

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Einfluss von Levosimendan auf den zerebralen
Reperfusionsschaden nach Ischämie**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Markus Henning Damm
aus Singapur

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. H. Schild

Tag der Promotion: 19.02.2025

„Ich lasse nicht locker.“

- Heinrich Hermann Robert Koch –

(1843 – 1910)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
1 Einleitung / Ziel der Dissertation	1
1.1 Allgemeine Notwendigkeit	1
1.2 Das Pharmakon Levosimendan	2
1.3 Studienmodell	2
2 Literaturdiskussion	4
2.1 Historie	4
2.2 Epidemiologie	5
2.3 Pathophysiologie des Herz-Kreislauf-Stillstandes	7
2.4 Therapie des Herz-Kreislauf-Stillstandes	9
2.5 Pathophysiologie des Postreanimationssyndroms	11
2.6 Therapie des Postreanimationssyndroms	14
2.7 Inflammationsmarker und Prognosemanagement	15
3 Material und Methoden	17
3.1 Materialliste	17
3.2 Versuchsaufbau sowie -Durchführung	20
3.3 Histologische Bearbeitung	27
3.4 Molekularbiologische Bearbeitung	31
3.5 Statistische Betrachtung	33
4 Ergebnisse	34
4.1 Parameter	34
4.2 Statistische Datenanalyse	42
5 Diskussion	48
5.1 Methodik und Limitationen	48
5.2 Vital- und Laborwerte	50
5.3 Molekularbiologie	51
5.4 Histologie	53
5.5 Konklusion	54
6 Zusammenfassung	56
7 Literaturverzeichnis	57
8 Anhang	64
9 Danksagung	67
10 Lebenslauf	68

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg/Kg KG	Mikrogramm pro Kilogramm Körpergewicht
µg/KgKG/min	Mikrogramm pro Kilogramm Körpergewicht pro Minute
µg/L	Mikrogramm pro Liter
mg/Kg KG	Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht
ml/Kg KG	Milliliter pro Kilogramm Körpergewicht
Abb	Abbildung
ACVC	Acute Cardiovascular Care Association
ALS	Advanced Life Support
ATP	Adenosintriphosphat
BGA	Blutgasanalyse
BLH	Baseline Healthy
BLS	Basic Life Support
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CI	Cardiac Index
CPR	Cardiopulmonale Reanimation
CT	Computertomographie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
EEG	Elektroenzephalographie
ESC	European Society of Cardiology
ERC	European Resuscitation Council
etCO ₂	Endtidales Kohlenstoffdioxid
ELWI	Extravaskuläres Lungenwasserindex
EUSEM	European Society of Emergency Medicine
ESICM	European Society of Intensive Care
FiO ₂	Inspiratorische Sauerstoffkonzentration
FRC	Funktionelle Residualkapazität
GEDI	Globaler enddiastolischer Volumen-Index
GEV	Globales enddiastolisches Volumen
HF	Herzfrequenz
HZV	Herzzeitvolumen

IHCA	In-Hospital Cardiac Arrest
ILCOR	International Liaison Committee on Resuscitation
i.m.	Intramuskuläre Injektion
i.o.	Intraossäre Injektion
i.v.	Intravenöse Injektion
IL	Interleukin
MAD	Mittlerer arterieller Blutdruck
MRT	Magnetresonanztomographie
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
NIRS	Nah-Infrarot Spektroskopie
paCO ₂	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
paO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PCWP	Lungenkapillaren-Verschlussdruck
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Peep	Positiver endexpiratorischer Druck
PiCCO	Pulse Contour Cardiac Output
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
POSTCAM	Post-cardiac-arrest management
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
rSo ₂	Sättigung der cerebralen Perfusion
ROSC	Return of spontaneous circulation
SaO ₂	Arterielle Sauerstoffsättigung
SpO ₂	Periphere kapilläre Sauerstoffsättigung
SvO ₂	Venöse Sauerstoffsättigung
TIVA	Total intravenöse Anästhesie
OHCA	Out-of-Hospital Cardiac Arrest
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentral nervöse Strukturen
ZVK	Zentraler Venenkatheter

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>The chain of survival</i> von Perkins, Handley et al. 2015.....	1
Abbildung 2: Öffentlicher Jahresbericht 2022 des Deutschen Reanimationsregisters, Seewald et al 2022.....	5
Abbildung 3: Öffentlicher Jahresbericht 2022 des Deutschen Reanimationsregisters, Seewald et al 2022.....	6
Abbildung 4: Regelkreislauf aerobe/anaerobe Glykolyse, Löffler/Petridis in <i>Biochemie und Pathobiochemie 9., vollständige Auflage</i>	7
Abbildung 5: ALS Algorithmus, Notfall Rettungsmed 2021.....	10
Abbildung 6: Post-cardiac arrest Syndrom, Nolan et al 2008.....	11
Abbildung 7: Sedierte Versuchsobjekt, Eigenaufnahme aus Großtierlabor UMM – KfA.....	20
Abbildung 8: Spezielle Maskenbeatmung, Eigenaufnahme aus Großtierlabor UMM – KfA.....	21
Abbildung 9: Schleusenanlage, Versuchs SOP Großtierlabor UMM – KfA.....	22
Abbildung 10: Monitoring - Versuchs SOP Großtierlabor UMM – KfA.....	22
Abbildung 11a: Sternotomie, Eigenaufnahme aus Großtierlabor UMM – KfA.....	23
Abbildung 11b: Post mortale Gefäßpräparation Aortenbogen - Eigenaufnahme aus Großtierlabor UMM – KfA.....	23
Abbildung 12: CPR5 Ablaufprotokoll und Versuchszeitplan.....	25
Abbildung 13: HE-Übersichtsaufnahme sowie Vergrößerung Hippocampaler Verlauf.....	28
Abbildung 14: Nissl-Übersichtsaufnahme sowie Vergrößerung Hippocampaler Verlauf.....	29
Abbildung 15: Analyse HE-Färbungen.....	41
Abbildung 16: Analyse Nissl-Färbungen.....	42
Abbildung 17: Analyse IL-6 hippocampale Proben.....	43
Abbildung 18: Analyse IL-6 corticale Proben.....	44
Abbildung 19: Analyse TNF-Alpha hippocampale Proben.....	45
Abbildung 20: Analyse TNF-Alpha corticale Proben.....	46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>Zusammenfassung Daten Hämodynamik</i>	33
Tabelle 2: <i>Zusammenfassung Daten Spirometrie</i>	35
Tabelle 3: <i>Zusammenfassung Daten Laborwerte & weitere Parameter</i>	36
Tabelle 4: <i>Zusammenfassung Daten Histologie</i>	39

Gender-Hinweis

Ausschließlich zum Zweck der besseren Lesbarkeit wird auf eine geschlechterspezifische Schreibweise sowie auf eine Mehrfachbezeichnung verzichtet. Alle Personenbezeichnungen sollen dennoch als geschlechtsneutral angesehen werden.

1 Einleitung / Ziel der Dissertation

1.1 Allgemeine Notwendigkeit

Der plötzliche Kreislaufstillstand stellt die dritthäufigste Todesursache in Europa dar. (1)

Im Rahmen dessen kommt es durch fehlende Organperfusion häufig zu einem sekundären hypoxischen-hypoxämischen Hirnschaden. Für die neurologische Lebensqualität und die korrelierende Rehabilitation nach Entlassung ist das Verhindern bzw. die Therapie des sekundären hypoxischen-hypoxämischen Hirnschadens entscheidend.

Die zerebrale Reperfusion nach einem Herz-Kreislauf-Stillstand spielt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des sekundären hypoxischen-hypoxämischen Hirnschadens. Sein Umfang ist eminent für das Langzeitüberleben sowie für die Lebensqualität der Patienten, was sich in Folge der zunehmenden primären Überlebensraten nach Herz-Kreislauf-Stillständen abzeichnet.

Aus diesem Grund wurde federführend durch die ACVC (*Acute Cardiovascular Care Association*) des ESC (*European Society of Cardiology*) sowie durch Kooperation mit der EUSEM (*European Society of Emergency Medicine*) und der ESICM (*European Society of Intensive Care*) und dem ERC (*European Resuscitation Council*), der Begriff des POSTCAM (*Post-cardiac arrest management*) und dessen Ziele in den Fokus gesetzt sowie thematische Workshops etabliert. (2) Auf Basis aktueller Evidenz und Expertenkonsens soll in Zukunft die Verbesserung des Überlebens und der neurologischen Lebensqualität der Patienten in den Fokus genommen werden. Des Weiteren hat das ERC im Rahmen der europaweiten Ausbildung des ALS (*Advanced Life Support*) die Überlebenskette um einen vierten Punkt des POSTCAM verdeutlicht. (3)

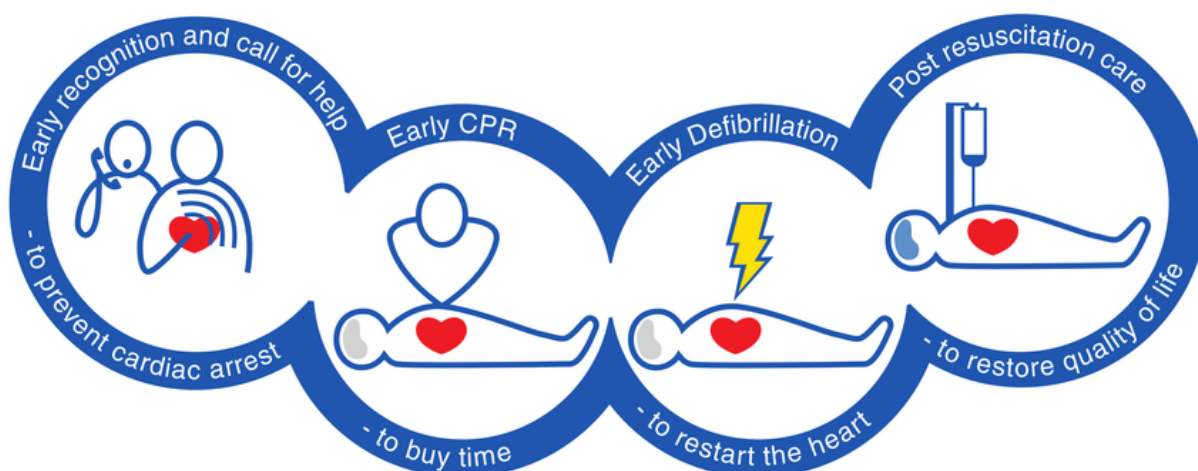


Abb.1

The chain of survival von Perkins, Handley et al. 2015

Die frühe Therapie des POSTCAM rückt somit zunehmend in den Fokus der leitliniengerechten Therapie eines ROSC (*Return of spontaneous circulation*). Verschiedene Substanzen konnten frustrierend erprobt werden, jedoch erwies sich bis heute kein Pharmakon als plausibler Kandidat für die Neuroprotektion und Therapie des POSTCAM. Aufgrund der protektiven myokardialen Pharmakodynamik von Levosimendan wird dieses Pharmakon zunehmend als möglicher relevanter Baustein für die Neuroprotektion und die Therapie des POSTCAM diskutiert.

1.2 Das Pharmakon Levosimendan

Levosimendan, ursprünglich ein Therapeutikum der Wahl bei therapieresistenter dekompensierter Herzinsuffizienz, ist in der jüngeren Vergangenheit häufiger als potentiell Medikament zur Neuroprotektion diskutiert worden. Die Studienlage ist jedoch uneinheitlich. Levosimendan gehört zur Gruppe der Inotropika: Der Wirkmechanismus von Levosimendan ist positiv inotrop, indem es die kontraktilen Proteine Aktin und Myosin für Kalzium sensibilisiert. Die Schwellenkonzentration wird hierbei nicht verändert. Dies ist entscheidend, da die diastolische Erschlaffung nicht beeinträchtigt wird. (4) Weiterhin wirkt Levosimendan in hoher Konzentration hemmend auf die Phosphodiesterase 3. (5) Es erhöht sich der zelluläre Spiegel des cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP) und es entsteht ein positiv inotroper sowie ein vasodilatierender Effekt. Energiebilanz und Sauerstoffbedarf der Zellen scheinen hiervon nicht ungünstig betroffen zu sein. Außerdem konnte Levosimendan ein kardioprotektiver Wirkmechanismus an den Mitochondrien der Kardiomyozyten im Rahmen der Reperfusion zugeschrieben werden. (6) (7)

Aufgrund dieser Erkenntnisse erscheint es möglich, dass Levosimendan auch im Rahmen anderer Reperfusionseignisse, insbesondere des zerebralen Reperfusionsschadens, einen Effekt erzielen und für verschiedene Organe zur Protektionstherapie in Frage kommen könnte. Dies würde die Postreanimationsbehandlung zielführend und sinnvoll erweitern.

1.3 Studienmodell

Aufgrund der vorangegangenen Überlegung erfolgte die Überprüfung dieser Hypothesen in einer Studie am Tiermodell mit bestätigtem Tierversuchsantrag.

Die Untersuchung fand am Großtiermodell (Schwein) nach Induktion einer cerebralen *No-Flow*-Situation statt, was mittels Ligaturklemmung der aufsteigenden und versorgenden Gefäße des Gehirns nach offener Sternotomie erreicht wurde. Diese Situation wurde über zehn Minuten aufrechterhalten. Nach Öffnung der Ligaturen wurde eine zerebrale Reperfusion

erzielt und die Therapie nach einer vorherigen doppelblinden Randomisierung initiiert (Levosimendan vs. NaCl 0,9% vs. Sham). Die Erhebung weiterer Daten und Stabilisierung des Großtiers wurden über 24 Stunden fortgeführt. Die detaillierte Untersuchung des Hirnschadens erfolgte nach Organentnahme und histologischer Aufarbeitung.

Ziel dieser Dissertation ist die Veri- oder Falsifizierung des Effektes von Levosimendan auf zerebrale Perfusion, und es ergibt sich die folgende Fragestellung der vorliegenden Arbeit:

„Einfluss von Levosimendan auf den zerebralen Reperfusionsschaden nach Ischämie“.

2 Literaturdiskussion

2.1 Historie

Die Geschichte der Reanimation reicht mutmaßlich bis zum Ursprung der Menschheit zurück. Im Laufe der Jahrhunderte entstanden verschiedenste Ansätze: Bereits in der Schlacht gegen Ramses II. im Jahre 1296 v. Chr. bei Kadesch im heutigen Syrien fiel der König von Aleppo im Fluss Orontes dem Ertrinkungstod zum Opfer. Seine Soldaten hielten ihn kopfüber, in dem Glauben, dass dies den König wiederbeleben würde. Diese Überlieferung zeigt vermutlich den ersten vergeblichen Ansatz einer Wiederbelebung, die Inversionsmethode. Aetius von Amida empfahl in seinem Tetrabiblion zur Rettung Ertrunkener ähnliches Vorgehen, was bis 1760 Bestand hatte und erst dann in Verruf geriet. Eine weitere Methodik entwickelte sich in Europa durch Samuel de Champlain im 16. Jahrhundert. Bei seinen Reisen in Nordamerika konnte er indigene Völker bei der Anwendung von Klistieren mit Rauch beobachten und adaptierte dieses Vorgehen als probate Therapie. Es entstand die Fumigationsmethode. Sie wurde ab dem Jahr 1661 von Thomas Bartholin postuliert und schließlich von Lorenz Heister im Jahr 1719 für Notfallgeschehen beschrieben. Im Jahr 1740 befahl Ludwig XV. dieses Vorgehen als Standard bei Ertrinkungsunfällen. Ab dem frühen Mittelalter wurde die Flagellationsmethode ebenfalls häufiger beobachtet. Hierbei traktierte man den Ertrunkenen mit Brennesseln, Gräsern oder anderem Holzgewerk, um den leblosen Körper schmerzhaft zu stimulieren. Diese ‚Reizmethode‘ ist in der heutigen Zeit im Rahmen von Wiederbelebungen nicht mehr im Einsatz, sie findet jedoch in Form von Riechsalztherapien anderer Art Anwendung. Seit 1740 konnte vereinzelt eine weitere Methode beobachtet werden, die sogenannte Fassmethode: Hierbei rollte man den leblosen Körper repetierend über die Wölbung eines großen Fasses, um ihm wieder Leben „einzuhauchen“ und die physiologische Atmung nachzuahmen. (9)

Eine monumentale Entdeckung, die erste orale Beatmung mittels Kaminblasebalg, wird mutmaßlich Theophrastus Bombast von Hohenheim, bekannt als Paracelsus, zugeschrieben. Gesichert ist jedoch, dass Andreas Vesalius erfolgreich ein Schwein mittels Schilfrohr und eigenem Atem beatmete. Im Jahre 1667 beschrieb der Engländer Robert Hooke in seinem *„Experiment of Preserving Animals alive by Blowing through their Lungs with Bellows“* dieselbe Beatmung erstmalig. In diesem Jahrhundert konkurrierten mehrere Ansätze parallel, bis sich Letzterer 1776 mit zusätzlicher Gabe von Sauerstoff durch die Empfehlung des englischen Chirurgen John Hunter durchsetzte. Darauf aufbauend empfahl der Franzose Leroy d’Etiolles ab 1829, das Verfahren durch intermittierende externe Kompression von Brust und Bauch zu ersetzen. 1831 griff der Engländer Dalrymple diesen Ansatz grundlegend auf und modifizierte ihn zu intermittierenden Kompressionen des Körpers mit einem umschlingenden Tuch. Diese Methode nach Dalrymple sowie die ‚physiologische Methode‘ nach Silvester aus dem Jahr

1858, die die am meisten und längsten angewandte Methode manueller künstlicher Atmung ist, stellen vereinfacht und in Kombination den modernen Reanimationsansatz dar. (9)

Bereits in früher Zeit erkannte Galenos von Pergamon bereits, dass Wärmezufuhr im Rahmen von ‚Ohnmacht‘ durch Auskühlung äußerer sowie innerer Verfahren dem Patienten helfen könne. (9) Auch dieser weitreichende Urgedanke lässt sich vor allem im Rahmen der modernen Therapie der heutigen Zeit bei der Reanimation und im Postreanimationsmanagement wiederfinden. (1)

Jüngere Ansätze wie die Hustenreanimation, die Klopfschrittmarkerstimulation oder auch der präkordiale Faustschlag stellten sich abermals als tradierte Ansätze heraus. Die Geschichte der Reanimation untermauert, dass aktuelle Ansätze stets kritisch beurteilt und wissenschaftlich überprüft werden müssen. Darüber hinaus ist es sinnhaft, auf zeitgemäße und evidente Vorgehensweisen wie zum Beispiel die Herzdruckmassage zu vertrauen, statt Zeit in unnötige Interventionen zu investieren. (14) (18)

Neuzeitlich gelingt es zunehmend durch Zuhilfenahme von Apparaturen und technischen Möglichkeiten, Patienten erfolgreich wiederzubeleben, sodass ein eigener Kreislauf und Leben möglich werden. Infolgedessen entwickelte sich bis zum heutigen Tag fortsetzend die moderne Fragestellung der adäquaten und evidenzbasierten Therapie eines wiederbelebten Patienten und des oft festgestellten fulminanten Hirnschadens. Dies steht zunehmend im Zentrum moderner Reanimationsforschung. (18)

2.2 Epidemiologie

Grundsätzlich wird in ein außerklinisches OHCA (*Out-of-Hospital Cardiac Arrest*)- und ein innerklinisches IHCA (*In-Hospital Cardiac Arrest*)-Ereignis unterschieden. Die jährliche Inzidenz für ein OHCA-Ereignis beläuft sich in Europa zwischen 67 und 170 pro 100 000 Einwohner. In etwa 50 bis 60% der Fälle (zwischen 19 und 97 pro 100 000 Einwohner) wird eine Wiederbelebung durch Rettungskräfte versucht oder fortgesetzt. Die Überlebensrate bei Entlassung aus dem Krankenhaus variiert zwischen 0 und 18% und beträgt im Durchschnitt 8%. Für ein IHCA-Ereignis kann eine jährliche Inzidenz in Europa zwischen 1,5 und 2,8 pro 1000 Krankenhauseinweisungen gemessen werden. Die Überlebensrate nach Entlassung aus dem Krankenhaus liegt hier zwischen 15 und 34%. (1)

Für ein IHCA-Ereignis listet das deutsche Reanimationsregister in seinem aktuellen Jahresbericht das Durchschnittsalter von 72,4 Jahren und eine Geschlechtsverteilung von 64,6% für männliche Patienten, die weiteren weiblich, auf. 57,1% des Herz-Kreislauf-Stillstands erfolgen auf einer Normalstation, 21,2% in Notaufnahmen sowie Schockräumen

und Funktionsabteilungen, 18,0% auf Intensiv- und Überwachungsstationen, 1,9% im Operationsbereich und 1,8% an sonstigen Orten. Insgesamt sind hiervon 67,7% beobachtete Herz-Kreislauf-Stillstände. In 88,6% der Fälle gab es Reanimationsbemühung vor dem Eintreffen des Notfallteams. Der erste abgeleitete EKG-Rhythmus war zu 86,4% nicht defibrillierbar, genauer zu 48,8% eine Asystolie und zu 37,6% eine pulslose elektrische Aktivität. Defibrillierbare Rhythmen, wie eine pulslose ventrikuläre Tachykardie oder Kammerflimmern, wurden mit 13,3% festgestellt. Häufigste initiale Verdachtsdiagnose bei 51,3% war eine kardiale Genese, zu 27,3% ein respiratorischer Ursprung, zu 11,8% sonstige nicht-kardiale Ursachen, zu 9,2% ein unbekannter Auslöser und zu 0,4% ein Trauma. Lebend entlassen wurden 19,1%. Der *Cerebral-Performance-Categories-Scale* Grad 1 und 2, ein gutes neurologisches Ergebnis, wurde mit 13,9% beschrieben. (10)

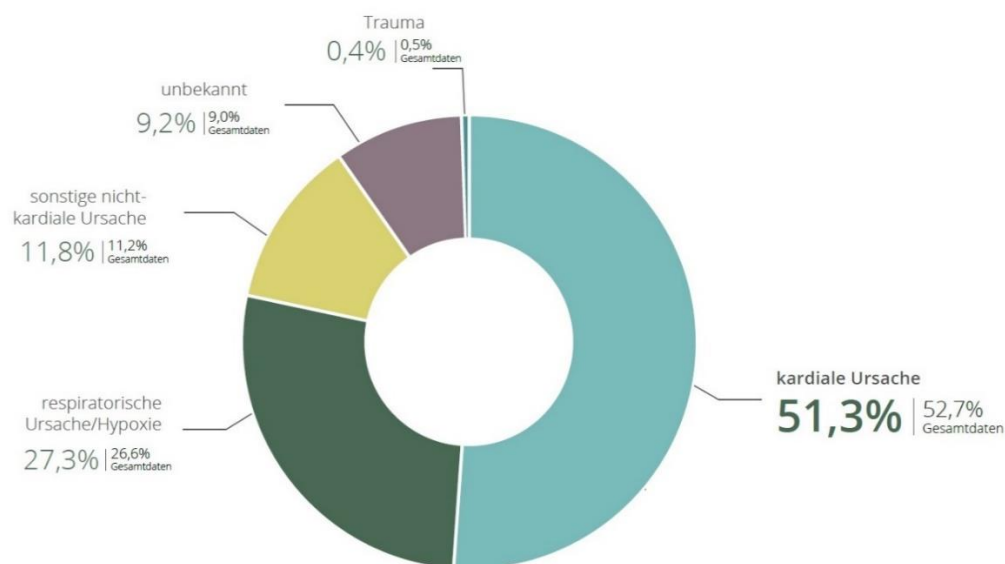


Abb. 2

Öffentlicher Jahresbericht 2022 des Deutschen Reanimationsregisters, Seewald et al. 2022

Für ein OHCA-Ereignis listet das deutsche Reanimationsregister in seinem aktuellen Jahresbericht das Durchschnittsalter von 70,2 Jahren und eine Geschlechtsverteilung von 66,7% für männliche Patienten, die weiteren weiblich, auf. In 57,3% der Fälle waren bis zum Eintreffen von professionellen Hilfskräften Wiederbelebensmaßnahmen eingeleitet worden. Der Ort des Herz-Kreislauf-Stillstandes ist mit 65,4% eine Wohnung und in 18,9% der Fälle im öffentlichen Raum. In 15,7% waren es andere Einsatzorte. Beobachtete Herz-Kreislauf-Stillstände wurden mit 56,3% der Fälle gemessen. Bei 30,9% konnte eine telefonische Anleitung zur Wiederbelebung durch einen Leitstellendisponenten durchgeführt werden. Die Eintreffzeit am Einsatzort des ersten Rettungsfahrzeuges seit der Alarmierung betrug im Mittel sechs Minuten und 55 Sekunden (+/- 3 Minuten und 48 Sekunden). Der erste abgeleitete EKG-Rhythmus war zu 79,4% nicht defibrillierbar, genauer zu 56,5% eine Asystolie und zu 22,9%

eine pulslose elektrische Aktivität. Defibrillierbare Rhythmen wie eine pulslose ventrikuläre Tachykardie oder Kammerflimmern wurden mit 19,8% festgestellt. Die häufigsten initialen Verdachtsdiagnosen waren zu 16,3% ein unbekannter Auslöser und zu 15,6% ein respiratorischer Anlass. Sonstige kardiale Ursachen konnten zu 6,6% und traumatische Ursachen zu 3,2% festgestellt werden. Ertrinken wurde mit 0,4% gemessen. Lebend entlassen wurden 10,7%.

