Aus der Klinik für Innere Medizin m. S. Nephrologie und Intensivmedizin der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Serielle Messung der Plasmacholinkonzentration bei Patienten nach kardiopulmonaler Reanimation unter besonderer Berücksichtigung der milden therapeutischen Hypothermie

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Tim Schröder aus Frankfurt am Main

Gutachter/in:

- 1. Priv.-Doz. Dr. med. C. Storm
- 2. Prof. Dr. med. P. Tonner
- 3. Prof. Dr. med. T. Kerner

Datum der Promotion: 01.02.2013

Widmung

Diese Arbeit ist Cordula Schröder und Norbert Porschke gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

WIDMU	NG	3
INHALT	SVERZEICHNIS	4
ABKÜR	ZUNGSVERZEICHNIS	6
1 EIN	ILEITUNG	9
1.1 Der	Herz-Kreislaufstillstand	9
1.1.1	Ursachen des Herz-Kreislaufstillstands	10
1.2 Dia	gnostik des Herz-Kreislaufstillstands	11
1.2.1	Notfalldiagnostik	
1.2.2	Weiterführende Diagnostik	
1.3 The	rapie des Herzkreislaufstillstands	13
1.3.1	Milde Therapeutische Hypothermie	
1.3.2	Weitere therapeutische Möglichkeiten in der Postreanimationsphase	
1.4 Pro	gnose nach Kreislaufstillstand	17
1.4.1	Neurologische Untersuchung zur Prognoseabschätzung	18
1.4.2	Somatosensibel evozierte Potentiale zur Prognoseabschätzung	19
1.4.3	Biochemische Marker zur Prognoseabschätzung	20
1.5 Cho	olin	21
1.5.1	Cholinzufuhr	23
1.5.2	Cholinmetabolismus	24
1.5.3	Cholinfreisetzung aus der Zellmembran	25
1.5.4	Normwerte für Plasmacholin	26
1.5.5	Cholin als möglicher zerebraler Biomarker nach Reanimation	27
2 FR	AGESTELLUNG	28
3 ME	THODEN	29
3.1 Stu	dienprotokoll	29
3.1.1	Studienpopulation	
212	Finschluss der Studiennatienten	30

3	3.1.3	Selektion der Studienpatienten und Bildung der Untergruppen	30
3	3.1.4	Probengewinnung	30
3	3.1.5	Probenverarbeitung	32
3.2	Anal	yseverfahren zur Cholinbestimmung	
3	3.2.1	HPLC	33
3	3.2.2	HPLC-MS gekoppelt durch Elektrospray-Ionisation	36
3	3.2.3	Detektion des Analysats im Massenspektrometer	37
3.3	Weit	ere untersuchte Parameter	39
3.4	Stati	stische Auswertung	39
4	ED/	DEDNICOE	44
4	EK	GEBNISSE	41
4.1	Chai	akterisierung des Studienkollektivs	41
4	.1.1	Verlauf der Cholinkonzentration im Gesamtkollektiv	
	.1.2	Veränderung der Plasmacholinkonzentration im Gesamtkollektiv unter	
		sichtigung der milden therapeutischen Hypothermie	44
		,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	
4.2	Erge	bnisse der beiden Gruppen im Vergleich	45
4	.2.1	Verlauf der Plasmacholinkonzentration in den Gruppen im Verhältnis zur	
7	empe	raturänderung unter milder therapeutischer Hypothermie	52
4.3	Neui	ologisches Ergebnis und Überleben des Patientenkollektivs	53
_			
5	DIS	KUSSION	57
E 1	Diek	ussion der Ergebnisse	5 7
5.1	DISK	ussion der Ergebnisse	31
5.1	Disk	ussion der Methodik	63
6	zus	SAMMENFASSUNG	66
I IT	FRΔ	TURVERZEICHNIS	68
			00
D۷	NIKE	AGUNG	76
υA	IN NO.	4GUNG	10
	DE::-		
LE	BENS	SLAUF	<i>7</i> 7
ER	KLÄF	RUNG	78

Abkürzungsverzeichnis

AAN American Academy of Neurology

ACLS Advanced Cardiac Life Support

(Erweiterte Reanimationsmaßnahmen)

ADP Adenosindiphosphat

AED Automatischer Externer Defibrillator

AHA American Heart Association

ALAT Alanin-Amino-Transferase

ATP Adenosintriphosphat

Auc Auc Area under the curve

(Fläche unter der Kurve)

BLS Basic Life Support

(Basisreanimation)

CK Creatinkinase

CPC Cerebral Performance Category Scale

CPR Cardiopulmonary Resuscitation

(Kardiopulmonale Reanimation)

EDTA Ethylendiamintetraacetat

EEG Elektroenzephalogramm

EKG Elektrokardiogramm

ERC European Resuscitation Council

ESI Elektrospray Ionisation

GCS Glasgow Coma Scale

High Performance Liquid Chromatography
HPLC

(Hochleistungsflüssigchromatografie)

ICB Intrakranielle Blutung

Intra-hospital cardiac arrest

(Kreislaufstillstand im Krankenhaus erlitten)

ILCOR International Liaison Committee on Resuscitation

KF Kammerflimmern

KHK Koronare Herzkrankheit

Length Of Stay

LOS (Aufenthaltsdauer im Krankenhaus)

MRM Multiple Reaction Monitoring

(Detektionsmodus im Massenspektrometer)

MS Massenspektrometer

MTH Milde Therapeutische Hypothermie

NNT Number Needed to Treat

NP-HPLC Normalphasen HPLC (s. auch HPLC)

NSE Neuronen Spezifische Enolase

Out-of-hospital cardiac arrest

OHCA (Kreislaufstillstand außerhalb des Krankenhau-

ses erlitten)

PCI Perkutane Koronarintervention

PEA Pulslose Elektrische Aktivität

PLCHO Plasmacholin

ROC Receiver Operating Characteristic

(Grenzwertoptimierungskurve)

ROSC Return Of Spontaneous Circulation

(Wiedererlangen eines spontanen Kreislaufs)

RP-HPLC RP-HPLC

(Umkehrphasen HPLC)

RTW Rettungstransportwagen

SAB Subarachnoidal Blutung

SEP Somatosensibel Evozierte Potentiale

VT Ventrikuläre Tachykardie

ZNS Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Herz-Kreislauferkrankungen stellen mit 41,1% die häufigste Todesursache in Deutschland dar. Im Jahr 2010 sind laut statistischem Bundesamt in der Bundesrepublik Deutschland 352.689 Menschen an den Folgen einer Herz-Kreislauf-Erkrankung verstorben [1]. Ungefähr 60% dieser Todesfälle sind auf einen plötzlichen Herztod zurückzuführen, welcher deshalb als eine der Haupttodesursachen in Deutschland angesehen werden kann [2].

Obwohl mittlerweile Datenbanken zur Registrierung der Reanimationen eingeführt wurden, liegen noch keine exakten Zahlen vor. In unterschiedlichen Quellen wird von circa 375.000 - 500.000 Reanimationsbemühungen pro Jahr in den USA und etwa der gleichen Anzahl in Europa ausgegangen [2-4]. Die therapeutischen Möglichkeiten sind nach wie vor limitiert, wie die folgenden Zahlen verdeutlichen: In circa 30-50% der Reanimationsversuche gelingt die Wiederherstellung eines spontanen Kreislaufs [3, 5, 6]. Das bedeutet, dass sie per definitionem primär erfolgreich sind. Lediglich zwischen 7-14% aller Patienten mit erlittenem Herz-Kreislaufstillstand können aus dem Krankenhaus entlassen werden [3, 6, 7]. Diese Diskrepanz lässt sich unter anderem durch eine hohe Mortalität infolge des neurologischen Schadens erklären, welcher sich im Verlauf nach einem Herz-Kreislaufstillstand ausbilden kann [8].

Die hohe Inzidenz mit, nach wie vor, limitierten Erfolgsraten sowohl in der Erstversorgung als auch im Verlauf der Behandlung und die häufig langfristig benötigte Betreuung bei neurologischen Defiziten machen den Herz-Kreislaufstillstand zu einem bedeutenden Problem in der Notfallmedizin. Nachfolgend werden die Ursachen, die Diagnostik sowie die therapeutischen Möglichkeiten bei einem Herz-Kreislaufstillstand dargestellt. Besonders eingegangen wird hierbei auf die Möglichkeiten zur Prognose und Beeinflusung des neurologischen Ergebnisses. Das neurologische Ergebnis bezeichnet dabei den neurologischen, aber auch den daraus resultierenden allgemeinen Zustand des Patienten am Entlassungstag aus dem Krankenhaus.

1.1 Der Herz-Kreislaufstillstand

Der Herz-Kreislaufstillstand ist durch eine unterbrochene Pumpleistung des Herzens gekennzeichnet, die in einem Stillstand des Blutkreislaufs mündet und dadurch eine globale Ischämie bedingt. Das Gehirn reagiert besonders empfindlich auf Sauerstoff-

und Energiemangel. Daher verlieren die Patienten innerhalb einiger Sekunden das Bewusstsein und der Sauerstoffgehalt im Gewebe sinkt [9, 10]. Die Energieträger, wie beispielsweise Adenosintriphosphat (ATP), werden verbraucht und anfallende Stoffwechselprodukte akkumulieren in den Zellen [11, 12]. Ab einer Dauer von etwa zwei Minuten setzt die neuronale Degeneration ein. Hierbei spielen sowohl Nekrose, als auch Apoptose eine Rolle [13]. Diese Mechanismen sind die hauptsächlichen Faktoren, die bei vielen Patienten einen hypoxischen Hirnschaden verursachen, der sich klinisch sehr variabel darstellen kann.

1.1.1 Ursachen des Herz-Kreislaufstillstands

Dem Kreislaufstillstand liegt in 55-80% der Fälle eine kardiale Ätiologie zu Grunde [7, 14]. Die meisten dieser Patienten erleiden einen akuten Myokardinfarkt mit Kammerflimmern auf dem Boden einer koronaren Herzerkrankung (KHK). Dieser Vorgang wird umgangssprachlich als "plötzlicher Herztod" bezeichnet. Für die Entwicklung einer KHK sind atherosklerotische Veränderungen an den Herzkranzgefäßen verantwortlich. Sie werden durch kardiale Risikofaktoren begünstigt. Dazu gehören der arterielle Hypertonus, die Hypercholesterinämie, die Adipositas, der Diabetes mellitus, der Nikotinabusus, der Bewegungsmangel und die genetische Disposition.

Etwa 13% der Kreislaufstillstände sind durch eine Lungenarterienembolie bedingt [14]. Eine intrakranielle Blutung (ICB) im Sinne einer Subarachnoidalblutung (SAB) liegt in europäischen Kollektiven selten (nur circa 4 % der Fälle) als primäre Ursache einer Reanimation vor [15].

In der folgenden Tabelle werden weitere mögliche und reversible Ursachen eines Herz-kreislaufstillstands aufgeführt. Sie sollten während der Durchführung von Reanimationsmaßnahmen differentialdiagnostisch bedacht werden, um die Reanimation erfolgreich beenden zu können. Als Gedächtnisstütze existiert dabei im anglo-amerikanischen Sprachraum die "H's and T's" Regel, da die Ursachen jeweils mit einem H oder T beginnen. Der Merkspruch wurde als "4x H's und HITS" an den deutschen Sprachraum angepasst. An diesem Merkspruch orientiert sich auch die tabellarische Darstellung. Die in Tabelle 1 genannten Ursachen liegen häufiger nicht defibrillierbaren Kreislaufstillständen zu Grunde (s. auch Kapitel 1.2.1).

Tabelle 1: "4x H's und HITS"

4x H's	HITS
Hypoxie	Herzbeuteltamponade
Hypovolämie	Intoxikation
Hypo- / Hyperkaliämie / metabolisch	Thromboembolie
Hypothermie	Spannungspneumothorax

1.2 Diagnostik des Herz-Kreislaufstillstands

Die Diagnostik bei einem Kreislaufstillstand besteht aus der initialen Notfalldiagnostik sowie der weiterführenden Diagnostik. Zusätzlich spielen verschiedene diagnostische Verfahren eine Rolle bei der Einschätzung der Prognose des Patienten. Diesem Thema wird ein gesondertes Kapitel gewidmet, da sich hier der Schwerpunkt der Arbeit befindet. Die Darstellung der Diagnostik bezieht sich auf professionelle Ersthelfer. Laien sollten bei bewusstlosen Personen mit fehlender oder abnormaler Atmung ohne weitere Untersuchung mit der Reanimation beginnen [16].

1.2.1 Notfalldiagnostik

Ein Kreislaufstillstand kann klinisch diagnostiziert werden. Die folgenden Angaben beziehen sich auf die aktuellen Leitlinien des "European Resuscitation Council" zur erweiterten kardiopulmonalen Reanimation (CPR / ACLS), welche im Jahr 2010 veröffentlicht wurden und gelten für professionelle Ersthelfer [17]. Bewusstlos wirkende Patienten werden angesprochen und es sollte ein taktiler Reiz, zum Beispiel durch Anfassen an der Schulter, gesetzt werden. Erfolgt keine Reaktion auf diese Stimuli wird ein Schmerzreiz gesetzt. Reagiert der Patient auch nicht auf den Schmerzreiz, ist er als komatös einzustufen. Komatöse Patienten werden entsprechend der ABC Regel weiterversorgt. Die notwendigen Maßnahmen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: ABC Regel

Buchstabe	Bedeutung	Übersetzung / Untersuchung
Α	Airways	Atemwege freimachen, Inspektion des Oropharynx
В	Breathing	Überprüfung der Atmung bei freigemachten Atemwegen
С	Circulation	Kreislauf? Tastbarer Puls? Lebenszeichen?

Für die Überprüfung von Atmung und Kreislauf sollten jeweils nicht mehr als zehn Sekunden verwendet werden. Bei bewusstlosen Patienten mit Atemstillstand beziehungsweise mit agonaler Schnappatmung sowie nicht sicher tastbarem Puls ist die Indikation zur Reanimation gegeben und die Herzdruckmassage sollte ohne Zeitverzögerung begonnen werden. Hierzu folgen Angaben in Kapitel 1.3. Zur Einleitung einer etwaigen kausalen Therapie ist als nächstes das Ableiten eines Notfall-Elektrokardiogramms (EKG) zur Rhythmusanalyse indiziert und unabdingbar. Für die Rhythmusanalyse genügt eine einzelne EKG-Ableitung, sodass am besten direkt die Elektroden des Defibrillators dafür verwendet werden. Mit Hilfe der EKG-Ableitung kann festgestellt werden, ob eine Herzrhythmusstörung vorliegt, welche durch Defibrillation terminiert werden kann. Eine Übersicht der möglichen Rhythmen bietet Tabelle 3. Die Patienten können anhand des initialen Rhythmus in zwei Gruppen eingeteilt werden (s. Tabelle 3).

Tabelle 3: EKG Rhythmen im Notfall-EKG

Schockbarer Rhythmus	Nicht-schockbarer Rhythmus
Kammerflimmern (KF)	Asystolie
pulslose Ventrikuläre Tachykardie (VT)	pulslose elektrische Aktivität (PEA)

Patienten mit einem schockbarem Rhythmus haben in der Mehrzahl ein akutes Koronarsyndrom mit nachfolgendem Kammerflimmern oder einer Kammertachykardie. Diesen Patienten kann mit einer Defibrillation geholfen werden. Ergänzend kann eine Rescue-Lyse durchgeführt werden, wenn sich kein stabiler Kreislauf etablieren lässt. Einem nicht-schockbaren Rhythmus liegt häufig eine andere Ursache zugrunde. Diese Patien-

ten sollten daher unter besonderer Berücksichtigung der H's and T's Regel (Kapitel 1.1.1) diagnostiziert werden, um die Reanimation erfolgreich beenden zu können.

1.2.2 Weiterführende Diagnostik

Die weiterführende Diagnostik umfasst, je nach vermuteter Ätiologie unterschiedliche Verfahren. Standardmäßig gehören ein 12-Kanal EKG, eine Laboruntersuchung zur Bestimmung der Herzenzyme (Troponin, CK-MB, Myoglobin) und zum Ausschluss einer Elektrolytentgleisung sowie ein Toxikologie-Screening dazu.

Bei Verdacht auf eine fokale Hirnschädigung (z. Bsp. Subarachnoidalblutung mit nachfolgender Reanimationspflichtigkeit) sollte eine zerebrale Computertomographie durchgeführt werden.

Bei Verdacht auf eine Lungenarterienembolie ist auch hier eine Computertomographie zur Diagnosesicherung indiziert. Jedoch gehören zur Diagnostik bei Verdacht auf eine Lungenarterienembolie zunächst eine transthorakale Echokardiografie zur Evaluation einer akuten Rechtsherzbelastung sowie eine laborchemische Troponinbestimmung.

Liegt eine kardiale Ursache zu Grunde sollte schnellstmöglich eine perkutane Koronarintervention (PCI) zur genaueren Diagnostik und Therapie durchgeführt werden. Eine
transthorakale Echokardiographie ist auch hier sinnvoll. Die Leitlinien empfehlen dem
Notarzt bei Verdacht auf Myokardischämie direkt ein Krankenhaus mit PCI Möglichkeit
anzufahren.

1.3 Therapie des Herz-Kreislaufstillstands

Nach Feststellung des Herz-Kreislaufstillstands erfolgt unmittelbar die Reanimation, wobei schon hier betont werden soll, dass noch weitere Faktoren eine wichtige Rolle im Verlauf der Therapie bei Patienten nach Kreislaufstillstand spielen und die therapeutischen Möglichkeiten mit dem Erreichen eines suffizienten Eigenkreislaufs noch nicht ausgeschöpft sind. Die folgende Grafik ist aus den aktuellen Leitlinien entnommen und zeigt, welches Gesamtkonzept die optimale Therapie des Patienten nach dem heutigen Stand der Wissenschaft darstellt [18].



Abbildung 1: Grafik aus den aktuellen Leitlinien: Überlebenskette bei Patienten mit Kreislaufstillstand – An die Reanimation schließt sich die Postreanimationsphase an, welche in den letzten Jahren erheblich an Bedeutung gewonnen hat [18].

Die wichtigste und initiale Maßnahme bei Patienten mit Kreislaufstillstand ist die Durchführung einer suffizienten kardiopulmonalen Reanimation bis zur Wiederherstellung eines spontanen Kreislaufs (Return Of Spontaneous Circulation - ROSC). Dabei kann zwischen dem Basic Life Support (BLS) und dem Advanced Cardiac Life Support (ACLS) unterschieden werden. Die zeitliche Abfolge wird im Folgenden kurz skizziert.

Der BLS durch Laienhelfer beginnt mit Überprüfung der Vitalzeichen, wie unter 1.2 beschrieben. Den aktuellen Leitlinien nach sollen Laien dabei auf die Überprüfung des Pulses verzichten, da es selbst bei professionellen Helfern zu Fehlern kommt und nur bei regelmäßigem Training eine hohe Sensitivität und Spezifität der Methode erreicht werden kann [19, 20]. Der BLS beinhaltet weiterhin die Herzdruckmassage und die Mund-zu-Mund Beatmung, wobei auf 30 Thorax Kompressionen 2 Beatmungsversuche erfolgen [17].

Nach Eintreffen des Rettungstransportwagens (RTW) übernimmt die Besatzung die Reanimation und führt den BLS weiter durch. Ergänzend verfügt der RTW über einen automatischen externen Defibrillator (AED) mit dem tödliche Herzrhythmusstörungen terminiert werden können. Diese AEDs wurden in den letzten Jahren auch an vielen öffentlichen Orten installiert und sind dort der Allgemeinheit für die Laienreanimation zugänglich.

Erst mit Eintreffen des Notarztes kann dann der ACLS durchgeführt werden. Es erfolgt ein intravasaler oder intraossärer Zugang zur Applikation von Medikamenten sowie in den meisten Fällen die orotracheale Intubation beziehungsweise ein anderes probates Mittel zur Atemwegssicherung. Durch die adäquate Reanimation kann eine Teil-Reperfusion der Organe, insbesondere des Gehirns, erreicht werden und der Sauerstoffgehalt steigt an [10].

Um die CPR möglichst einheitlich und effektiv gestalten zu können, werden seit dem Jahr 2000 unter der Schirmherrschaft des "International Liaison Committee On Resuscitation" (ILCOR) Therapieempfehlungen zur Reanimation veröffentlicht. Die Aktualisierung geschieht fünfjährlich und stellt die Grundlage für die Leitlinien der einzelnen Gesellschaften, wie der "American Heart Association" (AHA) oder dem "European Resuscitation Council" (ERC) dar. Die letzte Aktualisierung ist im Jahr 2010 geschehen. An die erfolgreiche CPR schließt sich die Postreanimationsphase an, in welcher seit 2005 die milde therapeutische Hypothermie (MTH) empfohlen wird. Die MTH ist zurzeit die einzige evidenzbasierte Therapieform in der Postreanimationsphase zur Verbesserung der neurologischen Prognose.

