

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

Einfluss einer Ultra-Niedrigtidalvolumenbeatmung im Vergleich zur intermittierenden
Positivdruckbeatmung auf die zerebrale Schädigung nach kardiopulmonaler Reanimation am
Schweinemodell

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

Vorgelegt von

Pascal Siegert
aus Bad Soden am Taunus

Mainz, 2024

Terminblatt

Wissenschaftlicher Vorstand:	Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild
1. Gutachter:	PD Dr. med. Robert Rümmler
2. Gutachter:	Prof. Dr. Anja Harder
3. Gutachter:	Prof. Dr. Clemens Kill
Tag der Promotion:	14.03.2025

Widmung

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	X
1 EINLEITUNG UND ZIEL DER DISSERTATION	1
2 LITERATURDISKUSSION	3
2.1 HISTORISCHE ANNÄHERUNG	3
2.2 HERZSTILLSTAND.....	4
2.2.1 <i>Nomenklatur und Ätiologie</i>	4
2.2.2 <i>Epidemiologie</i>	4
2.2.3 <i>Pathophysiologie des Herzstillstands</i>	6
2.2.4 <i>Therapie</i>	6
2.2.5 <i>Beatmung unter Reanimation</i>	9
2.2.6 <i>Postreanimationsphase</i>	12
2.3 POSTREANIMATIONSSYNDROM	13
2.3.1 <i>Nomenklatur des hypoxisch-ischämischen Hirnschadens</i>	13
2.3.2 <i>Post-Cardiac-Arrest Brain Injury</i>	13
2.3.3 <i>Prävention, Diagnostik und Therapie des Hirnschadens</i>	14
2.3.4 <i>Systemische Ischämie/Reperfusionen-Reaktion</i>	15
2.4 HISTOLOGISCHE BEWERTUNG DES NEUROLOGISCHEN SCHADENS	18
2.4.1 <i>Hirnregionen zur Bewertung des neurologischen Schadens und anatomische Besonderheiten</i> .	18
2.4.2 <i>Schnitttechnik</i>	20
2.5 TIERMODELL UND ETHISCHE EINORDNUNG.....	21
3 MATERIAL UND METHODEN	23
3.1 MATERIALLISTE	23
3.1.1 <i>Geräteliste</i>	23
3.1.2 <i>Verbrauchsmaterial</i>	24
3.1.3 <i>Medikamente</i>	25
3.1.4 <i>Geräte Neuropathologie</i>	27
3.1.5 <i>Geräte Molekularbiologie und Immunassay</i>	27
3.1.6 <i>Verbrauchsmaterial Molekularbiologie</i>	28
3.1.7 <i>Verbrauchsmaterial Immunassay</i>	29
3.1.8 <i>Software</i>	30
3.2 VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	31
3.2.1 <i>Versuchstiere</i>	31
3.2.2 <i>Tiervorbereitung</i>	31
3.2.3 <i>Reanimationsversuch</i>	35

3.2.4	<i>Überwachungsphase</i>	36
3.2.5	<i>Messzeitpunkte</i>	37
3.2.6	<i>Versuchsabschluss und Organentnahme</i>	38
3.3	HISTOLOGISCHE AUFARBEITUNG.....	39
3.3.1	<i>Probenzuschnitt</i>	39
3.3.2	<i>Probeneinbettung, Feinschnitt und Färbung</i>	40
3.3.3	<i>Histopathologische Auswertung</i>	40
3.3.4	<i>Erstellung eines neuropathologischen Scores</i>	42
3.3.5	<i>Kriterien für die Zellzählung</i>	42
3.3.6	<i>Neuronenbewertung und Cell Counting</i>	43
3.4	MOLEKULARBIOLOGISCHE AUFARBEITUNG.....	47
3.4.1	<i>RNA-Extraktion</i>	47
3.4.2	<i>Erstellung einer cDNA-Bibliothek</i>	48
3.4.3	<i>Quantifizierung mittels real-time quantitativer PCR</i>	48
3.5	IMMUNASSAY.....	50
3.6	STATISTISCHE METHODEN.....	51
3.6.1	<i>Validierung histopathologischer Score</i>	51
3.6.2	<i>Statistik der Versuchsergebnisse</i>	51
4	ERGEBNISSE	53
4.1	ALLGEMEINE STUDIENDATEN.....	53
4.2	VALIDIERUNG DES HISTOPATHOLOGISCHEN SCORES.....	55
4.2.1	<i>Intra-Klassen-Korrelation</i>	55
4.2.2	<i>Intra-Observer-Reliabilität</i>	56
4.3	NEUROLOGISCHE AUSWERTUNG.....	57
4.3.1	<i>Histologie</i>	57
4.3.2	<i>Inflamationsmarker Hirngewebe (Molekularbiologie)</i>	60
4.3.3	<i>Inflamationsmarker Serum (ELISA)</i>	61
4.3.4	<i>Nahinfrarot-Spektroskopie</i>	62
5	DISKUSSION	63
5.1	KRITISCHE WERTUNG DER ERGEBNISSE.....	63
5.1.1	<i>Beatmungsparameter</i>	64
5.1.2	<i>Histologie</i>	65
5.1.3	<i>Inflamationsmarker</i>	66
5.1.4	<i>Nahinfrarot-Spektroskopie</i>	67
5.2	METHODIK.....	68
5.2.1	<i>Versuchsdurchführung</i>	68
5.2.2	<i>Bewertung des neurologischen Schadens</i>	69

5.3	ERSTELLUNG UND VALIDIERUNG EINES NEUROPATHOLOGISCHEN SCORES	73
5.4	LIMITATIONEN.....	75
5.4.1	<i>Limitationen der Übertragbarkeit der Studie</i>	75
5.4.2	<i>Allgemeine Limitationen aktueller neuroprotektiver Forschung</i>	76
6	ZUSAMMENFASSUNG	79
7	LITERATURVERZEICHNIS	80
8	ANHANG	101
8.1	PROTOKOLL DES INSTITUTS FÜR NEUROPATHOLOGIE ZUR HE-FÄRBUNG	101
8.2	PROTOKOLL DES INSTITUTS FÜR NEUROPATHOLOGIE ZUR NISSL-FÄRBUNG	101
8.3	ZIELGEN-PRIMER FÜR PCR	102
8.4	PROGRAMM ZUM ZIELGENNACHWEIS MITTELS LIGHTCYCLER	103
8.5	R-CODE ZUR ERRECHNUNG DER INTER-RATER-KORRELATION	104
	DANKSAGUNG	105
	TABELLARISCHER LEBENSLAUF	106

Abkürzungsverzeichnis

Allgemein bekannte Abkürzungen nach dem Duden werden nicht gesondert aufgeführt

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
ACD	Aktive Kompression-Dekompression (active compression-decompression)
AED	Automatisch externer Defibrillator
AHA	American Heart Association
ALS	Advanced Life Support
ARDS	akutes Lungenversagen (Acute Respiratory Distress Syndrome)
BGA	Blutgasanalyse
BLH	baseline healthy
BLS	Basic Life Support
CA	Cornu ammonis
cDNA	komplementäre DNA
CC	Zellzählung (cell counting)
CCSV	Thoraxkompression synchronisierte Beatmung (chest compression synchronized ventilation)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPC	zerebrale Performanz-Kategorien (cerebral performance categories)
CPR	Kardiopulmonale Reanimation (cardiopulmonary resuscitation)
CRP	C-Reaktives Protein
D	Deutschland
DG	Gyrus Dentatus
etCO ₂	endexpiratorisch gemessenes Kohlenstoffdioxid
eCPR	extrakorporale CPR
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERC	European Resuscitation Council
FiO ₂	inspiratorische Sauerstofffraktion (fraction of inspired oxygen)
h	Stunde
HC	Hippocampus
HE	Hämatoxylin-Eosin
HF	Herzfrequenz
HIBI	hypoxisch-ischämischer Hirnschaden (hypoxic-ischemic brain injury)
HKS	HerzKreislaufstillstand
HZV	Herzzeitvolumen
I:E	Beatmungsverhältnis (Inspiration:Expiration)

IE	Internationale Einheiten
IHCA	innerklinischer HKS (in-hospital cardiac arrest)
IL	Interleukin
INC	ischemic neuronal change (ischämische neuronale Veränderung)
IPPV	intermittierende Positivdruckbeatmung (intermittent positive pressure ventilation)
ITD	Impedanzschwellengerät (Impedance threshold device)
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
MAD	mittlerer arterieller Druck
Max. P _{insp.}	maximaler inspiratorischer Beatmungsdruck
mCPR	mechanische Reanimationshilfe
mg/dL	Milligramm pro Deziliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MIGET	Multiple-Inertgas-Eliminationstechnik
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleid acid)
mRS	modifizierte Rankin-Skala
NIRS	Nahinfrarot-Spektroskopie
nm	Nanometer
OHCA	außerklinischer HKS (out-of-hospital cardiac arrest)
PA	Pulmonalarterie
paCO ₂	arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck
paO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PCABI	Post-Reanimations-Hirnschaden (post-cardiac arrest brain injury)
PCAS	Postreanimationssyndrom (post-cardiac arrest syndrome)
PEEP	positiver endexpiratorischer Druck (positive endexpiratory pressure)
PiCCO	Pulse Contour Cardiac Output
PMax	Beatmungsspitzenndruck (pressure maximum)
qPCR	quantitative polymerase chain reaction (quantitative Polymerase-Kettenreaktion)
RR	Beatmungsfrequenz (respiratory rate)
ROSC	Wiederherstellung eines spontanen Kreislaufs (return of spontaneous circulation)
SpO ₂	partielle Sauerstoffsättigung (Pulsoxymetrie)
T	Messzeitpunkt (Time)
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
TTM	Therapeutisches Temperatur-Management
U/min	Umdrehungen pro Minute

ULTVV	Ultra-Niedrigtidalvolumenbeatmung (ultra low tidal volume ventilation)
US	United States (of America)
VF	Kammerflimmern (ventricular fibrillation)
V_t	Tidalvolumen
WLST	Beendigung oder Vorenthaltung lebenserhaltender Maßnahmen (Withdrawal or Withholding of Life-Sustaining Therapy)
ZVD	zentralvenöser Druck

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Outcome nach Krankenhausaufnahme in Folge eines OHCA.....	5
Abbildung 2: ALS-Algorithmus	8
Abbildung 3: Übersichtsaufnahme Hippocampus	19
Abbildung 4: Übersichtsaufnahme Kortex.....	20
Abbildung 5: Darstellung der NIRS-Ableitung	34
Abbildung 6: Übersicht Versuchsablauf	35
Abbildung 7: Schematische Darstellung Zuschnitt Histologie Hippocampus	39
Abbildung 8: Definition der Zonen des Cornu ammonis.....	41
Abbildung 9: Darstellung der Neuronen unterschiedlicher Kategorien in HE-Färbung	45
Abbildung 10: Beispielbild CA2 (HE_537.5_CA2).....	45
Abbildung 11: CONSORT Flow-Chart.....	53
Abbildung 12: Zeit ab VF bis ROSC nach Versuchsgruppe.....	54
Abbildung 13: Mehrliniendiagramme der Zellzählung zur Score-Validierung	55
Abbildung 14: Differenz der Zellzählung von 1. und 2. Zählung (Intra-Observer-Reliabilität)	56
Abbildung 15: Mittelwerte der Zellzählung nach Regionen	57
Abbildung 16: Prozentualer Anteil von HIBI nach Gehirnregion und Versuchsgruppe	58
Abbildung 17: Box-Plot des Anteils von HIBI nach Region	59
Abbildung 18: PCR-Ergebnis von Hippocampus und Kortex für TNF- α , IL-6 und IL-1	60
Abbildung 19: Mehrliniendiagramm von IL-6 und TNF- α im Serum	61
Abbildung 20: Mehrliniendiagramm der Nahinfrarot-Spektroskopie (NIRS).....	62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Laborgeräte	23
Tabelle 2: Verbrauchsmaterial	24
Tabelle 3: Medikamente und MIGET-Reagenzien	25
Tabelle 4: Neuropathologische Aufarbeitung	27
Tabelle 5: Geräte für Molekularbiologie und Immunassay	27
Tabelle 6: Verbrauchsmaterial für Molekularbiologie	28
Tabelle 7: Verbrauchsmaterial für Immunassay.....	29
Tabelle 8: Software	30
Tabelle 9: Morphologische Kriterien zur Neuronenbewertung	44
Tabelle 10: Zielgen-Primer für PCR	102
Tabelle 11: Programm zum Zielgenachweis mittels LightCycler.....	103

1 Einleitung und Ziel der Dissertation

In Europa erleiden jedes Jahr ca. 89 pro 100.000 Personen einen Herzkreislaufstillstand (HKS) außerhalb des Krankenhauses. Die Überlebensraten bis zur Krankenhausentlassung sind dabei mit 8 % weiterhin niedrig. (1, 2) Trotz intensiver Forschung im Bereich der Neuroprotektion stellt der Post-Reanimations-Hirnschaden (post-cardiac arrest brain injury, PCABI) weiterhin eine der Haupttodesursachen dar. (3-5) Aufgrund der schlechten Prognose des HKS kommt der Prävention eine wichtige Rolle bei der Verhinderung eines frühzeitigen, HKS-bedingten Todes zu. (6) Tritt ein HKS dennoch auf, ist die frühzeitige Initiierung der kardiopulmonalen Reanimation (cardiopulmonary resuscitation, CPR) mit qualitativ hochwertigen Thoraxkompressionen und einer frühzeitigen Defibrillation (wenn indiziert) entscheidend für das Überleben. (7) Ziel ist dabei zunächst die Wiederherstellung eines spontanen Kreislaufs (return of spontaneous circulation, ROSC).

Im Bereich der bestmöglichen Beatmungsstrategie ist nur wenig und häufig widersprüchliche Evidenz vorhanden. (6, 8) In den letzten Jahren wurden folglich Thoraxkompressionen gegenüber der Beatmung priorisiert. (9, 10) Die Beatmung hat aufgrund der Veränderung des intrathorakalen Drucks einen Einfluss auf die Koronardurchblutung, den kardialen Auswurf unter Reanimation, den venösen Rückfluss und den intrakraniellen Druck. (11-14) Der Untersuchung innovativer Beatmungsformen und deren Einfluss auf den PCABI kommt daher eine besondere Bedeutung für die Reanimationsforschung zu. In einer Pilotstudie der Arbeitsgruppe des Verfassers der Dissertation zeigte die Beatmungsform der Ultra-Niedrigtidalvolumenbeatmung (ultra low tidal volume ventilation, ULTVV) gegenüber der intermittierenden Positivdruckbeatmung (intermittent positive pressure ventilation, IPPV) eine reduzierte zerebrale Inflammation und geringere Beatmungsdrücke bei gleichzeitig adäquater Oxygenierung und Decarboxylierung. (15) In der vorliegenden Folgestudie wurde daher der Einfluss einer ULTVV im Vergleich zur IPPV umfangreicher untersucht. Hierfür wurden längere, realitätsnahe No-Flow-Zeiten nach Beginn des HKS und eine längere Nachbeobachtungszeit von 20 Stunden (h) gewählt. Die vorliegende Dissertation untersucht im Rahmen der Folgestudie den Einfluss der Beatmungsform auf den neurologischen Schaden. Hierfür wurden zuvor die Null- und Alternativhypothese wie folgt definiert:

Nullhypothese: Die Beatmung mittels ULTVV im Vergleich zu IPPV unter Reanimation im Schweinmodell zeigt keinen Unterschied im Einfluss auf den neurologischen Schaden.

Alternativhypothese: Die Beatmung mittels ULTVV ist im Vergleich zu IPPV unter Reanimation im Schweinmodell mit einem geringeren neurologischen Schaden assoziiert.

Hierzu diente als primärer Endpunkt der histologisch und molekularbiologisch nachweisbare neurologische Schaden der Versuchstiere mit erreichtem ROSC und als sekundärer Endpunkt das Erreichen eines ROSC.

Zur Einordnung der zugrundeliegenden Studie und vor dem Hintergrund eines geringen Fortschritts im Bereich der Reanimation und Neuroprotektion (16-20) werden zudem wissenschaftliche und klinische Probleme in der Reanimationsforschung dargestellt. Für die Bewertung des experimentellen neurologischen Schadens im Großtiermodell ist bisher kein Goldstandard verfügbar. Im Rahmen dieser Dissertation wurde daher ein neuartiger, einfach anwendbarer morphologisch-histologischer Score entwickelt und mittels Inter- und Intra-Observer-Reliabilität validiert. Grundlagen dieses Scores sind bereits in einem Buchkapitel veröffentlicht. (21) Weiterhin zeigte sich im Rahmen dieser Dissertation eine fehlende anatomische Definition der Unterregionen des Hippocampus (HC). Diese konnte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Neuropathologie erarbeitet werden und soll in Kürze publiziert werden. (22)

2 Literaturdiskussion

2.1 Historische Annäherung

Ein Blick in die Geschichte stellt in der Forschung eine wichtige Perspektive dar, um Fehler der Vergangenheit nicht zu wiederholen und den Innovationscharakter neuer Entdeckungen realistischer zu bewerten. In der Geschichte der CPR finden sich u. a. das langjährige Festhalten an veralteten Methoden, das Ignorieren von neuen Erkenntnissen und andererseits das vorschnelle Umsetzen neuartiger Methoden ohne ausreichende Evidenz (23-25).

„We continue to ignore sound medical evidence for comfortable known practices. We often will jump to new technologies without proven benefits. To avoid the mistakes of the past, we must temper innovation with reasoned skepticism, and traditional thinking with an open mind.“ (23)

So wurden die Thoraxkompressionen, wie wir sie heute kennen, erstmals 1892 vom deutschen Friedrich Maass publiziert (26). Dies erlangte jedoch wenig Aufmerksamkeit und es wurde zunächst an der Wiederbelebung am offenen Herzen festgehalten, bis die Publikation von Jude, J.R. et al. 1961 (27) die Wende hin zur modernen CPR brachte. (23-25) Die ersten Mund-zu-Mund-Beatmungen wurden möglicherweise bereits um 1300 vor Christus von hebräischen Hebammen durchgeführt. (28) Ab dem 18. Jahrhundert wurde hierzu vermehrt publiziert und seit den 1960er Jahren konnte sich die endotracheale Intubation und Positivdruckbeatmung als Standard in der CPR etablieren. (23-25) Im Bereich der Neuroprotektion wurde 1991 im Eröffnungspaper des Buches „Advances in Brain Resuscitation“ (29) optimistisch prophezeit:

“One can foresee that pharmacological treatment during brain resuscitation will include a combination of at least two types of calcium antagonists (...) and free radical scavengers/iron chelators, perhaps supplemented with moderate hypothermia.” (30)

Dem historischen Optimismus stehen diverse Fehlschläge pharmakologischer Ansätze zur Neuroprotektion nach HKS gegenüber. (16-18) Dies ist der Fall, obwohl bereits Ende des 20. Jahrhunderts methodische Verbesserungen in der neuroprotektiven Forschung angemahnt wurden. (31, 32)

2.2 Herzstillstand

2.2.1 Nomenklatur und Ätiologie

Die Nomenklatur des HKS stellt ein semantisches Problem dar. Daher wurde 1991 die Nomenklatur mittels „Utstein-Kriterien“ vereinheitlicht und kontinuierlich überarbeitet. (33-36)

“Cardiac arrest is the cessation of cardiac mechanical activity as confirmed by the absence of signs of circulation.” (35)

Hinsichtlich der Ursachen eines HKS wird unterschieden zwischen medizinischer (vermutet kardial, unbekannt oder andere medizinische Ursache) und nicht-medizinischer (Trauma, Drogen-Überdosierung, Ertrinken, Stromschlag oder extern-asphyktisch) Ursache. (35) Eine ungenaue Feststellung der Todesursache (37) und Verwendung uneinheitlicher Definitionen (36, 38-40) erschweren die Zuordnung zur tatsächlichen Todesursache und somit die Angabe korrekter Inzidenzen. Dementsprechend variiert der Anteil bspw. der kardialen Ätiologie des außerklinischen HKS (out-of-hospital cardiac arrest, OHCA) in Studien zwischen 50 und 91 %. (41)

2.2.2 Epidemiologie

In Deutschland wurden im Jahr 2022 hochgerechnet ca. 60.000 Patient*innen nach OHCA durch den Rettungsdienst reanimiert. (42) Die Inzidenz des OHCA in Europa wurde mit 89 pro 100.000 Einwohner*innen (variierend zwischen 53 und 166) angegeben, mit Laienhelfer*innen-CPR in 58 % (13-82 %) der Fälle, ROSC-Raten von 33 % (8-42 %) und Überleben bis Krankenhausentlassung von 8 % (0-18 %). Variationen im Outcome entstehen vermutlich aufgrund unterschiedlicher Rückmeldequoten, Unterschieden in der HKS-Ursache inkl. Komorbiditäten, Lai*in-Reanimationsraten sowie heterogenen Rettungs- und Krankenhaussystemen. (1, 2) Weiterhin variiert bei prognostiziertem schlechten neurologischen Outcome die Entscheidung für oder gegen die Beendigung oder Vorenthaltung lebenserhaltender Maßnahmen (Withdrawal or Withholding of Life-Sustaining Therapy, WLST) weltweit deutlich. (43) Dennoch zeigten sich international vergleichbare Zahlen mit ROSC-Raten von 29,7 % (95 % CI 27,6-31,7 %) und ein Überleben bis Krankenhausentlassung von 8,8 % (95 % CI 8,2-9,4 %). (44) Das 1-Jahres Überleben nach OHCA lag bei 7,7 % (44) und nach innerklinischem HKS (in-hospital cardiac arrest, IHCA) bei 13,4 %. (45) Aktuelle Daten zum OHCA stützen sich meist auf die durch den Rettungsdienst versorgten OHCA und könnten somit die Inzidenz unterschätzen. Im Krankenhaus werden u.a. aufgrund von Do-Not-Resuscitate Festlegungen und unterschiedlicher Definitionen nicht alle Todesfälle als IHCA erfasst. (1) Detaillierte Kenntnisse über die Epidemiologie des HKS dienen zum Vergleich verschiedener Versorgungssysteme und als Grundlage zur Bewertung

2.2.3 Pathophysiologie des Herzstillstands

Ein Herzstillstand führt zum Sistieren des kardialen Schlagvolumens und zur Unterbrechung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung aller Organe. (4, 35) Die resultierende Ganzkörperischämie führt zu einem globalen Gewebe- und Organschaden. (52) Aufgrund der geringen Kapazität des Gehirns zu anaerobem Stoffwechsel führt der HKS innerhalb von wenigen Sekunden zum zerebralen Energiemangel. Klinisch äußert sich dies 9-21 Sekunden nach Beginn des HKS durch Auftreten von Bewusstlosigkeit, nach weniger als 30 Sekunden zeigt sich ein isoelektrisches Elektroenzephalogramm, kortikal evozierte Potentiale sind allerdings noch nach mehreren Minuten nachweisbar. (53)

Der HKS stellt den Endpunkt von verschiedenen reversiblen und irreversiblen Krankheitsbildern dar. Die Ätiologie hat dabei Einfluss auf die Pathophysiologie und konsekutiv auf die Prognose. (54, 55) Respiratorisches Versagen verursacht einen stärkeren Hirnschaden, während bei einem primär kardialen HKS eine stärkere kardiale Dysfunktion resultiert. Bei respiratorischer Ursache entstehen bereits vor dem HKS Abnormalitäten im zellulären Metabolismus mit Verbrauch von Energiereserven. (56) Dagegen ist bei plötzlichem, kardialen HKS das Blut in den Pulmonalvenen, dem linken Herzen und dem arteriellen System noch oxygeniert und kein pathologischer Metabolismus vorausgehend. (54) Zudem stellt die Lunge ein Sauerstoff-Reservoir dar. (12) Nach Erreichen eines ROSC bei HKS mit respiratorischer Ursache kommt es zu einer stärkeren Reperfusion, mehr freien Radikalen und oxidativem Stress. Dadurch entsteht vermutlich ein stärker ausgeprägter Hirnschaden und somit eine schlechtere neurologische Prognose. (54, 56)

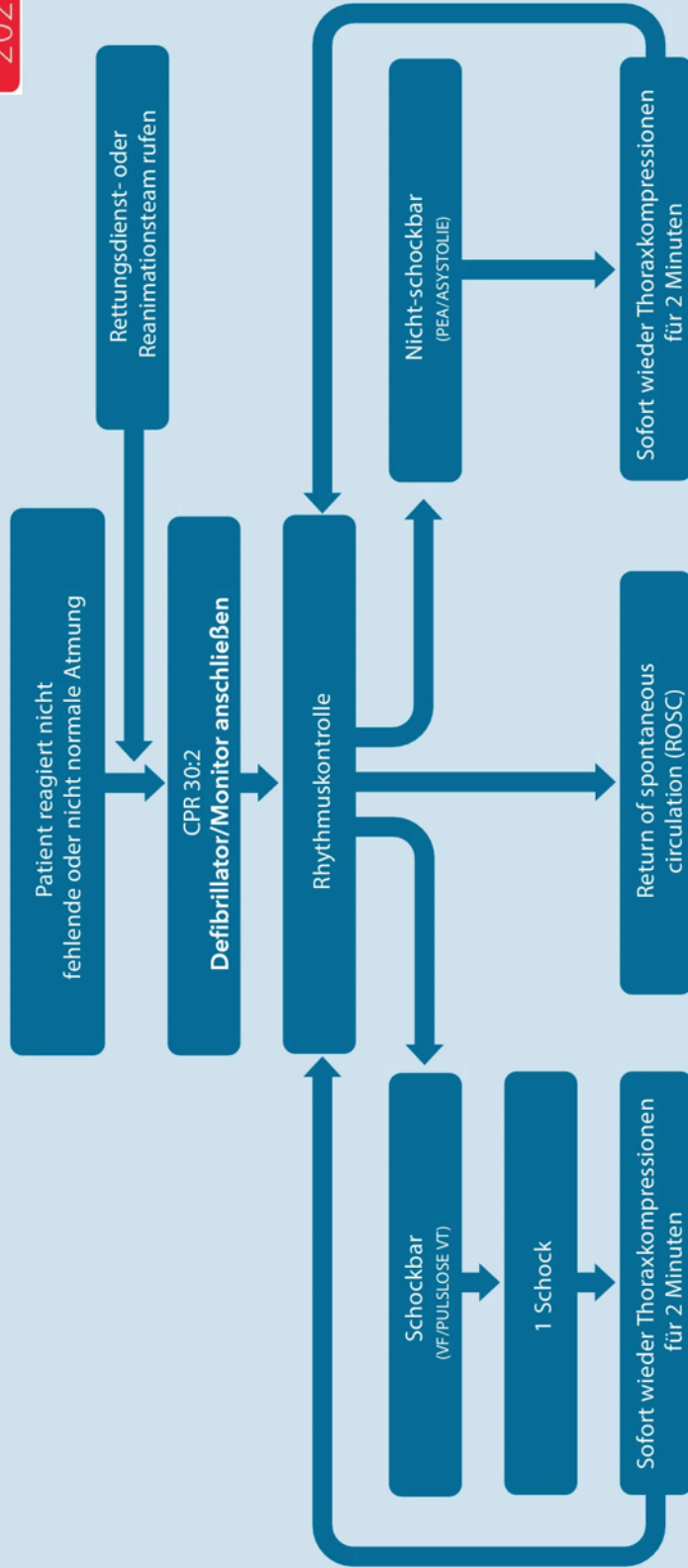
Pathophysiologische Folgen des HKS entstehen teils erst Stunden nach einem ROSC. Nach OHCA (57, 58) tritt in bis zu 50 % und nach IHCA in bis zu 71,9 % (59) ein akutes Lungenversagen (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) auf. HKS-assoziierte Risikofaktoren für ein ARDS sind u. a. Aspiration, Lungenkontusion durch Thoraxkompressionen, systemische Inflammation und Reperfusionverletzung. (60) Die Schäden an den einzelnen Organen wie bspw. Darm, Lunge und Gehirn beeinflussen sich zudem gegenseitig negativ. (61)

2.2.4 Therapie

Seit 1974 werden von der American Heart Association (AHA) und seit 1992 vom ERC Leitlinien mit evidenzbasierten Empfehlungen zur CPR veröffentlicht. (62) Die Grundlage der CPR bildet der Basic Life Support (BLS): Nach Feststellen eines HKS und Notruf werden bei Erwachsenen Thoraxkompressionen (untere Sternumhälfte, 100-120/min, 5-6 cm, vollständige Entlastung) und Mund-zu-Mund-Beatmungen (bis zum Heben des Brustkorbs) im

Verhältnis 30:2 durchgeführt. Wenn verfügbar, soll ergänzend zum BLS frühzeitig ein automatischer externer Defibrillator (AED) angeschlossen werden, um bei Detektion eines defibrillierbaren Rhythmus einen Schock abzugeben. (7) Als Alternative zu manuellen Thoraxkompressionen sind seit Jahren mechanische Reanimationshilfen (mCPR) verfügbar. Bisherige Studien konnten keinen relevanten Überlebensvorteil bei der routinemäßigen Verwendung von mCPR zeigen. (6, 63) In einer Meta-Analyse zeigte sich eine höhere Inzidenz an Verletzungen durch mCPR ohne signifikanten Unterschied an lebensbedrohlichen Verletzungen. (64) Die Verwendung von mCPR wird bisher aufgrund des fehlenden Outcome-relevanten Vorteils nicht routinemäßig empfohlen. (6) Weitere Veränderungen der Thoraxkompressionen wie bspw. eine veränderte Druckposition (unteres Drittel Sternum) oder die Verwendung von Hilfsmitteln zur aktiven Kompression-Dekompression (active compression-decompression, ACD) zur Optimierung der Dekompressionsphase konnten in Studien positive Ergebnisse zeigen, werden aber aufgrund unzureichender Evidenz nicht standardmäßig empfohlen. (6, 7, 65)

Auf den BLS aufbauend werden im Rahmen des Advanced Life Support (ALS) weitere Maßnahmen wie die manuelle Defibrillation, Intubation und Medikamentengabe ergänzt (Abb. 2). Außerdem können Ultraschall und erweiterte Techniken wie extrakorporale CPR (eCPR) zum Einsatz kommen. Zudem werden reversible Ursachen therapiert. (6) Anpassungen des ALS-Algorithmus bei Patient*innen auf der Intensivstation oder im Operationssaal sind in den Leitlinien aufgeführt. (66)



- Hochwertige Thoraxkompressionen und**
- Sauerstoffgabe
 - **Kapnografie**
 - Kontinuierliche Thoraxkompressionen, wenn Atemweg gesichert ist
 - Minimale Unterbrechungen der Thoraxkompression
 - IV- oder IO-Zugang
 - Adrenalin alle 3-5 min
 - **Amiodaron nach 3 Defibrillationsversuchen**
 - Erkennen und Behandeln reversibler Ursachen

- Erkennen und Behandeln reversibler Ursachen**
- Hypoxie
 - Hypovolämie
 - Hypo-/Hyperkaliämie metabolisch
 - Hypo-/Hyperthermie
 - Herzbeuteltamponade
 - Intoxikation
 - Thrombose, koronar oder pulmonal
 - Spannungspneumothorax
- Eventuell Sonographie und Bildgebung zum Erkennen reversibler Ursachen einsetzen**

- Eventuell**
- **Koronarangiografie und PCI**
 - Mechanische Reanimation für Patiententransport/Therapie
 - Extrakorporale CPR

- Nach ROSC**
- Nach ABCDE vorgehen
 - Zielwert SpO₂ 94–98% und normaler PaCO₂
 - 12-Kanal-EKG
 - Erkennen und Behandeln der Ursache
 - Targeted temperature management

Abbildung 2: ALS-Algorithmus
(67)

2.2.5 Beatmung unter Reanimation

Die aktuellen Empfehlungen zur Beatmung während CPR haben ein niedriges Evidenzniveau. (6) Im Bereich BLS wird eine Mund-zu-Mund-Beatmung über 1 Sekunde bis zum Heben des Brustkorbs empfohlen. Dabei sollen die Thoraxkompressionen nicht länger als 10 Sekunden unterbrochen werden. Sollte der*die Laienhelfer*in untrainiert in der Beatmung oder nicht in der Lage sein zu beatmen, sollen nur Thoraxkompressionen durchgeführt werden. (7) Im Rahmen des ALS soll zunächst mit Basis-Atemwegstechniken (z. B. Beatmungsbeutel, oropharyngealen bis hin zu supraglottischen Atemwegshilfen) gearbeitet werden. Eine endotracheale Intubation kann von erfahrenen Anwender*innen durchgeführt werden. Hierfür sollten die Thoraxkompressionen nicht länger als 5 Sekunden unterbrochen werden. Der Intubationserfolg sollte kapnographisch gesichert werden. Sobald eine supraglottische oder endotracheale Intubation erfolgt ist, wird eine kontinuierliche Beatmung von 10 Atemhüben/min bei durchgehenden Thoraxkompressionen empfohlen. Bei inadäquater Beatmung (deutliche Leckage) durch eine supraglottische Atemwegshilfe sollen Thoraxkompressionen und Beatmung im Verhältnis 30:2 durchgeführt werden. (6)

Insgesamt wird in den Leitlinien die Beatmung unter CPR zugunsten qualitativ hochwertiger Thoraxkompressionen und einer frühen Defibrillation zurückgestellt. (6, 7) Besonders während eines hypoxischen HKS spielt die Beatmung aber eine wichtige Rolle. (11, 54) Aktuell wird nur im Falle der Neugeborenen- oder Kinderreanimation oder für professionelle Helfer*innen bei Ertrinkungsunfällen ein Vorgehen mit Priorisierung der Beatmung empfohlen. (68-70)

Tidalvolumen

Im Jahr 1992 empfahlen die Leitlinien von AHA und ERC ein Tidalvolumen (V_t) von 800-1200 ml. (71, 72) In verschiedenen Studien wurden u. a. das erhöhte Risiko einer Magenüberblähung bei hohem V_t und eine potenziell inadäquate Oxygenierung bei niedrigem V_t diskutiert. (73-76) In der Folge wurde ein V_t von 5-6 ml pro Kilogramm Körpergewicht (kgKG) (ca. 500-600 ml) (77) vom ERC empfohlen, zunächst jedoch als „Kompromiss“ zwischen divergierenden Empfehlungen und pathophysiologischen Überlegungen ein V_t von 10 ml/kgKG (700-1000 ml) in die BLS-Leitlinie im Jahr 2000 übernommen. (9) Im Rahmen des ALS wurde im Jahr 2000 bei Verfügbarkeit von Sauerstoff eine Reduktion auf 400-600 ml empfohlen. (78, 79) Seit 2005 wurde auch im BLS ein V_t von 6-7 ml/kgKG empfohlen. (10, 80, 81) In den aktuellen Leitlinien wird kein konkretes V_t , sondern eine Beatmung bis zur Hebung des Thorax, empfohlen. (6)

Beatmungsfrequenz

Die Empfehlungen zur Beatmungsfrequenz (respiratory rate, RR) unter CPR haben sich bei fehlender robuster Evidenz in den letzten Jahrzehnten nicht geändert. Die Leitlinien von AHA und ERC empfahlen 1992 10-12 Atemhübe/min. (71, 72) Aktuelle Leitlinien empfehlen nach durchgeführter Intubation eine RR von 10 Atemhüben/min. (6) Allerdings wird seit Jahren von Hyperventilationen unter CPR und damit einhergehenden negativen Auswirkungen berichtet. (82) Es finden sich nach wie vor präklinisch, klinisch, in Simulationen und Umfragen deutliche Abweichungen der Empfehlungen zur Beatmung mit häufig auftretender Hyperventilation, teils aber auch Hypoventilation. (83-88) Dagegen zeigten sich in der Sekundäranalyse einer OHCA-Interventionsstudie überwiegend adäquate RR. (89) Zur Reduktion von menschlichen Einflussfaktoren können Feedback-Systeme in Simulationstrainings eine Verbesserung hinsichtlich leitliniengerechter RR und V_t zeigen. (90, 91)

Pathophysiologische Überlegungen zur Beatmung unter Reanimation

Unter CPR kommt es zu einer gegenseitigen Beeinflussung von Beatmung und Blutfluss durch Thoraxkompressionen. (92) Bei konventioneller CPR wird der venöse Rückstrom zum Herzen lediglich durch die Thorax-Reexpansion während der Dekompressionsphase verursacht, da physiologische Faktoren wie die Entspannung des rechten Ventrikels, die Muskelpumpe und der negative intrathorakale Druck durch die aktive Inspiration fehlen. Überdruckbeatmung oder positiver endexpiratorischer Druck (positive endexpiratory pressure, PEEP) erhöhen den intrathorakalen Druck und vermindern somit potenziell den venösen Rückstrom. (11) Der intrathorakale Druck zeigte sich zudem im Tierexperiment antiproportional zur Koronarperfusion und zum Überleben und steigerte den intrazerebralen Druck. (13)

Durch höhere RR, erhöhtes V_t und eine reduzierte Expirationszeit kann in der Theorie ein Auto-PEEP mit konsekutivem Airtrapping entstehen. (14) Eine Veränderung des Verhältnisses von Inspiration zu Expiration (I:E) zugunsten der Expirationszeit könnte diesem Problem entgegenwirken. (93) Unter CPR können Atelektasen infolge von durch Thoraxkompressionen verursachter Lungenkontusion und pulmonaler Stauung entstehen. Weiterhin könnten diese durch eine ineffektive Beatmung verstärkt werden. (14) Zusätzlich wird das Phänomen des Atemwegsverschlusses unter CPR diskutiert. (94) Aufgrund der Lungenvolumenreduktion durch Thoraxkompressionen kann es besonders bei prolongierter CPR zum Kollabieren der Atemwege kommen. Die kapnographische Detektion dieses Phänomens und die Einstellung eines PEEP nahe der Atemwegsverschlussgrenze könnten daher ein weiterer Aspekt zur Optimierung der Beatmung unter CPR sein. (95)

Die Anwendung eines PEEP erhöht den intrathorakalen Druck und könnte dadurch in der Theorie zu einem geringeren venösen Rückfluss führen. (11) Andererseits kann die Verwendung eines PEEP im tierexperimentellen Modell (bis 16 mmHg untersucht) die Beatmungsdrücke (96) und die Oxygenierung (97) ohne Verschlechterung bzw. sogar mit Verbesserung des systolischen Blutdrucks optimieren. Dies könnte u. a. durch einen verbesserten Blutfluss aufgrund verringerter pulmonalvaskulärer Resistance erklärt werden. Eine ideale Beatmungsform sollte somit den venösen Rückstrom und den Gasaustausch in ein optimales Verhältnis bringen und weiterhin einen möglichst geringen Lungenschaden und intrakraniellen Druck verursachen. (11)

Neue Beatmungskonzepte

Zur Reduktion potenzieller Schäden durch die Beatmung wurde das Konzept einer passiven Beatmung, teils mit Oxygenierung, untersucht. (98, 99) Thoraxkompressionen erzeugen jedoch nur geringe V_t , welche den anatomischen Totraum nicht übersteigen. (100) Die passiven V_t können durch einen höheren PEEP in der Simulation (101) und im Schweinmodell (102) gesteigert werden. Insgesamt wird die passive Ventilation aufgrund inadäquater Decarboxylierung und Hyperkapnie als Folge nicht empfohlen. (11, 103)

Das Konzept der intrathorakalen Druckregulation hat zu verschiedenen innovativen Beatmungsansätzen geführt. (65) Hierzu zählt eine zu den Thoraxkompressionen synchronisierte Beatmung (chest compression synchronized ventilation, CCSV). Hierbei soll jeder Beatmungshub die externe Kompression des Herzens unterstützen. Zudem wird jede Beatmung vor Ende der Kompressionsphase gestoppt, um den venösen Blutrückfluss während der Dekompressionsphase nicht zu beeinträchtigen. CCSV zeigt im Schweinmodell verbesserte Outcome-Parameter. (104-106) Ein weiterer Ansatz ist die Integration eines Impedanzschwellengeräts (impedance threshold device, ITD) in den Beatmungskreislauf. Das ITD generiert einen negativen intrathorakalen Druck unter CPR mit dem Ziel eines verbesserten venösen Rückflusses. Dieser Effekt kann durch ACD erhöht werden. Untersuchungen zu ITD und ACD, teils in Kombination mit erhöhtem Oberkörper, zeigten bisher divergierende Ergebnisse. (11)

Die Vorgängerstudie der Dissertationsstudie verglich IPPV (RR 10/min, V_t 8-9 ml/kgKG), passive Beatmung (O_2 -Flow 10 L/min) und ULTVV (RR 50/min, V_t 2-3 ml/kgKG) miteinander. Hierbei zeigte ULTVV eine suffiziente Oxygenierung und Beatmung unter CPR bei gleichzeitig geringeren Beatmungsdrücken und intrathorakalem Druck. Zudem zeigte sich ein geringerer pulmonaler Shunt und eine geringere zerebrale Zytokinexpression. Während bei der passiven

Beatmung der arterielle Kohlenstoffdioxidpartialdruck (paCO_2) signifikant erhöht war, war dies bei ULTVV nicht der Fall. Nach ROSC zeigten sich vergleichbare paCO_2 Werte. (15)

2.2.6 Postreanimationsphase

Direkt mit dem Erreichen eines ROSC beginnt die Postreanimationsphase. Nach dem ABCDE-Vorgehen sollten Patient*innen wenn möglich intubiert werden und eine Normoxie (arterieller Sauerstoffpartialdruck (paO_2) 75-100 mmHg (Millimeter Quecksilbersäule), Normokapnie (paCO_2 35-45 mmHg), Normotension (MAD von > 65 mmHG), Normoglykämie (140-180 Milligramm pro Deziliter (mg/dL)) und Normovolämie angestrebt werden. (5) Eine insuffiziente Herstellung physiologischer Verhältnisse vermindert die Wahrscheinlichkeit eines guten neurologischen Outcomes. (107) Die genauen Zielwerte sind Bestandteil fortlaufender Untersuchungen. Bspw. hat CO_2 einen Einfluss auf den intrazellulären pH, den metabolischen Energie- und Sauerstoffbedarf und den zerebralen Blutfluss. (108) Ein protektiver Effekt durch einen höheren paCO_2 konnte aber nicht gezeigt werden. (109-111)

Darüber hinaus bildet die Behandlung der Ursache des HKS bspw. mittels Koronarangiographie eine wichtige therapeutische Säule. (5) Therapeutisches Temperatur-Management (TTM) dagegen steht aufgrund divergierender Ergebnisse in der Diskussion, wird aber aktuell empfohlen. Zudem gehört auf der Intensivstation ein multimodales neurologisches Assessment mit klinischer Untersuchung, elektrophysiologischen Messungen, Biomarkern und Bildgebung 72h nach HKS zur Postreanimationsbehandlung. Vor und nach Krankenhausentlassung sollen physische und nicht-physische Einschränkungen untersucht und eine Rehabilitation angeschlossen werden. (3, 5)

2.3 Postreanimationssyndrom

Auf der Basis der von Dr. Vladimir Negovsky 1972 als „postresuscitation disease“ beschriebenen Pathophysiologie wurde 2008 das pathophysiologische Konzept des „post-cardiac arrest syndrome“ (Postreanimationssyndrom, PCAS) entwickelt. (112, 113) PCAS tritt nach ROSC aufgrund der vorangegangenen Ganzkörperischämie und nachfolgender Reperfusion auf. Die vier Kernelemente des Postreanimationssyndroms sind:

- 1) PCABI
- 2) Post-Reanimations-Myokard-Dysfunktion (post-cardiac arrest myocardial dysfunction)
- 3) systemische Ischämie-/Reperusionsreaktion
- 4) persistierende, den Herzstillstand auslösende Pathologie

Die einzelnen Komponenten gelten dabei als potenziell reversibel, beeinflussen sich negativ und sind daher Bestandteil von Studien zur Verbesserung des Outcomes nach HKS. Für den neurologischen Schaden sind PCABI und die (systemische) Ischämie-/Reperusionsreaktion von besonderer Bedeutung.

