA- Gruppe noch eosinophile Neurone überwiegend in den Gehirnbereichen Motorkortex und Hippokampus zu finden, so wie es SCHMIDT-KASTNER und FREUND (1991) Jahre zuvor schon beobachtet hatten. Eine histologische Schädigung bei den Sham- operierten Tieren trat dabei zu keiner Zeit weder im Motorkortex, noch im Hippokampus auf (KURTH et al., 1999). Ähnliche Ergebnisse zeigt eine Studie an adulten Ratten mit einem 75-minütigem DHCA, in der die DHCA- Tiere am postoperativen Tag 14 eine geringgradige Anzahl an eosinophilen Zellen, die Sham- Tiere dagegen keinerlei geschädigte Zellen aufwiesen (DRABEK et al., 2007). Die geringfügige Anzahl eosinophiler Neurone in den beiden Sham- Gruppen in der eigenen Studie liegt im Bereich der unbehandelten Kontrolltiere. Die Ursache für diese geringe Anzahl eosinophiler Neurone könnte hier die kurze Isoflurannarkose (15 min) sein, in der ausnahmslos alle Tiere entblutet und getötet wurden. Denn Isofluran wird momentan als Auslöser von Apoptose diskutiert. So



konnten XIE et al. (2008) in einer Studie an naiven Mäusen bestätigen, dass ein transienter Insult, wie beispielsweise eine Isoflurananästhesie (1,4 Vol % über eine Zeitspanne von zwei Stunden) sekundäre und persistente Hirnschäden hervorrufen kann. Dabei konnte eine erhöhte Anzahl aktivierter Kaspase-3- positiver Zellen im zerebralen Kortex bis zu zwölf Stunden nach der Anästhesie, sowie eine verstärkte Ablagerung von  $\beta$ -Amyloidpeptiden, die eine wichtige Rolle in der Alzheimer- Erkrankung spielen, beobachtet werden (XIE et al., 2008). Wie genau Isofluran dabei Apoptose zu induzieren vermag, ist allerdings noch nicht vollständig bekannt. Man nimmt an, dass eine Dysfunktion der Kalziumhomöostase an der Isofluran- induzierten Kaspaseaktivierung beteiligt ist, die dann zur Apoptose führt (ZHANG et al., 2008). Die Ausprägung der Isofluran- induzierten Neurodegeneration scheint zudem von der Dauer der Isofluran- Exposition und vom Lebensalter abhängig zu sein (WISE-FABEROWSKI et al., 2005). Man weiß, dass Neurone besonders anfällig in der Periode der Synaptogenese des Gehirns auf eine Isofluran- Exposition reagieren. Dieses Zeitfenster dauert bei der Ratte z. B. vom zweiten präpartalen Tag bis zu zwei Wochen nach der Geburt. JEVTOMIC-TODOROVIC et al. (2003) konnten diese apoptotische Neuronendegeneration nach einer sechsstündigen Isofluraneinwirkung in einer Studie an sieben Tagen alten Ratten bestätigen. In der eigenen Studie geht man demnach davon aus, dass der Einfluss von Isofluran die Ursache für die eosinophilen Neurone in den beiden Sham- Gruppen und den Kontrolltieren ist.

Bekannt ist auch, dass herzchirurgische Eingriffe zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie z. B. IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF  $\alpha$  sowie Endotoxine führen und so eine systemische Inflammationsreaktion auslösen können (PINTAR und COLLARD, 2003). Diese systemischen Zytokine und Endotoxine können infolgedessen eine verstärkte Expression von u. a. COX-2 und iNOS in beispielsweise der zerebralen Vaskulatur oder den benachbarten perivaskulären Mikrogliazellen zur Folge haben (HINDMAN et al., 2001). Inwieweit diese systemische Entzündungsreaktion zu einer zerebralen Inflammation führt, wird noch diskutiert. So konnten beispielsweise HINDMAN et al. (2001) einen Zusammenhang zwischen systemischem IL-6 und zerebral exprimierter COX-2 mRNA herstellen. Ob eine vermehrte COX-2 mRNA- Expression auch zu einer vermehrten Synthese von COX-2 Protein und damit den eigentlichen Effektoren im Entzündungsgeschehen führt, ist in dieser Studie nicht näher untersucht worden.

Aus Voruntersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe (KELLERMANN et al., 2007) ist bekannt, dass in dem angewandten Modell die systemischen Zytokine wie TNF  $\alpha$  bereits 24

Stunden nach einem DHCA unter der Nachweisgrenze liegen. Auch andere Studien haben einen Höhepunkt der systemischen Inflammation zwischen zwei (KHABAR et al., 1997) und sechs Stunden (NANDATE et al., 1999) nach EKZ gezeigt. Die eigenen Ergebnisse passen zu vorhergehenden Studien, in denen die zerebrale Inflammation nach EKZ mit DHCA über einen Zeitraum von 28 Tagen untersucht wurde. Hier war sogar noch 28 Tage nach EKZ mit 45 min DHCA zerebral exprimiertes NFκB nachweisbar (KELLERMANN et al., in Vorbereitung). Andere Studien haben eine Hochregulation von sowohl NFκB, als auch COX-2 von bis zu sieben Tagen nach intrazerebraler Blutung im Gehirn beschrieben (ZHAO et al., 2007). In einer weiteren Studie über Entzündungsparameter nach Koronararterien- Bypass-Operation konnte in der zerebrospinalen Flüssigkeit ein Konzentrationsmaximum des Zytokins IL-8 am siebten postoperativen Tag festgestellt werden. Nach dem chirurgischen Eingriff wurden jedoch innerhalb von sechs Monaten wieder basale Ausgangswerte erreicht (KALMAN et al., 2006). LAMBERTSEN et al. (2005) konnten noch zehn Tage nach einer fokalen zerebralen Ischämie in der Maus TNF  $\alpha$ - mRNA im Gehirn nachweisen.

In der vorliegenden Studie geht man davon aus, dass die an Tag 14 immer noch sichtbare Hochregulation von zerebral exprimiertem NFκB nicht in direktem Zusammenhang mit der systemischen Reaktion auf die EKZ bzw. DHCA steht. Man folgert daraus, dass die EKZ mit 45 min DHCA zu einer mindestens 14 Tage anhaltenden, robusten Hochregulierung der zerebralen NFκB- Expression führt, unabhängig von einer systemischen Entzündungsreaktion, wie schon eine Langzeitstudie über 21 Tage gezeigt hat, bei der die Tiere allerdings 75 min normothermer EKZ ohne DHCA ausgesetzt waren (JUNGWIRTH et al., 2009).

NFκB als nukleärer Transkriptionsfaktor spielt eine Schlüsselrolle im zerebralen Entzündungsgeschehen. Dieser Faktor wird während einer zerebralen Ischämie u. a. über TNF  $\alpha$  (HERRMANN et al., 2005) hochreguliert und ist für die Expression proinflammatorischer Parameter, wie z. B. COX-2 oder iNOS verantwortlich (NEWTON et al., 1997; ZHAO et al., 2007).

Die Funktion von NFκB wird in verschiedenen Studien allerdings bisweilen kontrovers diskutiert. Wichtig scheinen dabei die Art sowie die Dauer der Schädigung zu sein. Neben schädigenden Wirkungen übernimmt NFκB v. a. bei der sog. „Präkonditionierung“ auch anti-apoptotische Funktionen (BLONDEAU et al., 2001). Untersuchungen an Ratten haben dabei den Hinweis erbracht, dass eine nur dreiminütige subletale Ischämie des Gehirns zu einer Aktivierung von NFκB in Neuronen des Hippokampus führt, während dabei die anti-apoptotische Rolle überwiegt. Schließt sich im Folgenden eine zweite, gravierende, letale

Ischämie an, kommt es unerwartet zu einer Hemmung von NFκB im Gehirn. Diese Resistenz des Gehirns gegen potentielle letale ischämische Prozesse bezeichnet man auch als „Gehirntoleranz“ (BLONDEAU et al., 2001; RIDDER und SCHWANINGER, 2009). Während einer lang andauernden zerebralen Ischämie, wie sie typischerweise während EKZ mit DHCA auftritt, scheint dagegen die schädigende Rolle von NFκB zu überwiegen (RIDDER und SCHWANINGER, 2009). Die eigene Studie stützt diese Vermutung, denn in beiden DHCA- Gruppen wird deutlich mehr zerebrales NFκB exprimiert, bedingt durch die lang andauernde Ischämie während des Kreislaufstillstands.

Die Menge an physiologisch exprimiertem, zerebralem NFκB ist vom jeweiligen Entwicklungsstand der Tiere und der synaptischen Aktivität abhängig, so dass hier auch das Alter der Tiere bezüglich einer physiologischen NFκB- Expression eine Rolle spielt. KALTSCHMIDT et al. (1995) konnten feststellen, dass die Werte im Zerebellum bei Ratten bis zum postnatalen Tag fünf ansteigen, in den weiteren zwei Lebensstagen jedoch wieder stark abfallen. Eine weitere Studie an 1-, 6- und 24- Monate alten Mäusen lieferte jedoch die Erkenntnis, dass die zerebrale NFκB- Aktivität mit steigendem Alter der Tiere zunimmt (YE und JOHNSON, 2001). Dies könnte erklären, weshalb in der vorliegenden Studie sowohl die Sham-, als auch die Kontrolltiere geringfügig NFκB- positive Neurone aufweisen. Eine weitere Ursache für das Vorhandensein von zerebralem NFκB in den Sham- sowie der Kontroll- Gruppe könnte auch hier die kurze Isoflurannarkose vor dem Entbluten der Tiere sein.

Neben der Art und Dauer der ischämischen Schädigung scheint auch die Kombination der fünf Untereinheiten bei der Aktivierung von NFκB (p50, p52, p65, cRel, RelB) für seine Rolle im Entzündungsgeschehen -pro- oder anti- apoptotisch-, wichtig zu sein (PIZZI et al., 2009). Während die beiden Domänen p50 und p52 als isolierte Formen inhibitorisch auf die NFκB- Transkription wirken, erfolgt nach Bildung eines Dimers mit einer der Untereinheiten p65, cRel oder RelB eine Aktivierung. In Zusammenhang mit zerebraler Ischämie weiß man, dass v. a. der heterogene Komplex p50/p65 maßgeblich an der Induktion pro- apoptotischer Faktoren beteiligt ist (SARNICO et al., 2009). Eine Studie an p50- defizienten Knockout-Mäusen, in der eine permanente MCAO durchgeführt wurde, hat gezeigt, dass sich das Ausmaß zerebraler Infarkte bei den p50- defizienten Tieren um 41 % verringert (NURMI et al., 2004). Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass die schädigenden Eigenschaften von NFκB in der vorliegenden Studie überwiegen.

Weiter zur Diskussion stellen muss man auch den bekannten und viel untersuchten neuroprotektiven Effekt der Hypothermie (COOK, 2001) auf den zerebralen Schaden. So haben YENARI und HAN (2006) eine Verringerung der Infarktgröße nach einer zwei-stündigen MCAO bei einer Gehirntemperatur von 33 °C feststellen können, der sie eine Hemmung der NFκB- Aktivität zugrunde legen. Im eigenen Modell wird der Kreislaufstillstand und damit die Ischämie bei 15 bis 18 °C Körpertemperatur durchgeführt, was einen Vergleich der Ergebnisse schwierig macht. Entsprechend kann man die Frage, inwieweit die profunde Hypothermie in der vorliegenden Studie eine durch die Inflammationsprozesse verursachte NFκB- Aktivierung reduzieren kann, mit dieser Studie nicht entgültig beantworten.

In die eigene Bewertung des geweblichen Schadens geht auch die Anzahl und Ausdehnung zerebraler Infarkte mit ein. JUNGWIRTH et al. (2007) zeigen anhand eines Rattenmodells einen Zusammenhang zwischen Luftembolien während einer EKZ und ausgeprägten Hirninfarkten am siebten postoperativen Tag. Dabei besteht eine Korrelation zwischen dem Volumen eines Luftembolus und dem zerebralen Infarktvolumen (JUNGWIRTH et al., 2007). Ob die Hirninfarkte in beiden DHCA- Gruppen der eigenen Studie durch Luftembolien ausgelöst werden, lässt sich nur spekulieren. Aus klinischen Studien weiß man, dass neben Luft v. a. aus stenosierten Karotiden abgeschwemmte Thrombozytenaggregate sowie Gewebe- und Zelltrümmer aus dem Operationsgebiet zu Embolien im Gehirn führen können (BARNETT et al., 2000). Da im eigenen Modell keine Eröffnung des Brustkorbes oder Manipulation des Herzens respektive der Karotiden erfolgt, und im Vergleich zur Human-Klinik mit meist älteren und multipel erkrankten Patienten in der vorliegenden Studie junge gesunde Tiere verwendet wurden, scheint Luft als mögliche operationsbedingte Komplikation als Ursache für die Embolien am wahrscheinlichsten.

