

*Explorative Studie zum Einfluss der konventionellen Herz-Lungen-Maschine
im Vergleich zur Herz-Lungen-Maschine mit minimierter Fremdoberfläche auf
die Freisetzung von mitochondrialer DNA im Blut*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Jan Schwiddessen
aus Soest
Gießen 2025

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Klinik für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie

Gutachter: Prof. Dr. Michael Sander

Gutachter: Prof. Dr. Bernd Niemann

Tag der Disputation: 18.02.2026

Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/Datum

Unterschrift

Inhalt

1	EINLEITUNG	1
1.1	PRÄAMBEL	1
1.2	GRUNDLAGEN DER KARDIOCHIRURGIE	2
1.2.1	INDIKATION ZUM KARDIOPULMONALEN BYPASS	2
1.2.2	AUFBAU EINES KARDIOPULMONALEN BYPASSES	3
1.3	KOMPLIKATIONEN BEI KARDIOCHIRURGISCHEN EINGRIFFEN	6
1.3.1	POSTOPERATIVES VORHOFFLIMMERN	6
1.3.2	NIERENINSUFFIZIENZ	7
1.3.2.1	Akute Niereninsuffizienz	7
1.3.3	POSTOPERATIVE INFEKTIONEN	8
1.3.4	SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE SYNDROME	8
1.4	PATHOPHYSIOLOGIE DER INFLAMMATIONSREAKTION IM RAHMEN VON KARDIOCHIRURGISCHEN OPERATIONEN UNTER DEM EINSATZ EINES KARDIOPULMONALEN BYPASSES	9
1.4.1	MITOCHONDRIALE NUKLEINSÄUREN WÄHREND KARDIOCHIRURGISCHER EINGRIFFE	11
1.4.2	MITOCHONDRIALE DNA ALS PROINFLAMMATORISCHER FAKTOR	12
2	FRAGESTELLUNG	13
3	MATERIAL UND METHODEN	15
3.1	STUDIENDESIGN	15
3.2	STUDIENPOPULATION	15
3.2.1	EIN-UND AUSSCHLUSSKRITERIEN	15
3.3	ZIELPARAMETER	16
3.4	ABLAUF DER ANÄSTHESIOLOGISCHEN VERSORGUNG EINER KORONAREN BYPASSOPERATION	16
3.4.1	HERZ-LUNGEN-MASCHINE	17
3.5	BLUTENTNAHMEZEITPUNKTE UND PROZESSIERUNG	18

3.6	PURIFIKATION VON MTDNA AUS PATIENTENPLASMEN.....	20
3.7	ANFERTIGEN DER STANDARDPROBEN.....	20
3.8	PCR ZUM QUANTITATIVEN NACHWEIS VON MTDNA	21
3.9	STATISTISCHE ANALYSE.....	23
4	ERGEBNISSE	25
4.1	BASISCHARAKTERISTIKA	25
4.2	QUANTIFIZIERUNG DER FREIEN MTDNA.....	26
4.2.1	ZEITLICHER VERLAUF	26
4.2.2	VERGLEICH DER MTDNA KONZENTRATION ZWISCHEN MI ECC UND cCPB ...	28
4.3	KORRELATION ZWISCHEN FREIER MTDNA UND DER PEAKKONZENTRATION WÄHREND DES CPB UND DEN INFLAMMATORISCHEN UND ISCHÄMISCHEN PARAMETERN.....	29
4.4	KORRELATION ZWISCHEN FREIER MTDNA UND OUTCOMEPARAMETERN	32
5	DISKUSSION	33
5.1	EINFLUSS DER MI ECC AUF DIE MTDNA-PLASMAKONZENTRATION	33
5.2	ASSOZIATION ZWISCHEN DER MTDNA-PLASMAKONZENTRATION UND OUTCOMEPARAMETERN.....	36
5.3	LIMITATIONEN.....	38
5.4	STÄRKEN DER STUDIE	39
5.5	AUSBLICK.....	41
6	SCHLUSSFOLGERUNG	43
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	46
8	SUMMARY.....	47
9	LITERATURVERZEICHNIS	48
10	ANHANG	54

10.1 QUIAGEN PROTOKOLL ZUR PURIFIZIERUNG.....	54
10.2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	54
10.3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	56
10.4 TABELLENVERZEICHNIS.....	57
10.5 PUBLIKATIONEN	57
10.6 DANKSAGUNG	58

1 Einleitung

1.1 Präambel

Im Jahr 2022 wurden in Deutschland über 160.000 kardiochirurgische Eingriffe durchgeführt, knapp 62.000 unter Einsatz des kardiopulmonalen Bypasses (*cardiopulmonary bypass*, CPB) [1].

Durch die immer älter werdende Bevölkerung sind mittlerweile 33,5% der Patienten¹, die einen kardiochirurgischen Eingriff benötigen, zwischen 70 und 79 Jahren alt. Eingriffe unter Einsatz des CPB gehen sowohl mit einem erhöhten Blutungsrisiko, als auch mit einem erhöhten Risiko für eine systemische Inflammationsreaktion einher [2]. Je älter die Patienten sind, desto häufiger beeinflussen Vorerkrankungen die Entstehung einer systemischen Inflammation bzw. Sepsis [2]. Eine systemische Inflammationsreaktion kann zu Komplikationen führen, wie das *Systemic Inflammatory Response* Syndrom (SIRS), postoperatives Vorhofflimmern (*postoperative atrial fibrillation*, POAF), Niereninsuffizienz oder postoperative Infektionen und ist somit einer der relevantesten Ursachen für Komplikationen in der Herzchirurgie. Dieses resultiert aus mehreren biochemischen Mechanismen, darunter die chirurgische Inzision, die Ischämie-Reperfusionsschädigung nach kardiopulmonalem Bypass sowie der Blutkontakt mit Fremdmaterialien, der zur Freisetzung mitochondrialer DNA (mtDNA) im Sinne eines *Damage-Associated Molecular Pattern* (DAMP) und zur Aktivierung inflammatorischer Signalwege führt. Es kommt zur Aktivierung von inflammatorischen Zellen mit Cytokinproduktion und oxidativem Stress [3]. Es ist somit von großer Bedeutung, eine Inflammation schnellstmöglich zu diagnostizieren, um die Mortalität zu senken [4]. Durch die physiologischen postoperativen Veränderungen der Vital- und Infektionsparameter, können pathologische Befunde kaschiert werden und somit die Diagnostik erschwert werden. Hierdurch erklärt sich

¹ Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird im Folgenden auf eine geschlechterspezifische Differenzierung verzichtet. Sämtliche personenbezogenen Bezeichnungen gelten im Sinne der Gleichbehandlung gleichermaßen für alle Geschlechter.

das zunehmende wissenschaftliche Interesse an alternativen, spezifischeren Biomarkern.

Mitochondriale DNA (mtDNA) ist ein körpereigenes Molekül, das sich in den Mitochondrien der Zellen befindet und ausschließlich maternal vererbt wird [5]. Während kardiochirurgischen Eingriffen aktiviert mtDNA den *Toll-like-receptor-9* (TLR-9), der eine zentrale Rolle in der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten spielt [6–8]. Er wird von verschiedenen Zellen wie Endothel- und neutrophilen Zellen freigesetzt und ist Teil der angeborenen Immunantwort. Weiter trägt mtDNA zur Bildung von *neutrophil-extracellular traps* (NETs) bei [9, 10]. Aufgrund der breiten physiologischen Funktion von mtDNA in der Inflammation konnten bereits erhöhte Plasmakonzentrationen von mtDNA bei Patienten mit Sepsis, schweren Traumata und malignen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden [9, 11, 12]. Da kardiochirurgische Patienten mit Nachweis einer systemischen Inflammation eine Erhöhung der mtDNA in ihrem Blut zeigten, könnte dies auch vielfältige weitere Veränderungen im Organismus hervorrufen. Unter anderem scheint eine erhöhte Konzentration von mtDNA im Plasma mit einer höheren Inzidenz von POAF in Verbindung stehen [7, 13, 14]. Somit könnte die Quantifizierung der mtDNA potenziell dazu beitragen, Inflammationen schneller zu detektieren und folglich auch zu therapieren. Im Folgenden sollen die Grundlagen der Kardiochirurgie, die Pathophysiologie und die damit verbundenen Komplikationen näher erläutert werden.

1.2 Grundlagen der Kardiochirurgie

1.2.1 Indikation zum kardiopulmonalen Bypass

Herzchirurgische Eingriffe können entweder am schlagenden Herzen oder am stillstehenden Herzen durchgeführt werden. Eingriffe wie der Ersatz oder die Rekonstruktion von Herzklappen erfordern eine Eröffnung der Herzhöhlen mit unter einem Herzstillstand und können daher nicht am schlagenden Herzen durchgeführt werden. Bei aortokoronaren Bypass (ACB)-Operationen ist der Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine abhängig vom gewählten Operationsverfahren sowie von patientenspezifischen und intraoperativen Faktoren. In den genannten Situationen

übernimmt die Herz-Lungen-Maschine unter Anwendung des kardiopulmonalen Bypasses (CPB) temporär die Funktion von Herz und Lunge. Ziel dieses Verfahrens ist die Aufrechterhaltung der systemischen Perfusion und Oxygenierung während der operativen Intervention. Darüber hinaus kann der CPB in ausgewählten klinischen Konstellationen, beispielsweise bei ausgeprägter hämodynamischer Instabilität oder im Rahmen eines kardiogenen Schocks, als Form der extrakorporalen Kreislaufunterstützung eingesetzt werden. In diesen Fällen dient das Verfahren der Stabilisierung der systemischen Blut- und Sauerstoffversorgung sowie der Reduktion des Risikos sekundärer Organischämien. Die Durchführung und Überwachung des Verfahrens erfolgen kontinuierlich durch ein interdisziplinäres Team aus Anästhesie und Kardiotechnik, während der herzchirurgische Eingriff vorgenommen wird [15].

1.2.2 Aufbau eines kardiopulmonalen Bypasses

Zur Ableitung des venösen Blutes aus dem Patienten erfolgt zunächst die Kanülierung des zentralvenösen Systems. Die Wahl der Kanülierungsstrategie richtet sich nach dem geplanten Eingriff, patientenspezifischen Faktoren sowie der chirurgischen Zugangsart. Neben der femoralen Kanülierung bei minimal-invasiven Verfahren stellt die zentrale Kanülierung des rechten Vorhofs mit Platzierung der Kanüle in die Vena cava inferior und gegebenenfalls die Vena cava superior eine häufig angewandte Technik dar [15]. Der venöse Blutrückfluss erfolgt dabei primär passiv entlang eines Druckgradienten zwischen dem venösen Gefäßsystem des Patienten und dem extrakorporalen Kreislauf. Dieser Rückfluss wird überwiegend durch Schwerkraft ermöglicht und kann bei Bedarf durch eine moderate Unterdruckunterstützung (vacuum-assisted venous drainage, VAVD) stabilisiert werden. Das abgeleitete venöse Blut wird dem extrakorporalen Kreislauf zugeführt und mittels der arteriellen Blutpumpe durch den Oxygenator und den Wärmetauscher transportiert. Der Oxygenator ermöglicht über eine mikroporöse Hohlfasermembran den Gasaustausch, wobei Blut- und Gaskompartiment voneinander getrennt bleiben. In diesem Prozess erfolgt die Oxygenierung des Blutes sowie die Elimination von Kohlenstoffdioxid.

Das oxygenierte und decarboxylierte Blut wird anschließend über eine arterielle Kanüle, typischerweise in die Aorta ascendens, in den systemischen Kreislauf zurückgeführt.

Die Aufrechterhaltung der systemischen Perfusion wird durch die extrakorporale Blutpumpe gewährleistet, während der Oxygenator die pulmonale Gastransferfunktion übernimmt. Anpassungen der Blutflussrate sowie des Gasflusses ermöglichen eine kontrollierte Steuerung der Perfusions- und Oxygenierungsparameter.

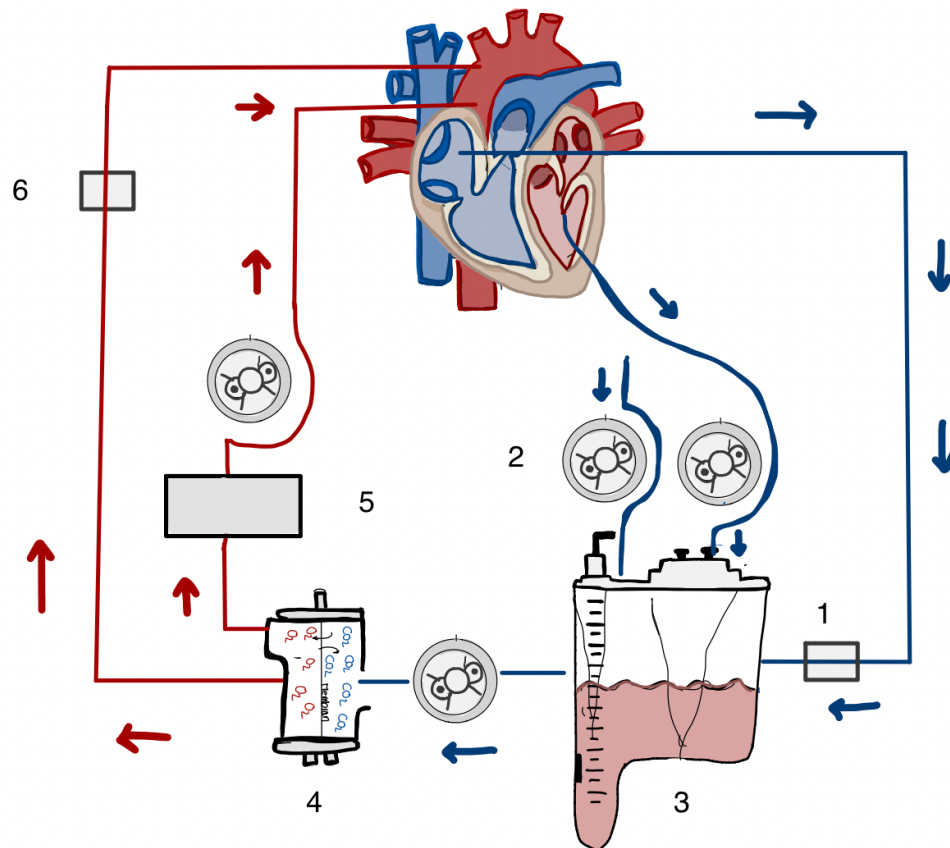


Abbildung 1: Schema eines kardiopulmonalen Bypasses. konventionelle HLM (eigene Grafik)

1=venöse Klemme, 2= Rollenpumpe, 3=Reservoir, 4=Oxygenator und Wärmetauscher, 5= Kardioplegie, 6=arterielle Klemme

Zur weiteren Optimierung der extrakorporalen Zirkulation wurden in den vergangenen Jahrzehnten verschiedene technische Modifikationen etabliert [16, 17]. Ein wesentlicher Entwicklungsschritt stellt die Einführung der minimalisierten extrakorporalen Zirkulation (MiECC) dar, die insbesondere aufgrund potenzieller protektiver Effekte auf die Organfunktion klinische Bedeutung erlangt hat [18–20]. Die MiECC ist als ein geschlossenes extrakorporales Kreislaufsystem definiert, das sich durch eine Reduktion der blutkontaktierenden Fremdoberflächen sowie des

Priming-Volumens auszeichnet [16]. Diese Effekte werden primär durch die Minimierung des Schlauchsystems, den Verzicht auf ein offenes venöses Reservoir sowie die Integration kompakter Systemkomponenten erzielt. Die Reduktion der Fremdoberflächenexposition führt zu einer verminderten Aktivierung inflammatorischer und hämostaseologischer Systeme. Insbesondere werden eine reduzierte Hämolyse, eine geringere Aktivierung zellulärer Blutbestandteile sowie eine abgeschwächte Zytokinfreisetzung beschrieben [21]. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Konzentrationen proinflammatorischer Mediatoren, darunter Interleukin-6 (IL-6), unter Anwendung der MiECC im Vergleich zum konventionellen CPB reduziert sind und teilweise Werte erreichen, die mit Eingriffen am schlagenden Herzen vergleichbar sind [22–24]. Auf die pathophysiologische Bedeutung inflammatorischer Mediatoren wird im weiteren Verlauf eingegangen.

