

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie

Direktorin: Frau Professor Dr. med. G.F.E. Nöldge-Schomburg

**TLR2-Defizienz verbessert das Überleben und das funktionell-
neurologische Behandlungsergebnis von Mäusen nach
Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation.**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Anne Güter, geb. am 25.06.1988 in Hagenow
aus Rostock

Rostock 2015

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger

- 1. Gutachter:** PD Dr. med. Jan P. Roesner
Klinikum Südstadt; Rostock
- 2. Gutachter:** Prof. Dr. med. Patrick Meybohm
Universitätsklinikum Frankfurt
- 3. Gutachter:** Prof. Dr. med. Peter Rosenberger
Universitätsklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin;
Tübingen

Datum der Einreichung: 30.11.2015

Datum der Verteidigung: 29.03.2015

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
AEDs	automatische externe Defibrillatoren
AK	Antikörper
AP1	Activator Protein 1
art.	arteriell
ATP	Adenosintriphosphat
AZ	Allgemeinzustand
BE	Blutentnahme
BGA	Blutgasanalyse
Bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CA	cardiac arrest
ca.	circa
CAE	Chloracetotestrase
cm	Zentimeter
CPR	kardio- pulmonale Reanimation
d	Tag
DAMP	damage associated molecular pattern
dl	Deziliter
EK	Erstkontakt
EKG	Elektrokardiogramm
F _I O ₂	Fraktion der inspiratorischen Sauerstoff Konzentration
G	Gauge

g	Gramm
GCS	Glasgow Coma Skale
h	Stunde
HMGB1	high-mobility group box1
HSP	Hitze-Schock- Protein
IL-18	Interleukin-18
IL-1	Interleukin-1
IL-12	Interleukin-12
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
i.p.	intraperitoneal
IRIS	Ischämie, Reperfusion, Inflammation und Sepsis
i.v.	intravenös
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
LTA	Lipotaichonsäure
LPS	Lipopolysaccharid
μ g	Mikrogramm
MAP	mittlerer arterieller Druck
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MTH	milde therapeutische Hypothermie
MV	Mecklenburg Vorpommern
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

PAMP	pathogen- associated- molecular- pattern
PCI	percutaneous coronary intervention
rpm	rounds per minute
ROSC	return of spontaneous circulation
s	Sekunden
SEM	Standardfehler
Tab.	Tabelle
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TRL2 ^{-/-}	Toll-like-Rezeptor 2 Defizienz
V.	Vena
vs.	versus
WMT	Water Maze-Test
WT	Wild-Typ
z.B.	zum Beispiel
ZVK	zentraler Venenkatheter

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 - Schematische Darstellung des TRL und seiner intrazellulären Signaltransduktionswege
- Abb. 2 - Reanimationsarbeitsplatz mit Beatmungsgerät und Überwachungsmonitor
- Abb. 3 - intubierte und beatmete Maus mit anliegendem EKG, rektaler Temperatursonde und nicht invasiver Ableitung des MAP an der Schwanzarterie vor Anlage des ZVK
- Abb. 4 - Ansicht des Überwachungsmonitors nach Induktion des Herzkreislaufstillstandes mit KCl
- Abb. 5 - zeitliches Ablaufschema der Durchführungstage neurophysiologischer Tests
- Abb. 6 - Punktevergabe im NeuroScore-Test
- Abb. 7 - Bewertungskriterien des Allgemeinzustandes
- Abb. 8 - Maus auf RotaRod
- Abb. 9 - Maus im Elevated Plus Maze-Test
- Abb. 10 - Maus nach erfolgreichem Auffinden der Plattform im WaterMaze-Test
- Abb. 11 - PCR Analyse der Tierstämme
- Abb. 12 - Stimulationsversuch mit Lipotaichonsäure in WT und TLR2^{-/-}
- Abb. 13 - TLR2 Expression der Zona fasciculata der Nebenniere
- Abb. 14 - Überlebenskurve nach 28 Beobachtungstagen
- Abb. 15 - Übersicht relatives Körpergewicht
- Abb. 16 - Plasmakonzentrationen von Corticosteron 8h nach CA/CPR
- Abb. 17 - Plasmakonzentration von IL-1 β 8h nach CA/CPR
- Abb. 18 - Plasmakonzentration von IL-6 8h nach CA/CPR

Abb. 19 - Hippocampus – Kontrolle, 50-fache Vergrößerung, Nissl

Abb. 20 - Hippocampus – fünfter Tag nach CA/CPR, 50-fache Vergrößerung, Nissl

Abb. 21 - Hippocampus – Kontrolle, 100-fache Vergrößerung, Nissl

Abb. 22 - Hippocampus – fünfter Tag nach CA/CPR, 100-fache Vergrößerung, Nissl

Abb. 23 - Lunge – fünfter Tag nach CA/CPR, 50-fache Vergrößerung, CEA

Abb. 24 - Leber – fünfter Tag nach CA/CPR, 50-fache Vergrößerung, HE

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	14
1.1 Der reanimationspflichtige Herz-Kreislaufstillstand und die kardiopulmonale Reanimation	14
1.2 Postreanimationserkrankung	15
1.3 Toll-like Rezeptoren	16
1.4 Fragestellung	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Versuchstiere	20
2.2 Voruntersuchungen	21
2.3 Reanimationsmodell	22
2.4 Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation	24
2.5. Nachbeobachtung	25
2.5.1 Überleben der Tiere	26
2.5.2 Körpergewicht	26
2.5.3 NeuroScore	26
2.5.4 Allgemeinzustand	27
2.5.5 RotaRod-Test	28
2.5.6 Elevated Plus Maze-Test	29
2.5.7 WaterMaze-Test	30
2.6 Inflammationsparameter	32
2.7 Histologie	33
2.8 Auswertung und Statistik	33
3. Ergebnisse	34
3.1 Vorversuche	34
3.1.1 PCR-Analyse	34
3.1.2 LTA-Stimulation	35
3.1.3 Immunhistologie	35
3.1.4 Gruppengröße/ Ausschlusskriterien	36
3.2 ROSC und Zeit bis zur Extubation	37
3.3 Überleben	37
3.4 Funktionell-neurologische Untersuchung	38
3.4.1 Körpergewicht	38
3.4.2 NeuroScore	40
3.4.3 Allgemeinzustand	41

3.4.4 RotaRod-Test	41
3.4.5 Elevated PlusMaze-Test.....	42
3.4.6 WaterMaze-Test	47
3.5 Inflammationsparameter	48
3.6 Histologie.....	50
4. Diskussion	53
4.1 Versuchstiere	53
4.1.1 Weibliche Maus	53
4.1.2 Größe, Alter, Gewicht.....	54
4.1.3 Gruppengröße	55
4.2 Voruntersuchungen	55
4.3 Reanimationsmodell	56
4.3.1 Narkose	56
4.3.2 Beatmung.....	57
4.3.3 Blutdruckmessung	57
4.3.4 Temperaturmessung	58
4.3.5 Zentraler Venen-Katheter	59
4.4 Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation	60
4.4.1 Induktion des Herz-Kreislaufstillstandes	60
4.4.2 Zeit des Herz-Kreislaufstillstandes.....	60
4.4.3 Beobachtungszeitraum	61
4.5 Nachbeobachtung	62
4.5.1 Überleben.....	62
4.5.2 Körpergewicht	62
4.5.3 NeuroScore.....	63
4.5.4 Allgemeinzustand	64
4.5.5 RotaRod-Test	64
4.5.6 Elevated Plus Maze-Test.....	65
4.5.7 WaterMaze-Test	66
4.5.8 Stress- und Inflammationsparameter	68
4.5.9 Histologie	69
4.6 Theorie zum Pathomechanismus	69
5. Schlussfolgerung	71
6. Literatur	73
7. Selbstständigkeitserklärung.....	79

8. Lebenslauf.....	80
9. Thesen zur Dissertation	82

1. Einleitung

1.1 Der reanimationspflichtige Herz-Kreislaufstillstand und die kardiopulmonale Reanimation

Der reanimationspflichtige Herz-Kreislaufstillstand ist ein häufiges Ereignis. In Europa werden jährlich rund 350.000 Patienten präklinisch reanimiert [1]. Durch den mit dem Herzstillstand einhergehenden Zirkulationsstopp des Blutes kommt es zur Ischämie in allen Bereichen des Körpers. Die geringste Toleranz gegenüber einer Ischämie weist das Gehirn auf. Bereits 15 Sekunden nach Beginn einer globalen Ischämie des Hirngewebes setzt eine Bewusstlosigkeit ein [2]. Ein ca. 3-minütiger Herz-Kreislaufstillstand kann bereits zu irreparablen Hirnparenchymschäden führen [2].

