

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemeine, Unfall- Hand und Plastische Chirurgie,
der Ludwig-Maximilians-Universität München,
Direktor: Prof. Dr. med. W. Böcker

Analyse der mRNA-Expression immunkompetenter Zellen nach primär erfolgreicher kardiopulmonaler Reanimation

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Martina Melanie Williamson
aus Kirchheim/Teck

2016

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. K-G. Kanz

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. T. Borghaus

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. med. V. Bogner-Flatz

Dekan: Prof. Dr. med. dent. R. Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 14.01.2016

Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
1.1. Herz-Kreislaufstillstand	3
1.2. Immunreaktion nach CPR	5
1.3. Postresuscitation syndrome	6
1.4. Zytokine	10
1.4.1 Proinflammatorische Zytokine, Tumornekrosefaktor-alpha, Interleukin-8	11
1.4.2 Antiinflammatorische Zytokine, Interleukin-10, Interleukin-1 Rezeptorantagonist	13
1.5. Funktionsweise und Anwendung der hypothermischen Therapie	16
2. Fragestellung	20
3. Patienten und Methoden	22
3.1. Patientenkollektiv, klinische Daten und Score erfassung	22
3.2. Quantitative Genexpressionsanalysen	24
3.2.1 PAXgene® Blood RNA System; mRNA-Isolierung aus Vollblut	24
3.2.2 cDNA-Synthese	26
3.2.3 Realtime-PCR, quantitative Genexpressionsanalyse	29
3.3. Statistische Auswertung	30
4. Ergebnisse	32
4.1. Präklinische und klinische Patientendaten	32
4.2. Quantitative Genexpressionsanalysen	35
4.2.1 Zeitlicher Verlauf zur Expressionsdynamik	35
4.2.2 Proinflammatorische Zytokine, TNF- α , Interleukin-8	35
4.2.3 Antiinflammatorische Zytokine, Interleukin-10, Interleukin-1 Rezeptorantagonist	37
4.3. Korrelation MOF-Score und Genanalysen	39
4.4. Vergleich der Patientengruppen hinsichtlich des Überlebens/ Versterbens	43
4.4.1 Proinflammatorische Zytokine	44
4.4.2 Antiinflammatorische Zytokine	45
4.5. Vergleich Hypothermie versus Normothermie	48

5. Diskussion	52
5.1. Studiendesign	52
5.2. Quantitative Genexpressionsanalysen	59
5.3. Expressionsdynamik MOF-Score und Genanalysen	64
5.4. Expressionsdynamik in Abhängigkeit Überlebt / Verstorben	65
5.5. Expressionsdynamik in der therapeutischen Hypothermie	67
6. Zusammenfassung	69
7. Literaturverzeichnis	72
8. Danksagung	84

1. Einleitung

1.1. Herz-Kreislaufstillstand

Die Ursachen die zu einem Herz-Kreislauf-Versagen führen und eine anschließende kardiopulmonale Reanimation erforderlich machen können vielseitig sein. Hauptursache für ein Kreislaufversagen sind jedoch Herzinfarkt und Lungenembolie und können mit einer letalen Arrhythmie einhergehen. Patienten, die einen Herz-Kreislaufstillstand erleiden, befinden sich in einem lebensbedrohlichen Zustand, der nur in den ersten Minuten durch geeignete Maßnahmen reversibel behoben werden kann (1).

Die außerklinischen Maßnahmen und die gesundheitliche Aufklärung zum Thema Herz-Kreislaufstillstand werden zunehmend intensiviert und tragen zu einer Sensibilisierung der Bevölkerung bei. Darüber hinaus wird auch die außerklinische Erstversorgung stetig verbessert, beispielsweise durch Schulung von Flugpersonal und Bereitstellung von halbautomatischen Defibrillatoren in U-Bahnstationen und Bahnhöfen. Auch die präklinische Versorgung der Patienten durch eine stetig verbessernde Infrastruktur des Rettungsdienstes führt zu verkürzten Einsatzzeiten und gewährleistet eine schnellere Einlieferung in eine Klinik (2). Eine frühe Versorgung des Patienten ist entscheidend, da die Überlebenschancen jede Minute nach Kreislaufstillstand um 8–10% sinken (3;4).

Im Raum München wurden 2006 ca. 142.000 Gesamteinsätze im Rettungsdienstbereich München registriert, wovon ca. 13% durch den NAW der Berufsfeuerwehr München durchgeführt wurden. Nach Auswertungen der integrierten Leitstelle München waren durch die Notarzteinsatzfahrzeuge der Berufsfeuerwehr davon 1 % Reanimationen. Etwa 50 % erreichten ein Wiedererlangen eines Spontankreislaufes und konnten in eine Münchener Klinik eingeliefert werden. Bei den vorliegenden Daten konnten 10% der Patienten ermittelt werden, die 30 Tage überlebten. Dies entspricht etwa einer Summe von 15 Patienten pro Jahr durch den NAW der Berufsfeuerwehr, sowie 70 Patienten in der gesamten Münchener Notfallrettung (2) für das Jahr 2006.

In den Updates der Leitlinien zur kardiopulmonalen Reanimation durch den European Resuscitation Council (ERC), 2010 erschienen (5), liegt die Betonung eindeutig auf

stetiger Herzdruckmassage. Diese sollte maximal für 5 Sekunden für spezielle Maßnahmen unterbrochen werden, da gezeigt werden konnte, dass auch kurze Unterbrechungen mit einer späteren myokardialen Dysfunktion und einer verminderten Überlebensrate assoziiert werden (6;7).

Zusätzlich werden die Behandlungsabläufe für medizinisches Personal von der wissenschaftlichen Fachorganisation wie der *AHA (American Heart Association)* oder der *ERC (European Resuscitation Council)* festgelegt, in Schulungen vermittelt und stetig optimiert. Durch dieses Vorgehen finden auch aktuelle Erkenntnisse der medizinischen Forschung Einzug in die Behandlungsrichtlinien und gewährleisten eine steigende Qualität der Behandlung. Aufgrund dieser Faktoren können immer mehr Patienten nach Reanimation mit einem Spontankreislauf (*ROSC – return of spontaneous circulation*) in die Klinik gebracht werden.

Es gibt verschiedene Arten von letalen Arrhythmien bei reanimationspflichtigen Patienten, dabei kann jedoch nicht jede Arrhythmie durch elektrische Defibrillation therapiert werden, die Zirkulation muss durch Herzdruckmassage aufrechterhalten werden. Die definitive Therapie bei Kammerflimmern und der pulslosen ventrikulären Tachykardie ist die Defibrillation, bis zum Eintreffen eines Defibrillators und während der Ladepausen muss auch hier eine suffiziente Thoraxkompression durchgeführt werden (8;9).

Obwohl die Behandlungsabläufe und die rhythmusbasierte Therapie durch die *AHA* und *ILCOR (International Committee on Resuscitation)* standardisiert sind, müssen auch diese Vorgaben den individuellen Bedürfnissen des Patienten angepasst werden (8), besonders im Hinblick auf die zunehmende Komorbidität des jeweiligen Patienten.

Verschiedene Studien setzen ihren Schwerpunkt auf das neurologische *Outcome* nach primärem Kreislaufstillstand, doch der Gesundheitszustand ist oft unterschiedlich und komplex (10) besonders im Hinblick auf das *postresuscitation syndrome*. Das Ziel einer erfolgreichen Reanimation und der entsprechenden Nachbehandlung sollte es sein, die volle Gesundheit wiederzuerlangen, um den gewohnten Lebensstandard beizubehalten (11;12). Nahezu alle Patienten müssen bereits initial intensivmedizinisch betreut werden. Einerseits aufgrund anhaltender komatöser Zustände, beeinträchtigten

Hirnstammreflexen und Krampfanfällen, andererseits durch die Folgen der systemischen Ischämie, welche unter anderem im Rahmen der Reperfusion regelmäßig zum SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*) und MOF (*multi organ failure*) führt.

1.2. Immunreaktion nach CPR

Obwohl seit 50 Jahren der Herz-Kreislaufstillstand durch Reanimation therapiert wird, ist die Mortalität der Patienten trotz klinischer Therapie sehr hoch. Ursachen dafür sind sowohl ein irreversibler hypoxischer Hirnschaden (13;14) sowie die Ausbildung eines *postresuscitation syndrome* (15). Bei einem Kreislaufstillstand von mehreren Minuten nach der systemischen Ischämie im Rahmen der Reperfusion ist insbesondere die Ausschüttung zelltoxischer Immunmodulatoren und Metabolite ein gravierendes Problem (8). Die immunologische Aktivierung, die systemische Ischämie und die Reperfusion tragen dazu bei, dass sich ein Hyperinflammationssyndrom ausbildet, welches häufig in einem therapierefraktären Organversagen endet. Je länger eine systemische Ischämie andauert, desto mehr Zytokine und toxische Metabolite, bspw. Sauerstoffradikale werden freigesetzt. Eine anschließende Reperfusion führt daher zu einer Verteilung dieser schädlichen Metabolite in den Kreislauf. Zur Zusammenfassung und Verständnis dieser Pathologie hat sich ein 3-Phasen-Modell etabliert (8;9;16). Die Zeit ab dem Kreislaufstillstand wird in drei Phasen unterteilt, wobei für jede Phase ein spezifisches Vorgehen in der Behandlung angezeigt ist. Die erste Phase, genannt die „elektrische Phase“ gilt bis 4 min nach Herz-Kreislaufstillstand. Die „Zirkulationsphase“ gilt ab etwa 4 min bis ca. 10 min nach Ereignis, gefolgt von der „metabolischen Phase“ die ab etwa 10 min nach Ereignis eintritt.

Es zeigte sich in experimentellen Studien sowie bei Patienten die außerklinisch einen Herzstillstand erlitten und von geschultem Personal z.B. vom Flughafenmitarbeiter reanimiert wurden, dass die sofortige Defibrillation Überlebensraten bis 50 % erreichen kann.

In der Zirkulationsphase wird aufgrund der zunehmenden Konzentration toxischer Metaboliten empfohlen, ab 4 Minuten nach Kreislaufstillstand keine direkte Defibrillation einzuleiten. Dies geschieht mit der Absicht zunächst durch Herzdruckmassage die Zirkulation aufrechtzuerhalten und die durch die Ischämie akkumulierten schädlichen metabolischen Faktoren zu verringern. Jedoch ist diese Phase einfacher in der Theorie zu verstehen und durchzuführen, praktisch ist dies schwierig umsetzbar, da der Zeitpunkt des Kreislaufstillstandes oft unklar ist und soll daher eher ein Vorschlag sein wenn dies innerklinisch unter Beobachtung auftritt.

Zuletzt folgt die 3. Phase, die sogenannte „metabolische Phase“. Dort führen weder Herzdruckmassage noch Defibrillation zu einer hohen Überlebensrate. Ursächlich werden hierfür Gewebeschäden sowie Folgen der Reperfusion genannt und werden in dem folgenden Kapitel näher beschrieben.

1.3. Postresuscitation syndrome

Das *postresuscitation syndrome* gilt als eigenständiges Krankheitsbild, das nach primär erfolgreicher Reanimation auftreten kann. Es kommt zustande durch die systemischen Schäden einer Ischämie des gesamten Organismus und der anschließenden Reperfusion des Kreislaufs. Zustände, die im Zusammenhang mit dem *postresuscitation syndrome* auftreten, wie eine fehlregulierte Zytokinproduktion, das Vorhandensein von Endotoxinen im Plasma, eine gestörte Blutgerinnung und eine Nierendysfunktion ähneln dabei dem Krankheitsbild der Sepsis (17;18). In einer Studie von Vanden Hoek et al. 2002 (19) wurden embryonale Myozyten aus Hühnern nach einer Ischämiezeit von einer Stunde für weitere drei Stunden reperfundiert. Diese wiesen eine verstärkte Ausschüttung von Sauerstoffradikalen während der Reperfusion auf, wobei *Cytochrome c* in das Zytosol freigesetzt und die Apoptose eingeleitet wurde.

Während der ischämischen Phase kann die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien nicht mehr stattfinden. Somit folgt die Zelle dem anaeroben Stoffwechsel

um Energie zu gewinnen. Allerdings sind diese Möglichkeiten schnell ausgeschöpft, ein ATP-Mangel entsteht und das Zellgewebe wird geschädigt.

Während der Reperfusionsphase bei Wiedererlangen des Blutkreislaufs wird aufgrund des sogenannten Sauerstoffparadoxons (20) möglicherweise noch mehr Gewebe geschädigt. Sauerstoffradikale, Gerinnungs- und komplementaktivierende Stoffe und die überschießende Zytokinbildung führen zu einer Aktivierung der neutrophilen Granulozyten, die auf ihrer Zelloberfläche verstärkt Adhäsionsmoleküle exprimieren. Diese aktivierte Granulozyten binden an endotheliale Liganden, verlassen somit die Gefäße und wandern in Gewebe mit beschädigtem Endothel (21). Durch die Leukozytenadhäsion an den beschädigten Gefäßendothelien kann es einerseits zu Permeabilitätsstörungen sowie zu Thrombosen in der Mikrozirkulation kommen. Des Weiteren kann eine Ischämie und Reperfusion der blutversorgenden Abschnitte des Darms zu einer Schädigung der Darmschleimhaut führen, die Barrieren der Mukosa werden vermehrt permeabel, bakterielle Endotoxine sowie Bakterien gelangen in die Zirkulation und können eine Immunantwort auslösen (17).

Diese Komponenten aus Ischämie, Reperfusion, gesteigerten Konzentrationen pro- und antiinflammatorischer Zytokine im Plasma, myokardiale und renale Dysfunktionen sowie eine gestörte Gerinnung, Permeabilitätsstörungen an Gefäßwänden und die Anwesenheit von Endotoxinen im Blut können zu einem SIRS mit folgendem MOF führen (22) .

Mittlerweile existieren zunehmende Kenntnisse über eine ähnlich ablaufende Immunkaskade des Herz-Kreislaufstillstandes und lebensbedrohlicher Polyraumata, wodurch eine Optimierung der Abläufe und der Patientenversorgung angestrebt wird. Dafür hat die *AHA* speziell ein *Newsroom* eingerichtet wo über Neuigkeiten berichtet wird und regelmäßig ein Gedankenaustausch stattfindet.

Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) und multi organ failure (MOF)

Bereits in der initialen Phase nach einem akuten Ereignis wie einer Reanimation kommt es zu einer Aktivierung humaner immunologischer Systeme, wie dem humoralen und dem zellulären System. Das humorale System ist gekennzeichnet durch das Komplement-

und Gerinnungssystem. Das zelluläre System vermittelt über die Freisetzung von Endothelzellen, neutrophile Granulozyten und Makrophagen. Dabei werden an der Immunmodulation beteiligte Enzyme synthetisiert, exprimiert und in die systemische Zirkulation freigegeben (23;24).

Diese Veränderungen können zu einer reversiblen, systemischen Entzündungsreaktion führen (23). Nachdem in den letzten Jahren die proinflammatorische Phase mit Parametern wie TNF- α , IL-8 und IL-6 im Schwerpunkt der Forschung stand (25;26), wird nun über ein weiteres Zusammenspiel diskutiert, dem SIRS/CARS/MARS-Modell, wie in **Abbildung 1** graphisch dargestellt.

Dieses beschreibt das gleichzeitige Aufeinandertreffen der verschiedenen Phasen der Immunreaktion. Während der kompensatorischen Immunantwort (*compensatory anti-inflammatory response syndrome*) CARS werden antiinflammatorische Zytokine im Mausmodell, unter anderem IL-10 und IL-1ra verstärkt exprimiert (27). Das Modell des CARS wird mit einer Immunparalyse in Verbindung gebracht, bei dem Patienten durch eine verringerte Immunabwehr infektanfälliger sind. Ebenso kann es ein prädisponierender Faktor zur Entstehung eines MODS (*multiple organ dysfunction syndrome*) sein (25;28). Das *mixed antagonistic response syndrome* (MARS) wird definiert als ein antagonistisches Reaktionssyndrom, das sich aus mehreren Phasen SIRS und CARS zusammensetzt.

Aus diesen Theorien sind neue Therapieansätze entstanden. Dazu zählen beispielsweise die Bestimmung klinischer *Scores* um eine Verlaufsbeurteilung bestimmen zu können, wie auch den Einsatz von Kühlelementen oder Infusionen (Hypothermie), um das Ausmaß des Ischämie/ Reperfusionsschadens durch die postischämische Immundysregulation zu mildern.

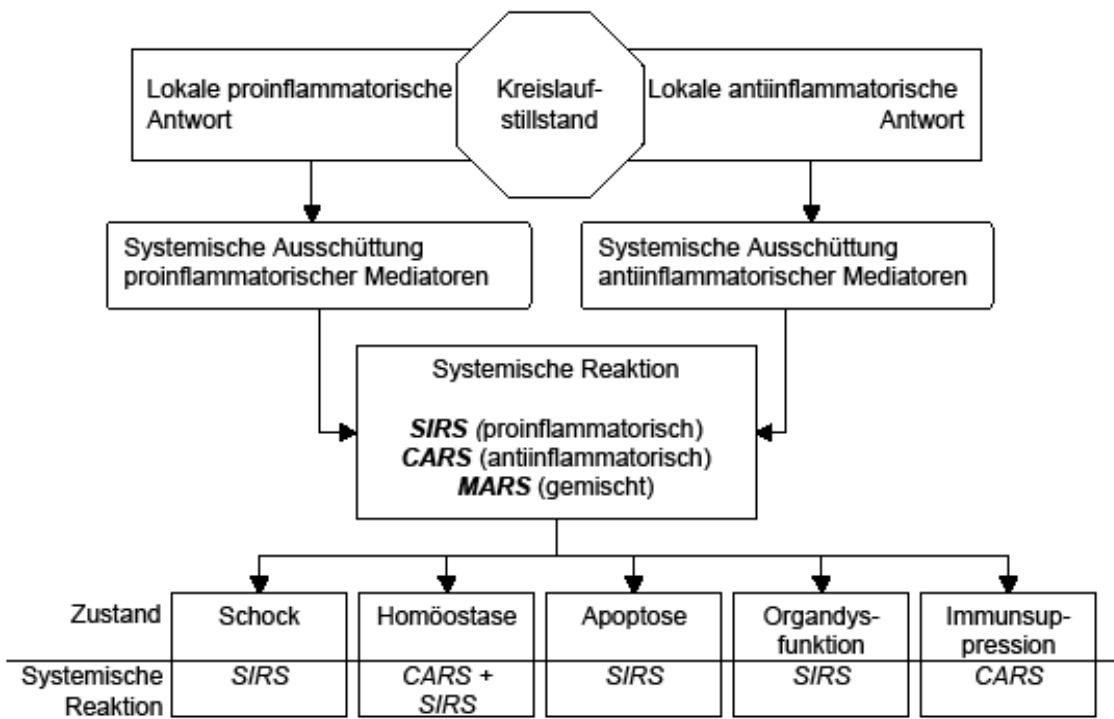


Abbildung 1: Folgeerscheinungen des Organismus auf die Folgen eines Kreislaufstillstandes, wie Homöostase durch SIRS (*systemic Inflammatory response syndrome*), CARS (*compensatory anti-inflammatory response syndrome*) und MARS (*mixed antagonistic response syndrome*) (29).

Klinisch wird das SIRS durch zwei oder mehr der folgenden Symptome definiert wobei kein infektiöser Fokus vorliegt:

- Körpertemperatur $> 38,0^{\circ}\text{C}$ oder $< 36,0^{\circ}\text{C}$
- Herzfrequenz $> 90/\text{min}$
- Atemfrequenz $> 20/\text{min}$ oder $\text{pCO}_2 < 32 \text{ mmHg}$
- Leukozyten $> 12000/\text{mm}^3$ oder $< 4000/\text{mm}^3$

Bei einer systemischen Entzündungsreaktion hat die Ausschüttung der Zytokine synergistische wie auch antagonistische Effekte auf das Gefäßendothel, die glatte Gefäßmuskulatur, die Blutplättchen sowie andere gewebsständige und migratorische Entzündungszellen. Sie kann durch das hohe Ausmaß der Zytokinproduktion Gewebe-

und Zellschäden auslösen und Organe schädigen, die von der eigentlichen Ursache nicht betroffen sind. Zu hohe Konzentrationen der Zytokine können das Gewebe nicht nur direkt schädigen, sondern auch indirekte Schäden durch Beeinträchtigung anderer Immunzellen, wie z.B. Granulozyten, hervorrufen (30).

Als Multiorganversagen bezeichnet man das innerhalb kurzer Zeit oder gleichzeitige Versagen zweier oder mehrerer Organe. Die hauptsächlich betroffenen Pathologien sind:

- Akute respiratorische Insuffizienz/ Lungenversagen (ARDS)
- Akute kardiozirkulatorische Insuffizienz/ Herz-Kreislauf-Schock
- Akute renale Insuffizienz/ Nierenversagen
- Akute Leberinsuffizienz/ Leberversagen
- Gastrointestinale Stressblutungen
- Enterokolitis/ Pankreatitis
- Gerinnungsstörungen und disseminierte intravasale Gerinnung
- Bewusstseinsstörungen und metabolisches Koma
- Störungen des autonomen und peripheren Nervensystems und der Skelettmuskulatur (28)

1.4. Zytokine

Nach Wiedererlangen eines Spontankreislaufes kommt es zur Freisetzung von zelltoxischen Metaboliten sowie von Zytokinen, die mit den Folgen nach Reanimation wie SIRS und CARS in Verbindung gebracht werden. Im Tiermodell sowie in experimentellen klinischen Studien konnte festgestellt werden, dass bereits in der initialen Phase nach Ischämie/ Reperfusion eine Aktivierung von humoralen, also Komplement- und Gerinnungssystem, und zellulären Systemen, sowie immunkompetenten Zellen wie Granulozyten und Makrophagen ausgelöst wird (31;32). Genau diese Veränderungen

werden für ein folgendes SIRS verantwortlich gemacht (27;33). Im späteren Verlauf nach der initialen Phase kommt es dann zu einem Erschöpfen der Aktivierung und somit zu einer Immunsuppression (34). Dieser Zustand ist für den Patienten ebenfalls problematisch, da hier das Infektionsrisiko hoch ist (35).

Zytokine, mit ihrem Molekulargewicht zwischen 25 und 65 kDa (Kilodalton) sind relativ kleine Proteine, die eine entscheidende Rolle in der Regulation der humanen Immunabwehr spielen. Hildebrand et al. (23) beschrieben die Namensgebung der Zytokine, die erstmalig als Lymphokine und Monokine benannt wurden, in der Annahme, dass diese Parameter von Lymphozyten und Monozyten synthetisiert werden. Da jedoch fast alle kernhaltige Zellen diese Proteine synthetisieren können, wurde der Name Zytokin eingeführt.

Zu den charakteristischen Eigenschaften der Zytokine gehören das Auslösen von Chemotaxis, Freisetzung intrazellulärer Granula, erhöhte Rezeptorexpression, verstärkter Adhärenz der Zellen und die Bildung von Lipiden für den Arachidonsäurestoffwechsel (36). Ob und wie diese Eigenschaften auftreten ist jedoch abhängig von vielen anderen Faktoren. Bis auf IL-1ra haben die antiinflammatorischen Zytokine auch proinflammatorische Eigenschaften, deshalb hat sich eine strenge Einteilung der Zytokine nicht bewährt (37). Abhängig sind die Effekte der Zytokine von dem lokalen Milieu, synergistischen Effekten und der Rezeptordichte der Zytokine (33).

1.4.1 Proinflammatorische Zytokine, Tumornekrosefaktor-alpha, Interleukin-8

Eine Immunsuppression oder eine anhaltende Stimulation des Monozyten-Makrophagen-Systems z.B. durch Ischämie und Reperfusion führt zu einer Überproduktion von Zytokinen und somit zu einem Verlust der regulatorischen Kontrolle durch den Organismus (38).

Verantwortlich für die frühe Immunantwort werden in der Literatur u.a. folgende Zytokine diskutiert: IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF- α . Des Weiteren haben proinflammatorische Eigenschaften folgende Zytokine: TGF- β , IFN γ , IL-11 und IL-8 (39).

Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α)

TNF- α wird vor allem von Makrophagen, Monozyten und T-Lymphozyten gebildet und ist einer der frühesten und potentesten proinflammatorischen Mediatoren in der Kaskade der Zytokine. Daher wurde TNF- α aufgrund seines breiten Spektrums in dieser Arbeit untersucht. TNF- α erhöht die Permeabilität und die prokoagulatorische Aktivität des Endothels und bewirkt eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen (64). Ausgelöst wird die Synthese von TNF- α durch verschiedene körperliche Einflüsse, wie z.B. Hypoxie, Ischämie, Endotoxine und LPS (Lipopolysaccharid), sowie verschiedene Faktoren des Komplementsystems (23). Inhibiert werden kann die TNF- α -Freisetzung durch antiinflammatorische Interleukine, insbesondere durch IL-10 (40).

Die löslichen TNF- α Rezeptoren sind dafür verantwortlich, dass TNF- α im Plasma nur eine kurze Halbwertszeit von 10-20 min aufweist, was seine Bedeutung für den klinischen Verlauf der Patienten limitiert (41).