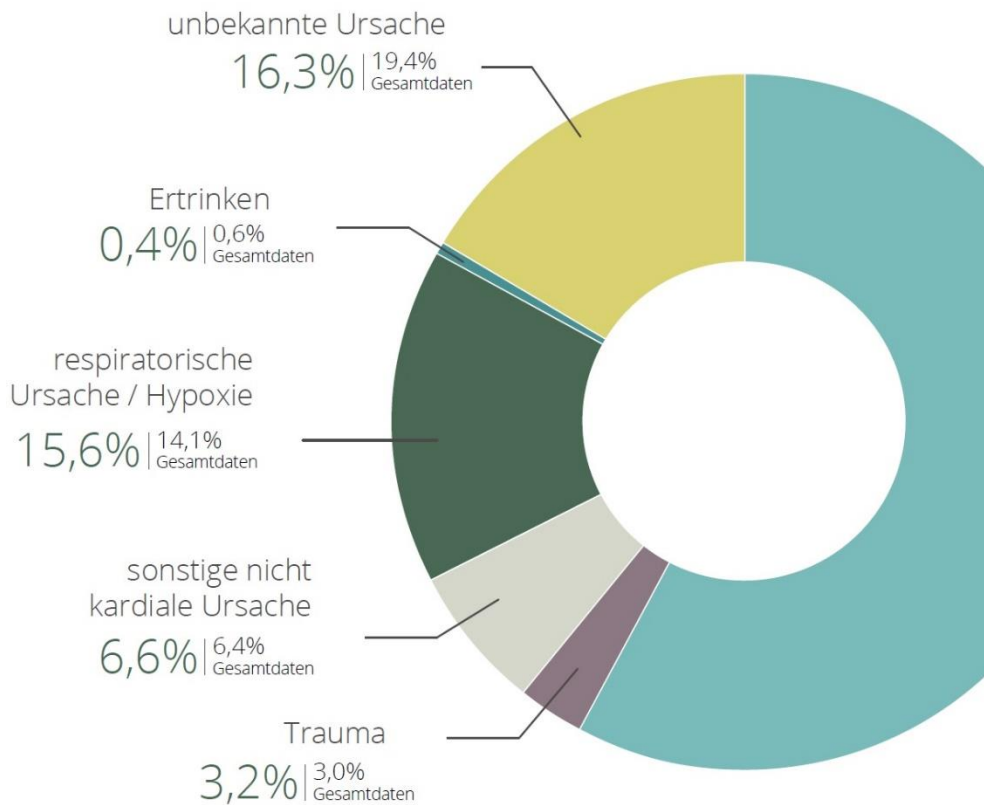


Abb. 3

Öffentlicher Jahresbericht 2022 des Deutschen Reanimationsregisters, Seewald et al. 2022

2.3 Pathophysiologie des Herz-Kreislauf-Stillstandes

Im Rahmen eines Herz-Kreislauf-Stillstandes kommt es zu einem vollständigen Stillstand des Kreislauf- und Blutflusses. Unmittelbar beginnt der Prozess einer Ganzkörperischämie.

Dieser Prozess wird aufgrund der fehlenden Funktion der Atmung sowie der kardialen Pumpfunktion eingeleitet. Diese beiden physiologischen Regelprozesse bilden die Grundpfeiler der Vitalfunktionen. Sie stehen in direktem Zusammenhang miteinander und bedingen sich gegenseitig. Der Prozess des Transports des lebensnotwendigen Sauerstoffs und der Rücktransport des zellulären Abbauprodukts Kohlenstoffdioxid (CO₂) sind entscheidend. Kommt es zum Ausfall einer der Funktionen, so folgt der Ausfall der anderen

Funktion unmittelbar. Die verschiedenen Organsysteme weisen eine unterschiedliche Toleranz bei Stillstand dieses Regelkreises auf. So ist für zentral-nervöse Strukturen (ZNS) mit einer Perfusionsintoleranz von ca. 8 bis 10 Sekunden zu rechnen, für Organe mit ähnlich hohem energetischen Umsatz von Adenosintriphosphat (ATP) (zum Beispiel Herz) mit nicht wesentlich längerer Minderperfusionszeit. Die ischämische Depolarisation setzt nach spätestens ein bis zwei Minuten ein. (15) Ist eine aerobe Glykolyse zur Bereitstellung von ATP nicht mehr möglich, können Zellen zur Überbrückung dieses Mangels auf eine anaerobe Energiegewinnung zurückgreifen. Hierbei entsteht Laktat. (13)

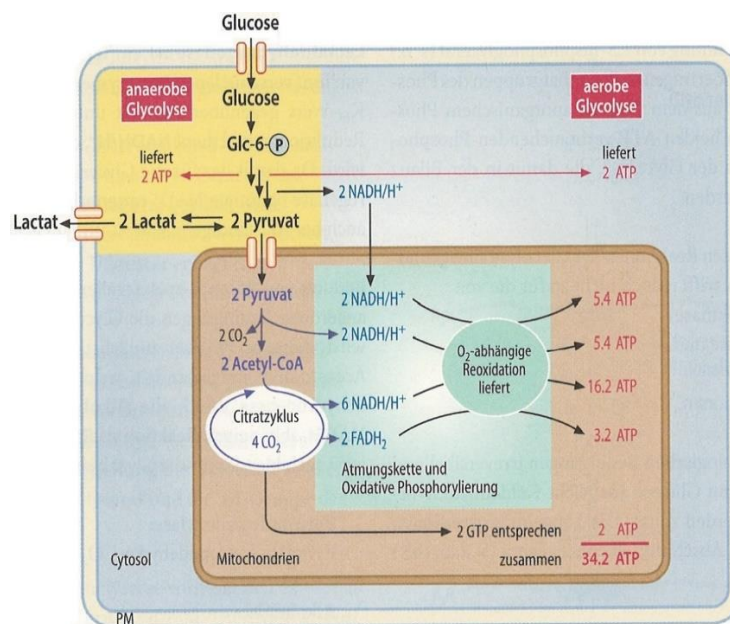


Abb. 4

*Regelkreislauf aerobe/anaerobe Glykolyse, Löffler/Petridis in Biochemie und Pathobiochemie
9. vollständige Auflage*

Um einen längeren Zeitraum überwinden zu können, muss Laktat über das Kreislaufsystem abtransportiert werden. Sollte es zu einem primären Ausfall der Atmung kommen, ist ein kurzweiliges Aufrechterhalten der kardialen Pumpfunktion denkbar und möglich. Im Rahmen des vollständigen Herz-Kreislaufstillandes ist dieser Mechanismus vollständig gestört und kompensiert die Minderperfusion für maximal ein bis zwei Minuten.

Werden diese Prozesse nicht zeitnah aufgehoben oder unterbrochen, kommt es unmittelbar zur zellulären Apoptose aufgrund von Mangelversorgung sowie der irreversiblen Autolyse, und der Tod tritt ein.

2.4 Therapie des Herz-Kreislauf-Stillstandes

Nach aktueller Evidenz gibt das ERC regelmäßige Leitlinien heraus, die den aktuellen wissenschaftlichen Stand widerspiegeln und daraus Handlungsempfehlungen ableiten. Unterschieden wird hierbei in Algorithmen der Laienhilfe, Basismaßnahmen durch Fachpersonal *Basic-Life-Support* (BLS), erweiterte Maßnahmen durch Fachpersonal *Advanced-Life-Support* (ALS) sowie spezielle Algorithmen für Reanimation bei Kindern und Neugeborenen. Auf Letztere wird in dieser Arbeit kein Bezug genommen. (3)

Sobald eine Reanimationssituation festgestellt worden ist, empfiehlt das ERC den sofortigen Beginn einer Herzdruckmassage. Diese Thoraxkompressionen sollen so hochwertig wie möglich und stets mit höchster Priorität durchgeführt werden, optimalerweise in einem Schnittpunkt in der Mitte einer gedachten Linie zwischen den Mamillen und der Median-Linie des Körpers. Die Kompressionstiefe des Thorax sollte zwischen fünf und sechs Zentimetern betragen. Die Entlastungen erfolgen nach jeder Herzdruckmassage bis zum Ausgangspunkt. Die Geschwindigkeit sollte so gewählt sein, dass es zu 100 bis 110 Kompression pro Minute kommen kann. Die zweite essentielle Säule ist die Beatmungstherapie. Dieses Vorgehen folgt einem 30:2-Rhythmus. Auf 30 Thoraxkompressionen folgen zwei Beatmungsversuche für jeweils eine Sekunde. Eine Masken-Beutel-Beatmung soll bestenfalls zunächst mit einer F_{iO_2} von 100% initiiert oder weitere Verbesserungen des Atemwegsmanagements angewandt werden. Dies darf jedoch nicht die Etablierung der dritten Säule des ALS verzögern, die die Interpretation der elektrokardiographischen Darstellung der Vektoren der möglichen Herzstromaktivität mittels Zwei-Kanal-Klebeelektroden/Pads mit Defibrillationsfunktion darstellt. Sind diese suffizient in der anterolateralen Brustposition positioniert, kann eine erste Interpretation begonnen werden, die ab diesem Zeitpunkt alle zwei Minuten wiederholt wird. Dieses Vorgehen stellt den einzigen Zeitpunkt dar, in dem die Thoraxkompression für zwei bis drei Sekunden unterbrochen werden darf. Die Interpretation erfolgt in zwei Bereichen: defibrillationswürdige Rhythmen sowie nicht-defibrillationswürdige Rhythmen. (3)

Defibrillationswürdige Rhythmen:

- Kammerflimmern
- Pulslose ventrikuläre Tachykardien

Hierauf erfolgt ein sofortiger Defibrillationsversuch. Im Anschluss werden die Thoraxkompressionen begonnen und der 30:2-Basis-Rhythmus fortgesetzt. Eine erneute Interpretation erfolgt nach zwei Minuten. (3)

Nicht-defibrillationswürdige Rhythmen:

- Pulslose elektrische Aktivität

- Asystolie

Es erfolgt die sofortige Wiederaufnahme der Thoraxkompressionen und des 30:2-Basis-Rhythmus. Zusätzlich sollte unverzüglich eine intravenöse/intraossäre Gabe von 1 mg Adrenalin alle drei bis fünf Minuten begonnen werden. Eine erneute Interpretation der elektrischen Aktivität erfolgt nach zwei Minuten. (3) Zusätzlich wird bei defibrillationswürdigen elektrischen Aktivitäten nach dreimaligem Defibrillationsversuch die intravenöse/intraossäre Gabe von 1 mg Adrenalin begonnen, sowie eine einmalige intravenöse/intraossäre Gabe von 300 mg Amiodaron durchgeführt. Nach der fünften Defibrillation ist die Amiodaron-Gabe mit 150 mg zu wiederholen. Dieser Basis-Algorithmus des ALS bildet nach aktueller Evidenz das erweiterte Vorgehen ab. (3)

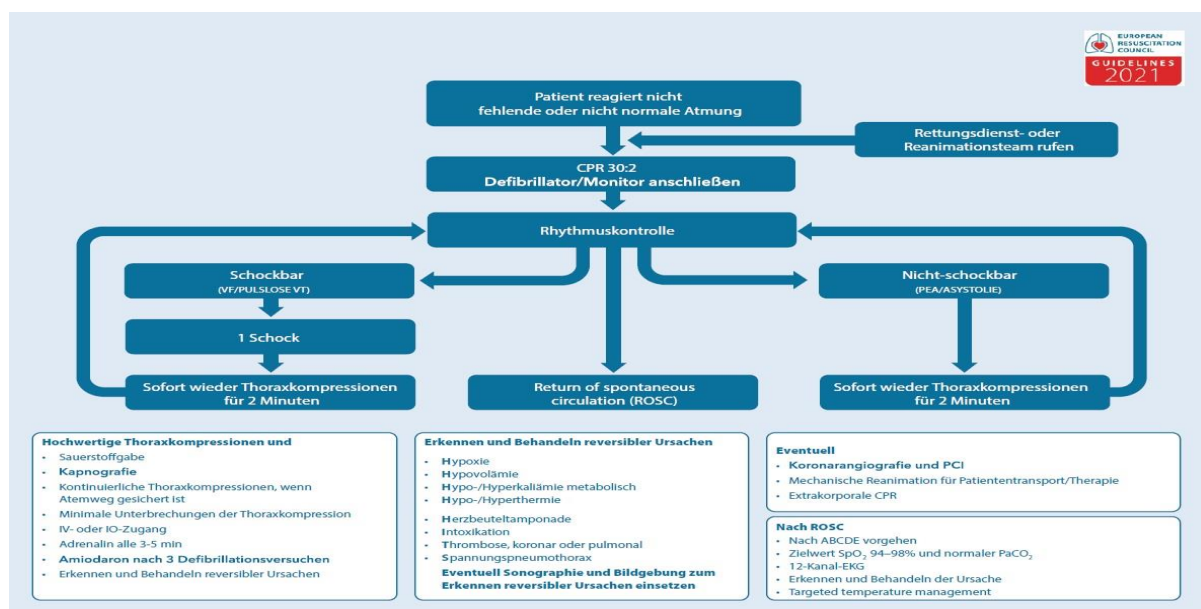


Abb. 5

ALS-Algorithmus, Notfall Rettungsmed 2021

Sobald eine Reanimation nach diesem Algorithmus voranschreitet, sollte schnellstmöglich das Erkennen und Behandeln potentieller reversibler Ursachen beginnen.

Laut dem *International Liaison Committee on Resuscitation* (ILCOR) ist es in kardiale und extrakardiale Ursachen einzuteilen. (12) Des Weiteren hat sich im präklinischen Alltag die Klassifikation des ERC in reversible Ursachen der vier „H“ und das „HITS“-Schema durchgesetzt. (3)

Reversible Ursachen der vier „H“ können sein:

1. Hypoxie
2. Hypovolämie
3. Hypo-/Hyperkaliämie metabolisch
4. Hypo/Hyperthermie

Reversible Ursachen des „HITS“-Schemas können sein:

1. Herzbeuteltamponade
2. Intoxikation
3. Thrombose, koronar oder pulmonal
4. Spannungspneumothorax

Entsprechend können weitere diagnostische Maßnahmen wie eine Sonographie o. Ä. sinnvoll sein. Eventuell sollten eine Koronarangiographie und eine perkutane Katheterintervention, insofern indiziert, angestrebt werden. (3)

Kommt es zu einer Wiederkehr des Spontankreislaufs (ROSC), empfiehlt das ERC ein strukturiertes Vorgehen nach ‚ABCDE-Schema‘ und ein 12-Kanal-EKG zur Überwachung von elektrischen Vektorveränderungen am Herzen. Ferner muss die periphere Sättigung des Hämoglobins, kurz SpO₂, mit einem Zielwert von 94% bis 98% überwacht werden. Der Partialdruck des Kohlenstoffdioxids im Blut, der „PaCO₂“, ist im Normbereich zu therapieren. (3)

Außerdem empfiehlt das ERC die sofortige Fortsetzung oder den Beginn der Therapie der Ursache sowie ein auf Zielwerte gerichtetes Temperaturmanagement. (3)

2.5 Pathophysiologie des Postreanimationssyndroms

Durch Wiederbelebensmaßnahmen kann ein ROSC gelingen. Im Anschluss daran entsteht ein Zustand, den das ILCOR als *Post-Cardiac-Arrest* Syndrom definiert. (12) Zunehmend hat sich gezeigt, dass ein hochwertiges Management des Postreanimationssyndroms für das Langzeitüberleben elementar ist. Dieses Postreanimationssyndrom gliedert sich häufig in mehrere Phasen. (16)

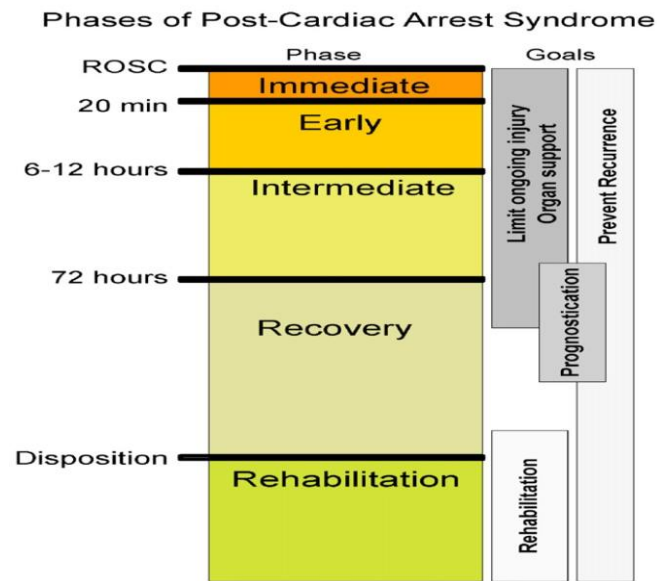


Abb. 6

Post-cardiac-arrest Syndrom, Nolan et al. 2008

Ein Kreislaufstillstand und ein ROSC sowie das *Post-Cardiac-Arrest* Syndrom hängen unmittelbar miteinander zusammen. Letzteres ist durch vier syndromatische Unterbereiche gekennzeichnet:

1. Hirnschaden (*Post-cardiac-arrest Brain injury*)

Durch den Stillstand der Perfusion kommt es zu einer Minderversorgung des Gehirns und somit zu einer Ischämie. Besonders vulnerabel sind hierbei in absteigender Reihenfolge die Strukturen des Hippocampus, des Cerebellums, des Corpus Striatum und des Cortex. (15) (16) Dieser Ausfall führt nach ca. ein bis zwei Minuten zu einer Störung der Elektronenströme der Zellmembran und zum unkontrollierten Einstrom von Elektrolyten. Besonders der Einstrom von Calcium in die Zelle verursacht mitochondriale Schäden, die zur Entstehung von Cytochrom C und von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in hoher Konzentration führen. (16) Im vitalen und physiologischen Zellgewebe entstehen regelhaft minimale Anteile von ROS, die unmittelbar verstoffwechselt werden. Im Rahmen eines Herz-Kreislaufstillstandes ist dieser Mechanismus gestört. Durch die hohen Konzentrationen von ROS kommt es zu mitochondrialen Schäden, sodass der Energieumsatz der Zelle stagniert und die Zelle in die Apoptose tritt oder nekrotisiert. Durch einen ROSC und eine wiederkehrende Reperfusion und Versorgung der Zelle kann die intrazelluläre Calciumkonzentration durch die Natrium-Calcium-Antiporter korrigiert werden (17), insofern der Zellschaden nicht zu umfangreich ist. Je umfangreicher der Schaden, umso höher die Konzentration

des Calciums im Verlauf. (15) Außerdem kann es durch Störung der Calciumhomöostase und durch den Blutstillstand im Rahmen eines Herz-Kreislauf-Stillstandes zu unabsichtlicher Aktivierung des Gerinnungssystems kommen. Darüber hinaus kann der Ausfall der regelhaften Thrombolyse von Mikrothromben zu mikrovaskulären Störungen führen. Dies begünstigt die Bildung von neuen Mikrothromben. (18) (15) Hierbei könnte im Rahmen der Reperfusion zu einer kompensatorischen Hyperämie kommen und bei gestörter Gefäßpermeabilität ein Hirnödem entstehen.

2. Kardiale Dysfunktion (*Post-cardiac-arrest myocardial dysfunction*)

Nach Yellon und Hausenloy kann die myokardiale Dysfunktion in vier Formen unterteilt werden: (19) Form 1 liegt zumeist dem myokardialen *Stunning* zugrunde. Hierbei kommt es nach kurzer Ischämiezeit und schneller Reperfusion zu einem leicht veränderten koronaren Blutfluss sowie zu vereinzelt Myokardnekrosen. In Form 2 kann durch verlängerte Minderperfusion eine intravasale Thrombenbildung und konsekutiv eine myozytäre Schwellung begünstigt werden. Form 3 provoziert höhergradige Arrhythmien wie zum Beispiel ventrikuläre Tachykardien oder Kammerflimmern. In Form 4 ist der irreversible Myokardschaden eingetreten, was einen unwiderruflichen Zelltod zur Folge hat. (20)

3. Systemische Reperusionsreaktion (*Systemic Ischemia/Reperfusion Response*)

Sobald eine ROSC generiert wurde und eine systemische Reperfusion einsetzt, zeigen sich eine Vielzahl an Reaktionen. Durch den Herz-Kreislauf-Stillstand sind im gesamten Organismus wie auch speziell in der Endothelzelle intrazellulär hohe Mengen an ROS entstanden, die zur Schädigung dieser und weiterer Endothelzellen führen. Dieser Reperfusionsschaden führt zu einer Trias aus Inflammation und Gerinnungsaktivierung und zu einem Aufrechterhalten des Endothelschadens. Dieser bewirkt unmittelbar eine Störung der Barriereintegrität und der Gefäßpermeabilität. Es kommt zu Koagulationen, Leukozytenaktivierungen sowie zu Ausschüttungen von inflammationsfördernden Zytokinen. (21) Ein besonders starker Anstieg ist bei den Zytokinen IL-6, IL-8 und IL-10 zu messen, ähnlich einer Sepsis. (22) In einem Schweinmodell von Meybohm et al. konnte ein ähnlicher Anstieg von IL-6 und IL-10 beobachtet werden. (23)

4. Anhaltende auslösende Pathologien (*Persistent precipitating pathology*)

Anhaltende auslösende Pathologien sollten nach ERC alsbald möglich, spätestens jedoch mit dem Auftreten eines ROSC, therapiert werden. Die oftmals multifaktorielle Genese dieser Pathologien erfordert eine erkrankungsspezifische Therapie, die ihren eigenen Gesetzmäßigkeiten und Leitlinien sowie Handlungsempfehlungen unterliegt. (18) (3)

2.6 Therapie des Postreanimationssyndroms

Die Therapie des Postreanimationssyndroms ist zeitsensibel und sollte interdisziplinär strukturiert sein. (16) Die Patienten benötigen eine schnellstmögliche intensivmedizinische Behandlungsoption, inklusive Überwachung der Blutdrücke mittels arterieller Kanülierung, Überwachung der peripheren pulsoxymetrischer Sättigung, der zentralvenösen Sättigung sowie Messungen des zentralvenösen Drucks via zentralvenösem Katheter. Eine kontinuierliche elektrokardiographische Überwachung und Temperaturmessung der Körperkerntemperatur sowie regelmäßige Bestimmungen der arteriellen Blutgase und Messungen der Laktatkonzentrationen im arteriellen Blut sind zu erheben. Blutzucker- und Elektrolytmessungen, Entzündungsmarker im Blut sowie allgemeine Blutbildüberwachungen und eine Röntgen-Thorax-Übersichtsaufnahme sind durchzuführen. (16)

Des Weiteren sollten eine Echokardiographie sowie ein *Monitoring* des *Cardiac-Outputs* erfolgen. Ergänzend sind ein frühzeitiges Elektroenzephalogramm (EEG) oder/und eine Magnetresonanztomographie (MRT) oder eine Computertomographie (CT) durchzuführen. (16)

All diese Gerätschaften und ,*Tools*‘ sollten genutzt werden, um folgende Zielparameter für eine frühe hämodynamische Optimierung ähnlich einer Sepsis zu ermöglichen (16) (22) (3):

Zentralvenöser Druck:	8-12 mmHG
Mittlerer arterieller Druck:	65-90 mmHG
Zentralvenöse Sättigung:	>70%
Hämatokrit:	>30%
Hämoglobin-Konzentration:	>8 g/dl
Laktat:	<2 mmol/L
Diurese:	>0,5 mL/Kg/KG/h
Oxygenierungsindex:	>600 ml/min/m*2

Werden diese Zielparameter konsequent therapiert, ist eine Reduktion der Inflammation, der Organdysfunktion sowie des Verbrauchs der Ressourcen im Gesundheitswesen messbar. (24) (25) (26) Darüber hinaus kann eine Reduktion der Mortalität beobachtet werden. (24)

Um diese Therapieziele konsequent zu verfolgen, sollten primär intravenöse Flüssigkeitstherapie, Vasopressoren, Inotropika und Bluttransfusionen eingesetzt werden.