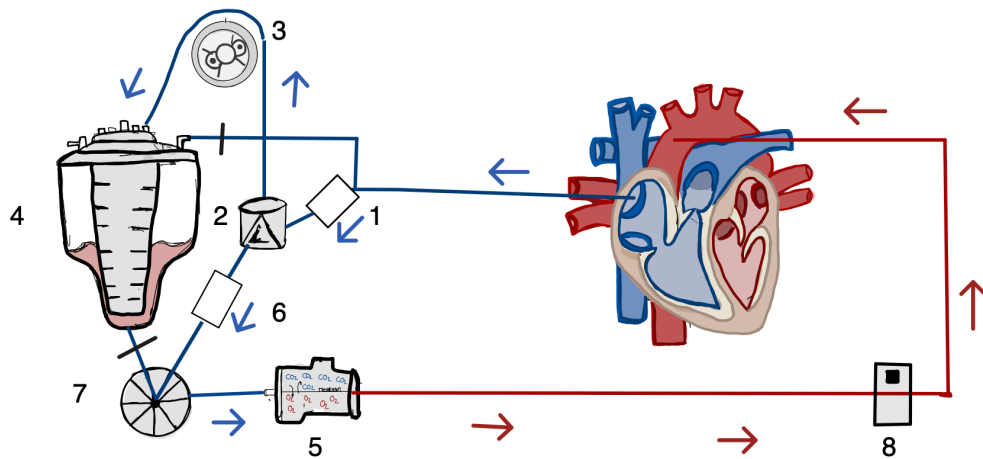


Abbildung 2: Schema eines kardiopulmonalen Bypasses Mini-Maschine (MiECC 4; so in Gießen verwendet) (eigene Grafik)
 1= venöse mechanische Klemme, 2=Luftfalle, 3= Rollenpumpe, 4= Reservoir, 5=Oxygenator und Wärmetauscher, 6= arterielle Klemme, 7=Zentrifuge, 8=Luftdetektor/ mechanische Klemme

1.3 Komplikationen bei kardiochirurgischen Eingriffen

1.3.1 Postoperatives Vorhofflimmern

Vorhofflimmern (VHF) stellt eine der häufigsten supraventrikulären Herzrhythmusstörungen dar und ist durch eine ungeordnete elektrische Aktivität der Vorhöfe charakterisiert. Elektrokardiographisch zeigt sich das Fehlen von P-Wellen bei gleichzeitig unregelmäßiger ventrikulärer Überleitung. Die Kammerfrequenz wird dabei maßgeblich durch die Leitungseigenschaften des atrioventrikulären Knotens bestimmt und weist typischerweise eine absolute Arrhythmie auf. Die gestörte atriale Kontraktion führt zu einer Beeinträchtigung der atrioventrikulären Synchronisation, wodurch das Herzzeitvolumen, insbesondere bei vorbestehender kardialer Dysfunktion, reduziert sein kann. Die Entstehung von VHF beruht auf einem komplexen Zusammenspiel aus strukturellen, elektrischen und autonomen Veränderungen des Vorhofmyokards. Als wesentliche pathophysiologische Grundlage gilt das atriale Remodeling, das durch Prozesse wie Fibrose, myokardiale Dehnung, Veränderungen der Ionenkanalfunktion sowie inflammatorische Mechanismen geprägt ist [25–27]. VHF tritt häufig im Kontext kardiovaskulärer Grunderkrankungen auf, darunter Klappenvitien, arterielle Hypertonie oder myokardiale Erkrankungen. Darüber hinaus können systemische Faktoren wie Infektionen, metabolische Störungen oder inflammatorische Prozesse zur Initiierung und Aufrechterhaltung der Arrhythmie beitragen [26, 27].

POAF stellt eine häufige Komplikation nach herzchirurgischen Eingriffen dar. Die Inzidenz variiert abhängig vom Operationsverfahren und liegt typischerweise zwischen 20 % und 50 % [28]. Trotz der hohen klinischen Relevanz ist der zugrunde liegende Pathomechanismus nicht vollständig geklärt. Gegenwärtig wird POAF als Ausdruck eines multifaktoriellen Prozesses verstanden, bei dem präexistierende strukturelle Vulnerabilität des Vorhofmyokards mit operationsassoziierten Triggermechanismen interagiert. Eine zentrale Rolle kommt hierbei inflammatorischen Prozessen zu. Herzchirurgische Eingriffe sowie der Einsatz des CBP führen zu einer systemischen und lokalen Entzündungsreaktion, die mit einer Aktivierung zellulärer und humoraler Immunmechanismen einhergeht. Die resultierende Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren, darunter Interleukin-6

(IL-6) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), wird mit Veränderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften des Vorhofmyokards in Verbindung gebracht [29]. Inflammatorische Prozesse können zur Ausbildung eines transienten atrialen Remodelings beitragen, welches durch interstitielles Ödem, Veränderungen der Leitungseigenschaften sowie eine erhöhte elektrische Heterogenität gekennzeichnet ist [26]. POAF ist somit als Resultat der Wechselwirkung zwischen Prädisposition und operationsbedingten Triggerfaktoren zu verstehen.

1.3.2 Niereninsuffizienz

Die Niereninsuffizienz beschreibt einen pathophysiologischen Zustand, bei dem die Nieren ihre physiologischen Funktionen nicht mehr in ausreichendem Maße erfüllen können. Hierzu zählen insbesondere die glomeruläre Filtration, die Regulation des Flüssigkeits- und Elektrolythaushalts sowie die Elimination metabolischer Abfallprodukte. Klinisch kann zwischen einer akuten Nierenschädigung (acute kidney disease, AKI) und einer chronischen Niereninsuffizienz (chronic kidney disease, CKD) unterschieden werden. Beide Entitäten unterscheiden sich hinsichtlich Ätiologie, zeitlichem Verlauf und potenzieller Reversibilität. Im Rahmen dieser Arbeit liegt der Fokus auf der akuten Nierenschädigung, welche eine relevante postoperative Komplikation nach herzchirurgischen Eingriffen darstellt.

1.3.2.1 Akute Niereninsuffizienz

Die AKI ist durch einen plötzlichen Abfall der glomerulären Filtrationsrate (GFR) charakterisiert. Klinisch manifestiert sich dies typischerweise durch einen Anstieg des Serumkreatinins, eine Akkumulation nierenpflichtiger Substanzen (z. B. Harnstoff) sowie mögliche Störungen des Elektrolythaushalts, insbesondere Hyperkaliämie. Die hieraus resultierenden Komplikationen umfassen unter anderem Volumenüberladung, Elektrolytverschiebungen, urämische Symptome sowie eine veränderte Pharmakokinetik renaler Eliminationsprozesse [30]. Die therapeutischen Maßnahmen richten sich nach Ursache und Schweregrad der Nierenschädigung. In fortgeschrittenen Stadien kann die Durchführung eines Nierenersatzverfahrens, beispielsweise einer Hämodiafiltration, erforderlich werden. Pathophysiologisch

beruht die AKI auf einem komplexen Zusammenspiel hämodynamischer, mikrozirkulatorischer und zellulärer Mechanismen. Insbesondere perioperative Faktoren wie vorübergehende Perfusionsstörungen, Ischämie-Reperfusionprozesse sowie inflammatorische Reaktionen tragen wesentlich zur Entstehung der Nierenschädigung bei. Im Kontext herzchirurgischer Eingriffe kommt der systemischen Entzündungsreaktion eine besondere Bedeutung zu. Die Aktivierung inflammatorischer Signalwege kann zu endothelialer Dysfunktion, Störungen der renalen Mikrozirkulation sowie einer erhöhten vaskulären Permeabilität führen. Diese Prozesse begünstigen die Ausbildung tubulärer Zellschäden und funktioneller Filtrationsstörungen. Die postoperative AKI stellt eine häufige Komplikation sowohl nach kardiochirurgischen als auch nach großen nicht-kardiochirurgischen Eingriffen dar [31] und ist mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert [32].

1.3.3 Postoperative Infektionen

Infektionen stellen ebenfalls eine häufige Komplikation nach Operationen dar. Neben Wundinfektionen kann es im perioperativen Rahmen auch zu nosokomialen Pneumonien, Harnwegsinfektionen und Katheter-assoziierten Blutstrominfektionen kommen. Die Rate an postoperativen Infektionen nach herzchirurgischen Infektionen variiert deutlich von 4,2 bis 26,2 %, was mit unterschiedlichen Definitionen der Infektionen erklärbar ist.[33] Vergleicht man alle nosokomialen Infektionen, ist der Anteil an Wundinfektionen am höchsten (24%), gefolgt von Harnwegsinfektionen (23%). Die nosokomiale Infektion der unteren Atemwege (75% Pneumonien, 25% Tracheobronchitis) und die Katheter-assoziierte Infektion sind seltener (22% Pneumonie, 6% Katheter-assoziierte Infektion), jedoch auf einer Intensivstation von hoher Relevanz. Besonders die Pneumonien sind mit der Notwendigkeit einer invasiven Beatmung assoziiert [31].

1.3.4 Systemic Inflammatory Response Syndrome

Das SIRS ist die klinische Bezeichnung für eine übermäßige und systemische Entzündungsreaktion im Körper auf verschiedene Auslöser. SIRS kann durch eine

Vielzahl von Zuständen oder Krankheiten verursacht werden, darunter Traumata, Verbrennungen, Operationen und andere Erkrankungen [32].

Die diagnostischen Kriterien für SIRS umfassen mind. zwei der vier Folgenden:

Atemfrequenz $\geq 20/\text{min}$ ($p_a\text{CO}_2 \leq 33 \text{ mmHg}$)

Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$

Temperatur $\geq 38^\circ\text{C}$ bzw. $\leq 36^\circ\text{C}$

Leukozytenzahl $\geq 12\,000/\text{mm}^3$ oder $\leq 4\,000/\text{mm}^3$; $\geq 10\%$ unreife Leukozyten im Differentialblutbild [32]

Das SIRS kann ein Hinweis auf eine schwerwiegende Krankheit oder einen Zustand sein, der dringend medizinische Aufmerksamkeit benötigt. Es ist hierbei wichtig die zugrunde liegende Ursache zu identifizieren und zu behandeln, da SIRS zu einem Multiorganversagen führen kann [32]. Im Folgenden wird auf die pathophysiologischen Reaktionen auf den CPB eingegangen.

1.4 Pathophysiologie der Inflammationsreaktion im Rahmen von kardiochirurgischen Operationen unter dem Einsatz eines kardiopulmonalen Bypasses

Die Pathophysiologie der systemischen Inflammation im Rahmen eines CPBs ist komplex und beinhaltet verschiedene, miteinander interagierende Signalwege. Der Blutkontakt zu den Fremdoberflächen des CPBs, die Erhöhung der Gefäßpermeabilität, die Ischämie- und Reperfusionsschäden, sowie das große chirurgische Trauma und die Hypothermie während der Operation sind potentielle Trigger für die systemische Immunantwort, indem sie eine Akute-Phase-Reaktion induzieren [34–37]. Kardiochirurgische Patienten stellen ein besonderes Patientenkontingent dar, da hier bereits präoperativ die Gewebepерfusion vermindert sein kann [35]. Wie sich der CPB auf die systemische Inflammation auswirkt, ist Gegenstand zahlreicher Studien. So konnte gezeigt werden, dass die Inzidenz für ein SIRS bei Patienten die einer ACB-Operation unter Einsatz des CPB, im Vergleich zu Patienten ohne CPB (*off-pump* ACB, OPACB), signifikant höher ist. Daher lässt sich vermuten dass bereits der alleinige Einsatz eines CPB zu einer relevanten

Ausschüttung von Zytokinen führt [28, 38]. Es kommt zu einer Gewebs-, bzw. Zellzerstörung, die durch die nun freigesetzten Zellanteile zum einen proinflammatorische, als auch antiinflammatorische Reaktionen aktivieren kann [35]. Durch die entstandene Immunreaktion und der damit verbundene Immunsuppression kann es im Verlauf zu einer Vielzahl von Komplikationen wie POAF, kardialer und neurologischer Dysfunktion, Niereninsuffizienz, Leberfunktionsstörungen mit Blutungskomplikationen, respiratorischer Insuffizienz, bakteriellen Infektionen bis hin zur Sepsis und letztlich zu einem Multiorganversagen kommen [34, 35]. Risikofaktoren für Patienten, ein postoperatives SIRS zu erleiden, sind Nikotinabusus, prolongierte Ischämie- und CPB-Zeiten, präexistente chronische Entzündungen und Diabetes mellitus [15, 34].

Der Kontakt zwischen Blut und Fremdoberfläche führt zur Aktivierung des Komplementsystems, vor allem über den alternativen Weg, wodurch Proteasen und freie Sauerstoffradikale freigesetzt werden [35]. Diese können die Endothelzellen weiter schädigen. Zusätzlich bewirkt die Komplementaktivierung die Freisetzung der Faktoren C3a und C5a, die anaphylaktische und chemotaktische Eigenschaften aufweisen [34]. Nach Verwendung der CPB werden vermehrt proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), IL-6 und IL-8 beobachtet, während das antiinflammatorische Zytokin IL-10 reduziert ist. Dieses Ungleichgewicht trägt möglicherweise zur Entwicklung eines SIRS bei [34]. Studien zeigen, dass hohe Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine mit einem schlechten Outcome nach Herzoperationen assoziiert sind [34]. TNF- α und IL-1 β beeinträchtigen die kontraktile Funktion des Myokards, indem sie die Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum hemmen [34]. TNF- α kann zudem glomeruläre Fibrinablagerungen und Vasokonstriktionen verursachen, was eine Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und eine Nierenfunktionsstörung begünstigt [39]. Zytokine und Endotoxine induzieren außerdem die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) durch die inducible nitric oxide synthase (iNOS). NO bewirkt eine Vasodilatation und erhöht die Gefäßpermeabilität, insbesondere in den Pulmonalgefäßen. Dies führt zu einer Störung der pulmonalen Barrierefunktion mit Lungenödem und eingeschränkter Sauerstoffversorgung [34]. Der Verlust des Gefäßtonus, das Austreten von Kapillarflüssigkeit und die Extravasation von

Leukozyten führen letztlich zu Organstörungen. Myokardiale Hypoxie und Ischämie wirken zusätzlich als proinflammatorische Stimuli [34].

Auf molekularer Ebene beginnt die Immunantwort mit der Erkennung von *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs), wie dem *High-Mobility-Group-Box Protein 1* (HMGB1), Histonen oder Interleukin-1 (IL-1) [9, 40]. Diese endogenen Moleküle werden von geschädigten oder abgestorbenen Zellen freigesetzt und binden an *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) wie TLRs [9, 40]. Dies aktiviert das angeborene Immunsystem und fördert Entzündungsreaktionen [9, 40–42]. Ähnliche Prozesse werden durch Pathogene via den *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) beispielsweise durch den Kontakt mit den bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) ausgelöst [9, 40]. Dagegen erfolgt die Freisetzung von DAMPs unter anderem durch Traumata, nicht-infektiöse Entzündungen und kardiochirurgische Eingriffe mit Einsatz der CPB [7, 9, 40, 41]. PRRs erkennen DAMPs oder PAMPs, stimulieren die Phagozytose und Entzündungsreaktionen und initiieren die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen und Interferonen, wodurch eine entzündliche Signalkaskade gestartet wird [9, 40]. Durch die ausgelöste Apoptose und den Zellzerfall kommt es zu einer Freisetzung von extrazellulären Nukleinsäuren. Diese können selbst als DAMPs die Immunreaktion beschleunigen. Hierauf soll im folgenden Abschnitt genauer eingegangen werden.

1.4.1 Mitochondriale Nukleinsäuren während kardiochirurgischer Eingriffe

Extrazelluläre DNA (*extracellular DNA*, ecDNA) bezeichnet freie DNA-Fragmente, die außerhalb von Zellen im Blutkreislauf zirkulieren. Sie stammt aus verschiedenen Quellen, darunter Zellnekrose, Apoptose und aktive Sekretionsmechanismen [43]. Im Kontext des CPB spielt ecDNA eine besondere Rolle, da der Einsatz der HLM eine Reihe von zellulären Stressreaktionen hervorruft. Die mechanische Belastung, die künstliche Fremdoberfläche des Oxygenators sowie die durch die extrakorporale Zirkulation ausgelöste inflammatorische Reaktion tragen zur verstärkten Freisetzung von DNA in den Blutkreislauf bei. Dabei werden sowohl nukleäre DNA als auch mtDNA in das Blut freigesetzt, die als potenzielle Mediatoren inflammatorischer Prozesse betrachtet werden [7]. Während es bereits beschrieben ist, dass die

Konzentration von nukleärer ecDNA bei prolongierter HLM-Dauer ansteigt und sie auch bereits als potentieller Biomarker für das Auftreten eines AKI diskutiert wurde, ist dies nur im geringen Maße für die mitochondriale DNA beschrieben[44–47].

1.4.2 Mitochondriale DNA als proinflammatorischer Faktor

Ein besonderes Augenmerk liegt auf der mtDNA, die immunologisch als DAMP erkannt wird. Im Gegensatz zur nukleären DNA besitzt mtDNA CpG-reiche, nicht-methylierte Sequenzen, die durch Bindung an TLR9 eine starke Immunantwort auslösen können [43]. Die Freisetzung von mtDNA während der CPB könnte somit wie oben beschrieben zur systemischen Inflammation beitragen und postoperativ zu Organdysfunktionen, verstärkter Thrombozytenaktivierung und endothelialer Dysfunktion führen [14].