In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass TNF- α pathophysiologisch nach Ischämie/ Reperfusion und Infektion in der inflammatorischen Reaktion eine bedeutende Rolle einnimmt (27;42), dadurch wird es als einer der Hauptmediatoren bei septischem Schock und gram-negativer Sepsis angesehen (43). Auch spielt TNF- α neben IL-1 β eine wichtige Rolle bei der Entstehung kardialer Dysfunktionen nach Reperfusion. Die hämodynamischen Einflüsse von TNF- α werden in Zusammenhang gebracht mit verminderter Kontraktilität des Herzmuskels, verringter Auswurfleistung (EF) und Herabsetzen des systemischen Gefäßwiderstandes mit daraus folgender Hypotension (44;45).

Interleukin 8 (IL-8)

IL-8 wird aufgrund seiner chemotaktischen Wirkungen auf neutrophile Granulozyten, den Chemokinen, zugeschrieben. Die Synthese von IL-8 wird z. B. durch IL-1, TNF- α , LPS und Hypoxie stimuliert (36). IL-8 wirkt auf neutrophile Granulozyten, wodurch eine Adhäsion am Endothel ausgelöst wird. Die Induktion von IL-8 kann erfolgen durch

lymphozytären Zellen wie Monozyten, T-Zellen, neutrophile Granulozyten, natürlichen Killerzellen sowie endothelialen und epithelialen Zellen, Fibroblasten und Hypoxie (36;46-48).

Die Migration der neutrophilen Granulozyten durch das Endothel wird durch IL-8 stimuliert, wodurch Proteasen und freie Radikale freigesetzt werden. Auch scheint IL-8 Einfluss zu nehmen auf die Interaktion von Makrophagen und Endothelzellen, an die im experimentellen Versuch eine verstärkte Adhäsion gezeigt werden konnte (36).

Diese freigesetzten Stoffe wie Proteasen und freie Radikale können NF- κ -B aktivieren. Dies ist ein essentieller Faktor für die Transkription von IL-8 durch eingewanderte und gewebsbeständige Zellen, nachdem die ischämischen Organe, wie Lunge (49), Myokard (50) und Gehirn (51) wieder reperfundiert werden. Des Weiteren hindert IL-8 durch Hemmung der Apoptose den Abbau der gewebsschädigenden Faktoren und verlängert somit den schädlichen Effekt (36). Die Zugabe von anti-IL-8-Antikörpern schützt im Versuch vor neutrophiler Infiltration und dem anschließenden Gewebeschaden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die neutrophile Granulozyteninfiltration mit der Freisetzung von IL-8 eine wesentliche Rolle in der Pathophysiologie des Myokardinfarktes (52) des Reperfusionssyndroms und der Ausbildung eines *ARDS* (*acute respiratory distress syndrome*) spielt (53;54). Daher war IL-8 auf intrazellulärer Ebene in dieser Studie von Interesse und wurde als Parameter herangezogen.

1.4.2 Antiinflammatorische Zytokine, Interleukin-10, Interleukin-1 Rezeptorantagonist

Wie bereits beschrieben wird die Immunantwort durch ein komplexes Netzwerk aus unterschiedlichen Kontrollmechanismen reguliert. Innerhalb dieser regulatorischen Mechanismen haben sich antiinflammatorische Zytokine, sowie spezifische Inhibitoren und lösliche Zytokinrezeptoren als wichtig erwiesen (33).

Unter physiologischen Bedingungen arbeiten diese antiinflammatorischen Zytokine als Modulatoren, die einer möglicherweise schädlichen Auswirkung entgegenwirken, welche durch eine anhaltende oder überschießende inflammatorische Reaktion bedingt wird.

Obwohl die antiinflammatorischen Zytokine einer unkontrollierten proinflammatorischen Zytokinausschüttung gegensteuern, kann es zu einer Überkompensation führen und das Leben des Patienten durch z. B. ein erhöhtes Infektionsrisiko gefährden (35).

Interleukin-10 (IL-10)

IL-10 wird als einer der wichtigsten antiinflammatorischen Parameter der menschlichen Immunantwort angesehen. Es ist ein wirksamer Inhibitor der durch Typ-1-Helferzellen (TH1)-produzierten Zytokine wie IFN γ , IL-2 und TNF- α . Des Weiteren ist es ein wichtiger Antagonist der proinflammatorischen Zytokinproduktion des Monozyten/Makrophagen-Systems.

IL-10 wird synthetisiert durch CD-4 und TH-2 Zellen, Monozyten, B-Zellen und zirkuliert als ein Homodimer bestehend aus zwei Proteinen mit jeweils 160 Aminosäuren (55-57).

Aus dem Monozyten/Makrophagen-System inhibiert IL-10, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, Gm-CSF, und die Zytokinproduktion aus Neutrophilen und natürlichen Killerzellen.

Weiterhin inhibiert IL-10 die Oberflächenexpression der MHC-Komplexe der Klasse 2 (Haupthistokompatibilitätskomplex), sowie CD-14, ein Signalmolekül, das in der Wiedererkennung von LPS eine wichtige Rolle einnimmt. IL-10 inhibiert die Translokation von NF- κ -B nach LPS Stimulation und fördert den Abbau von mRNA der proinflammatorischen Zytokine (40;57).

Zusätzlich schwächt IL-10 die Expression von TNF- α -Oberflächenrezeptoren (58).

IL-10 kann durch die inhibitorische Wirkung auf IL-6 die Körpertemperatur beeinflussen und zur Fiebersenkung beitragen (59).

Hohe IL-10 Werte in der Zirkulation wurden bei Patienten mit systemischen Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose, Psoriasis und in verschiedenen Entzündungsreaktionen wie Sepsis gemessen (40).

Eine physiologisch inadäquate IL-10 Sekretion durch eine systemische Verletzung kann aber auch schädliche Auswirkungen mit sich führen. So wurde bei Patienten mit einer akuten Lungenverletzung und verminderter IL-10 Konzentration ein möglicher Zusammenhang hergestellt, welcher darauf deutet, dass sich daraus mit größerer Wahrscheinlichkeit ein letales *ARDS* entwickelt (60).

Im Mausmodell wurde festgestellt, dass sich nach dem *Knock-out* des für IL-10 kodierenden Genabschnitts eine chronisch entzündliche Enteritis entwickelt, die einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung beim Menschen ähnelt (61). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die endogene Konzentration von IL-10 wichtig ist, um septische Zustände durch enterogene Bakterien zu verhindern (33).

Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra)

IL-1ra ist ein Protein, das aus 152 Aminosäuren besteht und als spezifischer Inhibitor kompetitiv die IL-1 Rezeptoren von IL-1a und IL-1b blockiert (37;62).

Nachdem IL-1 an seinen Rezeptor bindet, bildet sich ein Komplex aus dem Typ 1-Rezeptor und dem dafür benötigten spezifischen Protein, dem IL-1 *receptor accessory protein*. IL-1ra bindet mit hoher Affinität an den Typ-1 Rezeptor, jedoch kann es den heterodimerischen Komplex aus Rezeptor und dem *accessory protein* nicht binden. Somit ist der membrangebundene Rezeptor kompetitiv blockiert und die Zelle vor Aktivierung durch IL-1 geschützt (63).

Die antiinflammatorischen Zytokine IL-4, IL-6, IL-10 und IL-13 inhibieren die Synthese von IL-1b und stimulieren gleichzeitig die Produktion von IL-1ra (64).

IL-1ra wird von Monozyten und Makrophagen sezerniert. In einer Studie wurde nachgewiesen, dass durch Stimulation mit bakterieller LPS die Sekretion von IL-1ra in den Kreislauf im Vergleich zu IL-1 oder IL-1b über das 100-fache zunimmt (37). Es gibt außer LPS noch verschiedene andere Stimuli, die eine Sezernierung von IL-1ra und den proinflammatorischen Zytokinen aus der Interleukin-1 Familie auslösen. Unter anderem wird in der Literatur diskutiert, dass eine lokale überschießende Reaktion in der Lunge zu einem *ARDS* führen kann. Dieses endet oftmals letal, insbesondere da eine Pneumonie

als eine der größten Komplikationen bei annähernd 50% der Patienten in der *postresuscitation period* auftreten kann (65;66).

1.5. Funktionsweise und Anwendung der hypothermischen Therapie

Bereits in den Schriften der alten Ägypter wird der Nutzen der Kühlung als therapeutisches Konzept erwähnt. Während der Kriege riet Sokrates, die Körper der verwundeten Soldaten mit Eis und Schnee zu bedecken um den Blutverlust zu mindern. In der Medizin heute wurde die Hypothermie nach dem 2. Weltkrieg wiederentdeckt, eingesetzt bei Herzoperationen. Erste Studien über die Kühlung nach Herz-Kreislaufstillstand stammen aus dem Jahre 1958 (67). Dort zeigte sich eine Verbesserung des neurologischen *Outcome*, doch aufgrund der hohen Nebenwirkung von Infekten setzte sich die hypothermische Therapie nicht durch. Erst in den 90er Jahren wurde mit dem Wissen der reduzierten Mortalität und dem positiven neurologischen *Outcome* weitergeforscht. Seit 2003 wird diese Methode in den Leitlinien der ILCOR empfohlen, nachdem Studien belegen konnten, dass Patienten nach *ROSC* eine verbesserte Überlebenschance sowie ein verbessertes neurologisches *Outcome* haben (68;69). In den aktuell erschienenen Leitlinien 2010 gewinnt die Methode der Hypothermie weiter an Gewicht und wird mittlerweile in vielen deutschen Kliniken eingesetzt (70). Die milde Hypothermie ist definiert als eine Kühlung der Körperkerntemperatur auf 32-34 °C für einen Zeitraum von 24 Stunden (71). In der Literatur wird die Länge der Kühlung sowie die abschließende Erwärmung unterschiedlich diskutiert, die Zeitspanne der Kühlung schwankt dort zwischen 12 und 72 h (69). In den aktuellen Leitlinien wird eine 24 h Kühlung empfohlen (70). Zum Zeitpunkt der Studie soll diese angewandt werden bei Patienten, die nach Kammerflimmern erfolgreich außerklinisch reanimiert wurden. Die ILCOR empfiehlt dabei, die Patienten für 12-24 h auf 32-34 °C zu kühlen. Darüber hinaus wird mittlerweile empfohlen, unabhängig davon, ob der initiale Rhythmus defibrillierbar

war oder nicht (72), die Hypothermie auch innerklinisch anzuwenden. Dies gilt ebenso bei anderen Rhythmusstörungen, die zu einem Herz-Kreislaufstillstand führen (73).

Zahlreiche Studien mit dem Schwerpunkt auf die neurologische Komponente beschäftigten sich in den letzten Jahren mit der Anwendung der Hypothermie nach *ROSC* (69;73;74). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die Anwendung der Hypothermie das neurologische *Outcome* positiv beeinflusst (68;75) und dem ischämischen zerebralen Schaden vorbeugen kann (76). Die Schäden, ausgelöst durch das Reperfusionssyndrom, können ebenfalls durch milde Hypothermie unterdrückt werden (71;74), da die Hypothermie im Tiermodell die Nekrose sowie Apoptose signifikant verringern konnte (77;78). Auch die Entstehung freier Radikaler wird durch die Hypothermie gemindert (79;80).

Der Effekt der Hypothermie wird dadurch erklärt, dass die Kühlung zu einer geringeren Expression zelltoxischer Metaboliten und freier Radikaler führt (71), welche den programmierten Zelltod von Neuronen auslöst. Diese Forschungsergebnisse beziehen sich auf die Versuche am Tiermodell.

Die aufgrund des Sauerstoffmangels bei vermindertem zerebralen Blutflusses auftretende Azidose löst eine Nekrose sowie Apoptose aus. Dabei zeigte sich durch die Hypothermie eine verminderte Caspase-Aktivität sowie eine verminderte Translokation von Cytochrom c, die für die Apoptose verantwortlich gemacht werden (81;82).

Doch der genaue Effekt auf die pro-und antiinflammatorische Immunantwort ist weder im zerebralen und noch weniger im peripheren Immunsystem vollständig bekannt und wird in der experimentellen Forschung mit widersprüchlicher Datenlage diskutiert (83).

In einigen klinischen Studien werden Systeme wie Kühlhelme (84), äußerlich angewendete Kühlelemente (69), gesenkte Raumtemperatur (68), und Ringerinfusionen, gekühlt auf 4 °C mit 30 ml/kg KG verwendet (85;86). In experimentellen Tierstudien hat sich gezeigt, dass die frühe Anwendung der milden Hypothermie den positivsten Effekt zeigt (86). Die Kerntemperatur sollte schnellstmöglich auf 32 °C gesenkt werden, sobald ein Spontankreislauf wiedererlangt ist, wenn möglich sogar noch unter Reanimationsbedingungen (74). Bei den externen Anwendungen durch Kühlelemente wird die Körperkerntemperatur um ca. 0,9 °C/h (69) und bei herabgesenkter

Raumtemperatur um ca. 0,3 °C/h gesenkt (68). Die Kühlung durch 4 °C kalte Ringer/Natriumchloridlösung, infundiert mit 30 – 40 ml/ kg KG, erzeugt den besten Kühleffekt mit ca. 1,7 °C/h (69). Interessanterweise zeigte sich in den klinischen Studien, dass kein Patient, der kalte Infusionslösungen erhielt, ein Lungenödem entwickelte, obwohl dies aufgrund der Menge an Volumen durchaus denkbar wäre (86) (Beispiel: 70 kg, zwischen 2,1- 2,4 l NaCl).

In den letzten Jahren wurden durch zahlreiche klinische Studien erörtert (74;86), welche Patienten am meisten durch die Hypothermie profitieren und welche Kühltechnik und Kerntemperatur den größten positiven Effekt aufzeigen. In **Tabelle 1** sind die Methoden mit ihren Vor- und Nachteilen graphisch dargestellt.

Nach aktuellen Leitlinien wird die kontrollierte Wiedererwärmung von 0,25-0,5 °C pro Stunde empfohlen. Hyperthermien nach Wiedererwärmung müssen vermieden werden. Des Weiteren soll die Hypothermie bei allen Patienten nach Wiedererlangen eines Spontankreislaufes zur Verbesserung des *Outcome* angewendet werden (5;70) da es Hinweise gibt, dass auch Patienten, die länger als 15 min ohne Spontankreislauf waren, von der Hypothermie profitieren. Insbesondere im Hinblick darauf, dass außerhalb der Klinik keine genaue zeitliche Einschätzung möglich ist (87).

Methoden	Vorteile	Nachteile
Externe Kühlung durch Kühlelemente, Kühldecken	<ul style="list-style-type: none"> • Nichtinvasiv • Einfache Handhabung • Kann prähospital angewendet werden 	<ul style="list-style-type: none"> • Nichtausreichende Senkung der Kerntemperatur • Arbeitsbehinderung für Arzt/ Pfleger • Kälteschäden der Haut
Modifizierte externe Kühlung durch Kühlzelte, Kühlmatratzen	<ul style="list-style-type: none"> • Leicht anwendbar • Gute Aufrechterhaltung der Körperkerntemperatur • Gut kombinierbar mit gekühltem intravenösem Volumen 	<ul style="list-style-type: none"> • Höhere Kosten durch Materialanschaffung • Platzproblem durch Zelte • Nicht prähospital anwendbar
Gekühlte Infusionen z.B Ringer/NaCl 0,9%, 30-40 ml/kg KG, intravenös	<ul style="list-style-type: none"> • Schnell durchführbar auch prähospital • Geringer Kostenaufwand • Senkt schnell die Kerntemperatur • Gut kombinierbar mit anderen Elementen 	<ul style="list-style-type: none"> • Schwierige Aufrechterhaltung aufgrund großer Volumina • Kontraindiziert bei verringelter EF (<i>ejection fraction</i>)

Tabelle 1: Vorteile und Nachteile in der Aufrechterhaltung der milden Hypothermie (71)

2. Fragestellung

Wie anfangs beschrieben, ist die Frage nach der genauen Pathophysiologie des SIRS bzw. der *postresuscitation disease* und Multiorganversagen nach CPR Gegenstand vieler aktueller Studien (17;18;88). Obwohl über die initialen Mechanismen der Immunantwort wenig bekannt ist, wird angenommen, dass nach Wiedererlangen des Spontankreislaufs zelltoxische Metaboliten sowie Endotoxine und Zytokine in den Blutkreislauf sezerniert werden.

Die Induktion der zelltoxischen Metaboliten und Zytokine nach *ROSC* werden verantwortlich gemacht für das gestörte Gleichgewicht der immunkompetenten Zellen in der Blutzirkulation und damit an der Entstehung eines Multiorganversagens und eines *postresuscitation syndrome* (15;89). Daher sind insbesondere die initialen intrazellulären Steuerungsmechanismen von Interesse, da diese Veränderungen in Zusammenhang gebracht werden mit einem oftmals folgenden letalen Multiorganversagen. Durch ein bereits validiertes Verfahren besteht die Möglichkeit präklinisch Probenmaterial zu gewinnen und dieses zeitnah zu analysieren. Die Expression der relevanten Zytokine, die an der Immunreaktion nach CPR beteiligt sind, werden in einem zeitabhängigen Profil (1. Abnahmepunkt bis 72 h nach *ROSC*) dargestellt, um ihre Bedeutung besser zu verstehen und ihren Einfluss hinsichtlich des Krankheitsverlaufs der Patienten besser erfassen zu können.

Um die initialen pathophysiologischen Mechanismen besser zu verstehen, war es Ziel dieser Arbeit folgende Fragestellungen zu erfassen:

- I. Lässt sich anhand eines Patientenkollektives die Genexpression der hier untersuchten Zytokine bestätigen?
- II. Lassen sich die präklinisch- und klinischen Daten mit den gemessenen Zytokinexpressionen vergleichen und besteht ein Zusammenhang der experimentellen Daten mit dem klinischen Verlauf der reanimierten Patienten?

- III. Gibt es Unterschiede in der mRNA-Expression pro- und antiinflammatorischer Mediatoren und unterscheidet sich die Dynamik der mRNA-Expression hinsichtlich des Überlebens und Versterbens innerhalb der ersten 12-72 h nach *ROSC*?
- IV: Existieren Unterschiede in der Genexpression und im Überleben hinsichtlich verschiedener Therapieanwendungen wie hypothermisch behandelter Patienten vs. nicht hypothermisch therapiert Patienten?

3. Patienten und Methoden

3.1. Patientenkollektiv, klinische Daten und Scoreerfassung

Die Studie wurde mit 25 Patienten in einem Zeitraum von 4 Jahren durchgeführt. Alle Patienten erlitten präklinisch einen Herz-Kreislaufstillstand und wurden reanimationspflichtig. Nicht berücksichtigt wurden dabei Patienten, die innerhalb der ersten 24 Stunden nach *ROSC* verstarben. Nach der ersten Stabilisierungsphase präklinisch wurden die Patienten in verschiedene Kliniken im Raum München zur Weiterversorgung gebracht und intensivmedizinisch versorgt. Die präklinische sowie die klinische Behandlung erfolgte nach den Richtlinien der Internationalen Konsensuskonferenz 2000 „Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care“ (11).

Studienort

Die Untersuchungen wurden an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität München durchgeführt, in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie. Die präklinische Versorgung erfolgte durch die eingesetzten Münchener Notärzte.

Blutentnahmen

Die erste Blutabnahme erfolgte durch den Notarzt der Feuerwehr direkt nach Wiedererlangen des Spontankreislaufs in speziell gefertigten Blutnahmesets. Nach Anruf durch die Feuerwehr am Ende des Einsatzes, wurden die Blutröhrchen abgeholt und im Labor weiterverarbeitet. Nach der initialen Blutabnahme folgten, standardisiert nach Protokoll, weitere Abnahmen in den entsprechenden Kliniken im Raum München in den Zeitabständen von 6 h, 12 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Wiedererlangen des *ROSC*.

Die PAXgene® Röhrchen wurden bis zur Aufarbeitung im Kühlschrank bei + 4°C aufbewahrt. Das Blutmaterial in Lithium-Heparinat wurde bei 2500 U/min 10 Minuten zentrifugiert und im Kühlschrank bei 80 °C eingefroren.

Präklinische und klinische Daten

Nach Genehmigung der lokalen Ethikkommission (AZ: 282/01) erfolgte die Datenerhebung dieser Studie von 2004 bis 2006.

Die relevanten klinischen und intensivmedizinischen Daten wurden dokumentiert und sind dargestellt in **Tabelle 4 und 5**.

Scoreerfassung

Zu jedem Zeitpunkt der Blutabnahme wurden die relevanten Parameter zur Errechnung des MOF-Scores nach Goris (90) erhoben und nach Lefering (91) modifiziert, um das Ausmaß des MOF, sowie den Verlauf und die Letalität abzuschätzen (92). Die Höhe der Scores korrelieren dabei mit den Schweregrad der Dysfunktionen der Organe. Erfasst werden Werte der Lunge, Leber, Niere sowie Herz-Kreislauf, Blutparameter und Glasgow-Coma-Scale (92).

Klinisch werden die Scores zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen Aufnahme bis zu 72 h nach Krankheitsbeginn errechnet (93). In der vorliegenden Studie wurden die Patienten in Gruppen unterteilt, bei $MOF < 4$ und $MOF \geq 4$ innerhalb des beobachteten Zeitraumes von 72 h. Es wurden 15 Patienten mit vollständiger Errechnung eingeschlossen.

Gruppen

Um Unterschiede hinsichtlich des klinischen *Outcome* „Überlebt“ vs. „Verstorben“ darzustellen, wurden die Patienten in die jeweilige Gruppe eingeteilt, je nach klinischem Befund. Patienten die in Rehabilitation oder nach Hause entlassen werden konnten, wurden in die Gruppe „Überlebt“ eingeschlossen, unabhängig vom jeweiligen

Gesundheitszustand. Patienten die innerhalb von 30 d nach *ROSC* verstarben, wurden in die ‚Verstorben‘ Gruppe eingeteilt.

Hypothermie

In dem Zeitraum von 2004-2006 wurden sechs hypothermisch behandelte Patienten in die Studie eingeschlossen. Diese wurden in den Kliniken im Raum München bis zu 24 h mit Kühldecken/ Infusionen sowie Kühlelementen behandelt. In dieser Studie wurden sechs hypothermisch behandelte Patienten mit sieben normotherapierten Patienten verglichen.

Zum Vergleich der Auswirkungen der verschiedenen Behandlungsarten wurden 13 Patienten in zwei Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe wurde hypothermisch innerhalb der ersten 24 Stunden behandelt, die andere Gruppe hingegen wurde nach *ROSC* nicht gekühlt. Von besonderem Interesse war das Verhalten der Expression in den ersten 24 h nach Ereignis, da die Dauer der Kühlung in diesem Zeitraum stattfand. Des Weiteren war von Interesse, ob sich die Parameter nach der Kühlung im Vergleich zur Gruppe regulär therapiierter Patienten wieder angleichen.

3.2. Quantitative Genexpressionsanalysen

3.2.1 PAXgene® Blood RNA System; mRNA-Isolierung aus Vollblut

Das PAXgene® Blood RNA *Kit* (Fa. PreAnalytix, Hombrechtikon, Schweiz) als RNA-stabilisierendes Vollblutentnahmesystem hat präklinisch den Vorteil, dass Blut durch ein einfaches System gewonnen wird und zur Stabilisierung der intrazellulären mRNA nach Zell-Lyse verwendet werden kann.

Der Prozess gliederte sich in ein Protokoll mit einer Arbeitszeit von ca. 150 min. Nachdem die Proben bei + 4 °C für 3 Tage im Kühlschrank lagerten, wurde mit der

Waschung und Resuspension der Pellets begonnen und bei 4260 g für 10 min zentrifugiert (Zentrifuge CT 4 22 Fa. Juan, Unterhaching). Der Überstand wurde dekantiert, der Gefäßrand mit einem sauberen Tuch getrocknet. Anschließend wurden die Proben mit 5 ml RNAse freiem Wasser gefüllt und mit einem neuen Deckel versehen. Um den Inhalt zu homogenisieren, wurden die Proben durch maschinelles Aufschütteln (*vortexen*, Schüttler VM 4, Fa. Cat, Deutschland) bearbeitet, bis sich das Pellet sichtbar mit dem Wasser vermischt. Anschließend wurde wieder bei 4260 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett dekantiert, es sollte nur der Bodensatz (Pellet) zurückbleiben. Mit 360 µl Resuspensionspuffer (Buffer 1) wurde das Pellet mit der geeigneten Präzisionspipette resuspensiert (Fa. Eppendorf, Hamburg) und in einen 1,5 ml sterilen, nummeriertes Cup (Fa. Eppendorf) überführt. Sobald das Pellet überführt ist, wurde es mit Binding Buffer (300 µl BR2) und anschließend mit Proteinkinase K vermengt. Diese besitzt endo- und exoproteolytische Aktivität und kann daher für die Aufspaltung der Proteine und zur Freisetzung von Nukleinsäuren eingesetzt werden. Danach wurden die Proben bei 10 min und 55°C in einem Wasserbad (WNE 14, Fa. Memmert, Schwabach) mit Schüttler erwärmt. Nach 5 min erfolgte die kurze Vortexung der Proben, möglichst ohne abzukühlen. Sofort im Anschluss wurden die Proben in die Kühlzentrifuge gegeben und bei 14000 U/min und 4°C für 4 min zentrifugiert. Das Lysat wurde komplett auf Qiashreddersäulen (Qiagen) überführt, um das Lysat zu homogenisieren und alte Zellteile zu entfernen. Die Säulen mussten an Deckel und Wand beschriftet werden, um der adäquaten Nummerierung zu folgen. Bei 16100 g wurden die Säulen für 3 min zentrifugiert (Tischzentrifuge, Heraeus Biofuge pico, Fa. Kendro, Hanau). Das Lysat wurde vorsichtig vom Pellet getrennt und in vorbereitete 350 µl Ethanol überführt. Durch *vortexen* und anzentrifugieren sollten eventuelle Tropfen gelöst werden. Je 650 µl der Proben wurden auf die PAXgene® Säulen gegeben, die auf einem 2 ml *processing tube* saßen, und für eine Minute zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Säule auf einen neuen Cup überführt und der Rest der Probenlösung wird aufgetragen und nochmals für 1 min zentrifugiert. Um die gebundene mRNA zu waschen, die sich in den Säulen befindet, wurde 350 µl Waschpuffer BR3 auf die Säulen gegeben. Anschließend erfolgte die Lösung bei einminütiger Zentrifugierung. Um die Membran der Säule von Resten der DNA zu befreien, wurde RNAse freie DNase auf die Säule pipettiert. Diese Mischung

(Master Mix) bestand pro Probe aus 70 µl RDD puffer (DNA Digestion Buffer) und 10 µl DNase. Insgesamt wurden 80 µl des Master Mix direkt auf die Säulen pipettiert und bei Raumtemperatur 15 min inkubiert.