Damit weiter oxidativer Stress vermieden werden kann, erfolgt die Beatmungstherapie/Oxygenierungstherapie nicht zwangsläufig mit einer F_{iO_2} von 1,0, sondern blutgasanalytisch ausgerichtet. Hierbei beträgt die arterielle Sauerstoffkonzentration zwischen 94 und 96 %. (27) Eine Hypoxämie ist jedoch immer zu vermeiden. Die mechanische Ventilation ist so zu wählen, dass eine Hyperkapnie umgangen und bestenfalls eine lungenprotektive Beatmung mit 6 bis 8 ml/KgKG und einem Druckmaximum von 30 mBar nicht überschritten wird. Der pCO_2 wird regelmäßig via arterieller Blutgasanalysen überprüft und beobachtet. Eine Hyperkapnie ist zu vermeiden, jedoch kann es in Einzelfällen zu notwendiger Abweichung der Limitationen kommen. Aktuell besteht hierzu keine Evidenz für das jeweilige Vorgehen.

Ein besonderes Augenmerk liegt auf der therapeutischen Hypothermie. Das ERC empfiehlt diese ausdrücklich als *targeted temperature management*. (3) Eine passagere Hypothermie kann neuroprotektive Effekte erzielen und zur Reduktion des Sauerstoffverbrauchs des ZNS beitragen. Dies führt intrazellulär zur Reduktion von ROS und somit konsekutiv zur Reduktion der Reperfusionstrias. Bei korrekter Anwendung wird mit einer *Number needed to treat* von sechs gerechnet. (28) (29) In Tierversuchsstudien konnte ein Vorteil festgestellt werden, wenn ein frühzeitiger Beginn der Hypothermie innerhalb der ersten 15 Minuten oder während der Wiederbelebung begonnen und für ein bis zwei Stunden fortgesetzt wurde. (30) (31) Die genauen Schemata und Algorithmen sind Gegenstand aktueller Untersuchungen, weshalb sich kein eindeutiges evidentes Regime für ein spezifisches Patientenkollektiv als überlegen erweisen konnte.

2.7 Inflammationsmarker und Prognosemanagement

Als Zytokine werden verschiedene Mediatoren zusammengefasst, die eine polypeptidale Struktur aufweisen und der Signaltransduktion dienen. (32) Im Vordergrund der Postreanimationstherapie steht das *Monitoring* verschiedener Mediatoren und Hormone zur Prognose- und Therapiesteuerung.

Die Ausschüttung von Interleukin 1 (IL-1) aufgrund von apoptotischen Prozessen und zellulärem Stress, insbesondere aus Endothelzellen, stimuliert eine proinflammatorische Kaskade, die zur weiteren Ausschüttung von Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 8 (IL-8) sowie des Tumor-Nekrose-Faktors-alpha (TNF-alpha) führt. Interleukin 10 (IL-10) fungiert als Gegenspieler; wirkt antiinflammatorisch und als regulierendes Korrektiv. Dieses ausbalancierte System gerät im Rahmen einer Reperfusion nach einem Herz-Kreislauf-Stillstand in eine Dysbalance zugunsten der Inflammation. IL-1, IL-6 sowie TNF-a wirken als endogene Pyretika direkt auf hypothalamische Strukturen und können zur

Hyperthermie/Pyrese führen. (32) (33) (34) Diese Mediatoren konnten unter anderem bei Aufnahme von Patienten nach einem OHCA-Ereignis in erhöhter Konzentration gemessen werden. (35) Im Schweinmodell konnten Meybohm et al. eine Abstrahierung von IL-1, IL-6, IL-10 sowie des TNF-alpha in Cortextgeweben nach Herz-Kreislauf-Stillstand beobachten. Diese Interleukine haben einen modulierenden Effekt auf Lipocalin 2, welches hydrophobe Moleküle transportabel machen kann und als Akute-Phase-Protein für Zellen des Hirngewebes wie zum Beispiel Mikroglia, Astrozyten, Neurone und Endothelzellen gilt. (32) (33) (34) Lipocalin 2 kann somit Hinweise auf cerebrale Reperfusion- und Ischämieschäden geben, bei denen gliale Aktivierung, Zellverlust und/oder Neurodegeneration stattfinden. (36)

Die neuronenspezifische Enolase (NSE) ist ein zytoplasmatisches Enzym, das spezifisch in Neuronen oder Neurotumoren vorkommen kann. (32)

Der biochemische Marker S100 ist ein kalziumbindendes Protein, welches aus Astroglia- und Schwann-Zellen stammt. (32)

Bei Überlebenden eines Herz-Kreislauf-Stillstandes konnten Stunden nach ROSC die NSE und der S100 ermittelt werden. In verschiedenen Untersuchungen variabler Güte zeigte sich bei Letzterem zwar stets eine hohe Spezifität, jedoch zumeist eine niedrige Sensitivität. (16) (37) Eine Konzentration der NSE $> 33 \mu\text{g/L}$ scheint mit einer schlechten Prognose verbunden zu sein, wobei verschiedene Untersuchungen variable *Cut-off*-Werte zwischen 30 und 60 $\mu\text{g/L}$ bei verschiedenen venösen Entnahmezeitpunkten zwischen 24 und 72 Stunden nach ROSC zeigten. (16) (37) Aufgrund der uneinheitlichen Datenlagen sollten NSE und S100 überwacht werden, jedoch aufgrund der Studienlimitationen in eine multidiagnostische Bewertung einfließen. (37) (38)

3 Material und Methoden

3.1 Materialliste

3.1.1 Apparaturen

Blutgasanalysator	Radiometer ABL 800 Basic (Willich, D)
Elektrokauter	Fa. Erbe ICC 350 (Tübingen, D)
HZV-Messung	Pulsion Medical Systems PiCCO Plus (München, D)
Infusomat	B. Braun Infusomat FM (Melsungen, D)
Intensivventilator	AVEA Viasys (Franklin Lakes, USA)
Invos 5100C-System	Medtronic (Meerbusch, D)
Kamera	Olympus SC50 (Hamburg, D)
Kapnometrie	Nellcor N1000 / N-25000 (Hayward, USA)
Laryngoskop	Teleflex Medical GmbH (Fellbach, D)
Laryngoskopspatel Mac Intosh	Teleflex Medical GmbH (Fellbach, D)
Mikroskop	Olympus CX43 (Hamburg, D)
Monitor	Datex Ohmeda S/5 FM (Freiburg i. Breisgau, D)
Oszillierende Säge	Ceabis CEATA47 (Este, I)
Perfusoren	B. Braun Perfusor FM (Melsungen, D)
Pipetten	Eppendorf Research 10/100/200/1000 (Hamburg, D)
Pulsoximetrie	Masimo SET (Irvine, USA)
RNA-Bestimmung	Heidolph REAX Control (Wiesbaden, D)
Sonographie	Sonosite MicroMexx Ultrasound (Bothell, USA)
Zentrifuge	VWR MicroStar 17R (Osterode, D)
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5804R (Hamburg, D)

3.1.2 Pharmaka

Atracuriumbesilat	Hikma Atracurium (Gräfeling, D)
-------------------	---------------------------------

Azaperon	Elanco Stressnil (Bad Homburg, D)
Calciumgluconat	B. Braun Calciumgluconat 10 % (Melsungen, D)
Esmololhydrochlorid	Baxter Brevibloc (Unterschleißheim, D)
Fentanylcitrat	Janssen Fentanyl (Neuss, D)
Glucose-Monohydrat	Fresenius Kabi Glucosteril 40 % (Bad Homburg, D)
Heparin-Natrium	Ratiopharm Heparin-Natrium 25000 (Ulm, D)
Kaliumchlorid	B. Braun Kaliumchlorid 7,45 % (Melsungen, D)
Kristalloide Infusionslösung	B. Braun Sterofundin ISO (Melsungen, D)
Midazolamhydrochlorid	Hamelin Midazolam (Hamelin, D)
Natriummetabisulfit	Dr. F. Köhler Natriumthiosulfat 10 % (Bensheim, D)
Nitroprussidnatrium	Rottapharm Nitropussiat Fides (Barcelona, ES)
Norepinephrin	Sanofi Aventis Arterenol (Frankfurt a.M., D)
Propofol	B. Braun, Propofol Lipuro (Melsungen, D)

3.1.3 Verbrauchsgegenstände

3-Wege-Hahn	BD Connecta (Helsingborg, SE)
Abdecktücher	Care Fusion Convertors (Chateaubriant, FR)
Beatmungsbeutel	Ambu Spur 2 Set (Ballerup, DK)
Beatmungsmaske	Ambu Spur 2 Set (Ballerup, DK)
Desinfektionsmittel farbig	Schülke Kodan Tinktur forte gefärbt (Norderstedt, D)
Desinfektionsmittel farblos	Schülke Octeniderm farblos (Norderstedt, D)
DNA-Lösung	Quiagen gDNA-Eliminator Solution (Hilden, D)
Drucksystem	Smiths Medical Monitoring Set (Grasbrunn, D)
Einmalhandschuhe	Semper Care Premium Latex (Northhamptonshire, GB)
Einmalrasierer	MedicalCare & Serve Premium Plus (Willich, D)
EKG-Elektroden	Covidien Kendall ECG Electrodes (Mansfield, USA)

Fixierung	BSN Fixomull Stretch (Hamburg, D)
Infusomatsystem	B. Braun Original Infusomat line (Melsungen, D)
Infusionssystem	Codan Infusion Set (Lehnsahn, D)
Invos Oximetrie-Sensoren	Medtronic (Meerbusch, D)
Kanülen	B. Braun Sterican (Melsungen, D)
Kombistopfen	B. Braun Combi Stopper (Melsungen, D)
Kompressen	MaiMed VK non sterile (Neuenkirchen, D)
Kryogefäß	Nalgene Cryoware Cryovine (New York, USA)
Leitung	Smiths Medical RR-Messschlauch (Glasbrunn, D)
Luer-Kanüle	Dispomed Strauss Kanüle Luer (Gelnhausen, D)
LV-Katheter	Cordis Standard Ducor SIM2 5F (Fremont, USA)
Lösungsmittel	Qiagen Lysis Reagent (Hilden, D)
Monovetten	Sarstedt S-Monovetten (Nürnbrecht, D)
Nahtmaterial	Ethicon Monoacryl 3-0 (St. Stevens, BE)
PA-Katheter	Merit Medical PA-Kath. FR. 6 3L (South Jordan, USA)
Perfusorleitungen	Fresenius Kabi Injectomat line (Bad Homburg, D)
Perfusorspritze	BD Perfusion 50 Syringe (Drogheda, IE)
Pipettenspitzen	Biozym Safe Seal – Tips Professional (Oldendorf, D)
Puffer	Qiagen Buffer RPE / RWT (Hilden, D)
Punktionsnadel	Smiths Medical Seldinger Nadel (Glasbrunn, D)
Sauerstoff	Fa. Air Liquide Takeo medicAL (Düsseldorf, D)
Schleuse FR. 5	Terumo Radifocus Introducer 2 FR. 5 (Elkton, USA)
Schleuse FR. 6	Terumo Radifocus Introducer 2 FR. 6 (Elkton, USA)
Tubes	Qiagen Collection Tubes (Hilden, D)
Tubus	Rüsch Supersafety Clear (Kamunting, MY)
Trennsäulen	Qiagen QIAShredder (Hilden, D)

Ultraschall-Gel	ASID-Bonz Ultraschall-Gel Sonosid (Herrenberg, D)
Venenverweilkanülen	B. Braun Vasofix Safety (Melsungen, D)
Winkelstücke	Intersurgical Drehkonnektor (Berkshire, GB)
ZVD-System	Smiths Medical Medex Logical (Grasbrunn, D)
Zentralvenöser Katheter	Smith Medical Deltec Logicath 3 L. (Grasbrunn, D)

3.2 Versuchsaufbau sowie -Durchführung

3.2.1 Versuchsobjekt

Als Versuchsobjekt wurde die deutsche Landrasse des Hausschweins (lat. *Sus scrofa domestica*) standardisiert verwendet. Das Hausschwein als Versuchsobjekt birgt Besonderheiten in sich. Zum einen ist die hohe Variabilität der zentral versorgenden Gefäße anspruchsvoll zu präparieren, zum anderen wird ein Großteil der Hirnperfusion über die Aa. Vertebrales sichergestellt. Dies steht konträr zur menschlichen Hirnperfusion, die größtenteils über die Aa. Carotides internae gewährleistet wird. Um eine Vergleichbarkeit zu simulieren, müssen die Aa. vertebrales am Abgang des Aortenbogens durch eine Thorakotomie zusätzlich geklemmt werden. Dies konnte durch eine vorangegangene Versuchsreihe, die mittels CT-A eine No-Flow-Situation untersuchte, bestätigt werden. Das Alter der Tiere war zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung zwölf Wochen, das Gewicht differierte zwischen 30 und 39 kg. Die Tierversuchsreihe wurde durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz unter dem Aktenzeichen 23-177-07/G13-1-041 und dem Erweiterungsantrag G13-1-1-041 E2 genehmigt und unter strenger Einhaltung der allgemeinen und konkreten Tierschutzrichtlinien und Gesetzen, sowie nach den Arbeitsprinzipien der *Good Practice of Animal Care* in Übereinstimmung mit den *ARRIVE-Leitlinien* (Kilkenny et al., 2010) durchgeführt. Dies fand im Zeitraum vom 04.08.2017 bis 03.04.2018 in den Großtierforschungsräumlichkeiten der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsmedizin an der Johannes Gutenberg Universität in Mainz statt. Im Vorfeld wurde eine verblindete Randomisierung der Versuchstiere in drei Gruppen vorgenommen:

Gruppe 1: Levosimendan-Gruppe (Applikation von Levosimendan)

N= 8

Gruppe 2: Kontroll-Gruppe (Applikation von NaCl 0,9%)

N= 8

Gruppe 3: Sham-Gruppe (Scheinapplikation)

N= 8

3.2.2 Versuchsvorgang

Versuchsvorbereitung

Am Vorabend des Versuchs wurde das Versuchstier aus dem gemeinschaftlichen Stall entnommen und verbrachte die Nacht getrennt, um eine sichere Nüchternheit zu gewährleisten. Jedes Tier wurde zwischen 07:30 und 08:00 Uhr am Morgen des Versuchstages durch einen qualifizierten Mitarbeiter des Zuchtbetriebes angeliefert. Eine Stressprophylaxe wurde sofort nach dem Eintreffen des Tieres in den Versuchsräumen vorgenommen. Hierzu erfolgte eine intramuskuläre Injektion (i. m.) von 2,5 mg Midazolam sowie 100 mg Azaperon intramuskulär.



Abb. 7

Sediertes Versuchsobjekt, Eigenaufnahme aus Großtierlabor UMM – KfA

Nach Abwarten der Wirkzeit (sieben bis neun Minuten) wurde am äußeren Rand des Tierohres eine Venenverweilkanüle (20 G) intravasal platziert und ein *Basismonitoring* bestehend aus Pulsoxymetrie, zerebraler Oximetrie und Elektrokardiographie etabliert. Die Venenverweilkanüle wurde im Anschluss zur Narkoseeinleitung genutzt. Die Narkoseinduktion erfolgte standardisiert durch Applikation von 4 µg/KgKG Fentanyl zur Analgesie, 3 mg/KgKG Propofol zur Hypnose und 1,5 mg/KgKG Atracurium zur Muskelrelaxation. Im weiteren Verlauf wurde die Narkose mittels gleicher Medikation im Rahmen einer totalen intravenösen Anästhesie (TIVA) aufrechterhalten. Die Oxygenierung wurde durch eine spezielle anatomische Beatmungsmaske bis zum Erreichen der Wirkungsmaxima sichergestellt.



Abb. 8

Spezielle Maskenbeatmung, Eigenaufnahme aus Großtierlabor UMM – KfA

Daraufhin wurden die Versuchstiere unter Zuhilfenahme eines Miller-Spatels (Größe 4) endotracheal intubiert. Die erfolgreiche Intubation wurde anhand einer Kapnometrie und direkter Auskultation überprüft. Im Anschluss erfolgte die invasive Beatmung durch einen Respirator unter einer F_iO_2 von 0,4, einem Tidalvolumen von 6 bis 8 ml/KgKG, einer Atemfrequenz von 20/min bis 26/min und einem Partialdruck des endtidalen Kohlenstoffdioxid ($etCO_2$) von 35 bis 45 mm Millimeter-Quecksilbersäule (mmHG). Zusätzlich wurde eine Magensonde (18 FR) oral platziert sowie die sichere Lage durch Auskultation überprüft. Zur weiteren Vorbereitung wurden die Tiere an allen Extremitäten fixiert.

Es erfolgte ultraschallgestützt im *In-Plane*-Verfahren und in Seldinger-Technik die sterile Anlage von folgenden Kathetern:

1. Vena femoralis dexter

Dreilumiger zentraler Venenkatheter (ZVK) und ZVD-Messsystem sowie Platzierung eines PiCCO-Messsystems (*Pulse Contour Cardiac Output*) zum Messen des Herzzeitvolumens (HZV) und des extravaskulären Lungenwasserindex (ELWI)

2. Arteria femoralis dexter

Schleusensystem (FR 5)

3. Vena femoralis sinister

Arterieller Katheter zur invasiven Blutdruckmessung

4. Arteria femoralis sinister

Schleusensystem (FR 5) und Platzierung eines PiCCO-Messsystems zum Messen des HZV



Abb. 9

Schleusenanlage, Versuchs-SOP Großtierlabor UMM – KfA

Die Positionierung eines dreilumigen Pulmonalkatheters zur Messung des Lungenkapillaren-Verschlussdrucks (PCWP) erfolgte durch die Druckkurvenüberprüfung über das Schleusen- und das Rechtsherzsystem. Außerdem wurde eine Nah-infrarot-spektroskopische (NIRS) Bestimmung der Sättigung der cerebralen Perfusion (rSO_2) mittels zweifach platzierter präfrontaler Hautsonden vollzogen. Zusätzlich zum *Basismonitoring* ergab sich dadurch insgesamt folgendes standardisiertes Überwachungsprofil: Herzfrequenz (HF), SpO_2 , invasive Messung des Blutdrucks, ZVD, PCWP, ELWI, HZV, Cardiac Index (CI), rSO_2 , arterielle und venöse Blutgasanalyse (BGA) sowie Serumblutproben. Letztere und alle weiteren Blutproben wurden bei 4000 Umdrehungen/min und 6 Grad Celcius für zehn Minuten zentrifugiert, der Überstand pipettiert und bei -20 Grad Celcius bis zur Verarbeitung tiefgefroren. Zunächst wurde von allen Parametern ein Basiswert bestimmt (*Baseline Healthy*) und die Aufzeichnung der kontinuierlich erhobenen Daten erfolgte durch das Programm ‚Lab Chart 5‘.



Abb. 10

Monitoring – Versuchs-SOP Großtierlabor UMM – KfA

Versuchsintervention

Nach Bestimmung der Grundwerte und Parameter der *Baseline Healthy* (BLH) erfolgte die Thorakotomie unter Zuhilfenahme einer oszillierenden Säge und Präparation des Aortenbogens.



Abb. 11a

Sternotomie, Eigenaufnahme aus Großtierlabor UMM – KfA

Mittels reversibler Ligatur wurde die Perfusion der entspringenden Gefäßstämme des Aortenbogens, die der Versorgung des Cerebrums, der Aa. Carotides und der Aa. Vertebrales, und deren Kollateralen dient, für zehn Minuten vollständig unterbunden.

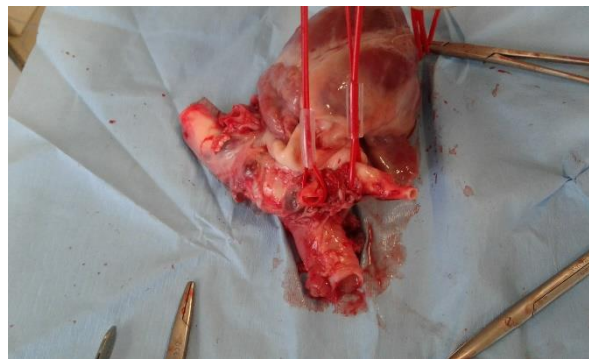


Abb. 11b

Postmortale Gefäßpräparation Aortenbogen - Eigenaufnahme aus Großtierlabor UMM – KfA

Im Anschluss erfolgen die Aufhebung der Ligaturen und die vollständige Reperfusion.

Kompensationsphase:

Innerhalb einer kurzen Adaptationsphase von maximal 30 Minuten wurde die Narkoseführung durch die vorangegangene TIVA aufrechterhalten, die Beatmungsparameter optimiert, sowie für die Kompensationsphase eine FiO_2 -Konzentration von 1,0 eingestellt. Die kontinuierliche Basisvolumengabe wurde mit 15 ml/KgKG/h angesetzt. Eine Therapie von Noradrenalin wurde, insofern eine Notwendigkeit bestand, durch Perfusoren und eine Laufrate von 0,1-0,3 $\mu\text{g}/\text{KgKG}/\text{min}$ begonnen. Es wurden erneut die Kontrollparameter und Proben erhoben und entnommen.

Therapiephase:

Unmittelbar nach Stabilisierung des Versuchstiers und 30 Minuten Zeit wurde die Therapie nach bereits vorher erfolgter Randomisierung gestartet.