Die aktuelle Studienlage zeigt, dass bereits erhöhte Level von mtDNA bei Patienten mit Sepsis, Trauma und maligner Erkrankungen in Verbindung gebracht werden konnten und zu Nierenschädigungen, Thrombozytenfunktionsstörungen und weiteren Komplikationen führen können [9, 11, 12]. Aktuell existieren nur wenige Studien, die untersucht haben, wie sich die Plasmakonzentration von mtDNA bei CPB verhält und welche Einflüsse dies auf den Organismus hat. Eine erhöhte Inzidenz von POAF nach CPB in Verbindung mit der Ausschüttung von mtDNA konnte bereits gezeigt werden [7]. Somit könnte die mtDNA ggf. als Biomarker zur Erkennung dieser und weiterer Komplikationen genutzt werden. Bei genauerer Betrachtung ist zu erkennen, dass die Untersuchung von mtDNA ausschließlich bei Patienten, die sich einer herzchirurgischen Operation mit cCPB unterzogen, durchgeführt wurden [6, 7, 13, 14, 48]. Da bei der MiECC bereits gezeigt werden konnte, dass die Zytokinausschüttung scheinbar mit der Größe der Fremdoberfläche korreliert und ähnlich gering ist wie bei OPACB stellt sich die Frage, ob auch die Menge an frei zirkulierender mtDNA bei einer MiECC geringer als bei einem cCPB ist [21–23, 49]. Dieser Zusammenhang wurde bisher noch nicht untersucht.

2 Fragestellung

Kardiochirurgische Eingriffe sind, insbesondere unter Einsatz des CPB, in Deutschland weit verbreitet und häufig bei älteren Patienten mit relevanten Vorerkrankungen notwendig. Dabei kommt es jedoch häufig zu SIRS aufgrund von Faktoren wie Ischämie-, Reperfusionsschäden, Fremdoberflächenkontakt und hypothermischem Stress. Diese Inflammation ist mit Komplikationen wie POAF, AKI und systemischen Infektionen assoziiert, die das postoperative Outcome negativ beeinflussen. MtDNA spielt eine zentrale Rolle in der Inflammationskaskade, da sie durch Aktivierung die TLR-9-positiven neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten stimuliert. Bisherige Studien zeigten, dass mtDNA-Plasmaspiegel bei kardiochirurgischen Patienten mit systemischer Inflammation erhöht sind, so dass sie einen potenziellen Biomarker für die frühzeitige Diagnostik und Therapie der SIRS-Komplikationen darstellen könnten. Die Identifizierung spezifischer Biomarker wie mtDNA könnte somit einen wichtigen Beitrag zur Optimierung der Therapie und Prognose kardiochirurgischer Patienten leisten.

Neben traditionellen CPB-Systemen wurden in den letzten Jahren Technologien wie die MiECC entwickelt, um Inflammationsprozesse und damit verbundene Komplikationen zu reduzieren. Diese Methoden minimieren den Kontakt des Bluts mit nicht-endothelialen Oberflächen und zeigen positive Effekte auf Myokard-, Nieren- und neurologische Funktionen. Trotzdem bleibt der genaue Pathomechanismus vieler Komplikationen, wie POAF, unklar, was weitere Forschung erfordert. Es existieren insgesamt nur wenige wissenschaftliche Studien zur mtDNA-Dynamik bei kardiochirurgischen Eingriffen und speziell zu herzchirurgischen Eingriffen mit MiECC fehlen sie bisher vollständig [6, 7, 13, 14, 48].

Die Haupthypothese dieser Studie ist es, dass der Einsatz der MiECC im Vergleich zum cCPB zu einer verringerten Freisetzung freier mtDNA führt. Daraus ergeben sich folgenden Fragestellungen:

Hauptfragestellung

Ist die Menge an freigesetzter mtDNA bei der Verwendung der MiECC signifikant geringer ist als bei dem Einsatz einer cCPB?

Für den Fall, dass sich die Haupthypothese bestätigt, wurde eine Subhypothese erstellt. Hierzu wurde postuliert, dass eine verringerte mtDNA-Freisetzung zu einer Reduktion von postoperativen Komplikationen nach CPB führt. Somit könnte die Menge an mtDNA mit den Komplikationen korrelieren. Hierzu wurde folgende Sekundärfragestellungen definiert:

Sekundärfragestellungen

Korreliert die Menge an frei zirkulierender mtDNA mit dem Auftreten einer akuter Niereninsuffizienz bei Patienten nach herzchirurgischen Eingriffen mit CPB?

Korreliert die Menge an frei zirkulierender mtDNA mit dem Auftreten eines postoperativen Vorhofflimmerns bei Patienten nach herzchirurgischen Eingriffen mit CPB?

Korreliert die Menge an frei zirkulierender mtDNA mit dem Auftreten postoperativen Infektionen bei Patienten nach herzchirurgischen Eingriffen mit CPB?

Korreliert die Menge an frei zirkulierender mtDNA mit der Readmissionsrate auf die Intensivstation bei Patienten nach herzchirurgischen Eingriffen mit CPB?

3 Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Es handelt sich um eine Sekundäranalyse einer prospektiven, explorativen Single-Center-Studie. Alle Patienten erhielten eine ACB-Operation an der Universitätsklinik Gießen. Die lokale Ethikkommission genehmigte sowohl die Primärstudie, als auch die sekundäre Datenanalyse (Justus-Liebig-Universität Gießen, AZ 30/16, Zustimmung zum Amendment am 03.07.2018) Die Primärstudie wurde im German Clinical Trials Register registriert (DRKS00010959). Beide Studien wurden in Übereinstimmung mit der Helsinki-Erklärung durchgeführt und die Methoden und Ergebnisse sind gemäß der Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) Guidelines dargestellt.

3.2 Studienpopulation

In der primären Studie wurden 90 Patienten eingeschlossen von denen 45 mit einem „goal-directed-treatment“ Protokoll hämodynamisch optimiert wurden. Um den therapeutischen Effekt der hämodynamischen Intervention auszuschließen, wurden nur die nicht optimierten Patienten in diese Studie eingeschlossen. Somit wurden 45 Patienten eingeschlossen.

3.2.1 Ein-und Ausschlusskriterien

Zwischen September 2016 und Dezember 2018 wurden fortlaufend alle Patienten die mindestens 18 Jahre alt und für eine elektive ACB-Operation vorgesehen waren registriert. Alle eingeschlossenen Patienten unterschrieben eine Einwilligung zur Teilnahme an der Studie.

Die Ausschlusskriterien waren höhergradige Arrhythmien, hochgradige Herz- und Niereninsuffizienz (linksventrikuläre Funktion $\leq 30\%$, Niereninsuffizienz: Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Stadium > 2 [30]), Schwangerschaft oder Stillzeit, gleichzeitige Teilnahme an einer weiteren interventionellen Studie, vorbekannte Autoimmun- oder Infektionserkrankung und immunmodulative Vormedikation.

3.3 Zielparameter

Primärer Zielparameter dieser Studie ist die Menge an quantifizierter freier mtDNA gemessen mittels einer quantitative PCR (qPCR).

Die sekundären Zielparameter sind Outcome-relevante Parameter und die Korrelation mit der Menge an mtDNA:

- POAF
- AKI (definiert als \geq Stadium II nach der Definition von KDIGO [30])
- Wiederaufnahme auf die Intensivstation
- postoperative Infektion (definiert als Pneumonie, Katheter-assoziierte Blutstrominfektion und urogenitale Infektionen)

3.4 Ablauf der anästhesiologischen Versorgung einer koronaren Bypassoperation

Nach der Zustimmung der Patienten an der Studie teilzunehmen sowie der Kontrolle der Einwilligung in die Narkose und in die Operation wurde zunächst das Standardmonitoring angelegt. Dazu zählten die Überwachung der peripheren Sauerstoffsättigung im kapillären Blut (SpO_2), des Elektrokardiogramms (EKG) und des Blutdrucks.

Patienten ohne Studienintervention erhielten vor der Narkoseeinleitung einen arteriellen Katheter in die Arteria radialis. Anschließend wurde die Narkose mit Sufentanil (0,25–0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$), Etomidate (0,1–0,2 mg/kg) und Pancuronium (0,05–0,1 mg/kg) eingeleitet. Die Narkose wurde mittels Propofol (3 $\text{mg}/\text{kg}/\text{h}$) und Sufentanil (0,3–1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$) aufrechterhalten. Danach erfolgte die Platzierung eines zentralvenösen Katheters (ZVK) in die Vena jugularis interna sowie die Anlage eines Blasenkatheters.

Während der gesamten Operation fand eine kontinuierliche Überwachung aller Vitalparameter statt, um die Stabilität des Patienten sicherzustellen. Nach Abschluss der Operation wurde der Patient intubiert und kontrolliert beatmet auf die

Intensivstation aufgenommen, wo die postoperativen Maßnahmen und die weitere Überwachung durchgeführt wurden.

3.4.1 Herz-Lungen-Maschine

Die kardiopulmonalen Bypasssysteme (cCPB und MiECC) basierten auf der S5-Heart-Lung-Machine (LivaNova, London, UK) und waren jeweils mit einem Membranoxygenator ausgestattet (CAPIOX[®] FX 15 Oxygenator [Terumo, Tokio, Japan] für MiECC; Inspire[®] 6F Oxygenator [LivaNova, London, UK] für cCPB). Zudem kam ein hausspezifisches Perfusionskanülensystem (LivaNova, London, UK) zum Einsatz. Für den cCPB wurden eine Rollenpumpe sowie ein zusätzliches Reservoir verwendet, während bei der MiECC eine Zentrifugalpumpe ohne Reservoir und Hämofilter zum Einsatz kam.

Die Kanülierung für die Herz-Lungen-Maschine wurde vom Herzchirurgen durchgeführt. Dabei wurde zunächst die Kanüle für die venöse Drainage in die Vena cava inferior oder superior eingebracht, um das venöse Blut aus dem Körper in das System der Herz-Lungen-Maschine abzuleiten. Die arterielle Rückführung des oxygenierten Bluts erfolgte in der Regel über eine Kanüle, die in die Aorta ascendens eingeführt wurde. Dieser Schritt wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt und setzt eine exakte Platzierung der Kanülen voraus, um eine optimale Funktion der Herz-Lungen-Maschine sicherzustellen.

Das Priming der Herz-Lungen-Maschine wurde mit 1000 mL kristalloider Lösung (Sterofundin Iso[®], Braun, Melsungen, Germany), 250 mL Mannitol 15% (Seraq-Wiessner, Naila, Germany) und 50 mL Humanalbumin 20% (CSL Behring, Marburg, Germany) vorbereitet. Zur Antikoagulation wurden bei der MiECC 10.000 I.E. Heparin und bei der cCPB 2.500 I.E. Heparin verwendet

3.5 Blutentnahmezeitpunkte und Prozessierung

Das Blut wurde zu sechs verschiedenen Zeitpunkten entnommen. Unmittelbar nach Induktion der Narkose wurde die erste Blutentnahme vorgenommen (T1). Während der Operation wurde der Patient an eine HLM angeschlossen, die den Herzkreislauf und die Lungenfunktion übernahm. Die Zeit zwischen dem Anschließen des Patienten an die HLM bis zur Wiederaufnahme des Kreislaufes durch den Patienten, wird als „Bypass-Zeit“ bezeichnet. Jeweils 15 Minuten und 60 Minuten nach Beginn der Bypass-Zeit erfolgten die zweite (T2) und dritte (T3) Blutentnahme. Nach Beendigung der Bypass-Zeit waren drei weitere Blutentnahmen vorgesehen. Die vierte (T4) und fünfte (T5) jeweils 15 Minuten bzw. zwei Stunden nach dem Ende der Bypasszeit. Die sechste und letzte Blutentnahme (T6) erfolgte am ersten postoperativen Tag im Rahmen der Routinelaborentnahme.

Zur Übersicht:

- T1 - Unmittelbar nach Narkoseinduktion
- T2 - 15 Minuten nach Beginn der Bypass-Zeit
- T3 - 60 Minuten nach Beginn der Bypass-Zeit
- T4 - 15 Minuten nach Ende der Bypass-Zeit
- T5 - 120 Minuten nach Ende der Bypass-Zeit
- T6 - Erster postoperativer Tag

Das Blut wurde in Ethylendiamintetraessigsäure- (EDTA) Röhrchen (20mL) über den arteriellen Katheter entnommen.

Zuerst zentrifugierten wir das EDTA-Blut mit 200 g für zehn Minuten bei Raumtemperatur, um das Plasma abzutrennen. Dann folgte eine 1:1 Dilution (jeweils 100 µL Plasma und 100 µL Phosphat-Buffert-Saline (PBS), die daraufhin mit 5.000 g (10 Minuten bei 4°C) zentrifugiert wurde. Der Überstand froren wir zur späteren Weiterverarbeitung (siehe Purifikation von mtDNA aus Patientenplasma) bei -80°C ein. Die klinischen und laborchemischen Daten wurden aus dem Patientendatensystem (IMESO GmbH, Gießen, Deutschland) entnommen. Die weiteren Infektionsparameter Leukozytenanzahl (100.000/µL), C-reaktives Protein (CRP, mg/dL), Procalcitonin (PCT, µg/L), Fibrinogen (g/L), IL-6 (ng/L) und Laborparameter wie das Kreatinin

(mg/dL), die Kreatininkinase (CK, U/L) und die Kreatininkinase MB (CK-MB, U/L) wurden im Routinelabor der Universitätsklinikum Gießen gemessen.

System	Spezifikation
Applied Biosystems	StepOnePlus Real Time PCR Systems
Eppendorf Tubes	2 mL, 1,5 mL PCR clean Pipettenspitzen PCR clean
Hettich Zentrifugen	Mikro 200R
QIAGEN	QIAGEN QIAamp DNA Blood Mini Kit (REF: 51106)
Primer	Eurofins Genomics mitoDNA ND1 FW: 5'-CCA CCT CTA GCC TAG CCG TTT A-3 mitoDNA ND1 RW: 5'-GGG TCA TGA TGG CAG GAG TAA T-3'
Thermo Fisher Scientific	Nanodrop 2000 Spectrophotometer
SyBR Select Master Mix	
Abnahmeröhrchen EDTA	S-Monovette® 7,5ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 1: Materialliste zur Purifikation von mtDNA

3.6 Purifikation von mtDNA aus Patientenplasmen

Die zuvor bearbeiteten und eingefrorenen Plasmadilutionen wurden weiterverarbeitet, um die sich frei im Plasma befindliche mtDNA zu purifizieren. Dabei wurde nach dem Protokoll der Firma Qiagen und dem zugehörigen Purifikations-Kit (Qiagen QIAamp DNA Blood Mini Kit) vorgegangen. Von der in diesem Kit enthaltene Proteinkinase K wurden 15 µL mit 200 µL der Probe und 200 µL des „Buffer AL“ gemischt und für 15 Sekunden auf einer Platte gerüttelt. Dieses Gemisch inkubierte für 10 Minuten bei 56°C in einem Wärmeblock. Um zu verhindern, dass Teile der Probe am Rand des Eppendorfgefäßes hafteten, wurde die Lösung ein weiteres Mal für eine Minute bei 6000 g zentrifugiert. Als nächster Schritt folgte nun die Hinzugabe von 200 µL 96-100%igem Ethanol. Nach erneutem Rütteln und Zentrifugation mit 6000 g für eine Minute, wurde die gesamte entstandene Lösung in spezielle Gefäße pipettiert und ein weiteres Mal für eine Minute bei 6000 g zentrifugiert. Die speziellen Gefäße bestehen aus einer Säule, die die zuvor lysierten Bestandteile der Lösung aufnimmt, und einem Sammelröhrchen, in das die übrigen flüssigen Bestandteile abfließen und verworfen werden können. Nach der Durchführung wurden 500 µL der Lösung „Buffer AW1“ in die Säule pipettiert und der Vorgang wiederholt, um die Säule auszuwaschen. Dies wurde ein weiteres Mal mit der Lösung „Buffer AW2“ wiederholt, wobei in diesem Durchgang eine höhere Zentrifugationskraft von 20000 g gewählt und drei Minuten zentrifugiert wurde. Zum Abschluss wurden 200 µL der Lösung „Buffer AE“ in die Säule pipettiert und eine Minute bei 6000 g zentrifugiert. Die Flüssigkeit, die sich im nun Sammelröhrchen befand, war die Lösung mit purifizierter mtDNA (Protocol: DNA purification from blood or body fluids (spin Protocol); siehe Anhang).

Wir erhielten 200 µL Reagenz. Dadurch, dass nach der Purifikation ausschließlich die frei im Plasma befindliche mtDNA vorhanden war, konnte im nächsten Schritt die Vervielfältigung dieser ohne bzw. mit möglichst geringen Störfaktoren stattfinden.

3.7 Anfertigen der Standardproben

Die Standardkurven wurden mit einer Plasmid-beinhaltenen humanen NADH-Dehydrogenase 1 (ND1) mtDNA (OriGene Technologies, Rockville, MD, United States) erzeugt. Die Berechnung der Plasmidzahl in verschiedenen Verdünnungen

erfolgte anhand eines Nanodrop 2000 Spectrophotometers (Thermo Fisher Scientific). Hierzu wurde eine bekannte Menge von Plasmid, die durch den Hersteller angegeben war, mit H₂O in Reihe verdünnt und anschließend in der PCR quantifiziert. Letztendlich zeigte sich, dass eine Verdünnungsreihe mit 30-300.000 Kopien pro PCR die Ergebnisbreite abdeckte.

