

Aus dem  
CharitéCentrum für Anästhesiologie und Intensivmedizin  
Klinik für Anästhesiologie m. S. operative Intensivmedizin  
Campus Benjamin Franklin  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. S. Treskatsch

## **Habilitationsschrift**

# **Pathophysiologie, Diagnostik und therapeutische Strategien zur perioperativen Risikominimierung mit Fokus auf die Inflammationsreaktion**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Anästhesiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Christian Berger, MHBA

Eingereicht: Juni 2023  
Dekan: Prof. Dr. Joachim Spranger  
Gutachter\*in: Prof. Dr.  
Gutachter\*in: Prof. Dr.

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen .....	4
1 Einleitung .....	6
1.1 Perioperatives Risiko nicht-kardiochirurgischer Eingriffe .....	6
1.2 Perioperatives Risiko kardiochirurgischer/kardiologischer Eingriffe .....	8
1.3 Perioperative Inflammation.....	8
1.3.1 Hämodynamik und Inflammation .....	14
1.3.2 Respiration und Inflammation.....	17
1.3.3 Perioperative Inflammation durch Erreger .....	18
1.4 Perioperatives Risiko und Kompetenz.....	20
1.5 Problemstellung und wissenschaftliche Zielsetzung .....	21
2 Eigene Arbeiten.....	23
2.1 Originalarbeit 1: Der kardiopulmonale Bypass mittels Herz-Lungen-Maschine beeinflusst die Leukozytenaktivierung bei herzchirurgischen Eingriffen .....	23
2.2 Originalarbeit 2: Lidocain beeinflusst die Leukozytenaktivierung in der Sepsis durch eine Verminderung von Chemokin-induziertem Arrest und Transmigration.....	35
2.3 Originalarbeit 3: Dexmedetomidin basierte Sedierung in Kombination mit Remifentanyl bei MitraClip Eingriffen .....	48
2.4 Originalarbeit 4: PBL in Kombination mit high-fidelity Simulation als Lehrmethoden führt zu anhaltend besseren praktischen Fähigkeiten bei der kardiopulmonalen Reanimation.....	58
2.5 Originalarbeit 5: Echokardiografische Evaluation der rechtsventrikulären Funktion im SARS-CoV-2 ARDS.....	71
3 Diskussion.....	84
3.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der Originalarbeiten .....	84
3.2 Ansätze zur Reduktion unvermeidbarer Risiken .....	86
3.3 Ansätze zur Reduktion vermeidbarer Risiken.....	88
3.4 Ansätze zum Monitoring von Risiken.....	92
4 Zusammenfassung.....	95

---

5	Literaturverzeichnis .....	97
6	Danksagung .....	107
7	Eidesstattliche Erklärung .....	108

## Abkürzungen

ARDS	acute respiratory distress syndrome
ASA PS	American Society of Anesthesiologists Physical Status
CPR	Cardiopulmonary resuscitation
CXCL-1	C-X-C motif ligand - 1
CXCR2	CXC-motif chemokine receptor 2
DAMP	damage associated molecular pattern
ESAM	endothelial cell-selective adhesion molecule
fMLP	N-formyl-methionylleucyl-phenylalanine
GDT	goal directed therapy
h	Stunde
HES	Hydroxyethylstärke
HF	high-fidelity
HLM	Heart Lung Machine
HMGB-1	High-Mobility-Group-Protein B1
HPV	hypoxisch pulmonale Vasokonstriktion
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1
IL8	Interleukin 8
insb.	insbesondere
JAM	junctional adhesion molecule
KC	keratinocyte chemoattractant
kg	Kilogramm
LFA1	lymphocyte function-associated antigen 1
LV	linker Ventrikel
MAC1	macrophage antigen 1
MAD	mittlerer arterieller Blutdruck
MADCAM1	mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule 1
min	Minute
MINS	Myocardial Injury after Non-Cardiac Surgery
MIP	macrophage inflammatory protein
mg	Milligramm
p38 MAPK	p38 mitogen-activated protein kinase
PBL	problem based learning
PECAM1	platelet/endothelial-cell adhesion molecule 1
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PLC $\gamma$ 2	phospholipase C $\gamma$ 2

---

POCD	post-operative cognitive dysfunction
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
RV	rechter Ventrikel
RV-FAC	right ventricular fractional area change
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome - coronavirus - 2
TAPSE	tricuspid annular plane systolic excursion
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor alpha
u.a.	unter anderem
VATS	Video-assist thoracoscopic surgery
VCAM1	vascular cell-adhesion molecule 1
VILI	Ventilator Induced Lung Injury
VLA4	very late antigen
vWF	von Willebrand Factor
$\mu$ g	Mikrogramm
z. B.	zum Beispiel

# 1 Einleitung

## 1.1 Perioperatives Risiko nicht-kardiochirurgischer Eingriffe

Operative Eingriffe werden meist aufgrund spezifischer Pathologien durchgeführt. Diese Pathologien beinhalten ein gesundheitliches Risiko für die Erkrankten. Darüber hinaus beinhaltet der gesamte perioperative Prozess und insbesondere die damit verbundenen, notwendigen anästhesiologischen und operativen Maßnahmen, die zur Behandlung dieser Pathologien notwendig sind, eigene Risiken. So erleiden beispielsweise bei 5% aller Patient\*innen bei nicht-kardiochirurgischen Eingriffen eine kardiovaskuläre Komplikation (MINS – Myocardial Injury after Non-Cardiac Surgery) im Verlauf des perioperativen Prozesses [1]. Ursachen für das perioperative Auftreten von MINS können Blutungen, Gerinnungsstörungen, Aktivierung des sympathischen Nervensystems und auch Inflamationsreaktionen sein [2]. Diese Entstehungswege verdeutlichen, dass perioperative Risiken sowohl patient\*innen- als auch eingriffsimmanent sein können.

**Tabelle 1:** Die verschiedenen ASA PS Kategorien mit Beschreibung und Häufigkeit des Auftretens von perioperativen Komplikationen (modifiziert nach [3, 4])

ASA PS	Beschreibung	Häufigkeit Komplikationen	perioperative Sterblichkeit
I	Gesunde*r Patient*in	2%	0,02%
II	Patient*in mit milder systemischer Erkrankung	5%	0,14%
III	Patient*in mit schwerer systemischer Erkrankung	14%	1,41%
IV	Patient*in mit schwerer systemischer Erkrankung, welche konstant lebensbedrohend ist	37%	11,14%
V	Moribunde*r Patient*in, bei dem*r kein Überleben ohne Operation erwartet wird	71%	50,87%
IV	Hirntote*r Patient*in mit geplanter Organspende	-	-

Aktuelle Leitlinien versuchen diese Zusammenhänge und das damit einhergehende kumulative Risiko durch verschiedene Scoring-Systeme zu quantifizieren und so Risikoprofile mit entsprechenden Handlungsempfehlungen zu erstellen [5]. Ein im perioperativen Prozess zentral genutztes Scoring System ist das 1941 eingeführte Klassifikationssystem des

patient\*innen-spezifischen Risikoprofils ASA PS (American Society of Anesthesiologists Physical Status). Wie in Tabelle 1 dargestellt, bildet dieses System auch in seinen aktuellen Weiterentwicklungen eine gute Differenzierung in der Prädiktion von perioperativen Komplikationen ab und zeigt mit der Prädiktion der perioperativen Sterblichkeit die Outcomerelevanz des patient\*innen-spezifischen Risikos auf [3, 6].

Unabhängig vom patient\*innen-spezifischen Risiko, stellt die Schwere des operativen Eingriffes einen eigenständigen Risikofaktor dar, perioperative Komplikationen zu erleiden. Dementsprechend werden in der Risikoevaluation ähnlich wie bei der ASA PS Klassifikation dem Risiko entsprechend die verschiedenen operativen Eingriffe in drei Schweregradkategorien nach der Häufigkeit des Auftretens von kardiovaskulären perioperativen Komplikationen eingeteilt [5]. Tabelle 2 gibt eine Übersicht mit Beispielen zu Eingriffen, nach denen in die einzelnen Risikokategorien unterteilt wird. Das Risiko für rein eingriffsbezogene kardiovaskuläre Komplikationen bis hin zum Versterben liegt dabei je nach Eingriffskategorie unter 1% bis hin zu über 5%. Dies verdeutlicht die separate Outcomerelevanz der Schwere des operativen Traumas im perioperativen Prozess. Das perioperative Gesamtrisiko der Patient\*innen ergibt sich demnach aus dem persönlichen, begleiterkrankungsabhängigen Risiko und dem Eingriffsassoziierten-Risiko, welche sich beide addieren. Um diesem möglichst adäquat zu begegnen, werden anästhesiologische Maßnahmen entsprechend dieses kumulativen Risikos perioperativ geplant und durchgeführt.

**Tabelle 2:** Einteilung chirurgischer Eingriffe und Interventionen bzgl. des perioperativen Risikos für das Auftreten von Myokardinfarkt, Schlaganfall oder kardiovaskulär assoziiertes Versterben (modifiziert nach [5])

Geringes chirurgisches Risiko (< 1%)	Intermediäres chirurgisches Risiko (1 – 5 %)	Hohes chirurgisches Risiko (> 5 %)
Brusteingriffe	Asymptomatische Karotischirurgie	Symptomatisches Karotisstenting
Zahneingriffe	Asymptomatisches Karotisstenting	Aortenchirurgie, große Gefäßchirurgie
Schilddrüsenchirurgie	Symptomatische Karotischirurgie	Nebennierenresektionen
Augeneingriffe	Endovaskuläre Aortenchirurgie	Duodenum-Pankreas Chirurgie
Kleine gynäkologische Eingriffe	Kopf oder Halschirurgie	Leber-/Bilio-duktale Chirurgie
Kleine orthopädische Eingriffe	Intraperitoneale Chirurgie	Ösophagus Resektion
Rekonstruktive Eingriffe	Kleine intrathorakale Chirurgie	Offene Revaskularisierung der unteren Extremitäten (Ischämien/ Amputationen)
Oberflächliche Chirurgie	Neurologische Chirurgie	Pneumektomie (VATS oder offen)
Kleine urologische Eingriffe	Orthopädische Chirurgie	Lungen- oder Lebertransplantation
VATS/kleine Lungenresektionen	Angioplastie peripherer Arterien	Chirurgie bei Hohlorganperforation
	Nierentransplantation	Totale Zystektomie
	Große urologische Eingriffe	
	Große gynäkologische Eingriffe	

## 1.2 Perioperatives Risiko kardiochirurgischer/kardiologischer Eingriffe

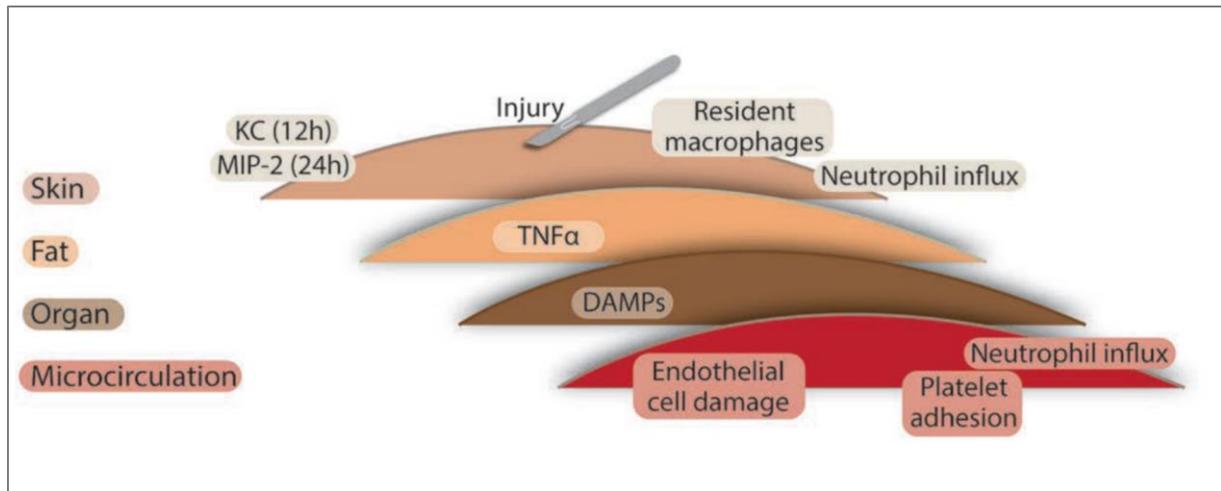
Die Herzchirurgie und katheterbasierte kardiale Interventionen sind bei den vorherig vorgestellten Modellen zur Prädiktion des perioperativen Risikos ausgenommen, da hier die kardiale Pathologie der Grund des Eingriffes ist und sie verfahrensspezifische, zusätzliche perioperative Risiken beinhalten kann. Dementsprechend kann das perioperative Risiko nach eigenen Klassifikationssystemen, wie z.B. dem 1999 etablierten EuroSCORE und 2012 aktualisierten EuroSCORE II, eingeschätzt werden [7, 8]. Folgende Evaluierungen des EuroSCORE Modells zeigten zum einen eine gute Korrelation der vorherigen Risikoeinschätzung mit der tatsächlichen perioperativen Sterblichkeit und zum anderen, dass diese mit 3-11% deutlich über der oben dargestellten perioperativen Sterblichkeit nicht-kardiochirurgischer Eingriffe liegt [7, 9]. Dies verdeutlicht das besondere Risiko, dem Patient\*innen bei kardialen Eingriffen ausgesetzt sind, welches sich aus dem eigentlichen operativen Trauma, der zur Operation führenden Pathologie sowie vorliegenden Begleiterkrankungen und auch notwendiger apparativer Unterstützungssysteme zum Ermöglichen des Eingriffes zusammensetzt. Ein solches Unterstützungssystem ist die Herz-Lungen-Maschine (HLM), mit deren Hilfe bei einem für den Eingriff notwendigen temporären Herzstillstand die Versorgung der weiteren Organe aufrecht gehalten wird. Die HLM, welche als kardiopulmonaler Bypass angelegt wird, übernimmt sowohl die Pumpfunktion des Kreislaufes als auch Oxygenierung und Decarboxylierung des Blutes. Trotz dieser so geschaffenen Möglichkeit der Versorgung der weiteren Organe nimmt der kardiopulmonale Bypass mittels HLM eine besondere Rolle mit eines spezifischen Risiko ein, da er selbst einen perioperativen myokardialen Schaden zu bedingen scheint und auch zu einer gesteigerten Immunreaktion des Organismus führen kann [10, 11].

## 1.3 Perioperative Inflammation

Ein operativer Eingriff triggert eine Akute-Phase-Reaktion, welche in ihrem Ausmaß von der Ausprägung des chirurgischen Eingriffes und der damit notwendigen Gewebeverletzung abhängig ist [12]. Neben dem operative Eingriff führt auch ein Trauma an sich sowie auch eine Infektion zu einer Aktivierung des Immunsystems mit Zellschaden, gestörten Organbarrieren und beeinträchtiger Gerinnungsfunktion [13]. Dies erschwert die Unterscheidung zwischen einer operationsassoziierten Inflammationsreaktion und einer Erreger-induzierten Infektion.

Das Ausmaß des Eingriffes beeinflusst dabei direkt das Ausmaß der Immunreaktion, wobei aber auch bei geringer invasiven Eingriffsarten eine Immunaktivierung festzustellen ist. So zeigen beispielsweise Vergleiche von laparoskopischen mit offenen Eingriffen am Magen eine reduzierte, aber vorhandene Immunaktivierung bei dem weniger invasiven, laparoskopischen Verfahren [14]. Tierexperimentelle Untersuchungen haben dabei gezeigt, dass eine chirurgische Inzision der Haut alleine schon zu einer systemischen und lokalen Inflamationsreaktion durch Chemokinfreisetzung und konsekutiver Neutrophilen-Aktivierung und Infiltration führt [15].

Wie Abbildung 1 verdeutlicht, führt jede Verletzung von Gewebe zu einer Inflamationsreaktion, die von spezifischen Geweben deutlich unterschiedlich ausfallen kann. Zudem existieren organspezifische Unterschiede in der Interaktion mit dem Immunsystem bei Schädigung. So wurden für Leber, Nieren oder Lunge Unterschiede im Ausmaß und auch im Weg der Leukozyten-Rekrutierung und Aktivierung nachgewiesen [16]. Für die Leber wurde beispielsweise im Mausversuch gezeigt, dass es bei einem spezifischen Leberschaden zu einer besonders ausgeprägten Aktivierung neutrophiler Leukozyten kommt [17]. Dabei ist das Ausmaß der Immunaktivierung innerhalb derselben Organart aber nicht zwangsläufig gleich. Dies verdeutlicht eine Arbeit an Patient\*innen mit vergleichbaren Lebereingriffen welche ein unterschiedliches Ausmaß an perioperativer Inflamationsreaktion zeigte. Dieses individuelle Ausmaß der Inflamationsreaktion am selben Organ bei vergleichbaren Eingriffen hat auch eine prognostische Relevanz, da damit einhergehend vermehrte postoperative Komplikationen bei höherem postoperativen oxydativem Stress und erhöhten Interleukinen festgestellt wurden [18]. Diese beispielhaft aufgeführten Untersuchungen bei Leberschädigungen verdeutlichen, dass die perioperative Inflamationsreaktion sowohl durch das Ausmaß des Schadens als auch von der Art des geschädigten Gewebes und Organs beeinflusst wird, darüber hinaus aber von weiteren Faktoren abhängig ist und sich so individuell unterschiedlich auf perioperative Komplikationen und das Patient\*innen-Outcome auswirken kann.

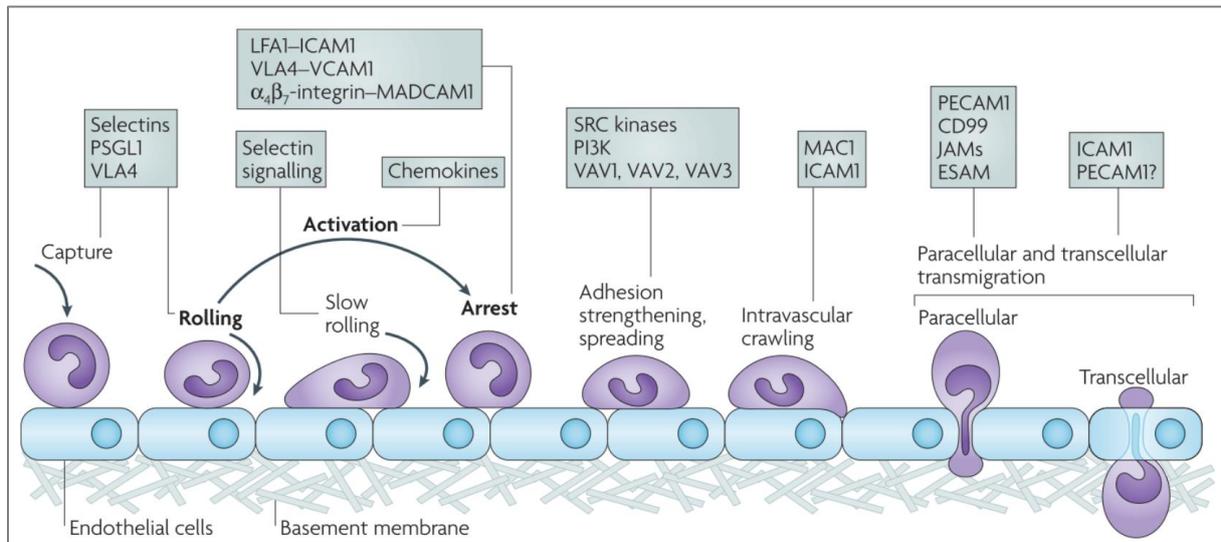


**Abbildung 1:** Durch Haut und tieferem Gewebe bei einer chirurgischen Inzision initiierte Immunreaktion und freigesetzte immunkompetente Zellen. (KC: keratinocyte chemoattractant, MIP: macrophage inflammatory protein, TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor alpha, DAMP: damage associated molecular pattern; Aus [13], mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc., Lizenz Nummer 5555231245235)

Ein zentraler Schritt in der Initiierung und Unterhaltung einer Inflamationsreaktion mit Aktivierung weiterer immunkompetenter Zellen ist die Aktivierung von Leukozyten. Aktivierte Leukozyten können dabei Ausgangspunkt und Mediator weiterer Immunreaktionen sein. Neutrophile Leukozyten können sowohl ihre eigene Immunantwort verstärken und so weitere Leukozyten anlocken und aktivieren als auch einen Organschaden einleiten oder verändern, indem auch potentiell reparative Prozesse an Organen beeinflussen werden [19-21]. Dementsprechend nehmen sie eine zentrale Rolle in der komplexen Inflamationsreaktion ein und können mit den verschiedensten pro- und antiinflammatorischen Mechanismen einen Ansatzpunkt darstellen, therapeutisch regulativ in die Inflamationsreaktion einzugreifen.

Die Aktivierung des Leukozyten kann durch unterschiedliche Stimuli erfolgen. Sie läuft als eine Kaskade von Ereignissen ab, die mit dem Kontakt zu aktiviertem Endothel, welches Selectine exprimiert, beginnt und dadurch den Leukozyten in der Blutbahn beim Endothelkontakt aktiviert. Das Verbleiben des Leukozyten am Endothel nach diesem Kontakt wird als „Capturing“ bezeichnet. Nach dem Capturing rollt der Leukozyt auf der Zelloberfläche und verlangsamt durch die Interaktion mit weiteren zellmembranständigen Rezeptoren seine Rollgeschwindigkeit bis zum völligen Stillstand auf der Endotheloberfläche. Demnach sind ein initial vorliegendes schnelleres Rollen, gefolgt von einem langsameren Rollen bis hin zu einem Arrest auf der Endotheloberfläche weitere Schritte der Leukozytenaktivierung. Diese Schritte werden durch Konformitätsänderungen von zellwandständigen Rezeptoren und deren damit verbundene Zell-Zell Interaktion moduliert. Dem Arrest folgt ein „Crawling“, bei dem der

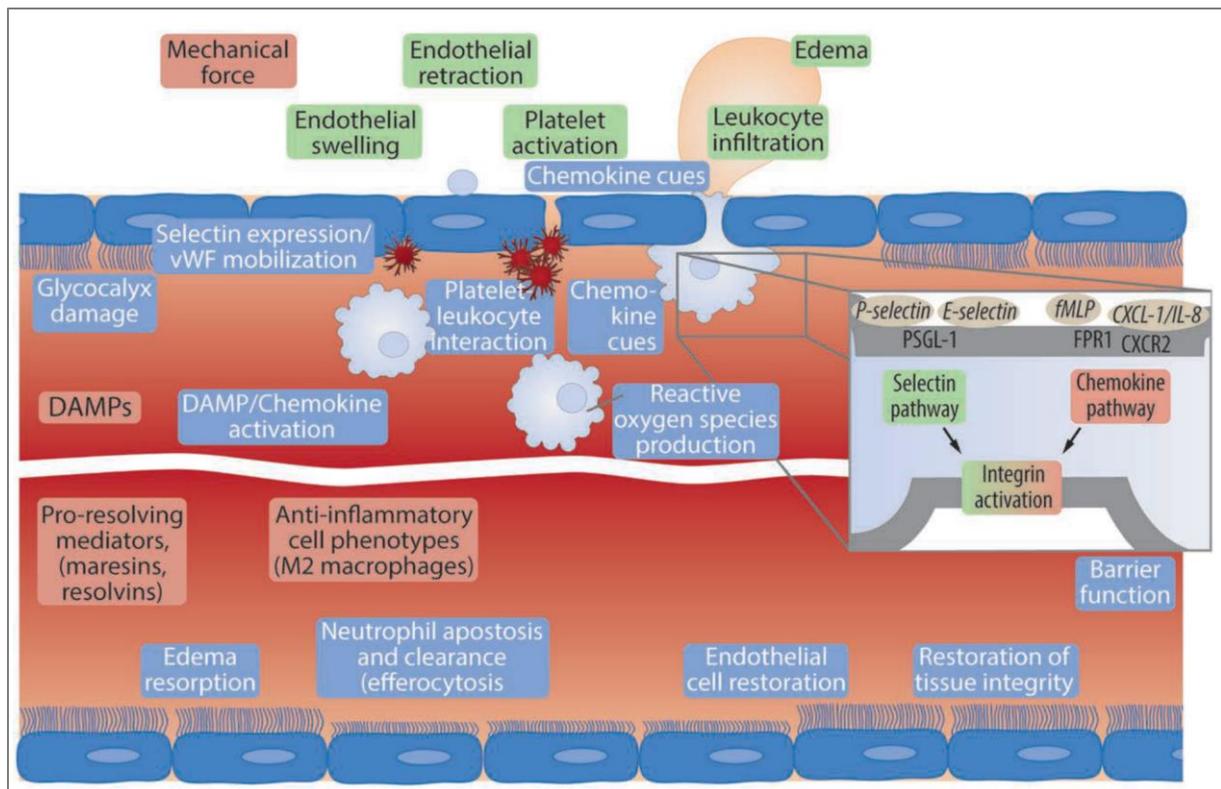
anhaftende Leukozyt durch eine Kriechbewegung entlang des Endothels geeignete Stellen für einen Durchtritt durch das Endothel sucht. Dieser Durchtritt stellt den letzten Schritt der Aktivierungskaskade dar und kann sowohl para- als auch transzellulär durch das Endothel erfolgen [22]. Abbildung 2 verdeutlicht die gesamte Abfolge dieser Schritte mit den dabei involvierten membranständigen Rezeptor-Interaktionen.



**Abbildung 2:** Die einzelnen Schritte der Leukozyten Aktivierungskaskade mit initialem Endothelkontakt, schnellen und langsamen Rollen, Adhäsion, Kriechen und schlussendlich Transmigration. (ESAM: endothelial cell-selective adhesion molecule, ICAM1: intercellular adhesion molecule 1, JAM: junctional adhesion molecule, LFA1: lymphocyte function-associated antigen 1, MAC1: macrophage antigen 1, MADCAM1: mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule 1, PSGL1: P-selectin glycoprotein ligand 1, PECAM1: platelet/endothelial-cell adhesion molecule 1, PI3K: phosphoinositide 3-kinase, VCAM1: vascular cell-adhesion molecule 1, VLA4: very late antigen 4; Aus [22], mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature, Lizenz Number 5554120266992)

Wie schon angedeutet, können die Aktivierungsschritte der Inflammation dabei vielfältig sein. Neben der initialen Aktivierung des Immunsystems durch eine spezifische Einwirkung eines Schadens von „außen“ auf den Organismus kann auch die Inflammationsreaktion selbst zu einem weiteren Schaden führen und sich somit selber unterhalten oder auch andernorts initiieren. Die endotheliale Glykokalyx ist ein weiterer Teil dieser komplexen Zusammenhänge. Sie ist ebenfalls ein Faktor in der Ausprägung der perioperativen Inflammationsreaktion und kann sowohl Ursache als auch Angriffspunkt einer Schädigung sein. Die Glykokalyx befindet sich an der Außenseite der Zelloberfläche und beinhaltet sogenannte DAMPs (damage associated molecular pattern) wie z.B. HMGB-1 (High-Mobility-Group-Protein B1) als Komponenten ihrer Integrität, die bei entsprechender Schädigung freigesetzt werden und eine Inflammationsreaktion auslösen und unterhalten können [23]. Bei Traumapatient\*innen konnte für DAMPs und proinflammatorische Interleukine ein zweigipfliger Peak, einmal direkt nach erfolgtem Trauma und dann zu einem späteren Zeitpunkt ohne weiteres Trauma nachgewiesen werden [24], was die Hypothese einer zweiten, durch das Immunsystem selbst getriggerten Schädigung nach stattgehabtem Gewebetrauma unterstreicht.

Die endotheliale Glykokalyx kann in ihrer Integrität demnach auch unabhängig von einer Zerstörung der zugehörigen Endothelzelle durch Trauma auch durch andere Stimuli beeinflusst werden. Sie ist somit als ein weiterer, separater Modulator der Inflammationsreaktion mit Einfluss auf die Leukozytenaktivierung zu verstehen. Neben der Interaktion zwischen Leukozyten und Glykokalyx und auch zwischen Leukozyten selbst, wird die Inflammationsreaktion noch durch weitere, bei Gewebeschäden typischerweise aktivierte Zellen beeinflusst. So führt eine direkte Interaktion vom ebenfalls durch das Trauma aktivierten Thrombozyten mit Leukozyten zu einer Aktivierung von immunkompetenten Zellen und triggert die weitere Expression von Chemokinen und von proinflammatorischen, wiederum potentiell leukozytenaktivierenden Adhäsionsmolekülen auf der Endotheloberfläche [25, 26]. Die Zusammenhänge dieser Interaktionen zwischen Endothel, Leukozyten, Glykokalyx und Thrombozyten bei einem Gewebeschaden mit den zentralen Mediatoren ihrer Interaktionen sind in Abbildung 3 verdeutlicht.



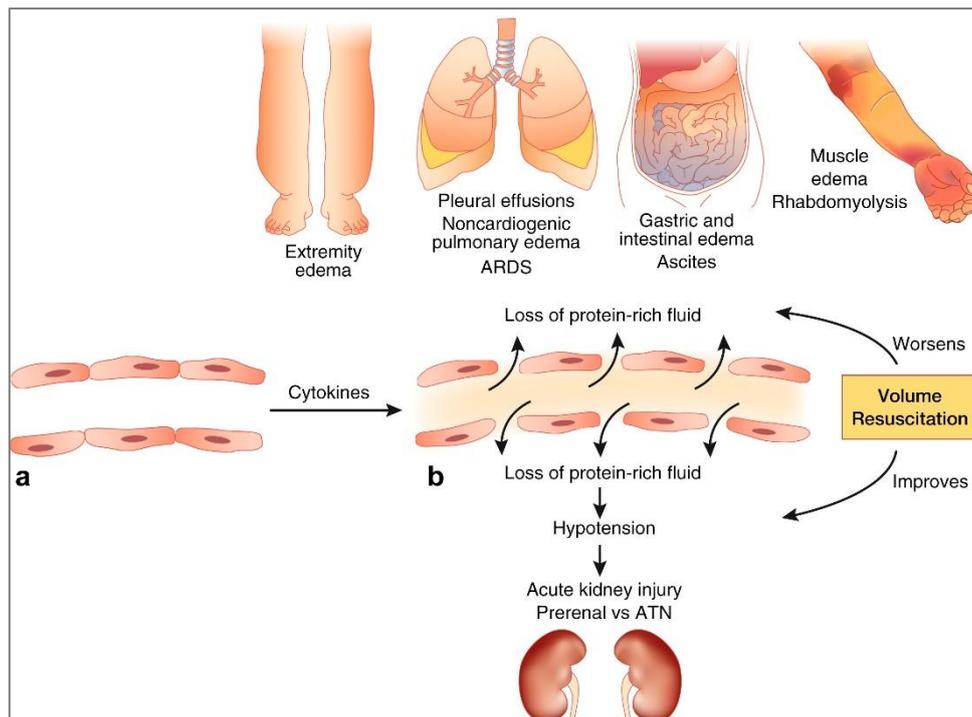
**Abbildung 3:** Auswirkungen des chirurgischen Schadens mit Schädigung der Glycocalyx, Zellschwellung, Verlust der Barrierefunktion, Gerinnungsaktivierung und konsekutiver Ödembildung und Migration von Leukozyten (vWF: von Willebrand Factor, PSGL-1: P-selectin glycoprotein ligand-1, fMLP: N-formyl-methionylleucyl-phenylalanine, CXCL-1: C-X-C motif ligand - 1, CXCR2: CXC-motif chemokine receptor 2, IL8: Interleukin 8; Aus [13], mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc., Lizenz Nummer 5555231245235)

Neben dem chirurgisch induzierten Trauma durch eine direkte und sterile Gewebsverletzung existieren weitere, im operativen Prozess notwendige Maßnahmen, die zu einer Immunaktivierung führen können. Ist es beispielsweise aufgrund des Eingriffes notwendig, einzelne Bereiche des Körpers oder Organsysteme von der Blutzirkulation zu unterbinden, so kann es bei Wiedereröffnen der Durchblutung zu einem Reperfusionssyndrom mit Immunaktivierung und im Extremfall einem sogenannten Zytokinsturm kommen [27]. Diese Immunaktivierung kann dann ihrerseits wieder zu den in Abbildung 3 beschriebenen Mechanismen der Endothelschädigung mit u.a. konsekutivem Kapillarleck aufgrund des Verlustes von endothelialen Verbindungen führen. Diese, auch als endotheliales Leck bezeichnete erhöhte vaskuläre Durchlässigkeit in das umgebende Gewebe kann über verschiedene Mediatoren wie u.a. Interleukine und TNF- $\alpha$  vermittelt sein und sowohl parazellulär als auch transzellulär erfolgen [28, 29].

### 1.3.1 Hämodynamik und Inflammation

Zwischen der perioperativ vorliegenden Hämodynamik der Patient\*innen und der Ausprägung einer Inflammationsreaktion liegen verschiedene, wechselseitige Beziehungen vor. So kann eine nicht ausreichende Hämodynamik im Sinne einer inadäquaten Oxygenierung von Organen und Geweben ein eigener Auslöser einer Organschädigung mit Zelluntergang sein und dadurch die schon vorab beschriebenen Mechanismen der Inflammationsreaktion auslösen. Dieser Zusammenhang mit der Notwendigkeit der perioperativen Aufrechterhaltung einer adäquaten Perfusion und damit Sauerstoffversorgung der Organe ist zwar seit längerem bekannt, stellt aber eine weiterhin vorhandene perioperative Herausforderung dar. Es sind in der Vergangenheit verschiedene Ansätze entwickelt worden, welche versuchen dieses Problem anhand Zielparameter gesteuerter, spezifischer Therapiekonzepte zur Aufrechterhaltung einer adäquaten Hämodynamik (GDT – goal directed therapy) zu adressieren [30-33]. Bislang konnte aber kein spezifisches hämodynamisches Konzept identifiziert werden, welches dieses Ziel sicher erreicht, so dass dies weiterhin Gegenstand der aktuellen wissenschaftlichen Diskussion ist [30, 33].

Ebenso wie eine kompromittierte Hämodynamik zu einer Aktivierung des Immunsystems führen kann, kann eine Inflammationsreaktion die Hämodynamik negativ beeinflussen. So kann eine Inflammationsreaktion sowohl zu einem Flüssigkeitsverlust aus dem Intravasalraum führen als auch die kardiale Funktion direkt beeinflussen und somit über beide Wege separat oder auch kombiniert zu einer verminderten Organperfusion durch beeinflusste Hämodynamik führen. Eine zentrale Rolle nimmt hierbei das Endothel ein, welches auch entsprechend der schon vorab beschriebenen Mechanismen sowohl Ziel der Schädigung als auch Aktivator des Pathomechanismus und somit ein unterhaltender Faktor sein kann [34, 35]. Das immunaktivierte und geschädigte Endothel verringert bzw. verliert seine Barrierefunktion und es kommt durch eine Aufweitung der endothelialen Verbindungen zu einem Flüssigkeitsverlust vom Intravasalraum in das Interstitium und Verlust von osmotisch wirksamen Substanzen, denen wiederum Flüssigkeit folgt [36, 37]. Wie auch Abbildung 4 verdeutlicht, kann dieser Mechanismus über die reine Ödementstehung hinaus zu weiteren Schädigungen von Organen, bis hin zum Multiorganversagen und Versterben führen [35, 37].



**Abbildung 4:** Mögliche Endorganschädigungen durch einen Verlust von osmotisch wirksamen Substanzen aus dem Intravasalraum heraus aufgrund einer inflammatorisch induzierten Herabsetzung der Barrierefunktion des vaskulären Endothels (aus [37], mit freundlicher Genehmigung von Elsevier, Lizenz Nummer 5555250164168)

Zusätzlich zu der Entstehung einer endothelialen Dysfunktion mit ihren beschriebenen Konsequenzen kann eine Immunaktivierung zu einer direkten, sowohl rechts- als auch linksventrikulären kardialen Beeinträchtigung führen, was ebenfalls wieder ein Risiko für eine nicht ausreichende Hämodynamik darstellt und zur weiteren Organ-Minderperfusion mit zusätzlicher Inflammation beitragen kann [38]. Neben weiteren verschiedensten Mechanismen die als potentielle Auslöser der myokardialen Schädigung identifiziert wurden, nimmt hier die Aktivierung von immunkompetenten Zellen und die vermehrte Freisetzung von Zytokinen wie  $\text{TNF-}\alpha$  und proinflammatorischen Interleukinen eine entscheidende Rolle ein [39, 40].

Dementsprechend trägt die Inflamationsreaktion sowohl zu einer intravasalen Hypovolämie als auch Beeinträchtigung der kardialen Funktion bei und kann so das Erreichen einer adäquaten Hämodynamik kompromittieren. Ein Surrogatparameter der perioperativ adäquaten Hämodynamik ist der Blutdruck, welcher während anästhesiologischer oder intensivmedizinischer Behandlung mit einem mittleren arteriellen Druck (MAD) von 60 – 70mmHg als adäquat für eine ausreichende Organperfusion angesehen wird [41]. Dieser Ziel-MAD kann, unter anderem bedingt durch die vorab geschilderten, inflammationsgetriggerten Mechanismen, perioperativ häufig nicht ohne regulierende Maßnahmen erreicht werden. Auch

entsprechend der schon dargestellten GDT-Protokolle sind die dazu durchgeführten therapeutischen Maßnahmen zur Aufrechterhaltung des adäquaten MAD meist eine Volumen- und Katecholaminapplikation. Wie auch schon in Abbildung 4 verdeutlicht wird, kann eine forcierte Volumenzufuhr auch ein Risiko für verschiedenste Organe sein. Neben der Volumenzufuhr ist die vermehrte Nutzung von Vasopressoren, wie beispielsweise Norepinephrin, zum Erreichen eines Ziel MAD perioperativ häufig notwendig. Dabei können aber Vasopressoren, ebenso wie eine Volumenzufuhr, die Organfunktion selber gefährden und damit das gesamte Outcome negativ beeinflussen [42-44]. Auch unabhängig von einer generellen Beeinflussung des Patient\*innen-Überlebens beinhaltet eine Immunaktivierung und eine in diesem Zusammenhang notwendige Vasopressortherapie Risiken für weitere Komplikationen im Behandlungsverlauf, wie beispielsweise ein erhöhtes Auftreten von Anastomoseninsuffizienzen nach Darmchirurgie [45, 46]. Demnach scheint nicht nur die Aufrechterhaltung eines perioperativen Ziel-MAD, sondern auch die dazu verwendeten Maßnahmen relevant zu sein, das Patient\*innen Risiko zu beeinflussen. In diesem Zusammenhang ist zu verstehen, dass zusätzliche wechselseitige Beeinflussungen zwischen dem Immunsystem und dem autonomen Nervensystem existieren und sich beide Systeme gegenseitig, unter anderem durch Zytokine und Bindung von Neurotransmittern an immunkompetenten Zellen, aktivieren können [47]. In dieser Interaktion beider Systeme spielen Katecholamine eine zentrale Rolle. Sie sind sowohl endogene Neurotransmitter auch als Therapeutika, die zur Aufrechterhaltung des adäquaten MAD eingesetzt werden [47, 48]. Norepinephrin ist ein zentraler Neurotransmitter des autonomen Nervensystems und ein häufig genutztes und empfohlenes Katecholamin in hämodynamisch instabilen Situationen und ist darüber hinaus in der Lage, die Leukozytenfunktion direkt zu beeinflussen [49]. Insgesamt können Katecholamine sowohl potentiell positive als auch negative inflammatorische Effekte auslösen und es fehlen bislang Strategien zu Alternativen oder der optimalen Art und Menge der Anwendung in der kritischen Erkrankung [48].

In Zusammenschau existierten demnach verschiedene Interaktionen zwischen Inflammation und Hämodynamik sowie dem autonomen Nervensystem und Katecholaminen, welche bislang nicht ausreichend verstanden sind. Da aktuell sichere Strategien fehlen, diese Wechselwirkungen perioperativ positiv zu beeinflussen, erscheint es sinnvoll im Sinne einer risikominimierenden Strategie, perioperative Behandlungskonzepte zu entwickeln und anzuwenden, die diese einzelnen Systeme und damit die Interaktionen insgesamt so wenig wie möglich aktivieren.

### 1.3.2 Respiration und Inflammation

Neben den vorab dargestellten hämodynamischen Komplikationen besteht perioperativ auch ein Risiko für pulmonale Komplikationen, welche in verschiedenen Ausprägungen auftreten und ebenfalls die perioperative Morbidität erhöhen sowie die Gesamtsterblichkeit negativ beeinflussen können [50, 51]. Pulmonale Komplikationen treten dabei in einer Gesamthäufigkeit von ungefähr 6-7% bei nicht-kardiochirurgischen Eingriffen auf und sind ebenso wie die kardialen Komplikationen von verschiedenen Risikofaktoren abhängig, wie u.a. Begleiterkrankungen und Eingriffsschwere [52, 53]. Ist eine Allgemeinanästhesie für die Durchführung eines chirurgischen Eingriffes notwendig, so ist meist eine mechanische, invasive Ventilation unumgänglich. Hierbei sind das Patientenalter und auch die Dauer der Anästhesie sowie weiteren, insbesondere die individuellen Vorerkrankungen betreffenden Faktoren, Risiken für postoperative pulmonale Komplikationen [54, 55]. Die mechanische Ventilation stellt selber ebenfalls ein Risiko für einen beatmungsassoziierten Lungenschaden (VILI – Ventilator Induced Lung Injury) als perioperative Komplikation dar [56]. Sowohl VILI als auch weitere perioperative pulmonale Komplikationen wie Aspiration, Pneumonie oder Atelektasenbildung können in ihrem Schweregrad und ihrer Ausprägung bis hin zum akuten Lungenversagen (ARDS - acute respiratory distress syndrome) führen [54, 57].

Perioperative pulmonale Komplikationen können potentiell pulmonales Gewebe schädigen und so ebenfalls wieder eine Inflamationsreaktion auslösen. Neben den durch infektiologische Ursachen hervorgerufenen perioperativen pulmonalen Komplikationen, wie z.B. der Pneumonie, sind auch nicht-infektiologische, perioperativ entstehende pulmonale Komplikationen dazu in der Lage. So scheint beispielsweise das dem VILI zugrunde liegende mechanische Trauma des pulmonalen Gewebes weitere Organdysfunktionen außerhalb der Lunge zu verursachen [58]. Ein möglicher Mechanismus ist dabei eine durch den Respiatorhub ausgelöste mechanische Schädigung, die sowohl zu einer inflammatorischen Aktivierung der alveolarseitigen als auch kapillarseitigen Zellen führt, konsekutiv proinflammatorische Zytokinen freisetzt und Leukozyten aktiviert [56, 59]. Entsprechend der schon oben beschriebenen Mechanismen (1.3) kann sich diese Aktivierung dann selber unterhalten und zu einer weiteren Schädigung der Lunge, sowie durch die zerstörte endotheliale Barriere und systemische Inflamationsreaktion zur Schädigung weiterer Organe, bis hin zum Multiorganversagen führen [60].

Entsprechend der schon dargestellten Komplexität der Aktivierungskaskade fehlt bislang ein ausreichendes Verständnis aller relevanter, wechselseitiger Signalwege in dem Zusammenhang zwischen Inflammation und Lungenschaden mit konsekutivem

Multiorganschaden. Erst wenn etablierte perioperative Strategien vorliegen, die Signalwege so zu beeinflussen, dass es trotz vorhandener Noxe zu keiner inflammatorisch assoziierten weiteren Organschädigung kommt, wäre dieses perioperative Risiko entsprechend adressiert. Auch hier scheint es sinnvoll das inflammationsassoziierte Risiko zu reduzieren in dem Behandlungsstrategien etabliert werden, die regulierend in diese Signalwege eingreifen oder die auslösende Noxe möglichst vermeiden.

### 1.3.3 Perioperative Inflammation durch Erreger

Im Gegensatz zu den bislang dargestellten erregerunabhängigen Wegen der Inflammation können die Patient\*innen zusätzlich durch perioperativ vorliegende Infektionen und eine dadurch stattfindende weitere Aktivierung des Immunsystems gefährdet sein. Eine maximale Ausprägung einer erregerassoziierten Inflammationsreaktion ist die Sepsis, welche perioperativ neu auftreten oder bei unvermeidbaren Operationen bereits zeitgleich vorliegen kann.

Die Sepsis ist in ihrer aktuellen Definition beschrieben als eine lebensbedrohliche Organdysfunktion, verursacht durch eine dysregulierte Immunantwort des Organismus auf eine Infektion [61]. Trotz der nun schon in der dritten Version vorliegenden Definition und einer seit Jahrzehnten bekannten Relevanz des Erkrankungsbildes hat sich die Sterblichkeit in an der Sepsis in den letzten Jahren nur gering positiv verändert und weist mit über 30% eine hohe 90 Tages-Sterblichkeit auf [62]. In der schwersten Form der Sepsis, dem septischen Schock, welche als eine Sepsis mit anhaltender Hypotonie und Laktatanstieg definiert ist, steigt die Sterblichkeit noch deutlich an und liegt in aktuellen Untersuchungen bei 40% und höher [61-63]. Die pathophysiologische Grundlage des septischen Krankheitsgeschehens bildet eine unkontrollierte proinflammatorische Reaktion [64]. Diese, auch als Systemisches Inflammation Response Syndrom (SIRS) beschriebene Reaktion erfolgt über eine u.a. DAMP vermittelte Zytokin und Komplementaktivierung mit wechselseitiger Beeinflussung des Immun- und Gerinnungssystems und kann sich, einmal begonnen, selbst unterhalten und verstärken [65]. Ein Bestandteil dieser Reaktion ist die im vorherigen Abschnitt (1.3) beschriebene Selectin vermittelte Aktivierung des Leukozyten, welche möglicherweise auch Einfluss auf die Schwere der Ausprägung des septischen Krankheitsverlaufes bis hin zum Entstehen eines septischen Schock haben kann [66]. Norepinephrin ist dabei das Katecholamin der Wahl zur Stabilisierung der Hämodynamik in der Sepsis und insbesondere im septischen Schock [67]. Entsprechend der schon dargestellten Wechselwirkungen (1.3.1) können demnach auch die empfohlenen und notwendigen therapeutischen Maßnahmen bei der Sepsis zu einer weiteren Beeinflussung der Inflammationsreaktion führen.

Unterschiedliche Erreger können dabei auf unterschiedlichen Wegen Einfluss auf die Inflamationsreaktion nehmen. Trotzdem ist ihnen aber der schlussendliche Mechanismus der Inflamationssteigerung im Falle eines Organschadens als ein möglicher Mediator weiterer Organschädigung gemeinsam. Im Gegensatz zur häufig bakteriell induzierten Sepsis ist das SARS-CoV-2 induzierte ARDS ein Beispiel für eine primär viral verursachte Infektion, welche ebenfalls über die Beeinflussung des Immunsystems zu Endorganschäden und Versterben führen kann [68, 69]. Als möglicher Pathomechanismus für diese Schädigungen ist ebenfalls eine Zytokinsturm-artige Aktivierung von Interleukinen und weiteren proinflammatorischen Faktoren identifiziert worden [70, 71]. Für diese Erkrankung wurde eine perioperativ erhöhte Mortalität nachgewiesen, die über den Zeitraum des eigentlichen Vorliegens aktiver Erreger hinaus geht [72]. Hier kann eine, über das Vorhandensein des eigentlichen Erregers hinaus unterhaltende Inflamationsreaktion als eine mögliche Ursache hypothetisiert werden. Gemeinsam ist allen perioperativ vorhandenen erregerassoziierten Inflamationsreaktionen, dass sie schon zum Zeitpunkt des Eingriffes vorliegen und somit Strategien zur Vermeidung der Noxe im Falle zwingen notwendiger Eingriffe nicht sinnvoll anwendbar sein können. Demnach sollten in diesen Fällen Strategien zur Modulation der schon vorhandenen Inflamationsreaktion erarbeitet werden. Zudem sollten Verfahren etabliert werden, den Erkrankungsverlauf mit assoziierten Risiken adäquat zu Monitoren um möglichst frühzeitig therapeutisch eingreifen zu können.

Zusammenfassend zeigen diese hier dargestellten Entstehungswege der unterschiedlichen Organdysfunktionen den zentralen Stellenwert der Inflamationsreaktion als perioperativen Risikofaktor. Dabei kann die Inflamationsreaktion durch Maßnahmen während eines notwendigen Eingriffes „steril“ ausgelöst werden oder aufgrund einer bestehenden Infektion schon verkomplizierend zum Eingriff vorliegen. In diesem Zusammenhang stellen potentielle Beeinträchtigungen der Respiration sowie Hämodynamik, welche durch eine invasive Beatmung, intravasalen Flüssigkeitsverlust oder auch durch eine kardiale Funktionsbeeinflussung ausgelöst sein können, weitere perioperative Risikofaktoren für Organdysfunktionen dar. Diese können ebenfalls selbst durch eine Inflamationsreaktion hervorgerufen oder auch in ihrer Ausprägung gesteigert werden. Demnach ist die perioperative Inflamationsreaktion ein relevanter Ansatzpunkt, das perioperative Risiko für Patient\*innen zukünftig durch Modulation dieser Reaktion oder Maßnahmen zur Vermeidung der Entstehung, zu reduzieren.