Levosimendan-Gruppe:

1. Initialer Levosimendanbolus von 24 $\mu\text{g}/\text{KgKG}$ über 20 Minuten
2. Anschließende Perfusortherapie mit 0,3 $\mu\text{g}/\text{KgKG}/\text{min}$

NaCl 0,9%-Gruppe:

3. Initialer NaCl 0,9 % Bolus von 20 ml/KgKG
4. Anschließende Perfusortherapie mit 10 ml/KgKG/h

Sham-Gruppe:

1. Start NaCl 0,9% Perfusortherapie mit 5 ml/KgKG/h als Basisbedarf

Der Blutdruck wurde in beiden Gruppen durch eine Noradrenalin-Perfusortherapie stets nach dem Zielbereich des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAD) von 65 bis 85 mmHG therapiert. Konzeptionell erfolgten Noradrenalinboli (10 μgr) und eine Anpassung der Perfusorlaufrate, um den vorgegebenen Zielbereich zu erreichen und zu stabilisieren. Eine Reduktion des Blutdruckes war mittels Urapidil Boli (10 mg) (bei Resistenz mittels Perfusortherapie) vorgesehen. Dies war in keinem der Versuche notwendig. Vereinzelt wurden Tachyarrhythmien mit 5 mg Esmolol behandelt und auf eine maximale Herzfrequenz von 100/min limitiert. Die Beatmungstherapie orientierte sich für die Oxygenierung am arteriell gemessenen pO_2 mit einem Zielbereich von 80 bis 120 mmHG und für die Decarboxylierung am arteriell gemessenen pCO_2 mit einem Zielbereich von 35 bis 45 mmHG. Falls es zu Abweichung in den Blutgasanalysen kam, wurden diese zum Normbereich therapiert.

Messzeitpunkte und Messparameter:

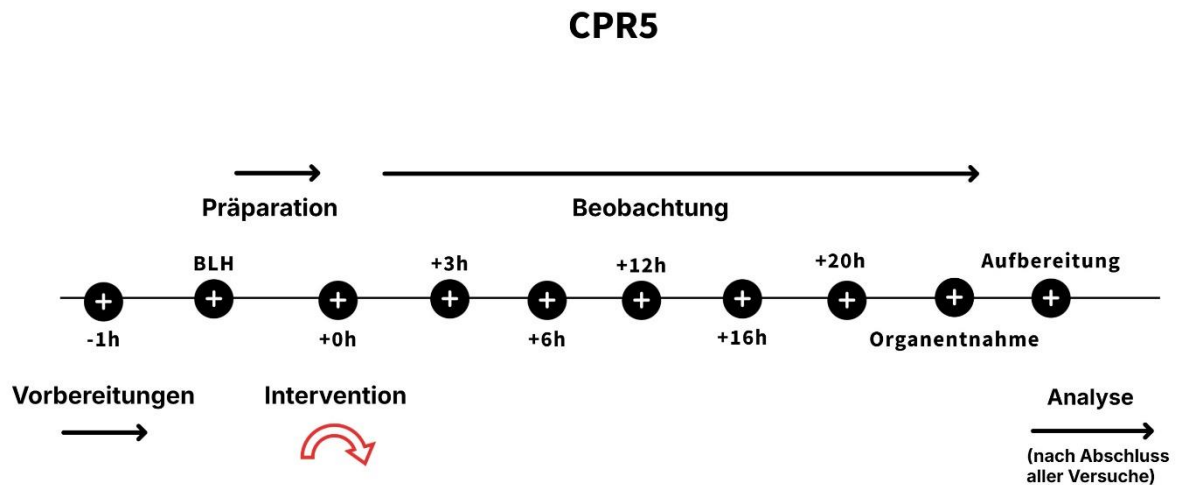


Abb. 12

CPR5 Ablaufprotokoll und Versuchszeitplan

Die Parameterdokumentation sowie Probenentnahmen von Blut und BGAs erfolgten regelmäßig zu definierten Messzeitpunkten. BLH definiert hierbei den Zeitpunkt, nach dem die Vorbereitungen abgeschlossen sind und nun alle Parameter als Ausgangsparameter bestimmt werden. Beginnend ab der Intervention wurden diese 60-minütig wiederholt und erhoben. Folgende Parameter wurden regelhaft über die gesamte Versuchszeit dokumentiert:

- Herzfrequenz
- Invasiver Blutdruck
- Zentralvenöser Druck
- Arteriell-pulmonaler Druck
- Temperatur
- SpO₂
- etCO₂
- ELWI
- CI
- HZV
- Global enddiastolischer Volumen-Index (GEDI)
- Global enddiastolisches Volumen (GEV)
- cSpO₂
- Applikation und Menge der Pharmaka
- Venöse und arterielle BGAs

Versuchsende und Organentnahme

Die Versuchstiere wurden über 24 Stunden entsprechend ihrer Versuchsgruppe therapiert und unter den vorangegangenen beschriebenen Standards intensivmedizinisch überwacht. Das Versuchsende war nach 24 Stunden erreicht und die Organentnahme wurde vorbereitet. Unter invasiver TIVA und stabilisiertem Kreislauf wurde die Schädelkalotte mittels oszillierender Säge kreisförmig auf supraorbitaler Höhe eröffnet. Im Anschluss ereigneten sich die vollständige Kraniektomie und die Präparation der Dura Mater. Diese wurde entfernt. Das Hirn wurde nach Durchtrennung des Cerebrums unterhalb der Medulla oblongata im Bereich des Foramen Magnum steril entnommen. Sofort wurde die linke Hemisphäre vollständig in Formalin gelagert und die rechte Hemisphäre zur Probengewinnung von hippocampalen Strukturen sowie frontocorticalen Strukturen benutzt. Anteilig wurden Proben unmittelbar in flüssigem Stickstoff gefroren.

3.3 Histologische Bearbeitung

Probenvorbereitung

Die in flüssigem Formalin eingelegten linken Gehirnhemisphären wurden nach dreimonatiger Lagerung in frisches Formalin umgebettet und nach weiteren drei Monaten zur Verarbeitung separiert. In temporaler Höhe erfolgte im Bereich des Hippocampus ein Schnitt und es wurden 2 bis 4 mm flache Blockschnittproben entnommen. Die Schnittführung erfolgte bei ca. 30 bis 40 Grad rostral geneigt zur Frontalebene. Dieses Schnittverfahren orientierte sich vorbildlich nach dem stereotaktischen Atlas des Schweinehirns mit Schnittebene A 2.00 mm. (8) Die Schnittführung für Frontalschnitte des Gehirns wurde in Frontalebene durchgeführt. Hierfür wurde orientierend das Schnittverfahren auf Höhe der Commissura Anterior vorbildlich nach Schnittmuster A 14.50 mm gewählt. (8) Im Anschluss erfolgten die Paraffineinbettung, der Feinschnitt sowie die Färbung der Schnittproben in enger Zusammenarbeit durch das Institut für Neuropathologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg Universität in Mainz. Die Verblindung der Proben wurde durch die Zuordnung der Reihenbezeichnung der Versuchstiere mit zufällig gewählten Vorgangsnummern durch die Neuropathologie aufrechterhalten. Die Dekodierungsliste verblieb stets im Neuropathologischen Institut unter Verschluss.

Probenbearbeitung

Die Paraffineinbettung erfolgte maschinell durch einen Histologie-Automaten (Sakura Tissue-Tek VIP 6 Vacuum Infiltration Processor (Alphen, NLD) des Instituts für Neuropathologie.

Hierfür wurde nach erfolgreicher Parafineinbettung mittels Widerstandsverlustmethode die Feinschnittbearbeitung durchgeführt. Die Schnittdicke beschränkte sich auf 3 bis 4 µm. Um eine volumetrische Berechnung der Zellen im Gewebe durchführen zu können, wurden im Abstand von 40 µm und einem 160 µm breiten Gesamtausschnitt drei weitere Schnitte für spezifische Färbungen (HE, Nissl, Iba-1) hergestellt.

Probenfärbungen

Die Schnittpräparate wurden entsprechend den standardisierten Protokollen (Anhang 8.1.1 bis 8.1.3) für Hämatoxylin (HE), Nissl-Färbungen und Iba1-Färbungen des Instituts für Neuropathologie der Universitätsmedizin Mainz verarbeitet und gefärbt.

Probenauswertung

Die histologische Untersuchung der Schnitte geschah durch ein Olympus CX43-Mikroskop unter Zuhilfenahme eines Olympus SC50-videomikroskopischen Objektivs; Die Visualisierung ereignete sich durch die ‚Cell Sens‘-Software. Die Dunkelfeldaufnahmen wurden zur Optimierung der Kontraste gewählt. Die weitere Auswertung erfolgte anhand der benannten ‚Cell Sens Entry‘-Software der Fa. Olympus und einem Laptop-Computer der Marke Fujitsu mit der internen Betriebskennung ‚cmp03770‘. Zur Unterstützung der Neuronenzählung wurden das Freeware-Tool ‚Fiji‘ und ‚ImageJ Docs 2.15.1‘ unter der Lizenz ‚GPLv3+‘ von ‚on GitHub‘ verwendet.

1. HE-Schnitte

Von jedem Schnitt wurden fünf digitale Bilder erstellt und zur digitalen Auswertung sowie Archivierung gespeichert. Es wurde eine Übersichtsaufnahme angefertigt und im Anschluss jeweils ein Bild in 20-facher Vergrößerung des Gebiets des Cornu ammonis (CA) des Hippocampus als CA-1, CA-2, CA-3, CA-4 gespeichert. Die HE-Schnittaufnahmen unterlagen einer stets sorgfältigen Prüfung zur Vergleichbarkeit der Färbungsaufnahmen. Daraufhin wurden die Bilder durch die Software ‚Olympus Cell Sens Entry‘ weiterverarbeitet, die vitalen Neurone identifiziert, durch das Zähltool ‚Fiji‘ erfasst und die Anzahl gespeichert. Nur Neurone, die vollständig im Bildausschnitt des zu identifizierenden Bereichs erkennbar wurden, waren Teil der Zählung. Neurone wurden als ‚vital‘ betrachtet, wenn ein abgrenzbarer Nukleus, ein abgrenzbarer und zentral gelegener Nukleolus sowie ein klares abgrenzbares Zytoplasma identifiziert werden konnten. Aus jedem Block und jeder Ebene wurde die Anzahl der vitalen Neurone bestimmt und addiert. Dies erfolgte für jedes Versuchstier einzeln. Des

Weiteren wurde eine Summenkalkulation für alle Versuchstiere vorgenommen. Nach Überprüfung und Abschluss der histologischen Untersuchung wurde die Zuordnung zu den Versuchsgruppen entblindet und im Anschluss die Gruppen verglichen. Für unterschiedliche Färbungen wurde stets sorgfältig die Vergleichbarkeit der Bildaufnahme geprüft.

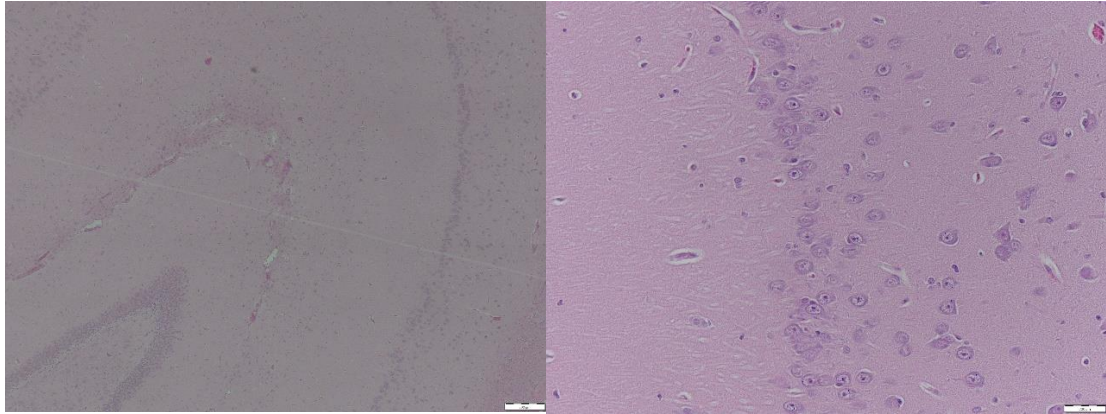


Abb. 13

Das linke Bild zeigt die Übersichtsaufnahme einer HE-Probe mit identifizierbarem Hippocampalen-Verlauf. Das rechte Bild ist der vergrößerte und zur Auswertung verwendete Ausschnitt des Hippocampalen-Verlaufs.

2. Nissl-Schnitte

Von jedem Schnitt wurden fünf digitale Bilder erstellt und zur digitalen Auswertung sowie Archivierung gespeichert. Es wurde eine Übersichtsaufnahme angefertigt und im Anschluss jeweils ein Bild in 20-facher Vergrößerung des Gebietes des Cornu ammonis (CA) des Hippocampus als CA-1, CA-2, CA-3, CA-4 gesichert. Für die Nissl-Schnittaufnahmen wurde stets sorgfältig die Vergleichbarkeit zu den anderen Färbungsaufnahmen geprüft. Daraufhin wurden die Bilder durch die *Software ‚Olympus Cell Sens Entry‘* weiterverarbeitet, die vitalen Neurone identifiziert, mittels integriertem *Zähltool* erfasst und die Anzahl gespeichert. Es wurden nur Neurone gezählt, die vollständig im zu identifizierenden Bereich des Bildausschnittes waren. Neurone wurden als ‚vital‘ betrachtet, wenn ein abgrenzbarer Nukleus, ein abgrenzbarer und zentral gelegener Nukleolus und klares, abgrenzbares Zytoplasma identifiziert werden konnten. Aus jedem Block und jeder Ebene wurde die Anzahl der vitalen Neurone bestimmt und addiert. Dies erfolgte für jedes Versuchstier einzeln. Des Weiteren erfolgte eine Summenkalkulation für alle Versuchstiere. Nach Überprüfung und Abschluss der histologischen Untersuchung wurden die Entblindung sowie die

Zuordnung zu den Versuchsgruppen aufgehoben und die Gruppen verglichen. Für unterschiedliche Färbungen wurde stets sorgfältig die Vergleichbarkeit der Bildaufnahme geprüft.

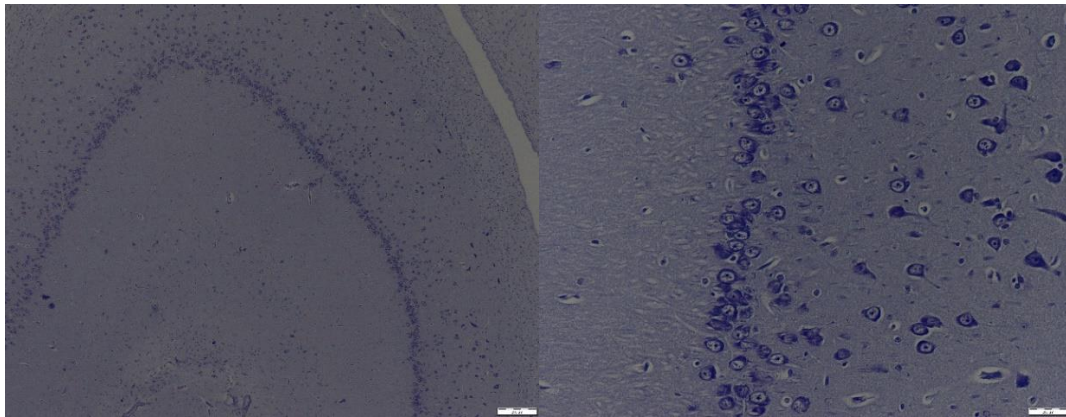


Abb. 14

Das linke Bild zeigt die Übersichtsaufnahme einer HE-Probe mit identifizierbarem Hippocampalen-Verlauf. Das rechte Bild ist der vergrößerte und zur Auswertung verwendete Ausschnitt des Hippocampalen-Verlaufs.

3. Iba1-Schnitte

Von jedem Schnitt wurden fünf digitale Bilder erstellt und zur digitalen Auswertung sowie Archivierung gespeichert. Eine Übersichtsaufnahme wurde angefertigt und im Anschluss jeweils ein Bild in 20-facher Vergrößerung des Gebiets des Cornu ammonis (CA) des Hippocampus als CA-1, CA-2, CA-3, CA-4 gespeichert. Für die Iba1-Schnittaufnahmen wurde stets sorgfältig die Vergleichbarkeit zu den anderen Färbungsaufnahmen geprüft. Daraufhin wurden die Bilder mittels der Software ‚Olympus Cell Sens Entry‘ weiterverarbeitet, die vitalen Neurone identifiziert, mittels integriertem Zähltool erfasst und die Anzahl gespeichert. Nur Neurone, die vollständig im Bildausschnitt des zu identifizierenden Bereichs erkennbar waren, waren Teil der Zählung. Neurone wurden als ‚vital‘ betrachtet, wenn ein abgrenzbarer Nukleus, ein abgrenzbarer und zentral gelegener Nukleolus und klares, abgrenzbares Zytoplasma identifiziert werden konnten. Aus jedem Block und jeder Ebene wurde die Anzahl der vitalen Neurone bestimmt und addiert. Dies erfolgte für jedes Versuchstier einzeln. Des Weiteren erfolgte eine Summenkalkulation für alle Versuchstiere. Nach Überprüfung und Abschluss der histologischen Untersuchung erfolgten die Entblindung sowie die Zuordnung zu den Versuchsgruppen. Im Anschluss geschah der Vergleich der Gruppen.

3.4 Molekularbiologische Bearbeitung

1. RNA-Extraktion

Um eine quantitative Zielgenbestimmung durchzuführen, wurde aus den stickstoffgefrorenen Proben RNA gewonnen. Die Entnahme erfolgte nach Standardprotokoll und des „*Quiagen-RNeasy plus universal kits*“. Hierfür wurden die Proben mit 0,9 ml Quiazol versetzt und sofort in einer Mühle mittels rotierender Stahlkugeln (20 Hertz) zweimal für eine Minute zerkleinert. Im Anschluss geschah die Inkubation bei Raumtemperatur für fünf Minuten. Daraufhin wurden den Proben 180 µl Chloroform und 100 µl gDNA-Eliminator hinzugegeben und dieses Konzentrat für 15 Sekunden gemischt. Nachfolgend wurde es für drei Minuten inkubiert. Das Konzentrat wurde bei 4 Grad Celsius für 15 Minuten zentrifugiert (12000 x g). Durch die Zentrifugation entstanden drei Phasen: Erstere war eine farblose, wässrige Phase, Zweite eine weißliche Misch- und Dritte eine rote Phase. Die erste Phase war die Zielphase und enthielt RNA. Diese Phasen wurden abpipettiert und in einem neuen Reaktionsgefäß mit 600 µl Ethanol überführt. Nach Durchmischen der Bestandteile wurde diese Phase in eine Extraktionsfiltersäule mit Zentrifugation gegeben. Erneut erfolgte eine Zentrifugation für 15 Sekunden (8000 x g). Die im Filter aufgefangene RNA wurde daraufhin mittels 500 µl RPE-Buffer sowie 700 µl RWT-Buffer gereinigt. Dieser Vorgang wurde mehrfach nach demselben Vorgehen wiederholt. Zum Abschluss erfolgte die Zugabe von 500 µl RPE-Buffer und eine erneute Zentrifugation für zwei Minuten bis zur Austrocknung (8000 x g). Um die getrocknete RNA aus dem Filter zu gewinnen, wurden 40 µl reines H₂O hinzugegeben und final für eine Minute zentrifugiert (8000 x g). Das Eluat wurde auf Reinheit und Konzentration der RNA untersucht, die Extinktion bei 260 nm für Nukleinsäuren und 260 nm für Proteinstrukturen wurde gemessen. Im Anschluss erfolgte die Asservierung bei -80 Grad Celsius.

2. DNA-Bibliothek

Um durch Polymerase Kettenreaktion (PCR) einzelne Zielgene nachzuweisen sowie in einer Bibliothek zu sichern und amplifizieren zu können, wurde mittels reverser Transkriptase die gewonnene RNA zu DNA umgeschrieben. Dies erfolgte durch ein Standardprotokoll und das ‚*Quiagen QuantiTect Reverse Transcriptase Kit*‘. Hierfür wurden die asservierten RNA-Proben (ein µg-RNA-Probe) aufgetaut und mit zwei µl DNA-*Wipeout*-Buffer und 14 µl reinem H₂O vermischt. Es erfolgte eine Inkubation bei 42 Grad Celsius für zwei Minuten. Sodann geschah die Zugabe von einen µl Quanticript

RT, vier μl Quanticript RT Buffer sowie einem μl RT Primer Mix. Anschließend inkubierten diese bei 42 Grad Celsius für 15 Minuten. Durch Erhitzung auf 95 Grad Celsius für drei Minuten wurde die reverse Transkriptase deaktiviert und die gewonnene DNA dann bei -20 Grad Celsius asserviert.

3. Zielgenachweis

Der Zielgenachweis wurde durch eine in Echtzeit durchgeführte Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion ((engl. *real-time RT-PCR*)-Protokoll siehe Anhang) sichergestellt und erfolgte durch Markierung komplementärer Oligonukleotidfrequenzen. Die aus RNA gewonnene, asservierte DNA wurde hierfür mittels Hybridisierungssonden (Sequenz s. Anhang) an Start und Ende des amplifizierenden Bereichs markiert. An diesen Hybridisierungssonden konnte die verwendete Polymerase anbinden und amplifizieren. Die Hybridisierungssonden waren mit einem fluoreszierenden Farbstoff gebunden, welcher die Detektion ermöglichte. Die Sensorsonde wurde paarweise am 3'-Ende mit der passenden Ankersonde am 5'-Ende positioniert, sodass sie während der PCR an komplementären Strängen binden konnten. Durch Anregung der Sensorsonde mittels einer Lichtwelle von 470 nm kam es gekoppelt zur Anregung der Ankersonde. Diese emittierte eine Lichtwelle von 64 nm, welche detektiert wurde. Somit konnte sicher die komplementäre Sequenz bestimmt werden.

Zunächst war ein leichter Anstieg der Zielgene nachweisbar. Im weiteren Verlauf konnte ein exponentielles Wachstum beobachtet werden. Dies erreichte ein Maximum im Übergang zu einer Plateauphase. Am *Crossing Point*, dem Übergang in den exponentiellen Anstieg, konnte zielgenspezifisch anhand bekannter standardisierter Ausgangskonzentrationen ein Vergleich der Standardkurven durchgeführt werden.

Dieser Ablauf war regelhaft sowie fehlerfrei und für eine in Echtzeit gemessene reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion repräsentativ.

3.5 Statistische Betrachtung

Die Anlage einer Datenbank zur Verarbeitung der gewonnenen Daten, das Erstellen der Grafiken sowie die Auswertung und Interpretation erfolgten primär mittels Microsoft Excel 2016. Alle mit Hilfe von Microsoft Excel 2016 erzeugten Grafiken beschreiben auf der Abszisse die entsprechenden Messzeitpunkte während der Versuche. Diese sind aufsteigend und fortfolgend mit R0 (Induktion), R1 (eine Stunde nach Induktion), R3 (drei Stunden nach Induktion) etc. angegeben. Als Ausgangswert wurde stets ein Wert vor Induktion bestimmt und als ‚*baseline healthy*‘ (BLH) definiert. Auf der Ordinate ist der entsprechende Parameter aufgetragen. Alle Tiere einer Gruppe wurden gemittelt und die Gruppen gegeneinander verglichen. Die angewendeten Daten sind jeweils einzeln wie auch für die einzelnen Gruppen als Mittelwertberechnung mit +/- Standardabweichung sowie vereinzelt zusätzlich im Median über die Zeit berechnet.

Die PCR-Berechnung wurde nach den Parametern von Nativtieren sowie des *Housekeeping*-Gens berechnet.

Die deskriptive Statistik erfolgte durch „Sigma Plot 15“ der Fa. ‚Inpixon‘. Es wurden Box-Plot-Analysen durchgeführt und diese mittels ‚*Indexed One-Way ANOVA on Ranks*‘-Berechnung überprüft.

Zur Zurückweisung der Nullhypothese wurde das Signifikanzniveau unter 5 % festgesetzt. Dies entspricht einem p -Wert $< 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 Parameter

Die Präsentation der Daten erfolgt anhand der Messzeitpunkte. Beginnend ist der Zeitpunkt ‚baseline Healthy‘ (BLH). Dies ist der Zeitpunkt, bei dem das Versuchsobjekt alle vorbereitenden Maßnahmen durchlaufen hat und sich kurz vor der Intervention befindet. R0 markiert den Zeitpunkt unmittelbar nach der Intervention. R3, R6, R12, R16 und R20 sind stundenweise aufsteigend die Zeitpunkte nach der Intervention.