Die entstehende Sauerstoff- und Nährstoffunterversorgung sowie der mangelnde Abtransport von Stoffwechselprodukten aktivieren verschiedene molekulare Mechanismen, die teilweise irreversible Schädigungen der Zellen induzieren. Von Parks und Granger konnte 1986 erstmals an intestinalem Gewebe gezeigt werden, dass eine Ischämie zu deutlichen Schäden der Zellen führt [3]. Folgt auf eine Ischämie eine Reperfusion, kann sich der initiale Gewebsschaden verstärken. Parks und Granger verglichen dazu eine Ischämiezeit von drei Stunden und einer anschließenden einstündigen Reperfusion mit einer alleinigen Ischämie von vier Stunden. Es konnte gezeigt werden, dass die zur Erhaltung des Organs notwendige Reperfusion zunächst zu einer Aggravierung des Ischämie-induzierten Schadens führen kann [3].

Trotz zahlreicher Fortschritte auf dem Gebiet der Grundlagenforschung, Intensivmedizin und der neusten Reanimationsleitlinien ist das Überleben und das funktionell-neurologische Behandlungsergebnis der betroffenen Patienten nach wie vor unbefriedigend schlecht. Innerhalb der letzten 30 Jahre hat sich die Überlebensrate nach CA (cardia carrest, Herzstillstand) und CPR (cardio-pulmonary-resuscitation, kardiopulmonale Reanimation) nicht wesentlich verbessert. Zeigte die Studie von Wilson et al. 1984 ein Überleben von 8,7%, so sind es im Jahr 2007, wie von Morrison et al. dargestellt, 5,1% [4]. Nur etwa 50% der Betroffenen mit Herz-Kreislaufstillstand konnten erfolgreich reanimiert und in ein Krankenhaus eingeliefert werden. Von diesen Patienten sterben bis zu 70% im

Verlauf der Behandlung auf der Intensivtherapiestation [1]. Nur etwa 0,6-1,8% der Patienten überleben ein solches Ereignis ohne neurologisches Defizit [5].

Bisher gibt es nur wenige etablierte Therapiestrategien, die das Überleben und das funktionell-neurologische Behandlungsergebnis von Patienten mit Herz-Kreislaufstillstand nachweislich verbessern. Dazu gehören unter anderem die regelmäßige Schulung der Bevölkerung zur Durchführung einer suffizienten Laienreanimation und die Verfügbarkeit von AEDs (automatische externe Defibrillatoren) an öffentlichen Orten [4]. Zu den etablierten Therapieverfahren in der Klinik zählen das Therapiekonzept der milden therapeutischen Hypothermie (MTH), die schnellstmögliche Stabilisierung der Vitalparameter sowie die frühzeitige Durchführung einer PCI (percutaneous coronary intervention, perkutane Koronarintervention) bei Verdacht auf ein akutes Koronarsyndrom als Ursache des Herz-Kreislaufstillstandes [6], [7].

1.2 Postreanimationserkrankung

Im Rahmen einer erfolgreichen kardiopulmonalen Reanimation mit Wiederherstellung des Spontankreislaufes (ROSC, return of spontaneous circulation) kommt es zur erneuten Durchblutung und Reoxygenierung der Gewebe [1]. In dieser Phase entwickelt sich der postischämische Reperfusionsschaden. Wie heute bekannt ist, wird dieser unter anderem durch die Toxizität von Sauerstoffradikalen verursacht, welche die DNS (Desoxyribonukleinsäure) schädigen, Membranstrukturen oxidieren und Enzymstrukturen verändern können. Eine Mediatorfreisetzung aus geschädigten Zellen führt gleichzeitig zur Aktivierung von Zytokinkaskaden. Daraus folgt eine Steigerung der Expression von Adhäsionsmolekülen auf den Oberflächen von Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen. Diese Vorgänge führen zu einer vermehrten Adhäsion von Leukozyten an das vaskuläre Endothel, einer Aktivierung des Gerinnungssystems und konsekutiv zu schweren Mikrozirkulationsstörungen [8]. Das sogenannte „no-reflow“-Phänomen konnte erstmals in den 1960er Jahren an Gehirnen von Kaninchen gezeigt werden. Nach längerer Ischämiephase war der Blutfluss, auch nach Wiederherstellung einer normalen Blutversorgung, im Vergleich minimiert [9]. Apoptotische sowie nekrotische Prozesse auf zellulärer Ebene werden aktiviert.

Aus hochgradig geschädigten Zellen werden Moleküle wie das Hitze-Schock-Protein (HSP), high-mobility-group-box 1 (HMGB1)-Proteine und weitere DAMPs (damage associated molecular patterns) wie z.B. Biglycan und Hyaluronsäure freigesetzt. Diese Proteine dienen als endogene Liganden der auf den äußeren Zellmembranen gebundenen Toll-like Rezeptoren (TLR). Somit führt eine globale Ischämie und Reperfusion über TLR zu einer Aktivierung des Immunsystems [10]. TLR werden auch in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde exprimiert und üben dort einen Einfluss auf die Glucocortikoidsynthese aus. Einer globalen Ischämie und Reperfusion folgt eine sterile Inflamationsreaktion unter Beteiligung des Immunsystems, des Gerinnungssystems und der neuroendokrinen Achse mit Auswirkung auf den gesamten Organismus. Die klinischen Zeichen entsprechen denen einer Sepsis mit dem Potential eines Multiorganversagens. Man spricht dabei von der Postreanimationserkrankung oder dem sepsis like syndrom [11].

1.3 Toll-like Rezeptoren

Die TLR sind eine Gruppe von Transmembranproteinen mit Ähnlichkeit zur Interleukin-Familie [12]. Sie wurden Mitte der 1980er Jahre entdeckt. Die ersten genaueren Untersuchungen zur Differenzierung fanden in der Forschungsgruppe um die Nobelpreisträgerin Christiane Nüsslein-Volhard an der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* statt. Primär wurden sie den Zellen des angeborenen Immunsystems zugeordnet. Spätere Forschungsarbeiten haben jedoch gezeigt, dass sie auf nahezu allen Zellen des Körpers exprimiert werden [13]. TLR reagieren auf verschiedene PAMPs (pathogen associated molecular patterns), genetisch hochkonservierte Moleküle und Proteinstrukturen, die von Mikroorganismen wie Bakterien, Viren oder Pilzen stammen. Außerdem erkennen sie endogene Mediatoren, sogenannte DAMPs, die z.B. während einer Stressreaktion von geschädigten körpereigenen Zellen ausgeschüttet werden [14]. TLR vermitteln über verschiedene Signalwege unter anderem eine Hochregulation von NF- κ B (nuclearfactor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells), AP1 (Activator Protein 1) und verschiedener Interferone, was insgesamt zu einem Konzentrationsanstieg der proinflammatorischen Zytokine im Körper und somit zu einer Aktivierung der Effektorzellen des angeborenen Immunsystems führt. Die wichtigsten freigesetzten Zytokine sind IL-1 (Interleukin-1), TNF α (Tumor Nekrose Faktor α), IL-6 (Interleukin-6), IL-12 (Interleukin-12) und IL-18 (Interleukin-18) [15].

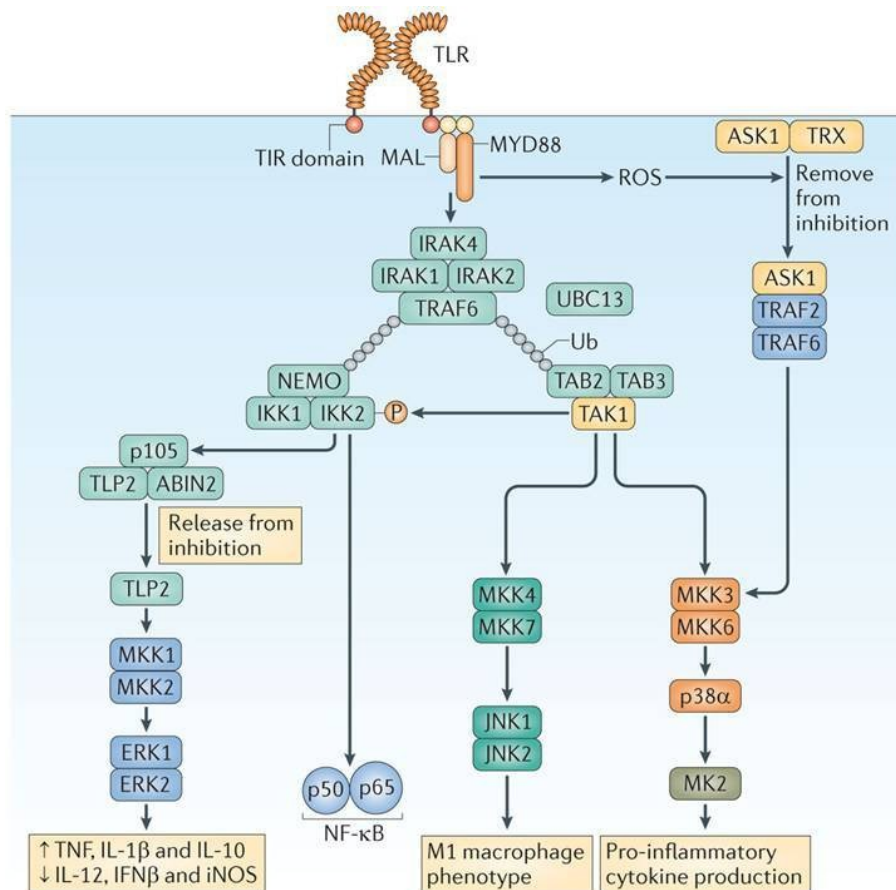


Abb1. Schematische Darstellung des TLR und seiner intrazellulären Signaltransduktionswege (modifiziert nach J. Simon mitogen- activated protein kinase innate immunity)