## 1.4 Perioperatives Risiko und Kompetenz

Die adäquate Durchführung einer ärztlichen Maßnahme erfordert ein hohes Maß an Kompetenz. Diese notwendige Kompetenz beinhaltet theoretisches Wissen und praktische Fähigkeiten zur spezifisch durchzuführenden Maßnahme und darüber hinaus auch hohe Fähigkeiten in Kommunikation und Management [73]. Dies gilt nicht nur für einzelne Maßnahmen, sondern auch für das Etablieren und Umsetzen komplexer, mitunter multiprofessioneller Behandlungspfade, wie es beispielsweise die schon dargestellten GDT-Strategien sind. Dementsprechend erscheint es logisch, dass das Risiko für perioperative Komplikationen und ein schlechteres Behandlungsergebnis bei komplexen chirurgischen und auch anästhesiologischen Maßnahmen von der Kompetenz der Behandelnden abhängig ist, was auch jüngere Arbeiten bestätigt haben [74-76]. Dabei ist es relevant, dass eine hohe Kompetenz nicht allein durch eine Anzahl an Berufsjahren zu erlangt ist. So geben ältere Arbeiten Hinweise darauf, dass weiter fortgeschrittene Berufsjahre nicht zwangsläufig zu einer Verbesserung der Behandlungsergebnisse führen, sondern das Gegenteil der Fall sein kann [77]. Ein Erklärungsansatz für diese Veränderung über die Zeit ist, dass Behandlungsverfahren und auch das Wissen um Erkrankungen sich ständig weiterentwickeln und somit auch ein kontinuierliches weiteres Lernen der Behandelnden erforderlich ist. Diesen Erkenntnissen folgend, sind in der Vergangenheit Programme und auch die Pflicht zur kontinuierlichen berufsbegleitenden Fortbildung geschaffen worden und konnten positive Effekte auf die Patientenbehandlung nachweisen [78].

Dementsprechend kann zusammengefasst werden, dass insb. bei komplexen Behandlungen die individuelle Kompetenz der Behandelnden abhängig von entsprechenden Fortbildungen und Trainings in den spezifischen medizinischen Bereichen ist und eine reine Anzahl an Berufsjahren solche Kompetenzen weniger hervorbringt. Daher sollten Strategien im Sinne einer perioperativen Risikoreduktion sowohl das theoretische als auch praktische Training der Behandelnden mit einbinden und ebenso nicht originär fachliche Fähigkeiten, wie Kommunikation- und Teamfähigkeiten mit einschließen, umso das perioperative Ergebnis bestmöglich zu verbessern.

## 1.5 Problemstellung und wissenschaftliche Zielsetzung

Aufgrund behandlungsbedürftiger Pathologien sind oftmals operative Eingriffe notwendig. Um diese Eingriffe zu ermöglichen, sind anästhesiologische Maßnahmen in der perioperativen Phase notwendig. Dabei sind die Patient\*innen Risiken für Organschäden ausgesetzt, welche durch die für den Eingriff notwendigen Maßnahmen beeinflusst werden. Das Risiko dieser Organschädigung wird maßgeblich durch das Vorhandensein und die Ausprägung einer perioperativen Inflammationsreaktion beeinflusst, die direkt durch das operative Trauma aber auch durch anästhesiologische Maßnahmen, wie eine invasive Beatmung, hervorgerufen und beeinflusst werden kann. Unabhängig von diesen Entstehungsmechanismen kann perioperativ auch eine Inflammation durch eine schon bestehende Infektion zum Zeitpunkt des notwendigen Eingriffes vorliegen. Demnach ist das gesamte Ausmaß einer perioperativen Inflammationsreaktion und der damit einhergehenden Organschädigungen ein Risiko, das Patient\*innen-Outcome negativ zu beeinflussen.

**Die in dieser Zusammenfassung dargestellten wissenschaftlichen Arbeiten sind mit der Idee entstanden, das perioperative Patient\*innen Risiko insbesondere im Hinblick auf inflammationsinduzierte perioperative Organschädigungen zu reduzieren. Dazu sollen spezifische Signalwege der unvermeidbaren perioperativen Inflammation, mit möglichen Ansätzen hier regulierend einzugreifen, sowie Methoden zur Vermeidung oder Verminderung der Entstehung einer Inflammationsreaktion oder deren Organkomplikationen untersucht werden.**

Die perioperative Inflammationsreaktion wird auf verschiedenen Wegen wechselseitig beeinflusst. Sie kann durch kardiale und vaskuläre Beeinträchtigungen zu einer instabilen Hämodynamik führen. Sie kann auch selbst durch eine instabile Hämodynamik oder Organschäden ausgelöst werden und sich selber unterhalten oder verstärken. Operative Ansätze, die perioperative Inflammationsreaktion zu reduzieren zielen darauf ab, das operative Trauma als Noxe der Inflammationsreaktion zu reduzieren. So führte die Etablierung weniger invasiver Verfahren bis hin zur aktuellen roboterassistierten Chirurgie zu einer Reduktion der perioperativen Inflammation, können diese aber nicht gänzlich verhindern [79, 80]. Zudem ermöglicht die Entwicklung neuer, „schonender“ operativer Verfahren auch den Einsatz bei immer älteren und multimorbideren Patient\*innen, was wieder neue Risiken mit sich bringt.

Gleiches gilt für anästhesiologische Verfahren, die ebenfalls eine Tendenz zur geringeren Beeinflussung der Patientenhomöostase zeigen, aber analog des immer älter werdenden operativen Patientenkollektives ebenso für immer ältere und vermehrt begleiterkrankte Patient\*innen mit entsprechendem hämodynamischen und pulmonalen Risiko angeboten werden [81].

Daher sind im Sinne des spezifischen Fokus dieser Arbeit perioperative anästhesiologische Maßnahmen zu untersuchen und zu implementieren, die den spezifischen operativen Eingriff ermöglichen, dabei aber die perioperative Inflammationsreaktion so gering wie möglich aktivieren oder sogar in der Lage sind, diese zu reduzieren. Dies gilt sowohl für eine perioperativ induzierte als auch für eine perioperativ schon vorliegende Inflammationsreaktion. Um dies zu erreichen, ist ein besseres pathophysiologisches Verständnis der auslösenden und unterhaltenen Mechanismen der Inflammationsreaktion notwendig. So können Ansatzpunkte identifiziert und getestet werden, um hier positiv regulatorisch einzugreifen. Zudem ist es notwendig, weniger hämodynamische, pulmonale oder inflammatorische Noxen setzende Verfahren als Alternativen zu bisherigen anästhesiologischen Verfahren zu untersuchen und zu etablieren. Über die Strategie der direkten Beeinflussung der Inflammationsreaktion hinaus sind Monitoringverfahren zu etablieren, die potentielle Organkomplikationen der Inflammation möglichst frühzeitig detektieren, um diese somit auch frühzeitig behandeln zu können. Neben der Entwicklung solcher Verfahren bedarf es entsprechender Trainingsstrategien zur breiten Anwendung in der klinischen Praxis, um das Risiko auch im Behandlungsalltag entsprechend zu reduzieren.

Mit der hier vorliegenden Arbeit soll demnach langfristig die Basis für eine Verbesserung der perioperativen Versorgung im Sinne einer Reduktion des Patient\*innen-Risikos durch die Untersuchung von möglichen Wegen und Maßnahmen zur Reduktion der perioperativen Inflammationsreaktion und Organschäden gesetzt werden.

## 2 Eigene Arbeiten

### 2.1 Originalarbeit 1: Der kardiopulmonale Bypass mittels Herz-Lungen-Maschine beeinflusst die Leukozytenaktivierung bei herzchirurgischen Eingriffen

Rossaint J\*, **Berger C\***, Van Aken H, Scheld HH, Zahn PK, Rukosujew A, Zarbock A. Cardiopulmonary bypass during cardiac surgery modulates systemic inflammation by affecting different steps of the leukocyte recruitment cascade. PLoS One. 2012;7(9):e45738. doi: 10.1371/journal.pone.0045738.

Ziel dieser prospektiv durchgeführten Arbeit war es, den Einfluss der Herz-Lungen Maschine (HLM) bei kardiochirurgischen Eingriffen auf einzelne Phasen der Aktivierungskaskade neutrophiler Leukozyten als Teil der Inflammationsreaktion zu untersuchen.

Der kardiopulmonale Bypass mittels HLM wird bei kardialen Eingriffen angewendet, um eine Perfusion des Organismus ohne funktionellen Herzschlag zu ermöglichen und so verbesserte Operationsbedingungen am Herz zu schaffen. Diese Technik ist 1953 erstmalig erfolgreich genutzt worden und zeigte im Verlauf der weiteren Jahre, dass sie neben den verbesserten operativen Bedingungen auch potentiell negative Begleiteffekte, wie eine Aktivierung des Immunsystems hat [82, 83]. Ältere Arbeiten haben einen HLM-assoziierten Anstieg verschiedener proinflammatorischer Mediatoren mit genereller Aktivierung von Endothelzellen und Leukozyten nachgewiesen [11]. Es war aber unklar, ob die HLM zu spezifischen Veränderungen in einzelnen Schritten der Leukozyten-Aktivierung führt. Verschiedenste pharmakologische Therapieansätze wurden in der Vergangenheit untersucht, diese assoziierte Inflammationsreaktion insgesamt zu vermindern, ohne dabei eine eindeutig vorteilhafte Maßnahme zu identifizieren [84]. Aufgrund der anhaltenden Problematik und weiterer, damit potentiell auch assoziierter outcomerelevanter Beeinträchtigungen von Organsystemen bei HLM-Anwendung, wurde als eine mögliche Lösungsstrategie bei einem Teil der kardialen Eingriffe wieder zum eigentlich älteren Verfahren, der off-pump Herzchirurgie gewechselt [10, 83, 85]. Da aber nicht jede kardiale Pathologie ohne HLM behandelt werden kann, ist eine komplette Abkehr im klinischen Alltag nicht möglich.

Basierend auf dieser Ausgangslage wurde der Mechanismus der leukozytären Aktivierung während intraoperativer HLM-Anwendung bei kardiochirurgischen Eingriffen untersucht. Ein

besseres Verständnis dieses Mechanismus und seiner Signalwege kann möglicherweise zu spezifischen und damit besseren Therapieansätzen zur Reduktion der HLM-assoziierten Inflammationsreaktion führen. Um zwischen operativen als auch anästhesiologischen Einflüssen und dem direkten Einfluss der HLM auf den Leukozyten zu unterscheiden, wurden Patienten mit HLM bei herzchirurgischen Eingriffen mit sowohl off-pump Eingriffen als auch gesunden Probanden prospektiv verglichen. Diese Untersuchungen fanden an sowohl vor und während der HLM-Phase, als auch postoperativ, 24h nach beendeter HLM-Phase abgenommenen Patient\*innenblut statt. Als Ansatzpunkt dafür diente die schon in der Einleitung dargestellte Aktivierungskaskade des Leukozyten mit E-Selectin, P-Selectin und ICAM-1 vermittelte Aktivierung und Bindung an das Endothel mit den entsprechenden, auf der Leukozytenoberfläche exprimierten Rezeptoren [22, 86]. Die einzelnen Aktivierungsschritte Rollgeschwindigkeit, Arrest sowie Transmigration wurden mittels beschichteter Flusskammerkapillaren und Endothelzellen von Nabelschnurvenen untersucht [87, 88]. Zur möglichen Ursachenfindung bei detektierten Effekten wurde zusätzlich die Oberflächenexpression der leukozytären Adhäsionsmoleküle (PSGL1, LFA1, MAC1) mittels fluoreszenzaktivierter Flusszytometrie quantifiziert und sowie die Aktivierung einzelner in einer vorherigen Arbeit der Arbeitsgruppe identifizierten, an der intrazellulären Signalkaskade zur Aktivierung des Leukozyten beteiligten Enzyme (PLC $\gamma$ 2, p38 MAPK und Akt) mittels Western Blotting untersucht [89].

Als Ergebnis konnte mit diesem Untersuchungsansatz zusammenfassend gezeigt werden, dass während der HLM-Phase bei herzchirurgischen Eingriffen das langsame Rollen als Schritt der Leukozytenaktivierung aufgehoben ist, zusätzlich aber die Menge an adhärenen und transmigrierenden Leukozyten im Vergleich zu gesunden Probanden und off-pump operierten Patient\*innen, im Sinne einer vermehrten Aktivierung, erhöht ist. Dieser Effekt hielt auch noch 24h nach HLM-Ende an. Eine durch die HLM verursachte Verminderung der im aktiven Stadium vorliegenden, am langsamen Rollen beteiligten intrazellulären Enzyme PLC $\gamma$ 2, p38 MAPK und Akt sowie eine erhöhte MAC1 Oberflächenexpression als Mediator der Adhäsion und Transmigration, konnten als mögliche Mechanismen der veränderten Aktivierung identifiziert werden.

# Cardiopulmonary Bypass during Cardiac Surgery Modulates Systemic Inflammation by Affecting Different Steps of the Leukocyte Recruitment Cascade

Jan Rossaint<sup>1</sup>, Christian Berger<sup>1</sup>, Hugo Van Aken<sup>2</sup>, Hans H. Scheld<sup>3</sup>, Peter K. Zahn<sup>4</sup>, Andreas Rukosujew<sup>5</sup>, Alexander Zarbock<sup>6\*</sup>

**1** Department of Anesthesiology, Intensive Care and Pain Medicine, University Hospital Münster, Münster, Germany, **2** Department of Anesthesiology, Intensive Care and Pain Medicine, University Hospital Münster, Münster, Germany, **3** Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, University Hospital Münster, Münster, Germany, **4** Department of Anesthesiology, Intensive Care Medicine, Palliative Care Medicine and Pain Management, University Hospital Bergmannsheil Bochum, Bochum, Germany, **5** Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, University Hospital Münster, Münster, Germany, **6** Department of Anesthesiology, Intensive Care and Pain Medicine, University Hospital Münster, Münster, Germany

## Abstract

**Background:** It is known that the use of a cardiopulmonary bypass (CPB) during cardiac surgery leads to leukocyte activation and may, among other causes, induce organ dysfunction due to increased leukocyte recruitment into different organs. Leukocyte extravasation occurs in a cascade-like fashion, including capturing, rolling, adhesion, and transmigration. However, the molecular mechanisms of increased leukocyte recruitment caused by CPB are not known. This clinical study was undertaken in order to investigate which steps of the leukocyte recruitment cascade are affected by the systemic inflammation during CPB.

**Methods:** We investigated the effects of CPB on the different steps of the leukocyte recruitment cascade in whole blood from healthy volunteers (n=9) and patients undergoing cardiac surgery with the use of cardiopulmonary bypass (n=7) or in off-pump coronary artery bypass-technique (OPCAB, n=9) by using flow chamber experiments, transmigration assays, and biochemical analysis.

**Results:** CPB abrogated selectin-induced slow leukocyte rolling on E-selectin/ICAM-1 and P-selectin/ICAM-1. In contrast, chemokine-induced arrest and transmigration was significantly increased by CPB. Mechanistically, the abolishment of slow leukocyte rolling was due to disturbances in intracellular signaling with reduced phosphorylation of phospholipase C (PLC)  $\gamma$ 2, Akt, and p38 MAP kinase. Furthermore, CPB induced an elevated transmigration which was caused by upregulation of Mac-1 on neutrophils.

**Conclusion:** These data suggest that CPB abrogates selectin-mediated slow leukocyte rolling by disturbing intracellular signaling, but that the clinically observed increased leukocyte recruitment caused by CPB is due to increased chemokine-induced arrest and transmigration. A better understanding of the underlying molecular mechanisms causing systemic inflammation after CPB may aid in the development of new therapeutic approaches.

**Citation:** Rossaint J, Berger C, Van Aken H, Scheld HH, Zahn PK, et al. (2012) Cardiopulmonary Bypass during Cardiac Surgery Modulates Systemic Inflammation by Affecting Different Steps of the Leukocyte Recruitment Cascade. PLoS ONE 7(9): e45738. doi:10.1371/journal.pone.0045738

**Editor:** Christian Schulz, Heart Center Munich, Germany

**Received:** June 23, 2012; **Accepted:** August 24, 2012; **Published:** September 19, 2012

**Copyright:** © 2012 Rossaint et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This study was funded by the DFG ("Deutsche Forschungsgemeinschaft"). The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: zarbock@uni-muenster.de

## Introduction

Cardiopulmonary bypass (CPB) triggers a systemic inflammation which is caused by an increase in the blood concentration of inflammatory markers and activation of immune cells [1,2]. Organ dysfunction is attributed to a multitude of factors involving a cascade of inflammatory responses culminating in the inappropriate recruitment of leukocytes from the circulation [3]. Cellular indicators of inflammation include neutrophil activation and can be detected by measuring release of inflammatory cytokines as well as upregulation and release of adhesion molecules [4]. Increased blood cytokine concentrations and neutrophil

activation are reported in acute complications after CPB [5]. Experimental and clinical studies implicate the activation of neutrophils in both acute and chronic vascular complications [6,7,8,9].

Various treatment strategies have been tested to reduce the severity of the systemic inflammation induced by CPB and to improve the treatment, including anti-inflammatory drugs, novel components of the CPB, and new surgical techniques, but no single strategy has been proven effective yet [10,11].

Leukocyte adhesion constitutes an essential process in the immune system, one that enables the accumulation of immune

cells at sites of infection and inflammation [12]. Leukocyte recruitment occurs in a cascade of events that involves a series of adhesion and homing receptors [12]. In order to leave the vessel at sites of tissue damage or inflammation, leukocytes have to interact with and roll along the endothelium before they arrest and transmigrate into inflamed tissue [12]. Leukocyte capturing and rolling is mediated by selectins expressed on inflamed endothelial cells and their counter-receptors on neutrophils [13]. Slow rolling and arrest is predominantly mediated by integrins interacting with their ligands expressed on endothelial cells [14]. Integrins are members of a large family of functionally conserved adhesion receptors, which occur in low affinity conformational states on circulating leukocytes [15]. During rolling, leukocytes collect different inflammatory signals that activate intracellular signaling pathways [16]. Selectin engagement activates a signaling pathway in neutrophils causing the conformational change of integrins and the initiation of slow rolling [17]. This signaling pathway consists of the signaling molecules phospholipase (PLC)  $\gamma$ 2, p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK), and Akt [18]. The binding of chemokines to their receptors induces the activation of signaling pathways in leukocytes which activates integrins (high affinity state) and induces leukocyte arrest [19]. Following arrest, integrins bound to their ligands transduce signals into leukocytes, which strengthen adhesion and induce transmigration.

The aim of this study was to elucidate how the CPB during cardiac surgery alters the different steps of the leukocyte recruitment cascade. By using flow chamber assays with human whole blood samples, *in vitro* transmigration assays, and biochemical phosphorylation experiments, we demonstrate that CPB during cardiac surgery abolishes selectin-mediated slow leukocyte rolling by altering intracellular signaling including the phosphorylation of PLC $\gamma$ 2, Akt, and p38 MAPK while increasing chemokine-induced arrest and transmigration of neutrophils.

## Materials and Methods

### Reagents

Unlike otherwise stated, all reagents were obtained from Sigma Aldrich (Taufkirchen, Germany).

### Observational study

To investigate the effects of CPB on the different steps of leukocyte recruitment, we conducted a prospective observational study in patients undergoing cardiac surgery for bypass grafting. This study was approved by the local ethic committee of the University of Münster (Institutional Review Board). Informed written consent for inclusion into the study was obtained from every patient more than 24 hours before enrollment. Patients received cardiac surgery for bypass grafting and were scheduled either for operation with the use of CPB (on-pump group) or surgery in off-pump coronary artery bypass-technique (OPCAB group). Two experienced, skilled cardiac surgeons were involved in this study and all on-pump and OPCAB patients were operated by these surgeons. The decision regarding the operation technique (on-pump or OPCAB) was only made by the surgeons based on the planned positions of the bypass grafts and overall patient status. 25 patients (7 on-pump, 9 OPCAB, 9 healthy volunteers) were included in this study and analyzed. The patients in both groups received the same anesthesia regimen with sodium thiopental, sufentanil, and cisatracurium for induction of anesthesia and sevoflurane or isoflurane to maintain general anesthesia. Blood samples were obtained after the induction of general anesthesia, immediately following protamine administration (on-pump and OPCAB), and 24 hours after the end of the surgical

procedure. Healthy volunteers did not receive anesthesia or any type of surgery and donated whole blood samples at the corresponding time points. Patients were excluded from the study if they met one of the following exclusion criteria: age <18 years, pregnancy, immunosuppressive therapy within the last 7 days, chronic renal insufficiency (eGFR <60 ml/min), renal replacement therapy, pre-existing hematologic diseases and/or HIV-infection, acute or chronic inflammatory condition, organ transplantation or any malignancy in patient medical history.

### Blood-perfused human microflow chamber

To investigate selectin-mediated slow neutrophil rolling, we used a whole blood perfused human microflow chamber system as described previously [20,21]. Briefly, glass capillaries were coated with E-selectin (3.5  $\mu$ g/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), P-selectin (20  $\mu$ g/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), E-selectin/ICAM-1 (3.5/3.5  $\mu$ g/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) or P-selectin/ICAM-1 (20/5  $\mu$ g/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) for 2 hours. Chambers were blocked with casein 1% (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 1 hour and afterwards perfused with heparinised whole blood samples at a constant shear stress of 5–6 dynes/cm<sup>2</sup>. It has been demonstrated before, that >90% of rolling cells in this system are polymorphonuclear neutrophils [20]. To investigate the chemokine-induced arrest of rolling neutrophils, a separate set of flow chambers was used. This flow chambers were coated with P-selectin (20  $\mu$ g/ml), ICAM-1 (5  $\mu$ g/ml) and Interleukin-8 (50  $\mu$ g/ml, Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) or P-selectin and ICAM-1 as a control. Rolling and adhering cells per field of view were counted after 2 minutes of perfusion with whole blood at 5–6 dynes/cm<sup>2</sup> and the ratio of adhering to rolling cells was calculated.

### *In vitro* transmigration assay

The transendothelial migration of isolated human neutrophils through a monolayer of cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) was performed as previously described [22]. Briefly, the 6.5 mm transwell filters (Corning Life Sciences, Corning, NY, USA) were coated with fibronectin (0.01%) for 1 hour.  $4 \times 10^4$  HUVECs were seeded per well and grown to confluence for 2 days. HUVECs were stimulated with TNF- $\alpha$  (5 nM, Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) for 16 hours. Human neutrophils were isolated from whole blood by Histopaque density centrifugation, resuspended in control plasma or plasma obtained from on-pump or OPCAB patients after administration of protamine and incubated at 37°C for 30 minutes in the presence or absence of a blocking antibody directed against Mac-1 (clone ICRF44, Biolegend, San Diego, CA, USA).  $5 \times 10^5$  neutrophils were applied on top of each transwell filter. Transmigration was allowed for 30 minutes and the number of transmigrated cells in the outer well was counted.

### FACS-analysis of neutrophils from human whole blood

The surface expression of leukocyte surface adhesion molecules on neutrophils was analyzed by flow cytometry. Human neutrophils were incubated with different antibodies (anti-human PSGL-1-antibody, clone KPL-1, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA; anti-human LFA-1-antibody, clone MEM-25, ImmunoTools, Friesoythe, Germany; anti-human Mac-1-antibody, clone MEM-174, ImmunoTools) for 20 minutes. Samples were analyzed on a FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). FACS data was processed using FlowJo (version 7.5.5; Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

### Western blotting

For biochemical assays, isolated neutrophils from human whole blood were stimulated with immobilized E-selectin as described previously [23,24]. Following stimulation, cells were lysed using RIPA buffer [23]. Lysate was boiled with Laemmli sample buffer at 95°C for 10 minutes, run on a 10% PAGE-SDS gel and immunoblotted with antibodies against Akt, phospho-Akt, PLC $\gamma$ 2, phospho-PLC $\gamma$ 2, p38 MAPK and phospho-p38 MAPK (all from Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Blots were developed using the Amersham ECL Prime detection system (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed with SPSS (version 20.0) using one-way ANOVA, Student-Newman-Keuls test, post-hoc correction or t-test where appropriate. All data are represented as means  $\pm$  SEM. A p-value <0.05 was taken as statistically significant.

### Results

#### Selectin-mediated slow leukocyte rolling is abolished in patients after CPB

One of the first steps of the leukocyte recruitment cascade is the selectin-mediated transition from rolling to slow rolling [12]. Binding of selectins to their ligands on neutrophils induces the activation of an intracellular signaling pathway leading to activation of the  $\beta_2$ -integrin LFA-1 which mediates slow leukocyte rolling [25]. In order to investigate the effect of cardiopulmonary bypass (CPB) on neutrophil slow rolling, we conducted a prospective observational study in patients undergoing cardiac surgery. There were no significant differences regarding demographic data, including age, weight and serum electrolytes between the patient groups (Table 1). There were no differences with respect to the clinical severity of the underlying cardiovascular disease, as detected by preoperative EuroSCORE, acute or previous myocardial infarctions, ejection fraction, presence of cerebrovascular diseases, and history of cerebral stroke (Table 1). We also included the NYHA and ASA scores.

To investigate the effect of CPB on selectin-mediated slow leukocyte rolling, we used a previously published flow chamber system [20,21]. The advantage of the flow chamber system is that the neutrophil rolling behavior can be investigated in whole blood without isolating neutrophils. This is important, because it has been shown that the isolation process might alter the activation status and rolling ability of neutrophils [26,27,28]. After the induction of anesthesia, neutrophils from both patient groups and healthy volunteers showed the same rolling velocity on E-selectin or P-selectin alone and a reduction of the rolling velocity on E-selectin or P-selectin in the presence of the LFA-1 ligand ICAM-1 (Figure 1 A+B). After the administration of protamine, neutrophils from on-pump patients failed to reduce their rolling velocity on E- or P-selectin when ICAM-1 was added to the substrate, whereas neutrophils from OPCAB patients and healthy volunteers showed a reduction of the rolling velocity on E-selectin and ICAM-1 or P-selectin and ICAM-1 (Figure 1 C+D). During cardiac surgery with the use of CPB and in OPCAB technique, systemic anticoagulation with heparin was antagonized with protamine. Onpump patients were anticoagulated before connection to the cardio-pulmonary bypass with heparin at a dose of 400 I.U./kg bodyweight. OPCAB patients received heparin at a dose of 200 I.U./kg bodyweight. Heparin was antagonized with protamine at a ratio of 1 I.U. protamine per 1 I.U. heparin. Onpump patients received 34583 $\pm$ 2770 I.U. protamine, whereas OPCAB patients received 16375 $\pm$ 1849 I.U. protamine (p = 0.00). In an additional

**Table 1.** Demographic and clinical patient data.

	On-pump patients	OPCAB patients	p-value
<b>No. of patients</b>	7	9	
<b>Gender (m/f)</b>	6/1	6/3	
<b>Age [yrs]</b>	71 $\pm$ 4	67 $\pm$ 3	n.s.
<b>Body weight [kg]</b>	85.8 $\pm$ 5.7	84.6 $\pm$ 6.3	n.s.
<b>Body surface area [m<sup>2</sup>]</b>	2.05 $\pm$ 0.08	1.99 $\pm$ 0.09	n.s.
<b>CPB time [min]</b>	95 $\pm$ 6	-	
<b>Aortic-clamp time [min]</b>	62 $\pm$ 7	-	
<b>Procedure duration [min]</b>	230 $\pm$ 20	181 $\pm$ 61	n.s.
<b>Preoperative NYHA score</b>	2.0 $\pm$ 0.26	2.38 $\pm$ 0.18	n.s.
<b>ASA score</b>	2.83 $\pm$ 0.31	2.88 $\pm$ 0.23	n.s.
<b>Cardiovascular diseases</b>			
Previous MI (>90d)	2/7	4/9	n.s.
Acute MI (<90d)	2/7	4/9	n.s.
Ejection fraction [%]	54 $\pm$ 7	50 $\pm$ 3	
Cerebrovascular disease	1/7	2/9	
Stroke	0/7	2/9	
EuroSCORE	3.67 $\pm$ 1.02	4.25 $\pm$ 1.01	
<b>No. of treated vessels</b>	2.8 $\pm$ 0.20	2.0 $\pm$ 0.26	n.s.
<b>ICU days</b>	8 $\pm$ 5	5 $\pm$ 2	n.s.
<b>Transfused blood products [ml]</b>	219 $\pm$ 88	292 $\pm$ 77	n.s.

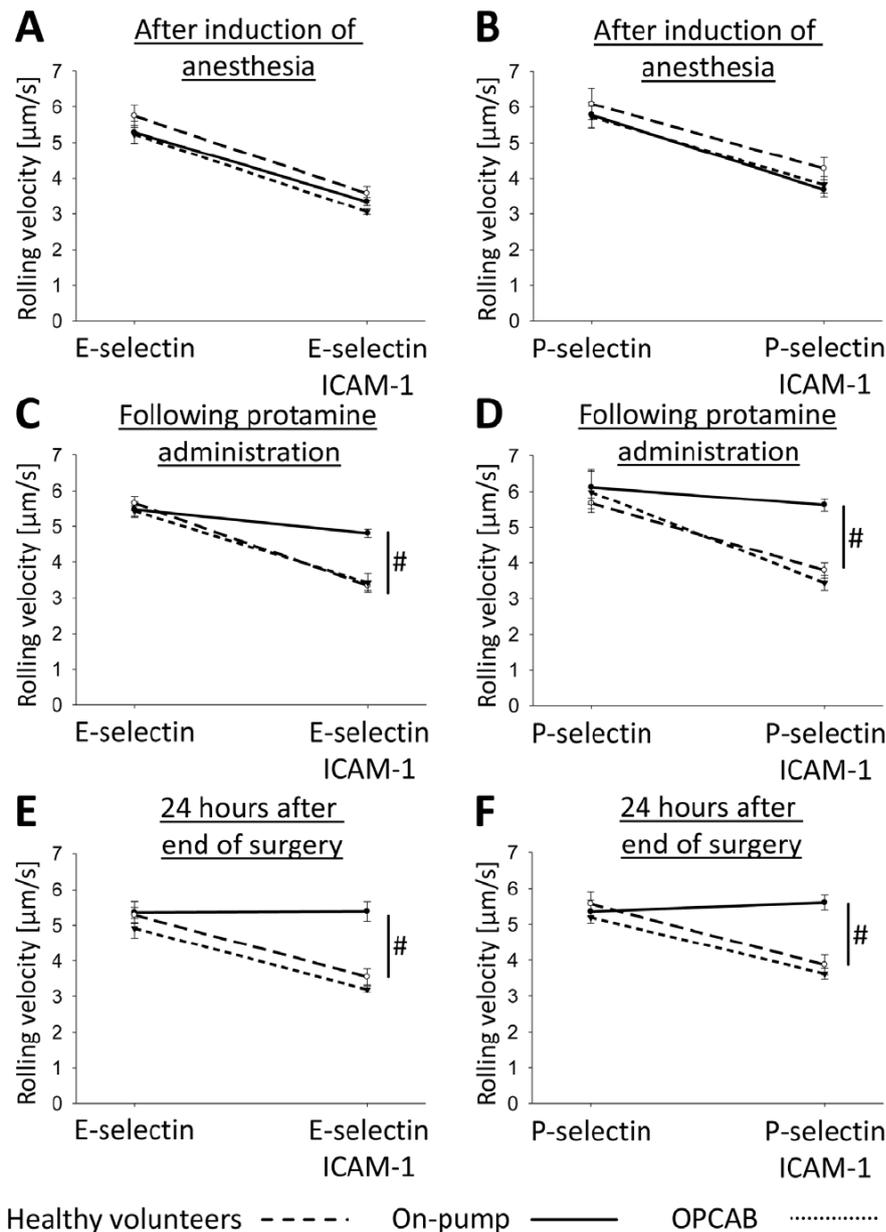
Values are presented as mean  $\pm$  SEM or numbers of patients. MI: myocardial infarction. ICU: intensive care unit. n.s.: not significant.  
doi:10.1371/journal.pone.0045738.t001

experiment we investigated whether protamine can directly influence selectin-mediated slow leukocyte rolling. In order to show that protamine has no direct effect on neutrophil rolling and adhesion, whole blood samples from some healthy volunteers were treated with protamine at a dose of 0, 16 or 32 I.U./ml, corresponding to the administration of protamine at 0, 200 or 400 I.U./kg bodyweight in patients (as calculated from the assumption of 80 ml blood per 1 kg bodyweight). No difference in neutrophil rolling and arrest was observed between the groups (data not shown).

Interestingly, slow neutrophil rolling in on-pump patients was still defective 24 hours after the end of the surgical procedure (Figure 1 E+F). These data suggest that the use of CPB during cardiac surgery abolishes selectin-mediated integrin activation and subsequently alters neutrophil recruitment.

#### CPB during cardiac surgery increases chemokine-induced arrest of neutrophils

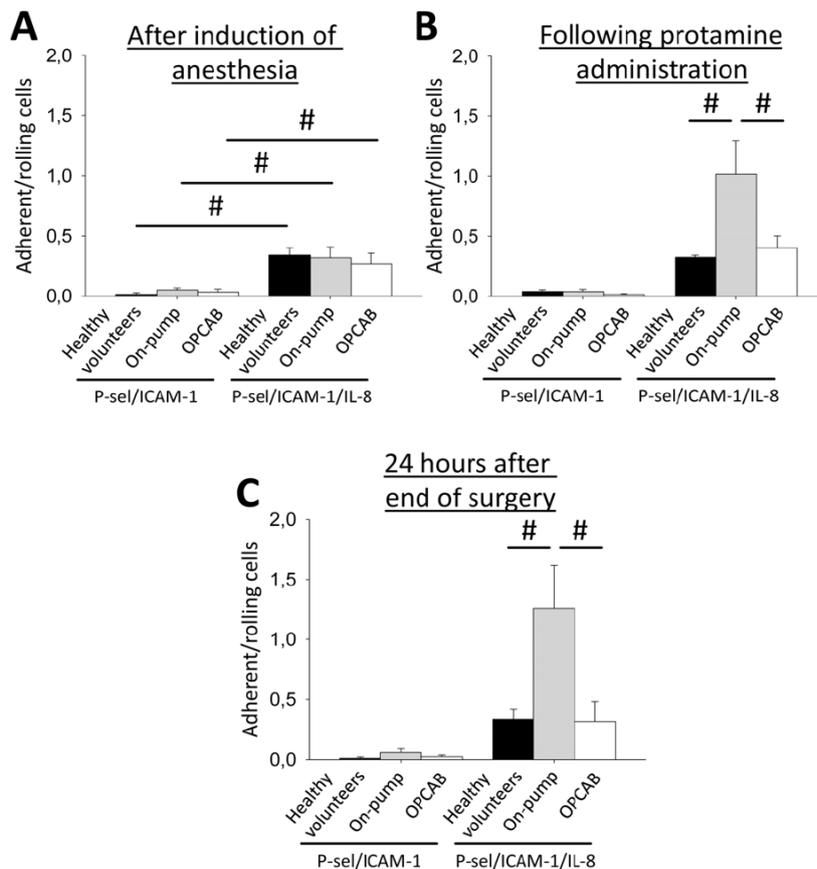
During rolling along the endothelium, neutrophils are activated by different chemokines presented by inflamed endothelial cells [12]. Binding of chemokines to their receptors on neutrophils induces integrins activation and leads to leukocyte arrest [19]. Similar to selectin-mediated slow leukocyte rolling, chemokine-induced neutrophil arrest is LFA-1 dependent [29]. This process occurs partly overlapping with selectin-mediated slow rolling. To



**Figure 1. Selectin-mediated slow leukocyte rolling is abolished in patients after CPB.** The rolling velocity of neutrophils in whole blood from healthy control volunteers (dashed line), on-pump patients (straight line) and OPCAB patients (dotted line) was measured after induction of anesthesia (A, B), following administration of protamine (C, D), and 24 hours after the end of surgery (E, F) using microflow chambers coated with E-selectin or P-selectin alone and in combination with ICAM-1. The average rolling velocity of neutrophils is presented as mean  $\pm$  SEM (n=7-9). The wall shear stress in all flow chamber experiments was 5-6 dynes/cm<sup>2</sup>. # p<0.05. doi:10.1371/journal.pone.0045738.g001

investigate the effect of CPB on chemokine-induced arrest, we performed experiments with flow chambers coated with P-selectin, ICAM-1 and immobilized interleukin (IL)-8. After inducing anesthesia, the ratio of adherent neutrophils to rolling neutrophils in flow chambers coated with P-selectin and ICAM-1 was low in both patient groups and in healthy volunteers at the corresponding time point (Figure 2A). The ratio of adherent neutrophils to rolling neutrophils in flow chambers coated with P-selectin, ICAM-1, and

IL-8 significantly increased in all three groups (Figure 2A). After administration of protamine, the ratio of adherent to rolling neutrophils was increased in on-pump patients compared to OPCAB patients and controls at the corresponding time point (Figure 2B). This effect was still present 24 hours after the end of the surgical procedure (Figure 2C). These data show that the use of CPB increases chemokine-induced arrest of circulating neutrophils.



**Figure 2. CPB during cardiac surgery increases chemokine-induced leukocyte arrest.** Chemokine-induced arrest of neutrophils was investigated in a human microflow chamber assay. Flow chambers coated with P-selectin/ICAM-1 or P-selectin/ICAM-1/Interleukin-8 were perfused with whole blood from healthy control volunteers (black bars) or from cardiac surgery patients operated with the use of CPB (on-pump patients, grey bars) or from patients operated in OPCAB technique (OPCAB patients, white bars) after induction of anesthesia (A), after the administration of protamine (B), and 24 hours after the end of the surgery (C). The ratio of adherent/rolling cells was calculated after 2 minutes of perfusion at a constant wall shear stress of 5–6 dynes/cm<sup>2</sup> (n = 7–9). # p < 0.05. doi:10.1371/journal.pone.0045738.g002

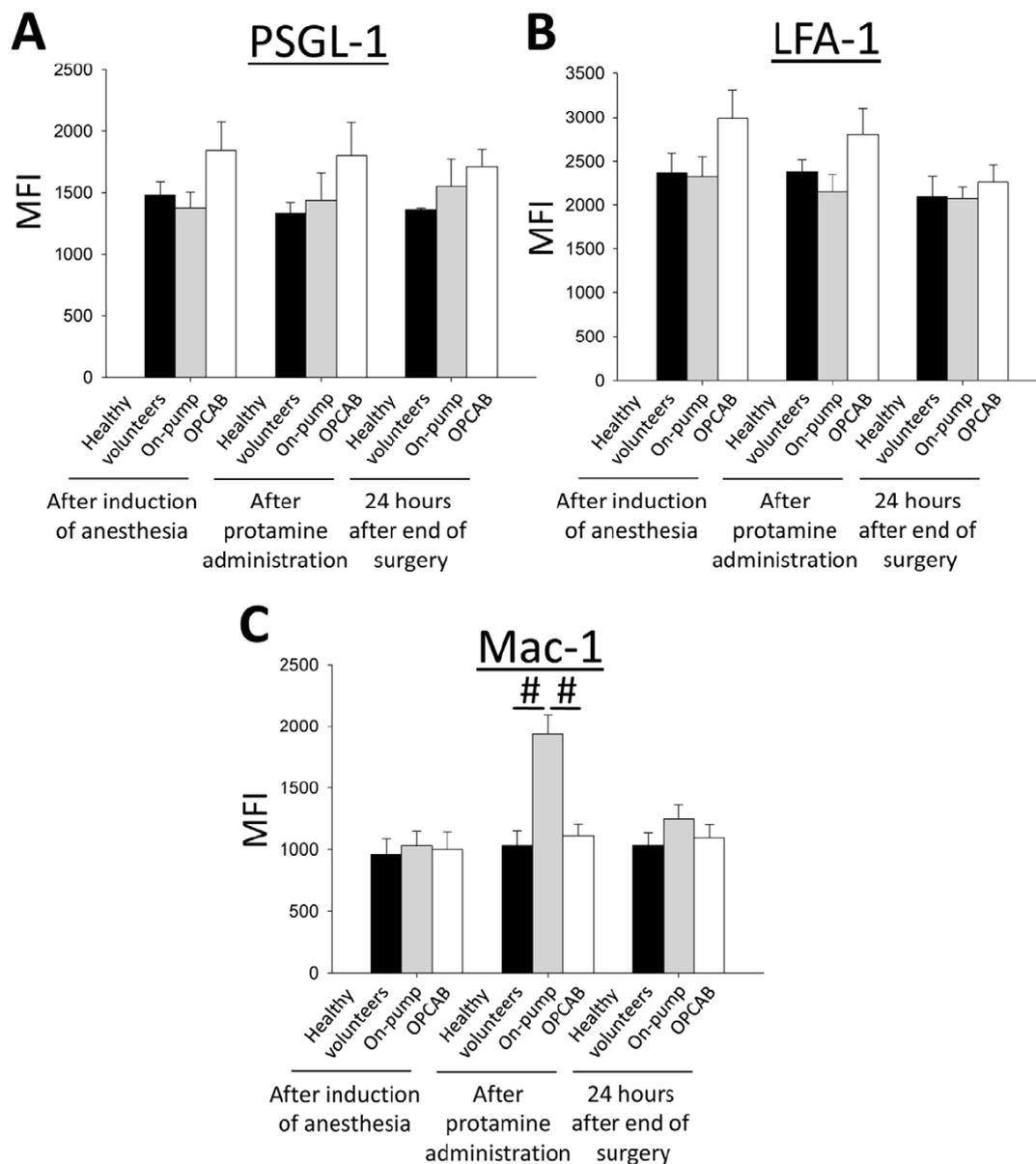
CPB does not alter the expression of adhesion molecules on neutrophils involved in slow leukocyte rolling and chemokine-induced arrest, but increases Mac-1 expression

Activation of neutrophils might be associated with the change of the surface expression of different adhesion molecules including PSGL-1 and integrins [30,31,32]. To elucidate whether the effects of CPB on neutrophil slow rolling and chemokine-induced arrest is caused by an altered expression profile of surface adhesion molecules involved in leukocyte recruitment, we investigated the surface expression of PSGL-1, LFA-1, and Mac-1 on neutrophils by flow cytometry. The expression of PSGL-1 (Figure 3A) and LFA-1 (Figure 3B) on neutrophils from both patient groups and from healthy volunteers was not significantly different after inducing anesthesia, following protamine administration, and 24 hours after the end of the surgical procedure. In contrast, the expression level of Mac-1 on neutrophils from on-pump patients was significantly elevated after the end of CPB compared to the other groups (Figure 3C). However, the increased Mac-1 expression on neutrophils from on-pump patients cannot explain the altered selectin-mediated slow leukocyte rolling and chemo-

kine-induced arrest, because both steps are dependent on the  $\beta_2$ -integrin LFA-1 [29,33]. In order to show that Mac-1 is not involved in slow leukocyte rolling and chemokine-induced arrest, we blocked Mac-1 in whole blood samples obtained from healthy volunteers with a monoclonal antibody and showed that the blockade of Mac-1 has no effect on selectin-mediated slow rolling and chemokine-induced adhesion (data not shown).

#### CPB affects intracellular signaling

It is known that binding of selectins to their counter ligands on neutrophils induces the activation of an intracellular signaling cascade leading to integrin activation and slow leukocyte rolling *in vivo* [13,34]. Following selectin engagement, Btk is phosphorylated in a Syk-dependent manner, and the signaling pathway downstream of Btk divides into PLC $\gamma$ 2- and PI3K $\gamma$ -dependent branches, which both regulate  $\beta_2$ -integrin-mediated slow rolling [35]. p38 MAPK is located downstream of PLC $\gamma$ 2 [24,36]. To study, whether the observed effects of CPB on neutrophil rolling velocity might be caused by a disruption of intracellular signal transduction, we investigated the phosphorylation of PLC $\gamma$ 2, Akt (as a readout for PI3K activation), and p38 MAPK. Phosphory-

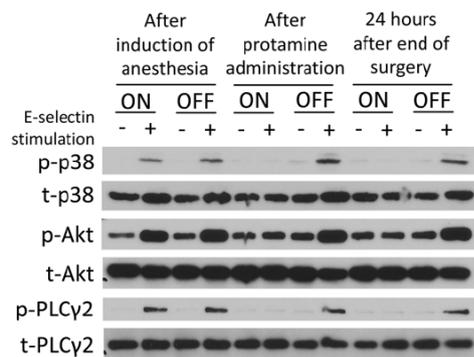


**Figure 3. CPB does not alter the expression of adhesion molecules on neutrophils involved in slow leukocyte rolling and chemokine-induced arrest, but increases Mac-1 expression.** The surface expression of different adhesion molecules on human neutrophils from healthy control volunteers (black bars), patients undergoing cardiac surgery with CPB (on-pump patients, grey bars) or without CPB (OPCAB patients, white bars) were analyzed by flow cytometry after induction of anesthesia, after administration of protamine, and 24 hours after the end of the surgery. The mean fluorescence intensity as a measure for surface expression of PSGL-1 (A), LFA-1 (B), and Mac-1 (C) was quantified (n=7-9). # p<0.05.

doi:10.1371/journal.pone.0045738.g003

lation of PLC $\gamma$ 2, Akt, and p38 MAPK after E-selectin stimulation could be detected in neutrophils from OPCAB patients and on-pump patients after inducing anesthesia (Figure 4). However, immediately after the administration of protamine, E-selectin-induced phosphorylation of PLC $\gamma$ 2, Akt, and p38 MAPK was completely abolished in neutrophils from on-pump patients, whereas E-selectin induced phosphorylation of these molecules was normal in neutrophils from OPCAB patients (Figure 4). The

abolished phosphorylation of PLC $\gamma$ 2, Akt and p38 MAPK following stimulation in neutrophils from on-pump patients was still present 24 hours after the end of the surgical procedure (Figure 4). These data suggest that CPB inhibits selectin-mediated integrin activation by interfering with intracellular signaling pathways.



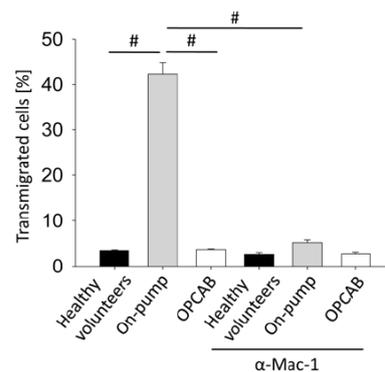
**Figure 4. CPB affects intracellular signaling.** The phosphorylation of PLC $\gamma$ 2, Akt, and p38 MAPK was investigated by western blot. Neutrophils derived from patients undergoing cardiac surgery with CPB (ON) or without CPB (OFF) obtained after induction of anesthesia, after administration of protamine, and 24 hours after the end of the surgery were left unstimulated or stimulated by rolling on E-selectin-coated wells for 10 minutes. Lysates were prepared and immunoblotted with antibodies against phosphorylated PLC $\gamma$ 2 (phospho PLC $\gamma$ 2 (Tyr1217)), total PLC $\gamma$ 2, phosphorylated Akt (phospho Akt (S473)), total Akt, phosphorylated p38 MAPK (phospho-p38), or total p38 MAPK (exemplary blot of 3 experiments).  
doi:10.1371/journal.pone.0045738.g004

#### CPB causes increased Mac-1 dependent neutrophil transmigration *in vitro*

The last step in the leukocyte recruitment cascade is transmigration, when the leukocytes leave the vessel and emigrate into the inflamed tissue [12]. To investigate the effect of CPB on the transmigration process, we performed an *in vitro* transmigration assay using a transwell system with TNF- $\alpha$ -stimulated human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and isolated neutrophils from healthy volunteers incubated with plasma from on-pump patients, OPCAB patients, or healthy volunteers. Neutrophils incubated with plasma from healthy volunteers and OPCAB patients (obtained after protamine administration) show similar transmigration rates through the TNF- $\alpha$ -stimulated HUVEC-monolayer (Figure 5). However, the number of transmigrated neutrophils increased after 30 minutes of incubation with plasma obtained from on-pump patients (obtained after protamine administration, Figure 5). This effect could be nearly completely reversed by pre-incubation with a blocking Mac-1 antibody (Figure 5), suggesting that CPB increases the Mac-1 dependent transmigration by a direct effect on neutrophils.