Die Daten konnten zeigen, dass die relevanten und zu untersuchenden Haupteffekte in den ersten 24 Stunden beobachtbar sind.

In den folgenden Stunden konnten selten relevante Unterschiede beobachtet werden, sodass sich bei den folgenden Tabellen auf die Kernuntersuchungszeit der Studie beschränkt wurde.

Parameter [Einheit]	Gruppe (SD)	BLH	R0	R3	R6	R12	R16	R20
		Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert
ELWI [ml/m ²]	Levo	13 (±2,39)	13,5 (±2,40)	12,5 (±3,21)	14,5 (±6,81)	14,5 (±4,61)	15,38 (±5,04)	16 (±5,29)
	NaCl	11,5 (±4,60)	10,5 (±5,23)	11,5 (±3,88)	12,5 (±3,28)	13 (±5,50)	15,5 (±7,27)	14,14 (±4,26)
	Sham	12 (±4,96)	12 (±4,96)	13 (±4,07)	14 (±4,02)	14 (±7,32)	14,88 (±3,94)	15,75 (±6,67)
GEDI [ml/m ²]	Levo	490 (±55,66)	495 (±62,94)	480,5 (±84,18)	453,5 (±114,11)	478 (±134,10)	589,5 (±68,91)	502,63 (±90,50)
	NaCl	579 (±97,90)	534,5 (±113,38)	537,5 (±77,11)	532,5 (±62,58)	507,5 (±123,83)	555,4 (±101,32)	540,57 (±94,57)
	Sham	570 (±76,63)	570 (±76,63)	579,5 (±80,09)	562,5 (±102,96)	526 (±251,88)	524,75 (±101,90)	528,63 (±135,50)
CI [l/min/m ²]	Levo	3,12 (±0,95)	3,65 (±1,07)	3,11 (±0,35)	2,98 (±0,34)	3,22 (±0,77)	3,39 (±0,68)	3,72 (±0,99)
	NaCl	3,45 (±1,00)	4,03 (±1,19)	2,93 (±0,40)	2,98 (±0,70)	3,23 (±0,82)	3,75 (±1,13)	4,28 (±1,78)
	Sham	3,1 (±0,49)	3,07 (±0,49)	3,32 (±0,5)	3,33 (±0,80)	2,94 (±1,26)	3,49 (±1,38)	4,17 (±1,70)
PAP	Levo	17,97 (±3,60)	21,1 (±6,85)	17,2 (±2,98)	17,18 (±3,64)	19,6 (±5,76)	19,23 (±7,48)	18,89 (±4,30)

[mmHG]	NaCl	19,6 (±4,11)	23,1 (±6,04)	19,98 (±4,20)	20,77 (±2,23)	22,4 (7±7,0)	25,61 (±7,80)	26,04 (±7,45)
	Sham	20,07 (±3,11)	19,77 (±3,80)	17,6 (±5,80)	20,26 (±5,46)	20,58 (±4,02)	21,09 (±4,06)	21,42 (±4,63)
MAD	Levo	63,92 (±12,46)	63,19 (±14,95)	65,71 (10,24)	59,1 (±8,74)	51,5 (±10,03)	51,49 (±6,82)	56,5 (±19,54)
[mmHG]	NaCl	60,01 (±12,84)	70,61 (±15,04)	62,38 (±12,25)	55,5 (±9,94)	44,27 (±10,22)	46,36 (±10,80)	43,28 (±9,46)
	Sham	66,21 (±13,44)	66,55 (±13,77)	61,75 (±15,88)	58,52 (±13,92)	48,5 (±6,96)	44,44 (±6,13)	43,05 (±7,34)
ZVD	Levo	6,89 (±1,96)	6,4 (±1,03)	6,86 (±1,19)	6,89 (±0,86)	7,26 (±1,63)	7,92 (±2,54)	9,68 (±2,38)
[mmHg]	NaCl	8,9 (±4,30)	6,92 (±1,52)	7,35 (±1,03)	8,17 (±1,44)	8,42 (±2,34)	8,91 (±3,69)	9,68 (±3,11)
	Sham	7,7 (±2,36)	7,73 (±2,34)	8,13 (±3,53)	8,92 (±3,61)	10,91 (±3,03)	10,81 8±2,89)	10,96 (±3,84)
HF [Schlag/min]	Levo	81,63 (±25,91)	149,8 (±58,97)	104,13 (±28,14)	101,63 (±29,18)	99 (±31,36)	107,5 (±34,87)	115,62 (±45,06)
	NaCl	79 (±30,08)	104,25 (±35,34)	98,88 (±28,12)	102 (±35,39)	95,69 (±44,97)	117,88 (±43,93)	121,88 (±36,95)
	Sham	73,5 (±9,24)	74 (±9,01)	102,25 (±16,84)	94,06 (±18,29)	97,63 (±25,90)	110,38 (±38,70)	119,63 (±32,21)
*Indiziert p<0.05 im Gruppenvergleich;								
ELWI = Extravaskulärer Lungenwasserindex; GEDI = Global enddiastolisches Volumen; PAP = Pulmonalarteriendruck; CI = Herzindex (Cardiacindex); MAD = Mittlerer arterieller Druck; ZVD = Zentral venöser Druck; HF = Herzfrequenz; SD = Standardabweichung;								

Tabelle 1 – Zusammenfassung Daten Hämodynamik

Tabelle 1 zeigt die Zusammenfassung der Daten der Hämodynamik sowie der konventionellen Parameter. Die Daten der Hämodynamik in Tabelle 1 verdeutlichen, dass die Parameter, die durch das Verfahren der transpulmonalen Thermodilution gemessen wurden, im Gruppenvergleich nicht grundsätzlich voneinander abweichen. Grundlegende Unterschiede konnten nicht beobachtet werden und unterliegen mutmaßlich der statistischen Streuung und Normalverteilung. Innerhalb der Levosimendan-Gruppe zeigten sich niedrigere pulmonale arterielle Drücke. Die Mittelwerte im Verlauf über die Zeit zeigten eine ähnliche Dynamik wie die Sham-Gruppe. Die NaCl-Gruppe zeigte einen konstanten Anstieg über die Zeit in den

Mittelwerten. Auffällig zeigte sich der Parameter der Herzfrequenz und des mittleren arteriellen Drucks. Hierbei konnten in den Mittelwerten innerhalb der Levosimendan-Gruppe höhere Werte beobachtet werden. Diese Effekte waren statistisch nicht signifikant.

Parameter [Einheit]	Gruppe (SD)	BLH Mittelwert	R0 Mittelwert	R3 Mittelwert	R6 Mittelwert	R12 Mittelwert	R16 Mittelwert	R20 Mittelwert
Ppeak [cm H ₂ O]	Levo	15,88 (±1,96)	16,13 (±1,89)	17 (±1,60)	17,13 (±0,99)	17,88 (±1,25)	19,88 (±2,70)	20,5 (±6,30)
	NaCl	16,88 (±1,64)	16,63 (±1,69)	17,5 (±1,60)	18 (±2,27)	19,38 (±2,88)	21,88 (±4,79)	23,75 (±5,09)
	Sham	18,38 (±2,93)	18,38 (±2,93)	18,5 (±2,73)	18,5 (±2,73)	20,3 (± 3,45)	22 (±4,14)	23,88 (±5,46)
Pmean [cm H ₂ O]	Levo	8 (±0,76)	8 (±0,74)	8 (±1,64)	9 (±0,76)	9 (±0,54)	9 (±1,19)	10 (±3,15)
	NaCl	8,5 (±0,74)	8,5 (±0,93)	9 (±0,89)	9 (±1,13)	9,5 (±1,06)	10 (±2,56)	11,5 (±2,25)
	Sham	9 (±0,93)	9 (±0,93)	9,5 (±0,89)	9,5 (±0,89)	10,5 (±1,30)	10 (±0,92)	10,5 (±1,55)
Peep [cm H ₂ O]	Levo	5 (±0,0)	5 (±0,0)	5 (±0,0)	5 (±0,0)	5 (±0,0)	5 (±0,0)	5 (±0,0)
	NaCl	5 (±0,0)	5 (±0,0)	5 (±0,0)	5 (±0,0)	5 (±0,0)	5 (±0,0)	5 (±0,0)
	Sham	5 (±0,0)	5 (±0,0)	5 (±0,0)	5 (±0,0)	5 (±0,0)	5 (±0,0)	5 (±0,0)
FRC [ml]	Levo	958,13 (±211,44)	892 (±246,05)	820,86 (±258,37)	807,5 (±321,40)	616,71 (±119,13)	577,29 (±112,11)	523,75 (±188,53)
	NaCl	712,06 (±246,66)	714,17 (±200,72)	586,75 (±193,86)	551,31 (±191,45)	459,75 (±188,28)	445,5 (±182,43)	371,88 (±176,55)
	Sham	714,17 (±157,51)	714,17 (±157,51)	586,75 (±163,94)	547 (±173,37)	505,17 (±132,90)	453 (±103,23)	421,92 (±142,14)
*Indiziert p<0.05 im Gruppenvergleich;								
Ppeak = Inspiratorischer Spitzendruck; Pmean = Durchschnittlicher Atemwegsdruck; PEEP = Positiver endexpiratorischer Druck; FRC = Funktionelle Residualkapazität; SD = Standardabweichung;								

Tabelle 2 – Zusammenfassung Daten Spirometrie

Die in Tabelle 2 zusammengefassten Daten der spirometrischen Messungen zeigen, dass über den gesamten Versuchszeitraum ein standardisiertes Protokoll eingehalten werden konnte.

Hierbei wurden die Versuchstiere bei einer fraktionierten Sauerstoffkonzentration von 40% beständig beatmet, und der positive endexpiratorische Druck (*Peep*) wurde auf fünf Zentimeter Wassersäule definiert und stets eingehalten. Hierbei konnte in allen Gruppen ein durchschnittlicher Beatmungsdruck von acht bis maximal elf Zentimetern Wassersäule beobachtet werden, da das vom Studienprotokoll vorgegebene und in allen Gruppen und Vergleichstieren gleichwertige und gewichtsadaptierte Tidalvolumen einzuhalten war. Der Spitzendruck stieg oder fiel hierbei nie außerhalb des Bereichs von 15 bis 21 Zentimetern Wassersäule. Somit konnte das Ziel einer lungenprotektiven Beatmung ausnahmslos eingehalten werden. Aus diesem Grund erscheint der Parameter der funktionellen Residualkapazität (FRC) auffällig.

Die Kontrollgruppe (NaCl) sowie die Sham-Gruppe zeigten eine gleichwertige funktionelle Residualkapazität. Diese verlor unter Beatmungstherapie linear an Volumen. Überraschenderweise konnte, trotz erhöhter Volumina zum Zeitpunkt BLH und unter Levosimendan-Therapie, eine konstant erhöhte FRC beobachtet werden. Dies zeigte im zeitlichen Verlauf dieselbe Linearität der anderen Gruppen. Dieser Effekt konnte nicht statistisch signifikant beobachtet werden.

Parameter [Einheit]	Gruppe (SD)	BLH	R0	R3	R6	R12	R16	R20
		Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert	Mittelwert
SvO ₂ [%]	Levo	61 (±18,77)	69,3 (±11,95)	49,05 (±10,38)	46,1 (±7,50)	56,6 (±11,59)	53,21 (±10,74)	52,48 (±8,20)
	NaCl	54,35 (±16,56)	69,7 (±13,07)	46,7 (±13,40)	47,25 (±14,07)	48,05 (±12,18)	51,67 (±12,34)	53,24 (±11,94)
	Sham	60,5 (±12,37)	60,5 (±12,37)	46,7 (±10,21)	47,25 (±7,70)	48,05 (±11,27)	48,59 (±14,55)	52,55 (±16,95)
pH	Levo	7,5 (±0,028)	7,42 (±0,022)	7,54 (±0,023)	7,53 (±0,025)	7,52 (±0,024)	7,5 (±0,047)	7,5 (±0,055)
	NaCl	7,49 (±0,070)	7,46 (±0,038)	7,53 (±0,021)	7,52 (±0,049)	7,5 (±0,042)	7,45 (±0,091)	7,42 (±0,077)
	Sham	7,47 (±0,042)	7,47 (±0,042)	7,51 (±0,035)	7,5 (±0,039)	7,49 (±0,033)	7,46 (±0,028)	7,5 (±0,048)

BE [mmol/ml]	Levo	6,7 (±2,22)	3,25 (±1,37)	8 (±1,45)	8,3 (±1,78)	6,5 (±1,02)	5,47 (±1,05)	4,88 (±1,43)
	NaCl	7,45 (±2,38)	5,65 (±2,43)	9,2 (±1,25)	7,25 (±1,95)	5,1 (±2,11)	2,78 8±4,82)	2,11 (±5,24)
	Sham	6,85 (±3,52)	6,85 (±3,52)	7,3 (±1,37)	6,15 (±1,54)	4,55 (±1,49)	3,1 (±1,40)	2,56 (±3,35)
art.CO ₂ [mmHg]	Levo	37,7 (±10,34)	43,25 (±21,13)	36,05 (±9,30)	36,3 (±11,54)	37,25 (±32,30)	37,36 (±30,82)	36,64 (±38,71)
	NaCl	41,5 (±21,27)	43 (±42,20)	37,9 (±28,03)	37,25 (±33,66)	37,05 (±49,36)	39,82 (±41,59)	40,06 (±43,83)
	Sham	41,5 (±25,90)	41,5 (±25,90)	39,1 8±29,08)	38,25 (±40,18)	37,05 (47,88)	38,5 (±34,12)	42,5 (±46,73)
ex.CO ₂ [mmHg]	Levo	34,26 (±1,25)	38,76 (±3,50)	34,56 (±2,68)	34,43 (±4,30)	34,66 (±1,93)	32,74 (±2,87)	32,64 (±3,08)
	NaCl	37,58 (±4,10)	40,04 (±7,11)	34,48 (±1,96)	33,44 (±2,46)	32,56 (±3,74)	35,5 (±3,19)	35,2 (±4,52)
	Sham	36,86 (±3,74)	36,86 (±3,74)	37,5 (±3,68)	35,89 (±5,25)	34,66 (±2,99)	34,7 (±5,19)	35,43 (±4,95)
Laktat [mmol/l]	Levo	1,3 (±0,52)	3,45 (±1,16)	0,95 (±0,33)	0,75 (±0,22)	0,6 (±0,40)	0,59 (±0,21)	0,84 (±0,71)
	NaCl	0,95 (±0,34)	2,35 (±1,50)	0,8 (±0,49)	0,75 (±0,45)	0,8 (±0,85)	2,01 (±2,75)	2,7 (±4,13)
	Sham	0,9 (±0,29)	0,9 (±0,29)	0,7 (±0,13)	0,7 (±0,19)	0,65 (±0,21)	0,71 (±0,31)	0,95 (±0,31)
Horovitz Index [PaO ₂ /FiO ₂]	Levo	517,5 (±25,95)	466,25 (±52,99)	472,5 (±23,29)	461,25 (±28,95)	458,75 (±80,82)	412,82 (±77,18)	348,09 (±84,63)
	NaCl	483,75 (±53,25)	461,25 (±105,40)	471,25 (±70,07)	443,75 (±84,29)	377,5 (±123,50)	254,73 (±126,29)	289,57 (±115,66)
	Sham	477,5 (±64,88)	477,5 (±64,88)	421,25 (±72,59)	443,75 (±100,46)	416,25 (±119,64)	366,56 (±95,44)	324,01 (±123,14)
Invos [%]	Levo	100 (±0,0)	100 (±12,43)	102 (±13,98)	107 (±17,25)	111 (±18,08)	114 (±23,90)	117 (±21,51)
	NaCl	100 (±0,0)	109 (±9,76)	109 (±17,41)	114 (±22,79)	121 (±24,14)	126 (±27,89)	126 (±30,01)
	Sham	100 (±0,0)	100 (±0,0)	105 (±14,13)	109 (±11,69)	114 (±16,44)	121 (±17,49)	120 (±20,99)
PaO ₂	Levo	207 (±10,36)	186,5 (±21,13)	189 (±9,30)	184,5 (±11,54)	183,5 (±32,31)	165,13 (±62,24)	144,06 (±68,79)

Noradrenalindosis [mmHg]	NaCl	193,5 (±21,27)	184,5 (±69,95)	188,5 (±28,02)	177,5 (±64,22)	151 (±72,05)	123,46 (±57,70)	117,59 (±63,92)
	Sham	191 (±25,90)	191 (±25,90)	168,5 (±29,08)	177,5 (±40,18)	166,5 (±67,39)	149,5 (±34,18)	132,09 (±68,13)
	Levo	0,013 (±0,029)	0,14 (±0,100)	0,003 (±0,002)	0,012 (±0,021)	0,067 (±0,149)	0,2 (±0,293)	0,18 (±0,252)
	NaCl	0,086 (±0,169)	0,191 (±0,171)	0,013 (±0,030)	0,068 (±0,160)	0,202 (±0,329)	0,68 (±0,957)	0,78 (±1,437)
	Sham	0,002 (±0,003)	0,002 (±0,003)	0,014 (±0,034)	0,034 (±0,043)	0,073 (±0,084)	0,172 (±0,191)	0,323 (±0,309)
	[µg/kgKG/min]							
CRP [mg/l]	Levo	BLH 0,4 (±0,18)	/	/	/	R10 1,243 (±0,41)	/	R20 2,025 (±0,53)
	NaCl	0,404 (±0,23)	/	/	/	0,978 (±0,52)	/	1,693 (±0,57)
	Sham	0,357 (±0,10)	/	/	/	1,004 (±0,45)	/	1,763 (±0,51)
Creatinin [mg/dl]	Levo	0,859 (±0,19)	/	/	/	0,904 8±0,29	/	0,894 (±0,24)
	NaCl	0,736 (±0,09)	/	/	/	0,863 (±0,35)	/	1,2 (±0,43)
	Sham	0,806 (±0,12)	/	/	/	0,82 (±0,16)	/	0,875 (±0,23)
Leukozyten [Anzahl x 1000/nl]	Levo	19,875 (±5,92)	/	/	/	17,763 (±5,31)	/	16,882 (±4,87)
	NaCl	13,496 (±5,65)	/	/	/	18,12 (±7,03)	/	18,325 (±6,39)
	Sham	14,559 (±5,18)	/	/	/	13,516 (±3,56)	/	15,24 (±5,48)
*Indiziert p<0.05 im Gruppenvergleich;								
SvO ₂ = Zentral venöse Sättigung; BE: Basenüberschuss; art. CO ₂ = Arteriell Kohlendioxid; pH = näherungsweise der negative dekadische Logarithmus der Konzentration von Protonen in Wässrigen Lösungen; exCO ₂ = Endexpiratorisches Kohlendioxid; Laktat = Laktat; PaO ₂ = Arteriell Sauerstoffpartialdruck; Noradrenalindosis = Perfusorendosis von Noradrenalin; PaO ₂ /FiO ₂ = Oxygenierungsindex; Invos = Transkutane prozentuelle cerebrale Perfusionsmessung; CRP = C-Reaktives Protein; Creatinin = Creatinin; Leukozyten = Leukozytenanzahl; SD = Standardabweichung;								

Tabelle 3 – Zusammenfassung Daten Laborwerte & weitere Parameter

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Parameter von Laborwerten sowie der *Point of Care*-Blutgasanalysen zu den entsprechenden Zeitpunkten zusammengefasst. Die Parameter der zentralvenösen Sättigung, des Basenüberschusses, der Konzentration der arteriellen Kohlenstoffdioxid-Messung sowie des pH-Wertes zeigten keine Auffälligkeiten im Gruppenvergleich. Selbiges konnte für die Parameter des endexpiratorischen Kohlenstoffdioxids, des *Invos*-Wertes sowie des Sauerstoff-Partialdruckes beobachtet werden. Die Parameter zeigten vereinzelte Streuung, die jedoch normalen statistischen Streuungseffekten unterliegt. Der Horowitz-Index fiel in den Mittelwerten der Levosimendan-Gruppe sowie in der Sham-Gruppe weniger ab. Diese Tendenz konnte in der NaCl-Gruppe nicht beobachtet werden. Dieser Effekt zeigte sich statistisch nicht signifikant. Außerdem konnte in der NaCl-Gruppe im Rahmen der regelmäßig bestimmten Laktatwerte ab Versuchszeitpunkt R12 ein Anstieg beobachtet werden. Dieser zeigte sich in der Sham-Gruppe wie auch in der Levosimendan-Gruppe vielmehr mit einem Abfall der Werte. Diese Tendenz konnte primär im Rahmen der Mittelwerte gesehen werden. In der nachträglichen Analyse wurden zwei Versuchstiere mit herausragendem Anstieg identifiziert und als *confounding* im Rahmen einer Infektion bewertet. Möglicherweise führten diese Tiere zu einer Verzerrung der NaCl-Gruppe im Gesamten. Eine entsprechende Adjustierung führte zu keiner höhergradigen Änderung oder Beeinflussung der statistischen Signifikanz.

Im direkten Gruppenvergleich konnte die durchschnittliche Noradrenalinosis in $\mu\text{g}/\text{KgKG}/\text{min}$ untersucht werden. Hierbei fiel auf, dass im Mittelwert der Verbrauch von Noradrenalin in der Levosimendan-Gruppe niedriger war. Dieser Effekt wurde teilweise mit Schwankungen über den gesamten Versuchszeitraum festgestellt. In der statistischen Datenanalyse stellt sich diese Beobachtung als nicht signifikant dar. Die Zentrallaborparameter des C-reaktiven Proteins (CRP) und die Leukozytenzahl, beide als Infektparameter kontrolliert, wurden zu vereinzelten Stichprobenmesspunkten zur Überwachung abgenommen. Selbiges Vorgehen galt für das Creatinin als Marker der Nierenfunktion. Alle drei Parameter zeigten im Einzelnen sowie im Verlauf keine Auffälligkeiten.