Danach erfolgte ein zweiter Waschgang mit 350 µL Puffer 3, und einminütige Zentrifugierung. Die alten Cups mit dem Überstand wurden verworfen und die Säulen auf neue Cups überführt. Im Anschluss daran erfolgte eine zweite Waschung mit Puffer 4. Zu diesem Puffer mussten vorab, da dieser konzentriert vorlag, 44 ml 96–100-prozentiger Ethanol hinzugefügt werden. 500 µl des verdünnten Puffer 4 wurden auf die Säule pipettiert und ebenfalls für 1 min zentrifugiert. Die Säulen wurden auf Cups überführt und die Reste verworfen. Der vorhergegangene Arbeitsschritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurden 500 µl Waschpuffer auf die Säule gegeben und die Proben 3 min zentrifugiert. Die Cups wurden inklusive Überstände verworfen und die Säulen auf neue Cups überführt, diese wurden nochmals für 1 min zentrifugiert. Dieser Arbeitsschritt diente der Entfernung von eventuellen Resten auf der Säule. Anschließend werden die Säulen auf sterile 1,5 ml Eppendorfer Cups überführt. Im letzten Schritt wurden auf die Säulen 40 µl Elutionspuffer (BR 5) aufgegeben, wobei der Puffer direkt auf die Membran der Säule pipettiert werden musste. Dann erfolgte die Zentrifugierung der Cups um die RNA zu eluieren. Dieser Schritt wurde wiederholt, so dass im Anschluss 80 µl Eluat in den Cups vorhanden waren. Das Eluat wurde 5 min im Wasserbad bei 65 °C inkubiert. Bei dieser Temperatur denaturierten die Fragmente, die an die RNA anlagerten. Die Proben wurden sofort auf Eis gekühlt, im Anschluss erfolgte die photometrische Konzentrationsbestimmung der extrahierten RNA. Bis zur Weiterverarbeitung bzw. Messung wurden die Proben bei 80°C im Gefrierschrank gelagert.

3.2.2 cDNA-Synthese

Für die quantitativen RT-PCR Analysen musste die vorhandene mRNA in DNA umgeschrieben werden. Dies erfolgte über die Herstellung eines komplementären DNA-Strangs (*complementary DNA* - cDNA) mittels der Avian-Myeloblastosis-Virus-Reversen Transkriptase (AMV-RT). Dazu wurde das *First Strand cDNA Synthesis Kit*

(AMV, Fa. Roche, Penzberg, Germany) verwendet. Hier wurde der Oligo-dT-Primer angewandt, dieser bindet zum 3'-Ende des Poly-A-Schwanzes der mRNA.

Pro Reaktion wurde 1 µg Gesamt-RNA benötigt. Da die Menge der Reagenzien im Kit festgelegt ist, musste die RNA-Menge in 8.2 µl vorliegen, um für den Ansatz inkl. Reagenzien 20 µl Gesamtinhalt zu erzielen.

Die benötigte Menge mRNA wurde aus dem Probengefäß in ein steriles Reaktionsgefäß (Fa. Eppendorf) überführt.

Die sterilen Cups und die PCR Tubes (0,2 ml) wurden beschriftet und auf Eis gelagert. Um 8.2 µl in den Cups zu erhalten, musste die Gesamtmenge mittels Vakuumverdampfer (Zentrifuge *RC 10.10* + ATMA-Kompressor, Fa. Juan, Unterhaching) bei einer Temperatureinstellung von 45°C reduziert werden. Nach vorgegebener Zeit wurden die Proben mit einer geeichten Präzisionspipette überprüft und nach erreichtem Zielvolumen in die PCR-Cups (Fa. Eppendorf, Hamburg) überführt.

Anschließend erfolgte die Hitzedenaturierung die Sekundärstruktur der mRNA.

Für den Versuch wurde ein sogenannter Master Mix (**Tabelle 2**) hergestellt. Dieser besteht aus 10 ml Reaktions-Buffer (entspricht: 100 mM Tris, 500 mM KCl, pH 8.3, Puffer 1); 25mM MgCl₂, (Puffer 2), Deoxynucleotid Mix (dATP, dCTP, dTTP, dGTP, jeweils 10 mM, entspricht Puffer 3), Oligo-p(dT)15-Primer (Puffer 5), RNaseInhibitor (Puffer 7) und AMV-Reverse-Transkriptase (Puffer 8).

Die für die Versuchsdurchführung benötigte Reagenzienmenge wurde in Abhängigkeit der Probenanzahl ermittelt.

10 mal Reaction Buffer	2 µl x Probenanzahl
25 mM MgCl ₂	4 µl x Probenanzahl
Desoxynucleotid Mix	2 µl x Probenanzahl
Oligo p(dT) Primer	2 µl x Probenanzahl
RNase Inhibitor	1 µl x Probenanzahl
AMV RT	0,8 µl x Probenanzahl

Tabelle 2: Mastermix für reverse Transkription: Reagenzien für die Probenanalyse

Nachdem die Proben 5 min auf Eis lagerten, wurden jeweils 11,8 µl Master Mix auf jede Probe gegeben und kurz anzentrifugiert, damit das Enzym vollständig im Master Mix inkubiert.

Die Proben wurden anschließend in einen Heizblock (PTC-200, Fa. MJ Research, Watham, USA) gegeben und in folgenden Zyklen inkubiert:

Annealing (Oligonukloetid-Bindung an die RNA) bei 25°C für 10 min
Transkription (Überschreibung der RNA in cDNA bei 42°C für 60 min
Denaturierung des AMV Enzyms (Inaktivierung der Reversen Transkriptase) bei 99°C für 5 min
Abkühlen der Reagenzien bei 4°C für weitere 5 min

Tabelle 3: Inkubationsbedingungen im Thermalblock zeit- und temperaturabhängig

Nach Abkühlung der Proben wurden diese im Kühlschrank bei -20°C eingefroren.

3.2.3 Realtime-PCR, quantitative Genexpressionsanalyse

Zusätzlich zur herkömmlichen PCR lässt sich mit dem Verfahren der *Real-Time-quantitativen PCR (rt-PCR)* die Menge der amplifizierten DNA-Fragmente quantifizieren (52). Hierfür wurde das Light Cycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Fa. Roche, Penzberg, Germany) verwendet. Die Quantifizierung erfolgte mittels einer Fluoreszenzmessung während jedes PCR-Schrittes in der exponentiellen Phase der PCR. Die Fluoreszenz entstand durch den DNA-Farbstoff SYBR Green, der in Nukleinsäure-Doppelstränge interkaliert. Dies wurde durch eine Schmelzkurvenanalyse bestätigt.

Diese Messtechnik macht sich die Eigenschaft zu nutze, dass bestimmte PCR-Produkte im Vergleich zu unspezifischen Produkten, wie Primerdimeren und Verunreinigungen, eine spezifische Schmelztemperatur haben.

Wird eine DNA aufgeschmolzen, löst sich das daran gebundene SYBR Green und fluoresziert nicht mehr. Der Wendepunkt der Fluoreszenzkurve gibt somit Aufschluss über die vorhandene Menge des gesuchten Produkts. Die Quantifizierung erfolgt dabei mittels der LightCycler® analysis software (Version 3.39) anhand einer externen Standardkurve.

Aus dem Kit von *LC-Search* werden der Standard, die Standardverdünnungslösung, das Primer Set und die Kontroll-DNA verwendet. Aus dem Kit SYBR Green wird SYBR Green 1a verwendet.

Die benötigte Anzahl an Glaskapillaren wurden in den Kapillaren-Kälteblock eingesetzt und mit dem Deckel verschlossen.

Um eine Standardverdünnung herzustellen, wurden in 4 Cups 10,8 µl Standardlösung pipettiert, dann erfolgte die Zugabe in das erste Gefäß mit 1,2 µl des Standards einer bekannten Konzentration mit definierter Kopienzahl. Anschließend wurde aus der Standardlösung jeweils 1,2 µl entnommen und mit dem nächsten Gefäß vermengt. So entstand eine Standardlösung von unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000.

Um den Master Mix für die PCR herzustellen, verwendete man 6 µl RNase-freies Wasser und jeweils 2 µl LC- Primer und SYBR Green je Probenansatz. Der Mix musste lichtverschlossen aufbewahrt werden, da SYBR Green lichtempfindlich ist.

Anschließend wurden in alle Glaskapillaren 9 µl H₂O vorgelegt, zusätzlich wurde eine Negativ-sowie eine Positivkontrolle befüllt (10 µl).

Im nächsten Schritt erfolgte die Zuführung von 1 µg DNA in die Kapillaren und dann 10 µl des MasterMix. Alle Kapillaren wurden mit einem Verschluss versehen und mit der Kühlzentrifuge bei 4°C und 660 rpm für 4 min zentrifugiert (Zentrifuge BR 4, Fa. Juan, Unterhaching, Germany).

Danach wurden die Proben in das LightCycler® Karussel überführt.

Nach dem Durchlauf wurden die Proben herausgenommen und die analysierten Daten wurden ausgedruckt und gespeichert.

3.3. Statistische Auswertung

Zur Bestimmung der gewählten Parameter wurden bei jedem Patienten zu jedem der sechs Zeitpunkte (Abnahmezeitpunkt, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h und 72 h) jeweils zwei Blutproben entnommen. Aus den gemessenen Rohdaten wurde der Mittelwert errechnet und als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*) MW ± SEM dargestellt und in entsprechende Patientenkollektive eingeteilt. Die ermittelten Messwerte werden als Kopienzahl/µl mRNA angegeben.

Um die gewonnenen Daten auf mögliche Unterschiede hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs zu untersuchen, wurden die Messwerte auf Normalverteilung getestet und dann eine Varianzanalyse (ANOVA-Analysis on variance) nach Kruskal-Wallis, mit anschließendem paarweisen Vergleich (Dunn's Methode), durchgeführt.

Um Unterschiede in den Subgruppen aufzuzeigen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt, gefolgt von einem Mann-Whitney Rank Sum Test.

Um die Signifikanzen im zeitlichen Verlauf und in den Gruppen untereinander darzustellen wurde das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ festgesetzt. Damit beträgt die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) weniger als 5%.

Zur statistischen Auswertung und Analyse der Daten wurde die Software *SigmaStat* für *Windows* Version 3.00 und zur Visualisierung der Ergebnisse die Software *SigmaPlot* für *Windows* Version 8.0 verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Präklinische und klinische Patientendaten

In die Studie von 2003 bis 2006 wurden 25 Patienten im Alter von 35-90 Jahren eingeschlossen. Das Durchschnittsalter betrug 67,15 Jahre. Aus der Gesamtgruppe der Patienten waren 19 männlich und 6 weiblich. Von den teilnehmenden Patienten erlitten 12 einen Herzinfarkt, weitere Diagnosen waren Lungenembolie und maligne Rhythmusstörungen. Während der ersten Behandlungstage auf der Intensivstation verstarben 10 Patienten. 15 Patienten überlebten während dieses Zeitraums und wurden meist in die Rehabilitation entlassen. Im Zeitraum von 2004 bis 2006 wurden 6 Patienten hypothermisch behandelt. Die Faktoren die in die Score-Berechnung mit eingehen wurden aus den Patientenakten und den Laborwerten zu den jeweiligen Stunden errechnet.

Die Arbeitsdiagnose, Geschlecht, Alter, Reanimationsdauer und die initiale Gabe von Katecholaminen sind in **Tabelle 4** aufgeführt.

Nr.	Initialen	Geschlecht	Alter in Jahren	Klinische Arbeitsdiagnose	1.Dauer CPR in min	Defibrillation Anzahl	Katecholamine in mg
1	H., E.	m	62	Alkoholabusus, respiratorische Insuffizienz bei Hypothermie mit Hyperkapnie, Asystolie	5	HDM	0,15
2	B., H.	m	76	Kammerflimmern wegen Myokardinfarkt	5	6	k.A.
3	B., A.	m	63	Asystolie, schwerste COPD und respiratorischer Insuffizienz	25	1	15
4	D., T.	m	32	I.v. Drogenmischintoxikation, Aspiration, Asystolie	10	HDM	k.A:
5	F., T.	m	34	Schweres isoliertes Thorax-Einklemmtrauma, Hypoxie, Asystolie	15	HDM	k.K.
6	G., K.	m	61	Kammerflimmern wegen Myokardinfarkt	10	k. A.	k. A.
7	M., H.	m	86	Asystolie wegen Myokardinfarkt	17	k. A.	k. A.
8	G., N.	m	56	Kammerflimmern wegen, Herzhinterwandinfarkt	25	3	7,3
9	K., G.	m	45	Kammerflimmern wegen Myokardinfarkt	10	3	2
10	B., D.	m	44	Myokardinfarkt	10	5	1
11	S., A.	m	67	Asystolie bei Myokardinfarkt	10	HDM	4
12	B., M.	w	72	Asystolie bei fulminanter Lungenembolie	40	k. A.	k. A.
13	P., A.	m	54	Asystolie, unkl. Genese	25	3	k.K.
14	D., W.	m	61	KHK mit kardiogenem Schock, Kammerflimmern	35	6	8
15	P., L.	m	90	Myokardinfarkt, Kammerflimmern	7	1	k. K.
16	D., D.	m	51	Hinterwandinfarkt, Kammerflimmern	10	1	k. K.
17	P., W.	w	62	Koronare Herzerkrankung, Kammerflimmern	20	9	9
18	T., H.	m	70	Koronare Herzerkrankung, Kammerflimmern	8	1	k. K.
19	S., U.	w	62	Koronare Herzerkrankung, Kammerflimmern	12	2	k.K.
20	G., E.	w	51	Myokardinfarkt, Kammerflimmern	45	7	9
21	M., A.	w	69	Myokardinfarkt, Kammerflimmern	13	10	3
22	A., M.	m	72	Hinterwandinfarkt, Asystolie	20	HDM	4
23	K., J.	m	88	Stemi, kardiogener Schock mit Kammerflimmern	9	4	2
24	K., R.	w	82	KHE/COPD, Kammerflimmern	10	1	1,5
25	Z., F.	m	75	KHK, Kammerflimmern	11	1	k. K.

Tabelle 4 Angaben zur Reanimationsnummer, Geschlecht und Alter, sowie Arbeitsdiagnose. Reanimationsdauer in min aus Notarztprotokoll. k.A. Keine Angaben zu Reanimationsdauer. HDM = Herzdruckmassage, bei defibrillierten Patienten die Anzahl der Elektroschocks. Katecholamine je nach Dosis in mg intravenös oder über den Tubus verabreicht (k.K. = keine Katecholamine erhalten).

Der klinische Verlauf sowie die Scores der Patientenauswertung sind in **Tabelle 5** aufgeführt.

Nr.	Initialen	Verlauf des Patienten Überlebt/Verstorben	MOF-Score nach 24h	MOF-Score nach 72h
1	H., E.	Selbstentlassung aus Klinik	6	3
2	B., H.	Überlebt	4	3
3	B., A.	Verstorben am 4. Behandlungstag	5	4
4	D., T.	Verstorben, Hirntod		
5	F., T.	Überlebt, in Rehabilitation	k.A.	k.A.
6	G., K.	Überlebt, in Rehabilitation	k.A.	k.A.
7	M., H.	Vor 3. Behandlungstag verstorben	k.A.	k.A.
8	G., N.	Überlebt, in Rehabilitation	6	5
9	K., G.	Überlebt, in Rehabilitation	4	3
10	B., D.	Überlebt, in Rehabilitation	1	1
11	S., A.	Überlebt in Rehabilitation	7	6
12	B., M.	Verstorben nach 72 h	k.A.	k.A.
13	P., A.	Verstorben 5 Tage nach Ereignis, hypoxischer Hirnschaden, gastrointestinale Blutungen, Hyperthermie unklarer Genese	5	3
14	D., W.	Entlassen in gebessertem Allgemeinzustand	7	5
15	P., L.	Entlassen in gebessertem Allgemeinzustand	1	2
16	D., D.	Entlassen in stabilem Allgemeinzustand	1	0
17	P., W.	Verstorben 5 Tage nach Ereignis, ausgeprägter hypoxischer Hirnschaden	3	3
18	T., H.	Entlassen in gebessertem Allgemeinzustand	2	2
19	S., U.	Entlassen in Rehabilitation	0	0
20	G., E.	Verstorben 4 Tage nach Ereignis durch kardiorespiratorische Insuffizienz bei generalisiertem Hirnödem	4	3
21	M., A.	Entlassen in Rehabilitation	3	4
22	A., M.	Verstorben 11 Tage nach Ereignis, Aspirationspneumonie, Sepsis, Nierenversagen, Subileus, zunehmende Azidose mit terminalem Kreislaufversagen	6	6
23	K., J.	Verstorben 9 Tage nach Ereignis, schwerer hypoxischer Hirnschaden, Asystolie	3	4
24	K., R.	Verstorben nach 48 h	6	6
25	Z., F.	Entlassen in gutem Allgemeinzustand	2	1

Tabelle 5 Klinischer Verlauf der einzelnen Patienten und Score-Werte zur Stunde 24 und 72.

4.2. Quantitative Genexpressionsanalysen

4.2.1 Zeitlicher Verlauf zur Expressionsdynamik

Um den zeitlichen Verlauf aller Patienten zur Expressionsdynamik darzustellen, wurden die Daten mit den Werten der Abnahmzeitpunkte verglichen, siehe **Abbildung 2**. Die x-Achse beschreibt die Zeitpunkte der Blutabnahme im zeitlichen Verlauf. „Zeitpunkt A“ beschreibt den Abnahmzeitpunkt direkt nach *ROSC*.

4.2.2 Proinflammatorische Zytokine, TNF- α , Interleukin-8

Eine signifikante Abnahme zeigt sich nach einem Kruskal-Wallis Test ($p < 0,05$) für TNF- α zur 24 h. Bei IL-8 kommt es zu einem signifikanten Abfall zu allen Zeitpunkten außer zur 6. h ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis-Test), siehe **Abbildung 3**. Im Verlauf sind kaum mehr Expressionen von IL-8 nachweisbar, Werteminima werden bereits 24 h nach Ereignis erreicht.

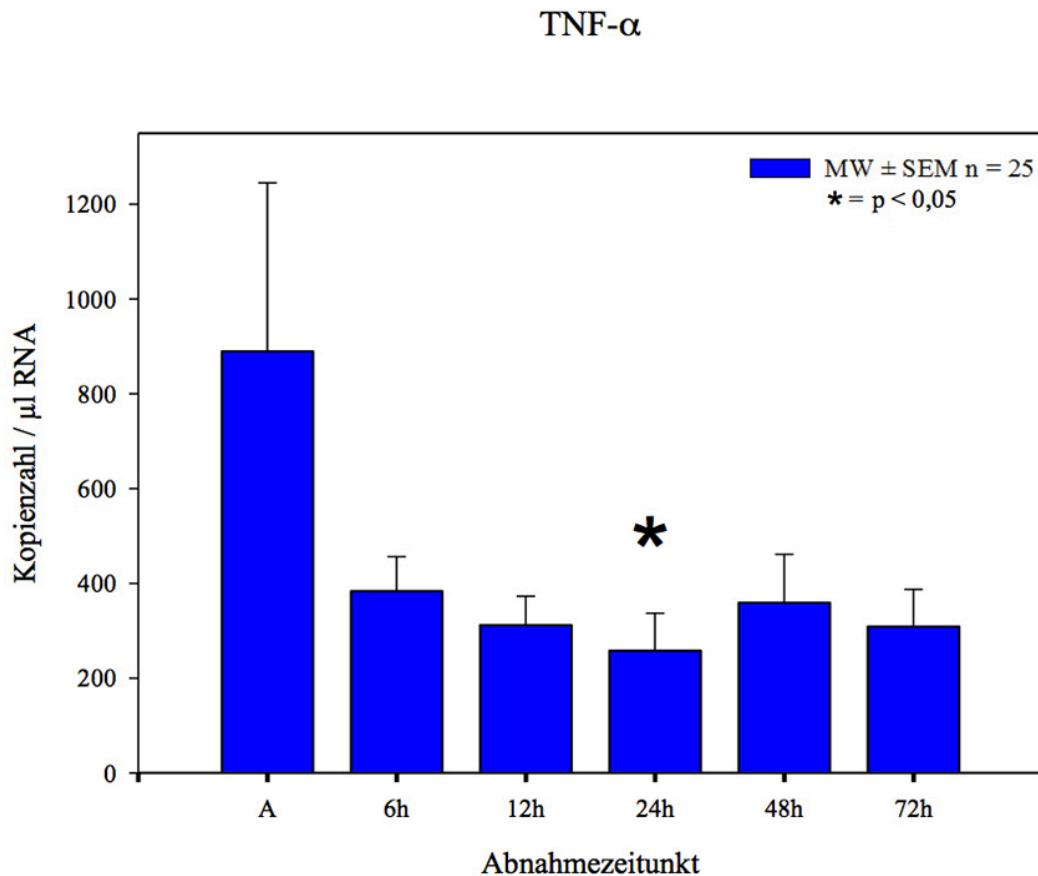


Abbildung 2 Vollblut-RNA Expression von TNF- α im zeitlichen Verlauf nach ROSC. Kruskal-Wallis-Test p<0,05 vs Abnahmezeitpunkt (MW ± SEM).

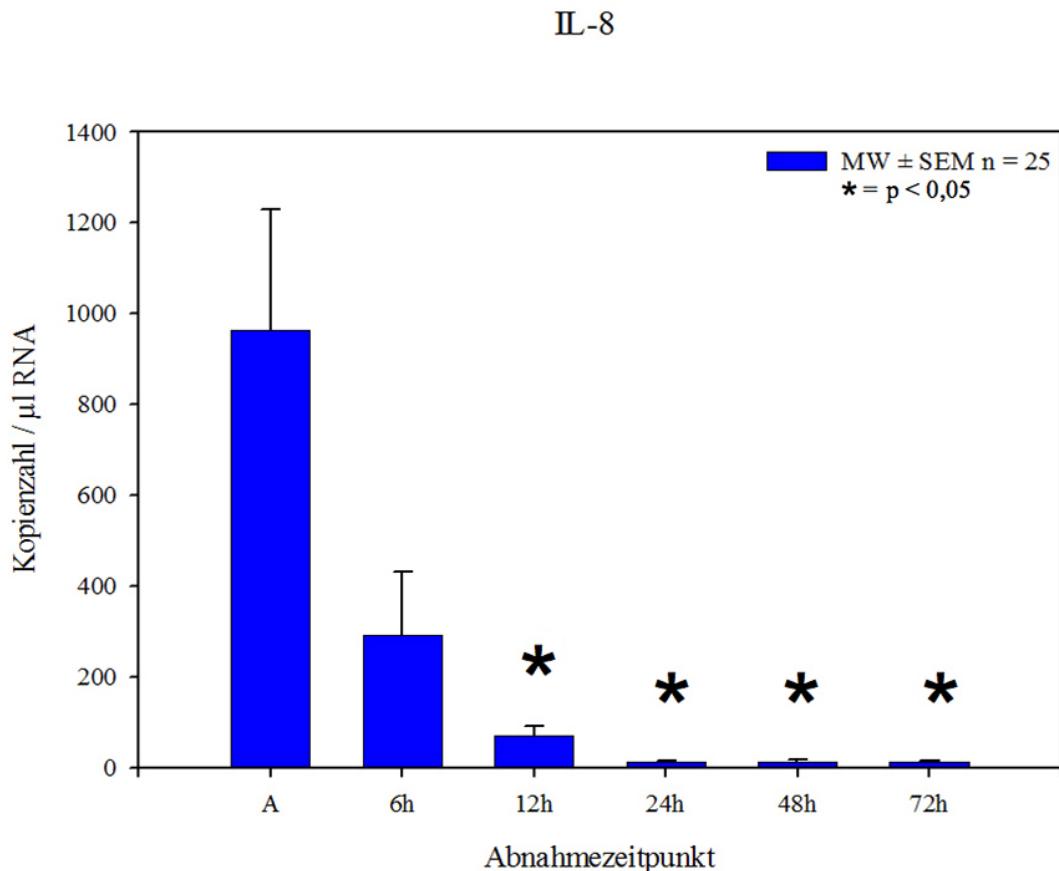


Abbildung 3 Vollblut-RNA Expression von IL-8 im zeitlichen Verlauf nach ROSC. Kruskal-Wallis-Test * = p < 0,05 (MW ± SEM).