1.3.1 Milde Therapeutische Hypothermie

Die Idee der Hypothermiebehandlung nach Herzkreislaufstillstand ist schon seit Ende der fünfziger Jahre bekannt [21-23]. Peter Safar, der als Vater der modernen CPR gilt, entwickelte sogar schon Anfang der 1960er Jahre ein Konzept bzw. eine erste Leitlinie zur Versorgung von Patienten mit Herzkreislaufstillstand. Darin findet sich bereits der Hinweis zur Einleitung einer Hypothermiebehandlung bei komatösen Überlebenden [24].

Bei der milden therapeutischen Hypothermie (MTH) werden die Patienten für 12-24 Stunden auf 32-34° Celsius gekühlt. Im Jahr 2002 sind zwei Studien erschienen, die zeigen konnten, dass diese Therapie das neurologische Ergebnis verbessert [25, 26]. In der ersten größeren und randomisierten Studie der "Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group" hatten im Median 55% der Patienten in der Hypothermiegruppe ein gutes neurologisches Ergebnis, in der Normothermiegrupppe waren es nur 39% (p=0,0009). Gutes neurologisches Ergebnis war definiert als Kategorie eins oder zwei in der "cerebral performance category scale" (CPC; s. Kap. 1.4). Die Number-Needed-To-Treat (NNT) betrug sechs [25]. Es wurde keine signifikant erhöhte Rate an Komplikationen

oder Infektionen festgestellt, wenngleich Pneumonien in der MTH Gruppe etwas häufiger auftraten. Die MTH ist daher seit 2005 in den Leitlinien empfohlen.

Beide Studien haben sehr selektierte Patientenkollektive betrachtet (ausschließlich Kammerflimmern). Mittlerweile wurde in Anwendungsstudien auch ein Effekt der MTH auf andere initiale Rhythmen nachgewiesen [27]. Seit der letzten Leitlinienaktualisierung ist es daher empfohlen, die MTH auch bei anderen initalen Rhythmen als dem Kammerflimmern in Erwägung zu ziehen. Durch MTH kann nicht nur das neurologische Ergebnis, sondern auch das Langzeitüberleben nach initialem Kammerflimmern verbessert werden [28].

1.3.2 Weitere therapeutische Möglichkeiten in der Postreanimationsphase

Hämodynamische Stabilität ist ein primäres Ziel in der Postreanimationsphase. Weiterhin empfehlen die Leitlinien Normokapnie und Normoglykämie anzustreben. Der CO₂ Partialdruck soll zwischen 35-45 mmHg liegen und Blutzuckerwerte über 180 mg/dL sollen, ebenso wie Hypoglykämien, vermieden werden.[17]. Es ist noch Gegenstand der Forschung, ob bei diesem Patientengut eventuell andere Werte angestrebt werden sollten als bei Gesunden. Weiterhin gilt es zu beachten, dass gemessene Parameter, wie die Blutgase, teilweise temperaturabhängige Werte annehmen und dementsprechend unter Hypothermie temperaturkorrigiert werden sollen, um einer Verfälschung der Werte entgegen zu wirken [29]. Die Temperaturkorrektur wird für Bereiche >30°C in der aktuellen Literatur teilweise noch kontrovers diskutiert. Eine antikonvulsive Therapie ist bei Myoklonien und epileptischen Anfällen indiziert [30]. Die aktuellen Leitlinien empfehlen eine Hyperoxämie zu vermeiden und eine arterielle Sauerstoffsättigung zwischen 94-98% anzustreben, um die übermäßige Bildung von Radikalen und reaktiven Sauerstoffspezies zu minimieren. Es gibt Forschungsansätze die Mikrozirkulation nach Kreislaufstillstand verbessern zu wollen. Dabei stehen die Thrombolyse sowie hypertone, hyperonkotische Infusionen im Fokus. Die Thrombolysetherapie während der Wiederbelebung konnte keinen Benefit zeigen. Die entsprechende TROICA Studie wurde vorzeitig beendet, da sich kein therapeutischer Vorteil zeigte [31]. Eine Thrombolyse ist jedoch weiterhin bei Verdacht auf Lungenarterienembolie oder als ultima ratio bei bislang frustraner Reanimation indiziert.

1.4 Prognose nach Kreislaufstillstand

Wie bereits eingangs erwähnt, sind die Prognose und damit häufig das neurologische Ergebnis nach Kreislaufstillstand schlecht. Nur etwa zehn Prozent aller Patienten, die einen Kreislaufstillstand erleiden, werden aus dem Krankenhaus entlassen (s. Kap. 1). Wie zuvor beschrieben konnte die Prognose, insbesondere der Patienten mit initial schockbarem Rhythmus, durch Einführung der MTH deutlich verbessert werden [28, 32]. Aufgrund eines ansteigenden Anteils an Patienten mit nicht schockbaren Rhythmen ist das Gesamtüberleben noch immer schlecht [32]. Als Mortalitätsfaktoren sind bei der Prognoseeinschätzung neben dem Kreislaufstillstand, die zur Reanimation führende Grunderkrankung als auch andere Begleiterkrankungen zu berücksichtigen. Weiterhin wird die Prognose durch die Umstände des Kreislaufstillstands beeinflusst. Eine Fremdanamnese zur Reanimation ist daher besonders wichtig. Sowohl ein nicht beobachteter Kreislaufstillstand, der häufig mit einem längeren Zeitintervall bis zum Beginn einer effektiven Reanimation einhergeht, als auch eine insgesamt längere Reanimationsdauer bis zur Wiederherstellung eines spontanen Kreislaufs sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert [33]. Zur Kategorisierung des neurologischen Ergebnisses existiert die "Cerebral Performance Category Scale" (CPC), eine Skala zur Einschätzung der neurologischen Schädigung der Patienten [34]. Eine Übersicht bietet Tabelle 4.

Tabelle 4: CPC Skala

СРС	Bezeichnung	Merkmale
1	Gute Funktion	wach, aufmerksam, normale bis geringfügig eingeschränkte Gehirnfunktion, kann arbeiten
2	Leichte Schädigung	wach, kann Aktivitäten des täglichen Lebens alleine bewältigen, kann mit Betreuung arbeiten
3	Schwere Schädigung	wach, Wahrnehmung eingeschränkt, benötigt Hilfe bei den Aktivitäten des täglichen Lebens
4	Koma	keine Kommunikation mit der Umwelt möglich, Koma oder vegetativer Status
5	Tod	Apnoe, Areflexie, Nulllinien-EEG, Hirntod oder Tod

Andere etablierte Mittel zur Prognoseeinschätzung sind die klinische Untersuchung, biochemische Marker und neurologisch-elektrophysiologische Untersuchungen. Bei Patienten mit persistierendem vegetativen Status wird oft ein Punkt in der Therapie erreicht, an dem die Diskussion über die Beendigung lebenserhaltender Maßnahmen sinnvoll sein kann. Dies wird von Angehörigen oftmals befürwortet [35]. Daher ist die Prognoseabschätzung eine diffizile und gleichzeitig sehr wichtige Aufgabe. Laut Prohl et al. ist eine relativ zuverlässige Aussage innerhalb von 3-5 Tagen nach Reanimation möglich [36].

Allerdings ist durch Implementierung der MTH eine Einschätzung der Prognose schwieriger geworden. Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass die an Kollektiven normotherm behandelter Patienten etablierten Prognoseparameter für mit Hypothermie behandelte Patienten nicht in gleicher Weise angewendet werden können [37-40]. Auf diesen Sachverhalt wird auch in den aktuellen Empfehlungen des ILCOR hingewiesen [41]. Im Jahr 2006 wurden von der "American Academy of Neurology" (AAN) Kriterien zur Prädiktion eines schlechten neurologischen Ergebnisses nach Reanimation veröffentlicht [42]. Diese bezogen sich allerdings fast ausschließlich auf Studien an normotherm behandelten Patienten. In den letzten Jahren sind aber zahlreiche Studien erschienen, die zu einer Neubewertung der prognostischen Parameter für Hypothermie-Patienten geführt haben. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse in internationale Leitlinien steht derzeit noch aus. Es hat sich aber gezeigt, dass die Sicherheit, mit der ein schlechtes neurologisches Ergebnis früh vorhergesagt werden kann für Hypothermie-Patienten geringer ist, so dass die Notwendigkeit entstanden ist, zu den bereits vorhandenen zusätzliche prognostische Parameter zu etablieren.

1.4.1 Neurologische Untersuchung zur Prognoseabschätzung

Die neurologische Untersuchung der Hirnstammreflexe und der motorischen Antwort basierend auf der Glasgow Coma Scale (GCS) ist eine einfache und für nicht mit Hypothermie behandelte Patienten weitgehend sichere Methode, um Patienten mit schwerem, postanoxischem Hirnschaden zu identifizieren. Es können der Pupillenreflex, der Kornealreflex, der vestibulookuläre Reflex und der Hustenreflex untersucht werden. Fehlende Hirnstammreflexe am ersten bis dritten Tag nach Reanimation zeigen eine schwere neurologische Schädigung an und sind nicht mit einem guten Ergebnis vereinbar [42]. Die Validität dieses Parameters scheint durch die MTH leicht eingeschränkt zu

werden. Bei einer Testung drei Tage nach Reanimation liegt die falsch-positiv Rate in den meisten Studien noch immer bei null Prozent [43, 44]. Es existieren jedoch auch Beschreibungen, dass Patienten mit fehlenden Hirnstammreflexen eine gute neurologische Erholung zeigten [40]. Das Gleiche gilt auch für einen myoklonischen Status epilepticus, für den ebenfalls Berichte über falsch-positive Testergebnisse vorliegen [45]. Auch hier sind die initialen Studien an normothermen Patienten durchgeführt worden und untersuchten einen myoklonischen Status innerhalb der ersten 24 Stunden nach Reanimation [46]. Weiterhin ist eine motorische Antwort auf Schmerzreiz am dritten Tag, die nicht besser als ein Strecksynergismus ist (motorischer Teil der GCS ≤ 2; M2), mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet. Die Zuverlässigkeit dieses Parameters ist seit Einführung der MTH eingeschränkt. In mehreren Untersuchungen kam es zur Erholung der Patienten trotz fehlender adäquater motorischer Reaktion [40, 43, 44]. Es konnte gezeigt werden, dass eine GCS > 4 am ersten Tag nach Beendigung der Sedierung und eine GCS > 6 an den drei folgenden Tagen mit einem guten neurologischen Ergebnis vergesellschaftet sind (CPC 1 oder 2) [47]. Die Befunderhebung ist seit Einführung der MTH auch deshalb erschwert, weil die MTH eine Analgosedierung der Patienten notwendig macht. Alle Untersuchungen sollten durch einen erfahrenen Neurologen durchgeführt werden und eine genauere Aussage lässt sich erst nach Beendigung der Sedierung und einer Körpertemperatur >35°C treffen. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sollten Therapieentscheidungen nur in der Zusammenschau mehrere Untersuchungsmöglichkeiten getroffen werden und nicht ausschließlich auf der Basis einer neurologischen körperlichen Untersuchung gefällt werden.

1.4.2 Somatosensibel evozierte Potentiale zur Prognoseabschätzung

Somatosensibel evozierte Potentiale (SEP) des Nervus medianus können eingesetzt werden, um Patienten mit schlechter Prognose zu identifizieren. Das beidseitige Fehlen der N20 Antwort gilt als sicheres Zeichen einer schlechten Prognose und ist unabhängig von der Sedierungstiefe. Eine entsprechende Studie konnte keine falsch-positiven Ergebnisse feststellen, was für eine hohe Sensitivität der Methode spricht [48]. Die somatosensibel evozierten Potentiale werden durch Medikamente und metabolische Störungen weniger beeinflusst als das Elektroencephalogramm (EEG) [42]. Allerdings gibt es seit Einführung der MTH einzelne Fälle behandelter Patienten, die sich trotz beidseits fehlender N20 Antwort gut erholten [38].

1.4.3 Biochemische Marker zur Prognoseabschätzung

Die wichtigsten prognostischen Marker sind die neuronenspezifische Enolase (NSE) sowie das Protein S-100B. Die NSE ist ein organspezifisches Isomer der Enolase und kommt in Neuronen und neuroektodermalen Zellen vor. Beim Zelluntergang und den daraus resultierenden Membranschäden wird die NSE in Blut und Liquor freigesetzt und ist dort messbar. Bisher gilt ein Wert > 33 µg/L am dritten Tag als Zeichen einer ungünstigen Prognose [48]. Aktuelle Studien zeigen auch hier eine Beeinflussung der Cut-off-Werte durch die MTH. So werden allgemein niedrigere NSE Konzentrationen unter MTH beobachtet. Mit Hypothermie behandelte Patienten können jedoch auch mit einem höheren Messwert, als dem bisherigen Cut-off von 33 µg/L, die Kategorie eins oder zwei in der CPC erreichen. In einer Untersuchung lagen die Cut-off-Werte, die ein schlechtes, neurologisches Ergebnis (CPC 3-5) mit einer Sensitivität von 100% vorhersagen, in der MTH Gruppe bei 78,9 µg/L und in der Normothermie-Gruppe bei 26,9 µg/L [39]. Dies ist eine eindeutige Abweichung von dem in den Leitlinien zur Prognosestellung nach globaler Hypoxie beschriebenen Cut-off Wert von 33 µg/L der AAN und verdeutlicht die Schwierigkeit der differenzierten Prognosestellung in dieser Patientengruppe durch Einführung der milden therapeutischen Hypothermie, da die Grenzwerte der AAN an Patienten ohne Hypothermiebehandlung ermittelt wurden.

Das Protein S-100B ist ein Isomer aus einer Enzymfamilie Calcium-bindender Proteine und kommt überwiegend in Gliazellen vor. Auch hier wird es nach Membranschäden in hypoxischen Zellen ins Blut freigesetzt. Allerdings ist die Spezifität nicht so hoch, wie bei der NSE. Eine Studie konnte zeigen, dass Protein S-100B auch bei Marathonläufern freigesetzt wird, obwohl kein Hirnschaden vorliegt [49]. In einer anderen Untersuchung fanden sich ebenfalls fünf Prozent falsch-positive Ergebnisse [48]. Das Protein S-100B und die NSE werden auch von Tumoren produziert und sogar als Tumormarker eingesetzt. Bei einem vorliegenden Tumor kann es zu falsch-positiven Ergebnissen kommen. Die Interpretation der Werte muss daher mit Vorsicht erfolgen. Falsch-positive Ergebnisse können außerdem bei einer fokalen Hirnschädigung auftreten.

Andere biochemische Marker sind das zerebrale Isoenzym der Creatinkinase "CK-BB" oder Neurofilamente. Die Marker können auch im Liquor bestimmt werden. Es liegen noch keine ausreichenden Daten vor, um diese Marker im Hinblick auf die Prognosestellung nach Reanimation hinreichend zu bewerten.

1.5 Cholin

Cholin ist eine quartäre Ammoniumverbindung. Es wurde 1849 erstmalig durch Adolph von Strecker in Schweingalle isoliert und von selbigem im Jahr 1862 benannt [50, 51]. Aufgrund seines Auftauchens in der Galle erhielt es den Namen Cholin (von griechisch $\chi o \lambda \dot{\eta} = chol\acute{e} = Galle$). Heutzutage ist bekannt, dass Cholin in allen Geweben des Menschen vorkommt und dort einen wichtigen Baustein für die korrekte Funktion und Kommunikation der Zellen darstellt. Es ist ein essentieller Nahrungsbestandteil, wie im folgenden Abschnitt erläutert wird [52]. Zellkulturen deren Kulturmedium kein Cholin enthält, werden apoptotisch [53]. Die größte Menge Cholin ist im Körper als Bestandteil von Phospholipiden in den Zellmembranen gebunden und für die Stabilität der Zellen, die Zellteilung und den Zellumsatz essentiell.

Ein gewichtsmäßig geringerer, von der Bedeutung jedoch genauso wichtiger Teil ist an der Bildung des Neurotransmitters Acetylcholin und anderer Botenstoffe des Köpers beteiligt. Cholin spielt eine Rolle bei der Entwicklung und Instandhaltung des zentralen Nervensystems und der Gedächtnisleistung. Die genauen Mechanismen sind bislang noch unbekannt. Buchman et al. konnten zeigen, dass die Gedächtnisleistung von Patienten mit totaler parenteraler Ernährung unter Zusatz von Cholin verbessert werden kann [54]. In Tierexperimenten an Nagern führte eine erhöhte Cholinzufuhr in der Perinatalperiode zu langfristig verbesserter Gedächtnisleistung und Hippocampusveränderungen [55-58]. Einen Überblick über einige wichtige Strukturformeln von cholinhaltigen Molekülen bietet Tabelle 5. In den nachfolgenden Kapiteln wird näher auf den Cholinmetabolismus eingegangen.

Tabelle 5: Cholin und für dessen Metabolismus wichtige Moleküle

Name	Strukturformel	Funktion /Beispiel
Cholin	H_3C OH H_3C OH	Bestandteil aller Zellen in gebunde- ner Form

Betaine	H ₃ C CH ₃ O H ₃ C C O H ₃ C C O	Abbauprodukt, Methylgruppen Donor
Acetylcholin	CH ₃ O CH ₃	Neurotransmitter
Phosphatidylcholin	CH ₃ H ₃ C -N - CH ₃	Bestandteil von Zellmembranen
Sphingomyelin	OH O	Bestandteil von Zellmembranen
Lysophophatidylcholin	O O OH O	Second messenger, moduliert Protein- kinase C Aktivität
Phosphatidyletha- nolamin	NH ₃ ⁺	Edukt der Cholin de novo Synthese

1.5.1 Cholinzufuhr

Cholin kommt in fast allen Speisetieren sowie in vielen Pflanzen vor. Besonders viel Cholin ist in Hühnereiern enthalten. Es ist davon auszugehen, dass Cholin bei einer ausgewogenen Diät in ausreichender Menge zugeführt wird; meist in Form des Phosphatidylcholins. In einer Studie kam es selbst nach einer Woche fasten nicht zu einem schädlichen Abfall der Plasmacholinkonzentration [59].

Außerdem kann Cholin vom Körper "de novo" synthetisiert werden. Der Mechanismus wird weiter unten beschrieben. Erst bei längerer Fehlernährung kommt es zu Mangelerscheinungen. Daher ist die Aufnahme mit der Nahrung auf Dauer unverzichtbar. Es konnte in Studien gezeigt werden, dass die Syntheseleistung längerfristig nicht ausreicht, um Schäden am Organismus zu verhindern. Wird die Cholinzufuhr mit der Nahrung unter Studienbedingungen über mehrere Wochen kontrolliert unterbrochen, entwickeln die Probanden Leberzellschäden im Sinne einer Erhöhung der Serum Alaninaminotransferase (ALAT) sowie Dichteveränderungen der Leber in der Computertomografie [60, 61]. In Tierexperimenten an Nagern kam es außerdem zu Entwicklungsverzögerungen, Blutungen und Gedächtnisstörungen, wie ein Review von Steven Zeisel zusammenfasst [62].

Besonders wichtig ist eine ausreichende Cholinzufuhr während der Schwangerschaft und Stillzeit. Zum einen benötigt der heranwachsende Organismus viel Cholin für die Membransynthese der neugebildeten Zellen [63]. Zum anderen scheint Cholin eine noch nicht verstandene aber durchaus relevante Rolle in der Entwicklung des zentralen Nervensystems zu spielen (s. auch Kapitel 1.5). Patientinnen mit hoher Cholinzufuhr während der Schwangerschaft brachten in einer Studie seltener Kinder mit Neuralrohrdefekten zur Welt als solche mit geringer Cholinaufnahme [64].

1.5.2 Cholinmetabolismus

Die Resorption des freien Cholins findet hauptsächlich im Jejunum statt. Eine entsprechende Untersuchung konnte zeigen, dass hierbei sowohl Carriersysteme, als auch Diffusion entlang des Konzentrationsgradienten über die Darmwand eine Rolle spielen [65]. Phosphatidylcholin wird im Darmlumen mit Hilfe von Phospholipasen gespalten und dann resorbiert [66].

Die "de novo" Synthese von Cholin funktioniert über die Methylierung von Phosphatidylethanolamin durch die Phosphatidylethanolamin-N-Methyltransferase. Die Methylgruppen stammen hierbei von S-Adenosylmethionin, welches unter Abgabe einer Methylgruppe zu Homocystein und Adenosin hydrolysiert wird. Die entsprechenden Strukturformeln sind in Tabelle 5 zu finden.