Parameter [Einheit]	Gruppe	R24 Hippocampus	R24 Cortex	R24 H & C Standardabweichung
HE-Färbung [Neuronenzahl]	Levo	11760^^	9,29	$\pm 2577 / \pm 2,59$
	NaCl	12930^^	11,25	$\pm 3481 / \pm 1,88$
	Sham	11520^^	10,5	$\pm 977 / \pm 1,02$
Nissl-Färbung [Neuronenzahl]	Levo	15180	17,14	$\pm 2347 / 3,12$
	NaCl	12960	15,25	$\pm 1870 / 2,22$
	Sham	12180	23,33	$\pm 1082 / 4,17$

Iba1-Färbung [Neuronenzahl]	Levo	xxx	xxx	xxx
	NaCl	xxx	xxx	xxx
	Sham	xxx	xxx	xxx
IL6 [ng/l]	Levo	0,00050471 #	0,00042371 #	±0,00008871 # / ±0,00007547 #
	NaCl	0,00032733	0,000541 #	±0,00012247 # / ±0,000094 #
	Sham	0,00041143 #	0,00042371 #	±0,00007199 # / ±0,00001924 #
TNF-Alpha [Neurone/mm]	Levo	0,000026185 #*	0,00001523625 #	±0,000008459 # / ±0,00000983856 #
	NaCl	0,000020175 #*	0,00001706125 #	±0,000007128 # / ±0,00001077599 #
	Sham	0,0000105525 #*	0,000016485 #	±0,0000007857 # / ±0,000002286 #
*Indiziert p<0.05 im Gruppenvergleich; # näherungsweise gerundet; xxx = Aufgrund mangelnder Probenqualität nicht auswertbar; ^^ = Volumetrische Durchschnittsberechnung mit der Einheit = Neurone/mm; # = Näherungsweise gerundet;				
HE-Färbung = Hämatoxylin-Eosin-Färbung; Nissl-Färbung = Kresylviolett-Toluidinblau-Färbung; Iba1-Färbung = Ionisiertes-Calcium-bindendes-adaptations-Molekül 1-Färbung (Immunhistochemische Färbung); TNF-Alpha = Tumornekrose-Faktor Alpha; IL6 = Interleukin 6;				

Tabelle 4 - Zusammenfassung Daten Histologie

In Tabelle 4 sind die Daten der histologischen Untersuchung zusammenfassend aufgeführt. Zu dem Messzeitpunkt R24, der Organentnahme, wurden jeweils Proben der hippocampalen und kortikalen Struktur entnommen und untersucht. Die Auswertung zeigt, dass im direkten Vergleich in der Levosimendan-Gruppe vor allem in den HE-Färbungen keine Auffälligkeiten gesehen werden konnten. Jedoch wird in derselben Berechnung im direkten Gruppenvergleich für die Neuronen spezifischen Nissl-Färbungen eine höhere Neuronenzahl sichtbar. Es konnten in den hippocampalen wie auch den kortikalen Schnitten mehr vitale Neurone identifiziert werden. In der statistischen Datenanalyse zeigte sich diese Beobachtung nicht signifikant. Die Iba1-Färbung unterliegt schwierigen Herstellungsbedingungen und konnte aufgrund von über 90 % fehlerhaften Schnitt- sowie Färbefehlern nicht verwertet werden. Sie wurde in der Auswertung ausgeschlossen. Zwei besondere Parameter sind das Interleukin 6 (IL6) sowie der Tumor-Nekrose-Faktor-alpha. Diese Parameter wurden als frühzeitige und sensitive Marker der Signaltransduktion von Gewebsuntergängen untersucht. Das IL6 zeigte sich in allen drei Vergleichsgruppen und Gewebearten unauffällig. Jedoch war der TNF-alpha Wert in der Levosimendan-Gruppe, besonders in den hippocampalen Proben, auffällig erhöht. In der dazugehörigen statistischen Datenanalyse konnte dieser Effekt als statistisch signifikant festgestellt werden. (P = 0,039, Alpha-Fehler (0,05) = 0,490)

4.2 Statistische Datenanalyse

4.2.1 Analyse HE-Färbungen

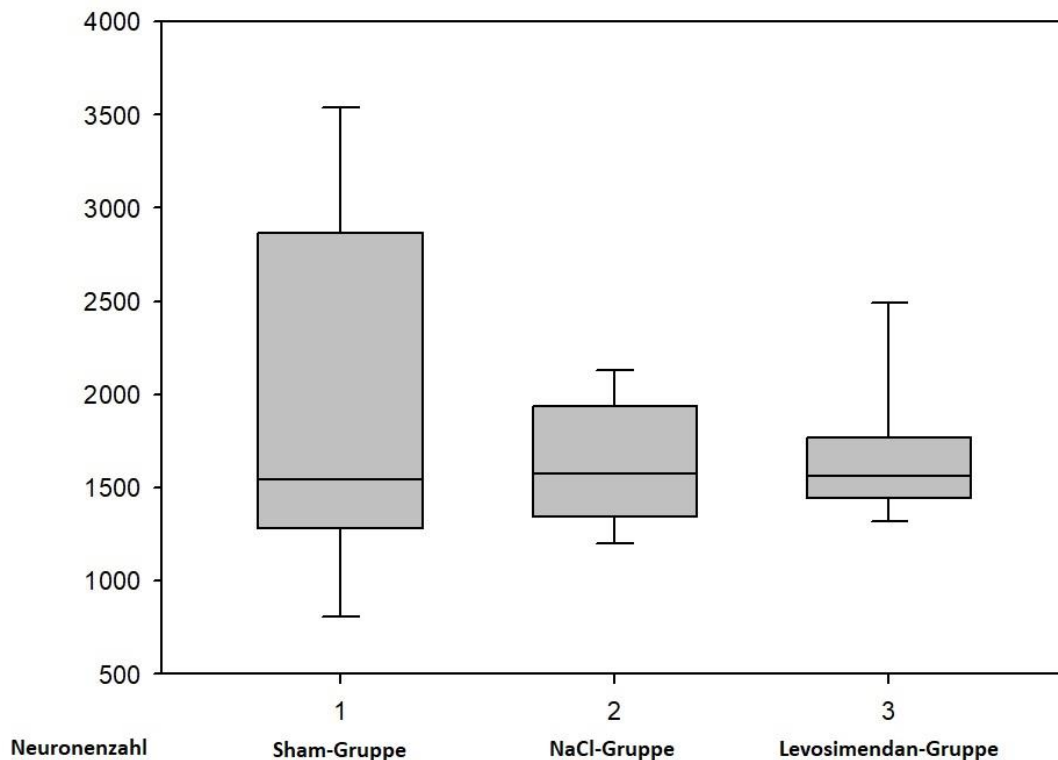


Abb. 15 – Analyse HE-Färbungen

Abb. 15 zeigt die statistische Datenanalyse der HE-Färbungen als Box-Plot. Auf der Ordinate ist die Anzahl der Neurone nach volumetrischer Berechnung aufgetragen. Auf der Abszisse sind die einzelnen Versuchsgruppen aufgetragen. Gruppe 1 ist hierbei die Sham-Gruppe, Gruppe 2 die NaCl-Gruppe und Gruppe 3 ist die Levosimendan-Gruppe. Die Unterschiede in den Mittelwerten zwischen den Behandlungsgruppen sind nicht groß genug, um die Möglichkeit auszuschließen, dass der Unterschied auf zufällige Stichprobenvariabilität zurückzuführen ist; Es gibt keinen statistisch signifikanten Unterschied ($P = 0,637$). Eine geringere Leistung als gewünscht weist darauf hin, dass die Wahrscheinlichkeit geringer ist, dass ein Unterschied, insofern tatsächlich vorhanden, detektierbar ist. Negative Ergebnisse sollten mit Vorsicht interpretiert werden.

4.2.2 Analyse Nissl-Färbungen

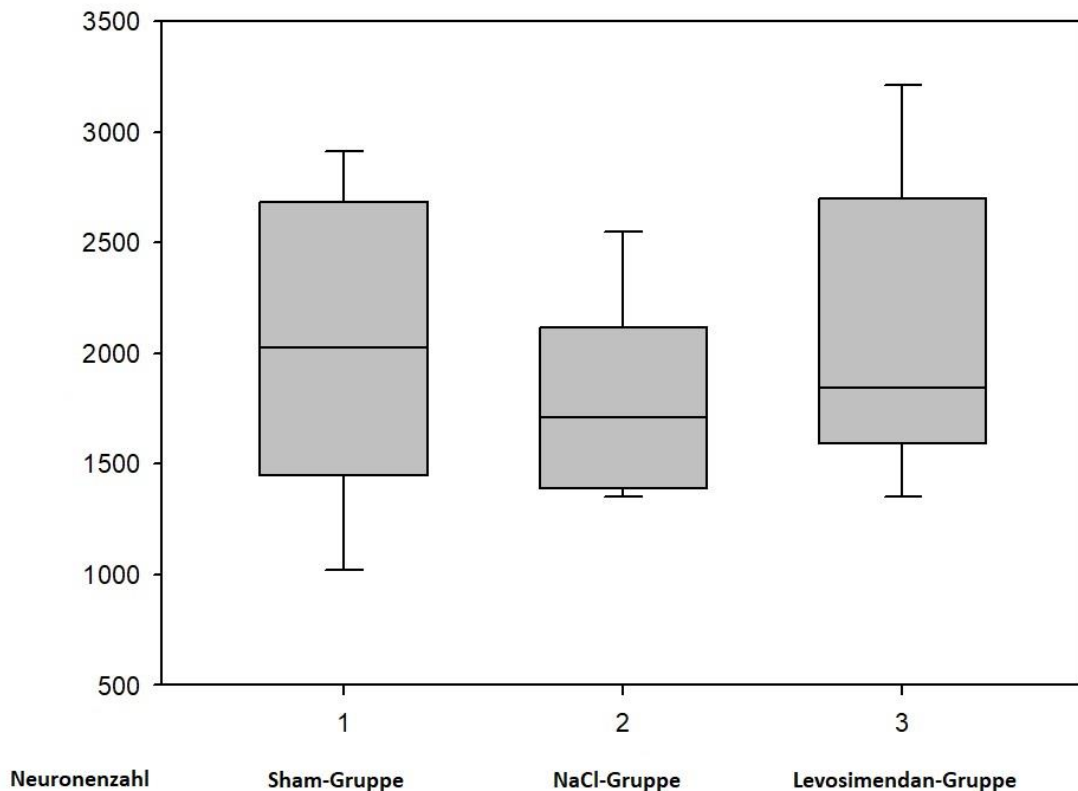


Abb. 16 – Analyse Nissl-Färbungen

Abb. 16 zeigt die statistische Datenanalyse der Nissl-Färbungen als Box-Plot. Auf der Ordinate ist die Anzahl der Neurone nach volumetrischer Berechnung aufgetragen. Auf der Abszisse sind die einzelnen Versuchsgruppen aufgetragen. Gruppe 1 ist hierbei die Sham-Gruppe, Gruppe 2 die NaCl-Gruppe und Gruppe 3 ist die Levosimendan-Gruppe. Die Unterschiede in den Mittelwerten zwischen den Behandlungsgruppen sind nicht groß genug, um die Möglichkeit auszuschließen, dass der Unterschied auf zufällige Stichprobenvariabilität zurückzuführen ist; Es gibt keinen statistisch signifikanten Unterschied ($P = 0,629$). Eine geringere Leistung als gewünscht weist darauf hin, dass die Wahrscheinlichkeit geringer ist, dass ein Unterschied, insofern tatsächlich vorhanden, detektierbar ist. Negative Ergebnisse sollten mit Vorsicht interpretiert werden.

4.2.3 Analyse IL-6 hippocampale Proben

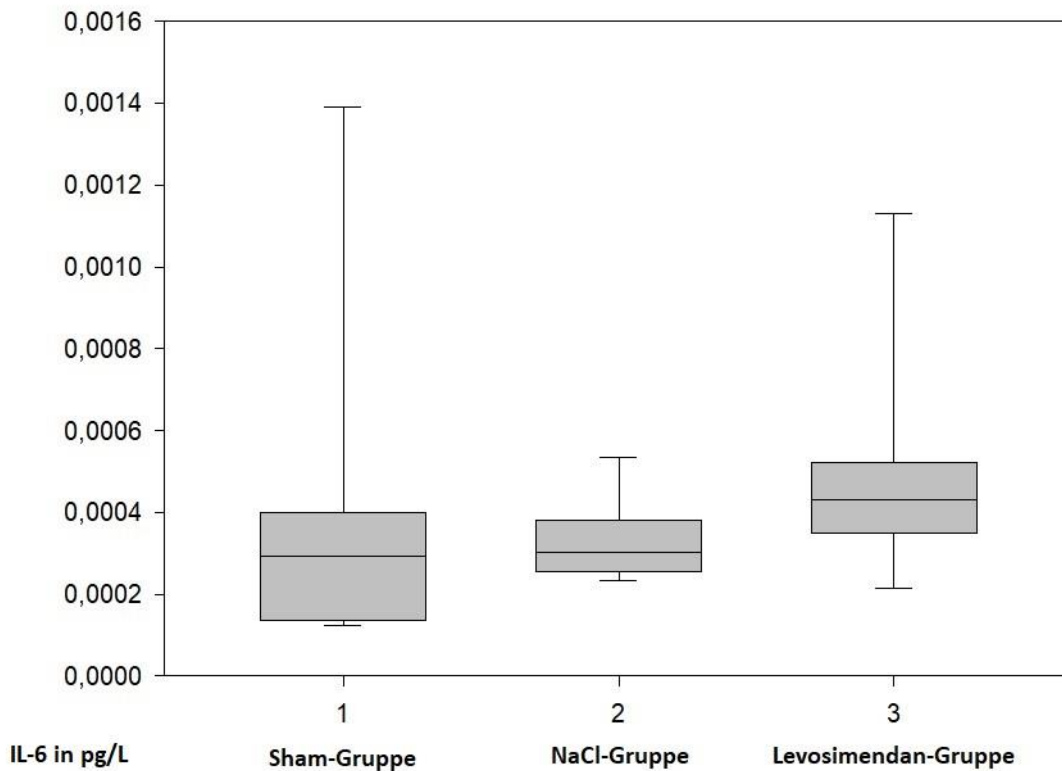


Abb. 17 – Analyse IL-6 hippocampale Proben

Abb. 17 zeigt die statistische Datenanalyse der Konzentration des IL-6 aus hippocampalen Proben als Box-Plot. Auf der Ordinate ist die Konzentration von IL-6 in pg/L aufgetragen. Auf der Abszisse sind die einzelnen Versuchsgruppen aufgetragen. Gruppe 1 ist hierbei die Sham-Gruppe, Gruppe 2 die NaCl-Gruppe und Gruppe 3 ist die Levosimendan-Gruppe. Die Unterschiede in den Mittelwerten zwischen den Behandlungsgruppen sind nicht groß genug, um die Möglichkeit auszuschließen, dass der Unterschied auf zufällige Stichprobenvariabilität zurückzuführen ist; Es gibt keinen statistisch signifikanten Unterschied ($P = 0,620$). Eine geringere Leistung als gewünscht weist darauf hin, dass die Wahrscheinlichkeit geringer ist, dass ein Unterschied, insofern tatsächlich vorhanden, detektierbar ist. Negative Ergebnisse sollten mit Vorsicht interpretiert werden.

4.2.4 Analyse IL-6 corticale Proben

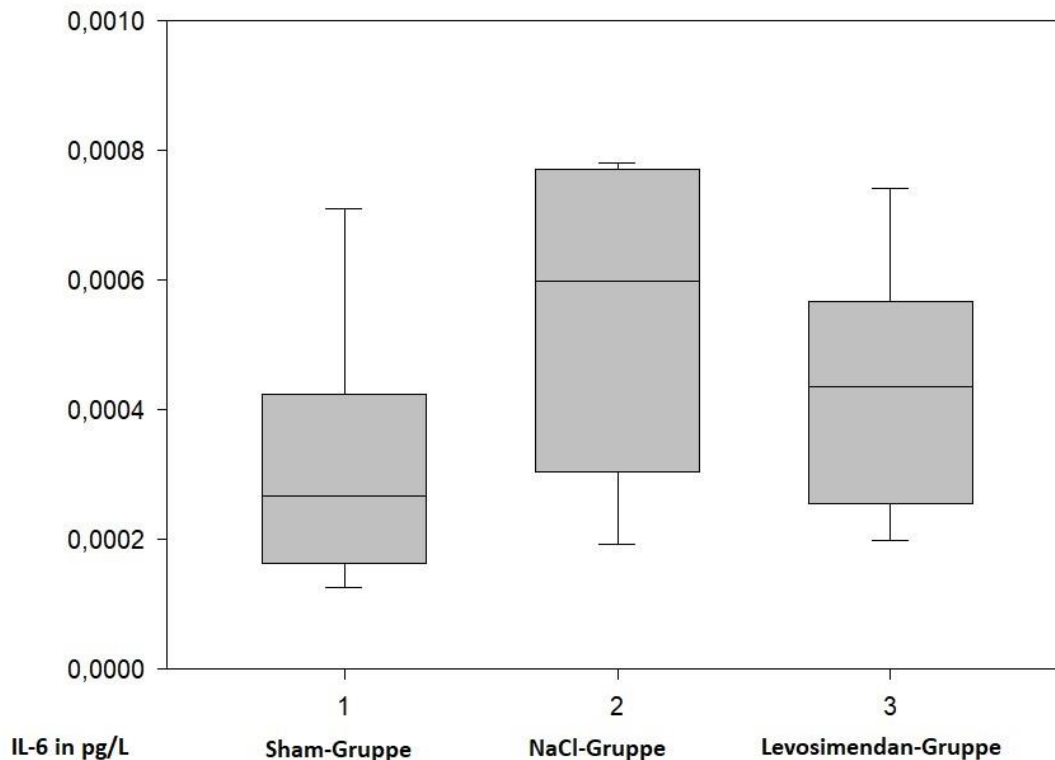


Abb. 18 – Analyse IL-6 corticale Proben

Abb. 18 zeigt die statistische Datenanalyse der Konzentration des IL-6 aus corticalen Proben als Box-Plot. Auf der Ordinate ist die Konzentration von IL-6 in pg/L aufgetragen. Auf der Abszisse sind die einzelnen Versuchsgruppen aufgetragen. Gruppe 1 ist hierbei die Sham-Gruppe, Gruppe 2 die NaCl-Gruppe und Gruppe 3 ist die Levosimendan-Gruppe. Die Unterschiede in den Mittelwerten zwischen den Behandlungsgruppen sind nicht groß genug, um die Möglichkeit auszuschließen, dass der Unterschied auf zufällige Stichprobenvariabilität zurückzuführen ist; Es gibt keinen statistisch signifikanten Unterschied ($P = 0,175$). Eine geringere Leistung als gewünscht weist darauf hin, dass die Wahrscheinlichkeit geringer ist, dass ein Unterschied, insofern tatsächlich vorhanden, detektierbar ist. Negative Ergebnisse sollten mit Vorsicht interpretiert werden.

4.2.5 Analyse TNF-alpha hippocampale Proben

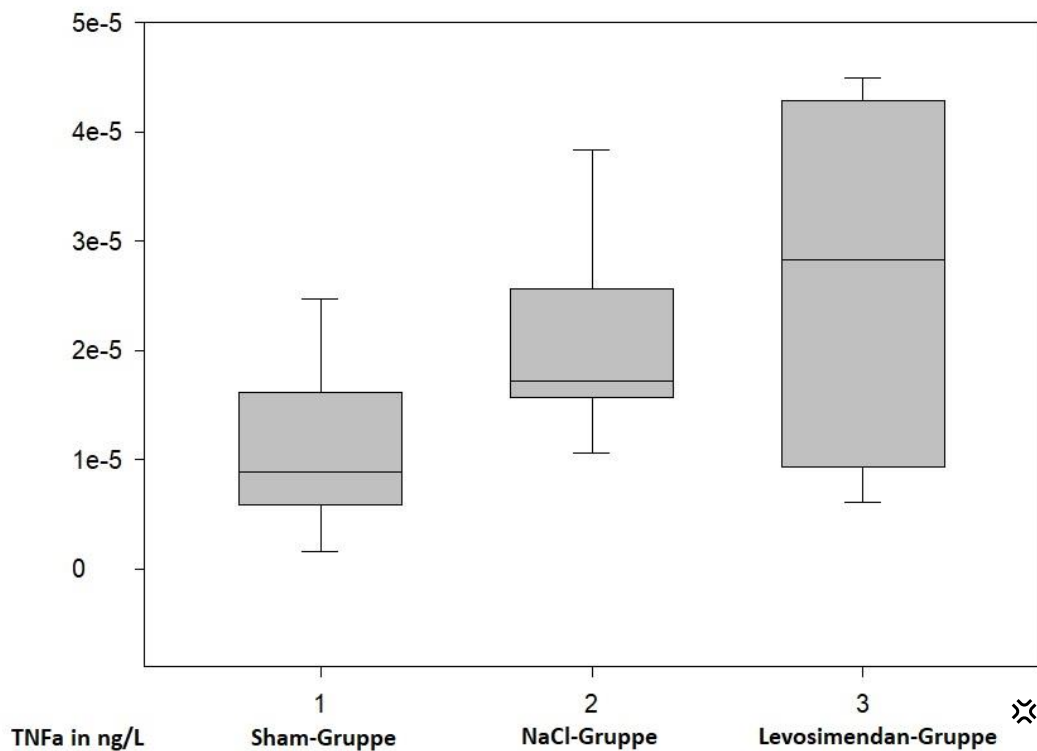


Abb. 19- Analyse TNF-alpha hippocampale Proben

Abb. 19 zeigt die statistische Datenanalyse der Konzentration des TNF-alpha aus hippocampalen Proben als Box-Plot. Auf der Ordinate ist die Konzentration von TNF-alpha in ng/L aufgetragen. Auf der Abszisse sind die einzelnen Versuchsgruppen aufgetragen. Gruppe 1 ist hierbei die Sham-Gruppe, Gruppe 2 die NaCl-Gruppe und Gruppe 3 ist die Levosimendan-Gruppe (statistisch signifikanter Unterschied). Die Unterschiede in den Mittelwerten zwischen den Behandlungsgruppen sind größer, als man zufällig erwarten würde; **es besteht ein statistisch signifikanter Unterschied** (\otimes = statistisch signifikant) ($P = 0,039$). Alle paarweisen Mehrfachvergleichsverfahren wurden nach der Holm-Sidak-Methode geprüft. Das Gesamtsignifikanzniveau liegt bei $= 0,05$ und die Vergleichsdifferenz der Mittelwerte $t P$ ist $P < 0,050$.

4.2.6 Analyse TNF-alpha corticale Proben

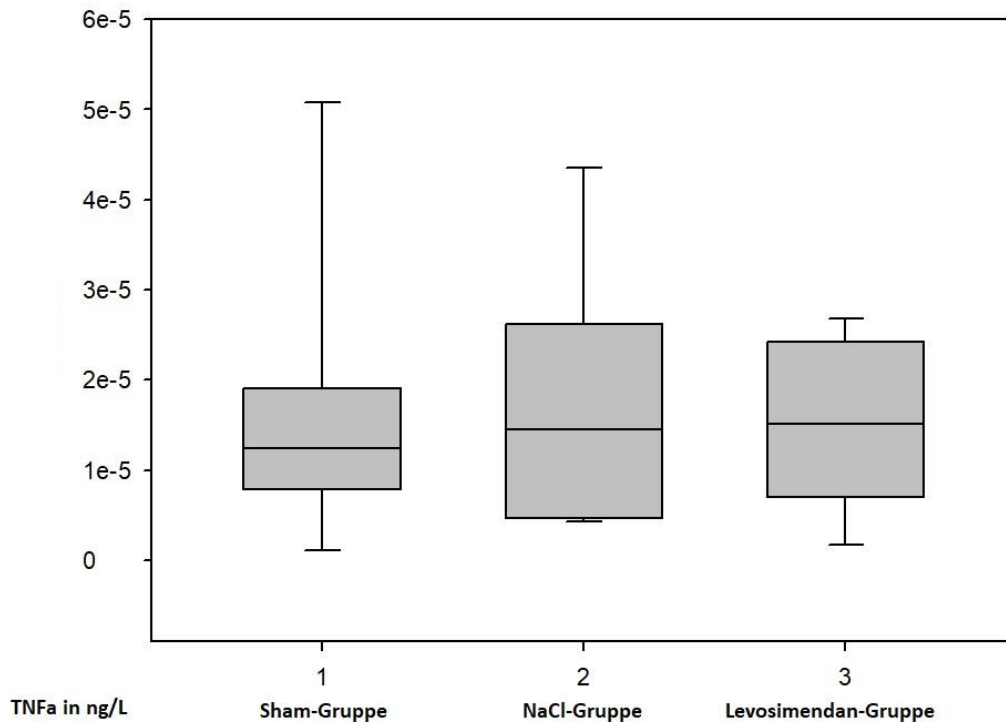


Abb. 20 – Analyse TNF-alpha corticale Proben

Abb. 20 zeigt die statistische Datenanalyse der Konzentration des TNF-alpha aus corticalen Proben als Box-Plot. Auf der Ordinate ist die Konzentration von TNF-alpha in ng/L aufgetragen. Auf der Abszisse sind die einzelnen Versuchsgruppen aufgetragen. Gruppe 1 ist hierbei die Sham-Gruppe, Gruppe 2 die NaCl-Gruppe und Gruppe 3 ist die Levosimendan-Gruppe. Die Unterschiede in den Mittelwerten zwischen den Behandlungsgruppen sind nicht groß genug, um die Möglichkeit auszuschließen, dass der Unterschied auf zufällige Stichprobenvariabilität zurückzuführen ist; Es gibt keinen statistisch signifikanten Unterschied ($P = 0,960$). Eine geringere Leistung als gewünscht weist darauf hin, dass die Wahrscheinlichkeit geringer ist, dass ein Unterschied, insofern tatsächlich vorhanden, detektierbar ist. Negative Ergebnisse sollten mit Vorsicht interpretiert werden.