Ein anderer Faktor für die Infarktentwicklung ist aber auch der Effekt der Hämodilution. Denn eine Studie an Ratten mit MCAO und hypothermer EKZ lieferte die Erkenntnis, dass im Vergleich zu Kontrolltieren (Hb- Konzentration 11 g/dl) eine exzessiv durchgeführte Hämodilution (Hb- Konzentration 6 g/dl) mit einer Vergrößerung des zerebralen Infarktvolumens in Verbindung steht (HOMI et al., 2004). Da die Tiere in der eigenen Studie aber zu keiner Zeit Hämoglobinkonzentrationen unter 7,5 g/dl aufwiesen, ist die Hämodilution als Ursache für die Entstehung von Infarkten auszuschließen (siehe Physiologietabelle, S. 79). In beiden Sham- Gruppen, die weder einer EKZ noch einem DHCA unterzogen wurden, konnten wie

erwartet keinerlei Hirninfarkte detektiert werden. Erwartungsgemäß zeigt auch die vollkommen unbehandelte Kontrollgruppe keine Infarkte.

Die histologischen Ergebnisse zeigen insgesamt, dass ein Unterschied zwischen den DHCA- und den Sham- Gruppen besteht, was den histologischen Zellschaden angeht. Der Einfluss einer perioperativen Gabe von MXF auf den zerebralen Schaden kann dabei nicht bestätigt werden. In Voruntersuchungen (STÜCKLE, Medizinische Dissertation in Vorbereitung) hatte sich gezeigt, dass eine perioperative Gabe von MXF 24 Stunden nach einer EKZ mit DHCA zu einer verminderten Expression neuronaler NFκB- und COX-2- Proteine im Hippokampus führt.

Man hat bereits experimentell und klinisch nachgewiesen, dass sich MXF als Vertreter aus der Gruppe der Fluorchinolone günstig nach akuten Schlaganfällen auswirkt, indem es posttraumatische Infektionen reduziert, die Mortalitätsrate verringert und die neurologische Funktion bei Maus (MEISEL et al., 2004) und Mensch (HARMS et al., 2008) verbessert.

MXF weist antimikrobielle Fähigkeiten (BOSWELL et al., 1999), intrazelluläre Aktivität (PASCUAL et al., 1999), sowie immunmodulatorische Effekte auf (SHALIT et al., 2001; SHALIT et al., 2002; SHALIT et al., 2006). Während einer EKZ werden bakterielle Endotoxine aufgrund der Hypoperfusion und Vasokonstriktion der Darmmukosa in die Blutbahn freigesetzt und können somit eine systemische Inflammation bedingen (DOHERTY et al., 1989). HINDMAN et al. (2001) wiederum konnten einen Zusammenhang zwischen systemisch exprimiertem IL-6 und zerebral exprimierter COX-2 mRNA herstellen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die während und nach einer EKZ auftretende systemische Inflammation die zerebrale Entzündungsreaktion beeinflusst. Deshalb liegt die Idee nahe, dass die Gabe von MXF als Antiinfektivum eine inflammatorische Reaktion systemisch und zerebral reduzieren kann. MEISEL et al. (2004) konnten diese Vermutung in einem Schlaganfallmodell (MCAO) in der Maus bestätigen. Dabei zeigte sich eine signifikante Verringerung der zerebralen Infarktgröße in den mit MXF behandelten Tieren (MEISEL et al., 2004). Allerdings ist in dem vorliegenden Modell eine systemische Inflammation bereits 24 Stunden nach DHCA nicht mehr nachweisbar (STÜCKLE, Medizinische Dissertation in Vorbereitung). Man geht deshalb davon aus, dass in der eigenen Studie die immunmodulatorischen Eigenschaften des MXF überwiegen. Es gibt aber auch einige Spekulationen darüber, inwiefern MXF die Expression von z. B. NFκB in den Neuronen, als auch die Aktivierung proinflammatorischer Zytokine immunmodulatorisch beeinflussen kann. Es hat sich gezeigt, dass MXF in der Lage ist, die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen im

Lungengewebe von *Candida albicans*- infizierten Mäusen zu verhindern. Da *Candida albicans* außerhalb des antiinfektiven Wirkspektrums von MXF liegt, beruht die Wirkung von MXF in dieser Studie rein auf immunmodulatorischen Eigenschaften (SHALIT et al., 2002). Eine in vitro- Studie lieferte den Beweis, dass MXF die Sekretion von Nitritoxid (NO) in humanen Alveolarepithelzellen, die zuvor mit den Zytokinen IL-1 $\beta$  und Interferon- $\gamma$  stimuliert wurden, signifikant hemmt. Zudem besitzt MXF die Fähigkeit, die IL-1 $\beta$ - induzierte Translokation von NF $\kappa$ B und dessen DNA- Bindungsaktivität zu inhibieren (WERBER et al., 2005). Bei den Studien von SHALIT et al. (2002) und WERBER et al. (2005) ist aber zu berücksichtigen, dass die Tiere bzw. humane Zellkulturen mit MXF vorbehandelt wurden, bevor eine Stimulation mit Zytokinen vorgenommen worden ist. Da sich zwischen den Behandlungsgruppen der eigenen Studie kein MXF- Effekt feststellen lässt, vermutet man, dass u. U. eine vor dem eigentlichen Trauma durchgeführte MXF- Applikation zu einer Verringerung bzw. Verhinderung des histologischen Schadens führen könnte. Die Fragestellung, auf welche Art MXF ins Gehirn gelangt, um dort seine Wirkung zu entfalten, bleibt ebenfalls spekulativ.

Man weiß, dass es während EKZ mit DHCA zu einer Störung der Blut- Hirn- Schranke kommt (ABDUL-KHALIQ et al., 2000; CAVAGLIA et al., 2004) und eine Exposition mit inflammatorischen Zytokinen, Leukozytenaktivierung oder Ischämieprozesse zu einer Dysfunktion der Blut- Hirn- Schranke führen (MOODY, 2006). SIEFERT et al. (1999) konnten in einer Studie an gesunden Ratten mit einer intakten Blut- Hirn- Schranke bestätigen, dass sich nach einer oralen oder intravenösen Applikation von MXF nur sehr geringe Konzentrationen an MXF im Gehirn nachweisen lassen. Beim gesunden Menschen konnte nach einer oralen MXF- Gabe allerdings eine gute Penetration von MXF über die Blut- Hirn- Schranke beobachtet werden, die zu einer adäquat hohen Konzentration in der zerebrospinalen Flüssigkeit innerhalb von zwei bis sechs Stunden mit einer ausreichend bakteriziden Wirkung führte (KANELLAKOPOULOU et al., 2008). Insgesamt existieren kontroverse Meinungen zur Schädigung der Blut- Hirn- Schranke nach alleiniger EKZ oder nach EKZ mit DHCA. In diesem Zusammenhang wurden überwiegend Studien an Großtieren durchgeführt. Eine Schädigung der Blut- Hirn- Schranke konnte dabei aber nach zwei- stündiger moderater hypothermer EKZ bei neugeborenen Schweinen nicht belegt werden (GILLINOV et al., 1992). Im Gegensatz dazu zeigten CAVAGLIA und Kollegen (2004) eine allgemeine Dysfunktion der Blut- Hirn- Schranke von Lämmern nach 15 bis 120-minütiger normothermer EKZ. Während die Permeabilität der Blut- Hirn- Schranke dabei mit steigender Dauer der EKZ zunahm, erhöhte sich in den endothelialen Zellen der Blut- Hirn- Schranke,

im Chorioideplexus und im Ependym zusätzlich die Anzahl sog. „FOS“- Proteine. Diese Proteine werden über physiologische und pathologische Faktoren induziert und gelten bereits vor dem eigentlichen Zelltod als Marker für eine neuronale Schädigung (MA et al., 2002). Tiere, die dagegen einem zweistündigen DHCA unterzogen wurden, wiesen dementsprechend eine gravierendere Schädigung der Blut- Hirn- Schranke auf. Zudem waren alle Bereiche des Gehirns betroffen. Nach dem DHCA waren zusätzlich signifikant hohe Mengen an „FOS“- Proteinen nicht nur in den endothelialen Zellen, sondern auch in Neuronen nachweisbar. Innerhalb von drei bis vier Stunden nach dem Ende der EKZ konnte dabei die Schädigung der Blut- Hirn- Schranke beobachtet werden (CAVAGLIA et al., 2004).

Die Untersuchung des MXF- Gehalts direkt im Zielorgan Gehirn hat in der vorangegangenen Studie gezeigt, dass MXF in der DHCA- Gruppe 20 Stunden nach der letzten Applikation noch nachweisbar ist (STÜCKLE, Medizinische Dissertation in Vorbereitung).

Man nimmt daher an, dass MXF durch die im Rahmen der EKZ mit DHCA geschädigte Blut- Hirn- Schranke direkt in das Gehirn gelangt. Eine zweite Möglichkeit ist der intrazelluläre Transport von MXF durch Aufnahme in Granulozyten, Lymphozyten oder Monozyten, die die Substanz dann intrazellulär an den Ort des entzündlichen Geschehens weitertransportieren und dort anhäufen (PASCUAL et al., 1999; MANDELL und COLEMAN, 2001). Welcher Mechanismus nun ausschlaggebend dafür verantwortlich ist bzw. ob eine Kombination dieser Mechanismen stattfindet, bleibt für diese Studie spekulativ.

#### 4.3 Abschließende Betrachtung und Ausblick

Zusammenfassend beschreibt diese Studie erstmals den Einfluss einer perioperativen Gabe von Moxifloxazin nach EKZ mit DHCA auf die neurologische und kognitive Funktion, sowie den histologischen Schaden über einen Beobachtungszeitraum von 14 Tagen an der Ratte. Verschiedene Testsysteme konnten die neurologische Funktion abbilden und mit dem modifizierten Zylinder- Hole- Board- Test (ZHBT) wurde die kognitive Leistungsfähigkeit ermittelt. Die Auswertung der Daten zeigt ausgeprägte neurologische und kognitive Defizite in beiden DHCA- Gruppen. Die Ergebnisse der abschließenden histologischen Untersuchung der Gehirne entsprechen dabei den klinisch erhobenen Daten. Die DHCA- bedingten neuronalen Schädigungen sind auch 14 Tage nach EKZ mit DHCA deutlich nachweisbar. Entgegen den eigenen Erwartungen zeigt sich aber insgesamt kein ausgeprägter neuro- protektiver Effekt durch MXF. Die perioperative MXF- Gabe hat in keiner der Gruppen

Einfluss auf die Entstehung motorischer und kognitiver Defizite sowie auf die Ausprägung des histologischen Schadens. Allerdings zeigt MXF auch keine negativen Auswirkungen auf die drei Parameter.

Es ist deshalb u. a. zu vermuten, dass zum einen die Applikationsdauer von Moxifloxazin bei solch einem globalen Schaden insgesamt zu kurz gewesen sein könnte und somit keine ausreichende Wirkung erzielt wurde. Zum anderen spielt, neben der Dauer der Applikation, mit Sicherheit auch der Zeitpunkt des Beginns der MXF- Gabe eine wichtige Rolle.

Die Frage aber, wie und in welchem Ausmaß eine prä- oder deutlich postoperative begonnene MXF- Gabe Einfluss auf die Ausprägung postoperativer neurokognitiver Defizite nehmen könnte, bleibt das Ziel weiterführender Untersuchungen.



## 5 Zusammenfassung

### **„Beeinflusst die perioperative Gabe von Moxifloxazin die zerebrale inflammatorische Reaktion und das neurokognitive Outcome 14 Tage nach extrakorporaler Zirkulation mit tief- hypothermem Kreislaufstillstand bei der Ratte ?“**

Die hier vorliegende Studie soll den Einfluss der perioperativen Gabe von Moxifloxazin (MXF) auf das neurokognitive Outcome und den histologischen Schaden 14 Tage nach extrakorporaler Zirkulation (EKZ) mit 45 min tief- hypothermem Kreislaufstillstand (DHCA) bei der Ratte untersuchen.