Bis heute sind 13 TLR identifiziert worden, davon zwölf im murinen und zehn im humanen Genom. TLR1 bis TLR9 werden sowohl im Menschen als auch in der Maus exprimiert [16] [17].

Der TLR2 wird ubiquitär exprimiert. So ist dieser Rezeptor z.B. auf Zellen der Leber, des Herzens, der Niere, der Nebenniere und in den intestinalen Epithelien zu finden. Im Gehirn sind sie auf Zellen der Mikroglia, Astrozyten, Oligodendrozyten und auch auf den Neuronen nachzuweisen [14]. Hier dienen sie der Regulation des Energiestoffwechsels sowie der Differenzierung von neuronalen Strukturen.

Bekannte Liganden der TLR2 aus den Gruppen der DAMPs und PAMPs sind z.B. bakterielle Lipoproteine, Lipopolysaccharid (LPS) von gram-positiven Bakterien und Hitzeschockproteine [14]. Eine Auflistung der Liganden ist der Tabelle 1.3.1 zu entnehmen. Durch die Bildung von funktionellen Heterodimeren mit TLR1 und auch TLR6 erhöht sich das Spektrum der Liganden des TLR2 maßgeblich.

Rezeptor	PAMPs mikrobielle Invasion/Infektion	DAMPs endogener Gewebsschaden
TLR2	Lipoprotein/Lipopetid Peptidoglycan Lipotaichonsäure Lipoarabinomannan A phenol- soluble modulin Glycoinositolphospholipide Glycolipide Porine Zymosan atypische Lipopolysaccharid	HSP dsDNA Harnsäure HMGB1 Serum amyloid A
TLR1/2	Tri-acyl lipopeptide lösliche Faktoren Oberflächenprotein A (<i>Borrelia burgdorferi</i>)	
TLR6/2	Di-acyl Lipopeptide	

Tab.1 Liganden des TLR2

In verschiedenen tierexperimentellen Studien wurde bereits ein positiver Effekt einer TLR2-Defizienz nach Ischämie und Reperfusion auf Einzelorgane dargestellt. Favre et al. zeigten, dass die postischämische Dysfunktion koronarer Endothelzellen bei Mäusen mit TLR2-Defekt signifikant geringer ausgeprägt ist [18]. Im Rahmen der Schlaganfallforschung wurde nach ischämischer Schädigung des Gehirns ein protektiver Effekt bei Bestehen einer TLR2-Defizienz durch Tang et al. dargestellt [19]. Auch für die Niere ließ sich ein geringerer Untergang von Nephronen nach Ischämie und Reperfusion bei vorhandener TLR2-Defizienz im Vergleich zu Wildtyp-Tieren nachweisen [20]. Dies führt zu der Vermutung, dass dem TLR2 in der Pathogenese der Postreanimationserkrankung eine wichtige Rolle zukommt.

1.4 Fragestellung

In der vorliegenden Untersuchung sollte folgende Fragestellung beantwortet werden: Welchen Einfluss hat eine TLR2-Defizienz auf das Überleben und das funktionell-neurologische Behandlungsergebnis von Mäusen nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation?

Des Weiteren wurde geprüft, ob sich ein möglicher positiver Effekt auch durch pharmakologische Hemmung des TLR2 bei Wildtyp-Tieren erzielen lässt.

Da der TLR2 eine enge Verknüpfung mit dem Immunsystem aufweist, wurde untersucht, ob sich durch Unterschiede in den Inflamationsparametern IL-1 β , IL-6 und Kortikosteron zwischen den Versuchsgruppen Divergenzen ergeben.

Als Grundlage diente ein etabliertes, valides und hochstandardisiertes Kleintierreanimationsmodell der Arbeitsgruppe IRIS (Ischämie, Reperfusion, Inflammation, Sepsis) [21]. Dieses ist besonders zur Grundlagenforschung der Pathophysiologie des Ischämie- und Reperfusionsschadens nach Herz-Kreislaufstillstand geeignet.

Die Fragestellung, mit der sich diese Arbeit beschäftigt lautet demnach: Verbessert eine TLR2-Defizienz das Überleben und das funktionell-neurologische Behandlungsergebnis von Mäusen nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation?

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die vorliegende Arbeit ist eine prospektive, randomisierte und kontrollierte tierexperimentelle Untersuchung. Die Genehmigung des Tierversuches erfolgte durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei MV unter dem Aktenzeichen LALLF MV/TSD/7221.3-1.1-073/10.

Die verwendeten Tiere hatten ein Alter von 12-16 Wochen und ein Körpergewicht von 20-24g (hauseigene Zucht). Bereits sieben Tage vor Beginn der Versuche wurden die Tiere aus den Aufzuchtträumen zur Gewöhnung in die Laborräume des Institutes für experimentelle Chirurgie gebracht. Die Haltung erfolgte in standardisierten Käfigen. Es bestand zu jeder Zeit freier Zugang zu Wasser und Laborfutter. Ein geregelter 12 Stunden Tag-/Nachtrhythmus war gegeben. Die Raumtemperatur betrug 22°C bei konstanter Luftfeuchtigkeit von 45%.

Zu Beantwortung der Fragestellung erfolgte eine Einteilung des Experimentes in zwei Abschnitte.

Zum einen wurde eine Langzeitstudie zur Prüfung des Überlebens sowie der funktionell-neurologischen Regeneration nach Reanimation durchgeführt. In einem zweiten Ansatz prüfte eine Kurzzeitstudie, in der zur Untersuchung der Pathophysiologie des Postreanimationssyndroms acht Stunden (h) nach CA/CPR die Inflamationsparameter Kortikosteron, IL-1 β und IL-6 im Blut der Tiere bestimmt wurden, ob sich zwischen diesen Unterschiede ergaben. Um die Basalwerte der Inflamationsparameter zu bestimmen, wurde den gleichen Tieren 14 Tage zuvor Blut in Allgemeinanästhesie entnommen.

Als Wildtyp-Tiere (WT) der Kontrollgruppe dienten weibliche C57BL/6J Mäuse, als TLR2-defiziente Tiere (TLR2^{-/-}) Weibchen des Stammes B6.129-Tlr2^{tm1Kir}/J, die auf dem Hintergrund der C57BL/6J Mäuse gezüchtet wurden. Zur Prüfung eines therapeutischen Ansatzes installierten wir eine dritte Versuchsgruppe (WT-AK2.5), für die weibliche C57BL/6J Mäuse genutzt wurden, die während der Reanimation 0,5 μ g je Gramm (g) Körpergewicht eines in 0,9% Kochsalzlösung gelösten blockierenden Anti-TLR2-Antikörpers (Antikörper T2.5; Hycult Biotech, Anti-Mouse TLR2, Clone T2.5, Cat.#: HM1054b, Lot.#: 5523M20) intravenös appliziert bekamen.

Die Zuordnung der Tiere erfolgte in sechs Gruppen.