5 Diskussion

5.1 Methodik und Limitationen

Für diese experimentelle, prospektive, dreifach verblindete Studie wurde ein Modell zur Simulation eines Herzkreislaufstillstandes verwendet. Es beruht auf den akademischen Überlegungen, dass eine unmittelbar einsetzende *No-Flow*-Situation eine organspezifische Untersuchung von Post-Reanimationsschäden ermöglicht. Dieses Modell wurde bereits mehrfach in seiner Basisvariante erfolgreich bei verschiedenen Fragestellungen angewandt. (39) Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei prinzipiell auf dem Herz- und Kreislaufsystem sowie auf dem Cerebrum. Beide Organe sind stets hochgradig von einer guten Perfusion abhängig. In vielen Untersuchungen, vorrangig an Ratten, wurde sichtbar, dass verschiedene Anästhesie-Regime einen Effekt auf die cerebrale Perfusion haben. (40) Studien konnten zeigen, dass durch den Einsatz von Levosimendan Reperfusionsschäden limitiert werden. (41) (42) Levosimendan ist somit ein potentiell Pharmakon, um im Rahmen von IHCA- oder OHCA-Situationen als mögliches additives Therapeutikum zur Neuroprotektion untersucht zu werden. Zu diesem Zweck wurde das erprobte Modell in dieser Arbeit entsprechend modifiziert, um der vorrangigen Fragestellung des Einflusses von Levosimendan auf den cerebralen Reperfusionsschaden gerecht werden zu können. Ähnliche erfolgsversprechende Ansätze mit Hilfe von Thorakotomien am Schweinemodell wurden in jüngerer Zeit in vereinzelt Untersuchungen beobachtet. Hierbei wurde sich jedoch auf die Okklusion von Koronargefäßen konzentriert. (43) In dieser Untersuchung war ein besonderes Augenmerk auf die kranial abgehenden Gefäße der Aorta gerichtet. Die anatomischen Besonderheiten des Hausschweins konnten durch das Vorgehen der direkten Klemmung durch eine Thorakotomie bedacht werden. Nur wenn an diesen (Aa. Vertebrales et Aa. Carotides internae) eine vollständige und umfangreiche Okklusion generiert wird, ist eine simulierte cerebrale *No-Flow*-Situation bei erhaltendem kardialem Organsystem möglich. Um mögliche *Confounder*, zum Beispiel *Low-Flow*-Situationen, zu eliminieren, erscheint dies essentiell. Damit im Rahmen der Versuchsreihe Sicherheit bezüglich dieser Fragestellung herrscht, konnte vorab im Modell das Verfahren erprobt und mittels gleichzeitiger CT-A-Darstellung gesichert werden. In den CT-A-Untersuchungen wurde repetitiv sichtbar, dass es zu keinem cerebralen Blutfluss bei gleichzeitig erhaltener Rest-Organfunktion des gesamten Organismus kam. Folglich wurden alle Tiere konsequent nach diesem weiterentwickelten Protokoll untersucht. Die Versorgung, Stabilisierung sowie die Überwachung der Versuchstiere erfolgten über 24 Stunden, um Levosimendan einen adäquaten Wirkeintritt zu ermöglichen. Die Organentnahme wurde stets nach dem gleichen Regime durchgeführt. Insbesondere die Präparation und Asservierung des Cerebrums erfolgten strikt nach gleichem Vorgang. Zur Quantifizierung des möglichen Reperfusionsschadens ist dies eminent, denn nur so konnte ein vergleichbarer standardisierter

Schaden unterhalb der Versuchsgruppen sichergestellt werden. Infolgedessen konnten die sauerstoffsensiblen Areale des Cornu Ammonis im Bereich des kaudalen Hippocampus reproduzierbar untersucht und verglichen werden. Neurone, vor allem die des Hippocampus, sind aufgrund ihrer besonderen Sauerstoffsensibilität besonders geeignet, um an ihnen Reperfusionsschäden zu untersuchen. Aufgrund dieser Empfindlichkeit kann das Neuron zumeist vital überleben oder leitet unmittelbar die Apoptose ein. Die Einteilung in eine einfache Bewertung, nämlich vital und nicht vital, ermöglicht deshalb eine gute quantitative Betrachtung. Die Neurone wurden hierbei aus verschiedenen, jedoch gleich definierten Ebenen und Abständen addiert und volumetrisch extrapoliert. Im Gesamten scheint dieser Versuchsaufbau ein zeitgemäßer Ansatz zu sein, um das durchaus realistische Szenario eines IHCA oder OHCA zu simulieren. Die Prophylaxe eines Hirnödems, größtenteils durch den Reperfusionsschaden ausgelöst, ist eine wichtige Fragestellung. Hierfür können vor allem die Neuronenzählungen im Rahmen von histologischen Untersuchungen, molekularbiologische Verfahren wie die Bestimmung der Konzentration von IL-6 und TNF-alpha sowie die Zusammenschau der intensivmedizinischen Parameter wegweisend sein. In Bezug auf das eben Dargestellte identifizieren sich die möglichen Limitationen dieser Untersuchung. Trotz sorgfältiger Auswahl der Versuchstiere und konstanten Versuchsparametern unterliegen diese letztendlich der biologischen Varianz, beginnend bei speziellen anatomischen Variationen sowie individuellen Pharmakodynamiken, bis zu unklaren Vorerkrankungsprofilen, die zumeist ausgelöst durch mögliche Gendefekte aufgrund von Konsanguinität hervortreten. Des Weiteren unterliegt die Auswertung der Daten anwenderspezifischen Schwankungen, die trotz protektiven Maßnahmen nicht gänzlich auszuschließen sind. Besonders störanfällig ist die Untersuchung der Neuronenzählung, da diese vom Erfahrungsgrad sowie der individuellen Einschätzung des Untersuchenden abhängt. Hierbei ist eine statistische Analyse essentiell, um Fehlmessungen detektieren zu können. Außerdem unterliegt die Herstellung der einzelnen Präparate ähnlichen Schwankungen durch die Schnittführung und Positionierung der Proben. Größtenteils ist zum Beispiel die IBA-1-Färbung aufgrund von Gewebs- und Resorptionsschwankungen herausfordernd und konnte in dieser Studie nicht reproduzierbar hergestellt werden. Hieraus leitet sich für zukünftige Studien der Anspruch zur weiteren Verfahrensoptimierung ab. Hilfreich könnten Organschnitttraster, Stammbaumanalysen der Zuchttiere sowie vor allem das Etablieren eines international standardisierten und objektivierbaren Scores zur Bewertung von Neuronen im Rahmen von Hirnödem oder Zelluntergangszuständen sein.

5.2 Vital- und Laborwerte

Im Rahmen der Reperfusionendynamik sind bestimmte Parameter wegweisend und stehen im Fokus dieser Dissertation. Der mittlere arterielle Druck ist von herausragender Bedeutung. (44) (45) (46) (47) (48) Entscheidend ist hierbei vor allem, dass ein relevanter Zieldruck oberhalb der physiologischen Autoregulationsschwelle erreicht wird. In dieser Studie konnte beobachtet werden, dass der Einsatz von Levosimendan zu höheren Mittelwerten des mittleren arteriellen Drucks führt. Dieser führte zu einer nicht statistisch signifikanten, aber beobachtbaren Reduktion des Noradrenalin-Verbrauchs in der Levosimendan-Gruppe. Der beschriebene Effekt offenbarte sich mit Zunahme der Versuchszeit, was sich über den positiven inotropen Effekt von Levosimendan erklären lässt. (4)

Des Weiteren konnten in dieser Studie innerhalb der Levosimendan-Gruppe niedrigere pulmonale arterielle Drücke gemessen werden. Diese Beobachtung zeigte sich statistisch nicht signifikant. Bereits in seiner ursprünglichen Indikationsstudie konnte bei Levosimendan jedoch dieser Effekt beobachtet werden. Die in dieser Studie erhobenen Daten reproduzieren diese Annahme. (50) (51)

Der Horovitz-Index fiel in den Mittelwerten der Levosimendan-Gruppe sowie in der Sham-Gruppe weniger ab. Diese Beobachtung war statistisch nicht signifikant, was in zukünftigen Studiendesigns berücksichtigt und als genauere Fragestellungen integriert werden sollte. Darüber hinaus könnte dies einen interessanten Nebeneffekt darstellen, da auch bei den Parametern der funktionellen Residualkapazität Schwankungen beobachtet werden konnten. Zu diesem Themenfeld ist der aktuelle wissenschaftliche Stand spärlich bzw. nicht vorhanden, sodass relevante Erkenntnisse bislang fehlen.

Außerdem konnte in der NaCl-Gruppe im Rahmen der regelmäßig bestimmten Laktatwerte ab Versuchszeitpunkt R12 ein Anstieg beobachtet werden. Um diesen Effekt genauer bestimmen zu können, ist eine weitere Studie zu dieser spezifischen Fragestellung sinnvoll. Sie sollte sich eines gewissen Umfangs und einer gewissen Versuchsanzahl bedienen, um eine statistische Signifikanz sicher bestimmen zu können. Vereinzelt konnten ähnliche Konstellationen in anderen Untersuchungen beobachtet werden. (51) (52)

Ein weiterer indirekter Parameter ist der Verbrauch von Katecholaminen: In der modernen Intensivtherapie hat sich Norepinephrin als mitunter einer der wichtigsten Katecholaminderivate herausgestellt. Norepinephrin führt durch seine hohe Alpha1-Aktivität zu einer Vasokonstriktion. Die Beta1-Aktivität ist hierbei so gering, dass es vereinzelt durch Detektion über Barorezeptoren im herznahen Abschnitt der Aorta zu einer reflektorischen Parasympathikuswirkung und somit zu einer Bradykardie kommen kann. Trotz dessen hat sich das Norepinephrin aufgrund seiner exzellenten Steuerbarkeit einen festen Stellenwert im

Rahmen der Sepsistherapie, aber auch im direkten Kontext des *Post-resuscitation-Care* erworben. (12) (13) Innerhalb dieser Untersuchung konnte unter Einsatz von Levosimendan ein geringerer Verbrauch von Norepinephrin zur Therapie der Hypotonie festgestellt werden. Dieser Effekt lässt sich auf den bekannten und vermuteten positiven inotropen Effekt von Levosimendan zurückführen. (4)

5.3 Molekularbiologie

Interleukin 6 (IL-6) zählt zu den wichtigsten laborchemisch und molekularbiologisch messbaren Markern der aktuellen Zeit. (60) (61) (62) (63) (64) Als proinflammatorisches Zytokin initiiert es Entzündungsreaktionen durch die Stimulation von T- und B-Lymphozyten und die Anregung der Produktion von weiteren Akute-Phase-Proteinen, zum Beispiel in der Leber. (13) (65) (33) (34) Es wird unter anderem als Sofortreaktion zumeist von Makrophagen, Monozyten oder auch Endothelzellen zur Signaltransduktion genutzt, um an Tyrosinkinaserzeptoren des Hypothalamus synergistisch zusammen mit IL-1 und TNF-alpha die Soll-Ist-Wert-Einstellung zu modulieren. (13) (65) (33) (34) Hierauf kommt es zu einer messbar hyperthermen Körperreaktion, welche laienhaft als ‚Fieber‘ bezeichnet wird. Da es nach einem erfolgreichen ROSC zu einer Wiederaufnahme der Perfusion kommt, führt dies durch den wiedereinsetzenden Kreislauf zum Transport von Zytokinen und Hormonen über die Blutbahn. Entsprechend können Interleukine an Ihrem Zielrezeptor die Signaltransduktion etablieren und in der Gewebskonzentration gemessen werden. In dieser Studie wurden Organproben aus dem kaudalen Hypothalamus sowie aus höheren Cortex-Arealen untersucht. Es wurde offenkundig, dass IL-6 im Hippocampus-Bereich unter Levosimendan-Therapie am höchsten, jedoch relativ ähnlich der Sham-Gruppe war. Die NaCl-Gruppe wiederum zeigte sich in einer niedrigeren Konzentration. Paradoxerweise waren die Ergebnisse der Proben aus dem Cortex gegensätzlich. Die NaCl-Gruppe wies hierbei die höchsten Konzentrationen von IL-6 auf. Vergleichbares konnte in absteigender Reihenfolge in der Levosimendan-Gruppe sowie der Sham-Gruppe beobachtet werden. Es ist denkbar, dass hippocampale Areale sowie Cortex-Areale mit unterschiedlicher Sensitivität auf Signaltransduktion reagieren. Dies erscheint aufgrund der vorrangigen evolutionären Entwicklung des Hippocampus logisch. Dies könnte sich in einer unterschiedlichen und gewebsspezifischen Dichte von Rezeptoren innerhalb der Areale begründen. Des Weiteren kann die akademische Überlegung angestellt werden, dass nach Einsetzen der Reperfusion zunächst eine hohe Konzentration von Interleukinen vorherrscht, aber nicht alle cerebralen Strukturen vollständig versorgt sind, sondern sukzessiv reperfundiert werden. Dies könnte zu niedrigeren Konzentrationen in ferner versorgenden Arealen führen. Jenes könnte die unterschiedliche Gewebssättigung und Konzentration erklären. Basal- und zentralcerebral

sitzende Strukturen werden über den Circulus Arteriosus Willisii strukturell mitunter als Erstes reperfundiert. Es ist vorstellbar, dass dies zu einer höheren Absättigung von Rezeptoren in den hypothalamischen Gebieten und damit zu einer messbaren Diskrepanz führt. Dies konnte jedoch in einer modellhaften Untersuchung in der MRT nicht beobachtet werden. Diese Fragestellungen wie auch diese Erkenntnisse sollten in weiteren Untersuchungen differenziert und genauer betrachtet werden. Eine Untersuchung der Reperfusionssdynamik innerhalb spezifischer Hirnareale könnte weitere Erkenntnisse hierzu beitragen.

TNF-alpha zählt zu den proinflammatorischen Proteinen und wird hauptsächlich von Makrophagen, Monozyten und T-Lymphozyten ausgeschüttet. Dies initiiert die Entzündungsreaktion. Einerseits kommt es zu Aktivierung von Endothelzellen, welche daraufhin die Gefäßpermeabilität steigern, andererseits entsteht eine Rezeptor-Hoch-Regulation von Adhäsionsmolekülen, welche die Leukozytenmigration verstärkt. Außerdem werden Thrombozyten zu einer erhöhten Gerinnungsneigung stimuliert. Weitere Effekte sind ähnlich der Kaskade von IL-6 angegliedert. TNF-alpha stimuliert die weitere Produktion von Akute-Phase-Proteinen in der Leber, was eine Modulation der Körpertemperatur über die hypothalamische Signaltransduktion zur Folge hat. (58) (59) (33) (34) (13) In dieser Untersuchung konnten innerhalb der Mittelwerte der Proben der Cortex-Areale und der verschiedenen Untersuchungsgruppen keine herausragenden Unterschiede festgestellt werden. Auch in der statistischen Datenanalyse wurden in den Box-Plots ähnliche Konzentrationen über alle Gruppen identifiziert. Auffällig zeigte sich jedoch die niedrige Streuung der Levosimendan-Gruppe. Hierfür ursächlich könnte der auf die Reperfusionssdynamik positiv wirkende und modulierende Effekt der Pharmakodynamik von Levosimendan sein. (5) Weitere Untersuchungen und Erkenntnisse hierzu sind empfehlenswert. In den Proben der Hippocampus-Areale wurde hingegen für Levosimendan eine deutlich höhere Konzentration in den Mittelwerten beobachtet. In der zugehörigen statistischen Datenanalyse fallen die Box-Plot-Messungen für Levosimendan auf. Es zeigt sich eine eindeutige und höhere Konzentration von TNF-alpha unter Levosimendan-Therapie. Die Einwegvarianzanalyse konnte hierbei einen Unterschied in den Mittelwerten zwischen den Behandlungsgruppen detektieren. Somit besteht eine statistische Signifikanz bei $p = 0,039$. Die statistische Datenanalyse untermauerte, dass Levosimendan im Rahmen der Reperfusionssdynamik zu einer höheren Konzentration von TNF-alpha im Hippocampus von Schweinen führt. Ursächlich hierfür könnte der *Calcium-Sensitizing-Effect* des Pharmakons sein. Bisweilen wurden in Untersuchungen teilweise gegensätzliche und ähnliche Effekte beobachtet. (66) (67) (68) (69) (70) (71) Die Datenlage erscheint hierzu uneins. Aus diesem Grund sollten Studien und Untersuchungen zu dieser Fragestellung erfolgen, um die Datenlage zu verbessern und das Wissen über diese Vorgänge und Dynamiken zu verstehen und zu vertiefen.

5.4 Histologie

Wie auch im Rattenmodell konnte Levosimendan bisher keinen signifikanten Vorteil bei der Untersuchung von vitalen Neuronen zeigen. (53) Als widersprüchlich zeigt sich der durchaus protektive Effekt auf Zellen und Gewebe des Rückenmarks. (54) Daher wurde in dieser Studie der neurohistopathologischen Bewertung und Analyse ein besonderes Augenmerk zuteil. Die Zellen im caudalen Hypothalamus sind besonders sauerstoffsensible Areale und können somit als sensitive Marker für schwere hypoxische Gewebstraumata und Inflammationsreaktionen fungieren. (55) (56) (60) Diese Zellen adäquat zu bewerten, ist bis heute herausfordernd und unterliegt Schwankungen des Ausbildungsstands, den Fähigkeiten des Untersuchenden, aber auch dem Vorerkrankungsprofil der Versuchstiere. Aktuell konnte sich jedoch kein Verfahren im Rahmen von wissenschaftlichen Arbeiten gegen die klassische neuropathologische Schnittuntersuchung durchsetzen. (57) Die Färbungen mittels Hämatoxylin-Eosin (HE) sowie die Nissl-Färbung stellen den sogenannten ‚Goldstandard‘ dar. (58) (59) Die HE-Färbung wird zumeist als Übersichtsfärbung benutzt und kann folglich zur Orientierung und Identifikation von einzelnen Strukturen verwendet werden. Die Nissl-Färbung, meist bestehend aus einer Mischung und Färbereihe aus Kresylviolett und Toluidinblau (alternativ Thionin), dient zur genaueren Identifikation und Bewertung von Nucleoli und ribosomalen Strukturen. (58) (59) Daher ist es möglich, den Zellkern und die Zellorganellen zu differenzieren, deren Vitalität zu beurteilen und einzuschätzen. Die Herstellung dieser Präparate bedarf einer zeitintensiven Präparation in Formaldehyd zweimal über ca. drei Monate. Dies ist zwingend notwendig, um eine gute Schnittfestigkeit zu generieren, welche eine unbedingt identische Wiederholung der Schnitttechnik gewährleistet, um infolgedessen dieselbe Schnittebene generieren zu können. Um die schweinespezifischen Unterschiede der Anatomie zu kennen und die gezielte Struktur aufzubereiten, wäre ein einheitlicher Standard wünschenswert. Gemessen am aktuellen Stand empfiehlt sich die Nutzung eines stereotaktischen Atlas. (8) Eine weitere Herausforderung stellt die adäquate und gleichbleibende Dicke der Schnitte dar. Dies kann durch Verwendung derselben Schnittklingen zwar moduliert, aber die Streuung in der Breite nicht gänzlich verhindert werden. Um Anwenderstreuungen zu vermeiden, wurden die histologischen Untersuchungen stets von derselben Person und unter selbigen Bedingungen und Vorgehen durchgeführt. In der histologischen Volumetrie wurden in den Mittelwerten der HE-Färbung keine nennenswerten Unterschiede detektiert. In der Nissl-Färbung zeigte sich, dass Levosimendan einen möglichen Effekt auf die Anzahl der vitalen Neurone nach volumetrischer Berechnung hat. Im Vergleich zur HE-Färbung erscheint dies plausibel, da der pharmakologische Effekt von Levosimendan auf intrazelluläres *Calcium-Sensitizing* zurückzuführen ist. Um diesen möglichen protektiven Effekt demaskieren zu können, ist die Nissl-Färbung aufgrund ihrer Herstellung und besseren Zelldarstellung überlegen. In der statistischen Datenanalyse wurden diese Daten erneut einer Testung unterzogen: Es zeigte

sich in der Box-Plot-Analyse, dass die Daten der HE-Färbung Schwankungen aufwiesen und die Levosimendan-Gruppe einer breiten Effektstreuung unterlag. Die Einwegvarianzanalyse bestätigte dies. Vermutlich werden diese Schwankungen von der einerseits schlechteren Färbung für Zellfragen und der kleinen Versuchstierzahl bestimmt, sodass nicht von einer statistischen Signifikanz gesprochen werden kann. In der statistischen Datenanalyse und Testung der Daten der Nissl-Färbung zeigte sich ein erwartbareres und eindeutigeres Bild. Es verbleibt zwar eine Streuung in der Levosimendan-Gruppe, jedoch scheint diese im selben Verhältnis wie die NaCl-Gruppe zu sein, sodass in der Box-Plot-Analyse von einer eindeutig höheren Anzahl von vitalen Neuronen gesprochen werden kann. Die Einwegvarianzanalyse untermauert die nicht vorhandene statistische Signifikanz aufgrund der kleinen Stichprobengröße (Versuchstiere). Hieraus leitet sich die Aufgabe für zukünftige Untersuchungen ab, dass diese Versuchsreihe mit deutlich größerer Stichprobengröße durchgeführt werden sollte, um eine mögliche statistische Signifikanz detektieren zu können. Hierbei ist es eminent, das histologische Untersuchungsverfahren weiter zu optimieren, um in erster Linie einen einheitlichen Bewertungsscore für vitale und geschädigte Neurone zu etablieren.

5.5 Konklusion

In der Zusammenschau der Ergebnisse konnte das Ziel dieser Dissertation, nämlich die Verifizierung oder Falsifizierung des Effektes von Levosimendan auf zerebrale Perfusion, und die daraus folgende Fragestellung dieser Arbeit, *„Einfluss von Levosimendan auf den zerebralen Reperfusionsschaden nach Ischämie“*, sehr erfolgreich untersucht, diskutiert sowie beschrieben werden. Die Fragestellung dieser Dissertation wurde durch eine Zusammenführung von bereits etablierten Methoden und Techniken sowie einem neuartigen Versuchsansatz und dreifach verblindetem *Setting* genauer betrachtet. Die Parameter des mittleren arteriellen Drucks und die Reduktion des Norepinephrin-Verbrauchs unter Levosimendan-Therapie waren detektierbar. Des Weiteren wurden Einflüsse auf den Horowitz-Quotienten und die funktionelle Residualkapazität festgestellt. Die niedrigere Laktatdynamik unter Levosimendan-Therapie spricht möglicherweise für einen verbesserten energetischen Zellumsatz. Diese Beobachtung ist jedoch durch vereinzelt besonders erkrankte Tiere beeinflusst und auch durch statistische Adjustierung nicht signifikant. Besonders hervorzuheben und teilweise paradox zugleich sind die molekularbiologisch gemessenen Parameter. Die Daten der TNF-alpha Untersuchungen ergaben, dass unter Levosimendan-Therapie eine höhere Konzentration in den sensiblen hippocampalen Arealen detektiert werden konnte. Dies zeigte sich als einziger Parameter statistisch signifikant. Die histologische Volumetrie in Nissl-Präparaten konnte aufzeigen, dass unter Levosimendan-Therapie eine

höhere Anzahl von vitalen Neuronen festzustellen war. Insbesondere letztere Erkenntnis, aber auch viele weitere Parameter sind aufgrund der mangelnden statistischen Signifikanz nur unter Vorbehalt Bedeutung beizumessen. Aus diesem Grund kann keine Aussage über die Effekte sowie genauere Mechanismen von Levosimendan auf ischämische cerebrale Reperfusionseignisse getroffen werden. Die Hauptursache hierbei ist die unklare Aussagekraft der erhobenen Daten aufgrund der deutlich zu niedrigen Stichprobengröße (Versuchstiere). Kleinere Effekte und Mechanismen lassen sich nur durch große Fallzahlen demaskieren.