2.3.1 Nomenklatur des hypoxisch-ischämischen Hirnschadens

Neben dem Ausdruck „post-cardiac arrest brain injury“ (PCABI) findet sich in der Literatur vielfach der Ausdruck des hypoxisch-ischämischen Hirnschadens (hypoxic-ischemic brain injury, HIBI). Zusätzlich finden sich Ausdrücke wie „Post-Cardiac Arrest HIBI“ (114) bzw. „post-cardiac arrest hypoxic-ischemic brain injury“ (5) oder „Brain injury after cardiac arrest“ (3). Dabei wird keine klare Definition zur Trennung der Begrifflichkeiten vorgenommen. (21, 115, 116) Im Folgenden soll unterschieden werden zwischen:

HIBI: Hirnschaden, der auf histologischer Ebene festgestellt wird

PCABI: Hirnschaden, der auf klinischer Ebene (z.B. klinische Untersuchung, Neuromonitoring) festgestellt wird

2.3.2 Post-Cardiac-Arrest Brain Injury

PCABI umfasst ein breites klinisches Spektrum von milden Einschränkungen (CPC 2 oder mRS 1) bis hin zum Hirntod. Die Pathophysiologie des PCABI lässt sich in primären (kein Kreislauf: no flow) und sekundären Schaden (ROSC mit Reperfusion) einteilen und findet hauptsächlich in Minuten bis Tagen nach dem HKS statt. Die CPR (Minimalkreislauf: low flow) wird z. T. dem primären oder sekundären Schaden zugeordnet. Eine genaue Unterscheidung scheint aufgrund der vielfältigen Wechselwirkungen nicht möglich. Das Verständnis der

Pathophysiologie, insbesondere des sekundären Hirnschadens, eröffnet jedoch ein Zeitfenster für potenzielle neuroprotektive Therapiestrategien. (3, 4, 18)

Der primäre Hirnschaden entsteht, sobald Hypoxie, Ischämie oder die Kombination ausgeprägt genug sind, um eine Depolarisation der neuronalen Zellmembran zu verursachen. Dies ist innerhalb von wenigen Minuten nach Beginn des HKS mit resultierendem Sauerstoff-, Glukose- und Adenosin-Triphosphat-Mangel sowie Verlust des mitochondrialen, inneren Membranpotentials der Fall. In der Folge werden exzitatorische Neurotransmitter freigesetzt und führen letztendlich zur Induktion des Zelltods. (3, 18) Nach Erreichen eines ROSC löst die plötzlich einsetzende Reperfusion ein komplexes Wechselspiel aus verschiedenen pathophysiologischen Prozessen wie bspw. einer gestörten Calcium-Hämostase mit resultierender Exzitotoxizität und Zelltod sowie einer Aktivierung des Immunsystems mit folgender Gewebeeinflammation aus (sekundärer Hirnschaden). (4, 18) Durch eine konsekutive mikrovaskuläre und endotheliale Dysfunktion, gestörte Autoregulation, oxidativen Stress und Hirnödem entsteht ein Circulus vitiosus mit neuronalem Zelluntergang als Folge. (4, 18) Hypotension, Hypo-/Hyperoxie, erhöhter Hirndruck, Krampfanfälle, Hypo-/Hyperglykämie und Hyperthermie sind Folge sowie teilweise Ursache dieses Schadens. (3, 4, 18)

2.3.3 Prävention, Diagnostik und Therapie des Hirnschadens

Die Reduktion des primären Hirnschadens lässt sich in erster Linie durch frühzeitige Wiederherstellung eines spontanen Kreislaufs erreichen. Eine suffiziente CPR begrenzt zudem den primären Hirnschaden. Inwieweit diese ausreicht, um einen adäquaten zerebralen Blutfluss zu etablieren, ist unklar. Sandroni et al. geben an, dass unter CPR ca. 25 % des normalen zerebralen Blutflusses erreicht werden können, jedoch 40-50% für die Aufrechterhaltung der neuronalen Integrität und Vermeidung zusätzlicher Schäden notwendig seien. (4, 65) Demgegenüber steht das Phänomen des Erwachens während CPR mit Augenöffnen, aktiven Bewegungen oder einfachen (Schmerz)-Äußerungen bei weiterhin vorliegendem HKS. (117, 118) Zudem gibt es Berichte von Überleben ohne oder mit geringem neurologischen Schaden trotz prolongierter (> 20 min) CPR. (119) Unter suffizienter CPR ist somit ein ausreichender Kreislauf zum Erhalt der neuronalen Integrität grundsätzlich möglich.

Diverse Präventions- und Therapieansätze wurden in den letzten Jahrzehnten experimentell und klinisch untersucht. Dabei zeigte keine Strategie zur Neuroprotektion überzeugende Resultate, lediglich das TTM wird insgesamt eher positiv bewertet. (3, 16, 17) Bei der wissenschaftlichen Untersuchung des Outcomes nach HKS sind eine Vielzahl von Einflussfaktoren zu beachten. (39, 120) In Reviews zu PCABI werden die Grundkondition der Patient*innen vor HKS und äußere Faktoren nicht explizit diskutiert. (3, 4, 18) Dabei können

HKS-assoziierte Faktoren (Lai*innenreanimation, Ätiologie, Rhythmus), Patient*innen-assoziierte Faktoren (Schweregrad der systemischen Inflammation, Versagen der Autoregulation, fortbestehende zerebrale Ischämie) und Therapie-assoziierte Faktoren (Thrombolyse, TTM, ECMO) das Ausmaß von PCABI beeinflussen. (5, 121) So korrelierten bspw. ein niedriger Hämoglobinwert (18), Untergewicht (122, 123) und Diabetes mellitus (124) mit einem schlechteren Outcome. Experimentell zeigten zudem sozial isolierte Mäuse ein schlechteres Outcome. (125, 126) Geringe soziale Kontakte sind direkt assoziiert mit erhöhter allgemeiner, kardiovaskulärer Mortalität (127) und gute soziale Kontakte sind assoziiert mit langsamerem kognitiven Abbau. (128) In Wohngebieten (129, 130) und bei Individuen (131) mit einem niedrigen sozioökonomischen Status zeigen sich niedrigere Lai*innenreanimationsraten und ein schlechteres Outcome nach OHCA. Somit könnten diverse individuelle Faktoren einen Einfluss auf das Outcome haben und mögliche Confounder in Studien darstellen. (18) Entsprechend einer niederländischen prospektiven Registerstudie mit 1.332 Patient*innen ab 70 Jahren bestimmten jedoch CPR-assoziierte Faktoren und nicht Komorbiditäten das Outcome. (132) Strukturell könnte nach Krankenhausentlassung eine ungenügende Rehabilitation eine Rolle spielen. Bisher ist allerdings nur wenig Evidenz zu Rehabilitation nach PCABI verfügbar. (3, 5)

Die Erstellung einer frühzeitigen neurologischen Prognose stellt weiterhin eine besondere Herausforderung dar. Im Rahmen des multimodalen Assessments werden Biomarker im Blut, welche von verletztem neuronalen Gewebe freigesetzt werden, eingesetzt. Aktuell wird von den Leitlinien die Bestimmung der neuronenspezifischen Enolase 72h nach ROSC empfohlen. (5) Als weiterer Biomarker wird u. a. Neurofilament light zur Detektion des Schadens der weißen Gehirnsubstanz und des Axonschadens diskutiert. In einem aktuellen systematischen Review mit über 10.000 Patient*innen zeigte Neurofilament light die höchste Spezifität 48 h nach ROSC zur Vorhersage eines schlechten Outcomes. (133)

2.3.4 Systemische Ischämie/Reperfusion-Reaktion

Im Rahmen des HKS ist die Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen sowie der Abtransport von Metaboliten abrupt gestoppt. Unter CPR wird dies nur geringfügig wiederhergestellt und auch nach Erreichen eines ROSC besteht häufig weiterhin eine inadäquate Versorgung mit anaerobem Metabolismus. Dies führt zu einer generalisierten Aktivierung von immunologischen Prozessen sowie der Gerinnungskaskade mit vielen Parallelen zur Pathophysiologie der Sepsis. (52) Im Rahmen des PCAS wird eine komplexe immunologische Reaktion ausgelöst, an der u. a. freie Radikale, Lipopolysaccharide, Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), Interleukine (IL), Leukozytose, das Komplementsystem und T-Lymphozytose beteiligt sind. (134) Die Unterscheidung zwischen angemessener und pathologischer

Inflammation und folglich eine Unterscheidung zwischen der Inflammation als Ursache oder Konsequenz des Schadens ist schwer bis unmöglich. (134, 135)

Zytokine spielen eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese des PCAS. Zytokine sind kleine, kurzlebige Proteine mit autokriner, parakriner und endokriner Signalfunktion. (136) Pro- und antiinflammatorische Zytokine stehen normalerweise in einem fragilen Gleichgewicht. Durch z. B. Sepsis oder HKS wird dieses gestört und ein Zytokin-Freisetzungssyndrom bis hin zum Zytokin-Sturm kann ausgelöst werden. Nach initialer Freisetzung von IL-1 (137) und TNF- α (138-141) kommt es zu einer sekundären Ausschüttung weiterer Zytokine. (138, 142, 143) Die sehr komplexe Dynamik unterscheidet sich jedoch gerade in der Anfangsphase interindividuell. Dies erschwert den Einsatz von Zytokin-Messungen zur Prognoseabschätzung oder Entwicklung von Therapieansätzen. (135)

IL-1 beta ist ein überwiegend proinflammatorisches Zytokin und hat eine pyretische Wirkung. (135) IL-1 beta wird im Gehirn hauptsächlich von Mikroglia produziert und spielt eine wichtige Rolle bei immunologischen und nicht-immunologischen Prozessen im Gehirn. (144) Dabei hat es konzentrationsabhängig einen Einfluss auf Lernprozesse, Verhalten, Kortison-Ausschüttung und das Auftreten von Fatigue. (144, 145) IL-6 (146) ist ein proinflammatorisches, pyretisches Zytokin, induziert eine Akute-Phase-Reaktion und wird als führender Marker im Rahmen der inflammatorischen Pathophysiologie diskutiert. (135, 147) Zusätzlich hat IL-6 abhängig von dem Rezeptor-Signalweg auch antiinflammatorische Funktionen (136), erhöht die Gefäßpermeabilität und aktiviert die Gerinnungskaskade. (148)

In Studien korrelierten erhöhte Inflammationsmarker wie IL-6 (138, 149, 150), C-reaktives Protein (CRP) (149, 151), Procalcitonin (152, 153), Komplement-Aktivatoren-Produkt C3bc (154), TNF- α (155) oder Leukozyten (156) mit einem schlechten Behandlungsergebnis (Tod oder schlechtes neurologisches Outcome) nach CPR. Bei Untersuchungen zu mehreren Inflammationsmarkern in der gleichen Studie zeigten sich heterogene Ergebnisse mit Angiopoetin-2 (157), ciliarem neurotrophem Faktor (IL-6 Familie) und IL-17 (158) oder IL-6 (138) als Inflammationsmarker mit der stärksten Assoziation zu einem schlechten Outcome. Allerdings war bspw. in einer Studie eine IL-6-Erhöhung mit einer erhöhten Mortalität, aber nicht mit dem funktionellen Outcome assoziiert. (138) Im experimentellen Setting des HKS werden Inflammationsmarker vereinzelt als Surrogat-Parameter zur Antizipation einer Verbesserung des Outcomes durch eine Intervention genutzt. (15, 159-161) Methodisch zu unterscheiden ist die Messung der Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleid acid, mRNA)-Expression (Molekularbiologie siehe 3.4) von der Messung des fertig translatierten Proteins (Immunassay siehe 3.5). Darüber hinaus sollte bei der Beurteilung von

Inflamationsmarkern berücksichtigt werden, dass die Art des biologischen Materials bzw. des Körperkompartiments Einfluss auf die Konzentration von Inflamationsmarkern hat. (135, 162, 163) Im Liquor zeigte sich in einer kleinen prospektiven Studie eine höhere Sensitivität für die gewählten IL-6- und IL-8-Grenzwerte im Vergleich zum Serum 48h nach OHCA. (142) Zudem war nach HKS im Blutplasma eine Erhöhung von TNF- α nur bei 54 % (164) bzw. 36 % (138) und von IL-1 beta in 31 % (138) der untersuchten Patient*innen nachweisbar.

Die systemische Ischämie- und Reperfusionreaktion geht neben der systemischen Inflammation auch mit einer gestörten Gefäßregulation einher. Zudem kommt es durch Ausschüttung von antiinflammatorischen Zytokinen und Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Achse mit Ausschüttung von Kortison (165) zu einer Immunsuppression mit resultierender erhöhter Infektanfälligkeit. (52, 143) Darüber hinaus findet ein Crosstalk zwischen den verschiedenen Organen untereinander und dem Immunsystem statt. (162) In Tiermodellen konnte die Einwanderung von peripheren Makrophagen in das Gehirngewebe nachgewiesen werden, wobei unklar war, ob die Zellen die Bluthirnschranke überschreiten oder sich an die Gefäßwände anlagern. (134, 166, 167) Es besteht entsprechend einer Multi-Center-Studie eine signifikante Assoziation zwischen Inflammation und ARDS, welches wiederum mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. (57)

2.4 Histologische Bewertung des neurologischen Schadens

Für die Bewertung des experimentellen neurologischen Schadens gibt es aktuell keinen etablierten Goldstandard oder eine breit etablierte Best-Practice-Technik. Bei der Auswahl der Methodik ist daher hinsichtlich des Umfangs eine Balance zwischen Detektion des relevanten Schadens (so viele Untersuchungen wie nötig) und der Vermeidung unnötiger Methodik mit Verbrauch von finanziellen und personellen Ressourcen (so wenig wie möglich) zu suchen. (168, 169) Die im Folgenden dargestellten Überlegungen zielen auf die Entwicklung einer einfach zu etablierenden und durchführbaren Basisdiagnostik ab. Grundlagen hierfür sind bereits in zwei Publikationen mit dem Autor dieser Dissertation als Co-Autor veröffentlicht bzw. werden in Kürze veröffentlicht. (21, 22)

2.4.1 Hirnregionen zur Bewertung des neurologischen Schadens und anatomische Besonderheiten

HIBI findet sich beim Menschen primär in Hirnregionen, welche vulnerabel auf hypoxisch-ischämische Situationen reagieren. Hierzu zählen HC, Kortex, Zerebellum und Thalamus. (4, 18, 52) Nach HKS zeigten Verstorbene den schwersten Schaden im HC (170) und bei Überlebenden war ein HC-Schaden im MRT mit schlechtem neurologischen Outcome verbunden. (171, 172) Im Schweinmodell zeigten sich neurologische Veränderungen im Kortex, Striatum und HC. Im HC war speziell das Cornu ammonis 1 (CA1) betroffen. Die Lokalisationen im Schweinegehirn sind mit dem genannten humanen Verteilungsmuster vergleichbar und korrelierten mit dem neurologischen Outcome. (173, 174) Laut einer anderen Studie am Schweinmodell waren histopathologische HIBI-Veränderungen in CA1, Nucleus caudatus und Putamen mit schlechteren neurologischen Testergebnissen assoziiert. (175) Ein besonderes Augenmerk in der Literatur liegt auf dem Sommer-Sektor, ein Bereich, der CA1 und Teile des angrenzenden Subiculum umfasst und als selektiv vulnerabel beschrieben wurde. (176, 177) Hierzu finden sich jedoch divergierende Ergebnisse. So konnte bspw. in einer Studie im Schwein keine selektive Vulnerabilität festgestellt werden. Allerdings wurde eine möglicherweise zu kurze Nachbeobachtungszeit (72 h) als Ursache diskutiert. (173) In einem Rattenmodell mit einer Nachbeobachtungszeit von bis zu einer Woche konnte eine selektive Vulnerabilität nicht nachgewiesen werden, der HC war dennoch die am stärksten betroffene Hirnregion. (178)

Anatomische Grundlagen

HIBI-Forschung mit einem translationalen Ansatz sollte sich auf vulnerable Regionen fokussieren, welche bereits in verschiedenen Spezies identifiziert wurden. Der HC ist Teil des Archikortex, besteht aus drei Schichten und ist im Temporallappen des Gehirns lokalisiert.

(179) Der HC lässt sich in Gyrus Dentatus (DG), CA und Subiculum unterteilen (Abb. 3). Dabei finden sich im HC verschiedene Zelltypen. In der CA-Region sind Pyramidenzellen und im DG Körnerzellen vorhanden. (180) Das CA wiederum lässt sich grundsätzlich in vier Felder unterteilen. (181) In einer Vergleichsstudie von Ratte, Meerschwein, Kaninchen und Katze zeigten sich nur geringe Unterschiede im Bereich des HC. CA4 variiert jedoch zwischen verschiedenen Spezies und war schwer von CA3 zu unterscheiden, insbesondere im Meerschwein. (182) In Ratten ließ sich teils kein CA4 abgrenzen und stattdessen wurde eine Hilarregion, in der CA und DG sich verbinden, beschrieben. (183, 184) Eine von der Arbeitsgruppe dieses Dissertationsprojekts aktuell erarbeitete anatomische Einordnung der CA-Regionen zeigt Abb. 3. (22)



Abbildung 3: Übersichtsaufnahme Hippocampus

Darstellung in HE-Färbung. Eingezeichnet sind die Aufnahmepositionen von Cornu ammonis (CA) 1-4 und Gyrus dentatus (DG). Das Bild wurde durch Kombination kleinerer Bilder mit Adobe Photoshop Lightroom 6.14 (Adobe Systems Incorporated) aufgenommen. Maßstabsbalken = 200 µm.

Neben dem HC kann HIBI in verschiedenen Spezies auch im Kortex nach HKS gefunden werden. Der Kortex von Säugetieren zeigt Unterschiede in Form, Größe und Neuronenzahl. (185) Der Schweinekortex ist, wie der menschliche Neokortex, in 6 Schichten unterteilt. (186)

Pyramidenzellen finden sich in Schicht 2-6. Schicht 1 beinhaltet keine Neurone mit Ausnahme von wenigen inhibitorischen Neuronen und Gliazellen. (187) HIBI im Schweinekortex kann mit Ausnahme von Schicht 1 in allen 6 Schichten gefunden werden. Allerdings fanden sich in Schicht 2, 3 und 5 mehr ischämische Neurone. (173) Abb. 4 zeigt die Aufnahmepositionen.

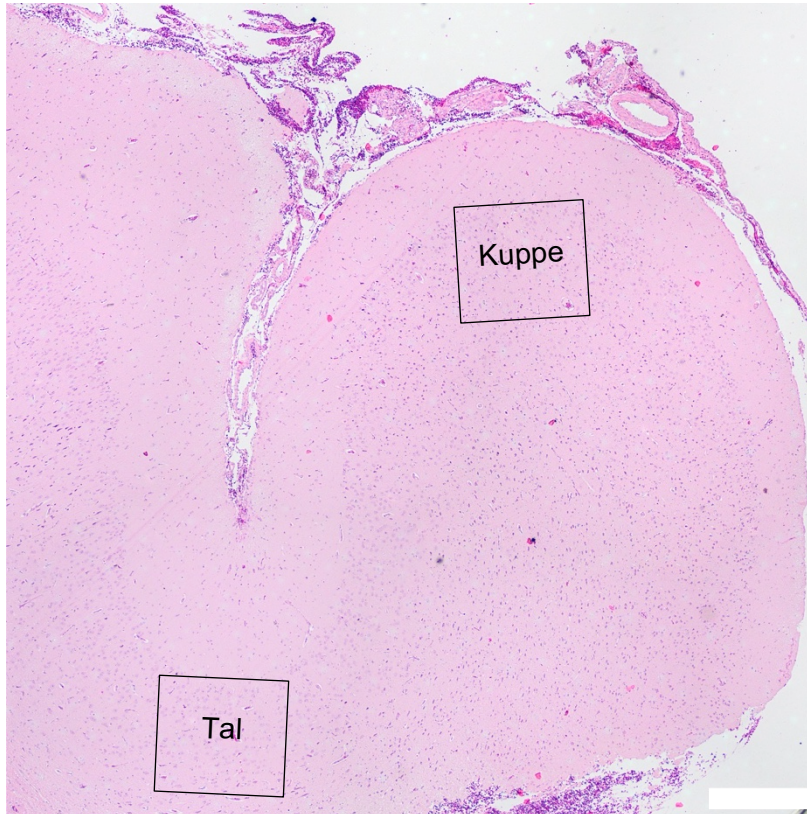


Abbildung 4: Übersichtsaufnahme Kortex

Darstellung in HE-Färbung. Eingezeichnet sind die Aufnahmepositionen von der Kortexkuppe und dem Kortextal. Die Aufnahmefelder sind jeweils am Übergang von Kortex-Schicht 1 zu -Schicht 2 ausgerichtet. Das Bild wurde durch Kombination kleinerer Bilder mit Adobe Photoshop Lightroom 13.0.1 (Adobe Systems Incorporated) aufgenommen. Maßstabsbalken = 100 μ m.

2.4.2 Schnitttechnik

Die verwendete makroskopische Verarbeitung des Gehirngewebes hat einen relevanten Einfluss auf die Ergebnisqualität. Nach erfolgter Formalinfixierung ist besondere Sorgfalt bei der Schnitttechnik nötig. Ein suboptimaler bzw. variabler Schnittwinkel oder Druck auf das Gewebe während des Schnittprozesses kann einen Einfluss auf die Gewebequalität und den auszuwertenden Hirnabschnitt haben. Zur Bestimmung des Schnittwinkels wird teilweise die Forel-Achse genannt, welche eine virtuelle rostro-occipitale Linie durch das Prosencephalon ist. Sie entspricht einer Verbindungslinie zwischen Commissura anterior und Commissura posterior und ist somit nicht von außen sichtbar. Es wird diskutiert, ob die Mitte oder die obere bzw. untere Kante der Kommissuren als Schnittpunkt verwendet werden sollte. (188)

2.5 Tiermodell und ethische Einordnung

Zur experimentellen CPR-Forschung eignen sich verschiedene Tiermodelle. Vereinfacht lässt sich zwischen Kleintiermodell (insb. Nagetiere wie Maus, Ratte) und Großtiermodell (meist Schwein, seltener Hund, Affe) unterscheiden. Aufgrund der vergleichbaren Anatomie und Physiologie von Säugetieren sind Nagetiere grundsätzlich geeignet, zeigen jedoch Unterschiede bei bspw. höheren Herzfrequenzen oder spontanem Sinusrhythmus nach induziertem VF. (189) Der Vorteil des Kleintiermodells liegt in der einfacheren Haltung der Tiere sowie besserer Kontrolle von Variablen wie Reduzierung von genetischer Variabilität oder Modulierung von Vorerkrankungen. Im Großtiermodell dagegen sind die anatomischen Größenverhältnisse ähnlicher zum Menschen. Daher zählt das Schwein zu den am besten etablierten Tiermodellen in der CPR-Forschung. Zudem ist im Vergleich zur Maus die Genexpression im Schwein ähnlicher zu der des Menschen. (190) Auf makroskopischer, neurologischer Ebene zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies. Schweine haben dabei das größte Gehirn von allen gängigen Labortieren. (191) Während Menschen ein gyrencephales Gehirn (mit Furchen) haben, haben Nagetiere ein lissencephales Gehirn (keine Furchen). (192) Schweine haben ein gyrencephales Gehirn (193, 194) mit einem kortikal sechsschichtigen Aufbau. (186)

Weltweit wurden 2005 hochgerechnet 115,2 Millionen und 2015 hochgerechnet 192,1 Millionen Tiere für Forschungszwecke verwendet. (195) In der Europäischen Union zeigt sich in den letzten Jahren ein abnehmender Trend an Tierversuchen. (196, 197) Weiterhin hohe Zahlen zu Tierexperimenten rücken Fragen zur Tierethik in den Fokus. Die Grundsatzfrage lautet dabei, ob Tierversuche nötig für den medizinischen Fortschritt sind. Die Mehrheit der Bevölkerung hält den Einsatz von Tierversuchen unter Schaden-Nutzen-Abwägung für akzeptabel. (198) Es besteht in der Ethik überwiegend ein Konsens über das Vorhandensein von moralischen Verpflichtungen des Menschen gegenüber empfindungsfähigen Tieren. Dabei unterscheiden sich die verschiedenen Theorien in der Begründung und in der konkreten Ausgestaltung dieser Pflichten. Die Schwierigkeit jeder dieser Ethiktheorien ist der Vorwurf einer „Ideologie“, welche nur von einem Teil der Bevölkerung geteilt wird. Daher hat sich in der Tierforschung das dogmafremde 3R-Prinzip etabliert. Demnach sollen Tierversuche möglichst vermieden (Replacement), die Zahl der Tiere reduziert (Reduction) und das Wohlergehen der Tiere gesteigert werden (Refinement). (199) Das 3R-Prinzip ist mittlerweile in der Wissenschaft breit akzeptiert und gesetzliche Grundlage der Europäischen Richtlinie zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. (198, 200-202) Für die Klassifizierung eines Experiments als „ethisch akzeptabel“ muss zudem eine fundierte Methodik verwendet werden, welche geeignet ist, die Fragestellung beantworten zu können. Ein experimentelles Modell dient der Vereinfachung

der Komplexität der Realität. Der Kontrolle von vielen Variablen im experimentellen Modell steht jedoch ein heterogenes Auftreten dieser Variablen in der klinischen Realität gegenüber. (203) Daher sollten positive Effekte im Tiermodell robust, funktionell und klinisch relevant sowie in verschiedenen Laboren reproduzierbar sein. (202, 204)

Um eine Abwägung zwischen Schaden und Nutzen treffen zu können, ist eine nähere Definition dieser Aspekte nötig. Schaden wird dabei überwiegend als negativer Einfluss (tatsächlich oder potenziell) auf das Wohlergehen der Tiere definiert. Dies umfasst negative Effekte auf die Gesundheit oder das subjektive Erleben (z. B. Schmerz oder Angst). (202) Je nach Definition wird auch der Tod des Tieres negativ bewertet, da dadurch zukünftiges positives Erleben unmöglich wird. (202, 205) Gemäß der europäischen Union wird der Schweregrad des Verfahrens eingeteilt in „non-recovery“ (gänzlich unter Vollnarkose, keine Wiederherstellung der Lebensfunktion), gering (kurzfristige, geringe Beeinträchtigung), mittel (z. B. postoperative Schmerzen und Leiden) oder schwer (z. B. starke oder dauerhaft mittelstarke postoperative Schmerzen). (200) Schwieriger oder fast unmöglich zu definieren ist der Nutzen von Forschung. Dies ist besonders im Bereich der Grundlagenforschung der Fall, da die Unvorhersehbarkeit ein entscheidendes Element von Forschung ist. Daher liegt in der Schaden-Nutzen-Abwägung aktuell häufig der Fokus auf der Schadensreduzierung. (202)

In Teilbereichen der HKS-Forschung ist zudem in-vitro-Forschung möglich (Replacement). Bspw. lässt sich auf zellulärer Ebene der Schaden durch Reperfusion nach Ischämie untersuchen und hierdurch mögliche pharmakologische Ansatzpunkte identifizieren. (206, 207) Nicht-pharmakologische Interventionen mit Einfluss auf ganze Organsysteme (z. B. Beatmung) lassen sich jedoch weiterhin nur in vivo untersuchen, da Alternativen wie technische Modelle, Organmodelle oder Computersimulation bisher für die CPR-Forschung nicht etabliert sind.

3 Material und Methoden

3.1 Materialliste

3.1.1 Geräteliste

Tabelle 1: Laborgeräte

Produkttyp	Produktbezeichnung	Firma	Firmensitz
Beatmungsgerät	Engström Carestation	General Electrics	Frankfurt a.M., Deutschland (D)
Bildschirm Fiberoptik	aView	Ambu GmbH	Bad Nauheim, D
Blutgasanalyse	BGA ABL 90 Flex	Radiometer	Krefeld, D
Defibrillator	Corpuls C3	GS Elektromedizinische Geräte G. Stemple	Kaufering, D
Drucküberwachung	LogiCal	Smiths Medical GmbH	Grasbrunn, D
Fiberoptik	aScope 4 Broncho Regular	Ambu GmbH	Bad Nauheim, D
HZV-Messung	PiCCO 2	PULSION Medical Systems SE	Pulsion Medical Systems SE, Feldkirchen, D
Infusomat	Volumed 5000 Diabolo	Fresenius Kabi AG	Bad Homburg, D
Laryngoskopgriff	Laryngoskopgriff	Medicon eG	Tuttlingen, D
Laryngoskopspatel	Stainless Macintosh-Spatel	Rüsch+Welsh Allyn	Sulzbach, D
Intraarterielle O ₂ - Messung	NeoFox-GT	Ocean Insight	Largo, US
MIGET-MMIMS System	Oscilogy LCC	Oscilogy	Folsom P.A., United States of America (US)
Mikroskop	CX 43RF	Olympus Corporation	Tokyo, Japan
Mikroskop Kamera	SC50	Olympus Corporation	Tokyo, Japan
Perfusor	Perfusor fm	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, D
Pipette	100-1000 µl	Eppendorf AG	Hamburg, D
Pulsoximetrie	Masimo Radical 7	Masimo Corporation	Irvine, US

Reanimationsgerät	Corpuls CPR	GS Elektromedizinische Geräte G. Stemple	Kaufering, D
Reanimationsgerät	LUCAS 2	Physio-Control	Redmond, US
Überwachungsmonitor	S5	Datex Ohmeda GmbH	Duisburg, D
Ultraschall	Micro Maxx Ultrasound System	Fujifilm Sonosite	Bothell, US
Ultraschall-Kopf	MicroMaxx HFL38/13-6 MHz	Fujifilm Sonosite	Bothell, US
Wärmesystem	Warmtouch Patient Warming System	Medtronic	Minneapolis, US
Wobbelgenerator	Model 8202	Voltcraft	Hirschau, D
Zentrifuge	EBA 3S	Andreas Hettich GmbH & Co.KG	Tuttlingen, D
NIRS	Invos 5100C Oximeter cerebral/somatic	Medtronic	Minneapolis, US

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Verbrauchsmaterial

Produkttyp	Produktbezeichnung	Firma	Firmensitz
3-Wege-Hahn	BD Luer connecta	Becton Dickinson	Franklin Lakes, US
Aufziehkanüle	BD Microlance 3 20G	Becton Dickinson	Franklin Lakes, US
Beatmungsbeutel	SPUR II	Ambu GmbH	Bad Nauheim, D
Beatmungsmaske	feline/canine small anesthesia mask	Midmark	Dayton, US
Blutentnahmeröhrchen	Monovette Serum Gel/Li-Hep- Gel/EDTA-K/Luer-Lock-Adapter	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, D
Defibrillationselektroden	Corpatch Easy	GS Elektromedizinische Geräte G. Stemple	Kaufering, D
Desinfektionsmittel	Octeniderm farblos	Schülke & Mayr GmbH	Norderstedt, D
DNA-Spray bei Organentnahme	RNaseZap-Spray	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
EDTA (MIGET)	CAS-Nr. 139-33-3	Merck KGaA	Darmstadt, D
Einbettkassette	Gewebe-Einbettkassette Universal	Kabe Labortechnik GmbH	Nümbrecht- Elsenroth, D

Gefäßschleuse	Radifocus Introducer Schleuse Fr. 5/6/7/8, 10cm	Terumo International Systems	Shibuya, Japan
Gefäßschleuse	Percutaneous sheath introducer set 8,5/9 Fr	Arrow International	Cleveland, US
Glasspritze (MIGET)	Dissolved Gas Analysis 5 ml in 1/5 ml, Lock Tip	Cadence Science Inc.	Cranston, US
Infusionsbesteck	Infusionsset	Codan Medizinische Geräte	Lensahn, D
Magensonde	Salem Sump PVC	Medtronic	Minneapolis, US
NIRS Sensor	INVOS Cerebral/Somatic Oximetry Adult Sensor	Medtronic	Minneapolis, US
Perfusorleitung	Injectomat line 150cm	Fresenius Kabi	Bad Homburg, D
Perfusorspritze	Original-Perfusor-Spritze 50 ml	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, D
PiCCO Monitor System	Picco Monitoring Kit	Pulsion Medical Systems	München, D
Pipettenspitze	Quality Pipette Tips	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, D
Pulmonalkatheter	PA Katheter Swan Ganz 7,5 Fr 110 cm	Edwards Lifesciences Corporation	Irvine, US
Punktionskanüle	Seldinger Nadel mit Fixierflügel	Smiths Medical Deutschland	Grasbrunn, D
Sekretbeutel	Sekretbeutel mit NRV	ASID BONZ GmbH	Herrenberg, D
Spritzen	BD Discardit II 1, 2, 5, 10, 20 ml	Becton Dickinson	Franklin Lakes, US
Stimulationskatheter	VascoStim B 2/5F	Vascomed	Binzen, D
Thermodilutionskatheter	PiCCO Katheter 5F	Pulsion Medical Systems	München, D
Tubus	Rüsch sterile endotracheal tube 7.0/7.5	Wirutec Rüsch	Sulzbach, D
Venenverweilkanüle	Vasofix Safety 22G-16G	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, D
ZVK-Lege-Set	ZVK-Lege-Set, Version 5	Wagner Kliniksbedarf	Remscheid, D

3.1.3 Medikamente

Tabelle 3: Medikamente und MIGET-Reagenzien

Wirkstoff	Handelsname	Firma	Firmensitz
Amiodaron HCL	Amiodaron HCL 150 mg/ml	Hikma Pharma GmbH	Martinsried, D
Atracuriumbesilat	Atracurium 50 mg/5 ml	Hikma Pharma GmbH	Martinsried, D

Arginin-Vasopressin	Pitressin Injection 20 I.E./ml	Pfizer Inc.	New York City, US
Azaperon	Stresnil 80 mg	Lilly Deutschland GmbH, Abteilung Elanco Animal Health	Bad Homburg, D
Azeton (MIGET)	CAS-Nr. 67-64-1	Merck KGaA	Darmstadt, D
Desfluran (MIGET)	CAS-Nr. 57041-67-5	Baxter Deutschland GmbH	Unterschleißheim, D
Diethylether (MIGET)	CAS-Nr. 60-29-7	Merck KGaA	Darmstadt, D
Enfluran (MIGET)	CAS-Nr. 139-33-3	Merck KGaA	Darmstadt, D
Epinephrin	Suprarenin 1 mg/ml, 25 ml Durchstechflasche	Sanofi-Aventis GmbH	Frankfurt a.M., D
Fentaylcitrat	Fentanyl 0,05 mg/ml	Janssen-Cilag GmbH	Neuss, D
Formalinaldehydlösung 4 %	Roti-Histofix 4 %	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, D
Glukose 5 % & 40 %	Glukose 5 % & 40 %	B.Braun Melsungen AG	Melsungen, D
Heparin-Natrium	Heparin-Natrium 25000IE/5 ml	Ratiopharm GmbH	Ulm, D
Kaliumchlorid	1 M Kaliumchlorid Lösung 7,46 % 20 ml	B.Braun Melsungen AG	Melsungen, D
Ketaminhydrochlorid	Ketamin 50 mg	Hameln Pharmaceuticals GmbH	Hameln, D
Krypton 4.7 (MIGET)	CAS-Nr. 7439-90-0	Westfalen AG	Münster, D
Midazolamhydrochlorid	Midazolam 10 mg	Hameln Pharmaceuticals GmbH	Hameln, D
Natriumchlorid	NaCl 0,9 %	B.Braun Melsungen AG	Melsungen, D
Norepinephrin	Arterenol 5 mg/50 ml	Sanofi-Aventis GmbH	Frankfurt a.M., D
Propofol	Propofol 2 % 20 mg/ml	Fresenius Kabi Deutschland GmbH	Bad Homburg, D

Schwefelhexafluorid 3.0 (MIGET)	CAS-Nr. 2551-62-4	Messer Group GmbH	Sulzbach/Taunus, D
Sterofundin	Sterofundin 1/1 E ISO 1000 ml	B.Braun Melsungen AG	Melsungen, D

3.1.4 Geräte Neuropathologie

Tabelle 4: Neuropathologische Aufarbeitung

Produkttyp	Produktbezeichnung	Firma	Firmensitz
Automatisches Mikrotom	HM 355S	Expredia	Essendonk, NLD
Dako Bluingpuffer	Code Nr. CS702	Aglient	Santa Clara, US
Dako Cover Glass 24 x 50 mm	Code Nr. CS704	Aglient	Santa Clara, US
Dako Eosin	Code Nr. CS 701	Aglient	Santa Clara, US
Dako Hämatoxylin	Code Nr. CS700	Aglient	Santa Clara, US
Eindeckmittel	CAS Nr. 1330-20-7	Expredia	Kalamazoo, US
Ethanol 70/80/96/100 %	CAS Nr. 64-17-5	SAV Liquid Production GmbH	Flintsbach am Inn, D
Histologie-Wasserbad	HI 1210	Leica	Barrington, US
Paraffin-Arbeitsplatz	Tissue-Tek TEC 5	Sakura Finetek Europe B.V.	Alphen, NLD
Trockenschrank	Heraeus UT6	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
Vakuuminfiltrationsprozessor	Tissue-Tek VIP 6	Sakura Finetek Europe B.V.	Alphen, NLD

3.1.5 Geräte Molekularbiologie und Immunassay

Tabelle 5: Geräte für Molekularbiologie und Immunassay

Produkttyp	Produktbezeichnung	Firma	Firmensitz
Mikroplattenleser	MRX TC II	Dynex Technologies	Chantilly, US
Mikroplattenschüttler	Unimax 2010	Heidolph	Schwabach, D
PCR-Analysesystem	Light Cycler 480	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, D
Reagenzglasschüttler	REAX Control	Heidolph	Schwabach, D
Schwingmühle	MM 300	Retsch GmbH & Co. KG	Haan, D

Spektrophotometer	NanoVue	General Electrics	Frankfurt a.M., D
Zentrifuge	Centrifuge 5804 R	Eppendorf AG	Hamburg, D
Zentrifuge	VWR Micro Star 17R	VWR International GmbH	Darmstadt, D

3.1.6 Verbrauchsmaterial Molekularbiologie

Tabelle 6: Verbrauchsmaterial für Molekularbiologie

Arbeitsschritt	Produktbezeichnung	Firma	Firmensitz
RNA Extraktion	70 % Ethanol		
RNA Extraktion	Buffer RPE Wash buffer	Qiagen GmbH	Hilden, D
RNA Extraktion	Buffer RWT Wash buffer	Qiagen GmbH	Hilden, D
RNA Extraktion	Chloroform		
RNA Extraktion	Collection Tubes (1,5 ml; 2 ml)	Qiagen GmbH	Hilden, D
RNA Extraktion	gDNA Eliminator Solution	Qiagen GmbH	Hilden, D
RNA Extraktion	Metallkugel		
RNA Extraktion	QIAzol Lysis Reagent	Qiagen GmbH	Maryland, US
RNA Extraktion	RNase-freies Wasser	Qiagen GmbH	Hilden, D
RNA Extraktion	Rneasy Mini Spin Column	Qiagen GmbH	Hilden, D
RNA Extraktion	Sterile, Rnase-freie Pipetten Spitzen		
RNA Extraktion	Trockeneis		
Erstellung cDNA Datenbank	gDNA Wipeout Buffer	Qiagen GmbH	Hilden, D
Erstellung cDNA Datenbank	Quantiscript Reverse Transcriptase	Qiagen GmbH	Hilden, D
Erstellung cDNA Datenbank	Quantiscript RT Buffer	Qiagen GmbH	Hilden, D
Erstellung cDNA Datenbank	RNase-freies Wasser	Qiagen GmbH	Hilden, D

Erstellung cDNA

Datenbank	RT Primer Mix	Qiagen GmbH	Hilden, D
Quantifizierung qt-PCR	Absolute Blue QPCR Mix, SYBR Green	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
Quantifizierung qt-PCR	MgCl ₂	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
Quantifizierung qt-PCR	Primer	Eurofins Genomics	Ebersberg, D
Quantifizierung qt-PCR	ROX Reference Dye	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US

3.1.7 Verbrauchsmaterial Immunassay

Tabelle 7: Verbrauchsmaterial für Immunassay

Arbeitsschritt	Produktbezeichnung	Firma	Firmensitz
Immunassay	Diluted Wash Buffer	R&D Systems, INC.	Minneapolis, US
Immunassay	Stop Solution	R&D Systems, INC.	Minneapolis, US
Immunassay	Calibrator Diluent RD5T	R&D Systems, INC.	Minneapolis, US
Immunassay	Calibrator Diluent RD6-32	R&D Systems, INC.	Minneapolis, US
Immunassay	Assay Diluent RD1-63	R&D Systems, INC.	Minneapolis, US
Immunassay	Conjugate	R&D Systems, INC.	Minneapolis, US
Immunassay	Unmixed Color Reagent A	R&D Systems, INC.	Minneapolis, US
Immunassay	Unmixed Color Reagent B	R&D Systems, INC.	Minneapolis, US
Immunassay	Porcine IL-6 Standard (2500 pg/ml)	R&D Systems, INC.	Minneapolis, US
Immunassay	Porcin IL-6 Control	R&D Systems, INC.	Minneapolis, US
Immunassay	Porcine TNF- α Standard (1500 pg/ml)	R&D Systems, INC.	Minneapolis, US
Immunassay	Porcine TNF- α Control	R&D Systems, INC.	Minneapolis, US
Immunassay	Microplate Wells	R&D Systems, INC.	Minneapolis, US

3.1.8 Software

Tabelle 8: Software

Produkttyp	Softwarebezeichnung	Firma	Firmensitz
Biologische Bildanalyse	Fiji 2.3.0	Image J (NIH)	Bethesda, US
Herkunftssicherungs- und Informationssystem für Tiere	hi-tier.de	Bayerisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten	München, D
Bildbearbeitungssoftware	Photoshop Lightroom 6.14 und 13.0.1	Adobe Systems Incorporated	San José, US
Literaturverwaltungsprogramm	EndNote 20	Clarivate	Philadelphia, US
MIGET-Software	MIMIS control software (mod. Version 1.02)	Oscillogy LLC	Folsom, US
Mikroskop Bildsoftware	cellSens Entry 2.1	Olympus Corporation	Tokyo, Japan
Sauerstoffpartialdruckdokumentation	NeoFox Viewer	Ocean Insight	Largo, US
Statistikprogramm	R 4.3.2	R-Foundation	Wien, Österreich
Statistikprogramm	SPSS Statistics 27.0.1	IBM	Armonk, US
Tabellenkalkulationsprogramm	Excel	Microsoft Corporation	Remond, US
Textbearbeitungsprogramm	Word	Microsoft Corporation	Remond, US
Vitalparameterdokumentation	LabChart	ADInstruments	Dunedin, Neuseeland
Vitalparameterdokumentation	S/5 Collect	Datex-Ohmeda GmbH	Duisburg, D

3.2 Versuchsdurchführung

Alle Versuche wurden im Labor für Experimentelle Intensivmedizin der Klinik für Anästhesiologie (Klinikleitung: Univ.-Prof. Dr. C. Werner, Laborleitung: PD Dr. R. Rümmler, PD Dr. A. Ziebart, zuvor Prof. Dr. E. Hartmann) im Gebäude 911 der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

3.2.1 Versuchstiere

Das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz genehmigte die Versuche unter der Tierversuchsnummer G 16-1-042. Die Fallzahlplanung erfolgte empirisch auf der Basis der Vorgängerstudie. Als Versuchstiere wurden 72 deutsche Landrassenschweine (*sus scrofa domestica*) von einem lokalen Züchter (Lindenhof Eisenmenger) verwendet. Es handelte sich um 62 männliche und 9 weibliche Tiere, bei einem Tier war das Geschlecht nicht dokumentiert. Die für die neuropathologische Auswertung verwendeten Tiere waren männlich mit Ausnahme von Tier 55 (IPPV 4) und Tier 56 (Sham). Die Tiere waren 12-16 Wochen alt und hatten ein Gewicht von 26-37 kg.