#### Discussion

Lamy and colleagues have shown that the overall 30-day mortality is not different between cardiac surgery patients with off-pump or on-pump coronary-artery bypass grafting [37]. However, this study and other studies demonstrated a significantly lower incidence of acute kidney injury, respiratory complications, and postoperative delirium in the off-pump groups compared to on-pump patients. These postoperative complications have multifactorial causes, including hypoperfusion, hypoxia and inflammation. The CPB circuit induces a release of pro-inflammatory cytokines and activation of leukocytes resulting in systemic inflammation [2,3]. The inflammatory response and the inappropriate displacement of leukocytes frequently induces organ dysfunction after using a CPB circuit [38]. These organ dysfunctions may contribute to postoperative complications and procedure-associated mortality



**Figure 5. CPB causes increased Mac-1 dependent neutrophil transmigration *in vitro*.** Isolated neutrophils from healthy volunteers were preincubated with control serum (black bars) or serum obtained from cardiac surgery patients operated with the use of CPB (grey bars) or in OPCAB technique (white bars) at 37°C for 30 minutes in the presence or absence of a blocking Mac-1 antibody. The neutrophils were allowed to transmigrate through a confluent HUVEC monolayer in a transwell system *in vitro*. The endothelial cell layer has been stimulated with TNF- $\alpha$  for 16 hours. After 30 minutes, the number of transmigrated neutrophils was determined (n=3). # p<0.05.  
doi:10.1371/journal.pone.0045738.g005

[1,39,40]. Although cardiac surgery without CPB reduces the inflammatory response [41], it does not modulate hypoperfusion and hypoxia during the procedure. This goes along with our results, showing that cardiac surgery with CPB is associated with increased leukocyte recruitment. As the pathogenesis of the organ dysfunction is multifactorial, it is not surprising that modulating inflammation does not translate into a survival benefit. However, reducing inflammation and additional causes promoting organ dysfunction (e.g. hypoxia and hypoperfusion) may reduce mortality under these conditions.

The mechanisms by which CPB alters leukocyte recruitment remain unknown. A better understanding of the molecular pathways causing systemic inflammation might be valuable for the improvement of the clinical management of patients with cardiac surgery. By performing a clinical trial, we here show that CPB alters different steps of the leukocyte recruitment cascade. The use of a CPB circuit during cardiac surgery abolished selectin-mediated slow leukocyte rolling. This effect appears to be mediated by altered intracellular signaling rather than by changing the surface expression of adhesion molecules. However, chemokine-induced arrest and transmigration was significantly increased after cardiac surgery with CPB, showing that the different steps of the recruitment cascade are differently affected by the use of a CPB circuit.

During CPB-induced inflammation, selectins expressed on inflamed endothelial cells mediate the first contact between leukocytes and endothelial cells and initiate leukocyte recruitment. The subsequent activation of neutrophils by a number of pro-inflammatory mediators, including platelet-activating factor (PAF) and IL-8, provokes an increase of CD11b/CD18 (Mac-1) integrin levels on the leukocyte surface [42]. Released cytokines and chemokines upregulate the expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1, and platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM)-1 on the surface of endothelial cells [43]. The binding of integrins to ICAM-1 and VCAM-1 initiates firm adhesion of leukocytes to endothelial cells, leading to their transendothelial migration into the tissue. Here, leukocytes release their lysosomal contents

[44,45]. These agents stimulate lipid peroxidation of endothelial cells and myocyte membranes, causing cellular dysfunction, edema and cell death [46]. CPB is associated with increased levels of soluble adhesion molecules [47]. Higher levels of adhesion molecules are briefly expressed and return to normal within a few hours but they are believed to be responsible for the dysfunction of multiple organ systems observed in the post-operative period [47]. A relationship between adhesion molecule expression and inflammatory mediators has also been shown [48].

To further study the underlying mechanisms of the altered leukocyte recruitment during cardiac surgery with CPB, we used a newly developed microfluidic whole blood perfusion system originally developed for mouse blood [25,49]. The advantage of this system is that neutrophils can be investigated in whole blood without isolation. This is important, because it has been shown that the isolation process might alter the activation status and rolling ability of neutrophils.

We studied the rolling of neutrophils from on-pump patients, OPCAP patients, and healthy volunteers in the autoperfused flow chamber assay. Neutrophils from all patients demonstrated similar rolling velocities on P-selectin and E-selectin. Neutrophils from on-pump patients, however, did not display reduced rolling velocities on P-selectin/ICAM-1 or E-selectin/ICAM-1 after protamine administration. These data suggest that the signaling pathway linking PSGL-1 to integrin activation is disturbed. It has been demonstrated that this pathway is important for  $G\alpha$ -independent leukocyte recruitment [18,23,25,50].

Leukocyte adhesion molecules, including selectins and their ligands, play a crucial role in leukocyte recruitment [51]. Nonetheless, we could not detect changes in surface expression of adhesion molecules involved in selectin-mediated integrin activation on neutrophils (PSGL-1 and LFA-1).

Since CPB drastically affects selectin-dependent leukocyte rolling, we next investigated the intracellular, selectin-dependent signaling pathways. Both the PI3K $\gamma$ - and PLC $\gamma$ 2-dependent pathways and their phosphorylation are crucial for leukocyte recruitment [18]. Whereas we could find E-selectin-stimulated phosphorylation in neutrophils from OPCAP patients, we could not detect E-selectin-stimulated phosphorylation in neutrophils from on-pump patients. We therefore hypothesize that CPB inhibits selectin-mediated integrin activation by means of interference with intracellular signaling pathways and thereby ultimately impairs slow leukocyte rolling. Similar to these findings, we could recently show that acute uremia also abolishes selectin-mediated slow leukocyte rolling [21]. However, the molecular mechanisms of disturbed selectin-induced intracellular signaling remain elusive.

However, in contrast to other adhesion molecules, Mac-1 (CD11b) was up-regulated on neutrophils from on-pump patients. Neutrophil CD11b expression is up-regulated during systemic inflammation caused by different stimuli [52,53,54], and positively correlates with indicators of disease severity [55] and adverse outcomes [56,57]. Our data are in accordance to the findings of another study showing that the surface expression of CD11b is up-regulated following cardiac surgery with CPB [42]. However, increased CD11b expression does not necessarily equate to augmented CD11b-dependent adhesion [58,59] which is requisite for neutrophil-endothelial interactions [60]. Increased expression of conformationally active CD11b is seen on circulating leukocytes during CPB [61] and systemic inflammation [57,62,63]. Based on these data and the fact that neutrophil transmigration is Mac-1 dependent, [64] our observation of an increased transmigration of neutrophils incubated with plasma from on-pump patients can be explained. Blocking Mac-1 by a blocking antibody completely

inhibited neutrophil transmigration in the transwell assay, showing that the increased transmigration of neutrophils incubated with plasma from on-pump patients is Mac-1 dependent. The increased chemokine-induced arrest and transmigration may be implicated in inadvertent tissue injury during cardiac surgery with CPB. The reasons why anti-Mac-1 strategies failed to improve outcomes in human trials may be a result of the failure of antibodies to specifically inhibit conformationally active CD11b on circulating leukocytes [65]. The effectiveness of blocking GPIIa/IIIb in acute coronary syndromes may be partially attributed to its ability to bind conformationally active CD11b and inhibit Mac-1 mediated leukocyte adhesion [66].

It is known that hypoxia, which may occur during cardiac surgery, can cause an inflammatory response by signaling pathways involving the hypoxia-inducible transcription factor (HIF) [67]. It has been demonstrated that HIF-1 $\alpha$ , a key sensor of ischemia-reperfusion, is up-regulated in cardiac surgery patients during CPB and is associated with increased release of inflammatory mediators [68]. However, the precise molecular signaling pathways leading to Mac-1 up-regulation on neutrophils during CPB are still unknown. A possible mechanism for this observations is that the different proinflammatory mediators released during CPB directly activate neutrophils [69] and induce the up-regulation of Mac-1 on the cell surface. Another possible mechanism is that the exposition of blood to non-physiological surfaces during CPB activates platelets [70] which subsequently may interact with neutrophils and form platelet-neutrophil aggregates [71]. It is known that this interaction induces the up-regulation of Mac-1 on neutrophils [72].

The expression of HIF-1 $\alpha$  during hypoxic conditions has been shown to trigger the production and release of adenine nucleotides [67,73]. These mediators cause an increased expression of Mac-1 on the cell surface of neutrophils, similar to our observations during CPB [74]. In addition, HIF-1 $\alpha$  enhances the endothelial production of TNF- $\alpha$  by activation of NF- $\kappa$ B [67,75], which may cause the enhanced recruitment of neutrophils into different organs in response to CPB. TNF- $\alpha$  can also directly activate neutrophils and up-regulate Mac-1 on the cell surface [76].

Our study has some limitations. Although the transfused blood products did not significantly differ between the groups, it has to be considered that blood transfusion may have an influence on inflammation [77]. In addition, the low number of patients included in this study does not entirely rule out the possibility of additional factors affecting leukocyte activation. The regulation of proteins involved in circadian rhythmicity has recently been shown to play a role in the control of HIF (hypoxia-inducible factor)-dependent cardiac metabolism and ischemia tolerance [78]. However, since all patients underwent surgery in the morning and experiments with blood from healthy volunteers were conducted at the same time point, we can exclude a possible effect of circadian rhythmicity on the observed results.

To this end, our data show that CPB during cardiac surgery impairs leukocyte slow rolling, but significantly elevates chemokine-induced arrest and transmigration. The defect in selectin-mediated integrin activation appears to be, at least partially, due to decreased phosphorylation of selectin-dependent intracellular signaling. The increased transmigration is caused by an increased Mac-1 expression on circulating neutrophils after CPB. These data suggest that the inappropriate leukocyte displacement during CPB-induced inflammation is caused by an increased chemokine-induced arrest and transmigration.

The pharmacological blockade of Mac-1 could be a promising target for a novel therapeutic approach to reduce leukocyte

recruitment during CPB-induced systemic inflammation and dampen the severity of this condition in cardiac surgery patients.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PKZ AZ. Performed the experiments: JR CB. Analyzed the data: JR CB AZ. Wrote the paper: JR

AZ. Equally contributed to this work and share first authorship: JR CB. Equally contributed to this work and share senior authorship: AR AZ. Revised the manuscript: HVA HHS PKZ.

### References

- Warren OJ, Smith AJ, Alexiou C, Rogers PL, Jawad N, et al. (2009) The inflammatory response to cardiopulmonary bypass: part 1—mechanisms of pathogenesis. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia* 23: 223–231.
- Paparella D, Yau TM, Young E (2002) Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *European journal of cardio-thoracic surgery: official journal of the European Association for Cardiothoracic Surgery* 21: 232–244.
- Asimakopoulos G (2001) Systemic inflammation and cardiac surgery: an update. *Perfusion* 16: 353–360.
- Landis RC (2009) Redefining the systemic inflammatory response. *Seminars in cardiothoracic and vascular anesthesia* 13: 87–94.
- Ben-Abraham R, Weinbroum AA, Dekel B, Paret G (2003) Chemokines and the inflammatory response following cardiopulmonary bypass—a new target for therapeutic intervention?—A review. *Paediatric anaesthesia* 13: 655–661.
- Braude S, Nolop KB, Fleming JS, Krausz T, Taylor KM, et al. (1986) Increased pulmonary transvascular protein flux after canine cardiopulmonary bypass. Association with lung neutrophil sequestration and tissue peroxidation. *The American review of respiratory disease* 134: 867–872.
- Hind CR, Griffin JF, Pack S, Latchman YE, Drake HF, et al. (1988) Effect of cardiopulmonary bypass on circulating concentrations of leucocyte elastase and free radical activity. *Cardiovascular research* 22: 37–41.
- Gillinov AM, Redmond JM, Zehr KJ, Wilson IC, Curtis WE, et al. (1994) Inhibition of neutrophil adhesion during cardiopulmonary bypass. *The Annals of thoracic surgery* 57: 126–133.
- Dreyer WJ, Michael LH, West MS, Smith CW, Rothlein R, et al. (1991) Neutrophil accumulation in ischemic canine myocardium. Insights into time course, distribution, and mechanism of localization during early reperfusion. *Circulation* 84: 400–411.
- Abdel-Rahman U, Margraf S, Aybek T, Logters T, Bitu-Moreno J, et al. (2007) Inhibition of neutrophil activity improves cardiac function after cardiopulmonary bypass. *Journal of inflammation* 4: 21.
- Landis C (2007) Pharmacologic strategies for combating the inflammatory response. *The Journal of extra-corporeal technology* 39: 291–295.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7: 678–689.
- Zarbock A, Ley K, McEver RP, Hidalgo A (2011) Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood* 118: 6743–6751.
- Laudanna C, Bolomini-Vittori M (2009) Integrin activation in the immune system. *Wiley interdisciplinary reviews Systems biology and medicine* 1: 116–127.
- Alon R, Ley K (2008) Cells on the run: shear-regulated integrin activation in leukocyte rolling and arrest on endothelial cells. *Curr Opin Cell Biol* 20: 525–532.
- Zarbock A, Ley K (2009) Neutrophil adhesion and activation under flow. *Microcirculation* 16: 31–42.
- Zarbock A, Muller H, Kuwano Y, Ley K (2009) PSGL-1-dependent myeloid leukocyte activation. *J Leukoc Biol* 86: 1119–1124.
- Mueller H, Stadtmann A, Van Aken H, Hirsch E, Wang D, et al. (2010) Tyrosine kinase Btk regulates E-selectin-mediated integrin activation and neutrophil recruitment by controlling phospholipase C (PLC) gamma2 and PI3Kgamma pathways. *Blood* 115: 3118–3127.
- Ley K (2003) Arrest chemokines. *Microcirculation* 10: 289–295.
- Kuwano Y, Spelten O, Zhang H, Ley K, Zarbock A (2010) Rolling on E- or P-selectin induces the extended but not high-affinity conformation of LFA-1 in neutrophils. *Blood* 116: 617–624.
- Rossaint J, Spelten O, Kassens N, Mueller H, Van Aken HK, et al. (2011) Acute loss of renal function attenuates slow leukocyte rolling and transmigration by interfering with intracellular signaling. *Kidney international* 80: 493–503.
- Schnoor M, Lai FP, Zarbock A, Klaver R, Polaschegg C, et al. (2011) Cortactin deficiency is associated with reduced neutrophil recruitment but increased vascular permeability in vivo. *The Journal of experimental medicine* 208: 1721–1735.
- Zarbock A, Abram CL, Hundt M, Altman A, Lowell CA, et al. (2008) PSGL-1 engagement by E-selectin signals through Src kinase Fgr and ITAM adaptors DAPI2 and FcR gamma to induce slow leukocyte rolling. *J Exp Med* 205: 2339–2347.
- Mueller H, Stadtmann A, Van Aken H, Hirsch E, Wang D, et al. (2010) Tyrosine kinase Btk regulates E-selectin-mediated integrin activation and neutrophil recruitment by controlling phospholipase C (PLC) gamma2 and PI3Kgamma pathways. *Blood* 115: 3118–3127.
- Zarbock A, Lowell CA, Ley K (2007) Spleen tyrosine kinase Syk is necessary for E-selectin-induced alpha(L)beta(2) integrin-mediated rolling on intercellular adhesion molecule-1. *Immunity* 26: 773–783.
- Forsyth KD, Levinsky RJ (1990) Preparative procedures of cooling and re-warming increase leukocyte integrin expression and function on neutrophils. *J Immunol Methods* 128: 159–163.
- Glasser L, Fiederlein RL (1990) The effect of various cell separation procedures on assays of neutrophil function. A critical appraisal. *Am J Clin Pathol* 93: 662–669.
- Kuijpers TW, Tool AT, van der Schoot CE, Ginsel LA, Onderwater JJ, et al. (1991) Membrane surface antigen expression on neutrophils: a reappraisal of the use of surface markers for neutrophil activation. *Blood* 78: 1105–1111.
- Kunkel EJ, Dunne JL, Ley K (2000) Leukocyte arrest during cytokine-dependent inflammation in vivo. *J Immunol* 164: 3301–3308.
- Lewis SM, Treacher DF, Bergmeier L, Brain SD, Chambers DJ, et al. (2009) Plasma from patients with sepsis up-regulates the expression of CD49d and CD64 on blood neutrophils. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 40: 724–732.
- Lo Presti R, Camino B, Montana M, Ferrara F, Carollo C, et al. (2004) Polymorphonuclear leukocyte integrin profile in vascular atherosclerotic disease. *Clinical hemorheology and microcirculation* 30: 53–60.
- Marsik C, Mayr F, Cardona F, Schaller G, Wagner OF, et al. (2004) Endotoxin down-modulates P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1, CD162) on neutrophils in humans. *Journal of clinical immunology* 24: 62–65.
- Kuwano Y, Spelten O, Zhang H, Ley K, Zarbock A (2010) Rolling on E- or P-selectin induces the extended but not high-affinity conformation of LFA-1 in neutrophils. *Blood* 116: 617–624.
- Zarbock A, Muller H, Kuwano Y, Ley K (2009) PSGL-1-dependent myeloid leukocyte activation. *Journal of leukocyte biology* 86: 1119–1124.
- Zarbock A, Kempf T, Wollert KC, Vestweber D (2012) Leukocyte integrin activation and deactivation: novel mechanisms of balancing inflammation. *Journal of molecular medicine* 90: 353–359.
- Stadtmann A, Brinkhaus L, Mueller H, Rossaint J, Bolomini-Vittori M, et al. (2011) Rap1a activation by CalDAG-GEF1 and p38 MAPK is involved in E-selectin-dependent slow leukocyte rolling. *Eur J Immunol* 41: 2074–2085.
- Lamy A, Devereaux PJ, Prabhakaran D, Taggart DP, Hu S, et al. (2012) Off-Pump or On-Pump Coronary-Artery Bypass Grafting at 30 Days. *The New England journal of medicine* 366: 1489–1497.
- Murphy GJ, Angelini GD (2004) Side effects of cardiopulmonary bypass: what is the reality? *Journal of cardiac surgery* 19: 481–488.
- Marcantonio ER, Goldman L, Mangione CM, Ludwig LE, Muraca B, et al. (1994) A clinical prediction rule for delirium after elective noncardiac surgery. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 271: 134–139.
- Kumar AB, Suneja M, Bayman EO, Weide GD, Tarasi M (2012) Association between postoperative acute kidney injury and duration of cardiopulmonary bypass: a meta-analysis. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia* 26: 64–69.
- Raja SG, Berg GA (2007) Impact of off-pump coronary artery bypass surgery on systemic inflammation: current best available evidence. *Journal of cardiac surgery* 22: 445–455.
- Asimakopoulos G, Kohn A, Stefanou DC, Haskard DO, Landis RC, et al. (2000) Leukocyte integrin expression in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *The Annals of thoracic surgery* 69: 1192–1197.
- Vestweber D (2007) Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. *Immunol Rev* 218: 178–196.
- Klebanoff SJ (2005) Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of leukocyte biology* 77: 598–625.
- Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC (1998) Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92: 3007–3017.
- Vinten-Johansen J (2004) Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovascular research* 61: 481–497.
- Wei M, Kuukasjarvi P, Laurikka J, Kaukinen S, Iisalo P, et al. (2003) Soluble adhesion molecules and myocardial injury during coronary artery bypass grafting. *World journal of surgery* 27: 140–144.
- Hambusch J, Osmancik P, Boci J, Schneider P, Tarnok A (2002) Neutrophil adhesion molecule expression and serum concentration of soluble adhesion molecules during and after pediatric cardiovascular surgery with or without cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology* 96: 1078–1085.
- Chesnutt BC, Smith DF, Raffler NA, Smith ML, White EJ, et al. (2006) Induction of LFA-1-dependent neutrophil rolling on ICAM-1 by engagement of E-selectin. *Microcirculation* 13: 99–109.

50. Block H, Herter JM, Rossaint J, Stadtmann A, Kliche S, et al. (2012) Crucial role of SLP-76 and ADAP for neutrophil recruitment in mouse kidney ischemia-reperfusion injury. *The Journal of experimental medicine* 209: 407–421.
51. Zarbock A, Ley K (2008) Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *Am J Pathol* 172: 1–7.
52. Tellado JM, Christou NV (1993) Activation state of polymorphonuclear leukocytes in surgical patients: characterization of surface receptor expression. *Surgery* 113: 624–630.
53. Rosenbloom AJ, Pinsky MR, Bryant JL, Shin A, Tran T, et al. (1995) Leukocyte activation in the peripheral blood of patients with cirrhosis of the liver and SIRS. Correlation with serum interleukin-6 levels and organ dysfunction. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 274: 58–65.
54. Asimakopoulos G, Taylor KM (1998) Effects of cardiopulmonary bypass on leukocyte and endothelial adhesion molecules. *The Annals of thoracic surgery* 66: 2135–2144.
55. Chishti AD, Shenton BK, Kirby JA, Baudouin SV (2004) Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. *Intensive care medicine* 30: 605–611.
56. Rinder CS, Fontes M, Mathew JP, Rinder HM, Smith BR (2003) Neutrophil CD11b upregulation during cardiopulmonary bypass is associated with postoperative renal injury. *The Annals of thoracic surgery* 75: 899–905.
57. Inoue T, Uchida T, Yaguchi I, Sakai Y, Takayanagi K, et al. (2003) Stent-induced expression and activation of the leukocyte integrin Mac-1 is associated with neointimal thickening and restenosis. *Circulation* 107: 1757–1763.
58. Schleiffenbaum B, Moser R, Patarroyo M, Fehr J (1989) The cell surface glycoprotein Mac-1 (CD11b/CD18) mediates neutrophil adhesion and modulates degranulation independently of its quantitative cell surface expression. *Journal of immunology* 142: 3537–3545.
59. Vedder NB, Harlan JM (1988) Increased surface expression of CD11b/CD18 (Mac-1) is not required for stimulated neutrophil adherence to cultured endothelium. *The Journal of clinical investigation* 81: 676–682.
60. Elliott MJ, Finn AH (1993) Interaction between neutrophils and endothelium. *The Annals of thoracic surgery* 56: 1503–1508.
61. Orr Y, Taylor JM, Cartland S, Bannon PG, Geczy C, et al. (2007) Conformational activation of CD11b without shedding of L-selectin on circulating human neutrophils. *Journal of leukocyte biology* 82: 1115–1125.
62. May AE, Schmidt R, Kanse SM, Chavakis T, Stephens RW, et al. (2002) Urokinase receptor surface expression regulates monocyte adhesion in acute myocardial infarction. *Blood* 100: 3611–3617.
63. Rosenbloom AJ, Pinsky MR, Napolitano C, Nguyen TS, Levann D, et al. (1999) Suppression of cytokine-mediated beta2-integrin activation on circulating neutrophils in critically ill patients. *Journal of leukocyte biology* 66: 83–89.
64. Diacovo TG, Roth SJ, Buccola JM, Bainton DF, Springer TA (1996) Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. *Blood* 88: 146–157.
65. Faxon DP, Gibbons RJ, Chronos NA, Gurbel PA, Sheehan F (2002) The effect of blockade of the CD11/CD18 integrin receptor on infarct size in patients with acute myocardial infarction treated with direct angioplasty: the results of the HALT-MI study. *Journal of the American College of Cardiology* 40: 1199–1204.
66. Simon DI, Xu H, Ortlepp S, Rogers C, Rao NK (1997) 7E3 monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa cross-reacts with the leukocyte integrin Mac-1 and blocks adhesion to fibrinogen and ICAM-1. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 17: 528–535.
67. Eltzschig HK, Carmeliet P (2011) Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med* 364: 656–665.
68. Liangos O, Domhan S, Schwager C, Zeier M, Huber PE, et al. (2010) Whole blood transcriptomics in cardiac surgery identifies a gene regulatory network connecting ischemia reperfusion with systemic inflammation. *PLoS one* 5: e13658.
69. Cameron D (1996) Initiation of white cell activation during cardiopulmonary bypass: cytokines and receptors. *Journal of cardiovascular pharmacology* 27 Suppl 1: S1–5.
70. Sniecinski RM, Chandler WL (2011) Activation of the hemostatic system during cardiopulmonary bypass. *Anesthesia and analgesia* 113: 1319–1333.
71. Rinder CS, Bonan JL, Rinder HM, Mathew J, Hines R, et al. (1992) Cardiopulmonary bypass induces leukocyte-platelet adhesion. *Blood* 79: 1201–1205.
72. Rahman M, Zhang S, Chew M, Ersson A, Jeppsson B, et al. (2009) Platelet-derived CD40L (CD154) mediates neutrophil upregulation of Mac-1 and recruitment in septic lung injury. *Annals of surgery* 250: 783–790.
73. Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Forster I, Pawlinski R, et al. (2003) HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 112: 645–657.
74. Freyer DR, Boxer LA, Axtell RA, Todd RF 3rd (1988) Stimulation of human neutrophil adhesive properties by adenine nucleotides. *Journal of immunology* 141: 580–586.
75. Chen LW, Egan L, Li ZW, Greten FR, Kagnoff MF, et al. (2003) The two faces of IKK and NF-kappaB inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Nature medicine* 9: 575–581.
76. Montecucco F, Steffens S, Burger F, Da Costa A, Bianchi G, et al. (2008) Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) induces integrin CD11b/CD18 (Mac-1) up-regulation and migration to the CC chemokine CCL3 (MIP-1alpha) on human neutrophils through defined signalling pathways. *Cellular signalling* 20: 557–568.
77. Urner M, Herrmann IK, Buddeberg F, Schuppli C, Roth Z'raggen B, et al. (2012) Effects of blood products on inflammatory response in endothelial cells in vitro. *PLoS one* 7: e33403.
78. Eckle T, Hartmann K, Bonney S, Reithel S, Mittelbronn M, et al. (2012) Adora2b-elicited Per2 stabilization promotes a HIF-dependent metabolic switch crucial for myocardial adaptation to ischemia. *Nature medicine* 18: 774–782.

## **2.2 Originalarbeit 2: Lidocain beeinflusst die Leukozytenaktivierung in der Sepsis durch eine Verminderung von Chemokin-induziertem Arrest und Transmigration.**

**Berger C\***, Rossaint J\*, Van Aken H, Westphal M, Hahnenkamp K, Zarbock A. Lidocaine reduces neutrophil recruitment by abolishing chemokine-induced arrest and transendothelial migration in septic patients. *J Immunol.* 2014 Jan 1;192(1):367-76. doi: 10.4049/jimmunol.1301363.

Ziel dieser prospektiv, randomisiert und verblindet durchgeführten Arbeit war es, in einem translationalem Ansatz den Einfluss einer Lidocain Gabe auf die Leukozytenaktivierung und den entsprechenden Wirkmechanismus, verglichen mit Placebo, in der Sepsis assoziiert gesteigerten Inflammationsreaktion an kritisch kranken Patient\*innen zu untersuchen.

Das septische Krankheitsbild ist in seinen verschiedenen Ausprägungen mit einer hohen Sterblichkeit assoziiert. Der Verlauf der Sepsis unterliegt dabei mehreren Phasen, beginnend mit einer initialen Phase der gesteigerten Immunaktivierung, gefolgt von einer späteren Phase der Immunsuppression [90, 91]. In der Vergangenheit wurden verschiedene Ansätze untersucht, vor allem die Initialphase der Sepsis, die gesteigerte inflammatorische Reaktion zu modulieren und damit den septischen Krankheitsverlauf potentiell positiv zu beeinflussen [92]. Bislang zeigte aber keine der Ansätze eine deutliche Verbesserung der Sterblichkeit in der Sepsis [92, 93]. Zudem gaben frühere Arbeiten mit Lokalanästhetika Hinweise auf ein Potential zur positiven Beeinflussung einer Inflammationsreaktion. Dabei zeigten sich auch nachgewiesene positive Effekte auf einzelne Organsysteme, sowohl bei kritisch Kranken als auch bei der perioperativ auftretenden Inflammationsreaktion [94, 95]. Der genaue Mechanismus der Lokalanästhetika vermittelten Beeinflussung der Inflammationsreaktion war bislang unklar, es wurde aber vermutet, dass diese Effekte nicht durch die Beeinflussung des Natrium-Kanals vermittelt wurden.

Auf Basis dieser Ausgangslage und den bisherigen Erkenntnissen zu Signalwegen der Leukozytenaktivierung, wurde die hier dargestellte prospektive Studie konzipiert und durchgeführt. In einem translationalem Untersuchungsansatz wurden ein potentieller Einfluss auf die verschiedenen Stufen der Aktivierungskaskade durch die Verabreichung von Lidocain in der Sepsis untersucht. Zudem wurden in einem weiteren Schritt die Wirkweise des Lidocains auf die intrazelluläre Signalkaskade des Leukozyten untersucht. Dazu wurden Patient\*innen während der initialen Phase der Sepsis auf der Intensivstation zu einer Lidocain oder Placebo Therapie randomisiert und doppelt verblindet untersucht.

Patient\*innen wurden bei einem vermuteten oder nachgewiesenen Infekt und zusätzlichen, seit weniger als 24h erfüllten Sepsis-Kriterien in Anlehnung an die zum Zeitpunkt der Studienplanung aktuellen Sepsis-Definition eingeschlossen [96]. Verum randomisierte Patient\*innen erhielten einen Lidocain-Bolus von 1,5 mg pro kg Körpergewicht gefolgt von einer kontinuierlichen, 48h andauernden Infusion von 100mg/h Lidocain bei Patient\*innen über 70 kg Körpergewicht und 70 mg/h für 48h bei weniger als 70 kg Körpergewicht. Bei akut auftretendem Nierenversagen oder möglicherweise beeinträchtigender Begleitmedikation (Beta-Blocker, Amiodaron, Norepinephrin über 0,2 µg/kg/min) wurde die Dauerinfusion auf 40mg/h bzw. bei niedrigerem Körpergewicht 20mg/h reduziert. Um ein einheitliches Vorgehen im Rahmen der Verblindung zu ermöglichen wurden alle Dosierungsschritte entsprechend der Konzentration der verwendeten Lidocain-Lösung in ml/h umgerechnet und angegeben. Als Placebo wurde eine isoosmolare Kochsalzlösung in entsprechenden Mengen infundiert. Vor Beginn der Infusion des Studienmedikamentes, 4h und 24h nach Beginn sowie 24h nach Ende der Infusion wurden den Patient\*innen Blutproben abgenommen. Diese wurden dann zu jedem Zeitpunkt mit den schon bei der vorherigen Arbeit beschriebenen Methoden hinsichtlich der Leukozyten-Aktivierungsstadien Rollen, Arrest und Transmigration sowie der Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche untersucht.

Als Ergebnis zeigte sich, dass das leukozytäre Rollen nicht durch Lidocain beeinflusst wird, es aber durch die Lidocain Infusion zu einem reduzierten Arrest 4h und 24h nach Infusionsbeginn kommt. 24h nach Infusionsende war dieser Unterschied nicht mehr nachweisbar. Um diesen Effekt tatsächlich auf die Lidocain-Infusion zurückführen zu können, wurden in einem weiteren Untersuchungsschritt Leukozyten von gesunden Probanden mit drei verschiedenen Lidocain-Konzentrationen inkubiert und ebenfalls hinsichtlich des Arrests untersucht. Die Lidocain-Konzentrationen wurden entsprechend der Bandbreite der in der Verum-Gruppe nachgewiesenen Lidocain-Plasmakonzentrationen gewählt und betragen 1,5, 2, und 3 µg/ml. Dabei zeigte sich eine konzentrationsabhängige Verminderung des Arrests. Auch die Transmigration war bei Lidocain Behandlung 4h und 24h nach Infusionsbeginn erniedrigt und blieb aber, im Gegensatz zum Arrest, auch noch 24h nach Infusionsende niedriger als in der Placebo-behandelten Gruppe. Die Analyse der Expression von L-Selectin, PSGL-1 und LFA-1 an der Zelloberfläche zeigte keine Unterschiede zwischen Placebo und Lidocain. Um den möglichen Mechanismus des beeinflussten Arrestes zu untersuchen, wurden in weiteren Schritten die Aktivierung (Phosphorylierung) der, die für den Arrest relevante LFA-1 Konformitätsänderung herbeiführende Phosphokinase C Theta (PKC-θ) und RAP-1, als ein am intrazellulären Signalweg beteiligtes Enzym untersucht. Sowohl PKC-θ als auch RAP-1 waren bei Lidocain-Behandlung vermindert phosphoryliert. Für die PKC-θ existiert ein spezifischer Inhibitor (Ro-31-8220). Um eine direkte Beeinflussung dieses Signalweges nachzuweisen und Nebeneffekte auszuschließen, wurde der Arrest zusätzlich mit Lidocain,

RO-31 und Lidocain+Ro-31 inkubierten Zellen untersucht. Hier zeigte sich eine vergleichbare Inhibition des Arrestes bei allen drei Varianten. Eine Zugabe von schon aktiviertem RAP-1 war in der Lage diesen Effekt aufzuheben und eine Arresthäufigkeit wie bei Placebo behandelten Zellen wieder herbeizuführen. Diesem Ansatz folgend wurde die Transmigration ebenfalls mit Lidocain, Ro-31 und Lidocain+Ro-31 inkubierten Zellen untersucht. Auch hier zeigte sich die gleiche Verminderung der Transmigration bei allen drei Varianten im Vergleich zu Placebo.

Zusammenfassend zeigen die Erkenntnisse dieser Arbeit, dass Lidocain dosisabhängig den Arrest als auch die Transmigration als Schritte der Aktivierungskaskade neutrophiler Leukozyten in der Sepsis herabsetzt. Als möglicher, an diesem Mechanismus beteiligter Weg konnte eine durch Lidocain hervorgerufene verminderte Aktivierung der PKC- $\theta$  ermittelt werden, welche sowohl bei der Einleitung des Arrests als auch der Transmigration involviert ist.

# Lidocaine Reduces Neutrophil Recruitment by Abolishing Chemokine-Induced Arrest and Transendothelial Migration in Septic Patients

Christian Berger,<sup>1</sup> Jan Rossaint,<sup>1</sup> Hugo Van Aken, Martin Westphal, Klaus Hahnenkamp, and Alexander Zarbock

The inappropriate activation, positioning, and recruitment of leukocytes are implicated in the pathogenesis of multiple organ failure in sepsis. Although the local anesthetic lidocaine modulates inflammatory processes, the effects of lidocaine in sepsis are still unknown. This double-blinded, prospective, randomized clinical trial was conducted to investigate the effect of lidocaine on leukocyte recruitment in septic patients. Fourteen septic patients were randomized to receive either a placebo ( $n = 7$ ) or a lidocaine ( $n = 7$ ) bolus (1.5 mg/kg), followed by continuous infusion (100 mg/h for patients >70 kg or 70 mg/h for patients <70 kg) over a period of 48 h. Selectin-mediated slow rolling, chemokine-induced arrest, and transmigration were investigated by using flow chamber and transmigration assays. Lidocaine treatment abrogated chemokine-induced neutrophil arrest and significantly impaired neutrophil transmigration through endothelial cells by inhibition of the protein kinase C- $\theta$  while not affecting the selectin-mediated slow leukocyte rolling. The observed results were not attributable to changes in surface expression of adhesion molecules or selectin-mediated capturing capacity, indicating a direct effect of lidocaine on signal transduction in neutrophils. These data suggest that lidocaine selectively inhibits chemokine-induced arrest and transmigration of neutrophils by inhibition of protein kinase C- $\theta$  while not affecting selectin-mediated slow rolling. These findings may implicate a possible therapeutic role for lidocaine in decreasing the inappropriate activation, positioning, and recruitment of leukocytes during sepsis. *The Journal of Immunology*, 2014, 192: 367–376.

Sepsis is a major healthcare problem, affecting millions of individuals around the world each year, and is associated with a high morbidity and mortality (1). The immune system combats microbial infections. In severe sepsis, however, circulating bacteria and LPS exposition may lead to an uncontrolled release of proinflammatory cytokines (e.g., TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, and IL-8) from immune cells, including monocytes and macrophages. In response to this cytokine release and bacterial shedding of LPS during the initial phase of sepsis, leukocytes become inappropriately activated, get stuck in the microcirculation, and may subsequently be recruited into different organs, where they can cause tissue damage and organ failure (2). However, sepsis can also be caused by Gram-positive bacteria lacking LPS (3). Interestingly, although the inappropriate activation of leukocytes occurs in the early phase of sepsis, the later stage may be characterized by immune paralysis (4).

The mechanism by which inappropriately activated and recruited leukocytes induce injury is indicated by in vitro studies showing that endotoxin and other proinflammatory mediators directly and potently activate neutrophils to produce elastase (5) and superoxide ions (6). In vitro and in vivo data provide evidence that activated neutrophils may induce considerable endothelial injury via combined action of these agents, probably acting synergistically (7). Neutrophils incubated with endotoxin are capable of causing acute lung injury when reinjected into animals (8). Furthermore, endotoxin primes neutrophils to produce an enhanced respiratory burst in response to a second activating stimulus (9). This priming effect is characterized by the ability of trace amounts of endotoxin to act synergistically in producing lung injury in animals whose neutrophils have been exposed to small amounts of a chemotactic peptide (10). Injection of either agent alone does not cause lung injury in this model, demonstrating that sublethal doses of endotoxin can still provoke significant injury in the presence of other predisposing factors.

Neutrophil migration from the intravascular to the extravascular compartment predominantly occurs in the postcapillary venules, which proceeds in a cascade-like fashion (11–14). The first steps of this cascade are mediated by endothelial P- and E-selectin interacting with their counterreceptor P-selectin glycoprotein ligand (PSGL)-1 on leukocytes (14). Selectin engagement triggers the activation of an intracellular signaling pathway inducing the extended conformation of the  $\beta_2$  integrin LFA-1 (integrin  $\alpha_L\beta_2$ ) on neutrophils (15). The extended conformation of LFA-1 enables the integrin to interact with ICAM-1 on endothelia, and this interaction leads to a reduction of the rolling velocity (14). During slow rolling on endothelial cells, neutrophils are exposed to different chemokines (14). Binding of chemokines to their receptors on neutrophils induces the high-affinity conformation of LFA-1, which mediates neutrophil adhesion to the endothelium. Following adherence, leukocytes require a chemokine gradient to complete the process of

Department of Anesthesiology, Intensive Care and Pain Medicine, University Hospital Münster, 48149 Münster, Germany

<sup>1</sup>C.B. and J.R. contributed equally to this work and share first authorship.

Received for publication May 22, 2013. Accepted for publication October 30, 2013.

This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant ZA428/6-1 (to A.Z.) and by the Innovative Medizinische Forschung, University Münster, Germany (to A.Z.).

Address correspondence and reprint requests to Dr. Alexander Zarbock, Department of Anesthesiology, Intensive Care and Pain Medicine, University Hospital Münster, Albert-Schweitzer-Campus 1, Building A1, 48149 Münster, Germany. E-mail address: zarbock@uni-muenster.de

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: GPCR, G protein-coupled receptor; PKC, protein kinase C; PSGL, P-selectin glycoprotein ligand.

Copyright © 2013 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/13/\$16.00

transmigration. The CXC-family chemokines, including IL-8 (CXCL-8) and growth-related oncogene, attract mainly neutrophils, whereas the C-C chemokines, such as MCP-1, are chemotactic for a variety of leukocytes. The excessive activation of neutrophils by chemokines contributes to uncontrolled leukocyte recruitment and organ damage in critically ill patients during sepsis (2).

The local anesthetic lidocaine has a variety of actions, including modulation of the inflammatory response, in addition to sodium channel blockade to relieve pain (16). *In vivo*, local anesthetics prevent or reduce inflammatory disorders such as reperfusion injury in heart, lung, and brain, as well as endotoxin- or hypoxia-induced pulmonary injury (16). *In vitro*, local anesthetics inhibit cellular functions of neutrophils that mediate early steps of the inflammatory response (16–21). However, the mechanisms behind these potentially beneficial effects of local anesthetics are largely unknown. It is clear that these actions do not result primarily from sodium channel blockade. The putative anti-inflammatory mechanisms of lidocaine and its exact effects on neutrophil recruitment in septic patients are completely unknown. The aim of this double-blinded, prospective, randomized clinical trial was to investigate the effects of lidocaine on neutrophil recruitment in septic patients.

## Materials and Methods

### *Blinded, prospective, randomized clinical trial*

To investigate the effects of lidocaine on the different steps of leukocyte recruitment, we conducted a prospective interventional study in septic patients. This study was approved by the local ethic committee of the University of Münster (Institutional Review Board). Patients were eligible for enrollment if they met all of the following inclusion criteria: 1) early sepsis due to suspected or proven infection and at least two of the following clinical signs of a systemic inflammatory response syndrome: hypothermia ( $\leq 36^\circ\text{C}$ ) or hyperthermia ( $\geq 38^\circ\text{C}$ ); tachycardia ( $\geq 90/\text{min}$ ); tachypnoea ( $\geq 20/\text{min}$ ) and/or  $\text{paCO}_2 \geq 33$  mmHg and/or mechanical ventilation; leucocytosis ( $\geq 12 \times 10^3/\mu\text{l}$ ) or leukopenia ( $\leq 4 \times 10^3/\mu\text{l}$ ); diagnosis of sepsis within the past 24 h; and written informed consent.

Patients were excluded from the study if they met one of the following exclusion criteria: age  $< 18$  y; pregnancy; known or suspected allergy to local anesthetics; severe sinus-atrial, atrial-ventricular, or intraventricular arrhythmias; terminal multiorgan failure; myocardial infarction during the past 3 months; cardiac ejection fraction  $< 35\%$ ; cardiogenic shock; renal replacement therapy or chronic kidney disease; and liver failure with model for end-stage liver disease score  $\geq 30$  (22).

Eligible patients were randomly allocated to either the placebo or lidocaine group. Patients in the lidocaine group received a bolus infusion of 1.5 mg/kg lidocaine (equals 0.075 ml/kg 2% lidocaine solution), followed by a continuous infusion of 100 mg/h lidocaine (equals 5 ml/h) for patients with a body weight  $> 70$  kg or a continuous infusion of 70 mg/h lidocaine (equals 3.5 ml/h) for patients  $< 70$  kg over a period of 48 h. Lidocaine was obtained from Braun (Lidocarb B, Braun 2%; B. Braun, Melsungen, Germany). This preparation contains lidocaine hydrochloride (20 mg/ml) and sodium chloride (94.9  $\mu\text{mol}/\text{ml}$ ) in aqueous solution. To avoid critically high plasma levels of lidocaine if patients suffered from acute kidney injury (glomerular filtration rate  $< 50$  ml/h) or received amiodarone,  $\beta$ -receptor antagonists, or norepinephrine at dosages  $> 0.2$   $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ , the continuous infusion of the study medication was decreased to 40 mg/h lidocaine (equals 2 ml/h) for patients with a body weight  $> 70$  kg or a continuous infusion of 20 mg/h lidocaine (equals 1 ml/h) for patients  $< 70$  kg. Control patients received a bolus of 0.075 ml/kg saline, followed by a continuous infusion of 5 ml/h saline over a period of 48 h; continuous infusion rates were reduced as specified for the study medication. Heparinized whole-blood samples and plasma samples were obtained from patients before administration of the study medication, 4 and 24 h after starting the study medication and 24 h after the cessation of the study medication.

### *Reagents*

Unless otherwise stated, all reagents were obtained from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany).

### *Blood-perfused human microflow chamber*

To investigate selectin-mediated slow neutrophil rolling, we used a whole-blood perfused human flow chamber system, as described previously (15,

23). Briefly, glass capillaries were coated with E-selectin (3.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; R&D Systems, Minneapolis, MN), P-selectin (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; R&D Systems), E-selectin/ICAM-1 (3.5/3.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; R&D Systems), or P-selectin/ICAM-1 (20/5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; R&D Systems) for 2 h. Chambers were blocked with 1% casein (Fisher Scientific, Waltham, MA) for 1 h and afterwards perfused with heparinized whole-blood samples at a constant shear stress of 5–6 dynes/cm<sup>2</sup>. It has been demonstrated that  $> 90\%$  of rolling cells in this system are neutrophils (15).

To investigate chemokine-induced arrest of neutrophils, flow chambers were coated with P-selectin (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), ICAM-1 (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), and IL-8 (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; PeproTech, Rocky Hill, NJ), or P-selectin and ICAM-1 as a control. The flow chambers were perfused with whole blood at a constant shear stress of 5–6 dynes/cm<sup>2</sup> for 2 min, and, subsequently, the number of rolling and adherent cells per field of view was determined and the ratio of adherent to rolling cells was calculated.

### *In vitro transmigration assay*

The transendothelial migration of isolated human neutrophils through a monolayer of cultured HUVECs was performed, as described previously (24). Briefly, 6.5-mm Transwell filters (Corning Life Sciences, Corning, NY) were coated with fibronectin (0.01%) for 1 h. HUVECs were seeded into the wells and grown to confluence for 2 d. HUVECs were stimulated with TNF- $\alpha$  (5 nM; PeproTech) for 16 h. Human neutrophils were isolated from whole blood by Histopaque density centrifugation, resuspended in control plasma or plasma obtained from placebo- or lidocaine-treated septic patients at different time points, and incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 30 min. The neutrophils were applied on top of each Transwell filter, and transmigration was allowed for 30 min, after which the number of transmigrated cells in the outer well was counted. To enforce transmigration, IL-8 (100 ng/ml; PeproTech) was added to the media in the outer well.

### *FACS analysis of neutrophils from human whole blood*

The surface expression of neutrophil surface adhesion molecules on neutrophils was analyzed by flow cytometry. Human neutrophils were incubated with different Abs (anti-human PSGL-1 Ab, clone KPL-1, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ; anti-human LFA-1 Ab, clone MEM-25, ImmunoTools, Friesoythe, Germany; anti-human L-selectin Ab, clone LT-TD180, ImmunoTools) for 20 min. Samples were analyzed on a FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences). FACS data were processed using FlowJo (version 7.5.5; Tree Star, Ashland, OR). Neutrophils were identified by their typical appearance in the forward light scatter/side light scatter plot. In separate experiments, isolated donor neutrophils were incubated with plasma obtained from healthy control volunteers or septic patients treated with placebo or lidocaine, and the conformational activation of  $\beta_2$  integrins was investigated using the reporter Ab mAb24 in flow cytometry analysis.

### *Western blotting*

Western blot analysis from isolated human neutrophils was performed, as described previously (25). Following stimulation, cells were lysed using radioimmunoprecipitation assay buffer (25). Lysate was boiled with Laemmli sample buffer at  $95^\circ\text{C}$  for 10 min, run on a 10% SDS-PAGE gel, and immunoblotted with Abs against total PKC- $\theta$  and phospho-PKC- $\theta$  (pThr<sup>538</sup>; Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Blots were developed using the Amersham ECL Prime detection system (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

### *Rap1 activation assay*

To investigate Rap1 activation, isolated human neutrophils were stimulated with IL-8 and immediately lysed with EDTA-free ice-cold lysis buffer (25). Detection of GTP-bound Rap1 (Rap1-GTP) in lysates was performed by Rap1-GTP pulldown. Briefly, Rap1-GTP was precipitated from lysates using GST-Ral beads. Precipitated proteins were separated using a 10% SDS-PAGE gel and transferred to nitrocellulose membranes. To determine the level of total Rap1, a small portion of the cell lysate was mixed with SDS sample buffer and separated by 10% SDS-PAGE. Rap1 was detected with a rabbit polyclonal Ab.

### *Measurement of IL-8 plasma levels*

IL-8 in patient plasma samples was analyzed by ELISA, according to the manufacturer's instructions (R&D Systems).

### *Statistical analysis*

The power analysis on the required patient group size was performed with G\*Power software (G\*Power 3.1.7 by Axel Buchner, University of

Duesseldorf). Based on preliminary in vitro experiments showing a completely abolished chemokine-induced arrest of neutrophils after lidocaine treatment, we expected a strong effect size. For the clinical trial, we used an effect size of 0.8 and an  $\alpha$ -error probability of 0.05 and calculated a required group size of  $n = 7$  patients with an actual power of 0.8029. The study population is described by absolute and relative frequencies, mean and SE, where appropriate. Statistical analysis was performed with SPSS 21 (IBM SPSS Statistics for Windows, version 21.0; IBM, Armonk, NY) using Student-Newman-Keuls test, post hoc correction, or  $t$  test, where appropriate. More than two groups were compared using one-way ANOVA. Continuous variables lacking normality were tested using Mann-Whitney  $U$  tests. All data are represented as means  $\pm$  SEM. A  $p$  value  $< 0.05$  was considered as statistically significant.

## Results

### Lidocaine does not affect selectin-mediated slow neutrophil rolling

Demographic variables, vital parameters, renal function, infectious parameters, hepatic function, and vasopressor use did not differ significantly between the groups (Tables I, II). Details on the primary site of infection and isolated pathogens are provided in Table III. In patients of the lidocaine-treated group, the plasma levels of lidocaine averaged  $1.7 \pm 0.15 \mu\text{g/ml}$  and  $2.2 \pm 0.28 \mu\text{g/ml}$  at 4 and 24 h after initiation of lidocaine administration, respectively.