50 männliche Sprague- Dawley Ratten (330 - 400 g) wurden randomisiert drei Gruppen zugeteilt: Kontrolle (n=10), Sham und DHCA (je n=20). Die Sham- und DHCA- Tiere wurden weiter unterteilt in MXF und Plazebo behandelte Gruppen (n=10). Die Tiere erhielten intraperitoneal mit Beginn der Anästhesie alle zwei Stunden 6 x 100 mg/kg MXF bzw. dasselbe Volumen physiologische Kochsalzlösung. Tiere der DHCA- Gruppen wurden intubiert, mit Isofluran (2,0 – 2,5 Vol % in 40 % O<sub>2</sub>) anästhesiert, katheterisiert, an die EKZ angeschlossen und über 30 min auf 15 – 18 °C rektale Körpertemperatur abgekühlt. Nach 45 min DHCA wurden die Tiere innerhalb von 40 min an der EKZ auf 35,5 °C rektale Körpertemperatur wiedererwärmt. Tiere der Sham- Gruppen wurden analog anästhesiert, kanüliert, jedoch weder an die EKZ angeschlossen noch einem DHCA unterzogen. Die Tiere der Kontroll- Gruppen wurden weder anästhesiert noch katheterisiert.

Alle Tiere wurden präoperativ an den Tagen -2 und -1, sowie postoperativ an den Tagen 1, 2, 3 und 14 neurologisch- motorisch getestet. Die Untersuchung der neurokognitiven Funktion mit dem modifizierten Zylinder- Hole- Board- Test (ZHBT) fand täglich vom vierten bis einschließlich 13. postoperativen Tag statt. Am 14. postoperativen Tag wurden die Ratten dann in tiefer Isoflurannarkose entblutet, die Gehirne in toto entnommen, tiefgefroren (-80 °C) und histologisch untersucht. Dazu wurde eine Hämatoxylin- Eosin- Färbung, sowie eine immun- histochemische Markierung Nukleärer Faktor kappa B (NFκB) positiver Neurone angefertigt, um anhand der Menge eosinophiler Zellen sowie NFκB- positiver Neurone und der Anzahl sowie Ausdehnung der Hirninfarkte das Ausmaß des histologischen Schadens zu ermitteln.

Die Ergebnisse zeigen im Vergleich zu den präoperativen Ausgangswerten und den Sham- Gruppen postoperativ neurologisch- motorische Beeinträchtigungen der Tiere der beiden DHCA- Gruppen. Zudem zeigen beide DHCA- Gruppen deutliche postoperative neurokog-

nitiv Defizite im Vergleich zu den Sham- Tieren und der Kontroll- Gruppe. Der histologische Schaden ist ebenfalls in den DHCA- Gruppen am deutlichsten ausgeprägt. Dabei gibt es jedoch keinen Unterschied zwischen den mit Moxifloxazin- oder Plazebo- behandelten Tieren.

Die perioperative Applikation von Moxifloxazin zeigt demnach keine positive Wirkung auf das neurokognitive Ergebnis 14 Tage nach EKZ mit 45 min DHCA an der Ratte. Um die Frage zu beantworten, ob eine Verlängerung der Applikationsdauer oder ein anderer Applikationszeitpunkt das postoperative Ergebnis verändern könnte, bedarf es weiterführender Untersuchungen.

## 6 Summary

### **„Does the perioperative application of Moxifloxacin influence the cerebral inflammatory reaction and the neurocognitive outcome 14 days after cardiopulmonary bypass with deep hypothermic circulatory arrest in the rat ?“**

The present study investigates the influence of a perioperative application of Moxifloxacin (MXF) on the neurocognitive outcome and the histological damage 14 days after cardiopulmonary bypass (CPB) with 45 min deep hypothermic circulatory arrest (DHCA) in the rat.

50 male Sprague- Dawley rats (330 – 400 g) were randomly assigned to one of three groups: Control (n=10), Sham and DHCA (each n=20). Sham- and DHCA- animals were further subdivided into MXF and Placebo treated groups (n=10). Starting from the onset of anaesthesia the animals received every two hours intraperitoneal 6 x 100 mg/kg MXF or the same volume physiological solution of sodium chloride. Animals of the DHCA- groups were intubated, anaesthetized with Isoflurane (2,0 – 2,5 Vol % in 40 % O<sub>2</sub>), catheterized, connected to the CPB and cooled over 30 min to 15 – 18 °C rectal body temperature. After 45 min DHCA the animals were reconnected to CPB and rewarmed within 40 min to 35,5 °C rectal body temperature. Animals of the Sham- groups were anaesthetized and cannulated analogously, but were neither connected to the CPB nor submitted to DHCA. The animals of the Control- groups were neither anaesthetised nor catheterised. All animals were tested in the neurological- motor function preoperatively on days -2 and -1, as well as postoperatively on days one, two, three and 14. The neurocognitive function was assessed daily from the fourth to the 13<sup>th</sup> day via the modified “Cylinder- Hole- Board- Test” (CHBT). On the 14<sup>th</sup> postoperative day the rats were sacrificed during deep Isoflurane- anaesthesia, their brains removed and deep frozen (-80 °C) for further analyses. A Hematoxylin- Eosin- and an immunohistochemical double staining for nuclear factor kappa B (NFκB) were performed to determine the magnitude of the overall histological damage, based on the amount of eosinophilic as well as NFκB- positive neurons as well as the number and size of brain infarcts.

The results showed a neurologic impairment in both DHCA- groups in comparison to the preoperative values and to the Sham- groups. In addition both DHCA- groups show distinct

postoperative neurocognitive deficits in comparison to the Sham- animals and the Control-group. The histological damage is also more pronounced in the DHCA- animals. However, there is no significant difference between Moxifloxacin- or Placebo- treated animals. The perioperative application of Moxifloxacin has no positive impact on the neurocognitive outcome 14 days after CPB with 45 min DHCA in the rat. To answer the question whether a lengthening of the application duration or a different application time could affect the postoperative results, further investigations are required.

## 7 Literaturverzeichnis

ABDUL-KHALIQ H, SCHUBERT S, STOLTENBURG-DIDINGER G, TROITZSCH D, BOTTCHER W, HUBLER M, MEISSLER M, GROSSE-SIESTROP C, ALEXI-MESKISHVILI V, HETZER R, LANGE PE

Protein S-100beta in brain and serum after deep hypothermic circulatory arrest in rabbits: relationship to perivascular astrocytic swelling

Clin Chem Lab Med 2000; 38:1169-72

AOKI M, NOMURA F, STROMSKI ME, TSUJI MK, FACKLER JC, HICKEY PR, HOLTZMAN DH, JONAS RA

Effects of pH on brain energetics after hypothermic circulatory arrest

Ann Thorac Surg 1993; 55:1093-103

ARAUJO FG, SLIFER TL, REMINGTON JS

Effect of moxifloxacin on secretion of cytokines by human monocytes stimulated with lipopolysaccharide

Clin Microbiol Infect 2002; 8:26-30

ARROWSMITH JE, GROCOTT HP, REVES JG, NEWMAN MF

Central nervous system complications of cardiac surgery

Br J Anaesth 2000; 84:378-93

ASHRAF S, BHATTACHARYA K, TIAN Y, WATTERSON K

Cytokine and S100B levels in paediatric patients undergoing corrective cardiac surgery with or without total circulatory arrest

Eur J Cardiothorac Surg 1999; 16:32-7

ASTRUP J, SYMON L, BRANSTON NM, LASSEN NA

Cortical evoked potential and extracellular K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> at critical levels of brain ischemia

Stroke 1977; 8:51-7

ATKINSON R, SHIFFRIN R

Human memory: a proposed system and its control processes, *In*: Spence KW (Hrsg.) The psychology of learning and motivation: advances in research and theory

Academic Press, New York, 1968:89-195

BADDELEY A

The fractionation of working memory

Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93:13468-72

BADDELEY A

Working memory

C R Acad Sci III 1998; 321:167-73

BADDELEY A

The episodic buffer: a new component of working memory?

Trends Cogn Sci 2000; 4:417-23

BADDELEY A, BUENO O, CAHILL L, FUSTER JM, IZQUIERDO I, MCGAUGH JL, MORRIS RG, NADEL L, ROTTENBERG A, XAVIER G, DA CUNHA C  
The brain decade in debate: I. Neurobiology of learning and memory  
Braz J Med Biol Res 2000; 33:993-1002

BADDELEY A, HITCH G  
Working memory, In: Bower GA (Hrsg.) Recent advances in learning and motivation  
Academic Press, New York 1974; 8:47-90

BAEUERLE PA, BAICHWAL VR  
NF-kappa B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules  
Adv Immunol 1997; 65:111-37

BAEUERLE PA, BALTIMORE D  
NF-kappa B: ten years after  
Cell 1996; 87:13-20

BAEUERLE PA, HENKEL T  
Function and activation of NF-kappa B in the immune system  
Annu Rev Immunol 1994; 12:141-79

BARNETT HJ, GUNTON RW, ELIASZIW M, FLEMING L, SHARPE B, GATES P, MELDRUM H  
Causes and severity of ischemic stroke in patients with internal carotid artery stenosis  
JAMA 2000; 283:1429-36

BAUD V, KARIN M  
Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives  
Trends Cell Biol 2001; 11:372-7

BAUERNFEIND A  
Comparison of the antimicrobial activities of the quinolones Bay 12-8039, gatifloxacin (AM 1155), trovafloxacin, clinafloxacin, levofloxacin and ciprofloxacin  
J Antimicrob Chemother 1997; 40:637-51

BELLINGER DC, JONAS RA, RAPPAPORT LA, WYPIJ D, WERNOVSKY G, KUBAN KC, BARNES PD, HOLMES GL, HICKEY PR, STRAND RD, WALSH AZ, HELMERS SL, CONSTANTINOU JE, CARRAZANA EJ, MAYER JE, HANLEY FL, CASTANEDA AR, WARE JH, NEWBURGER JW  
Developmental and neurologic status of children after heart surgery with hypothermic circulatory arrest or low-flow cardiopulmonary bypass  
N Engl J Med 1995; 332:549-55

BELLINGER DC, WERNOVSKY G, RAPPAPORT LA, MAYER JE, JR., CASTANEDA AR, FARRELL DM, WESSEL DL, LANG P, HICKEY PR, JONAS RA, NEWBURGER JW  
Cognitive development of children following early repair of transposition of the great arteries using deep hypothermic circulatory arrest  
Pediatrics 1991; 87:701-7

BELLINGER DC, WYPIJ D, KUBAN KC, RAPPAPORT LA, HICKEY PR, WERNOVSKY G, JONAS RA, NEWBURGER JW

Developmental and neurological status of children at 4 years of age after heart surgery with hypothermic circulatory arrest or low-flow cardiopulmonary bypass  
Circulation 1999; 100:526-32

BENDTZEN K

Interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity  
Immunol Lett 1988; 19:183-91

BENDTZEN K

Immune hormones (cytokines); pathogenic role in autoimmune rheumatic and endocrine diseases  
Autoimmunity 1989; 2:177-89

BEUZEN A, BELZUNG C

Link between emotional memory and anxiety states: a study by principal component analysis  
Physiol Behav 1995; 58:111-8

BISSONNETTE B, HOLTBY HM, DAVIS AJ, PUA H, GILDER FJ, BLACK M

Cerebral hyperthermia in children after cardiopulmonary bypass  
Anesthesiology 2000; 93:611-8

BLONDEAU N, WIDMANN C, LAZDUNSKI M, HEURTEAUX C

Activation of the nuclear factor-kappaB is a key event in brain tolerance  
J Neurosci 2001; 21:4668-77

BOISSIER JR, SIMON P

Dissociation de deux composantes dans le comportement d'investigation de la souris  
Arch Int Pharmacodyn 1964; 147:372-87

BORGER MA, PENISTON CM, WEISEL RD, VASILIOU M, GREEN RE, FEINDEL CM

Neuropsychologic impairment after coronary bypass surgery: effect of gaseous microemboli during perfusionist interventions  
J Thorac Cardiovasc Surg 2001; 121:743-9

BOSWELL FJ, ANDREWS JM, WISE R, DALHOFF A

Bactericidal properties of moxifloxacin and post-antibiotic effect  
J Antimicrob Chemother 1999; 43 Suppl B:43-9