4.2.3 Antiinflammatorische Zytokine, Interleukin-10, Interleukin-1 Rezeptorantagonist

Der Verlauf der Expressionsniveaus der antiinflammatorischen Zytokine verläuft, im Vergleich mit TNF- α und IL-8 in die entgegengesetzte Richtung. Nach dem Abnahmzeitpunkt ist eine Zunahme zu erkennen, siehe **Abbildungen 4 und 5**. Im Fall von IL-10 zeigt sich dabei lediglich eine Tendenz, während die Zunahme von IL-1ra zu allen Abnahmzeitpunkten signifikant ist im Vergleich zum Anfangsabnahmzeitpunkt (Kruskal-Wallis-Test, p < 0,05).

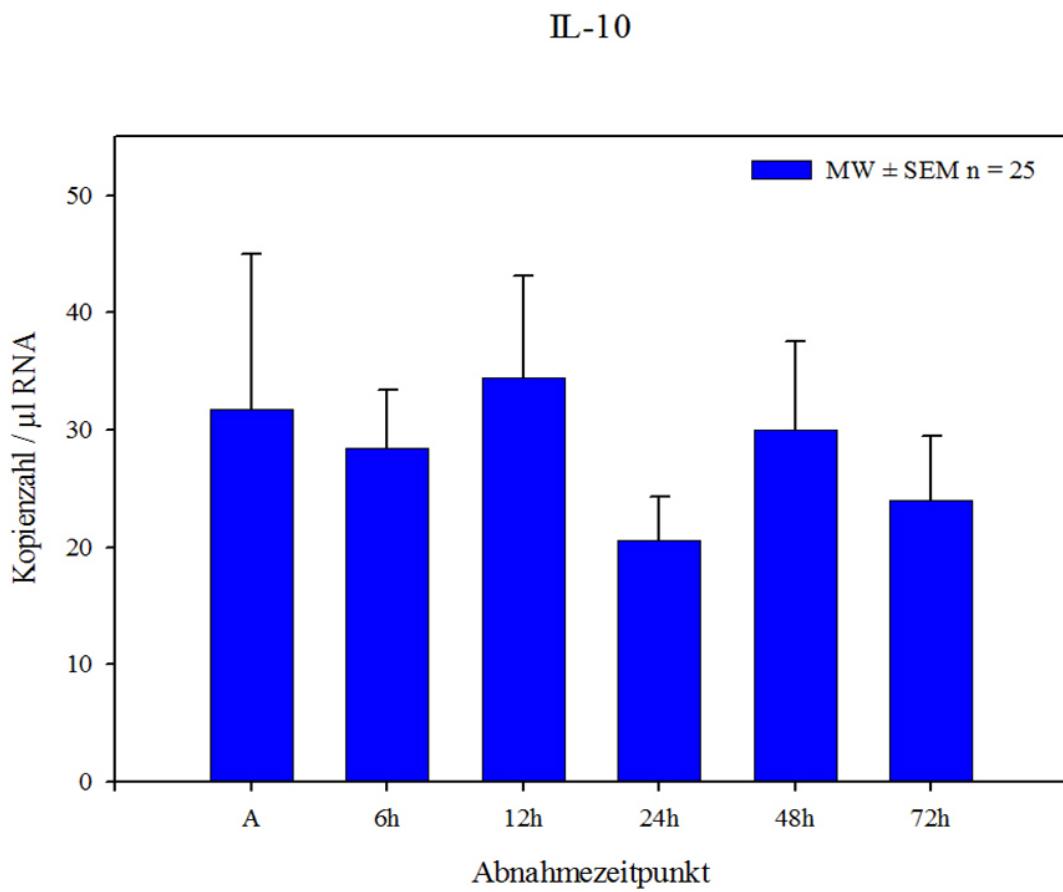


Abbildung 4 Vollblut-RNA Expression von IL-10 im zeitlichen Verlauf nach *ROSC* (MW ± SEM).

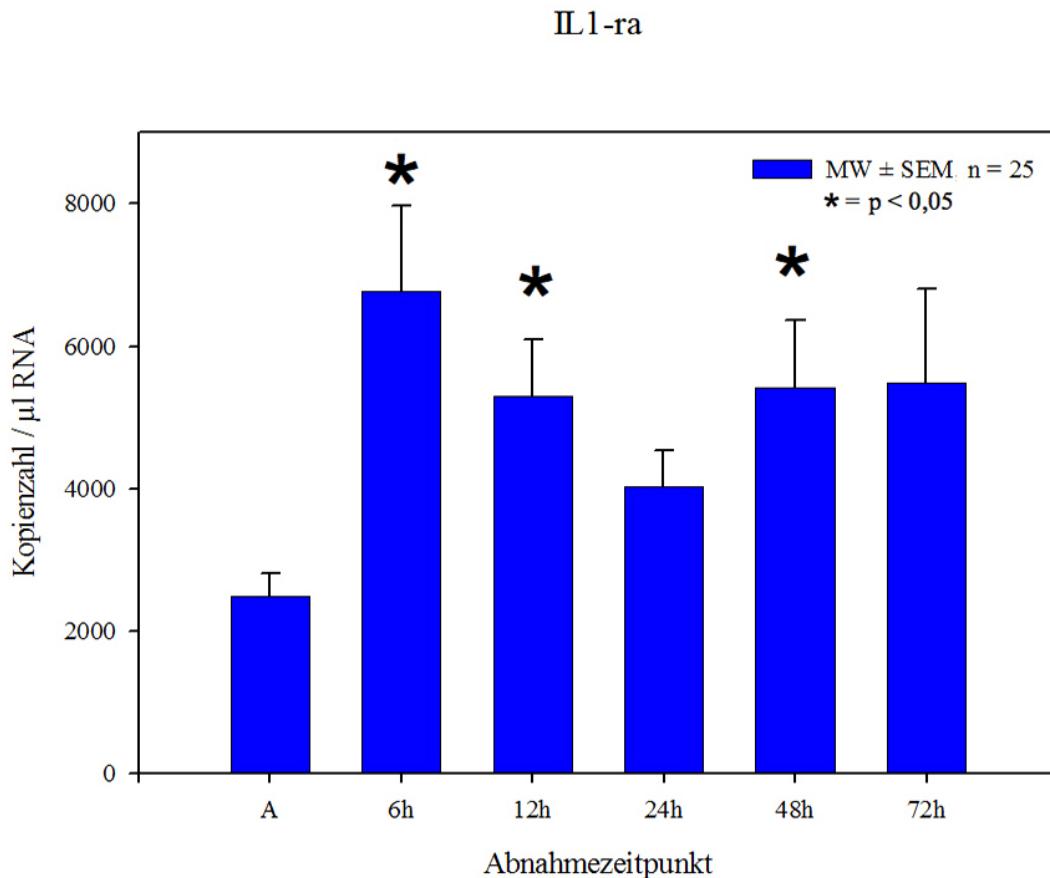


Abbildung 5 Vollblut-RNA Expression von IL-1ra im zeitlichen Verlauf nach *ROSC*. Vergleich Abnahmzeitpunkt zum Anfangsabnahmzeitpunkt mit Kruskal-Wallis-Test, $p < 0,05$ (MW \pm SEM).

4.3. Korrelation MOF-Score und Genanalysen

Im Folgenden wurde untersucht ob die Expressionsniveaus der pro- und antiinflammatorischen Zytokine mit dem Ausmaß des Multiorganversagens korrelieren.

Es konnte allerdings für keines der untersuchten Zytokine, zu keinem Abnahmzeitpunkt ein signifikanter Unterschied innerhalb der vergleichenden Gruppe festgestellt werden. Die Versuchsergebnisse zeigten lediglich Tendenzen.

Die intrazelluläre Expression von TNF- α der Gruppe MOF < 4 stellte sich über den beobachteten Zeitraum von 72 h deskriptiv höher dar, als die Gruppe mit höheren Werten.

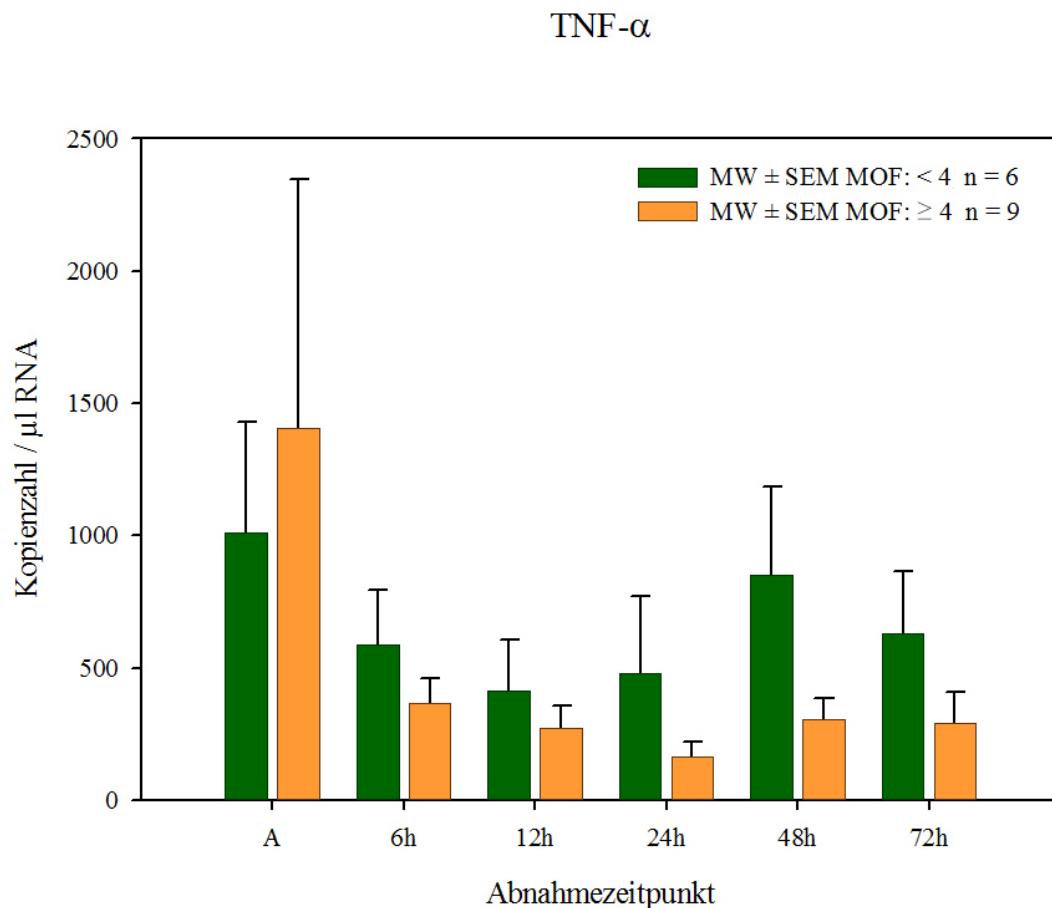


Abbildung 6 Vollblut-RNA Expression von TNF- α . Vergleich der Gruppen MOF < 4 vs. MOF ≥ 4 (MW ± SEM).

Die intrazelluläre Expression von IL-8 der Gruppe MOF ≥ 4 zeigt deskriptiv höhere Werte zu A, 6 h und 12 h, mit einer tendenziellen Erhöhung zum Abnahmzeitpunkt A und zum Zeitpunkt 6 h, siehe **Abbildung 7** (Mann-Whitney Rank Sum Test, $p = 0,087$ und $p = 0,059$). Im zeitlichen Verlauf nehmen die Expressionen ab, Werteminima werden für beide Gruppen ab dem Zeitpunkt 24 erreicht.

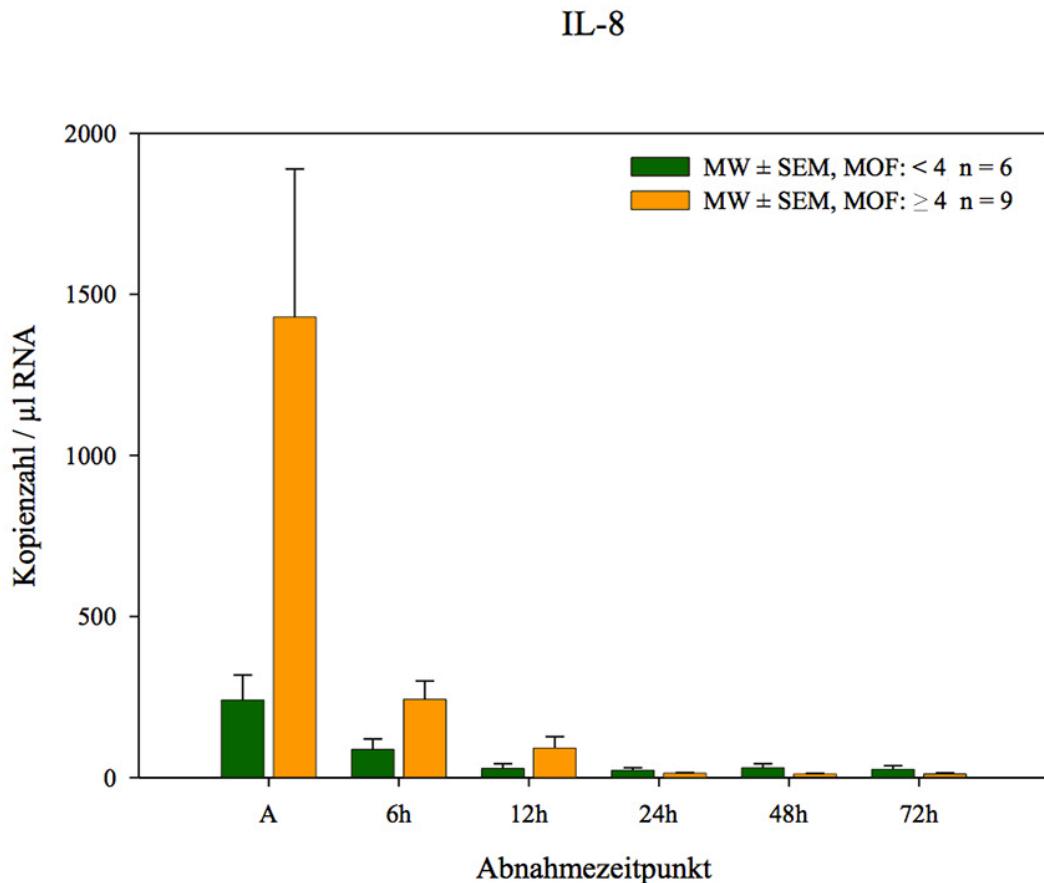


Abbildung 7 Vollblut-RNA Expression von IL-8. Vergleich der Gruppen MOF < 4 vs MOF \geq 4 (MW \pm SEM).

Auch die Expression von IL-10 zeigt zu Beginn höhere Werte der Gruppe MOF \geq 4, es zeigen sich tendenziell höhere Werte dieser Gruppe zum Zeitpunkt 12 h, siehe **Abbildung 8** (Mann-Whitney Rank Sum Test $p = 0,052$). Ab dem Zeitpunkt 24 h verlaufen die Expressionen beider Gruppen ähnlich deskriptiv und ohne signifikanten Nachweis.

IL-10

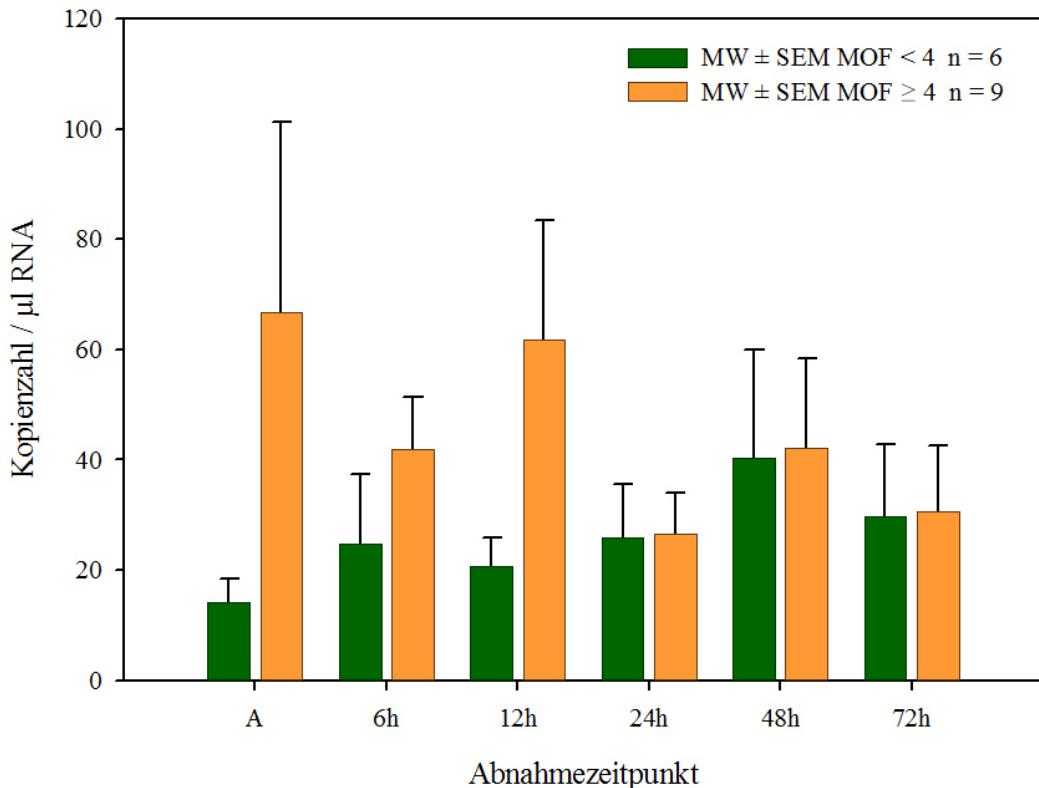


Abbildung 8 Vollblut-RNA Expression von IL-10. Vergleich der Gruppen MOF < 4 vs. MOF \geq 4 (MW \pm SEM).

Bei IL-1ra scheinen die Expressionen der Gruppe mit MOF-Werten ≥ 4 ebenfalls höher zu sein, als in der Gruppe mit niedrigeren MOF-Werten. Die Gruppe MOF < 4 verhält sich deskriptiv, auf einem ähnlichen, nicht schwankenden Expressionsniveau, ohne Signifikanz oder Tendenz, siehe **Abbildung 9**.

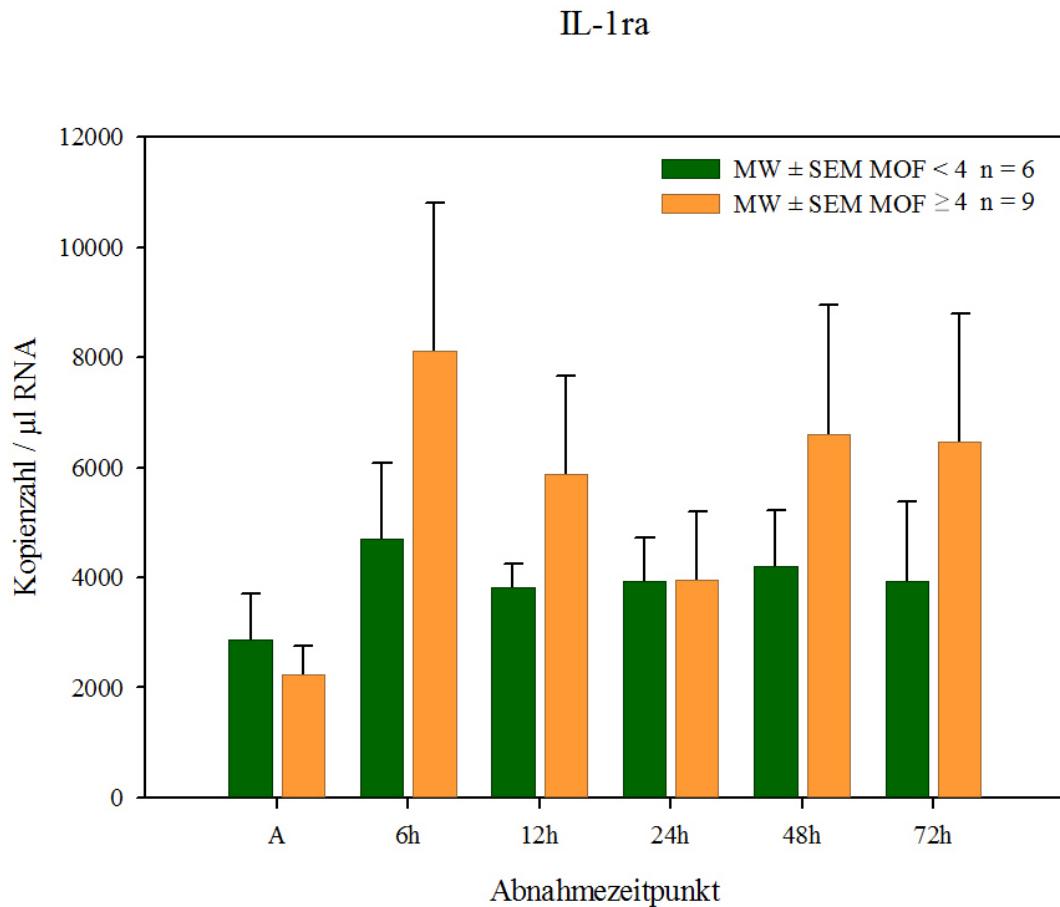


Abbildung 9 Vollblut-RNA Expression von IL-1ra im Vergleich der Subgruppen MOF < 4 vs. MOF ≥ 4 (MW ± SEM).

4.4. Vergleich der Patientengruppen hinsichtlich des Überlebens/Versterbens

Die **Abbildungen 10 bis 13** zeigen Expressionsunterschiede der Zielparameter in Abhängigkeit vom Überleben und Versterben der Patienten im zeitlichen Verlauf nach *ROSC*.

Die Ergebnisse wurden statistisch mit einer Varianzanalyse (ANOVA, $p < 0,05$) auf Signifikanz getestet, gefolgt von einem Mann-Whitney Rank Sum Test als Post-hoc Verfahren.

4.4.1 Proinflammatorische Zytokine

Im Vergleich der Gruppen zeigt sich kein Expressionsunterschied hinsichtlich des klinischen *Outcome* bei TNF- α , siehe **Abbildung 10**. Bei TNF- α erscheint der Expressionsabfall bei den Verstorbenen allenfalls deskriptiv niedriger als bei den Überlebenden.

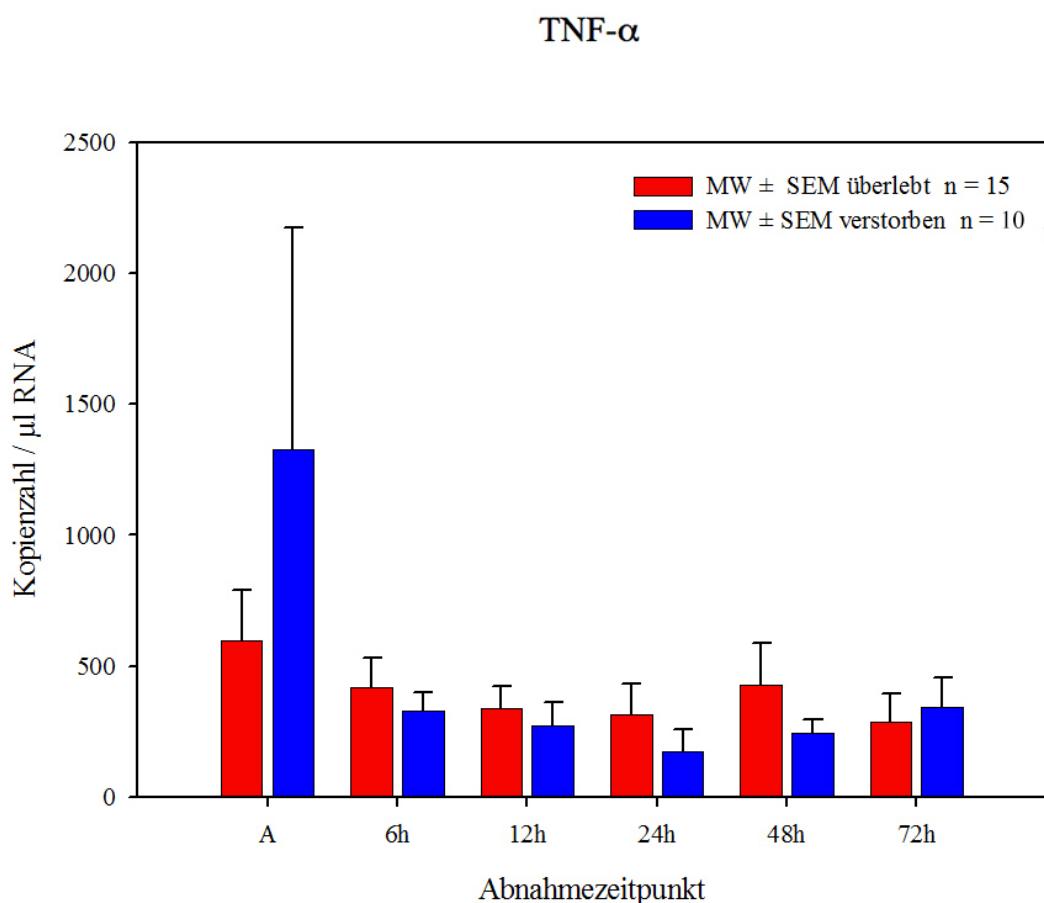


Abbildung 10 Vollblut-RNA Expression von TNF- α von überlebenden vs. verstorbenen Patienten (MW \pm SEM).