To investigate the effect of lidocaine on selectin-mediated slow neutrophil rolling, we used a previously published flow chamber system (15, 23). The flow chamber system has the advantage that neutrophil rolling behavior can be investigated in whole blood without isolating neutrophils. This is important, because it has been demonstrated that the isolation process might alter the activation status and rolling ability of neutrophils (26–28). Before administering the study medication, neutrophils from both patient groups showed the same rolling velocity on E-selectin or P-selectin alone and a reduction of the rolling velocity on E-selectin or P-selectin in the presence of the LFA-1 ligand ICAM-1 (Fig. 1A, 1B). Lidocaine did not alter the rolling velocity on P-selectin or E-selectin alone or in combination with ICAM-1 compared with the treatment with saline 4 and 24 h after starting the study medication and 24 h after the cessation of the study medication (Fig. 1C–H), showing that lidocaine treatment does not affect slow neutrophil rolling in septic patients.

### Lidocaine reduces chemokine-induced neutrophil arrest

Neutrophils interacting with inflamed vascular endothelial cells are exposed to chemokines presented by the vascular endothelium (29). Binding of chemokines to G protein-coupled receptors (GPCRs) on neutrophils induces an intracellular signaling cascade leading to the transition of LFA-1 to the high-affinity conformation that induces neutrophil adhesion (30). The chemokine IL-8, which is

Table I. Demographic patient data

	Placebo	Lidocaine	$p$ Value
No. of patients	7	7	
Gender (male/female)	6/1	4/3	
Age (y)	$57.0 \pm 3.5$	$60.7 \pm 6.3$	0.617
Body weight (kg)	$76.5 \pm 7.0$	$76.9 \pm 3.7$	0.962
APACHE II	$31.7 \pm 3.4$	$35.5 \pm 2.2$	0.383
SOFA	$8.4 \pm 1.5$	$11.0 \pm 1.5$	0.259
SAPS II	$55.1 \pm 8.0$	$59.9 \pm 4.9$	0.626
MELD	$14.1 \pm 2.9$	$11.4 \pm 1.4$	0.421

Values are presented as mean  $\pm$  SEM or numbers of patients.

APACHE, Acute physiology and chronic health evaluation score; MELD, model for end-stage liver disease score; SAPS, simplified acute physiology score; SOFA, sequential organ failure assessment score.

Table II. Clinical patient data

	Placebo	Lidocaine	$p$ Value
Vital parameters			
Heart rate (1/min)	$114.7 \pm 5.7$	$120.0 \pm 8.0$	0.602
Respiratory rate (1/min)	$26.0 \pm 3.8$	$31.7 \pm 2.0$	0.176
paCO <sub>2</sub> (mmHg)	$47.1 \pm 8.1$	$48.0 \pm 3.9$	0.923
Body temperature (°C)	$38.6 \pm 0.2$	$38.7 \pm 0.3$	0.892
Renal function			
Creatinine (mg/dl)	$1.34 \pm 0.2$	$1.2 \pm 0.3$	0.684
Urea (mg/dl)	$38.0 \pm 6.4$	$27.9 \pm 7.3$	0.317
Urine production (ml/d)	$1673 \pm 396$	$1543 \pm 493$	0.842
Inflammatory markers			
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	$16.7 \pm 2.1$	$17.6 \pm 2.8$	0.794
CRP (mg/dl)	$19.6 \pm 3.4$	$21.5 \pm 5.1$	0.759
IL-6 (pg/ml)	$623 \pm 288$	$514 \pm 486$	0.845
PCT (ng/ml)	$4.9 \pm 2.3$	$6.8 \pm 3.7$	0.680
Hepatic function			
Bilirubin (mg/dl)	$3.9 \pm 1.8$	$0.8 \pm 0.2$	0.116
AST (U/l)	$58.6 \pm 11.9$	$54.0 \pm 17.9$	0.830
ALT (U/l)	$88.6 \pm 47.0$	$53.7 \pm 21.9$	0.514
$\gamma$ -GT (U/l)	$134.0 \pm 21.4$	$192.3 \pm 104.2$	0.594
Vasopressors			
Patients requiring vasopressor therapy	6/7	6/7	
Epinephrine ( $\mu\text{g/kg/min}$ )	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	—
Norepinephrine ( $\mu\text{g/kg/min}$ )	$0.229 \pm 0.087$	$0.373 \pm 0.142$	0.403
Vasopressin	$0.257 \pm 0.257$	$0 \pm 0$	0.337
Dobutamine	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	—

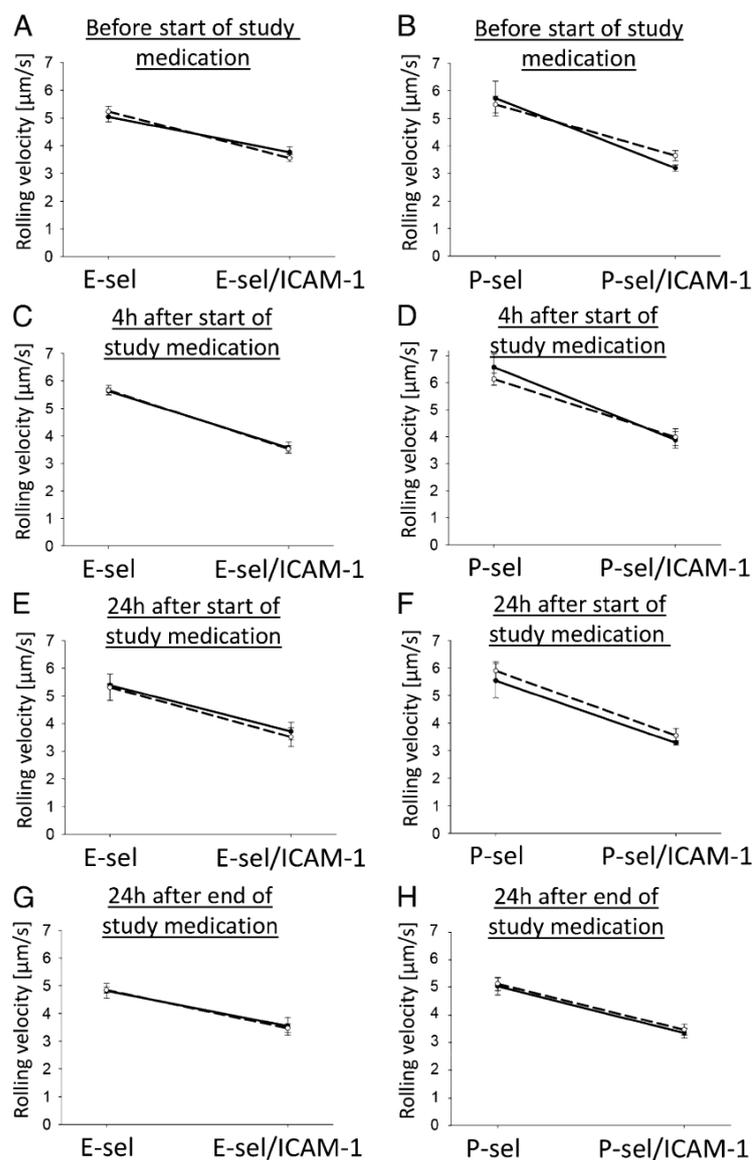
Values are presented as mean  $\pm$  SEM or numbers of patients.

ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; CPR, C-reactive protein;  $\gamma$ -GT,  $\gamma$ -glutamyltransferase; PCT, procalcitonin.

upregulated in the blood of septic patients, binds to the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 on human neutrophils. The mean IL-8 plasma levels were  $914 \pm 257 \text{ pg/ml}$  in patients in the placebo group and  $989 \pm 339 \text{ pg/ml}$  in patients in the lidocaine group (Supplemental Fig. 1) ( $p > 0.05$ ). The mean IL-8 plasma levels decreased in both groups in the course of the diseases, with no significant differences between the groups (Supplemental Fig. 1). To investigate neutrophil arrest in whole-blood samples from septic patients, we used a separate set of flow chambers coated with P-selectin/ICAM-1/IL-8 or P-selectin/ICAM-1 as a control

Table III. Primary site of infection and isolated pathogens

	Placebo	Lidocaine
Primary site of infection		
Pneumonia	3/7	3/7
Peritonitis	2/7	2/7
Urinary tract infection	1/7	1/7
Catheter infection	1/7	
Unknown		1/7
Infectious pathogen		
<i>S. aureus</i>		1/7
<i>S. epidermidis</i>	2/7	
<i>E. faecalis</i>	1/7	
<i>E. coli</i>		2/7
<i>S. maltophilia</i>	1/7	
<i>S. marcescens</i>	1/7	
<i>S. capitis</i>		1/7
<i>P. aeruginosa</i>		2/7
<i>K. pneumoniae</i>		2/7
<i>K. oxytoca</i>		2/7
<i>C. albicans</i>	1/7	1/7
<i>C. lusitanae</i>	1/7	
<i>C. glabrata</i>		1/7
No pathogen isolated	3/7	1/7

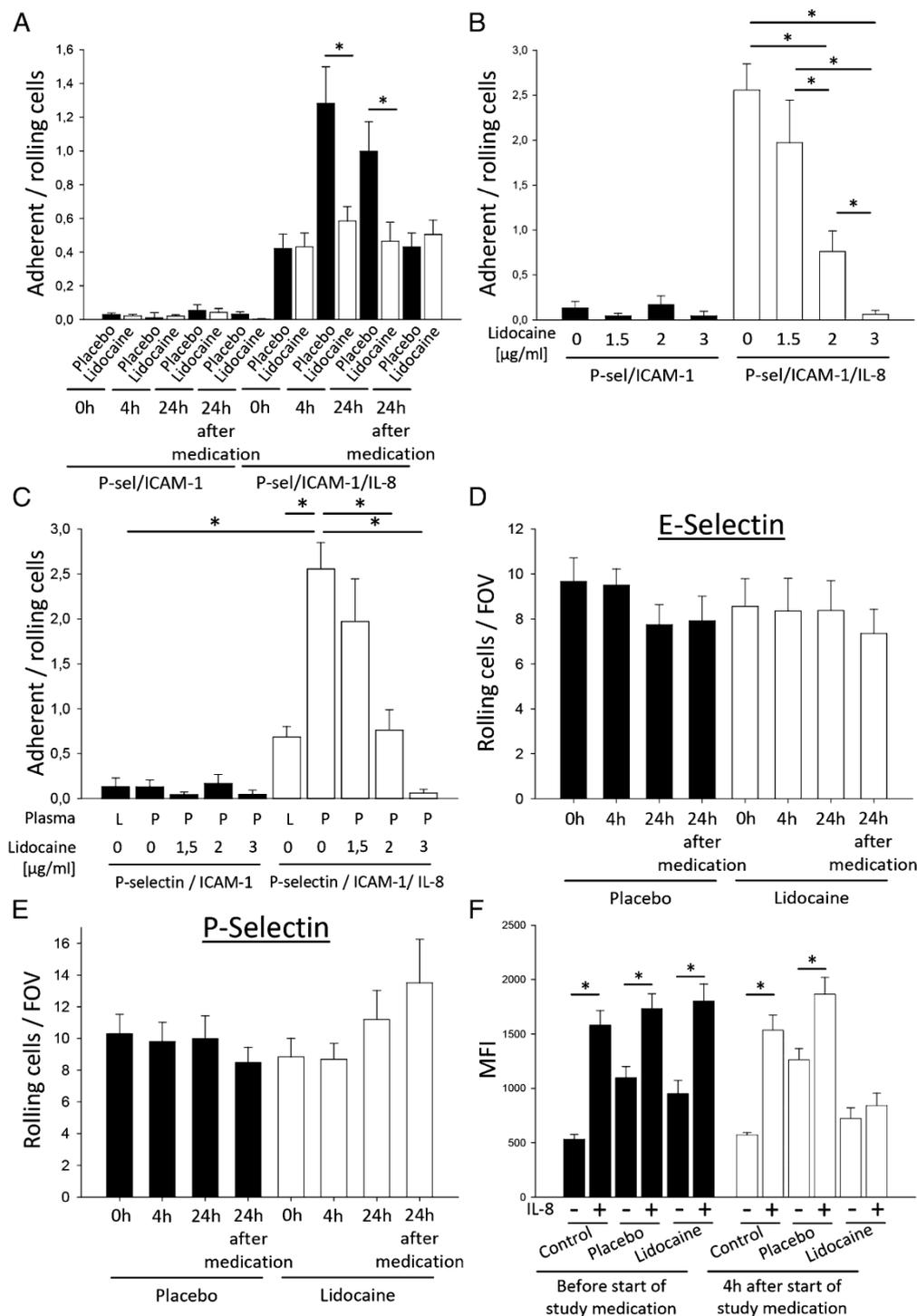


**FIGURE 1.** Lidocaine does not affect selectin-mediated slow neutrophil rolling. The neutrophil rolling velocity in whole blood from patients treated with placebo (dashed line) or lidocaine (straight line) was analyzed before starting the study medication (**A, B**), 4 h (**C, D**), and 24 h (**E, F**) after starting the study medication, and 24 h after stopping the study medication (**G, H**) using microflow chambers coated with E-selectin or P-selectin alone and in combination with ICAM-1. The average rolling velocity of neutrophils is presented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 7$  patients). The wall shear stress in all flow chamber experiments was 5–6 dynes/cm<sup>2</sup>.

(31). The ratio of adherent to rolling cells was similar in the placebo and lidocaine group prior to administration of study medication (Fig. 2A). Neutrophil arrest significantly increased during the acute phase of sepsis in placebo-treated patients 4 h after starting the study medication, with a decline at 24 h and a return to baseline values 24 h after stopping the study medication (Fig. 2A). Lidocaine strongly inhibited the increase of chemokine-induced neutrophil arrest at 4 and 24 h after starting the study medication (Fig. 2A). To confirm that the observed reduction of chemokine-induced arrest is solely due to the effect of lidocaine on neutrophils, we conducted flow chamber experiments with healthy donor neutrophils incubated with different doses of lidocaine, which were similar to the levels measured in septic patients after treating with lidocaine. Untreated neutrophils showed the expected increase in the ratio of adherent to rolling cells in flow chambers coated with P-selectin/ICAM-1/IL-8 compared with flow chambers coated with P-selectin/ICAM-1 alone (Fig. 2B). Pretreatment of neutrophils with lidocaine caused a dose-dependent

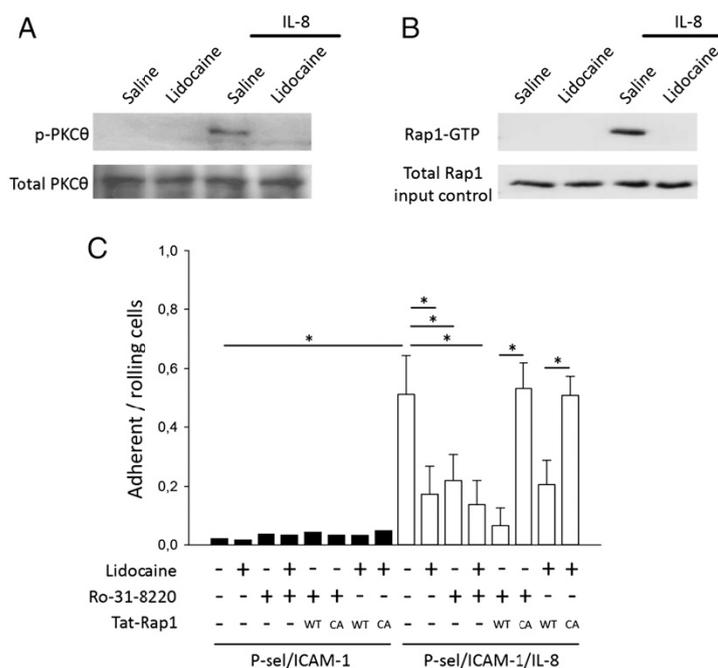
decrease of chemokine-induced arrest, with a nearly complete inhibition of chemokine-induced arrest at lidocaine concentration of 3  $\mu$ g/ml (Fig. 2B).

To clarify whether lidocaine directly affects chemokine-induced arrest of neutrophils and to exclude potential confounding effects on plasma composition in patients from the lidocaine group, we incubated isolated neutrophils from healthy donors with plasma obtained from septic patients from the placebo group and added lidocaine at different concentrations in vitro. Lidocaine showed a dose-dependent inhibition of chemokine-induced arrest (Fig. 2C). Substitution of lidocaine at 2  $\mu$ g/ml inhibited chemokine-induced arrest of neutrophils to the same degree as pretreatment with plasma obtained from septic patients 4 h after initiation of lidocaine administration. In accordance with this finding, the mean lidocaine levels in patients were  $1.7 \pm 0.15$   $\mu$ g/ml and  $2.2 \pm 0.28$   $\mu$ g/ml at 4 and 24 h after initiation of lidocaine administration, respectively. In the control group, lidocaine levels in the blood were not detectable.



**FIGURE 2.** Lidocaine reduces chemokine-induced neutrophil arrest. **(A)** The chemokine-induced neutrophil arrest was investigated using the flow chamber assay. Flow chambers coated with P-selectin/ICAM-1 or P-selectin/ICAM-1/IL-8 were perfused with whole blood obtained from patients treated with placebo (black bars) or lidocaine (white bars) before starting the study medication, 4 and 24 h after starting the study medication, and 24 h after stopping the study medication. The ratio of adherent to rolling cells was calculated 2 min after starting the perfusion of the chamber with whole blood at a constant wall shear stress of 5–6 dynes/cm<sup>2</sup> (*n* = 7 patients). **(B)** Isolated donor neutrophils were pretreated with lidocaine, and chemokine-induced neutrophil arrest was investigated using the flow chamber assay (*n* = 4 experiments). **(C)** Isolated neutrophils from healthy volunteers were incubated with plasma from placebo-treated (P) or lidocaine-treated (L) patients and with different lidocaine concentrations. Chemokine-induced neutrophil arrest was investigated using the flow chamber assay (*n* = 3 experiments). **(D)** and **(E)** Flow chambers coated with E-selectin (**D**) or P-selectin (**E**) were perfused with whole blood obtained from patients treated with placebo (black bars) or lidocaine (white bars) before starting the study (Figure legend continues)

**FIGURE 3.** Lidocaine inhibits phosphorylation of PKC- $\theta$ . **(A)** The phosphorylation of PKC- $\theta$  was analyzed by Western blot. Neutrophils were isolated from whole blood of healthy volunteers and preincubated with saline or lidocaine before stimulation with IL-8. Lysates were prepared and immunoblotted with Abs against phosphorylated PKC- $\theta$  (phospho-PKC- $\theta$  [Thr<sup>538</sup>]) or total PKC- $\theta$  (exemplary blot of three experiments). **(B)** The activation of Rap1 was analyzed by GTP-pulldown assays. Neutrophils were isolated from whole blood of healthy volunteers and preincubated with saline or lidocaine before stimulation with IL-8. GTP-bound Rap1 was precipitated from lysates using Ral-GST beads and immunoblotted with Abs against total Rap1 (exemplary blot of three experiments). **(C)** Chemokine-induced neutrophil arrest was investigated using the flow chamber assay. Flow chambers coated with P-selectin/ICAM-1 or P-selectin/ICAM-1/IL-8 were perfused with isolated donor neutrophils that were pretreated with lidocaine and/or Ro-31-8220. In a separate set of experiments, lidocaine- or Ro-31-8220-pretreated neutrophils were incubated with wild-type (WT) or constitutively active (CA) Tat-Rap1 fusion proteins ( $n = 4$  experiments). \* $p < 0.05$ .



To exclude a possible effect of the total number of rolling cells on the observed effects, we determined the capturing capacity of neutrophils in whole-blood samples from both patient groups in flow chambers coated with E-selectin or P-selectin alone. There was no significant difference in the capturing capacity, measured as the total number of rolling neutrophils per field of view after 2 min between both study groups at the different time points (Fig. 2D, 2E).

To directly investigate the effect of lidocaine treatment on the conformational activation of LFA-1, we incubated healthy donor neutrophils with control plasma or plasma obtained from placebo- or lidocaine-treated patients before and 4 h after starting the study medication. The high-affinity conformation, which mediates chemokine-induced arrest, is selectively recognized by the reporter Ab mAb24 (32). Incubation of donor neutrophils with plasma obtained from lidocaine-treated patients 4 h after starting the study medication significantly decreased binding of the reporter Ab mAb24 both under baseline conditions and following stimulation with IL-8 (Fig. 2F). These data demonstrate that lidocaine inhibits the chemokine-induced conformational change of LFA-1 from the resting to the high-affinity state and thus inhibits neutrophil arrest.

#### Lidocaine inhibits phosphorylation of protein kinase C- $\theta$

Protein kinase C (PKC)- $\theta$  is involved in T cell activation via regulating the avidity of the  $\beta_2$  integrin LFA-1 in the immunological synapse (33). Western blot analysis showed that PKC- $\theta$  in neutrophils is phosphorylated after stimulation with IL-8 (Fig. 3A). Pretreatment with lidocaine abolished PKC- $\theta$  phosphorylation. The small GTPase Rap1 is a downstream effector of chemokine signaling in neutrophils. Rap1 is activated following IL-8 stimulation in neutrophils (Fig. 3B). Lidocaine pretreatment inhibited Rap1 activation. To investigate the functional conse-

quence of reduced PKC- $\theta$  activation by lidocaine pretreatment on chemokine-induced arrest, we performed flow chamber assays. Pretreatment with lidocaine or the PKC inhibitor Ro-31-8220 significantly reduced chemokine-induced arrest (Fig. 3C). The combined pretreatment of neutrophils with lidocaine and Ro-8320 did not show an additive effect, indicating that lidocaine abolishes chemokine-induced arrest by inhibiting PKC- $\theta$  activation. Pretreatment of neutrophils with lidocaine or Ro-31-8220 and a constitutively active Tat-Rap1 fusion protein restored chemokine-induced arrest, whereas pretreatment with a wild-type Tat-Rap1 fusion protein as a control did not reverse the inhibition of chemokine-induced arrest (Fig. 3C).

#### The expression of neutrophil surface adhesion molecules is not altered by lidocaine

Alterations of neutrophil-rolling behavior and chemokine-induced arrest may be attributable to changes in the expression pattern of surface adhesion molecules on the surface of neutrophils (34–36). To investigate whether the observed effect of lidocaine treatment on chemokine-induced arrest may be due to changes in the expression of adhesion molecules on the surface of neutrophils, we analyzed the surface expression of different important adhesion molecules, including PSGL-1, LFA-1, and L-selectin. There was no significant difference in the surface expression of PSGL-1 (Fig. 4A), LFA-1 (Fig. 4B), and L-selectin (Fig. 4C) between the two groups before and after administration of study medication as well as 24 h after cessation of the study medication.

#### Lidocaine abolishes transmigration of neutrophils

After arresting on the inflamed vascular endothelium, neutrophils leave the vessel by transmigration into the surrounding tissue,

medication, 4 and 24 h after starting the study medication, and 24 h after stopping the study medication. The number of rolling cells was analyzed 2 min after starting the perfusion of the chamber with whole blood ( $n = 7$  patients). **(F)** To directly investigate the high affinity conformational of the integrin LFA-1, donor neutrophils were incubated with plasma obtained from placebo- or lidocaine-treated patients before and 4 h after starting the study medication. The binding of the reporter Ab mAb24 was analyzed by flow cytometry ( $n = 4$  experiments). \* $p < 0.05$ .

where they participate in tissue damage and organ dysfunction during sepsis (14). To investigate the effect of lidocaine on transmigration, we used an *in vitro* transmigration assay with TNF- $\alpha$ -stimulated HUVECs (24, 31). Healthy donor neutrophils were preincubated with control plasma or plasma obtained from placebo- or lidocaine-treated septic patients. Neutrophils incubated with plasma from both patient groups obtained before the administration of the study medication showed a significantly higher transmigration rate compared with neutrophils incubated with plasma from healthy volunteers (Fig. 5A). However, the transmigration rate of neutrophils incubated with plasma from septic patients treated with lidocaine significantly decreased compared with the transmigration rate of neutrophils incubated with plasma from septic patients treated with saline (Fig. 5A). Astonishingly, incubating neutrophils with plasma from septic patients obtained 24 h after cessation of lidocaine infusion significantly reduced the neutrophil transmigration rate compared with the incubation of neutrophils with plasma from septic patients obtained 24 h after cessation of saline infusion (Fig. 5A). Western blot analysis showed that PKC- $\theta$  is phosphorylated in neutrophils that transmigrated through a HUVEC monolayer *in vitro* (Fig. 5B). Pretreatment of neutrophils with lidocaine or Ro-31-8220 significantly reduced transmigration (Fig. 5C). The combined pretreatment of neutrophils with lidocaine and Ro-31-8220 did not show any additive effect (Fig. 5C). To investigate whether lidocaine directly affects transmigration of neutrophils and to exclude potential confounding effects due to an indirect action of lidocaine on plasma, we incubated isolated neutrophils from healthy donors with plasma from septic patients and added lidocaine (2  $\mu$ g/ml) or saline as a control. The addition of lidocaine and plasma from septic patients to donor neutrophils caused a significant reduction in transendothelial migration compared with donor neutrophils incubated with plasma from septic patients

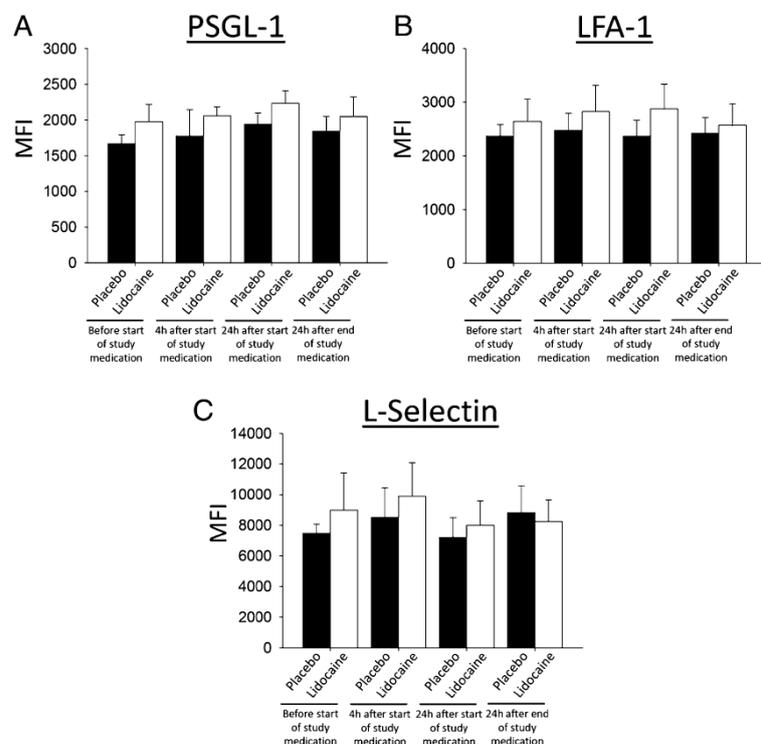
and saline. These data show that lidocaine directly reduces neutrophil transendothelial migration (Fig. 5D).

## Discussion

Sepsis is a major challenge in intensive care patients and largely contributes to the high morbidity and mortality in these patients (1). The uncontrolled systemic activation of immune cells, for example, due to circulating proinflammatory mediators, causes inappropriate activation and recruitment of leukocytes into peripheral tissues, followed by extensive tissue injury, a process that may ultimately lead to the organ dysfunction (37). Several laboratory and clinical strategies have been employed to diminish the uncontrolled systemic inflammation during sepsis. However, none have proven efficient to this date.

The aim of this study was to investigate the effects of systemic lidocaine application on the different steps of the leukocyte recruitment cascade, including selectin-mediated slow neutrophil rolling, chemokine-induced arrest, and transmigration in septic patients. Using flow chamber assays and flow cytometry analysis, we were able to demonstrate that lidocaine does not affect neutrophil slow rolling, but inhibits chemokine-induced arrest by inhibiting the affinity upregulation of the  $\beta_2$  integrin LFA-1. In addition, we provided evidence that lidocaine inhibits transendothelial migration. We identified the inhibition of PKC- $\theta$  activation as the molecular mechanism by which lidocaine inhibits chemokine-induced arrest and transmigration of neutrophils.

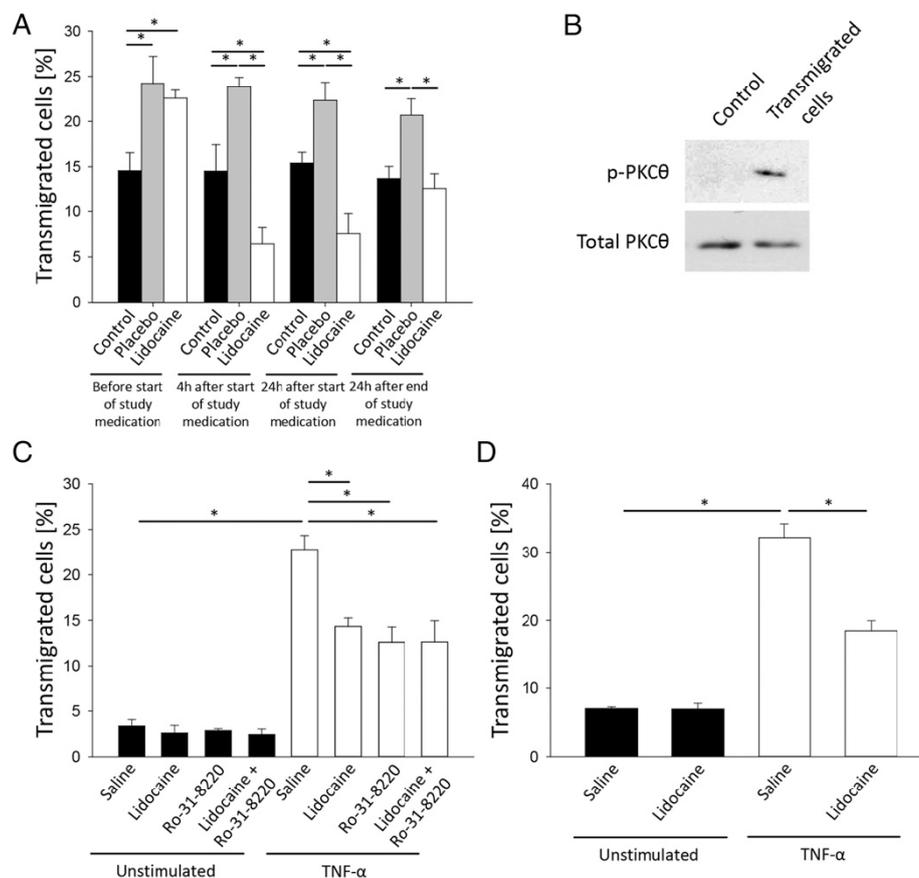
Several studies have indicated an anti-inflammatory effect of lidocaine (16). In this context, it has been shown that lidocaine suppresses superoxide release from stimulated neutrophils (38, 39). As superoxide production relies on integrin-mediated outside-in signaling and GPCR function (40, 41), these data go along with our results indicating an inhibitory role of lidocaine in chemokine-induced activation of the integrin LFA-1 and leukocyte arrest. In



**FIGURE 4.** The expression of neutrophil surface adhesion molecules is not altered by lidocaine. Surface adhesion molecules on human neutrophils obtained from patients treated with placebo (black bars) or lidocaine (white bars) were stained with fluorescently labeled Abs, and the surface expression was analyzed by flow cytometry. The mean fluorescence intensity (MFI) as a measure for surface expression of PSGL-1 (**A**), LFA-1 (**B**), and L-selectin (**C**) was quantified ( $n = 7$  patients).

374

LIDOCAINE ABROGATES LEUKOCYTE RECRUITMENT



**FIGURE 5.** Lidocaine abolishes transmigration of neutrophils. **(A)** Neutrophils isolated from whole-blood samples obtained from healthy volunteers were treated with control plasma (black bars) or plasma obtained from patients treated with placebo (gray bars) or lidocaine (white bars) at 37°C for 30 min. Neutrophil transmigration through a confluent, TNF- $\alpha$ -stimulated HUVEC monolayer was allowed for 30 min. Afterwards, the number of transmigrated neutrophils was determined ( $n = 3$  experiments). **(B)** The phosphorylation of PKC- $\theta$  was analyzed by Western blot. Lysates were prepared from neutrophils after transmigration through a HUVEC monolayer and not-transmigrated control neutrophils and immunoblotted with Abs against phosphorylated PKC- $\theta$  (phospho-PKC- $\theta$  [Thr<sup>538</sup>]) or total PKC- $\theta$  (exemplary blot of three experiments). **(C)** Isolated neutrophils from healthy volunteers were treated with saline, lidocaine, Ro-31-8220, or lidocaine and Ro-31-8220, and the number of transmigrated neutrophils through an unstimulated or TNF- $\alpha$ -stimulated HUVEC monolayer was determined ( $n = 3$  experiments). **(D)** Isolated neutrophils from healthy volunteers were treated with plasma from lidocaine-treated patients and with saline or lidocaine, and the number of transmigrated neutrophils was determined ( $n = 3$  experiments). \* $p < 0.05$ .

addition, lidocaine has been reported to ameliorate several inflammatory conditions in vivo, including cardiac reperfusion injury and endotoxin- or hypoxia-induced pulmonary injury (16). However, these studies did not address the question how lidocaine suppresses leukocyte recruitment into the inflamed tissue.

Lidocaine at mean levels of 1.7  $\mu\text{g/ml}$  in the blood of septic patients blocked neutrophil arrest and transmigration. The arrest was induced by coating the flow chamber with IL-8, a chemokine that is upregulated in the blood of septic patients (42). IL-8 binds to chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 on human neutrophils and induces integrin activation, neutrophil arrest, and neutrophil transmigration (43, 44). Blocking these receptors prevents the activation of different signaling molecules, including PKC, the upregulation of integrin affinity, neutrophil arrest, and transmigration (43). Our in vitro experiments in which human neutrophils were incubated with plasma from septic patients treated with lidocaine showed that this plasma reduced neutrophil arrest and transmigration compared with plasma from septic patients treated with saline. It could be that lidocaine attenuates neutrophil recruitment by altering the chemokine homeostasis and/or inhibiting intracellular signaling in neutrophils. However,

our in vitro experiments in which the human neutrophils were preincubated with different concentrations of lidocaine suggest that lidocaine directly affects intracellular signaling following GPCR engagement. These data are in agreement with experiments showing that local anesthetics inhibit the activation of phospholipase D in the neutrophil-like human promyelocytic leukemia HL60 cell line and PKC in human neutrophils (45, 46). When reviewing these data together, it is most likely that lidocaine abolishes leukocyte arrest and transmigration by antagonizing GPCR signaling. By using Western blot analysis, flow chamber, and transmigration assays, we demonstrate that lidocaine affects GPCR signaling by inhibition of PKC- $\theta$  activation, leading to abolished adhesion and transmigration of neutrophils. Future studies have to address the question whether lidocaine reduces the release of proinflammatory mediators and/or increases the release of anti-inflammatory mediators, which are also released during inflammation (47). Recent studies showed that this mechanism is very important in limiting inflammation (48).

Although being of crucial importance, the chemokine-induced activation of neutrophil integrins is not the only prerequisite for leukocyte recruitment into peripheral tissues. The activation of

endothelial cells and the expression of adhesion molecules on endothelial cells may also influence leukocyte recruitment (14). Based on our experiments, we cannot exclude that lidocaine may also have an effect on vascular endothelial cells in septic patients. The available evidence for modulating the inflammatory response through the interaction of lidocaine with endothelial cells is limited. Lidocaine does not modulate the blood-aqueous permeability of the endothelium after intraocular injection in humans (49). In another study, lidocaine did not affect the mRNA transcription of proinflammatory gene, for example, E-selectin, in an equine laminitis model (50). Although these results go along with the assumption that the anti-inflammatory properties of lidocaine do not include modulation of the inflammatory response in vascular endothelial cells, the available data on this topic are not sufficient to completely exclude this possibility.

The lung is frequently one of the first organs affected during systemic inflammatory processes. Due to its unique microvasculature, the molecular mechanisms involved in neutrophil recruitment into the lung differ compared with other organs (51). Chemokine signaling plays a dominant role for neutrophil recruitment into the lung tissue, whereas selectins are only of minor importance in response to most inflammatory stimuli in the lung. However, as the mechanisms of neutrophil recruitment into the lung vary with different insults and may not necessarily require  $\beta_2$  integrins, it is uncertain whether the inhibitory effects of lidocaine treatment would be more pronounced in this organ or not.

Our study has some limitations that we would acknowledge. If lidocaine inhibits chemokine-induced arrest and transendothelial migration, the systemic application during the acute phase of sepsis in patients may have an influence on the course of the disease. However, the number of intensive care patients included in this study was not sufficient to detect significance differences in clinical outcome parameters, for example, mortality and length of stay on the intensive care unit. Another limitation is that we could not investigate the effect of lidocaine on endothelial cells under septic conditions.

In conclusion, this blinded, prospective, randomized clinical trial demonstrates that lidocaine modulates inflammation in septic patients by decreasing chemokine-induced neutrophil arrest and transendothelial migration by inhibition of PKC- $\theta$  activation. These findings may give rise to further research to investigate the effects of lidocaine treatment during the course of sepsis in critically ill patients.

## Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

## References

- Dellinger, R. P., M. M. Levy, J. M. Carlet, J. Bion, M. M. Parker, R. Jaeschke, K. Reinhart, D. C. Angus, C. Brun-Buisson, R. Beale, et al; International Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee; American Association of Critical-Care Nurses; American College of Chest Physicians; American College of Emergency Physicians; Canadian Critical Care Society; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; European Society of Intensive Care Medicine; European Respiratory Society; International Sepsis Forum; Japanese Association for Acute Medicine; Japanese Society of Intensive Care Medicine; Society of Critical Care Medicine; Society of Hospital Medicine; Surgical Infection Society; World Federation of Societies of Intensive and Critical Care Medicine. 2008. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit. Care Med.* 36: 296–327.
- de Jong, H. K., T. van der Poll, and W. J. Wiersinga. 2010. The systemic pro-inflammatory response in sepsis. *J. Innate Immun.* 2: 422–430.
- Lappin, E., and A. J. Ferguson. 2009. Gram-positive toxic shock syndromes. *Lancet Infect. Dis.* 9: 281–290.
- Sriskandan, S., and D. M. Altmann. 2008. The immunology of sepsis. *J. Pathol.* 214: 211–223.
- Smedly, L. A., M. G. Tonnesen, R. A. Sandhaus, C. Haslett, L. A. Guthrie, R. B. Johnston, Jr., P. M. Henson, and G. S. Worthen. 1986. Neutrophil-mediated injury to endothelial cells: enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase. *J. Clin. Invest.* 77: 1233–1243.
- Boueiz, A., and P. M. Hassoun. 2009. Regulation of endothelial barrier function by reactive oxygen and nitrogen species. *Microvasc. Res.* 77: 26–34.
- Seeley, E. J., M. A. Matthay, and P. J. Wolters. 2012. Infection points in sepsis biology: from local defense to systemic organ injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 303: L355–L363.
- Welsh, C. H., D. C. Lien, G. S. Worthen, P. M. Henson, and J. V. Weil. 1989. Endotoxin-pretreated neutrophils increase pulmonary vascular permeability in dogs. *J. Appl. Physiol.* 66: 112–119.
- Forehand, J. R., M. J. Pabst, W. A. Phillips, and R. B. Johnston, Jr. 1989. Lipopolysaccharide priming of human neutrophils for an enhanced respiratory burst: role of intracellular free calcium. *J. Clin. Invest.* 83: 74–83.
- Worthen, G. S., C. Haslett, A. J. Rees, R. S. Gumbay, J. E. Henson, and P. M. Henson. 1987. Neutrophil-mediated pulmonary vascular injury: synergistic effect of trace amounts of lipopolysaccharide and neutrophil stimuli on vascular permeability and neutrophil sequestration in the lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136: 19–28.
- Phillips, M., and P. Kubes. 2011. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat. Med.* 17: 1381–1390.
- Butcher, E. C. 1991. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67: 1033–1036.
- Springer, T. A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76: 301–314.
- Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky, and S. Nourshargh. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 678–689.
- Kuwano, Y., O. Spelten, H. Zhang, K. Ley, and A. Zarbock. 2010. Rolling on E- or P-selectin induces the extended but not high-affinity conformation of LFA-1 in neutrophils. *Blood* 116: 617–624.
- Hollmann, M. W., and M. E. Durieux. 2000. Local anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication? *Anesthesiology* 93: 858–875.
- Arakawa, K., H. Takahashi, S. Nakagawa, and S. Ogawa. 2001. The effects of lidocaine on superoxide production and p47 Phox translocation in opsonized zymosan-activated neutrophils. *Anesth. Analg.* 93: 1501–1506.
- Fischer, L. G., M. Bremer, E. J. Coleman, B. Conrad, B. Krumm, A. Gross, M. W. Hollmann, G. Mandell, and M. E. Durieux. 2001. Local anesthetics attenuate lysophosphatidic acid-induced priming in human neutrophils. *Anesth. Analg.* 92: 1041–1047.
- Welters, I. D., A. Menzebach, T. W. Langefeld, M. Menzebach, and G. Hempelmann. 2001. Inhibitory effects of S(-) and R-(+) bupivacaine on neutrophil function. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 45: 570–575.
- Bengtsson, T., C. Dahlgren, O. Stendahl, and T. Andersson. 1991. Actin assembly and regulation of neutrophil function: effects of cytochalasin B and tetracaine on chemotactic peptide-induced O<sub>2</sub><sup>-</sup> production and degranulation. *J. Leukoc. Biol.* 49: 236–244.
- Azuma, Y., P. L. Wang, M. Shinohara, and K. Ohura. 2001. Differentiation by in vitro treatment of lidocaine-epinephrine and prilocaine-felypressine in neutrophils. *Immunol. Lett.* 77: 151–158.
- Kamath, P. S., W. R. Kim; Advanced Liver Disease Study Group. 2007. The model for end-stage liver disease (MELD). *Hepatology* 45: 797–805.
- Rossaint, J., O. Spelten, N. Kässens, H. Mueller, H. K. Van Aken, K. Singbartl, and A. Zarbock. 2011. Acute loss of renal function attenuates slow leukocyte rolling and transmigration by interfering with intracellular signaling. *Kidney Int.* 80: 493–503.
- Schnoor, M., F. P. Lai, A. Zarbock, R. Kläver, C. Polaschegg, D. Schulte, H. A. Weich, J. M. Oelkers, K. Rottner, and D. Vestweber. 2011. Cortactin deficiency is associated with reduced neutrophil recruitment but increased vascular permeability in vivo. *J. Exp. Med.* 208: 1721–1735.
- Zarbock, A., C. L. Abram, M. Hundt, A. Altman, C. A. Lowell, and K. Ley. 2008. PSGL-1 engagement by E-selectin signals through Src kinase Fgr and ITAM adapters DAP12 and FcR gamma to induce slow leukocyte rolling. *J. Exp. Med.* 205: 2339–2347.
- Forsyth, K. D., and R. J. Levin. 1990. Preparative procedures of cooling and re-warming increase leukocyte integrin expression and function on neutrophils. *J. Immunol. Methods* 128: 159–163.
- Glasser, L., and R. L. Fiedlerlein. 1990. The effect of various cell separation procedures on assays of neutrophil function: a critical appraisal. *Am. J. Clin. Pathol.* 93: 662–669.
- Kuijpers, T. W., A. T. Tool, C. E. van der Schoot, L. A. Ginsel, J. J. Onderwater, D. Roos, and A. J. Verhoeven. 1991. Membrane surface antigen expression on neutrophils: a reappraisal of the use of surface markers for neutrophil activation. *Blood* 78: 1105–1111.
- Ley, K. 2003. Arrest chemokines. *Microcirculation* 10: 289–295.
- Kunkel, E. J., J. L. Dunne, and K. Ley. 2000. Leukocyte arrest during cytokine-dependent inflammation in vivo. *J. Immunol.* 164: 3301–3308.
- Rossaint, J., C. Berger, H. Van Aken, H. H. Scheld, P. K. Zahn, A. Rukosujew, and A. Zarbock. 2012. Cardiopulmonary bypass during cardiac surgery modulates systemic inflammation by affecting different steps of the leukocyte recruitment cascade. *PLoS One* 7: e45738.
- Dransfield, I., C. Cabañas, A. Craig, and N. Hogg. 1992. Divalent cation regulation of the function of the leukocyte integrin LFA-1. *J. Cell Biol.* 116: 219–226.
- Letschka, T., V. Kollmann, C. Pfeiffer-Obermair, C. Lutz-Nicoladoni, G. J. Obermair, F. Fresser, M. Leitges, N. Hermann-Kleiter, S. Kaminski, and

- G. Baier. 2008. PKC-theta selectively controls the adhesion-stimulating molecule Rap1. *Blood* 112: 4617–4627.
34. Lewis, S. M., D. F. Treacher, L. Bergmeier, S. D. Brain, D. J. Chambers, J. D. Pearson, and K. A. Brown. 2009. Plasma from patients with sepsis up-regulates the expression of CD49d and CD64 on blood neutrophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 40: 724–732.
35. Lo Presti, R., B. Canino, M. Montana, F. Ferrara, C. Carollo, F. Porretto, and G. Caimi. 2004. Polymorphonuclear leukocyte integrin profile in vascular atherosclerotic disease. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 30: 53–60.
36. Marsik, C., F. Mayr, F. Cardona, G. Schaller, O. F. Wagner, and B. Jilma. 2004. Endotoxin down-modulates P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1, CD162) on neutrophils in humans. *J. Clin. Immunol.* 24: 62–65.
37. Gustot, T. 2011. Multiple organ failure in sepsis: prognosis and role of systemic inflammatory response. *Curr. Opin. Crit. Care* 17: 153–159.
38. Shi, W., R. Jiang, G. P. Dobson, A. Granfeldt, and J. Vinten-Johansen. 2012. The nondepolarizing, normokalemic cardioplegia formulation adenosine-lidocaine (adenocaine) exerts anti-neutrophil effects by synergistic actions of its components. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 143: 1167–1175.
39. Hollmann, M. W., A. Gross, N. Jelacin, and M. E. Durieux. 2001. Local anesthetic effects on priming and activation of human neutrophils. *Anesthesiology* 95: 113–122.
40. Luo, B. H., C. V. Carman, and T. A. Springer. 2007. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 25: 619–647.
41. Groemping, Y., and K. Rittinger. 2005. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem. J.* 386: 401–416.
42. Steinbach, G., E. Bölke, J. Schulte am Esch, M. Peiper, R. Zant, A. Schwarz, B. Spiess, M. van Griensven, and K. Orth. 2007. Comparison of whole blood interleukin-8 and plasma interleukin-8 as a predictor for sepsis in postoperative patients. *Clin. Chim. Acta* 378: 117–121.
43. Godaly, G., L. Hang, B. Frendeus, and C. Svanborg. 2000. Transepithelial neutrophil migration is CXCR1 dependent in vitro and is defective in IL-8 receptor knockout mice. *J. Immunol.* 165: 5287–5294.
44. Godaly, G., A. E. Proudfoot, R. E. Offord, C. Svanborg, and W. W. Agace. 1997. Role of epithelial interleukin-8 (IL-8) and neutrophil IL-8 receptor A in *Escherichia coli*-induced transuroepithelial neutrophil migration. *Infect. Immun.* 65: 3451–3456.
45. Tan, Z., S. Dohi, K. Ohguchi, S. Nakashima, Y. Banno, Y. Ono, and Y. Nozawa. 1999. Effects of local anesthetics on phospholipase D activity in differentiated human promyelocytic leukemia HL60 cells. *Biochem. Pharmacol.* 58: 1881–1889.
46. Tomoda, M. K., M. Tsuchiya, W. Ueda, M. Hirakawa, and K. Utsumi. 1990. Lidocaine inhibits stimulation-coupled responses of neutrophils and protein kinase C activity. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR* 22: 199–210.
47. Zarbock, A., T. Kempf, K. C. Wollert, and D. Vestweber. 2012. Leukocyte integrin activation and deactivation: novel mechanisms of balancing inflammation. *J. Mol. Med.* 90: 353–359.
48. Kempf, T., A. Zarbock, C. Widera, S. Butz, A. Stadtmann, J. Rossaint, M. Bolomini-Vittori, M. Korf-Klingebiel, L. C. Napp, B. Hansen, et al. 2011. GDF-15 is an inhibitor of leukocyte integrin activation required for survival after myocardial infarction in mice. *Nat. Med.* 17: 581–588.
49. Iradier, M. T., C. Fernandez, P. Bohorquez, E. Moreno, J. B. del Castillo, and J. Garcia. 2000. Intraocular lidocaine in phacoemulsification: an endothelium and blood-aqueous barrier permeability study. *Ophthalmology* 107: 896–900, discussion 900–901.
50. Williams, J. M., Y. J. Lin, J. P. Loftus, R. R. Faleiros, J. F. Peroni, J. A. Hubbell, W. R. Ravis, and J. K. Belknap. 2010. Effect of intravenous lidocaine administration on laminar inflammation in the black walnut extract model of laminitis. *Equine Vet. J.* 42: 261–269.
51. Rossaint, J., and A. Zarbock. 2013. Tissue-specific neutrophil recruitment into the lung, liver, and kidney. *J. Innate Immun.* 5: 348–357.