BOTTIGER BW, SCHMITZ B, WIESSNER C, VOGEL P, HOSSMANN KA

Neuronal stress response and neuronal cell damage after cardiocirculatory arrest in rats  
J Cereb Blood Flow Metab 1998; 18:1077-87

BOUNDS SJ, NAKKULA R, WALTERS JD

Fluoroquinolone transport by human monocytes: characterization and comparison to other cells of myeloid lineage  
Antimicrob Agents Chemother 2000; 44:2609-14

BOWIE A, O'NEILL LA

Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries  
Biochem Pharmacol 2000; 59:13-23

BOZOKY B, BARA D, KERTESZ E

Autopsy study of cerebral complications of congenital heart disease and cardiac surgery  
J Neurol 1984; 231:153-61

BREDER CD, TSUJIMOTO M, TERANO Y, SCOTT DW, SAPER CB  
Distribution and characterization of tumor necrosis factor-alpha-like immunoreactivity in the murine central nervous system  
J Comp Neurol 1993; 337:543-67

BRIX-CHRISTENSEN V  
The systemic inflammatory response after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass in children  
Acta Anaesthesiol Scand 2001; 45:671-9

BROCKHAUS-ENZYKLOPÄDIE  
In: Brockhaus-Enzyklopädie, Band 8, S.151  
Edition 20, Bibliographisches Institut & FA Brockhaus AG, Mannheim 1998

BROWN J  
Some tests of the decay theory of immediate memory  
Quart J Exp Psychol 1958; 10:12-21

BRUNBERG JA, REILLY EL, DOTY DB  
Central nervous system consequences in infants of cardiac surgery using deep hypothermia and circulatory arrest  
Circulation 1974; 50:II60-8

BUTLER J, ROCKER GM, WESTABY S  
Inflammatory response to cardiopulmonary bypass  
Ann Thorac Surg 1993; 55:552-9

CALABRESE P, MARKOWITSCH HJ  
[Memory and brain--neurobiological correlates of memory disturbances]  
Fortschr Neurol Psychiatr 2003; 71:211-9

CARROLL JE, HOWARD EF, HESS DC, WAKADE CG, CHEN Q, CHENG C  
Nuclear factor-kappa B activation during cerebral reperfusion: effect of attenuation with N-acetylcysteine treatment  
Brain Res Mol Brain Res 1998; 56:186-91

CAVAGLIA M, SESHADRI SG, MARCHAND JE, OCHOCKI CL, MEE RB, BOKESCH PM  
Increased transcription factor expression and permeability of the blood brain barrier associated with cardiopulmonary bypass in lambs  
Ann Thorac Surg 2004; 78:1418-25

CLEMENS JA, STEPHENSON DT, DIXON EP, SMALSTIG EB, MINCY RE, RASH KS, LITTLE SP  
Global cerebral ischemia activates nuclear factor-kappa B prior to evidence of DNA fragmentation  
Brain Res Mol Brain Res 1997; 48:187-96

CLEMENT Y, PROESCHEL MF, BONDOUX D, GIRARD F, LAUNAY JM, CHAPOUTHIER G



Genetic factors regulate processes related to anxiety in mice  
Brain Res 1997; 752:127-35

COMBS DJ, D'ALECY LG

Motor performance in rats exposed to severe forebrain ischemia: effect of fasting and 1,3-butenediol  
Stroke 1987; 18:503-11

COOK DJ

Cerebral hyperthermia and cardiac surgery: consequences and prevention  
Semin Thorac Cardiovasc Surg 2001; 13:176-83

CRABBE JC

Genetic differences in locomotor activation in mice  
Pharmacol Biochem Behav 1986; 25:289-92

CRUSIO WE, SCHWEGLER H

Learning spatial orientation tasks in the radial-maze and structural variation in the hippocampus in inbred mice  
Behav Brain Funct 2005; 1:1-11

DALHOFF A

Pharmacodynamics of fluoroquinolones  
J Antimicrob Chemother 1999; 43 Suppl B:51-9

DECKER MW

Animal models of cognitive function  
Crit Rev Neurobiol 1995; 9:321-43

DEGRABA TJ, OSTROW P, HANSON S, GROTTA JC

Motor performance, histologic damage, and calcium influx in rats treated with NBQX after focal ischemia  
J Cereb Blood Flow Metab 1994; 14:262-8

DEMERS P, ELKOURI S, MARTINEAU R, COUTURIER A, CARTIER R

Outcome with high blood lactate levels during cardiopulmonary bypass in adult cardiac operation  
Ann Thorac Surg 2000; 70:2082-6

DENNIS C, SPRENG DS, JR., NELSON GE, KARLSON KE, NELSON RM, THOMAS JV, EDER WP, VARCO RL

Development of a pump-oxygenator to replace the heart and lungs; an apparatus applicable to human patients, and application to one case  
Ann Surg 1951; 134:709-21

DERNEVIK L, ARVIDSSON S, WILLIAM-OLSSON G

Cerebral perfusion in dogs during pulsatile and non pulsatile extracorporeal circulation  
J Cardiovasc Surg (Torino) 1985; 26:32-5

DERTINGER N

Untersuchungen zur Neurologie und zerebralen Inflammation nach tief hypothermem Kreislaufstillstand der Ratte: Einfluss der Wiedererwärmungsgeschwindigkeit  
Vet Med Diss, München, 2007

DIELEMAN JM, DE LANGE F, HOUSTON RJ, BIESELS GJ, BAR PR, MACKENSEN GB, GROCOTT HP, KALKMAN CJ  
Cardiopulmonary bypass and long-term neurocognitive dysfunction in the rat  
Life Sci 2006; 79:551-8

DIETRICH WD, BUSTO R, ALONSO O, GLOBUS MY, GINSBERG MD  
Intraischemic but not postischemic brain hypothermia protects chronically following global forebrain ischemia in rats  
J Cereb Blood Flow Metab 1993; 13:541-9

DIXON CE, LYETH BG, POVLISHOCK JT, FINDLING RL, HAMM RJ, MARMAROU A, YOUNG HF, HAYES RL  
A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat  
J Neurosurg 1987; 67:110-9

DOHERTY DE, ZAGARELLA L, HENSON PM, WORTHEN GS  
Lipopolysaccharide stimulates monocyte adherence by effects on both the monocyte and the endothelial cell  
J Immunol 1989; 143:3673-9

DRABEK T, FISK JA, DIXON CE, GARMAN RH, STEZOSKI J, WISNEWSKI SR, WU X, TISHERMAN SA, KOCHANNEK PM  
Prolonged deep hypothermic circulatory arrest in rats can be achieved without cognitive deficits  
Life Sci 2007; 81:543-52

DU PLESSIS AJ  
Pediatric cardiovascular intensive care: neurologic problems  
Prog Pediatr Cardiol 1995; 4:135-41

DU PLESSIS AJ  
Cerebral hemodynamics and metabolism during infant cardiac surgery. Mechanisms of injury and strategies for protection  
J Child Neurol 1997; 12:285-300

DUVAL EL, KAVELAARS A, VEENHUIZEN L, VAN VUGHT AJ, VAN DE WAL HJ, HEIJNEN CJ  
Pro- and anti-inflammatory cytokine patterns during and after cardiac surgery in young children  
Eur J Pediatr 1999; 158:387-93

EHYAI A, FENICHEL GM, BENDER HW, JR.  
Incidence and prognosis of seizures in infants after cardiac surgery with profound hypothermia and circulatory arrest  
JAMA 1984; 252:3165-7

EICHENBAUM H  
How does the hippocampus contribute to memory?  
Trends Cogn Sci 2003; 7:427-9

EICHENBAUM H, MATHEWS P, COHEN NJ  
Further studies of hippocampal representation during odor discrimination learning

Behav Neurosci 1989; 103:1207-16

FEENEY DM, GONZALEZ A, LAW WA

Amphetamine, haloperidol, and experience interact to affect rate of recovery after motor cortex injury

Science 1982; 217:855-7

FEERICK AE, JOHNSTON WE, JENKINS LW, LIN CY, MACKAY JH, PROUGH DS

Hyperglycemia during hypothermic canine cardiopulmonary bypass increases cerebral lactate

Anesthesiology 1995; 82:512-20

FERRY PC

Neurologic sequelae of open-heart surgery in children. An 'irritating question'

Am J Dis Child 1990; 144:369-73

FILE SE

Effects of chlorpromazine on exploration and habituation in the rat

Br J Pharmacol 1973; 49:303-10

FILE SE, POPE JH

The action of chlorpromazine on exploration in pairs of rats

Psychopharmacologia 1974; 37:249-54

FILE SE, WARDILL AG

The reliability of the hole-board apparatus

Psychopharmacologia 1975; 44:47-51

FORSCHUNGSWERKSTATT MOXIFLOXACIN

2005, Abfrage am 11.08.2009

FORTH W, HENSCHLER D, RUMMEL W

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie

9. Auflage, Urban und Fischer, München, Jena, 2004; 831-7

FOX LS, BLACKSTONE EH, KIRKLIN JW, STEWART RW, SAMUELSON PN

Relationship of whole body oxygen consumption to perfusion flow rate during hypothermic cardiopulmonary bypass

J Thorac Cardiovasc Surg 1982; 83:239-48

FUJIMOTO ST, LONGHI L, SAATMAN KE, CONTE V, STOCCHETTI N, MCINTOSH TK

Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury

Neurosci Biobehav Rev 2004; 28:365-78

GAO L, TAHA R, GAUVIN D, OTHMEN LB, WANG Y, BLAISE G

Postoperative cognitive dysfunction after cardiac surgery

Chest 2005; 128:3664-70

GERMANO AF, DIXON CE, D'AVELLA D, HAYES RL, TOMASELLO F

Behavioral deficits following experimental subarachnoid hemorrhage in the rat

J Neurotrauma 1994; 11:345-53

GIBBON JH, JR

Artificial maintenance of circulation during experimental occlusion of pulmonary artery  
Arch Surg 1937; 34:1105-31

GIBBON JH, JR

Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery  
Minn Med 1954; 37:171-85

GILLINOV AM, DAVIS EA, CURTIS WE, SCHLEIEN CL, KOEHLER RC, GARDNER TJ, TRAYSTMAN RJ, CAMERON DE

Cardiopulmonary bypass and the blood-brain barrier. An experimental study  
J Thorac Cardiovasc Surg 1992; 104:1110-5

GILROY DW, COLVILLE-NASH PR

New insights into the role of COX 2 in inflammation  
J Mol Med 2000; 78:121-9

GINSBERG MD, BUSTO R

Rodent models of cerebral ischemia  
Stroke 1989; 20:1627-42

GINSBERG MD, BUSTO R

Combating hyperthermia in acute stroke: a significant clinical concern  
Stroke 1998; 29:529-34

GIONET TX, THOMAS JD, WARNER DS, GOODLETT CR, WASSERMAN EA, WEST JR

Forebrain ischemia induces selective behavioral impairments associated with hippocampal injury in rats  
Stroke 1991; 22:1040-7

GLAUSER TA, RORKE LB, WEINBERG PM, CLANCY RR

Acquired neuropathologic lesions associated with the hypoplastic left heart syndrome  
Pediatrics 1990; 85:991-1000

GOLD JP, CHARLSON ME, WILLIAMS-RUSSO P, SZATROWSKI TP, PETERSON JC, PIRRAGLIA PA, HARTMAN GS, YAO FS, HOLLENBERG JP, BARBUT D, HAYES JG, THOMAS SJ, PURCELL MH, MATTIS S, GORKIN L, POST M, KRIEGER KH, ISOM OW

Improvement of outcomes after coronary artery bypass. A randomized trial comparing intraoperative high versus low mean arterial pressure  
J Thorac Cardiovasc Surg 1995; 110:1302-11; discussion 11-4

GREELEY WJ, KERN FH, UNGERLEIDER RM, BOYD JL, 3RD, QUILL T, SMITH LR, BALDWIN B, REVES JG

The effect of hypothermic cardiopulmonary bypass and total circulatory arrest on cerebral metabolism in neonates, infants, and children  
J Thorac Cardiovasc Surg 1991; 101:783-94

GROCOTT HP, HOMI HM, PUSKAS F

Cognitive dysfunction after cardiac surgery: revisiting etiology  
Semin Cardiothorac Vasc Anesth 2005; 9:123-9

GROCOTT HP, MACKENSEN GB, GRIGORE AM, MATHEW J, REVES JG, PHILLIPS-BUTE B, SMITH PK, NEWMAN MF

Postoperative hyperthermia is associated with cognitive dysfunction after coronary artery bypass graft surgery

Stroke 2002; 33:537-41

GROCOTT HP, MACKENSEN GB, NEWMAN MF, WARNER DS

Neurological injury during cardiopulmonary bypass in the rat

Perfusion 2001; 16:75-81

GV-SOLAS

Gesellschaft für Versuchstierkunde-Society for laboratory animal science

Planung und Struktur von Versuchstierbereichen tierexperimentell tätiger Institutionen, In: GV-Solas (Hrsg.)