Für das proinflammatorische Zytokin IL-8 fallen die Kopienzahlen für beide Gruppen auf einen sehr niedrigen Wert zurück, IL-8 wird also im zeitlichen Verlauf kaum mehr exprimiert (siehe **Abbildung 11**). Im Vergleich der Gruppen zeigt sich eine Tendenz zum

Zeitpunkt 6 h mit verringerten Werten der überlebenden Gruppe. Die Expression von IL-8 scheint bei den Verstorbenen bis zum Zeitpunkt 12 h gering erhöht zu sein.

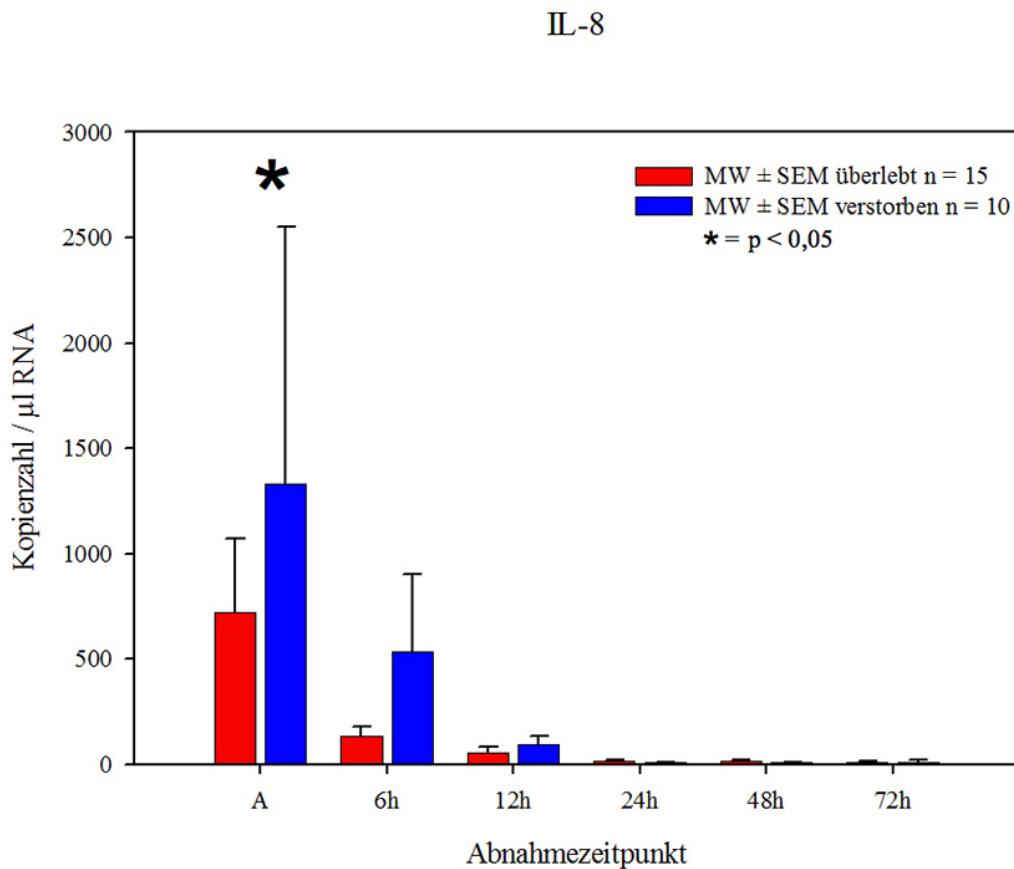


Abbildung 11 Vollblut-RNA Expression von IL8 von überlebenden vs. verstorbenen Patienten (MW ± SEM).

4.4.2 Antiinflammatorische Zytokine

Bei dem antiinflammatorischen Zytokin IL-10 zeigen sich zu allen Abnahmezeitpunkten erhöhte Expressionsraten in der Gruppe der Verstorbenen. Es kommt bei beiden Gruppen zu einem Abfall zum Zeitpunkt 24 h, mit anschließendem Wiederanstieg, dies ist in der Gruppe der verstorbenen Patienten deutlicher zu sehen. Zum Abnahmezeitpunkt 48 h und 72 h sind die Expressionsraten, im Vergleich zur überlebenden Gruppe, signifikant

erhöht, siehe **Abbildung 12** (ANOVA, gefolgt von Mann-Whitney Rank Sum Test, $p<0,05$).

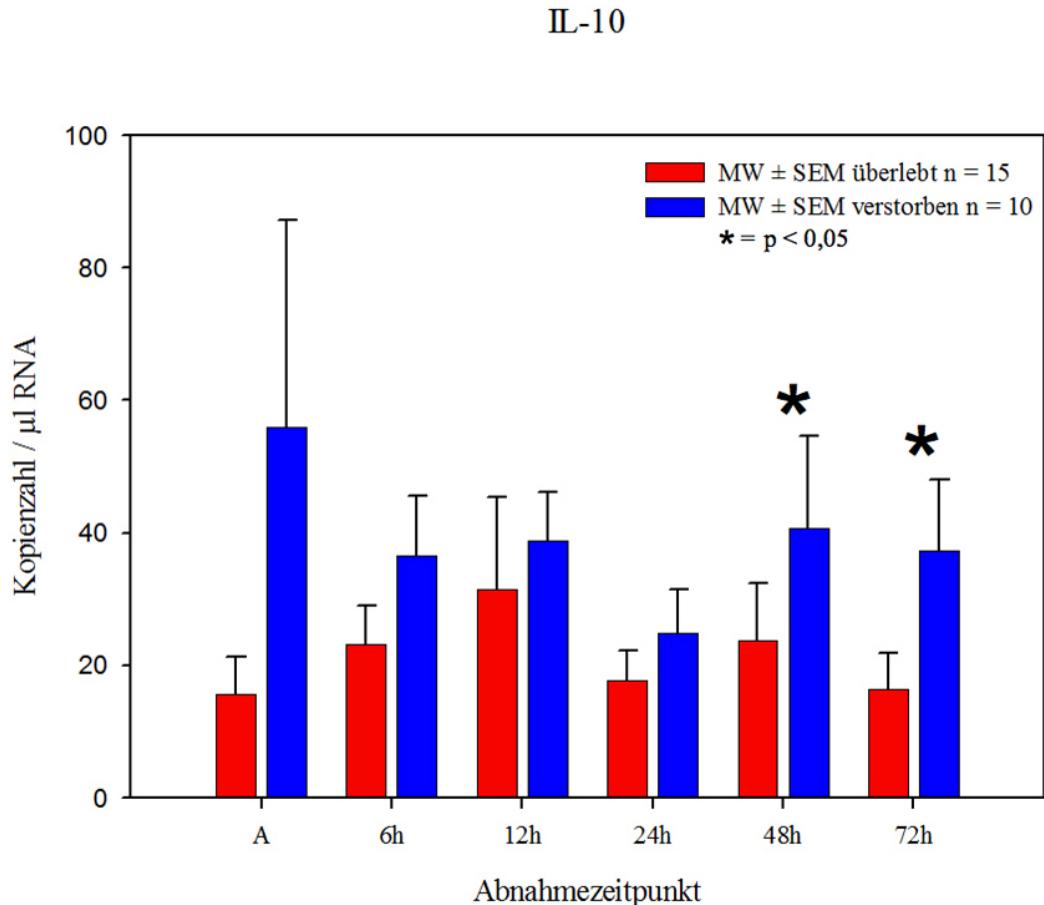


Abbildung 12 Vollblut-RNA Expression von IL-10 von überlebenden vs. verstorbenen Patienten (MW \pm SEM).

Auch bei IL-1ra, als antiinflammatorischem Parameter, zeigen sich wie in **Abbildung 13** dargestellt keine signifikanten Unterschiede in der Expression innerhalb der beiden Gruppen.

IL-1ra

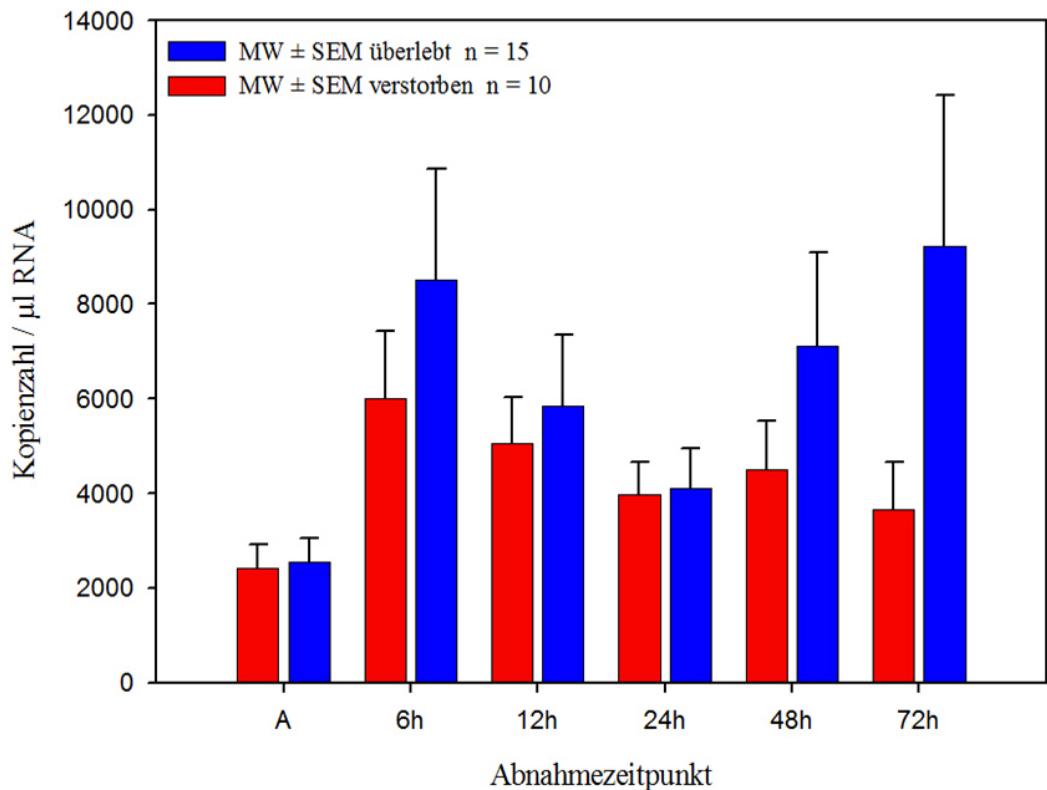


Abbildung 13 Vollblut-RNA Expression von IL-1ra von überlebenden und verstorbenen Patienten (MW ± SEM).

4.5. Vergleich Hypothermie versus Normothermie

Die intrazelluläre Expression von TNF- α (siehe **Abbildung 14**) zeigt einen biphasischen Verlauf der nichtgekühlten Patientengruppe. Nach 24 h steigen die Expressionen an, während die hypothermisch behandelten Patienten konstant niedrige Raten zeigen. Beide Verläufe zeigen sich jedoch nur deskriptiv, ohne signifikante Unterschiede der jeweiligen Subgruppen, zu den Abnahmepunkten.

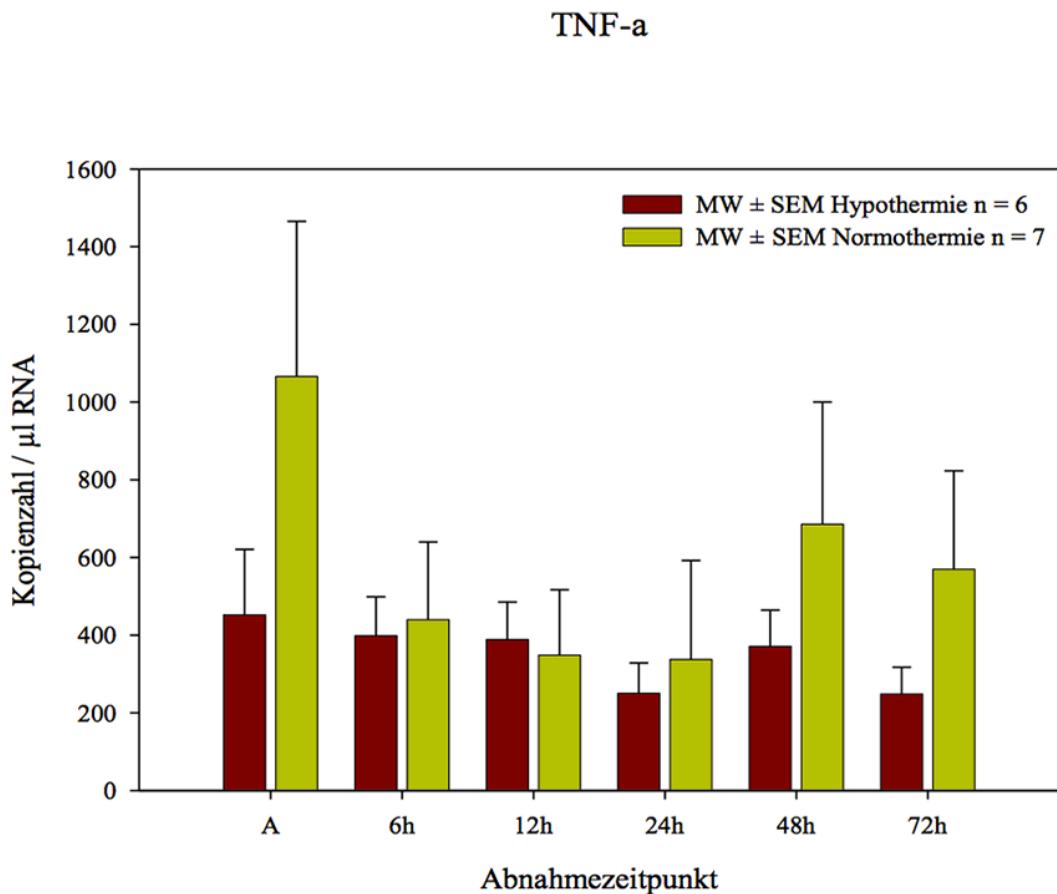


Abbildung 14 Vollblut-RNA Expression von TNF- α im Vergleich der Gruppen hypothermisch vs. normothermisch behandelter Patienten (MW ± SEM).

Die Expression von IL-8 zeigt sowohl bei der Gruppe der hypothermisch behandelten Patienten, als auch bei der Gruppe der normothermisch behandelten Patienten ein

abnehmendes Niveau ab dem Zeitpunkt 6 h und danach über den gesamten Beobachtungszeitraum, siehe **Abbildung 15**. Ab dem Zeitpunkt 24 h zeigen sich in beiden Gruppen kaum mehr Konzentrationen. Auch hier zeigt sich im direkten Vergleich der Subgruppen untereinander nur ein deskriptiver Verlauf ohne statistische Signifikanz.

IL-8

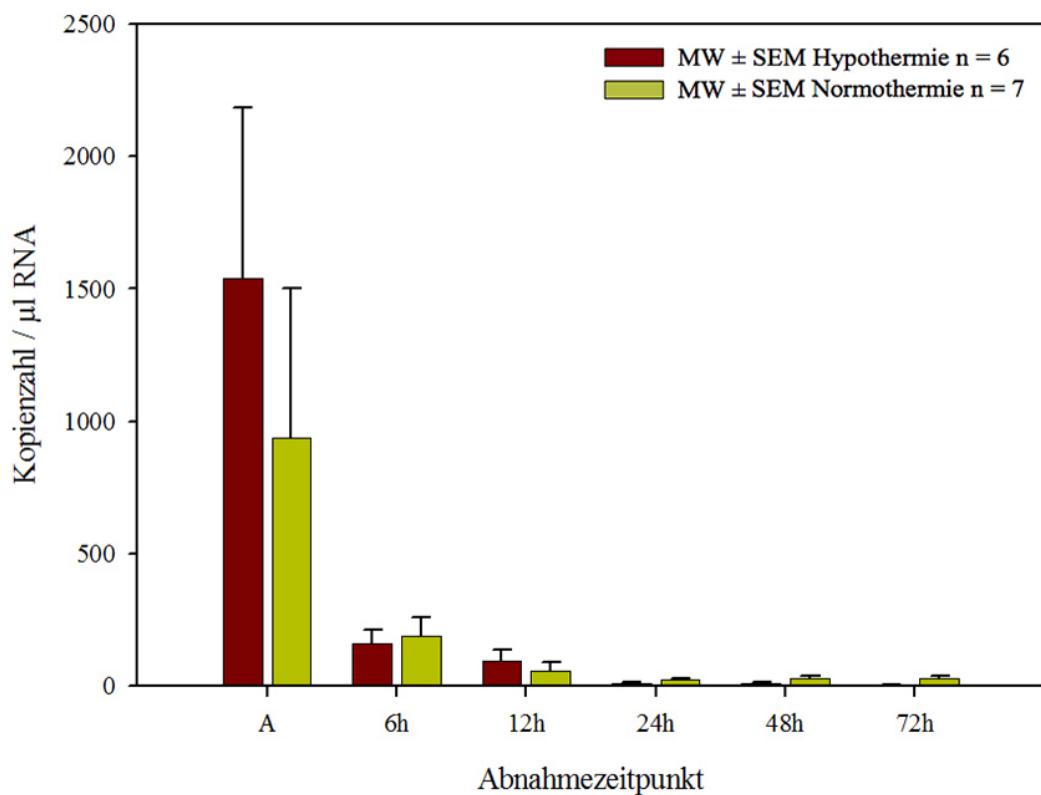


Abbildung 15 Vollblut-RNA Expression von IL-8 im Vergleich hypothermisch-behandelter Patienten zu normothermen Patienten (MW ± SEM).

Die Expressionsraten von IL-10 bei gekühlten Patienten zeigen sich erhöht im Zeitraum der Kühlung (bis zum Zeitpunkt 24 h), während die nicht gekühlte Gruppe geringere Konzentrationen zeigt, siehe **Abbildung 16**. Nach dem Zeitpunkt 24 h steigen beide Konzentrationen wieder an. Im Vergleich der Gruppen untereinander gibt es zum Zeitpunkt 12 h einen signifikanten Unterschied, wobei die Subgruppe der hypotherm-behandelten Patienten erhöhte Werte zeigt (Mann-Whitney Rank Sum Test, $p > 0,05$).

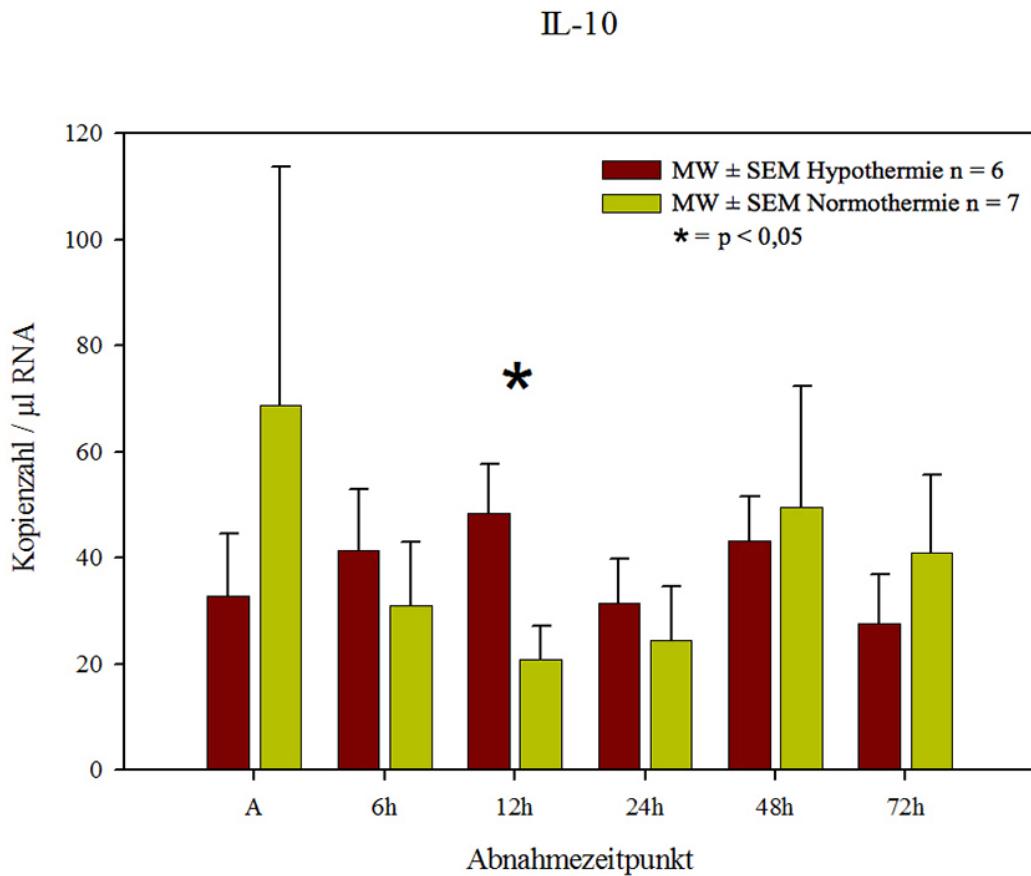


Abbildung 16 Vollblut-RNA Expression von IL-10 im Vergleich hypothermisch-behandelter Patienten zu normothermen Patienten (MW ± SEM).

Bei der Zytokinexpression von IL-1ra zeigt sich interessanterweise ein biphasischer Verlauf unter den gekühlten Patienten, siehe **Abbildung 17**. Die Expression steigt nach dem Abnahmezeitpunkt A, fällt bis zum Zeitpunkt 24 h und steigt nach Ende der Kühltherapie wieder an. Die Expressionsraten der normothermen Gruppe zeigen sich demgegenüber im Vergleich zum Abnahmezeitpunkt leicht erhöht und bleiben relativ konstant im gesamten gemessenen Zeitraum. Im Vergleich der Gruppen untereinander zeigten sich bis auf die 12 h in allen Vergleichen eine signifikante Mehrexpression der gekühlten Patienten (ANOVA gefolgt von Mann-Whitney Rank Sum Test, $p < 0,05$).

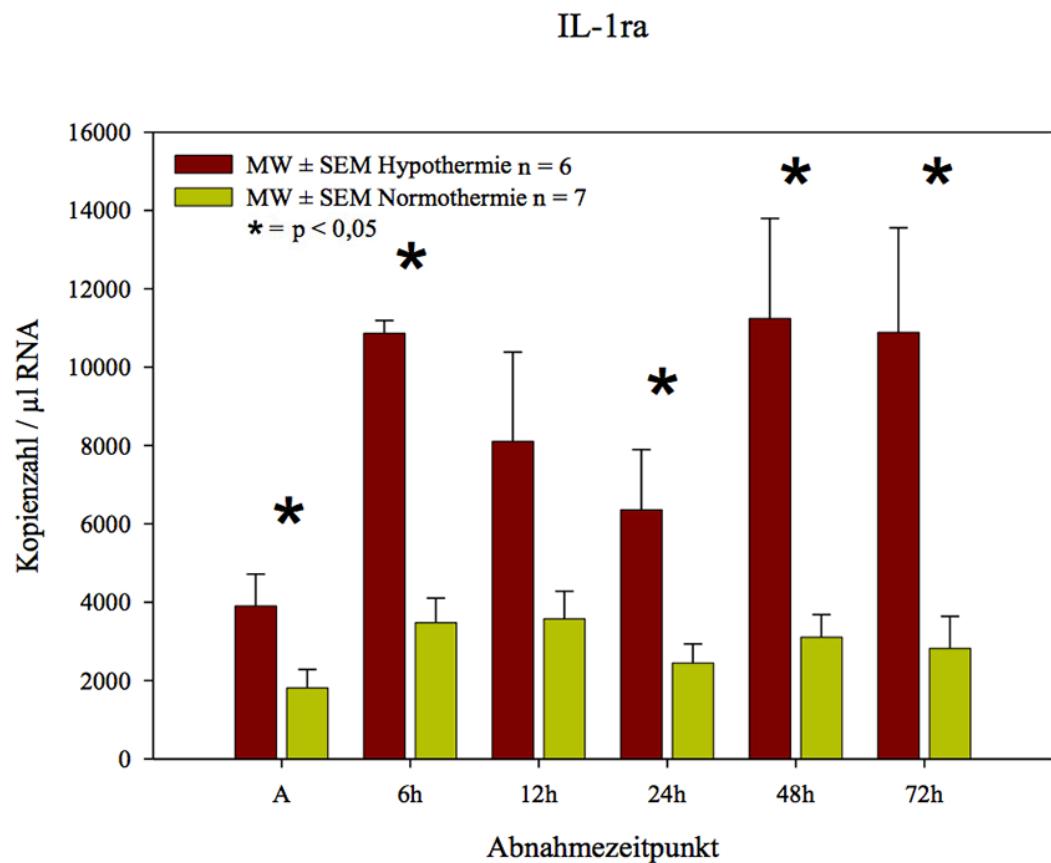


Abbildung 17 Vollblut-RNA-Expression von IL1-ra im Vergleich hypothermisch-behandelter Patienten zu normothermen Patienten (MW \pm SEM).