### 2.3 Originalarbeit 3: Dexmedetomidin basierte Sedierung in Kombination mit Remifentanyl bei MitraClip Eingriffen

**Berger C**, Said E, Haller K, Nordine M, Reinthaler M, Landmesser U, Treskatsch S. Dexmedetomidine Sedation Combined With Remifentanyl in MitraClip Procedures is Feasible and Improves Hemodynamics. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2023 Jan;37(1):50-57. doi: 10.1053/j.jyca.2022.10.001.

Ziel dieser retrospektiv durchgeführten Arbeit war es, eine neu eingeführte, Dexmedetomidin basierte Sedierung hinsichtlich Sicherheit und potentieller positiver Effekte auf die hämodynamische Stabilität bei kardialen Risikopatienten während MitraClip® Interventionen zu untersuchen.

Die kathetergestützte, minimalinvasive Behandlung der schweren Mitralklappeninsuffizienz mittels edge-to-edge Clip Verfahren stellt eine seit nun einigen Jahren vorhandene Alternative zur offenen Rekonstruktion oder Ersatz der Mitralklappe bei Hochrisiko-Patient\*innen dar [97]. Das Platzieren des katheterbasierten Clip ist dabei deutlich weniger invasiv als die offene Operation, zu der auch ein kardiopulmonaler Bypass mittels HLM, mit den schon einleitend (1.2) beschriebenen potentiellen Risiken, notwendig wäre. Das aktuell verbreitet angewandte anästhesiologische Verfahren während der minimalinvasiven Prozedur ist die Vollnarkose [98]. Aufgrund der Historie des Verfahrens, welches als Alternative für Patient\*innen mit einem als zu hoch eingeschätzten operativen Risiko konzipiert wurde und auch aufgrund der in Deutschland geltenden Bestimmungen zur Patientenselektion für edge-to-edge Clipings, wird diese Behandlungsmethode hauptsächlich älteren und multimorbideren Patient\*innen angeboten. Wie auch schon vorab erwähnt, ist diese Patientengruppe allein schon aufgrund des hohen Alters und insbesondere durch multiple Begleiterkrankungen einem hohen perioperativen anästhesiologischen Risiko ausgesetzt. Neben einem aufgrund der Grunderkrankung und den begleitenden Faktoren erhöhten kardialen Risiko haben die Patient\*innen auch ein erhöhtes Risiko für postoperative kognitive Defizite [99]. Analog der Reduktion der Invasivität des operativen Eingriffes ist eine Reduktion der Anästhesietiefe daher ein möglicherer Ansatz, diese perioperativen Risiken zu reduzieren [100]. Dementsprechend erscheint es sinnvoll in diesem Risikokollektiv vollständig auf eine Allgemeinanästhesie und eine damit assoziierte invasive Beatmung, als möglicher Trigger perioperativer Risiken, zu verzichten und stattdessen auf sedierende Konzepte zu wechseln. Bislang existieren einzelne Arbeiten zu Propofol oder Benzodiazepin basierten Sedierungskonzepten, die zeigen, dass eine Sedierung bei interventionellen Mitralklappen Eingriffen ebenso sicher wie eine Allgemeinanästhesie durchführbar ist [101-104]. Potentiell

nachteilig an diesen Konzepten ist aber, dass die darin verwendeten Substanzen im Verdacht stehen postoperative kognitive Funktionsstörungen, insbesondere in diesem vulnerablen Patientenkollektiv, auszulösen und auch inflammationssteigernde Mechanismen zu aktivieren [105, 106]. Im Gegensatz dazu zeigen frühere Arbeiten Hinweise auf mögliche positive Effekte auf die postoperative kognitive Funktion bei der Verwendung von alpha-2 Agonisten und insbesondere dem zentralen, selektiver Alpha-2 Agonisten Dexmedetomidin [107, 108]. Aufgrund dessen und auch aufgrund positiver Erfahrungen mit früheren Dexmedetomidin basierten Sedierungskonzepten zu anderen Eingriffsarten [109], wurde das hier untersuchte Sedierungsverfahren konzipiert und nach zweijähriger Anwendung retrospektiv analysiert. Zur besseren Vergleichbarkeit der Behandlungsdaten und aufgrund der hohen Nutzungsfrequenz von MitraClip® Systemen im Beobachtungszeitraum, wurde die Auswertung ausschließlich an Prozeduren mit diesem System durchgeführt.

Insgesamt wurden im Beobachtungszeitraum 79 MitraClip® Eingriffe retrospektiv ausgewertet, bei denen 26 in Sedierung und 53 in Allgemeinanästhesie durchgeführt wurden. Das Sedierungsverfahren wurde Dexmedetomidin-basiert mit Hinzunahme einer kontinuierlichen, niedrig dosierten Remifentanyl-Laufrate durchgeführt. Bei beiden Verfahren waren respiratorische und hämodynamische Zielparameter während des gesamten Eingriffes in adäquaten Zielbereichen. In der Sedierungs-Gruppe zeigte die detaillierte Verlaufsanalyse der einzelnen mittleren arteriellen Blutdrücke (MAD) zu einigen Zeitpunkten höhere Werte als in der Vergleichsgruppe und insgesamt einen deutlich niedrigeren Norepinephrin Bedarf zur Aufrechterhaltung des Ziel-MAD. Perioperative Komplikationen wie Blutungen, Delir oder Pneumonie zeigten keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Zusammenfassend lässt sich demnach sagen, dass ein Dexmedetomidin-basiertes Sedierungskonzept bei MitraClip® edge-to-edge Repair der Mitralkappeninsuffizienz in einem älteren, multimorbiden Patientenkollektiv in Bezug auf Hämodynamik, Respiration und perioperative Komplikationen ebenso sicher durchzuführen ist wie eine Allgemeinanästhesie und darüber hinaus zu einem deutlich geringeren Norepinephrinbedarf führt.

**Dexmedetomidine sedation combined with remifentanil in MitraClip procedures is feasible and improves hemodynamics**

C. Berger, E. Said, K. Haller, M. Nordine, M. Reinthaler, U. Landmesser, et al.

Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia 2022

DOI: <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2022.10.001>















## **2.4 Originalarbeit 4: PBL in Kombination mit high-fidelity Simulation als Lehrmethoden führt zu anhaltend besseren praktischen Fähigkeiten bei der kardiopulmonalen Reanimation.**

**Berger C**, Brinkrolf P, Ertmer C, Becker J, Friederichs H, Wenk M, Van Aken H, Hahnenkamp K. Combination of problem-based learning with high-fidelity simulation in CPR training improves short and long-term CPR skills: a randomised single blinded trial. *BMC Med Educ.* 2019 May 31;19(1):180. doi: 10.1186/s12909-019-1626-7.

Ziel dieser prospektiv, randomisiert und teil-verblindet durchgeführten Arbeit war es, den Einfluss von Problem Based Learning (PBL) und einer, mittels modernen Simulationstechniken herbeigeführten, möglichst realitätsnahen Lernumgebung auf das Wissen, die praktischen Fähigkeiten und die Selbsteinschätzung direkt nach und sechs Monate nach Abschluss der Lerneinheit bei Student\*innen der Humanmedizin zu untersuchen.

Die Kompetenz in der Durchführung von Behandlungsmaßnahmen ist ein relevanter Faktor das Patient\*innen-Risiko zu beeinflussen. Komplexe medizinische Behandlungsabläufe müssen zur optimalen Durchführung adäquat erlernt werden und die so erlangte Kompetenz muss auch über einen längeren Zeitraum erhalten werden. Die kardiopulmonale Reanimation (Cardiopulmonary resuscitation - CPR) ist ein Beispiel für eine solche relevante medizinische Maßnahme. Sie stellt die einzige Möglichkeit dar, die Organperfusion bei einem eintretenden funktionellen Kreislaufstillstand solange aufrecht zu erhalten, bis dieser therapeutisch behoben wurde oder apparative Verfahren zur Aufrechterhaltung der Perfusion etabliert wurden. Wird die CPR in dieser Initialphase des Kreislaufstillstandes nicht oder inadäquat durchgeführt, führt dies zur Organ-Minderperfusion bis hin zum Versterben. Dementsprechend sollte ein hoher Stellenwert auf das Wissen und die Qualität der CPR-Durchführung bei Laien sowie insbesondere auch bei Mitarbeitenden in der Gesundheitsversorgung gelegt werden. In der Vergangenheit zeigten aber Arbeiten, dass weder bei Laien noch bei professionell im Gesundheitswesen tätigen, das Wissen und die adäquate Umsetzung der CPR in einem ausreichend hohen Maße vorhanden ist [110-112]. Im direkten Vergleich waren Ärzt\*innen zwar Laien überlegen, schnitten aber schlechter ab als Rettungsdienstpersonal [112]. Als mögliche Erklärung wurde eine Unterrepräsentation der CPR in der Ausbildung von Medizinstudent\*innen und im Berufsalltag von Ärzt\*innen im Vergleich zu Rettungsdienstpersonal, welches einen hohen Fokus auf die CPR hat, vermutet. Entsprechend der zum Zeitpunkt der Planung dieser Studie geltenden Kurrikula wurde während des Medizinstudiums nur eine Lerneinheit mit CPR durchgeführt. Nach Abschluss des Studiums war eine weitere Pflicht zum CPR-Training für approbierte Ärzt\*innen

ausschließlich von der Wahl des Fachbereiches und möglichen angestrebten Zusatzqualifikationen abhängig. Eine Reanimationssituation, wie auch die Erfahrungen der Arbeitsgruppe als prä- und innerhospitale Notfallmediziner zeigte, kann unabhängig von der Fachbereichswahl allen im Gesundheitswesen tätigen begegnen. Daher stellte sich die Frage, wie, im Sinne einer Risikominimierung, diese einzige im Medizinstudium vorhandene Lerneinheit zur CPR so gestaltet werden kann, dass sie eine möglichst hohe und nachhaltige Kompetenz in der praktischen Durchführung der CPR generiert.

PBL ist seit Jahrzehnten auch in der medizinischen Lehre bekannt und zeigte zumindest Hinweise, Lernende auf ein potentiell „berufslebenslanges“ Lernen vorzubereiten [113, 114]. Zudem kann eine simulationsbasierte Ausbildung auch bei der Reanimationsausbildung zu einem höheren Lernerfolg führen [115, 116]. Aufgrund dieser Ausgangslage und neueren, nun vorhandenen transportablen high-fidelity (HF) Reanimationsphantomen mit einem hohen Maß an Feedback an die Übenden wurde diese Arbeit mit einer Lerneinheit, die PBL und HF-Simulation kombiniert, konzipiert und ein möglicher kurzfristiger sowie längerfristiger Effekt auf die CPR Kompetenz untersucht.

Dazu wurden Medizinstudierende randomisiert und verblindet im Rahmen einer kurrikulären Lerneinheit in eine Gruppe mit PBL und folgender HF-Simulation oder die Kontrollgruppe mittels „klassischem“, tutoriell geleiteten CPR-Training an einem Standard Reanimationsphantom innerhalb desselben Zeitraumes ausgebildet. Am Ende des Unterrichtstages wurden die Studierenden erneut zu Paaren innerhalb der beiden Gruppen randomisiert. Diese Paare wurden dann mit einer für nun beide Gruppen identische Simulationsumgebung mit gleichen Phantomen konfrontiert, in der erneut eine CPR durchgeführt wurde. Hierbei wurde dann mittels computergestütztem Feedback des Phantoms und Videoanalyse die Daten erhoben. Bis zum Abschluss dieser Datenerhebung war den Studierenden die Teilnahme an der Studie nicht bekannt. Studierende der PBL/HF-Gruppe zeigten in der Analyse eine höhere Erfolgsquote im Erreichen eines definierten Gesamtzieles bestehend aus Erkennen und zeitgerechtem Anfang einer suffizient durchgeführten CPR im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch einzelne, rein manuelle Fähigkeiten, wie die Häufigkeit der suffizienten Thoraxkompression, wurden in der PBL/HF-Gruppe besser durchgeführt und auch schneller initiiert. Zudem zeigte eine Befragung der Teilnehmenden nach dem Training, dass sich die Gruppe der PBL/HF-ausgebildeten Studierenden selber kompetenter und sicherer in der Anwendung der CPR im Vergleich zur Kontrollgruppe einschätzt. Sechs Monate nach der Lerneinheit und initialen Datenerhebung wurden die ursprünglich teilnehmenden Studierenden zu einem, aufgrund der Vorgaben der Fakultät, freiwilligen Notfallseminar eingeladen. Im Rahmen dieses Seminars wurden die Studierenden wieder in gruppenspezifisch randomisierten Paaren erneut mit der gleichen CPR-Simulationsumgebung konfrontiert und entsprechend analysiert. Dabei zeigte sich im Erreichen des Gesamtzieles kein Unterschied

mehr zwischen den Gruppen. In einzelnen Aspekten der Kontinuität einer Kardiokompression, wie die Dauer der „hands-off“ Zeit war die PBL/HF-Gruppe aber weiterhin der Kontrollgruppe überlegen.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass eine Kombination aus PBL und HF-Simulation im Vergleich zu einem klassischen, tutoriell geleiteten hands-on Reanimationstraining in der Lage ist, höhere manuelle Fähigkeiten und selbst wahrgenommene Kompetenz zu erzielen und dass dieser Effekt über einem Zeitraum von sechs Monaten bei einzelnen Aspekten der suffizienten Kardiokompression anhaltend ist.

## RESEARCH ARTICLE

## Open Access

# Combination of problem-based learning with high-fidelity simulation in CPR training improves short and long-term CPR skills: a randomised single blinded trial



Christian Berger<sup>1\*</sup> , Peter Brinkrolf<sup>2</sup>, Cristian Ertmer<sup>3</sup>, Jan Becker<sup>4</sup>, Hendrik Friederichs<sup>4</sup>, Manuel Wenk<sup>3</sup>, Hugo Van Aken<sup>3</sup> and Klaus Hahnenkamp<sup>2</sup>

## Abstract

**Background:** Performance of sufficient cardiopulmonary resuscitation (CPR) by medical personnel is critical to improve outcomes during cardiac arrest. It has however been shown that even health care professionals possess a lack of knowledge and skills in CPR performance. The optimal method for teaching CPR remains unclear, and data that compares traditional CPR instructional methods with newer modalities of CPR instruction are needed. We therefore conducted a single blinded, randomised study involving medical students in order to evaluate the short- and long-term effects of a classical CPR education compared with a bilateral approach to CPR training, consisting of problem-based learning (PBL) plus high fidelity simulation.

**Methods:** One hundred twelve medical students were randomized during a curricular anaesthesiology course to a control ( $n = 54$ ) and an intervention ( $n = 58$ ) group. All participants were blinded to group assignment and partook in a 30-min-lecture on CPR basics. Subsequently, the control group participated in a 90-min tutor-guided CPR hands-on-training. The intervention group took part in a 45-min theoretical PBL module followed by 45 min of high fidelity simulated CPR training. The rate of participants recognizing clinical cardiac arrest followed by sufficiently performed CPR was the primary outcome parameter of this study. CPR performance was evaluated after the intervention. In addition, a follow-up evaluation was conducted after 6 months.

**Results:** 51.9% of the intervention group met the criteria of sufficiently performed CPR as compared to only 12.5% in the control group on the day of the intervention ( $p = 0.007$ ). Hands-off-time as a marker for CPR continuity was significantly less in the intervention group (24.0%) as compared to the control group (28.3%,  $p = 0.007$ , *Hedges' g* = 1.55). At the six-month follow-up, hands-off-time was still significantly lower in the intervention group (23.7% vs. control group: 31.0%,  $p = 0.006$ , *Hedges' g* = 1.88) but no significant difference in sufficiently performed CPR was detected (intervention group: 71.4% vs. control group: 54.5%,  $p = 0.55$ ).

**Conclusion:** PBL combined with high fidelity simulation training leads to a measurable short-term increase in initiating sufficient CPR by medical students immediately after training as compared to classical education. At six month post instruction, these differences remained only partially.

**Keywords:** Cardiopulmonary resuscitation, Medical students' education, Problem-based learning, High-fidelity simulation, Hands-on training, Advanced adult CPR

\* Correspondence: [christian.berger@charite.de](mailto:christian.berger@charite.de)

<sup>1</sup>Department of Anesthesiology and Operative Intensive Care Medicine, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Hindenburgdamm 30, 12200 Berlin, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

## Background

Surviving cardiac arrest is dependent upon the quality and timely initiation of optimal cardiopulmonary resuscitation (CPR) performed by medical personnel. [1] However, evidence has accrued that suggest a lack of knowledge exists amongst health care professionals regarding handling these time-critical situations, which can strongly influence the ultimate outcome for a patient experiencing cardiac arrest. [2–6] Enhancement in CPR education for medical students could improve CPR knowledge, performance, and outcome of CPR performed by later medical physicians. Therefore it seems to be reasonable to find the optimal way to teach CPR with a long as possible lasting effect.

Little is known about the most effective way of teaching medical students CPR and the half-life of CPR-skills after a training session may be briefer than previously assumed. [7–9] There is evidence to suggest that, higher self-confidence in performing CPR is associated with higher quality in basic life support (BLS) as measured via compression depth, compression frequency and manual ventilation. [10] Therefore, CPR training focussed on the acquisition of sustained skills in combination with improved self-confidence in initiating CPR may be beneficial.

Classical CPR training methods include theoretical lectures and instructor-guided CPR hands-on-training. In recent years, CPR simulation manikins have been developed as a high-fidelity simulation which are increasingly available in medical students' education. It is unclear as to whether or not new training methods and up-to-date simulation equipment in realistic environments do contribute to improved CPR quality and outcome. [11–14]. Furthermore, it is unclear whether this has a measurable effect on long-term CPR performance.

Problem based learning (PBL) is an instructional learner-centered approach that empowers learners to research, integrate theory and practise and apply knowledge and skills to develop a viable solution to a defined problem [15]. This seems to be a promising alternative to classical instructor-guided CPR-training. There is evidence that graduates of PBL curricula demonstrate equivalent or superior professional competencies compared with graduates of more traditional curricula [16], but it is still unclear, if PBL leads to long lasting superiority of theoretically and practically skills, which seems to be a necessary combination for optimal performed CPR.

This raises the question, whether PBL teaching approaches combined with up-to-date manikin-technology make teaching CPR more effective. Furthermore, it is unclear whether this has a measurable effect on long-term CPR performance. In the present study we hypothesized, that PBL combined with a high-fidelity CPR simulation in a realistic environment improves short-

and long-term CPR skills of medical students as compared to classical CPR-teaching techniques.

## Methods

We conducted a prospective, randomised, single-blinded interventional study involving fourth year medical students of the medical school of the University of Muenster, Germany. The study was approved by the ethics committee of the University of Muenster and the Medical Association of North Rhine-Westfalia (reference number 2010–225-f-S). During a week long curricular anaesthesiology course combined with advanced life support (ALS) lectures and integrated CPR hands-on training, the students were randomized into a control and an intervention group by their matriculation number. Besides being student in the course named above, no specific inclusion or exclusion criteria were applied. The intervention and initial data collection took part in December 2010, data of the follow-up evaluation were collected in June 2011.

For blinding, all participants were informed that they would participate in a new educational approach, but neither group knew about the distinct study methods and purpose, nor about group allocation. In accordance with the ethic committee approval, information about the distinct study purpose and written informed consent was given after completed data collection. To avoid forwarding of information between students, we conducted the data collection in parallel in four separate rooms with four standard CPR manikins (Resusci Anne, Laerdal Medical GmbH, Puchheim, Germany) at the end of the course to minimize the risk for unblinding before data collection was completed. Apart from this, the students were asked to withhold this information until end of the data collection process.

A calculation of sample size was not performed, as this course was a mandatory part of the medical curriculum.

## Data collection by questionnaire

An initial paper-based questionnaire for empirical data collection and assessment of the participants' self-perception of personal CPR-skills was completed. A second set of questionnaires was completed after the end of each educational unit, covering the training and time-dependent self-perception of the students' CPR-skills (see Additional file 1). Each question had to be answered using a Likert-scale from 1-worst to 6-best.

## Teaching techniques

During the described curricular course, all participants initially received a 30-min theoretical lecture about advanced adult CPR according to the ERC guidelines [17]. In the following four days, practical and theoretical teaching was conducted in groups of six to eight

students. Each group was allocated to one of four trained tutors. All tutors were experienced in BLS and ALS teaching and had been previously instructed in the PBL-tutorial process according to the PBL guidelines [18]. The tutors were not blinded and did not participate in data collection and analysing. To avoid tutor influence, tutor distribution among intervention and control group changed daily during the course.

The control group received classical CPR training. Classical CPR training was defined in this study as two different hands on advanced CPR scenarios on a standard CPR manikin (Resusci Anne, Laerdal Medical GmbH, Puchheim, Germany) in groups of 6 to 8 students, each lasting 45 min without further simulated environment. One tutor was present in each scenario, initially explained practical aspects and guided the students permanently for correct performed CPR. The tutor was allowed to interrupt the students and directly corrected and explained dubieties and errors. In each group, every student had to perform hands-on training and a feedback was given.

Participants in the intervention group first received a 45-min PBL-module followed by a 45-min CPR hands on training ( $n = 32$ ) or vice versa ( $n = 26$ ). The hands on training was conducted on a high-fidelity full-scale simulator (SimMan 3G, Fa. Laerdal Medical GmbH, Puchheim).

In the PBL-module, groups of 6 to 8 students had to solve a standardised advanced adult CPR-case in meeting the criteria for PBL-standard. [18] According to the PBL-tutorial process, the tutor guided to identifying and defining the problem and ensured appropriate learning objectives. Studying and gathering solutions was performed by self study within the group of students using current literature. Afterwards, results were discussed and if necessary corrected by the tutor in accordance with the ERC guidelines.

During the high-fidelity hands on simulator training, students were obliged to solve an advanced CPR-situation by reacting on the condition presented by the high-fidelity manikin. The presented situation was an asystole patient discovered during ward round. According to the above mentioned PBL-tutorial process, analysing of the manikins condition and performing CPR was performed within the group with the possibility to correct each other. A tutor introduced and observed the case but was not allowed to disrupt or guide the participants for correct CPR during the scenario. To account for a realistic environment the simulator was placed in a simulated general hospital ward. A debriefing was done afterwards.

During the practical scenarios, both groups had free access to a standardized set of airway management tools and a manual defibrillator (LIFEPAK 10, Physio-Control, Redmond, USA) without automated feedback on CPR quality.

#### CPR skill assessment and data collection

Two hours after the training, participants were randomly divided into pairs. It was ensured that each pair did not complete the initial training together but had been randomized to the same study-group.

For data collection, four identical patient rooms on a simulated general hospital ward were equipped with a CPR-training manikin (Resusci Anne, Laerdal Medical GmbH, Puchheim) in a cardiac arrest scenario. The participants had access to a standardized set of drugs, airway management tools and a defibrillator. The time from entering the room, to first contact, to assessment and initiation of CPR was documented accordingly using video recording. The evaluation of the video documentation concerning specific time points was performed by an external person having not participated in teaching or data analysis using a checklist based evaluation protocol. The manikin data was collected by Laerdal PC SkillReporting System (Fa. Laerdal Medical GmbH, Puchheim). Each scenario and video-documentation lasted for 5 minutes.

#### Follow-up

An unannounced follow-up session was conducted six months later during a regularly scheduled course. The same scenario as described above was instituted. The investigators were blinded to participant's previous group allocation. Students were again divided into groups of two that matched the initial study group assignment, but were different to the first skill assessment.

#### Evaluation of guideline conform CPR

The primary endpoint "Guideline conform CPR" was defined as initial evaluation of the manikin's condition, including breath control and call for help followed by sufficient chest compression. Sufficient chest compression was defined as a sequence of at least ten compressions in a row with a minimum compression depth of 45 mm and a frequency between 90 and 120 compressions per minute.

Besides the primary endpoint, a number of secondary endpoints were evaluated including hands-off time, and time from start of the scenario to the first sufficient chest compression. Other secondary endpoints were time to first ten sufficient compressions in a row as well as quality and quantity of ventilation.

#### Statistical analysis

All data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) or Median and 25%/75% quartiles for non-normally distributed data. Statistical analysis was performed with SPSS statistical package (version 20.0; IBM, Armonk, USA). Normal distribution of data was assessed using a Kolmogorov-Smirnov-test. Wilcoxon signed-rank test or Mann-Whitney-U test were used for non-normally

distributed data as appropriate for comparisons between or within groups. Student's t test were used after testing for normal distribution. Categorical data was analysed by Chi square test. Effect sizes were calculated as Hedges' *g* (bias-corrected standardized mean difference) with values of 0.2 indicating small and values of 0.8 indicating large effects. [19] A *p* value < 0.05 was considered statistically significant with Holm-Bonferroni correction for multiple testing if applicable.

## Results

One hundred twelve of 127 fourth year students participated in the module of the anaesthesiology course and were enrolled in the study. One hundred eleven complete sets of questionnaires were returned. Fifty four students were assigned to the control group and 58 to the intervention group. Due to a lack in data recording, 3 manikin data sets in the control group and 2 in the intervention group could only partially be evaluated.

Six month later 50 of the previously enrolled students participated in the follow-up scenario, of which 22 were included in the control group follow-up (CFU) and 28 in the intervention group follow-up (IFU).

Due to the group approach in our study, manikin data were analysed for each group of two participants. Therefore, the number of analysed manikin data sets was 27 respectively 29 for the initial data collection and 11 respectively 14 for the follow up.

Participants' demographical data, previous medical education, period of time since the last CPR-training and experience in real-life CPR scenarios were similar amongst both groups (Table 1).

### Compression quality

"Guideline conform CPR" was performed significantly more in the intervention group as compared to the control group (51.9% vs. 12.5%, *p* = 0.007; Fig. 1). During the follow-up session, no differences in guideline conform

CPR between groups (71.4% vs. 54.5%, *p* = 0.55; Fig. 1) were found.

The percentage of sufficient compressions meeting the criteria of at least 45 mm depth and 90–120 bpm showed no significant difference between the groups in both the 2 h and the follow-up skills assessment (intervention: 42, 9 ± 34% vs. control: 41,2 ± 33% *p* = 0.98; IFU: 41,5 ± 31% vs. CFU: 45,1 ± 37% *p* = 0.93). The number of consecutive sufficient compressions was also not different between groups (intervention: 13.5(1.9/27.7) vs. control: 8.0(1.3/14.8), *p* = 0.37; IFU: 9.7(3.6/21.1) vs. CFU: 8.6(3.6/25.1), *p* = 0.99; Table 2).

The intervention group had a significantly lower percentage of interruptions during CPR (hands off time 24.0(23.0/26.7)% vs. 28.3(24.3/31.7)% *p* = 0.007, *g* = 1.55). This was reproduced during the follow-up (IFU: 23.7(19.3/26.6)% vs. CFU: 31.0(25.0/33.7)% *p* = 0.006, *g* = 1.88; Fig. 2a). There was no difference between the groups regarding the time to first sufficient compression in the skills assessment (41.2(33.0/53.5)sec. vs. 32.6(21.4/77.7)sec., *p* = 0.12) and follow-up (41.2(33.8/57.0)sec. vs. 38.4(31.6/120.7)sec., *p* = 0.85; Fig. 2b).

The intervention group reached the target of first ten consecutive sufficient compressions significantly faster than the control group (52.3(39.3/72.8)sec. vs. 109.6(42.6/158.2)sec., *p* = 0.03; Fig. 2c). This difference was not replicated during the follow-up session (IFU: 46.9(40.6/103.5) sec.; CFU: 43.0(34.5/59.8)sec., *p* = 0.52).

The mean compression frequency tended to be non-significantly higher in the control group (intervention: 112(105/125)bpm vs. control: 125(104.5/133)bpm, *p* = 0.17), with the intervention group being closer to the recommended frequency of 100/min. During the follow-up, no difference between groups was revealed (IFU: 118(97/120)bpm vs. CFU: 114(102/128)bpm, *p* = 0.52). Compression depth at skill-assessment and follow-up were similar (intervention: 44 ± 8 mm vs. control 43 ± 9 mm, *p* = 0.56; IFU: 44 ± 8 mm vs. CFU: 44 ± 11 mm, *p* = 0.88; Table 2).

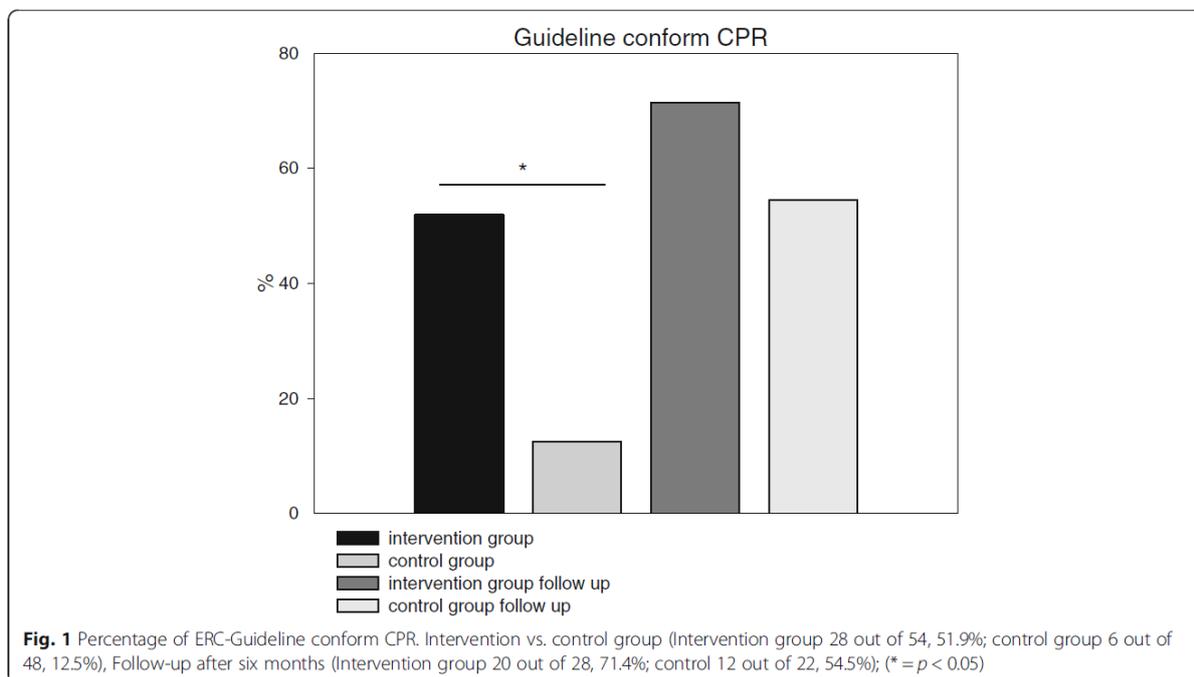
### Ventilation quality

Both groups tended to administer a lower ventilation rate than recommended by the ERC guidelines. The highest rate of ventilations per minute (VPM) was measured in the control group (control: 3.9 ± 0.9 VPM, intervention: 2.8 ± 0.8 VPM, *p* = 0.001; IFU: 2.7 ± 1.0 VPM, CFU: 3.2 ± 1.0 VPM, *p* = 0.7) with ongoing significant difference compared to CFU (*p* = 0.03; Fig. 3a). In the intervention group, the compression breaks for ventilation tended to be shorter (4.4(3.8/5.4)sec. vs. 5.3(4.5/6.1) sec., *p* = 0.14) and were significantly shorter during the follow-up (IFU: 4.4(3.8/4.8) sec. vs. CFU: 5.1(4.9/5.9) sec., *p* = 0.05; Fig. 3b). The percentage of ventilations with a sufficient air-flow showed no difference between

**Table 1** Demographic data and previous experience in CPR

	Control	Intervention
N (Students)	54	58
Age (in years)	24.9 ± 3.9	24.0 ± 2.6 (n.s.)
Gender	37,1% male 62,9% female	32,8% male 67,2% female
last CPR training (in Months)	15.2 ± 8.7	13.6 ± 8.2 (n.s.)
Experience in real CPR	27.8%	22.4% (n.s.)
Previous medical education	20.4%	20.7% (n.s.)

Values are presented as mean +/- SD, percentage of participants or numbers of participants



groups (intervention: 23.2(0/35.2)% vs. control: 29.0(13.2/40.7)%,  $p = 0.37$ ; IFU: 19.4(3.4/25.0)% vs. CFU: 15.9(0/36.4)%,  $p = 0.73$ ; Fig. 3c). The mean tidal volume was significantly lower in the intervention group ( $186 \pm 155$  ml vs.  $275 \pm 115$  ml,  $p = 0.03$ ). The follow-up showed no difference between intervention and control group ( $169 \pm 97$  ml vs.  $150 \pm 141$  ml,  $p = 0.539$  Fig. 3d).

#### Self-assessment by questionnaire

All students sensed the CPR-algorithm as taught completely and memorably after the training, irrespectively of the teaching technique they participated in (intervention:  $5.3 \pm 0.8$  vs. control:  $5.4 \pm 0.8$ ,  $p = 0.36$ ).

After the training, self-assessment of CPR-competence increased (intervention:  $2.7 \pm 1.0$  vs.  $4.1 \pm 0.7$ ,  $p < 0.001$ ; control:  $2.7 \pm 1.0$  vs.  $4.0 \pm 0.9$ ,  $p < 0.001$ ; Fig. 4a), with no difference between groups. Students in the control group estimated their threshold reduction to perform CPR

significantly higher (intervention:  $4.3 \pm 1.5$  vs. control:  $5.1 \pm 1.1$ ,  $p < 0.001$ ; Fig. 4b). Also the self-estimated improvement in CPR abilities due to the training (intervention:  $4.6 \pm 1.4$  vs. control:  $5.4 \pm 0.9$ ,  $p < 0.001$ ; Fig. 4b) and the estimated effectiveness of the teaching technique (intervention:  $5.0 \pm 1.0$  vs. control:  $5.6 \pm 0.8$ ,  $p < 0.001$ ; Fig. 4b) were higher in the control group.

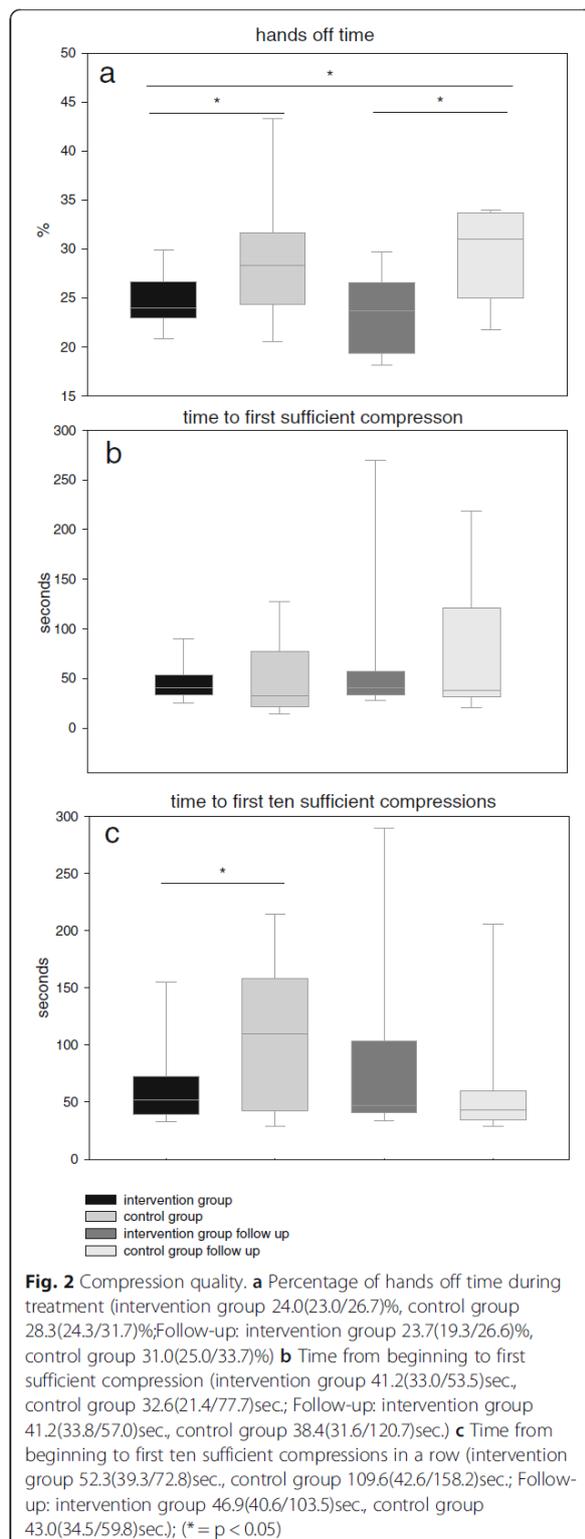
#### Discussion

The aim of the study was to investigate, whether PBL combined with high-fidelity full-scale simulator training improve short- and long-term CPR skills, according to the ERC/ILCOR guidelines, compared to a classical, hands on tutor-guided CPR training. Our data demonstrate that students in the high-fidelity simulated intervention group were more often able to perform sufficient guideline conform CPR compared to the control students. After 6 months, there were still favorable

**Table 2** Compression times and compression quality

	intervention group	control group	intervention follow-up	control follow-up
Compression frequency (bpm)	112(105/125)	125(104.5/133) ( $p = 0.17$ )	118(97/120)	114(102/128) ( $p = 0.525$ )
Compression depth (mm)	$43.9 \pm 1.8$	$42.8 \pm 1.9$ ( $p = 0.558$ )	$44.3 \pm 8$	$43.9 \pm 11$ ( $p = 0.880$ )
Hands-off time (%)	24.0(23.0/26.7)	28.3(24.3/31.7) ( $p = 0.007$ )	23.7(19.3/26.6)	31.0(25.0/33.7) ( $p = 0.006$ )
Sufficient compressions (%)	$42.9 \pm 34$	$41.2 \pm 33$ ( $p = 0.984$ )	$41.5 \pm 31$	$45.1 \pm 37$ ( $p = 0.928$ )
Sufficient compressions in a row	13.5(1.9/27.7)	8.0(1.3/14.8) ( $p = 0.37$ )	9.7(3.6/21.1)	8.6(3.6/25.1) ( $p = 0.99$ )
Time to first sufficient compression (sec.)	41.2(33.0/53.5)	32.6(21.4/77.7) ( $p = 0.12$ )	41.2(33.8/57.0)	38.4(31.6/120.7) ( $p = 0.85$ )
Time to first 10 sufficient compressions (sec.)	52.3(39.3/72.8)	109.6(42.6/158.2) ( $p = 0.03$ )	46.9(40.6/103.5)	43.0(34.5/59.8) ( $p = 0.52$ )

Values are presented as mean  $\pm$  SD or median and (25/75) quartiles



effects of the interventional teaching approach but without significant differences in the primary endpoint.

The primary purpose of performing CPR is the maintenance of cerebral blood flow, as emphasized by the ERC guidelines, which changed the chest compression/ventilation ratio from 15/2 to 30/2 in adults in 2005. [20, 21] The 2010 and 2015 guideline-revisions underline the importance of minimal interruptions, sufficient depth and frequency of compressions. [22] Former investigations studying CPR education and subsequent quality used single endpoints such as compression depth or frequency. [23, 24] In contrast, we used “Guideline conforming CPR” as a more comprehensive definition of successful CPR as the study’s primary endpoint.

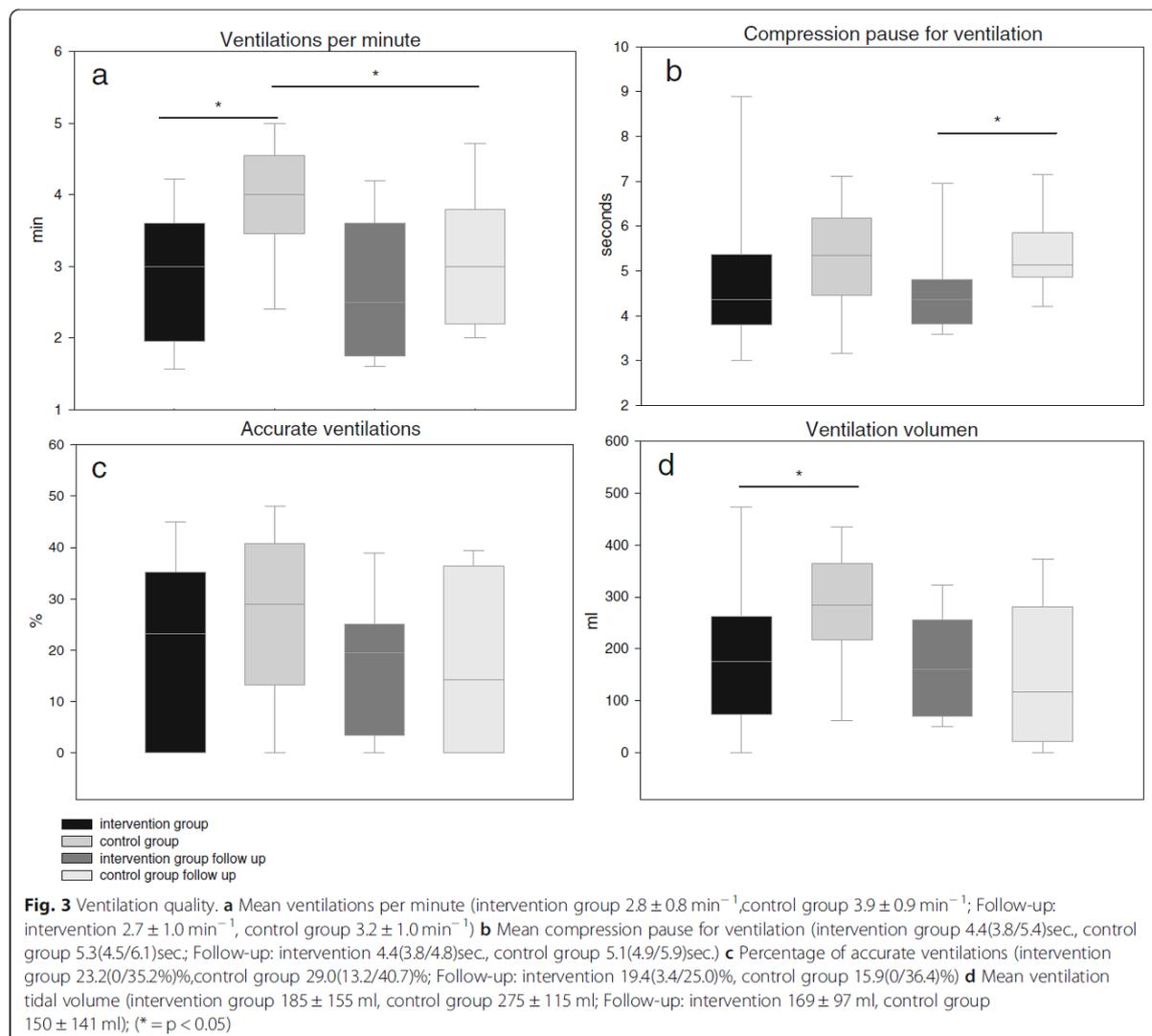
To represent this, a holistic approach of evaluating the CPR guidelines’ requirements of compression quality is reasonable to determine between sufficient and insufficient CPR.

Kern et al. showed, that every interruption of chest compressions leads to an immediate loss of coronary perfusion pressure and that approximately five to ten successfully performed compressions in a row are necessary to re-establish the pressure to previous levels. [25] Hence, only high quality compressions without interruptions can be rated as a potential benefit. Furthermore, to ensure that the participant was aware of the patient’s condition and to make our results more applicable to real CPR situations, we hypothesized, that without performing a prior diagnostic bloc, CPR in an artificial scenario cannot be considered successful.

In meeting the requirement of patient evaluation followed by correctly indicated sufficient chest compressions as primary endpoint, the intervention group outperformed the control group fourfold (51.9% vs. 12.5%). This difference was not carried forward to the follow up measurement, where both groups reached similar improved results.

The short term superiority of the intervention group may be explained by the PBL-tutorial process, which was shown in a retrospective study on CPR-education of nurses. [26] The combination of theoretical and practical PBL-process, with peer guidance and self-developed problem solution may lead to better results in a situation, where theoretically and practically skills are crucial. Evaluating the improved performances in both groups in the follow up scenario, we cannot conclude, that the short term superiority of the PBL-process can be responsible for long lasting effects. Due to the also improved results in the control group, we cannot exclude, that a highly motivation in medical students for reaching a good CPR-performance after the first training may lead to the good overall results in both groups.

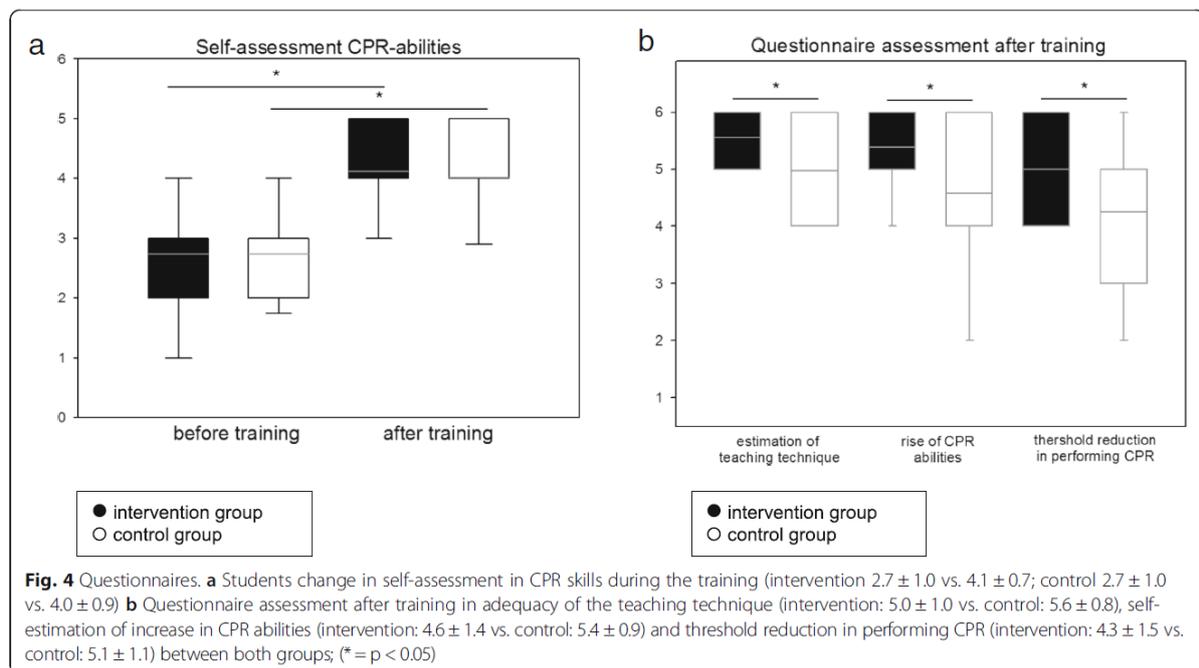
Another important factor of patient’s survival and neurological outcome [1], is the establishment of



sufficient perfusion pressure and blood flow during CPR as early as possible. This was reached 57 s faster in the intervention group from the beginning of the scenario until the first ten sufficient cardio compressions performed in a row.

It is well known, that a delay of the initiation of CPR treatment in a cardiac arrest situation reduces the chance of survival and the outcome of the patient. [27–29] Higher self-confidence of physicians regarding their abilities and optimal training-methods may lead to a more self-confident behaviour and thus to a faster evaluation of cardiac arrest, followed by a faster initiation of CPR. This was supported by research performed by Verplancke et al., who found improved compression and ventilation skills in more self-confident trainees. [10]

In self assessment, both groups in our study estimated their CPR-abilities after the training to be significantly higher compared to the initial evaluation, with no differences between the groups. Despite this, the control group reported a significantly higher self-confidence by estimating their inhibition threshold reduction in performing CPR, as well as the increase of their own CPR-abilities and the competence of the teaching technique they fulfilled. Comparing the higher self-confidence with the less effectively performed CPR in the control group contrast to the findings of Verplancke et al.. This may be explained by a phenomenon termed illusory superiority, a well-known effect where a lack of knowledge leads to overestimation of competence. [30] It is assumable that a more realistic environment and a teaching technique closer to the needs of real performed CPR leads to a



more realistic self-assessment in the intervention group, whereas the control group overestimated their abilities due to a lack of knowledge.

Beside initiating CPR, limiting interruptions during CPR is crucial for maintaining blood flow. As emphasized by the ERC-guidelines [22] and Kern et al. [25], hands-off time is an important component for maintaining blood flow. Compared to an evaluation of professional first responders [31], both groups in our study maintained a more continuously chest compression shown by lower percentage of hands off time, where the intervention group with 24% outperformed the control group significantly.

Some other particular target values of sufficient CPR showed relevant differences between both groups.