Edition 4, Verlag GV-SOLAS, Biberach an der Riß, 1988

HALL CS

Emotion behavior in the rat: I.defecation and urination as measures of individual differences in emotionality

J Comp Psychol 1934; 18:385-403

HALL IH, SCHWAB UE, WARD ES, IVES TJ

Effects of moxifloxacin in zymogen A or S. aureus stimulated human THP-1 monocytes on the inflammatory process and the spread of infection

Life Sci 2003; 73:2675-85

HARMS H, PRASS K, MEISEL C, KLEHMET J, ROGGE W, DRENCKHAHN C, GOHLER J, BERESWILL S, GOBEL U, WERNECKE KD, WOLF T, ARNOLD G, HALLE E, VOLK HD, DIRNAGL U, MEISEL A

Preventive antibacterial therapy in acute ischemic stroke: a randomized controlled trial

PLoS One 2008; 3:e2158

HARRIS DN, OATRIDGE A, DOB D, SMITH PL, TAYLOR KM, BYDDER GM

Cerebral swelling after normothermic cardiopulmonary bypass

Anesthesiology 1998; 88:340-5

HEINZL S

Neue Antibiotika

Chemother J 1999; 2:89-90

HERRMANN O, BAUMANN B, DE LORENZI R, MUHAMMAD S, ZHANG W, KLEESIEK J, MALFERTHEINER M, KOHRMANN M, POTROVITA I, MAEGELE I, BEYER C, BURKE JR, HASAN MT, BUJARD H, WIRTH T, PASPARAKIS M, SCHWANINGER M

IKK mediates ischemia-induced neuronal death

Nat Med 2005; 11:1322-9

HINDMAN BJ, MOORE SA, CUTKOMP J, SMITH T, ROSS-BARTA SE, DEXTER F, BRIAN JE, JR.

Brain expression of inducible cyclooxygenase 2 messenger RNA in rats undergoing cardiopulmonary bypass

Anesthesiology 2001; 95:1380-8

HIXSON JE

Apolipoprotein E polymorphisms affect atherosclerosis in young males. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group  
Arterioscler Thromb 1991; 11:1237-44

HODGES H

Maze procedures: the radial-arm and water maze compared  
Brain Res Cogn Brain Res 1996; 3:167-81

HOMI HM, YANG H, PEARLSTEIN RD, GROCCOTT HP

Hemodilution during cardiopulmonary bypass increases cerebral infarct volume after middle cerebral artery occlusion in rats  
Anesth Analg 2004; 99:974-81

HOVELS-GURICH HH, KONRAD K, WIESNER M, MINKENBERG R, HERPERTZ-DAHLMANN B, MESSMER BJ, VON BERNUTH G

Long term behavioural outcome after neonatal arterial switch operation for transposition of the great arteries  
Arch Dis Child 2002; 87:506-10

JEVTOVIC-TODOROVIC V, HARTMAN RE, IZUMI Y, BENSHOFF ND, DIKRANIAN K, ZORUMSKI CF, OLNEY JW, WOZNIAK DF

Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits  
J Neurosci 2003; 23:876-82

JORDAN BD, RELKIN NR, RAVDIN LD, JACOBS AR, BENNETT A, GANDY S

Apolipoprotein E epsilon4 associated with chronic traumatic brain injury in boxing  
JAMA 1997; 278:136-40

JOURNOIS D, ISRAEL-BIET D, POUARD P, ROLLAND B, SILVESTER W, VOUHE P, SAFRAN D

High-volume, zero-balanced hemofiltration to reduce delayed inflammatory response to cardiopulmonary bypass in children  
Anesthesiology 1996; 85:965-76

JUNGWIRTH B, ECKEL B, BLOBNER M, KELLERMANN K, KOCHS EF, MACKENSEN GB

Impact of cardiopulmonary bypass on systemic Interleukin-6 release, cerebral NFκB expression and neurocognitive outcome in rats  
Anesth Analg 2009; Manuskript akzeptiert, noch nicht publiziert

JUNGWIRTH B, KELLERMANN K, BLOBNER M, SCHMEHL W, KOCHS EF, MACKENSEN GB

Cerebral air emboli differentially alter outcome after cardiopulmonary bypass in rats compared with normal circulation  
Anesthesiology 2007; 107:768-75

JUNGWIRTH B, MACKENSEN GB, BLOBNER M, NEFF F, REICHART B, KOCHS EF, NOLLERT G

Neurologic outcome after cardiopulmonary bypass with deep hypothermic circulatory arrest in rats: description of a new model

J Thorac Cardiovasc Surg 2006; 131:805-12

KALMAN J, JUHASZ A, BOGATS G, BABIK B, RIMANOCZY A, JANKA Z, PENKE B, PALOTAS A

Elevated levels of inflammatory biomarkers in the cerebrospinal fluid after coronary artery bypass surgery are predictors of cognitive decline  
Neurochem Int 2006; 48:177-80

KALTEIS T, BECKMANN J, SCHRODER HJ, SCHAUMBURGER J, LINDE HJ, LERCH K, LEHN N

Treatment of implant-associated infections with moxifloxacin: an animal study  
Int J Antimicrob Agents 2006; 27:444-8

KALTSCHMIDT C, KALTSCHMIDT B, BAEUERLE PA

Stimulation of ionotropic glutamate receptors activates transcription factor NF-kappa B in primary neurons  
Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92:9618-22

KANELLAKOPOULOU K, PAGOULATOU A, STROUMPOULIS K, VAFIADOU M, KRANIDIOTI H, GIAMARELLOU H, GIAMARELLOS-BOURBOULIS EJ

Pharmacokinetics of moxifloxacin in non-inflamed cerebrospinal fluid of humans: implication for a bactericidal effect  
J Antimicrob Chemother 2008; 61:1328-31

KAUFMANN WE, WORLEY PF, PEGG J, BREMER M, ISAKSON P

COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex  
Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93:2317-21

KELLERMANN K, GORDAN ML, NOLLERT G, BLOBNER M, KOCHS EF, JUNGWIRTH B

Long-term assessment of NFκB-expression in the brain and neurologic outcome following deep hypothermic circulatory arrest in rats  
Perfusion; Manuskript eingereicht

KELLERMANN K, JUNGWIRTH B, BLOBNER M, STÜCKLE J, KOCHS EF

Does moxifloxacin influence brain TNFα-expression after deep hypothermic circulatory arrest in rats?  
Anesthesiology 2007; 107:A1564

KESNER RP

Correspondence between humans and animals in coding of temporal attributes: role of hippocampus and prefrontal cortex  
Ann N Y Acad Sci 1985; 444:122-36

KESNER RP, DIMATTIA BV, CRUTCHER KA

Evidence for neocortical involvement in reference memory  
Behav Neural Biol 1987; 47:40-53

KHABAR KS, ELBARBARY MA, KHOUQEER F, DEVOL E, AL-GAIN S, AL-HALEES Z

Circulating endotoxin and cytokines after cardiopulmonary bypass: differential correlation with duration of bypass and systemic inflammatory response/multiple organ dysfunction syndromes

Clin Immunol Immunopathol 1997; 85:97-103

KIRKLIN JW, DONALD DE, HARSHBARGER HG, HETZEL PS, PATRICK RT, SWAN HJ, WOOD EH

Studies in extracorporeal circulation. I. Applicability of Gibbon-type pump-oxygenator to human intracardiac surgery: 40 cases

Ann Surg 1956; 144:2-8

KOLB B

Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review

Brain Res 1984; 320:65-98

KOLB B, WHISHAW IQ

An observer's view of locomotor asymmetry in the rat

Neurobehav Toxicol Teratol 1985; 7:71-8

KURTH CD, PRIESTLEY M, GOLDEN J, MCCANN J, RAGHUPATHI R

Regional patterns of neuronal death after deep hypothermic circulatory arrest in newborn pigs

J Thorac Cardiovasc Surg 1999; 118:1068-77

LACROIX S, RIVEST S

Effect of acute systemic inflammatory response and cytokines on the transcription of the genes encoding cyclooxygenase enzymes (COX-1 and COX-2) in the rat brain

J Neurochem 1998; 70:452-66

LAFFEY JG, BOYLAN JF, CHENG DC

The systemic inflammatory response to cardiac surgery: implications for the anesthesiologist

Anesthesiology 2002; 97:215-52

LAMBERTSEN KL, MELDGAARD M, LADEBY R, FINSEN B

A quantitative study of microglial-macrophage synthesis of tumor necrosis factor during acute and late focal cerebral ischemia in mice

J Cereb Blood Flow Metab 2005; 25:119-35

LARSON DF, BOWERS M, SCHECHNER HW

Neutrophil activation during cardiopulmonary bypass in paediatric and adult patients

Perfusion 1996; 11:21-7

LEWIS FJ, TAUFIC M

Closure of atrial septal defects with the aid of hypothermia; experimental accomplishments and the report of one successful case

Surgery 1953; 33:52-9

LIEBERMAN AP, PITHA PM, SHIN HS, SHIN ML

Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus

Proc Natl Acad Sci U S A 1989; 86:6348-52

LISTER RG

Ethologically-based animal models of anxiety disorders



Pharmacol Ther 1990; 46:321-40

MA D, WILHELM S, MAZE M, FRANKS NP  
Neuroprotective and neurotoxic properties of the 'inert' gas, xenon  
Br J Anaesth 2002; 89:739-46

MA D, YANG H, LYNCH J, FRANKS NP, MAZE M, GROCOTT HP  
Xenon attenuates cardiopulmonary bypass-induced neurologic and neurocognitive dysfunction in the rat  
Anesthesiology 2003; 98:690-8

MACKENSEN GB, TI LK, PHILLIPS-BUTE BG, MATHEW JP, NEWMAN MF, GROCOTT HP  
Cerebral embolization during cardiac surgery: impact of aortic atheroma burden  
Br J Anaesth 2003; 91:656-61

MANDELL GL, COLEMAN E  
Uptake, transport, and delivery of antimicrobial agents by human polymorphonuclear neutrophils  
Antimicrob Agents Chemother 2001; 45:1794-8

MATHEW JP, GROCOTT HP, PHILLIPS-BUTE B, STAFFORD-SMITH M, LASKOWITZ DT, ROSSIGNOL D, BLUMENTHAL JA, NEWMAN MF  
Lower endotoxin immunity predicts increased cognitive dysfunction in elderly patients after cardiac surgery  
Stroke 2003; 34:508-13

MATSUO Y, ONODERA H, SHIGA Y, SHOZUHARA H, NINOMIYA M, KIHARA T, TAMATANI T, MIYASAKA M, KOGURE K  
Role of cell adhesion molecules in brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in the rat  
Brain Res 1994; 656:344-52

MAYHAN WG  
Effect of lipopolysaccharide on the permeability and reactivity of the cerebral microcirculation: role of inducible nitric oxide synthase  
Brain Res 1998; 792:353-7

MCBRIDE WT, ARMSTRONG MA, GILLILAND H, MCMURRAY TJ  
The balance of pro and anti-inflammatory cytokines in plasma and bronchoalveolar lavage (BAL) at paediatric cardiac surgery  
Cytokine 1996; 8:724-9

MCEWEN BS, SAPOLSKY RM  
Stress and cognitive function  
Curr Opin Neurobiol 1995; 5:205-16

MEISEL C, PRASS K, BRAUN J, VICTOROV I, WOLF T, MEGOW D, HALLE E, VOLK HD, DIRNAGL U, MEISEL A  
Preventive antibacterial treatment improves the general medical and neurological outcome in a mouse model of stroke  
Stroke 2004; 35:2-6

MEYER R, HATADA EN, HOHMANN HP, HAIKER M, BARTSCH C,  
ROTHLISBERGER U, LAHM HW, SCHLAEGER EJ, VAN LOON AP, SCHEIDEREIT C  
Cloning of the DNA-binding subunit of human nuclear factor kappa B: the level of its mRNA  
is strongly regulated by phorbol ester or tumor necrosis factor alpha  
Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88:966-70