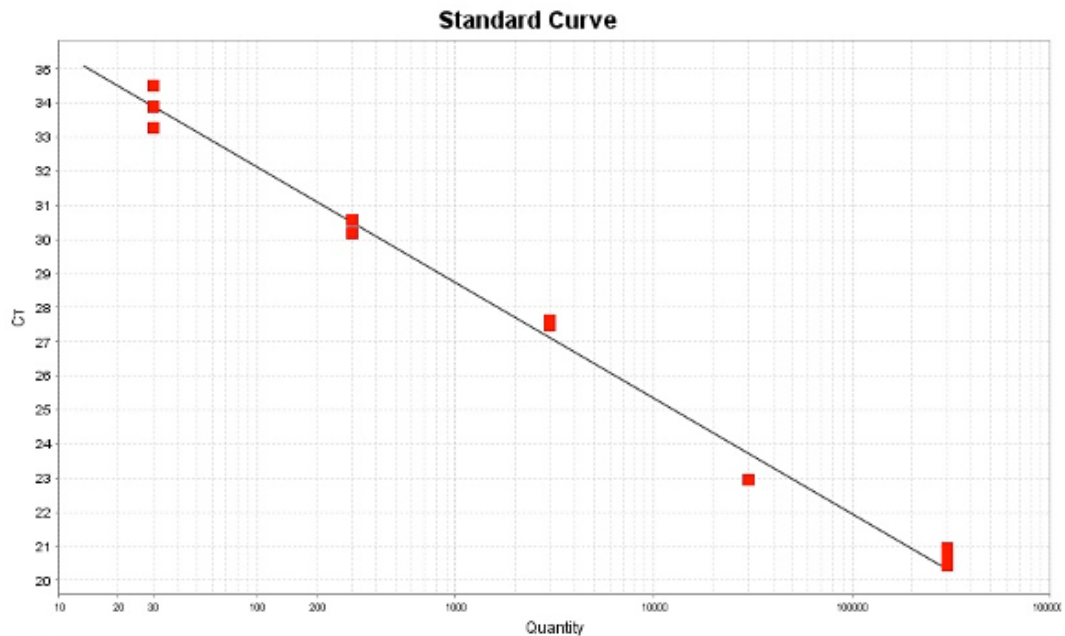


Abbildung 3: Standardkurve der PCR.

3.8 PCR zum quantitativen Nachweis von mtDNA

ND1 kodierende mtDNA ist ein gut beschriebenes und bereits als Surrogatparameter für mitochondriale Schädigung genutztes mitochondriales Zielgen [50–53].

Die qPCR fertigten wir mit Hilfe des StepOnePlus Real Time PCR Systems (Thermo Fisher, Waltham, MA, United States) an. Die entstandenen Daten wurden sowohl als Datensatz, als auch als Diagramm dargestellt. Die Ergebnisse der Triplets wurden gemittelt und in „Kopien/ μ L“ berechnet [54].

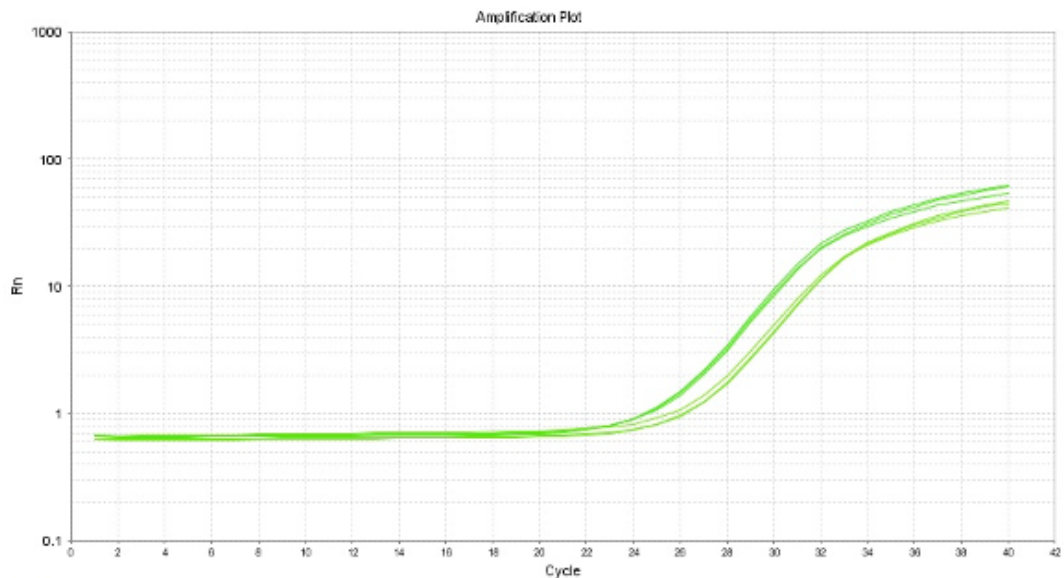


Abbildung 4: Beispiel für zwei qPCR-Messungen mit Tripletten.

Zuerst wurde die Platte (s.u.) vorbereitet, in welche wir die verschiedenen Reagenzien, Standards und Proben unter einer PCR-Bank pipettierten. Die Platte besteht aus 96 Wells. Jede Standard-, jede Negativ- und jede Patientenprobe wurde dreimal pipettiert, um zum einen mögliche Ungenauigkeiten beim Pipettieren zu erkennen und einen möglichst genauen Wert zu erhalten. Bei jeder PCR pipettierten wir insgesamt fünf Standards.

Zuerst wurden pro „Well“ 40 μL „SyBR Select Master Mix“, dann je 4 μL der Primer (“ND1 mtDNA FW: 5'-CCA CCT CTA GCC TAG CCG TTT A-3' ” und “ND1 mtDNA RW: 5'-GGG TCA TGA TGG CAG GAG TAA T-3' ” (hergestellt von Eurofins, Luxembourg, Luxembourg)) pipettiert. Bei der Negativ-Kontrolle gaben wir weitere 32 μL H_2O , bei den Patientenproben 8 μL der oben beschriebenen purifizierten mtDNA des Patienten und 24 μL H_2O hinzu. Der gesamte Vorgang wurde unter einer PCR-Bank durchgeführt, um eine mögliche Kontamination mit Fremd-DNA zu minimieren.

Nach dem oben beschriebenen Pipettiervorgang wurde die Platte in die PCR eingelegt (Thermo Fisher, Waltham, MA, United States) Dies ist eine molekularbiologische Technik, die die Amplifikation von DNA ermöglicht. In der PCR wird die doppelsträngige DNA durch erhöhte Temperaturen in Einzelstränge denaturiert. Die

dabei gemessene Fluoreszenz wurde gemessen, und die resultierende Kurve gab Aufschluss über die spezifischen Schmelztemperaturen der amplifizierten DNA-Fragmente (siehe Abbildung 5).

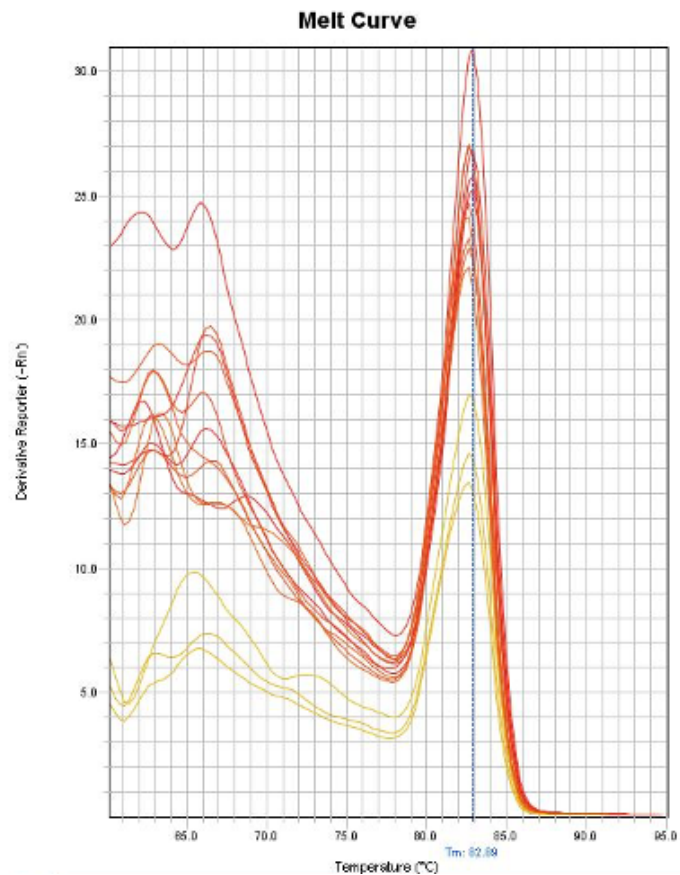


Abbildung 5: Schmelzkurve der PCR.

3.9 Statistische Analyse

Für die Beschreibung der nicht parametrischen Daten nutzen wir den Median und den Interquartilsabstand (*interquartile range*, IQR). Um die Variabilität der Ergebnisse abbilden zu können, sind die Analysen auf den logarithmierten Datensätzen basiert.

Generelle Unterschiede der DNA-Quantität stellten wir mit ANOVA, gefolgt von Tukey HSD Test zur Detektion der statistisch relevanten Unterschiede in den

Studiengruppen bzw. den Blutentnahmezeitpunkten dar. Ein p-Wert von $p < 0,05$ wurde als signifikant erachtet.

Korrelationen zwischen mtDNA und verschiedenen Parametern wurden mit dem Pearson-Korrelations-Koeffizienten berechnet. Die Outcomeparameter wurden über die gesamte Zeit und zum Peak-Zeitpunkt der mtDNA-Konzentration bewertet. Cut-Off Werte für die Menge an mtDNA wurden mittels der AUCROC (*area under the receiver operating curve*) berechnet. Die resultierenden Cut-Off Werte wurden anschließend mit dem Fischertest auf statistische Signifikanz überprüft und anschließend die Odds Ratio's, Sensitivität und Spezifität berechnet. Experimentelle, klinische und Routinelabordaten wurden mit Microsoft Excel (Redmond, WA, USA) erfasst, während die statistische Datenanalyse mit der Statistiksoftware R Version 4.0.4 (2021-02-15; www.r-project.org) erfolgte.

4 Ergebnisse

4.1 Basischarakteristika

Insgesamt wurden 45 Patienten eingeschlossen, von denen 23 mit einer cCPB und 22 Patienten mit einem MiECC operiert wurden. Die Basischarakteristika sind in Tabelle 2 dargestellt. Hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Studiengruppen

Parameter	cCPB (n=23)	MiECC (n=22)	Alle (n=45)
Alter (Jahre)	62 [56-70]	67 [59-73]	65 [57-73]
Männliches Geschlecht	21 (91,3)	17 (77,3)	38 (84,4)
BMI (kg/m ²)	29 [28-31]	28 [24-32]	29 [25-32]
EuroSCORE	0,88 [0,72-1,25]	0,99 [0,74-1,2]	0,96 [0,73-1,24]
Vorerkrankungen			
Angina pectoris	15 (65,2)	15 (68,1)	30 (66,7)
Arterielle Hypertension	21 (91,3)	19 (86,3)	40 (88,9)
Akuter Myokardinfarkt	3 (13,0)	5 (22,7)	8 (17,8)
Myokardinfarkt innerhalb der letzten 90 Tage vor OP	3 (13,0)	8 (36,4)	11 (24,4)
Schwere Klappenvitien (≥2 Grades)	6 (26,1)	1 (4,5)	7 (15,6)
Hirminfarkt	2 (8,6)	3 (13,6)	5 (11,1)
Chronische Nierenerkrankung	1 (4,3)	3 (13,6)	4 (8,9)
COPD	2 (8,6)	2 (9,1)	4 (8,9)
Diabetes	9 (39,1)	6 (27,2)	15 (33,3)
Raucher	12 (52,1)	14 (63,6)	26 (57,8)
Missbräuchlicher Gebrauch von Alkohol	6 (26,1)	8 (36,4)	14 (31,3)
Prozesszeiten			
Dauer der Anästhesie (min)	275,0 [251,0 – 322,0]	279,8 [248,5-320,3]	277,4 [249,5-321,6]
Dauer des CPB (min)	83,0 [68,0 – 103,0]	90,0 [69,5 – 109,5]	84,5 [67,8 – 106,5]
Dauer der invasiven Beatmung (h)	833,0 [602,0 -1001,0]	677,0 [564,0–917,0]	752,5 [576,8 – 987,8]

Tabelle 2: Basischarakteristika Darstellung der Studienkohorten. Daten werden als Median und IQR[Q25-Q75] oder als absolute Zahl und Prozent (n (%)) der Studiengruppe dargestellt. *Abkürzungen:* BMI: Body mass index; COPD: Chronic obstructive pulmonary disease; cCPB: conventional cardiopulmonary bypass; CPB: cardiopulmonary bypass; MiECC: Minimized extracorporeal circulation.

4.2 Quantifizierung der freien mtDNA

4.2.1 Zeitlicher Verlauf

Die Menge an frei zirkulierender mtDNA stieg schnell nach Beginn des CBPs an und erreichte den Höhepunkt 60 Minuten später (Abbildung 6, Tabelle 3, T1 vs. T2: $p < 0,001$; T1 vs. T3: $p < 0,001$; T2 vs. T3: $p = 0,006$). Nach Beendigung des CBPs fiel die Menge der freien mtDNA rapide und erreicht wieder die präoperative Menge (Abbildung 7, Tabelle 3, T3 vs. T4: $p < 0,001$; T3 vs. T5: $p < 0,001$; T3 vs. T6: $p < 0,001$; T1 vs. T4, T5 und T6: $p = 0,88$).

Menge der mtDNA im Plasma (Kopien/ μ L)			
Zeitpunkte	cCPB	MiECC	Alle
Nach Narkoseinduktion (T1)	152,5 [80,9-207,6]	68,2 [26,5-104,9]	91,1 [44,8-175,1]
15 Minuten nach CPB (T2)	673,0 [334,9-1111,2]	316,4 [184,2-683,8]	431,7 [235,5-882,4]
60 Minuten nach CPB (T3)	1818,0[844,2-3932,2]	536,5 [215,7-919,6]	904,8 [266,2-2909,3]
15 Minuten nach Ende des CPB (T4)	155,0 [79,0-361,8]	59,2 [33,2-151,7]	108,3 [40,0-232,1]
120 Minuten nach Ende des CPB (T5)	124,0 [66,9-182,4]	74,6 [52,9-173,0]	104,1 [55,6-191,9]
Erster postoperativer Tag (T6)	72,9 [56,1-196,6]	122,6 [52,6-305,9]	75,9 [52,6-287,4]

Tabelle 3: Ergebnisse der Quantifizierung der mtDNA im Plasma

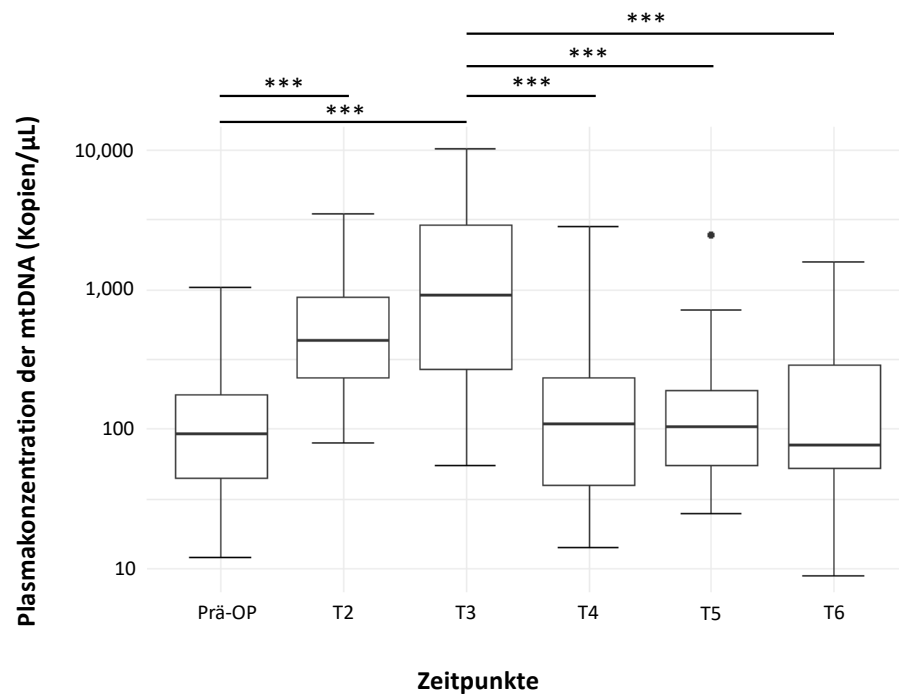


Abbildung 6: Zeitlicher Verlauf der Menge mtDNA in Plasmaproben. Ergebnisse sind dargestellt als Boxplot-Diagramm. ***: $p < 0.001$

4.2.2 Vergleich der mtDNA Konzentration zwischen MiECC und cCPB

Insgesamt war über alle Zeitpunkte die Menge an freier mtDNA im Plasma bei Patienten mit MiECC niedriger im Vergleich zu denen mit cCPB (Abbildung 7, MiECC: 166,8 [65,5- 501,9]; cCPB 190,8 [82-705,7]; $p < 0,001$).