The guidelines recommend a rate of approximately 100 compressions per minute without exceeding 120 bpm. [22] A recently published meta-analysis reported beneficial compression rates of 85–120 bpm but with a reduced survival in exceeding 120 bpm. [32] Based on this, all compressions between 90 and 120 bpm were defined in our study as successful. The intervention group reached this goal while students in the control group performed chest compressions at a frequency of approximately 121 bpm (median 125 bpm).

The compression depth reached an average of 43.7 mm over all groups and therewith was lower than the guideline's requirements [22] but within the range of 40.3 to 55.3 mm, which showed the maximum survival in a recently published study. [33]

In both groups, we found a serious lack of ventilation frequency and ventilation volume compared to the recommendations. [22] Other works evaluating medical students and health care professionals performance on CPR-manikins showed similar results of low ventilation frequency and volume. [24, 34] Several theories might explain these results: Sufficient ventilation could be a difficult goal to achieve for the untrained and airway management skills are obviously more advanced than the skills needed for delivering adequate chest compressions. These findings might also be a result of observed little efforts by the trainees to optimize ventilation, possibly caused by the guideline related strong focus placed on performing adequate chest compression and minimizing hands-off time. This theory is supported by results of Jones et al., who showed an increase in compression frequency in 2010 CPR guideline educated students as compared to 2005 guideline educated students. [35]

Therefore, despite the undoubted necessity of adequate chest compression, the teaching of airway management in CPR-situations for health care professionals should not be neglected.

In contrast to previously published results showing no difference in long-term retention of theoretical CPR knowledge between traditional and high-fidelity educated students [13], our work demonstrated after 6 months some relevant differences in solitary measurements. The follow up still reveals a significantly lower hands-off time and a reduced compression pause for ventilation in the

interventional group. However, the initial significant difference between groups in time to achieve the first ten sufficient compressions was not carried forward to the follow up, due to an improvement in the control group. The improvement of particular endpoints after 6 month in the control group may lead to a loss of measurable differences between the two analysed teaching techniques which is maybe explained by a over representation of highly motivated and skilled students during the follow up.

### Limitations

Different learning experiences among the participants during the 6 months before the unannounced follow-up evaluation were not measured. Further, according to the university regulations, the follow-up took place during a voluntary anaesthesiology course, where only 45% of the initial participants took part. This may have led to a selection bias with an over representation of highly motivated and above average skilled students in both groups.

Further, to maintain a maximum of blinding, we tested multiple students at the same time with the same CPR-scenario in four rooms, while others were still in course core lectures. We cannot exclude communication between already tested and still to be tested students during data collection.

### Conclusion

Our study shows that even directly after an intensive CPR training, the guideline requirements on CPR are hard to achieve.

Hence, the best possible learning strategy should include a broad expertise with a significant emphasis on long-term skill retention. PBL combined with a high-fidelity CPR-training leads to a measurable short-term increase in initiating sufficient CPR, with some long-lasting effects. In contrast, the classical education leads to an overestimation in self-confidence most likely owing to a lack of knowledge, which seems to be crucial to avoid.

Therefore, a periodic self-guided training, which can be achieved using high-fidelity CPR-manikins appears to be a promising way to reach the aim of maintaining persistent sufficient CPR skills and should be implemented in every medical student's training.

### Additional file

**Additional file 1:** Self-assessment by questionnaire. Initial self-assessment by questionnaire for empirical data collection and self-perception of personal CPR-skills followed by a second set of questionnaires covering the training and time-dependent self-perception of the students' CPR-skills. (DOC 28 kb)

### Abbreviations

ALS: Advanced live support; BLS: Basic live support; CFU: Control group follow-up; CPR: Cardiopulmonary resuscitation; IFU: Intervention group

follow-up; PBL: Problem-based learning; SEM: Standard error of the mean; VPM: Ventilations per minute

### Acknowledgements

The authors thank Matthias Schmitt-Mattern for his support in video evaluation and data collection.

### Authors' contributions

CB and KH designed the study, collected and analysed the data, wrote and approved the article. CE collected and analysed the data, contributed to concept and design of the study, revised and approved the article. PB, JB, HF, MW, HVA contributed to concept and design of the study, revised and approved the article.

### Funding

The CPR-manikins for data collection were a free of charge loan by Laerdal Medical GmbH, Puchheim. The SimMan 3G was funded by tuition fees of North Rhine-Westphalia.

### Availability of data and materials

The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article and its additional files. Files containing all raw data are available from the corresponding author on request. The questionnaires used are attached as a supplementary file.

### Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the ethics committee of the University of Muenster and the Medical Association of North Rhine-Westphalia (reference-number 2010-225-f-5). All participants were informed that they participate in a new educational approach, but neither about the distinct study methods and purpose, nor about group allocation. In accordance with the ethic committee approval, information about the distinct study purpose and written informed consent was given after completed data collection.

### Consent for publication

Not applicable.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Author details

<sup>1</sup>Department of Anesthesiology and Operative Intensive Care Medicine, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Hindenburgdamm 30, 12200 Berlin, Germany. <sup>2</sup>Department of Anesthesiology, University Medicine Greifswald, Greifswald, Germany.

<sup>3</sup>Department of Anaesthesiology, Intensive Care and Pain Medicine, University Hospital Münster, Münster, Germany. <sup>4</sup>Institute for Education and Students Affairs-IFAS, Medical Faculty, University of Münster, Münster, Germany.

Received: 10 November 2017 Accepted: 22 May 2019

Published online: 31 May 2019

### References

- 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;98:497–9.
- Rojas L, Aizman A, Arab JP, Utili F, Andresen MM. Basic cardiopulmonary resuscitation: knowledge, practical skills and effectiveness of maneuvers of general physicians. *Revista medica de Chile.* 2012;140:73–7.
- Hopstock LA. Cardiopulmonary resuscitation; use, training and self-confidence in skills. A self-report study among hospital personnel. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2008;16:18.
- Healey A, Sherbino J, Fan J, Mensour M, Upadhye S, Wasi P. A low-fidelity simulation curriculum addresses needs identified by faculty and improves the comfort level of senior internal medicine resident physicians with in-hospital resuscitation. *Crit Care Med.* 2010;38:1899–903.
- Preusch MR, Bea F, Roggenbach J, Katus HA, Junger J, Nikendei C. Resuscitation guidelines 2005: does experienced nursing staff need training and how effective is it? *Am J Emerg Med.* 2010;28:477–84.

6. Curran V, Fleet L, Greene M. An exploratory study of factors influencing resuscitation skills retention and performance among health providers. *J Contin Educ Heal Prof.* 2012;32:126–33.
7. Anderson GS, Gaetz M, Statz C, Kin B. CPR skill retention of first aid attendants within the workplace. *Prehospital and disaster medicine, vol. 27;* 2012. p. 312–8.
8. Smith KK, Gilcreast D, Pierce K. Evaluation of staff's retention of ACLS and BLS skills. *Resuscitation.* 2008;78:59–65.
9. Riegel B, Nafziger SD, McBurnie MA, Powell J, Ledingham R, Sehra R, Mango L, Henry MC. How well are cardiopulmonary resuscitation and automated external defibrillator skills retained over time? Results from the public access defibrillation (PAD) trial. *Academic emergency medicine official journal of the Society for Academic Emergency Medicine.* 2006;13:254–63.
10. Verplancke T, De Paepe P, Calle PA, De Regge M, Van Maele G, Monsieurs KG. Determinants of the quality of basic life support by hospital nurses. *Resuscitation.* 2008;77:75–80.
11. Ko PY, Scott JM, Mihai A, Grant WD. Comparison of a modified longitudinal simulation-based advanced cardiovascular life support to a traditional advanced cardiovascular life support curriculum in third-year medical students. *Teach Learn Med.* 2011;23:324–30.
12. King JM, Reising DL. Teaching advanced cardiac life support protocols: the effectiveness of static versus high-fidelity simulation. *Nurse Educ.* 2011;36:62–5.
13. Lo BM, Devine AS, Evans DP, Byars DV, Lamm OY, Lee RJ, Lowe SM, Walker LL. Comparison of traditional versus high-fidelity simulation in the retention of ACLS knowledge. *Resuscitation.* 2011;82:1440–3.
14. Lee J, Cheng A, Angelski C, Allain D, Ali S. High-fidelity simulation in pediatric emergency medicine: a national survey of facilitator comfort and practice. *Pediatr Emerg Care.* 2015;31:260–5.
15. JR S. Overview of problem-based learning: definitions and distinctions. *Interdisciplinary journal of Problem-based learning.* 2006;1:9–20.
16. Neville AJ. Problem-based learning and medical education forty years on. A review of its effects on knowledge and clinical performance. *Med Princ Pract.* 2009;18:1–9.
17. Deakin CD, Nolan JP, Soar J, Sunde K, Koster RW, Smith GB, Perkins GD. European resuscitation council guidelines for resuscitation 2010 section 4. Adult advanced life support. *Resuscitation.* 2010;81:1305–52.
18. Wood DF. Problem based learning. *BMJ.* 2003;326:328–30.
19. Cohen J. A power primer. *Psychol Bull.* 1992;112:155–9.
20. 2005 American Heart Association guidelines for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care. *Circulation* 2005, 112:IV1–203.
21. Handley AJ, Koster R, Monsieurs K, Perkins GD, Davies S, Bossaert L. European resuscitation council guidelines for resuscitation 2005. Section 2. Adult basic life support and use of automated external defibrillators. *Resuscitation.* 2005;67(Suppl 1):S7–23.
22. Koster RW, Baubin MA, Bossaert LL, Caballero A, Cassan P, Castren M, Granja C, Handley AJ, Monsieurs KG, Perkins GD, et al. European resuscitation council guidelines for resuscitation 2010 section 2. Adult basic life support and use of automated external defibrillators. *Resuscitation.* 2010;81:1277–92.
23. Lukas RP, Engel P, Wecker S, Thies S, Friederichs H, Gerss J, Van Aken H, Hahnenkamp K, Bohn A. Cardiopulmonary resuscitation guidance improves medical students' adherence to guidelines in simulated cardiac arrest: a randomised cross-over study. *Eur J Anaesthesiol.* 2013;30:752–7.
24. Roppolo LP, Heymann R, Pepe P, Wagner J, Commons B, Miller R, Allen E, Horne L, Waincott MP, Idris AH. A randomized controlled trial comparing traditional training in cardiopulmonary resuscitation (CPR) to self-directed CPR learning in first year medical students: the two-person CPR study. *Resuscitation.* 2011;82:319–25.
25. Kern KB, Hilwig RW, Berg RA, Ewy GA. Efficacy of chest compression-only BLS CPR in the presence of an occluded airway. *Resuscitation.* 1998;39:179–88.
26. Szogedi I, Zrinyi M, Betlehem J, Ujvarine AS, Toth H. Training nurses for CPR: support for the problem-based approach. *Eur J Cardiovasc Nurs.* 2010;9:50–6.
27. Berdowski J, Beekhuis F, Zwiderman AH, Tijssen JG, Koster RW. Importance of the first link: description and recognition of an out-of-hospital cardiac arrest in an emergency call. *Circulation.* 2009;119:2096–102.
28. Layon AJ, Gabrielli A, Goldfeder BW, Hevia A, Idris AH. Utstein style analysis of rural out-of-hospital cardiac arrest [OOHCA]: total cardiopulmonary resuscitation (CPR) time inversely correlates with hospital discharge rate. *Resuscitation.* 2003;56:59–66.
29. Travers AH, Rea TD, Bobrow BJ, Edelson DP, Berg RA, Sayre MR, Berg MD, Chameides L, O'Connor RE, Swor RA. Part 4: CPR overview: 2010 American Heart Association guidelines for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care. *Circulation.* 2010;122:5676–84.
30. Kruger J, Dunning D. Unskilled and unaware of it: how difficulties in recognizing one's own incompetence lead to inflated self-assessments. *J Pers Soc Psychol.* 1999;77:1121–34.
31. Beesems SG, Wijmans L, Tijssen JG, Koster RW. Duration of ventilations during cardiopulmonary resuscitation by lay rescuers and first responders: relationship between delivering chest compressions and outcomes. *Circulation.* 2013;127:1585–90.
32. Talikowska M, Tohira H, Finn J. Cardiopulmonary resuscitation quality and patient survival outcome in cardiac arrest: a systematic review and meta-analysis. *Resuscitation.* 2015;96:66–77.
33. Stiell IG, Brown SP, Nichol G, Cheskes S, Vaillancourt C, Callaway CW, Morrison LJ, Christenson J, Aufderheide TP, Davis DP, et al. What is the optimal chest compression depth during out-of-hospital cardiac arrest resuscitation of adult patients? *Circulation.* 2014;130:1962–70.
34. Schulz CM, Mayer V, Kreuzer M, Kochs EF, Schneider G. A tool for immediate and automated assessment of resuscitation skills for a full-scale simulator. *BMC research notes.* 2011;4:550.
35. Jones CM, Owen A, Thorne CJ, Hulme J. Comparison of the quality of basic life support provided by rescuers trained using the 2005 or 2010 ERC guidelines. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2012;20:53.

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

#### Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)



## 2.5 Originalarbeit 5: Echokardiografische Evaluation der rechtsventrikulären Funktion im SARS-CoV-2 ARDS

Asgarpur G, Treskatsch S, Angermair S, Danassis M, Nothnagel AM, Toepper C, Trauzeddel RF, Nordine M, Heeschen J, Al-Chehadeh A, Landmesser U, Sander LE, Kurth F, **Berger C**. Echocardiographic Evaluation of Right Ventricular (RV) Performance over Time in COVID-19-Associated ARDS-A Prospective Observational Study. J Clin Med. 2021 May 1;10(9):1944. doi: 10.3390/jcm10091944.

Ziel dieser prospektiv durchgeführten Arbeit war es, die rechtsventrikuläre Funktion bei intensivmedizinisch behandelten Patient\*innen im SARS-CoV-2 assoziiertem akutem Lungenversagen (ARDS – acute respiratory distress syndrome) mittels transthorakaler Echokardiografie (TTE) sowohl in der Initialphase als auch im Verlauf der Erkrankung zu untersuchen.

Im „klassischen“ nicht SARS-CoV-2 assoziierten ARDS kann, möglicherweise ausgelöst durch eine hypoxisch-pulmonale Vasokonstriktion und auch beatmungsassoziiert, zusätzlich eine rechtsventrikuläre (RV) Dysfunktion auftreten und den Verlauf der Erkrankung negativ beeinflussen [117, 118]. Sowohl beim klassischen ARDS als auch beim viralen SARS-CoV-2 ARDS steht eine Schädigung des Endothels und überschießende Inflammationsreaktion als Pathomechanismus im Fokus, welche aber im Signalweg und Ausprägung einzelner Inflammationsreaktionen möglicherweise unterschiedlich abläuft [119, 120]. In der Initialphase der SARS-CoV-2 Pandemie war es unklar, ob das SARS-CoV-2 ARDS demnach zu einer veränderten Beeinflussung des pulmonalen Widerstandes und der RV-Funktion führt und ob die RV-Funktion einen möglichen Risikofaktor darstellt oder auch ein Ansatzpunkt für einen potentiellen Verlaufsparemeter der Erkrankung bzw. der Steuerung therapeutischer Maßnahmen sein kann. Zum Evaluieren der RV-Funktion steht die TTE als risikoarmes, nicht invasives Verfahren bettseitig zur Verfügung und hat schon in frühere Arbeiten im ARDS gezeigt, dass sie in der Lage ist die RV-Funktion adäquat zu Monitoren und auch zur Risikoprädiktion beizutragen [118, 121, 122].

Um erste Erkenntnisse über die RV Funktion im SARS-CoV-2 ARDS zu erlangen wurden daher in der ersten Infektionswelle behandelte Patient\*innen mittels TTE sowohl in den ersten Tagen der intensivmedizinischen Behandlung als auch im Verlauf der zweiten Behandlungswoche auf der Intensivstation untersucht. Die Evaluation der systolische RV-Parameter (TAPSE, RV-FAC) zeigten sowohl zum frühen als auch zum späten Messzeitpunkt eine normwertige Funktion. Das Verhältnis der Weite des RV im Verhältnis zum LV (RV/LV-

Ratio), als Surrogatparameter der RV-Druckbelastung, zeigte ebenfalls über alle Messungen einen nur geringgradigen Anstieg über dem Normalwert von 0,6. Zur Analyse der Abhängigkeit der Ergebnisse vom Schweregrad des ARDS wurde die RV/LV-Ratio im Verhältnis zum PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>-Quotienten ausgewertet. Hier zeigte sich bei den initialen Messungen keine Korrelation, wohingegen in den Verlaufsmessungen eine Korrelation einer höheren RV/LV-Ratio mit einem niedrigerem PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>-Quotienten festgestellt wurde.

Zusammenfassend kann daher gesagt werden, dass diese Arbeit Hinweise liefert, dass es in den ersten Tagen der intensivmedizinischen Behandlung des SARS-CoV-2 ARDS zu keiner relevanten RV Dilatation mit Anstieg der RV/LV-Ratio kommt, sich aber im Erkrankungsverlauf nach über einer Woche intensivmedizinischer Behandlung bei den bis dahin Überlebenden eine Tendenz zu höherer RV/LV-Ratio bei schwererem ARDS zeigt. Darüber hinaus war die systolische RV-Funktion zu allen Messzeitpunkten erhalten, so dass hier innerhalb des Messzeitraumes kein SARS-CoV-2 assoziiertes RV-Versagen detektiert wurde.



## Article

# Echocardiographic Evaluation of Right Ventricular (RV) Performance over Time in COVID-19-Associated ARDS—A Prospective Observational Study

Golschan Asgarpur <sup>1,†</sup>, Sascha Treskatsch <sup>1,\*,†</sup>, Stefan Angermair <sup>1</sup>, Michaela Danassis <sup>1</sup>, Anna Maria Nothnagel <sup>1</sup>, Christoph Toepper <sup>1</sup>, Ralf Felix Trauzeddel <sup>1</sup>, Michael Nordine <sup>1</sup>, Julia Heeschen <sup>1</sup>, Alaa Al-Chehadeh <sup>1</sup>, Ulf Landmesser <sup>2</sup>, Leif Erik Sander <sup>3</sup>, Florian Kurth <sup>3</sup> and Christian Berger <sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, Charité Campus Benjamin Franklin, Corporate Member of Freie Universität and Humboldt Universität zu Berlin, Charité—Universitätsmedizin Berlin, 12203 Berlin, Germany; golschan.asgarpur@charite.de (G.A.); stefan.angermair@charite.de (S.A.); michaela.danassis@charite.de (M.D.); anna-maria.nothnagel@charite.de (A.M.N.); christoph.toepper@charite.de (C.T.); ralf-felix.trauzeddel@charite.de (R.F.T.); michael.nordine@charite.de (M.N.); julia.heeschen@charite.de (J.H.); alaa.al-chehadeh@charite.de (A.A.-C.); christian.berger@charite.de (C.B.)
- <sup>2</sup> Department of Cardiology, Charité Campus Benjamin Franklin, Corporate Member of Freie Universität and Humboldt Universität zu Berlin, Charité—Universitätsmedizin Berlin, 12203 Berlin, Germany; ulf.landmesser@charite.de
- <sup>3</sup> Department of Infectious Disease and Respiratory Medicine, Corporate Member of Freie Universität and Humboldt Universität zu Berlin, Charité—Universitätsmedizin Berlin, 12203 Berlin, Germany; leif-erik.sander@charite.de (L.E.S.); florian.kurth@charite.de (F.K.)
- \* Correspondence: sascha.treskatsch@charite.de; Tel.: +49-30-450551522
- † These authors contributed equally.



Citation: Asgarpur, G.; Treskatsch, S.; Angermair, S.; Danassis, M.; Nothnagel, A.M.; Toepper, C.; Trauzeddel, R.F.; Nordine, M.; Heeschen, J.; Al-Chehadeh, A.; et al. Echocardiographic Evaluation of Right Ventricular (RV) Performance over Time in COVID-19-Associated ARDS—A Prospective Observational Study. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 1944. <https://doi.org/10.3390/jcm10091944>

Academic Editor: Heinrich Volker Groesdonk

Received: 13 March 2021  
Accepted: 29 April 2021  
Published: 1 May 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** (1) Background: To evaluate time-dependent right ventricular (RV) performance in patients with COVID-19-associated acute respiratory distress syndrome (ARDS) undergoing intensive care (ICU) treatment. (2) Methods: This prospective observational study included 21 ICU patients with COVID-19-associated ARDS in a university hospital in 2020 (first wave). Patients were evaluated by transthoracic echocardiography at an early (EE) and late (LE) stage of disease. Echocardiographic parameters describing RV size and function as well as RV size in correlation to  $P_aO_2/F_iO_2$  ratio were assessed in survivors and nonsurvivors. (3) Results: Echocardiographic RV parameters were within normal range and not significantly different between EE and LE. Comparing survivors and nonsurvivors revealed no differences in RV performance at EE. Linear regression analysis did not show a correlation between RV size and  $P_aO_2/F_iO_2$  ratio over all measurements. Analysing EE and LE separately showed a significant increase in RV size correlated to a lower  $P_aO_2/F_iO_2$  ratio at a later stage of COVID-19 ARDS. (4) Conclusion: The present study reveals neither a severe RV dilatation nor an impairment of systolic RV function during the initial course of COVID-19-associated ARDS. A trend towards an increase in RV size in correlation with ARDS severity in the second week after ICU admission was observed.

**Keywords:** COVID-19; transthoracic echocardiography; RV function; ARDS; intensive care

## 1. Introduction

The 2019 Coronavirus disease (COVID-19) caused by the novel SARS Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is responsible for a global pandemic, infecting millions of people worldwide. In certain cases, a fulminant SARS-CoV-2 infection led to severe acute respiratory distress syndrome (ARDS), as well affecting other organ systems, such as the nervous and the cardiovascular system [1,2]. The incidence of hospitalized patients with COVID-19 developing ARDS is approximately 33% [3] and is associated with poor clinical outcome and a high mortality rate, reaching up to 45% according to recent research [4].

The pathophysiology of non-COVID-associated ARDS has been described as an increased permeability to liquid, protein and cellular compounds across the lung endothelium, leading to interstitial edema, which further translocate across the alveolar barrier into the alveolar space, impairing oxygenation [5]. The resulting hypoxemia caused by a ventilation-to-perfusion mismatch as well as right-to-left intrapulmonary shunting provokes compensatory hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) with consecutive pulmonary hypertension and increased afterload, leading to right ventricular (RV) impairment or failure [6,7]. Non-COVID ARDS-associated RV failure is associated with a mortality rate of up to 60–70% [2,6,8].

Virus-associated RV impairment has been documented during the outbreak of H1N1 in 2009 [9]. However, in contrast to the pathophysiological course of non-COVID ARDS, early experiences with COVID-19-associated ARDS raised the suspicion for a loss of pulmonary vascular tone. Therapeutic strategies aiming to dilate alveolar pulmonary vessels in the area of alveoli still participating in gas exchange in order to improve gas exchange, with for example, inhaled nitric oxide, were found to be not as clinically effective as deemed [10]. Thus, we hypothesized that hypoxemia in COVID-19-associated ARDS may present as a different hemodynamic phenotype without increases in afterload, thus impairing RV performance. To investigate this hypothesis, we evaluated time-dependent RV performance in COVID-19-associated ARDS intensive care (ICU) patients using transthoracic echocardiography (TTE) as a noninvasive diagnostic and readily available bedside tool [7,8].

## 2. Materials and Methods

For evaluating the impact of COVID-19 ARDS on RV performance, we conducted a monocenter prospective observational study at the department of anesthesiology and intensive care medicine, Campus Benjamin Franklin, Charité—Universitätsmedizin Berlin. This study was constituted as a substudy of the PA-COVID-19 trial [11], approved by Charité's Ethics committee (EA2/066/20). Informed consent was obtained from all participants or their authorized representative. The trial was registered with the following number DRKS00021688 on 13 May 2020 (WHO International Clinical Trials Registry Platform).

Adult patients with positive SARS-CoV-2 polymerase chain reaction (PCR) testing admitted to our intensive care unit (ICU) requiring treatment due to COVID-19 ARDS in accordance with the Berlin Definition [4] were included in this study during the first wave in Germany in 2020. Patients with a palliative approach to therapy were excluded. All participants were scheduled for an early TTE evaluation (EE) of RV performance within the first week of ICU treatment. For evaluating a possible time-dependent impact on RV performance, an additional "late" transthoracic echocardiography (LE) was conducted in the second week after ICU admission. All TTE examinations were performed by echocardiography-trained ICU practitioners according to national standards [12] and actual guidelines [13]. For evaluation of RV performance, the 2-dimensional apical-4-chamber (A4C) or subcostal 4-chamber view (SC4C) were obtained using a VIVID S60 ultrasound system (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). The following parameters were analyzed using EchoPac (GE Healthcare, Chicago, USA) according to recent guidelines: RV medial diameter (RVMD), RV end diastolic area index (RVEDA<sub>i</sub>), RV/LV medial diameter ratio (RLDR), RV/LV area ratio (RLAR), tricuspid annular plain systolic excursion (TAPSE) and RV fractional area change (RFAC) [13].

Demographic, morphometric, laboratory, respiratory/ventilatory and hemodynamic data were obtained from two patient data management systems (COPRA System GmbH, Sasbachwalden, Germany and SAP AG, Walldorf, Germany) at two time points: EE and LE. All data are available on demand.

Descriptive analyses and statistical testing were performed using IBM SPSS Statistics (version 25; IBM, Armonk, NY, USA) with a *p*-value below 0.05 regarded as significant. Unless otherwise stated, all data are presented as median and interquartile range (IQR). Statistical significance among groups was analyzed by the exact nonparametric Mann-Whitney U test or Wilcoxon single rank test. Exact chi-square tests were used for qualitative

data. Linear regression ( $r^2$ ) was calculated to detect correlations between parameters describing RV performance and oxygenation index as surrogate for ARDS severity. All tests should be understood as constituting explorative analysis, and no adjustment for multiple testing was performed.

### 3. Results

Between March and May 2020, 28 patients were assessed for eligibility. Twenty-one patients were included in this study, while six did not meet inclusion criteria (no ARDS according to Berlin definition), and one patient was transferred to a different ICU after initial evaluation (Figure 1).

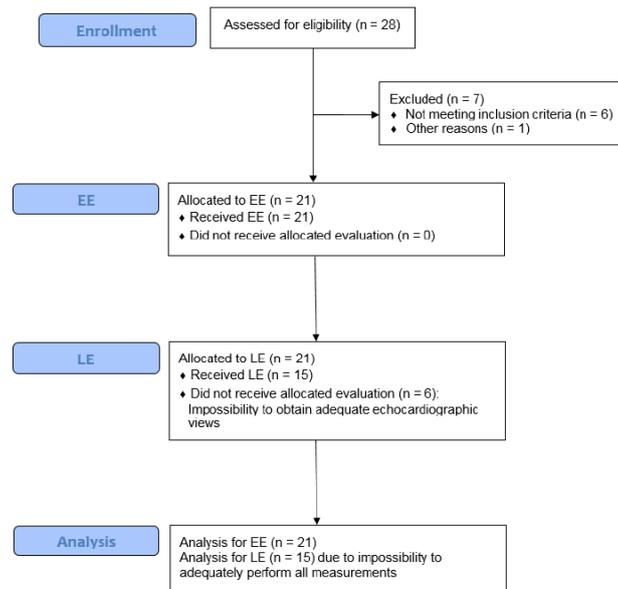


Figure 1. Consort flow diagram.

Median (IQR) age of all included patients was 68 (59/76) years with a body mass index (BMI) of 27.8 (24.0/31.8) kg/m<sup>2</sup> and a gender distribution of 9/12 (female/male). Seven out of 21 patients died, accounting for a mortality rate of 33%. Median time from ICU admission to death was 20 (12/30) days. Detailed morphometric and demographic data of survivors and nonsurvivors at ICU admission are presented in Table 1. Except for hyperlipoproteinemia (HLP), which found was more amongst nonsurvivors (survivors 7%, nonsurvivors 43%;  $p = 0.007$ ), both groups exhibited comparable age, gender, BMI and comorbidities (for detailed and patient individual information for comorbidities, see Supplementary Table S1). Laboratory parameters at ICU admission showed no differences between survivors and nonsurvivors (Supplemental Table S2).

Table 1. Survivor and nonsurvivor demographic data and medical history at intensive care unit (ICU) admission.

	Survivor <i>n</i> = 14	Nonsurvivor <i>n</i> = 7	<i>p</i>
Age (years)	70 (57/76)	68 (62/79)	0.36
Gender (female/male)	7/7	2/5	0.076
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28.2 (23.0/31.7)	27.0 (26.1/34.0)	0.799
History of			

Table 1. Cont.

	Survivor <i>n</i> = 14	Nonsurvivor <i>n</i> = 7	<i>p</i>
CAD	3 (21%)	0 (0%)	n.a.
AHT	8 (57%)	3 (43%)	0.280
HF	0 (0%)	1 (14%)	n.a.
COPD	1 (7%)	1 (14%)	0.445
IDDM	1 (7%)	0 (0%)	n.a.
NIDDM	2 (14%)	1 (14%)	1.0
CKD	1 (7%)	1 (14%)	0.445
CLD	0 (0%)	0 (0%)	n.a.
HLP	1 (7%)	3 (43%)	0.007
PVD	1 (7%)	0 (0%)	n.a.

BMI: body mass index; CAD: coronary artery disease; AHT: arterial hypertension; HF: heart failure; COPD: chronic obstructive pulmonary disease; IDDM: insulin-dependent diabetes mellitus; NIDDM: non-insulin-dependent diabetes mellitus; CKD: chronic kidney disease; CLD: chronic liver disease; HLP: hyperlipoproteinemia; PVD: peripheral vascular disease.

Increased APACHE II and SAPS II scores at ICU admission depict an increased disease severity in nonsurvivors despite comparable ratios of arterial partial pressure of oxygen to fraction of inspired oxygen ( $P_aO_2/F_iO_2$ ) (Table 2).

Table 2. Survivor and nonsurvivor medical conditions at ICU admission.

	Survivor <i>n</i> = 14	Nonsurvivor <i>n</i> = 7	<i>p</i>
$P_aO_2/F_iO_2$ ratio	126 (98/163)	142 (81/173)	1.00
NIV/IV	3/11	1/6	0.445
SOFA	5 (4/11)	10 (7/12)	0.197
APACHE II	15 (7/19)	21 (11/30)	0.031
SAPS II	31 (22/44)	64 (30/71)	0.02

$P_aO_2$ : arterial partial pressure of oxygen,  $F_iO_2$ : fraction of inspired oxygen, NIV: noninvasive ventilation, IV: invasive ventilation, SOFA: Sequential Organ Failure Assessment, APACHE: Acute Physiology And Chronic Health Evaluation, SAPS: Simplified Acute Physiology Score.

Seventeen out of 21 patients (81%) required invasive mechanical ventilation at ICU admission (survivors: *n* = 11; nonsurvivors *n* = 6) (Table 2), and nearly all patients had bacterial superinfections during ICU treatment (Supplementary Table S2). Time from ICU admission to EE was 1.7 (0.4/3.7) days and 11.0 (7.9/12.8) days to LE. No patient died before the LE examination. Clinical conditions were comparable between EE and LE (Table 3) as well as between survivors and nonsurvivors at EE (Table 4). Computer tomography (CT) confirmed segmental pulmonary embolism (PE) in 5 of 21 (24%) patients during the observation period without significant differences between survivors (*n* = 3; 21%) and nonsurvivors (*n* = 2; 29%) (*p* = 0.717).

Table 3. Scores, respiratory/ventilatory and hemodynamic data obtained at EE and LE echocardiographic examination.

	EE	LE	<i>p</i>	No. of Patients
$P_aO_2/F_iO_2$ ratio	203 (138/269)	166 (138/273)	0.570	21/15
Invasive Ventilation				
ΔP [mbar]	10.0 (9.5/14)	10.0 (8.5/15.0)	0.929	17/14
PEEP [mbar]	14.0 (10.0/16.0)	14.0 (12.3/15.3)	0.330	17/14
TV [mL/kg]	5.8 (5.4/6.5)	5.9 (4.6/7.1)	0.859	17/14
PaCO <sub>2</sub> [mbar]	38 (34/46)	39 (32/46)	0.776	21/15
MAP [mmHg]	70 (65/85)	70 (70/85)	0.653	21/15
HR [BPM]	82 (72/93)	78 (74/103)	0.233	21/15
Norepinephrine [μg/kg/min]	0.05 (0.0/0.17)	0.02 (0.00/0.08)	0.054	21/15

Table 3. Cont.

	EE	LE	<i>p</i>	No. of Patients
APACHE II	23 (18/28)	28 (21/34)	0.100	21/15
SOFA	9 (4/12)	10 (8/12)	0.059	21/15
SAPS II	40 (37/61)	58 (41/73)	0.139	21/15

P<sub>a</sub>O<sub>2</sub>: arterial partial pressure of oxygen, F<sub>i</sub>O<sub>2</sub>: fraction of inspired oxygen, ΔP: change in mechanical respiratory pressure, PEEP: positive end expiratory pressure, TV: tidal volume, MAP: mean arterial pressure, HR: heart rate, SOFA: Sequential Organ Failure Assessment, APACHE: Acute Physiology And Chronic Health Evaluation, SAPS: Simplified Acute Physiology Score.

Table 4. Respiratory/ventilator, hemodynamic data, and clinical scores at EE for survivors and nonsurvivors.

	Survivors	Nonsurvivors	<i>p</i>	No. of Patients
P <sub>a</sub> O <sub>2</sub> /F <sub>i</sub> O <sub>2</sub> ratio	177 (128/256)	238 (148/283)	0.535	14/7
Invasive Ventilation				
ΔP [mbar]	11 (9/14)	10 (10/15)	0.961	11/6
PEEP [mbar]	14 (10/15)	16 (13/17)	0.256	11/6
TV [mL/kg]	6.0 (5.4/6.9)	5.6 (5.1/6.8)	0.428	11/6
PaCO <sub>2</sub> [mbar]	36 (31/41)	48 (37.0/50.0)	0.036	14/7
MAP [mmHg]	73 (65/85)	70 (65/85)	0.799	14/7
HR [BPM]	81 (70/91)	90 (72/95)	0.360	14/7
Norepinephrine [μg/kg/min]	0.04 (0.0/0.13)	0.13 (0.0/0.22)	0.360	14/7
APACHE II	20 (17/27)	28 (21/29)	0.197	14/7
SOFA	8 (4/11)	10 (6/12)	0.172	14/7
SAPS II	40 (36/55)	56 (38/65)	0.287	14/7

P<sub>a</sub>O<sub>2</sub>: arterial partial pressure of oxygen, F<sub>i</sub>O<sub>2</sub>: fraction of inspired oxygen, ΔP: driving pressure, PEEP: positive end expiratory pressure, TV: tidal volume, MAP: mean arterial pressure, HR: heart rate, SOFA: Sequential Organ Failure Assessment, APACHE: Acute Physiology And Chronic Health Evaluation, SAPS: Simplified Acute Physiology Score.

Echocardiographic parameters evaluating RV size (RVMD, RVEDAi, RLDR, RLAR) and systolic function (TAPSE, RFAC) were not significantly different between both time points (Table 5). Comparing survivors with nonsurvivors also revealed no differences in RV performance parameters at EE (Table 6). Paradoxical movement of the interventricular septum (IVS) was observed in only one patient at EE.

Table 5. TTE evaluated parameters for right ventricular function at EE and LE.

	EE	LE	<i>p</i>	No. of Patients
RVMD [mm]	30 (28/37)	32 (29/37)	0.724	21/15
RVEDAi	11.6 (9.8/13.0)	12.4 (10.8/13.5)	0.820	20/15
RLDR	0.70 (0.63/0.84)	0.72 (0.67/0.81)	0.570	21/15
RLAR	0.68 (0.57/0.77)	0.68 (0.54/0.73)	0.191	20/15
TAPSE [mm]	22 (19/26)	24 (21/27)	0.345	19/15
RFAC [%]	0.35 (0.30/0.44)	0.36 (0.32/0.39)	0.650	20/15

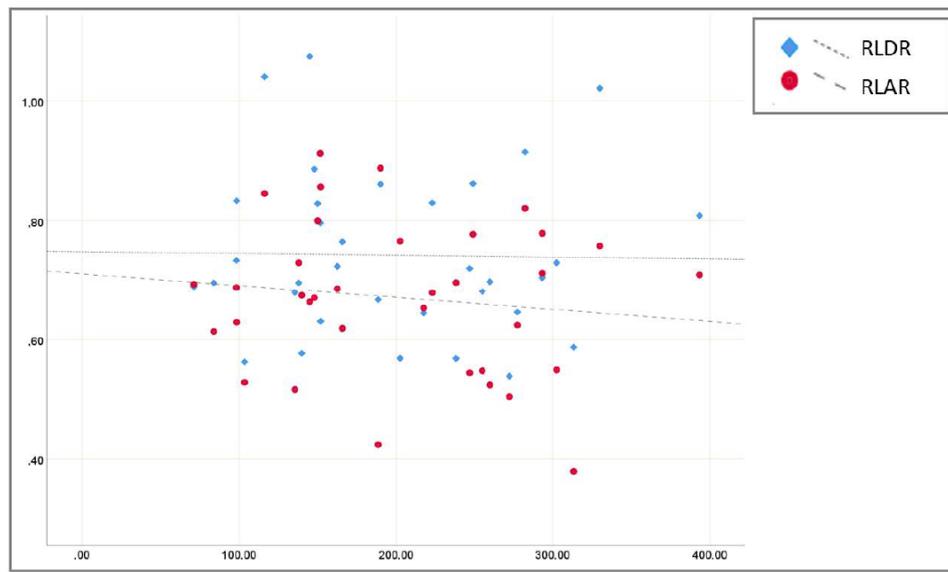
RVMD: right ventricular medial diameter, RVEDAi: RV enddiastolic area index, RLDR: RV/LV diameter ratio, RLAR: RV/LV area ratio, TAPSE: tricuspid annular plain systolic excursion, RFAC: RV fractional area change.

Table 6. TTE evaluated parameters for right ventricular function, survivors compared to nonsurvivors at EE.

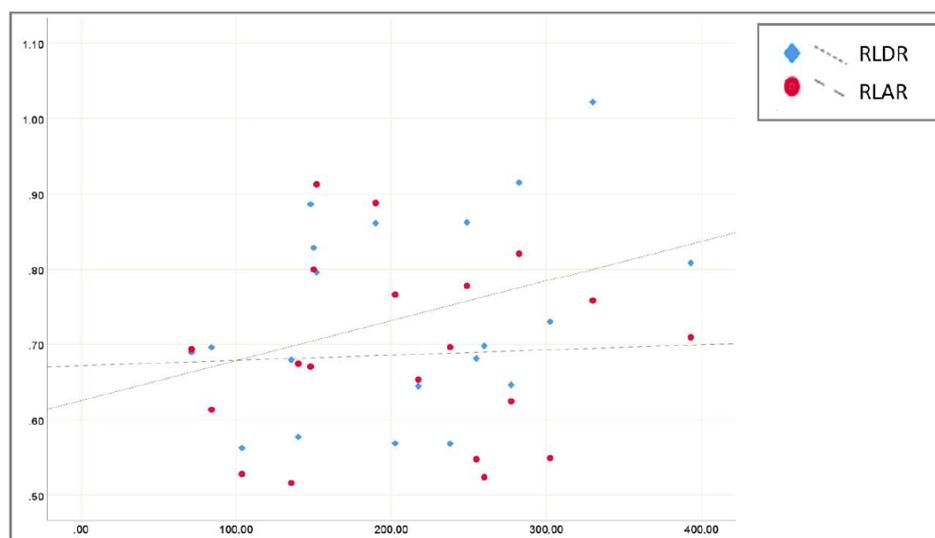
	Survivors	Nonsurvivors	<i>p</i>	No. of Patients
RVMD [mm]	31 (29/37)	28 (25/39)	0.360	14/7
RVEDAi	12.0 (10.0/14.2)	10.7 (9.7/12.5)	0.397	14/6
RLDR	0.69 (0.63/0.81)	0.73 (0.62/0.89)	0.689	14/7
RLAR	0.68 (0.54/0.77)	0.68 (0.61/0.84)	0.602	14/6
TAPSE [mm]	23 (20/26)	21 (19/25)	0.579	13/6
RFAC [%]	35 (32/41)	36 (25/47)	0.779	14/6

RVMD: right ventricular medial diameter, RVEDAi: RV enddiastolic area index, RLDR: RV/LV diameter ratio, RLAR: RV/LV area ratio, TAPSE: tricuspid annular plain systolic excursion, RFAC: RV fractional area change.

Linear regression analysis including all echocardiographic measurements did not detect a correlation between RV size and  $P_aO_2/F_iO_2$  ratio (RLDR:  $r^2 = 0.000$ ,  $p = 0.907$ ; RLAR:  $r^2 = 0.02$ ,  $p = 0.466$ ) (Figure 2a). Separate evaluation of time-dependent RV performance also found no correlation between RV size and  $P_aO_2/F_iO_2$  ratio at EE (RLDR:  $r^2 = 0.149$ ,  $p = 0.084$ ; RLAR:  $r^2 = 0.002$ ,  $p = 0.835$ ) (Figure 2b). Nevertheless, a trend towards a slight, though significant increase in RV size associated with a decreased  $P_aO_2/F_iO_2$  ratio became noticeable in the second week of ICU treatment at LE (RLDR:  $r^2 = 0.27$ ,  $p = 0.047$ ; RLAR:  $r^2 = 0.168$ ,  $p = 0.129$ ) (Figure 2c).

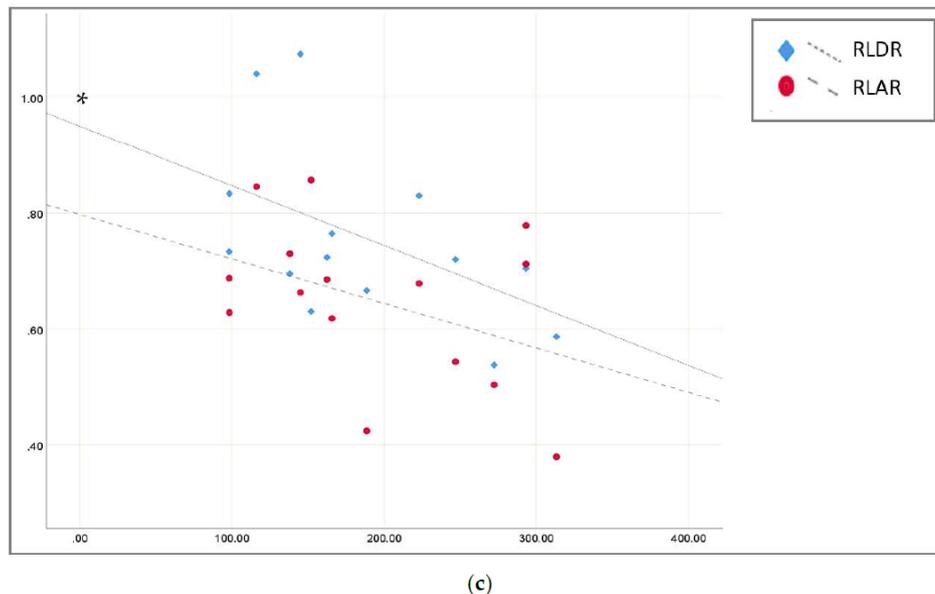


(a)



(b)

Figure 2. Cont.



**Figure 2.** (a): Linear regression of RV/LV ratio (RLAR = red; RLDR = blue) and  $pO_2/F_iO_2$  ratio; All measurements (RLDR:  $r^2 = 0.000$ , RLAR:  $r^2 = 0.02$ ); (b): Linear regression of RV/LV ratio (RLAR = red; RLDR = blue) and  $pO_2/F_iO_2$  ratio EE (RLDR:  $r^2 = 0.149$ , RLAR:  $r^2 = 0.002$ ); (c): Linear regression of RV/LV ratio (RLAR = red; RLDR = blue) and  $pO_2/F_iO_2$  ratio LE (RLDR  $r^2 = 0.27^*$ , RLAR  $r^2 = 0.168$ );  $* = p < 0.05$ .

#### 4. Discussion

This observational study is the first to evaluate the time-dependent impact of COVID-19-associated ARDS on RV performance and demonstrated a virtually unaffected RV with absence of severe RV dilatation within the first two weeks after ICU admission using two-dimensional echocardiography. We were also unable to detect any discernible RV differences between survivors and nonsurvivors during the observation period via echocardiographic bedside examinations. Although RV values remained within normal or acceptable ranges, according to proposed values in COVID-19 ARDS, non-COVID ARDS and/or ASE/ESC guidelines [13–15], a trend towards RV enlargement correlating with a decrease in  $P_aO_2/F_iO_2$  ratio—as surrogate marker for ARDS severity—was observed during the second week of evaluation. These results may support previous assumptions that COVID-19 ARDS may present as an altered hemodynamic phenotype without severe impairment of RV performance.

RV dilatation or dysfunction in non-COVID ARDS is understood as a result of physiological changes in the pulmonary circulation [16]. The mechanism of acute cor pulmonale in non-COVID ARDS has been established as refractory pulmonary edema due to endothelial cell swelling and hypoxemia, leading to HPV in precapillary arterioles and consecutively increasing RV afterload. Additional microvascular thrombosis deriving from endothelial cell activation can further promote RV deterioration, and later remodeling can lead to persistent pulmonary hypertension [17,18].

According to this pathophysiological pathway, we assumed that RV function during COVID-19-associated ARDS would follow suit, however, we were not able to detect any meaningful RV impairment in COVID-19 ARDS patients in our results. For higher accuracy, we determined RV size not only in terms of absolute diameter, but also in correlation to LV size using two different methods: end-diastolic RV/LV diameter (RLDR) and end-diastolic RV/LV area (RLAR). With a calculated RLDR and RLAR between 0.68 and 0.72 in conjunction with a preserved systolic RV function, our COVID-19 ARDS cohort revealed, at most, only a slight increase in RV size. Whether or not this increase implies a clinically

relevant RV impairment remains controversial, as former studies regarding disease impact on RV set a much higher limit for a relevant RV/LV ratio increase [19–21]. Analyzing timed-dependent RV performance in our ICU cohort, an absence of severe RV impairment was also observed at a later stage of disease. Further, to investigate if a more severe COVID-19 ARDS may correlate with a pronounced RV impairment, we analyzed linear regression of  $P_{aO_2}/F_{iO_2}$  ratios with RV/LV ratios. Based on experience from non-COVID ARDS pathophysiology, a more severe ARDS should lead to a higher RV/LV ratio. Again, this assumption could not be confirmed in our COVID-19 ARDS cohort as we observed only a slight increase in RV in relation to LV size correlating with a more impaired oxygenation at a later stage of disease.

Interestingly, critically ill patients suffering from H1N1 infection frequently exhibit RV dilatation and failure [9], whereas a recent study showed a reduced incidence of RV failure in ventilated COVID-19 patients [22]. These findings may reflect the varying clinical manifestation due to different pathophysiological changes in non-COVID and COVID-19 ARDS. The precise pathological mechanism in COVID-19 ARDS is still unknown, but comparisons to other viral infections support the hypothesis of a different clinical phenotype with altered pulmonary vascular reactivity [22,23] promoting increased vascular permeability [24] finally leading to vasoplegia [10]. Impaired endothelial function without HPV may thus provide an explanation for the sustained absence of severe RV dysfunction among the COVID-19 ARDS population over time, as demonstrated by our findings.

In this context, the course of COVID-19 as well as non-COVID ARDS may be assumed as being possibly bimodal in nature, or as some authors have suggested, with different phenotypes [10,25]. This theory may be supported by our observed shift to a slightly higher correlation of increased RV/LV ratio with a decreased  $P_{aO_2}/F_{iO_2}$  ratio in the second week after ICU admission. Furthermore, it should be taken into consideration that during the course of virally induced ARDS, bacterial superinfection is a common complication [22,26]. This was also present in our study population, where 80.9% of patients had a proven bacterial superinfection during their ICU treatment (Supplementary Table S3). Hence, it cannot be ruled out that the ARDS phenotype may change over time. It is thus reasonable that the later course of COVID-19 ARDS may present as a mixture of viral and bacterial ARDS, which may be reflected in the observed change in linear regression analysis at LE. The destruction of pulmonary tissue, which we frequently observed in our COVID-19 ARDS (Supplemental Figure S1), may provide another explanation for our findings, especially in the late course. Such destruction may lead to a rarefaction of the pulmonary vascular bed resulting in an increased RV afterload. Another possible explanation for a change in RV performance over time may be pulmonary embolism with consecutive RV impairment. Segmental PE was detected in five (21%) patients during the observation period, which is within the reported incidence of PE in COVID-19 [27]. No central PE occurred among our population and comparison of RV parameters in PE and non-PE patients revealed no significant differences in RV performance (Supplementary Table S4). Therefore, additional PE seems to be unlikely to have a relevant impact on the findings in this study.