Cholin wird hauptsächlich über drei Stoffwechselwege metabolisiert [67]. Diese werden im folgenden Abschnitt kurz erläutert.

- Cholin reagiert unter Katalyse der Cholin-Acetyltransferase mit Acetyl-CoenzymA zu Acetylcholin. Acetylcholin ist als Neurotransmitter bekannt und kann mit Hilfe der Cholinesterase wieder in Cholin und Acetat gespalten werden.
- 2. Cholin reagiert unter Katalyse der Cholinkinase mit ATP zu Phosphorylcholin und Adenosindiphosphat (ADP). Phosphorylcholin ist ein energiereiches Molekül und stellt ein Edukt für die Bildung von cholinhaltigen Phospholipiden dar. Cholin kann aus den Phospholipiden durch Phospholipasen wieder freigesetzt werden. Hierzu folgt ein gesonderter Abschnitt.
- 3. Cholin reagiert unter Katalyse der Cholinoxidase direkt zu Betain oder über einen Zwischenschritt, katalysiert durch die Cholindehydrogenase, zu Betainaldehyd. Die Reaktion zu Betain stellt den Hauptabbauweg von Cholin dar [67].

Die Beeinflussung der Blutkonzentration von Cholin erfolgt hauptsächlich über den Abbau zu Betain und die Aufnahme in Zielorgane. In der Studie von Roivainen et al. an radioaktiv markiertem ¹¹C-Cholin zeigte sich eine Halbwertszeit von zehn Minuten [67]. Betain stellt einen Methylgruppendonator im Stoffwechsel dar. Es ist beispielsweise an der Methylierung von Homocystein zu Methionin beteiligt.

1.5.3 Cholinfreisetzung aus der Zellmembran

Cholin ist in den Zellmembranen in Form von Phospholipiden gespeichert. Die Freisetzung geschieht enzymatisch im Sinne einer Hydrolyse der Membranlipide durch Phospholipasen. Im menschlichen Organismus existieren vier verschiedene Hauptgruppen der Phospholipasen, die teilweise noch in mehrere Subklassen aufgeteilt werden können. Die Bezeichnung der Phospholipasen wird über den Ort der enzymatischen Spaltung definiert und ist in Abbildung 2 dargestellt. Die Grafik zeigt weiterhin, dass Cholin nur durch die Phospholipase D direkt freigesetzt werden kann. Eine vermehrte Aktivierung der Phospholipase D durch Thrombin oder Kollagen spielt eine wichtige Rolle für erhöhte Cholinkonzentrationen im Rahmen des akuten Koronarsyndroms bei der Plaqueaktivierung und der Thrombusformation [68].

Für die Cholinfreisetzung aus hypoxischen Neuronen scheint jedoch eine andere Phospholipase vorrangig von Bedeutung zu sein. Sie geschieht hauptsächlich durch die Phospholipase A2 und über ein cholinhaltiges Zwischenprodukt, dem Lysophosphatidylcholin, wie es in mehreren Studien gezeigt werden konnte [69, 70]. Die Phospholipase A2 existiert in einer Calcium-abhängigen und einer Calcium-unabhängigen Form. Der Cholinanstieg konnte in den Studien sowohl durch eine niedrige Calciumkonzentration in der Perfusionslösung, als auch durch einen Inhibitor der Phospholipase A2 verhindert werden. Daraus wurde geschlossen, dass die Calcium-abhängige Form der Phospholipase A2 hauptsächlich für den Anstieg der Cholinkonzentration nach Hypoxie verantwortlich ist. Unter Hypoxie steht intrazellulär vermehrt Calcium zur Verfügung und kann so die betroffene Phospholipase aktivieren. Die Aktivität der Phospholipase D blieb in den vorgenannten Studien unter Hypoxie unverändert.

Das hohe Konzentrationsgefälle zwischen der extrazellulären und der intrazellulären Calciumkonzentration bedingt einen Calciumeinstrom durch Membranschäden in hypoxischen Neuronen. Dies führt zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden (darunter auch Apoptosekaskaden) und durch die mit dem Einstrom verbundene Depolarisation der Zelle zur Öffnung weiterer Calciumkanäle, die ein Fortbestehen des Calciumeinstroms unterhalten. Außerdem findet Calcium-abhängig eine vermehrte Transmitterausschüttung statt, wodurch es zur Überaktivierung verschiedener Rezeptortypen im Gehirn und zur Öffnung weiterer rezeptorabhängiger Calciumkanäle kommt. Der so

entstehende Circulus vitiosus führt zu andauerndem Calciumeinstrom und spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Zellschäden.

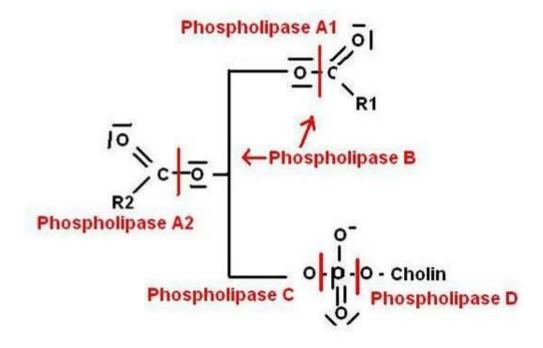


Abbildung 2: Spaltort der verschiedenen Phospholipasen

1.5.4 Normwerte für Plasmacholin

Es gibt mehrere Studien, die die Plasmacholinkonzentration an gesunden Probanden untersucht haben. Die größte Studie von Konstantinova et al. hat mehr als 7.000 Probanden eingeschlossen [71]. Der Mittelwert lag bei 9,9 μmol/L mit einer Standardabweichung von 2,3 μmol/L. Ältere Studienteilnehmer zeichneten sich durch tendenziell höhere Plasmakonzentrationen aus (Mittelwert etwa 1 μmol/L höher).

Auch eine Untersuchung von Savendahl et al. zeigte ähnliche Werte. Er ließ eine sehr kleine Studienpopulation (n=10) eine Woche lang fasten und erhob dann erneut die Plasmacholinkonzentration [59]. In seiner Untersuchung lag die durchschnittliche Konzentration vor Intervention bei 9,5 \pm 0,5 μ mol/L (Mittelwert und Standardabweichung). Nach einer Woche Fasten sanken die Werte auf 7,8 \pm 0,3 μ mol/L (Mittelwert und Standardabweichung).

Die Werte steigen während der Schwangerschaft im Blut der Mutter an und auch neugeborene Säuglinge haben eine etwa vierfach höhere Plasmacholinkonzentration als gesunde Erwachsene [72, 73]. Das in unserer Studie mit der Bestimmung der Cholinkonzentrationen beauftragte Labor (bevital, Bergen, Norwegen) gibt einen Referenzbereich von 8 (5 - 12) μmol/L im EDTA-Plasma an (Median und 5. bzw. 95. Perzentile) [74].

1.5.5 Cholin als möglicher zerebraler Biomarker nach Reanimation

Cholin ist als Marker zur Risikostratifizierung beim akuten Koronarsyndrom in der Literatur bekannt. Es liegen mehrere Untersuchungen vor, die zeigen konnten, dass von der Norm abweichende Cholinwerte Auskunft über eine Plaqueinstabilität, Thrombusformation und Ischämien geben können [75-78]. Dabei konnte gezeigt werden, dass Cholin besonders zur Unterscheidung von Hochrisiko- und Niedrigrisiko-Patienten beitragen kann [75].

Des Weiteren ist Cholin in tierexperimentellen Studien als Hypoxiemarker untersucht worden [69, 70, 79]. In den Studien konnte gezeigt werden, dass Cholin unter Hypoxie in beträchtlichen, messbaren Mengen freigesetzt wird, wahrscheinlich aufgrund der Degradation von Zellmembranen. Phosphatidylcholin stellt mit einem Anteil von 40% das häufigste Phospholipid in Zellmembranen dar [80]. Beim Abbau von Phosphatidylcholin wird Cholin über einen Zwischenschritt aus Glycerophosphocholin freigesetzt. Nebenbei akkumulieren auch freie Fettsäuren als Abbauprodukt der Membranphospholipide [81, 82]. Die Menge an freigesetztem Cholin ist proportional zum Membranzerfall und stellt somit einen Marker dar, um den Zelluntergang nach Hypoxie zu quantifizieren.

Neben Sauerstoffmangel wird Cholin auch bei Energieträgermangel vermehrt freigesetzt. Eine Studie zeigte eine erhöhte Cholinfreisetzung aus dem Rattenhirn bei niedriger ATP Konzentration im Gehirn [83]. Die Freisetzung war in der gleichen Studie temperaturabhängig und hatte ihr Maximum bei 37°C, was die Annahme einer enzymatischen Freisetzung des Cholins unterstützt.

Das Gehirn scheint stetig Cholin freizusetzen. Es besteht bereits vor experimentell induzierter Hypoxie/Ischämie eine negative arteriovenöse Differenz der Cholinkonzentration im Gehirn. Diese vergrößert sich unter Sauerstoffmangel [70, 84].

2 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es erstmalig den zeitlichen Verlauf der Cholinkonzentration im Plasma (Plasmacholin, plasma choline, PLCHO) bei Patienten nach erfolgreicher kardiopulmonaler Reanimation unter Berücksichtigung der milden therapeutischen Hypothermie zu untersuchen.

Dabei sollte untersucht werden,

- ob es eine Kinetik des Cholins unter besonderer Berücksichtigung der milden therapeutischen Hypothermie gibt.
- ob die gemessenen Cholinkonzentrationen das neurologische Ergebnis der Patienten vorhersagen können.
- ob die Cholinkonzentration im Referenzbereich Erwachsener liegt oder sich durch die Hypoxie Abweichungen ergeben.

3 Methoden

3.1 Studienprotokoll

Das Studienprotokoll wurde bei der zuständigen Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin vor Beginn der Studie vorgestellt und durch diese genehmigt. Es beinhaltet die angestrebte Studienpopulation, Ein- und Ausschlusskriterien, die Abnahmezeitpunkte der Proben, die Probengewinnung sowie die Probenverarbeitung. Der Entwurf des Studiendesigns sowie die Erstellung des Studienprotokolls und des Ethikantrages waren bereits Teil der Dissertationsarbeit.

3.1.1 Studienpopulation

Im Zeitraum Juni 2010 bis Mai 2011 wurden insgesamt 26 Patienten in die Studie eingeschlossen. Alle Studienpatienten wurden komatös bei Zustand nach Herz-Kreislaufstillstand und erfolgreicher Reanimation auf einer der beiden internistischen Intensivstationen der Charité am Campus Virchow Klinikum aufgenommen und dort über den gesamten Zeitraum behandelt. Alle Patienten erhielten milde therapeutische Hypothermie mit dem Ziel einer Verbesserung des neurologischen Ergebnisses ohne Berücksichtigung des initialen Rhythmus'. Die Behandlung erfolgte bei allen Patienten nach einem standardisierten Hypothermieprotokoll, welches den aktuellen Empfehlungen der Fachgesellschaften entspricht. Während des Aufenthalts wurden regelmäßig Blutentnahmen, entsprechend des Studienprotokolls, durchgeführt.

Einschlusskriterien waren Alter > 18 Jahre, das primär erfolgreiche Überleben eines Herz-Kreislaufstillstands durch kardiopulmonale Reanimation sowie die Behandlung mit milder therapeutischer Hypothermie.

Ausschlusskriterien waren eine im Aufnahmelabor diagnostizierte oder vorbekannte Anämie mit einem Hämoglobingehalt unter 10 g/dL, eine aktive Blutung sowie das Ablehnen einer Studienteilnahme.

Im Untersuchungszeitraum wurden alle Patienten, die den vorgenannten Kriterien entsprachen, in die Studie eingeschlossen. Das Einverständnis zur Studie wurde, entsprechend den Vorgaben der lokalen Ethikkommission der Charité, entweder nach Wiedererlangung ausreichender kognitiver Funktionen und detaillierter Aufklärung über die Studie durch den Patienten selbst erteilt oder in den meisten Fällen von einem gesetzlich bestellten Betreuer unterzeichnet. Im Fall einer Verweigerung der Studienteilnahme wurden die gewonnenen Proben verworfen und nicht für die Analyse verwendet.

3.1.2 Einschluss der Studienpatienten

Die Studienpatienten wurden nach Voranmeldung durch den Notarzt bzw. das hausinterne Reanimationsteam direkt auf die Intensivstation aufgenommen. Dort erfolgte die intensivmedizinische Erstversorgung. Nach Etablierung eines zentralvenösen Zugangs, eines arteriellen Zugangs sowie kontinuierlicher Monitorüberwachung fand zusätzlich zum Aufnahmelabor die Abnahme einer Blutprobe für die Bestimmung der Plasmacholinkonzentration statt. Die weitere Therapie erfolgte entsprechend des klinikinternen Hypothermieprotokolls in Übereinstimmung mit den aktuellen Leitlinien. Alle Therapieentscheidungen wurden ohne Kenntnis der Cholinkonzentration im Blutplasma getroffen.

3.1.3 Selektion der Studienpatienten und Bildung der Untergruppen

In die Studie wurden initial 26 Patienten eingeschlossen. Bei sechs dieser Patienten war eine ausreichende Probensammlung aufgrund von dringend notwendigen, unaufschiebbaren Eingriffen oder Untersuchungen, wie Herzkatheter und Computertomografie oder aber frühzeitigem Exitus der Patienten nicht möglich. Die Auswertung beschränkt sich daher auf 20 Patienten von denen mindestens 10 Blutentnahmen zu den Zeitpunkten des Studienprotokolls vorliegen. Die 20 ausgewählten Studienteilnehmer wurden daraufhin in zwei Gruppen eingeteilt. Als Selektionsparameter wurde dabei das neurologische Ergebnis, gemessen an der CPC, genutzt. Patienten mit einem CPC Wert von 1 oder 2 wurden dabei als gutes neurologisches Ergebnis bewertet und bilden die Gruppe 1. Alle Patienten mit einem CPC Wert zwischen 3 und 5 wurden als schlechtes neurologisches Ergebnis definiert und bilden somit Gruppe 2. Die vorgenommene Einteilung entspricht der gängigen Praxis bei der Analyse reanimierter Patienten.

3.1.4 Probengewinnung

Entsprechend des Studienprotokolls wurden je Patient insgesamt 16 Blutentnahmen durchgeführt, um die Konzentration von Cholin im Plasma über den zeitlichen Verlauf einer Woche darzustellen. Die erste Probe wurde nach Aufnahme und Erstversorgung des Patienten abgenommen. Die restlichen Abnahmen erfolgten gemäß den im Studienprotokoll definierten Zeitpunkten über einen bereits liegenden, intravasalen Katheter. Das Studienprotokoll ist in Abbildung 3 dargestellt. Es existieren keine Voruntersuchun-

gen zur seriellen Cholinmessung nach Reanimation, sodass keine Aussage bezüglich möglicher Konzentrationsschwankungen in der unmittelbaren Folge zum Ereignis getroffen werden konnte. Da in verschiedenen Publikationen eine kurze Halbwertszeit des Markers von nur 10 Minuten nachgewiesen werden konnte und der initiale Maximalwert erfasst werden sollte, wurden die ersten sechs Proben jeweils in einem kurzen Abstand von 30 Min akquiriert [67]. Die Abstände wurden fortlaufend vergrößert und nach den ersten 24 Stunden erfolgte die Blutentnahme einmal täglich.

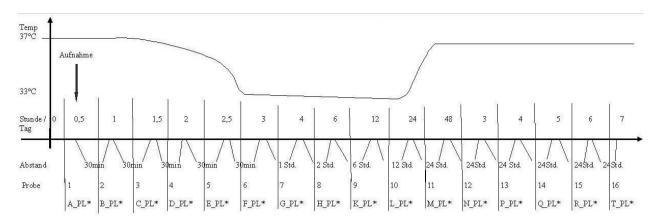


Abbildung 3: Studienprotokoll mit Darstellung der Abnahmezeitpunkte nach Aufnahme. Aufgrund der unterschiedlichen Intervalle zwischen den Abnahmen ist die Temperaturkurve gestaucht beziehungsweise gestreckt

Zur Probensammlung wurden mit Ethylendiamintetraacetat (EDTA) beschichtete Spezialröhrchen der Firma BectonDickinson, New Jersey, USA (BD Vacutainer® PPT™) verwendet. Ein Röhrchen entspricht einem Volumen von 8,5 ml. Die verwendeten Spezialröhrchen enthalten ein Gelkissen, welches beim Zentrifugieren der Probe aufsteigt und so eine sichere und irreversible Auftrennung von Plasma und zellulären Blutbestandteilen erlaubt. Alle Proben wurden direkt nach Abnahme auf der Intensivstation bei 2.016 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Sofort nach dem Zentrifugieren wurden die Proben bei -80°C eingefroren und gelagert. Da alle benötigten Geräte im Labor der Intensivstation vorhanden sind, war eine schnelle Verarbeitung der Proben möglich und garantiert. Diese Vorgehensweise liefert die größtmögliche Probenstabilität und verhindert die Verfälschung der Werte durch nachträgliche Freisetzung ins Plasma. Bei der Cholinbestimmung im EDTA-Plasma findet laut Yue et al. eine nachträgliche Freisetzung noch für circa 60 Minuten nach Abnahme statt [85]. In einer anderen Studie blieb die Konzentration im EDTA-Plasma über 72 Stunden stabil [86].

3.1.5 Probenverarbeitung

Zur Vorbereitung der Blutproben für die Plasmacholin-Analysen wurden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Homogenisierung der Proben erfolgte durch den Einsatz eines Schüttelgeräts. Anschließend wurde jede Plasmaprobe in zwei Kryotubes aufgeteilt (Nunc CryoTubes™, Nunc GmbH, Langenselbold). Eine Probe diente dabei als Messprobe und die andere Probe wurde als Rückstellprobe eingelagert. Sofort nach Verarbeitung wurden beide Kryotubes wieder bei -80°C eingefroren und gelagert. Der Transport ins Labor zur Messung der Proben erfolgte auf Trockeneis. Die Temperatur wurde dabei kontinuierlich überwacht. Die Kühlkette war zu keinem Zeitpunkt unterbrochen und es traten keine Unregelmäßigkeiten im Sinne von Temperaturschwankungen auf.

3.2 Analyseverfahren zur Cholinbestimmung

In der Literatur sind verschiedene Messverfahren zur Bestimmung der Cholinkonzentration im Blut beschrieben. In den meisten beschriebenen Verfahren erfolgt nach Auftrennung des Stoffgemischs die Detektion. Im Fall des Cholins ist es jedoch auch möglich eine enzymatische Reaktion zur Quantifizierung des Cholingehalts in der Probe zu nutzen. Die erste enzymatische Methode datiert aus dem Jahr 1975. Cholin wurde unter Katalyse der Cholinkinase phosphoryliert. Das Phosphorylcholin konnte mittels Ionen-Austausch-Chromatographie quantifiziert werden [87]. Eine neuere enzymatische Methode basiert auf der Reaktion des Cholins mit der Cholinoxidase. Das entstehende Peroxid reagiert weiter, wobei es zur Emission von Licht kommt. Die Quantifizierung erfolgt dann photometrisch [88]. In der Analyse komplexer Gemische wie Blut kann es zu Kreuzreaktionen der Enzyme kommen, welche zu Messfehlern führen können. In dieser Untersuchung wurde daher die Normalphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (NP-HPLC) in Kopplung mit einem Massenspektrometer (MS) benutzt. Dieses kostenintensive und maschinell aufwendige Verfahren zeichnet sich durch eine sehr hohe Genauigkeit aus. Die zu analysierenden Substanzen werden durch die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) nach ihren chemischen Eigenschaften aufgetrennt und anschließend im Massenspektrometer identifiziert, beziehungsweise im Falle der Cholinbestimmung quantifiziert. Die Auftrennung der Proben zur Cholinbestimmung ist erforderlich, da es im Massenspektrometer zu Querstörungen mit anderen Bestandteilen der Probe kommen kann. Für viele andere Fragestellungen ist diese Auf-

trennung verzichtbar und die Proben können direkt im Massenspektrometer analysiert werden. Um die Vorteile beider Verfahren nutzen zu können, ist die Kopplung der HPLC mit dem MS obligat. Hierzu wurde die Elektrospray-Ionisation (ESI) verwendet. Das Trenn- und Messverfahren wird in den folgenden Abschnitten genauer erläutert.

3.2.1 HPLC

Die HPLC ist ein chromatographisches Trennverfahren. Chromatographische Trennverfahren bestehen aus einer stationären und einer mobilen Phase. Die Bestandteile des zu untersuchenden Stoffgemischs wandern aufgrund von Wechselwirkungen mit den beiden Phasen unterschiedlich schnell durch die Trennsäule und werden dabei aufgetrennt. Hierbei spielen die bekannten zwischenmolekularen Kräfte eine Rolle. Diese lauten ionische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken, Dipolkräfte und van der Waals Kräfte.