MINGHETTI L

Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases  
J Neuropathol Exp Neurol 2004; 63:901-10

MONTGOMERY KC, MONKMAN JA

The relation between fear and exploratory behavior  
J Comp Physiol Psychol 1955; 48:132-6

MOODY DM

The blood-brain barrier and blood-cerebral spinal fluid barrier  
Semin Cardiothorac Vasc Anesth 2006; 10:128-31

MORRIS R

Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat  
J Neurosci Methods 1984; 11:47-60

MORTENSEN RF, ZHONG W

Regulation of phagocytic leukocyte activities by C-reactive protein  
J Leukoc Biol 2000; 67:495-500

MUIJSERS RB, JARVIS B

Moxifloxacin in uncomplicated skin and skin structure infections  
Drugs 2002; 62:967-73; discussion 74-5

MULLER M, STASS H, BRUNNER M, MOLLER JG, LACKNER E, EICHLER HG

Penetration of moxifloxacin into peripheral compartments in humans  
Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:2345-9

MUNOZ R, LAUSSEN PC, PALACIO G, ZIENKO L, PIERCEY G, WESSEL DL

Changes in whole blood lactate levels during cardiopulmonary bypass for surgery for  
congenital cardiac disease: an early indicator of morbidity and mortality  
J Thorac Cardiovasc Surg 2000; 119:155-62

MURKIN JM, FARRAR JK, TWEED WA, MCKENZIE FN, GUIRAUDON G

Cerebral autoregulation and flow/metabolism coupling during cardiopulmonary bypass: the  
influence of PaCO<sub>2</sub>  
Anesth Analg 1987; 66:825-32

MYUNG RJ, KIRSHBOM PM, PETKO M, GOLDEN JA, JUDKINS AR, ITTENBACH RF,  
SPRAY TL, GAYNOR JW

Modified ultrafiltration may not improve neurologic outcome following deep hypothermic  
circulatory arrest  
Eur J Cardiothorac Surg 2003; 24:243-8

NANDATE K, VUYLSTEKE A, CROSBIE AE, MESSAHEL S, ODURO-DOMINAH A,  
MENON DK

Cerebrovascular cytokine responses during coronary artery bypass surgery: specific production of interleukin-8 and its attenuation by hypothermic cardiopulmonary bypass  
*Anesth Analg* 1999; 89:823-8

NEWMAN MF, KIRCHNER JL, PHILLIPS-BUTE B, GAVER V, GROCOTT H, JONES RH, MARK DB, REVES JG, BLUMENTHAL JA  
Longitudinal assessment of neurocognitive function after coronary-artery bypass surgery  
*N Engl J Med* 2001; 344:395-402

NEWTON R, KUITERT LM, BERGMANN M, ADCOCK IM, BARNES PJ  
Evidence for involvement of NF-kappaB in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1beta  
*Biochem Biophys Res Commun* 1997; 237:28-32

NURMI A, LINDSBERG PJ, KOISTINAHO M, ZHANG W, JUETTNER E, KARJALAINEN-LINDSBERG ML, WEIH F, FRANK N, SCHWANINGER M, KOISTINAHO J  
Nuclear factor-kappaB contributes to infarction after permanent focal ischemia  
*Stroke* 2004; 35:987-91

OATES RK, SIMPSON JM, TURNBULL JA, CARTMILL TB  
The relationship between intelligence and duration of circulatory arrest with deep hypothermia  
*J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 110:786-92

OHL F  
Testing for anxiety  
*Clin Neurosci Res* 2003; 3:233-8

OHL F, FUCHS E  
Differential effects of chronic stress on memory processes in the tree shrew  
*Brain Res Cogn Brain Res* 1999; 7:379-87

OHL F, HOLSBOER F, LANDGRAF R  
The modified hole board as a differential screen for behavior in rodents  
*Behav Res Meth Instrum Comput* 2001a; 33:392-7

OHL F, KECK ME  
Behavioural screening in mutagenised mice--in search for novel animal models of psychiatric disorders  
*Eur J Pharmacol* 2003; 480:219-28

OHL F, OITZL MS, FUCHS E  
Assessing cognitive functions in tree shrews: visuo-spatial and spatial learning in the home cage  
*J Neurosci Meth* 1998; 81:35-40

OHL F, ROEDEL A, BINDER E, HOLSBOER F  
Impact of high and low anxiety on cognitive performance in a modified hole board test in C57BL/6 and DBA/2 mice  
*Eur J Neurosci* 2003; 17:128-36

OHL F, ROEDEL A, STORCH C, HOLSBOER F, LANDGRAF R

Cognitive performance in rats differing in their inborn anxiety  
Behav Neurosci 2002; 116:464-71

OHL F, TOSCHI N, WIGGER A, HENNIGER MS, LANDGRAF R  
Dimensions of emotionality in a rat model of innate anxiety  
Behav Neurosci 2001b; 115:429-36

OKA Y, MURATA A, NISHIJIMA J, YASUDA T, HIRAOKA N, OHMACHI Y,  
KITAGAWA K, TODA H, TANAKA N, YASUDA T, MORI T  
Circulating interleukin 6 as a useful marker for predicting postoperative complications  
Cytokine 1992; 4:298-304

OLTON DS  
Frontal cortex, timing and memory  
Neuropsychologia 1989; 27:121-30

OLTON DS, SAMUELSON RJ  
Remembrance of places passed: spatial memory in rats  
J Exp Psychol (Anim Behav) 1976; 2:97-116

PASCUAL A, GARCIA I, BALLESTA S, PEREA EJ  
Uptake and intracellular activity of moxifloxacin in human neutrophils and tissue-cultured  
epithelial cells  
Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:12-5

PAXINOS G, WATSON C  
The rat brain in stereotaxic coordinates  
Edition 4, Academic Press, New York, 1998

PELLOW S, CHOPIN P, FILE SE, BRILEY M  
Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the  
rat  
J Neurosci Meth 1985; 14:149-67

PERSCH A  
Die Bedeutung des Explorationsverhaltens bei Versuchstieren  
Tierärztl Umschau 1994; 49:539-45

PINTAR T, COLLARD CD  
The systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass  
Anesthesiol Clin North Am 2003; 21:453-64

PIZZI M, SARNICO I, LANZILLOTTA A, BATTISTIN L, SPANO P  
Post-ischemic brain damage: NF-kappaB dimer heterogeneity as a molecular determinant of  
neuron vulnerability  
FEBS J 2009; 276:27-35

POPOVIC P, HORECKY J, POPOVIC VP  
Circulation extracorporelle chez le rat blanc en hypothermie  
J Physiol Paris 1966; 58:594

PRIESTLEY MA, GOLDEN JA, O'HARA IB, MCCANN J, KURTH CD

Comparison of neurologic outcome after deep hypothermic circulatory arrest with alpha-stat and pH-stat cardiopulmonary bypass in newborn pigs  
J Thorac Cardiovasc Surg 2001; 121:336-43

PROCTOR E

An oxygenator for cardiopulmonary bypass in the rat  
J Surg Res 1977; 22:124-7

PRUT L, BELZUNG C

The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review  
Eur J Pharmacol 2003; 463:3-33

PUA HL, BISSONNETTE B

Cerebral physiology in paediatric cardiopulmonary bypass  
Can J Anaesth 1998; 45:960-78

RANUCCI M, DE TOFFOL B, ISGRO G, ROMITTI F, CONTI D, VICENTINI M

Hyperlactatemia during cardiopulmonary bypass: determinants and impact on postoperative outcome  
Crit Care 2006; 10:R167

REDMOND JM, GILLINOV AM, ZEHR KJ, BLUE ME, TRONCOSO JC, REITZ BA, CAMERON DE, JOHNSTON MV, BAUMGARTNER WA

Glutamate excitotoxicity: a mechanism of neurologic injury associated with hypothermic circulatory arrest  
J Thorac Cardiovasc Surg 1994; 107:776-86; discussion 86-7

RIDDER DA, SCHWANINGER M

NF-kappaB signaling in cerebral ischemia  
Neuroscience 2009; 158:995-1006

ROACH GW, KANCHUGER M, MANGANO CM, NEWMAN M, NUSSMEIER N, WOLMAN R, AGGARWAL A, MARSCHALL K, GRAHAM SH, LEY C

Adverse cerebral outcomes after coronary bypass surgery. Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group and the Ischemia Research and Education Foundation Investigators  
N Engl J Med 1996; 335:1857-63

ROCHE-LEXIKON

In: Roche Lexikon Medizin, S. 1051  
Edition 5, Urban & Fischer, München 2003

ROT A

Chemotactic potency of recombinant human neutrophil attractant/activation protein-1 (interleukin-8) for polymorphonuclear leukocytes of different species  
Cytokine 1991; 3:21-7

ROTHBLAT LA, VNEK N, GLEASON TC, KROMER LF

Role of the parahippocampal region in spatial and non-spatial memory: effects of parahippocampal lesions on rewarded alternation and concurrent object discrimination learning in the rat  
Behav Brain Res 1993; 55:93-100

- RUBINSTEIN E, CAMM J  
Cardiotoxicity of fluoroquinolones  
J Antimicrob Chemother 2002; 49:593-6
- SAKAMOTO T, NOLLERT GD, ZURAKOWSKI D, SOUL J, DUEBENER LF, SPERLING J, NAGASHIMA M, TAYLOR G, DUPLESSIS AJ, JONAS RA  
Hemodilution elevates cerebral blood flow and oxygen metabolism during cardiopulmonary bypass in piglets  
Ann Thorac Surg 2004; 77:1656-63; discussion 63
- SANCHEZ-SANTED F, DE BRUIN JP, HEINSBROEK RP, VERWER RW  
Spatial delayed alternation of rats in a T-maze: effects of neurotoxic lesions of the medial prefrontal cortex and of T-maze rotations  
Behav Brain Res 1997; 84:73-9
- SARNICO I, LANZILLOTTA A, BORONI F, BENARESE M, ALGHISI M, SCHWANINGER M, INTA I, BATTISTIN L, SPANO P, PIZZI M  
NF-kappaB p50/RelA and c-Rel-containing dimers: opposite regulators of neuron vulnerability to ischaemia  
J Neurochem 2009; 108:475-85
- SCHMIDT-KASTNER R, FREUND TF  
Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia  
Neuroscience 1991; 40:599-636
- SCHMUCK G, SCHURMANN A, SCHLUTER G  
Determination of the excitatory potencies of fluoroquinolones in the central nervous system by an in vitro model  
Antimicrob Agents Chemother 1998; 42:1831-6
- SCHONING B, ELEPFANDT P, LANKSCH WR, VOLK HD, WOICIECHOWSKY C  
Continuous infusion of proinflammatory cytokines into the brain to study brain cytokine induced local and systemic immune effects  
Brain Res Brain Res Protoc 1999; 4:217-22
- SCHRECKINGER M, GEOCADIN RG, SAVONENKO A, YAMASHITA S, MELNIKOVA T, THAKOR NV, HANLEY DF  
Long-lasting cognitive injury in rats with apparent full gross neurological recovery after short-term cardiac arrest  
Resuscitation 2007; 75:105-13
- SHALIT I, HALPERIN D, HAITE D, LEVITOV A, ROMANO J, OSHEROV N, FABIAN I  
Anti-inflammatory effects of moxifloxacin on IL-8, IL-1beta and TNF-alpha secretion and NFkappaB and MAP-kinase activation in human monocytes stimulated with Aspergillus fumigatus  
J Antimicrob Chemother 2006; 57:230-5
- SHALIT I, HOREV-AZARIA L, FABIAN I, BLAU H, KARIV N, SHECHTMAN I, ALTERAZ H, KLETTER Y  
Immunomodulatory and protective effects of moxifloxacin against Candida albicans-induced bronchopneumonia in mice injected with cyclophosphamide  
Antimicrob Agents Chemother 2002; 46:2442-9

SHALIT I, KLETTER Y, HALPERIN D, WALDMAN D, VASSERMAN E, NAGLER A, FABIAN I

Immunomodulatory effects of moxifloxacin in comparison to ciprofloxacin and G-CSF in a murine model of cyclophosphamide-induced leukopenia  
Eur J Haematol 2001; 66:287-96

SHIN'OKA T, SHUM-TIM D, JONAS RA, LIDOV HG, LAUSSEN PC, MIURA T, DU PLESSIS A

Higher hematocrit improves cerebral outcome after deep hypothermic circulatory arrest  
J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 112:1610-20; discussion 20-1