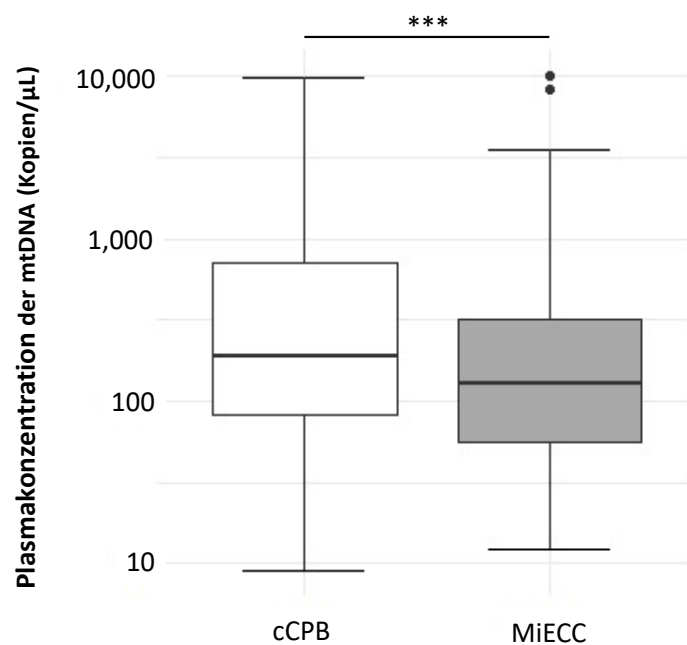


Abbildung 7: Vergleich der Plasmakonzentration von mtDNA zwischen dem konventionelle (cCPB) und minimalisierten CPB (MiECC) über alle Zeitpunkte. Ergebnisse sind als Boxplotdiagramme dargestellt. ***: $p < 0.001$.

Die Plasmakonzentration der mtDNA zeigten dabei vergleichbare Verläufe in beiden Studiengruppen und hatten jeweils ihren Höhepunkt während des CPB (Abbildung 8, Tabelle 3, MiECC: T1 vs. T2: $p < 0,001$; T1 vs. T3: $p < 0,001$; T3 vs. T4: $p < 0,01$; T3 vs. T5: $p < 0,001$; T3 vs. T6: $p < 0,01$; cCPB: T1 vs. T2: $p < 0,001$; T1 vs. T3: $p < 0,001$; T2 vs. T4: $p < 0,01$; T3 vs. T4: $p < 0,001$; T3 vs. T5: $p < 0,001$; T3 vs. T6: $p < 0,001$). Des Weiteren war die Menge an mtDNA bei Patienten mit MiECC geringer. Die Differenz zu cCPB ist jedoch nicht statistisch signifikant.

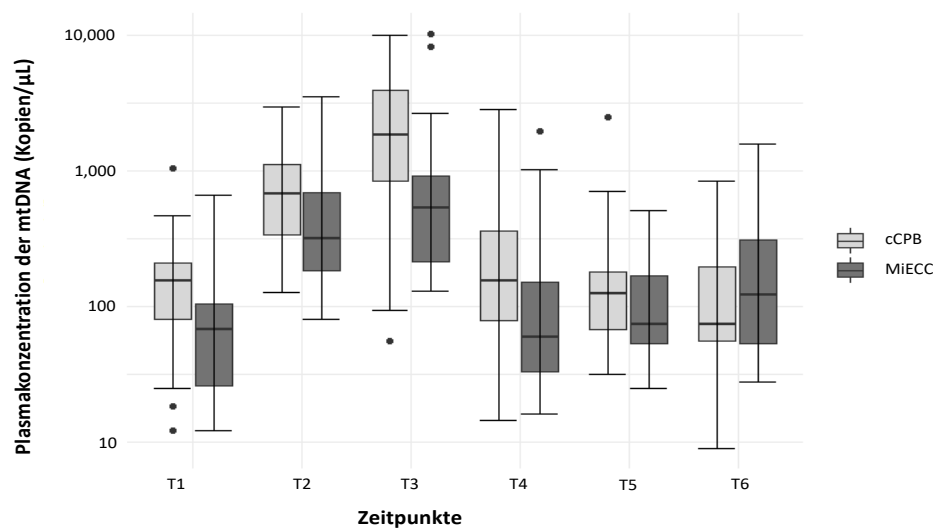


Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf der mtDNA Level in Abhängigkeit der Studiengruppe. Ergebnisse werden als Boxplot-Diagramm dargestellt

4.3 Korrelation zwischen freier mtDNA und der Peakkonzentration während des CPB und den inflammatorischen und ischämischen Parametern

Die Menge an freier mtDNA korrelierte nicht mit inflammatorischen Parametern wie CRP, PCT, Leukozyten und Fibrinogen. Die Peakzeitpunkte entsprachen T2 und T3 und wurden für die folgenden Analysen verwendet.

Die Dauer des CPB korrelierte positiv mit der Menge an freier mtDNA während des CPB (T2 und T3), hatte jedoch knapp die statistische Relevanz verfehlt (Abbildung 9A, Korrelationskoeffizient = 0,3. Bereinigt r^2 : 0,09; $p = 0,051$)

Weiter zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Menge an mtDNA während der CPB (T2 und T3) und der postoperativen Konzentration der CK und CKMB (Abbildung 9B und C; CKMB: Korrelationskoeffizient: 0,47; Bereinigt r^2 : 0,20; $p < 0,001$; CK: Korrelationskoeffizient: 0,61; bereinigt r^2 : 0,3; $p < 0,001$).

Die Menge des postoperativen Troponins korrelierte nicht mit der Menge der mtDNA (Korrelationskoeffizient: 0,24; bereinigt r^2 : 0,06; $p=0,13$).

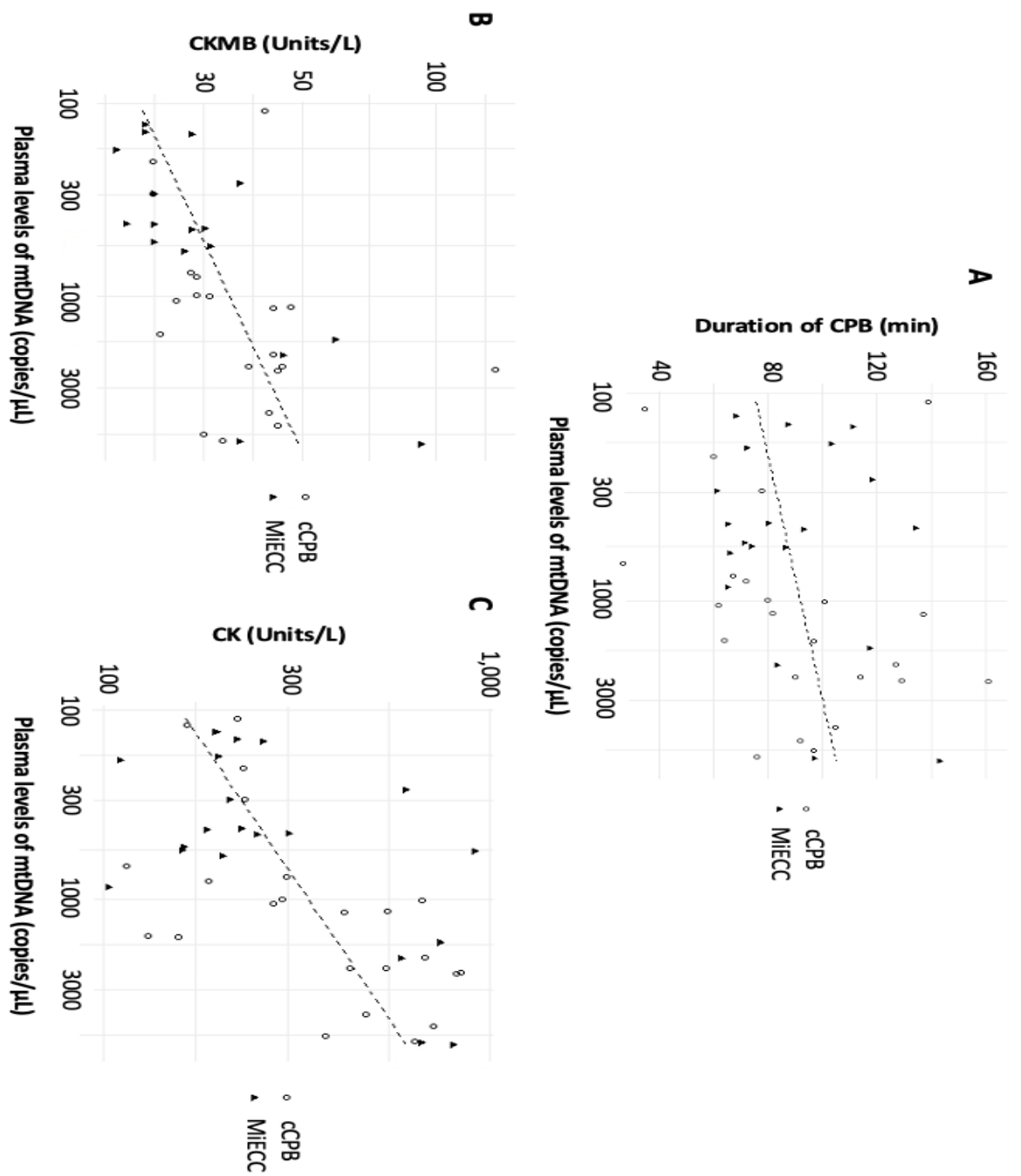


Abbildung 9: Scatter Plot für Korrelationen zwischen mtDNA und Dauer des CPB (A); der Konzentration von CKMB (B) und CK (C).

4.4 Korrelation zwischen freier mtDNA und Outcomeparametern

Die Inzidenz von Komplikationen unterschied sich nicht in beiden Studiengruppen (Tabelle 4). In Zusammenschau hatte die Menge der mtDNA über alle Zeitpunkte keinen Einfluss auf die Outcomeparameter.

Die ROC-Analyse der stark erhöhten Werte nach Beginn des CPB (T2) zeigte eine Vorhersehbarkeit eines POAF ab einem Cut-Off Wert von 637,2 Kopien/ μ L mit einem AUROC von 0,71 [0.53 - 071], beziehungsweise einer Spezifität von 67% und Sensitivität von 75%. Folglich haben Patienten mit einem mtDNA Level von über 650 Kopien/ μ L bei T2, ein fünffach höheres Risiko ein POAF zu entwickeln (Tabelle 4).

Outcome Parameter	Inzidenz der Outcomeparameter pro Studiengruppe	mtDNA > 650 Kopien/ μ L		
		2x2 Kreuztabelle	Odd's Ratio [CI]	p-Wert
AKI	MiECC 4/44	Ja 3/4 (75%)	4.82 [0.35-272.3]	0.29
	cCPB 5/44	Nein 15/40 (38%)		
Wiederaufnahme auf die Intensivstation	MiECC 2/44	Ja 0/3 (0%)	0 [0-3.46]	0.26
	cCPB 1/44	Nein 18/41 (44%)		
POAF	MiECC 3/44	Ja 6/8 (75%)	5.74 [0.86-66.6]	0.048
	cCPB 1/44	Nein 12/36 (33%)		
Postoperative Infektionen	MiECC 2/44	Ja 2/5 (40%)	0.96 [0.07-9.41]	1
	cCPB 3/44	Nein 16/39 (41%)		

Tabelle 4: Outcomeparameter Analyse an Zeitpunkt T2 (Peakkonzentration von mtDNA). Basierend auf der ROC-Analyse ist der Cut-Off Wert 650 Kopien/ μ L gewählt worden. Die Inzidenz wird in Zahlen und Prozent der Patienten mit höherem mtDNA Level als der Cut-Off Wert versus der Patienten pro Gruppe (Outcome: Ja/Nein). Daten werden als Odds Ratio und Konfidenzintervall [CI] dargestellt. Die Blutprobe eines Patienten fehlte zu diesem Zeitpunkt, daher wurde die Gesamtzahl auf 44 gesetzt. Abk.: AKI: Acute kidney injury; POAF: Postoperative atrial fibrillation.

5 Diskussion

5.1 Einfluss der MiECC auf die mtDNA-Plasmakonzentration

Die vorliegende Untersuchung konnte die aufgestellte Haupthypothese bestätigen, dass die extrazelluläre Plasmakonzentration von mtDNA bei Patienten, die mit einem cCPB operiert wurden, höher ausfällt als bei jenen, die mit einer MiECC behandelt wurden. Diese Studie liefert damit, soweit bekannt, erstmals Evidenz für einen spezifischen Zusammenhang zwischen der Art des extrakorporalen Kreislaufsystems und der Freisetzung von mtDNA. Allerdings erreichte der Unterschied in den Einzelzeitpunktanalysen keine statistische Signifikanz, sondern wurde lediglich im Rahmen der gepoolten Datenauswertung über alle Messzeitpunkte hinweg bestätigt. Die fehlende Signifikanz in den Einzelzeitpunkten könnte im Wesentlichen auf zwei Faktoren zurückzuführen sein. Einerseits wurde für diese Studie eine Sekundäranalyse einer bereits bestehenden Datenerhebung verwendet, die ursprünglich nicht für diese spezifische Fragestellung konzipiert wurde. Im Rahmen der Primärstudie wurde eine Interventionsgruppe untersucht, die durch ein hämodynamisches Behandlungsprotokoll optimiert wurde. Um potenzielle Verzerrungen zu vermeiden, wurden die entsprechenden Patientendaten in dieser Auswertung ausgeschlossen, was die Studienpopulation erheblich reduzierte und somit die statistische Aussagekraft für Subgruppenanalysen limitiert. Zweitens schwankte die Menge der gemessenen mtDNA stark mit einem hohen Anteil sich überlappender Interquartilsbereiche. Dies ist insbesondere zum präoperativen Zeitpunkt bemerkenswert, da der Medianwert von MiECC im Vergleich zum cCBP niedriger ist, während sein Interquartilsbereich die entsprechenden Werte des cCBP übersteigt. Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass Patienten, die unmittelbar oder in den letzten 90 Tagen vor der Operation einen Herzinfarkt erlitten hatten, in der MiECC-Gruppe trotz niedrigeren Werten häufiger waren. Es ist zu betonen, dass sich die Konzentration an präoperativer mtDNA, der EuroSCORE und andere Vorerkrankungen nicht signifikant zwischen den Studiengruppen unterschieden. Dennoch kann ein Einfluss der Myokardinfarkte nicht ausgeschlossen werden.

Die gewonnenen Ergebnisse decken sich grundsätzlich mit der aktuellen Literatur zu anderen entzündlichen Markern und DAMPs im Kontext mit MiECC. Die Mehrzahl der entsprechenden Studien zeigte einen MiECC-induzierten Rückgang der Entzündungsreaktionen, der mit verschiedenen Entzündungs-Biomarkern quantifiziert wurde [6]. So zeigten Mazzei et al. und Formica et al., dass sich die postoperative Menge an IL-6, insbesondere entzündliche Muster der Endothelaktivierung, zwischen MiECC und Off-Pump-Herzoperationen nicht unterscheiden [22, 23]. Dagegen konnte eine randomisierte kontrollierte Studie keine MiECC-assoziierte Verringerung von IL-6 feststellen, während eine andere Studie einen MiECC-induzierten Anstieg von IL-6 nach den ersten 24 postoperativen Stunden zeigte [55, 56]. IL-6 eignet sich zum Vergleich mit der mtDNA, da es einer ähnlichen Kinematik unterliegt und sehr früh ansteigt.

Die Freisetzung von mtDNA wurde mit verschiedenen Krankheiten wie Sepsis, chirurgischen Traumata und insbesondere mit Eingriffen der Herzchirurgie in Verbindung gebracht [7, 9, 57]. Dennoch wurde die Rolle der mtDNA in der Herzchirurgie nur in einer begrenzten Anzahl von Studien untersucht, von denen keine Patienten einschloss, die sich einer CPB mit MiECC unterzogen hatten [6, 7, 13, 14, 48]. In unserer Untersuchung begann der zeitliche Verlauf der mtDNA-Freisetzung mit einem starken Anstieg direkt nach Beginn der CPB, gefolgt von einem signifikanten Rückgang nach dem Ende der CPB, unabhängig von der Art der CPB. Während die absoluten Plasmaspiegel der mtDNA während der cCPB mit anderen Studien, die ACB-Patienten untersuchten, vergleichbar waren, unterschied sich die Kinetik von einigen anderen Studien [13, 14, 58]. So zeigten die Studien von Qin et al. ebenfalls eine frühe mtDNA-Freisetzung, die jedoch erst 12 Stunden nach der Operation ihren Höhepunkt erreichte [13, 14]. Zu diesem Zeitpunkt hatten sich die Plasmaspiegel von mtDNA in unserer Studienpopulation nahezu normalisiert. Die Arbeit von Sandler et al. zeigte sogar noch einen späteren Anstieg mit Peakkonzentrationen am ersten postoperativen Tag. Da sie jedoch mtDNA verwendeten, die für menschliches Cytochrom B kodiert, sind ihre Studienergebnisse nicht direkt mit unseren vergleichbar [7]. Andererseits berichteten Baysa et al. analog zu unseren Ergebnissen von einem frühen mtDNA-Peak, der bereits 20 Minuten nach

Beginn der CPB auftrat, was darauf hindeutet, dass die CPB hauptsächlich für den Anstieg der mtDNA-Konzentration verantwortlich sein könnte [58].