3.2.2 Tiervorbereitung

Im Folgenden soll die Vorbereitung des Tieres vor dem Auslösen eines Kammerflimmerns (ventricular fibrillation, VF) beschrieben werden, welche in der Arbeitsgruppe des Verfassers bereits etabliert ist. (21, 208, 209) Nach intramuskulärer Injektion von 10 mg Midazolam (Hameln Pharmaceuticals GmbH Hameln, Deutschland (D)), 50 mg Ketamin (Hameln Pharmaceuticals GmbH Hameln, D) und 80 mg Azaperon (Lilly Deutschland GmbH Bad Homburg, D) zur Sedierung und Stressabschirmung der Tiere erfolgte der Transport durch den Züchter am Morgen des jeweiligen Versuchstages in das Labor. Dort angekommen erfolgte die Anlage einer peripheren Venenverweilkanüle (B. Braun Melsungen AG Melsungen, D) am Ohr des Tieres. Über diese wurde die Narkose mit 4 µg/kgKG (Mikrogramm/Kilogramm Körpergewicht) Fentanyl (Janssen-Cilag GmbH Neuss, D), 4 mg/kgKG Propofol (Fresenius Kabi Deutschland GmbH Bad Homburg, D) und 0,5 mg/kgKG Atracurium (Hikma Pharma GmbH Martinsried, D) eingeleitet. Die Überwachung wurde mittels Pulsoxymetrie (Masimo Radical 7, Masimo Corporation Irvine, US) und Überwachungsmonitor (S5 mit S/5 Collect Software, Datex Ohmeda GmbH Duisburg, D) sichergestellt. Das Tier wurde zunächst über 2-3 Minuten mittels Beatmungsmaske mit einer inspiratorischen Sauerstofffraktion (fraction of inspired oxygen, FiO_2) von 1,0 einer RR von 30/min, einem PEEP von 5 mmHg, einem I:E von 1:2, einem Spitzendruck (pressure maximum, P_{Max}) von 40 mmHg und einem V_t von 6-8 ml/kgKG mittels Beatmungsgerät (Engström Carestation, General Electrics Frankfurt a.M., D) präoxygeniert. Im Anschluss

wurde das Tier konventionell mit Laryngoskop oder mit Hilfe einer Fiberoptik (aScope 4 Broncho Regular, Ambu GmbH Bad Nauheim, D) endotracheal intubiert. (210) Der Intubationserfolg wurde mittels Auskultation und Kapnographie sichergestellt und die FiO_2 auf 0,4 reduziert. Die RR wurde anhand des endexpiratorisch gemessenen Kohlenstoffdioxid (etCO_2) mit einem Zielwert von 35-45 mmHg angepasst. Über die Venenverweilkanüle am Ohr wurde eine kontinuierliche Narkose mittels zwei Perfusoren (Perfusor fm, B. Braun Melsungen AG Melsungen, D) appliziert. Hierfür wurden Propofol in 2%-Lösung und Fentanyl verwendet. Nach Anlage einer peripheren Venenverweilkanüle in die Vena epigastrica caudalis superficialis wurde die Narkose über diese weiter verabreicht. Eine Sterofundininfusion (5 ml/kgKG; B.Braun Melsungen AG Melsungen, D) wurde vor Intervention mit 150 ml/h infundiert und zusätzlich ein Sterofundinbolus (30 ml/kgKG) verabreicht. Ultraschallgesteuert (Micro Maxx Ultrasound System mit MicroMaxx HFL38/13-6 MHz Fujifilm Sonosite Bothell, US) wurden sterile Katheter in Seldingertechnik in die Femoralisgefäße platziert:

- Arteria femoralis links: 5 French Schleuse (Radifocus Introducer Schleuse Fr. 5/6/7/8, 10 cm Terumo International Systems Shibuya, Japan) und arterielle Blutdruckmessung, Temperatursonde PiCCO-System (Pulse Contour Cardiac Output; Picco Monitoring Kit, Pulsion Medical Systems München, D)
- Vena femoralis links: 7 French Schleuse und Swan-Ganz-Katheter (Pulmonalarterien (PA)-Katheter; PA-Katheter Swan Ganz 7,5 Fr 110 cm, Edwards Lifesciences Corporation Irvine, US) mit Messung des zentralvenösen Drucks (ZVD) und PiCCO-System (Injektionstemperaturmessung)
- Arteria femoralis rechts: 5 French Schleuse und intravasale O_2 -Partialdruckmessung Fluorometer (NeoFox-GT Ocean Insight Largo, US)
- Vena femoralis rechts: 8-9 French Schleuse (Percutaneous sheath introducer set 8,5/9 Fr Arrow International Cleveland, US) und Stimulationskatheter (VascoStim B 2/5F, Vascomed Binzen, D)

Das PiCCO-System dient dem erweiterten hämodynamischen Monitoring. Es kombiniert transkardiopulmonale Thermodilution und Pulsconturenanalyse. Zunächst wird ein 10 ml Bolus einer auf 4 Grad Celsius ($^{\circ}\text{C}$) gekühlten 0,9 % Kochsalzlösung (B.Braun Melsungen AG Melsungen, D) über die am zentralvenösen Katheter konnektierte Injektionskomponente injiziert. Die Temperaturveränderung über die Zeit wird über die arterielle Sonde detektiert. Der Vorgang wird zur Bildung eines Mittelwerts dreimal wiederholt. Hierdurch wird die Sonde für die kontinuierliche Pulsconturenanalyse kalibriert und zum Messzeitpunkt das

Herzzeitvolumen (HZV), das extrazelluläre Lungenwasser und der globale enddiastolische Volumenindex bestimmt. (211)

Ein PA-Katheter dient ebenfalls dem erweiterten hämodynamischen Monitoring. Der Katheter wird venös zum Herzen vorgeschoben und durch das rechte Herz bis in die Arteria pulmonalis eingeschwenkt. Hierdurch kann u. a. der pulmonal arterielle Druck am distalen Ende des Katheters oder der ZVD am proximalen Ende gemessen werden. Weiterhin kann über Blutentnahmen die zentralvenöse Sättigung bestimmt werden. (212, 213) Der PA-Katheter wurde monitorgestützt in die Arteria pulmonalis oder alternativ (bei fehlendem Erfolg der Platzierung in der Arteria pulmonalis) in den rechten Ventrikel vorgeschoben, um bei den folgenden Messungen gemischt-venöses Blut entnehmen zu können.

Die intravasale O₂-Partialdruckmessung erfolgte mittels Fluorometer. Unter Verwendung von LED-Licht und Photodioden-Detektion kann dabei der O₂-Partialdruck in Echtzeit gemessen werden. (214)

Die zerebrale Sauerstoffsättigung wurde kontinuierlich mittels Nahinfrarot-Spektroskopie (NIRS; InVivo 5100C Oximeter cerebral/somatic Medtronic Minneapolis, US) gemessen. Nach Rasur wurden die Nahinfrarot-Licht-Elektroden (INVOS Cerebral/Somatic Oximetry Adult Sensor, Medtronic Minneapolis, US) auf dem frontalen Schädel platziert. NIRS wird zur nicht-invasiven Messung der zerebralen, regionalen Sauerstoffsättigung eingesetzt. NIRS beruht dabei wie die Messung der peripheren Sauerstoffsättigung auf dem photometrischen Prinzip, benötigt allerdings keinen pulsatilen Blutfluss. Somit eignet es sich auch zum Einsatz unter CPR. Im Wellenlängenbereich von 700 bis 1300 Nanometer (nm) können Lichtstrahlen effektiv durch biologisches Material transmittiert werden. (215) Der Anteil des venösen Blutvolumens am zerebralen Blutvolumen wird mit 70-80 % angegeben, sodass NIRS hauptsächlich venöses Blut erfasst (Abb. 5). (216)

Die Defibrillations-Elektroden (Corpatch Easy GS, Elektromedizinische Geräte G. Stemple Kaufering, D) wurden nach einer Rasur in anterior-posterior Position geklebt. Zur besseren Fixierung des Tiers unterhalb des Druckstempels des mCPR (LUCAS 2 Physio-Control Redmond, US) wurde das Tier in einer Vakuummatratze in Rückenlage immobilisiert. Zur Erhöhung der Vergleichbarkeit der Ausgangssituation wurde ein Rekrutierungs-Manöver der Lunge durchgeführt. Hierzu wurde der PEEP für 30 Sekunden auf 15 mmHg erhöht und dann über 30 Sekunden schrittweise auf 5 mmHg reduziert. Eine durchgängige Überwachung war mittels Pulsoxymetrie, Kapnographie, invasivem Monitoring und NIRS gewährleistet. Zudem erfolgte eine kontinuierliche Temperaturüberwachung mittels der Temperatursonde des

PiCCO-Systems. Bei Abfall der Körpertemperatur unter 37 °C wurde das Tier mittels Wärmendecke gewärmt.

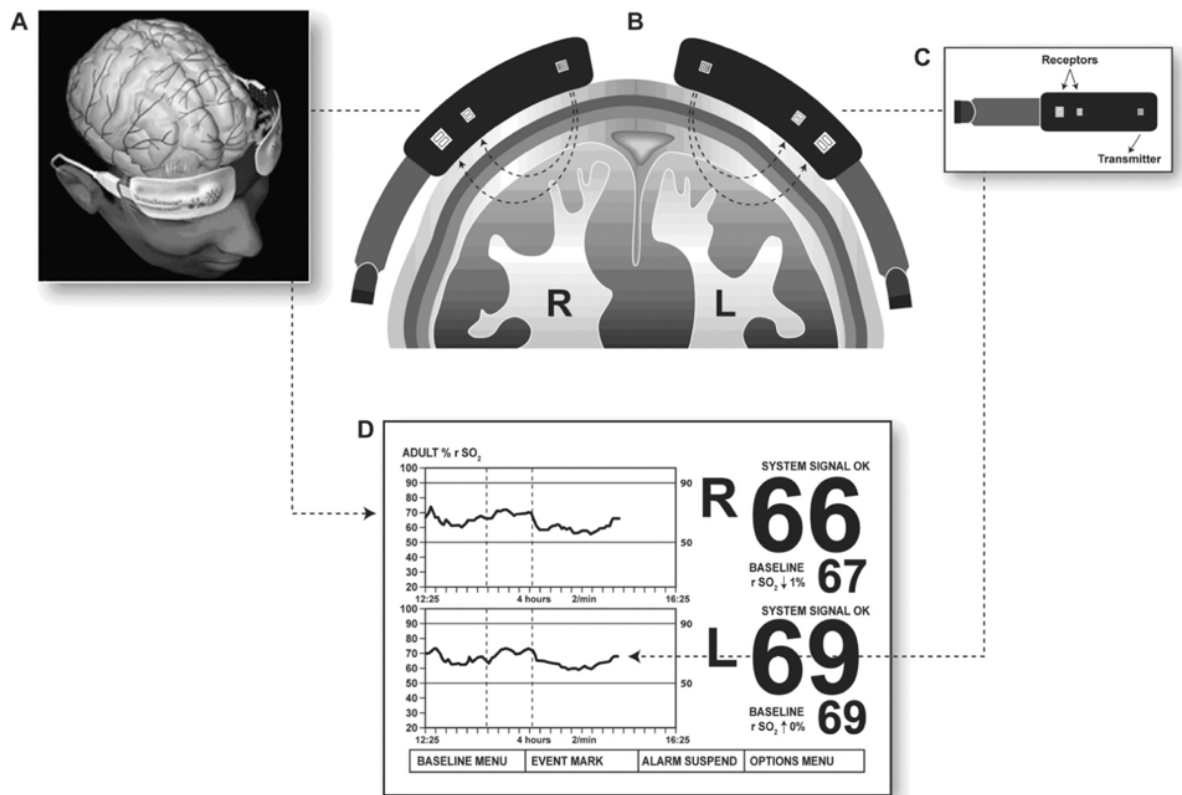


Abbildung 5: Darstellung der NIRS-Ableitung

(A) Elektrodenpositionierung beim Menschen (B) Signalableitungen beider Hemisphären (C) Das Signal des proximalen Rezeptors wird von dem des distalen subtrahiert. Somit werden lediglich Informationen tieferer Hirnareale dargestellt. (D) Displays: Große Zahlen stellen die aktuelle zerebrale Sauerstoffsättigung dar, kleine Zahlen die zu Beginn festgehaltene Baseline-Messung jeweils für die rechte (R) und linke (L) Hemisphäre. (217)

In Abb. 6 ist der Versuchsablauf als Übersicht dargestellt. Die Tiere wurden randomisiert einer der 5 Gruppen zugeordnet: IPPV 4 (10 Tiere), IPPV 8 (14 Tiere), ULTVV 4 (11 Tiere), ULTVV 8 (11 Tiere), Sham (5 Tiere).

- IPPV 4: 4 Minuten No-Flow-Time, dann IPPV
- IPPV 8: 8 Minuten No-Flow-Time, dann IPPV
- ULTVV 4: 4 Minuten No-Flow-Time, dann ULTVV
- ULTVV 8: 8 Minuten No-Flow-Time, dann ULTVV
- Sham: Kontrollgruppe ohne Intervention

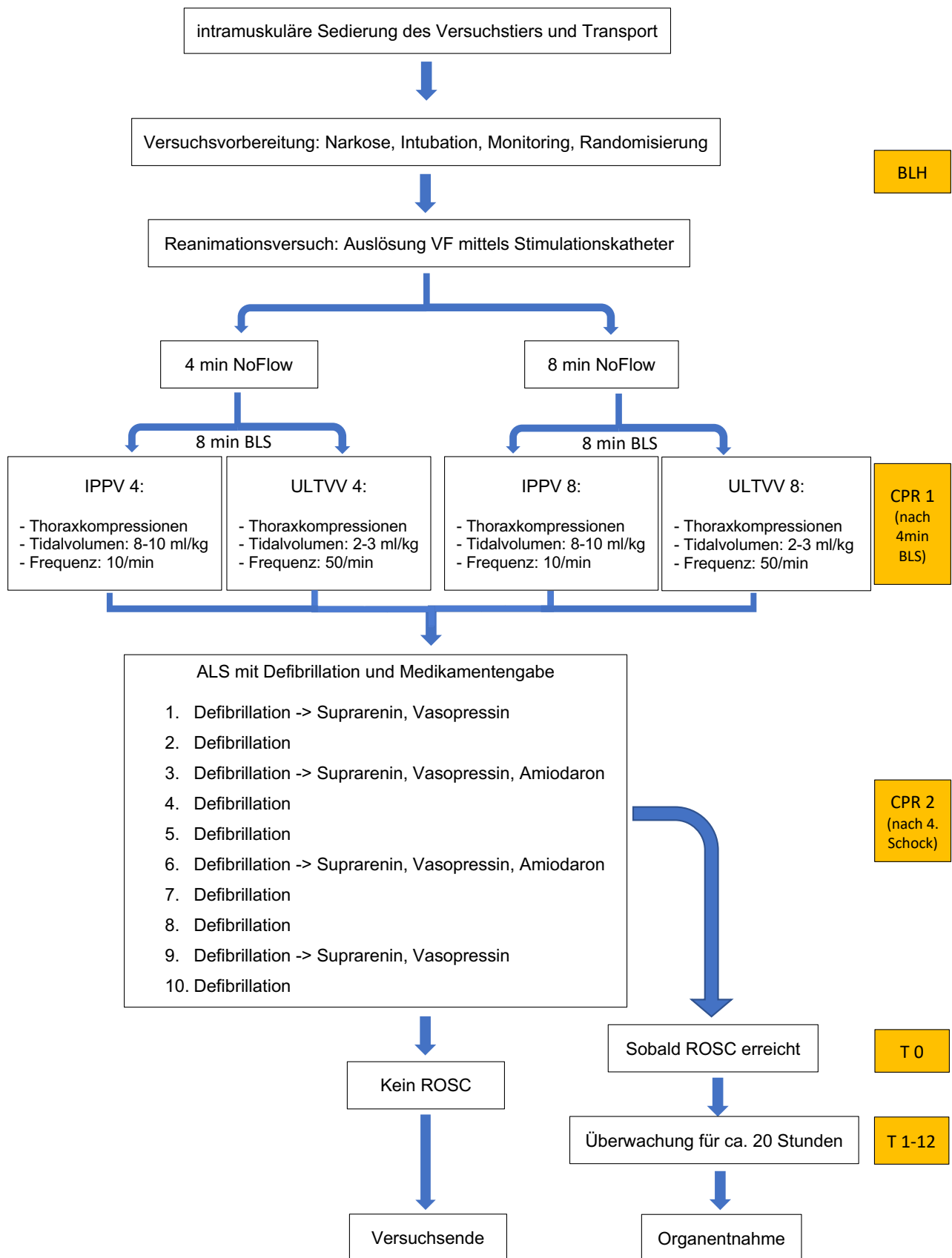


Abbildung 6: Übersicht Versuchsablauf

3.2.3 Reanimationsversuch

Vor Beginn der Intervention wurde das Tier erneut mit 0,8 mg/kgKG Atracurium relaxiert. Über die Gefäßschleuse in der rechten Arteria femoralis wurde ein Stimulationskatheter intravasal

platziert und unter Abgabe von Wechselstrom mit ca. 100 Hertz bis zum rechten Vorhof vorgeschoben. Bei Einsetzen des provozierten VF wurde die Beatmung getrennt und es folgte je nach Versuchsgruppe eine vier- bzw. achtminütige No-Flow-Zeit ohne jegliche Manipulation am Tier (keine Beatmung, keine Thoraxkompression, keine Medikamentengabe). Anschließend wurde mit der CPR gemäß Leitlinien des ERC 2015 (63) begonnen. Zunächst wurde ein achtminütiger BLS mit Thoraxkompressionen und Beatmung durchgeführt. Die Thoraxkompressionen wurden automatisiert und kontinuierlich durch die mCPR mit einer Frequenz von 100 ± 2 Kompressionen/min und einer Tiefe von 40 bis 53 mm durchgeführt. Die maschinelle Beatmung erfolgte mit einem P_{Max} von 40mmHg, einem FiO₂ von 1,0 und einem I:E von 1:1. Je nach Versuchsgruppe wurden außerdem folgende Parameter gewählt:

IPPV: V_t von 8-10 ml/kgKG, RR von 10/min

ULTVV: V_t von 2-3 ml/kgKG, RR von 50/min

Nach achtminütiger BLS-Phase wurden die Maßnahmen gemäß ALS erweitert. In einem zweiminütigen Intervall erfolgten Rhythmusanalyse und bei VF oder pulsloser ventrikulärer Tachykardie eine Schockabgabe mit 200 Joule (Corpuls C3, GS Elektromedizinische Geräte G. Stemple Kaufering, D). Nach der ersten, dritten, sechsten und neunten Defibrillation wurden je 10 µg/kgKG (1 mg) Epinephrin (Suprarenin 1 mg/ml, Sanofi-Aventis GmbH Frankfurt a.M., D) und 15 Internationale Einheiten (IE) Vasopressin (Pitressin Injection 20 I.E./ml, Pfizer Inc. New York City, US) appliziert. Nach der dritten und sechsten Defibrillation wurden je 5 mg/kgKG (150 mg) Amiodaron (Amiodaron HCL 150 mg/ml Hikma Pharma GmbH Martinsried, D) appliziert. Bei Erreichen eines ROSC wurden die CPR-Maßnahmen beendet und der Zeitpunkt des ROSC festgelegt. Wurde nach zehn Defibrillationen kein ROSC erreicht, galt der Versuch als beendet und das Tier wurde aus der Studie ausgeschlossen.

3.2.4 Überwachungsphase

Mit Erreichen des ROSC begann die ca. 20-stündige Überwachungsphase. Die Beatmung wurde auf die Einstellungen vor CPR geändert. PEEP und FiO₂ wurden gemäß der ARDS-Network-Tabelle (218) nach Messung des paO₂ angepasst. Die RR wurde anhand des paCO₂ gesteuert und ein physiologischer Zielwert im Bereich 35-45 mmHg angestrebt. Des Weiteren erfolgte eine kontinuierliche Infusion von Sterofundin (3 ml/kgKG/h) und ein Sterofundinbolus (30 ml/kgKG) nach Erreichen des ROSC. Bei einem mittleren arteriellen Druck < 60 mmHg erfolgte eine Katecholamintherapie mit Noradrenalin (Arterenol 5 mg/50 ml Sanofi-Aventis GmbH Frankfurt a.M., D) zum Erreichen eines Ziel-Mitteldrucks > 60 mmHg. Bei Anzeichen eines Volumenmangels (persistierend niedriger Blutdruck, erhöhte Pulswellendifferenz, PiCCO-Messung) wurde 250 ml Sterofundin verabreicht. Im Falle des

Auftretens von Fieber ($> 39,9\text{ °C}$) wurden kühlende Maßnahmen (kalte Infusion, Kühlung mit Eis) vorgenommen. Bei therapierefraktärer Instabilität wurde der Versuch in Absprache mit dem Versuchsleiter beendet und das Versuchstier ausgeschlossen. Weiterhin wurde das Versuchstier während des gesamten Versuchs klinisch überwacht und bei Anzeichen einer unzureichenden Narkose (z. B. einzelne kurze Bewegungen) wurde die Narkose vertieft. Bei starker Füllung der Harnblase wurde ultraschallgesteuert ein suprapubischer Blasenkatheter etabliert. Die Gesamtausfuhr wurde dokumentiert und vor Organentnahme eine Probe des Sammelurins zur Messung des Kreatinins bzw. der Kreatinin-Clearance abgenommen.

3.2.5 Messzeitpunkte

Während des gesamten Versuchs erfolgte ein kontinuierliches Monitoring und die digitale Dokumentation (LabChart, ADInstruments Dunedin, Neuseeland) der folgenden Vitalparameter: Herzfrequenz (HF), Arterieller Blutdruck, ZVD, partielle Sauerstoffsättigung (SpO_2), Temperatur, Beatmungsparameter inkl. Kapnographie.

Zusätzlich wurden vor Beginn der CPR (baseline healthy, BLH), nach Erreichen des ROSC (Messzeitpunkt 0 (T_0)), im Anschluss stündlich (T_1 - T_8) und später alle 3 h (T_9 - T_{12}) folgenden Messungen durchgeführt:

- HZV und hämodynamisches Monitoring
- Venöse und arterielle BGA
- Dokumentation aller Laufraten der Medikamente
- Blutentnahme (BLH, T_0 , T_5 , T_{12}): eine Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Monovette und 2 Serum-Monovetten (Monovette Serum Gel/Li-Hep-Gel/EDTA-K/ Luer-Lock-Adapter, Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, D)
- Multiple Inertgas-Eliminationstechnik (MIGET) (BLH, T_0 , T_5 , T_{12}) nach Gabe eines Bolus von 5000 IE Heparin

Bei der MIGET (Oscilyogy LCC Oscilyogy Folsom P.A., United States of America (US) handelt es sich um ein Verfahren zur Bestimmung des Ventilations-Perfusionsverhältnisses. Hierfür wird ein Gasgemisch mit sechs inerten (in Blut und Ausatemluft unveränderten) Gasen (siehe Medikamentenliste 3.1.3) verabreicht, welche in der Lunge eliminiert oder in der Blutbahn zurückgehalten werden. Durch Messung der Konzentrationsdifferenz zwischen arteriellen und venösen Blutproben kann auf das Ventilations-Perfusionsverhältnis geschlossen werden. (219)

Eine Serum-Monovette wurde nach zehnminütiger Ruhephase für zehn Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute (U/min) zentrifugiert, das Serum abpipettiert und bei -20 °C

zur Lagerung eingefroren. Die zweite Serum- sowie die EDTA-Monovetten wurden zur Labordiagnostik im Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz genutzt. Hier wurden ein kleines Blutbild, Kreatinin, Harnstoff, Glutamat-Pyruvat-Transaminase und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase bestimmt. Die Messung der Ventilations-Perfusionsverhältnisse der Lunge erfolgte mittels MIGET. (219) Hierzu wurde die MIGET-Infusion mit 240 ml/h mittels Infusomat (Volumed 5000 Diabolo Fresenius Kabi AG Bad Homburg, D) kontinuierlich appliziert und nach Infusion von mindestens 3 ml/kgKG die Messung begonnen. Während der CPR wurden beim Messpunkt CPR 1 (4 Minuten nach Beginn BLS) eine MIGET-Messung und eine venöse und arterielle BGA abgenommen. Beim Messpunkt CPR 2 (nach dem vierten Schock) erfolgte zudem eine arterielle BGA.

3.2.6 Versuchsabschluss und Organentnahme

Am Ende der Überwachungsphase erfolgte die Bauchlagerung des Versuchstiers. Unter weiterhin adäquater Narkosetiefe erfolgte zur Vorbereitung einer Kraniotomie zunächst ein Hautschnitt über dem frontalen Kranium. Im Anschluss erfolgte die intravenöse Gabe einer letalen Dosis Kalium (20-40 ml, 1 M Kaliumchlorid Lösung 7,46 % 20 ml, B.Braun Melsungen AG Melsungen, D) und die parallel durchgeführte Kraniotomie. Hierdurch konnte die zerebrale Hypoxiezeit kurzgehalten und gleichzeitig unnötiger Stress für das Versuchstier verhindert werden. Unmittelbar nach Kraniotomie erfolgte die Gehirnentnahme. Im Anschluss wurde die linke Hemisphäre in Formalin (Roti-Histofix 4 %, Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, D) für die spätere histologische Untersuchung konserviert. Aus der rechten Hemisphäre wurden jeweils drei Proben (ca. 2 x 2 x 2 mm) aus HC und frontalem Kortex für molekularbiologische Untersuchungen präpariert sowie je eine Probe (ca. 5 x 5 x 5 mm) als Backup für ggf. weitere histologische Untersuchungen entnommen. Die Probengefäße wurden vor der definitiven Lagerung für die weitere Diagnostik in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Parallel zur Präparation des Gehirns wurde das Tier erneut auf den Rücken gedreht und es erfolgte die Organentnahme von Lunge, Leber und Niere. Die Untersuchungen dieser Organe und dazugehörigen Versuchsparameter sind Bestandteil der Dissertationsschriften von Kolleg*innen der Arbeitsgruppe (Victoria Buschmann, Philipp Conzelmann, Thomas Baller) und wurden bereits publiziert. (220-224)

Nach Abschluss der Organentnahme sowie nach einem vorzeitigen Versuchsende wurde der Tierkadaver gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 sowie des Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsgesetzes durch eine externe Firma entsorgt.

3.3 Histologische Aufarbeitung

3.3.1 Probenzuschnitt

Die linke Gehirnhemisphäre wurde zur gleichmäßigen Aufnahme des Formalins in das Gewebe für mindestens zwei Monate zur Fixation in Formalin 4 % gelagert. Im Anschluss erfolgte die Vorbereitung auf die histologischen Untersuchungen. Hierfür erfolgte zunächst gemäß des im Labor bisher durchgeführten Verfahrens der Grobschnitt des HC und Frontalkortex in 2-3 mm dicke Blöcke. Der Grobschnitt wurde parietal um ca. 30° nach rostral angewinkelt durchgeführt. Das Institut für Neuropathologie der Universitätsmedizin Mainz (Leitung Univ.-Prof. Dr. C. Sommer) übernahm die Paraffineinbettung der Blockschnitte, den Feinschnitt und die Färbungen mit Hämatoxylin-Eosin (HE) und Nissl. Nachdem in der mikroskopischen Auswertung eine große Varianz des Anschnitts des HC auffiel, erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Neuropathologie der Universitätsmedizin Mainz eine Korrektur der Schnitttechnik. Das zwischenzeitlich weiterhin in Formalin 4 % gelagerte Gehirngewebe wurde dann senkrecht zur Forel-Achse geschnitten. Der Schnitt erfolgte durch den Temporallappen auf Höhe des ersten Sulcus, welcher okzipital des Sulcus centralis gelegen ist. Dies entsprach der Ebene A2.00 mm des stereotaktischen Atlas des Schweinehirns. (225) Der in der gleichen Schnittebene gelegene Kortex wurde ebenfalls mitbeurteilt. Die neue Schnittserie wurde durch das Institut für Neuropathologie gleichermaßen weiterbearbeitet.

Zuvor wurden durch das Institut für Neuropathologie institutseigene Versuchsternummern erstellt und diese den Labornummern zufällig zugeordnet, sodass für die folgenden Untersuchenden eine Verblindung entstand. Im Rahmen der oben genannten Fehlerbehebung erfolgte einmalig eine zwischenzeitliche Entblindung. Die weitere Bearbeitung der Schnitte erfolgte wieder verblindet anhand der Labornummern.

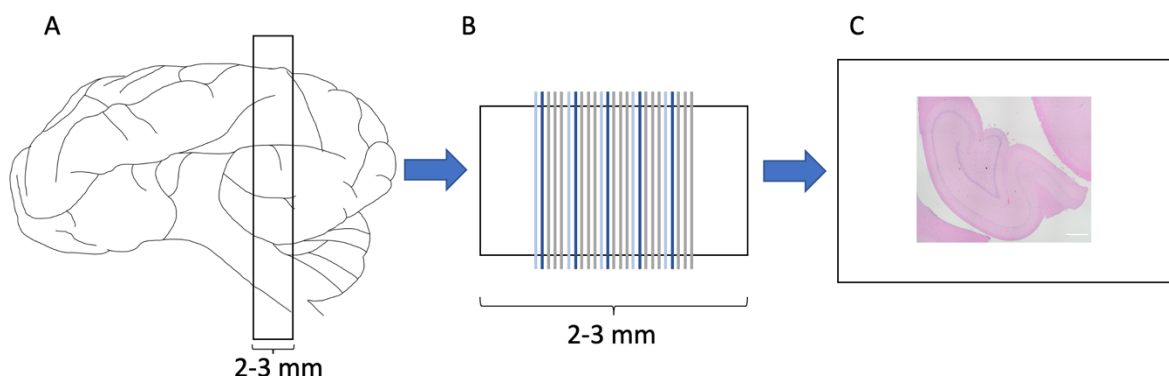


Abbildung 7: Schematische Darstellung Zuschnitt Histologie Hippocampus

A) Zuschnitt der linken Hemisphäre B) Feinschnitt des Paraffinblocks und Färbung: Hämatoxylin-Eosin (hellblau), Nissl (dunkelblau), Leerschnitt 1,2,3 (grau) C) Objektträger mit Feinschnitt

3.3.2 Probeneinbettung, Feinschnitt und Färbung

Durch eine*n Mitarbeiter*in des Instituts für Neuropathologie erfolgte die weitere Verarbeitung der Blockschnitte. Über Nacht wurde das Gewebe automatisiert mithilfe eines Vakuuminfiltrationsprozessors (Tissue-Tek VIP 6, Sakura Finetek Europe B.V. Alphen, Niederlande) mit Paraffin durchtränkt. Anschließend erfolgte das Ausblocken am Paraffin-Arbeitsplatz (Tissue-Tek TEC 5, Sakura Finetek Europe B.V. Alphen, Niederlande). Nach Härtung des Paraffins erfolgte der Feinschnitt mithilfe des automatischen Mikrotoms (HM 355S, Expredia Essendonk, Niederlande). Hierbei wurde zunächst überstehendes Paraffin scheibenweise entfernt, bis das Gehirngewebe gleichmäßig mit einer geraden Schnittkante frei lag. Anschließend erfolgte der Feinschnitt. Es wurden 25 je 3-4 µm dicke Schnitte erstellt. Diese wurden jeweils wenige Sekunden zunächst in einem kalten Wasserbad (Raumtemperatur) und anschließend wenige Sekunden in einem warmen Histologie-Wasserbad (48 °C) geglättet. Anschließend wurde der Feinschnitt auf einen Objektträger aufgezogen und mittels Deckglas eingedeckt. Danach erfolgte die Trocknung der Objektträger im Wärmeschrank bei 70 °C für 15 Minuten. Die Objektträger wurden anschließend nach dem Schema HE und Nissl gefärbt, gefolgt von drei Leerschnitten. Diese Serie wurde fünfmal wiederholt. (Abb. 7) Am häufigsten wird in Studien zur Bewertung von HIBI eine HE- und alternativ eine Nissl-Färbung verwendet. Teilweise werden zusätzlich z. B. immunhistologische Färbungen wie ionisiertes Calcium-bindendes Adaptermolekül 1 verwendet. (173, 226-228) Da in der vorliegenden Studie der Fokus auf der Erstellung eines allgemein einfach anzuwendenden histopathologischen Scores lag, wurde als primäre Färbung HE gewählt. Die Leerschnitte dienten für möglicherweise weitere benötigte Färbungen. Die Färbungen der Feinschnitte wurden durch das Institut für Neuropathologie nach einem etablierten Protokoll durchgeführt (Anhang 8.1, 8.2).

3.3.3 Histopathologische Auswertung

Für die histologische Auswertung wurde ein Olympus Mikroskop mit Kamera (CX 43RF mit SC50, Olympus Corporation Tokyo, Japan) in einer Dunkelkammer zur besseren Kontrastierung verwendet. Es erfolgte die mikroskopische Darstellung der zu untersuchenden HC- und Kortexregionen. Hierbei wurde immer unter gleichen Belichtungseinstellungen mikroskopiert (Filter BF; 2/3 Belichtung; Blende 1,25; Belichtung manuell 1,097 ms). Für die weitere Auswertung wurden mittels Olympus cellSens Entry 2.1 Software digitale Aufnahmen mit 200-facher Vergrößerung von den Zielregionen eines jeden Schnittes zur Auswertung und Archivierung angefertigt. Die Bilder hatten eine Größe von 2560 x 1920 Pixel (558,95 x 419,21 µm). Im Anschluss wurden die Neurone mittels der Software Fiji (Fiji 2.3.0, Image J (NIH) Bethesda, US) (229) anhand des neuropathologischen Scores gezählt.

Im Rahmen der histologischen Auswertung stellt sich die Frage, welche und wie viele Regionen des Gehirns repräsentativ für den gesamten neurologischen Schaden untersucht werden sollten. Der HC gehört allgemein zu den am häufigsten untersuchten Hirnarealen. In einer Studie mit 22 untersuchten Hirnarealen zeigten sich im Kortex, Nucleus caudatus, Putamen, HC, Kleinhirn und Thalamus signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe. (173) Da die anderen Hirnregionen dem HC allerdings in der Detektion von HIBI nicht überlegen waren, scheint eine Beschränkung auf den HC in Kombination mit einer weiteren bekannt vulnerablen Region als ausreichend. Dieser pragmatische Ansatz wird auch in anderen Studien verfolgt. (226) Die Hirnareale DG, CA4, CA3 und Kortex (Kuppe und Tal) lassen sich mikroskopisch gut identifizieren. Schwierigkeiten bestehen bei der genauen Position von CA1 und CA2. Das CA des humanen HC ist im Bereich CA1 deutlich verbreitert, insb. im Vergleich mit dem HC der Maus. (184) Im HC des Schweins lässt sich ebenfalls eine Verbreiterung des CA feststellen. Bisher fand sich keine genaue anatomische Definition der Regionen CA1, CA2 und CA3 im Landrassenschwein. Anhand des Calcium-bindenden Proteins calbindin-D28K like und des Arginin-Vasopressin-Rezeptors 1B konnte die Region CA2 und die Abgrenzung zu CA1 und CA3 im Rahmen des vorliegenden Forschungsprojektes eindeutig definiert werden (Abb. 8). (22)

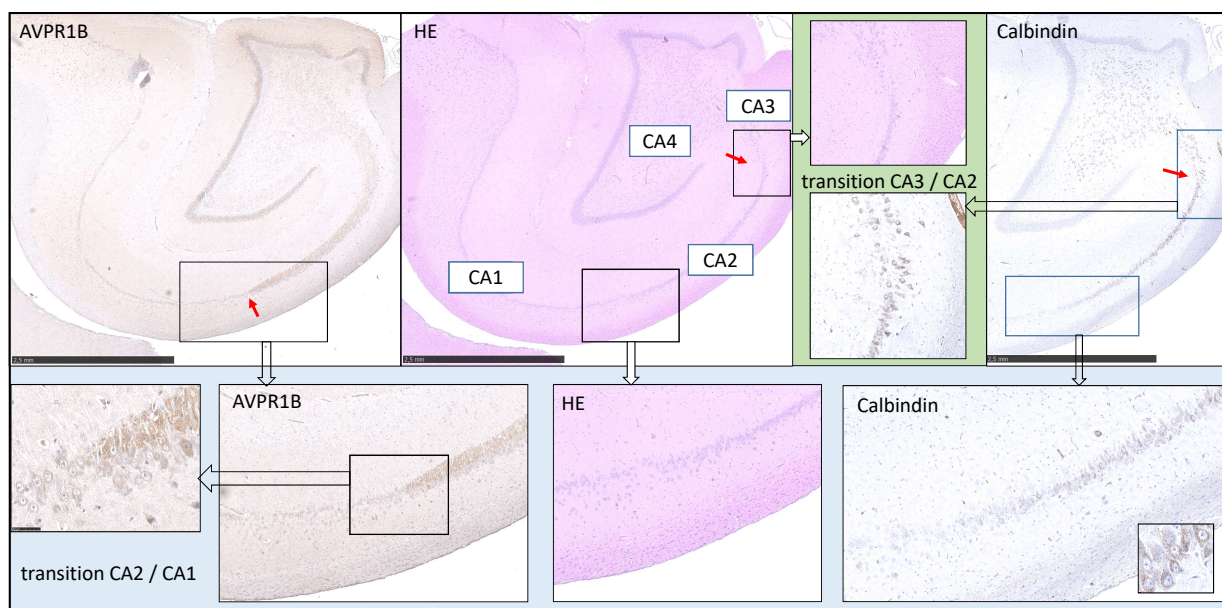


Abbildung 8: Definition der Zonen des Cornu ammonis

Die oberen beiden linken und das obere rechte Bild zeigen den gleichen Abschnitt des Hippocampus. Zur Färbung wurde ein Antikörper gegen AVPR1B (oben links), CaBP-Li (Calbindin; oben rechts) und Hämatoxylin-Eosin (HE; oben mittig links) verwendet. Die Übergangszonen von CA3/CA2 und CA2/CA1 sind vergrößert dargestellt. (22)

In jedem Feinschnitt wurden digitale Aufnahmen der Regionen CA1, CA2, CA3, CA4, DG des HC sowie eine Talaufnahme und eine Kuppenaufnahme des Kortex angefertigt. Pro

Versuchstier und pro Färbung wurden somit regelhaft 30 digitale Aufnahmen angefertigt. Wenn der HC zweimal vollständig im Feinschnitt angeschnitten war, wurden digitale Aufnahmen beider angeschnittenen HC-Anschnitte angefertigt, diese gezählt und für jede Region der Mittelwert gebildet.