Bei der HPLC befindet sich die stationäre Phase im festen Aggregatzustand und die mobile Phase im flüssigen. Die zu analysierende Substanz wird gemeinsam mit der mobilen Phase durch die Trennsäule gepumpt. Stoffe, die sich gut in der mobilen Phase auch als Laufmittel oder Elutionsmittel bezeichnet lösen, werden schneller durch die Trennsäule transportiert, als solche die eine stärkere Wechselwirkung zur festen, stationären Phase eingehen. Diese erscheinen folglich später am Trennsäulenende. Die Zeit vom Eintritt der Substanz in die Trennsäule bis zum Erscheinen an deren Ende wird als Retentionszeit bezeichnet. Sie ist abhängig von den oben erläuterten Wechselwirkungen der Analysesubstanz mit den beiden Phasen der HPLC.

Das Nernst'sche Verteilungsgesetz bildet die Grundlage für die Trennung von Stoffgemischen durch Extraktion oder chromatographische Methoden, da sich verschiedene Stoffe zwischen zwei Phasen in unterschiedlichen Konzentrationen verteilen. Ist bei der Verteilung eine der Phasen eine Gasphase, gilt als Spezialfall des Nernst'schen Verteilungssatzes das Henry-Dalton'sche Gesetz.

Bei der HPLC wird der Strömungswiderstand über die Partikelgröße der festen stationären Phase bestimmt. Entsprechend unterschiedlich kann der benötigte Druck sein, um die mobile Phase durch die Säule zu pumpen. Die HPLC, früher als Hochdruckflüssigkeitschromatographie bezeichnet, benutzt im Gegensatz zur klassischen Flüssigkeitschromatografie dünnere Säulen und kleinere Teilchen in der stationären Phase, wodurch deutlich bessere Trennergebnisse erzielt werden können [89]. Die theoretische

Trennleistung eines Flüssigchromatographiesystems kann mit Hilfe der van Deetmer Gleichung berechnet werden.

Es gibt verschiedene Formen der HPLC, die über die stationäre Phase definiert werden. Die beiden wichtigsten Formen werden im folgenden Abschnitt kurz erläutert. Bei der Normalphasen-HPLC ist die stationäre Phase polar. Sie stellt die ursprüngliche Form der HPLC dar. Meist wird hier Silicagel oder Kieselgel benutzt. Daraus folgt, dass polare Moleküle leicht in der stationären Phase verbleiben und dementsprechend nach langer Retentionszeit am Säulenende erscheinen. Je nach Polarität der mobilen Phase kann die Elutionskraft auf die zu analysierende Substanz beeinflusst werden. Es müssen meist organische Lösungsmittel verwendet werden. Die Umkehrphasen-HPLC, im Englischen als RP-HPLC bezeichnet für *reverse phase*, verwendet hingegen eine stationäre Phase, die relativ unpolar ist. Dies wird durch Oberflächenmodifikation der Kieselgele erreicht und führt dazu, dass die mobile Phase polarer ist als die stationäre Phase. Verwendung finden hier beispielsweise Alkyl-Chlor-Silane [89]. So werden polare Moleküle leichter eluiert und erscheinen früh am Säulenende. Als Lösungsmittel können hier sowohl wässrige als auch organische Lösungsmittel eingesetzt werden.

Weiterhin ist es wichtig zwischen isokratischen Trennungen und Gradiententrennungen zu unterscheiden. Bei der isokratischen Trennung wird die Zusammensetzung der mobilen Phase über die Zeit nicht verändert. Die Zusammensetzung des Eluenten hat aber einen großen Einfluss auf die Retentionszeiten des Analysats. Bei gleichbleibender Zusammensetzung kann es dazu kommen, dass eine Substanz aus dem Gemisch erst nach sehr langer Retentionszeit und langsam eluiert wird. Dies führt zu langen Trennzeiten und Bandenverbreiterung, wie Abbildung 4 zeigt. Bei der Gradientenelution wird die mobile Phase in ihrer Zusammensetzung über die Zeit verändert. So können der Elution bisher schwer zugängliche Stoffe leichter mobilisiert werden. Die Trennzeit verkürzt sich und die Substanz taucht in einem kleinen Zeitfenster am Ende der Trennsäule auf, was einer schmalen Bande entspricht.

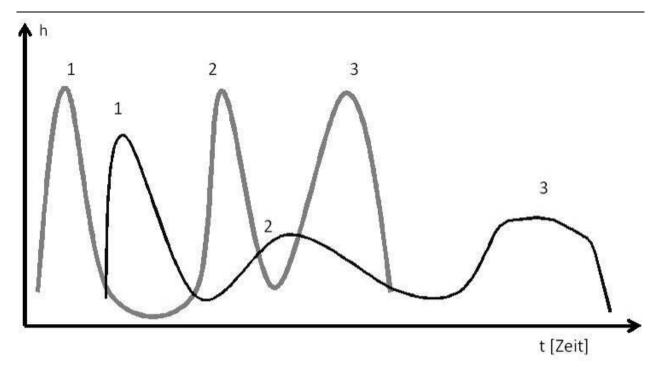


Abbildung 4: schematische Darstellung des Unterschieds von isokratischer zu Gradienten-Elution: Bei der isokratischen Elution, hier die schwarze dünne Linie, kann es zu langen Retentionszeiten und zu Bandenverbreiterungen kommen. Die fiktiven Substanzen 1, 2, 3 verdeutlichen die Abhängigkeit von der Elutionsmethode; h = Höhe der Bande.

Die Cholin Analyse wurde in einem spezialisierten, internationalen Referenz-Labor in Bergen, Norwegen durchgeführt [74]. Dabei wurde das von Holm et al. entwickelte und 2003 publizierte Verfahren verwendet [86]: Für die Cholin Analyse wurde ein HPLC-System der Firma Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA) mit einer NP-HPLC Säule (10 cm x 2,1mm, Teilchengröße 5μm, Hypersil silica Säule, Agilent, Kalifornien, USA) verwendet. Die Trennsäule wurde mit Elutionsmittel im Verhältnis 25% Ammoniumformiat und 75% Acetonitril vorgefüllt. Das Gerät ist mit einem Autosampler zur automatisierten Probenaufgabe sowie einem Degasser zur Entgasung ausgestattet. Autosampler können auch Verdünnungsschritte vornehmen und erhöhen so die Messgenauigkeit. Die Flussrate in der Trennsäule betrug 600 μL/min und das Probenvolumen betrug 2μL. Zur Kalibrierung wurden jeweils vier Proben mit einer Konzentration von 3; 7,5; 15 und 30 μmol/L verwendet. Eine Gradientenelution wurde zur besseren Auftrennung der Probe verwendet. Die Konzentrationen des Elutionsmittels wurden linear zusammengesetzt verändert. Als Elutionsmittel wurden Ammoniumformiat 15 mmol/L, pH 3,5 (Lösung A) sowie Acetonitril (Lösung B) genutzt. Entsprechend der von

Holm et al. entwickelten Messmethode wurden die Konzentrationsgradienten wie folgt verändert: 0-0,1 min 25% A, 75% B; 3,5 min 80% A und 20% B; 3,6 min 25% A, 75% B; 5,6 min 25% A, 75% B [86]. Nach Splitting im Verhältnis 1:4 wurden die Proben mit einer Flussrate von 150µL/min ins Massenspektrometer eingegeben.

3.2.2 HPLC-MS gekoppelt durch Elektrospray-Ionisation

Nachdem die Substanzen entsprechend ihrer Retentionszeiten in der HPLC aufgetrennt worden sind, kann die Detektion zur Identifizierung oder auch Quantifizierung der Substanzen im Massenspektrometer beginnen. Um im Massenspektrometer analysiert werden zu können, müssen die Proben in die Gasphase überführt und ionisiert werden. Die hierfür notwendige Energie führt nicht selten dazu, dass Moleküle fragmentiert werden und nur noch die Fragmente analysiert werden können. Zusätzlich ist es notwendig die gelöste Substanz von der Lösungsmittelmatrix des HPLC-Eluats abzutrennen.

Die Elektrospray-Ionisation macht es möglich die vorgenannten Probleme zu umgehen und die beiden Verfahren HPLC und MS zu kombinieren. Es handelt sich dabei um eine Atmosphärendruck Ionisationstechnik. Das heißt, die für die Massenspektrometrie notwendige Erzeugung von Ionen findet unter Atmosphärendruck statt. Die ESI hat sich für diesen Zweck etabliert und stellt ein Standardverfahren zur Kombination von HPLC und MS dar, welches auch in hiesiger Untersuchung eingesetzt wurde. Eine Fragmentierung findet kaum statt, da die ESI eine relativ sanfte Ionisationstechnik darstellt. Sie ist daher auch für die Ionisierung in der Analytik labiler Moleküle gut geeignet. Die zu manchen Zwecken gewünschten Fragmentierungsmuster, genannt sei hier beispielsweise die Identifikation unbekannter Bestandteile einer Probe, entstehen praktisch nicht. Diese sind vornehmlich bei der Elektronenstoß-Ionisation zu finden.

Um die Analyte im Vakuum des Massenspektrometers messen zu können, werden sie neben der Ionisierung von der flüssigen, mobilen Phase der HPLC abgeschieden und in den gasförmigen Aggregatzustand überführt. Der komplexe Mechanismus wird im Folgenden kurz erläutert. Die aus der HPLC Auftrennung stammende Lösung wird unter Atmosphärendruck durch eine Kapillare (Nebulizernadel) geleitet und versprüht. Am Ende der Kapillare ist eine Spannung angelegt, die meistens zwischen 3-6 kV beträgt [90]. Wenn die elektrostatischen Kräfte, die durch die anliegende Spannung bedingt sind, größer werden als die Oberflächenspannung des Analysats bildet sich ein "taylor cone" an der Nebulizernadel aus [90]. Stickstoff fungiert bei dem Prozess als Trägergas

und unterstützt die Zerstäubung. Das im Sprayraum vorherrschende elektrische Feld zwischen Kapillare und Gegenelektrode, in diesem Fall die zum MS führende Transferkapillare, führt zur Bildung von gleichartig geladenen Molekülionen, wenn es zur vollständigen Verdampfung der Trägerflüssigkeit gekommen ist [91]. Um die Evaporation der Trägerflüssigkeit zu unterstützen, wird zusätzlich Stickstoff orthogonal zur Sprührichtung der Kapillare appliziert, wodurch die Tröpfchengröße reduziert und die Ladungsdichte pro Tröpfchen erhöht werden. Über die Transferkapillare gelangen die Teilchen in das Vakuum des Massenspektrometers.

3.2.3 Detektion des Analysats im Massenspektrometer

In unserer Untersuchung wurde ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer zur Detektion genutzt (API 3000, AB SCIEX, Framingham, Massachusetts, USA). Dabei werden drei Quadrupole hintereinander geschaltet. In einem Quadrupol können Ionen entsprechend ihres Masse- zu Ladungs- Verhältnisses (m/z) aufgetrennt werden. Abbildung 5 zeigt schematisch die Funktionsweise eines Quadrupols.

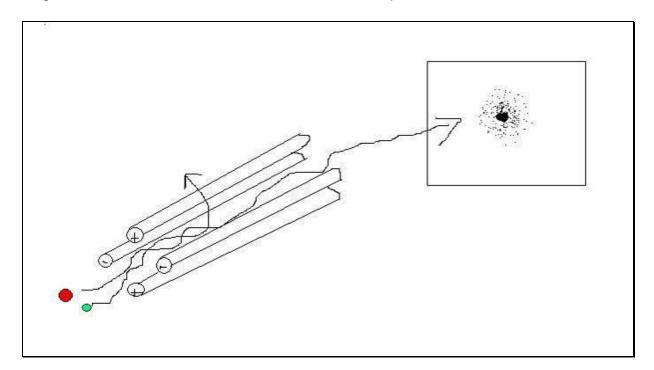


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Quadrupols. Die Ionen werden durch das Spannungsfeld beeinflusst. Nur Ionen einer vorgegebenen Masse erreichen den Detektor.

Die Funktionsweise eins Quadrupols lässt sich folgendermaßen beschreiben. An den vier Stäben wird eine Wechselspannung angelegt, welche von einer Gleichspannung

überlagert wird. Dabei ist die Gleichspannung für die jeweils gegenüberliegenden Stäbe identisch. Die Ionen werden auf ihrem Weg entlang der Stäbe durch die Wechselspannung ausgelenkt und zusätzlich durch die Gleichspannung beeinflusst. Positiv geladene Teilchen werden durch elektrostatische Abstoßung von den positiv geladenen Stäben auf einen Vektor zwischen den Stäben gedrängt. Von den negativ geladenen Stäben geht eine Anziehung auf die positiv geladenen Teilchen aus und sie werden zur Seite abgelenkt. Die Stärke der Auslenkung ist von der Masse des Teilchens abhängig. Nur Teilchen einer vorher über die anliegende Spannung definierten Masse gelangen durch den Quadrupol und können somit detektiert und quantifiziert werden [92].

In dem verwendeten Triple Quadrupol werden im ersten Quadrupol auf die beschriebene Art und Weise Teilchen einer vordefinierten Masse isoliert. Im zweiten Quadrupol erfolgt die erneute Anregung des Teilchens durch Kollision mit einem inerten Gas. Hierzu wurde Stickstoff verwendet. Die Detektion erfolgt schließlich im dritten Quadrupol [93]. Durch die Kombination mehrerer Massenspektrometer kann das Auflösungsvermögen verbessert werden. Abbildung 6 zeigt den Weg des Analysats von der Probeeingabe bis zur Detektion.

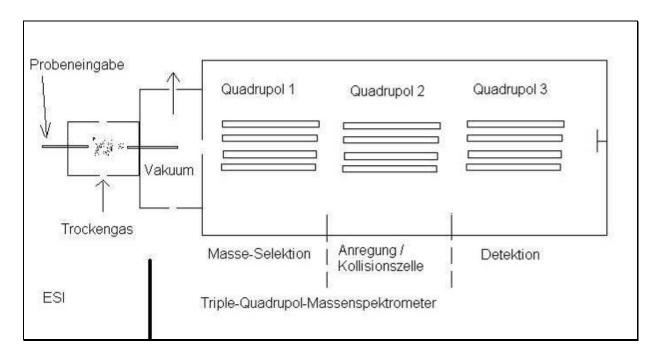


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Kopplung zwischen ESI und dem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer. Auf die Probeneingabe folgt die Überführung in den gasförmigen Zustand und dann das Massenspektrometer.

Die Detektion kann grundsätzlich in verschiedenen Modi erfolgen. Der "Full-Scan" Modus bietet die Möglichkeit sich einen Überblick über ein unbekanntes Substanzgemisch zu verschaffen. Im Gegenzug sinkt die Nachweisempfindlichkeit. Im "Singe Ion Monitoring" Modus wird der Scan auf einige wenige Massen reduziert. Die Nachweisempfindlichkeit kann dadurch gesteigert werden. Voraussetzung ist, dass die zu analysierenden Teilchen bekannt sind. In unserer Untersuchung wurde der "Multiple-Reaction Monitoring" Modus (MRM) verwendet. Dabei werden nur ein bis zwei bestimmte Fragmentionen beobachtet, weshalb eine sehr genaue und selektive Quantifizierung möglich ist. Zur Steuerung der Geräte sowie zur computergestützten Auswertung der Ergebnisse (Peakerkennung, Quantifizierung) wurde die Analyst® Software der Firma AB SCIEX (Framingham, Massachusetts, USA) verwendet.

3.3 Weitere untersuchte Parameter

Neben der seriellen Messung der Cholinkonzentrationen im Plasma erfolgte die Registrierung weiterer Parameter aller Patienten bis zur Entlassung. Zur Charakterisierung der Reanimation wurden zum einen die Notarztprotokolle ausgewertet. Dabei wurden die applizierte Adrenalindosis, die Zeit bis ROSC sowie der initiale Rhythmus erfasst. Zum anderen erfassten wir, ob der Kreislaufstillstand beobachtet wurde, ob eine Laienreanimation stattfand und wo sich der Kreislaufstillstand ereignete. Weiterhin wurden etablierte Basisparameter der Intensivmedizin dokumentiert. Dazu gehören die Respiratorstunden (Beatmungsdauer), die Dauer des Aufenthalts (LOS = Length Of Stay), sowie der APACHE II Score als Score zur Outcomeprädiktion und Erkrankungsschwere. Die im Rahmen der Hypothermiebehandlung notwendige kontinuierliche Überwachung der Körperkerntemperatur wurde ebenfalls für die Studie registriert. Zur Charakterisierung des Patientenkollektivs wurden außerdem das Alter sowie das Geschlecht erfasst. Zur Dokumentation des neurologischen Ergebnisses erfassten wir die CPC. Die NSE wurde 72h nach Ereignis als etablierter Prognosemarker zu Vergleichszwecken bestimmt.

3.4 Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse der erhobenen Parameter wurde die Statistiksoftware SPSS© Version 20 (IBM) genutzt. Die grafische Darstellung und Verarbeitung der Ergebnisse erfolgte mit SPSS sowie Microsoft Excel (Microsoft Office Home and Student, Version 2010). Grafiken wurden mit Hilfe der Programme Microsoft Paint (Microsoft

Methoden 40

Windows XP) sowie Microsoft PowerPoint (Office Home and Student, Version 2010) erstellt und bearbeitet.

Die Feststellung der Datenverteilung erfolgte mittels Histogramm und Kolmogorov-Smirnov-Test. Eine Gauß'sche Normalverteilung konnte nur bei einzelnen Variablen nachgewiesen werden. Weiterhin ist die Studienpopulation von n=20 klein. Deshalb erfolgte die weitere Analyse der Daten mittels statistischer Tests für nicht-parametrisch verteilte Daten. Diese sind auch zur Analyse normalverteilter Daten geeignet und zeigen sich bei kleinen Populationen unempfindlicher gegenüber Ausreißern [94].

Unverbundene Stichproben, beispielsweise der Vergleich beider Gruppen, wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests analysiert. Die statistische Auswertung verbundener Stichproben, beispielsweise der Verlauf innerhalb einer Gruppe, erfolgte mittels des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Tests für verbundene Stichproben und der Friedmans Zweifach-Rangvarianzanalyse. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha=0.05$ festgelegt. Mittels einer Kaplan-Meier Überlebensfunktion ermittelten wir den Anteil der verstorbenen Patienten. Zur Überprüfung der Sensitivität und Spezifität der Ergebnisse erstellten wir eine "Receiver Operating Characteristic"-Kurve. Aufgrund der nicht-parametrischen Verteilung sind die Daten in Tabellen und Grafiken als Median (25. – 75. Perzentile) oder als absolute Zahlen mit dem prozentualen Anteil am Gesamtkollektiv angegeben.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Beobachtungsstudie zum Verlauf der Plasmacholinkonzentration nach kardiopulmonaler Reanimation und milder therapeutischer Hypothermie wurden 20 Patienten zu 16 unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Dabei wurden retrospektiv zwei Gruppen gebildet. Die zur Gruppeneinteilung herangezogenen Kriterien sind unter Kapitel 3.1.3 beschrieben.

4.1 Charakterisierung des Studienkollektivs

Zur Charakterisierung des untersuchten Studienkollektivs wurden verschiedene Basisparameter erhoben (s. auch Kapitel 3.3). Das mediane Alter der untersuchten Patienten betrug 65,5 Jahre. 70% der Patienten waren männlich. Alle erhobenen Parameter sind zur besseren Übersicht in Tabelle 6 dargestellt. Die Daten sind als Median mit der 25. sowie 75. Perzentilen beziehungsweise als absolute Zahl mit dem relativen Anteil am Gesamtkollektiv angegeben.