5. Diskussion

Mit dieser Arbeit konnte in einem ersten Schritt gezeigt werden, dass eine Quantifizierung der mRNA- Expression für immunologisch relevante Zytokine mit dem PAXgene® Blood RNA System aus Vollblut zum einen möglich ist und zum anderen auch unter schwierigen präklinischen Blutentnahmebedingungen zuverlässig funktioniert.

In einem zweiten Schritt konnten durch die quantitative Analyse der mRNA Expressionsmuster von definierten pro- und antiinflammatorischen Zytokinen neue Erkenntnisse über die initialen Aktivierungsvorgänge nach Ischämie und Reperfusion gewonnen werden. Anhand der Daten aus der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass spezifische pro- und antiinflammatorische Parameter bereits frühzeitig nach Wiedererlangen eines Spontankreislaufes signifikant verändert sind. Durch eine serielle Untersuchung der mRNA-Expressionsmuster konnte es uns gelingen, den zeitlichen Verlauf von spezifischen pro- und antiinflammatorischen Parametern in der frühen Phase nach erfolgreicher Reanimation auf Genomebene darzustellen. Selbstverständlich handelt es sich hierbei nur um einen sehr kleinen Ausschnitt sehr komplexer und bisher nicht vollständig verstandener pathophysiologischer Vorgänge im Rahmen des *postresuscitation syndrome*. Allerdings kann die hier dargestellte Expressionsaktivität definierter Zytokine möglicherweise einen Beitrag zum Verständnis dieser komplizierten immunologischen Prozesse liefern.

5.1. Studiendesign

In unsere Studie wurden insgesamt 25 Patienten eingeschlossen, die einen außerklinischen Herz-Kreislaufstillstand erlitten und nach Reanimation einen Spontankreislauf wiedererlangten. Patienten, die innerhalb der ersten 24 Stunden nach

ROSC verstarben, wurden nicht in unsere Studie eingeschlossen, da das Ziel der vorliegenden Arbeit in der Darstellung der Zytokinexpressionsmuster über einen Zeitraum von 72 Stunden lag.

Das Durchschnittsalter des Kollektivs betrug 63,4 Jahre. Darunter waren 6 (24%) Patienten weiblich und 19 (76%) männliche Patienten, dies entspricht einem Verhältnis von 0,34: 1. 10 Patienten verstarben während des Klinikaufenthaltes, 15 konnten aus der Klinik unter anderem in Rehabilitation entlassen werden. Die 30-Tages-Überlebensrate unseres Kollektives betrug 60%.

6 Patienten wurden hypothermisch therapiert, da die Hypothermie zum Zeitpunkt der Studiendurchführung noch keine generelle Leitlinienempfehlung war und daher im individuellen Ermessen des behandelnden Ärzteteams lag.

Aus der Gesamtgruppe an Patienten stammen 15 Patienten aus einer Pilotstudie zur Etablierung der PAXgene®-Methode der Arbeitsgruppe *'Trauma and Resuscitation'* der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Die deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin ev. (DAGI) erhob folgende Daten für das Jahr 2007-2009 (94), die mit unseren epidemiologischen Daten vergleichbar sind.

Das Durchschnittsalter aus den Daten des seit 2007 existierenden Reanimationsregisters lag bei 67,1 Jahren und war vergleichbar mit den Daten an den verschiedenen teilnehmenden Standorten.

66,9% waren männlich, dies unterschied sich ebenfalls wenig an den involvierten Zentren. Die Daten aus dem Reanimationsregister entsprechen denen unseres Kollektives hinsichtlich Alters und Geschlechts. In Bezug auf die Überlebensraten wurden aus den verschiedenen teilnehmenden Zentren unterschiedliche Entlasszahlen aus der Klinik berichtet. Teils lagen diese zwischen 14-20 %, jedoch wurden auch Zahlen genannt zwischen 1-3 %, die aus der Klinik entlassen werden konnten in einem akzeptablen Allgemeinzustand (94). Dies sind erhebliche Unterschiede zwischen den Kliniken an den verschiedenen Standorten, obwohl doch überall mit den gleichen, regelmäßig überarbeiteten Guidelines gearbeitet wurde (95-97). Dies ist ein Grund für die

Entwicklung des Reanimationsregisters 2007 der DGAI, um genau diese Unterschiede zu detektieren. Bekannte Faktoren wie Qualitätsmanagement, Ausbildungsniveau des Rettungsteams, Zeit bis Eintreffen des Teams können somit besser erfasst werden. Zusätzlich spielen sicherlich auch unbekannte Faktoren eine Rolle, die an der Auslösung eines postresuscitation syndrome beteiligt sind (31;98).

In unserer Studie lag die Entlassrate aus einer Klinik bei 60 %, jedoch muss in Betracht gezogen werden, dass Patienten die weniger als 24 h überlebten nicht in die Studie miteingeschlossen wurden. Daher sind unsere Angaben in Bezug auf das sekundäre Outcome nicht mit der aktuellen Studienlage vereinbar. Sicher ist jedoch, dass das Qualitätsmanagement präklinisch und klinisch einen Einfluss auf die Überlebensraten hat und durch regelmäßiges Training und regelmäßige Fortbildung der entsprechenden Teams verbessert werden kann. In München besteht durch die Berufsfeuerwehr schon seit 1998 ein internes Reanimationsregister womit die außerklinischen Reanimationen evaluiert werden um das Qualitätsmanagement kontinuierlich zu verbessern. Somit wurden Einsatzdetails wie Alter, Geschlecht, Rhythmus sowie Einsatzzeiten und Ort genau dokumentiert und analysiert. Ebenfalls wurde die Klinik nach Einlieferung vermerkt. Des Weiteren ist belegt aus den Münchener Daten 2007-2009 nach ROSC und erfolgreicher Klinikeinweisung, dass eine höhere Überlebensrate in Fachkliniken mit Kardiologie und Herzchirurgie erreicht werden konnte (Zwischen 14,3% keine Fachklinik bis 60,5% Fachklinik) (99). Daher können die Daten dieser Studie zum Vergleich herangezogen werden in Bezug auf die 30-Tagesüberlebensrate, da der Großteil unseres Kollektives in eine Fachklinik eingeliefert wurde.

Es existieren einige Studien mit ähnlichem Kollektiv und ähnlicher Fallzahl. Ito et al. (100) untersuchten an 28 Patienten nach ROSC und Klinikeinlieferung bestimmte Zytokin-Konzentrationen im Serum. Es konnten signifikante Unterschiede von IL-8 und TNF- α im Serum innerhalb von 12 h nach Klinikeinlieferung nachgewiesen werden. Gando et al. (101) konnten in einer Studie mit 23 Patienten eine aktivierte Immunantwort nach ROSC durch endotheliale und neutrophile Aktivierung zeigen, die mit Zeichen einer Endothelverletzung einhergehen. Signifikante Anstiege ließen sich innerhalb der ersten 24 h nach Einlieferung in die Klinik nachweisen. Es wurde geschlussfolgert, dass diese

inflammatorischen Aktivierungen beim postresuscitation syndrome eine wichtige Rolle spielen können. Auch zeigten beispielsweise Bishops et al. (102) in einer Studie mit 10 Patienten nach ROSC und behandelt mit Hypothermie über den Zeitpunkt der Kühlung eine supprimierte Komplementaktivierung sowie signifikante Unterschiede von IL-8 und IL-10 Konzentrationen im Verlauf der Kühlung und während der Wiedererwärmung. Dies erlaubt die Schlussfolgerung, dass die Hypothermie die Immunaktivierung nach ROSC dämpft.

In allen hier aufgeführten Studien sind bei der kleinen Fallzahl und besonders dem besonderen Patientenklientel ähnliche Limitationen aufgeführt. Obwohl doch viele Patienten einen Kreislaufstillstand erleiden, ist die Anzahl der sekundär Überlebenden gering. Aus dem Münchener Reanimationsregister 2007-2009 wurden 2.484 Reanimationen registriert, wovon bei 49,3% kein Spontankreislauf wiederhergestellt werden konnte. In den entsprechenden Kliniken betrug die Sterberate innerklinisch 50%, und bei 12% des Gesamtkollektives konnten keine Angaben ermittelt werden. Die 30-Tage-Überlebensrate aus diesem Register betrug 12,1% in einem Zeitraum von 2007-2009 (2).

Aufgrund der geringen Anzahl an Patienten kann es zu den großen Unterschieden zwischen den gemessenen Konzentrationen der Parameter beigetragen haben und die systemische Immunantwort kann variabel sein. Dies könnte zu einer Heterogenität der genetischen Faktoren während der Immunantwort geführt haben, besonders auch im Hinblick auf die Dauer der Reanimation bis zum Erlangen eines Spontankreislaufs (102). Jedoch können die Schlussfolgerungen aus den Arbeiten richtungsweisend sein für die weitere Identifizierung zum Verständnis des postresuscitation syndrome nach Wiedererlangen eines Spontankreislaufs.

Sequentielle Blutentnahme

In vorangegangenen Studien konnte dargestellt werden, dass die initiale Phase nach Ischämie mit anschließender Reperfusion bei der Ausbildung von Organschädigungen eine wichtige Rolle spielt (31), ähnlich wie bei thematisch verwandten Fragestellungen nach Polytrauma oder Verbrennungen (103;104). Daher lag unser Hauptinteresse für das

Studiendesign auf den Expressionsveränderungen in der frühen Phase nach Wiedererlangen des Kreislaufs.

In einem Review von Mannick et al. (105) aus der Polytraumaforschung wurde die Notwendigkeit kontinuierlicher, serieller Messungen zur Abbildung der Immunreaktion nach Verletzungen dargestellt. Grund dafür sind die frühen und dynamischen Veränderungen, denen das Immunsystem ausgesetzt ist. Ebenfalls ist dies die kritische Phase indem nach kardiopulmonaler Reanimation und ROSC ein postresuscitation syndrome auftreten kann (15;17;25). Die Abnahmepunkte sollten daher im kritischen Zeitintervall der immunologischen Veränderungen in der frühen Phase nach ROSC gesetzt werden. Entscheidend ist es, in dieser für den Patienten in der meist hämodynamisch instabilen Klinik einen Kompromiss zwischen der zeitlichen Auflösung dieser vulnerablen Phase sowie der geringstmöglichen Schädigung des jeweiligen Patienten zu finden. Diese Zeitpunkte wurden in Anlehnung an andere Forschungsgruppen gewählt (105;106).

In den oben aufgeführten Studien sowie in weiteren Studien konnte die Blutentnahme erst bei Eintreffen des Patienten in den entsprechenden Kliniken durchgeführt werden (100-102) und somit konnte dort die initiale Zeit nach Wiedererlangen eines Spontankreislaufs nicht erfasst werden. In unserer Studie war ein Schwerpunkt auf diese initiale Zeit gesetzt. Daher ergaben sich große Anforderungen an die von uns durchgeführte klinisch-experimentelle Studie. Die praktische Umsetzung der Studie wies einige Limitationen auf, schon während der präklinischen Phase. Idealerweise erfolgte die erste Blutentnahme unmittelbar nach Wiedererlangen des Spontankreislaufs durch den Notarzt. Dies ist mit großem logistischem Aufwand in unserer Studie gelungen, trotz der geringen Fallzahl der primär erfolgreichen Reanimationen, die sich pro Notarzt/Notarzteinsatzfahrzeug auf ca. 1-2 pro Jahr beläuft. Zusätzlich erklärte sich nicht jeder Notarzt zur Mitarbeit bereit und befüllte die Blutröhrchen. Des Weiteren verstarben ein Teil der Patienten prä- sowie innerklinisch innerhalb der ersten 24 h, so dass diese aus der Studie ausgeschlossen werden mussten. Ohne die Mitarbeit und Zustimmung der jeweiligen Klinik konnte keine Blutentnahme zu den festgelegten Zeitpunkten erfolgen, diese fanden Tag und Nacht statt. Dies erforderte eine hohe Einsatzbereitschaft mit 24h-Rufbereitschaft und großer

logistischer Herausforderung, die Blutentnahmen zu den jeweiligen Zeitpunkten durchzuführen. Auch war Voraussetzung, dass die Patienten klinisch *ausreichend stabil* waren und 72 h überlebten, damit die Studie durchgeführt werden konnte.

Unterteilung MOF-Scores

Ein weiterer zu diskutierender Punkt ist die vorgenommene Unterteilung des Patientenkollektivs anhand des MOF-Scores in zwei Gruppen. In der vorliegenden Gruppe wurde die Abstufung $MOF < 4$ Punkte (es liegt kein relevantes Organversagen vor) und $MOF \geq 4$ (es liegt ein relevantes Organversagen vor) herangezogen. Dies stellt eine valide statistische Methode zur Gruppenbildung innerhalb eines Kollektivs dar. Sie kann allerdings auch aufgrund der zwischen den beiden gebildeten Gruppen als Schwachstelle der Datenbewertung angesehen werden, weil eine solche Einteilung den individuell vorliegenden Grunderkrankungen und damit der individuellen Prognose nicht gerecht werden kann. Es muss davon ausgegangen werden, dass bestehende Komorbiditäten und medikamentöse Behandlungen sowie die unterschiedlichen Ursachen des Kreislaufstillstands Einfluss auf die Zytokinexpression haben. Einige Studien befassten sich mit der Fragestellung, ob eine adäquate Vorhersage über ein Outcome nach ROSC und besonders außerklinischem Herz-Kreislaufstillstandes möglich ist. Dafür wurden unterschiedliche Score-Systeme verwendet. Robert et al. (98) berichteten beispielsweise, nach Auswertung von Patienten nach ROSC anhand des SOFA-Scores (sequential organ failure assessment) eine erhöhte innerklinische Mortalität in Bezug auf die Parameter betreffend das kardiovaskuläre und respiratorische System, die anderen Organsysteme zeigten sich unabhängig davon. In der Studie konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Multiorganversagen und innerklinischem Versterben hergestellt werden. Schlussfolgerung von Jacobs et al. (107) war, dass eher verwertbare Faktoren wie Körpertemperatur, Hyperglykämie, niedriger pH-Wert und Krampfanfälle negativ das Überleben beeinflussen. Natürlich ist auch der Score-Wert vor Ereignis unbekannt, denn dies ist ein unerwartetes Geschehen und kann daher nicht zum Vergleich herangezogen werden. Ebenfalls besteht auch hier die Möglichkeit von unbekannten und nicht messbaren Faktoren die auf die Unterteilung Einfluss nehmen.

Outcome Überlebt/ Verstorben

Die Einteilung der Patientengruppe anhand des zweiten klinischen Parameters Outcome wurde in der hier vorliegenden Arbeit als Überleben innerhalb einer Follow-Up- Periode von 30 Tagen definiert. Das Ziel dieser Unterteilung nach Überleben und Versterben war die Identifizierung einer möglichen Risikogruppe innerhalb des Patientenkollektivs. Ein Nachteil dieser Form der Gruppenbildung liegt in der Vernachlässigung der individuellen Todesursachen einschließlich der ihr zugrundeliegenden Pathophysiologie. Weder die Vorerkrankungen noch das Alter der Patienten konnten aufgrund der insgesamt eingeschränkten Fallzahl in der Auswertung berücksichtigt werden. Zusammenfassend bedeutet das, dass zwar anhand des gewählten Kriteriums Überleben vs. Versterben eine eindeutige Gruppenunterscheidung gelingt, nicht aber zwei in sich homogene Gruppen gebildet werden konnten.

Milde Hypothermie

Das Kollektiv der gekühlten Patienten ist mit 6 Patienten sehr gering. Mit ein Grund dafür ist, dass zum durchgeführten Zeitpunkt der Studie keine klare Empfehlung zur hypothermischen Therapie bestand, daher erfolgte die Kühlung nicht nach einem einheitlichen Protokoll und wurde auch nicht in allen beteiligten Kliniken durchgeführt. Erst in den Leitlinien von 2010 (5) wurde die einheitliche Empfehlung ausgesprochen, nach jeglicher Art von Herz-Kreislaufstillstand eine Kühlung durchzuführen. Aufgrund der kleinen Patientengruppe und damit geringen Datenanzahl müssen weitere Studien nach einheitlichem Protokoll durchgeführt werden, um eine klare Aussage über den Einfluss der Hypothermie auf die Zytokinkonzentration und eine statistische Aussage treffen zu können.

Limitationen

Als klare Limitation ist zu werten, dass die Veränderungen der mRNA- Expression nicht automatisch zu Änderungen auf Proteinebene führen. In Bezug auf die biologische Funktion im menschlichen Organismus spielen Proteine eine zentrale Rolle. In dieser Studie wurde der Fokus jedoch auf die Veränderungen der mRNA-Expression gesetzt, um die frühzeitigen Regulierungen nach ROSC zu analysieren. Um unsere Zielvorgaben zu unterstützen wäre es von wesentlichem Interesse, die Daten auf Protein-Ebene analysieren zu können um einen relevanten Vergleich aufzuzeigen. Aus diesem Grund sind weitere Untersuchungen notwendig und diese Studie kann höchstens als richtungsweisend interpretiert werden. Ein limitierendes Problem in der Untersuchung dieses Kollektivs ist jedoch, dass im lebendenden, jedoch schwer erkranktem Menschen nur eine sehr geringe Menge an Blut für Forschungszwecke entnommen werden kann um den instabilen Patienten nicht zu gefährden. Deshalb wurde in dieser Studie auf die Untersuchungen auf Transkriptions- und Proteinebene verzichtet.

5.2. Quantitative Genexpressionsanalysen

Validierung des experimentellen Protokolls

Im Rahmen einer vorangegangenen Doktorarbeit wurden im Vorfeld an 18 freiwilligen Probanden anhand eines Protokolls Validierungen durchgeführt. Dies ist eine Vorarbeit unserer Studie mit dem Titel „Initiale Analyse der RNA-Expression spezifischer Mediatoren nach erfolgreicher kardiopulmonaler Reanimation“ von Herrn Henning Laven aus dem Jahr 2009 (108). Anhand dieser Validierungen konnte gezeigt werden, dass die Muster der Genexpressionen mit dem PAXgene® Blood RNA Kit sinnvolle Ergebnisse liefern, und somit auch geeignet sind für die Anwendbarkeit am schwer kranken Patienten. Dies wurde auch durch andere Autoren bestätigt (109).

mRNA-Analyse

Um RNA zu analysieren, ist das humane Blut eine schnell verfügbare und vitale Quelle. Durch das PAXgene® Blood RNA Kit lässt sich aus Vollblut eine sogenannte *snapshot* Analyse durchführen, also eine Momentaufnahme aller immunkompetenten Zellen zum Abnahmzeitpunkt. Bei dem angewendeten Verfahren können durch die sofortige Zell-Lyse aber keine einzelnen Zellpopulationen identifiziert werden und es ist keine Differenzierung in verschiedene immunkompetente Zellen möglich (104).

Vorteil des PAXgene® Systems ist die geringe Ausgangsmenge der Blutproben (3 x 2,5 ml), so dass Blutproben auch bei instabilem Kreislauf gewonnen werden können (104). Ein weiterer Vorteil bei der Aufbereitung im PAXgene® System besteht darin, dass durch eine stabilisierende Lösung, die das System beinhaltet, der aktuelle 'Status quo' aufrechterhalten wird und eine Lagerungsmöglichkeit besteht. Dies ist besonders in der präklinischen Anwendung von Bedeutung.

Realtime-PCR

In den letzten Jahren ist das wissenschaftliche Interesse an der quantitativen mRNA-Analyse bestimmter Zytokine angestiegen, um die spezifischen Vorgänge der immunkompetenten Zellen zu erfassen. Dabei hat sich die Realtime-PCR als sensitive und spezifische Methode erwiesen und ist mittlerweile als Standardmethode zur Quantifizierung von mRNA von Zytokinen anerkannt. Diese ist in der Lage, hoch-sensitive Zielgen-Expressionen zu detektieren, auch wenn die ursprünglich eingesetzten mRNA Konzentrationen sehr niedrig sind.

Aus zirkulierendem Vollblut werden kernhaltige Zelltypen mit Immunkompetenz, wie z.B. B-Zellen, T-Lymphozyten und Natural-Killer-(NK) Zellen abgebildet. Daher ist die mRNA nicht den einzelnen Zelltypen zuzuordnen, obwohl dies prinzipiell von Interesse

wäre, z.B. in Hinblick auf die Beteiligung der Monozyten an der Immunantwort. Aus technischen und logistischen Gründen mussten wir auf diese Analyse verzichten.

Zeitliche Expressionsdynamik

Um den zeitlichen Verlauf der Zytokinexpression nach *ROSC* darzustellen wurde Blut in einem Zeitrahmen von 72 h entnommen, da innerhalb dieser 72 h eine Organdysfunktion mit all ihren pathophysiologischen Folgen auftreten kann und maßgeblich das Überleben bestimmt (110).

In Bezug auf das *postresuscitation syndrome* existieren mittlerweile einige wissenschaftliche Stellungnahmen, die sich hauptsächlich auf Serumanalysen entweder kardio-chirurgisch oder auf das neurologische *Outcome* nach hypoxischen Zuständen beziehen (31;68;79;88;100), jedoch nicht auf den initialen Mechanismen zur Zytokinexpression.

In dieser Arbeit konnte eine Immunreaktion der immunkompetenten Zellen im zeitlichen Verlauf dargestellt werden, es ließen sich unterschiedliche Expressionsdynamiken in den gemessenen Zytokinen aufzeigen.

Die Expression der proinflammatorischen Zytokine nach Wiedererlangen des Spontankreislaufs hat im Verlauf von 72 h nach *ROSC* im Verhältnis zum Abnahmzeitpunkt abgenommen, **siehe Abbildung 2 und 3**. Diese Veränderung ist besonders von Interesse im Hinblick auf das Auftreten von Multiorganversagen nach Reanimation und anschließender Reperfusion. Es steht jedoch auf den ersten Blick in scheinbarem Widerspruch zu dem Modell des Verlaufes der systemischen inflammatorischen Immunantwort (SIRS), da nach diesem Modell zunächst ein Anstieg der Expression proinflammatorischer Zytokine erfolgt, bevor die Expression zurückgeht und eine kompensatorische Immunantwort folgt (105). Die gemessenen Werte der proinflammatorischen Zytokinexpression aus der vorliegenden Arbeit lassen sich jedoch trotzdem mit dem genannten SIRS-Modell in Einklang bringen, wenn man annimmt, dass die Expressionsniveaus zum Abnahmzeitpunkt bereits erhöht waren und dann – im Zeitraum der Studie bis 72 h nach dem Ereignis – wieder abnahmen. Eine mögliche

Erklärung dafür bietet ein Experiment, in dem *in vitro* zu Vollblutproben Lipopolysaccharid (LPS) hinzugegeben wird, um die Ausschüttung von Zytokinen wie TNF- α hervorzurufen (111) und damit eine Entzündungsreaktion zu simulieren. Das Expressionsniveau von TNF- α aber auch IL-10 ist nach Zugabe von LPS nach 2–4 Stunden signifikant erhöht (104). Geht man davon aus, dass dieser Vorgang während der Reanimation stattfindet, ließe sich erklären, wieso das Expressionsniveau der proinflammatorischen Zytokine zum Abnahmezeitpunkt bereits erhöht ist. Um ein genaueres Bild vom Verlauf der Expressionsniveaus der Zytokine zu erhalten müsste jedoch Blut *vor* der Reperfusion entnommen werden, um den gesamten Zeitraum ab Herz-Kreislaufstillstand betrachten zu können. Dies wurde in einer Studie von Niemann et al. (41) am Schweinemodell durchgeführt. Es wurde angenommen, dass die Serumspiegel von TNF- α nach Wiedererlangen eines Herz-Kreislaufstillstandes ansteigen und eine signifikante Rolle an der postischämischen myokardialen Dysfunktion spielen. Blutproben wurden vor einem ausgelösten Herz-Kreislaufstillstand sowie zwischen 15 min und 6 h nach dem Ereignis untersucht. Es konnte 15 min nach dem Ereignis ein abrupter signifikanter Anstieg der TNF- α Konzentration festgestellt werden und 3 h nach ROSC war die Konzentration wieder auf dem Ausgangslevel. Daraus lässt sich folgern, dass die Reperfusion nach wiedererlangtem Kreislauf mit einem abrupten Anstieg von TNF- α im Plasma einhergeht. Dies ist eine mögliche Erklärung für die abfallenden Werte im zeitlichen Verlauf in der vorliegenden Arbeit. Ein weiterer relevanter Punkt ist auch die Halbwertszeit von TNF- α im Plasma, die in der Literatur zwischen 20 und 40 min angegeben wird (41), doch letztendlich ist unklar, wie viel der exprimierten mRNA in Protein transkribiert wird und in die Zirkulation übergeht.

Die Arbeitsgruppe um Ito et al. (100) hat als eine der Ersten TNF- α eine Rolle im Zusammenhang mit der postischämischen myokardialen Dysfunktion zugeordnet. Dinarello et al. (112) diskutierten, dass TNF- α im Zusammenspiel mit IL-1 β eine kardiale Dysfunktion auslösen kann und den peripheren Widerstand sinken lässt, was hypotone Kreislaufverhältnisse zur Folge hat und sich negativ auf die Kreislaufsituations in der frühen Phase nach Wiedererlangen eines Spontankreislaufs auswirkt.