Aus physiologischer Sicht ist eine rasche Abnahme der mtDNA-Konzentration nach Beendigung der CPB erklärbar, da sie schnell plasmatisch abgebaut wird [59–61]. Es muss jedoch betont werden, dass der Abbau von mtDNA während Stressreaktionen noch nicht gut verstanden ist und die zugrunde liegenden Daten hauptsächlich aus Tierversuchen stammen [59, 60]. Insbesondere wurde der mögliche Einfluss des CPB auf die Integrität der mtDNA noch nicht untersucht. Darüber hinaus könnten diese gegensätzlichen Ergebnisse auch durch andere Gründe erklärt werden:

Erstens ist festzustellen, dass ein direkter Vergleich der mtDNA-Plasmaspiegel aufgrund mangelnder Standardisierung nach wie vor schwierig ist. Die meisten Studien verwenden Methoden zur relativen Quantifizierung von mtDNA [6, 7], während in unserer Studie eine absolute Messung mittels plasmidbasierter qPCR durchgeführt wurde.

Zweitens wird noch diskutiert, ob der chirurgische Schnitt, insbesondere die Sternotomie, ebenfalls zur Freisetzung von mtDNA beitragen könnte. So konnten Naase et al. in einem Nagetiermodell einen 19-fachen Anstieg der zirkulierenden mtDNA im Plasma nach einer Sternotomie feststellen [6]. Unterschiedliche Operationstechniken könnten daher zu einer stärkeren Freisetzung von mtDNA in unserer Studienkohorte beigetragen haben.

Drittens wurden in früheren Studien keine Einzelheiten über die verwendeten CPB-Techniken berichtet, die die Menge der freigesetzten mtDNA beeinflussen könnten. Zum Beispiel könnte die Verwendung eines Hämofilters die quantifizierte Menge an mtDNA während der CPB beeinflussen. Schließlich wurde in beiden Studien von Qin et al. zwar auch die mtDNA untersucht, die für ND1 kodiert, aber sie schlossen nur eine begrenzte Anzahl von Patienten ein (38 bzw. 68 Patienten) [13, 14]. Dies stellt ein Problem dar, wenn es sich um Biomarker mit einem hohen Maß an Datenvarianz handelt, wie wir es bei unseren Messungen beobachtet haben. Infolgedessen ist eine hohe Anzahl von Patienten erforderlich, um Normalwerte und Kinetik zu definieren [62, 63]. Darüber hinaus könnte sie die Vorhersagekraft der mtDNA (z. B. als Biomarker für die Vorhersage von POAF) einschränken, da eine

hohe Varianz der Datenpunkte zu einer verminderten Spezifität führen kann, was z. B. aus der Sepsisforschung bekannt ist [62, 63].

5.2 Assoziation zwischen der mtDNA-Plasmakonzentration und Outcomeparametern

Da die Hauptfragestellung positiv beantwortet wurde, wurden die Sekundärfragestellungen untersucht. Diese hatte zum Ziel, mögliche Zusammenhänge zwischen der Menge an mtDNA und typischen herzchirurgischen Komplikationen in der Herzchirurgie zu identifizieren. Diese Studie zeigte weder einen Zusammenhang zwischen der mtDNA-Plasmakonzentration und AKI noch postoperativen Infektionen, sowie der Wiederaufnahmerate auf der Intensivstation. Es erscheinen mehrere Gründe für diese Ergebnisse möglich. Zum einen war die Studie primär nicht für die Fragestellung erstellt worden, so dass zur deren Beantwortung die Fallzahl zu gering sein könnte. Dies ist vor allem vor dem Hintergrund der hohen Datenvarianz der mtDNA-Quantifizierung von großer Bedeutung. Des Weiteren stellen ACB-Operationen eine standardisierte Operation mit einer hohen Sicherheit dar, so dass die Wiederaufnahmerate auf die Intensivstation mit 6,7% gering ist. Um hier statistische Effekte zu zeigen, müsste die Fallzahl ebenso höher sein. Dies war zwar bei den Endpunkten „postoperative Wundinfektion“ (11,1%) und „AKI“ (20%) gegeben, allerdings zeigte sich hier ebenso keine statistische Signifikanz für die Berechnung des Odds Ratio. Dieser war insbesondere für das AKI deutlich erhöht (4.82 [0.35-272.3]), welches auch mit bereits bestehenden Studien übereinstimmt [20, 46, 64]. Allerdings muss betont werden, dass diese Studien meist nur geringe Fallzahlen und keine einheitlichen Gene untersuchten und somit die Vergleichbarkeit eingeschränkt ist. Einen interessanten Ansatzpunkt wurde in einer aktuellen Studie dargestellt. In dieser wurde anhand von 628 Patienten eines gemischten herzchirurgischen Kollektivs zunächst eine Inzidenz des AKI von 11% nachgewiesen. Es zeigte sich, dass eine präoperative Erhöhung von mtDNA-Kopien im Blut mit einem geringeren Auftreten eines postoperativen AKI assoziiert war. Die Autoren dieser Studie postulierten, dass die Erhöhung der präoperativen plasmatischen DNA ein Ausdruck für die funktionelle Reserve der Niere und ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber Stress ist [65]. Diese Hypothese beruht auf experimentellem Daten aus einem murinen Tiermodell.

Die fehlende Korrelation der mtDNA mit Wundinfektionen könnte sowohl mit der geringen Fallzahl als auch mit der pathophysiologischen Genese erklärbar sein. Da Wundinfektionen im Gegensatz zur Sepsis meist keine systemischen Inflammationsreaktionen verursachen, könnten sie auch nur geringen Einfluss auf die Dynamik der mtDNA aufweisen. Des Weiteren stellen Wundinfektionen eine heterogene Gruppe dar, welche von kleineren Nahtdehiszenzen bis hin zur Mediastinitis reichen können. In dieser Studie wies keiner der Patienten Anzeichen für eine Sepsis auf, so dass von kleineren Wundinfektionen auszugehen ist, die nicht für eine relevante Korrelation mit der mtDNA aufweisen.

Während die Analyse aller Zeitpunkte ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen den mtDNA-Spiegeln und POAF zeigte, ergab die Analyse einzelner Zeitpunkte einen signifikanten Zusammenhang mit POAF in der frühen Phase der CPB, der unabhängig von der Studiengruppe war. Im Einzelnen war das Risiko für POAF um das Fünffache erhöht, wenn die Menge der mtDNA über 650 Kopien/ μ L anstieg. Zu diesem Zeitpunkt bot die mtDNA-Konzentration eine mäßige Vorhersagekraft für den Nachweis von POAF, was mit anderen Studien übereinstimmt [7, 66]. Dennoch muss dies mit Vorsicht interpretiert werden, da das Konfidenzintervall des Odd's Ratio aufgrund der oben erwähnten hohen Varianz der Daten und der begrenzten Anzahl der eingeschlossenen Patienten hoch war. Darüber hinaus muss betont werden, dass diese Sekundäranalyse nicht für diese Ergebnisanalyse geplant war und daher möglicherweise daher nicht ausreichend aussagekräftig ist. Dieses Ergebnis wird jedoch durch die Studie von Sandler et al. gestützt, die bei einer noch geringeren Anzahl eingeschlossener Patienten einen Zusammenhang zwischen mtDNA-Freisetzung und POAF aufzeigte (n = 16, [7]). Die einzige verfügbare Beobachtungsstudie mit einer höheren Patientenzahl (n = 485) untersuchte die *off-pump*-Herzchirurgie und kann daher nicht mit *on-pump*-Eingriffen verglichen werden [66]. Aufgrund der Tatsache, dass bei der *off-pump*-Chirurgie kein CPB eingesetzt wurde, war die absolute Menge der mtDNA viel geringer als in unserer Studie, und außerdem wurde für die qPCR ein anderer Primer verwendet. Obwohl die hier zitierte Studie nur einen geringen Anstieg der mtDNA zeigte, hatte sie dennoch einen vergleichbaren prädiktiven Wert für die Identifizierung von POAF, was die Ergebnisse unserer Studie unterstützt (AUROC 0,81; Spezifität 80,2 %; Sensitivität 70,3 %).

Eine neuere Studie, die die mtDNA-Konzentration im Blut und in der Perikardflüssigkeit untersuchte, konnte jedoch die mtDNA im Plasma nicht als Risikofaktor für POAF identifizieren [67]. Interessanterweise wiesen Patienten mit POAF in dieser Studie eine signifikant höhere Menge an mtDNA in der Perikardflüssigkeit auf, was darauf hindeutet, dass sie zur Entwicklung von Herzentzündungen und konsekutiver POAF beitragen könnte. Im Gegensatz dazu deuten neuere Studien darauf hin, dass mtDNA aus gestressten atrialen Kardiomyozyten stammt [68, 69]. Diese Frage muss jedoch weiter untersucht werden, denn es scheint, dass die Freisetzung von mtDNA auch mit einer Schädigung des Herzmuskels verbunden ist, wie die positive Korrelation mit der postoperativen Konzentration von CK und CKMB in unserer Studie zeigt. Da unsere Ergebnisse auch auf einen CPB-zeitabhängigen Anstieg der mtDNA-Plasmaspiegel hindeuten, scheint eine Kombination von operations- und CPB-assoziierten Entzündungsreaktionen mit konsekutiver mtDNA-Freisetzung möglich. Es wird von großem Interesse sein, die Quelle der mtDNA zu klären, um ihre Verwendung als prognostischer Biomarker für POAF zu bewerten. Außerdem müssen die verschiedenen Arten der Herzchirurgie, einschließlich MiECC, cCPB und Off-Pump-Techniken, berücksichtigt werden.

5.3 Limitationen

Diese Studie weist einige Einschränkungen auf. Erstens war aufgrund des Studiendesigns als Sekundäranalyse keine Berechnung des Stichprobenumfangs möglich, was zu einer unzureichenden Aussagekraft der Studienergebnisse geführt haben könnte, insbesondere hinsichtlich des Unterschieds zwischen cCPB und MiECC zu den einzelnen Messzeitpunkten. Zweitens handelt es sich bei unserer Studie um eine explorative Studie, was bedeutet, dass weder Schlussfolgerungen hinsichtlich der zugrunde liegenden Mechanismen der mtDNA-Freisetzung gezogen werden können noch, ob die mtDNA ursächlich für die Komplikationen sein könnte oder diese nur anzeigt. Drittens, obwohl das chirurgische und anästhesiologische Management hochgradig standardisiert ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass individuelle Abweichungen in diesem Management die Studienergebnisse beeinflusst haben könnten. Viertens unterschieden sich die Studiengruppen hinsichtlich der Anzahl der Patienten, die kürzlich oder in den letzten 90 Tagen vor der Operation einen

Myokardinfarkt erlitten hatten, wobei die Prävalenz in der MiECC-Studiengruppe höher war. Da ein Myokardinfarkt zu einem hohen Maß an Zellschädigung und Entzündung führt, könnte er die präoperativen mtDNA-Werte in der MiECC-Studiengruppe beeinflusst haben. Aufgrund des Studiendesigns konnte diese Verzerrung nicht vermieden, sollte jedoch in zukünftigen Studien berücksichtigt werden. Schließlich ist zu bedenken, dass mtDNA auch durch Arteriosklerose selbst freigesetzt werden kann [40]. Daraus ergibt sich die Frage, inwieweit sie die Freisetzung von mtDNA während der CPB beeinflusst. Die Annahme eines Einflusses der Arteriosklerose könnte die hohe Varianz der gemessenen mtDNA-Ergebnisse erklären, insbesondere zum präoperativen Zeitpunkt. Dies hätte Auswirkungen auf den prädiktiven Wert der mtDNA, da die durch Arteriosklerose ausgelöste Freisetzung von mtDNA so zu einer hohen Sensitivität, aber geringen Spezifität führt. Zuletzt wurde keine Heparinase eingesetzt [70]. Zwar kann Heparin auf Grund der negativen Ladungseigenschaften die Konzentration von Nukleinsäuren beeinflussen, allerdings wäre dieser Effekt bei allen Patienten gleichsam entstanden. Insofern ist nicht von einer Verzerrung der Ergebnisse auszugehen.

5.4 Stärken der Studie

Die vorliegende Arbeit weist trotz der genannten Limitationen mehrere methodische Stärken auf, die zur Validität der erhobenen Daten beitragen.

Ein wesentlicher Vorteil liegt in der hohen Standardisierung des perioperativen Managements. Sowohl die chirurgische Technik als auch die anästhesiologische Betreuung sowie der Einsatz der jeweiligen Herz-Lungen-Maschine (cCPB bzw. MiECC) erfolgten nach festgelegten Protokollen, wodurch mögliche Verzerrungen durch unterschiedliche Behandlungsstrategien minimiert wurden. Diese einheitlichen Bedingungen ermöglichen eine gute Vergleichbarkeit der Messwerte zwischen den beiden untersuchten Gruppen.

Darüber hinaus erfolgte die Quantifizierung der mtDNA auf Basis einer absoluten Messmethode mittels plasmidbasierter quantitativer qPCR. Im Gegensatz zu den in vielen Studien üblichen relativen quantitativen Verfahren, die auf der Vergleichbarkeit

mit einem Referenzgen beruhen, ermöglicht die hier eingesetzte Methode eine exakte und standardisierte Bestimmung der mtDNA-Kopienzahl im Plasma. Dies erlaubt eine bessere Vergleichbarkeit der Daten innerhalb der Studienkohorte und stellt eine belastbare Grundlage für die zukünftige Definition der Referenzwerte.

Ein weiterer positiver Aspekt dieser Arbeit ist die konsequente zeitliche Erfassung der mtDNA-Freisetzung an standardisierten, klinisch relevanten Messpunkten vor, während und nach der HLM-Perfusion. Durch dieses systematische Vorgehen konnte der dynamische Verlauf der mtDNA-Freisetzung im Rahmen der Operation konsequent dokumentiert werden, was insbesondere für die Interpretation möglicher pathophysiologischer Zusammenhänge von Bedeutung ist.

Zusätzlich ist hervorzuheben, dass sich diese Studie als eine der ersten gezielt mit der Fragestellung der mtDNA-Freisetzung im Kontext der MiECC beschäftigt hat. Die Einbeziehung dieser modernen Perfusionstechnologie bietet neue, klinisch relevante Einblicke in deren potenzielle Auswirkungen auf die systemische inflammatorische Antwort während herzchirurgischer Eingriffe.

Schließlich liefert diese Arbeit mit der explorativen Analyse dem Nachweis der Assoziation zwischen mtDNA-Konzentrationen und dem Auftreten von POAF Hinweise auf einen möglichen prädiktiven Zusammenhang, der eine Grundlage für weiterführende Hypothesengenerierung und zukünftige interdisziplinäre Forschungsansätze darstellen kann.

5.5 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie bieten eine wichtige Grundlage für zukünftige Forschungsprojekte, die darauf abzielen, den Einfluss extrakorporaler Zirkulationsverfahren auf die Freisetzung von mtDNA und deren klinische Bedeutung weiter zu charakterisieren. Die nachgewiesene Assoziation zwischen der Art der HLM und den zirkulierenden mtDNA-Konzentrationen legt nahe, dass Modifikationen der maschinellen Perfusionstechnik, wie sie durch den Einsatz von MiECC bereits initiiert wurden, Einfluss auf die systemische Freisetzung von DAMPs und damit auf inflammatorische Prozesse nehmen.

In zukünftigen Studien sollte daher in einem größeren, prospektiv angelegten Studiendesign überprüft werden, ob die beobachteten Unterschiede in der mtDNA-Freisetzung zwischen MiECC und konventioneller CPB auch in einer repräsentativen Kohorte unter Berücksichtigung präoperativer Risikofaktoren und kardiovaskulärer Begleiterkrankungen nachweisbar sind. Insbesondere der Einfluss von Myokardinfarkten, die in der vorliegenden Arbeit ungleich zwischen den Gruppen verteilt waren, sollte dabei systematisch kontrolliert werden.