SHINDE SB, GOLAM KK, KUMAR P, PATIL ND

Blood lactate levels during cardiopulmonary bypass for valvular heart surgery  
Ann Card Anaesth 2005; 8:39-44

SIEFERT HM, DOMDEY-BETTE A, HENNINGER K, HUCKE F, KOHLSDORFER C, STASS HH

Pharmacokinetics of the 8-methoxyquinolone, moxifloxacin: a comparison in humans and other mammalian species  
J Antimicrob Chemother 1999; 43 Suppl B:69-76

SILLESEN H, NEDERGAARD M, SCHROEDER T, BUCHARDT HANSEN HJ

Middle cerebral artery occlusion in presence of low perfusion pressure increases infarct size in rats  
Neurol Res 1988; 10:61-3

SIMMONS DL, BOTTING RM, HLA T

Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition  
Pharmacol Rev 2004; 56:387-437

SMITH PL, TREASURE T, NEWMAN SP, JOSEPH P, ELL PJ, SCHNEIDAU A, HARRISON MJ

Cerebral consequences of cardiopulmonary bypass  
Lancet 1986; 1:823-5

SMITH WL, GARAVITO RM, DEWITT DL

Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2  
J Biol Chem 1996; 271:33157-60

SQUIRE LR

Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans  
Psychol Rev 1992; 99:195-231

SQUIRE LR

Memory systems  
C R Acad Sci III 1998; 321:153-6

SQUIRE LR, ZOLA SM

Episodic memory, semantic memory, and amnesia  
Hippocampus 1998; 8:205-11

STADELMANN C, LASSMANN H

Detection of apoptosis in tissue sections

Cell Tissue Res 2000; 301:19-31

STAHLMANN R

Clinical toxicological aspects of fluoroquinolones  
Toxicol Lett 2002; 127:269-77

STARKER LK

Neurologische und kognitive Leistungsfähigkeit nach tief hypothermem Kreislaufstillstand bei der Ratte - Etablierung eines neuen Modells  
Vet Med Diss, München, 2005

STASS H, KUBITZA D

Pharmacokinetics and elimination of moxifloxacin after oral and intravenous administration in man  
J Antimicrob Chemother 1999; 43 Suppl B:83-90

STASS H, KUBITZA D, SCHUHLY U

Pharmacokinetics, safety and tolerability of moxifloxacin, a novel 8-methoxyfluoroquinolone, after repeated oral administration  
Clin Pharmacokinet 2001; 40 Suppl 1:1-9

STECKLER T, MUIR JL

Measurement of cognitive function: relating rodent performance with human minds  
Brain Res Cogn Brain Res 1996; 3:299-308

STÜCKLE J

Beeinflusst die perioperative Gabe von Moxifloxazin die zerebrale inflammatorische Reaktion und das neurologische Outcome 24 Stunden nach extrakorporaler Zirkulation mit tief-hypothermem Kreislaufstillstand an der Ratte?  
Med Diss, TU München, Dissertation in Vorbereitung

SWIRCZEK SB

Beeinflusst die komplette extrakorporale Zirkulation (EKZ) bei Ratten deren neurokognitive Leistung, neurologischen Status und Verhalten?  
Vet Med Diss, München, 2005

TARNOK A, HAMBSCH J, EMMRICH F, SACK U, VAN SON J, BELLINGHAUSEN W, BORTE M, SCHNEIDER P

Complement activation, cytokines, and adhesion molecules in children undergoing cardiac surgery with or without cardiopulmonary bypass  
Pediatr Cardiol 1999; 20:113-25

TAYLOR KM

Brain damage during cardiopulmonary bypass  
Ann Thorac Surg 1998; 65:S20-6; discussion S7-8

TONNESEN E, CHRISTENSEN VB, TOFT P

The role of cytokines in cardiac surgery  
Int J Cardiol 1996; 53 Suppl:S1-10

TRIGGIANI E, COPPOLA M, NIGRO R, NAPOLI V, BELLINI O

[Extracorporeal circulation in the rat. Technical aspects]  
Boll Soc Ital Biol Sper 1970; 46:998-1001



TULVING E, MARKOWITSCH HJ

Episodic and declarative memory: role of the hippocampus  
Hippocampus 1998; 8:198-204

TUPPER DE, WALLACE RB

Utility of the neurological examination in rats  
Acta Neurobiol Exp (Wars) 1980; 40:999-1003

UTAGAWA A, TRUETTNER JS, DIETRICH WD, BRAMLETT HM

Systemic inflammation exacerbates behavioral and histopathological consequences of isolated traumatic brain injury in rats  
Exp Neurol 2008; 211:283-91

VAN DAMME J, OPDENAKKER G, SIMPSON RJ, RUBIRA MR, CAYPHAS S, VINK A, BILLIAU A, VAN SNICK J

Identification of the human 26-kD protein, interferon beta 2 (IFN-beta 2), as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor  
J Exp Med 1987; 165:914-9

VON KEUTZ E, SCHLUTER G

Preclinical safety evaluation of moxifloxacin, a novel fluoroquinolone  
J Antimicrob Chemother 1999; 43 Suppl B:91-100

WALF AA, FRYE CA

The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents  
Nat Protoc 2007; 2:322-8

WALTERS JD, ZHANG F, NAKKULA RJ

Mechanisms of fluoroquinolone transport by human neutrophils  
Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:2710-5

WEHBERG KE, FOSTER AH, WISE RM, MCLAUGHLIN JS, BRUNNER MJ

Nitric oxide mediates fluid accumulation during cardiopulmonary bypass  
J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 112:168-74

WEISCHER ML

[A simple device for measuring exploratory activity and motility in mice (author's transl)]  
Psychopharmacology (Berl) 1976; 50:275-9

WELLS FC, COGHILL S, CAPLAN HL, LINCOLN C

Duration of circulatory arrest does influence the psychological development of children after cardiac operation in early life  
J Thorac Cardiovasc Surg 1983; 86:823-31

WERBER S, SHALIT I, FABIAN I, STEUER G, WEISS T, BLAU H

Moxifloxacin inhibits cytokine-induced MAP kinase and NF-kappaB activation as well as nitric oxide synthesis in a human respiratory epithelial cell line  
J Antimicrob Chemother 2005; 55:293-300

WHITESIDE ST, ISRAEL A

I kappa B proteins: structure, function and regulation  
Semin Cancer Biol 1997; 8:75-82

WIEN S

Zu Entstehungsmechanismen von Plasma Leakage in mikroporösen Kapillarmembranoxygenatoren  
Med Diss, TU Aachen, 2004

WIJNBERGEN A

Ratten. *In*: GABRISCH K, ZWART P (Hrsg.): Krankheiten der Heimtiere  
Schlütersche Verlagsgesellschaft GmbH & Co KG, Edition 6, Hannover; 2005:139

WILSON R, ALLEGRA L, HUCHON G, IZQUIERDO JL, JONES P, SCHABERG T, SAGNIER PP

Short-term and long-term outcomes of moxifloxacin compared to standard antibiotic treatment in acute exacerbations of chronic bronchitis  
Chest 2004; 125:953-64

WISE-FABEROWSKI L, ZHANG H, ING R, PEARLSTEIN RD, WARNER DS

Isoflurane-induced neuronal degeneration: an evaluation in organotypic hippocampal slice cultures

Anesth Analg 2005; 101:651-7

WWW.BRUCKENBERGER.DE

17. Herzbericht, 2004

Abfrage am 22.07.2008

WWW.NEUROPSYCHOANALYSE.BLOGSPOT.COM

Abfrage am 08.07.2008

WWW.PHARMAZEUTISCHE-ZEITUNG.DE/INDEX.PHP?ID=29451

Archiv 03/2009; Abfrage am 11.08.2009

WWW.ZCT-BERLIN.DE/NEUEINFUEHRUNGEN/MOXIFLOXACIN.HTML

Abfrage am 11.08.2009

WYPIJ D, NEWBURGER JW, RAPPAPORT LA, DUPLESSIS AJ, JONAS RA, WERNOVSKY G, LIN M, BELLINGER DC

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 2003; 126:1397-403

XIE Z, CULLEY DJ, DONG Y, ZHANG G, ZHANG B, MOIR RD, FROSCH MP, CROSBY G, TANZI RE

The common inhalation anesthetic isoflurane induces caspase activation and increases amyloid beta-protein level in vivo

Ann Neurol 2008; 64:618-27

YE SM, JOHNSON RW

Regulation of interleukin-6 gene expression in brain of aged mice by nuclear factor kappaB

J Neuroimmunol 2001; 117:87-96

YENARI MA, HAN HS

Influence of hypothermia on post-ischemic inflammation: role of nuclear factor kappa B (NFkappaB)

Neurochem Int 2006; 49:164-9

ZAUSINGER S, HUNGERHUBER E, BAETHMANN A, REULEN H, SCHMID-ELSAESSER R

Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: a comparative study under various treatment paradigms

Brain Res 2000; 863:94-105

ZHANG G, DONG Y, ZHANG B, ICHINOSE F, WU X, CULLEY DJ, CROSBY G, TANZI RE, XIE Z

Isoflurane-induced caspase-3 activation is dependent on cytosolic calcium and can be attenuated by memantine

J Neurosci 2008; 28:4551-60

ZHAO X, ZHANG Y, STRONG R, ZHANG J, GROTTA JC, ARONOWSKI J

Distinct patterns of intracerebral hemorrhage-induced alterations in NF-kappaB subunit, iNOS, and COX-2 expression

J Neurochem 2007; 101:652-63

ZOLA-MORGAN SM, SQUIRE LR

The primate hippocampal formation: evidence for a time-limited role in memory storage

Science 1990; 250:288-90

ZOLA-MORGAN SM, SQUIRE LR

Neuroanatomy of memory

Annu Rev Neurosci 1993; 16:547-63

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 01: Punkteschema zur Beurteilung der motorischen Funktion .....	61
Tabelle 02: Randomisierte Lochkombinationen in der Lernphase .....	65
Tabelle 03: Überblick über Aktionen, Tastenbelegungen und Definitionen im ZHBT.....	68
Tabelle 04: Punkteschema zur Bewertung der kognitiven Funktion im ZHBT.....	70
Tabelle 05: Punkteschema zur Bewertung des Verhaltens im ZHBT.....	72
Tabelle 06: Histologisches Punkteschema zur Bewertung des neuronalen Zellschadens in Hippokampus und Motorkortex .....	76
Tabelle 07: Immunhistochemisches Punkteschema zur Bewertung des neuronalen Zellschadens in Hippokampus und Motorkortex .....	77
Tabelle 08: Physiologische Parameter aller vier Gruppen während des operativen Eingriffs zu den definierten Messzeitpunkten .....	79
Tabelle 09: Körpergewicht (g) aller fünf Gruppen im prä-, peri- und postoperativen Verlauf .....	81
Tabelle 10: Motorischer Gesamtscore der fünf Untersuchungsgruppen.....	83
Tabelle 11: Kognitions- Score der fünf Untersuchungsgruppen.....	85
Tabelle 12: Verhaltens- Score der fünf Untersuchungsgruppen .....	87
Tabelle 13: Histologie- Score der fünf Untersuchungsgruppen.....	89
Tabelle 14: NFκB- Score der fünf Untersuchungsgruppen.....	91