Jedoch lässt sich aufgrund des Ergebnisses der TNF-alpha-Untersuchung in der Zusammenschau der Daten sowohl durch die grundlegenden Tendenzen der Parameter als auch durch die höhere Anzahl von vitalen Neuronen durchaus die These ableiten, dass Levosimendan einen Effekt im Rahmen der Reperfusionodynamik hat. Die genauen Effekte und Mechanismen bleiben weiterhin unklar und bedürfen weiterer und insbesondere umfangreicherer Studien. Eine Folgestudie mit entsprechender *Power* ($n > 250$) könnte verbesserte Daten generieren und sollte unbedingt in Betracht gezogen werden. Das angewandte Untersuchungsmodell bietet sich hierbei exzellent als zukünftiges Modell für Folgestudien an, da es umfangreiche Untersuchung verschiedenster Parameter und die Erzeugung großer Datensätze ermöglicht.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation widmet sich der Untersuchung von Levosimendan im *postarrest-Setting* bei einer iatrogenen *No-Flow-Situation*. Sie richtet ein Augenmerk auf die komplexen pathophysiologischen sowie pharmakologischen Auswirkungen des Medikaments und des Herz-Kreislauf-Stillstandes: Insbesondere werden den Effekten während der Genese eines cerebralen Reperfusionsschadens, den damit einhergehenden neuropathologischen Veränderungen sowie den Auswirkungen von Levosimendan hierauf Beachtung geschenkt. Die Ischämie-Reperfusionsdynamik ist hierbei von besonderer Wichtigkeit. Eine grundlegende pharmakologische Therapieoption ist bis heute Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Der Kern dieser Dissertation befasst sich mit einer umfangreichen, dreifach verblindeten Untersuchung der pharmakologischen Intervention mittels Levosimendan am Schweinemodell, um mögliche protektive Effekte und Mechanismen zu erkennen und zu verstehen. Die Daten der Vitalparameter zeigen im Mittelwert eine Reduktion des generierten Laktats unter Levosimendan-Therapie. Außerdem konnte im Mittelwert ein deutlich reduzierter Verbrauch des Norepinephrins zur Kreislauftherapie beobachtet werden. Alle weiteren Parameter waren in ihrer Dynamik gleichwertig oder nicht überlegen oder nicht unterlegen. In den molekularen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass Levosimendan insbesondere in sauerstoffsensitiven cerebralen Arealen zu einer Zunahme der Konzentration von TNF-alpha führen kann. Dies könnte paradoxerweise einen möglichen indirekten Effekt der verbesserten Reperfusion darstellen. In der histologischen Volumetrie wurden in der Auswertung der HE-Färbungen keine Unterschiede in der Anzahl der vitalen Neurone sichtbar. In den neuronenspezifischen Nissl-Färbungen konnte jedoch eine höhere Rate von vitalen Neuronen identifiziert werden. Dies ist in der statistischen Datenanalyse allerdings als nicht signifikant bewertet worden. Die Ergebnisse dieser Dissertation legen nahe, dass Levosimendan die Eigenschaft zur Modulation von Entzündungsreaktionen, die Fähigkeit zur Verbesserung der Eigenschaften der zellulären Überlebensmechanismen hat sowie die Anzahl vitaler Neurone erhöhen kann. In der Zusammenschau dieser Effekte könnte Levosimendan darüber hinaus oxidativen Stress reduziert und somit einen cerebralen Reperfusionsschaden moduliert haben.

Die Fragestellung dieser Dissertation ‚Einfluss von Levosimendan auf den zerebralen Reperfusionsschaden nach Ischämie‘ konnte adäquat untersucht und aufschlussreiche Erkenntnisse gewonnen werden. Aus ebendiesen Erkenntnissen ergibt sich die Chance, weitere, noch spezifischere Untersuchungen durchzuführen, um somit potentielle Ergebnisse erneut und spezifischer zu falsifizieren.

7 Literaturverzeichnis

- (1) Gräsner et al (2021)
Notfall + Rettungsmedizin. 24:346-366.
- (2) European Society of Cardiology (2022)
[https://www.escardio.org/Sub-specialty-communities/Association-for-Acute-CardioVascular-Care-\(ACVC\)/Education/working-together-to-improve-post-cardiac-arrest-management](https://www.escardio.org/Sub-specialty-communities/Association-for-Acute-CardioVascular-Care-(ACVC)/Education/working-together-to-improve-post-cardiac-arrest-management)
- (3) Perkins et al (2021)
Notfall + Rettungsmedizin. 24:274-345.
- (4) Thiel/Roewer (2021)
Anästhesiologische Pharmakotherapie 4. Auflage Thieme.
- (5) Orstavik et al (2014)
British Journal of pharmacology. Dec; 171(23):5163-81.
- (6) Häberle HA (2021)
Anästhesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie; 56: 414-426.
- (7) Kopustinskiene et al (2004)
Potassium-specific effects of levosimendan on heartmitochondria
BiochemPharmacol. 68: 807–812.
- (8) Félix et al (1999)
Stereotaxic Atlas of the Pig Brain
Brain Research Bulletin, Vol. 49, Nos. 1/2 pp. 1-138, Elsevier Science Inc. ; 0361-9230/99/.\$
- (9) Brandt/Artmeier-Brandt (2020)
Eine kurze Geschichte der Wiederbelebung
<https://www.springermedizin.de/eine-kurze-geschichte-der-wiederbelebung/18448620>
,Persönliche Genehmigung der Autoren‘.
- (10) Seewald et al & die teilnehmenden Kliniken am Deutschen Reanimationsregister (2023)
Öffentlicher Jahresbericht 2022 des Deutschen Reanimationsregisters:
Innerklinische Reanimation 2022.
www.reanimationsregister.de/berichte.html
- (11) Fischer et al & die teilnehmenden Rettungsdienste im Deutschen Reanimationsregister (2023).
Öffentlicher Jahresbericht 2022 des Deutschen Reanimationsregisters:
Außerklinische Reanimation 2022.
www.reanimationsregister.de/berichte.html
- (12) Neumar et al (2008)
Post-cardiac arrest syndrome: epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication. A consensus statement from the International Liaison Committee on Resuscitation (American Heart Association, Australian and New Zealand Council on Resuscitation, European Resuscitation Council, Heart and Stroke Foundation of Canada, InterAmerican Heart Foundation, Resuscitation Council of Asia, and the Resuscitation Council of Southern Africa); the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee; the Council on Cardiovascular Surgery

and Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council on Clinical Cardiology; and the Stroke Council
Circulation. Dec 2;118(23):2452-83.

- (13) Löffler/Petridis (2014)
Biochemie und Pathobiochemie 9., vollständige Auflage.
- (14) Dee R et al (2021)
The effect of alternative methods of cardiopulmonary resuscitation – Cough CPR, percussion pacing or precordial thump – on outcomes following cardiac arrest. A systematic review,
Resuscitation 162: 73–81.
- (15) Neumar RW (2000)
Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury
Annals of emergency medicine. 36(5):483-506.
- (16) Nolan et al (2008)
Post-cardiac arrest syndrome: Epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication A Scientific Statement from the International Liaison Committee on Resuscitation; the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee; the Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council on Clinical Cardiology; the Council on Stroke;
Elsevier Ireland Ltd.
- (17) Annunziato et al (2004)
Pharmacology of brain Na⁺/Ca²⁺ exchanger: from molecular biology to therapeutic perspectives
Pharmacol Rev. Dec; 56(4):633-54.
- (18) Neumar et al (2008)
Post-cardiac arrest syndrome: epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication. A consensus statement from the International Liaison Committee on Resuscitation (American Heart Association, Australian and New Zealand Council on Resuscitation, European Resuscitation Council, Heart and Stroke Foundation of Canada, InterAmerican Heart Foundation, Resuscitation Council of Asia, and the Resuscitation Council of Southern Africa); the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee; the Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council on Clinical Cardiology; and the Stroke Council.
Circulation. 118(23):2452-83.
- (19) Yellon/Hausenloy (2007)
Myocardial Reperfusion Injury.
N Engl J Med; 357 (11): 1121–35.
- (20) Park/Lucchesi (1999)
Mechanisms of myocardial reperfusion injury.
Ann Thorac Surg; 68 (5): 1905–12.
- (21) Karimova/Pinsky (2002)
The endothelial response to oxygen deprivation: biology and clinical implications.
Intensive care medicine. 27(1):19-31.

- (22) Adrie C (2002)
Successful Cardiopulmonary Resuscitation After Cardiac Arrest as a "Sepsis-Like" Syndrome.
Circulation. 106(5):562-8.
- (23) Meybohm et al (2010)
Mild hypothermia alone or in combination with anesthetic post-conditioning reduces expression of inflammatory cytokines in the cerebral cortex of pigs after cardiopulmonary resuscitation.
Critical care. 2010;14(1):R21.
- (24) Rivers et al (2001)
Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock.
N Engl J Med 345:1368—77.
- (25) Polonen et al (2000)
A prospective, randomized study of goal-oriented hemodynamic therapy in cardiac surgical patients.
Anesth Analg 90:1052—9
- (26) Pearse et al (2005)
Early goal-directed therapy after major surgery reduces complications and duration of hospital stay. A randomised, controlled trial.
Crit Care; 9:R687—93.
- (27) Balan et al (2006)
Oximetry-guided reoxygenation improves neurological outcome after experimental cardiac arrest,
Stroke 37:3008—13.
- (28) Arrich et al (2012)
Hypothermia for neuroprotection in adults after cardiopulmonary resuscitation.
The Cochrane database of systematic reviews. 9:CD004128
- (29) Holzer et al (2005)
Hypothermia for neuroprotection after cardiac arrest: systematic review and individual patient data meta-analysis.
Critical care medicine. 33(2):414-8.
- (30) Kuboyama et al (1993)
Delay in cooling negates the beneficial effect of mild resuscitative cerebral hypothermia after cardiac arrest in dogs: a prospective, randomized study.
Crit Care Med 21:1348—58.
- (31) Abella et al (2004)
Intra-arrest cooling improves outcomes in a murine cardiac arrest model.
Circulation 2004;109:2786—9.
- (32) Heinrich et al (2014)
Löffler/Petridis: Biochemie und Pathobiochemie. 9. Auflage Springer.
- (33) Rassow et al (2008)
Duale Reihe Biochemie. 2. Auflage Thieme.

- (34) Horn et al (2015)
Biochemie des Menschen. 6. Auflage Thieme.
- (35) Adrie C (2002)
Successful Cardiopulmonary Resuscitation After Cardiac Arrest as a "Sepsis-Like" Syndrome.
Circulation.106(5):562-8.
- (36) Jha et al (2015)
Diverse functional roles of lipocalin-2 in the central nervous system.
Neurosci Biobehav Rev. 49:135-56.
- (37) Wang et al (2020)
Neuroprognostic accuracy of blood biomarkers for post-cardiac arrest patients: A systematic review and meta-analysis.
Resuscitation Mar 1;148:108-117.
- (38) Sharma et al (2022)
Serum Neuron-Specific Enolase Thresholds for Predicting Postcardiac Arrest Outcome: A Systematic Review and Meta-analysis.
Neurology. Jan 4;98(1):e62-e72
- (39) Klein et al (2012)
Transmission of arterial oxygen partial pressure oscillations to the cerebral microcirculation in a porcine model of acute lung injury caused by cyclic recruitment and derecruitment.
British Journal of Anaesthesia 110 (2): 266–73.
- (40) Bleilevens et al (2013)
Effect of anesthesia and cerebral blood flow on neuronal injury in a rat middle cerebral artery occlusion (MCAO) model.
Exp Brain Res 224: 155–164.
- (41) Hein et al (2013)
Levosimendan limits reperfusion injury in a rat middle cerebral artery occlusion (MCAO) model.
BMC Neurol 13: 106.
- (42) Katircioglu et al (2008)
Levosimendan effect on spinal cord ischemia-reperfusion injury following aortic clamping.
J Card Surg 23: 44–48.
- (43) Metzsch et al (2007)
Levosimendan cardioprotection reduces the metabolic response during temporary regional coronary occlusion in an open chest pig model.
Acta Anaesthesiol Scand 51: 86–93.
- (44) Thomas et al (2021)
Correlation between radial and femoral arterial blood pressure during reperfusion in living donor liver transplantation.
Indian J Anaesth. Apr;65(4):302-308.
- (45) Lurie et al (2016)
The Physiology of Cardiopulmonary Resuscitation.

- Anesth Analg. Mar;122(3):767-783.
- (46) van den Brule et al (2018)
Cerebral Perfusion and Cerebral Autoregulation after Cardiac Arrest.
Biomed Res Int. May 8;2018:4143636.
- (47) Claassen et al (2021)
Regulation of cerebral blood flow in humans: physiology and clinical implications of autoregulation.
Physiol Rev. Oct 1;101(4):1487-1559.
- (48) Aygun et al (2022)
The effect of post-reperfusion levosimendan in an experimental intestinal ischemia-reperfusion model.
J Anesth Analg Crit Care. Oct 27;2(1):45.
- (49) Kundra et al (2018)
Inhaled levosimendan versus intravenous levosimendan in patients with pulmonary hypertension undergoing mitral valve replacement.
Ann Card Anaesth. Jul-Sep;21(3):328-332.
- (50) Fang et al (2017)
Levosimendan in patients with cardiogenic shock complicating myocardial infarction: A meta-analysis.
Med Intensiva (Engl Ed). Oct;42(7):409-415.
- (51) Sun et al (2022)
Efficacy of Levosimendan in the Treatment of Patients With Severe Septic Cardiomyopathy.
J Cardiothorac Vasc Anesth. Mar;37(3):344-349.
- (52) De Backer et al (2022)
A plea for personalization of the hemodynamic management of septic shock.
Crit Care. Dec 1;26(1):372.
- (53) Roehl et al (2012)
The effects of levosimendan on brain metabolism during initial recovery from global transient ischaemia/hypoxia.
BMC Neurol. Aug 24;12:81.
- (54) Katircioglu et al (2008)
Levosimendan effect on spinal cord ischemia-reperfusion injury following aortic clamping.
J Card Surg. Jan-Feb;23(1):44-8.
- (55) Horn/Waldrop (1997)
Oxygen-sensing neurons in the caudal hypothalamus and their role in cardiorespiratory control.
Respir Physiol. Nov;110(2-3):219-28.
- (56) Neubauer/Sunderram (1985)
Oxygen-sensing neurons in the central nervous system.
J Appl Physiol. Jan;96(1):367-74.
- (57) Zille et al (2012)
Visualizing cell death in experimental focal cerebral ischemia: promises, problems,

- and perspectives.
J Cereb Blood Flow Metab. Feb;32(2):213-31.
- (58) Welsch et al (2022)
Histologie – Lehrbuch und Atlas.
6. Auflage Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
- (59) Lüllmann-Rauch/Asan (2019)
Histologie – Taschenlehrbuch.
6. Auflage Thieme Verlag.
- (60) Xing et Lu (2016)
HIF-1 α Activation Attenuates IL-6 and TNF- α Pathways in Hippocampus of Rats
Following Transient Global Ischemia.
Cell Physiol Biochem. 39(2):511-20.
- (61) Ma et al (2016)
Role of interleukin-6 to differentiate sepsis from non-infectious systemic inflammatory
response syndrome.
Cytokine. Dec;88:126-135.
- (62) Han et al (2020)
Current Evidence of Interleukin-6 Signaling Inhibitors in Patients With COVID-19: A
Systematic Review and Meta-Analysis.
Front Pharmacol. ;11:615972.
- (63) Wang et al (2016)
Hypothermia Protects Pigs' Gastric Mucosa After Cardiopulmonary Resuscitation via
Inhibiting Interleukin 6 (IL-6) Production.
Med Sci Monit.;22:3523-3528.
- (64) Krüttgen et Rose-John (2012)
Interleukin-6 in sepsis and capillary leakage syndrome.
J Interferon Cytokine Res. Feb;32(2):60-5.
- (65) Bode et al (2012)
Hepatic acute phase proteins--regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving
STAT3 and its crosstalk with NF- κ B-dependent signaling.
Eur J Cell Biol. Jun-Jul;91(6-7):496-505.
- (66) Krychtiuk et al (2014)
Levosimendan exerts anti-inflammatory effects on cardiac myocytes and endothelial
cells in vitro.
Thromb Haemost. Feb;113(2):350-62.
- (67) Maloberti et al (2022)
Endothelial Dysfunction in Patients with Advanced Heart Failure Treated with
Levosimendan Periodic Infusion Compared with Optimal Medical Therapy: A Pilot
Study.
Life (Basel).;12(9):1322.
- (68) Kipka et al (2023)
The Effects of the Levosimendan Metabolites OR-1855 and OR-1896 on Endothelial
Pro-Inflammatory Responses
Biomedicines. Mar 16;11(3):918.

- (69) Rodríguez-González et al (2019)
Effects of Levosimendan on Inflammation and Oxidative Stress Pathways in a Lipopolysaccharide-Stimulated Human Endothelial Cell Model.
Biol Res Nurs. Oct;21(5):466-472.
- (70) Sangalli et al (2016)
Effects of Levosimendan on Endothelial Function and Hemodynamics During Weaning From Venous-Arterial Extracorporeal Life Support.
J Cardiothorac Vasc Anesth. Dec;30(6):1449-1453.
- (71) Krychtiuk et al (2017)
Anti-thrombotic and pro-fibrinolytic effects of levosimendan in human endothelial cells in vitro.
Vascul Pharmacol. Mar;90:44-50.

8 Anhang

8.1 Färbeprotokolle

8.1.1 HE-Färbe-Protokoll des Institutes für Neuropathologie der Universitätsmedizin Mainz

1. Entparaffinierung	15 Minuten
2. Inkubation Hämatoxylin	1 Minute
3. Wässern (bläuen)	1 Minute
4. 96 % Ethanol	20 Sekunden
5. Eosin Y	20 Sekunden
6. 2x 96 % Ethanol	Jeweils 1 Minute
7. 2x 100 % Ethanol	Jeweils 1 Minute
8. 2x Xylol	Jeweils 1 Minute
9. Cytoseal XYL Finalisierung	

Substanzen:

Eosin Y, Nr. 71204, Thermo Fisher Scientific (Dreieich, D)

Hämatoxylin, Nr. 7211, Thermo Fisher Scientific (Dreieich, D)

8.1.2 Nissl-Färbe-Protokoll des Institutes für Neuropathologie der Universitätsmedizin Mainz

1. Entparaffinierung	
2. 2 % Kresylechtviolett (wässrige Lösung zweifach filtiert)	5 Minuten
3. Aqua destillata Spülung	1 Minute
4. 70 % Isopropanol (0,2 L) + wenige Tropfen Eisessig	Sekunden
5. 2x 96 % Isopropanol zur weiteren Differenzierung	Sekunden
6. 2x 100 % Isopropanol	30 Sekunden
7. Xylol	1 Minute
8. Cytoseal XYL Finalisierung	

8.1.3 Iba1-Färbe-Protokoll des Institutes für Neuropathologie der Universitätsmedizin Mainz

1. Entparaffinierung + Antigen retrieval (ph9)	
2. Blockade endogene Peroxidase mit 3,5 % H ₂ O ₂ in PBST bei Raumtemperatur	30 Minuten
3. 2x Waschung mit PBST	Jeweils 2-3 Minuten
4. FICIN-Zymed Inkubation im Brutschrank in feuchter Kammer bei 37 Grad Celsius	5 Minuten
5. 2x Waschung mit PBST	Jeweils 2-3 Minuten
6. Inkubation mit NGS (1 Tropfen NGS + 5 ml PBST Vectastain Kit)	20 Minuten
7. 2x Waschung mit PBST	Jeweils 2-3 Minuten
8. Blockade endogenem Biotin mit Avidin/Biotin Blocking Kit	
a. Avidin	10 Minuten
b. PBST Waschung	
c. Biotin	10 Minuten
d. PBST Waschung	
9. Inkubation Iba-1 Antikörpers bei Raumtemperatur über Nacht 1:2000 in PBST	1 Nacht
10. 2x Waschung mit PBST	Jeweils 2-3 Minuten
11. Inkubation mit Anti-Rabbit bei Raumtemperatur (2 Tropfen Antikörper + 2 Tropfen NHS + 5 ML PBST Vectastain Kit)	30 Minuten

12. 2x Waschung mit PBST	Jeweils 2-3 Minuten
13. ABC Reagenz bei Raumtemperatur (2 Tropfen Reagenz A + 2 Tropfen Reagenz B + 5 ml PBST)	30 Minuten
14. 2x Waschung mit PBST	Jeweils 2-3 Minuten
15. Inkubation mit DAB bei Raumtemperatur ((Labvision) 1000 µl Substrat + 20 µl Chromogen)	1 Minute
16. Waschung Aqua destillata	Kurz
17. Trocknung	
18. Cytoseal XYL Finalisierung	

8.2 Primer zur Zielgenachweis der PCR

PPIA S CTTTCACAgAATAATTCCAaggATT
PPIA A ggACAAgATgCCAaggACC
PPIA FL ATgCTTCAggATAAAATTCTCATCATCAAA(--FL)
PPIA CY5 (L670-)TTCTCTCCATAgATggACTTgCCACCA(--PH)

Dynamo TM Color Flash F-456L / Biozym

sIL 6 S CCAATCTgggTTCAATCAggA
sIL 6 A gTggTggCTTTgTCTggATTC
sIL 6 FL TgTCgAggCTgTgCAgATTAgTACCA(--FL)
sIL6 CY5 (L670-)gCACTgATCCAgACCCTgAggCAA(--PH)

Dynamo TM Color Flash F-456L / Biozym

TNFa F CCCAgAaggAAgAgTTTCCA
TNFa R CggCTTTgACATTggCTACA
TNFa FL ggCCCAaggACTCAgATCATCgTC(--FL)
TNFa CY5 (L670-)CAAACCTCAgATAAgCCcgTCgC(--PH)

Dynamo TM Color Flash F-456L / Biozym

s/NOS F gATggCACCATCATAggggAC
s/NOS A ggCACCTgggAACTCAA
s/NOS FL TGGAACACCCCAAATACGAGTGGTTCC(--FL)
s/NOS CY5 (L670-)GGAGCTGGAGCTGAAGTGGTACGCC(--PH)

Dynamo TM Color Flash F-456L / Biozym

sIL8 S CAAgAgTAAgTgCAgAACTTCgAT
sIL8 A CAggCAgACCTCTTTTCCAT
sIL8 FL CACCTTTCCACCCCAAATTTATCAAg(--FL)
sIL8 Cy5 (L670-)AACTgAgAgTgATTgAgAgTggACCCC(--PH)

Dynamo TM Color Flash F-456L / Biozym

s-LCN2-F AAACCACGCTTTACGGGAGG
s-LCN2-R ATGGGCAAAGGCTGAAGACA

Absolute Blue qPCR SybrgreenMix AB-4166 / Thermo

8.3 LightCycler Programmablauf zum Zielgennachweis

Dynamo CF 55 Grad Celsius 5-10-15:

Präinkubation	95	Grad Celsius	7 Minuten
Denaturierung	95	Grad Celsius	5 Sekunden
Annealing	55	Grad Celsius	10 Sekunden
Extension	72	Grad Celsius	15 Sekunden
Denaturierung	95	Grad Celsius	1 Minute
Annealing	40	Grad Celsius	1 Minute
Melting	95	Grad Celsius	0 Sekunden
		<i>Slope von 0,1 Grad Celsius pro Sekunde</i>	
Cooling	40	Grad Celsius	30 Sekunden

9 Danksagung

10 Lebenslauf