Langzeitstudie			
1.) WT	CA/CPR 8 min	Überleben und Neurotests	n= 35
2.) TLR2 ^{-/-}	CA/CPR 8 min	Überleben und Neurotests	n= 35
3.) WT-AK2.5	CA/CPR 8 min	Überleben und Neurotests	n= 17
Kurzzeitstudie			
4.) WT	CA/CPR 8 min	Blutentnahme (BE) nach 8h	n= 6
5.) TLR2 ^{-/-}	CA/CPR 8 min	BE nach 8h	n= 6
6.) WT-AK2.5	CA/CPR 8 min	BE nach 8h	n= 6

Tab.2 Versuchsgruppen

2.2 Voruntersuchungen

Bereits während der Etablierung des Kleintierreanimationsmodells fanden folgende Voruntersuchungen statt:

Genetischer TLR2-Status

In einem ersten Untersuchungsgang wurde der TLR2-Status der Tierstämme auf genetischer Ebene mittels PCR-Analyse und Immunhistochemie geprüft [22]. In der Immunhistochemie wurde die TLR2 Expression in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde, dem Ort der Glucocortikoidsynthese, dargestellt.

Funktioneller TLR2-Status

In einem weiteren Schritt wurde die Funktionalität des Rezeptors überprüft. Dazu wurde ein Stimulationsversuch mit Lipoteichonsäure (LTA), einem spezifischen Liganden für den Toll-like Rezeptor 2, durchgeführt. Die Tiere beider Gruppen, WT und TLR2^{-/-}, erhielten 1mg LTA/kg Körpergewicht intraperitoneal (i.p.) appliziert. Nach acht Stunden erfolgten die Laparotomie und Blutentnahme aus der Pfortader sowie die Bestimmung der Plasmakonzentration von Corticosteron im Blut.

2.3 Reanimationsmodell

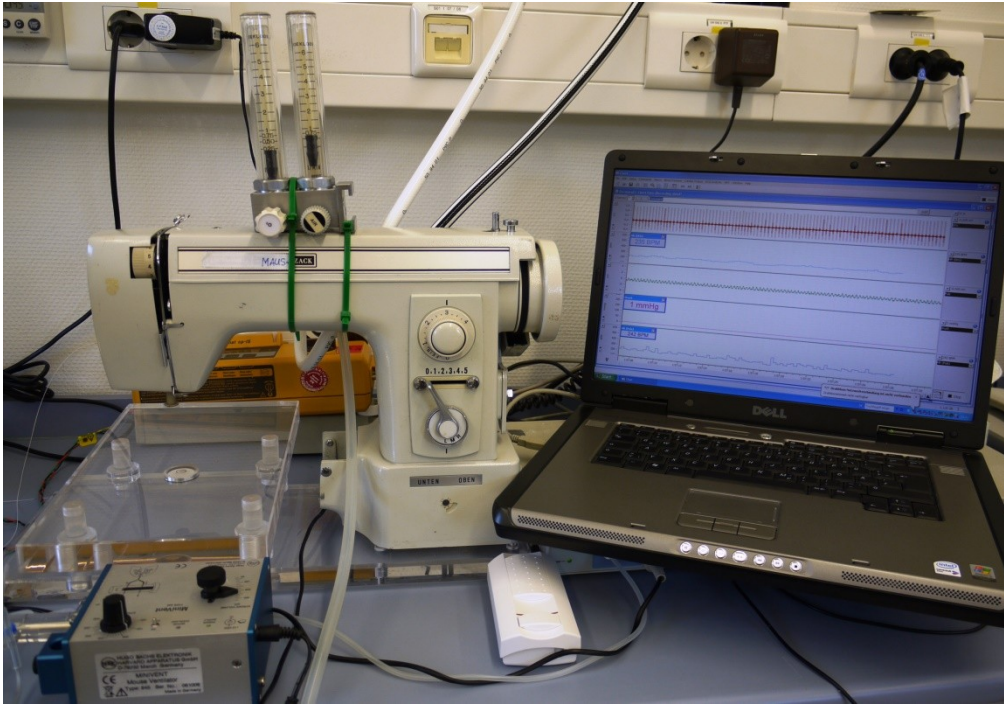


Abb. 2 Reanimationsarbeitsplatz mit Beatmungsgerät und Überwachungsmonitor

Die Untersuchung basiert auf einem etablierten und weiterentwickelten Kleintierreanimationsmodell [21]. Die Versuchstiere wurden vor Beginn der Präparation durch intraperitoneale Applikation mit einem Gemisch aus Xylazin (8 $\mu\text{g/g}$) und Ketamin (12 $\mu\text{g/g}$) narkotisiert. Das Tier wurde unter einem Operationsmikroskop (Leica M651, Leica Microsysteme Hamburg) gelagert. Nach orotrachealer Intubation (Braunüle 22G) erfolgte die kontrollierte maschinelle Beatmung mit Raumluft ($F_{\text{I}}\text{O}_2$ von 0,21), Atemfrequenz 130/min, Tidalvolumen 10 $\mu\text{l/g}$ (MiniVent Ventilator Typ 845, Hugo Sachs; March-Hugstetten). Zur Überprüfung einer suffizienten, körpergewichtsadaptierten Beatmung wurde in Voruntersuchungen an einer Kontrollgruppe mit $n=8$ Tieren arterielles Blut zur Blutgasanalyse (BGA) entnommen. Die Messwerte waren durchgehend normwertig. Eine Übersicht der Messwerte der art. BGA in Tabelle 3 zu finden. Die Tiere wurden auf einer Wärmeplatte gelagert. Durch eine rückgekoppelte rektale Temperatursonde (Effenberger, Pfaffing, Deutschland) war die genaue Einstellung der Körpertemperatur auf 36°C möglich. Um Wärmeverluste durch Konvektion und Konduktion zu vermeiden, erfolgte eine Abdeckung der Tiere mit einer Mullkompressen und Alufolie. Für das hämodynamische Monitoring erhielten die Tiere über Nadelstichelektroden eine EKG- Ableitung. Eine nicht-invasive Blutdruckmessung war durch Anlegen einer pneumatischen Manschette

(AD Instruments, Spechbach) und Ableitung einer Pulskurve mittels Plethysmographie über der Schwanzarterie während des ganzen Versuchsablaufs möglich. Die abgeleiteten Parameter wurden an einem PC dargestellt und aufgezeichnet.

Zur Sicherstellung eines suffizienten venösen Zuganges wurde die rechte V. jugularis externa präpariert und ein Polyethylenkatheter mit einem Innendurchmesser von 0,28 mm (PE 50, Portex, Hythe, Großbritannien) eingelegt und fixiert.

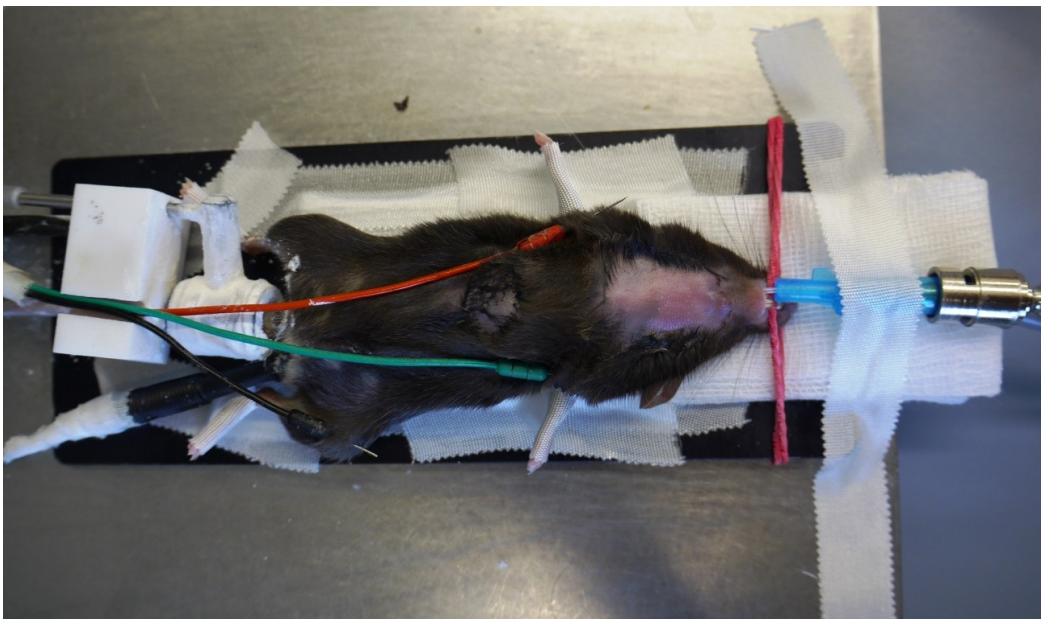


Abb. 3 intubierte und beatmete Maus mit anliegendem EKG, rektaler Temperatursonde und nicht-invasiver Ableitung des MAP an der Schwanzarterie vor Anlage des ZVK