Only limited data for RV performance in COVID-19 ARDS exist to date and the studies vary in their finding. Other than the above-mentioned pathophysiological theories, some methodical explanations may account for these differences. Recently presented results for RV function in COVID-19 were obtained from single, inconsistent time points among COVID-19 infected patients but without differentiation between presence or absence of ARDS or sepsis [28–31]. Other working groups have presented data with partly mechanically ventilated COVID-19 patients (30%) [29] or exclusion of ventilated COVID-19 patients [30], while echocardiographic examinations were performed. Another work from Bagate et al. reported at a single time point—with a focus on filling pressures—a high incidence of cor pulmonale, but RV functional parameters like TAPSE were found to be comparable to our findings [28]. These different approaches may lead to a heterogeneity of studied populations and may impact RV evaluation findings in COVID-19

patients. Therefore, we assessed RV performance in every patient, irrespective of ventilation status at an early state after onset of COVID-19-associated ARDS followed by a second evaluation within the second week of treatment. Nevertheless, we did not find any differences in parameters describing sole RV performance as well as in correlation with ARDS severity between survivors and nonsurvivors. The observed slight but not significant decrease of TAPSE in nonsurvivors is somewhat in contrast to a recent study from D'Alto and colleagues. They investigated TAPSE in relation to echocardiographic estimations of systolic pulmonary arterial pressure (sPAP) among a comparable cohort of mostly mechanically ventilated COVID-19 ARDS patients [32]. A significant reduction in TAPSE and TAPSE/sPAP ratio between survivors and nonsurvivors was observed, but despite statistical significance, TAPSE in nonsurvivors was also still within normal ranges confirming our results. In addition, a significant increase in C-reactive protein and procalcitonin were observed only among nonsurvivors in their study, which could be interpreted as a higher incidence of bacterial superinfections at the time of RV assessment. This finding cannot be confirmed by our results as most patients suffered bacterial superinfections irrespective of survival.

This study has some limitations. Due to the course of ARDS, with the need of invasive ventilation, including high PEEP and periodic change to prone position, obtaining adequate TTE views at exactly the same time point was not possible. Further, TTE evaluation in such patients is challenging, therefore, our results are somewhat limited due to the absence of sPAP evaluation. The assessment of RV function via TTE amongst ARDS patients has been observed to be inferior to transesophageal echocardiography (TEE), as TTE is prone to interference due to anatomical barriers such as the chest wall [33]. Additionally, Evrard et al. found that cardiac assessment via TTE was suboptimal compared with TEE assessment amongst COVID-19 patients, and the primary reason for this is the ability to obtain short axis cardiac images with TEE [22]. Because of the increased complexity to obtain proper Doppler-derived sPAP in a positive pressure ventilated ARDS population, we decided to utilize a simple and reproducible protocol for TTE evaluation over time. Furthermore, all participants required (non)invasive ventilatory support at the time of RV evaluation. It may be reasonable to suggest that this intervention improved  $P_aO_2/F_iO_2$  ratios, thereby preserving RV performance. In this context a baseline TTE evaluation before initiation of ARDS therapy would have been beneficial, but ethically not feasible. Because of the nature of this study, a previous sample size calculation was not possible. Additionally, due to the small sample size in this study, drawing broader conclusions concerning RV function in the majority of COVID-19 patients may be limited. A higher number of cases might have led to more statistically significant differences between groups, as well as increasing the general power of the study.

## 5. Conclusions

Our work reveals neither severe RV dilatation nor impairment of systolic RV function during the initial course of COVID-19-associated ARDS. In contrast to the initial evaluation, a trend towards an increase in RV size in correlation with ARDS severity in the second week after ICU admission was detectable. These findings support the assumptions of impaired regulation of pulmonary vascular and/or endothelial dysfunction due to SARS-CoV-2 and hint towards a change of the COVID-19-associated ARDS phenotype over time. However, final evidence for these assumptions is still missing, and further research into the hemodynamic changes during the course of COVID-19 ARDS needs to be performed.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jcm10091944/s1>, Table S1: Known medical history, Table S2: Laboratory data on ICU admission from survivors vs. nonsurvivors, Table S3: Presumed superinfections and proven superinfections, pulmonary and extrapulmonary during ICU stay, Table S4: TTE evaluated parameters for right ventricular function at EE in patients without PE compared to patients with PE, Figure S1: Pat. No 4, CT Scan of the lung at LE, after first week of ICU stay due to COVID-19 ARDS (mechanically ventilated).

**Author Contributions:** Overall responsibility: S.T., C.B., G.A.; conceptualization, S.T., C.B., G.A.; methodology, S.T., C.B., G.A.; software, C.B., G.A.; validation, C.B., G.A., C.T., R.F.T., M.N., J.H., S.A., M.D., A.M.N., U.L., L.E.S., F.K., A.A.-C.; formal analysis, C.B., S.T.; investigation, G.A., C.T., S.A., A.M.N., M.D.; resources, A.A.-C., J.H., C.B., G.A.; data curation, S.A., J.H.; writing—original draft preparation, C.B., G.A.; writing—review and editing, S.T., U.L., L.E.S., F.K., S.A.; visualization, C.B.; supervision, S.T., U.L., L.E.S., C.B.; project administration, C.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Charité—Universitätsmedizin Berlin: PA-COVID-19 trial (EA2/066/20).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study or their authorized representatives. Written informed consent has been obtained from the patients to publish this paper.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to ethical restrictions.

**Conflicts of Interest:** M.D., A.M.N., C.T., R.F.T., J.H., G.A., M.N., S.A., A.A.-C., U.L., L.E.S., F.K. have nothing to declare. S.T. received funding for experimental research as well as honoraria for lectures from Edwards, OrionPharma, Amomed and Smith & Nephews outside this work. C.B. received funding for travel costs from OrionPharma.

## References

1. Evans, P.C.; Rainger, G.E.; Mason, J.C.; Guzik, T.J.; Osto, E.; Stamataki, Z.; Neil, D.; Hoefer, I.E.; Fragiadaki, M.; Waltenberger, J.; et al. Endothelial dysfunction in COVID-19: A position paper of the ESC Working Group for Atherosclerosis and Vascular Biology, and the ESC Council of Basic Cardiovascular Science. *Cardiovasc. Res.* **2020**. [\[CrossRef\]](#)
2. Zochios, V.; Parhar, K.; Tunnicliffe, W.; Roscoe, A.; Gao, F. The Right Ventricle in ARDS. *Chest* **2017**, *152*, 181–193. [\[CrossRef\]](#)
3. Tzotzos, S.J.; Fischer, B.; Fischer, H.; Zeitlinger, M. Incidence of ARDS and outcomes in hospitalized patients with COVID-19: A global literature survey. *Crit. Care* **2020**, *24*, 516. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Ranieri, V.M.; Rubenfeld, G.D.; Thompson, B.T.; Ferguson, N.D.; Caldwell, E.; Fan, E.; Camporota, L.; Slutsky, A.S. Acute respiratory distress syndrome: The Berlin Definition. *JAMA* **2012**, *307*, 2526–2533. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Matthay, M.A.; Zemans, R.L.; Zimmerman, G.A.; Arabi, Y.M.; Beitler, J.R.; Mercat, A.; Herridge, M.; Randolph, A.G.; Calfee, C.S. Acute respiratory distress syndrome. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2019**, *5*, 18. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Repessé, X.; Charron, C.; Vieillard-Baron, A. Acute cor pulmonale in ARDS: Rationale for protecting the right ventricle. *Chest* **2015**, *147*, 259–265. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Taha, A.; Zaytoun, T.; Eid, H.; Baess, A.; Elrewey, E. Echocardiographic assessment of the right ventricle and its correlation with patient outcome in acute respiratory distress syndrome. *Adv. Respir. Med.* **2020**, *88*, 412–419. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Capotosto, L.; Nguyen, B.L.; Ciardi, M.R.; Mastroianni, C.; Vitarelli, A. Heart, COVID-19, and echocardiography. *Echocardiography* **2020**. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Brown, S.M.; Pittman, J.; Miller Iii, R.R.; Horton, K.D.; Markewitz, B.; Hirshberg, E.; Jones, J.; Grissom, C.K. Right and left heart failure in severe H1N1 influenza A infection. *Eur. Respir. J.* **2011**, *37*, 112–118. [\[CrossRef\]](#)
10. Gattinoni, L.; Chiumello, D.; Rossi, S. COVID-19 pneumonia: ARDS or not? *Crit. Care* **2020**, *24*, 154. [\[CrossRef\]](#)
11. Kurth, F.; Roennefarth, M.; Thibeault, C.; Corman, V.M.; Muller-Redetzky, H.; Mittermaier, M.; Ruwwe-Glosenkamp, C.; Heim, K.M.; Krannich, A.; Zvorc, S.; et al. Studying the pathophysiology of coronavirus disease 2019: A protocol for the Berlin prospective COVID-19 patient cohort (Pa-COVID-19). *Infection* **2020**, *48*, 619–626. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Greim, C.-A.; Göpfert, M.; Groesdonk, H.; Treskatsch, S.; Wolf, B.; Zahn, P.; Müller, M.; Zenz, S.; Rauch, H.; Molitoris, U.; et al. Perioperative fokussierte Echokardiographie: Modul 1–5. *A&I* **2017**, *58*, 616–648.
13. Rudski, L.G.; Lai, W.W.; Afilalo, J.; Hua, L.; Handschumacher, M.D.; Chandrasekaran, K.; Solomon, S.D.; Louie, E.K.; Schiller, N.B. Guidelines for the echocardiographic assessment of the right heart in adults: A report from the American Society of Echocardiography and the Canadian Society of Echocardiography. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **2010**, *23*, 685–713; quiz 786–688. [\[CrossRef\]](#)
14. Lazzeri, C.; Bonizzoli, M.; Batacchi, S.; Peris, A. Echocardiographic assessment of the right ventricle in COVID-related acute respiratory syndrome. *Intern. Emerg. Med.* **2020**, 1–5. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Boissier, F.; Katsahian, S.; Razazi, K.; Thille, A.W.; Roche-Campo, F.; Leon, R.; Vivier, E.; Brochard, L.; Vieillard-Baron, A.; Brun-Buisson, C.; et al. Prevalence and prognosis of cor pulmonale during protective ventilation for acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.* **2013**, *39*, 1725–1733. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

16. Dhainaut, J.F.; Brunet, F. Right ventricular performance in adult respiratory distress syndrome. *Eur. Respir. J. Suppl.* **1990**, *11*, 490s–495s. [[PubMed](#)]
17. Klok, F.A.; Kruip, M.; van der Meer, N.J.M.; Arbous, M.S.; Gommers, D.; Kant, K.M.; Kaptein, F.H.J.; van Paassen, J.; Stals, M.A.M.; Huisman, M.V.; et al. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb. Res.* **2020**. [[CrossRef](#)]
18. Price, L.C.; McAuley, D.F.; Marino, P.S.; Finney, S.J.; Griffiths, M.J.; Wort, S.J. Pathophysiology of pulmonary hypertension in acute lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2012**, *302*, L803–L815. [[CrossRef](#)]
19. Cirulis, M.M.; Huston, J.H.; Sardar, P.; Suksaranjit, P.; Wilson, B.D.; Hatton, N.D.; Liou, T.G.; Ryan, J.J. Right-to-left ventricular end diastolic diameter ratio in severe sepsis and septic shock. *J. Crit. Care* **2018**, *48*, 307–310. [[CrossRef](#)]
20. Frémont, B.; Pacouret, G.; Jacobi, D.; Puglisi, R.; Charbonnier, B.; de Labriolle, A. Prognostic value of echocardiographic right/left ventricular end-diastolic diameter ratio in patients with acute pulmonary embolism: Results from a monocenter registry of 1416 patients. *Chest* **2008**, *133*, 358–362. [[CrossRef](#)]
21. Kukucka, M.; Stepanenko, A.; Potapov, E.; Krabatsch, T.; Redlin, M.; Mladenow, A.; Kuppe, H.; Hetzer, R.; Habazettl, H. Right-to-left ventricular end-diastolic diameter ratio and prediction of right ventricular failure with continuous-flow left ventricular assist devices. *J. Heart Lung Transplant.* **2011**, *30*, 64–69. [[CrossRef](#)]
22. Evrard, B.; Goudelin, M.; Montmagnon, N.; Fedou, A.L.; Lafon, T.; Vignon, P. Cardiovascular phenotypes in ventilated patients with COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care* **2020**, *24*, 236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Li, X.; Ma, X. Acute respiratory failure in COVID-19: Is it “typical” ARDS? *Crit. Care* **2020**, *24*, 198. [[CrossRef](#)]
24. Kaur, S.; Tripathi, D.M.; Yadav, A. The Enigma of Endothelium in COVID-19. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 989. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Panwar, R.; Madotto, F.; Laffey, J.G.; van Haren, F.M.P. Compliance Phenotypes in Early Acute Respiratory Distress Syndrome before the COVID-19 Pandemic. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2020**, *202*, 1244–1252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Huang, C.; Wang, Y.; Li, X.; Ren, L.; Zhao, J.; Hu, Y.; Zhang, L.; Fan, G.; Xu, J.; Gu, X.; et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* **2020**, *395*, 497–506. [[CrossRef](#)]
27. Poyiadji, N.; Cormier, P.; Patel, P.Y.; Haddad, M.O.; Bhargava, P.; Khanna, K.; Nadig, J.; Keimig, T.; Spizarny, D.; Reeser, N.; et al. Acute Pulmonary Embolism and COVID-19. *Radiology* **2020**, *297*, E335–E338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Bagate, F.; Masi, P.; d’Humieres, T.; Al-Assaad, L.; Chakra, L.A.; Razazi, K.; de Prost, N.; Carteaux, G.; Derumeaux, G.; Mekontso Dessap, A. Advanced echocardiographic phenotyping of critically ill patients with coronavirus-19 sepsis: A prospective cohort study. *J. Intensive Care* **2021**, *9*, 12. [[CrossRef](#)]
29. Argulian, E.; Sud, K.; Vogel, B.; Bohra, C.; Garg, V.P.; Talebi, S.; Lerakis, S.; Narula, J. Right Ventricular Dilation in Hospitalized Patients with COVID-19 Infection. *JACC Cardiovasc. Imaging* **2020**, 3443. [[CrossRef](#)]
30. Barman, H.A.; Atici, A.; Tekin, E.A.; Baycan, O.F.; Alici, G.; Meric, B.K.; Sit, O.; Genc, O.; Er, F.; Gungor, B.; et al. Echocardiographic features of patients with COVID-19 infection: A cross-sectional study. *Int. J. Cardiovasc. Imaging* **2020**. [[CrossRef](#)]
31. Szekely, Y.; Lichter, Y.; Taieb, P.; Banai, A.; Hochstadt, A.; Merdler, I.; Gal Oz, A.; Rothschild, E.; Baruch, G.; Peri, Y.; et al. Spectrum of Cardiac Manifestations in COVID-19: A Systematic Echocardiographic Study. *Circulation* **2020**, *142*, 342–353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. D’Alto, M.; Marra, A.M.; Severino, S.; Salzano, A.; Romeo, E.; De Rosa, R.; Stagnaro, F.M.; Pagnano, G.; Verde, R.; Murino, P.; et al. Right ventricular-arterial uncoupling independently predicts survival in COVID-19 ARDS. *Crit. Care* **2020**, *24*, 670. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Lheritier, G.; Legras, A.; Caille, A.; Lherm, T.; Mathonnet, A.; Frat, J.P.; Courte, A.; Martin-Lefevre, L.; Gouello, J.P.; Amiel, J.B.; et al. Prevalence and prognostic value of acute cor pulmonale and patent foramen ovale in ventilated patients with early acute respiratory distress syndrome: A multicenter study. *Intensive Care Med.* **2013**, *39*, 1734–1742. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## 3 Diskussion

### 3.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der Originalarbeiten

Die hier zusammenfassend vorgestellten wissenschaftlichen Arbeiten verfolgen das Ziel, das perioperative Risiko und insbesondere die, dieses Risiko beeinflussende perioperative Inflamationsreaktion und begleitende Organschäden zu untersuchen. Dabei sollen Ansatzpunkte identifiziert werden, diese im Sinne des Patient\*innen-Outcomes positiv zu beeinflussen. Dazu wurden zum besseren Verständnis der perioperativen Inflamationsreaktion spezifische Noxen und die Signalwege ihres Einflusses auf die Inflammation sowie Möglichkeiten der medikamentösen Modulation dieser Wege als potentieller Therapieansatz untersucht. Darüber hinaus wurden alternative anästhesiologische Behandlungskonzepte untersucht, die das perioperative Risiko durch weniger hämodynamische und respiratorische Beeinflussung und damit potentiell auch weniger Inflamationsreaktion reduzieren sowie adäquate Trainingskonzepte um eine hohe Behandlungskompetenz möglichst lange vorzuhalten. Zudem wurden Ansätze untersucht, mögliche Organschädigungen adäquat zu monitoren und möglichst frühzeitig zu detektieren, umso zu verbesserten Erkrankungsverständnissen und Therapieentscheidungen beizutragen.

Dementsprechend lassen sich diese Ansätze und die damit in den vorgestellten Originalarbeiten erlangten Erkenntnisse wie folgt zusammenfassen.

Der Einsatz der HLM kann eine Inflamationsreaktion hervorrufen und eine gesteigerte Inflamationsreaktion ist potentiell mit erhöhten perioperativen Risiken assoziiert [11]. Dementsprechend untersuchte die erste Originalarbeit (2.1) den Einfluss des kardiopulmonalen Bypasses mittels HLM bei kardiochirurgischen Eingriffen auf die einzelnen Schritte der Leukozytenaktivierung, um weitere Erkenntnisse über den spezifischen Mechanismus dieser Aktivierung zu erlangen und so mögliche therapeutische Ansatzpunkte zu identifizieren. Es konnte gezeigt werden, dass neben einem Aufheben des langsamen Rollens, vor allem ein gesteigerter Arrest und Transmigration im Sinne einer vermehrten inflammatorischen Reaktion vorlagen. Dabei konnte eine gesteigerte Oberflächenexpression des Zell-Adhäsionsmoleküles MAC-1 als mögliche Ursache oder Mediator identifiziert werden.

Die zweite hier vorgestellte Originalarbeit (2.2) untersuchte in einem translationalen Ansatz die Gabe von Lidocain in der Sepsis als möglichen Modulator der initial gesteigerten, septischen Inflamationsreaktion. Dabei konnte gezeigt werden, dass Lidocain dosisabhängig den Arrest und auch die Transmigration des Leukozyten in der Sepsis herabsetzt. Als ein daran beteiligter Mechanismus wurde eine dosisabhängige, verminderte Aktivierung der PKC- $\theta$  durch Lidocain

identifiziert, welche durch das Hervorrufen der Konformitätsänderung des Oberflächenrezeptors LFA-1 den Arrest und die Transmigration beeinflusst.

In der dritten hier vorgestellten Originalarbeit (2.3) wurden die Sicherheit und potentielle Einflüsse auf Respiration und Hämodynamik eines neu konzipierten Sedierungskonzeptes im Vergleich zur bislang etablierten Allgemeinanästhesie, im Sinne eines risikominimierenden Behandlungsansatzes, in einem Hochrisiko-Patientenklientel bei MitraClip® Eingriffen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das Dexmedetomidin-basierte Sedierungskonzept im Hinblick auf die Respiration und postoperative Komplikationen ebenso sicher wie die Allgemeinanästhesie ist und in Bezug auf einen definierten Ziel-MAD mit einem deutlich geringeren Bedarf an Norepinephrin erreicht werden kann.

Da eine hohe therapeutische Kompetenz ohne adäquates Training nicht langjährig erhalten bleibt [77], wurde in der vierten Originalarbeit (2.4) ein neues, auf PBL und HF-Simulation basierendes Lehrkonzept zur CPR untersucht, um so das Patient\*innen Risiko durch ungenügende Kompetenz in der Behandlung des schwerwiegendsten kardialen Ereignisses, dem funktionellen Herz-Kreislauf-Stillstand, zu reduzieren. Hierbei konnte gezeigt werden, dass das untersuchte PBL/HF-Lernkonzept im Vergleich zu einem klassischen, tutoriell begleiteten Training in der Lage ist, die selbst wahrgenommene Kompetenz der Teilnehmenden zu erhöhen, sowie auch praktische Fähigkeiten in der manuellen Durchführung der CPR zu verbessern. Diese höhere Kompetenz war bei einzelnen Fähigkeiten noch sechs Monate später nachzuweisen.

Da ein RV-Versagen als mögliche Organkomplikation eines ARDS auftreten kann [118], wurde die fünfte Originalarbeit (2.5) durchgeführt, um eine potentielle Beeinflussung der RV-Funktion durch das zu diesem Zeitpunkt noch wenig bekannte SARS-CoV-2 ARDS als mögliches, zusätzliches Behandlungsrisiko zu untersuchen. Die TTE ermittelten Daten geben Hinweise darauf, dass es in den ersten Tagen der intensivmedizinischen Behandlung zu keiner Beeinträchtigung der systolischen RV Funktion und auch zu keiner relevanten RV Dilatation als mögliche Zeichen eines RV Versagens kommt. Erst im späteren Behandlungsverlauf, nach über einer Woche, gibt es Hinweise auf eine mit der Schwere des ARDS korrelierend ansteigende RV/LV-Ratio.

Aus Basis dieser Ergebnisse lassen sich drei Strategien zum Umgang mit perioperativen Risiken identifizieren, die in der weiteren Diskussion fokussiert werden. Diese Strategien sind Maßnahmen zur Komplikationsreduktion bei unvermeidbaren Risiken, Maßnahmen zur Vermeidung von perioperativen Risiken und Maßnahmen zum Monitoring von potentiellen Risiken.

### 3.2 Ansätze zur Reduktion unvermeidbarer Risiken

Auch wenn es mittlerweile für bestimmte operative Eingriffe Möglichkeiten der weniger invasiven, meist kathetergestützten Behandlungen gibt, wie das Beispiel des interventionellen edge-to-edge Repair der Mitralklappe zeigt, sind nach wie vor operative Eingriffe zur Behandlung einer Vielzahl von Pathologien alternativlos. Wie einführend dargestellt, entsteht bei operativen Eingriffen oder auch bei Erkrankungen wie der Sepsis eine gesteigerte Inflamationsreaktion mit entsprechenden eigenen Risiken, den Erkrankungsverlauf zu verkomplizieren und damit den Behandlungserfolg zu vermindern [65, 123]. Die vorgestellte Originalarbeit 1 (2.1) trägt hier zu weiteren Erkenntnissen bei, indem schon vorhandene Vermutungen zu zusätzlichen Immunaktivierungen durch notwendige Unterstützungssysteme wie die HLM bestätigt wurden [11, 124]. Darüber hinaus wurde ein konkreter Mechanismus der HLM-induzierten inflammatorischen Aktivierung über den MAC-1 vermittelten Leukozyten-Arrest und folgende Transmigration identifiziert. Dementsprechend ergibt sich aus dieser Arbeit die Frage, ob eine Modulation dieses Aktivierungsweges eine Möglichkeit darstellt, die Inflamationsreaktion und auch damit einhergehende Komplikationen zu reduzieren. Entsprechend dieses Ansatzes haben aktuellere Untersuchungen zur spezifischen MAC-1 Blockade eine Reduktion der Inflamationsreaktion nach entsprechendem Stimulus zeigen können [125, 126]. Diese Untersuchungen liegen aber bislang nur tierexperimentell vor, mit Substanzen, die bislang nicht für den Menschen verfügbar sind. Dem Ansatz der Modulation der Inflammation entsprechend folgend, untersuchte die 2. Originalarbeit (2.2) den Einfluss von Lidocain, als ein für den Menschen verfügbares Medikament, auf die Inflamationsreaktion. Dabei konnte gezeigt werden, dass spezifische Schritte der Leukozyten Aktivierung bei Patient\*innen in der Sepsis, als Abbild der massiv gesteigerten Inflammation, reduziert werden können.

Generell ist aber für weiterführende Aussagen kritisch bei beiden Arbeiten zu bedenken, dass die Erkenntnisse nur aus einer kleinen Anzahl von Patient\*innen gewonnen wurden und so keine Aussage über ein Gesamtüberleben oder interindividuelle Besonderheiten getroffen werden können. Zudem zeigen auch aktuellere Arbeiten, dass Art und Menge der zur Allgemeinästhesie oder Sedierung verwendeten Medikamente ebenfalls spezifische, mitunter reduzierende Einflüsse auf die Inflamationsreaktion haben können [127, 128]. Da in beiden Untersuchungen die individuellen Mengen der verwendeten, sonstig angewandten Medikamente nicht ausgewertet wurden, kann hier ein möglicher Einfluss auf das Ergebnis nicht sicher ausgeschlossen werden. Darüber hinaus existieren noch weitere Substanzen, die typischerweise im perioperativen Kontext gerade in der Intensivmedizin und Kardiochirurgie zur Anwendung kommen, die ebenfalls einen eigenen Einfluss auf verschiedene Inflamationsprozesse haben. Hier sind nur beispielhaft Katecholamine, Tranexamsäure und

Acetylsalicylsäure erwähnt [129-131], die nicht im Kontext der Ergebnisse ausgewertet wurden. Darüber hinaus ist zu beachten, dass Arbeiten der letzten Jahren zunehmend die komplexen Wege der gesteigerten inflammatorischen Reaktion aufgezeigt haben, die neben Leukozyten ebenfalls über beispielsweise Makrophagen oder Thrombozyten vermittelt werden kann und durch die gegenseitige Zell-Interaktionen mit der Bildung von Netz-Formationen zusätzlich proinflammatorisch stattfindet [13]. Demnach kann nicht vorhergesagt werden, dass die Modulation eines einzelnen Signalweges in diesem Kontext auch zu einer positiven Beeinflussung der gesamten Inflammationsreaktion führt oder darüber hinaus zu einer relevanten Outcomeveränderung beiträgt.

In einer folgenden Arbeit zur Modulation der Inflammation durch Hyddroxyethylstärke (HES) wurde im Sinne der relevanten Zell-Zell Interaktionen neben der leukozytären Aktivierungskaskade ebenfalls die Thrombozyten-Leukozyten Interaktion und folgende Bildung von Netz-Formationen untersucht [132]. Hierbei wurde HES als Modulator untersucht, da vorherige Arbeiten auch hier Effekte auf die Inflammation zeigten. Die Wirkmechanismen, insbesondere auf die Leukozyten-Aktivierung waren aber unklar [133, 134]. Diese am Sepsis-Tiermodell durchgeführte Arbeit konnte zeigen, dass HES sowohl den Arrest als auch die Transmigration beeinflusst und gab zudem Hinweise darauf, dass die Bildung von Thrombozyten-Leukozyten Aggregaten mit folgenden Netz-Formationen durch HES ebenfalls auf Seiten der Thrombozyten beeinflusst wird [132]. Dies unterstreicht die vorher diskutierte Limitation der Originalarbeiten 2.1 und 2.2, die auf die reine Leukozyten-Aktivierungskaskade fokussieren. Neben einzelnen Aktivierungswegen der Inflammation mit assoziiertem Endothelschaden zeigte sich in jüngerer Zeit, dass spezifische Kompartimente wie die endotheliale Glykokalyx eine zentrale Rolle in der Funktionalität und damit auch in der Barrierefunktion des Endothels einnimmt [135, 136]. Eine auf Basis der ersten Erkenntnisse der Arbeitsgruppe zu HES in der Inflammation und bislang bekannten Erkenntnisse zur Glykokalyx durgeführte Arbeit zeigte, ebenfalls am Sepsis-Tiermodell, protektive Effekte von HES auf den Erhalt der Glykokalyx und deren Funktionalität [137].

Kritisch ist zu betrachten, dass diese Erkenntnisse aus tierexperimentellen und in-vitro Studien generiert sind. Auch für Lidocain liegen mittlerweile weitere Erkenntnisse zu möglichen Effekten auf weitere Signalwege und auch auf die Integrität der Glykokalyx vor, die aber bisher ebenfalls alle in vitro oder tierexperimentellen Ursprungs sind [138, 139]. Sowohl für HES als auch für Lidocain liegen bislang aber keine Hinweise darauf vor, dass die Applikation in klinischen Situationen der massiv gesteigerten Inflammation auch zu einem Überlebensvorteil der Behandelten führt [138, 140]. Neben diesen beiden Ansätzen wurden in der Vergangenheit weitere Substanzen, wie z.B. Kortikosteroide oder Vitamin C getestet, die gesteigert Inflammationsreaktion in der Sepsis positiv zu modulieren [141]. Keine dieser Maßnahmen zeigte sich dabei erfolgreich, das Überleben in der Sepsis positiv zu beeinflussen [62, 141].

Ein Erklärungsansatz für den ausbleibenden Erfolg dieser Therapieversuche ist, dass diese Substanzen einen unspezifischen Einfluss auf viele inflammatorische Prozesse haben und bislang Ergebnisse zu spezifischen, an einzelnen Signalwegen ansetzende Substanzen für Untersuchungen am Menschen nicht zur Verfügung stehen [126].

Neben der Modulation von Signalwegen ist ein weiterer Ansatz, die leukozytär getriggerte Inflammationsreaktion durch Reduktion der vorhandenen Anzahl an aktivierten Leukozyten oder Mediatoren der Aktivierung zu beeinflussen. So führt beispielsweise die Nutzung von Leukozyten Filtern bei der HLM zu einer initialen Reduktion der messbaren Inflammation und auch zu einer Verbesserung einzelner Organsysteme, mit aber nur kurzfristig anhaltendem Effekt [142]. Ansätze in der Sepsis, inflammatorische Mediatoren mittels Dialyse zu reduzieren, zeigten in der Vergangenheit ebenfalls kontroverse, teils sogar negative Effekte [143]. Insgesamt muss damit festgehalten werden, dass weder die Signalwegmodulation noch die Gesamtreduktion aktivierter Zellen oder Metabolite bislang einen nachhaltigen positiven Effekt auf das Patient\*innen-Outcome zeigen konnten. Ob dies an einem nach wie vor noch nicht ausreichend verstandenen Mechanismus der komplexen Inflammationsreaktion liegt oder ob es, wie auch schon weiter oben dargestellt, zu viele Einflussgrößen in einer Gesamtpopulation gibt und sich solche Therapieansätze in mehr selektioniertem Patientenklientel doch möglicherweise positiv auf das Überleben auswirken könnten, kann bislang nicht beantwortet werden. Daher ist es sicherlich sinnvoll, die schon erkannten Mechanismen und deren mögliche Beeinflussbarkeit, gerade in spezifischeren Situationen und insbesondere auf ihre Übertragbarkeit auf den Menschen, weiter zu untersuchen. Genauso verdeutlichen diese Erkenntnisse zu Ansätzen der Modulation einer vorhandenen Inflammation mit ihrem bislang ausbleibenden Erfolg aber, dass der Ansatz der Risiko- bzw. Noxenvermeidung einen entsprechend hohen Stellenwert haben sollte.

### **3.3 Ansätze zur Reduktion vermeidbarer Risiken**

Einen möglicheren Ansatz zur Reduktion eines in einer spezifischen Patientenklientel besonders hoch vorliegenden Risikos, indem es systemisch umgangen bzw. vermieden wird, stellt die hier vorgestellte Originalarbeit 2.3 dar. Aufgrund der bestehenden Selektionskriterien für einen Mitralklappen Clip zur Behandlung der Mitralklappeninsuffizienz wird dieses Verfahren hauptsächlich bei älteren, multimorbideren Patient\*innen angewandt. Alter allein ist zwar nicht zwangsläufig ein, das perioperative Risiko erhöhender Faktor, aber begleitende Erkrankungen im Kontext des erhöhten Alters wie auch ein insbesondere bei älteren Patienten häufiger vorliegendes Frailty, erhöhen das Risiko für ein schlechtes Patient\*innen-Outcome [144, 145]. Dabei haben mehrere Arbeiten gezeigt, dass sowohl die Tiefe als auch die Dauer

einer Anästhesie Einfluss auf die perioperative Komplikationsrate, speziell auch der postoperativen kognitiven Dysfunktionen (POCD – post-operative cognitive dysfunction) hat [100, 105, 146-148]. Die perioperative Inflammation ist ebenfalls an der Häufigkeit und Ausprägung von POCDs beteiligt [147]. Das Auftreten eines POCD kann zu einer erhöhten Rate von postoperativ neu vorhandenen Einschränkungen im Alltag führen und sowohl die Behandlungsdauer als auch das behandlungsassoziierte Versterben wird durch das perioperative Auftreten eines Delirs, eine mögliche Variante eines POCD, negativ beeinflusst [149, 150]. Als Risikofaktoren für postoperative neurologische Dysfunktionen sind neben einem höheren Alter insbesondere die Dauer der Anästhesie sowie respiratorische Störungen zu erwähnen [99]. Ein schon einführend beschriebenes Risiko für respiratorische Störungen bis hin zu einem Lungenversagen, an dem auch eine inflammatorische Aktivierung beteiligt ist, ist die invasive Beatmung. Analog des interventionellem Ansatzes, nämlich das Vermeiden eines offenen Eingriffes mit HLM und den schon beschriebenen zugehörigen Risiken, ist hier der zusätzliche Ansatz, die potentiellen anästhesieassoziierten Risiken durch Vermeidung einer Allgemeinanästhesie und invasiver Beatmung in Kombination mit der Verwendung möglichst gering inflammationssteigernden Sedativa zu reduzieren.

In jüngerer Zeit wurden bei verschiedenen, interventionellen Therapieverfahren die meist historisch etablierte Allgemeinanästhesie vermehrt mit Sedierungskonzepten verglichen, ohne einen eindeutigen Vorteil der Sedierung oder Allgemeinanästhesie im Hinblick auf das Patient\*innen-Outcome aufzeigen zu können [151, 152]. Ein möglicher Erklärungsansatz für diese bislang unklare Datenlage ist, dass in der Vielzahl der vorhandenen Studien das Sedierungskonzept nicht klar definiert ist. Wie das Beispiel der bislang größten deutschen Untersuchung zu Anästhesieverfahren bei interventionellem Aortenklappenersatz zeigt, werden eine Vielzahl an unterschiedlichen Sedierungskonzepten mit verschiedenen angewandten Substanzen als Gesamtvergleich zur Allgemeinanästhesie herangezogen [151]. Da aber verschiedene Sedativa unterschiedliche Effekte sowohl auf die hämodynamische als auch pulmonale Funktionen haben [153, 154], sollte der Einsatz der entsprechenden Substanzen in Sedierungsregimen differenzierter betrachtet werden, umso auch mögliche Effekte auf das Outcome unterscheiden zu können. Die bislang untersuchten Sedierungsverfahren zum interventionellen Mitralclipping waren aber bislang rein Propofol- und/oder Benzodiazepin basiert [155].

In einer aktuellen Arbeit wurde gezeigt, dass Dexmedetomidin einen deutlich unterschiedlichen Einfluss auf die Hämodynamik und auch Immunfunktion im Vergleich zu Propofol und auch weiteren Sedativa hat [156]. Zudem zeigten frühere Arbeiten Hinweise auf einen organprotektiven Effekt bei der Verwendung von Dexmedetomidin im Sedierungs- oder Anästhesieregime sowohl bei der Niere als auch der Lunge [157, 158]. Dabei ist zu erwähnen, dass entsprechend der schon vorab dargestellten, generellen Zusammenhänge zwischen

Inflammation und Lungenfunktion, als ein möglicher Weg der Beeinflussung der Lungenfunktion von Dexmedetomidin, die direkte Modulation der Inflammationsreaktion im Tiermodell nachgewiesen werden konnte [159, 160]. Insgesamt scheint die Immunmodulation ein relevanter Mechanismus der bislang identifizierten Effekte des Dexmedetomidin zu sein [161]. So konnte auch in der Sepsis eine Reduktion der endothelialen Permeabilität durch Beeinflussung inflammatorischer Aktivierungswege festgestellt werden [162].

Zudem zeigen Arbeiten mit Dexmedetomidin mehrfach sowohl klinisch als auch tierexperimentell Hinweise auf eine Neuroprotektion mit verbesserter Kognition nach entsprechenden Noxen [163-165]. Der hier hauptsächlich postulierte Mechanismus ist ebenfalls die Modulation der Inflammationsreaktion und ein dadurch reduzierter Zellschaden. Neben der Inflammationsreaktion als Ursache postoperativer kognitiver Defizite sind Patient\*innen perioperativ auch dem Risiko fokaler neurologischer Beeinträchtigungen durch beispielsweise Embolien ausgesetzt. Dieses Risiko scheint bei interventionellen Herzklappenprozeduren noch erhöht zu sein [166, 167]. In einer weiteren eigenen Arbeit zur Häufigkeit der zerebralen Embolien während Mitral-Clipping konnte gezeigt werden, dass insb. bei der Clip-Positionierung vermehrt embolisches Material freigesetzt wird und einige Patient\*innen postinterventionell sowohl klinisch als auch in der Bildgebung fokale Beeinträchtigungen zeigen [168]. In dieser Untersuchung wurden ebenfalls Patient\*innen mit dem beschriebenen Dexmedetomidin Sedierungskonzept eingeschlossen. Diese Patient\*innen zeigten postoperativ bei vergleichbarer Anzahl an periprozeduralen Embolien keine klinischen Zeichen eines fokalen Defizits. Statistisch konnte hier kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, was möglicherweise durch eine geringe Fallzahl bedingt ist. In Absoluten Zahlen (Symptommhäufigkeit: 0% Dexmedetomidin-Sedierung; 21% Allgemeinanästhesie) ist dies aber möglicherweise als Trend zu deuten.

Der funktionelle Schaden nach einem stattgehabten zerebralen Gefäßverschluss ist nicht alleine durch die dadurch entstehende Minderperfusion des abhängigen Gewebes, sondern auch durch begleitend entstehende Inflammationsreaktionen bestimmt [169]. Demnach, und auch aufgrund der geringen Fallzahl, kann hier keine sinnvolle Hypothese abgeleitet werden, ob dieses Ergebnis durch eine Modulation der Inflammation durch Dexmedetomidin hervorgerufen ist. Alternativ oder auch additiv wäre ebenso eine Verbesserung der zerebralen Perfusion, insbesondere der Penumbra, durch die Dexmedetomidin vermittelte, stabilere Hämodynamik denkbar.

Die hier vorgestellte Originalarbeit (2.3), wie auch die folgende Arbeit zu Embolien [168], kann aufgrund der Fallzahl und des Studiendesigns keine abschließenden Erkenntnisse zur tatsächlichen Risikoreduktion im Hinblick auf das Auftreten postoperativer kognitiver, kardialer oder pulmonaler Komplikationen und eine assoziierte Inflammationsreaktion liefern. Sie zeigt

aber, dass dieses Regime, welches erstmalig Dexmedetomidin-basierend ist, ebenso sicher wie eine Vollnarkose durchzuführen ist. Damit bildet sie eine Grundlage, die vorhandenen Hinweise auf mögliche Vorteile dieses Verfahrens in folgenden, dazu entsprechend geplanten weiteren Studien zu untersuchen.

Ein weiterer, möglicherweise das Behandlungsergebnis beeinflussender Faktor kann die Kompetenz der Durchführenden einer Maßnahme sein. Die Analyse einzelner, komplexer anästhesiologischer als auch chirurgischer Maßnahmen haben gezeigt, dass sowohl die Erfahrung als auch die praktischen Fähigkeiten der Durchführenden ergebnisrelevant sein können [74, 75]. Ebenso existieren Hinweise darauf, dass die Kompetenz der Durchführenden ein relevanter Faktor für die Sicherheit einer prozeduralen Sedierung ist [170]. Zudem wurde in der Vergangenheit ein fehlendes Training zur Sedierungskompetenz im nicht-anästhesiologischen Bereich kritisch angemerkt [171]. Ob aber per se eine anästhesiologisch durchgeführte prozedurale Sedierung, unabhängig von den gewählten Substanzen, ein anderes Patientenrisiko beinhaltet als eine nicht-anästhesiologisch durchgeführte Sedierung, ist bislang nicht geklärt. So sind auch im Kontext des interventionellen Mitralklappenrepairs durchgeführte Sedierungen nicht-anästhesiologisch und auch parallel zu anderen Aufgaben, wie beispielsweise dem TEE-Guiding, erfolgt [155]. Neben der Frage der Kompetenz kann auch die Parallelisierung von Maßnahmen als mögliches Patientenrisiko vermutet werden. Im Vergleich zu Daten von parallel zum echokardiografischen Guiding durchgeführten nicht-anästhesiologischen prozeduralen Sedierungen, ist die hämodynamische Stabilität der Patient\*innen in unserer Sedierungsgruppe höher [103]. Dennoch kann hier nur gemutmaßt werden, ob solch unterschiedliche Ergebnisse an einer unterschiedlichen Kompetenz, potentieller Ablenkung durch weitere Aufgaben, medikamentös bedingt oder durch eine Kombination dieser und weiterer Einflüsse bedingt sind. Festzuhalten ist jedoch, dass eine Kompetenz zur adäquaten und damit möglichst risikoarmen Maßnahme durch ein entsprechendes Training herbeigeführt werden kann und dass dementsprechend Ausbildungskonzepte etabliert werden sollten, die eine möglichst hohe Kompetenz über einen möglichst langen Zeitraum erhalten.

Die dargestellte Originalarbeit 2.4 trägt in diesem Kontext dazu bei, indem sie aufzeigt, dass ein auf Selbsterarbeiten und Erleben basierendes Ausbildungskonzept in Kombination mit einer HF-Simulationsumgebung in der Lage ist, die selbst wahrgenommene Kompetenz zu erhöhen und auch spezifische praktische Fähigkeiten zu einer medizinischen Maßnahme über einen längeren Zeitraum zu erhalten. Zu betonen ist, dass die dabei durchgeführten Lernmethoden dieses Ergebnis innerhalb desselben Zeitraumes wie die Lernmethode der Kontrollgruppe erreicht haben. Auch in folgenden Studien wurden bestätigt, dass PBL und Simulationstechnik vorteilhaft darin sind, im Vergleich zu tutorieller Lehre oder low-fidelity Simulationen, Wissen kurzfristig und auch zumindest Teilaspekte davon langfristig zu

vermitteln [172]. Im Hinblick auf das Ziel eines langfristigen Lehrerfolges ist aber kritisch zu beachten, dass der in unserer Arbeit untersuchte Zeitraum von 6 Monaten im Vergleich zu anderen Untersuchungen schon als lang anzusehen ist [173]. Einzelne Arbeiten empfehlen zum adäquaten Erhalt der Reanimationskompetenz sogar Trainingsintervalle von einem Monat [174]. Die kardiopulmonale Reanimation ist nicht direkt mit anderen komplexen medizinischen Herausforderungen vergleichbar. Dennoch geben diese Daten einen Hinweis darauf, welches Risiko eine von den Durchführenden nur selten angewandte oder alternativ auch nach Erlernen gar nicht oder ebenfalls nur selten trainierte komplexe Maßnahme für Patient\*innen beinhalten kann. Dementsprechend können geeignete Ausbildungsstrukturen und auch Ausbildungsintervalle als Möglichkeiten angesehen werden, ein kompetenzassoziiertes Risiko in der Patientenbehandlung zu reduzieren oder sogar ganz zu vermeiden.

### **3.4 Ansätze zum Monitoring von Risiken.**

Die vorgestellte Originalarbeit 2.5 zeigt einen Ansatz auf, erkrankungs- oder auch behandlungsassoziierte Komplikationen so früh wie möglich zu erkennen, um geeignete Therapien möglichst vor Eintritt eines Patientenschadens zu etablieren. Es wurde die TTE als Methode gewählt, die rechtsventrikuläre Funktion im ARDS zu untersuchen und auch im Verlauf zu monitorieren. Dabei war unsere Arbeit eine der ersten die zeigte, dass es in der frühen Phase des SARS-CoV-2 ARDS und insbesondere im initialen Erkrankungsverlauf zu keiner Beeinträchtigung der systolischen RV-Funktion kommt. Diese Erkenntnis wurde auch von anderen Arbeiten bestätigt, die ebenfalls keine Korrelation systolischer RV-Funktionsparameter mit der Schwere des SARS-CoV-2 ARDS und nur moderate RV-Dilatationen in den ersten intensivmedizinischen Behandlungstagen oder vergleichend zwischen Überlebenden und Verstorbenen detektieren konnten [175, 176]. Ursächlich werden hier andere Mechanismen, wie z.B. thromboembolische Ereignisse mit konsekutiver RV-Belastung im Behandlungsverlauf, anstatt eine direkte RV-Beeinflussung durch eine hypoxisch-pulmonale Vasokonstriktion (HPV) diskutiert [175]. Auch wenn in unserer Arbeit kein Zusammenhang zwischen Patient\*innen mit und ohne detektierten Thromboembolie hergestellt werden konnte, so kann dies eine mögliche Erklärung sein. Radiografische Perfusionsuntersuchungen der Lunge bestätigen durch fehlende Minderperfusion der besonders SARS-CoV-2 ARDS betroffenen Bereiche die Hypothese der fehlenden HPV [177]. Auch hierbei scheint eine Inflammationsreaktion des pulmonalen Endothels im ARDS generell ursächlich für die veränderte HPV, wobei unterschiedliche Mechanismen im „klassischen“ und SARS-CoV-2 ARDS diskutiert werden [178]. Unsere Erkenntnisse zur ausbleibenden

Beeinträchtigung der RV-Funktion unterstützen die Hypothese der veränderten Inflammation und des konsekutiv beeinflussten pulmonalen Endothel mit verminderter HPV im SARS-CoV-2 ARDS. Damit liegen zudem Hinweise vor, dass die TTE in der Lage ist, die unterschiedlichen Auswirkungen verschiedener pulmonal-endothelialer Inflammationsreaktionen am Herz, als dadurch sekundär beeinflusstes Organ, abzubilden. Insgesamt ist bei der Interpretation der Ergebnisse aber zu bedenken, dass die generelle Aussagekraft durch das monozentrische Design und der geringen Fallzahl limitiert ist.

Als alternative und etablierte Methode zum Monitoring des RV und der pulmonalvaskulären Drücke steht neben der nicht invasiven TTE als weiteres, bettseitig und auch über einen längeren Zeitraum wiederholt anwendbares Verfahren, der pulmonalarterielle Katheter (PAK) zur Verfügung [179]. Vergleichende Untersuchungen haben gezeigt, dass sowohl die Evaluation der RV-Funktion als auch der pulmonalarteriellen Drücke mittels TTE mindestens gleichwertig zur Druck- und thermodilutions-basierten Flussmessungen via PAK sind [180-182]. Limitierender Faktor der TTE-Messungen ist die möglicherweise nicht ausreichend vorhandene Schallqualität [180]. Auch in unserer Arbeit konnten dadurch nicht alle am Untersuchungsstandort behandelten SARS-CoV-2 ARDS Patient\*innen eingeschlossen werden. Auch verschlechterte sich im Verlauf der ARDS Erkrankung die transthorakalen Untersuchungsbedingungen, so dass in 29% der Fälle keine adäquate Verlaufsuntersuchung durchgeführt werden konnte. Im Gegensatz dazu sind die Messungen mittels PAK bei korrekt einliegendem Katheter im Behandlungsverlauf gleichbleibend durchführbar. Auch beim PAK kann es aber durch Fehlanlagen zu Messfehlern, oder auch der Unmöglichkeit der Durchführung von Messungen kommen [183, 184]. Hierbei ist zu beachten, dass durch Neuanlage in vielen Fällen doch noch korrekte Messungen erreicht werden können. Es liegen bislang keine vergleichenden Gesamtzahlen zur Häufigkeit der Unmöglichkeit der korrekten PAK Anlage oder einer ausreichend guten TTE-Schallqualität vor. Aufgrund der berichteten Häufigkeit des Ausschlusses bei nicht ausreichendem Schallfenster in den funktionell vergleichenden Studien von ungefähr 14% und nur einzelnen Fallberichten zur Fehlanlage des PAK, kann vermutet werden, dass mittels PAK häufiger valide Werte ermittelt werden können [180, 182]. Bei Angabe der Häufigkeit der fehlenden Schallqualität ist zu beachten, dass im Gegensatz zu unserer Arbeit, in diesen Untersuchungen hauptsächlich kritisch kranke Patient\*innen ohne ARDS eingeschlossen wurden. Die noch höhere Rate an nicht ausreichender Schallqualität in unserer Arbeit könnte mutmaßlich durch die spezifische Pathologie und die damit einhergehende invasive Beatmung bedingt sein. Neben der Wahrscheinlichkeit, ausreichende Messdaten zu erlangen, liegen im Gegensatz zur TTE bei der Anwendung des PAK spezifische zusätzliche Risiken für Infektionen, Thrombosen, Blutungen oder Rhythmusstörungen vor [185]. Dementsprechend könnte im Hinblick der gezeigten Durchführbarkeit und Aussagekraft der Methode im Sinne einer Risikoreduktion das

TTE-Monitoring favorisiert empfohlen werden und der PAK nur in Fällen der nicht möglichen TTE-Anwendung als Verfahren der 2. Wahl genutzt werden.