Tabelle 6: Basischarakteristika des Patientenkollektivs

Variable	Gesamtkollektiv (n = 20)	
Alter (Jahre)	65,5* (52,75 – 73,75)	
Geschlecht		
Männlich	14** (70)	
Weiblich	6** (30)	
APACHE II	28,5* (21,25 – 34,5)	
Ereignisort		
IHCA	4** (20)	
OHCA	16** (80)	
Initialer Rhythmus		
KF	9** (45)	
PEA	5** (25)	
Asystolie	6** (30)	
Beobachtet		
Ja	14** (70%)	
Nein	6** (30%)	

Laienreanimation		
Ja	11** (55%)	
Nein	9** (45%)	
CPC		
1 = Keine Schädigung	5** (25%)	
2 = Leichte Schädigung	3** (15%)	
3 = Schwere Schädigu	ng 1** (5%)	
4 = Koma	3** (15%)	
5 = Tod	8** (40%)	
Zeit bis ROSC (min)	23* (15 – 39)	
Gesamtdosis Adrenali (mg)	n 4* (3,125 – 5,75)	
NSE Tag 3 (µg/L)	68* (24 – 192)	
Beatmungsdauer (Stunden	247* (176 – 355,75)	
Aufenthaltsdauer (Tage)	15* (7,25 – 26,75)	
Die Daten sind als *Median (25. – 75. Perzentile) oder als **absolute Zahl (Anteil an Hundert) angegeben. KF = Kammerflimmern; PEA = pulslose elektrische Aktivität; CPC = cerebral performance category; NSE = neuronen-		

Die Zeit bis zum Wiedereintritt eines spontanen Eigenkreislaufs war bei Patienten, die im Krankenhaus reanimiert wurden, verlängert. Die Reanimationsdauer betrug im Median 42,5 (28,75-56,25) Minuten. Bei Patienten, die außerhalb des Krankenhauses reanimiert wurden, betrug die Zeit bis ROSC im Median 20 (13,5-25) Minuten. Die statistische Überprüfung ergab einen signifikanten Unterschied in der Reanimationsdauer inner- und außerhalb des Krankenhauses mit einem p=0,02. Patienten, die im Verlauf der Studie starben, wurden im Median 22,5 (15,25-40) Minuten lang reanimiert.

spezifische Enolase; IHCA = intra-hospital cardiac arrest; OHCA = out-of-hospital cardiac arrest

4.1.1 Verlauf der Cholinkonzentration im Gesamtkollektiv

Die Plasmacholinkonzentration veränderte sich deutlich im zeitlichen Verlauf der Studie. Nach anfänglich leicht erhöhten Werten fiel die Plasmacholinkonzentration unter die Referenzwertgrenze, die unter Kapitel 1.5.4 beschrieben ist.

Zur besseren Visualisierung sind die gemessenen Plasmacholinkonzentrationen als Boxplot in Abbildung 7 aufgetragen. Dargestellt ist der Verlauf aller Studienpatienten über die gesamte Studiendauer. Die Hilfslinien stehen für die mediane Cholinkonzentration eines gesunden Kollektivs und die fünfte beziehungsweise 95. Perzentile des Referenzkollektivs. Werte innerhalb der Linien können als normwertig angesehen werden. Die Angaben beziehen sich auf den Referenzbereich des durch uns beauftragten Labors.

In der Studienpopulation liegt bei fast allen Patienten zwischen 48 Stunden und 96 Stunden nach dem Reanimationsereignis eine sehr niedrige Cholinkonzentration jenseits der fünften Perzentile, also geringer als 5 μ mol/L, vor. Der Medianwert zeigt einen signifikanten Abfall zwischen der initialen Abnahme (ca. 30 Minuten nach ROSC) und der Abnahme nach 72 Stunden (p = 0,001). Von gleicher Signifikanz ist auch der Abfall der Plasmacholinkonzentration zwischen dem Messzeitpunkt 90 Minuten nach ROSC und dem Messzeitpunkt nach 72 Stunden (p= 0,001). Auf den Abfall folgt ein signifikanter Wiederanstieg des Medianwerts zwischen den Abnahmezeitpunkten 72 Stunden nach ROSC und der letzten Messung der Studie nach sieben Tagen. Der p-Wert beträgt hier p = 0,002.

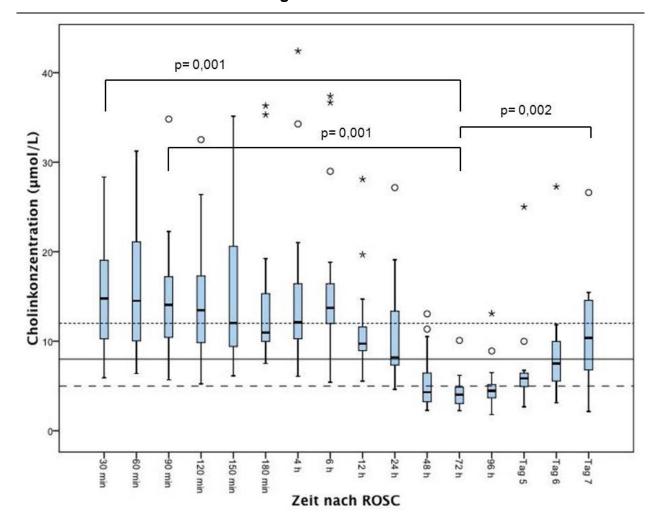


Abbildung 7: Darstellung der Plasmachonlinkonzentrationen im Verlauf des Beobachtungszeitraums. fortlaufende Linie = 8 μ mol/L; feingestrichelte Linie = 12 μ mol/L (95. Perzentile Normalkollektiv); grobgestrichelte Linie = 5 μ mol/L (fünfte Perzentile Normalkollektiv). Es zeigten sich signifikante Veränderungen der Cholinkonzentration im zeitlichen Verlauf. Die p-Werte können der Grafik entnommen werden.

4.1.2 Veränderung der Plasmacholinkonzentration im Gesamtkollektiv unter Berücksichtigung der milden therapeutischen Hypothermie

Bei der Auswertung der medianen Körperkerntemperatur zeigte sich, dass die Studienpatienten drei bis vier Stunden nach stationärer Aufnahme den oberen Zielbereich der
MTH von 34°C erreicht hatten. Spätestens nach sechs Stunden hatten alle Patienten
die gewünschte Zieltemperatur von 33°C erreicht. Das PLCHO zeigte zu diesem Zeitpunkt einen zweiten Maximalwert nach Reanimation und fiel daraufhin deutlich ab (s.
auch Abbildung 7). Der Abfall der PLCHO-Konzentration erreichte seinen tiefsten Punkt

nach etwa 48-72 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt waren die Studienpatienten bereits wieder normotherm (>36°C). Der beschriebene Verlauf ist in Abbildung 8 veranschaulicht.

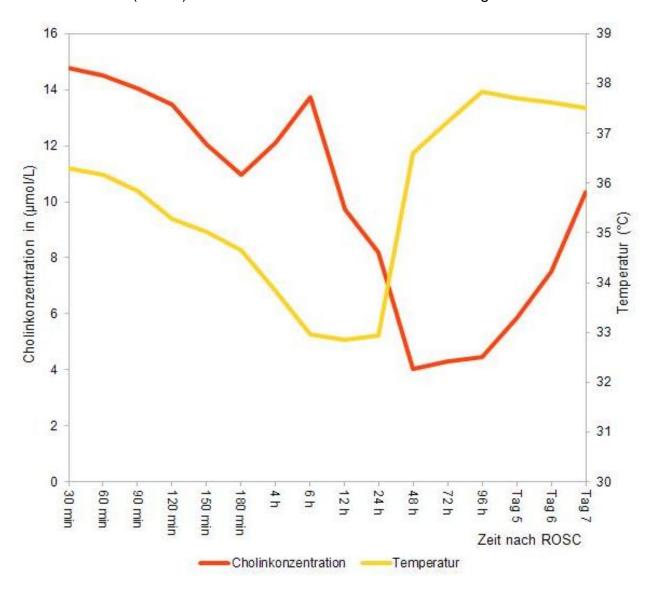


Abbildung 8: Verlauf der medianen Plasmacholinkonzentration und der Körpertemperatur im Gesamtkollektiv über den Beobachtungszeitraum einer Woche.

4.2 Ergebnisse der beiden Gruppen im Vergleich

Die Studienpatienten wurden anhand des neurologischen Ergebnisses in zwei Gruppen aufgeteilt (s. Kapitel 3.1.3). Studienteilnehmer mit gutem neurologischem Ergebnis (Gruppe 1; n=8; CPC 1-2) hatten signifikant häufiger einen schockbaren initialen Rhythmus, erhielten signifikant häufiger eine Laienreanimation und hatten signifikant niedrigere NSE Werte 72 Stunden nach dem Ereignis. Die restlichen erhobenen Basis-

charakteristika unterscheiden sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen. Tabelle 7 bietet den Vergleich der Basischarakteristika zwischen den beiden Gruppen des Patientenkollektivs im Überblick.

Tabelle 7: Vergleich Basischarakteristika zwischen den Untergruppen

Variable	Gruppe 1 (CPC 1-2)	Gruppe 2 (CPC 3-5)	p-Wert	
	n = 8	n = 12		
Alter (Jahre)	60,5* (52,75 – 76)	69,5* (43 – 73,75)	0,847	
APACHE II	30* (22,75 – 39,5)	27* (19 – 32)	0,263	
Rhythmus schockbar	7** (87,5)	2** (16,7)	0,002	
Ereignis beobachtet	7** (87,5)	7** (58,3)	0,174	
Laienreanimation erfolgte	7** (87,5)	4** (33,3)	0,02	
Zeit bis ROSC (min)	22,5* (9,75 – 39)	23* (15,25 – 40)	0,670	
Dosis Adrenalin (mg)	4* (1,625 – 5,5)	4,5* (3,25 – 5,75)	0,433	
NSE Tag 3 (µg/L)	23* (19 – 54,5)	164,4* (68 – 254)	0,003	
Beatmungsdauer (Std.)	273* (191,5 – 598,5)	194,5* (136,25 –335,75)	0,247	
Aufenthaltsdauer (Tage)	21,5* (10,25 – 36,5)	9,5* (5,5 – 25,5)	0,177	
Die Daten sind als *Median (25. – 75. Perzentile) oder als **absolute Zahl (%) angegeben. NSE = neuronenspezifische Enolase				

Die Plasmacholinkonzentration folgt insgesamt auch in beiden Untergruppen dem weiter oben beschriebenen Verlauf des Gesamtkollektivs. Die aufgetretenen Unterschiede zwischen den Gruppen sind im folgenden Abschnitt beschrieben. Patienten mit schlechtem neurologischem Ergebnis haben tendenziell höhere initiale Werte und unterscheiden sich vor allem zum Messzeitpunkt 3, also 90 Minuten nach ROSC, von der Gruppe mit gutem neurologischem Ergebnis.

In der Gruppe mit gutem neurologischem Ergebnis haben 80% der Patienten zum Abnahmezeitpunkt 90 Min nach ROSC eine Plasmacholinkonzentration < 13 µmol/L. Zum

gleichen Zeitpunkt haben unter den Patienten mit schlechtem neurologischem Ergebnis 72,8% der Teilnehmer eine PLCHO-Konzentration > 13 μ mol/L. Der Unterschied der medianen Plasmacholinkonzentration zwischen beiden Gruppen am dritten Messpunkt ist statistisch nicht signifikant (p = 0,1).

Zur Charakterisierung des Konzentrationsabfalls wurde die Differenz zwischen dem Abnahmezeitpunkt 90 Min nach ROSC und der niedrigsten Konzentration (Abnahmezeitpunkt 72h nach ROSC) gebildet ($\Delta_c = C_{90\text{Min}} - C_{72\text{h}}$). Dabei ergab sich in der Gruppe mit gutem neurologischem Ergebnis (Gruppe 1) ein absoluter Konzentrationsabfall Δ_c von 8,01 (3,97-10,53) µmol/L und in der Gruppe mit schlechtem neurologischem Ergebnis (Gruppe 2) ergab sich ein Δ_c von 9,86 (4,83-15,56) µmol/L. Der Abfall innerhalb der Gruppen war statistisch signifikant (Gruppe 1: p=0,043; Gruppe 2: p=0,012). Der Vergleich der errechneten Differenzen zwischen den Gruppen ($\Delta_{cGruppe1}$ vs. $\Delta_{cGruppe2}$) war nicht signifikant verschieden (p=0,52).

Für den Abnahmezeitpunkt 90 Min nach ROSC wurde aufgrund der beobachteten Unterschiede zwischen den Gruppen eine "Receiver Operating Characteristic"-Kurve (ROC) erstellt, um die Sensitivität und Spezifität der Cholinkonzentration zur Unterscheidung der Untergruppen bestimmen zu können.

Diese ergab eine Fläche unter der Kurve (Area under the curve; AUC) von 0,764 und ein 95% Konfidenzintervall von 0,51-1,0. Der p-Wert beträgt p=0,1. Eine Spezifität von 100% zeigte sich bei einer Plasmacholinkonzentration von 17,2 μ mol/L. Die Sensitivität ergab dabei 36,4%. Für den weiter oben beschriebenen auffälligen Wert von 13 μ mol/L als Grenzwert zwischen den Gruppen ergaben sich eine Sensitivität von 72,7% und eine Spezifität von 80%. Die ROC-Kurve ist unter Abbildung 9 zu finden.

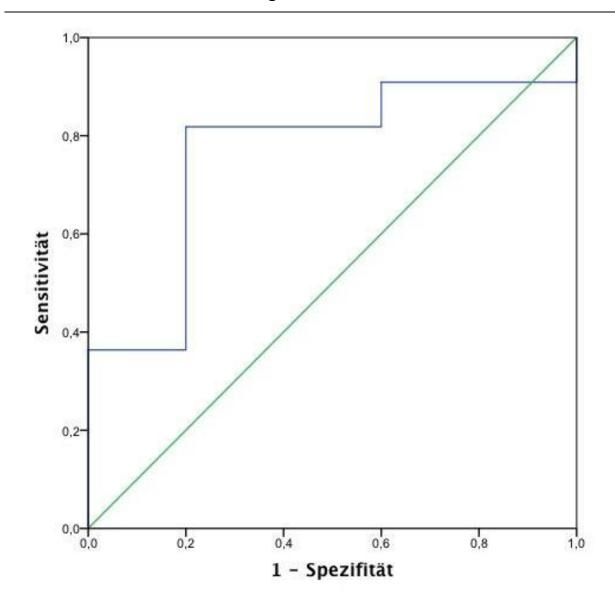


Abbildung 9: ROC Kurve Abnahmezeitpunkt 3 (entsprechend 90 Minuten nach ROSC). Die AUC beträgt 0,764.

Neben der absoluten Konzentrationsveränderung untersuchten wir den prozentualen Abfall der Cholinkonzentration zwischen den Abnahmezeitpunkten 90 Minuten und 72 Stunden nach ROSC und führten einen Vergleich der Untergruppen durch. Die Ergebnisse sind Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Prozentuale Veränderung zwischen den Abnahmezeitpunkten 90 Min und 72 Stunden nach ROSC

Gruppe 1	Gruppe 2	p-Wert	
-71% (-44%; -76%)	-70% (-45%; -80%)	0,724	
Angabe als Median und (25.; 75. Perzentile)			

Zum Vergleich beider Gruppen wurde der Verlauf der Cholinkonzentration im Verlauf der Studie grafisch dargestellt. Einige der initialen, engmaschigen Abnahmen wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit in dieser Grafik ausgelassen. Die angesprochene Grafik ist unter Abbildung 10 zu finden.

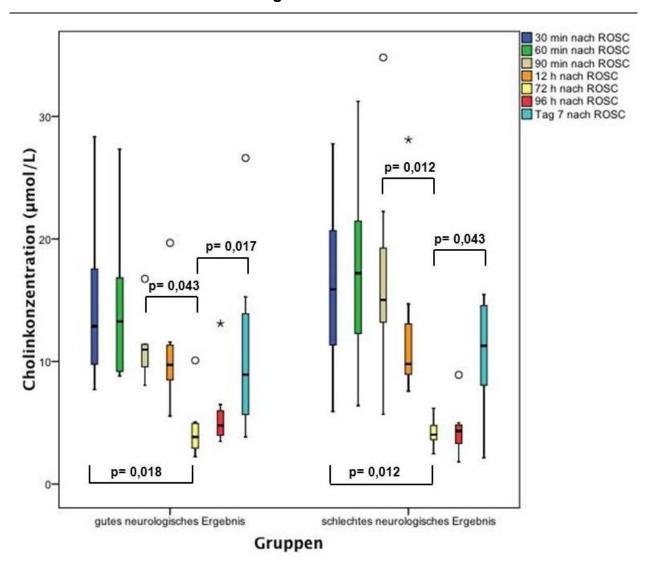


Abbildung 10: Darstellung der Cholinkonzentration im Verlauf der Studiendauer zwischen beiden Patientengruppen; Gruppe 1 = gutes neurologisches Ergebnis (CPC 1-2); Gruppe 2 = schlechtes neurologisches Ergebnis (CPC 3-5).

Die Unterschiede der Medianwerte in beiden Untergruppen sind zu keinem Messzeitpunkt signifikant verschieden. Sowohl in der Gruppe mit gutem Ergebnis als auch bei den Patienten mit schlechtem neurologischem Ergebnis (Gruppe 2) kommt es zum deutlichen Abfall der Cholinkonzentration innerhalb der ersten 72 Stunden (siehe auch Abbildung 10). Der Vergleich der Cholinkonzentrationen in beiden Gruppen ist in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Vergleich der Medianwerte der Cholinkonzentrationen zwischen den Gruppen 1 und 2

Abnahmezeitpunkt	p-Wert
Cholin Abnahmezeitpunkt 30 Min nach ROSC	0,751
Cholin Abnahmezeitpunkt 60 Min nach ROSC	0,342
Cholin Abnahmezeitpunkt 90 Min nach ROSC	0,100
Cholin Abnahmezeitpunkt 120 Min nach ROSC	0,637
Cholin Abnahmezeitpunkt 150 Min nach ROSC	0,248
Cholin Abnahmezeitpunkt 180 Min nach ROSC	0,665
Cholin Abnahmezeitpunkt 4 Std. nach ROSC	0,612
Cholin Abnahmezeitpunkt 6 Std. nach ROSC	0,322
Cholin Abnahmezeitpunkt 12 Std. nach ROSC	0,696
Cholin Abnahmezeitpunkt 24 Std. nach ROSC	0,859
Cholin Abnahmezeitpunkt 48 Std. nach ROSC	0,680
Cholin Abnahmezeitpunkt 72 Std. nach ROSC	0,700
Cholin Abnahmezeitpunkt 96 Std. nach ROSC	0,214
Cholin Abnahmezeitpunkt Tag 5 nach ROSC	0,859
Cholin Abnahmezeitpunkt Tag 6 nach ROSC	0,345
Cholin Abnahmezeitpunkt Tag 7 nach ROSC	0,699

4.2.1 Verlauf der Plasmacholinkonzentration in den Gruppen im Verhältnis zur Temperaturänderung unter milder therapeutischer Hypothermie

Patienten der Gruppe mit schlechtem neurologischem Ergebnis haben tendenziell höhere Cholinkonzentrationen bei Aufnahme. Der Unterschied in beiden Gruppen ist nicht signifikant (p = 0,75). Im Verlauf der Studie nähern sich die medianen Plasmacholinkonzentrationen der beiden Gruppen noch weiter an. Sie erreichen nach 48-72 Stunden fast identische Werte. Beide Gruppen haben spätestens 6 Stunden nach Ereignis die Zieltemperatur von 33°C erreicht. Der obere Grenzwert des Zieltemperaturbereichs (34°C) wurde in der Gruppe mit gutem neurologischem Ergebnis im Median eine Stunde früher erreicht. In Abbildung 11 ist der Verlauf der medianen Cholinkonzentration im Plasma sowie der Verlauf der medianen Körperkerntemperatur über die gesamte Studiendauer getrennt nach den Untergruppen aufgetragen.

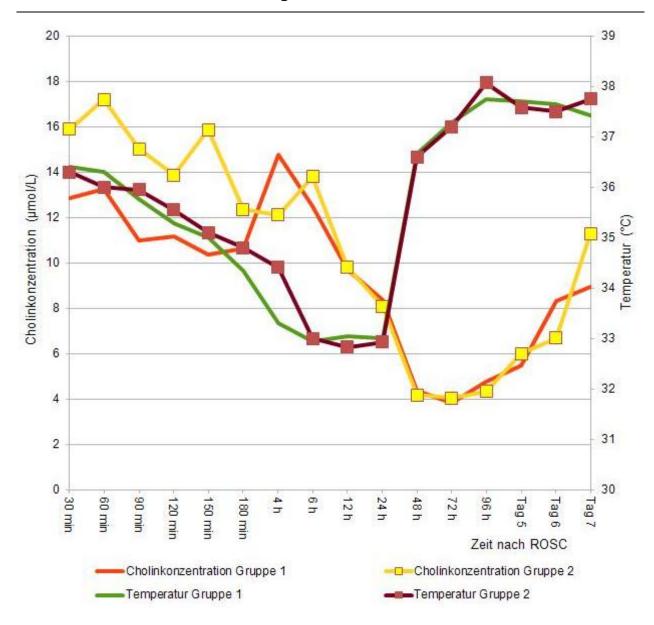


Abbildung 11: Verlauf der medianen Plasmacholinkonzentration und der medianen Körperkerntemperatur im Vergleich beider Untergruppen über den Beobachtungszeitraum einer Woche. Gruppe 1 = gutes neurologisches Ergebnis; Gruppe 2 = schlechtes neurologisches Ergebnis

4.3 Neurologisches Ergebnis und Überleben des Patientenkollektivs

Insgesamt konnten 40 Prozent der Patienten mit einem guten neurologischen Ergebnis aus dem Krankenhaus entlassen werden. Wie zuvor beschrieben, bilden diese Patienten die Gruppe 1 des Studienkollektivs. Die genaue Aufschlüsselung des neurologischen Ergebnisses entsprechend der CPC kann Abbildung 12 entnommen werden.