Ausgangswerte vor Reanimation			
Median [25 - 75 Perzentile]			
Mittelwert \pm SD			
pH	7,36	[7,32 - 7,42]	
paO ₂	100,8	\pm 9,2	mm Hg
paCO ₂	42,9	\pm 4,3	mm Hg
HCO ₃ ⁻	23,9	\pm 1,3	mmol/l
BE	-2,5	[-5,5 - 2,0]	mmp/l
Hb	8,5	\pm 0,7	mmol/l
Hk	43	[41 - 45]	%
Na ⁺	149	[146 - 150]	mmp/l
K ⁺	4,4	[3,5 - 4,6]	mmol/l
Ca ²⁺	1,15	[1,12 - 1,16]	mmol/l

Tab. 3 art. BGA von beatmeten Tieren (n=8) vor Reanimation

2.4 Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation

Nach Instrumentierung und einer 15-minütigen Stabilisierungsphase des Tieres erfolgte die Induktion des Herz-Kreislaufstillstandes durch die zentralvenöse Gabe von 80 µg/g Kaliumchlorid (KCl). Zeitgleich wurde die Beatmung pausiert. Der Herz-Kreislaufstillstand konnte sowohl durch die Asystolie im EKG als auch durch den Verlust der Pulscurve in der Schwanzarterie verifiziert werden. Nach exakt acht Minuten wurden die Tiere mit einer $F_{I}O_2$ von 1,0, einem Tidalvolumen von 12 µl/g und einer Frequenz von 200/min beatmet. Die Thoraxkompression wurde begonnen. Über den zentralen Venenkatheter (ZVK) erfolgte die Injektion von 0,4 µg/g Adrenalin. Durch kontinuierliche Thoraxkompression wurde ein Minimalkreislauf hergestellt. Um die Kontinuität und die ausreichend hohe und gleichbleibende Kompressionsfrequenz von 450/min sowie eine konstante Eindringtiefe von 7-8 mm sicherzustellen, wurde eine handelsübliche, umgebaute Nähmaschine (Privileg, Typ VZZ 450) verwendet. Die Katecholamintherapie wurde nach einer Minute wiederholt (Bolus Adrenalin, 0,4 µg/g), wenn ein Spontankreislauf bis dahin noch nicht zu beobachten war. Stellte sich nach drei Minuten Reanimationszeit kein

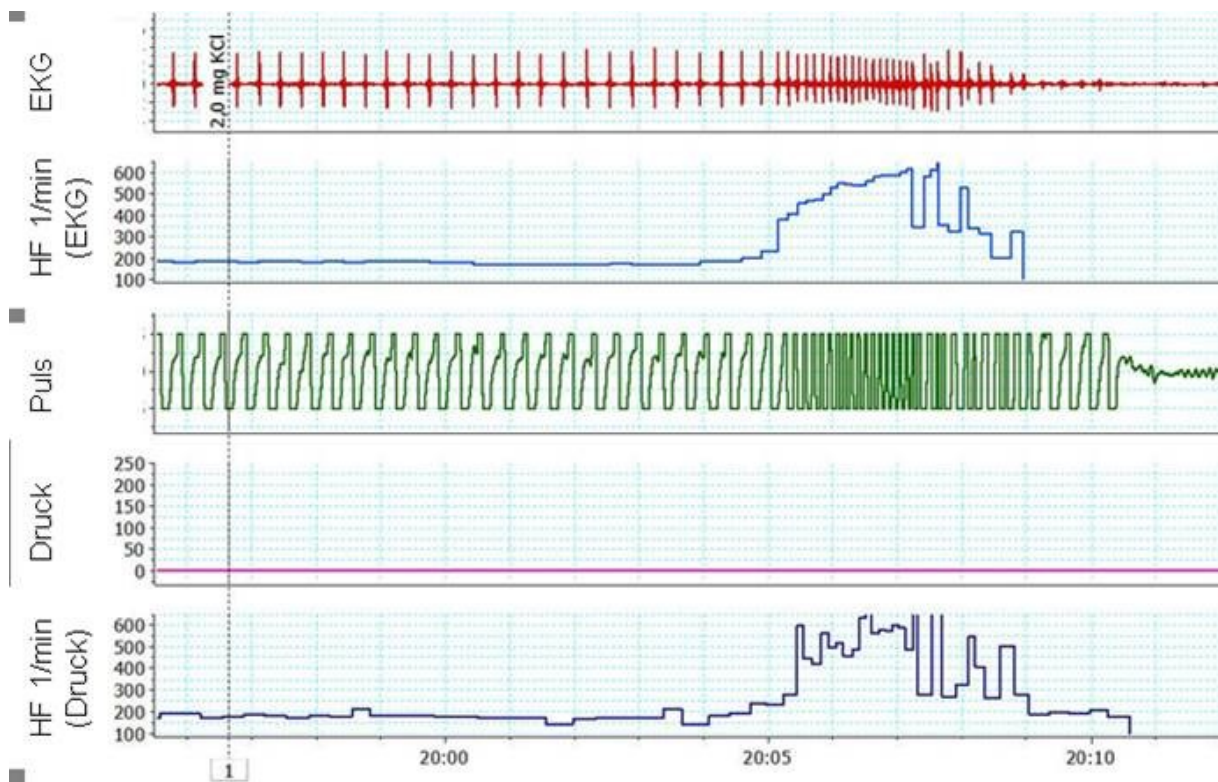


Abb. 4 Ansicht des Überwachungsmonitors nach Induktion des Herzkreislaufstillstandes mit KCl

Spontankreislauf ein wurden die Reanimationsversuche beendet.

Unmittelbar zu Beginn der Reanimation, mit der ersten Adrenalininjektion, erhielten die Tiere jeweils einen 0,15 ml Flüssigkeitsbolus, WT und TLR2^{-/-}-Tiere jeweils Natriumchlorid (NaCl 0,9%). Die Tiere der WT-AK2.5-Gruppe erhielten äquivalent hierzu 0,15 ml der Antikörperlösung mit einer Antikörperkonzentration von 5 µg/g Körpergewicht. Zwei Minuten nach Wiederherstellung eines suffizienten Kreislaufs wurde die inspiratorische Sauerstoffkonzentration auf 0,6 reduziert, nach 18 Minuten auf 0,4. Der ZVK wurde 70 Minuten nach ROSC entfernt. Die Vene wurde ligiert, die Wunde vernäht (Prolene 6.0 Firma: Ethicon Johnson & Johnson, Belgien) und mit jodhaltiger Lösung desinfiziert. Sobald die Tiere eine suffiziente Spontanatmung sowie Abwehrreaktionen auf taktile Reize oder spontane Bewegungen zeigten, erfolgte die Extubation. Im Anschluss erhielten alle Tiere eine subcutane Injektion von 0,5 ml Vollelektrolytlösung (Sterofundin® Firma: Braun Melsungen AG, Deutschland), um ein Flüssigkeitsdefizit auszugleichen. Zur postoperativen Schmerztherapie wurde das Trinkwasser mit Metamizol (250 mg/dl) versetzt.