3.3.4 Erstellung eines neuropathologischen Scores

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde in einem mehrstufigen Prozess ein neuropathologischer Score erstellt. Nach Einarbeitung in die bisherige Methodik der Arbeitsgruppe erfolgte eine erste Sichtung der mikroskopischen Bilder sowie eine Testzählung. Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Zuordnung einzelner Neurone zu den Kategorien HIBI und Regulär erfolgte eine ausführliche Überarbeitung der Methodik. Nach erneuter, umfassender Literaturrecherche erfolgte die Erstellung des Scores mittels klar definierter Kriterien für die Zuordnung zur Kategorie Regulär, HIBI oder INC. Im Anschluss erfolgte eine stichprobenartige Kontrollzählung durch eine Mitarbeiterin des Instituts für Neuropathologie zur Überprüfung der Anwendbarkeit des Scores und weiteren Überarbeitung der Kriterien. Zur besseren Einordnung von morphologischen Grenzfällen wurden im Konsensverfahren mit dem Institut für Neuropathologie verschiedene Neurone in einer Entscheidungshilfe zur Einordnung von Neuronen zusammengetragen. Die erstellten Kriterien dienten zusammen mit der Entscheidungshilfe als Schulungsgrundlage für die Testzählung.

Zur Validierung der Kriterien wurden zufällig 7 Personen aus der Arbeitsgruppe ausgewählt und in einer gemeinsamen Fortbildung von den 2 Erstellenden des Scores in die Thematik und die Verwendung der Software Fiji eingearbeitet. Bei der Testzählung von 4 Bildern hatten die Untersuchenden die Möglichkeit, Rückfragen zur Anwendung der Kriterien und der Entscheidungshilfe zu stellen. Im Anschluss zählten alle 9 Personen getrennt voneinander jeweils 8 Bilder aus der Region CA, Kortex und DG. Die Ergebnisse wurden separat in einer Tabelle erfasst (Excel, Microsoft Corporation Remond, US). Zur Überprüfung der Intra-Observer-Reliabilität wiederholten 5 zufällig ausgewählte Untersuchende die Zählung nach 3 Monaten.

3.3.5 Kriterien für die Zellzählung

Nach der Fixation und Färbung des Schnitts sollten die Gehirnareale histologisch anhand eines standardisierten Prozesses ausgewertet werden. (230) Hierfür wurden über die Bildausschnitte von CA1, CA2, CA3, DG mit der Software Fiji drei Zählboxen (je 853 x 853 Pixel; 186,24 x 186,24 μm) über das Neuronenband gelegt. Somit wurde pro Bild eine Fläche von 3 x 34.685 μm^2 , insgesamt somit 104.061 μm^2 gezählt. Für Bildausschnitte aus Kortex (Tal und Kuppe) und CA4 wurde der gesamte Bildausschnitt (2560 x 1920 Pixel;

558,95 x 419,21 μm), also eine Gesamtfläche von 234.320,47 μm^2 gezählt. Im Bereich des Kortex und CA4 wurde der gesamte Bildausschnitt gezählt, da hier die Neurone über den gesamten Ausschnitt verteilt sind. Im Bereich CA1, CA2, CA3 und DG wurden nur Neurone des Neuronenbands innerhalb der Zählboxen gezählt. Als Kriterien zum Zählen von Zellen im Verhältnis zur Position im Quadrat bzw. zum Bildrand (CA4, Kortex) wurde festgelegt: (231)

- Kriterien für Zellen, die in die Zählung eingeschlossen werden:
 - o Zellsoma liegt komplett im Quadrat
 - o Zellsoma berührt die obere oder rechte Kante des Quadrates
- Kriterien für Zellen, die NICHT in die Zählung eingeschlossen werden
 - o Zellsoma liegt komplett außerhalb des Quadrates
 - o Zellsoma berührt die untere oder linke Kante des Quadrates

Die Zuordnung der Neurone zu einer Kategorie erfolgte anhand morphologischer Kriterien (Tabelle 9). Nach Validierung des Scores wurden die digitalen Bilder der Zielregionen zur Qualitätssicherung erneut durch den Verfasser dieser Dissertation ausgewertet. Mit der Software Fiji wurden Neurone entsprechend den Kriterien zur Neuronenbewertung markiert und gezählt. Im Anschluss wurden die Werte der einzelnen Feinschnitte pro Tier addiert.

3.3.6 Neuronenbewertung und Cell Counting

Um Neurone morphologisch einer Kategorie zuordnen zu können, sind möglichst präzise Kriterien notwendig. Der Zelltod ist ein umfangreiches Forschungsthema und kann in verschiedenen Formen wie u. a. Apoptose, Nekrose, Autophagie oder Mischformen auftreten. (232, 233) Die verschiedenen Formen können als regulierter Zelltod zusammengefasst werden und ein breites Spektrum an morphologischen und immunmodulatorischen Eigenschaften aufweisen. (234) Eine sterbende Zelle befindet sich in einem reversiblen Prozess, bis mit einer ersten irreversiblen Phase ein Point of no Return überschritten wird. Hierbei werden verschiedene Prozesse wie bspw. eine massive Kaspasen-Aktivierung diskutiert, jedoch fehlt bisher eine allgemeingültige Definition. (234, 235) Das Auftreten von morphologischen Kriterien variiert mit der Schwere von und Dauer nach dem pathologischen Event und kann daher nur unter standardisierten, experimentellen Bedingungen verglichen werden. (227) Zur Auswertung des neurologischen Schadens im experimentellen Setting werden verschiedene Zelltoddefinitionen und verschiedene subjektive oder semiquantitative Scores verwendet. (173, 175, 226, 227, 236, 237) Die Scores wurden allerdings zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach HKS bzw. ROSC angewendet. (173, 226, 238) Ein Score verwendete Cell Counting (CC) zur Ermittlung des Prozentsatzes geschädigter Neurone an der Gesamtzahl der Neurone in demselben Bereich. (175, 238) CC dient aber auch der Angabe gesunder Neurone pro mm^2 pro Region. (226) Wiederum ein anderer

semiquantitativer Score gibt Ödem, eosinophile neuronale Nekrose und Infarkt als neuropathologische Veränderungen an und gewichtet diese anhand eines „weighting factors“. (173)

Im Rahmen dieser Dissertation wird ein Score zur Evaluation der hypoxischen Neuronenschädigung nach HKS und CPR erstellt (Tabelle 9, Abb. 10 + 11), der die Definitionen von Hoque et al. und Stummer et al. als Grundlage verwendet. (226, 239) Die Unterscheidung zwischen regelrechten und HIBI-Neuronen ist nicht immer eindeutig möglich. Manche Neurone erfüllen Kriterien beider Kategorien. Eine Zwischenphase kann als ischämische neuronale Veränderung (ischemic neuronal change, INC) bezeichnet werden. Jedoch ist es unklar, ob diese Neurone reversibel oder irreversibel geschädigt sind. (240)

*Tabelle 9: Morphologische Kriterien zur Neuronenbewertung
(Modifiziert nach 226, 239)*

Kriterien	
Regelrechte Neurone	1) Nukleolus klar abgrenzbar 2) Nukleus klar abgegrenzt, rund/oval <u>und/oder</u> Zytoplasma sichtbar und mit glatter Membran abgrenzbar vom umliegenden Gewebe
HIBI	1) Nukleolus nicht klar abgrenzbar 2) Nukleus <ul style="list-style-type: none"> ○ nicht klar abgrenzbar <u>und/oder</u> <ul style="list-style-type: none"> ○ hyperchromatisch (dunkler als Zytoplasma), pyknotisch (verkleinert) 3) Zytoplasma/Zellgrenze <ul style="list-style-type: none"> ○ verformt: entrundet oder triangulär <u>und/oder</u> <ul style="list-style-type: none"> ○ Hypereosinophil (HE) bzw. erhöhte Basophilie (Nissl) <u>und/oder</u> <ul style="list-style-type: none"> ○ Zellhomogenisierung, verkleinert (Schrumpfungssaum)
INC	Kriterien teils von regelrechten und teils von HIBI-Neuronen erfüllt, sodass keine klare Zuordnung in eine Kategorie mehr möglich ist. Häufig weisen die Neurone Kriterien von HIBI auf, allerdings ist der Nukleolus noch gut abgrenzbar.

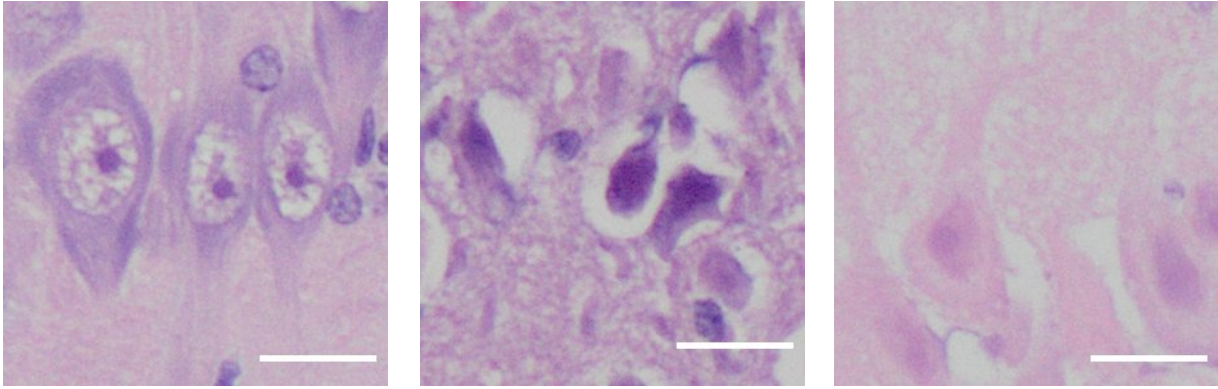


Abbildung 9: Darstellung der Neuronen unterschiedlicher Kategorien in HE-Färbung

A) Reguläre Neurone: Nukleolus, Nukleus und Zytoplasma sind klar abgrenzbar. B) HIBI Neurone: Nukleolus und Nukleus sind nicht klar abgrenzbar, der Nukleus ist hyperchromatisch und teils pyknotisch. Das Zytoplasma ist teils entrundet, hypereosinophil und insgesamt ist eine deutliche Zellhomogenisierung/-verkleinerung mit Schrumpfungssaum erkennbar. C) Links INC Neuron: Der Nukleolus ist zwar zu erahnen, aber nicht mehr eindeutig abgrenzbar. Nukleus und Zytoplasma sind noch abgrenzbar. Rechts HIBI Neuron: Der Nukleolus ist nicht abgrenzbar, der Nukleus ist abgrenzbar, aber hyperchromatisch und pyknotisch. Eine Zellhomogenisierung und ein verkleinertes Zytoplasma mit Schrumpfungssaum sind ebenfalls vorhanden. A-C: Deutlich kleinere Zellen sind Gliazellen. Maßstabsbalken 20 μm .

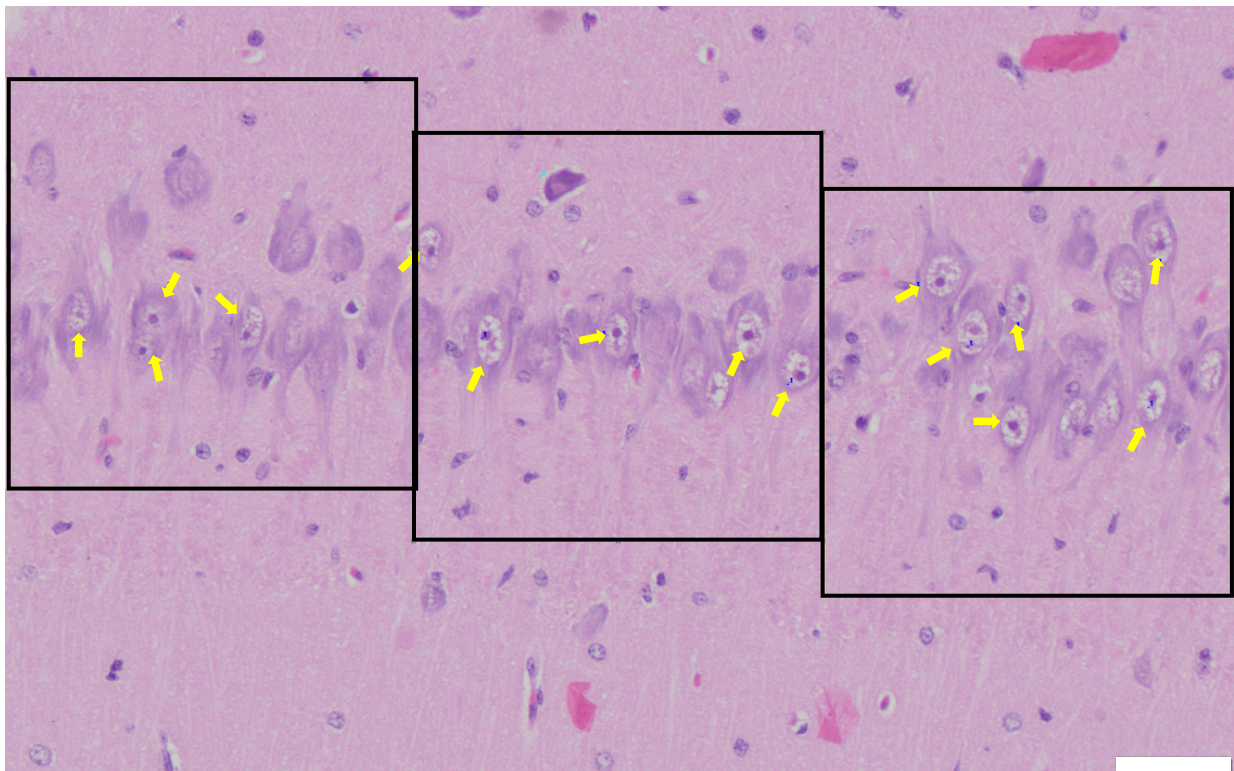


Abbildung 10: Beispielbild CA2 (HE_537.5_CA2)

Darstellung des Neuronenbands im Bereich CA2. Reguläre Neurone sind markiert. Zwischen diesen Neuronen liegen ebenfalls Regulär wirkende Neurone, bei denen der Nukleolus nicht angeschnitten ist und sie deshalb nicht exakt bewertet werden können. Im Bild befinden sich zudem zahlreiche Gliazellen, welche durch ihre geringere Größe von Neuronen unterschieden werden können. Die Zählboxen wurden über das Band gelegt und zur Erfassung möglichst aller Neurone vertikal ausgerichtet. Messbalken = 50 μm .

Zu beachten ist das mögliche Auftreten von „dark neurons“, welche mit HIBI-Neuronen verwechselt werden können. Diese sind basophil (blau) und können aufgrund ihrer Schrumpfung und dunkleren Erscheinung als HIBI-Neurone (hypereosinophil, rot) missinterpretiert werden. (227, 241-245) Andere pathologische Korrelate wie eine Inflammation im umgebenden Gewebe (aktivierte Mikroglia) oder Vakuolisierung des umgebenden Neuropils fehlen bei dark neurons. (245) Als Ursachen dieses Phänomens werden u. a. postmortales Trauma (241, 242) und Depolarisation (246) diskutiert, wobei die genaue Ursache und der Mechanismus bisher unbekannt sind. (227, 245)

Gliazellen wurden von der CC exkludiert. Sie können von Neuronen durch geringere Größe, kleineren Nukleus und kein oder kaum sichtbares Zytoplasma unterschieden werden. (226) Eine detailliertere Definition und einen Algorithmus zur Unterscheidung verschiedener Zellarten im Gehirn stellten Garcia-Cabezas et al. vor. (247)

3.4 Molekularbiologische Aufarbeitung

3.4.1 RNA-Extraktion

Durch sofortiges Einfrieren der ca. 2 x 2 x 2 mm großen Proben aus HC und frontalem Kortex mit flüssigem Stickstoff und anschließende Lagerung bei - 20 °C war die RNA vor Änderungen im Expressionsprofil geschützt. Zur quantitativen Bestimmung der für TNF- α , IL-1 und IL-6 codierenden mRNA-Konzentration im HC und Frontalkortex erfolgte die RNA-Extraktion aus den gefrorenen Proben durch eine Mitarbeiterin des Labors. Dies wurde anhand eines etablierten Protokolls mithilfe des Qiagen RNeasy Universal Handbuchs (Protokol: Purification of Total RNA Using the RNeasy Plus Universal Mini Kit, Qiagen GmbH Hilden, D) durchgeführt.

Homogenisierung

Zunächst wurden zu den gefrorenen Proben in einem 2 ml Reaktionsgefäß eine 5 mm Metallkugel und 900 μ l Quiazol hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Zerkleinerung und Fettlösung durch Zentrifugation (20.000 U/min) in der Schwingmühle (MM 300 Retsch GmbH & Co. KG Haan, D) für 2 Minuten, wobei einmalig die Position in der Schwingmühle rotiert wurde. Nach fünfminütiger Inkubation unter Raumtemperatur wurde zunächst zur Neutralisierung möglicher DNA-Kontamination 100 μ l gDNA-Eliminator für 15 Sekunden auf dem Reagenzglasschüttler (REAX Control, Heidolph Schwabach, D) vermischt. Anschließend wurde 180 μ l Chloroform hinzugefügt und ebenfalls für 15 Sekunden auf dem Reagenzglasschüttler vermischt. Nach dreiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Zentrifugation (12.000 U/min) bei 4 °C für 15 Minuten. Hierdurch entstanden neben einer farblosen, wässrigen Phase mit RNA eine weiße Interphase und eine rote, organische Phase. Anschließend wurde die wässrige Phase (ca. 600 μ l) in ein Reaktionsgefäß pipettiert und 600 μ l 70 % Ethanol hinzugefügt. Durch Auf- und Abpipettieren erfolgte eine Durchmischung.

RNA-Extraktion

Die gemischte Probe wurde auf eine „Mini-spin-column“-Extraktionssäule, welche aus einem Filtersystem und einem Auffanggefäß besteht, pipettiert. Durch 15-sekündige Zentrifugation bei 10.000 U/min wurde die Probe getrennt. Der Durchlauf wurde verworfen. Es erfolgte die Zugabe von 700 μ l Buffer RWT, Zentrifugation für 15 Sekunden bei 10.000 U/min und anschließendes Verwerfen des Durchlaufs. Dies wurde mit 500 μ l Buffer RPE, Zentrifugation und Verwerfen wiederholt. Anschließend wurde zum Trocknen erneut 500 μ l Buffer RPE einpipettiert und die Probe für 2 Minuten bei 10.000 U/min zentrifugiert. Zum Nachtrocknen wurde die Filtersäule in ein neues, trockenes Reaktionsgefäß gestellt und dieses für eine Minute bei 12.000 U/min zentrifugiert. Die Filtersäule wurde nun in ein frisches Reaktionsgefäß

gestellt und zusammen mit 40 µl RNase-freiem, destilliertem Wasser für eine Minute bei 10.000 U/min zentrifugiert.

RNA-Konzentrationsmessung

Mithilfe eines Spektrophotometers (NanoVue, General Electrics Frankfurt a.M., D) wurde die RNA-Konzentration gemessen. Zusätzlich wurde zur Bestimmung der Reinheit das Verhältnis der Extinktion der Wellenlänge 260 nm (Nukleinsäuren) zu 280 nm (Proteine) bzw. 230 nm (Salze, hier hauptsächlich Guanidiniethiocyanate für die Reinigung der RNA) in der Probe gemessen. Die Proben wurden bei -80 °C eingelagert.

3.4.2 Erstellung einer cDNA-Bibliothek

Durch eine Mitarbeiterin der Klinik für Anästhesiologie erfolgte die Erstellung einer komplementären DNA-Bibliothek (cDNA) und die anschließende Quantifizierung dieser. Mittels reverser Transkriptase wurde die RNA in cDNA überschrieben. Hierfür wurde nach einem etablierten Protokoll ein Transkriptase-Set (Quantitect Reverse Transcription, Qiagen GmbH Hilden, D) verwendet. Zwischen den Arbeitsschritten wurden die Reaktionsgefäße auf Eis gelagert.

Die RNA-Proben wurden aufgetaut und es wurden 2 µl gDNA Wipeout Buffer sowie 1 µg eluierte RNA (Menge aus Konzentrationsbestimmung aus 2.4.1 berechnet) in einem Reaktionsgefäß gemischt und mit RNase-freiem, destilliertem Wasser auf 14 µl aufgefüllt. Im Anschluss erfolgte eine zweiminütige Inkubation bei 42 °C. Danach wurden 1 µl Quantiscript Reverse Transkriptase, 4 µl Quantiscript RT Buffer sowie 1 µl RT Primer mix hinzugefügt und gemischt. Es folgte eine Inkubation bei 42 °C für 15 Minuten. Das Gemisch wurde dann auf 95 °C erhitzt und die Reverse Transkriptase so inaktiviert. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

3.4.3 Quantifizierung mittels real-time quantitativer PCR

Die relative Quantifizierung der cDNA-Bibliothek erfolgte mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (quantitative polymerase chain reaction, qPCR). Die Auswertung erfolgte im Advanced Modus des PCA-Analysesystems (Light Cycler 480, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, D) mit Standards und mit Kalibrator. Unter Verwendung des Absolute Blue QPCR Mix (SYBR Green, Thermo Fisher Scientific Waltham, US) und der für das Zielgen komplementären Oligonukleotid-Frequenzen (Primer; siehe Anhang 8.3) wurden Beginn und Ende des Zielgens markiert. Primer für jeweils das 3'-Ende (Sensorsonde/Forward) und das 5'-Ende (Ankersonde/Reverse) bildeten dabei ein Paar. Die Sonden waren zur Detektion mit einem Fluoreszenzfarbstoff verbunden. Durch die PCR konnten die Sonden an den

komplementären Strang binden und im gebundenen Zustand Licht emittieren. Wurde die Sensorsonde mittels Lichtimpuls angeregt, emittierte sie einen 470 nm Lichtimpuls. Dies führte wiederum zur Anregung der Ankersonde (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer), welche einen 640 nm Lichtimpuls emittierte. Dieser wurde durch den Light Cycler in Echtzeit detektiert.

Proportional zu der Menge der qPCR-Produkte nimmt die Fluoreszenz zu. Zunächst startet die Zunahme langsam, geht dann in eine exponentielle Phase über und endet mit einer Plateauphase. Die Quantifizierung der qPCR erfolgte während des Beginns der exponentiellen Phase am crossing point (Cp-Wert bzw. Ct-Wert). Zur korrekten Bestimmung des crossing point waren im verwendeten Light Cycler die Standardkurven mit bekannten Ausgangskonzentrationen für das gewünschte Zielgen hinterlegt. Zur Qualitätssicherung und Validierung der Ergebnisse waren Kalibratoren definierter Konzentration vorhanden.

Die Quantifizierung erfolgte relativ zur Messung von Veränderungen der Genexpression. Dafür wurden zwei Target-Sequenzen (Target-Gen, das analysiert wird und Referenzgen PPIA (248)) in den jeweiligen Proben verglichen. Das Referenzgen ist ein konstitutiv exprimiertes Gen, welches konstant exprimiert wird und nicht reguliert ist. Dieses dient als Basis zur Normalisierung von Unterschieden der Gesamtmenge an mRNA bzw. cDNA zwischen den einzelnen Proben. Das Ergebnis ist das Verhältnis dieser beiden Gene als dimensionslose Zahl.

Die qPCR wurde mit den jeweiligen spezifischen Primern gemäß dem Protokoll in Anhang 8.4 auf 96-Well Plates im Light Cycler durchgeführt.

3.5 Immunassay

Das bei den Messzeitpunkten durch Zentrifugation abgetrennte Serum wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefroren für die Auswertung gesammelt. Nach dem Auftauen wurden die Proben zur Bestimmung der IL-6 und TNF- α Konzentration durch eine Mitarbeiterin der Klinik für Anästhesiologie gemäß dem Protokoll (Quantikine Porcine IL-6 bzw. TNF- α Immunassay, R&D Systems, INC., Minneapolis, US) weiterverarbeitet (Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

Die Mikroplatte war mit polyklonalen Antikörpern gegen IL-6 bzw. TNF- α (Schwein) beschichtet. In jedes Fach der Mikroplatte wurden $50\text{ }\mu\text{l}$ des Assay Diluent RD1-63 pipettiert. Anschließend wurde gemäß einer vorher definierten Abfolge $50\text{ }\mu\text{l}$ der jeweiligen (IL-6 oder TNF- α) Standard- oder Kontrolllösung oder des zu messenden Serums hinzugefügt. Es folgte eine zweistündige Inkubation auf einem Mikroplattenschüttler (Unimax 2010, Heidolph Schwabach, D) mit 500 ± 50 Umdrehungen pro Minute, um die gesamten vorhandenen IL-6 bzw. TNF- α Proteine an den Antikörper zu binden. Anschließend wurde jedes Fach 4-mal zur Entfernung ungebundener Substanzen mit $400\text{ }\mu\text{l}$ Wasch Puffer und anschließender vollständiger Aspiration der Flüssigkeit gewaschen. Im nächsten Schritt wurden $100\text{ }\mu\text{l}$ Konjugat (IL-6 oder TNF- α Antikörper, mit Enzym verbunden) hinzugefügt, die Mikroplatte abgedeckt und diese erneut für 2 h auf dem Mikroplattenschüttler inkubiert. Der vorherige Waschschritt zur Entfernung ungebundener Konjugat-Reste wurde wiederholt. $100\text{ }\mu\text{l}$ Substrat Lösung wurde hinzugefügt und 30 min geschützt von Licht inkubiert. Danach wurden $100\text{ }\mu\text{l}$ Stopp Lösung hinzugefügt. Das mittels Antikörper an IL-6 bzw. TNF- α gebundene Enzym katalysierte eine Farbreaktion, welche im Mikroplattenleser (MRX TC II, Dynex Technologies Chantilly, US) bei 450 nm (Referenzfilter 570 nm) gemessen wurde. Dabei war die Intensität des Lichtsignals proportional zur vorhandenen Menge an IL-6 bzw. TNF- α in der Probe.

3.6 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte in Absprache mit dem Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik der Universitätsmedizin Mainz. Als Software wurde SPSS Statistics (SPSS Statistics 27.0.1, IBM Armonk, US) verwendet.

3.6.1 Validierung histopathologischer Score

Die Ermittlung der Inter-Observer-Reliabilität erfolgte mittels Intra-Klassen-Korrelation. Bei fehlenden Daten zur erwartbaren Übereinstimmung konnte keine vorherige Power-Kalkulation durchgeführt werden. Die Vorbereitung und Auswahl der statistischen Methodik erfolgten durch den Verfasser dieser Dissertation. Die Errechnung der Intra-Klassen-Korrelation wurde durch einen Statistiker des Instituts für medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (Manuel Herbst) mit der Software R durchgeführt. (249) Die Bewertung des Intra-Klassen-Korrelations-Koeffizienten wurde in schlecht ($< 0,5$), durchschnittlich ($0,5-0,75$), gut ($0,75-0,9$) und sehr gut ($\geq 0,9$) unterteilt. (250)

Die Intra-Observer-Reliabilität (Retest-Reliabilität) wurde anhand einer Pearson-Korrelation für 5 Untersuchende und pro Zelltyp (Regulär, INC, HIBI) bestimmt. (251) Die Pearson-Korrelation wurde als sehr gut ($0,7-1$), gut ($0,5-0,7$) oder mittel ($0,3-0,5$) angegeben. (252)

3.6.2 Statistik der Versuchsergebnisse

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte als explorative Analyse. Aufgrund der teils geringen Gruppengröße der ROSC-Tiere wurden jeweils die 4- und 8-Minuten-Gruppen zusammengefasst. Zur Darstellung der Messwerte nach Messzeitpunkt wurden die Mittelwerte zusammen mit dem einfachen Standardfehler dargestellt. Die Nullhypothese wurde bei Unterschreiten des Signifikanzniveaus (p) von $< 0,05$ abgelehnt.

Aufgrund der geringen Fallzahlen auch in den zusammengefassten Untergruppen wurde eine fehlende Normalverteilung angenommen. (253) Daher erfolgte die Auswertung bei einmaliger Messung der Variablen mittels Kruskal-Wallis-Test und bei mehrfacher Messung (verbundene Stichprobe) mittels Friedman-Test. (254, 255) Hierbei wird die asymptotische Signifikanz (zweiseitiger Test) berichtet. Bei signifikanten Gruppenunterschieden erfolgten paarweise Vergleiche der Gruppen mittels Dunn-Test mit post-hoc Bonferroni-Korrektur, um zu ermitteln, zwischen welchen Gruppen der Unterschied besteht (angepasste Signifikanz für mehrere Tests). Zur Errechnung der Effektstärke r von signifikanten Ergebnissen im Kruskal-Wallis-Test wurde der z-Wert (Standardteststatistik) durch die Wurzel der

Stichprobengröße geteilt. Nach Cohen wurde die Effektstärke r ab 0,1 als schwach, ab 0,3 als mittel und ab 0,5 als stark angegeben. (256, S. 79-81)

Die Prüfung von Korrelation zwischen der Zeit bis zum Erreichen eines ROSC und den Ergebnissen der Molekularbiologie, des Serums und des Anteils an HIBI-Neuronen wurde mittels Spearman-Korrelation (Angabe der zweiseitigen Signifikanz) durchgeführt.

Aufgrund von starken Ausreißern der Inflammationsmarker im Serum wurden die Daten um die Ausreißer bereinigt. Ausreißer wurden definiert als Abweichung größer als der 1,5-fache Interquartilsabstand des 3. Quartils. (257) Hierbei wurden die Gesamtdaten eines Inflammationsmarkers als Referenz verwendet und somit einmalig Ausreißer für TNF- α und IL-6 definiert. Die weitere Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- bzw. Friedman-Test.

4 Ergebnisse

4.1 Allgemeine Studiendaten

Im Rahmen der Studie wurden insgesamt 52 Tiere untersucht. Bei dem zunächst verwendeten Corplus CPR (GS Elektromedizinische Geräte G. Stemple, Kaufering, D) als mCPR konnte kein ROSC erreicht werden. Daher wurden die weiteren Versuche mit LUCAS 2 durchgeführt und ein Vergleich der beiden mCPR-Geräte separat ausgewertet. (258) Zur Darstellung der Methodik wurde ein weiteres Tier verwendet. (208) Nach Randomisierung und Ausschluss von 7 Tieren konnten 45 Versuchstiere in die Gesamtauswertung eingeschlossen werden. In die detaillierte Auswertung inkl. histologischer Untersuchung wurden ROSC-Tiere, welche am Ende der Überwachungszeit am Leben waren, eingeschlossen. Dies war bei 15 Tieren der Fall. (Abb. 12)

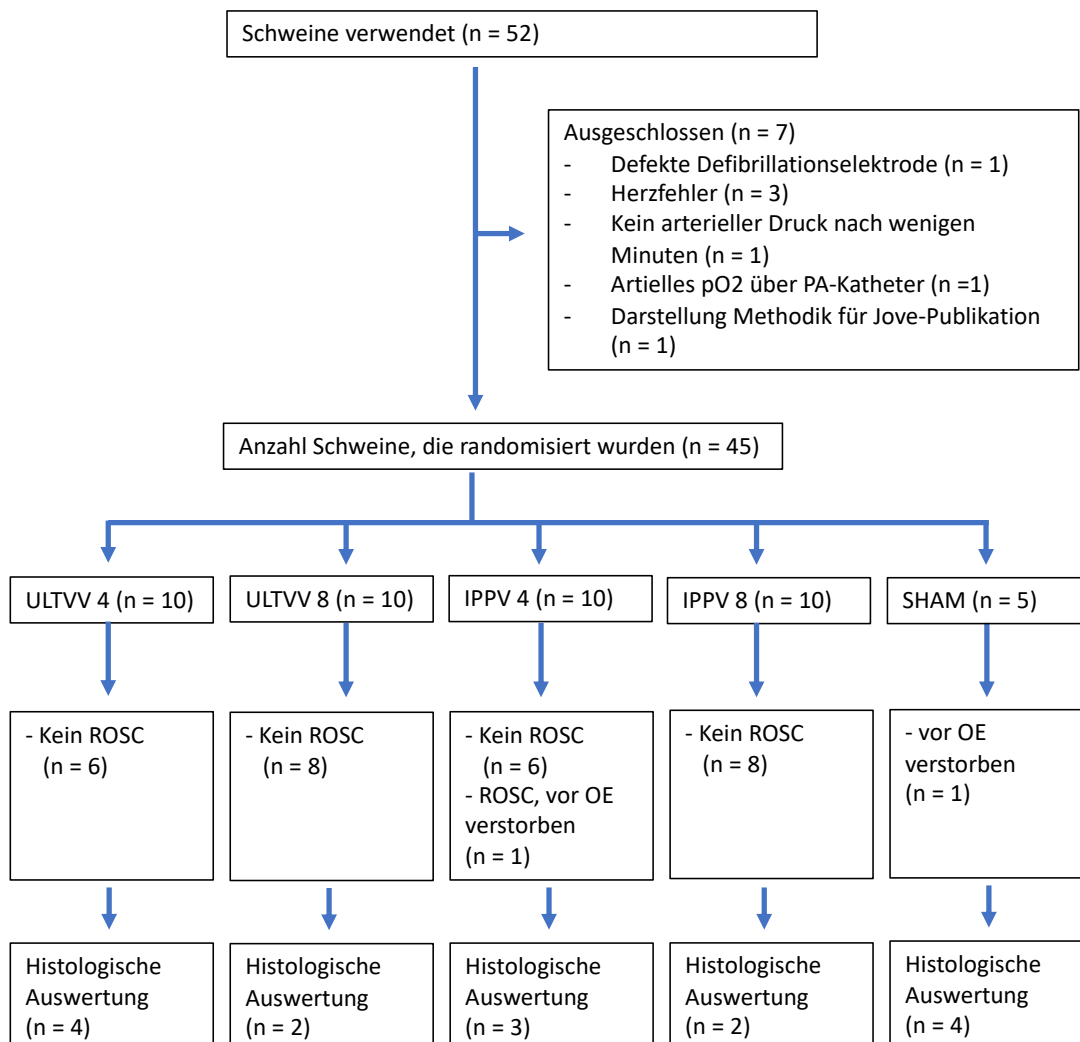


Abbildung 11: CONSORT Flow-Chart

7 Tiere wurden vor Randomisierung ausgeschlossen. Hierunter eines aufgrund der Messung eines arteriellen Sauerstoffpartialdrucks (pO_2) über den pulmonalarteriellen (PA) Katheter. Nach Wiederherstellung eines spontanen Kreislaufes (ROSC) erfolgte eine 20-stündige Nachbeobachtung. Tiere, welche vor Organentnahme (OE) starben, wurden ausgeschlossen.

Hinsichtlich des sekundären Endpunktes Erreichen eines ROSC zeigt sich kein Unterschied zwischen der Beatmungsintervention (ULTVV4: 40 %, IPPV4: 40 %, ULTVV8: 20 %, IPPV8: 20 %, jeweils n = 10). Auch in der Gesamtzeit aus No-Flow und Low-Flow (CPR) bis zum Erreichen eines ROSC (Minimum 16 Minuten, Maximum 32 Minuten, Mittelwert 21 Minuten) zeigt sich zwischen den Versuchsgruppen im Kruskal-Wallis-Test kein signifikanter Unterschied ($p = 0,192$; $n = 12$). (Abb. 13) Es besteht keine signifikante Korrelation (Spearman) der Zeit bis ROSC mit dem PCR-Ergebnis von HC TNF- α (Korrelationskoeffizient 0,176; $p = 0,606$; $n = 11$), HC IL-1 (Korrelationskoeffizient 0,097; $p = 0,777$; $n = 11$), HC IL-6 (Korrelationskoeffizient 0,180; $p = 0,596$; $n = 11$), Kortex IL-1 (Korrelationskoeffizient 0,577; $p = 0,063$; $n = 11$), Kortex IL-6 (Korrelationskoeffizient 0,476; $p = 0,139$; $n = 11$). Ebenfalls zeigt sich keine signifikante Korrelation (Spearman) für das histologische Ergebnis (Anteil HIBI gesamt: Korrelationskoeffizient -0,023 $p = 0,946$; $n = 11$) oder die Inflammation im Serum: Serum TNF- α T6 (Korrelationskoeffizient 0,167; $p = 0,448$; $n = 11$), Serum TNF- α T12 (Korrelationskoeffizient 0,540; $p = 0,086$; $n = 11$), Serum IL-6 T12 (Korrelationskoeffizient 0,430; $p = 0,187$; $n = 11$). Eine signifikante Korrelation (Spearman) findet sich für Kortex TNF- α (Korrelationskoeffizient 0,675; $p = 0,063$; $n = 10$) und Serum IL-6 T6 (Korrelationskoeffizient 0,614; $p = 0,044$; $n = 11$).

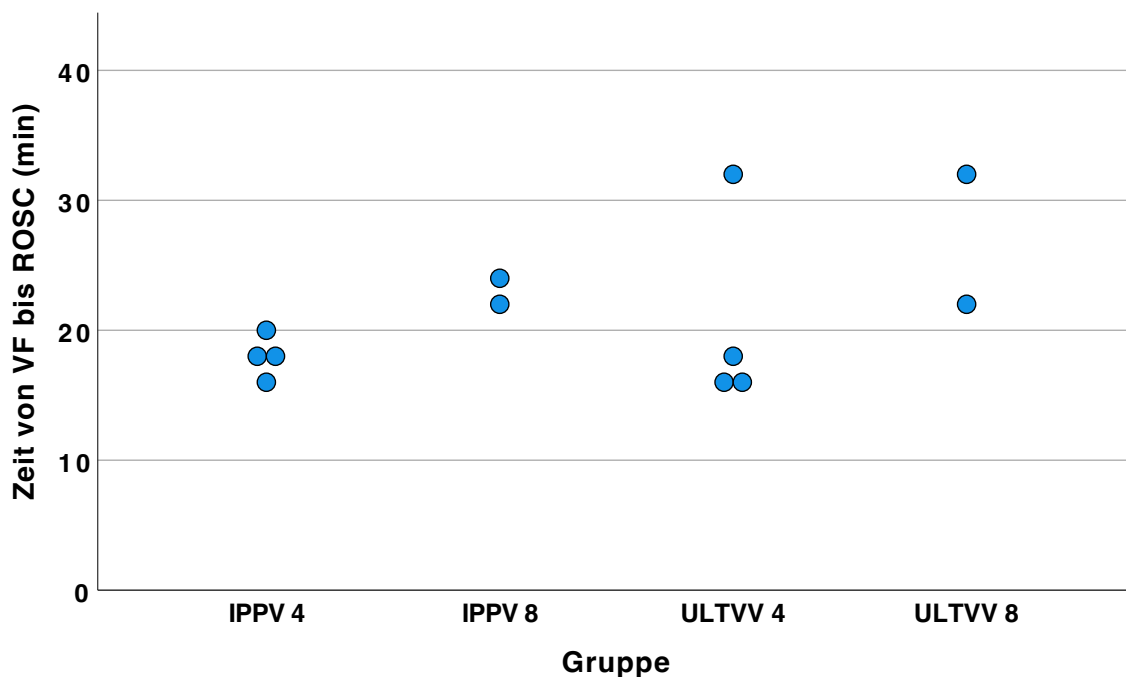


Abbildung 12: Zeit ab VF bis ROSC nach Versuchsgruppe

Darstellung aller Tiere, welche eine Wiederherstellung eines spontanen Kreislaufes (ROSC) erlangten nach Versuchsgruppe. Auf der Y-Achse ist die Zeit vom Einsetzen des Kammerflimmerns (VF) bis zur ROSC aufgetragen.