Zudem wäre es von hoher Relevanz, die Quelle der freigesetzten mtDNA genauer zu identifizieren. In bisherigen Studien blieb unklar, ob die mtDNA primär aus ischämisch geschädigtem Myokardgewebe, aus dem Endothel, aus Leukozyten oder aus anderen zellulären Quellen stammt. Die Kombination von mtDNA-Messungen im Plasma mit parallel erhobenen Biomarkern der Zell- oder Organherkunft, wie beispielsweise kardialen Troponinen, endothelialen Aktivierungsmarkern oder Leukozyten-spezifischen Freisetzungserzeugnissen, können hier neue Erkenntnisse liefern.

Auch die Fragestellung, ob die intraoperative Reduktion von mtDNA-Spiegeln durch den Einsatz von MiECC einen direkten Einfluss auf postoperative Komplikationen wie POAF, AKI oder systemische inflammatorische Reaktionen besitzt, sollte in einem interdisziplinären Setting weiter untersucht werden. Randomisierte, multizentrische Studien könnten klären, ob mtDNA als verlaufs- oder

prognosebestimmender Biomarker im klinischen Alltag eine praktikable Rolle einnehmen kann.

Nicht zuletzt wäre die Integration moderner molekularer Analyseverfahren wie Next-Generation-Sequencing zur genauen Charakterisierung der freigesetzten mtDNA-Fragmente eine wertvolle Ergänzung. Dadurch würden neben der quantitativen auch qualitative Aspekte der mtDNA, wie ihre Integrität oder Sequenzmuster, in die Bewertung einfließen. Diese Information kann helfen, den Mechanismus der Freisetzung weiter zu differenzieren und möglicherweise neue therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren.

6 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit untersuchte erstmals systematisch den Einfluss von MiECC im Vergleich zum cCPB auf die Freisetzung mtDNA im Rahmen herzchirurgischer Eingriffe. Der Ausgangspunkt dieser Untersuchung war die Hypothese, dass die reduzierte Fremdoberfläche und die modifizierte Kreislaufführung bei der MiECC-Technologie zu einer verminderten Aktivierung zellulärer Stressmechanismen und folglich zu einer geringeren Freisetzung von zirkulierender mtDNA führen.

Die Ergebnisse dieser explorativen Studie unterstützen diese Annahme zumindest teilweise. In der gepoolten Analyse der erhobenen Proben konnte gezeigt werden, dass Patienten, die mit MiECC operiert wurden, im Vergleich zur konventionellen Herz-Lungen-Maschine signifikant geringere Mengen an freier mtDNA im Blut aufwiesen. Obwohl dieser Unterschied in den Einzelauswertungen der jeweiligen Messzeitpunkte nicht durchgängig das Signifikanzniveau erreichte, zeigten sich konsistente Trends, die auf einen protektiven Effekt der MiECC auf die mtDNA-Freisetzung hinweisen. Die hohe interindividuelle Varianz der gemessenen mtDNA-Werte und die begrenzte Anzahl der untersuchten Patienten schränken jedoch die Aussagekraft dieser Beobachtungen ein.

Unabhängig von der Art der verwendeten Herz-Lungen-Maschine zeigte der zeitliche Verlauf der mtDNA-Freisetzung ein reproduzierbares Muster. Direkt nach Beginn der extrakorporalen Zirkulation wurde ein deutlicher Anstieg der mtDNA-Plasmaspiegel gemessen, gefolgt von einem Rückgang nach Beendigung der maschinellen Kreislaufführung. Dieses Kinetikmuster spricht für einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen der extrakorporalen Zirkulation und der Freisetzung von mitochondrialen DAMPs. Die beobachtete rasche Abnahme der mtDNA-Konzentration nach Abschluss der CPB-Phase ist mit den bekannten Abbau- und Clearance-Mechanismen zellfreier DNA im Plasma vereinbar, wenngleich die genauen Mechanismen der mtDNA-Elimination im humanen Kontext noch unzureichend verstanden sind.

Die Studie konnte darüber hinaus zeigen, dass erhöhte mtDNA-Plasmaspiegel in der frühen Phase der CPB mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten von POAF

assoziiert waren. Dieser Zusammenhang wurde unabhängig von der verwendeten CPB-Technologie festgestellt, was auf einen allgemeinen pathophysiologischen Zusammenhang zwischen intraoperativ freigesetzter mtDNA und inflammatorischen Komplikationen hinweist. Die beobachtete moderate prädiktive Aussagekraft der mtDNA-Konzentration im Hinblick auf POAF verdeutlicht das Potenzial von mtDNA als Biomarker, wobei die große Schwankungsbreite der Werte auch hier die klinische Anwendbarkeit derzeit noch einschränkt.

Die vorliegenden Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit einer Vielzahl von Studien, die die mtDNA-Freisetzung in verschiedenen klinischen Szenarien, wie Sepsis, Trauma oder chirurgischem Stress, als Ausdruck einer akuten Gewebeschädigung und systemischen Entzündungsaktivierung beschrieben haben. Im Kontext herzchirurgischer Eingriffe wurden bislang nur wenige Untersuchungen durchgeführt, die sich mit der mtDNA-Kinetik beschäftigten, und diese beschränkten sich vorwiegend auf Patienten, die unter Verwendung der konventionellen CPB operiert wurden. Die vorliegende Arbeit erweitert dieses Wissen, indem sie den Einfluss von MiECC in den Fokus rückt und damit eine relevante Lücke in der aktuellen Literatur schließt.

Ein bedeutsamer methodischer Fortschritt der vorliegenden Arbeit liegt in der Anwendung einer plasmidbasierten quantitativen PCR zur absoluten Messung der mtDNA-Konzentration, welche im Gegensatz zu relativen Messmethoden eine vergleichsweise robuste und reproduzierbare Erhebung der Werte erlaubt. Dennoch bleibt der Vergleich der absoluten mtDNA-Werte zwischen Studien schwierig, da bislang keine standardisierten Messverfahren oder Referenzwerte für klinische Fragestellungen etabliert sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Komplexität der Freisetzung und Clearance von mtDNA im Rahmen von herzchirurgischen Eingriffen. Sie deuten darauf hin, dass sowohl die technische Gestaltung der extrakorporalen Zirkulation als auch patientenspezifische Faktoren, wie bestehende kardiovaskuläre Vorerkrankungen, insbesondere Myokardinfarkte und arteriosklerotische Veränderungen, maßgeblich zur Höhe der gemessenen mtDNA beitragen können.

Diese Faktoren müssen bei der Interpretation zukünftiger Studienergebnisse berücksichtigt werden.

Trotz der Limitierungen der vorliegenden Untersuchung – insbesondere der eingeschränkten Patientenzahl, des explorativen Studiendesigns sowie der hohen biologischen Variabilität der mtDNA-Werte – liefert diese Arbeit wertvolle Hinweise auf den Zusammenhang zwischen der Art der extrakorporalen Zirkulation, der Freisetzung von mtDNA und möglichen klinischen Konsequenzen. Die Ergebnisse legen nahe, dass die technische Weiterentwicklung der CPB-Systeme, wie sie durch die MiECC-Technologie verkörpert wird, nicht nur hämodynamische Vorteile bieten könnte, sondern auch eine Modulation inflammatorischer Prozesse durch Reduktion der Freisetzung zellulärer DAMPs wie mtDNA ermöglichen könnte.

Für die klinische Praxis lassen sich aus den vorliegenden Daten derzeit noch keine unmittelbaren Handlungsanweisungen ableiten. Dennoch unterstreichen die Ergebnisse die Notwendigkeit, die Rolle der mtDNA als inflammatorischen Mediator sowie als potenziellen Biomarker für postoperative Komplikationen in der Herzchirurgie weiter zu untersuchen. Langfristig könnte ein besseres Verständnis dieser Zusammenhänge dazu beitragen, patientenspezifische Risiken präziser vorherzusagen und gezielte prä- oder intraoperative Maßnahmen zur Reduktion inflammatorischer Begleitreaktionen zu entwickeln.

Abschließend lässt sich festhalten, dass diese Arbeit einen ersten wichtigen Beitrag zur Charakterisierung der mtDNA-Freisetzung unter Verwendung minimal-invasiver extrakorporaler Kreislaufsysteme geleistet hat. Die Ergebnisse liefern sowohl experimentelle als auch klinische Ansatzpunkte für zukünftige Studien, die sich mit den pathophysiologischen Mechanismen, der prädiktiven Relevanz und den potenziellen therapeutischen Implikationen der mtDNA-Freisetzung in der Herzchirurgie beschäftigen sollten.

7 Zusammenfassung

Der Einsatz der minimierten extrakorporalen Zirkulation (MiECC) während herzchirurgischer Eingriffe ist im Vergleich zum konventionellen kardiopulmonalen Bypass (cCPB) mit einer geringeren Entzündungsreaktion verbunden. Da nicht bekannt ist, ob MiECC auch die Menge an freier zirkulierender mitochondrialer DNA (mtDNA) reduziert, zielt diese Studie darauf ab, die MiECC-induzierte mtDNA-Freisetzung mit cCPB zu vergleichen sowie mögliche Zusammenhänge zwischen den Plasmaspiegeln von mtDNA und Komplikationen zu identifizieren.

Insgesamt wurden 45 Patienten, die sich einem herzchirurgischen Eingriff mit entweder cCPB oder MiECC unterzogen, in die Studie aufgenommen. Die mtDNA, die für die NADH-Dehydrogenase 1 kodiert, wurde mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion quantifiziert. Komplikationen wurden definiert als postoperatives Vorhofflimmern (POAF), akute Niereninsuffizienz (AKI), postoperative Infektionen sowie Wiederaufnahme auf die Intensivstation.

Die Plasmakonzentration der mtDNA war bei Patienten, die sich einer Herzoperation mit MiECC unterzogen, im Vergleich zu cCPB signifikant niedriger (MiECC: 161,8 [65,5- 501,9]; cCPB 190,8 [82- 705,7]; $p < 0,001$). Die Plasmaspiegel der mtDNA zeigten unabhängig von der Studiengruppe eine vergleichbare Kinetik und erreichten ihren Höhepunkt während der CPB (MiECC präoperativ: 68,2 [26,5-104,9]; MiECC 60 min nach Beginn der CPB: 536,5 [215,7-919,6]; cCPB präoperativ: 152,5 [80,9-207,6]; cCPB 60 min nach Beginn der CPB: 1.818,0 [844,2-3.932,2]; alle $p < 0,001$). Patienten mit einer mtDNA-Blutkonzentration >650 Kopien/ μ l nach Beginn der CPB hatten unabhängig von der Art des CPB ein 5-fach erhöhtes Risiko für POAF. Die Menge an mtDNA zeigte eine mäßige Vorhersagekraft (AUROC 0,71 [0,53-071]) für die Identifizierung von POAF.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Plasmaspiegel von mtDNA bei Patienten, die sich einer Herzoperation mit MiECC unterzogen, im Vergleich zu cCPB niedriger waren. Die Menge an mtDNA zu Beginn der CPB wurde unabhängig von der Art des kardiopulmonalen Bypasses mit postoperativem Vorhofflimmern in Verbindung gebracht.

8 Summary

The use of minimized extracorporeal circulation (MiECC) during cardiac surgery is associated with a reduced inflammatory reaction compared to conventional cardiopulmonary bypass (cCPB). Since it is unknown if MiECC also reduces the amount of free circulating mitochondrial DNA (mtDNA), this study aims to compare the MiECC-induced mtDNA release to cCPB as well as to identify potential relations between the plasma levels of mtDNA and an adverse outcome.

Overall, 45 patients undergoing cardiac surgery with either cCPB or MiECC were included to the study. MtDNA encoding for the NADH dehydrogenase 1 was quantified with quantitative polymerase chain reaction. Complications were defined as postoperative atrial fibrillation (POAF), acute kidney injury (AKI), postoperative infections, and readmission to the intensive care unit.

The plasma amount of mtDNA was significantly lower in patients undergoing cardiac surgery with MiECC compared to cCPB (MiECC: 161.8 [65.5- 501.9]; cCPB 190.8 [82- 705.7]; $p < 0.001$). Plasma levels of mtDNA showed comparable kinetics independently of the study group and peaked during CPB (MiECC preoperative: 68.2 [26.5-104.9]; MiECC 60 min after start of CPB: 536.5 [215.7-919.6]; cCPB preoperative: 152.5 [80.9-207.6]; cCPB 60 min after start of CPB: 1,818.0 [844.2-3,932.2]; all $p < 0.001$). Patients offering a mtDNA blood concentration >650 copies/ μL after the commencement of CPB had a 5-fold higher risk for postoperative atrial fibrillation independently of the type of cardiopulmonary bypass. The amount of mtDNA showed a moderate predictive power (AUROC 0.71 [0.53 - 0.71]) for the identification of postoperative atrial fibrillation.

In conclusion, plasma levels of mtDNA were lower in patients undergoing cardiac surgery with MiECC compared to cCPB. The amount of mtDNA at the beginning of the CPB was associated to postoperative atrial fibrillation independently of the type of cardiopulmonary bypass

9 Literaturverzeichnis

1. Beckmann A, Meyer R, Lewandowski J, Markewitz A, Blaßfeld D, Böning A (2023) German Heart Surgery Report 2022: The Annual Updated Registry of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery. *Thorac Cardiovasc Surg* 71:340–355
2. Squicciarro E, Labriola C, Malvindi PG, et al (2019) Prevalence and Clinical Impact of Systemic Inflammatory Reaction After Cardiac Surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 33:1682–1690
3. Ferreira LO, Vasconcelos VW, Lima J de S, et al (2023) Biochemical Changes in Cardiopulmonary Bypass in Cardiac Surgery: New Insights. *J Pers Med*. <https://doi.org/10.3390/jpm13101506>
4. Brunkhorst FM (2020) S3 Guideline: Sepsis 2018. *Anästhesiologie Intensivmedizin* 61:178–188
5. White DJ, Wolff JN, Pierson M, Gemmell NJ (2008) Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance. *Mol Ecol* 17:4925–42
6. Naase H, Harling L, Kidher E, et al (2020) Toll-like receptor 9 and the inflammatory response to surgical trauma and cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Surg* 15:137
7. Sandler N, Kaczmarek E, Itagaki K, Zheng Y, Otterbein L, Khabbaz K, Liu D, Senthilnathan V, Gruen RL, Hauser CJ (2018) Mitochondrial DAMPs Are Released During Cardiopulmonary Bypass Surgery and Are Associated With Postoperative Atrial Fibrillation. *Heart Lung Circ* 27:122–129
8. Mallavia B, Liu F, Lefrançais E, et al (2020) Mitochondrial DNA Stimulates TLR9-Dependent Neutrophil Extracellular Trap Formation in Primary Graft Dysfunction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 62:364–372
9. Denning N-L, Aziz M, Gurien SD, Wang P (2019) DAMPs and NETs in Sepsis. *Front Immunol* 10:2536
10. Supinski GS, Schroder EA, Callahan LA (2020) Mitochondria and Critical Illness. *Chest* 157:310–322
11. Jansen MPB, Pulskens WP, Butter LM, Florquin S, Juffermans NP, Roelofs JJTH, Leemans JC (2018) Mitochondrial DNA is Released in Urine of SIRS Patients With Acute Kidney Injury and Correlates With Severity of Renal Dysfunction. *Shock* 49:301–310
12. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K, Hauser CJ (2010) Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 464:104–7
13. Qin C, Liu R, Gu J, Li Y, Qian H, Shi Y, Meng W (2015) Variation of perioperative plasma mitochondrial DNA correlate with peak inflammatory cytokines caused by cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Surg* 10:85

14. Qin C, Gu J, Hu J, Qian H, Fei X, Li Y, Liu R, Meng W (2016) Platelets activation is associated with elevated plasma mitochondrial DNA during cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Surg* 11:90
15. Sarkar M, Prabhu V (2017) Basics of cardiopulmonary bypass. *Indian J Anaesth* 61:760–767
16. Anastasiadis K, Murkin J, Antonitsis P, et al (2016) Use of minimal invasive extracorporeal circulation in cardiac surgery: principles, definitions and potential benefits. A position paper from the Minimal invasive Extra-Corporeal Technologies international Society (MiECTiS). *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 22:647–62
17. Anastasiadis K, Antonitsis P, Asteriou C, Deliopoulos A, Argiriadou H (2021) Modular minimally invasive extracorporeal circulation ensures perfusion safety and technical feasibility in cardiac surgery; a systematic review of the literature. *Perfusion* 2676591211026514
18. Diez C, Haneya A, Brünge F, et al Minimized extracorporeal circulation cannot prevent acute kidney injury but attenuates early renal dysfunction after coronary bypass grafting. *ASAIO J* 55:602–7
19. Zangrillo A, Garozzo FA, Biondi-Zoccai G, Pappalardo F, Monaco F, Crivellari M, Bignami E, Nuzzi M, Landoni G (2010) Miniaturized cardiopulmonary bypass improves short-term outcome in cardiac surgery: a meta-analysis of randomized controlled studies. *J Thorac Cardiovasc Surg* 139:1162–9
20. Likhvantsev V V, Landoni G, Grebenchikov OA, Skripkin Y V, Zabelina TS, Zinovkina LA, Prikhodko AS, Lomivorotov V V, Zinovkin RA (2017) Nuclear DNA as Predictor of Acute Kidney Injury in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Graft: A Pilot Study. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 31:2080–2085
21. Ranucci M, Baryshnikova E (2019) Inflammation and coagulation following minimally invasive extracorporeal circulation technologies. *J Thorac Dis* 11:S1480–S1488
22. Mazzei V, Nasso G, Salamone G, Castorino F, Tommasini A, Anselmi A (2007) Prospective randomized comparison of coronary bypass grafting with minimal extracorporeal circulation system (MECC) versus off-pump coronary surgery. *Circulation* 116:1761–7
23. Formica F, Mariani S, Broccolo F, Caruso R, Corti F, D'Alessandro S, Amigoni P, Sangalli F, Paolini G Systemic and myocardial inflammatory response in coronary artery bypass graft surgery with miniaturized extracorporeal circulation: differences with a standard circuit and off-pump technique in a randomized clinical trial. *ASAIO J* 59:600–6
24. Winkler B, Heinisch PP, Gahl B, Aghlmandi S, Jenni HJ, Carrel TP (2017) Minimally Invasive Extracorporeal Circulation Circuit Is Not Inferior to Off-Pump Coronary Artery Bypass Grafting: Meta-Analysis Using the Bayesian Method. *Ann Thorac Surg* 103:342–350
25. Allesie M, Ausma J, Schotten U (2002) Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 54:230–46