2.5. Nachbeobachtung

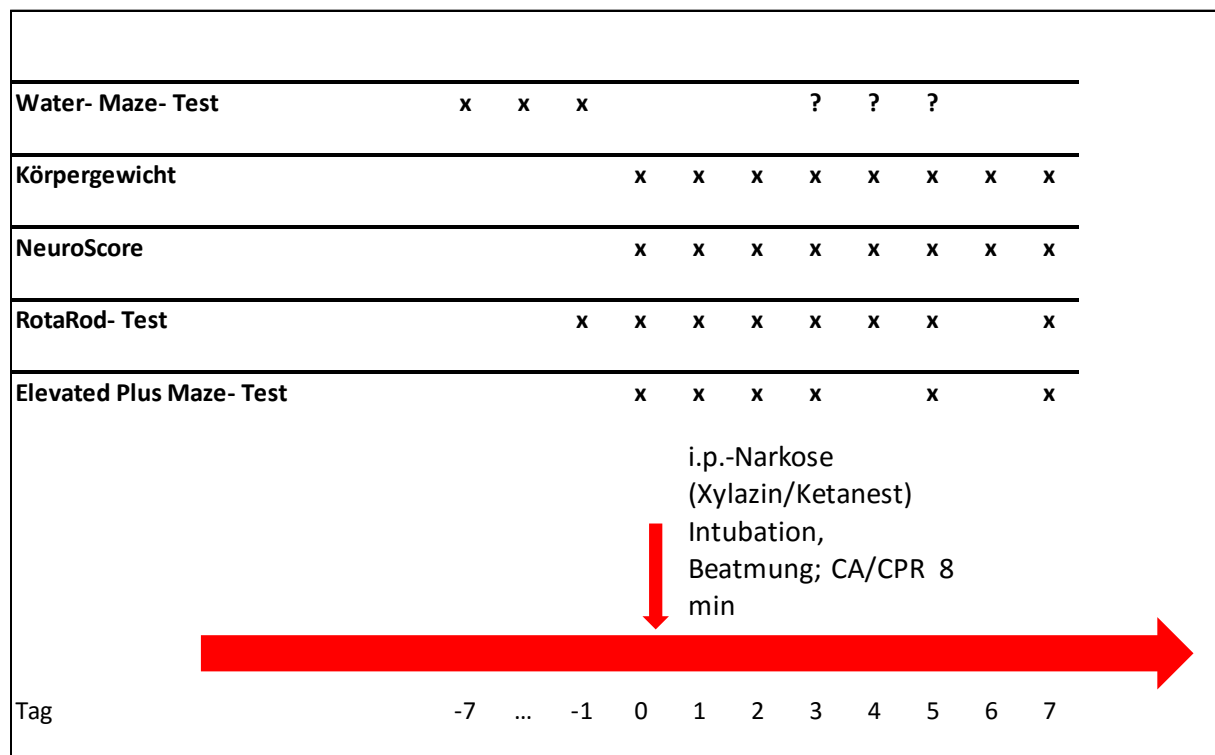


Abb. 5 zeitliches Ablaufschema der Durchführungstage neurophysiologischer Tests

Im Zentrum dieser Studie standen das Überleben sowie die funktionell-neurologische Regeneration nach CA/CPR. Zur verwendeten Testbatterie gehörten die Körpergewichtsmessung, die Erhebung des NeuroScores und des Allgemeinzustandes, der RotaRod-Test, der Elevated Plus Maze-Test und der Water Maze-Test. Bereits vor der Reanimation wurden alle Tiere an die neurophysiologischen Tests gewöhnt. Der Nachbeobachtungszeitraum betrug 28 Tage.

2.5.1 Überleben der Tiere

Ein zentraler Parameter dieser Untersuchung war das Überleben der Versuchstiere nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation in einem Beobachtungszeitraum von 28 Tagen. Es erfolgte eine Begutachtung der Tiere in regelmäßigen Abständen. Innerhalb der ersten zwölf Stunden nach Reanimation wurde das Überleben in stündlichen, danach für weitere zwölf Stunden in 2-stündlichen Abständen überprüft. Im Anschluss wurden die Tiere regelmäßig visitiert. Starb ein Versuchstier, wurde die Zeit als Überlebenszeitpunkt festgelegt, an dem das Tier zuletzt lebend gesehen wurde.

Der Vergleich der Überlebensrate erfolgte durch die lok-rank survival Analyse nach Kaplan-Meyer.

2.5.2 Körpergewicht

Die Körpergewichtsmessung erfolgte in den ersten 14 Tagen täglich morgens mit Hilfe einer geeichten Präzisionswaage (MXX-212, Denver Instrument, Göttingen, Deutschland). Die nächste und letzte Gewichtserhebung erfolgte an Tag 28. Um eine bessere Vergleichbarkeit bei verschiedenen Ausgangsgewichten gewährleisten zu können, wurde das relative Körpergewicht aus dem Quotienten zwischen aktuellem Gewicht und Ausgangsgewicht (Gewicht am Tag der Reanimation) erhoben.

2.5.3 NeuroScore

Beim NeuroScore handelt es sich um ein Punktesystem zur Beurteilung der Neurologie von Nagetieren, ähnlich der Glasgow Coma Scale (GCS) für Menschen.

Es wurden über zwei Wochen sowie am 28. Tag sechs Qualitäten geprüft. Die Tiere konnten maximal zwölf Punkte erreichen [23].

Punktevergabe für die Bewertung des neurologischen Zustandes - NeuroScore		
Bewusstsein	1. keine Reaktion auf Kneifen in den Schwanz	0
	2. geringfügige Reaktion auf Kneifen in den Schwanz	1
	3. normale Reaktion auf Kneifen in den Schwanz	2
Kornealreflex	1. kein Blinzeln	0
	2. träges Blinzeln	1
	3. normales Blinzeln	2
Atmung	1. irreguläres Atemmuster	0
	2. verminderte Atemfrequenz, normales Atemmuster	1
	3. normale Atemfrequenz und -muster	2
Stellreflex	1. keine Drehbewegung	0
	2. langsames Drehen	1
	3. spontanes und schnelles Umdrehen	2
Koordination	1. keine Bewegung	0
	2. moderate Ataxie	1
	3. normale Koordination	2
Bewegung/ Aktivität	1. keine spontane Bewegung	0
	2. verlangsamte Bewegung	1
	3. normale Bewegung	2
maximal mögliche Punktzahl		12

Abb. 6 Punktevergabe im NeuroScore Test

2.5.4 Allgemeinzustand

Der Allgemeinzustand (AZ) der Tiere wurde täglich als subjektiver Parameter bestimmt. Dabei wurde den Mäusen jeweils ein Punktwert von 0-3 zugeordnet. Null Punkte beschrieben einen guten und unbeeinträchtigten AZ. Drei Punkte

beschrieben einen subjektiv schlechten AZ. Beurteilt wurden hierbei das Fell (regelmäßige Fellpflege als Anzeichen des Wohlbefindens), die Nahrungsaufnahme sowie die Bewegung des Tieres. Die Bewertung erfolgte jeweils durch zwei unabhängige Untersucher.

Bewertungskriterien Allgemeinzustand		
Fellbeschaffenheit	1. sauber, glänzend	0
	2. struppig, verklebt	1
Nahrungsaufnahme	1. Maus frisst/trinkt	0
	2. Maus frisst/trinkt nicht	1
Bewegung	1. normale Bewegung	0
	2. verlangsamte oder keine Bewegung	1
0 Punkte - keine Beeinträchtigung 1 Punkt - leichte Beeinträchtigung 2 Punkte - mäßige Beeinträchtigung 3 Punkte - starke Beeinträchtigung		

Abb. 7 Bewertungskriterien des Allgemeinzustandes

2.5.5 RotaRod-Test

Der RotaRod-Test ist ein etabliertes physiologisches Testverfahren zur Beurteilung von Koordination, Geschicklichkeit und Ausdauer der Tiere [24]. Der Test besteht aus einer von einem Motor angetriebenen zylinderförmigen Walze, die mit einer Geschwindigkeit von zwölf Umdrehungen pro Minute rotiert. Damit die Tiere nicht herunterklettern konnten, wurden an den Seiten jeweils schwarze Blenden befestigt und die Walze in einer Höhe von 45 cm angebracht. Ein unbeeinträchtigtes Tier ist problemlos in der Lage, 15 Minuten auf einem rotierenden Zylinder zu laufen. Um Effekte wie Ablenkung durch äußere Reize ausschließen zu können, aber auch um bei neurologisch schlechten Tieren die Leistung oder das zufällige Herunterfallen besser differenzieren zu können, wurde die Gesamtzeit von 15 Minuten (900 s) in drei Einzelversuche zu je fünf Minuten geteilt. Die einzelnen Zeiten wurden dokumentiert und anschließend addiert. Zwischen den Versuchen war eine Erholungszeit von einer Minute geplant. Bereits einen Tag vor der Reanimation und