Und doch lässt sich keine ganz genaue Aussage treffen, da die Konzentrationen im Plasma stark unterschiedlich sind, was an vielen unterschiedlichen Ursachen liegen kann, z.B. wann die erste Blutentnahme erfolgte. Nieman et al. (41) beschrieben einen Umfang von 2 h 10 min bis 4 h 45 min. Schweregrad und verschiedene Ursachen der kardial bedingten Ischämie, aber auch die unterschiedlichen Therapien wie Vasopressoren bei anhaltender Hypotension und auch genetische Faktoren müssen in Erwägung gezogen werden.

Es bleibt zu berücksichtigen, dass die Immunantwort durch eine Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokine aufrecht erhalten wird. Da die meisten Zytokine beide Eigenschaften besitzen (37) und weitere Einflüsse, wie die Nachbarschaft der Zellen und die Anwesenheit von anderen Zytokinen, auf die jeweilige Zelle mitwirken, lässt sich keine eindeutige Linie zwischen pro- und antiinflammatorischer Mediatoren ziehen (37;39). Antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 unterdrücken dabei die Produktion proinflammatorischer Zytokine (112) und sind damit mitverantwortlich für den charakteristischen Verlauf von SIRS und CARS (113).

Die hier untersuchten antiinflammatorischen Zytokine haben eine wesentliche Rolle an der Entstehung eines CARS, welches zu einer Immunsuppression führt. IL-10 fungiert dabei als Regulator proinflammatorischer Zytokine wie z. B. TNF- α (114).

So zeigten sich beispielsweise schwerverletzte Patienten mit einer solchen Immunantwort auf ihre Verletzungen anfälliger für nosokomiale Keime (105) und Infektionen nach schwerem Blutverlust und Sepsis (115). Darüber hinaus konnte ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten Niveau von IL-10 in Anwesenheit von proinflammatorischen Parametern innerhalb der ersten zehn Tage nach der Verletzung mit einer erhöhten Sepsisrate hergestellt werden (116).

Die Ergebnisse der vorliegenden Analyse des mRNA-Expressionsniveaus zeigen im zeitlichen Verlauf einen signifikanten Anstieg von IL-1ra, **siehe Abbildung 5**, wie bereits in der Literatur beschrieben (117;118), jedoch keine signifikanten Veränderungen bei IL-10 (**Abbildung 4**). Möglicherweise hängt dies mit der geringen Halbwertszeit von IL-10 von 60 min zusammen, dem sehr heterogenen Patientengut oder den unterschiedlichen Therapieansätzen wie Vasopressingabe und hypothermischem Behandlung.

5.3. Expressionsdynamik MOF-Score und Genanalysen

Scores wurden entwickelt um große Kollektive, im Hinblick auf den Schweregrad der Erkrankung zu klassifizieren sowie das Risiko für die Entwicklung eines MOF im weiteren Verlauf abzuschätzen (119). Weiterhin besteht die Möglichkeit, die Scores nach festgelegten Kriterien und nationalen sowie internationalen Standards zu vergleichen und somit eine Vergleichbarkeit verschiedener Kliniken und Fachrichtungen herzustellen und Behandlungskosten zu erklären (120). Jedoch muss berücksichtigt werden, dass keine Aussage zum individuellen Verlauf eines Patienten getroffen werden kann, da die Risikoeinschätzung auf Basis eines Scores lediglich einer statistischen Wahrscheinlichkeit entspricht.

In der vorliegenden Studie wurden die Patienten in Gruppen unterteilt und in einem Score-System gruppiert. Hier wurde der MOF-Score angewandt. Diese wurden aus den vorhandenen klinischen Parametern errechnet, solange diese vollständig erfasst werden konnten.

Die entsprechende Einteilung in die klinische Gruppe erfolgte über die Vergabe von Punkten. Wie bereits oben erwähnt, sind der Score- Verwendung Grenzen gesetzt, denn innerhalb der Scores wird der Immunstatus nur anhand der Leukozytenzahlen abgebildet und somit die Immunantwort nur zu einem geringen Teil erfasst. Des Weiteren kann sich beispielsweise ein Patient bei Hirntod trotz eines moderaten MOF-Scores in einem letalen Zustand befinden.

In vorangegangenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Patienten die in die zwei Gruppen ‚Überlebt - Verstorben‘ gegliedert wurden einen signifikanten Unterschied zwischen den Scores und der Überlebensrate aufzeigten (4). In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine mögliche Korrelation der mRNA-Expression mit den MOF-Scores untersucht. Es zeigten sich lediglich Tendenzen zwischen den gemessenen Expressionen und den von den Patienten errechneten Score-Gruppierungen. Ein möglicher Erklärungsansatz für eine fehlende Korrelation ist, dass die Score-Systeme nicht als Aussage für einzelne Individuen, wie in der vorliegenden Arbeit erfolgt, herangezogen werden können. Des Weiteren war das Patientenkollektiv aufgrund der zu geringen

Fallzahlen in der vorliegenden Arbeit zu klein und die Heterogenität zu groß um eine Prognose treffen zu können. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass jedes gemessene Zytokin eine eigene Halbwertszeit sowie unterschiedliche Expressionsniveaus aufweisen. Aufgrund der starken interindividuellen Schwankungen der Serumspiegel und der kurzen Halbwertszeit haben Pilz et al. gezeigt, dass TNF- α nicht als klinisch relevanter Parameter geeignet ist (121). Dies könnte eine weitere Erklärung sein, warum es in der vorliegenden Arbeit nicht möglich war, mRNA Expressionen mit individuellen Score-Systemen zu vergleichen.

Ein interessanter Ansatz für die Zukunft wäre allerdings, an einem größeren Stichprobenumfang und einer spezifischeren Normierung der Patienten mögliche signifikante Unterschiede aufzuzeigen.

5.4. Expressionsdynamik in Abhängigkeit Überlebt / Verstorben

Die in der vorliegenden Arbeit eingeschlossenen 25 Patienten wurden in die Gruppen ‚Überlebt‘ und ‚Verstorben‘ unterteilt, je nach der 30-Tage-Überlebensrate (122). Zu Bedenken ist hierbei, dass unsere Studie zwar das Überlebensrate, aber nicht die Lebensqualität der überlebenden Patienten miterfasst hat.

Aufgrund der Inhomogenität der Patientengruppe bezüglich Dauer der Reanimation sowie Komorbiditäten kann keine Aussage zur Qualität des Überlebens getroffen. Bisher bezogen sich die meisten Studien auf neurologische Folgen eines Herz-Kreislaufstillstandes, und da bisher noch keine durchschlagenden Therapieoptionen bestehen, werden erst Studien in den kommenden Jahren die Lebensqualität nach Klinikaufenthalt klassifizieren (123).

In unserer Untersuchung konnte gezeigt werden, dass bei verstorbenen Patienten eine erhöhte intrazelluläre mRNA Expression bei IL-8 und IL-10 messbar war (**Abbildung 11 und 12**).

Maier et al. (124) konnten in einer Studie keinen Zusammenhang mit der Sterblichkeit der Patienten und den Konzentrationen von IL-8 und IL-10 im Serum nachweisen. Jedoch beschrieben sie Zytokinmessungen als wichtige biochemische Marker, anhand welcher sich der Verlauf eines späteren Multiorganversagens vorhersagen lässt. In einer Arbeit der Arbeitsgruppe Polytrauma der Ludwig-Maximilians-Universität München aus dem Jahre 2009 (125) wurden polytraumatisierte Patienten auf Zytokine im Serum untersucht, vor dem Hintergrund dass auch multiple Verletzungen ein SIRS auslösen können. Es konnten deutlich erhöhte IL-8 Spiegel im Serum nachgewiesen werden. In einer weiteren Studie (126) konnten erhöhte Monozyten-mRNA Konzentrationen bei Patienten, die das Trauma nicht überlebten, gezeigt werden.

Adrie et al. (17) zeigten, dass bei reanimierten Patienten mit anschließendem Kreislauf erhöhte Spiegel von Zytokinen im Plasma vorhanden sind. Der Zustand nach Reanimation wurde von der Arbeitsgruppe ebenfalls als Sepsis-ähnlich beschrieben. In der Studie konnten signifikant erhöhte IL-8 und IL-10 Konzentrationen bei verstorbenen Patienten nachgewiesen werden. Keine signifikanten Unterschiede zeigten sich bei IL-1ra, ähnlich unseren Ergebnissen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Serumproteine direkt nachproduziert werden und die Zellen dafür ihr Transfusionsmuster ändern.

In der Studie wird aber auch als mögliche Ursache für die hohen Zytokinkonzentrationen die Gabe von Vasopressoren diskutiert. Die Katecholamingabe induziert die Expression von IL-10 (127;128). Die Schlussfolgerung der Studie ist aber, dass die Expression der Zytokine eher die unterschiedlichen Verläufe eines Schocks beschreibt und man daher keine therapeutische Konsequenz ableiten kann, weil keine Unterschiede bei den überlebenden Patienten mit oder ohne Katecholamintherapie gezeigt werden konnten.

5.5. Expressionsdynamik in der therapeutischen Hypothermie

Kühlung nach Herz-Kreislaufstillstand verbessert die Überlebenschancen der betroffenen Patienten und ist mit einer supprimierten Immunantwort assoziiert. Es ist jedoch nicht abschließend geklärt, welche Faktoren dafür verantwortlich sind. Unklar ist, ob die pro- und antiinflammatorischen Zytokine, die mit den Folgen der Reperfusion in Verbindung gebracht werden, durch die Kühlung beeinflusst werden und die Immunantwort verändern (83).

Bisher bezogen sich viele experimentelle und klinische Studien auf die Auswirkungen der Hypothermie auf das neurologische *Outcome* im Hinblick auf die zerebrale Minderperfusion (129-131). Nur wenige Studien bezogen sich auf Organe wie Herz (132) Nieren und Lunge (133). Hauptsächlich wurden solche Studien nur am Tiermodell durchgeführt. Darüber hinaus sind wenig experimentelle Daten zur Zytokinproduktion nach Hypothermie veröffentlicht. Aus diesem Grund können nur wenige Studien zum Vergleich mit den Daten der vorliegenden Arbeit herangezogen werden.

Signifikante Unterschiede zeigten sich in der vorliegenden Arbeit bei IL-10 zum Zeitpunkt 12 h, siehe **Abbildung 16**. Die Expression der hypothermisch behandelten Patienten war im Vergleich zu nicht gekühlten Patienten zu diesem Zeitpunkt erhöht. Für IL-1ra, als antiinflammatorischer Marker, zeigten sich ebenfalls signifikant höhere mRNA Expressionen bei gekühlten Patienten, siehe **Abbildung 17**. Die ermittelten mRNA Expressionen von TNF- α zeigten sich nur in der graphisch vermindert in der gekühlten Gruppe, ohne Nachweis einer Signifikanz.

In einer Publikation von Callaway et al. 2008 (42) durchgeführt am Tiermodell, wurde über signifikante Unterschiede im Serum von IL-10 innerhalb der ersten Stunde nach Ereignis berichtet. Die nicht gekühlte Tiergruppe zeigte erhöhte Werte an IL-10. Der Abnahmzeitpunkt 1 h nach Ereignis konnte aus organisatorischen Gründen in unserer Studie nicht untersucht werden. In der Publikation von Callaway et al. wurde ebenfalls diskutiert, ob der Unterschied des IL-10 auf die Kühlung zurückzuführen ist, oder aber in der Gabe von Katecholaminen begründet ist (127).

IL-10 ist ein wichtiger Antagonist der proinflammatorischen Zytokinproduktion des Monozyten-/Makrophagen-Systems und wird mit einer inadäquaten Produktion während einer Sepsis als schädlich angesehen. IL-10 ist wiederum ein Induktor für IL-1ra (64), was sich in unserer Studie als stimmig darstellt, da die mRNA beider antiinflammatorischen Parameter in der gekühlten Patientengruppe signifikant erhöht ist.

Bishops et al. (134) untersuchten an 10 gekühlten Patienten die Unterschiede von Zytokinen im Serum. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in IL-10 und IL-1ra während der Wiedererwärmung gefunden. Dies wurde mit einer stabilen antiinflammatorischen Antwort begründet.

Andere Studien berichten über eine Abnahme der proinflammatorischen Zytokine, wie z.B. TNF- α (135), wenn die Patienten direkt nach Ereignis durch Hypothermie behandelt wurden (136), doch muss die Kühlung unmittelbar nach Ereignis erfolgen (137). In der vorliegenden Arbeit ist die sofortige Kühlung nach Ereignis der Patienten nicht gewährleistet, da zum Zeitpunkt der Datenerhebung noch keine standardisierten Protokolle zur Verfügung standen.

Interessanterweise zeigt sich jedoch in unserer Studie eine signifikant erhöhte Expression von IL-1ra bei Patienten nach Kreislaufstillstand, die hypothermisch behandelt wurden, und zwar über die 24. h hinaus. El-Menyar et al. (88) beschreibt, dass ein wesentlicher Teil des *postresuscitation syndrome* die inflammatorische Immunantwort ist. Unter anderem werden TNF- α und IL-1 β mitverantwortlich gemacht, in diesem Zustand eine kardiale linksventrikuläre Funktionsstörung auszulösen.

IL-1ra ist ein spezifischer Inhibitor, der die IL-1 Rezeptoren von IL-1a und IL-1 β blockiert und weiterhin TNF- α moduliert. Beilin et al. (135) konnten nachweisen, dass IL-1 β unter milder Hypothermie signifikant vermindert ist.

Somit kann die Hypothese aufgestellt werden, dass IL-1ra die inflammatorische Immunreaktion hemmt und als positive Reaktion die Pumpfunktion des Herzens schützt und die Überlebensrate verbessert.

6. Zusammenfassung

Trotz steigender Patienteneinlieferung in eine Klinik nach erfolgreicher kardiopulmonaler Reanimation entwickeln viele Patienten nach *ROSC* neben einer zerebralen Ischämie ein letales Multiorganversagen. Auslöser dafür ist die postischämische Immunreaktion des Körpers, das sogenannte *postresuscitation syndrome*. Bisher konnte nicht abschließend geklärt werden, welche genauen Umstände die postischämische Immunreaktion auslösen. Bei allen offenen Fragen scheint besonders die molekulare Ebene interessant. Neuere Studien befassen sich eingehend mit dem Thema der klinischen Überlebensrate nach kardiopulmonaler Reanimation. Der Forschungsschwerpunkt liegt bei den meisten Arbeiten aber auf dem Fokus der neurologischen Folgeschäden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, einen Einblick auf mögliche Ursachen eines Multiorganversagens nach kardiopulmonaler Reanimation zu gewinnen. Hierbei sind maßgeblich Zytokine an der Auslösung beteiligt, daher war in der vorliegenden Untersuchung von Interesse:

- I. Zu analysieren, ob sich die Zytokinexpression in einem Zeitraum von 72 h nach erfolgreicher Wiederherstellung eines Kreislaufs auf mRNA-Ebene quantifizieren lässt
- II. Einen möglichen Zusammenhang zwischen intrazellulär ermittelten Daten und dem klinischen Verlauf, anhand des MOF-Scores dargestellt, zu überprüfen
- III. Zu ermitteln, ob die gemessenen Daten eine Dynamik der pro- und antiinflammatorischen Zytokine aufzeigen und ob es Unterschiede in der Dynamik hinsichtlich des klinischen Verlaufs wie “Überlebt” und “Verstorben” gibt
- IV. Die neu in den Leitlinien aufgenommene Methode der Hypothermie, mit nicht gekühlten Patienten hinsichtlich eines möglichen Expressionsunterschieds zu vergleichen

Um über die initialen pathophysiologischen Mechanismen auf mRNA-Ebene mehr zu erfahren, wurden aus der Literatur relevante Zytokine, die an diesen Mechanismen beteiligt sind, in der vorliegenden Studie genauer untersucht. Als proinflammatorische Parameter wurden IL-8 und TNF- α , als antiinflammatorische Parameter wurden IL-10 und IL-1ra ausgewählt und quantitativ mittels RT-PCR bestimmt.

Zu diesem Zweck wurde aus Vollblut eine *snapshot*-Analyse zu verschiedenen Zeitpunkten nach erfolgreicher Reanimation durchgeführt. Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass sich das PAXgene® Blood RNA Kit dazu eignet, mRNA zu isolieren und nachzuweisen. Dies erfolgte nach einem Protokoll mit 6 seriellen Abnahmezeitpunkten, die erste Abnahme erfolgte nach Erlangen eines Spontankreislaufs unter Mithilfe des notärztlichen Teams, sowie nach 6 h, 12 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Ereignis. Die ermittelten Rohdaten des untersuchten Gens wurden auf eine definierte RNA Konzentration normalisiert.

In die Studie wurden 25 Patienten eingeschlossen. Prinzipiell war die Studie zwar durchführbar, jedoch unter erschwerten Bedingungen aufgrund des nicht alltäglichen Patientenkollektives mit der teils fehlenden Mitarbeit in der präklinischen und innerklinischen Versorgung sowie des individuellen, oft instabilen Zustandes der Patienten.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass das PAXgene® Blood RNA Kit zur mRNA Isolierung aus Vollblut geeignet ist und sich damit Unterschiede in den Expressionsniveaus im zeitlichen Verlauf nachweisen lassen.

Bezogen auf den zeitlichen Verlauf der proinflammatorischen Parameter zeigte sich 24 h nach Ereignis bei TNF- α ein signifikanter Abfall. Bei IL-8 zeigten sich signifikant erniedrigte Expressionsdynamiken 12 h bis 72 h nach Ereignis. Der antiinflammatorische Parameter IL-10 zeigte keine signifikanten Unterschiede an den untersuchten Abnahmezeitpunkten. IL-1ra zeigte einige signifikant erhöhte Expressionsprofile bis zur 48 h.

In Bezug auf die Fragestellung der Überlebensrate nach einer erfolgreichen Reanimation und Versorgung im Krankenhaus, wurden die Expressionsniveaus der Zytokine und die MOF-Scores der einzelnen Patienten miteinander in Korrelation gesetzt. Es konnte kein

Zusammenhang zwischen den MOF-Scores und dem Verlauf der Genexpressionen festgestellt werden.

Innerhalb des definierten Beobachtungszeitraums wurden Kollektive nach ‚Überlebt‘ und ‚Verstorben‘ eingeteilt und hinsichtlich der jeweiligen Expressionsraten der Zytokine miteinander verglichen. Für TNF- α und IL-8 konnten im zeitlichen Verlauf in keiner Gruppe signifikante Unterschiede detektiert werden. Lediglich bei IL-8 ist zum Abnahmzeitpunkt ein signifikanter Unterschied zu erkennen, da die Gruppe der Verstorbenen ein erhöhtes Maß an IL-8 Expression aufzeigt.

Für das Zytokin IL-10 wurden 48 h und 72 h nach Abnahmzeitpunkt signifikant erhöhte intrazelluläre mRNA-Konzentrationen bei dem Kollektiv ‚Verstorben‘ detektiert. IL-1ra zeigte lediglich einen leichten Anstieg in der Expression beim Kollektiv ‚Verstorben‘, erreichte jedoch kein Signifikanzniveau.

Aus der Patientengruppe wurden sechs Patienten nach Wiedererlangen eines Spontankreislaufs in den Münchener Kliniken gekühlt (sogenannte Hypothermie). Im Vergleich von TNF- α und IL-8 konnte nur eine leicht verminderte Zytokinexpression im Kollektiv der gekühlten Patienten festgestellt werden.

Das Zytokin IL-10 wurde zum Zeitpunkt 12 h nach Abnahme mit signifikant höheren Expressionen in der hypothermisch behandelten Gruppe ermittelt. Bei IL-1ra wurde ebenfalls zu mehreren Zeitpunkten ein signifikant erhöhter Wert bei den gekühlten Patienten gemessen. Es kann angenommen werden, dass dies die Pumpfunktion des Herzens verbessert.

In der hier durchgeführten Arbeit zeigt sich, dass pro- und antiinflammatorischen Parameter an der Immunreaktion nach Herz-Kreislaufstillstand und anschließend wiedererlangter Zirkulation beteiligt sind und negative Folgen wie ein Multiorganversagen mit sich führen.

Aufgrund der geringen Anzahl teilnehmender Patienten müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden um die hier erlangten Erkenntnisse zu bestätigen und um Zusammenhänge von Multiorganversagen und Zytokinen aus der Immunantwort noch besser verstehen zu können.

7. Literaturverzeichnis

- (1) Domanski MJ, Zipes DP, Schron E. Treatment of sudden cardiac death. Current understandings from randomized trials and future research directions. *Circulation* 1997 Jun 17;95(12):2694-9.
- (2) von Kaufmann F, Kanz KG. Die Rolle der Leitstelle im Prozess der präklinischen Versorgung. 2012. Ref Type: Generic
- (3) Valenzuela TD, Roe DJ, Cretin S, Spaite DW, Larsen MP. Estimating effectiveness of cardiac arrest interventions: a logistic regression survival model. *Circulation* 1997 Nov 18;96(10):3308-13.
- (4) Larsen MP, Eisenberg MS, Cummins RO, Hallstrom AP. Predicting survival from out-of-hospital cardiac arrest: a graphic model. *Ann Emerg Med* 1993 Nov;22(11):1652-8.
- (5) Nolan JP, Soar J, Zideman DA, Biarent D, Bossaert LL, Deakin C, et al. European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2010 Section 1. Executive summary. *Resuscitation* 2010 Oct;81(10):1219-76.
- (6) Yu T, Weil MH, Tang W, Sun S, Klouche K, Povoas H, et al. Adverse outcomes of interrupted precordial compression during automated defibrillation. *Circulation* 2002 Jul 16;106(3):368-72.
- (7) Kern KB, Hilwig RW, Berg RA, Sanders AB, Ewy GA. Importance of continuous chest compressions during cardiopulmonary resuscitation: improved outcome during a simulated single lay-rescuer scenario. *Circulation* 2002 Feb 5;105(5):645-9.
- (8) Weisfeldt ML, Becker LB. Resuscitation after cardiac arrest: a 3-phase time-sensitive model. *JAMA* 2002 Dec 18;288(23):3035-8.
- (9) Weisfeldt ML. A three phase temporal model for cardiopulmonary resuscitation following cardiac arrest. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2004;115:115-22.
- (10) de Vos R. Quality of life after cardiopulmonary resuscitation. *Resuscitation* 1997 Nov;35(3):231-6.
- (11) Part 1: introduction to the International Guidelines 2000 for CPR and ECC. A consensus on science. European Resuscitation Council. *Resuscitation* 2000 Aug 23;46(1-3):3-15.
- (12) Graves JR, Herlitz J, Bang A, Axelsson A, Ekstrom L, Holmberg M, et al. Survivors of out of hospital cardiac arrest: their prognosis, longevity and functional status. *Resuscitation* 1997 Oct;35(2):117-21.

- (13) Longstreth WT, Jr., Fahrenbruch CE, Olsufka M, Walsh TR, Copass MK, Cobb LA. Randomized clinical trial of magnesium, diazepam, or both after out-of-hospital cardiac arrest. *Neurology* 2002 Aug 27;59(4):506-14.
- (14) Rea TD, Eisenberg MS, Becker LJ, Lima AR, Fahrenbruch CE, Copass MK, et al. Emergency medical services and mortality from heart disease: a community study. *Ann Emerg Med* 2003 Apr;41(4):494-9.
- (15) Negovsky VA, Gurvitch AM. Post-resuscitation disease--a new nosological entity. Its reality and significance. *Resuscitation* 1995 Aug;30(1):23-7.
- (16) Gilmore CM, Rea TD, Becker LJ, Eisenberg MS. Three-phase model of cardiac arrest: time-dependent benefit of bystander cardiopulmonary resuscitation. *Am J Cardiol* 2006 Aug 15;98(4):497-9.
- (17) Adrie C, Laurent I, Monchi M, Cariou A, Dhainaou JF, Spaulding C. Postresuscitation disease after cardiac arrest: a sepsis-like syndrome? *Curr Opin Crit Care* 2004 Jun;10(3):208-12.
- (18) Ar'Rajab A, Dawidson I, Fabia R. Reperfusion injury. *New Horiz* 1996 May;4(2):224-34.
- (19) Vanden Hoek TL, Qin Y, Wojcik K, Li CQ, Shao ZH, Anderson T, et al. Reperfusion, not simulated ischemia, initiates intrinsic apoptosis injury in chick cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003 Jan;284(1):H141-H150.
- (20) Hearse DJ, Humphrey SM, Bullock GR. The oxygen paradox and the calcium paradox: two facets of the same problem? *J Mol Cell Cardiol* 1978 Jul;10(7):641-68.
- (21) Homer-Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MJ. Post-ischaemic organ dysfunction: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997 Sep;14(3):195-203.
- (22) Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull* 2004;70:71-86.
- (23) Hildebrand F, Pape HC, Krettek C. [The importance of cytokines in the posttraumatic inflammatory reaction]. *Unfallchirurg* 2005 Oct;108(10):793-803.
- (24) Yao YM, Redl H, Bahrami S, Schlag G. The inflammatory basis of trauma/shock-associated multiple organ failure. *Inflamm Res* 1998 May;47(5):201-10.
- (25) 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 Jul 30;106(5):562-8.