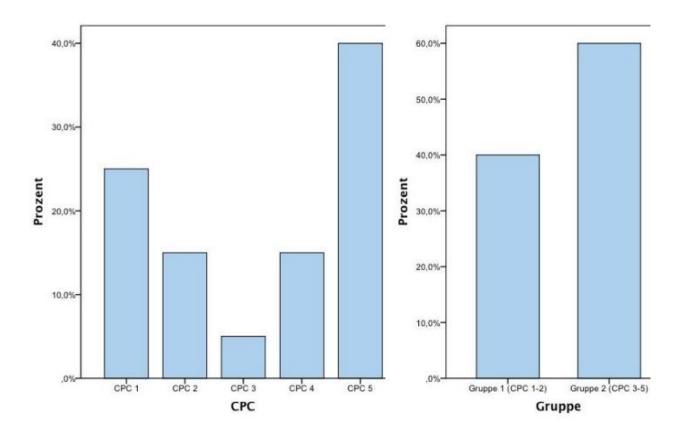


Abbildung 12: Neurologisches Ergebnis des Studienkollektivs: Links: Einteilung nach CPC; Rechts: Verteilung der Studienteilnehmer auf die Gruppen. Angaben als prozentualer Anteil am Gesamtkollektiv.

Als etablierter Marker zur Prognoseabschätzung bei Patienten nach kardiopulmonaler Reanimation wurde die NSE 72h nach dem Reanimationsereignis untersucht. Dabei ergaben sich deutliche Unterschiede in der Serumkonzentration im Vergleich der beiden Untergruppen. In Abbildung 13 ist die NSE Konzentration grafisch als Boxplot dargestellt. Patienten der Gruppe mit gutem neurologischem Ergebnis hatten deutlich niedrigere NSE Serumkonzentrationen. Sie lagen im Median (25./75. Perzentile) bei 23 μ g/L (19/54,5) und in der Gruppe mit schlechtem neurologischem Ergebnis im Median (25./75. Perzentile) bei 164,4 μ g/L (68/254). Der gemessene Unterschied ist statistisch signifikant. Der p-Wert beträgt p = 0,002.

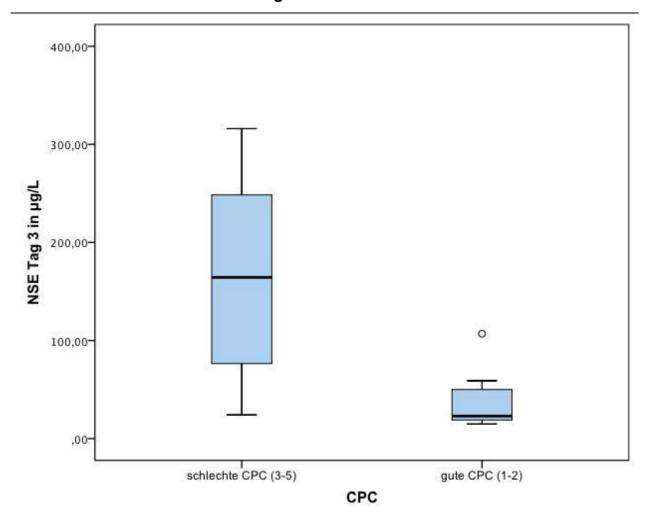


Abbildung 13: Boxplot zum Vergleich der NSE Konzentrationen zwischen den Untergruppen: Die Patienten mit gutem neurologischem Ergebnis haben signifikant niedrigere Werte (p = 0,002). Gruppe 1= gute CPC; Gruppe 2 = schlechte CPC

40% der eingeschlossenen Patienten sind während des stationären Aufenthaltes verstorben. Die Überlebensfunktion des Patientenkollektivs ist als Abbildung 14 zu finden.

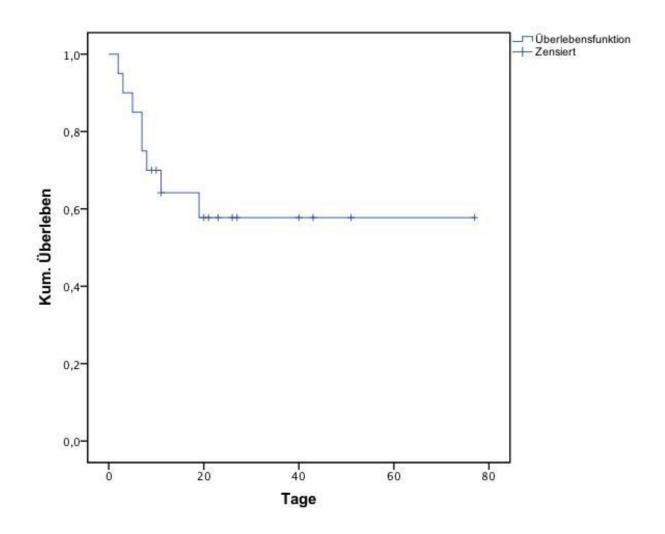


Abbildung 14: Kaplan-Meier Überlebensfunktion der Studienpatienten

5 Diskussion

Eine serielle Messung der Cholinkonzentration als möglicher Hypoxiemarker beim Menschen nach kardiopulmonaler Reanimation ist bisher nicht publiziert. Daher erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die detaillierte Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Cholinkonzentration im Plasma bei Patienten nach Reanimation zu untersuchen. Weiterhin wurde überprüft, ob es einen Zusammenhang zwischen der Cholinkonzentration und dem neurologischen Ergebnis gibt und ob die Änderung der Cholinkonzentration in Zusammenhang mit Temperaturänderungen im Rahmen der milden therapeutischen Hypothermie steht.

5.1 Diskussion der Ergebnisse

In der Literatur ist ein deutlicher Anstieg der Cholinkonzentration in der Folgezeit einer temporären Hypoxie beschrieben [69, 70]. Eine Erhöhung der Cholinkonzentration war in den genannten Untersuchungen ein empfindlicher Marker für den hypoxisch bedingten Zellschaden. Die beobachteten Zeiträume waren jedoch viel kürzer und beschränkten sich auf wenige Stunden. Auch in unserer Untersuchung war entsprechend der bisher vorliegenden Untersuchungen mit einem deutlichen Anstieg der Cholinkonzentrationen in den Proben innerhalb der ersten Stunden nach Reanimation zu rechnen. Die Probenakquise erfolgte in den ersten drei Stunden halbstündlich, um bei der kurzen Halbwertszeit das Maximum nicht zu verpassen. Allerdings war in unserer Untersuchung die Erfassung einer Kinetik ganz zu Beginn der Studie schwierig, da uns keine PLCHO-Konzentrationen der Patienten vor dem Reanimationsereignis und der stationären Aufnahme vorlagen. Anders als in tierexperimentellen Studien, wo die Ischämie kontrolliert herbeigeführt wird und vorher schon Blut untersucht werden kann, war es daher nicht möglich festzustellen, ob die Plasmacholinkonzentration vor Aufnahme höher oder niedriger als in unserer initialen Probe lag.

Zum ersten Messzeitpunkt bei Aufnahme des Patienten ergaben sich erhöhte Konzentrationen für Plasmacholin. Nach Wiedererlangen eines Eigenkreislaufs zirkuliert das freigesetzte Cholin im Blut und kann dort gemessen werden. Bei Aufnahme lag das Studienkollektiv im Median bei 14,77 µmol/L. Die obere Grenze des Referenzbereichs liegt in dem durch uns beauftragten Labor bei 12 µmol/L und entspricht dabei der 95. Perzentile des Normalkollektivs [74]. Die größte Studie zur Bestimmung eines Referenzbereichs für Plasmacholin gibt ähnliche Normalwerte für die Plasmacholinkonzent-

ration an [71]. Auch bei selektiver Betrachtung der Untergruppen zeigten sich initial erhöhte Werte in beiden Gruppen. Die Patienten mit gutem Ergebnis wiesen bei Aufnahme eine Plasmakonzentration von 12,88 µmol/L im Median auf. Sie liegt damit nur knapp oberhalb des Referenzbereichs. Die Patienten in der Gruppe mit schlechtem neurologischem Ergebnis lagen bei 15,89 µmol/L im Median bei Aufnahme. Die erhöhten Plasmacholinkonzentrationen könnten ein Hinweis für eine vermehrte Cholinformation während der Hypoxiezeit sein, wie sie in Studien vorbeschrieben ist [69, 70, 79, 83, 95]. Die initial tendenziell höheren Plasmakonzentrationen bei Patienten der Gruppe mit schlechtem neurologischem Ergebnis könnten anzeigen, dass diese Patienten einen größeren Zellschaden erlitten haben. Der Unterschied war statistisch jedoch nicht sicher nachzuweisen. Hier sind größer angelegte Studien notwendig, um eventuell statistische Signifikanz zu erlangen.

Es kann anhand unserer Daten aus der Höhe der initialen Plasmacholinkonzentration kein eindeutiger Schluss auf das zu erwartende neurologische Ergebnis gezogen werden. Zum Abnahmezeitpunkt 90 Minuten nach ROSC zeigten sich allerdings größere Unterschiede zwischen der Gruppe mit dem guten neurologischen Ergebnis und der Gruppe mit schlechtem Ergebnis. In der näheren Untersuchung dieses Zeitpunktes mittels ROC-Kurve ergab sich ein Cut-Off Wert von 17,2 µmol/L zur Unterscheidung der beiden Gruppen mit einer Spezifität von 100% und einer Sensitivität von 36%. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass über die Messung der Plasmacholinkonzentration ein neuer Frühmarker zur Verfügung stehen könnte, der bereits nach 90 Minuten einen zusätzlichen Hinweis auf das zu erwartende neurologische Ergebnis liefern kann. Eine Folgestudie zur Überprüfung dieser Hypothese erscheint sinnvoll. Vorstellbar wäre eine Untersuchung aller auffälligen Messzeitpunkte an einem größeren Patientenkollektiv, um dieses Ergebnis kritisch zu überprüfen und wenn möglich zu bestätigen.

Ein zweiter Maximalwert zeigte sich in unserer Untersuchung nach 4-6 Stunden. Zwischenzeitlich fiel die Cholinkonzentration auf leicht erhöhte bis hochnormale Werte ab. Der zweite Maximalwert könnte auf einem Auswaschphänomen, beispielsweise nach stattgefundener Koronarintervention, beruhen. Ein zweigipfliger Verlauf ist auch in einer experimentellen Studie beschrieben [69]. Allerdings wurde die Studie am isolierten Rattenherz durchgeführt und beide Maxima sind innerhalb einer Stunde erreicht worden.

Diskussion 59

Im weiteren Verlauf unserer Untersuchung kam es bei allen Patienten zu einem starken und statistisch signifikanten Abfall der Cholinkonzentration im Plasma. Die niedrigsten Werte wurden zwischen 48 und 96 Stunden nach der Reanimation gemessen. Es sind keine Studien zur seriellen Messung von PLCHO nach Reanimation bekannt, sodass keine Ergebnisse zum Vergleich der beobachteten Kinetik vorliegen. Um diesen Konzentrationsverlauf zu bestätigen und zu reproduzieren, sind weitere Untersuchungen notwendig. Der beschriebene Verlauf ereignete sich in unserer Studie in beiden Untergruppen, sodass wir aus dem Abfall der Cholinkonzentration keinen Hinweis für das neurologische Ergebnis ableiten können. Sowohl die Untersuchung des absoluten Abfalls in beiden Gruppen (ΔCholin 90Min-72h) als auch der prozentuale Abfall der Cholinkonzentration im Plasma brachten keine statistisch eindeutigen Ergebnisse hervor.

Die Cholinkonzentrationen erreichten Werte jenseits der 5. Perzentile des Referenzbereichs in unserem Labor. In der uns bekannten Literatur konnten wir keine so deutlich erniedrigten Werte (unter 5 µmol/L) bei einem Studienkollektiv feststellen. Nach einer Woche des Fastens sank die Plasmacholinkonzentration in einer Studie nur auf 7,8 ± 0,3 µmol/L (Mittelwert und Standardabweichung) [59]. Auch nach großen operativen Eingriffen und schweren Schädel-Hirn-Traumata ist ein Abfall der Cholinkonzentration beschrieben [96, 97]. In der einen Studie wurden niedrige Cholinkonzentrationen bereits eine Stunde postoperativ erreicht und hielten anschließend für 72 Stunden an [96]. In der Studie von Ulus et al. waren niedrige Konzentrationen für 48 Stunden postoperativ messbar. Beide Studien haben kleine Fallzahlen (16-36 Patienten) untersucht.

Die in unserer Studie gemessenen Blutwerte könnten für einen Cholinmangel 48-72 Stunden nach der Reanimation sprechen. Es konnte bereits in tierexperimentellen Studien gezeigt werden, dass die Cholinkonzentration im Plasma gut mit dem vorhandenen Cholinangebot im Gehirn korreliert [98]. Es ist auch bekannt (s. Kapitel 1.5), dass Cholin für die normale Entwicklung des Organismus und vor allem des Gedächtnisses und des zentralen Nervensystems wichtig ist. Daher ist ein erhöhter Cholinbedarf während der Neuroregeneration vorstellbar. Um einem etwaigen Cholindefizit in dieser Phase zu begegnen, wäre die Cholinsubstitution ein möglicher Schritt. Es liegen bereits experimentelle aber auch schon klinische Studien vor, die den Einfluss einer Cholinsubstitution bei Störungen des zentralen Nervensystems (ZNS) untersucht haben [99-101]. Die zitierten Arbeiten haben jedoch den Effekt einer Cholinsubstitution bei fokalen ZNS Schädigungen, wie Apoplex und ICB untersucht und beschreiben teilweise ermutigende Ergebnis-

se. Weitere Untersuchungen sind nötig, um eine genauere Aussage zur Effektivität einer Cholinsubstitution treffen zu können, insbesondere im Hinblick auf eine globale Hypoxie.

Gegen Ende des Beobachtungszeitraumes kam es zum erneuten und signifikanten Anstieg der Plasmacholinkonzentration in beiden untersuchten Gruppen. Dabei wiesen Patienten der Gruppe mit schlechtem neurologischem Ergebnis leicht höhere Werte auf als Patienten der anderen Gruppe. Am Ende des Beobachtungszeitraumes von sieben Tagen lagen die Messwerte in beiden Gruppen im oberen Bereich des Referenzfensters. Der Wiederanstieg geschah ohne, dass eine explizite Cholinsubstitution vorgenommen worden wäre. Es ist daher möglich, dass der Organismus eine Zeit lang benötigt, um Cholin für die Zellregeneration zu mobilisieren und dieses Zeitfenster eventuell durch Substitution sinnvoll zu überbrücken wäre.

Eine andere vorstellbare Möglichkeit ist die Abhängigkeit der Cholinkonzentration von der Körpertemperatur. Die MTH könnte Einfluss auf die gemessene Plasmacholinkonzentration haben. In einer Untersuchung an isolierten Rattenhirnen konnte gezeigt werden, dass bei 37°C mehr Cholin freigesetzt wurde als bei niedrigeren Temperaturen [83]. Allerdings wurde auch bei einer Temperatur von 50°C weniger Cholin freigesetzt. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Cholinfreisetzung enzymatisch geschieht. Die Aktivität der menschlichen Enzyme ist temperaturabhängig und hat ihr Maximum größtenteils bei normaler Körpertemperatur (36,9°C). Eine Veränderung der Körpertemperatur geht daher mit verminderter Enzymaktivität einher und könnte so niedrigere Cholinkonzentrationen bei Patienten mit MTH erklären.

Exzessiver Calciumeinstrom in hypoxische Zellen gilt als ein wichtiger Faktor bei der Entstehung postischämischer Schäden, da es zum einen zur Aktivierung verschiedenster intrazellulärer Siganlübertragungswege und zum anderen zur mitochondrialen Dysfunktion kommt. Zusätzlich findet Calcium-getriggert eine vermehrte Transmitterausschüttung statt, was zu einer Excitotoxizität führt. Alle genannten Mechanismen können zu Apoptose oder Nekrose führen und werden unter MTH gehemmt [29]. Diese hemmende Wirkungsweise der MTH unterstützt die These einer Temperaturabhängigkeit der Plasmacholinkonzentration. Durch reduzierten Calciumeinstrom unter Hypothermie könnte es zu verminderter Aktivität der Calcium-abhängigen, zytosolischen Phospholipase A2 und konsekutiv zu verminderter Cholinfreisetzung kommen. Wie unter 1.5.3

Diskussion 61

beschrieben, ist die Calcium-abhängige Phospholipase A₂ hauptsächlich an der Freisetzung von Cholin beteiligt [69, 70]. Dieser Mechanismus könnte deshalb die niedrigen Cholinkonzentrationen bei Patienten unter MTH erklären. Allerdings konnten wir keine enge zeitliche Korrelation zwischen einer Änderung der Körpertemperatur und einer Änderung in der Plasmacholinkonzentration feststellen. Der Abfall der Cholinkonzentration beginnt beim Erreichen der therapeutischen Temperatur und erreicht sein Minimum etwa 40 Stunden nach Erreichen der Zieltemperatur von 33°C. 48 Stunden nach Beendigung der MTH kam es dann zum Wiederanstieg der Cholinkonzentration. Der beschriebene Verlauf ist weiter oben unter Abbildung 8 zu finden. Aus den vorliegenden Daten kann keine definitive Aussage bezüglich einer kausalen Korrelation zwischen der Plasmacholinkonzentration und der Körpertemperatur getroffen werden. Zur genaueren Analyse sind weitere Untersuchungen nötig.

Der Verlauf der Plasmacholinkonzentration bei Patienten nach primär erfolgreicher kardiopulmonaler Reanimation und Behandlung mit milder therapeutischer Hypothermie scheint einer reproduzierbaren Kinetik zu unterliegen. Es kam im Verlauf der Untersuchung und nach initial erhöhten Werten bei allen Patienten zu einem deutlichen Abfall der Plasmacholinkonzentration. Dabei könnten die metabolischen Veränderungen im Rahmen der MTH eine Rolle spielen. Es besteht jedoch keine enge zeitliche Korrelation zwischen den niedrigen PLCHO-Werten und der Hypothermie. Vielmehr ist es vorstellbar, dass sich der Organismus nach einer Zeit des Zelluntergangs während des Kreislaufstillstands in einer Phase der Zellregeneration und des Zellumsatzes befindet und dabei einem erhöhten Cholinbedarf unterliegt. Dieser Bedarf scheint zwischenzeitlich vom Organismus nicht ausreichend gedeckt werden zu können. Eine sinnvolle Maßnahme könnte daher eine vermehrte Bereitstellung von Cholin oder Cholinderivaten im Sinne einer Substitution mit der Ernährung sein, wie sie auch schon bei Schlaganfallpatienten und Schädel-Hirn-Traumata angedacht wurde (s.o.). Um dieser Hypothese nach zu gehen, sind weitere Untersuchungen nötig. Aktuell läuft eine große Studie zur Cholinsubstitution nach Schädel-Hirn-Trauma (COBRIT Studie), in die etwa 1200 Patienten eingeschlossen werden sollen [102]. Die Ergebnisse könnten auch einen wichtigen Hinweis für die mögliche Effektivität der Cholinsubstitution zur Reduktion hypoxisch bedingter neuronaler Schäden geben.

Das Studienkollektiv stellte sich in den meisten untersuchten Basisparametern in typischer Weise dar. Dennoch ist die Belastbarkeit der statistischen Ergebnisse durch die geringe Fallzahl kompromittiert.

Der initiale Rhythmus war in unserer Untersuchung bei Patienten mit einem guten neurologischen Ergebnis signifikant häufiger schockbar als in der anderen Gruppe. Dieser Zusammenhang ist so bereits in anderen Studien beschrieben [103]. Selbst wenn sich der schockbare Rhythmus erst im Laufe der Reanimation einstellt, haben die Patienten eine bessere Überlebenschance als Patienten mit durchgehend nicht-schockbarem Rhythmus [104].