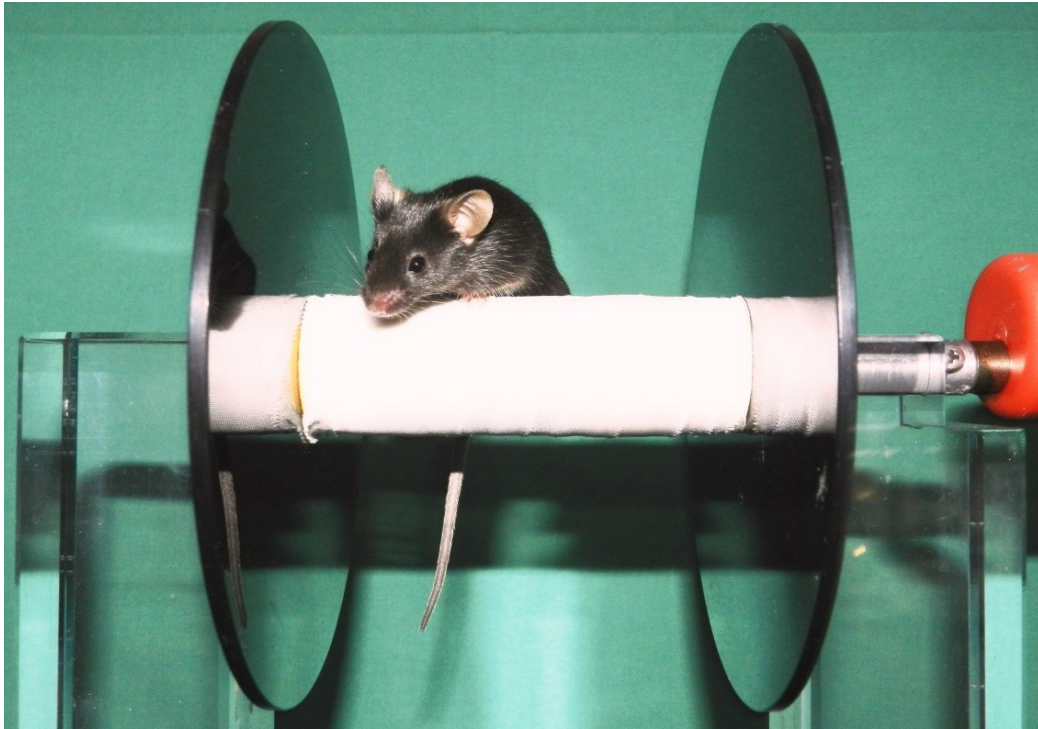


Abb. 8 Maus auf RotaRod

am Reanimationstag selbst wurden die Tiere an den Test gewöhnt. Nach jedem Tier wurde die Walze mit 70% Ethyl-Alkohol gereinigt, um Irritationen durch Gerüche zu vermeiden.

2.5.6 Elevated Plus Maze-Test

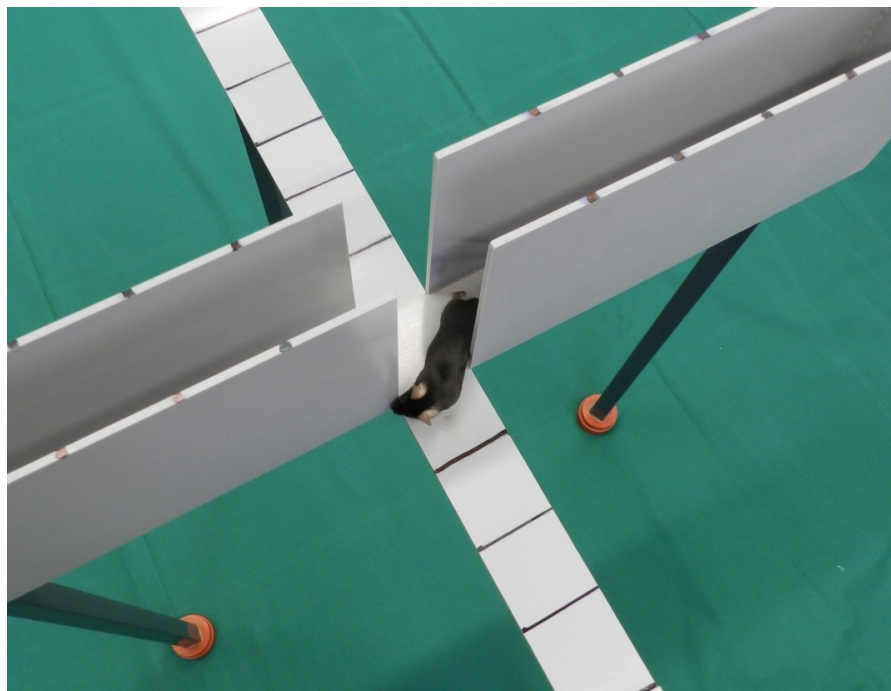


Abb. 9 Maus im Elevated Plus Maze-Test

Beim Elevated Plus Maze-Test wurden die Tiere für zehn Minuten auf einem Kreuz mit zwei offenen und zwei geschlossenen Armen zur späteren Auswertung per Videokamera aufgezeichnet. Dieser Test diente zur Beurteilung der Neugierde, Ängstlichkeit und Aktivität der Tiere [25].

Die Tiere wurden zu Beginn des Tests in die Mitte des Kreuzes gesetzt. Die Zeitmessung auf dem offenen Arm begann, wenn sich das Tier mit allen vier Pfoten auf diesem befand. Auch bei diesem Test wurde am Tag der Reanimation eine Gewöhnung durchgeführt. Die Auswertung bezog mit ein, wie oft sich die Tiere im Kreuz hochstreckten, wie oft sie über den Rand schauten sowie die insgesamt zurückgelegte Strecke auf dem Kreuz. Hierzu waren alle zehn Zentimeter Markierungen angebracht. Weiterhin wurden die zeitlichen Anteile auf dem offenen bzw. geschlossenen Arm innerhalb der 10-minütigen Testzeit protokolliert. Auch bei diesem Versuch erfolgte eine Reinigung des Kreuzes nach jedem Tier mit 70% Ethyl-Alkohol.

2.5.7 WaterMaze-Test

Der WaterMaze-Test ist ein Schwimmtest für Mäuse, der die räumliche Lernfähigkeit und das Reproduzieren des Gelernten testet. Die Hippocampusregion ist maßgeblich für das räumliche Lernen verantwortlich [26]. Dieser Teil des Gehirns gilt jedoch auch

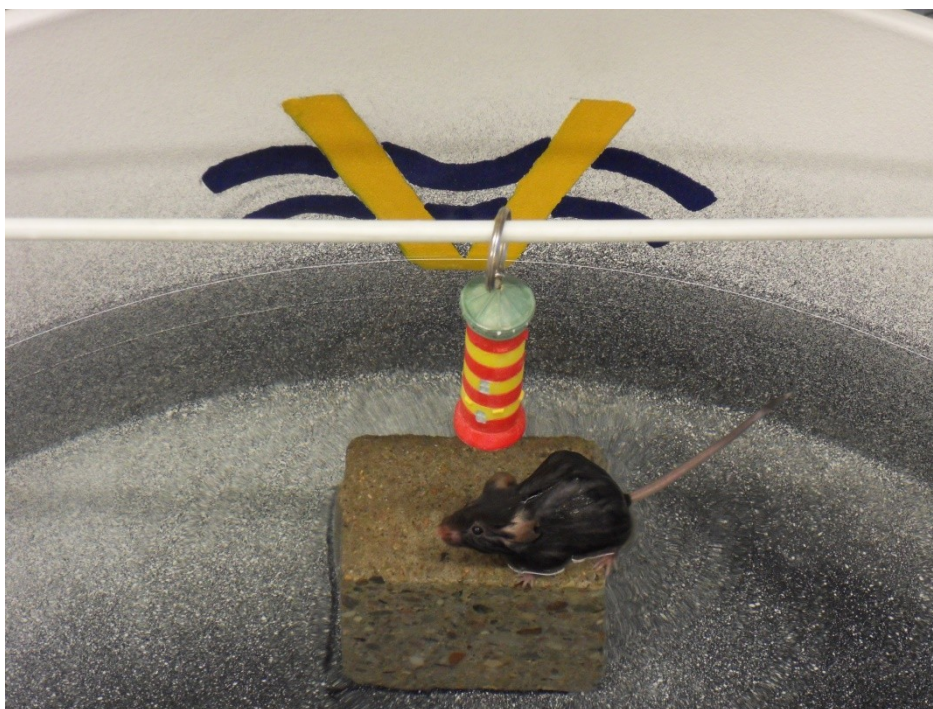


Abb. 10 Maus nach erfolgreichem Auffinden der Plattform im WaterMaze-Test

als sehr hypoxieempfindlich. Durch die Überprüfung des Erinnerns nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation ließ sich eine gute Aussage über mögliche Auswirkungen einer Ischämie im Gehirn treffen.