4.2 Validierung des histopathologischen Scores

4.2.1 Intra-Klassen-Korrelation

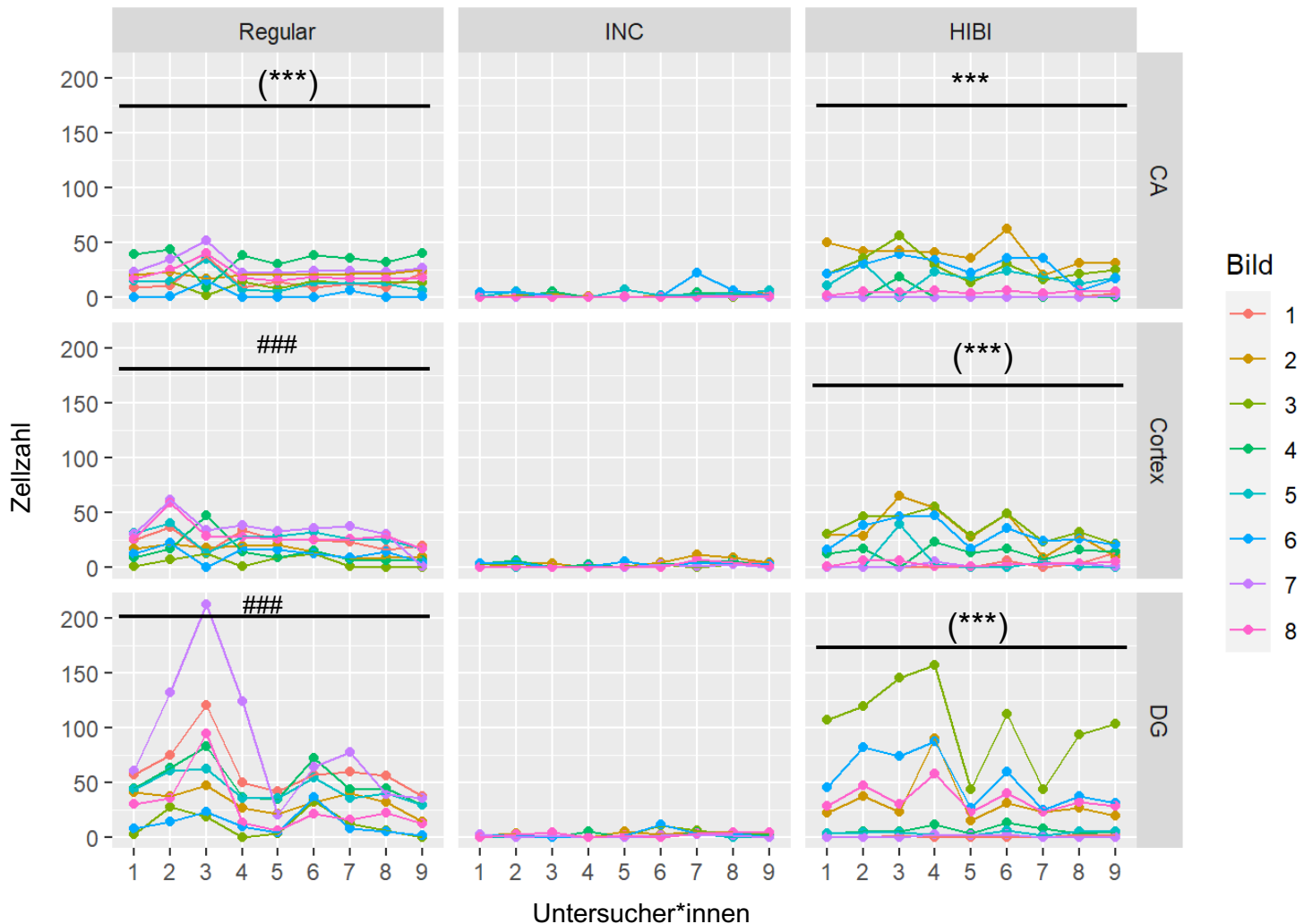


Abbildung 13: Mehrliniendiagramme der Zellzählung zur Score-Validierung

Die X-Achse zeigt die Untersucher*innen 1-9 je für die Neuronentypen Regular (Regulär; links), ischemic neuronal change (INC; mittig) und hypoxisch-ischämischer Hirnschaden (HIBI; rechts). Auf der Y-Achse ist die Anzahl gezählter Zellen nach den Gehirnregionen Cornu ammonis (CA; obere Reihe), Cortex (mittlere Reihe) und Gyrus dentatus (DG; untere Reihe) abgebildet. Jede Linie stellt ein bewertetes Bild dar. Berechnung und Abbildung erstellt von Manuel Herbst. Signifikanzen nachträglich ergänzt *** = sehr gute Übereinstimmung ($> 0,9$), $p < 0,001$. (***) = gute Übereinstimmung (0,75-0,9), $p < 0,001$. ### = durchschnittliche Übereinstimmung (0,5-0,75), $p < 0,001$.

Die Validierung des Scores durch 9 Untersucher*innen zeigt eine gute Übereinstimmung für den Anteil an HIBI-Neuronen (0,87 (0,79-0,93); $p < 0,001$; je 8 Bilder aus 3 Regionen). Für Reguläre Neurone lässt sich eine durchschnittliche bis gute Übereinstimmung (CA: 0,88, Kortex: 0,66, DG: 0,61; je $p < 0,001$), für HIBI-Neurone eine gute bis sehr gute Übereinstimmung (CA: 0,93, Kortex: 0,82, DG: 0,84; je $p < 0,001$) erzielen. Bei insgesamt geringer Zahl an INC-Neuronen zeigen sich hier keine signifikanten Ergebnisse. (Abb. 14) Die Intra-Klassen-Korrelation nach Region zeigt eine gute Übereinstimmung für CA (0,87 (0,71-0,97); $p < 0,001$) und Kortex (0,82 (0,63-0,95); $p < 0,001$) und eine sehr gute Übereinstimmung für den DG (0,87 (0,79-0,93); $p < 0,001$).

4.2.2 Intra-Observer-Reliabilität

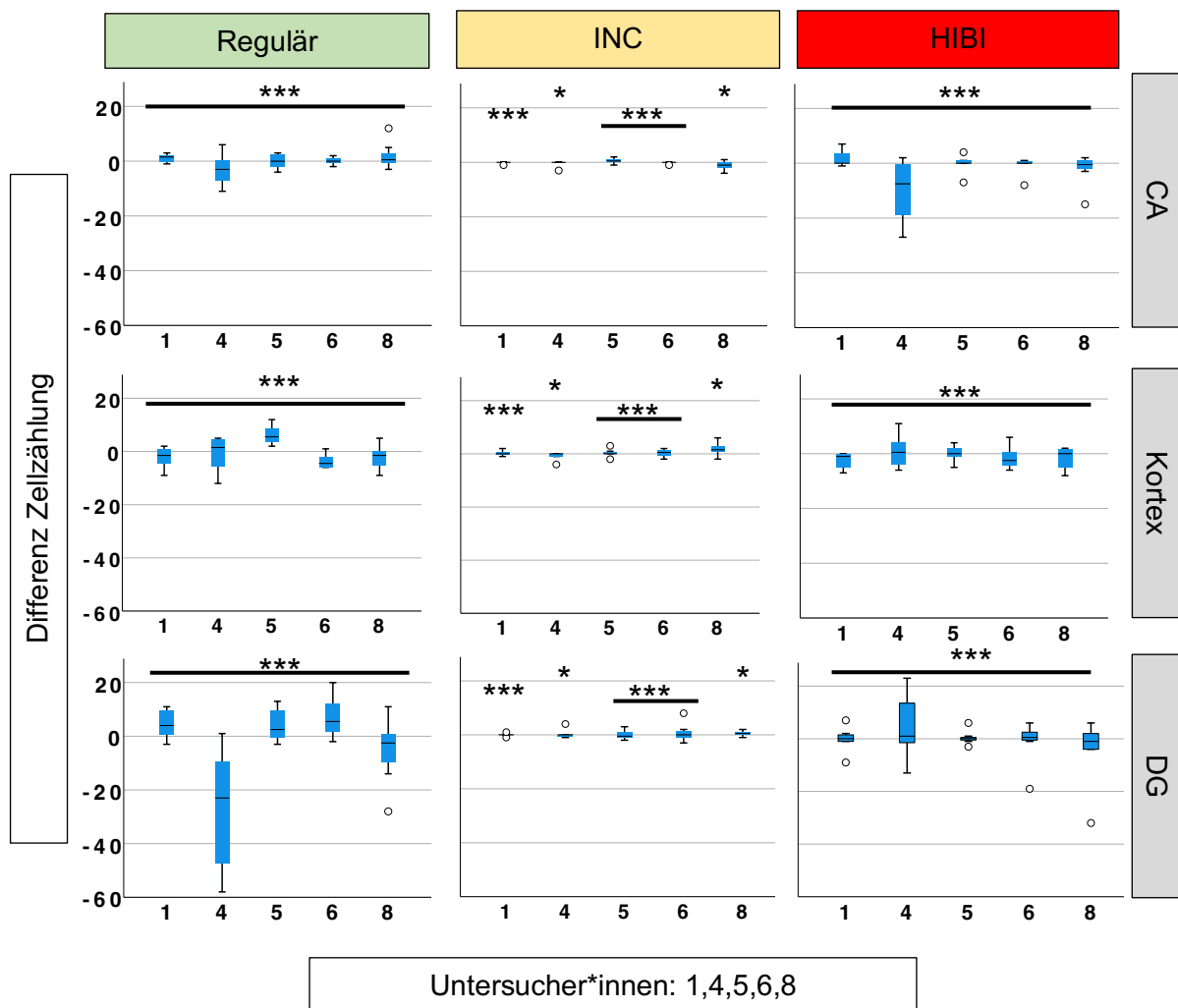


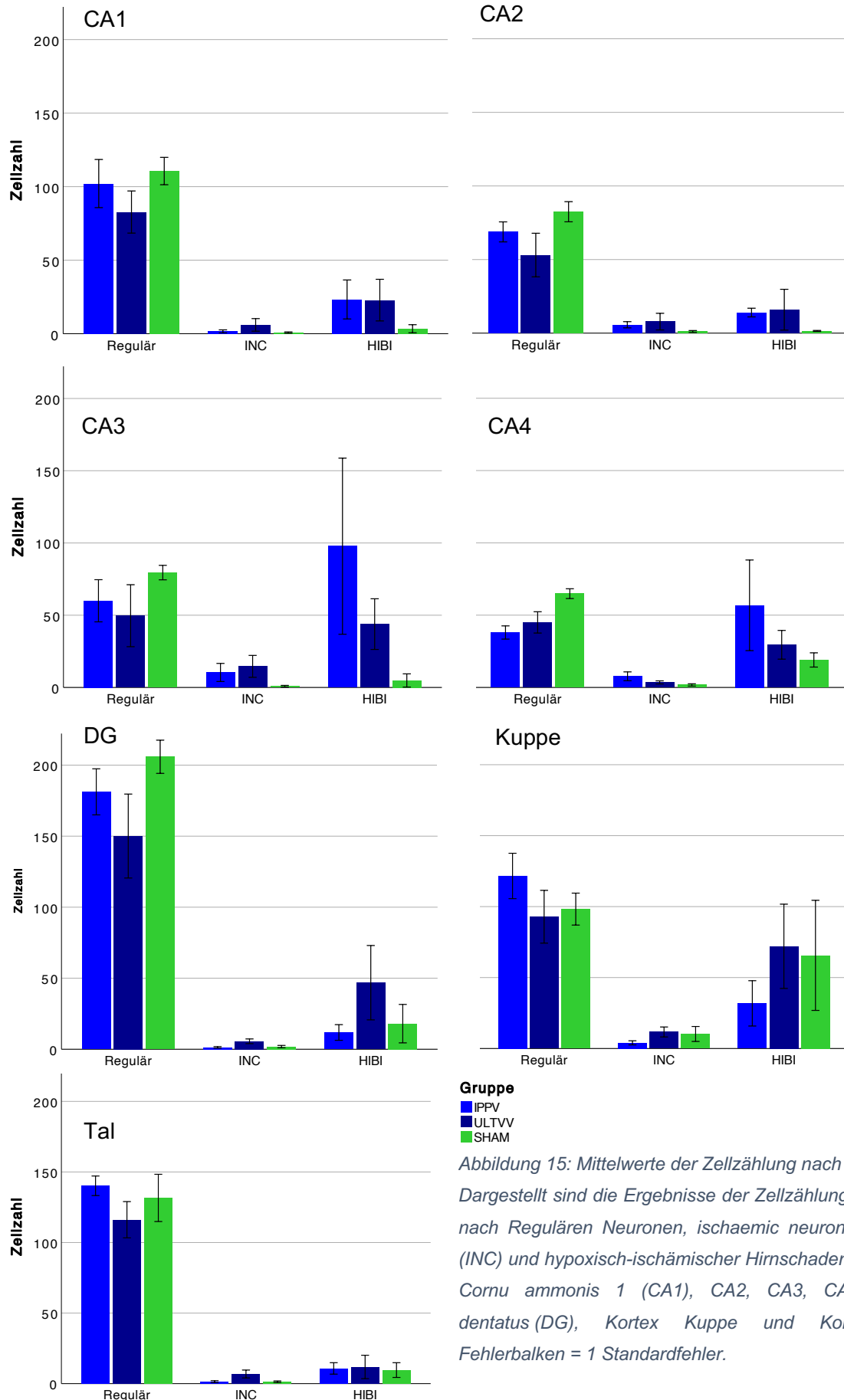
Abbildung 14: Differenz der Zellzählung von 1. und 2. Zählung (Intra-Observer-Reliabilität)

Auf der X-Achse aufgetragen sind die Untersucher*innen 1,4,5,6,8 jeweils für die Neuronenarten Regulär (links), ischemic neuronal change (INC; mittig) und hypoxisch-ischämischer Hirnschaden (HIBI; rechts). Auf der Y-Achse ist die Differenz zwischen erster und zweiter Zellzählung nach den Gehirnregionen Cornu ammonis (CA; obere Reihe), Kortex (mittlere Reihe) und Gyrus dentatus (DG; untere Reihe) als Boxplot für die 8 Bilder pro Region dargestellt. Kreis = Ausreißer, * = mittlere Korrelation (0,3-0,5) zwischen erster und zweiter Zählung, $p < 0,05$. *** = sehr gute Korrelation (0,7-1) zwischen erster und zweiter Zählung, $p < 0,001$.

Abb. 15 zeigt die Differenz der Wiederholungszählung von 5 zufällig ausgewählten Untersuchenden. Es zeigen sich für Reguläre (0,904-0,966; $p < 0,001$) und HIBI-Neurone (0,907-0,990; $p < 0,001$) sehr gute Korrelationen nach Pearson im Wiederholungstest. Bei insgesamt wenig vorhandenen INC-Neuronen besteht in der Wiederholungszählung in absoluten Zahlen nur eine geringe Abweichung mit einer mittleren bis sehr guten Korrelation (0,405-0,835; $p < 0,05$).

4.3 Neurologische Auswertung

4.3.1 Histologie



Gruppe

- IPPV
- ULTVV
- SHAM

Abbildung 15: Mittelwerte der Zellzählung nach Regionen. Dargestellt sind die Ergebnisse der Zellzählung aufgeteilt nach Regulären Neuronen, ischaemischer neuronaler Veränderung (INC) und hypoxisch-ischämischer Hirnschaden (HIBI) für Cornu ammonis 1 (CA1), CA2, CA3, CA4, Gyrus dentatus (DG), Kortex Kuppe und Kortex Tal. Fehlerbalken = 1 Standardfehler.

Als primärer Endpunkt ist der histologisch und molekularbiologisch nachweisbare neurologische Schaden festgelegt. Die histologische Zellzählung zeigt keinerlei signifikante Unterschiede für die Zahl der gezählten Regulären, INC- oder HIBI-Neurone innerhalb einer Region (pro Region n = 15; CA3 n = 13). (Abb. 16) Bei 5 Tieren ist der HC im Feinschnitt doppelt angeschnitten (2x Sham, 2x ULTVV 4, 1x IPPV 8). Hier werden beide HC-Anschnitte gezählt und hieraus der Mittelwert gebildet. Bei 2 Tieren ist CA3 nicht zu identifizieren (1x IPPV4, 1x Sham). Daher wird CA3 bei der Gesamtauswertung nicht berücksichtigt.

Auch für den Anteil an HIBI-Neuronen an der Gesamtzahl (HIBI + Regulär) zeigen sich keine signifikanten Unterschiede im Kruskal-Wallis-Test (pro Region n = 15; CA3 n = 13) nach Versuchsgruppen (zusammengefasst): CA1 (p = 0,478), CA2 (p = 0,126), CA3 (p = 0,287), CA4 (p = 0,382), DG (p = 0,639), Kuppe (p = 0,476), Tal (p = 0,638), Gesamtauswertung ohne CA3 (p = 0,404). (Abb. 17)

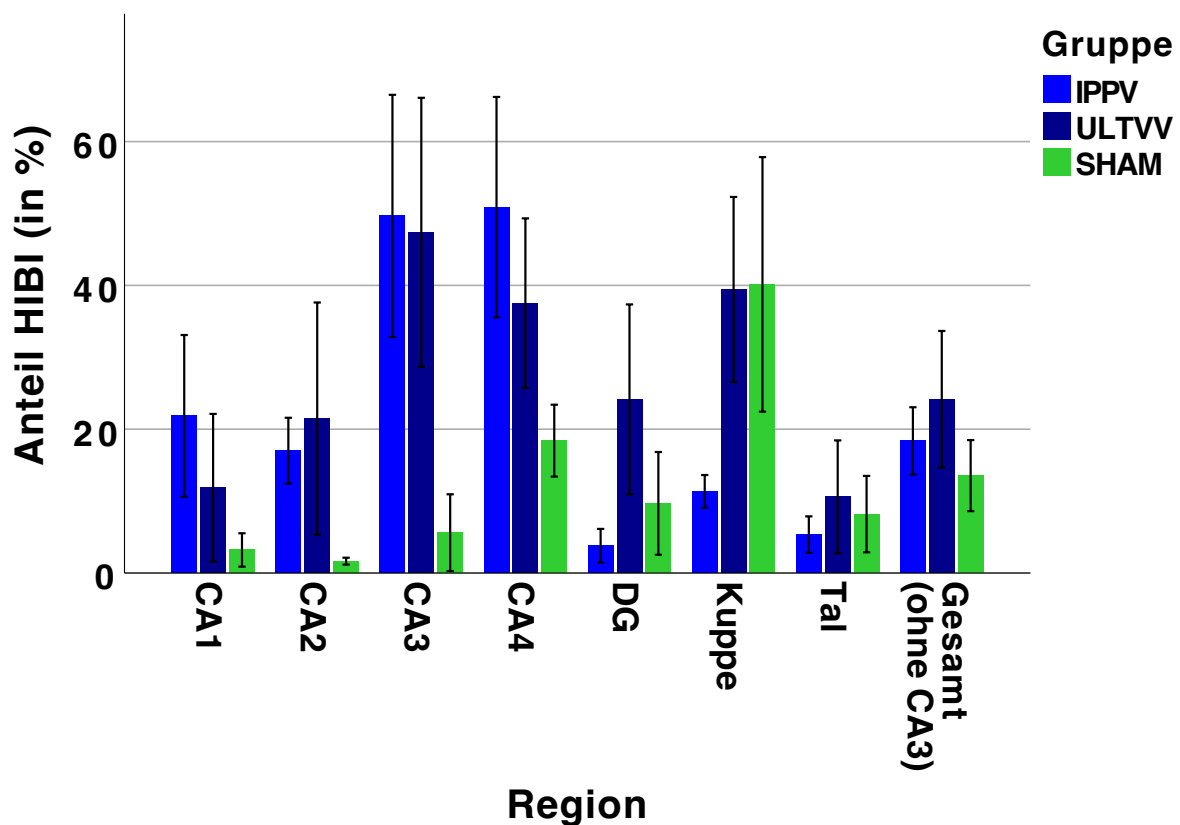


Abbildung 16: Prozentualer Anteil von HIBI nach Gehirnregion und Versuchsgruppe

Dargestellt ist der prozentuale Anteil von Neuronen mit hypoxisch-ischämischen Hirnschaden (HIBI) an der Gesamtzahl (Regulär + HIBI) für Cornu ammonis (CA) 1-4, Gyrus dentatus (DG), Kortex Kuppe, Kortex Tal und Gesamt (ohne CA3) aufgeteilt nach zusammengefassten Gruppen. Fehlerbalken = 1 Standardfehler.

Bei der Betrachtung der Regionen unabhängig der Versuchsgruppe zeigt sich der geringste Anteil an HIBI in CA1 (Mittelwert = $0,11 \pm 0,05$) und im Kortex Tal (Mittelwert = $0,08 \pm 0,03$). Der höchste Anteil an HIBI zeigt sich in CA3 (Mittelwert = $0,38 \pm 0,11$) und CA4 (Mittelwert = $0,37 \pm 0,07$). Bei fehlender Normalverteilung besteht nach Kruskal-Wallis-Test (pro Region $n = 15$; CA3 $n = 13$) ein signifikanter Unterschied mit jeweils starkem Effekt zwischen CA1 und Kuppe ($p = 0,038$; $r = 0,57$) und zwischen CA1 und CA4 ($p = 0,012$; $r = 0,63$). (Abb. 18)

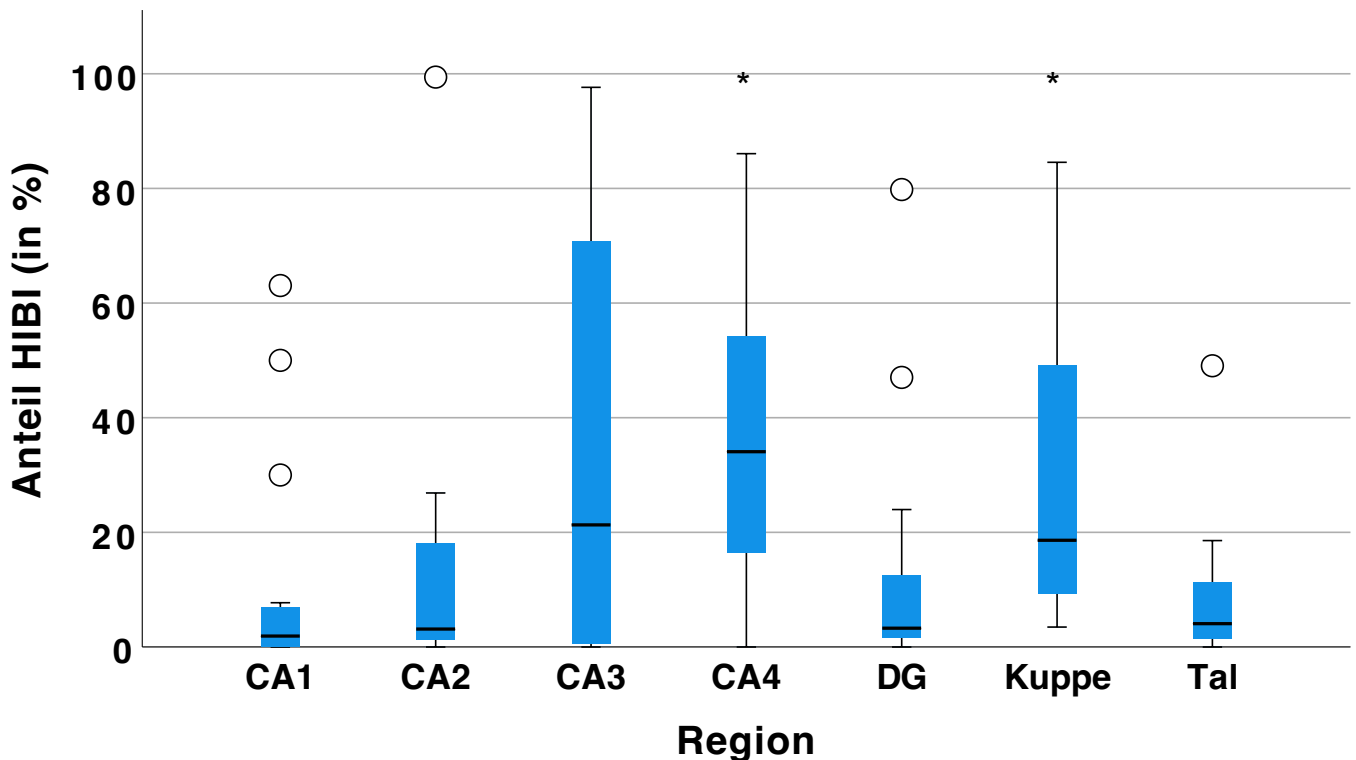


Abbildung 17: Box-Plot des Anteils von HIBI nach Region

Dargestellt ist der prozentuale Anteil von Neuronen mit hypoxisch-ischämischem Hirnschaden (HIBI) an der Gesamtzahl (Regulär + HIBI) unabhängig von der Versuchsgruppe für Cornu ammonis (CA) 1-4, Gyrus dentatus (DG), Kortex Kuppe, Kortex Tal. Kreis = Ausreißer, * = $p < 0,05$ zwischen CA1 und CA4 sowie CA1 und Kuppe.

4.3.2 Inflammationsmarker Hirngewebe (Molekularbiologie)

Der primäre Endpunkt der molekularbiologischen Auswertung von HC und Kortex (Gruppen zusammengefasst) zeigt signifikante Unterschiede zu Sham im Kruskal-Wallis-Test für TNF- α im HC ($p = 0,02$; $n = 16$, zwischen Sham und IPPV $p = 0,035$; $r = 0,76$), für IL-6 im HC ($p = 0,003$; $n = 16$, zwischen Sham und ULTVV $p = 0,002$) und IL-6 im Kortex ($p = 0,014$; $n = 16$, zwischen Sham und IPPV $p = 0,024$, $r = 0,84$). Durchgängig zeigt sich für Sham-Tiere die geringste molekularbiologische Inflammation (Abb. 19)

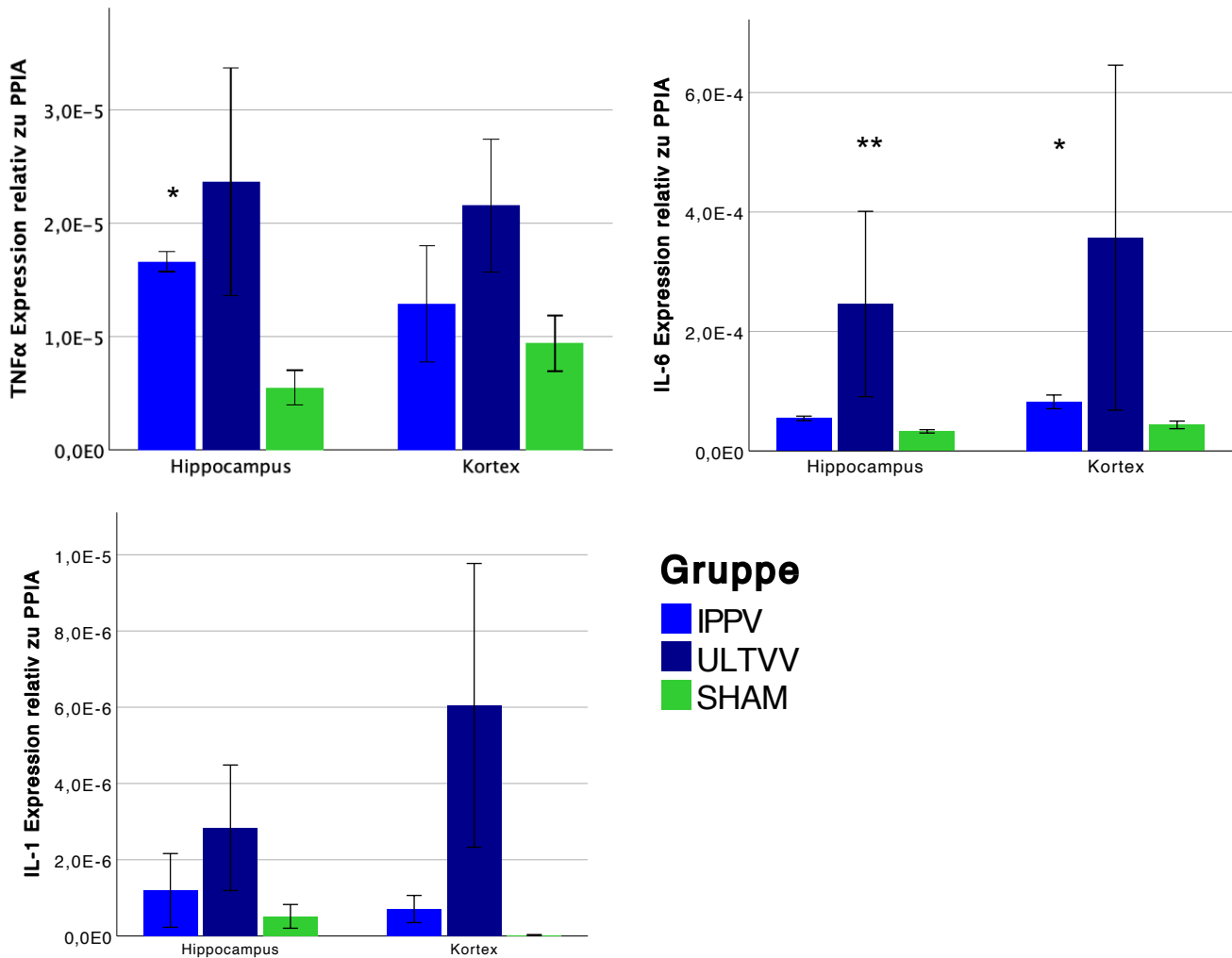


Abbildung 18: PCR-Ergebnis von Hippocampus und Kortex für TNF- α , IL-6 und IL-1

Darstellung der postmortalen Expression von TNF- α (oben links), IL-6 (oben rechts) und IL-1 (unten) von Hippocampus und Kortex nach zusammengefassten Gruppen relativ zur Expression des Referenzgens PPIA. * = $p < 0,05$ IPPV und Sham ** = $p < 0,01$ zwischen ULTVV und Sham. Fehlerbalken = 1 Standardfehler.

4.3.3 Inflammationsmarker Serum (ELISA)

Für IL-6 im Serum zeigt sich ein Absinken zum Zeitpunkt T6 (BLH: 49,35 pg/ml, T6: 12,67 pg/ml, T12: 240,19 pg/ml). Für TNF- α zeigt sich ein Absinken des Mittelwertes zu T12 (BLH: 127,07 pg/ml, T6: 135,62 pg/ml, T12: 132,33 pg/ml). Ein Absinken der Inflammation nach einem HKS wird als unplausibel gewertet und daher werden Ausreißer definiert als Abweichung größer als der 1,5-fache Interquartilsabstand des 3. Quartils. (257) Nach Ausschluss von Ausreißern zeigt sich im Friedman-Test ein signifikanter Anstieg von IL-6 (je $n = 14$) in der Gruppe IPPV ($p = 0,039$, zwischen BLH und T12 $p = 0,04$; $r = 0,88$). Keine signifikanten Änderungen bestehen für ULTVV ($p = 0,264$) und Sham ($p = 0,097$) sowie für TNF- α (je $n = 15$) in allen Gruppen: IPPV ($p = 0,105$), ULTVV ($p = 0,105$) und Sham ($p = 0,074$). Ebenfalls findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen im Kruskal-Wallis-Test für IL-6 zum Zeitpunkt BLH ($p = 0,352$; $n = 21$), T6 ($p = 0,797$; $n = 16$) oder T12 ($p = 0,455$; $n = 16$) und TNF- α zum Zeitpunkt BLH ($p = 0,237$; $n = 24$), T6 ($p = 0,272$; $n = 16$) oder T12 ($p = 0,762$; $n = 16$). (Abb. 20)

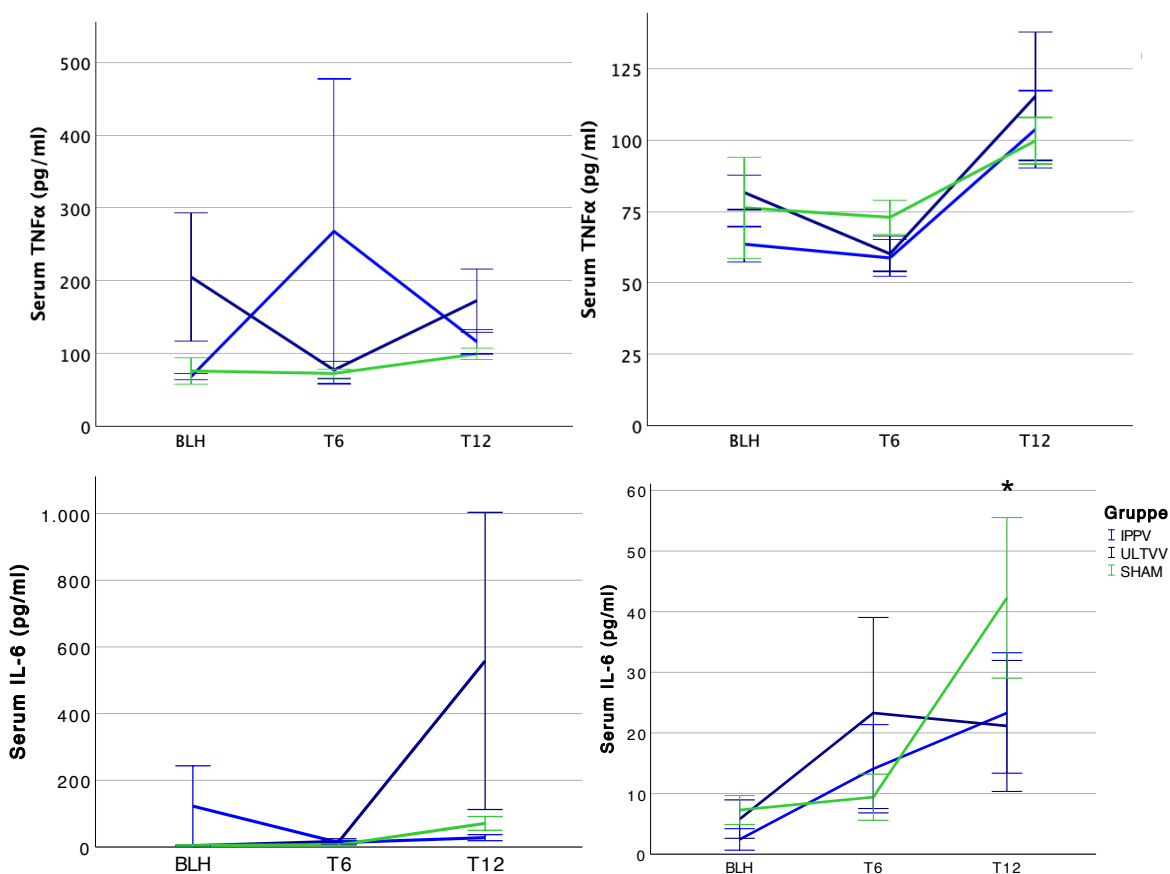


Abbildung 19: Mehrliniendiagramm von IL-6 und TNF- α im Serum

Darstellung der Serum-IL-6 Werte (oben) und TNF- α -Werte (unten) zu den drei Messzeitpunkten baseline healthy (BLH), T6 und T12 nach zusammengefassten Gruppen. Links: Rohdaten, deutliche Ausreißer führen zu hohen Werten (pg/ml) auf der Y-Achse. Rechts: Nach Ausschluss von Ausreißern. * = $p < 0,05$ von IPPV zwischen BLH und T12. Fehlerbalken = 1 Standardfehler.

4.3.4 Nahinfrarot-Spektroskopie

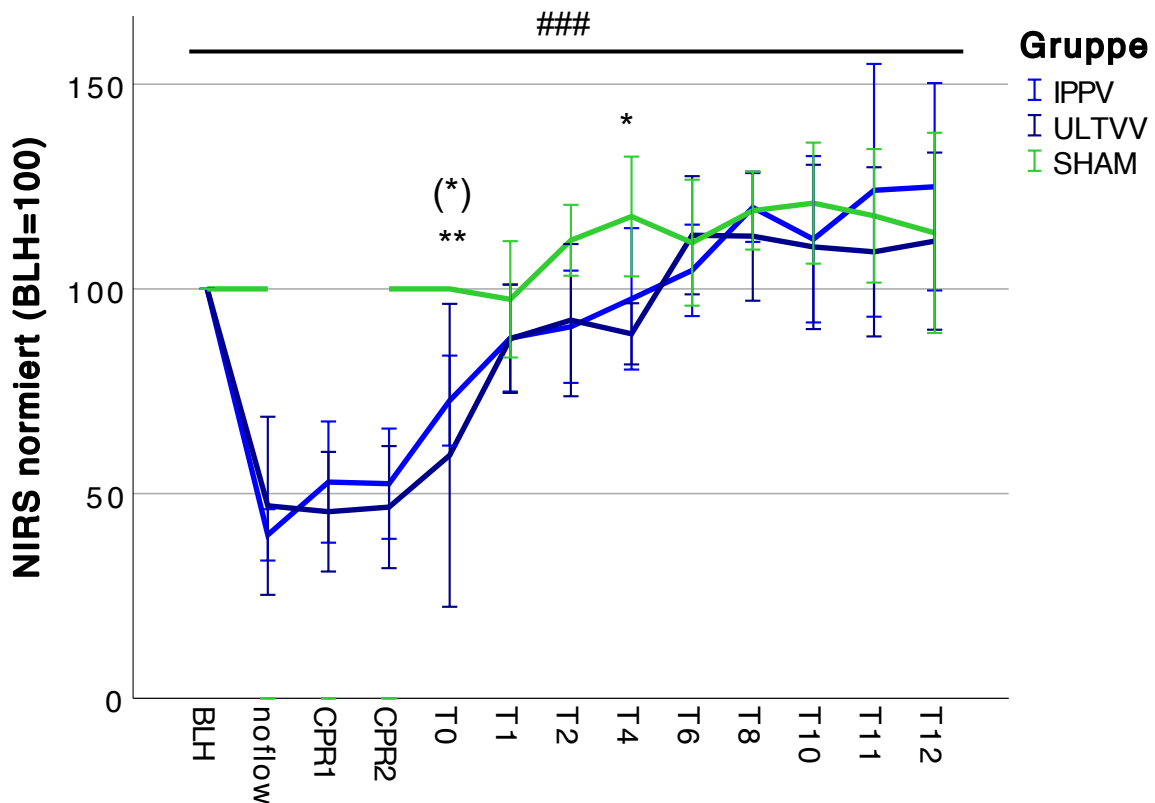


Abbildung 20: Mehrliniendiagramm der Nahinfrarot-Spektroskopie (NIRS)

Darstellung der Ergebnisse der NIRS-Messung nach zusammengefassten Gruppen. Der Ausgangswert baseline healthy (BLH) wurde genormt auf 100 und bei den folgenden Messzeitpunkten die Veränderung ausgehend vom Ausgangswert dargestellt. Die HKS-Messzeitpunkte No-Flow, CPR1 und CPR2 entfallen bei Sham, sodass hier T0 erneut auf 100 genormt wurde. ### = $p < 0,01$ zwischen den Messzeitpunkten jeweils innerhalb von ULTVV, IPPV und Sham. ** = $p < 0,01$ zu T0 zwischen ULTVV und Sham. (*) = $p < 0,05$ zu T0 zwischen IPPV und Sham. * = $p < 0,05$ zu T4 zwischen ULTVV und Sham. Fehlerbalken = 1 Standardfehler.