Eine stattgefundene Laienreanimation war in unserer Studie ebenfalls signifikant häufiger in der Gruppe mit dem besseren neurologischen Ergebnis zu finden. Es ist davon auszugehen, dass diese Korrelation auch einen kausalen Zusammenhang hat. In der Literatur ist wiederholt beschrieben, dass Patienten mit einem Herzkreislaufstillstand bessere Überlebenschancen haben, wenn die Reanimation frühzeitig begonnen wird [105, 106]. In unserer Studie fällt eine relativ hohe Rate an Laienreanimationen von 55% im Gesamtkollektiv und sogar 87,5% in Gruppe 1 auf. Eine schwedische Studie stellte im Verlauf der Jahre 1992 bis 2005 einen Anstieg der Laienreanimationen von 31% auf 50% fest [105]. Dieser Trend lässt sich an unseren Zahlen bestätigen. Die Verbesserung könnte durch eine breitere Schulung der Bevölkerung in BLS bedingt sein. Die Zahlen zeigen jedoch auch, dass noch immer knapp die Hälfte der Betroffenen keine Laienreanimation erhält. In unserer Studie sind 70% der Kreislaufstillstände beobachtet worden. Dagegen erhielten nur 55% eine Laienreanimation, wie bereits weiter oben beschrieben. Diese Diskrepanz sollte weiter verringert werden, um das neurologische Ergebnis von Patienten nach kardiopulmonaler Reanimation zu verbessern. Nach wie vor gilt hier die Regel "time is brain" und eine lange "no-flow" Zeit durch fehlende oder mangelhafte Reanimationsbemühungen kann im Verlauf der Behandlung nicht wieder aufgeholt werden. Die Schulung der Bevölkerung sollte zu diesem Zweck weiter intensiviert werden.

In unserer Untersuchung fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen in der Reanimationsdauer bis zum Wiedereinsetzen eines spontanen Kreislaufs. Hinweise für eine protrahierte Reanimation im Subkollektiv der verstorbenen Patienten fanden sich in unserer Studie nicht. Die Zeit bis ROSC betrug in der CPC 5 Grup-

pe im Median 22,5 (15,25 – 40) Minuten. Eine protrahierte Reanimation ist typischerweise mit einer schlechteren Überlebenswahrscheinlichkeit vergesellschaftet [33]. In der Untersuchung von Oddo et al. überlebten 65% der Patienten mit einer Reanimationsdauer von ≤ 25 Minuten. Ab einer Dauer von 25 Minuten waren es nur noch 3,1%.

Auch die verabreichten Adrenalindosen haben sich nicht signifikant unterschieden. Dies war bei einer ähnlichen Reanimationsdauer in beiden Gruppen so zu erwarten, da laut Leitlinien alle 3-5 Minuten 1mg Adrenalin verabreicht werden soll [41]. Auffälligerweise dauerten die Reanimationsbemühungen im Krankenhaus länger als außerhalb des Krankenhauses (42,5 (28,75 – 56,25) versus 20 (13,5 – 25) Minuten; p = 0,022). Aufgrund der kürzeren Wege und der schnellen Einleitung einer Reanimation durch Ersthelfer wäre hier auch eine kürzere Dauer der Reanimation vorstellbar gewesen. Die lange Dauer könnte durch vermehrte Multimorbidität der betroffenen Patienten im Krankenhaus bedingt sein. Aus dem gleichen Grund haben diese Patienten üblicherweise eine schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit als Patienten, die einen Herzstillstand außerhalb des Krankenhauses erleiden.

Ein hochsignifikanter Unterschied zeigte sich in der Serumkonzentration der NSE an Tag 3. Die Patienten in Gruppe 1 hatten deutlich niedrigere Werte als Patienten in Gruppe 2. Wir können in unserer Untersuchung bestätigen, dass niedrige NSE Werte mit einem guten neurologischen Ergebnis vergesellschaftet sind und dass Patienten mit schlechtem neurologischem Ergebnis erhöhte NSE Werte an Tag 3 aufweisen. Die NSE ist zurzeit der wichtigste Biomarker zur Prognoseabschätzung nach Reanimation. Seit Einführung der milden therapeutischen Hypothermie ist der aktuell gültige Grenzwert zur sicheren Prädiktion eines schlechten Ergebnisses nicht mehr ausreichend zuverlässig [39]. Dennoch kann die NSE frühzeitig Hinweise auf das zu erwartende neurologische Ergebnis liefern, wie unsere Daten zeigen. Falsch hohe Ergebnisse in Gruppe 2 unserer Untersuchung könnten in seltenen Fällen paraneoplastisch bedingt sein. Aufgrund der im Studienverlauf beobachteten neurologischen Entwicklung der Patienten ist davon nicht auszugehen.

5.1 Diskussion der Methodik

In der vorliegenden Arbeit wurden 20 Patienten entsprechend der unter Kapitel 3.1.2 definierten Einschlusskriterien in einer prospektiven Beobachtungsstudie untersucht. Beobachtungsstudien sind generell nicht-interventionelle Studien. Im Sinne der evi-

denzbasierten Medizin haben Beobachtungsstudien einen geringeren Evidenzgrad als randomisierte kontrollierte Studien. Sie spielen jedoch für die Entwicklung neuer Hypothesen eine wichtige Rolle und können auch erste Hinweise für deren Gültigkeit liefern. Damit stellen Beobachtungsstudien einen wichtigen Baustein in der Grundlagenforschung dar. Eine serielle Bestimmung der Plasmacholinkonzentration bei Patienten nach Reanimation ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Es war daher das Ziel eine Beobachtungsstudie durchzuführen, um einen Einblick in mögliche Korrelationen zwischen dem bestimmten Marker Plasmacholin und dem neurologischen Ergebnis der Patienten zu erhalten. Die Kausalität möglicher Korrelationen lässt sich mit Hilfe von Beobachtungsstudien nicht hundertprozentig sicher erfassen, da ein Einfluss durch Confounder (Störgrößen) schwieriger festzustellen ist als bei interventionellen Studien. Hierfür sind weiterführende Untersuchungen nötig.

Alle in das Studienkollektiv eingeschlossenen Patienten erlitten zwischen Juni 2010 und Mai 2011 einen Herz-Kreislaufstillstand und wurden nach erfolgreicher Reanimation auf einer der beiden internistischen Intensivstationen der Charité – Campus Virchow Klinikum aufgenommen.

Die Abnahmezeitpunkte der Proben waren zu Beginn des stationären Aufenthaltes sehr engmaschig angesetzt (alle 30 Minuten), da in Studien an Tieren und isolierten Geweben sofort nach Reperfusion eine Ausschwemmung von Cholin stattfand [69, 70]. In der Literatur ist außerdem eine kurze Halbwertszeit von 10 Minuten für Cholin beschrieben [67]. Im weiteren Verlauf einer Woche wurden die restlichen Proben gesammelt. So war es möglich Veränderungen der Cholinkonzentration im Plasma sicher zu erfassen. Die zeitlich aufwendige Methode zur Datensammlung führte dazu, dass primär nur 26 Patienten in die Studie eingeschlossen werden konnten. Durch diese geringe Fallzahl konnten wahrscheinlich vorhandene Effekte nicht immer sicher statistisch nachgewiesen werden.

Die Verarbeitung der Proben erfolgte jeweils gleich nach Blutentnahme im eigenen Labor der Arbeitsgruppe auf der Intensivstation. Eine nachträgliche Freisetzung ins Plasma und somit eine Verfälschung der Cholinkonzentration in den Proben, wie in der Literatur teilweise beschrieben, erscheint daher unwahrscheinlich [85, 86]. Die Plasmaproben wurden zur Messung per Kurier in ein spezialisiertes, internationales Referenz-Labor verschickt (Bevital, Bergen, Norwegen) [74]. Der Versand erfolgte auf

Diskussion 65

Trockeneis und die Temperatur der Proben wurde kontinuierlich überwacht. Es traten keine Unregelmäßigkeiten im Temperaturverlauf auf, sodass hier nicht von einer Fehlerquelle auszugehen ist. Die Vorbereitung der Proben für den Transport erfolgte etappenweise, um die Proben möglichst kurz im flüssigen Aggregatzustand vorliegen zu haben. Auch hier ist durch die kurze Dauer der Verarbeitung nicht mit einer Verfälschung der Plasmakonzentrationen zu rechnen. Die Cholinkonzentration ist im EDTA Plasma relativ stabil, wie schon in Kapitel 3.1.4 und weiter oben beschrieben [85, 86].

Die Messung des freien Cholins im Plasma erfolgte mittels HPLC-MS. Diese Analysemethode stellt ein Standardverfahren zur Messung polarer Substanzen in komplexen Stoffgemischen dar und ist durch eine sehr hohe Messgenauigkeit gekennzeichnet. Diese wurde durch den Einsatz eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers weiter gesteigert, wie unter 3.2.3 beschrieben. Ein Nachteil besteht in der Kostenintensität. Die Verarbeitung und Messung der Proben vor Ort erfolgte gemäß einem laborinternen Standardprotokoll. Dabei wurde ein automatisiertes System zur Verarbeitung genutzt, um die Präzision zu erhöhen. Während der Analyse der Proben wurden repetitiv Kalibrierungs- sowie Kontrolllösungen in die Messreihe integriert, um die Messgenauigkeit zu überprüfen und zu erhöhen. Unregelmäßigkeiten während der Messung wurden durch das beauftragte Labor nicht berichtet. Alternativ sind in der Literatur auch enzymatische und photometrische Methoden zur Cholinbestimmung beschrieben (siehe auch Kapitel 3.2). Zum einen ist die Kopplung der HPLC mit einem Fluoreszenzdetektor möglich. Dabei reagiert die Hydroxylgruppe des Cholins mit einem Isocyanat. Nach Auftrennung in der HPLC kann das fluoreszierende Cholinderivat detektiert werden [107]. Zum anderen existiert ein Verfahren unter Ausnutzung der Chemolumineszenz. Dabei kann Cholin unter Katalyse der Cholinoxidase zu Betain reagieren. Es entsteht Wasserstoffperoxid. welches unter Entsendung eines Lichtsignals weiterreagiert. Das Lichtsignal ist proportional zur Cholinkonzentration in der Probe [88, 108]. In den jeweiligen Studien korrelierten die gemessenen Konzentrationen gut mit der Referenzmethode HPLC-MS. Dies zeigt, dass die HPLC-MS zurzeit den Goldstandard zur Cholinbestimmung im Blutplasma darstellt.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Plasmacholin (PLCHO) als möglicher zerebraler Biomarker nach kardiopulmonaler Reanimation untersucht. Besondere Berücksichtigung erfuhr hierbei die milde therapeutische Hypothermie (MTH). Seit Einführung der MTH sind die etablierten Marker zur Prädiktion des neurologischen Ergebnisses nicht mehr ausreichend zuverlässig. Cholin erwies sich in Studien als Hypoxiemarker, da es aus den Zellmembranen nekrotischer und apoptotischer Zellen durch die Phosphlipase A2 freigesetzt wird. In Form von Phosphatidylcholin ist es in den Membranen aller Zellen des Körpers vorhanden und kann für diesen und andere Zwecke vom Organismus nicht in ausreichender Menge "de novo" synthetisiert werden. Es ist deshalb ein essentieller Nahrungsbestandteil. Unsere Fragestellung lautete daher:

- Wird Cholin nach hypoxischen Zuständen in großen, messbaren Mengen freigesetzt und ist die Kinetik durch die MTH beeinflusst?
- Besitzt Plasmacholin in Abhängigkeit von der Höhe der Plasmakonzentration einen prädiktiven Wert für das neurologische Ergebnis der Patienten?
- Liegt die Plasmacholinkonzentration des Studienkollektivs im Referenzbereich Erwachsener oder gibt es Abweichungen durch die erlittene Hypoxie?

In der Studie erfolgte die serielle Messung von Plasmaproben mittels einer Normalphasen - Hochleistungsflüssigchromatografie gekoppelt an ein Triple - Quadrupol - Massenspektrometer. Die Kopplung wurde durch Elektrospray Ionisation erreicht. 16 Blutproben wurden über den Zeitraum einer Woche je Patient akquiriert, um die Kinetik des Plasmacholins bestimmen zu können. Die initialen Abnahmen erfolgten dreißigminütig mit fortlaufender Vergrößerung der Intervalle, da Cholin eine kurze Halbwertszeit von 10 Minuten aufweist und das initiale Maximum erfasst werden sollte. Parallel registrierten wir den Verlauf der Köpertemperatur, das Alter, das Geschlecht, den initialen Rhythmus, die verabreichte Adrenalindosis, die Dauer der Reanimation, die Respiratorstunden, den APACHE II Score, die NSE an Tag 3, die Aufenthaltsdauer, den Ort der Reanimation sowie das neurologische Ergebnis bei Entlassung mit Hilfe der "Cerebral Performance Category" (CPC), um das Patientenkollektiv zu charakterisieren. Aus dem Gesamtkollektiv von 26 Patienten wurden 20 Patienten retrospektiv ausgewählt und anhand des neurologischen Ergebnisses in zwei Gruppen geteilt (Gruppe 1: gutes Ergebnis, n=8, CPC 1-2; Gruppe 2: schlechtes Ergebnis, n=12, CPC 3-5).

Die Mehrzahl der Patienten wies erhöhte Cholinkonzentrationen bei Aufnahme auf. Patienten mit schlechtem neurologischem Ergebnis (Gruppe 2) hatten initial höhere Plasmacholinkonzentrationen als Patienten mit gutem neurologischem Ergebnis. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war jedoch statistisch nicht signifikant. 90 Minuten nach ROSC zeigte sich ein größerer Unterschied zwischen beiden untersuchten Gruppen. Die nähere Betrachtung mittels ROC Kurve ergab für den Cut-Off von 17,2 µmol/L eine Spezifität von 100% und eine Sensitivität von 36%. Sollte sich dieses Ergebnis in einer Folgeuntersuchung bestätigen lassen, könnte PLCHO eventuell als Frühmarker zur Prognostik herangezogen werden. Im weiteren Verlauf der Untersuchung näherten sich die Plasmakonzentrationen zwischen beiden Gruppen an und es gab zu keinem Zeitpunkt der Studie einen statistisch signifikanten Unterschied in der Plasmacholinkonzentration zwischen den beiden Gruppen. Eine Vorhersage des neurologischen Ergebnisses mittels der Plasmacholinkonzentration war nicht sicher möglich. Zusätzlich konnten wir bei allen Patienten einen signifikanten Abfall der Konzentration unter die 5. Perzentile des Referenzbereichs 48-96 Stunden nach Reanimation (p=0,001), gefolgt von einem signifikanten Wiederanstieg (p=0,002) beobachten.

Der Konzentrationsverlauf des Plasmacholins unter MTH scheint einer reproduzierbaren Kinetik zu unterliegen. Möglicherweise ist der Abfall durch eine Hemmung der cholinfreisetzenden Enzyme unter Hypothermie zu erklären. In diesem Zusammenhang ist es vorstellbar, dass die Aktivierung der zytosolischen Phosphlipase A₂ durch verminderte intrazelluläre Calciumkonzentration unter MTH ausbleibt und somit niedrige Cholinkonzentrationen auftreten. Es bestand jedoch keine enge zeitliche Korrelation der gemessenen Plasmacholinwerte zur Veränderung der Körpertemperatur unter MTH, sodass eine Kausalität diesbezüglich unklar bleibt.

Aufgrund der vom Referenzbereich deutlich abweichenden Cholinkonzentrationen ist es ebenfalls gut vorstellbar, dass sich der Organismus nach einer Zeit des Zelluntergangs während des Kreislaufstillstands in einer Phase der Zellregeneration und des Zellumsatzes befindet und dabei einem erhöhten Cholinbedarf unterliegt. Dieser Bedarf scheint vom Organismus nicht dauerhaft ausreichend gedeckt werden zu können. Eine sinnvolle Maßnahme könnte daher eine vermehrte Bereitstellung von Cholin oder Cholinderivaten im Sinne einer Substitution mit der Ernährung sein. Um dieser Hypothese nach zu gehen, sind weitere Untersuchungen notwendig.

Literaturverzeichnis

- 1. Statistisches-Bundesamt-Deutschland. *Todesursachenstatistik*. 2010 [cited 2012 29.01.]; Available from: http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Aktuell.psml.
- 2. Zheng, Z.J., Croft, J.B., Giles, W.H., and Mensah, G.A., Sudden Cardiac Death in the United States, 1989 to 1998. Circulation, 2001. **104**(18): p. 2158-2163.
- 3. Bottiger, B.W., Grabner, C., Bauer, H., et al., Long term outcome after out-of-hospital cardiac arrest with physician staffed emergency medical services: the Utstein style applied to a midsized urban/suburban area. Heart, 1999. **82**(6): p. 674-9.
- 4. de Vreede-Swagemakers, J.J., Gorgels, A.P., Dubois-Arbouw, W.I., et al., *Out-of-hospital cardiac arrest in the 1990's: a population-based study in the Maastricht area on incidence, characteristics and survival.* Journal of the American College of Cardiology, 1997. **30**(6): p. 1500-5.
- 5. Eckstein, M., Stratton, S.J., and Chan, L.S., *Cardiac Arrest Resuscitation Evaluation in Los Angeles: CARE-LA.* Annals of emergency medicine, 2005. **45**(5): p. 504-9.
- 6. McNally, B., Robb, R., Mehta, M., et al., Out-of-hospital cardiac arrest surveillance --- Cardiac Arrest Registry to Enhance Survival (CARES), United States, October 1, 2005--December 31, 2010. Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries, 2011. **60**(8): p. 1-19.
- 7. Pell, J.P., Sirel, J.M., Marsden, A.K., et al., *Presentation, management, and outcome of out of hospital cardiopulmonary arrest: comparison by underlying aetiology.* Heart, 2003. **89**(8): p. 839-42.
- 8. Laver, S., Farrow, C., Turner, D., and Nolan, J., *Mode of death after admission to an intensive care unit following cardiac arrest.* Intensive care medicine, 2004. **30**(11): p. 2126-8.
- 9. Rossen, R., Kabat, H., and Anderson, J.P., *Acute arrest of cerebral circulation in man.* Arch Neurol Psychiatry, 1943. **50**: p. 510-28.
- 10. Cavus, E., Bein, B., Dorges, V., et al., *Brain tissue oxygen pressure and cerebral metabolism in an animal model of cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation*. Resuscitation, 2006. **71**(1): p. 97-106.
- 11. Winn, H.R., Rubio, R., and Berne, R.M., *Brain adenosine production in the rat during 60 seconds of ischemia*. Circulation research, 1979. **45**(4): p. 486-92.
- 12. Corbett, R.J. and Laptook, A.R., 31P NMR relaxation does not affect the quantitation of changes in phosphocreatine, inorganic phosphate, and ATP measured in vivo during complete ischemia in swine brain. Journal of neurochemistry, 1993. **61**(1): p. 144-9.
- 13. Padosch, S.A. and Bottiger, B.W., Neuronal apoptosis following cerebral ischaemia: pathophysiology and possible therapeutic implications. Current opinion in anaesthesiology, 2003. **16**(5): p. 439-45.
- 14. Vanbrabant, P., Dhondt, E., Billen, P., and Sabbe, M., *Aetiology of unsuccessful prehospital witnessed cardiac arrest of unclear origin.* European journal of emergency medicine: official journal of the European Society for Emergency Medicine, 2006. **13**(3): p. 144-7.

- 15. Kurkciyan, I., Meron, G., Sterz, F., et al., Spontaneous subarachnoid haemorrhage as a cause of out-of-hospital cardiac arrest. Resuscitation, 2001. **51**(1): p. 27-32.
- 16. Koster, R.W., Baubin, M.A., Bossaert, L.L., et al., Basismaßnahmen zur Wiederbelebung Erwachsener und Verwendung automatisierter externer Defibrillatoren: Sektion 2 der Leitlinien zur Reanimation 2010 des European Resuscitation Council. Notfall + Rettungsmedizin, 2010. **13**(7): p. 523-542.
- 17. Nolan, J.P., Soar, J., Zideman, D.A., et al., *European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2010 Section 1. Executive summary.* Resuscitation, 2010. **81**(10): p. 1219-76.
- 18. Nolan, J.P., Soar, J., Zideman, D.A., et al., *Kurzdarstellung*. Notfall + Rettungsmedizin, 2010. **13**(7): p. 515-522.
- 19. Moule, P., Checking the carotid pulse: diagnostic accuracy in students of the healthcare professions. Resuscitation, 2000. **44**(3): p. 195-201.
- 20. Eberle, B., Dick, W.F., Schneider, T., et al., Checking the carotid pulse check: diagnostic accuracy of first responders in patients with and without a pulse. Resuscitation, 1996. **33**(2): p. 107-16.
- 21. Benson, D.W., Williams, G.R., Jr., Spencer, F.C., and Yates, A.J., *The use of hypothermia after cardiac arrest.* Anesthesia and analgesia, 1959. **38**: p. 423-8.
- 22. Williams, G.R., Jr. and Spencer, F.C., *The clinical use of hypothermia following cardiac arrest.* Annals of surgery, 1958. **148**(3): p. 462-8.
- 23. Rosomoff, H.L., *Hypothermia and cerebral vascular lesions. II. Experimental middle cerebral artery interruption followed by induction of hypothermia.* A.M.A. archives of neurology and psychiatry, 1957. **78**(5): p. 454-64.
- 24. Safar, P., *Community-Wide Cardiopulmonary Resuscitation*. Journal of the Iowa Medical Society, 1964. **54**: p. 629-35.
- 25. The-Hypothermia-After-Cardiac-Arrest-Study-Group, *Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest.* The New England journal of medicine, 2002. **346**(8): p. 549-56.
- 26. Bernard, S.A., Gray, T.W., Buist, M.D., et al., *Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia.* The New England journal of medicine, 2002. **346**(8): p. 557-63.
- 27. Testori, C., Sterz, F., Behringer, W., et al., *Mild therapeutic hypothermia is associated with favourable outcome in patients after cardiac arrest with non-shockable rhythms.* Resuscitation, 2011. **82**(9): p. 1162-7.
- 28. Storm, C., Nee, J., Krueger, A., Schefold, J.C., and Hasper, D., 2-year survival of patients undergoing mild hypothermia treatment after ventricular fibrillation cardiac arrest is significantly improved compared to historical controls. Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine, 2010. 18: p. 2.
- 29. Polderman, K.H., *Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia.* Critical care medicine, 2009. **37**(7 Suppl): p. S186-202.
- 30. Herlitz, J., Castren, M., Friberg, H., et al., *Post resuscitation care: what are the therapeutic alternatives and what do we know?* Resuscitation, 2006. **69**(1): p. 15-22.