26. Wijesurendra RS, Casadei B (2019) Mechanisms of atrial fibrillation. *Heart* 105:1860–1867
27. Fuster V, Rydén LE, Cannom DS, et al (2006) ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the Management of Patients with Atrial Fibrillation: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice. *Circulation* 114:e257-354
28. Beaubien-Souligny W, Neagoe P-E, Gagnon D, Denault AY, Sirois MG (2020) Increased Circulating Levels of Neutrophil Extracellular Traps During Cardiopulmonary Bypass. *CJC open* 2:39–48
29. Ren M, Li X, Hao L, Zhong J (2015) Role of tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of atrial fibrillation: A novel potential therapeutic target? *Ann Med* 47:316–24
30. Levey AS, Eckardt K-U, Dorman NM, et al (2020) Nomenclature for kidney function and disease: report of a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Consensus Conference. *Kidney Int* 97:1117–1129
31. Oesterlee U, Holt SK, Schneitler S, Randerath W (2018) Nosokomiale Pneumonie. In: *Thoraxchir. für den Allg. und Visz.* Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 233–242
32. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al (2016) The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315:801–10
33. Massart N, Mansour A, Ross JT, Piau C, Verhoye J-P, Tattevin P, Nessler N (2022) Mortality due to hospital-acquired infection after cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 163:2131-2140.e3
34. Paparella D, Yau TM, Young E (2002) Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur J Cardiothorac Surg* 21:232–44
35. Paternoster G, Guarracino F (2016) Sepsis After Cardiac Surgery: From Pathophysiology to Management. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 30:773–80
36. Landis RC, Brown JR, Fitzgerald D, Likosky DS, Shore-Lesserson L, Baker RA, Hammon JW (2014) Attenuating the Systemic Inflammatory Response to Adult Cardiopulmonary Bypass: A Critical Review of the Evidence Base. *J Extra Corpor Technol* 46:197–211
37. Day JRS, Taylor KM (2005) The systemic inflammatory response syndrome and cardiopulmonary bypass. *Int J Surg* 3:129–40
38. Boeken U, Feindt P (2008) Ist das SIRS/Sepsis-Syndrom in der Herzchirurgie Folge der extrakorporalen Zirkulation und damit unvermeidlich? *Zeitschrift für Herz-,Thorax- und Gefäßchirurgie* 22:110–118
39. Meldrum DR, Donnahoo KK (1999) Role of TNF in mediating renal insufficiency following cardiac surgery: evidence of a postbypass cardiorenal syndrome. *J Surg Res* 85:185–99

40. Roh JS, Sohn DH (2018) Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw* 18:e27
41. McCarthy CG, Goulopoulou S, Wenceslau CF, Spitler K, Matsumoto T, Webb RC (2014) Toll-like receptors and damage-associated molecular patterns: novel links between inflammation and hypertension. *Am J Physiol Circ Physiol* 306:H184–H196
42. Gentile LF, Moldawer LL (2013) DAMPs, PAMPs, and the origins of SIRS in bacterial sepsis. *Shock* 39:113–4
43. Pisetsky DS (2012) The origin and properties of extracellular DNA: from PAMP to DAMP. *Clin Immunol* 144:32–40
44. Merkle J, Daka A, Deppe AC, Wahlers T, Paunel-Görgülü A (2019) High levels of cell-free DNA accurately predict late acute kidney injury in patients after cardiac surgery. *PLoS One* 14:e0218548
45. Qi Y, Uchida T, Yamamoto M, et al (2016) Perioperative Elevation in Cell-Free DNA Levels in Patients Undergoing Cardiac Surgery: Possible Contribution of Neutrophil Extracellular Traps to Perioperative Renal Dysfunction. *Anesthesiol Res Pract* 2016:2794364
46. Hyslop K, Ki KK, Naidoo R, et al (2025) Cell-free mitochondrial DNA may predict the risk of post-operative complications and outcomes in surgical aortic valve replacement patients. *Sci Rep* 15:15857
47. Paunel-Görgülü A, Wacker M, El Aita M, Hassan S, Schlachtenberger G, Deppe A, Choi Y-H, Kuhn E, Mehler TO, Wahlers T (2017) cfDNA correlates with endothelial damage after cardiac surgery with prolonged cardiopulmonary bypass and amplifies NETosis in an intracellular TLR9-independent manner. *Sci Rep* 7:17421
48. Qin C, Gu J, Qian H, Meng W Analysis of circulatory mitochondrial DNA level after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass and potential prognostic implications. *Indian Heart J* 68:389–90
49. Anastasiadis K, Antonitsis P, Haidich A-B, Argiriadou H, Deliopoulos A, Papakonstantinou C (2013) Use of minimal extracorporeal circulation improves outcome after heart surgery; a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Cardiol* 164:158–69
50. Johansson PI, Nakahira K, Rogers AJ, McGeachie MJ, Baron RM, Fredenburgh LE, Harrington J, Choi AMK, Christopher KB (2018) Plasma mitochondrial DNA and metabolomic alterations in severe critical illness. *Crit Care* 22:360
51. Kraft BD, Chen L, Suliman HB, Piantadosi CA, Welty-Wolf KE (2019) Peripheral Blood Mononuclear Cells Demonstrate Mitochondrial Damage Clearance During Sepsis. *Crit Care Med* 47:651–658
52. Wu L, Xu W, Wang F, Lv T, Yin Z, Song Y (2018) Plasma mtDNA Analysis Aids in Predicting

- Pancreatic Necrosis in Acute Pancreatitis Patients: A Pilot Study. *Dig Dis Sci* 63:2975–2982
53. Schneck E, Edinger F, Hecker M, et al (2020) Blood Levels of Free-Circulating Mitochondrial DNA in Septic Shock and Postsurgical Systemic Inflammation and Its Influence on Coagulation: A Secondary Analysis of a Prospective Observational Study. *J Clin Med*. <https://doi.org/10.3390/jcm9072056>
 54. Chiu RWK, Chan LYS, Lam NYL, Tsui NBY, Ng EKO, Rainer TH, Lo YMD (2003) Quantitative analysis of circulating mitochondrial DNA in plasma. *Clin Chem* 49:719–26
 55. Gygax E, Kaeser H-U, Stalder M, Gahl B, Rieben R, Carrel T, Erdoes G (2018) Type II Minimal-Invasive Extracorporeal Circuit for Aortic Valve Replacement: A Randomized Controlled Trial. *Artif Organs* 42:620–629
 56. Kiessling AH, Keller H, Moritz A (2018) Prospective, Randomized Un-Blinded Three Arm Controlled Study in Coronary Artery Revascularization with Minimal Invasive Extracorporeal Circulation Systems (MiECC): Surrogate Parameter Analysis of Biocompatibility. *Heart Surg Forum* 21:E179–E186
 57. Hu Q, Ren J, Wu J, Li G, Wu X, Liu S, Wang G, Gu G, Li J (2017) Elevated Levels of Plasma Mitochondrial DNA Are Associated with Clinical Outcome in Intra-Abdominal Infections Caused by Severe Trauma. *Surg Infect (Larchmt)* 18:610–618
 58. Baysa A, Fedorov A, Kondratov K, et al (2019) Release of Mitochondrial and Nuclear DNA During On-Pump Heart Surgery: Kinetics and Relation to Extracellular Vesicles. *J Cardiovasc Transl Res* 12:184–192
 59. Trumpff C, Michelson J, Lagranha CJ, et al (2021) Stress and circulating cell-free mitochondrial DNA: A systematic review of human studies, physiological considerations, and technical recommendations. *Mitochondrion* 59:225–245
 60. Zhao L (2019) Mitochondrial DNA degradation: A quality control measure for mitochondrial genome maintenance and stress response. *Enzym* 45:311–341
 61. He J, Lu Y, Xia H, et al (2015) Circulating Mitochondrial DAMPs Are Not Effective Inducers of Proteinuria and Kidney Injury in Rodents. *PLoS One* 10:e0124469
 62. Jensen J-U, Bouadma L (2016) Why biomarkers failed in sepsis. *Intensive Care Med* 42:2049–2051
 63. Pierrakos C, Velissaris D, Bisdorff M, Marshall JC, Vincent J-L (2020) Biomarkers of sepsis: time for a reappraisal. *Crit Care* 24:287
 64. Grigoriev E, Ponasenko A V, Sinitskaya A V, Ivkin AA, Kornelyuk RA (2022) Mitochondrial DNA as a Candidate Marker of Multiple Organ Failure after Cardiac Surgery. *Int J Mol Sci*. <https://doi.org/10.3390/ijms232314748>
 65. Jotwani V, Thiessen-Philbrook H, Arking DE, et al (2025) Association of Blood Mitochondrial

DNA Copy Number With Risk of Acute Kidney Injury After Cardiac Surgery. *Am J Kidney Dis* 85:130–133

66. Zhang J, Xu S, Xu Y, Liu Y, Li Z, Zhang Y, Jin Y, Xue X, Wang H (2017) Relation of Mitochondrial DNA Copy Number in Peripheral Blood to Postoperative Atrial Fibrillation After Isolated Off-Pump Coronary Artery Bypass Grafting. *Am J Cardiol* 119:473–477
67. Manghelli JL, Kelly MO, Carter DI, et al (2021) Pericardial Mitochondrial DNA Levels Are Associated With Atrial Fibrillation After Cardiac Surgery. *Ann Thorac Surg* 111:1593–1600
68. Wiersma M, van Marion DMS, Bouman EJ, Li J, Zhang D, Ramos KS, Lanter EAH, de Groot NMS, Brundel BJJM (2020) Cell-Free Circulating Mitochondrial DNA: A Potential Blood-Based Marker for Atrial Fibrillation. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells9051159>
69. Wiersma M, van Marion DMS, Wüst RCI, Houtkooper RH, Zhang D, Groot NMS de, Henning RH, Brundel BJJM (2019) Mitochondrial Dysfunction Underlies Cardiomyocyte Remodeling in Experimental and Clinical Atrial Fibrillation. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells8101202>
70. Kondratov K, Kurapeev D, Popov M, Sidorova M, Minasian S, Galagudza M, Kostareva A, Fedorov A (2016) Heparinase treatment of heparin-contaminated plasma from coronary artery bypass grafting patients enables reliable quantification of microRNAs. *Biomol Detect Quantif* 8:9–14

10 Anhang

10.1 Quiagen Protokoll zur Purifizierung

<https://dna.uga.edu/wp-content/uploads/sites/51/2013/12/QIA-amp-DNA-Blood-Kits-Handbook.pdf>

10.2 Abkürzungsverzeichnis

AV-Knoten	atrioventrikulären Knoten
ACB	Koronararterienbypass
AKI	akute Nierinsuffizienz
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
CPB	kardiopulmonaler Bypass
cCPB	konventioneller kardiopulmonaler Bypass
CK	Creatinkinase
CKMB	Creatinkinase Myokardialband
CRP	C-Reaktives Protein
DAMPs	Damage associated molecular patterns
ecDNA	extrazelluläre DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HLM	Herz-Lungen-Maschine
IL-1	Interleukin 1
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-6	Interleukin 6
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IQR	interquartile Range
mtDNA	mitochondriale DNA

MiECC	minimalisierte extrakorporale Zirkulation
ND1	NADH Dehydrogenase 1
NO	Stickstoffmonoxid
OMOIOO	Optimierte Makrozirkulation, optimierte Immunfunktion, optimiertes Outcome
OPACB	Off-Pump Koronararterienbypass
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
PCR	Polymerease-Chain-Reaction
PBS	Phosphat-buffered saline
POAF	post-operative atrial fibrillation
PRR	Pattern Recognition Receptor
qPCR	quantitative Polimerase-Chain-Reaction
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SpO2	periphere Sauerstoffsättigung mit O2 im kapillären Blut
TLR-9	Toll-Like-Receptor 9
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VHF	Vorhofflimmern
ZVK	zentralvenöser Katheter

10.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema eines kardiopulmonalen Bypasses. konventionelle HLM (eigene Grafik)	4
Abbildung 2: Schema eines kardiopulmonalen Bypasses Mini-Maschine (MiECC 4; so in Gießen verwendet) (eigene Grafik)	5
Abbildung 3: Standardkurve der PCR.....	21
Abbildung 4: Beispiel für zwei qPCR-Messungen mit Tripletten.....	22
Abbildung 5: Schmelzkurve der PCR.	23
Abbildung 6: Zeitlicher Verlauf der Menge mtDNA in Plasmaproben. Ergebnisse sind dargestellt als Boxplot-Diagramm. ***: $p < 0.001$	27
Abbildung 7: Vergleich der Plasmakonzentration von mtDNA zwischen dem konventionelle (cCPB) und minimalisierten CPB (MiECC) über alle Zeitpunkte. Ergebnisse sind als Boxplotdiagramme dargestellt. ***: $p < 0.001$	28
Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf der mtDNA Level in Abhängigkeit der Studiengruppe. Ergebnisse werden als Boxplot-Diagramm dargestellt.....	29
Abbildung 9: Scatter Plot für Korrelationen zwischen mtDNA und Dauer des CPB (A); der Konzentration von CKMB (B) und CK (C).	31

10.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Materialliste zur Purifikation von mtDNA.....	19
Tabelle 2: Basischarakteristika Darstellung der Studienkohorten. Daten werden als Median und IQR[Q25-Q75] oder als absolute Zahl und Prozent (n (%)) der Studiengruppe dargestellt. <i>Abkürzungen: BMI: Body mass index; COPD: Chronic obstructive pulmonary disease; cCPB: conventional cardiopulmonary bypass; CPB: cardiopulmonary bypass; MiECC: Minimized extracorporeal circulation.</i>	25
Tabelle 3: Ergebnisse der Quantifizierung der mtDNA im Plasma	26
Tabelle 4: Outcomeparameter Analyse an Zeitpunkt T2 (Peakkonzentration von mtDNA). Basierend auf der ROC-Analyse ist der Cut-Off Wert 650 Kopien/μL gewählt worden. Die Inzidenz wird in Zahlen und Prozent der Patienten mit höherem mtDNA Level als der Cut-Off Wert versus der Patienten pro Gruppe (Outcome: Ja/Nein). Daten werden als Odds Ratio und Konfidenzintervall [CI] dargestellt. Die Blutprobe eines Patienten fehlte zu diesem Zeitpunkt, daher wurde die Gesamtzahl auf 44 gesetzt. Abk.: AKI: Acute kidney injury; POAF: Postoperative atrial fibrillation.....	32

10.5 Publikationen

25. Mai 2022:

Zajonz T, Koch C, Schwiddessen J, Markmann M, Hecker M, Edinger F, Schmidt G, Boening A, Sander M, Schneck E. Minimized Extracorporeal Circulation Is Associated with Reduced Plasma Levels of Free-Circulating Mitochondrial DNA Compared to Conventional Cardiopulmonary Bypass: A Secondary Analysis of an Exploratory, Prospective, Interventional Study. *J Clin Med.* 2022 May 25;11(11):2994. doi: 10.3390/jcm11112994. PMID: 35683383; PMCID: PMC9181034.

10.6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mich auf dem Weg zur Fertigstellung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Vielen Dank an Prof. Michael Sander für die Überlassung des Themas.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Emmanuel Schneck, für die fachliche Betreuung, die stets konstruktiven Diskussionen und das Vertrauen, das mir im Verlauf dieses Projekts entgegengebracht hat.

Ebenso danke ich meinen Eltern, die mir durch ihre stetige Unterstützung – sowohl ideell als auch ganz praktisch – die Grundlage für diesen Werdegang geschaffen haben.

Meiner Frau gilt mein tiefster Dank für ihre Geduld, ihren unermüdlichen Rückhalt und ihre beständige Ermutigung. Ohne ihre Unterstützung wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