Die zerebrale, regionale Sauerstoffsättigung mittels NIRS-Messung wurde zum Zeitpunkt BLH normiert auf 100 (Sham zusätzlich T0 = 100). In allen Gruppen zeigt sich ein Anstieg im Verlauf, zudem zeigt sich in den Interventionsgruppen ein deutlicher Abfall mit Einsetzen des HKS und unter CPR. Der Unterschied im Zeitverlauf ist für alle Gruppen im Friedman-Test ($n = 16$) signifikant: IPPV ($p < 0,001$) und ULTVV ($p < 0,001$) und Sham ($p = 0,028$). Mittels Kruskal-Wallis-Test werden Unterschiede zwischen den Gruppen für jeden einzelnen Zeitpunkt ermittelt (T0-T4 $n = 17$; T6-T12 $n = 16$). Hierbei zeigen sich höhere Werte für Sham als für ULTVV zu T0 ($p = 0,007$; $r = 0,92$) und höhere Werte für Sham als für IPPV zu T0 ($p = 0,028$; $r = 0,78$). Weiterhin ist Sham gegenüber ULTVV erhöht zum Zeitpunkt T4 ($p = 0,020$; $r = 0,82$). (Abb. 21)

5 Diskussion

5.1 Kritische Wertung der Ergebnisse

In der zugrunde liegenden Studie konnten nach Ausschluss 45 Tiere randomisiert werden. Von den 5 Sham-Tieren verstarb 1 Tier kurz vor Versuchsende. Von den 40 Interventionstieren erreichten 12 Tiere ein ROSC und 11 Tiere überlebten bis zum Ende des Beobachtungszeitraums. Für den primären Endpunkt Histologischer Schaden und den sekundären Endpunkt Erreichen eines ROSC zeigt sich kein signifikanter Gruppenunterschied. Für den primären Endpunkt molekularbiologischer Schaden zeigt sich im HC ULTVV signifikant gegenüber Sham hinsichtlich der TNF- α -Messung und IL-6 erhöht. In der IPPV-Gruppe zeigt sich gegenüber Sham eine signifikante Erhöhung von IL-6 im Kortex. Die NIRS zeigt eine signifikante Veränderung im Messverlauf für ULTVV, IPPV und Sham. Zwischen den Gruppen besteht ein signifikanter Unterschied lediglich zum Zeitpunkt T0 (Sham > IPPV) und T4 (Sham > ULTVV). Hinsichtlich der Inflammationsmarker im Serum zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

Die ROSC-Rate von 30 % ergibt sich insbesondere aufgrund der geringen ROSC-Rate in den beiden 8-Minuten-Gruppen (je 20 %). In einer vergleichbaren Studie von Tan et al. (32 Schweine, $30,8 \pm 3,1$ kg, 4 oder 8 Minuten untherapiertes VF, dann 10 min BLS, dann ALS) zeigten sich deutlich höhere ROSC-Raten. Hier hatten nach der 2. Defibrillation in den 4-Minuten-VF-Gruppen 7 von 8 Tieren ein ROSC. Bei 8 Minuten VF hatten bei einem V_t von 10 ml/kgKG ebenfalls 7 von 8 Tieren, bei einem V_t von 7 ml/kgKG hatten 3 von 8 Tieren ein ROSC. Im Gegensatz zu der Studie dieser Dissertation wurde hier ohne PEEP (statt 5 mmHg) und mit einem I:E von 1:2 (statt 1:1) beatmet. Zudem erfolgte die Defibrillation mit 120 Joule (statt 200 Joule). (259) In der Studie dieser Dissertation waren nach Start des ALS-Algorithmus inkl. Medikation und Defibrillation mindestens 3 Defibrillationen (mindestens 4 Minuten ALS; mindestens 16 Minuten ab Auslösen VF) bis zum Erreichen eines ROSC notwendig. In der Studie von Tan et al. wurde bereits nach der 1. bzw. 2. Defibrillation ein ROSC erreicht. (259) Auch Högler et al. erreichten höhere ROSC-Raten nach untherapiertem VF von 7 Minuten (6 von 8 ROSC) und 10 Minuten (7 von 8 ROSC). Allerdings erfolgte vor der ersten Medikamentengabe (Vasopressin) in dieser Studie nur eine 3-minütige BLS-Phase und die Defibrillation wurde bereits 5 Minuten später und mit bis zu 3 aufeinander folgenden Defibrillationen durchgeführt. (115) Mit 30% liegen die ROSC-Raten in der Studie dieser Dissertation somit unter den durchschnittlichen experimentellen ROSC-Raten (≥ 70 %), unter den ROSC-Raten des OHCA in der EuReCa Two Studie (33 %) und deutlich unter der Utstein-Gruppe (Beobachteter HKS, initial schockbarer Rhythmus) des OHCA (59 %). (2, 260)

Insgesamt liegt aufgrund der Kombination aus 4 bzw. 8 Minuten No-Flow-Zeit und 8 Minuten BLS die Zeit bis zur ersten Defibrillation je nach Gruppe bei 12 bzw. 16 Minuten. Dies hatte den Zweck, aufgrund erwartbar längerer Reanimationszeiten die Intervention Beatmung unter Reanimation über einen längeren Zeitraum anwenden zu können. Weiterhin sollte die klinische Situation des OHCA, bei der die mediane Eintreffzeit des Rettungsdienstes bei unter 9 Minuten liegt, möglichst realistisch abgebildet werden. (261-264) Durch Lai*innenreanimation, telefonische CPR-Anleitung oder First Responder können schon vor Eintreffen des Rettungsdienstes BLS-Maßnahmen durchgeführt werden, sodass die 8 Minuten BLS diese Situation widerspiegeln sollen. Im Falle des OHCA reduziert eine Verzögerung der Defibrillation pro Minute die Überlebenschancen bis zur Krankenhausentlassung um 10-12 %. (265) Daher stellt das Studiendesign mit verzögertem Beginn von BLS und Defibrillation eine Situation mit geringerer Überlebenschancen dar. (266) Weiterhin könnten die präinterventionelle Tiergesundheit oder Unterschiede in der Beatmung, mCPR (u. a. genauer Druckpunkt) oder Defibrillationsstrategie (Joule, 1 Defibrillation vs. 3er Serie) ursächlich für geringere ROSC-Raten sein.

Aus den geringen ROSC-Raten folgt eine niedrige statistische Aussagekraft. Hierdurch kann ein β -Fehler mit fehlender Ablehnung der Nullhypothese begangen werden. (267) Dies ist ein bekanntes Problem in der Tierforschung. Nach dem 3R-Prinzip sollten möglichst wenige Tiere verwendet werden. Studien mit zu geringer Power führen zu Unter- oder Überschätzung von Effekten, schlechter Reproduzierbarkeit und somit Ressourcenverschwendung. (268, 269) Bei bisherigen Tierstudien zur CPR wird häufig keine Berechnung der Studiengröße berichtet. (270, 271) Auch im Rahmen der Dissertationsstudie wurde keine Power-Kalkulation durchgeführt, sodass lediglich eine explorative Datenanalyse möglich war. In zukünftigen Studien sollte, wenn möglich, eine Power-Kalkulation durchgeführt werden.

5.1.1 Beatmungsparameter

Die allgemeinen Beatmungsparameter (paO_2 , $paCO_2$, Horovitz-Index, p_{max} , Beatmungsmitteldruck, PEEP) wurden bereits in einer anderen Dissertation beschrieben und daher hier nicht gesondert ausgewertet. Es zeigte sich zusammenfassend weder während der Reanimation noch im Nachbeobachtungszeitraum ein relevanter Unterschied zwischen IPPV und ULTVV. Lediglich zwischen Sham und ULTVV zeigten sich signifikante Gruppenunterschiede. Eine lungenprotektivere Beatmung durch ULTVV zur Vermeidung eines ARDS (15) konnte somit nicht gezeigt werden. Allerdings zeigte sich ULTVV hinsichtlich der Beatmungsparameter gegenüber IPPV nicht unterlegen. Dies ist bemerkenswert, da in der Theorie bei ULTVV aufgrund der niedrigen V_t eine höhere Totraumventilation stattfindet. (221, 222)

Bei der Beurteilung der Beatmung ist der Einfluss auf Faktoren wie Oxygenierung, Decarboxylierung, kardialer Output und venöser Rückfluss zu beachten. Dabei spielt u. a. das V_t in Kombination mit RR und FiO_2 eine relevante Rolle. (73, 74, 106) Auch das Timing von Thoraxkompression und Beatmung hat aufgrund intrathorakaler Drücke einen relevanten Einfluss. Thoraxkompressionen während manueller Beatmung können einen Rückstrom der Luft (reversed airflow) verursachen und hierdurch zu einer Fragmentierung der Inspiration führen. (272) Die nötige Inspirationszeit könnte bei prolongierter CPR mit resultierend reduzierter Lungencompliance noch länger sein. (92) Neue Beatmungsansätze wie ULTVV, CCSV oder ITP versuchen diese verschiedenen Faktoren in ein optimales Gleichgewicht zu bringen, befinden sich jedoch noch in der wissenschaftlichen Evaluation. Entsprechend der Vorgängerstudie und der Dissertationsstudie konnte bei ULTVV trotz geringer Beatmungszeit und geringem V_t über mehrere Minuten eine adäquate Oxygenierung und Decarboxylierung im Schweinmodell aufrechterhalten werden. (15, 221) Ergänzend ist zu beachten, dass das V_t und die RR Einfluss auf das $etCO_2$ haben und somit ggf. beatmungsadaptierte $etCO_2$ -Werte notwendig sind. (273)

Unklar ist, wie lange eine CPR durchgeführt werden muss, damit Veränderungen der Beatmung einen Einfluss auf das Outcome haben. Spezielle Beatmungsstrategien wie ULTVV mit einem geringen PEEP könnten z. B. zur Prävention eines Atemwegsverschlusses unter prolongierter CPR eine Rolle spielen (95). Durch die Etablierung von mCPR und eCPR könnte die Relevanz der Beatmung aufgrund längerer CPR-Zeiten in Zukunft zunehmen.

5.1.2 Histologie

Für den primären Endpunkt der histologischen Auswertung zeigen sich keine signifikanten Unterschiede für alle untersuchten Neuronenarten (Regulär, INC, HIBI) und den relativen Anteil an HIBI-Neuronen zwischen den Gruppen. Bemerkenswert ist hierbei besonders, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der Sham-Gruppe und den Interventionsgruppen festgestellt werden konnte. Diese Feststellung ist kongruent mit den weiteren histopathologischen Auswertungen dieser Studie. So konnte lediglich in der Nierenhistologie ein höherer Schaden in der ULTVV-Gruppe gegenüber Sham festgestellt werden. Die histologische Auswertung der Niere von IPPV gegenüber Sham und der Lunge und Leber zwischen allen Gruppen zeigten keine signifikanten Gruppenunterschiede. Allerdings finden sich überwiegend Tendenzen eines geringen Organschadens in der Sham Gruppe. (220, 221)

In der Literatur findet sich vielfach die Beschreibung einer selektiven Vulnerabilität (CA1, Sommer-Sektor). CA1 soll dabei besonders vulnerabel auf Hypoxie reagieren (176, 177). Dies konnte allerdings in einer Schweine- (173) und einer Rattenstudie (178) nicht reproduziert

werden. Eine Analyse des Anteils von HIBI nach Gehirnregion, unabhängig von der Versuchsgruppe in der Studie dieser Dissertation, zeigte bemerkenswerterweise CA1 als die am wenigsten von HIBI betroffene Region. So bestand ein signifikanter Unterschied zu Kortex Kuppe und zu CA4, welche die beiden Regionen mit dem höchsten Anteil an HIBI darstellten. Die Vergleichbarkeit der verschiedenen Studien ist allerdings aufgrund unterschiedlicher Nachbeobachtungszeiten eingeschränkt.

5.1.3 Inflammationsmarker

Bei der Untersuchung der Inflammationsmarker im Serum zeigen sich vereinzelt deutliche Ausreißer. Dabei ist insbesondere der deutliche Abfall von IL-6 von BLH auf T6 unplausibel, da durch den HKS eine Erhöhung der Inflammationsparameter zu erwarten ist. Nach mathematischem Ausschluss (1,5-facher Interquartilsabstand zum 3. Quartil) der Ausreißer zeigen sich grafisch plausiblere Daten. Allerdings besteht nur für IL-6 bei IPPV eine signifikante Änderung im Zeitverlauf zwischen BLH und T12. Bei allen weiteren Auswertungen besteht weder ein Unterschied im Zeitverlauf noch zwischen den Gruppen zu den einzelnen Messzeitpunkten. Bisher hat sich kein Inflammationsmarker zur Prognoseabschätzung durchgesetzt. Eine mögliche Ursache könnte in den teils gleichzeitig vorliegenden pro- und antiinflammatorischen Effekten liegen. Jedoch werden insgesamt hohen Konzentrationen negative Effekte zugeschrieben. Je nach Studie wurden unterschiedliche Marker präferiert. (siehe 2.3.4) Nach HKS waren im Blutplasma nur bei 30-54 % der untersuchten Patient*innen erhöhte TNF- α - bzw. IL-1- β -Werte nachweisbar. (138, 164) Die dargestellten Zytokine spielen somit eine Rolle im PCAS und korrelieren mit einem schlechten Outcome. Für die Detektion der systemischen Ischämie- und Reperfusionreaktion bedarf es allerdings weiterer Forschung zur Etablierung methodischer Standards.

Für den primären Endpunkt der molekularbiologischen Auswertung zeigen sich die niedrigsten Werte in allen Auswertungen (HC, Kortex jeweils TNF- α , IL-6, IL-1) in der Sham-Gruppe. Dies spricht für die Plausibilität der Messung. Gruppenunterschiede zeigen sich vereinzelt zwischen Sham und ULTVV bzw. IPPV, nicht jedoch zwischen den beiden Interventionsgruppen. Für ULTVV kann insgesamt etwas mehr Inflammation nachgewiesen werden. Hier zeigen sich TNF- α und IL-6 im HC gegenüber Sham signifikant erhöht, während für IPPV nur IL-6 im Kortex signifikant erhöht ist. Somit lässt sich zwar auf allgemein mehr zerebrale Inflammation nach HKS schließen, allerdings kein relevanter Unterschied durch die Beatmungsform feststellen. Für die Quantifizierung der molekularbiologischen Proben wurde als Referenzgen PPIA verwendet. PPIA wurde als Referenzgen in Schweinezellen bereits validiert. (274) Es wird in verschiedenen Geweben beschrieben, allerdings fehlt bisher eine konkrete Beschreibung für Gehirngewebe. (248) In vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe zeigten sich plausible

Ergebnisse unter Verwendung von PPIA. (15, 159) Eine ausführliche Validierung als Referenzgen für neuronales Gewebe sollte dennoch in zukünftigen Studien vorgenommen werden.

5.1.4 Nahinfrarot-Spektroskopie

Durch die Normierung der NIRS-Werte (BLH = 100, Sham T0 = 100) lässt sich die relative Veränderung der zerebralen Oxygenierung messen und hierdurch Rückschlüsse auf die zerebrale Durchblutung schließen. Die NIRS zeigt eine signifikante Veränderung im Messverlauf für ULTVV, IPPV und Sham. Durch Erreichen eines ROSC kommt es zur Reperfusion mit zerebraler Hyperämie. (3, 4, 18) Dies lässt sich im NIRS anhand eines Anstieges über den Ausgangswert hinaus erkennen. Allerdings besteht zwischen den Gruppen ein signifikanter Unterschied lediglich zum Zeitpunkt T0 (Sham > IPPV) und T4 (Sham > ULTVV). Durch den Anstieg in der Sham-Gruppe lässt sich zeigen, dass allein die Narkose eine zerebrale Hyperämie auslöst.

NIRS ist ein etabliertes Verfahren zum intraoperativen Neuromonitoring. Eine Korrelation von NIRS und Outcome kann für Schock (275) und CPR (276, 277) gezeigt werden. Für einen kausalen Nutzen des Einsatzes von NIRS für das Outcome gibt es aber bisher keine ausreichende Evidenz. (275, 278, 279) In einer experimentellen Studie zum hypothermen HKS konnte NIRS keinen Gruppenunterschied zwischen einer Gruppe unter Normoxie und einer unter Hyperoxie detektieren. Die Messung der oxygenierten Cytochrome a,a₃ im Gehirngewebe korrelierte allerdings signifikant mit dem histologischen Schaden. (280) In der Arbeitsgruppe der vorliegenden Dissertationsstudie zeigt sich die invasive Messung der Sauerstoffsättigung des Gehirngewebes zuverlässiger gegenüber der NIRS-Messung insbesondere bei niedrigen Sauerstoffsättigungen. (281) Aufgrund der Invasivität könnte dies jedoch Einfluss auf die spätere histopathologische Bewertung haben, sodass in der vorliegenden Dissertationsstudie die NIRS-Messung gewählt wurde. Die NIRS-Messung kann durch die Differenzen in der Positionierung, durch Alter, Schädelgeometrie, Gehirn Temperatur, Ödem oder pH beeinflusst werden. (280) Zudem kann das Signal durch die extrazerebrale Durchblutung beeinflusst werden, sodass die Detektion einer zerebralen Hypoxie eingeschränkt ist. (282)

Zusammenfassend zeigt sich in der vorliegenden Studie ULTVV als nicht unterlegen zu IPPV. Allerdings zeigen alle Outcome-Messungen Einschränkungen und sollten daher nur in der Gesamtbewertung beurteilt werden. Die überwiegend fehlende Differenz zwischen Sham- und Interventions-Tieren sollte kritisch hinterfragt werden.

5.2 Methodik

5.2.1 Versuchsdurchführung

Bei dem gewählten Versuchsaufbau handelt es sich um eine in der Arbeitsgruppe des Autors bereits etablierte Methodik. (15, 159, 208, 258) Durch direktes Auslösen eines VF mittels Stimulationskatheter wird ein plötzlicher Herztod simuliert. Ein systematisches Review zu verschiedenen HKS-Modellen zeigte, dass mit 54 % die Auslösung eines VF die häufigste verwendete Methodik ist. (260) Zur Simulation eines kardial bedingten HKS ist zudem ein (temporäres) Verschließen der Koronararterien mittels Ballonkatheter in Kombination mit elektrisch ausgelöstem VF möglich. (283) Da nach plötzlichem HKS bei zuvor Gesunden in Autopsien in 35 % der Fälle Myokardinfarkte vorlagen (284), kann ein Koronarokklusions-Modell die Pathophysiologie des kardialen HKS und somit die klinische Realität wahrscheinlich besser abbilden. Allerdings ist hierfür die Verfügbarkeit einer Koronarangiographie nötig (283), welche in dem Versuchslabor der Arbeitsgruppe für experimentelle Großtierforschung in Mainz nicht zur Verfügung steht. In Abgrenzung zur kardialen Ätiologie wird in 25 % der HKS-Modelle ein asphyktischer HKS simuliert. (260)

Die Durchführung des BLS und ALS erfolgte gemäß aktueller Leitlinien mit leichten Modifikationen. Zur besseren Standardisierung zwischen den Tieren wurde zu Versuchsbeginn eine endotracheale Intubation und im Verlauf die Thoraxkompression mittels mCPR (LUCAS 2) durchgeführt. Die Verwendung von mCPR im klinischen Setting kann erwogen werden, (6) geht allerdings mit höherer Inzidenz an Verletzungen einher (64). Im Versuchsaufbau dieser Dissertation wurde zunächst mit der mCPR Corpuls CPR gearbeitet. Aufgrund hoher Inzidenzen an thorakalen Verletzungen und fehlendem Erreichen eines ROSC wurde auf das mCPR-Gerät LUCAS 2 gewechselt. (258) Die Medikamentengabe unter CPR wurde von den Leitlinien wie folgt modifiziert: Es erfolgten eine frühere Adrenalin-Gabe (bereits nach 1. Defibrillation) und zusätzlich Vasopressin-Gaben. Aus Schweinereanimationsstudien ist bekannt, dass dies die ROSC-Wahrscheinlichkeit erhöht. (191, 285-287) Zusätzlich wurde vor Auslösen des HKS erneut medikamentös relaxiert, um Einflussfaktoren wie Schnappatmung zu reduzieren, welche die Überlebenschancen erhöhen können. (76, 288) Zur kontinuierlichen Sedierung und Analgesie wurden auch unter CPR Propofol und Fentanyl verabreicht. Aufgrund der kardiodepressiven Wirkung dieser Medikamente könnte dies die Wahrscheinlichkeit des Erreichens eines ROSC reduzieren. Vor dem Hintergrund eines möglichen Erwachens unter suffizienter CPR (117, 118) reduziert die kontinuierliche Sedierung und Analgesie jedoch potenziell die Belastung des Tieres.

Nach Erreichen eines ROSC wurde kein TTM durchgeführt. TTM sollte nach aktuellen Leitlinien durchgeführt werden, es besteht jedoch keine klare Evidenz für den Einsatz von TTM. (3, 5) TTM wird insb. zur Neuroprotektion, also zur Reduzierung des sekundären Hirnschadens eingesetzt. Bspw. hat Hypothermie einen Einfluss auf Pharmakodynamik und Bioakkumulation von IL-1-Antagonisten im Gehirn. Daher schlussfolgern manche Autor*innen, dass bei experimentellen Studien zur Untersuchung neuroprotektiver Substanzen ein TTM durchgeführt werden sollte, um die klinische Übertragbarkeit zu erhöhen. (289) Schweine haben allerdings eine erhöhte physiologische Körperkerntemperatur (38,3-39,3 °C). (290, 291) Auf TTM wurde somit bei nicht eindeutiger Evidenzlage und zur potenziellen Erhöhung eines Unterschiedes des Hirnschadens verzichtet. Eine Kühlung bei eindeutigem Fieber (> 39,9 °C) war nur bei einem Tier notwendig.

Die Versuche erfolgten gemäß dem Versuchsprotokoll. Die genannten Abweichungen von der Leitlinie wurden somit bei allen Versuchen gleichbleibend durchgeführt. Die Abweichungen können die Übertragbarkeit der Experimente auf die Klinik reduzieren.

In der IPPV-Gruppe wurden die Tiere mit einem V_t von 8-10 ml/kgKG beatmet. Seit 2005 wird ein V_t von 6-7 ml/kgKG (500-600) bei niedriger vorhandener Evidenz empfohlen. (10, 80, 81) In den aktuellen Leitlinien findet sich keine Angabe eines V_t . Es soll beatmet werden, bis sich der Brustkorb sichtbar hebt. (6) Das in der IPPV-Gruppe verwendete V_t von 8-10 ml/kgKG entspricht älteren Empfehlungen von zuletzt 2001. (9) Aufgrund einer geringen Evidenzlage zum optimalen V_t und einer geringen Standardisierung der Beatmung in der Realität (siehe 2.2.5) wurde das leicht erhöhte V_t als adäquat für eine experimentelle Untersuchung bewertet.

5.2.2 Bewertung des neurologischen Schadens

Im klinischen Setting dient eine multimodale Untersuchung zur Abschätzung der neurologischen Prognose. (3, 5) Im experimentellen Setting ist bisher kein Standard vorhanden. Eine neurologische Beurteilung wenige Tage nach ROSC (173, 174, 260) erhöht die Wahrscheinlichkeit, klinisch relevante Auswirkungen zu messen. Histologische Ergebnisse, Biomarker und apparative Ergebnisse sind dagegen Surrogatparameter und geringe Effekte auf dieser Ebene haben somit nur eine reduzierte Wahrscheinlichkeit auf Detektion klinisch relevanter Vorteile in klinischen Studien. (202, 204) Ein neurologisches Assessment setzt jedoch eine längere Nachbeobachtungszeit und eine entsprechende Laborinfrastruktur voraus. Zudem steigt die Tierbelastung hierdurch nach europäischen Richtlinien von „non-recovery“ auf mittel bis schwer. (200) Zum Erreichen einer höheren klinischen Relevanz der Ergebnisse und im Umkehrschluss Reduktion von Studien mit geringer Aussagekraft, lässt sich diese höhere Belastung jedoch tierethisch rechtfertigen.

Letztendlich muss eine Balance zwischen Kostenaufwand, vorhandener Infrastruktur, prognostischer Aussagekraft der verschiedenen Methodiken und tierethischen Aspekten gefunden werden. Die Evaluation von Surrogat-Parametern in Scores und die Validierung dieser durch klinische Assessments bilden hierfür eine wichtige Grundlage. (31, 173) Die Erstellung eines neuropathologischen Scores in dieser Dissertation sollte dem nachkommen. In Zukunft könnte dieser durch weitere Untersuchungen wie Biomarker (z. B. Neurofilament light) ergänzt werden. (133)

Für die histopathologische Auswertung ist der optimale Zeitpunkt der Organentnahme unklar. Somit ist nicht bekannt, inwiefern der histologische Schaden wenige Stunden nach HKS mit dem neurologischen Outcome korreliert. (31) In der vorliegenden Studie war in der histologischen Untersuchung HIBI feststellbar. Dies lässt auf eine ausreichende Nachbeobachtungszeit schließen. Weitere Studien sind notwendig, um die optimale Nachbeobachtungszeit z. B. mit geringem Auftreten von INC-Neuronen zu definieren.

Fixierung

Für die Fixierung des Gewebes lässt sich zwischen Perfusions- und postmortalen Fixierung unterscheiden. Die Perfusionsfixierung wird zur Reduktion von Artefakten (169) wie dark neurons (245) empfohlen. Zur Untersuchung des neuropathologischen Schadens nach HKS wird dies in verschiedenen Studien praktiziert. Diese Studien beschränken sich jedoch auf das neurologische Outcome. (173, 226) Seltener wird eine postmortale Fixierung durchgeführt. Diese korrelierte in einer Studie jedoch ebenfalls mit dem neurologischen Assessment. (292)

Entsprechend dem Laborstandard wurde in der vorliegenden Dissertation eine Fixierungszeit von mindestens 2 Monaten gewählt. In der Literatur finden sich kürzere Zeiten von einer Woche (226) bzw. mindestens 2 Wochen (173). In einem Positionspapier zum Umgang mit neurologischem Gewebe in toxikologischen Studien wird eine Fixierungszeit von mindestens 48 h empfohlen. (168) Somit kann in zukünftigen Studien eine deutlich kürzere Fixierungszeit verwendet werden.

Makroskopischer Gehirnschnitt

Zur Vorbereitung des mikroskopischen Schnitts erfolgte der makroskopische Schnitt der in Formalin eingelegten Gehirnhälfte. Dies stellt einen methodisch schwierigen Schritt dar, welcher einen relevanten Einfluss auf das Ergebnis haben kann. Der HC liegt im Temporallappen, ist von außen nicht sichtbar und eine klare äußere Landmarke zur Orientierung fehlt. Im 31 kg schweren Schwein hat er einen Durchmesser von ca. 1-1,5 mm

(Vgl. Abb. 3 Übersichtsaufnahme HC). Bei im Mittel 58 kg schweren Schweinen mit einem Gehirngewicht von im Mittel 94,5 g hat der HC eine Gesamtlänge von 17 mm (Ebene A 10,0 mm bis P 7,0 mm). (225) Die anatomischen Verhältnisse können zwischen einzelnen Tieren, je nach Alter oder bei Pathologien wie intrakranieller Blutung oder Hirnödemen variieren. Zudem kann sich durch (unabsichtliche) Variation des Schnittwinkels in drei Ebenen der Anschnitt verändern. Aufgrund dieser Einflussfaktoren bei gleichzeitig kleiner Größe der Zielstruktur HC ist somit mit unterschiedlich angeschnittenen HC-Anteilen zu rechnen. In den meisten Publikationen wird nicht näher spezifiziert, an welcher Stelle und insb. in welchem Winkel der Schnitt des HC erfolgte. (173, 226, 228, 292) In einer Studie wurde zwischen ventralem und dorsalem HC unterschieden und es fanden sich vergleichbare Ergebnisse. (173) In der Studie dieser Dissertation musste der Schnittwinkel nach anfänglich unzureichenden HC-Anschnitten korrigiert und einige Gehirnhälften erneut geschnitten werden. Hierdurch konnte ein Anschnitt aller Anteile des HC mit Ausnahme von CA3 bei zwei Tieren erreicht werden. Daher wurde CA3 in der Gesamtbewertung nicht berücksichtigt. Weiterhin war der HC bei 5 Tieren im Feinschnitt zweimal vollständig angeschnitten, wurde daher doppelt gezählt und der Mittelwert verwendet. Die Methodik wurde für zukünftige Arbeiten in der Arbeitsgruppe angepasst und bedarf der weiteren Evaluation. Aufgrund der geringen Größe des HC ist jedoch mit einem Anteil an unvollständigen oder doppelten Anschnitten zu rechnen. Auch beim Schnitt des Kortex ist auf eine korrekte Schnittführung zu achten. Durch Orientierung an äußeren Landmarken (z. B. Gyrus centralis) lässt sich hier allerdings eine bessere Standardisierung erreichen.

Für die histologische Auswertung wurde nur die linke Hemisphäre verwendet, um aus der rechten Hemisphäre molekularbiologische Proben gewinnen zu können. In einer Studie im Schwein zeigte sich jedoch beim Vergleich des histologischen Assessments beider Hemisphären kein signifikanter Unterschied. (173)

Weiterhin kann unterschieden werden zwischen einer Bewertung des gesamten Gehirnareals (173) und der Auswertung der mikroskopischen Sichtfelder mittels Zellzählung (226). Zur besseren Objektivierung der Ergebnisse wurde die Verwendung der mikroskopischen Sichtfelder festgelegt und 5 Gehirnschnitte pro Tier bewertet. Zu beachten hierbei ist, dass die Auswahl der Felder einen deutlichen Einfluss auf das Ergebnis haben kann, wenn HIBI-Neurone nur in einem kurzen Abschnitt der Hirnregion vorhanden sind. Daher sollten mehrere Areale in der gleichen Region oder mehrere Gehirnschnitte untersucht werden.

Zellzählung

Für eine zuverlässige Zellzählung bedarf es möglichst eindeutiger morphologischer Kriterien. Schon die Unterscheidung von Neuronen zu anderen Zellen im Gehirn kann Schwierigkeiten bereiten. Durch die Einführung von einem Score konnte dies verbessert und die Inter-Observer-Reliabilität erhöht werden. Hierbei schien eine dünne Schnittdicke (1 μm) die Beurteilung zu erschweren, da u. a. der Nukleolus nur selten angeschnitten war. (247) Bei der Verwendung einer Schnittdicke von 3-4 μm in dieser Dissertation konnte der Nukleolus bei regelrechten Neuronen häufiger angeschnitten werden. Eine Schnittdicke von 4 μm (173, 228) bzw. 6 μm (226) wurde auch in anderen Studien verwendet. Zusätzlich zur Zellzählung wurde der relative Anteil an HIBI-Neuronen an HIBI- und Regulären Neuronen betrachtet.

5.3 Erstellung und Validierung eines neuropathologischen Scores

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnten morphologische Kriterien zur Bewertung von HIBI erstellt und durch eine gute bis sehr gute Inter- und Intra-Observer-Reliabilität validiert werden. Bisherige Studien verwenden verschiedene Zelldefinitions und verschiedene subjektive oder semiquantitative Scores. (173, 175, 226, 227, 236, 237) Definitionen zu morphologischen Kriterien von HIBI von Hoque et al. und Stummer et al. dienten als Grundlage zur Erstellung eines Kriterienkatalogs. (226, 239) Hoque et al. nennen dabei zwar verschiedene Charakteristika von ischämischer Zytopathie, legen sich allerdings nicht auf klare Kriterien fest. (226) Stummer et al. definieren ebenfalls lediglich reguläre Neurone eindeutig. (239) Zur Beurteilung von HIBI insb. durch neuropathologisch unerfahrene Untersuchende sind daher klare Kriterien notwendig.

Auf zellulärer Ebene ist ein Point of no Return, also der Beginn der definitiv irreversiblen Zellschädigung, schwer zu definieren. (235) Eine besondere Herausforderung im Bereich der morphologischen Kriterien ist daher die Einordnung von unklaren Befunden. Dies berücksichtigt die vorliegende Arbeit durch Einführung der Kategorie INC und die Einordnung schwieriger Befunde in eine Entscheidungshilfe. Da jedoch nicht festgelegt werden kann, ob INC reversibel oder irreversibel ist (240), erfolgte eine Zählung von INC, ohne diese in die Gesamtauswertung aufzunehmen. Zwischen den Untersuchenden zeigte sich eine schlechte Übereinstimmung für INC (CA 0,2; Kortex 0,1; DG 0,12). Die Intra-Observer-Reliabilität für INC zeigte eine mittlere bis hohe Korrelation. Die Anzahl an INC-Neuronen war insgesamt gering (Abb. 14), sodass hier kleinere Unterschiede in der Zählung statistisch einen stärkeren Einfluss hatten. Daher sollte die Definition dieser Kategorie in Zukunft weiterentwickelt werden.

Die statistische Auswertung der Validierung der morphologischen Kriterien erfolgte mittels Intra-Klassen-Korrelation. Zur Bewertung des Koeffizienten liegen verschiedene Einordnungen vor. (250, 293) Hierbei wurde die konservative Einordnung verwendet, welche erst ab einem Koeffizienten über 0,9 von einer sehr guten Übereinstimmung spricht. (250) Als Hauptkriterium für die spätere Auswertung wurde der Anteil an HIBI-Neuronen gewählt. Hierfür zeigte sich eine gute bis sehr gute Inter-Observer-Reliabilität (0,82-0,94) und im Wiederholungstest eine sehr gute Korrelation. Dabei zeigt sich die beste Übereinstimmung für das CA des HC. Somit konnte nach kurzer Einweisung eine zuverlässige Anwendung des neuropathologischen Scores durch unerfahrene Untersucher*innen gezeigt werden.

Högler et al. konnten in einer Studie eine gute Übereinstimmung ihres histologischen Schadens-Scores mit einer neurologischen Untersuchung vor Tötung der Tiere feststellen. Allerdings wurden hier ebenfalls keine klaren Kriterien zur Zellbewertung angegeben. (173)

Zur Erhöhung der klinischen Relevanz wäre eine weitere Validierung der in dieser Dissertation erarbeiteten Kriterien durch Korrelation mit einer neurologischen Untersuchung sinnvoll. Da dies aktuell aus organisatorischen und strukturellen Gründen im Labor der Arbeitsgruppe dieser Studie nicht möglich ist, ist hierfür eine Kooperation mit einem anderen Labor in Zukunft denkbar.

Erste Studien untersuchten eine automatisierte Zellzählung mittels Künstlicher Intelligenz. 2014 zeigten sich noch negative Ergebnisse. (294) Neuere Erkenntnisse zeigen im Bereich von HIBI-Detektion bereits Fortschritte. (295) Jede Künstliche Intelligenz benötigt jedoch einen möglichst großen Datensatz, anhand dessen ein Lernen stattfinden kann. Somit kann eine Vielzahl von menschlich durchgeführten und dokumentierten Zellzählungen als Datensatz dienen, um hiermit perspektivisch eine Künstliche Intelligenz trainieren zu können.

5.4 Limitationen

5.4.1 Limitationen der Übertragbarkeit der Studie

Die durchgeführte Studie beinhaltet verschiedene Einschränkungen. Durch geringe ROSC-Raten in verschiedenen Subgruppen und methodische Schwierigkeiten mit u. a. der Notwendigkeit einer zwischenzeitlichen Entblindung ist die Aussagekraft stark eingeschränkt.

Limitationen der Übertragbarkeit aus dem Schweinemodell auf den Menschen ergeben sich durch das geringe Gewicht und die geringe Körpergröße. Zusätzlich zeigt bspw. Schweineblut unter Low-Flow-Bedingungen eine deutlich erhöhte Viskosität. (296) Darüber hinaus sollten weitere Artefakte beachtet werden wie interne Confounder (z. B. genetische Unterschiede, subklinische Infektion) oder externe Confounder (z. B. Transport). (297) Ein grundlegendes Problem von experimentellen Studien ist häufig die Verwendung junger Tiere ohne Komorbiditäten. Dies wird auch in der Schlaganfallforschung für eine geringe Übertragbarkeit von Studienergebnissen verantwortlich gemacht. (298) In der CPR-Forschung gibt es für das Rattenmodell erste Ansätze einer Verwendung älterer Tiere. Dies war mit längerer Zeit bis ROSC, geringerer hyperdynamischer Blutdruckreaktion und verstärkter endothelialer Aktivierung assoziiert. (160)

Weiterhin verstarben ein Tier in der IPPV-4-Gruppe und ein Sham-Tier während des Nachbeobachtungsphase. Insb. das Versterben des Sham-Tieres stellt die Frage nach der Belastung durch die 24-stündige Narkose als Einflussfaktor auf die Outcome-Parameter. Das verstorbene Sham-Tier hatte zuvor plötzlich eine massive Gasaustauschstörung entwickelt und zeigte pulmonal eine sehr hohe Sekretlast. Anhand des klinischen Bildes wurde daher der Verdacht auf die Exazerbation eines vorbestehenden Infektes gestellt. Die Überprüfung der allgemeinen Tiergesundheit vor Versuchsbeginn zum Ausschluss von z. B. Tieren mit latenten Infektionen könnte hier einen möglichen Confounder reduzieren. Das Pig major acute-phase Protein, ein Akute-Phase-Protein in Schweinen, könnte hierfür verwendet werden. (299) Die hohe Ausschlussrate der vorliegenden Studie noch vor Randomisierung (6 von 52 Tieren aufgrund technischer oder klinischer Probleme) ist vor dem Hintergrund des 3R-Ansatzes kritisch zu betrachten. Bei einer Voruntersuchung könnten möglicherweise Tiere mit Herzfehlern (hier 3 von 52 Tieren) schon vor dem Transport in das Labor ausgeschlossen werden.

Grundvoraussetzung für die kontrollierte Anwendung von ULTVV mit 100 % Sauerstoff ist das Vorhandensein eines Beatmungsgeräts und Sauerstoff. Im Rahmen des BLS ließe sich ULTVV durch kleine V_t mit einem Beatmungsbeutel und Raumluft darstellen. Ein

Beatmungsbeutel ist allerdings bei Lai*innenreanimationen selten verfügbar. Darüber hinaus werden bei Verwendung von Raumluft höhere V_t zur Oxygenierung empfohlen. (78, 79) Somit scheint ULTVV realistisch aktuell nur im ALS-Setting anwendbar.

Eine weitere Limitation der Studie ist die Verwendung eines kardialen HKS-Modells mit vorhandenen Sauerstoffreserven in Blut und Lunge. Bei respiratorischem HKS spielt die Oxygenierung und Decarboxylierung eine größere Rolle. (54) Im Bereich der Ätiologie ist weiterhin zu bedenken, dass neurologische Ursachen zur dritthäufigsten Ursache des HKS zählen. (300) Entscheidend ist dabei, dass im Falle eines neurologisch bedingten HKS ein akuter neurologischer Schaden eine veränderte Pathophysiologie nach sich zieht. Daher sind mögliche positive Effekte von ULTVV im kardialen HKS-Modell nicht zwangsläufig auf HKS mit respiratorischer oder neurologischer Ursache übertragbar.

Weiterhin ist die fehlende Verblindung der Intervention anzumerken. Diese stellt im Falle der Untersuchung komplexer Interventionen wie der Beatmungsform eine besondere Herausforderung dar. Eine einfache Verblindung lässt sich durch Abdecken des Beatmungsgeräts darstellen, sodass nur eine Person den Beatmungsmodus kennt. Allerdings könnten durch Geräusche der Beatmung und Thoraxbewegungen Rückschlüsse auf den gewählten Beatmungsmodus gezogen werden. Für eine zuverlässige Verblindung wären somit zwei Teams nötig: Ein Team für die Zeit der Intervention und ein Team für die Vorbereitung und spätere Nachbeobachtung. Dies würde einen deutlichen Kosten- und Personalmehraufwand bedeuten. Bisher wird eine Verblindung zur Intervention in experimentellen HKS-Studien nicht durchgeführt. (8)

Aufgrund eines fehlenden Goldstandards zur neuropathologischen Evaluation konnte der primäre Endpunkt vor Studienbeginn nicht konkret definiert werden. Vielmehr wurde die histologische Auswertungsmethode der Studie anhand der Gehirnschnitte dieser Studie erstellt und validiert. Durch Erstellung und Validierung des neuropathologischen Scores kann der Anteil an HIBI-Neuronen in zukünftigen Studien als (primärer) Endpunkt gewählt werden. Hierdurch sollte im Rahmen dieser Dissertation ein Beitrag zur methodischen Weiterentwicklung und Reduktion des Reporting Bias geleistet werden.

5.4.2 Allgemeine Limitationen aktueller neuroprotektiver Forschung

Die deutlichen Limitationen der Studie geben Anlass zur breiteren Reflexion der aktuellen Reanimationsforschung. Grundlage wissenschaftlichen Arbeitens ist eine wissenschaftliche Integrität und der respektvolle Umgang mit Studienteilnehmer*innen und Tieren. (301) Die Forschung, insbesondere die präklinische Tierforschung, steht auch innerhalb der

wissenschaftlichen Community in der konstruktiven Kritik. (31, 302, 303) In den letzten Jahrzehnten ist eine Stagnation im Bereich der neuroprotektiven Forschung zu verzeichnen. Trotz intensiver Forschung und teils vielversprechenden experimentellen Ansätzen scheitern in klinischen Studien insbesondere pharmakologische Ansätze zur Neuroprotektion nach HKS (16-18), Schlaganfall (268, 298, 304) oder traumatischem Hirnschaden (305, 306). Damit wurde der vor 30 Jahren in der neuroprotektiven Forschung teils vorhandene Optimismus enttäuscht. (30, 307) Den geringen Fortschritten stehen allein in den USA Investitionen von ca. 42 Millionen US-Dollar pro Jahr in der CPR-Forschung gegenüber. (308) Seit 1996 dienen die Utstein-Style-Leitlinien für einheitliches Berichten als Grundlage für die CPR-Forschung. (32) Systematische Reviews zur experimentellen CPR-Forschung zeigen jedoch nach wie vor eine große Heterogenität in Definitionen, Methodik und Reporting sowie ein hohes Bias-Risiko. (8, 17, 260, 270)

Reporting

Insbesondere wenn es sich um negative Ergebnisse handelt, werden viele Studien nicht publiziert. (309) Entsprechend einer Untersuchung an zwei deutschen Universitätsklinika wurden nur 67 %, nach Ausschluss von Dissertationen sogar nur 58 % der Tierstudien publiziert. Dies scheint problematisch aufgrund der Legitimierung von Tierforschung, Verschwendung von wissenschaftlichen Ressourcen, unnötigen Wiederholung von Tierexperimenten und inkompletter, potenziell verzerrter präklinischer Evidenz als Grundlage für klinische Studien. (19) Ergebnisse der zugrundeliegenden Studie dieser Dissertation für die Organsysteme Lunge, Niere und Leber sowie der Vergleich der beiden verwendeten mCPR wurden bereits publiziert. (220, 222, 258) Die Publikation der neurologischen Daten ist in Planung und findet aufgrund der Erstellung des neuropathologischen Scores im Rahmen dieser Dissertation zeitlich verzögert statt.