- 31. Böttiger, B.W., Arntz, H.-R., Chamberlain, D.A., et al., *Thrombolysis during Resuscitation for Out-of-Hospital Cardiac Arrest.* New England Journal of Medicine, 2008. **359**(25): p. 2651-2662.
- 32. Deasy, C., Bray, J.E., Smith, K., et al., Cardiac arrest outcomes before and after the 2005 resuscitation guidelines implementation: Evidence of improvement? Resuscitation, 2011. **82**(8): p. 984-988.
- 33. Oddo, M., Ribordy, V., Feihl, F., et al., *Early predictors of outcome in comatose survivors of ventricular fibrillation and non-ventricular fibrillation cardiac arrest treated with hypothermia: a prospective study.* Critical care medicine, 2008. **36**(8): p. 2296-301.
- 34. Cummins, R.O., Chamberlain, D.A., Abramson, N.S., et al., Recommended guidelines for uniform reporting of data from out-of-hospital cardiac arrest: the Utstein Style. A statement for health professionals from a task force of the American Heart Association, the European Resuscitation Council, the Heart and Stroke Foundation of Canada, and the Australian Resuscitation Council. Circulation, 1991. **84**(2): p. 960-75.
- 35. Geocadin, R.G., Buitrago, M.M., Torbey, M.T., et al., *Neurologic prognosis and withdrawal of life support after resuscitation from cardiac arrest.* Neurology, 2006. **67**(1): p. 105-8.
- 36. Prohl, J., Rother, J., Kluge, S., et al., *Prediction of short-term and long-term outcomes after cardiac arrest: a prospective multivariate approach combining biochemical, clinical, electrophysiological, and neuropsychological investigations.* Critical care medicine, 2007. **35**(5): p. 1230-7.
- 37. Sunde, K., Dunlop, O., Rostrup, M., et al., *Determination of prognosis after cardiac arrest may be more difficult after introduction of therapeutic hypothermia.* Resuscitation, 2006. **69**(1): p. 29-32.
- 38. Leithner, C., Ploner, C.J., Hasper, D., and Storm, C., *Does hypothermia influence the predictive value of bilateral absent N20 after cardiac arrest?* Neurology, 2010. **74**(12): p. 965-9.
- 39. Steffen, I.G., Hasper, D., Ploner, C.J., et al., Mild therapeutic hypothermia alters neuron specific enolase as an outcome predictor after resuscitation: 97 prospective hypothermia patients compared to 133 historical non-hypothermia patients. Critical care, 2010. **14**(2): p. R69.
- 40. Rossetti, A.O., Oddo, M., Logroscino, G., and Kaplan, P.W., *Prognostication after cardiac arrest and hypothermia: a prospective study.* Annals of neurology, 2010. **67**(3): p. 301-7.
- 41. Nolan, J.P., Hazinski, M.F., Billi, J.E., et al., *Part 1: Executive summary: 2010 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science With Treatment Recommendations.* Resuscitation, 2010. **81 Suppl 1**: p. e1-25.
- 42. Wijdicks, E.F., Hijdra, A., Young, G.B., Bassetti, C.L., and Wiebe, S., *Practice parameter: prediction of outcome in comatose survivors after cardiopulmonary resuscitation (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology.* Neurology, 2006. **67**(2): p. 203-10.
- 43. Al Thenayan, E., Savard, M., Sharpe, M., Norton, L., and Young, B., *Predictors of poor neurologic outcome after induced mild hypothermia following cardiac arrest.* Neurology, 2008. **71**(19): p. 1535-7.

- 44. Rittenberger, J.C., Sangl, J., Wheeler, M., Guyette, F.X., and Callaway, C.W., Association between clinical examination and outcome after cardiac arrest. Resuscitation, 2010. **81**(9): p. 1128-32.
- 45. Bisschops, L.L., van Alfen, N., Bons, S., van der Hoeven, J.G., and Hoedemaekers, C.W., *Predictors of poor neurologic outcome in patients after cardiac arrest treated with hypothermia: a retrospective study.* Resuscitation, 2011. **82**(6): p. 696-701.
- 46. Wijdicks, E.F., Parisi, J.E., and Sharbrough, F.W., *Prognostic value of myoclonus status in comatose survivors of cardiac arrest.* Annals of neurology, 1994. **35**(2): p. 239-43.
- 47. Schefold, J.C., Storm, C., Kruger, A., Ploner, C.J., and Hasper, D., *The Glasgow Coma Score is a predictor of good outcome in cardiac arrest patients treated with therapeutic hypothermia.* Resuscitation, 2009. **80**(6): p. 658-61.
- 48. Zandbergen, E.G., Hijdra, A., Koelman, J.H., et al., *Prediction of poor outcome within the first 3 days of postanoxic coma.* Neurology, 2006. **66**(1): p. 62-8.
- 49. Hasselblatt, M., Mooren, F.C., von Ahsen, N., et al., Serum S100beta increases in marathon runners reflect extracranial release rather than glial damage. Neurology, 2004. **62**(9): p. 1634-6.
- 50. von Strecker, A., *Beobachtungen über die Galle verschiedener Thiere.* Justus Liebigs Annalen der Chemie, 1849. **70**(2): p. 149-197.
- 51. Strecker, A., *Ueber einige neue Bestandtheile der Schweinegalle.* Justus Liebigs Annalen der Chemie, 1862. **123**(3): p. 353-360.
- 52. Zeisel, S.H. and da Costa, K.A., *Choline: an essential nutrient for public health.* Nutrition reviews, 2009. **67**(11): p. 615-23.
- 53. Shin, O.H., Mar, M.H., Albright, C.D., et al., *Methyl-group donors cannot prevent apoptotic death of rat hepatocytes induced by choline-deficiency.* Journal of cellular biochemistry, 1997. **64**(2): p. 196-208.
- 54. Buchman, A.L., Sohel, M., Brown, M., et al., *Verbal and visual memory improve after choline supplementation in long-term total parenteral nutrition: a pilot study.* JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition, 2001. **25**(1): p. 30-5.
- 55. Meck, W.H. and Williams, C.L., Characterization of the facilitative effects of perinatal choline supplementation on timing and temporal memory. Neuroreport, 1997. **8**(13): p. 2831-5.
- 56. Meck, W.H. and Williams, C.L., Simultaneous temporal processing is sensitive to prenatal choline availability in mature and aged rats. Neuroreport, 1997. **8**(14): p. 3045-51.
- 57. Li, Q., Guo-Ross, S., Lewis, D.V., et al., *Dietary prenatal choline supplementation alters postnatal hippocampal structure and function.* Journal of neurophysiology, 2004. **91**(4): p. 1545-55.
- 58. Blusztajn, J.K., Cermak, J.M., Holler, T., and Jackson, D.A., *Imprinting of hippocampal metabolism of choline by its availability during gestation: implications for cholinergic neurotransmission.* Journal of physiology, Paris, 1998. **92**(3-4): p. 199-203.
- 59. Savendahl, L., Mar, M.H., Underwood, L.E., and Zeisel, S.H., *Prolonged fasting in humans results in diminished plasma choline concentrations but does not cause liver dysfunction.* The American journal of clinical nutrition, 1997. **66**(3): p. 622-5.

- 60. Zeisel, S.H., Da Costa, K.A., Franklin, P.D., et al., *Choline, an essential nutrient for humans.* The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 1991. **5**(7): p. 2093-8.
- 61. Buchman, A.L., Ament, M.E., Sohel, M., et al., *Choline deficiency causes reversible hepatic abnormalities in patients receiving parenteral nutrition: proof of a human choline requirement: a placebo-controlled trial.* JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition, 2001. **25**(5): p. 260-8.
- 62. Zeisel, S.H., *Choline: needed for normal development of memory.* Journal of the American College of Nutrition, 2000. **19**(5 Suppl): p. 528S-531S.
- 63. Buchman, A.L., Sohel, M., Moukarzel, A., et al., *Plasma choline in normal newborns, infants, toddlers, and in very-low-birth-weight neonates requiring total parenteral nutrition.* Nutrition, 2001. **17**(1): p. 18-21.
- 64. Shaw, G.M., Carmichael, S.L., Yang, W., Selvin, S., and Schaffer, D.M., *Periconceptional dietary intake of choline and betaine and neural tube defects in offspring.* American journal of epidemiology, 2004. **160**(2): p. 102-9.
- 65. Kuczler, F.J., Nahrwold, D.L., and Rose, R.C., *Choline influx across the brush border of guinea pig jejunum.* Biochimica et biophysica acta, 1977. **465**(1): p. 131-7.
- 66. Zeisel, S.H., *Dietary choline: biochemistry, physiology, and pharmacology.* Annual review of nutrition, 1981. **1**: p. 95-121.
- 67. Roivainen, A., Forsback, S., Gronroos, T., et al., *Blood metabolism of [methyl-11C]choline; implications for in vivo imaging with positron emission tomography.* European journal of nuclear medicine, 2000. **27**(1): p. 25-32.
- 68. Vorland, M., Thorsen, V.A., and Holmsen, H., *Phospholipase D in platelets and other cells.* Platelets, 2008. **19**(8): p. 582-94.
- 69. Bruhl, A., Hafner, G., and Loffelholz, K., Release of choline in the isolated heart, an indicator of ischemic phospholipid degradation and its protection by ischemic preconditioning: no evidence for a role of phospholipase D. Life sciences, 2004. **75**(13): p. 1609-20.
- 70. Klein, J., Holler, T., Cappel, E., Koppen, A., and Loffelholz, K., *Release of choline from rat brain under hypoxia: contribution from phospholipase A2 but not from phospholipase D.* Brain research, 1993. **630**(1-2): p. 337-40.
- 71. Konstantinova, S.V., Tell, G.S., Vollset, S.E., et al., *Divergent associations of plasma choline and betaine with components of metabolic syndrome in middle age and elderly men and women.* The Journal of nutrition, 2008. **138**(5): p. 914-20.
- 72. Friesen, R.W., Novak, E.M., Hasman, D., and Innis, S.M., *Relationship of dimethylglycine, choline, and betaine with oxoproline in plasma of pregnant women and their newborn infants.* The Journal of nutrition, 2007. **137**(12): p. 2641-6.
- 73. Ozarda Ilcol, Y., Uncu, G., and Ulus, I.H., Free and phospholipid-bound choline concentrations in serum during pregnancy, after delivery and in newborns. Archives of physiology and biochemistry, 2002. **110**(5): p. 393-9.
- 74. BEVITAL. *Internetseite des Labors*. [cited 2012 03.03.]; Available from: http://www.bevital.no.
- 75. LeLeiko, R.M., Vaccari, C.S., Sola, S., et al., *Usefulness of elevations in serum choline and free F2)-isoprostane to predict 30-day cardiovascular outcomes in*

- patients with acute coronary syndrome. The American Journal of Cardiology, 2009. **104**(5): p. 638-43.
- 76. Danne, O., Lueders, C., Storm, C., Frei, U., and Mockel, M., Whole blood choline and plasma choline in acute coronary syndromes: prognostic and pathophysiological implications. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry, 2007. **383**(1-2): p. 103-9.
- 77. Danne, O., Mockel, M., Lueders, C., et al., *Prognostic implications of elevated whole blood choline levels in acute coronary syndromes.* The American Journal of Cardiology, 2003. **91**(9): p. 1060-7.
- 78. Mockel, M., Danne, O., Muller, R., et al., *Development of an optimized multimarker strategy for early risk assessment of patients with acute coronary syndromes.* Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry, 2008. **393**(2): p. 103-9.
- 79. Korth, U., Krieter, H., Denz, C., et al., *Intestinal ischaemia during cardiac arrest and resuscitation: comparative analysis of extracellular metabolites by microdialysis.* Resuscitation, 2003. **58**(2): p. 209-17.
- 80. Klein, J., *Membrane breakdown in acute and chronic neurodegeneration: focus on choline-containing phospholipids.* Journal of neural transmission, 2000. **107**(8-9): p. 1027-63.
- 81. Gardiner, M., Nilsson, B., Rehncrona, S., and Siesjo, B.K., *Free fatty acids in the rat brain in moderate and severe hypoxia.* Journal of neurochemistry, 1981. **36**(4): p. 1500-5.
- 82. Ikeda, M., Yoshida, S., Busto, R., Santiso, M., and Ginsberg, M.D., *Polyphosphoinositides as a probable source of brain free fatty acids accumulated at the onset of ischemia.* Journal of neurochemistry, 1986. **47**(1): p. 123-32.
- 83. Zeisel, S.H., *Formation of unesterified choline by rat brain.* Biochimica et biophysica acta, 1985. **835**(2): p. 331-43.
- 84. Scremin, O.U. and Jenden, D.J., Focal ischemia enhances choline output and decreases acetylcholine output from rat cerebral cortex. Stroke, 1989. **20**(1): p. 92-5.
- 85. Yue, B., Pattison, E., Roberts, W.L., et al., *Choline in whole blood and plasma:* sample preparation and stability. Clinical chemistry, 2008. **54**(3): p. 590-3.
- 86. Holm, P.I., Ueland, P.M., Kvalheim, G., and Lien, E.A., *Determination of choline, betaine, and dimethylglycine in plasma by a high-throughput method based on normal-phase chromatography-tandem mass spectrometry.* Clinical chemistry, 2003. **49**(2): p. 286-94.
- 87. Wang, F.L. and Haubrich, D.R., *A simple, Sensitive, and Specific Assay for Free Choline in Plasma.* Analytical Biochemistry, 1975. **63**: p. 195-201.
- 88. Adamczyk, M., Brashear, R.J., Mattingly, P.G., and Tsatsos, P.H., *Homogeneous chemiluminescent assays for free choline in human plasma and whole blood.* Analytica chimica acta, 2006. **579**(1): p. 61-7.
- 89. Schwedt, G., *Analytische Chemie*. zweite ed2008, Weinheim: WILEY-VCH Verlag. p. 405.
- 90. Wink, M., *Molekulare Biotechnologie: Konzepte, Methoden und Anwendungen.* Zweite ed2011, Weinheim: WILEY-VCH. p. 120-121.

- 91. Nau, H., Steinberg, P., and Kietzmann, M., *Lebensmitteltoxikologie: Rückstände und Kontaminanten: Risken und Verbraucherschutz.* erste ed2003, Berlin: Blackwell Verlag. p. 72-73.
- 92. Dörner, K., *Klinische Chemie und Hämatologie.* siebte ed2009, Stuttgart: Georg Thieme Verlag. p. 91-92.
- 93. Matissek, R., Steiner, G., and Fischer, M., *Lebensmittelanalytik*. vierte ed2009, Heidelberg: Springer Verlag. p. 376-377.
- 94. Bühl, A. and Zöfel, P., SPSS 11 Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows. achte ed2002, München: Pearson Studium. p. 287-316.
- 95. Djuricic, B., Olson, S.R., Assaf, H.M., et al., Formation of free choline in brain tissue during in vitro energy deprivation. Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 1991. **11**(2): p. 308-13.
- 96. Ilcol, Y.O., Uncu, G., Goren, S., Sayan, E., and Ulus, I.H., *Declines in serum free and bound choline concentrations in humans after three different types of major surgery.* Clinical chemistry and laboratory medicine: CCLM / FESCC, 2004. **42**(12): p. 1390-5.
- 97. Ulus, I.H., Ozyurt, G., and Korfali, E., *Decreased serum choline concentrations in humans after surgery, childbirth, and traumatic head injury.* Neurochemical research, 1998. **23**(5): p. 727-32.
- 98. Klein, J., Koppen, A., and Loffelholz, K., *Small rises in plasma choline reverse the negative arteriovenous difference of brain choline.* Journal of neurochemistry, 1990. **55**(4): p. 1231-6.
- 99. Sahin, S., Alkan, T., Temel, S.G., et al., Effects of citicoline used alone and in combination with mild hypothermia on apoptosis induced by focal cerebral ischemia in rats. Journal of clinical neuroscience: official journal of the Neurosurgical Society of Australasia, 2010. **17**(2): p. 227-31.
- 100. Secades, J.J., Alvarez-Sabin, J., Rubio, F., et al., *Citicoline in intracerebral haemorrhage: a double-blind, randomized, placebo-controlled, multi-centre pilot study.* Cerebrovascular diseases, 2006. **21**(5-6): p. 380-5.
- 101. Turkkan, A., Alkan, T., Goren, B., et al., *Citicoline and postconditioning provides neuroprotection in a rat model of ischemic spinal cord injury.* Acta neurochirurgica, 2010. **152**(6): p. 1033-42.
- 102. Zafonte, R., Friedewald, W.T., Lee, S.M., et al., *The citicoline brain injury treatment (COBRIT) trial: design and methods.* Journal of neurotrauma, 2009. **26**(12): p. 2207-16.
- 103. Holmgren, C., Bergfeldt, L., Edvardsson, N., et al., *Analysis of initial rhythm, witnessed status and delay to treatment among survivors of out-of-hospital cardiac arrest in Sweden.* Heart, 2010. **96**(22): p. 1826-30.
- 104. Kajino, K., Iwami, T., Daya, M., et al., Subsequent ventricular fibrillation and survival in out-of-hospital cardiac arrests presenting with PEA or asystole. Resuscitation, 2008. **79**(1): p. 34-40.
- 105. Hollenberg, J., Herlitz, J., Lindqvist, J., et al., *Improved survival after out-of-hospital cardiac arrest is associated with an increase in proportion of emergency crew--witnessed cases and bystander cardiopulmonary resuscitation.* Circulation, 2008. **118**(4): p. 389-96.

- 106. Ritter, G., Wolfe, R.A., Goldstein, S., et al., *The effect of bystander CPR on survival of out-of-hospital cardiac arrest victims.* American heart journal, 1985. **110**(5): p. 932-7.
- 107. McEntyre, C.J., Slow, S., and Lever, M., Measurement of plasma free choline by high performance liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with 1-naphthyl isocyanate. Analytica chimica acta, 2009. **644**(1-2): p. 90-4.
- 108. Lueders, C., Danne, O., Müller, C., Storm, C., and Möckel, M., *Evaluation of a Chemiluminescent Assay for Analysis of Choline in Human Plasma and Whole Blood.* Laboratory Medicine, 2007. **38**(12): p. 726-728.

Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. med. Christian Storm für die freundliche Überlassung des Themas sowie für seine Unterstützung bei der Planung der Arbeit und der Einarbeitung in die Geräte.

Herrn PD Dr. Storm gilt auch mein ganzer Dank für die exzellente Betreuung während der Durchführung der Studie; aber auch darüber hinaus über den gesamten Zeitraum der Arbeit. Besonders bedanken möchte ich mich noch für die Durchsicht der Arbeit und die konstruktiven Anregungen.

Ich danke Herrn Dr. med. Christoph Leithner für die Durchsicht der Arbeit.

Ich danke allen Kolleginnen und Kollegen der Klinik, die mich unterstützt haben.

Ich danke meiner Freundin Anna für das Verständnis und die Unterstützung Patienten auch zu später Stunde in die Studie einschließen zu können.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Erklärung

Ich, Tim Schröder, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

"Serielle Messung der Plasmacholinkonzentration bei Patienten nach kardiopulmonaler Reanimation unter besonderer Berücksichtigung der milden therapeutischen Hypothermie"

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 22.05.2012

Tim Schröder