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 01: Taxonomie des Langzeitgedächtnisses mit beteiligten Gedächtnisstrukturen (modifiziert nach SQUIRE, 1998).....	4
Abbildung 02: Längsschnitt des menschlichen Gehirns (Quelle: WWW.NEUROPSYCHOANALYSE.BLOGSPOT.COM, Abfrage am 08.07.2008). .....	6
Abbildung 03: Darstellung des aktuellen Multikomponentenmodells des Arbeitsgedächtnisses (modifiziert nach BADDELEY, 2000). .....	7
Abbildung 04: Schematische Zeichnung des limbischen Systems mit Darstellung des Papezschen und emotionalen Schaltkreises, sowie des präfrontalen Kortex (modifiziert nach CALABRESE und MARKOWITSCH, 2003).....	8
Abbildung 05: Schematische Zeichnung des „Open- Field“ mit zentralem und peripherem Bereich (modifiziert nach HALL, 1934). .....	13
Abbildung 06: Schematischer Aufbau des modifizierten Hole- Board- Tests mit zentralem Hole- Board und peripherem Open- Field (modifiziert nach OHL, 2003).....	14
Abbildung 07: Darstellung und Aufbau des „Morris- Water- Maze“ mit Plattform, Wasserpegel und Wandmarkierungen (modifiziert nach MORRIS, 1984).....	15
Abbildung 08: Skizzierte Darstellung des „Elevated- Plus- Maze“- Tests mit offenen und geschlossenen Armen (modifiziert nach WALF und FRYE, 2007).....	16
Abbildung 09: Schematische Darstellung des „Radial- Arm- Maze“ mit Anordnung der Arme und Futterbelohnung, zentrales Einsetzen der Ratte (modifiziert nach CRUSIO und SCHWEGLER, 2005).....	17
Abbildung 10: Übersicht über die verschiedenen proinflammatorischen Ereignisse, die während und nach einer EKZ auftreten (modifiziert nach PINTAR und COLLARD, 2003). .....	28
Abbildung 11: Allgemeines Grundgerüst der Chinolone als Schema (modifiziert nach BAUERNFEIND, 1997).....	36
Abbildung 12: Strukturformel von Moxifloxazin (modifiziert nach STASS und KUBITZA, 1999). .....	37
Abbildung 13: Aufteilung und Darstellung der Versuchsgruppen (DHCA Moxifloxazin, DHCA Plazebo, Sham Moxifloxazin, Sham Plazebo und Kontrolle mit einer Gruppengröße von jeweils n=10). .....	46
Abbildung 14: Schematischer Zeitverlauf des Versuchs (Überblick Tag -2 bis Tag 14). .....	48
Abbildung 15: Schematische Darstellung der EKZ an der Ratte mit arteriellem und venösem Zugang, venösem Reservoir, Rollerpumpe, Oxygenator und Wärmetauscher (modifiziert nach DIELEMAN et al., 2006).....	51
Abbildung 16: Aufbau der EKZ mit Hilfe der HLM an der präparierten Ratte.....	53
Abbildung 17: Ratte beim Überqueren des 2,5 cm breiten Balkens im Beam- Walking- Test. ....	58
Abbildung 18: Ratte, die sich am Drahtgitter beim Rotating- Grid- Test mit allen vier Pfoten festhält.....	59
Abbildung 19: Ratte, die das Drahtseil mit beiden Vorderpfoten ergreift. ....	59
Abbildung 20: Ratte beim Balancieren auf dem 1,5 cm breiten Holzstab beim Beam- Balance- Test. ....	60
Abbildung 21: Linkes Bild: Darstellung des Arbeitsplatzes mit PC, Weichtastatur, Testutensilien, Videokamera sowie Homecage mit Futter und Wasserzugang; Bild in der Mitte: Aufsicht von oben in den Homecage mit	

	eingezogener Trennwand zur Separierung von Wohnabteil und Testarena; rechtes Bild: Aufsicht von oben auf Wohnabteil und Versuchsarena, Besuch eines Zylinders. ....	62
Abbildung 22:	Aufsicht auf das ZHB mit Nummerierung der zehn Löcher.....	64
Abbildung 23:	Aufsicht auf die Versuchsarena mit Line Crossing- Markierungen und eingelegtem ZHB.....	67
Abbildung 24:	Inkubation der histologischen Schnitte in der feuchten Kammer. ....	75
Abbildung 25:	Grafische Darstellung der MW $\pm$ SEM des Körpergewichts (g) der fünf Gruppen DHCA MXF, DHCA Plazebo, Sham MXF, Sham Plazebo und Kontrolle zu den definierten Untersuchungszeitpunkten. $p < 0,001$ Zeit x Gruppe; $p < 0,05$ * gg. DHCA MXF .....	82
Abbildung 26:	Vergleichende grafische Darstellung (Mediane, sowie 25 % und 75 % Perzentile) des Motorik- Scores der einzelnen Untersuchungsgruppen DHCA MXF, DHCA Plazebo, Sham MXF und Sham Plazebo. Der Motorik- Scorewert der unbehandelten Kontrolle liegt bei Null und wird deshalb nicht gesondert dargestellt. $p < 0,05$ ; * gg. Sham.....	84
Abbildung 27:	Vergleichende grafische Darstellung (Mediane, sowie 25 % und 75 % Perzentile) der Punktesumme kognitiver Ergebnisse der einzelnen Untersuchungsgruppen DHCA MXF, DHCA Plazebo, Sham MXF und Sham Plazebo. Der Median der unbehandelten Kontrolle liegt bei Null und wird deshalb nicht gesondert dargestellt. $p < 0,05$ ; * gg. Sham, † gg. Sham MXF, # gg. Kontrolle. ....	86
Abbildung 28:	Vergleichende grafische Darstellung (Mediane, sowie 25 % und 75 % Perzentile) des Verhaltens- Scores der einzelnen Untersuchungsgruppen DHCA MXF, DHCA Plazebo, Sham MXF und Sham Plazebo. Die gestrichelten Linien markieren die 25 % und 75 % Perzentile der unbehandelten Kontrolle.....	88
Abbildung 29:	Vergleichende grafische Darstellung (Mediane, sowie 25 % und 75 % Perzentile) der histologischen Gesamtpunktzahl zur Beurteilung des histologischen Zellschadens der einzelnen Untersuchungsgruppen DHCA MXF, DHCA Plazebo, Sham MXF und Sham Plazebo; die gestrichelte Linie markiert das obere 90 % Perzentil der unbehandelten Kontrolle, das untere 10 % Perzentil der unbehandelten Kontrolle wurde nicht dargestellt. $p < 0,05$ ; * gg. Sham, # gg. Kontrolle.....	90
Abbildung 30:	Vergleichende grafische Darstellung (Mediane, sowie 25 % und 75 % Perzentile) des NF $\kappa$ B- Scores zur Beurteilung des Zellschadens der einzelnen Untersuchungsgruppen DHCA MXF, DHCA Plazebo, Sham MXF und Sham Plazebo; die gestrichelten Linien markieren die 10 % und 90 % Perzentile der unbehandelten Kontrolle. $p < 0,05$ ; § gg. DHCA Plazebo, # gg. Kontrolle... ..	92

## 10 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arterie
Abb.	Abbildung
ApoE	Apolipoprotein E
ATP	Adenosintriphosphat
BE	Base excess, Basenüberschuss
bzw.	beziehungsweise
CA	Kornu ammonis, Ammonshorn
ca.	zirka
c-AMP	zyklo-Adenosinmonophosphat
CCCP	Chlor-Kabonyl-Zyanid-Phenylhydrazon
CFU-C	Granulopoietic progenitor cells, granulopoetische Vorläuferzellen
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX	Zyklooxygenase
CPB	cardiopulmonary bypass, kardiopulmonaler Bypass
CRP	C-reaktives Protein
CSA	Colony-Stimulating-Activity
DHCA	deep hypothermic circulatory arrest, tief- hypothermer Kreislaufstillstand
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EEG	Elektroenzephalogramm, Elektroenzephalografie
EKG	Elektrokardiogramm, Elektrokardiografie
EKZ	extrakorporale Zirkulation
EPM	Elevated- Plus- Maze
Fa.	Firma
FiO <sub>2</sub>	Fraction of inspired oxygen, Sauerstoffanteil der Inspirationsluft
Fr	French
g	Gramm
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
gg.	gegen
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Colony-Stimulating Factor
h	Stunde
HAES	Hydroxyethylstärke
HB	Hole- Board
Hb	Hämoglobin
HE	Hämatoxylin- Eosin
HLM	Herz- Lungen- Maschine
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogenperoxid, Wasserstoffperoxid
ICAM	intercellular adhesion molecule, interzelluläres Adhäsionsmolekül
I.E.	Internationale Einheiten
IKAP	IKK complex- associated protein
IκB	Inhibitorisches kappa B
IKK	IκB- Kinase
IL	Interleukin

IL-1RA	Interleukin- 1 Rezeptor Antagonist
iNOS	induzierbare Nitroxidsynthase
IQ	Intelligenzquotient
kD	Kilodalton
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
l	Liter
lat.	lateinisch
LD <sub>50</sub>	mittlere letale Dosis
LPS	Lipopolysaccharide
m	Meter
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
M	Molar
MAP	mean arterial pressure, mittlerer arterieller Blutdruck
MCAO	middle cerebral artery occlusion, mittlere Zerebralarterienokklusion
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
mg	Milligramm
mHB	modifiziertes Hole- Board
mHBT	modifizierter Hole- Board- Test
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mmHg	Millimeter- Quecksilbersäule
mmol	Millimol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
ms	Millisekunde
MW	Mittelwert
MWM	Morris- Water- Maze
MXF	Moxifloxazin
NaF	Natriumfluorid
NaCl	Natriumchlorid
NEMO	NFκB essential modulator
NFκB	Nukleärer Faktor kappa B
NH <sub>4</sub> CL	Ammoniumchlorid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Nitritoxid
NSAID	nicht- steroidales Antiphlogistikum
NU	neurologisch- motorische Untersuchung
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OE	Omission Error
PaCO <sub>2</sub>	arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PaO <sub>2</sub>	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS	Phosphate buffered saline
PG	Prostaglandin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Aktivität der Oxoniumionen
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
POCD	postoperative cognitive deficits, postoperative kognitive Defizite
RAM	Radial- Arm- Maze
s	Sekunde



S.	Seite
SEM	Standardfehler
sog.	sogenannt (e/er)
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TC	Time Complete
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
u. a.	unter anderem
usw.	und so weiter
US \$	US Dollar
u. U.	unter Umständen
V.	Vene
v. a.	vor allem
Vol %	Volumenprozent
WC	Wrong Choice
z. B.	zum Beispiel
ZHB	Zylinder- Hole- Board
ZHBT	Zylinder- Hole- Board- Test
ZNS	Zentrales Nervensystem
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{m}$	Mikrometer
°	Grad
°C	Grad Celsius
%	Prozent
§	Paragraf

## 11 Danksagung

Nach Abschluss dieser Doktorarbeit bedanke ich mich recht herzlich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. med. vet. habil. M. Erhard für die Übernahme der Arbeit an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher danke ich vielmals für die Möglichkeit, die tierexperimentellen Arbeiten am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapiefor- schung der Technischen Universität München durchführen zu können.

Ebenso gilt mein Dank zugleich Herrn Univ.-Prof. Dr. med., Dipl. phys. E. Kochs, Direktor des Instituts für Anaesthesiologie der Technischen Universität München und Herrn Prof. Dr. med. M. Blobner, Oberarzt der Klinik für Anaesthesiologie der TU München für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und Überlassung des Themas.

Bei Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. W. Erhardt bedanke ich mich besonders für die sorgfältige und schnelle Durchsicht und Korrektur des Manuskripts, sowie die stets freundliche Unterstützung und Beratung.

Meiner Betreuerin Frau Dr. med. vet. Kristine Kellermann möchte ich ganz herzlich für die große Unterstützung und Motivation, die stets professionelle Beratung und Kritik, das unermüdliche und rasche Korrekturlesen der Doktorarbeit und den permanenten Rückhalt danken.

Ein herzlicher Dank gilt meiner Kollegin Frau Dr. med. vet. Nadja Dertinger, die mich während der gesamten Zeit an diesem Institut mit großem Engagement tatkräftig motiviert und unterstützt hat, sowie Frau Dr. med. Bettina Jungwirth und meinen Mitdoktoranden Johannes Stückle und Alexander Kretschmer für ihre Hilfsbereitschaft und die stets gute und nette Zusammenarbeit.

Vielen Dank an die Kolleginnen der Forschungsgruppe „Kognition und Verhalten“ in der Klinik für Anaesthesiologie der TU München Frau Dr. med. vet. Laura Starker, Frau Dr. med. vet. Anja Berkmann und Frau Daniela Höfelmann für die Hilfe und Unterstützung zu Beginn meiner Doktorandenzeit an diesem Institut.

Frau Nicki Möll und Frau Franziska Saueressig danke ich für ihre jederzeit hilfsbereite Unterstützung in allen Fragen. Bei Frau Doris Droese, Frau Anne Frye und Herrn Sepp Straßmair möchte ich mich für die freundliche Unterstützung im Labor bedanken. Zudem danke ich recht herzlich den Tierpflegerinnen und Tierpflegern für die problemlose und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Geschwistern und vor allem meinen Eltern Gerlinde und Georg Denzler, die mir das Studium der Veterinärmedizin und diese Doktorarbeit erst ermöglicht haben. Für eure Geduld und moralische und finanzielle Unterstützung in den letzten Jahren möchte ich mich bei euch von ganzem Herzen bedanken!