Es existieren verschiedene Tools und Checklisten zur Reduktion des Bias-Risikos und Verbesserung der Reporting-Qualität wie bspw. die ARRIVE-Leitlinie. (310-312) Es lässt sich jedoch nur eine geringe, langsame Verbesserung der adressierten Reporting-Probleme feststellen. (313-316) Neben niedrigen Publikationsraten bestehen weitere fragwürdige Praktiken wie selektives Berichten, p-Hacking (nachträgliche Anpassung der Testparameter, bis Ergebnisse signifikant werden) oder HARKing (Bildung von Hypothesen nach Feststehen der Ergebnisse). (317) Da der primäre Endpunkt histologischer Schaden zu Beginn nicht konkret definiert werden konnte, unterliegt die vorliegende Arbeit diesem Bias-Risiko. Nach dem Vorbild klinischer Studien soll die vorherige Registrierung von Tierstudien zur Bias-Reduktion und zu einer Verminderung von Duplikaten parallel durchgeführter, vergleichbarer Studien führen. (318-321)

Studiendesign

Zur Erhöhung der Studienqualität ist eine Planung bspw. anhand des PREPARE-Protokolls möglich. (297) Als konkrete Maßnahmen zur Qualitätsverbesserung von In-vivo-Forschung sollten für verschiedene Zielparameter klare Verfahrensanweisungen etabliert werden. In der vorliegenden Studie waren Zielparameter entsprechend der Leitlinie Postreanimationsbehandlung (Normoxie, Normokapnie, Normotension, Normovolämie, Normoglyämie) (5) definiert. Konkrete Verfahrensanweisungen waren bspw. für die Beatmungseinstellung nach ROSC vorhanden (ARDS-Network-Tabelle). Für andere Zielparameter war dies nicht detailliert gegeben (bspw. Temperatur). Hinzu kommen unterschiedliche Outcome-Messungen. (298) Durch einheitliches Berichten von Tier- und Versuchscharakteristika und Standardmessungen würde die Vergleichbarkeit von Studien erhöht werden. (17, 260) Basismessungen, Verfahrensanweisungen und Zielparameter für verschiedene Organsysteme sind für das Schweinmodell teilweise bereits verfügbar, werden jedoch noch nicht standardisiert eingesetzt. (165, 283, 322). Der im Rahmen dieser Dissertation erstellte Score zur Bewertung des neurologischen Schadens könnte ergänzend als eine histologische Basisuntersuchung verwendet werden.

Translation

Die Ursache von Fehlschlägen von klinischen Studien ist jedoch nicht nur auf der experimentellen Seite zu suchen. Die Untersuchung von Interventionen bei HKS ist aufgrund des schwer vorhersehbaren Auftretens, der Heterogenität der Patient*innenpopulation und vielfältiger Einflussfaktoren (siehe 2.3.3) schwierig. (323) Mediane Zeiten vom Notruf bis zur ersten Medikamentengabe von 19 bis 25 Minuten trotz medianer Ankunftszeiten des Rettungsdienstes von weniger als 9 Minuten stellen die Aussagekraft von manchen klinischen Studien in Frage. (261-264) Daher stellt die Verbesserung der Rettungssysteme nicht nur einen klinischen Vorteil, sondern auch eine wichtige Grundlage für die Qualität zukünftiger Studien dar. (323)

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation sollten erste positive Ergebnisse der neuartigen Beatmungsform Ultra-Niedrigtidalvolumenbeatmung (ULTVV) im Vergleich zur intermittierenden Positivdruckbeatmung (IPPV) weiterführend untersucht werden.

Nach Auslösen eines Kammerflimmerns und Reanimation bei 40 eingeschlossenen Landrassenschweinen zeigte sich der sekundäre Endpunkt Wiederherstellung eines spontanen Kreislaufs (ROSC) identisch zwischen ULTVV und IPPV. Für den primären Endpunkt des histologisch und molekularbiologisch nachweisbaren Schadens zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Interventionsgruppen. Hier konnte lediglich ein signifikanter Unterschied zur Sham-Kontrollgruppe mit jeweils höheren Werten für ULTVV im HC und IPPV im Kortex gezeigt werden. Somit wird die Nullhypothese angenommen. Bemerkenswerterweise war der geringste histologische Schaden in der als hypoxieempfindlich geltenden Region Cornu ammonis (CA) 1 zu finden. Die Nahinfrarot-Spektroskopie und die Inflammation im Serum zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Interventionsgruppen. Limitierend muss die niedrige Fallzahl bei geringen ROSC-Raten und das Versterben eines Sham-Tieres in der Überwachungsphase festgestellt werden. Weiterhin sind methodische Einschränkungen wie eine zwischenzeitliche Entblindung und eine ungenaue Definition des primären histologischen Endpunktes anzumerken.

Zur Qualitätssteigerung der Auswertung des neuropathologischen Schadens wurde in der vorliegenden Dissertation ein histopathologischer Score entwickelt und durch Vergleich von verschiedenen Untersuchenden validiert. Es konnte für Reguläre Neurone und Neurone mit hypoxisch-ischämischem Hirnschaden (HIBI) eine gute bis sehr gute Inter-Observer-Reliabilität und sehr gute Intra-Observer-Reliabilität festgestellt werden. Nach dem aktuellen Wissensstand des Autors ist dies die erste Validierung von morphologischen Kriterien zur Bewertung von HIBI im Schweinemodell. Weiterhin zeigte sich im Rahmen dieser Dissertation eine Unterbestimmtheit der Hippocampus(HC)-Region CA2. Diese konnte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Neuropathologie anatomisch definiert werden.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass sich die neuartige Beatmungsform ULTVV im Vergleich zur Standardbeatmung unter Reanimation im Schweinemodell hinsichtlich des neurologischen Schadens als nicht unterlegen zeigt. Die geringen Überlebensraten in der vorliegenden Studie und die diskutierten methodischen Probleme in der Reanimationsforschung geben jedoch Anlass zur weitergehenden Qualitätssteigerung in der Forschung zum Herz-Kreislauf-Stillstand.

7 Literaturverzeichnis

1. Gräsner JT, Herlitz J, Tjelmeland IBM, Wnent J, Masterson S, Lilja G, et al. European Resuscitation Council Guidelines 2021: Epidemiology of cardiac arrest in Europe. *Resuscitation*. 2021;161:61-79.
2. Gräsner JT, Wnent J, Herlitz J, Perkins GD, Lefering R, Tjelmeland I, et al. Survival after out-of-hospital cardiac arrest in Europe - Results of the EuReCa TWO study. *Resuscitation*. 2020;148:218-26.
3. Perkins GD, Callaway CW, Haywood K, Neumar RW, Lilja G, Rowland MJ, et al. Brain injury after cardiac arrest. *Lancet*. 2021;398(10307):1269-78.
4. Sandroni C, Cronberg T, Sekhon M. Brain injury after cardiac arrest: pathophysiology, treatment, and prognosis. *Intensive Care Med*. 2021:1-22.
5. Nolan JP, Sandroni C, Böttiger BW, Cariou A, Cronberg T, Friberg H, et al. European Resuscitation Council and European Society of Intensive Care Medicine Guidelines 2021: Post-resuscitation care. *Resuscitation*. 2021;161:220-69.
6. Soar J, Böttiger BW, Carli P, Couper K, Deakin CD, Djärv T, et al. European Resuscitation Council Guidelines 2021: Adult advanced life support. *Resuscitation*. 2021;161:115-51.
7. Olasveengen TM, Semeraro F, Ristagno G, Castren M, Handley A, Kuzovlev A, et al. European Resuscitation Council Guidelines 2021: Basic Life Support. *Resuscitation*. 2021;161:98-114.
8. Vissers G, Soar J, Monsieurs KG. Ventilation rate in adults with a tracheal tube during cardiopulmonary resuscitation: A systematic review. *Resuscitation*. 2017;119:5-12.
9. Handley AJ, Monsieurs KG, Bossaert LL. European Resuscitation Council Guidelines 2000 for Adult Basic Life Support. A statement from the Basic Life Support and Automated External Defibrillation Working Group(1) and approved by the Executive Committee of the European Resuscitation Council. *Resuscitation*. 2001;48(3):199-205.
10. Handley AJ, Koster R, Monsieurs K, Perkins GD, Davies S, Bossaert L. European Resuscitation Council guidelines for resuscitation 2005. Section 2. Adult basic life support and use of automated external defibrillators. *Resuscitation*. 2005;67 Suppl 1:S7-23.
11. van Schuppen H, Boomars R, Kooij FO, den Tex P, Koster RW, Hollmann MW. Optimizing airway management and ventilation during prehospital advanced life support in out-of-hospital cardiac arrest: A narrative review. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2021;35(1):67-82.
12. Bobrow BJ, Ewy GA. Ventilation during resuscitation efforts for out-of-hospital primary cardiac arrest. *Curr Opin Crit Care*. 2009;15(3):228-33.
13. Aufderheide TP. The problem with and benefit of ventilations: should our approach be the same in cardiac and respiratory arrest? *Curr Opin Crit Care*. 2006;12(3):207-12.
14. Neth MR, Idris A, McMullan J, Benoit JL, Daya MR. A review of ventilation in adult out-of-hospital cardiac arrest. *J Am Coll Emerg Physicians Open*. 2020;1(3):190-201.
15. Ruemmler R, Ziebart A, Moellmann C, Garcia-Bardon A, Kamuf J, Kuroпка F, et al. Ultra-low tidal volume ventilation-A novel and effective ventilation strategy during experimental cardiopulmonary resuscitation. *Resuscitation*. 2018;132:56-62.
16. Hassager C, Nagao K, Hildick-Smith D. Out-of-hospital cardiac arrest: in-hospital intervention strategies. *Lancet*. 2018;391(10124):989-98.
17. Nutma S, le Feber J, Hofmeijer J. Neuroprotective Treatment of Postanoxic Encephalopathy: A Review of Clinical Evidence. *Front Neurol*. 2021;12:614698.

18. Sekhon MS, Ainslie PN, Griesdale DE. Clinical pathophysiology of hypoxic ischemic brain injury after cardiac arrest: a "two-hit" model. *Crit Care*. 2017;21(1):90.
19. Wieschowski S, Biernot S, Deutsch S, Glage S, Bleich A, Tolba R, et al. Publication rates in animal research. Extent and characteristics of published and non-published animal studies followed up at two German university medical centres. *PLoS One*. 2019;14(11):e0223758.
20. Ioannidis JP, Greenland S, Hlatky MA, Khoury MJ, Macleod MR, Moher D, et al. Increasing value and reducing waste in research design, conduct, and analysis. *Lancet*. 2014;383(9912):166-75.
21. Rümmler R, Renz M, Siegert P. Chapter 34 - Modeling and investigating neuroinflammation in cardiopulmonary resuscitation in pigs. In: Martin CR, Patel VB, Preedy VR, editors. *Handbook of Animal Models in Neurological Disorders*: Academic Press; 2023. p. 419-28.
22. Renz M, Siegert P, Ruemmler R, Mohnke K, Frauenknecht K, Sommer C, et al. Arginine vasopressin receptor 1B expression allows an accurate determination of domestic pig's cornu ammonis 2: striking similarity to human histoarchitecture but unanalogous sensitivity of the various subfields to hypoxic-ischemic injury (unpublished). 2024.
23. Webb RT, Bacon D. History of Resuscitation. *International Anesthesiology Clinics*. 2017;55(3):117-29.
24. Cooper JA, Cooper JD, Cooper JM. Cardiopulmonary resuscitation: history, current practice, and future direction. *Circulation*. 2006;114(25):2839-49.
25. Aitchison R, Aitchison P, Wang E, Kharasch M. A review of cardiopulmonary resuscitation and its history. *Dis Mon*. 2013;59(5):165-7.
26. Figl M, Pelinka LE, Mauritz W. Resuscitation great. Franz Koenig and Friedrich Maass. *Resuscitation*. 2006;70(1):6-9.
27. Jude JR, Kouwenhoven WB, Knickerbocker GG. Cardiac arrest. Report of application of external cardiac massage on 118 patients. *Jama*. 1961;178:1063-70.
28. Niggebrügge HC. Die Geschichte der Beatmung – Analyse und Neubewertung am Beispiel der Geschichte des „Pulmotor“ Notfallbeatmungs- und Wiederbelebungsgeräts der Lübecker Drägerwerke. Universität Lübeck: Lübeck; 2011.
29. Takeshita H, Siesjö BK, Miller JD. *Advances in brain resuscitation*: Springer-Verlag; 1991.
30. Siesjö BK, Smith M-L. *Brain resuscitation: yesterday, today and tomorrow*. *Advances in brain resuscitation*: Springer-Verlag; 1991. p. 3-19.
31. Corbett D, Nurse S. The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. *Prog Neurobiol*. 1998;54(5):531-48.
32. Idris AH, Becker LB, Ornato JP, Hedges JR, Bircher NG, Chandra NC, et al. Utstein-style guidelines for uniform reporting of laboratory CPR research. A statement for healthcare professionals from a Task Force of the American Heart Association, the American College of Emergency Physicians, the American College of Cardiology, the European Resuscitation Council, the Heart and Stroke Foundation of Canada, the Institute of Critical Care Medicine, the Safar Center for Resuscitation Research, and the Society for Academic Emergency Medicine. *Resuscitation*. 1996;33(1):69-84.
33. Perkins GD, Jacobs IG, Nadkarni VM, Berg RA, Bhanji F, Biarent D, et al. Cardiac Arrest and Cardiopulmonary Resuscitation Outcome Reports: Update of the Utstein Resuscitation Registry Templates for Out-of-Hospital Cardiac Arrest: A Statement for Healthcare Professionals From a Task Force of the International Liaison Committee on Resuscitation (American Heart Association, European Resuscitation Council, Australian

- and New Zealand Council on Resuscitation, Heart and Stroke Foundation of Canada, InterAmerican Heart Foundation, Resuscitation Council of Southern Africa, Resuscitation Council of Asia); and the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee and the Council on Cardiopulmonary, Critical Care, Perioperative and Resuscitation. *Resuscitation*. 2015;96:328-40.
34. Nolan JP, Berg RA, Andersen LW, Bhanji F, Chan PS, Donnino MW, et al. Cardiac Arrest and Cardiopulmonary Resuscitation Outcome Reports: Update of the Utstein Resuscitation Registry Template for In-Hospital Cardiac Arrest: A Consensus Report From a Task Force of the International Liaison Committee on Resuscitation (American Heart Association, European Resuscitation Council, Australian and New Zealand Council on Resuscitation, Heart and Stroke Foundation of Canada, InterAmerican Heart Foundation, Resuscitation Council of Southern Africa, Resuscitation Council of Asia). *Resuscitation*. 2019;144:166-77.
 35. Jacobs I, Nadkarni V, Bahr J, Berg RA, Billi JE, Bossaert L, et al. Cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation outcome reports: update and simplification of the Utstein templates for resuscitation registries. A statement for healthcare professionals from a task force of the international liaison committee on resuscitation (American Heart Association, European Resuscitation Council, Australian Resuscitation Council, New Zealand Resuscitation Council, Heart and Stroke Foundation of Canada, InterAmerican Heart Foundation, Resuscitation Council of Southern Africa). *Resuscitation*. 2004;63(3):233-49.
 36. Cummins RO, Chamberlain DA, Abramson NS, Allen M, Baskett P, Becker L, et al. Recommended guidelines for uniform reporting of data from out-of-hospital cardiac arrest: the Utstein Style. Task Force of the American Heart Association, the European Resuscitation Council, the Heart and Stroke Foundation of Canada, and the Australian Resuscitation Council. *Ann Emerg Med*. 1991;20(8):861-74.
 37. Alipour J, Payandeh A. Common errors in reporting cause-of-death statement on death certificates: A systematic review and meta-analysis. *J Forensic Leg Med*. 2021;82:102220.
 38. Warming PE, Ågesen FN, Lynge TH, Jabbari R, Smits RLA, van Valkengoed IGM, et al. Harmonization of the definition of sudden cardiac death in longitudinal cohorts of the European Sudden Cardiac Arrest network - towards Prevention, Education, and New Effective Treatments (ESCAPE-NET) consortium. *Am Heart J*. 2022;245:117-25.
 39. Ha ACT, Doumouras BS, Wang CN, Tranmer J, Lee DS. Prediction of Sudden Cardiac Arrest in the General Population: Review of Traditional and Emerging Risk Factors. *Can J Cardiol*. 2022;38(4):465-78.
 40. Müller D, Agrawal R, Arntz HR. How sudden is sudden cardiac death? *Circulation*. 2006;114(11):1146-50.
 41. Carter RM, Cone DC. When is a Cardiac Arrest Non-Cardiac? *Prehosp Disaster Med*. 2017;32(5):523-7.
 42. Fischer M, Wnent J, Gräsner J, Seewald S, Brenner S, Bein B, et al. Jahresbericht des Deutschen Reanimationsregisters Außerklinische Reanimation im Notarzt-und Rettungsdienst 2022. 2023.
 43. Wong WT, Phua J, Joynt GM. Worldwide end-of-life practice for patients in ICUs. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2018;31(2):172-8.

44. Yan S, Gan Y, Jiang N, Wang R, Chen Y, Luo Z, et al. The global survival rate among adult out-of-hospital cardiac arrest patients who received cardiopulmonary resuscitation: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care*. 2020;24(1):61.
45. Schluep M, Gravesteijn BY, Stolker RJ, Endeman H, Hoeks SE. One-year survival after in-hospital cardiac arrest: A systematic review and meta-analysis. *Resuscitation*. 2018;132:90-100.
46. Grasner JT, Lefering R, Koster RW, Masterson S, Bottiger BW, Herlitz J, et al. EuReCa ONE-27 Nations, ONE Europe, ONE Registry: A prospective one month analysis of out-of-hospital cardiac arrest outcomes in 27 countries in Europe. *Resuscitation*. 2016;105:188-95.
47. Wnent J, Masterson S, Maurer H, Tjelmeland I, Herlitz J, Rosell Ortiz F, et al. European Registry of Cardiac Arrest - Study-THREE (EuReCa THREE) - An international, prospective, multi-centre, three-month survey of epidemiology, treatment and outcome of patients with out-of-hospital cardiac arrest in Europe - The study protocol. *Resusc Plus*. 2022;12:100314.
48. Wittwer MR, Armstrong T, Conway J, Ruknudeen MI, Zeitz C, Beltrame JF, et al. In-hospital mode of death after out-of-hospital cardiac arrest. *Resusc Plus*. 2022;10:100229.
49. Witten L, Gardner R, Holmberg MJ, Wiberg S, Moskowitz A, Mehta S, et al. Reasons for death in patients successfully resuscitated from out-of-hospital and in-hospital cardiac arrest. *Resuscitation*. 2019;136:93-9.
50. Sandroni C, D'Arrigo S, Callaway CW, Cariou A, Dragancea I, Taccone FS, et al. The rate of brain death and organ donation in patients resuscitated from cardiac arrest: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med*. 2016;42(11):1661-71.
51. Elmer J, Torres C, Aufderheide TP, Austin MA, Callaway CW, Golan E, et al. Association of early withdrawal of life-sustaining therapy for perceived neurological prognosis with mortality after cardiac arrest. *Resuscitation*. 2016;102:127-35.
52. Nolan JP, Neumar RW, Adrie C, Aibiki M, Berg RA, Bottiger BW, et al. 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 (Part 1). *Int Emerg Nurs*. 2009;17(4):203-25.
53. Pana R, Hornby L, Shemie SD, Dhanani S, Teitelbaum J. Time to loss of brain function and activity during circulatory arrest. *J Crit Care*. 2016;34:77-83.
54. Varvarousis D, Varvarousi G, Iacovidou N, D'Aloja E, Gulati A, Xanthos T. The pathophysiologies of asphyxial vs dysrhythmic cardiac arrest: implications for resuscitation and post-event management. *Am J Emerg Med*. 2015;33(9):1297-304.
55. Dezfalian C, Lavonas EJ. Precision Cardiac Arrest Resuscitation Based on Etiology. *Crit Care Clin*. 2020;36(4):737-52.
56. Soar J, Becker LB, Berg KM, Einav S, Ma Q, Olasveengen TM, et al. Cardiopulmonary resuscitation in special circumstances. *Lancet*. 2021;398(10307):1257-68.
57. Czerwińska-Jelonkiewicz K, Grand J, Tavazzi G, Sans-Rosello J, Wood A, Oleksiak A, et al. Acute respiratory failure and inflammatory response after out-of-hospital cardiac arrest: results of the Post-Cardiac Arrest Syndrome (PCAS) pilot study. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*. 2020;9(4_suppl):S110-s21.

58. Johnson NJ, Caldwell E, Carlbom DJ, Gaieski DF, Prekker ME, Rea TD, et al. The acute respiratory distress syndrome after out-of-hospital cardiac arrest: Incidence, risk factors, and outcomes. *Resuscitation*. 2019;135:37-44.
59. Shih JA, Robertson HK, Issa MS, Grossestreuer AV, Donnino MW, Berg KM, et al. Acute respiratory distress syndrome after in-hospital cardiac arrest. *Resuscitation*. 2022;177:78-84.
60. Johnson NJ, Carlbom DJ, Gaieski DF. Ventilator Management and Respiratory Care After Cardiac Arrest: Oxygenation, Ventilation, Infection, and Injury. *Chest*. 2018;153(6):1466-77.
61. Mai N, Miller-Rhodes K, Knowlden S, Halterman MW. The post-cardiac arrest syndrome: A case for lung-brain coupling and opportunities for neuroprotection. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2019;39(6):939-58.
62. Bossaert L, Chamberlain D. The European Resuscitation Council: its history and development. *Resuscitation*. 2013;84(10):1291-4.
63. Soar J, Nolan JP, Böttiger BW, Perkins GD, Lott C, Carli P, et al. European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2015: Section 3. Adult advanced life support. *Resuscitation*. 2015;95:100-47.
64. Gao Y, Sun T, Yuan D, Liang H, Wan Y, Yuan B, et al. Safety of mechanical and manual chest compressions in cardiac arrest patients: A systematic review and meta-analysis. *Resuscitation*. 2021;169:124-35.
65. Lurie KG, Nemergut EC, Yannopoulos D, Sweeney M. The Physiology of Cardiopulmonary Resuscitation. *Anesth Analg*. 2016;122(3):767-83.
66. Chalkias A, Arnaoutoglou E, Xanthos T. Personalized physiology-guided resuscitation in highly monitored patients with cardiac arrest-the PERSEUS resuscitation protocol. *Heart Fail Rev*. 2019;24(4):473-80.
67. Soar J, Böttiger BW, Carli P, Couper K, Deakin CD, Djärv T, et al. Erweiterte lebensrettende Maßnahmen für Erwachsene. *Notfall + Rettungsmedizin*. 2021;24(4):406-46.
68. Madar J, Roehr CC, Ainsworth S, Ersdal H, Morley C, Rüdiger M, et al. European Resuscitation Council Guidelines 2021: Newborn resuscitation and support of transition of infants at birth. *Resuscitation*. 2021;161:291-326.
69. Van de Voorde P, Turner NM, Djakow J, de Lucas N, Martinez-Mejias A, Biarent D, et al. European Resuscitation Council Guidelines 2021: Paediatric Life Support. *Resuscitation*. 2021;161:327-87.
70. Wyckoff MH, Greif R, Morley PT, Ng KC, Olasveengen TM, Singletary EM, et al. 2022 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science With Treatment Recommendations: Summary From the Basic Life Support; Advanced Life Support; Pediatric Life Support; Neonatal Life Support; Education, Implementation, and Teams; and First Aid Task Forces. *Resuscitation*. 2022;181:208-88.
71. Holmberg S, Handley A, Bahr J, Baskeit P, Bossaert L, Chamberlain D, et al. Guidelines for basic life support: A statement by the Basic Life Support Working Party of the European Resuscitation Council, 1992. *Resuscitation*. 1992;24(2):103-10.
72. Association AH. Guidelines for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiac care. Emergency Cardiac Care Committee and Subcommittees, Part II. Adult basic life support. *Jama*. 1992;268(16):2184-98.

73. Dörge V, Ocker H, Hagelberg S, Wenzel V, Idris AH, Schmucker P. Smaller tidal volumes with room-air are not sufficient to ensure adequate oxygenation during bag-valve-mask ventilation. *Resuscitation*. 2000;44(1):37-41.
74. Dörge V, Ocker H, Hagelberg S, Wenzel V, Schmucker P. Optimisation of tidal volumes given with self-inflatable bags without additional oxygen. *Resuscitation*. 2000;43(3):195-9.
75. Baskett P, Nolan J, Parr M. Tidal volumes which are perceived to be adequate for resuscitation. *Resuscitation*. 1996;31(3):231-4.
76. Idris AH. Effects of inspired gas content during respiratory arrest and cardiopulmonary resuscitation. *Crit Care Med*. 2000;28(11 Suppl):N196-8.
77. Baskett PJF, Bossaert L, Carli P, Chamberlain D, Dick W, Nolan JP, et al. Guidelines for the basic management of the airway and ventilation during resuscitation. A statement by the Airway and Ventilation Management Working Group of the European Resuscitation Council. *Resuscitation*. 1996;31(3):187-200.
78. de Latorre F, Nolan J, Robertson C, Chamberlain D, Baskett P. European Resuscitation Council Guidelines 2000 for Adult Advanced Life Support. A statement from the Advanced Life Support Working Group(1) and approved by the Executive Committee of the European Resuscitation Council. *Resuscitation*. 2001;48(3):211-21.
79. Part 3: Adult Basic Life Support. *Circulation*. 2000;102(suppl_1):I-22-I-59.
80. Koster RW, Baubin MA, Bossaert LL, Caballero A, Cassan P, Castrén M, et al. European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2010 Section 2. Adult basic life support and use of automated external defibrillators. *Resuscitation*. 2010;81(10):1277-92.
81. Perkins GD, Handley AJ, Koster RW, Castrén M, Smyth MA, Olasveengen T, et al. European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2015: Section 2. Adult basic life support and automated external defibrillation. *Resuscitation*. 2015;95:81-99.
82. Aufderheide TP, Lurie KG. Death by hyperventilation: a common and life-threatening problem during cardiopulmonary resuscitation. *Crit Care Med*. 2004;32(9 Suppl):S345-51.
83. Abella BS, Alvarado JP, Myklebust H, Edelson DP, Barry A, O'Hearn N, et al. Quality of cardiopulmonary resuscitation during in-hospital cardiac arrest. *Jama*. 2005;293(3):305-10.
84. Vissers G, Duchatelet C, Huybrechts SA, Wouters K, Hachimi-Idrissi S, Monsieurs KG. The effect of ventilation rate on outcome in adults receiving cardiopulmonary resuscitation. *Resuscitation*. 2019;138:243-9.
85. Benoit JL, Lakshmanan S, Farmer SJ, Sun Q, Gray JJ, Sams W, et al. Ventilation rates measured by capnography during out-of-hospital cardiac arrest resuscitations and their association with return of spontaneous circulation. *Resuscitation*. 2023;182:109662.
86. Neth MR, Benoit JL, Stolz U, McMullan J. Ventilation in Simulated Out-of-Hospital Cardiac Arrest Resuscitation Rarely Meets Guidelines. *Prehosp Emerg Care*. 2021;25(5):712-20.
87. Cordioli RL, Brochard L, Suppan L, Lyazidi A, Templier F, Khoury A, et al. How Ventilation Is Delivered During Cardiopulmonary Resuscitation: An International Survey. *Respir Care*. 2018;63(10):1293-301.
88. Liu YC, Qi YM, Zhang H, Walline J, Zhu HD. A survey of ventilation strategies during cardiopulmonary resuscitation. *World J Emerg Med*. 2019;10(4):222-7.

89. Wang HE, Jaureguibeitia X, Aramendi E, Nichol G, Aufderheide T, Daya MR, et al. Airway strategy and ventilation rates in the pragmatic airway resuscitation trial. *Resuscitation*. 2022;176:80-7.
90. Charlton K, McClelland G, Millican K, Haworth D, Aitken-Fell P, Norton M. The impact of introducing real time feedback on ventilation rate and tidal volume by ambulance clinicians in the North East in cardiac arrest simulations. *Resusc Plus*. 2021;6:100130.
91. Lyngby RM, Clark L, Kjoelbye JS, Oelrich RM, Silver A, Christensen HC, et al. Higher resuscitation guideline adherence in paramedics with use of real-time ventilation feedback during simulated out-of-hospital cardiac arrest: A randomised controlled trial. *Resusc Plus*. 2021;5:100082.
92. Herff H, Bowden K, Paal P, Mitterlechner T, von Goedecke A, Lindner KH, et al. Effect of decreased inspiratory times on tidal volume. Bench model simulating cardiopulmonary resuscitation. *Anaesthetist*. 2009;58(7):686-90.
93. Orso D, Vetrugno L, Federici N, Borselli M, Spadaro S, Cammarota G, et al. Mechanical Ventilation Management During Mechanical Chest Compressions. *Respir Care*. 2021;66(2):334-46.
94. Grieco DL, LJB, Drouet A, Talias I, Delisle S, Bronchti G, et al. Intrathoracic Airway Closure Impacts CO₂ Signal and Delivered Ventilation during Cardiopulmonary Resuscitation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;199(6):728-37.
95. Charbonney E, Grieco DL, Cordioli RL, Badat B, Savary D, Richard JM. Ventilation During Cardiopulmonary Resuscitation: What Have We Learned From Models? *Respir Care*. 2019;64(9):1132-8.
96. Renz M, Müllejans L, Riedel J, Mohnke K, Rissel R, Ziebart A, et al. High PEEP Levels during CPR Improve Ventilation without Deleterious Haemodynamic Effects in Pigs. *J Clin Med*. 2022;11(16).
97. Levenbrow Y, Hossain MJ, Keith JP, Burr K, Hesek A, Shaffer T. The effect of positive end-expiratory pressure on cardiac output and oxygen delivery during cardiopulmonary resuscitation. *Intensive Care Med Exp*. 2020;8(1):36.
98. Hayes MM, Ewy GA, Anavy ND, Hilwig RW, Sanders AB, Berg RA, et al. Continuous passive oxygen insufflation results in a similar outcome to positive pressure ventilation in a swine model of out-of-hospital ventricular fibrillation. *Resuscitation*. 2007;74(2):357-65.
99. Hu X, Ramadeen A, Laurent G, So PP, Baig E, Hare GM, et al. The effects of an automatic, low pressure and constant flow ventilation device versus manual ventilation during cardiovascular resuscitation in a porcine model of cardiac arrest. *Resuscitation*. 2013;84(8):1150-5.
100. McDannold R, Bobrow BJ, Chikani V, Silver A, Spaite DW, Vadeboncoeur T. Quantification of ventilation volumes produced by compressions during emergency department cardiopulmonary resuscitation. *Am J Emerg Med*. 2018;36(9):1640-4.
101. Winkler BE, Muellenbach RM, Wurmb T, Struck MF, Roewer N, Kranke P. Passive continuous positive airway pressure ventilation during cardiopulmonary resuscitation: a randomized cross-over manikin simulation study. *J Clin Monit Comput*. 2017;31(1):93-101.
102. Levenbrow Y, Hossain MJ, Keith JP, Burr K, Hesek A, Shaffer TH. Effect of positive end-expiratory pressure on additional passive ventilation generated by CPR compressions in a porcine model. *Intensive Care Med Exp*. 2021;9(1):37.

103. Fritz C, Jaeger D, Luo Y, Lardenois E, Badat B, Roquet FE, et al. IMPACT OF DIFFERENT VENTILATION STRATEGIES ON GAS EXCHANGES AND CIRCULATION DURING PROLONGED MECHANICAL CARDIO-PULMONARY RESUSCITATION IN A PORCINE MODEL. *Shock*. 2022;58(2):119-27.
104. Xu J, Khan ZU, Zhang M, Wang J, Zhou M, Zheng Z, et al. The combination of chest compression synchronized ventilation and aortic balloon occlusion improve the outcomes of cardiopulmonary resuscitation in swine. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:1057000.
105. Renz M, Müller L, Herbst M, Riedel J, Mohnke K, Ziebart A, et al. Analysis of cerebral Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha patterns following different ventilation strategies during cardiac arrest in pigs. *PeerJ*. 2023;11:e16062.
106. Kill C, Hahn O, Dietz F, Neuhaus C, Schwarz S, Mahling R, et al. Mechanical ventilation during cardiopulmonary resuscitation with intermittent positive-pressure ventilation, bilevel ventilation, or chest compression synchronized ventilation in a pig model. *Crit Care Med*. 2014;42(2):e89-95.
107. Pitcher JH, Dziodzio J, Keller J, May T, Riker RR, Seder DB. Hemodynamic, Biochemical, and Ventilatory Parameters are Independently Associated with Outcome after Cardiac Arrest. *Neurocrit Care*. 2018;29(1):69-76.
108. Robba C, Siwicka-Gieroba D, Sikter A, Battaglini D, Dąbrowski W, Schultz MJ, et al. Pathophysiology and clinical consequences of arterial blood gases and pH after cardiac arrest. *Intensive Care Med Exp*. 2020;8(Suppl 1):19.
109. Tolins ML, Henning DJ, Gaieski DF, Grossestreuer AV, Jaworski A, Johnson NJ. Initial arterial carbon dioxide tension is associated with neurological outcome after resuscitation from cardiac arrest. *Resuscitation*. 2017;114:53-8.
110. Eastwood GM. NCT03114033: Targeted Therapeutic Mild Hypercapnia After Resuscitated Cardiac Arrest (TAME). 2017.
111. Eastwood GM, Schneider AG, Suzuki S, Peck L, Young H, Tanaka A, et al. Targeted therapeutic mild hypercapnia after cardiac arrest: A phase II multi-centre randomised controlled trial (the CCC trial). *Resuscitation*. 2016;104:83-90.
112. Negovsky VA. The second step in resuscitation--the treatment of the 'post-resuscitation disease'. *Resuscitation*. 1972;1(1):1-7.
113. Nolan JP, Neumar RW, Adrie C, Aibiki M, Berg RA, Böttiger BW, et al. 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. *Resuscitation*. 2008;79(3):350-79.
114. Hoiland RL, Ainslie PN, Wellington CL, Cooper J, Stukas S, Thiara S, et al. Brain Hypoxia Is Associated With Neuroglial Injury in Humans Post-Cardiac Arrest. *Circ Res*. 2021;129(5):583-97.
115. Barker M, Sekhon M, Krychtiuk KA, van Diepen S, Alviar CL, Granger CB, et al. Targeted Temperature Management Following Out-of-Hospital Cardiac Arrest: Integrating Evidence into Real World Practice. *Canadian Journal of Cardiology*. 2023.
116. Kim TJ, Kim J-M, Lee JS, Park S-H, Jeong H-B, Choi J-K, et al. Prognostication of neurological outcome after cardiac arrest using wavelet phase coherence analysis of cerebral oxygen. *Resuscitation*. 2020;150:41-9.

117. Howard J, Lipscombe C, Beovich B, Shepherd M, Grusd E, Nudell NG, et al. Pre-hospital guidelines for CPR-Induced Consciousness (CPRIC): A scoping review. *Resusc Plus*. 2022;12:100335.
118. West RL, Otto Q, Drennan IR, Rudd S, Böttiger BW, Parnia S, et al. CPR-related cognitive activity, consciousness, awareness and recall, and its management: A scoping review. *Resusc Plus*. 2022;10:100241.
119. Youness H, Al Halabi T, Hussein H, Awab A, Jones K, Keddissi J. Review and Outcome of Prolonged Cardiopulmonary Resuscitation. *Crit Care Res Pract*. 2016;2016:7384649.
120. Fernando SM, Tran A, Cheng W, Rochweg B, Taljaard M, Vaillancourt C, et al. Pre-arrest and intra-arrest prognostic factors associated with survival after in-hospital cardiac arrest: systematic review and meta-analysis. *Bmj*. 2019;367:l6373.
121. Beekman R, Maciel CB, Balu R, Greer DM, Gilmore EJ. Neuromonitoring After Cardiac Arrest: Can Twenty-First Century Medicine Personalize Post Cardiac Arrest Care? *Neurol Clin*. 2021;39(2):273-92.
122. Lee H, Shin H, Oh J, Lim TH, Kang BS, Kang H, et al. Association between Body Mass Index and Outcomes in Patients with Return of Spontaneous Circulation after Out-of-Hospital Cardiac Arrest: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(16).
123. Ma Y, Huang L, Zhang L, Yu H, Liu B. Association between body mass index and clinical outcomes of patients after cardiac arrest and resuscitation: A meta-analysis. *Am J Emerg Med*. 2018;36(7):1270-9.
124. Ro YS, Shin SD, Song KJ, Lee EJ, Lee YJ, Kim JY, et al. Interaction effects between hypothermia and diabetes mellitus on survival outcomes after out-of-hospital cardiac arrest. *Resuscitation*. 2015;90:35-41.
125. Norman GJ, Zhang N, Morris JS, Karelina K, Berntson GG, DeVries AC. Social interaction modulates autonomic, inflammatory, and depressive-like responses to cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(37):16342-7.
126. Gaudier-Diaz MM, Haines AH, Zhang N, DeVries AC. Social influences on microglial reactivity and neuronal damage after cardiac arrest/cardiopulmonary resuscitation. *Physiol Behav*. 2018;194:437-49.
127. Cené CW, Beckie TM, Sims M, Suglia SF, Aggarwal B, Moise N, et al. Effects of Objective and Perceived Social Isolation on Cardiovascular and Brain Health: A Scientific Statement From the American Heart Association. *J Am Heart Assoc*. 2022;11(16):e026493.
128. Samtani S, Mahalingam G, Lam BCP, Lipnicki DM, Lima-Costa MF, Blay SL, et al. Associations between social connections and cognition: a global collaborative individual participant data meta-analysis. *Lancet Healthy Longev*. 2022;3(11):e740-e53.
129. Lee S, Ahn KO, Cha MI. Community-level socioeconomic status and outcomes of patients with out-of-hospital cardiac arrest: A systematic review and meta analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2021;100(3):e24170.
130. Brown TP, Booth S, Hawkes CA, Soar J, Mark J, Mapstone J, et al. Characteristics of neighbourhoods with high incidence of out-of-hospital cardiac arrest and low bystander cardiopulmonary resuscitation rates in England. *Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes*. 2019;5(1):51-62.
131. van Nieuwenhuizen BP, Oving I, Kunst AE, Daams J, Blom MT, Tan HL, et al. Socio-economic differences in incidence, bystander cardiopulmonary resuscitation and survival from out-of-hospital cardiac arrest: A systematic review. *Resuscitation*. 2019;141:44-62.

132. Beeseems SG, Blom MT, van der Pas MHA, Hulleman M, van de Glind EMM, van Munster BC, et al. Comorbidity and favorable neurologic outcome after out-of-hospital cardiac arrest in patients of 70 years and older. *Resuscitation*. 2015;94:33-9.
133. Hoiland RL, Rikhraj KJK, Thiara S, Fordyce C, Kramer AH, Skrifvars MB, et al. Neurologic Prognostication After Cardiac Arrest Using Brain Biomarkers: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurol*. 2022;79(4):390-8.
134. Cunningham CA, Coppler PJ, Skolnik AB. The immunology of the post-cardiac arrest syndrome. *Resuscitation*. 2022;179:116-23.
135. Jarczak D, Nierhaus A. Cytokine Storm-Definition, Causes, and Implications. *Int J Mol Sci*. 2022;23(19).
136. Rose-John S. Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(2).
137. interleukin 1 beta (*Sus scrofa*, pig) [Internet]. National Center for Biotechnology Information. 2022 [cited 02.01.2023]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/397122/>.
138. Peberdy MA, Andersen LW, Abbate A, Thacker LR, Gaieski D, Abella BS, et al. Inflammatory markers following resuscitation from out-of-hospital cardiac arrest-A prospective multicenter observational study. *Resuscitation*. 2016;103:117-24.
139. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*. 2007;45(2):27-37.
140. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 2011;117(14):3720-32.
141. tumor necrosis factor (*Sus scrofa*, pig) [Internet]. National Center for Biotechnology Information. 2022 [cited 02.01.2023]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/397086/>.
142. Oda Y, Tsuruta R, Kasaoka S, Inoue T, Maekawa T. The cutoff values of intrathecal interleukin 8 and 6 for predicting the neurological outcome in cardiac arrest victims. *Resuscitation*. 2009;80(2):189-93.
143. Jou C, Shah R, Figueroa A, Patel JK. The Role of Inflammatory Cytokines in Cardiac Arrest. *J Intensive Care Med*. 2020;35(3):219-24.
144. Liu X, Quan N. Microglia and CNS Interleukin-1: Beyond Immunological Concepts. *Front Neurol*. 2018;9:8.
145. Mantovani A, Dinarello CA, Molgora M, Garlanda C. Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. *Immunity*. 2019;50(4):778-95.
146. interleukin 6 beta (*Sus scrofa*, pig) [Internet]. National Center for Biotechnology Information. 2022 [cited 02.01.2023]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/399500/>.
147. Nishimoto N, Kishimoto T. Interleukin 6: from bench to bedside. *Nature Clinical Practice Rheumatology*. 2006;2(11):619-26.
148. Kang S, Kishimoto T. Interplay between interleukin-6 signaling and the vascular endothelium in cytokine storms. *Exp Mol Med*. 2021;53(7):1116-23.
149. Samborska-Sablik A, Sablik Z, Gaszynski W. The role of the immuno-inflammatory response in patients after cardiac arrest. *Arch Med Sci*. 2011;7(4):619-26.
150. Bro-Jeppesen J, Kjaergaard J, Stammet P, Wise MP, Hovdenes J, Åneman A, et al. Predictive value of interleukin-6 in post-cardiac arrest patients treated with targeted temperature management at 33 °C or 36 °C. *Resuscitation*. 2016;98:1-8.
151. Kim HH, Lee JH, Lee DH, Lee BK. Association between C-reactive protein-to-albumin ratio and 6-month mortality in out-of-hospital cardiac arrest. *Acute Crit Care*. 2022.