- (26) Mussack T, Biberthaler P, Gippner-Steppert C, Kanz KG, Wiedemann E, Mutschler W, et al. Early cellular brain damage and systemic inflammatory response after cardiopulmonary resuscitation or isolated severe head trauma: a comparative pilot study on common pathomechanisms. *Resuscitation* 2001 May;49(2):193-9.
- (27) Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, Remick DG. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *J Immunol* 2006 Aug 1;177(3):1967-74.
- (28) Muller-Werdan U. [Septic shock and systemic inflammatory response syndrome--diagnosis]. *Dtsch Med Wochenschr* 2003 Nov 7;128(45):2368-71.
- (29) Bone RC. Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation. *Crit Care Med* 1996 Jan;24(1):163-72.
- (30) Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J. *Basislehrbuch Innere Medizin* 3. Auflage. 2003. Ref Type: Generic
- (31) Bottiger BW, Motsch J, Braun V, Martin E, Kirschfink M. Marked activation of complement and leukocytes and an increase in the concentrations of soluble endothelial adhesion molecules during cardiopulmonary resuscitation and early reperfusion after cardiac arrest in humans. *Crit Care Med* 2002 Nov;30(11):2473-80.
- (32) 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. *Resuscitation* 2008 Dec;79(3):350-79.
- (33) Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 2000 Apr;117(4):1162-72.
- (34) Faist E, Kim C. Therapeutic immunomodulatory approaches for the control of systemic inflammatory response syndrome and the prevention of sepsis. *New Horiz* 1998 May;6(2 Suppl):S97-102.
- (35) Kasai T, Inada K, Takakuwa T, Yamada Y, Inoue Y, Shimamura T, et al. Anti-inflammatory cytokine levels in patients with septic shock. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1997 Oct;98(1):34-42.

- (36) Mukaida N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003 Apr;284(4):L566-L577.
- (37) Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol* 1998;16(5-6):457-99.
- (38) Border JR. Hypothesis: sepsis, multiple systems organ failure, and the macrophage. *Arch Surg* 1988 Mar;123(3):285-6.
- (39) Horst Ibelgaufits "cope with cytokines". 2009. Ref Type: Generic
- (40) Marchant A, Bruyns C, Vandenabeele P, Ducarme M, Gerard C, Delvaux A, et al. Interleukin-10 controls interferon-gamma and tumor necrosis factor production during experimental endotoxemia. *Eur J Immunol* 1994 May;24(5):1167-71.
- (41) Niemann JT, Rosborough JP, Youngquist S, Shah AP, Lewis RJ, Phan QT, et al. Cardiac function and the proinflammatory cytokine response after recovery from cardiac arrest in swine. *J Interferon Cytokine Res* 2009 Nov;29(11):749-58.
- (42) Callaway CW, Rittenberger JC, Logue ES, McMichael MJ. Hypothermia after cardiac arrest does not alter serum inflammatory markers. *Crit Care Med* 2008 Sep;36(9):2607-12.
- (43) Bonavida B. Immunomodulatory effect of tumor necrosis factor. *Biotherapy* 1991;3(2):127-33.
- (44) Kelly RA, Smith TW. Cytokines and cardiac contractile function. *Circulation* 1997 Feb 18;95(4):778-81.
- (45) Meldrum DR. Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol* 1998 Mar;274(3 Pt 2):R577-R595.
- (46) Baggolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 1997;15:675-705.
- (47) Mukaida N. Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. *Int J Hematol* 2000 Dec;72(4):391-8.
- (48) Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol* 1991;9:617-48.
- (49) Sekido N, Mukaida N, Harada A, Nakanishi I, Watanabe Y, Matsushima K. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. *Nature* 1993 Oct 14;365(6447):654-7.

- (50) Kukiela GL, Smith CW, LaRosa GJ, Manning AM, Mendoza LH, Daly TJ, et al. Interleukin-8 gene induction in the myocardium after ischemia and reperfusion in vivo. *J Clin Invest* 1995 Jan;95(1):89-103.
- (51) Matsumoto T, Ikeda K, Mukaida N, Harada A, Matsumoto Y, Yamashita J, et al. Prevention of cerebral edema and infarct in cerebral reperfusion injury by an antibody to interleukin-8. *Lab Invest* 1997 Aug;77(2):119-25.
- (52) Elmas E, Lang S, Dempfle CE, Kalsch T, Hannak D, Sueselbeck T, et al. High plasma levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and interleukin-8 (IL-8) characterize patients prone to ventricular fibrillation complicating myocardial infarction. *Clin Chem Lab Med* 2007;45(10):1360-5.
- (53) De Perrot M, Sekine Y, Fischer S, Waddell TK, McRae K, Liu M, et al. Interleukin-8 release during early reperfusion predicts graft function in human lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2002 Jan 15;165(2):211-5.
- (54) Horgan MJ, Wright SD, Malik AB. Antibody against leukocyte integrin (CD18) prevents reperfusion-induced lung vascular injury. *Am J Physiol* 1990 Oct;259(4 Pt 1):L315-L319.
- (55) Brandtzaeg P, Osnes L, Ovstebo R, Joo GB, Westvik AB, Kierulf P. Net inflammatory capacity of human septic shock plasma evaluated by a monocyte-based target cell assay: identification of interleukin-10 as a major functional deactivator of human monocytes. *J Exp Med* 1996 Jul 1;184(1):51-60.
- (56) Howard M, O'Garra A, Ishida H, de Waal MR, de Vries J. Biological properties of interleukin 10. *J Clin Immunol* 1992 Jul;12(4):239-47.
- (57) Opal SM, Wherry JC, Grint P. Interleukin-10: potential benefits and possible risks in clinical infectious diseases. *Clin Infect Dis* 1998 Dec;27(6):1497-507.
- (58) Dickensheets HL, Freeman SL, Smith MF, Donnelly RP. Interleukin-10 upregulates tumor necrosis factor receptor type-II (p75) gene expression in endotoxin-stimulated human monocytes. *Blood* 1997 Nov 15;90(10):4162-71.
- (59) Leon LR. Invited review: cytokine regulation of fever: studies using gene knockout mice. *J Appl Physiol* 2002 Jun;92(6):2648-55.
- (60) Donnelly SC, Strieter RM, Reid PT, Kunkel SL, Burdick MD, Armstrong I, et al. The association between mortality rates and decreased concentrations of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist in the lung fluids of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med* 1996 Aug 1;125(3):191-6.
- (61) Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993 Oct 22;75(2):263-74.

- (62) Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996 Mar 15;87(6):2095-147.
- (63) Schreuder H, Tardif C, Trump-Kallmeyer S, Soffientini A, Sarubbi E, Akeson A, et al. A new cytokine-receptor binding mode revealed by the crystal structure of the IL-1 receptor with an antagonist. *Nature* 1997 Mar 13;386(6621):194-200.
- (64) Dinarello CA. Induction of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist. *Semin Oncol* 1997 Jun;24(3 Suppl 9):S9.
- (65) Bell DD, Brindley PG, Forrest D, Al Muslim O, Zygun D. Management following resuscitation from cardiac arrest: recommendations from the 2003 Rocky Mountain Critical Care Conference. *Can J Anaesth* 2005 Mar;52(3):309-22.
- (66) Busch M, Soreide E, Lossius HM, Lexow K, Dickstein K. Rapid implementation of therapeutic hypothermia in comatose out-of-hospital cardiac arrest survivors. *Acta Anaesthesiol Scand* 2006 Nov;50(10):1277-83.
- (67) WILLIAMS GR, Jr., SPENCER FC. The clinical use of hypothermia following cardiac arrest. *Ann Surg* 1958 Sep;148(3):462-8.
- (68) Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *N Engl J Med* 2002 Feb 21;346(8):549-56.
- (69) Bernard SA, Gray TW, Buist MD, Jones BM, Silvester W, Gutteridge G, et al. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N Engl J Med* 2002 Feb 21;346(8):557-63.
- (70) Wolfrum S, Radke PW, Pischon T, Willich SN, Schunkert H, Kurowski V. Mild therapeutic hypothermia after cardiac arrest - a nationwide survey on the implementation of the ILCOR guidelines in German intensive care units. *Resuscitation* 2007 Feb;72(2):207-13.
- (71) Castren M, Silfvast T, Rubertsson S, Niskanen M, Valsson F, Wanscher M, et al. Scandinavian clinical practice guidelines for therapeutic hypothermia and post-resuscitation care after cardiac arrest. *Acta Anaesthesiol Scand* 2009 Mar;53(3):280-8.
- (72) Deakin CD, Nolan JP, Soar J, Sunde K, Koster RW, Smith GB, et al. European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2010 Section 4. Adult advanced life support. *Resuscitation* 2010 Oct;81(10):1305-52.
- (73) Nolan JP, Morley PT, Hoek TL, Hickey RW. Therapeutic hypothermia after cardiac arrest. An advisory statement by the Advancement Life support Task Force of the International Liaison committee on Resuscitation. *Resuscitation* 2003 Jun;57(3):231-5.

- (74) Bernard S, Buist M, Monteiro O, Smith K. Induced hypothermia using large volume, ice-cold intravenous fluid in comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest: a preliminary report. *Resuscitation* 2003 Jan;56(1):9-13.
- (75) Mori K, Itoh Y, Saito J, Takeyama Y, Kurata Y, Kaneko M, et al. Post-resuscitative hypothermic bypass reduces ischemic brain injury in swine. *Acad Emerg Med* 2001 Oct;8(10):937-45.
- (76) Hickey RW, Ferimer H, Alexander HL, Garman RH, Callaway CW, Hicks S, et al. Delayed, spontaneous hypothermia reduces neuronal damage after asphyxial cardiac arrest in rats. *Crit Care Med* 2000 Oct;28(10):3511-6.
- (77) Chopp M, Knight R, Tidwell CD, Helpern JA, Brown E, Welch KM. The metabolic effects of mild hypothermia on global cerebral ischemia and recirculation in the cat: comparison to normothermia and hyperthermia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989 Apr;9(2):141-8.
- (78) Ding D, Moskowitz SI, Li R, Lee SB, Esteban M, Tomaselli K, et al. Acidosis induces necrosis and apoptosis of cultured hippocampal neurons. *Exp Neurol* 2000 Mar;162(1):1-12.
- (79) Globus MY, Busto R, Lin B, Schnippering H, Ginsberg MD. Detection of free radical activity during transient global ischemia and recirculation: effects of intraischemic brain temperature modulation. *J Neurochem* 1995 Sep;65(3):1250-6.
- (80) Globus MY, Alonso O, Dietrich WD, Busto R, Ginsberg MD. Glutamate release and free radical production following brain injury: effects of posttraumatic hypothermia. *J Neurochem* 1995 Oct;65(4):1704-11.
- (81) Ning XH, Chen SH, Xu CS, Li L, Yao LY, Qian K, et al. Hypothermic protection of the ischemic heart via alterations in apoptotic pathways as assessed by gene array analysis. *J Appl Physiol* 2002 May;92(5):2200-7.
- (82) Xu L, Yenari MA, Steinberg GK, Giffard RG. Mild hypothermia reduces apoptosis of mouse neurons in vitro early in the cascade. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002 Jan;22(1):21-8.
- (83) Callaway CW, Rittenberger JC, Logue ES, McMichael MJ. Hypothermia after cardiac arrest does not alter serum inflammatory markers. *Crit Care Med* 2008 Sep;36(9):2607-12.
- (84) Hachimi-Idrissi S, Corne L, Ebinger G, Michotte Y, Huyghens L. Mild hypothermia induced by a helmet device: a clinical feasibility study. *Resuscitation* 2001 Dec;51(3):275-81.

- (85) Kim F, Olsufka M, Carlbom D, Deem S, Longstreth WT, Jr., Hanrahan M, et al. Pilot study of rapid infusion of 2 L of 4 degrees C normal saline for induction of mild hypothermia in hospitalized, comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest. *Circulation* 2005 Aug 2;112(5):715-9.
- (86) Nordmark J, Rubertsson S. Induction of mild hypothermia with infusion of cold (4 degrees C) fluid during ongoing experimental CPR. *Resuscitation* 2005 Sep;66(3):357-65.
- (87) Kagawa E, Inoue I, Kawagoe T, Ishihara M, Shimatani Y, Kurisu S, et al. Who benefits most from mild therapeutic hypothermia in coronary intervention era? A retrospective and propensity-matched study. *Crit Care* 2010;14(4):R155.
- (88) El Menyar AA. Pathophysiology and hemodynamic of postresuscitation syndrome. *Saudi Med J* 2006 Apr;27(4):441-5.
- (89) Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today* 1994 Feb;15(2):74-80.
- (90) Goris RJ, te Boekhorst TP, Nuytinck JK, Gimbrere JS. Multiple-organ failure. Generalized autodestructive inflammation? *Arch Surg* 1985 Oct;120(10):1109-15.
- (91) Lefering R, Lefering R, Goris RJ, van Nieuwenhoven EJ, Neugebauer E. Revision of the multiple organ failure score. *Langenbecks Arch Surg* 2002 April;387:14-20. 2009. Ref Type: Generic
- (92) Pilz G, Werdan K. [Scores for multiple organ dysfunction and multiple organ failure]. *Internist (Berl)* 1998 May;39(5):502-8.
- (93) Le Gall JR, Klar J, Lemeshow S, Saulnier F, Alberti C, Artigas A, et al. The Logistic Organ Dysfunction system. A new way to assess organ dysfunction in the intensive care unit. ICU Scoring Group. *JAMA* 1996 Sep 11;276(10):802-10.
- (94) Neukamm J, Grasner JT, Schewe JC, Breil M, Bahr J, Heister U, et al. The impact of response time reliability on CPR incidence and resuscitation success: a benchmark study from the German Resuscitation Registry. *Crit Care* 2011;15(6):R282.
- (95) Atwood C, Eisenberg MS, Herlitz J, Rea TD. Incidence of EMS-treated out-of-hospital cardiac arrest in Europe. *Resuscitation* 2005 Oct;67(1):75-80.
- (96) Berdowski J, Berg RA, Tijssen JG, Koster RW. Global incidences of out-of-hospital cardiac arrest and survival rates: Systematic review of 67 prospective studies. *Resuscitation* 2010 Nov;81(11):1479-87.

- (97) Grasner JT, Herlitz J, Koster RW, Rosell-Ortiz F, Stamatakis L, Bossaert L. Quality management in resuscitation--towards a European cardiac arrest registry (EuReCa). *Resuscitation* 2011 Aug;82(8):989-94.
- (98) Roberts BW, Kilgannon JH, Chansky ME, Mittal N, Wooden J, Parrillo JE, et al. Multiple organ dysfunction after return of spontaneous circulation in postcardiac arrest syndrome. *Crit Care Med* 2013 Jun;41(6):1492-501.
- (99) Hohnhaus M. Auswirkung struktureller Unterschiede in den Krankenhauspatienten auf das Überleben von Patienten mit außerärztlichem Herz-Kreislauf-Stillstand im Rettungsdienstbereich München zwischen 2007-2009. 15-11-2012. Ref Type: Unpublished Work
- (100) Ito T, Saitoh D, Fukuzuka K, Kiyoizumi T, Kawakami M, Sakamoto T, et al. Significance of elevated serum interleukin-8 in patients resuscitated after cardiopulmonary arrest. *Resuscitation* 2001 Oct;51(1):47-53.
- (101) Gando S, Nanzaki S, Morimoto Y, Kobayashi S, Kemmotsu O. Out-of-hospital cardiac arrest increases soluble vascular endothelial adhesion molecules and neutrophil elastase associated with endothelial injury. *Intensive Care Med* 2000 Jan;26(1):38-44.
- (102) Levy M, Loirat C, Habib R. Idiopathic membrano-proliferative glomerulonephritis in children (corrections between light, electron, immunofluorescent microscopic appearances and serum C3 and C4 levels). *Biomedicine* 1973 Oct 10;19(10):447-54.
- (103) Biberthaler P, Stegmaier J, Mayer V, Kirchhoff C, Neth P, Mussack T, et al. Initial posttraumatic translocation of NF-kappaB and TNF-alpha mRNA expression in peripheral blood monocytes of trauma patients with multiple injuries: a pilot study. *Shock* 2004 Dec;22(6):527-32.
- (104) Landes J, Langer S, Kirchhoff C, Schuetz C, Joneidi-Jafari H, Stegmaier J, et al. Snapshot assessment of RNA-expression in severely burned patients using the PAXgene Blood RNA system: a pilot study. *Burns* 2008 Mar;34(2):197-204.
- (105) Mannick JA, Rodrick ML, Lederer JA. The immunologic response to injury. *J Am Coll Surg* 2001 Sep;193(3):237-44.
- (106) Bottiger BW, Motsch J, Bohrer H, Boker T, Aulmann M, Nawroth PP, et al. Activation of blood coagulation after cardiac arrest is not balanced adequately by activation of endogenous fibrinolysis. *Circulation* 1995 Nov 1;92(9):2572-8.

- (107) 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 Councils of Southern Africa). *Circulation* 2004 Nov 23;110(21):3385-97.
- (108) Initiale Analyse der RNA-Expression spezifischer Mediatoren nach erfolgreicher kardiopulmonaler Reanimation. Dissertation Henning Laven, 2009
- (109) Kamphuis W, Cailotto C, Dijk F, Bergen A, Buijs RM. Circadian expression of clock genes and clock-controlled genes in the rat retina. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 Apr 29;330(1):18-26.
- (110) Vukmir RB. Survival from prehospital cardiac arrest is critically dependent upon response time. *Resuscitation* 2006 May;69(2):229-34.
- (111) Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990 Sep 21;249(4975):1431-3.
- (112) Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000 Aug;118(2):503-8.
- (113) Moore FA, Saueria A, Moore EE, Haenel JB, Burch JM, Lezotte DC. Postinjury multiple organ failure: a bimodal phenomenon. *J Trauma* 1996 Apr;40(4):501-10.
- (114) Sherry RM, Cue JI, Goddard JK, Parramore JB, DiPiro JT. Interleukin-10 is associated with the development of sepsis in trauma patients. *J Trauma* 1996 Apr;40(4):613-6.
- (115) Ayala A, Lehman DL, Herdon CD, Chaudry IH. Mechanism of enhanced susceptibility to sepsis following hemorrhage. Interleukin-10 suppression of T-cell response is mediated by eicosanoid-induced interleukin-4 release. *Arch Surg* 1994 Nov;129(11):1172-8.
- (116) Lyons A, Kelly JL, Rodrick ML, Mannick JA, Lederer JA. Major injury induces increased production of interleukin-10 by cells of the immune system with a negative impact on resistance to infection. *Ann Surg* 1997 Oct;226(4):450-8.

- (117) Keel M, Ecknauer E, Stocker R, Ungethum U, Steckholzer U, Kenney J, et al. Different pattern of local and systemic release of proinflammatory and anti-inflammatory mediators in severely injured patients with chest trauma. *J Trauma* 1996 Jun;40(6):907-12.
- (118) Partrick DA, Moore EE, Moore FA, Biffl WL, Barnett CC, Jr. Release of anti-inflammatory mediators after major torso trauma correlates with the development of postinjury multiple organ failure. *Am J Surg* 1999 Dec;178(6):564-9.
- (119) Wagner DP, Knaus WA, Harrell FE, Zimmerman JE, Watts C. Daily prognostic estimates for critically ill adults in intensive care units: results from a prospective, multicenter, inception cohort analysis. *Crit Care Med* 1994 Sep;22(9):1359-72.
- (120) Cullen DJ, Chernow B. Predicting outcome in critically ill patients. *Crit Care Med* 1994 Sep;22(9):1345-8.
- (121) Pilz G, Fraunberger P, Appel R, Kreuzer E, Werdan K, Walli A, et al. Early prediction of outcome in score-identified, postcardiac surgical patients at high risk for sepsis, using soluble tumor necrosis factor receptor-p55 concentrations. *Crit Care Med* 1996 Apr;24(4):596-600.
- (122) Dimopoulou I, Orfanos S, Kotanidou A, Livaditi O, Giamarellos-Bourboulis E, Athanasiou C, et al. Plasma pro- and anti-inflammatory cytokine levels and outcome prediction in unselected critically ill patients. *Cytokine* 2008 Mar;41(3):263-7.
- (123) Becker LB, Aufderheide TP, Geocadin RG, Callaway CW, Lazar RM, Donnino MW, et al. Primary outcomes for resuscitation science studies: a consensus statement from the American Heart Association. *Circulation* 2011 Nov 8;124(19):2158-77.
- (124) Maier B, Lefering R, Lehnert M, Laurer HL, Steudel WI, Neugebauer EA, et al. Early versus late onset of multiple organ failure is associated with differing patterns of plasma cytokine biomarker expression and outcome after severe trauma. *Shock* 2007 Dec;28(6):668-74.
- (125) Bogner V, Keil L, Kanz KG, Kirchhoff C, Leidel BA, Mutschler W, et al. Very early posttraumatic serum alterations are significantly associated to initial massive RBC substitution, injury severity, multiple organ failure and adverse clinical outcome in multiple injured patients. *Eur J Med Res* 2009 Jul 22;14(7):284-91.
- (126) Biberthaler P, Bogner V, Baker HV, Lopez MC, Neth P, Kanz KG, et al. Genome-wide monocytic mRNA expression in polytrauma patients for identification of clinical outcome. *Shock* 2005 Jul;24(1):11-9.

- (127) Platzer C, Docke W, Volk H, Prosch S. Catecholamines trigger IL-10 release in acute systemic stress reaction by direct stimulation of its promoter/enhancer activity in monocytic cells. *J Neuroimmunol* 2000 Jun 1;105(1):31-8.
- (128) Riese U, Brenner S, Docke WD, Prosch S, Reinke P, Oppert M, et al. Catecholamines induce IL-10 release in patients suffering from acute myocardial infarction by transactivating its promoter in monocytic but not in T-cells. *Mol Cell Biochem* 2000 Sep;212(1-2):45-50.
- (129) Colbourne F, Li H, Buchan AM. Indefatigable CA1 sector neuroprotection with mild hypothermia induced 6 hours after severe forebrain ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999 Jul;19(7):742-9.
- (130) Hicks SD, DeFranco DB, Callaway CW. Hypothermia during reperfusion after asphyxial cardiac arrest improves functional recovery and selectively alters stress-induced protein expression. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000 Mar;20(3):520-30.
- (131) Logue ES, McMichael MJ, Callaway CW. Comparison of the effects of hypothermia at 33 degrees C or 35 degrees C after cardiac arrest in rats. *Acad Emerg Med* 2007 Apr;14(4):293-300.
- (132) Dixon SR, Whitbourn RJ, Dae MW, Grube E, Sherman W, Schaer GL, et al. Induction of mild systemic hypothermia with endovascular cooling during primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2002 Dec 4;40(11):1928-34.
- (133) Polderman KH. Application of therapeutic hypothermia in the ICU: opportunities and pitfalls of a promising treatment modality. Part 1: Indications and evidence. *Intensive Care Med* 2004 Apr;30(4):556-75.
- (134) Bisschops LL, Hoedemaekers CW, Mollnes TE, van der Hoeven JG. Rewarming after hypothermia after cardiac arrest shifts the inflammatory balance. *Crit Care Med* 2012 Apr;40(4):1136-42.
- (135) Beilin B, Shavit Y, Razumovsky J, Wolloch Y, Zeidel A, Bessler H. Effects of mild perioperative hypothermia on cellular immune responses. *Anesthesiology* 1998 Nov;89(5):1133-40.
- (136) Hildebrand F, van Griensven M, Giannoudis P, Luerig A, Harwood P, Harms O, et al. Effects of hypothermia and re-warming on the inflammatory response in a murine multiple hit model of trauma. *Cytokine* 2005 Sep 7;31(5):382-93.
- (137) Xiao F, Safar P, Radovsky A. Mild protective and resuscitative hypothermia for asphyxial cardiac arrest in rats. *Am J Emerg Med* 1998 Jan;16(1):17-25.

8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Karl-Georg Kanz, dem damaligen Leiter der Notaufnahme der Chirurgischen Klinik und Poliklinik-Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München für die freundliche Überlassung des Themas sowie der wissenschaftlichen Unterstützung bedanken.

Dem ehemaligen Direktor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik, Herrn Prof. Dr. med. Wolf Mutschler danke ich für die Bereitstellung der Mittel sowie der wissenschaftlichen Ausbildung und Förderung dieser Arbeit.

Mein aufrichtiger Dank gilt Frau PD Dr. med. Viktoria Bogner-Flatz für ihre sehr engagierte wissenschaftliche und konstruktive Betreuung und Unterstützung. Ihre Betreuung hat im Wesentlichen am Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ebenfalls gebührt mein besonderer Dank Frau Dr. med. Mareen Braunstein für ihre hilfsbereite und prompte Unterstützung.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern des chirurgischen Forschungslabors für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung während der Laboranalysen.

Der Arbeitsgruppe *,Trauma and Resuscitation'* gebührt mein Dank für die immer kollegiale und hilfsbereite gegenseitige Unterstützung während der Laborarbeiten.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Henning Laven, Frau Dr. med. Helen Vester und Herrn Dr. med. Michael Matz.

Für die Einsatzbereitschaft und Kooperation zur präklinischen Durchführung möchte ich allen beteiligten Notärzten und dem Rettungspersonal der NAW-Besatzung *,Florian 1-70-1'* der Berufsfeuerwehr München-Mitte danken, sowie den Münchner Kliniken für die Kooperation während des klinischen Aufenthaltes der Patienten.

Meinem Mann John Williamson danke ich für die vielen gemeinsamen Stunden, die wir bisher zusammen verbracht haben und die stetige Unterstützung während dieser Arbeit.

Meiner Schwester Daniela Arban, meiner Freundin Stefanie Marschick und meinen Freunden danke ich für ihr Dasein, ihren Einsatz und ihre Ermunterungen.

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mich in jeglicher Hinsicht stets unterstützt und meinen beruflichen Werdegang ermöglicht haben.