Entsprechend des Faktors der Risikoreduktion durch ausreichende Kompetenz ist zudem hervorzuheben, dass für die TTE in der Vergangenheit gezeigt wurde, dass schon mit einem überschaubaren Ausbildungsaufwand ein hohes Maß an Anwenderkompetenz zu erlangen ist [186]. Wird die TTE in ein Behandlungskonzept mit einem strukturierten Untersuchungsablauf eingebunden, so kann sie nachweislich zu einer positiven Beeinflussung von Therapieentscheidungen bei kritisch kranken Patient\*innen führen [186]. Dementsprechend liegen mittlerweile auch Vorgaben zu strukturierten Ausbildungskonzepten von Fachgesellschaften und Handlungsempfehlungen zu strukturierten Untersuchungsabläufen bei kritisch Kranken, auch von unserer Arbeitsgruppe vor [187, 188].

Neben der Anwendung im ARDS kann die TTE in weiteren Situationen als Monitoring-Verfahren hilfreich sein. So konnten wir in einer aktuellen Arbeit an 30 Probanden bei simuliertem Volumenverlust durch eine mittels Unterdruckkammer induzierte zentrale Hypovolämie zeigen, dass sowohl systolisch als auch diastolische Parameter der links und rechtsventrikulären Funktion schon durch einen milden Volumenverlust beeinflusst sind [189]. Demnach kann die TTE möglicherweise hilfreiche Hinweise liefern, einen Volumenverlust durch eine inflammationsinduziert gesteigerte endotheliale Permeabilität beim kritisch Kranken frühzeitig zu detektieren. Zudem liefert diese Untersuchung auch Erkenntnisse, über eine volumenabhängige Beeinflussung von systolischen Parametern und kann so dazu beitragen, durch vorgeschaltete Volumen-Testung nicht indizierte Gaben von Inotropika und damit verbundenen Risiken, zu vermeiden. Aktuell ist dazu eine Folgestudie zur Validierung der Ergebnisse im tatsächlichen Blutverlust geplant (Ethikantrag 30.05.2023 eingereicht).

## 4 Zusammenfassung

Patient\*innen sind nicht nur durch vorhandene Pathologien, sondern auch durch die zur Behandlung dieser Pathologien notwendigen Maßnahmen spezifischen Risiken ausgesetzt. Perioperativ beinhaltet sowohl der operative Eingriff als auch die für diesen Eingriff notwendigen anästhesiologischen Maßnahmen solche Risiken, welche sowohl das Behandlungsergebnis als auch das Gesamtüberleben der Patient\*innen negativ beeinflussen können. Ein spezifisches, durch den operativen Eingriff sowie durch anästhesiologische Maßnahmen beeinflusstes Risiko ist die perioperative Inflamationsreaktion. Sie kann durch Aktivierung von Leukozyten zur Beeinträchtigung des kardiovaskulären Systems und konsekutiven Organdysfunktionen führen und auch selbst durch Dysfunktionen dieser Systeme initiiert und unterhalten werden. Art und Umfang operativer und anästhesiologischer Maßnahmen beeinflusst maßgeblich die Ausprägung dieser Reaktion und damit das perioperative Auftreten von Organschäden.

Die hier zusammengefassten wissenschaftlichen Arbeiten sind mit dem Ziel entstanden, das perioperative Risiko mit besonderem Fokus auf die perioperative Inflammation und assoziierte Organschädigungen zu untersuchen. Dazu wurden spezifische Signalwege der perioperativen Inflammation und mögliche Modulatoren dieser Wege bei unvermeidbaren Risiken sowie anästhesiologische Maßnahmen zur Vermeidung von Risiken der Inflammation und assoziierten Organkomplikationen sowie Ansätze zum Monitoring dieser Risiken untersucht.

Ein derartiges perioperatives Risiko ist der kardiopulmonale Bypass mittels HLM, welcher eine perioperative Inflamationsreaktion triggert, aber aufgrund der Notwendigkeit bei spezifischen Eingriffen unvermeidbar ist. Mittels in vitro und in vivo Untersuchungen von HLM und nicht-HLM behandeltem Patientenblut konnten eine HLM verursachte, gesteigerte Leukozyten Aktivierung, assoziiert mit einer gesteigerten Expression von MAC-1 an der Zelloberfläche, identifiziert werden und so als möglicher Modulationsweg der Inflamationsreaktion aufgezeigt werden. In einem weiteren, translationalem Untersuchungsansatz wurde Lidocain als möglicher Modulator der gesteigerten Inflamationsreaktion in der Sepsis untersucht. Hier konnte ein Effekt von Lidocain auf die Inflamationsreaktion durch Reduktion des Leukozyten-Arrest sowie Transmigration mittels verminderter PKC- $\theta$  Aktivierung und konsekutiv verminderter LFA-1 Konformitätsänderung als Signalweg gezeigt werden. Im Sinne einer Strategie zur Verminderung oder Vermeidung des Risikos durch beeinflussbare anästhesiologische Maßnahmen konnte durch die Einführung eines Sedierungskonzeptes für Hochrisiko-Patient\*innen bei interventionellem Mitralklappen Repair gezeigt werden, dass ein Dexmedetomidin basiertes Sedierungskonzept sicher anwendbar ist und zu einem höheren Maß an hämodynamischer Stabilität bei verringertem Norepinephrinbedarf im Vergleich zu

einer Allgemeinanästhesie führt. Eine Erhöhung der Kompetenz der Behandelnden stellt ebenfalls eine mögliche Maßnahme zur Risikoreduktion dar. So konnte in einer prospektiv randomisierten Untersuchung zum Erhalt von kardiopulmonalen Reanimationskenntnissen gezeigt werden, dass eine Kombination von Problem basiertem Lernen und high-fidelity Simulation zu einer sowohl kurz als auch längerfristigen Verbesserung von praktischen Fähigkeiten führt. In einem Ansatz zur Echokardiografie als Möglichkeit des nicht-invasiven Monitorings eines spezifischen Organ-Risikos wurde der Verlauf der rechtsventrikulären Beeinflussung durch das SARS-CoV-2 ARDS in Patient\*innen der ersten Welle untersucht. Hierbei konnte eine zeitabhängige Assoziation der rechtsventrikulären Funktion mit der ARDS Schwere identifiziert werden.

Durch die hier zusammengefassten Arbeiten wurden somit Ansätze aufgezeigt, das perioperative Risiko durch alternative anästhesiologische Maßnahmen zu reduzieren oder durch geeignete Monitoringverfahren konsekutive Organdysfunktionen frühzeitig zu erkennen. Weiterhin wurden spezifische Signalwege der Aktivierung und Beeinflussung der perioperativ unvermeidbaren Inflammationsreaktion identifiziert und so Ansätze aufgezeigt, diese im Sinne einer Risikominimierung zu beeinflussen. Zudem konnte gezeigt werden, dass Behandlungskompetenzen durch etablieren moderner Lernmethoden längerfristig gesteigert werden können. Damit tragen die hier dargestellten Ergebnisse zum besseren Verständnis des perioperativen Risikos mit Fokus auf die Inflammationsreaktion und assoziierten Organschädigungen bei und liefern konkrete Anhaltspunkte für zukünftige Untersuchungen, dieses Risiko weiter zu reduzieren.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Ganesh, R., E. Kebede, M. Mueller, et al., *Perioperative Cardiac Risk Reduction in Noncardiac Surgery*. Mayo Clinic Proceedings, 2021. **96**(8): p. 2260-2276.
2. Devereaux, P.J. and D.I. Sessler, *Cardiac Complications in Patients Undergoing Major Noncardiac Surgery*. New England Journal of Medicine, 2015. **373**(23): p. 2258-2269.
3. Hackett, N.J., G.S. De Oliveira, U.K. Jain, et al., *ASA class is a reliable independent predictor of medical complications and mortality following surgery*. Int J Surg, 2015. **18**: p. 184-90.
4. Böhmer, A., J. Defosse, G. Geldner, et al., *The updated ASA classification*. Anästhesiologie, 2021. **62**: p. 223 - 227.
5. Halvorsen, S., J. Mehilli, S. Cassese, et al., *2022 ESC Guidelines on cardiovascular assessment and management of patients undergoing non-cardiac surgery*. European Heart Journal, 2022. **43**(39): p. 3826-3924.
6. Saklad, M., *GRADING OF PATIENTS FOR SURGICAL PROCEDURES*. Anesthesiology, 1941. **2**(3): p. 281-284.
7. Nashef, S.A., F. Roques, P. Michel, et al., *European system for cardiac operative risk evaluation (EuroSCORE)*. Eur J Cardiothorac Surg, 1999. **16**(1): p. 9-13.
8. Nashef, S.A., F. Roques, L.D. Sharples, et al., *EuroSCORE II*. Eur J Cardiothorac Surg, 2012. **41**(4): p. 734-44; discussion 744-5.
9. Paparella, D., P. Guida, G. Di Eusanio, et al., *Risk stratification for in-hospital mortality after cardiac surgery: external validation of EuroSCORE II in a prospective regional registry*. Eur J Cardiothorac Surg, 2014. **46**(5): p. 840-8.
10. Malik, V., S.C. Kale, U.K. Chowdhury, et al., *Myocardial injury in coronary artery bypass grafting: On-pump versus off-pump comparison by measuring heart-type fatty-acid-binding protein release*. Tex Heart Inst J, 2006. **33**(3): p. 321-7.
11. Paparella, D., T.M. Yau, and E. Young, *Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update*. Eur J Cardiothorac Surg, 2002. **21**(2): p. 232-44.
12. Andersson, R., B. Andersson, E. Andersson, et al., *Immunomodulation in surgical practice*. HPB (Oxford), 2006. **8**(2): p. 116-23.
13. Margraf, A., N. Ludwig, A. Zarbock, et al., *Systemic Inflammatory Response Syndrome After Surgery: Mechanisms and Protection*. Anesth Analg, 2020. **131**(6): p. 1693-1707.
14. Okholm, C., J.P. Goetze, L.B. Svendsen, et al., *Inflammatory response in laparoscopic vs. open surgery for gastric cancer*. Scand J Gastroenterol, 2014. **49**(9): p. 1027-34.
15. Endlich, B., D. Armstrong, J. Brodsky, et al., *Distinct temporal patterns of macrophage-inflammatory protein-2 and KC chemokine gene expression in surgical injury*. J Immunol, 2002. **168**(7): p. 3586-94.
16. Rossaint, J. and A. Zarbock, *Tissue-specific neutrophil recruitment into the lung, liver, and kidney*. J Innate Immun, 2013. **5**(4): p. 348-57.
17. Volmering, S., H. Block, M. Boras, et al., *The Neutrophil Btk Signalosome Regulates Integrin Activation during Sterile Inflammation*. Immunity, 2016. **44**(1): p. 73-87.
18. Schwarz, C., F. Fitschek, D. Bar-Or, et al., *Inflammatory response and oxidative stress during liver resection*. PLoS One, 2017. **12**(10): p. e0185685.
19. Klinke, A., C. Nussbaum, L. Kubala, et al., *Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces*. Blood, 2011. **117**(4): p. 1350-8.
20. McDonald, B. and P. Kubes, *Neutrophils and intravascular immunity in the liver during infection and sterile inflammation*. Toxicol Pathol, 2012. **40**(2): p. 157-65.
21. Yang, W., Y. Tao, Y. Wu, et al., *Neutrophils promote the development of reparative macrophages mediated by ROS to orchestrate liver repair*. Nature Communications, 2019. **10**(1).
22. Ley, K., C. Laudanna, M.I. Cybulsky, et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nature Reviews Immunology, 2007. **7**(9): p. 678-689.

23. Margraf, A., J.M. Herter, K. Kühne, et al., *6% Hydroxyethyl starch (HES 130/0.4) diminishes glycocalyx degradation and decreases vascular permeability during systemic and pulmonary inflammation in mice*. *Critical Care*, 2018. **22**(1).
24. Ottestad, W., I.N. Rognes, S.E. Pischke, et al., *Biphasic Release of the Alarmin High Mobility Group Box 1 Protein Early After Trauma Predicts Poor Clinical Outcome*. *Critical Care Medicine*, 2019. **47**(8): p. e614-e622.
25. Rossaint, J., K. Kühne, J. Skupski, et al., *Directed transport of neutrophil-derived extracellular vesicles enables platelet-mediated innate immune response*. *Nature Communications*, 2016. **7**(1): p. 13464.
26. Passacquale, G., P. Vamadevan, L. Pereira, et al., *Monocyte-Platelet Interaction Induces a Pro-Inflammatory Phenotype in Circulating Monocytes*. *PLoS ONE*, 2011. **6**(10): p. e25595.
27. Wu, M.Y., G.T. Yiang, W.T. Liao, et al., *Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury*. *Cell Physiol Biochem*, 2018. **46**(4): p. 1650-1667.
28. Mehta, D. and A.B. Malik, *Signaling mechanisms regulating endothelial permeability*. *Physiol Rev*, 2006. **86**(1): p. 279-367.
29. van Nieuw Amerongen, G.P. and V.W. van Hinsbergh, *Targets for pharmacological intervention of endothelial hyperpermeability and barrier function*. *Vascul Pharmacol*, 2002. **39**(4-5): p. 257-72.
30. Kaufmann, T., R.P. Clement, T.W.L. Scheeren, et al., *Perioperative goal-directed therapy: A systematic review without meta-analysis*. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2018. **62**(10): p. 1340-1355.
31. Rivers, E., B. Nguyen, S. Havstad, et al., *Early Goal-Directed Therapy in the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock*. *New England Journal of Medicine*, 2001. **345**(19): p. 1368-1377.
32. Shoemaker, W.C., P.L. Appel, H.B. Kram, et al., *Prospective trial of supranormal values of survivors as therapeutic goals in high-risk surgical patients*. *Chest*, 1988. **94**(6): p. 1176-86.
33. Jessen, M.K., M.F. Vallentin, M.J. Holmberg, et al., *Goal-directed haemodynamic therapy during general anaesthesia for noncardiac surgery: a systematic review and meta-analysis*. *British Journal of Anaesthesia*, 2022. **128**(3): p. 416-433.
34. Cepinskas, G. and J.X. Wilson, *Inflammatory response in microvascular endothelium in sepsis: role of oxidants*. *J Clin Biochem Nutr*, 2008. **42**(3): p. 175-84.
35. Aird, W.C., *The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome*. *Blood*, 2003. **101**(10): p. 3765-77.
36. Clarkson, B., D. Thompson, M. Horwith, et al., *Cyclical edema and shock due to increased capillary permeability*. *The American Journal of Medicine*, 1960. **29**(2): p. 193-216.
37. Siddall, E., M. Khatri, and J. Radhakrishnan, *Capillary leak syndrome: etiologies, pathophysiology, and management*. *Kidney International*, 2017. **92**(1): p. 37-46.
38. Pulido, J.N., B. Afessa, M. Masaki, et al., *Clinical Spectrum, Frequency, and Significance of Myocardial Dysfunction in Severe Sepsis and Septic Shock*. *Mayo Clinic Proceedings*, 2012. **87**(7): p. 620-628.
39. Habimana, R., I. Choi, H.J. Cho, et al., *Sepsis-induced cardiac dysfunction: a review of pathophysiology*. *Acute Crit Care*, 2020. **35**(2): p. 57-66.
40. Kakihana, Y., T. Ito, M. Nakahara, et al., *Sepsis-induced myocardial dysfunction: pathophysiology and management*. *Journal of Intensive Care*, 2016. **4**(1).
41. Saugel, B. and D.I. Sessler, *Perioperative Blood Pressure Management*. *Anesthesiology*, 2021. **134**(2): p. 250-261.
42. Claude-Del Granado, R. and R.L. Mehta, *Fluid overload in the ICU: evaluation and management*. *BMC Nephrology*, 2016. **17**(1): p. 109.
43. Messmer, A.S., C. Zingg, M. Müller, et al., *Fluid Overload and Mortality in Adult Critical Care Patients—A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies\**. *Critical Care Medicine*, 2020. **48**(12): p. 1862-1870.
44. Kastrup, M., J. Braun, M. Kaffarnik, et al., *Catecholamine Dosing and Survival in Adult Intensive Care Unit Patients*. *World Journal of Surgery*, 2013. **37**(4): p. 766-773.

45. Phillips, B., *Reducing gastrointestinal anastomotic leak rates: review of challenges and solutions*. Open Access Surgery, 2016: p. 5.
46. Foppa, C., S.C. Ng, M. Montorsi, et al., *Anastomotic leak in colorectal cancer patients: New insights and perspectives*. Eur J Surg Oncol, 2020. **46**(6): p. 943-954.
47. Kenney, M.J. and C.K. Ganta, *Autonomic nervous system and immune system interactions*. Compr Physiol, 2014. **4**(3): p. 1177-200.
48. Andreis, D.T. and M. Singer, *Catecholamines for inflammatory shock: a Jekyll-and-Hyde conundrum*. Intensive Care Medicine, 2016. **42**(9): p. 1387-1397.
49. Nicholls, A.J., S.W. Wen, P. Hall, et al., *Activation of the sympathetic nervous system modulates neutrophil function*. Journal of Leukocyte Biology, 2018. **103**(2): p. 295-309.
50. Fernandez-Bustamante, A., G. Frendl, J. Sprung, et al., *Postoperative Pulmonary Complications, Early Mortality, and Hospital Stay Following Noncardiothoracic Surgery: A Multicenter Study by the Perioperative Research Network Investigators*. JAMA Surg, 2017. **152**(2): p. 157-166.
51. Mazo, V., S. Sabaté, J. Canet, et al., *Prospective external validation of a predictive score for postoperative pulmonary complications*. Anesthesiology, 2014. **121**(2): p. 219-31.
52. Smetana, G.W., V.A. Lawrence, and J.E. Cornell, *Preoperative pulmonary risk stratification for noncardiothoracic surgery: systematic review for the American College of Physicians*. Ann Intern Med, 2006. **144**(8): p. 581-95.
53. Yang, C.K., A. Teng, D.Y. Lee, et al., *Pulmonary complications after major abdominal surgery: National Surgical Quality Improvement Program analysis*. J Surg Res, 2015. **198**(2): p. 441-9.
54. Miskovic, A. and A.B. Lumb, *Postoperative pulmonary complications*. British Journal of Anaesthesia, 2017. **118**(3): p. 317-334.
55. Rock, P. and P.B. Rich, *Postoperative pulmonary complications*. Curr Opin Anaesthesiol, 2003. **16**(2): p. 123-31.
56. Slutsky, A.S. and V.M. Ranieri, *Ventilator-induced lung injury*. N Engl J Med, 2013. **369**(22): p. 2126-36.
57. Spieth, P.M., A. Güldner, and M. Gama De Abreu, *Akutes Lungenversagen*. Der Anaesthesist, 2017. **66**(7): p. 539-552.
58. Slutsky, A.S. and L.N. Tremblay, *Multiple system organ failure. Is mechanical ventilation a contributing factor?* Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(6 Pt 1): p. 1721-5.
59. Wong, J.J.M., J.Y. Leong, J.H. Lee, et al., *Insights into the immuno-pathogenesis of acute respiratory distress syndrome*. Annals of Translational Medicine, 2019. **7**(19): p. 504-504.
60. Del Sorbo, L. and A.S. Slutsky, *Acute respiratory distress syndrome and multiple organ failure*. Curr Opin Crit Care, 2011. **17**(1): p. 1-6.
61. Singer, M., C.S. Deutschman, C.W. Seymour, et al., *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. JAMA, 2016. **315**(8): p. 801.
62. Bauer, M., H. Gerlach, T. Vogelmann, et al., *Mortality in sepsis and septic shock in Europe, North America and Australia between 2009 and 2019— results from a systematic review and meta-analysis*. Critical Care, 2020. **24**(1).
63. Scheer, C.S., C. Fuchs, S.O. Kuhn, et al., *Quality Improvement Initiative for Severe Sepsis and Septic Shock Reduces 90-Day Mortality: A 7.5-Year Observational Study*. Crit Care Med, 2017. **45**(2): p. 241-252.
64. Davies, M.G. and P.O. Hagen, *Systemic inflammatory response syndrome*. Br J Surg, 1997. **84**(7): p. 920-35.
65. de Jong, H.K., T. van der Poll, and W.J. Wiersinga, *The systemic pro-inflammatory response in sepsis*. J Innate Immun, 2010. **2**(5): p. 422-30.
66. Chandra, A., P. Enkhbaatar, Y. Nakano, et al., *Sepsis: emerging role of nitric oxide and selectins*. Clinics, 2006. **61**(1): p. 71-76.
67. Hamzaoui, O., T.W.L. Scheeren, and J.L. Teboul, *Norepinephrine in septic shock: when and how much?* Curr Opin Crit Care, 2017. **23**(4): p. 342-347.

68. Li, D., Y. Chen, H. Liu, et al., *Immune dysfunction leads to mortality and organ injury in patients with COVID-19 in China: insights from ERS-COVID-19 study*. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2020. **5**(1).
69. Carsana, L., A. Sonzogni, A. Nasr, et al., *Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study*. The Lancet Infectious Diseases, 2020. **20**(10): p. 1135-1140.
70. Huang, C., Y. Wang, X. Li, et al., *Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China*. Lancet, 2020. **395**(10223): p. 497-506.
71. Coperchini, F., L. Chiovato, L. Croce, et al., *The cytokine storm in COVID-19: An overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2020. **53**: p. 25-32.
72. Becke-Jakob, K., G. Geldner, F. Vescia, et al., *Zeitpunkt elektiver Eingriffe nach SARS-CoV-2-Infektion und Impfung*. Anästh Intensivmed, 2022. **63**: p. V179-V181.
73. Thomas, W.E., *Teaching and assessing surgical competence*. Ann R Coll Surg Engl, 2006. **88**(5): p. 429-32.
74. Stulberg, J.J., R. Huang, L. Kreutzer, et al., *Association Between Surgeon Technical Skills and Patient Outcomes*. JAMA Surg, 2020. **155**(10): p. 960-968.
75. Hofer, I., J. Spivack, M. Yapor, et al., *Association between anesthesiologist experience and mortality after orthotopic liver transplantation*. Liver Transpl, 2015. **21**(1): p. 89-95.
76. Goudra, B.G., P.M. Singh, and A.C. Sinha, *Anesthesia for ERCP: Impact of Anesthesiologist's Experience on Outcome and Cost*. Anesthesiol Res Pract, 2013. **2013**: p. 570518.
77. Choudhry, N.K., R.H. Fletcher, and S.B. Soumerai, *Systematic review: the relationship between clinical experience and quality of health care*. Ann Intern Med, 2005. **142**(4): p. 260-73.
78. Davis, D. and R. Galbraith, *Continuing medical education effect on practice performance: effectiveness of continuing medical education: American College of Chest Physicians Evidence-Based Educational Guidelines*. Chest, 2009. **135**(3 Suppl): p. 42s-48s.
79. Yim, A.P., S. Wan, T.W. Lee, et al., *VATS lobectomy reduces cytokine responses compared with conventional surgery*. Ann Thorac Surg, 2000. **70**(1): p. 243-7.
80. Jaradeh, M., B. Curran, K. Poulidakis, et al., *Inflammatory cytokines in robot-assisted thoracic surgery versus video-assisted thoracic surgery*. Journal of Thoracic Disease, 2022. **14**(6): p. 2000-2010.
81. Fowler, A.J., T.E.F. Abbott, J. Prowle, et al., *Age of patients undergoing surgery*. British Journal of Surgery, 2019. **106**(8): p. 1012-1018.
82. Edmunds, L.H., Jr., *The evolution of cardiopulmonary bypass: lessons to be learned*. Perfusion, 2002. **17**(4): p. 243-51.
83. Raja, S.G. and G.A. Berg, *Impact of off-pump coronary artery bypass surgery on systemic inflammation: current best available evidence*. J Card Surg, 2007. **22**(5): p. 445-55.
84. Landis, C., *Pharmacologic strategies for combating the inflammatory response*. J Extra Corpor Technol, 2007. **39**(4): p. 291-5.
85. Lamy, A., P.J. Devereaux, D. Prabhakaran, et al., *Off-pump or on-pump coronary-artery bypass grafting at 30 days*. N Engl J Med, 2012. **366**(16): p. 1489-97.
86. Vestweber, D., *Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium*. Immunol Rev, 2007. **218**: p. 178-96.
87. Kuwano, Y., O. Spelten, H. Zhang, et al., *Rolling on E- or P-selectin induces the extended but not high-affinity conformation of LFA-1 in neutrophils*. Blood, 2010. **116**(4): p. 617-24.
88. Schnoor, M., F.P. Lai, A. Zarbock, et al., *Cortactin deficiency is associated with reduced neutrophil recruitment but increased vascular permeability in vivo*. J Exp Med, 2011. **208**(8): p. 1721-35.
89. Mueller, H., A. Stadtmann, H. Van Aken, et al., *Tyrosine kinase Btk regulates E-selectin-mediated integrin activation and neutrophil recruitment by controlling*

- phospholipase C (PLC) gamma2 and PI3Kgamma pathways*. Blood, 2010. **115**(15): p. 3118-27.
90. Shubin, N.J., S.F. Monaghan, and A. Ayala, *Anti-inflammatory mechanisms of sepsis*. Contrib Microbiol, 2011. **17**: p. 108-124.
  91. Sriskandan, S. and D. Altmann, *The immunology of sepsis*. The Journal of Pathology, 2008. **214**(2): p. 211-223.
  92. Kumar, V. and A. Sharma, *Innate Immunity in Sepsis Pathogenesis and Its Modulation: New Immunomodulatory Targets Revealed*. Journal of Chemotherapy, 2008. **20**(6): p. 672-683.
  93. van der Poll, T., *Immunotherapy of sepsis*. Lancet Infect Dis, 2001. **1**(3): p. 165-74.
  94. Hollmann, M.W. and M.E. Durieux, *Local anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication?* Anesthesiology, 2000. **93**(3): p. 858-75.
  95. Hahnenkamp, K., G. Theilmeier, H.K. Van Aken, et al., *The effects of local anesthetics on perioperative coagulation, inflammation, and microcirculation*. Anesth Analg, 2002. **94**(6): p. 1441-7.
  96. Levy, M.M., M.P. Fink, J.C. Marshall, et al., *2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference*. Crit Care Med, 2003. **31**(4): p. 1250-6.
  97. Franzen, O., S. Baldus, V. Rudolph, et al., *Acute outcomes of MitraClip therapy for mitral regurgitation in high-surgical-risk patients: emphasis on adverse valve morphology and severe left ventricular dysfunction*. Eur Heart J, 2010. **31**(11): p. 1373-81.
  98. Kothandan, H., K.H. Vui, K.Y. Khung, et al., *Anesthesia management for MitraClip device implantation*. Ann Card Anaesth, 2014. **17**(1): p. 17-22.
  99. Brodier, E.A. and M. Cibelli, *Postoperative cognitive dysfunction in clinical practice*. BJA Education, 2021. **21**(2): p. 75-82.
  100. Chan, M.T., B.C. Cheng, T.M. Lee, et al., *BIS-guided anesthesia decreases postoperative delirium and cognitive decline*. J Neurosurg Anesthesiol, 2013. **25**(1): p. 33-42.
  101. Teufel, T., D.H. Steinberg, N. Wunderlich, et al., *Percutaneous mitral valve repair with the MitraClip® system under deep sedation and local anaesthesia*. EuroIntervention, 2012. **8**(5): p. 587-90.
  102. Rassaf, T., J. Balzer, T. Zeus, et al., *Safety and efficacy of deep sedation as compared to general anaesthesia in percutaneous mitral valve repair using the MitraClip system*. Catheter Cardiovasc Interv, 2014. **84**(4): p. E38-42.
  103. de Waha, S., J. Seeburger, J. Ender, et al., *Deep sedation versus general anesthesia in percutaneous edge-to-edge mitral valve reconstruction using the MitraClip system*. Clin Res Cardiol, 2016. **105**(6): p. 535-43.
  104. Horn, P., K. Hellhammer, M. Minier, et al., *Deep sedation Vs. general anesthesia in 232 patients undergoing percutaneous mitral valve repair using the MitraClip((R)) system*. Catheter Cardiovasc Interv, 2017. **90**(7): p. 1212-1219.
  105. Kok, L., A.J. Slooter, M.H. Hillegers, et al., *Benzodiazepine Use and Neuropsychiatric Outcomes in the ICU: A Systematic Review*. Crit Care Med, 2018. **46**(10): p. 1673-1680.
  106. Kallioinen, M., A. Scheinin, M. Maksimow, et al., *The influence of dexmedetomidine and propofol on circulating cytokine levels in healthy subjects*. BMC Anesthesiology, 2019. **19**(1).
  107. Ma, D., N. Rajakumaraswamy, and M. Maze, *alpha2-Adrenoceptor agonists: shedding light on neuroprotection?* Br Med Bull, 2004. **71**: p. 77-92.
  108. Su, X., Z.-T. Meng, X.-H. Wu, et al., *Dexmedetomidine for prevention of delirium in elderly patients after non-cardiac surgery: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. The Lancet, 2016. **388**(10054): p. 1893-1902.
  109. Suero Molina, E., S. Schipmann, I. Mueller, et al., *Conscious sedation with dexmedetomidine compared with asleep-awake-asleep craniotomies in glioma surgery: an analysis of 180 patients*. Journal of Neurosurgery, 2018. **129**(5): p. 1223-1230.

110. Kuhnigk, H., P. Sefrin, and T. Paulus, *Skills and self-assessment in cardio-pulmonary resuscitation of the hospital nursing staff*. Eur J Emerg Med, 1994. **1**(4): p. 193-8.
111. Kaye, W. and M.E. Mancini, *Retention of cardiopulmonary resuscitation skills by physicians, registered nurses, and the general public*. Crit Care Med, 1986. **14**(7): p. 620-2.
112. Ruppert, M., M.W. Reith, J.H. Widmann, et al., *Checking for breathing: evaluation of the diagnostic capability of emergency medical services personnel, physicians, medical students, and medical laypersons*. Ann Emerg Med, 1999. **34**(6): p. 720-9.
113. Hartling, L., C. Spooner, L. Tjosvold, et al., *Problem-based learning in pre-clinical medical education: 22 years of outcome research*. Med Teach, 2010. **32**(1): p. 28-35.
114. Polyzois, I., N. Claffey, and N. Mattheos, *Problem-based learning in academic health education. A systematic literature review*. Eur J Dent Educ, 2010. **14**(1): p. 55-64.
115. McGaghie, W.C., S.B. Issenberg, E.R. Petrusa, et al., *A critical review of simulation-based medical education research: 2003-2009*. Med Educ, 2010. **44**(1): p. 50-63.
116. Perkins, G.D., *Simulation in resuscitation training*. Resuscitation, 2007. **73**(2): p. 202-11.
117. Bunge, J.J.H., K. Caliskan, D. Gommers, et al., *Right ventricular dysfunction during acute respiratory distress syndrome and veno-venous extracorporeal membrane oxygenation*. J Thorac Dis, 2018. **10**(Suppl 5): p. S674-s682.
118. Shah, T.G., S.K. Wadia, J. Kovach, et al., *Echocardiographic parameters of right ventricular function predict mortality in acute respiratory distress syndrome: a pilot study*. Pulm Circ, 2016. **6**(2): p. 155-60.
119. Matthay, M.A., R.L. Zemans, G.A. Zimmerman, et al., *Acute respiratory distress syndrome*. Nat Rev Dis Primers, 2019. **5**(1): p. 18.
120. Tzotzos, S.J., B. Fischer, H. Fischer, et al., *Incidence of ARDS and outcomes in hospitalized patients with COVID-19: a global literature survey*. Crit Care, 2020. **24**(1): p. 516.
121. Heiberg, J., D. El-Ansary, D.J. Canty, et al., *Focused echocardiography: a systematic review of diagnostic and clinical decision-making in anaesthesia and critical care*. Anaesthesia, 2016. **71**(9): p. 1091-100.
122. Wadia, S.K., T.G. Shah, G. Hedstrom, et al., *Early detection of right ventricular dysfunction using transthoracic echocardiography in ARDS: a more objective approach*. Echocardiography, 2016. **33**(12): p. 1874-1879.
123. Kunkel, D., M. Parker, C. Casey, et al., *Impact of perioperative inflammation on days alive and at home after surgery*. BJA Open, 2022. **2**: p. 100006.
124. Warren, O.J., A.J. Smith, C. Alexiou, et al., *The inflammatory response to cardiopulmonary bypass: part 1--mechanisms of pathogenesis*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2009. **23**(2): p. 223-31.
125. Wolf, D., N. Anto-Michel, H. Blankenbach, et al., *A ligand-specific blockade of the integrin Mac-1 selectively targets pathologic inflammation while maintaining protective host-defense*. Nature Communications, 2018. **9**(1).
126. Siegel, P.M., I. Bojti, N. Bassler, et al., *A DARPIn targeting activated Mac-1 is a novel diagnostic tool and potential anti-inflammatory agent in myocarditis, sepsis and myocardial infarction*. Basic Res Cardiol, 2021. **116**(1): p. 17.
127. Koutsogiannaki, S., L. Hou, H. Babazada, et al., *The volatile anesthetic sevoflurane reduces neutrophil apoptosis via Fas death domain-Fas-associated death domain interaction*. Faseb j, 2019. **33**(11): p. 12668-12679.
128. Chen, M.S., W.C. Lin, H.T. Yeh, et al., *Propofol specifically reduces PMA-induced neutrophil extracellular trap formation through inhibition of p-ERK and HOCl*. Life Sci, 2019. **221**: p. 178-186.
129. Carter, D.W., I. Prudovsky, D. Kacer, et al., *Tranexamic acid suppresses the release of mitochondrial DAMPs and reduces lung inflammation in a murine burn model*. J Trauma Acute Care Surg, 2019. **86**(4): p. 617-624.
130. Kolmus, K., J. Tavernier, and S. Gerlo,  *$\beta$ 2-Adrenergic receptors in immunity and inflammation: stressing NF- $\kappa$ B*. Brain Behav Immun, 2015. **45**: p. 297-310.

131. Kharbanda, R.K., B. Walton, M. Allen, et al., *Prevention of inflammation-induced endothelial dysfunction: a novel vasculo-protective action of aspirin*. *Circulation*, 2002. **105**(22): p. 2600-4.
132. Rossaint, J., C. Berger, F. Kraft, et al., *Hydroxyethyl starch 130/0.4 decreases inflammation, neutrophil recruitment, and neutrophil extracellular trap formation*. *Br J Anaesth*, 2015. **114**(3): p. 509-19.
133. Nohé, B., T. Johannes, J. Reutershan, et al., *Synthetic colloids attenuate leukocyte-endothelial interactions by inhibition of integrin function*. *Anesthesiology*, 2005. **103**(4): p. 759-67.
134. Handrigan, M.T., A.R. Burns, E.M. Donnachie, et al., *Hydroxyethyl starch inhibits neutrophil adhesion and transendothelial migration*. *Shock*, 2005. **24**(5): p. 434-9.
135. Tarbell, J.M. and L.M. Cancel, *The glycocalyx and its significance in human medicine*. *J Intern Med*, 2016. **280**(1): p. 97-113.
136. Lipowsky, H.H., *The endothelial glycocalyx as a barrier to leukocyte adhesion and its mediation by extracellular proteases*. *Ann Biomed Eng*, 2012. **40**(4): p. 840-8.
137. Margraf, A., J.M. Herter, K. Kühne, et al., *6% Hydroxyethyl starch (HES 130/0.4) diminishes glycocalyx degradation and decreases vascular permeability during systemic and pulmonary inflammation in mice*. *Crit Care*, 2018. **22**(1): p. 111.
138. Beaussier, M., A. Delbos, A. Maurice-Szamburski, et al., *Perioperative Use of Intravenous Lidocaine*. *Drugs*, 2018. **78**(12): p. 1229-1246.
139. Rancan, L., C. Simón, G. Sánchez Pedrosa, et al., *Glycocalyx Degradation after Pulmonary Transplantation Surgery*. *Eur Surg Res*, 2018. **59**(3-4): p. 115-125.
140. Pustetto, M., N. Goldsztejn, K. Touihri, et al., *Intravenous lidocaine to prevent endothelial dysfunction after major abdominal surgery: a randomized controlled pilot trial*. *BMC Anesthesiology*, 2020. **20**(1): p. 155.
141. Vincent, J.L., *Current sepsis therapeutics*. *EBioMedicine*, 2022. **86**: p. 104318.
142. de Amorim, C.G., L.M. Malbouisson, F.C. da Silva, Jr., et al., *Leukocyte depletion during CPB: effects on inflammation and lung function*. *Inflammation*, 2014. **37**(1): p. 196-204.
143. Heymann, M., R. Schorer, and A. Putzu, *Mortality and adverse events of hemoadsorption with CytoSorb® in critically ill patients: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2022. **66**(9): p. 1037-1050.
144. Watt, J., A.C. Tricco, C. Talbot-Hamon, et al., *Identifying older adults at risk of harm following elective surgery: a systematic review and meta-analysis*. *BMC Med*, 2018. **16**(1): p. 2.
145. Lin, H.-S., J.N. Watts, N.M. Peel, et al., *Frailty and post-operative outcomes in older surgical patients: a systematic review*. *BMC Geriatrics*, 2016. **16**(1): p. 157.
146. Li, Y. and B. Zhang, *Effects of anesthesia depth on postoperative cognitive function and inflammation: a systematic review and meta-analysis*. *Minerva Anesthesiol*, 2020. **86**(9): p. 965-973.
147. Kristek, G., I. Radoš, D. Kristek, et al., *Influence of postoperative analgesia on systemic inflammatory response and postoperative cognitive dysfunction after femoral fractures surgery: a randomized controlled trial*. *Reg Anesth Pain Med*, 2019. **44**(1): p. 59-68.
148. Belrose, J.C. and R.R. Noppens, *Anesthesiology and cognitive impairment: a narrative review of current clinical literature*. *BMC Anesthesiology*, 2019. **19**(1): p. 241.
149. Deiner, S., X. Liu, H.-M. Lin, et al., *Does Postoperative Cognitive Decline Result in New Disability After Surgery?* *Annals of Surgery*, 2021. **274**(6): p. e1108-e1114.
150. Raats, J.W., W.A. van Eijnsden, R.M. Crolla, et al., *Risk Factors and Outcomes for Postoperative Delirium after Major Surgery in Elderly Patients*. *PLoS One*, 2015. **10**(8): p. e0136071.
151. Thiele, H., T. Kurz, H.J. Feistritz, et al., *General Versus Local Anesthesia With Conscious Sedation in Transcatheter Aortic Valve Implantation: The Randomized SOLVE-TAVI Trial*. *Circulation*, 2020. **142**(15): p. 1437-1447.

152. Wan, T.F., R. Xu, Z.A. Zhao, et al., *Outcomes of general anesthesia versus conscious sedation for Stroke undergoing endovascular treatment: a meta-analysis*. BMC Anesthesiol, 2019. **19**(1): p. 69.
153. Frölich, M.A., A. Arabshahi, C. Katholi, et al., *Hemodynamic characteristics of midazolam, propofol, and dexmedetomidine in healthy volunteers*. J Clin Anesth, 2011. **23**(3): p. 218-23.
154. Tobias, J.D. and M. Leder, *Procedural sedation: A review of sedative agents, monitoring, and management of complications*. Saudi J Anaesth, 2011. **5**(4): p. 395-410.
155. Jobs, A., S. Grund, S. de Waha-Thiele, et al., *Deep sedation versus general anaesthesia for transcatheter mitral valve repair: an individual patient data meta-analysis of observational studies*. EuroIntervention, 2021. **16**(16): p. 1359-1365.
156. Guo, Q., M. Ma, Q. Yang, et al., *Effects of different sedatives/analgesics on stress responses in patients undergoing craniotomy and bone flap decompression*. Journal of International Medical Research, 2021. **49**(12): p. 03000605211062789.
157. Huang, S.Q., J. Zhang, X.X. Zhang, et al., *Can Dexmedetomidine Improve Arterial Oxygenation and Intrapulmonary Shunt during One-lung Ventilation in Adults Undergoing Thoracic Surgery? A Meta-analysis of Randomized, Placebo-controlled Trials*. Chin Med J (Engl), 2017. **130**(14): p. 1707-1714.
158. Peng, K., D. Li, R.L. Applegate, 2nd, et al., *Effect of Dexmedetomidine on Cardiac Surgery-Associated Acute Kidney Injury: A Meta-Analysis With Trial Sequential Analysis of Randomized Controlled Trials*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2020. **34**(3): p. 603-613.
159. Wang, J., X. Yi, L. Jiang, et al., *Protective effects of dexmedetomidine on lung in rats with one-lung ventilation*. Exp Ther Med, 2019. **17**(1): p. 187-192.
160. Meng, L., L. Li, S. Lu, et al., *The protective effect of dexmedetomidine on LPS-induced acute lung injury through the HMGB1-mediated TLR4/NF- $\kappa$ B and PI3K/Akt/mTOR pathways*. Mol Immunol, 2018. **94**: p. 7-17.
161. Wang, K., M. Wu, J. Xu, et al., *Effects of dexmedetomidine on perioperative stress, inflammation, and immune function: systematic review and meta-analysis*. Br J Anaesth, 2019. **123**(6): p. 777-794.
162. She, H., Y. Hu, Y. Zhou, et al., *Protective Effects of Dexmedetomidine on Sepsis-Induced Vascular Leakage by Alleviating Ferroptosis via Regulating Metabolic Reprogramming*. J Inflamm Res, 2021. **14**: p. 6765-6782.
163. Unchiti, K., P. Leurcharusmee, A. Samerchua, et al., *The potential role of dexmedetomidine on neuroprotection and its possible mechanisms: Evidence from in vitro and in vivo studies*. Eur J Neurosci, 2021. **54**(9): p. 7006-7047.
164. Lv, H., Y. Li, Q. Cheng, et al., *Neuroprotective Effects Against Cerebral Ischemic Injury Exerted by Dexmedetomidine via the HDAC5/NPAS4/MDM2/PSD-95 Axis*. Molecular Neurobiology, 2021. **58**(5): p. 1990-2004.
165. Ge, Y., Q. Li, Y. Nie, et al., *Dexmedetomidine improves cognition after carotid endarterectomy by inhibiting cerebral inflammation and enhancing brain-derived neurotrophic factor expression*. J Int Med Res, 2019. **47**(6): p. 2471-2482.
166. Pagnesi, M., D. Regazzoli, M.B. Ancona, et al., *Cerebral Embolic Risk During Transcatheter Mitral Valve Interventions: An Unaddressed and Unmet Clinical Need?* JACC Cardiovasc Interv, 2018. **11**(6): p. 517-528.
167. Tay, E.L., R. Gurvitch, N. Wijesinghe, et al., *A high-risk period for cerebrovascular events exists after transcatheter aortic valve implantation*. JACC Cardiovasc Interv, 2011. **4**(12): p. 1290-7.
168. Braemswig, T.B., M.M.D. Kusserow, J. Kruppa, et al., *Cerebral embolisation during transcatheter edge-to-edge repair of the mitral valve with the MitraClip system: a prospective, observational study*. EuroIntervention, 2022. **18**(2): p. e160-e168.
169. Jayaraj, R.L., S. Azimullah, R. Beiram, et al., *Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke*. Journal of Neuroinflammation, 2019. **16**(1): p. 142.

170. Leroy, P.L., D.M. Schipper, and H.J. Knape, *Professional skills and competence for safe and effective procedural sedation in children: recommendations based on a systematic review of the literature*. Int J Pediatr, 2010. **2010**: p. 934298.
171. Lavi, S., S.S. Jolly, D. Bainbridge, et al., *Sedation, analgesia, and anaesthesia variability in laboratory-based cardiac procedures: an international survey*. Can J Cardiol, 2014. **30**(6): p. 627-33.
172. Trullàs, J.C., C. Blay, E. Sarri, et al., *Effectiveness of problem-based learning methodology in undergraduate medical education: a scoping review*. BMC Medical Education, 2022. **22**(1): p. 104.
173. Gugelmin-Almeida, D., L. Tobase, I. Maconochie, et al., *What can be learned from the literature about intervals and strategies for paediatric CPR retraining of healthcare professionals? A scoping review of literature*. Resusc Plus, 2022. **12**: p. 100319.
174. Anderson, R., A. Sebaldt, Y. Lin, et al., *Optimal training frequency for acquisition and retention of high-quality CPR skills: A randomized trial*. Resuscitation, 2019. **135**: p. 153-161.
175. Gibson, L.E., R.D. Fenza, M. Lang, et al., *Right Ventricular Strain Is Common in Intubated COVID-19 Patients and Does Not Reflect Severity of Respiratory Illness*. J Intensive Care Med, 2021. **36**(8): p. 900-909.
176. Oweis, J., A. Leamon, A.H. Al-Tarbsheh, et al., *Influence of right ventricular structure and function on hospital outcomes in COVID-19 patients*. Heart Lung, 2023. **57**: p. 19-24.
177. Lang, M., A. Som, D. Carey, et al., *Pulmonary Vascular Manifestations of COVID-19 Pneumonia*. Radiol Cardiothorac Imaging, 2020. **2**(3): p. e200277.
178. Gierhardt, M., O. Pak, D. Walmrath, et al., *Impairment of hypoxic pulmonary vasoconstriction in acute respiratory distress syndrome*. Eur Respir Rev, 2021. **30**(161).
179. Bellofiore, A. and N.C. Chesler, *Methods for measuring right ventricular function and hemodynamic coupling with the pulmonary vasculature*. Ann Biomed Eng, 2013. **41**(7): p. 1384-98.
180. Barthélémy, R., X. Roy, T. Javanainen, et al., *Comparison of echocardiographic indices of right ventricular systolic function and ejection fraction obtained with continuous thermodilution in critically ill patients*. Crit Care, 2019. **23**(1): p. 312.
181. Sato, T., I. Tsujino, H. Ohira, et al., *Validation study on the accuracy of echocardiographic measurements of right ventricular systolic function in pulmonary hypertension*. J Am Soc Echocardiogr, 2012. **25**(3): p. 280-6.
182. Mercado, P., J. Maizel, C. Beyls, et al., *Transthoracic echocardiography: an accurate and precise method for estimating cardiac output in the critically ill patient*. Crit Care, 2017. **21**(1): p. 136.
183. Friedman, S.M. and G.R. Rajan, *Pulmonary Artery Catheter Seemingly Entrapped in the Skull*. Case Rep Anesthesiol, 2019. **2019**: p. 9842129.
184. Varelmann, D.J. and J.N. Hilberath, *Misplacement of a pulmonary artery catheter*. A A Case Rep, 2014. **3**(10): p. 127-9.
185. Senoner, T., C. Velik-Salchner, and H. Tauber, *The Pulmonary Artery Catheter in the Perioperative Setting: Should It Still Be Used?* Diagnostics (Basel), 2022. **12**(1).
186. Manasia, A.R., H.M. Nagaraj, R.B. Kodali, et al., *Feasibility and potential clinical utility of goal-directed transthoracic echocardiography performed by noncardiologist intensivists using a small hand-carried device (SonoHeart) in critically ill patients*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2005. **19**(2): p. 155-9.
187. Trauzeddel, R.F., M. Ertmer, M. Nordine, et al., *Perioperative echocardiography-guided hemodynamic therapy in high-risk patients: a practical expert approach of hemodynamically focused echocardiography*. J Clin Monit Comput, 2021. **35**(2): p. 229-243.
188. Greim, C.-A., M. Göpfert, H. Groesdonk, et al., *Perioperative fokussierte Echokardiographie: Modul 1 - 5*. A&I, 2017. **58**: p. 616-648.

189. Feldheiser, A., P. Juhl-Olsen, M. Nordine, et al., *A comprehensive echocardiographic analysis during simulated hypovolaemia: An observational study*. Eur J Anaesthesiol, 2023.

## 6 Danksagung

Als Erstes möchte ich dem Direktor der Klinik, Herrn Professor Dr. Sascha Treskatsch, für das Vertrauen in mich, seine ständige und unermüdliche Unterstützung und die Möglichkeit, diese Forschungsprojekte zu realisieren und diese Arbeit zu erstellen, danken. Weiterhin möchte ich Herrn PD Dr. Tim Neumann für seine guten wissenschaftlichen Ratschläge und Gespräche danken, die mir stets geholfen haben. Darüber hinaus möchte ich allen danken, die in den letzten Jahren am Aufbau und Ausbau von Forschungsstrukturen in der Klinik beteiligt waren und so ebenso zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ebenso möchte ich meiner früheren Arbeitsgruppe aus Münster danken. Hier gilt mein besonderer Dank Frau Dr. Anika Cappenberg, Frau Dr. Helena Block, Herrn PD Dr. Jan Herter und Herrn Professor Dr. Jan Rossaint, die mich sowohl fachlich als auch zwischenmenschlich bei der Durchführung der tierexperimentellen Arbeiten unterstützt haben.

Mein weiterer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder Michael für ihre ständige und uneingeschränkte Unterstützung und insbesondere meiner Frau Angela, die unermüdlich an meiner Seite ist und ohne die dies hier und vieles mehr nicht möglich wäre.

## 7 Eidesstattliche Erklärung

Erklärung nach

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Berlin, den 18.06.2023

Dr. Christian Berger, MHBA