152. Isenschmid C, Kalt J, Gamp M, Tondorf T, Becker C, Tisljar K, et al. Routine blood markers from different biological pathways improve early risk stratification in cardiac arrest patients: Results from the prospective, observational COMMUNICATE study. *Resuscitation*. 2018;130:138-45.
153. Pekkarinen PT, Ristagno G, Wilkman E, Masson S, Latini R, Laurikkala J, et al. Procalcitonin and Presepsin as Prognostic Markers After Out-of-Hospital Cardiac Arrest. *Shock*. 2018;50(4):395-400.
154. Chaban V, Nakstad ER, Stær-Jensen H, Schjalm C, Seljeflot I, Vaage J, et al. Complement activation is associated with poor outcome after out-of-hospital cardiac arrest. *Resuscitation*. 2021;166:129-36.
155. Youngquist ST, Shah AP, Rosborough JP, Niemann JT. High Serum Tumor Necrosis Factor Levels in the Early Post-Cardiac Arrest Period Are Associated with Poor Short-Term Survival in a Swine Model of Ventricular Fibrillation. *J Interferon Cytokine Res*. 2016;36(10):575-9.
156. Gregers E, Mørk SR, Linde L, Andreassen JB, Smerup M, Kjærgaard J, et al. Extracorporeal cardiopulmonary resuscitation: a national study on the association between favourable neurological status and biomarkers of hypoperfusion, inflammation, and organ injury. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*. 2022;11(11):808-17.
157. Zelniker TA, Kaya Z, Gamerainger E, Spaich S, Stiepak J, Giannitsis E, et al. Relationship between markers of inflammation and hemodynamic stress and death in patients with out-of-hospital cardiac arrest. *Sci Rep*. 2021;11(1):9954.
158. Kernan KF, Berger RP, Clark RSB, Scott Watson R, Angus DC, Panigrahy A, et al. An exploratory assessment of serum biomarkers of post-cardiac arrest syndrome in children. *Resuscitation*. 2021;167:307-16.
159. Ruemmler R, Ziebart A, Kuropka F, Duenges B, Kamuf J, Garcia-Bardon A, et al. Bi-Level ventilation decreases pulmonary shunt and modulates neuroinflammation in a cardiopulmonary resuscitation model. *PeerJ*. 2020;8:e9072.
160. Secher N, Østergaard L, Tønnesen E, Hansen FB, Granfeldt A. Impact of age on cardiovascular function, inflammation, and oxidative stress in experimental asphyxial cardiac arrest. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2018;62(1):49-62.
161. Klein KU, Johannes A, Brückner M, Thomas R, Matthews S, Frauenknecht K, et al. Systemic PaO₂ Oscillations Cause Mild Brain Injury in a Pig Model. *Crit Care Med*. 2016;44(5):e253-63.
162. Cavaillon JM, Annane D. Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS. *J Endotoxin Res*. 2006;12(3):151-70.
163. Conway Morris A, Rynne J, Shankar-Hari M. Compartmentalisation of immune responses in critical illness: does it matter? *Intensive Care Medicine*. 2022;48(11):1617-20.
164. Adrie C, Adib-Conquy M, Laurent I, Monchi M, Vinsonneau C, Fitting C, et al. Successful cardiopulmonary resuscitation after cardiac arrest as a "sepsis-like" syndrome. *Circulation*. 2002;106(5):562-8.
165. Zhao Q, Shen Y, Li R, Wu J, Lyu J, Jiang M, et al. Cardiac arrest and resuscitation activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and results in severe immunosuppression. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2021;41(5):1091-102.
166. Zhang C, Brandon NR, Koper K, Tang P, Xu Y, Dou H. Invasion of Peripheral Immune Cells into Brain Parenchyma after Cardiac Arrest and Resuscitation. *Aging Dis*. 2018;9(3):412-25.

167. Smida T, Koller AC, Menegazzi JJ, Salcido DD. Early cytotoxic lymphocyte localization to the brain following resuscitation in a porcine model of asphyxial cardiac arrest: A pilot study. *Resusc Plus*. 2021;6:100125.
168. Bolon B, Garman RH, Pardo ID, Jensen K, Sills RC, Roulois A, et al. STP position paper: Recommended practices for sampling and processing the nervous system (brain, spinal cord, nerve, and eye) during nonclinical general toxicity studies. *Toxicol Pathol*. 2013;41(7):1028-48.
169. Garman RH. Evaluation of large-sized brains for neurotoxic endpoints. *Toxicol Pathol*. 2003;31 Suppl:32-43.
170. Björklund E, Lindberg E, Rundgren M, Cronberg T, Friberg H, Englund E. Ischaemic brain damage after cardiac arrest and induced hypothermia--a systematic description of selective eosinophilic neuronal death. A neuropathologic study of 23 patients. *Resuscitation*. 2014;85(4):527-32.
171. Fujioka M, Nishio K, Miyamoto S, Hiramatsu KI, Sakaki T, Okuchi K, et al. Hippocampal damage in the human brain after cardiac arrest. *Cerebrovasc Dis*. 2000;10(1):2-7.
172. Greer DM, Scripko PD, Wu O, Edlow BL, Bartscher J, Sims JR, et al. Hippocampal magnetic resonance imaging abnormalities in cardiac arrest are associated with poor outcome. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2013;22(7):899-905.
173. Högler S, Sterz F, Sipos W, Schratzer A, Weihs W, Holzer M, et al. Distribution of neuropathological lesions in pig brains after different durations of cardiac arrest. *Resuscitation*. 2010;81(11):1577-83.
174. Sipos W, Holzer M, Bayegan K, Janata A, Unterweger C, Graf A, et al. A novel highly observer-independent neurologic examination procedure for pigs in a model for cardiac arrest resuscitation. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*. 2008;95:28-38.
175. Fries M, Nolte KW, Coburn M, Rex S, Timper A, Kottmann K, et al. Xenon reduces neurohistopathological damage and improves the early neurological deficit after cardiac arrest in pigs. *Crit Care Med*. 2008;36(8):2420-6.
176. Schmidt-Kastner R. Genomic approach to selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia-hypoxia. *Neuroscience*. 2015;309:259-79.
177. Schmidt-Kastner R, Freund TF. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience*. 1991;40(3):599-636.
178. Hossmann KA, Oschlies U, Schwindt W, Krep H. Electron microscopic investigation of rat brain after brief cardiac arrest. *Acta Neuropathol*. 2001;101(2):101-13.
179. Schultz C, Engelhardt M. Anatomy of the hippocampal formation. *Front Neurol Neurosci*. 2014;34:6-17.
180. Förster E, Zhao S, Frotscher M. Laminating the hippocampus. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(4):259-67.
181. Braak H. On the structure of the human archicortex. *Cell and Tissue Research*. 1974;152(3):349-83.
182. Van Groen T, Wyss JM. Species differences in hippocampal commissural connections: studies in rat, guinea pig, rabbit, and cat. *J Comp Neurol*. 1988;267(3):322-34.
183. Amaral DG. A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol*. 1978;182(4 Pt 2):851-914.
184. Snyder JM, Hagan CE, Bolon B, Keene CD. 20 - Nervous System. In: Treuting PM, Dintzis SM, Montine KS, editors. *Comparative Anatomy and Histology (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2018. p. 403-44.

185. Herculano-Houzel S. The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Front Hum Neurosci.* 2009;3:31.
186. Job C, Tan SS. Constructing the mammalian neocortex: the role of intrinsic factors. *Dev Biol.* 2003;257(2):221-32.
187. Shipp S. Structure and function of the cerebral cortex. *Curr Biol.* 2007;17(12):R443-9.
188. Stärker K. Anatomische Zuordnung tiefer Hirnstrukturen auf hochauflösenden MRT-Aufnahmen fixierter Gehirnproben. Göttingen: Niedersächsische Staats- und Universitätsbibliothek: Göttingen; 2017.
189. Papadimitriou D, Xanthos T, Dontas I, Lelovas P, Perrea D. The use of mice and rats as animal models for cardiopulmonary resuscitation research. *Lab Anim.* 2008;42(3):265-76.
190. Sjöstedt E, Zhong W, Fagerberg L, Karlsson M, Mitsios N, Adori C, et al. An atlas of the protein-coding genes in the human, pig, and mouse brain. *Science.* 2020;367(6482):eaay5947.
191. Cherry BH, Nguyen AQ, Hollrah RA, Olivencia-Yurvati AH, Mallet RT. Modeling cardiac arrest and resuscitation in the domestic pig. *World J Crit Care Med.* 2015;4(1):1-12.
192. Lui JH, Hansen DV, Kriegstein AR. Development and evolution of the human neocortex. *Cell.* 2011;146(1):18-36.
193. Lind NM, Moustgaard A, Jelsing J, Vajta G, Cumming P, Hansen AK. The use of pigs in neuroscience: modeling brain disorders. *Neurosci Biobehav Rev.* 2007;31(5):728-51.
194. Swindle MM, Makin A, Herron AJ, Clubb FJ, Jr., Frazier KS. Swine as models in biomedical research and toxicology testing. *Vet Pathol.* 2012;49(2):344-56.
195. Taylor K, Alvarez LR. An Estimate of the Number of Animals Used for Scientific Purposes Worldwide in 2015. *Altern Lab Anim.* 2019;47(5-6):196-213.
196. Commission E. 2019 report on the statistics on the use of animals for scientific purposes in the Member States of the European Union in 2015-2017. Brüssel; 2019. Contract No.: Part 1.
197. Commission E. Summary Report on the statistics on the use of animals for scientific purposes in the Member States of the European Union and Norway in 2020. Brüssel; 2023. Contract No.: Part 1.
198. Gross D, Tolba RH. Ethics in Animal-Based Research. *Eur Surg Res.* 2015;55(1-2):43-57.
199. Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique: Methuen; 1959.
200. PARLAMENT DE, DER RDEU. RICHTLINIE 2010/63/EU DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES.
201. Ach JS, Borchers D. Handbuch Tierethik: Grundlagen–Kontexte–Perspektiven: Springer-Verlag; 2018.
202. Vieira de Castro AC, Olsson IA. Does the goal justify the methods? Harm and benefit in neuroscience research using animals. *Curr Top Behav Neurosci.* 2015;19:47-78.
203. Meijboom FLB, Kostrzewa E, Leenaars CHC. Joining forces: the need to combine science and ethics to address problems of validity and translation in neuropsychiatry research using animal models. *Philos Ethics Humanit Med.* 2020;15(1):1.
204. Filli L, Schwab ME. The rocky road to translation in spinal cord repair. *Ann Neurol.* 2012;72(4):491-501.
205. Yeates JW. Death is a Welfare Issue. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics.* 2010;23(3):229-41.

206. Ryou MG, Mallet RT. An In Vitro Oxygen-Glucose Deprivation Model for Studying Ischemia-Reperfusion Injury of Neuronal Cells. *Methods Mol Biol.* 2018;1717:229-35.
207. Wolters A, Reuther J, Gude P, Weber T, Theiss C, Vogelsang H, et al. Teriflunomide provides protective properties after oxygen-glucose-deprivation in hippocampal and cerebellar slice cultures. *Neural Regen Res.* 2021;16(11):2243-9.
208. Ruemmler R, Ziebart A, Garcia-Bardon A, Kamuf J, Hartmann EK. Standardized Model of Ventricular Fibrillation and Advanced Cardiac Life Support in Swine. *J Vis Exp.* 2020(155).
209. Zimmermann B. Einfluss verschiedener Blutdruckniveaus auf die cerebrale Schädigung nach cardiopulmonaler Reanimation am Großtiermodell. Johannes Gutenberg-Universität Mainz: Mainz; 2018.
210. Ruemmler R, Ziebart A, Ott T, Dirvonskis D, Hartmann EK. Flexible fibreoptic intubation in swine - improvement for resident training and animal safety alike. *BMC Anesthesiol.* 2020;20(1):206.
211. Litton E, Morgan M. The PiCCO monitor: a review. *Anaesth Intensive Care.* 2012;40(3):393-409.
212. Bootsma IT, Boerma EC, de Lange F, Scheeren TWL. The contemporary pulmonary artery catheter. Part 1: placement and waveform analysis. *J Clin Monit Comput.* 2022;36(1):5-15.
213. Bootsma IT, Boerma EC, Scheeren TWL, de Lange F. The contemporary pulmonary artery catheter. Part 2: measurements, limitations, and clinical applications. *J Clin Monit Comput.* 2022;36(1):17-31.
214. Optics O. NeoFox Phase Fluorometer - Installation and Operation Manual 2010. Available from: <https://www.oceaninsight.com/globalassets/catalog-blocks-and-images/manuals--instruction-ocean-optics/sensors/neofox-operation-manual.pdf> (19.11.23).
215. Jöbsis FF. Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. *Science.* 1977;198(4323):1264-7.
216. Hua J, Liu P, Kim T, Donahue M, Rane S, Chen JJ, et al. MRI techniques to measure arterial and venous cerebral blood volume. *Neuroimage.* 2019;187:17-31.
217. Denault A, Deschamps A, Murkin JM. A proposed algorithm for the intraoperative use of cerebral near-infrared spectroscopy. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth.* 2007;11(4):274-81.
218. Brower RG, Matthay MA, Morris A, Schoenfeld D, Thompson BT, Wheeler A. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 2000;342(18):1301-8.
219. Hartmann EK, Duenges B, Boehme S, Szczyrba M, Liu T, Klein KU, et al. Ventilation/perfusion ratios measured by multiple inert gas elimination during experimental cardiopulmonary resuscitation. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2014;58(8):1032-9.
220. Mohnke K, Buschmann V, Baller T, Riedel J, Renz M, Rissel R, et al. The Influence of Ultra-Low Tidal Volume Ventilation during Cardiopulmonary Resuscitation on Renal and Hepatic End-Organ Damage in a Porcine Model. *Biomedicines.* 2023;11(3).
221. Conzelmann PJ. Einfluss von Ultra-Niedrigtidalvolumen-Beatmung im Vergleich zur intermittierenden-Positivdruck-Beatmung auf die Endorganschädigung am Beispiel der Lunge nach experimenteller kardiopulmonaler Reanimation am Großtiermodell: Dissertation, Mainz, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2023.

222. Mohnke K, Conzelmann P, Renz M, Riedel J, Rissel R, Urmann A, et al. Ultra-low tidal volume ventilation during cardiopulmonary resuscitation shows no mitigating effect on pulmonary end-organ damage compared to standard ventilation: insights from a porcine model. *Intensive Care Med Exp.* 2023;11(1):81.
223. Baller T. Hepatische Auswirkungen einer kardiopulmonalen Reanimationbehandlung bei Anwendung einer neuartigen Beatmungsform im Schweinmodell: Dissertation, Mainz, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2023; 2023.
224. Buschmann V. Einfluss verschiedener Beatmungsformen auf die Endorganschädigung der Niere während kardiopulmonaler Reanimation am Großtiermodell: Dissertation, Mainz, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2023; 2023.
225. Félix B, Léger ME, Albe-Fessard D, Marcilloux JC, Rampin O, Laplace JP. Stereotaxic atlas of the pig brain. *Brain Res Bull.* 1999;49(1-2):1-137.
226. Hoque N, Sabir H, Maes E, Bishop S, Thoresen M. Validation of a neuropathology score using quantitative methods to evaluate brain injury in a pig model of hypoxia ischaemia. *J Neurosci Methods.* 2014;230:30-6.
227. Zille M, Farr TD, Przesdzing I, Müller J, Sommer C, Dirnagl U, et al. Visualizing cell death in experimental focal cerebral ischemia: promises, problems, and perspectives. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012;32(2):213-31.
228. Wollborn J, Steiger C, Doostkam S, Schallner N, Schroeter N, Kari FA, et al. Carbon Monoxide Exerts Functional Neuroprotection After Cardiac Arrest Using Extracorporeal Resuscitation in Pigs. *Crit Care Med.* 2020;48(4):e299-e307.
229. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):676-82.
230. Rininger A, Wayland A, Prifti V, Halterman MW. Assessment of CA1 injury after global ischemia using supervised 2D analyses of nuclear pyknosis. *J Neurosci Methods.* 2012;207(2):181-8.
231. Williams RW, Rakic P. Three-dimensional counting: an accurate and direct method to estimate numbers of cells in sectioned material. *J Comp Neurol.* 1988;278(3):344-52.
232. Northington FJ, Chavez-Valdez R, Martin LJ. Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia. *Ann Neurol.* 2011;69(5):743-58.
233. Rocha-Ferreira E, Hristova M. Plasticity in the Neonatal Brain following Hypoxic-Ischaemic Injury. *Neural Plast.* 2016;2016:4901014.
234. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation.* 2018;25(3):486-541.
235. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009;16(1):3-11.
236. Janata A, Drabek T, Magnet IA, Stezoski JP, Janesko-Feldman K, Popp E, et al. Extracorporeal versus conventional cardiopulmonary resuscitation after ventricular fibrillation cardiac arrest in rats: a feasibility trial. *Crit Care Med.* 2013;41(9):e211-22.
237. Spinelli E, Davis RP, Ren X, Sheth PS, Tooley TR, Iyengar A, et al. Thrombolytic-Enhanced Extracorporeal Cardiopulmonary Resuscitation After Prolonged Cardiac Arrest. *Crit Care Med.* 2016;44(2):e58-69.
238. Fries M, Nolte K, Demir F, Kottmann K, Timper A, Coburn M, et al. Neurocognitive performance after cardiopulmonary resuscitation in pigs. *Crit Care Med.* 2008;36(3):842-7.

239. Stummer W, Weber K, Tranmer B, Baethmann A, Kempfski O. Reduced mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil forebrain ischemia. *Stroke*. 1994;25(9):1862-9.
240. Hendrickx HH, Rao GR, Safar P, Gisvold SE. Asphyxia, cardiac arrest and resuscitation in rats. I. Short term recovery. *Resuscitation*. 1984;12(2):97-116.
241. Cammermeyer J. The importance of avoiding "dark" neurons in experimental neuropathology. *Acta Neuropathologica*. 1961;1(3):245-70.
242. Cohen EB, Pappas GD. Dark profiles in the apparently-normal central nervous system. A problem in the electron microscopic identification of early anterograde axonal degeneration. *J Comp Neurol*. 1969;136(4):375-96.
243. Csordás A, Mázló M, Gallyas F. Recovery versus death of "dark" (compacted) neurons in non-impaired parenchymal environment: light and electron microscopic observations. *Acta Neuropathol*. 2003;106(1):37-49.
244. Kövesdi E, Pál J, Gallyas F. The fate of "dark" neurons produced by transient focal cerebral ischemia in a non-necrotic and non-excitotoxic environment: neurobiological aspects. *Brain Res*. 2007;1147:272-83.
245. Jortner BS. The return of the dark neuron. A histological artifact complicating contemporary neurotoxicologic evaluation. *Neurotoxicology*. 2006;27(4):628-34.
246. Kherani ZS, Auer RN. Pharmacologic analysis of the mechanism of dark neuron production in cerebral cortex. *Acta Neuropathol*. 2008;116(4):447-52.
247. García-Cabezas M, John YJ, Barbas H, Zikopoulos B. Distinction of Neurons, Glia and Endothelial Cells in the Cerebral Cortex: An Algorithm Based on Cytological Features. *Front Neuroanat*. 2016;10:107.
248. PPIA peptidylprolyl isomerase A (Sus scrofa, pig) [Internet]. National Center for Biotechnology Information. 2023 [cited 28.06.2023]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/397637/#gene-expression>.
249. Shrout PE, Fleiss JL. Intraclass correlations: uses in assessing rater reliability. *Psychol Bull*. 1979;86(2):420-8.
250. Koo TK, Li MY. A guideline of selecting and reporting intraclass correlation coefficients for reliability research. *Journal of chiropractic medicine*. 2016;15(2):155-63.
251. Schermelleh-Engel K, Werner CS. SPSS-Beispiel zu Kapitel 6: Methoden der Reliabilitätsbestimmung. 2010.
252. Kuckartz U, Rädiker S, Ebert T, Schehl J. Statistik: eine verständliche Einführung: Springer-Verlag; 2013.
253. Schminder E, Ziegler M, Danay E, Beyer L, Bühner M. Is it really robust? Reinvestigating the robustness of ANOVA against violations of the normal distribution. *European Research Journal of Methods for the Behavioral and Social Sciences*. 2010;6(4):147-51.
254. Kruskal WH, Wallis WA. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American statistical Association*. 1952;47(260):583-621.
255. Friedman M. The use of ranks to avoid the assumption of normality implicit in the analysis of variance. *Journal of the American statistical Association*. 1937;32(200):675-701.
256. Cohen J. Statistical Power Analysis for Behavioral sciences. Lawrence Erlbaum Associates. 1988;2.
257. Field A. Discovering statistics using IBM SPSS statistics: sage; 2018.

258. Ruemmler R, Stein J, Duenges B, Renz M, Hartmann EK. Standardized post-resuscitation damage assessment of two mechanical chest compression devices: a prospective randomized large animal trial. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2021;29(1):79.
259. Tan D, Sun J, Geng P, Ling B, Xu J, Walline J, et al. Duration of cardiac arrest requires different ventilation volumes during cardiopulmonary resuscitation in a pig model. *J Clin Monit Comput.* 2020;34(3):525-33.
260. Vognsen M, Fabian-Jessing BK, Secher N, Løfgren B, Dezfulian C, Andersen LW, et al. Contemporary animal models of cardiac arrest: A systematic review. *Resuscitation.* 2017;113:115-23.
261. Dorian P, Cass D, Schwartz B, Cooper R, Gelaznikas R, Barr A. Amiodarone as compared with lidocaine for shock-resistant ventricular fibrillation. *N Engl J Med.* 2002;346(12):884-90.
262. Kudenchuk PJ, Brown SP, Daya M, Rea T, Nichol G, Morrison LJ, et al. Amiodarone, Lidocaine, or Placebo in Out-of-Hospital Cardiac Arrest. *N Engl J Med.* 2016;374(18):1711-22.
263. Kudenchuk PJ, Cobb LA, Copass MK, Cummins RO, Doherty AM, Fahrenbruch CE, et al. Amiodarone for resuscitation after out-of-hospital cardiac arrest due to ventricular fibrillation. *N Engl J Med.* 1999;341(12):871-8.
264. Perkins GD, Ji C, Deakin CD, Quinn T, Nolan JP, Scopin C, et al. A Randomized Trial of Epinephrine in Out-of-Hospital Cardiac Arrest. *N Engl J Med.* 2018;379(8):711-21.
265. Semeraro F, Greif R, Böttiger BW, Burkart R, Cimpoesu D, Georgiou M, et al. European Resuscitation Council Guidelines 2021: Systems saving lives. *Resuscitation.* 2021;161:80-97.
266. Hessulf F, Herlitz J, Rawshani A, Aune S, Israelsson J, Södersved-Källestedt ML, et al. Adherence to guidelines is associated with improved survival following in-hospital cardiac arrest. *Resuscitation.* 2020;155:13-21.
267. Giuffrida MA. Type II error and statistical power in reports of small animal clinical trials. *J Am Vet Med Assoc.* 2014;244(9):1075-80.
268. Sena E, van der Worp HB, Howells D, Macleod M. How can we improve the pre-clinical development of drugs for stroke? *Trends Neurosci.* 2007;30(9):433-9.
269. Button KS, Ioannidis JP, Mokrysz C, Nosek BA, Flint J, Robinson ES, et al. Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14(5):365-76.
270. Fabian-Jessing BK, Vallentin MF, Secher N, Hansen FB, Dezfulian C, Granfeldt A, et al. Animal models of cardiac arrest: A systematic review of bias and reporting. *Resuscitation.* 2018;125:16-21.
271. Kill C, Galbas M, Neuhaus C, Hahn O, Wallot P, Kesper K, et al. Chest Compression Synchronized Ventilation versus Intermittent Positive Pressure Ventilation during Cardiopulmonary Resuscitation in a Pig Model. *PLoS One.* 2015;10(5):e0127759.
272. Duchatelet C, Kalmar AF, Monsieurs KG, Hachimi-Idrissi S. Chest compressions during ventilation in out-of-hospital cardiac arrest cause reversed airflow. *Resuscitation.* 2018;129:97-102.
273. Ruiz de Gauna S, Gutiérrez JJ, Ruiz J, Leturiondo M, Azcarate I, González-Otero DM, et al. The impact of ventilation rate on end-tidal carbon dioxide level during manual cardiopulmonary resuscitation. *Resuscitation.* 2020;156:215-22.

274. Xie CD, Wang B, Shen ZJ, Yao WY, Ao H, Li B, et al. Validation of the Reference Genes for the Gene Expression Studies in Different Cell Lines of Pig. *Biomed Res Int.* 2021;2021:5364190.
275. Varis E, Pettilä V, Wilkman E. Near-Infrared Spectroscopy in Adult Circulatory Shock: A Systematic Review. *J Intensive Care Med.* 2020;35(10):943-62.
276. Cournoyer A, Iseppon M, Chauny JM, Denault A, Cossette S, Notebaert É. Near-infrared Spectroscopy Monitoring During Cardiac Arrest: A Systematic Review and Meta-analysis. *Acad Emerg Med.* 2016;23(8):851-62.
277. Laurikkala J, Aneman A, Peng A, Reinikainen M, Pham P, Jakkula P, et al. Association of deranged cerebrovascular reactivity with brain injury following cardiac arrest: a post-hoc analysis of the COMACARE trial. *Crit Care.* 2021;25(1):350.
278. Yu Y, Zhang K, Zhang L, Zong H, Meng L, Han R. Cerebral near-infrared spectroscopy (NIRS) for perioperative monitoring of brain oxygenation in children and adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018;1(1):Cd010947.
279. Hansen ML, Hyttel-Sørensen S, Jakobsen JC, Gluud C, Kooi EMW, Mintzer J, et al. Cerebral near-infrared spectroscopy monitoring (NIRS) in children and adults: a systematic review with meta-analysis. *Pediatr Res.* 2022.
280. Nollert G, Jonas RA, Reichart B. Optimizing cerebral oxygenation during cardiac surgery: a review of experimental and clinical investigations with near infrared spectrophotometry. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2000;48(4):247-53.
281. García-Bardon A, Kamuf J, Ziebart A, Liu T, Krebs N, Dünge B, et al. Levosimendan increases brain tissue oxygen levels after cardiopulmonary resuscitation independent of cardiac function and cerebral perfusion. *Sci Rep.* 2021;11(1):14220.
282. Soehle M, Langer J, Schindler E, Manekeller S, Coburn M, Thudium M. The effect of extracerebral contamination on near infrared spectroscopy as revealed during organ donation: A prospective observational study in brain dead organ donors. *Anesthesiology.* 2023.
283. Vammen L, Munch Johannsen C, Magnussen A, Povlsen A, Riis Petersen S, Azizi A, et al. Cardiac Arrest in Pigs With 48 hours of Post-Resuscitation Care Induced by 2 Methods of Myocardial Infarction: A Methodological Description. *J Am Heart Assoc.* 2021;10(23):e022679.
284. Holmgren C, Abdon NJ, Bergfeldt L, Edvardsson N, Herlitz J, Karlsson T, et al. Out-of-hospital cardiac arrest: Causes according to autopsy and electrocardiography - Analysis of 781 patients with neither hospital care nor prescribed medication during the preceding two years. *Resuscitation.* 2020;150:65-71.
285. Choi DH, Hong KJ, Kim KH, Shin SD, Song KJ, Kim Y, et al. Effect of first epinephrine administration time on cerebral perfusion pressure and cortical cerebral blood flow in a porcine cardiac arrest model. *Resuscitation.* 2023:109969.
286. Song NE, Kim KH, Hong KJ. Effect of no-flow period on the vasopressor effect of initial epinephrine administration in cardiac arrest. *Am J Emerg Med.* 2024;75:154-9.
287. Zuercher M, Kern KB, Indik JH, Loedl M, Hilwig RW, Ummenhofer W, et al. Epinephrine improves 24-hour survival in a swine model of prolonged ventricular fibrillation demonstrating that early intraosseous is superior to delayed intravenous administration. *Anesth Analg.* 2011;112(4):884-90.
288. Lin L, Wang P, Zheng H, Zhong Z, Zhuansun Y, Yang Z, et al. RESPIRATORY MECHANICS AND NEURAL RESPIRATORY DRIVE OF UNTREATED GASPING DURING CARDIAC ARREST IN A PORCINE MODEL. *Shock.* 2023;59(6):948-54.

289. Chevin M, Guiraut C, Sébire G. Effect of hypothermia on interleukin-1 receptor antagonist pharmacodynamics in inflammatory-sensitized hypoxic-ischemic encephalopathy of term newborns. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):214.
290. Koch F, Pieper R, Fischer-Tenhagen C. [Body temperature measurement in pigs: Are infrared thermometers a non-invasive alternative?]. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*. 2023;51(2):84-92.
291. Baumgartner W. *Klinische Propädeutik der Haus-und Heimtiere*. Vol. 8. aktualisierte Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag; 2014.
292. Babini G, Grassi L, Russo I, Novelli D, Boccardo A, Luciani A, et al. Duration of Untreated Cardiac Arrest and Clinical Relevance of Animal Experiments: The Relationship Between the "No-Flow" Duration and the Severity of Post-Cardiac Arrest Syndrome in a Porcine Model. *Shock*. 2018;49(2):205-12.
293. Cicchetti DV. Guidelines, criteria, and rules of thumb for evaluating normed and standardized assessment instruments in psychology. *Psychological assessment*. 1994;6(4):284.
294. Schmitz C, Eastwood BS, Tappan SJ, Glaser JR, Peterson DA, Hof PR. Current automated 3D cell detection methods are not a suitable replacement for manual stereologic cell counting. *Frontiers in Neuroanatomy*. 2014;8.
295. Bhattacharya S, Bennet L, Davidson JO, Unsworth CP. A novel approach to segment cortical neurons in histological images of the near-term fetal sheep brain model. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*. 2020;2020:1051-4.
296. Ecker P, Sparer A, Lukitsch B, Elenkov M, Seltenhammer M, Crevenna R, et al. Animal blood in translational research: How to adjust animal blood viscosity to the human standard. *Physiol Rep*. 2021;9(10):e14880.
297. Smith AJ. Guidelines for planning and conducting high-quality research and testing on animals. *Lab Anim Res*. 2020;36:21.
298. Goenka L, Uppugunduri Satyanarayana CR, S SK, George M. Neuroprotective agents in Acute Ischemic Stroke-A Reality Check. *Biomed Pharmacother*. 2019;109:2539-47.
299. Piñeiro M, Morales J, Vizcaíno E, Murillo JA, Klauke T, Petersen B, et al. The use of acute phase proteins for monitoring animal health and welfare in the pig production chain: the validation of an immunochromatographic method for the detection of elevated levels of pig-MAP. *Meat Sci*. 2013;95(3):712-8.
300. Nazerian P, De Stefano G, Lumini E, Fucini P, Nencioni A, Paladini B, et al. Comparison of out of hospital cardiac arrest due to acute brain injury vs other causes. *Am J Emerg Med*. 2022;51:304-7.
301. Forschungsgemeinschaft D. *Leitlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis*. Kodex, Bonn. 2019.
302. Altman DG. The scandal of poor medical research. *Bmj*. 1994;308(6924):283-4.
303. Chalmers I, Bracken MB, Djulbegovic B, Garattini S, Grant J, Gülmezoglu AM, et al. How to increase value and reduce waste when research priorities are set. *Lancet*. 2014;383(9912):156-65.
304. Schmidt-Pogoda A, Bonberg N, Koecke MHM, Strecker JK, Wellmann J, Bruckmann NM, et al. Why Most Acute Stroke Studies Are Positive in Animals but Not in Patients: A Systematic Comparison of Preclinical, Early Phase, and Phase 3 Clinical Trials of Neuroprotective Agents. *Ann Neurol*. 2020;87(1):40-51.

305. Gruenbaum SE, Zlotnik A, Gruenbaum BF, Hersey D, Bilotta F. Pharmacologic Neuroprotection for Functional Outcomes After Traumatic Brain Injury: A Systematic Review of the Clinical Literature. *CNS Drugs*. 2016;30(9):791-806.
306. Maas AIR, Menon DK, Adelson PD, Andelic N, Bell MJ, Belli A, et al. Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *Lancet Neurol*. 2017;16(12):987-1048.
307. Ropper AH. Neurological intensive care: past lessons, current accomplishments, future directions. *Advances in Brain Resuscitation*: Springer; 1991. p. 301-14.
308. Coute RA, Panchal AR, Mader TJ, Neumar RW. National Institutes of Health-Funded Cardiac Arrest Research: A 10-Year Trend Analysis. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(7).
309. Schmucker C, Schell LK, Portalupi S, Oeller P, Cabrera L, Bassler D, et al. Extent of Non-Publication in Cohorts of Studies Approved by Research Ethics Committees or Included in Trial Registries. *PLOS ONE*. 2014;9(12):e114023.
310. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2010;8(6):e1000412.
311. Hooijmans CR, Rovers MM, de Vries RB, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M, Langendam MW. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med Res Methodol*. 2014;14:43.
312. Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2020;18(7):e3000410.
313. Leung V, Rousseau-Blass F, Beauchamp G, Pang DSJ. ARRIVE has not ARRIVED: Support for the ARRIVE (Animal Research: Reporting of in vivo Experiments) guidelines does not improve the reporting quality of papers in animal welfare, analgesia or anesthesia. *PLoS One*. 2018;13(5):e0197882.
314. Alemán-Laporte J, Alvarado G, Sa Garcia-Gomes M, Fonseca Brasil Antiorio AT, Zúñiga-Montero M, Cabrera Mori CM. Quality of Adherence to the ARRIVE Guidelines in the Material and Methods Section in Studies Where Swine Were Used as Surgical Biomodels: A Systematic Review (2013-2018). *Animals (Basel)*. 2019;9(11).
315. Kousholt BS, Præstegaard KF, Stone JC, Thomsen AF, Johansen TT, Ritskes-Hoitinga M, et al. Reporting quality in preclinical animal experimental research in 2009 and 2018: A nationwide systematic investigation. *PLoS One*. 2022;17(11):e0275962.
316. Granfeldt A, Nolan JP, Ristagno G. Resuscitation Plus: The right journal for a new dawn for experimental resuscitation science research. *Resusc Plus*. 2020;3:100019.
317. Ellis RJ. Questionable Research Practices, Low Statistical Power, and Other Obstacles to Replicability: Why Preclinical Neuroscience Research Would Benefit from Registered Reports. *eNeuro*. 2022;9(4).
318. van der Naald M, Chamuleau SAJ, Menon JML, de Leeuw W, de Haan J, Duncker DJ, et al. Preregistration of animal research protocols: development and 3-year overview of preclinicaltrials.eu. *BMJ Open Sci*. 2022;6(1):e100259.
319. van der Naald M, Wenker S, Doevendans PA, Wever KE, Chamuleau SAJ. Publication rate in preclinical research: a plea for preregistration. *BMJ Open Sci*. 2020;4(1):e100051.
320. Heintz C, Scholman-Végh AMD, Mellor D, Schönfelder G, Strech D, Chamuleau S, et al. Declaration of common standards for the preregistration of animal research-speeding up the scientific progress. *PNAS Nexus*. 2022;1(1):pgac016.
321. Bert B, Heintz C, Chmielewska J, Schwarz F, Grune B, Hensel A, et al. Refining animal research: The Animal Study Registry. *PLoS Biol*. 2019;17(10):e3000463.

322. Bro-Jeppesen J, Johansson PI, Kjaergaard J, Wanscher M, Ostrowski SR, Bjerre M, et al. Level of systemic inflammation and endothelial injury is associated with cardiovascular dysfunction and vasopressor support in post-cardiac arrest patients. *Resuscitation*. 2017;121:179-86.
323. Berg KM. The limitations of evidence: increasing data and increasing doubt in the treatment of cardiac arrest. *Curr Opin Crit Care*. 2020;26(6):617-21.

8 Anhang

8.1 Protokoll des Instituts für Neuropathologie zur HE-Färbung

1. Schnitte Entparaffinieren
2. Hämalun 3 min
3. Fließend wässern 10 min
4. 96 % Ethanol 20 sec (ca.)
5. Eosin 1 min
6. 2x 96 % Ethanol 2x 1 min (ca.)
7. 2x 100 % Ethanol 2x 1 min (ca.)
8. 3x Xylol 3x 1 min
9. Eindecken mit Cytoseal XYL (Expredia, Essendonk, NLD) und Deckgläschen

8.2 Protokoll des Instituts für Neuropathologie zur Nissl-Färbung

1. Schnitte Entparaffinieren mit Aqua (destilliert)
2. 2 % wässrige Kresylechtviolett Lösung mit doppeltem Filterpapier filtrieren 5 min
3. Mit Aqua (destilliert) spülen 1 min
4. 70 % Ethanol mit einigen Tropfen Eisessig kurz
5. 2x 96 % Ethanol zum differenzieren einige Sek - 1 min
6. 2x 100 % Ethanol einige Sek - 1 min
7. Xylol 1 min (ca.)
8. Eindecken mit Cytoseal XYL (Expredia, Essendonk, NLD) und Deckgläschen

Im Ergebnis zeigen sich Zellkerne und Nissl-Substanz violett, Nervenzellen ganz schwach blau und der Rest farblos.

8.3 Zielgen-Primer für PCR

Tabelle 10: Zielgen-Primer für PCR

Zielgen	Nukleosidfrequenz	Definition	Version
TNFalpha (Forward)	CCCAGAAggAAgAgTTTCCA	Sus scrofa tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2) (TNF), mRNA.	NM_214022
TNFalpha (Reverse)	CggCTTTgACATTggCTACA		
IL6 (Sensor)	CCAATCTgggTTCAATCAggA	Sus scrofa interleukin 6 (interferon, beta 2) (IL6), mRNA.	NM_214399
IL6 (Anker)	gTggTggCTTTgTCTggATTC		
IL1b (Foward)	ACCCTgCAgCTggAggAT	Sus scrofa interleukin 1, beta (IL1B), mRNA	NM_214055
IL1b (Reverse)	CCTTTggAgTTTCCCAGgA		
PPIA (Sensor)	CTTTCACAgAATAATTCCAggATT	Sus scrofa peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) (PPIA), mRNA.	NM_214353
PPIA (Anker)	ggACAAGATgCCAggACC		

8.4 Programm zum Zielgennachweis mittels LightCycler

Material:

0,25 µl Primer F

0,25 µl Primer R

5 µl Mastermix (FastStart Taq Polymerase, PCR-Puffer, dNTP-Mix, MgCl₂),
5-fach konzentriert

4,5 µl Wasser (H₂O)

1 µl cDNA

Programm:

AbsGreen 58 °C - 10s - 15s

Tabelle 11: Programm zum Zielgennachweis mittels LightCycler

	Temperatur	Zeit	Einheit	Zyklen
		(Zeit)		
Präinkubation	95 °C	15	min	
Denaturierung	95 °C	10	sec	
Annealing	58 °C	10	sec	50
Extension	72 °C	15	sec	
Meling	95 °C	5	sec	
	55 °C	1	min	1
	97 °C (Slope = 2,2 °C/sec)			
Cooling	40 °C	10	sec	1

8.5 R-Code zur Errechnung der Inter-Rater-Korrelation

The ICC-value for the **inter-rater reliability** is calculated using

- * a twoway random-effects model,
- * the single rater type,
- * the absolute agreement definition.

We evaluate the inter-rater reliability of the **first assessment**.

```
``(r)
#####
# function my_icc()
#####
tmp <- data %>%
  pivot_wider(
    names_from = "Untersucher",
    values_from = "Prop_HIBI",
    names_prefix = "U_"
  ) %>%
  filter(Auswertung == 1)
p.round <- function(p) {
  out <- ifelse(p < 0.001, "< 0.001", round(p,3))
  return(out)}
my_icc <- function(region) {
  df <- tmp %>%
    filter(Region %in% region) %>%
    select(-Auswertung,-Region,-Bild)

  erg <- irr::icc(
    df,
    model = "twoway", # both subjects and raters are considered as random effects
    type = "agreement",
    unit = "single")
  out <- c(
    paste(round(erg$value,2), " (", round(erg$lbound,2), "-", round(erg$subound,2), ")"),
    p.round(erg$p.value))
  return(out)}
`(r)
```

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, welche mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt **Herrn PD Dr. Robert Rümmler**. Neben der Überlassung des Themas und der fachlich kompetenten Anleitung, stand er immer schnell mit einem hilfreichen, kritischen Rat zur Seite und begleitete so exzellent meine Promotionsarbeit. Danken möchte ich **Herrn PD Dr. Robert Rümmler** und **Herrn Prof. Dr. Erik Hartmann** zudem für die persönlichen Empfehlungen für die Einwerbung der Stipendien. Weiterhin möchte ich **Frau Prof. Dr. Anja Harder** für die Begutachtung meiner Dissertationsschrift danken.

Die Bearbeitung dieses wissenschaftlichen Projektes wäre zudem nicht ohne die arbeitsteilige Mitarbeit vieler Kolleg*innen möglich gewesen. Daher möchte ich **Frau Dr. Miriam Renz**, **Frau Prof. Dr. Anja Harder** und **Frau PD. Dr. Katrin Frauenknecht** für den fachlichen Austausch zu Fragen der neuropathologischen Auswertung danken. Weiterhin gilt mein Dank meinen Mit-Doktorand*innen, der Arbeitsgruppe und den unterstützenden Kolleg*innen im Labor und der Neuropathologie. **Frau Dagmar Dirvonskis** gilt zudem mein besonderer Dank, da sie mit ihrer langjährigen Erfahrung stets einen guten Tipp parat und ein offenes Ohr für mich hatte.

Vielen Dank auch an Herrn Brahim Aboulmaouahib und *(aus Datenschutzgründen gelöscht)* für die statistische Beratung.

Weiterhin möchte ich der Deutschen Herzstiftung e. V. für das Kaltenbach-Doktorandenstipendium und der Mainz Research School of Translational Biomedicine für das MAInz-DOC-Promotionsstipendium danken. Die finanzielle Unterstützung gab mir den zeitlichen Freiraum, mich intensiv meiner Forschungsarbeit zu widmen.

Abschließend möchte ich meinen Schwestern Patricia und Sophia Siegert, meiner Mutter Christine Siegert und meinen Freunden danken. Mit eurem wertvollen Zuspruch habt ihr mich auf meinem bisherigen Lebensweg begleitet und mir stets Mut zugesprochen.

Tabellarischer Lebenslauf