Sieben Tage vor der Reanimation wurden die Tiere an den komplexen Test gewöhnt. Dazu setzte man sie in ein Bassin mit einem Durchmesser von 80 cm. Dieses war mit 24°C warmem, 15 cm tiefem Wasser gefüllt, sodass sich die Tiere nicht auf dem Boden abstützen konnten. Innerhalb des Bassins befand sich 1 cm unter der Wasseroberfläche ein Stein als Plattform mit einer Oberfläche von 5 x 5 cm, auf den sich die Tiere retten konnten. Zur besseren räumlichen Orientierung wurden zuvor an den Wänden Symbole aufgetragen. Eine Markierung war direkt oberhalb des Steins befestigt. Die Tiere wurden immer an der gleichen Position, mit dem Blick vom Stein weggerichtet, in das Wasser gesetzt. Sie mussten zunächst im Zufallsprinzip den Stein finden, um sich zu retten. Die dazu benötigte Zeit wurde gemessen. Gelang es dem Tier auch nach zwei Minuten nicht, den Stein zu finden, wurde es mit sanfter Bewegung auf den Stein geführt und im Anschluss aus dem Becken genommen. Die Tiere hatten pro Versuchstag je fünf Versuche den Stein selbstständig zu finden und sich im Verlauf seine immer gleiche Position zu merken. Der Versuch wurde täglich morgens durchgeführt und die benötigte Zeit bis zum Erreichen der Plattform notiert. Nach Durchführung des Testes über drei Tage erschwerten sich die Testbedingungen durch Einfärben des Wassers. Nach Zugabe von Milch war der Stein nicht mehr sichtbar. Auch jetzt hatten die Tiere täglich, bis einen Tag vor der Reanimation (Tag -1), fünf Versuche, die gelernte Position des Steins zu finden, wobei wiederum jeweils die Zeit gemessen wurde. Nach der Reanimation mussten die Tiere erneut den Test durchlaufen. Zur Vermeidung eines Ertrinkens bei zu schwachen oder neurologisch beeinträchtigten Tieren wurden zuvor Kriterien zur Teilnahme am Test nach CA/CPR festgelegt. Voraussetzungen waren eine Gewichtszunahme und ein guter Allgemeinzustand, d.h. einen AZ=0, ohne Beeinträchtigung. Eine weitere Bedingung war, dass die Tiere mindestens einmal 300 Sekunden Laufzeit ohne Unterbrechung im RotaRod-Test erreicht hatten. Waren diese Kriterien erfüllt, mussten die Tiere, wie oben beschrieben, in fünf Versuchen die erlernte Position der Plattform in eingefärbtem Wasser schwimmend erreichen. Nach der Reanimation konnte durch den Test zum einen beantwortet werden, ob die Tiere motorisch noch in der Lage waren zu schwimmen und zum anderen, ob sie die Gedächtnisleistung erbringen konnten, sich an die Position der Plattform zu erinnern.

Voraussetzungen für die Teilnahme am Water-Maze-Test	
volle Punktzahl im NeuroScore	12 von 12
einer von drei Versuchen im RotaRod- Test ohne Herunterfallen	[300 sec]
Zunahme des Körpergewichts	
keine subjektiven Zeichen von Beeinträchtigung (AZ)	

Tab. 4 Voraussetzungen für die Teilnahme am WaterMaze-Test

Zunächst schwammen die Tiere jeweils einmal an drei aufeinanderfolgenden Tagen und pausierten dann bis Tag zehn nach Reanimation. Zwischen Tag 10-14 mussten die Tiere den Schwimmtest täglich absolvieren. Am letzten Beobachtungstag, Tag 28, wurden die Tiere erneut getestet. An jedem Durchführungstag wurde geprüft, ob die Voraussetzungen für die Teilnahme des Tieres erfüllt waren.

2.6 Inflammationsparameter

Der induzierte Herz-Kreislaufstillstand und die anschließende Reanimation resultieren in einer systemischen Inflammationsreaktion. An den Versuchstieren der Kurzzeitstudie, Gruppen 4, 5, 6, erfolgte zur Bestimmung der Inflammationsparameter Corticosteron, IL-1 β und IL-6 eine Blutentnahme. Die Tiere wurden acht Stunden nach Reanimation erneut narkotisiert und wie im Kapitel *Reanimationsmodell* (2.3) beschrieben, intubiert. Mit einer 1ml-Spritze und einer 23G-Kanüle konnte durch Punktion der V. cava inferior venöses Blut aus dem noch zirkulierenden Kreislauf gewonnen werden. Nach Zentrifugation (CS-15, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Germany) mit 3500 rpm für zehn Minuten wurde das Plasma bis zur Analyse bei -80°C aufbewahrt. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) Kits für Corticosteron (Demeditec Diagnostic GmbH, Kiel, Germany) sowie IL-1 β und IL-6 (Thermo Scientific, Pierce Biotechnologie, Rockford, USA) und ein Mikroplattenausleser (Sunrise Remote, TECAN Austria GmbH, Salzburg, Austria) wurden zur Bestimmung der Plasmakonzentration der Inflammationsparameter genutzt. Um Basalwerte zu bestimmen, wurde den Tieren der Kurzzeitgruppen 14 Tage vor Reanimation venöses Blut in Allgemeinanästhesie entnommen.

2.7 Histologie

Alle innerhalb des 28-Tage-Zeitraums verstorbenen Tiere der Gruppen 1-3 wurden autopsiert, um relevante Verletzungen im Thorax und Abdomen als Folge der Reanimation ausschließen zu können.

Organe von kürzlich (<1h) innerhalb des Beobachtungszeitraumes verstorbenen Tieren wurden zur histologischen Untersuchung entnommen und in 4%igem Formalin fixiert. In lichtmikroskopischer Untersuchung der relevanten Organe Herz, Leber, Niere und Lunge wurden die zellulären Veränderungen bei HE-Färbung (Hämatoxylin Eosin- Färbung) begutachtet. Zusätzliche Präparate wurden mit CAE (Chloracetotestrose) gefärbt, um die Leukozyteninfiltration zu beurteilen.

2.8 Auswertung und Statistik

Trotz unterschiedlicher Genotypen wiesen alle Versuchstiere den gleichen Phänotyp auf. Somit war es möglich, die Reanimationsprozedur und neurologischen Tests in Bezug auf den Untersucher „verblindet“ durchzuführen.

Die Daten für die Kaplan-Meier-Überlebenskurve wurden mittels des log-rank Testes bewertet. Für multiple Gegenüberstellungen wurde die Holm Sidak Methode zur Analyse verwendet. Alle Werte wurden mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung geprüft. Es wurden weiterhin der Student's t-Test, der ANOVA-Test und der Rangsummen-Test nach Mann-Whitney verwendet. Die Werte sind mit Mittelwert \pm Standardfehler (SEM), bzw. bei Nichtnormalverteilung mit Median und Interquartil-Abständen (25%-75%) dargestellt. Der Unterschied der Teilnehmeranzahl am WaterMaze-Test nach CA/CPR wurde durch den Chi-Quadrat Test bewertet. Für die statistische Auswertung und Darstellung wurden die Programme SigmaStat 3.5 und SigmaPlot 10.0 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Vorversuche

3.1.1 PCR-Analyse

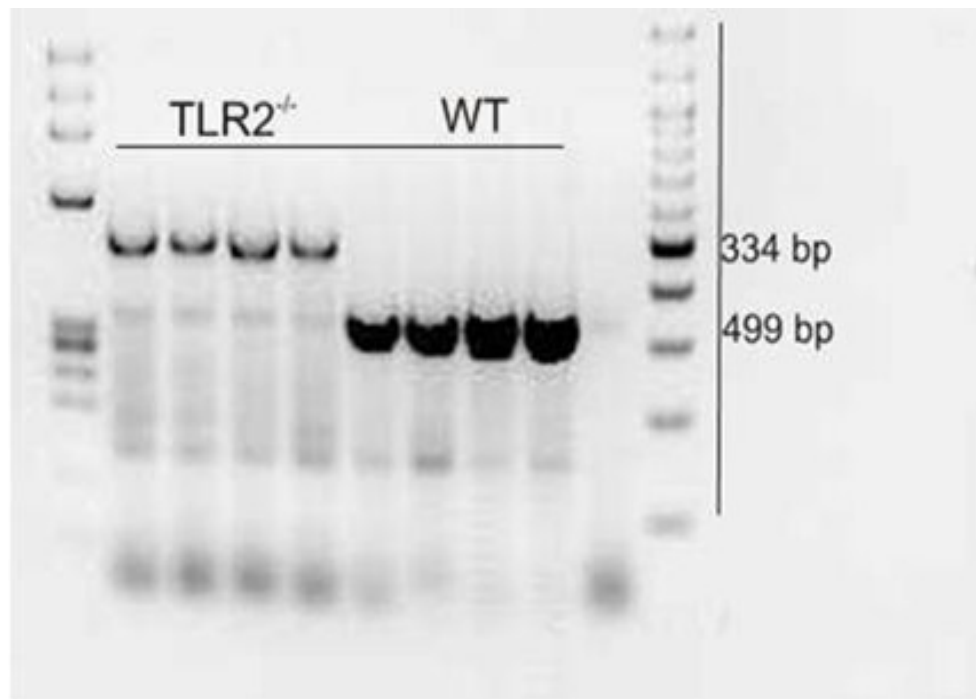


Abb. 11 PCR Analyse der Tierstämme

Während der WT-Stamm eine Amplifikation des intakten TLR2-Gens bei 499 Basenpaaren (bp) zeigt, amplifiziert die funktionelle Mutation der TLR2^{-/-}-Tiere bei 334 bp. Beide Tierstämme sind jeweils homozygot für das Genom des intakten bzw. funktionell defekten Rezeptors.

3.1.2 LTA-Stimulation

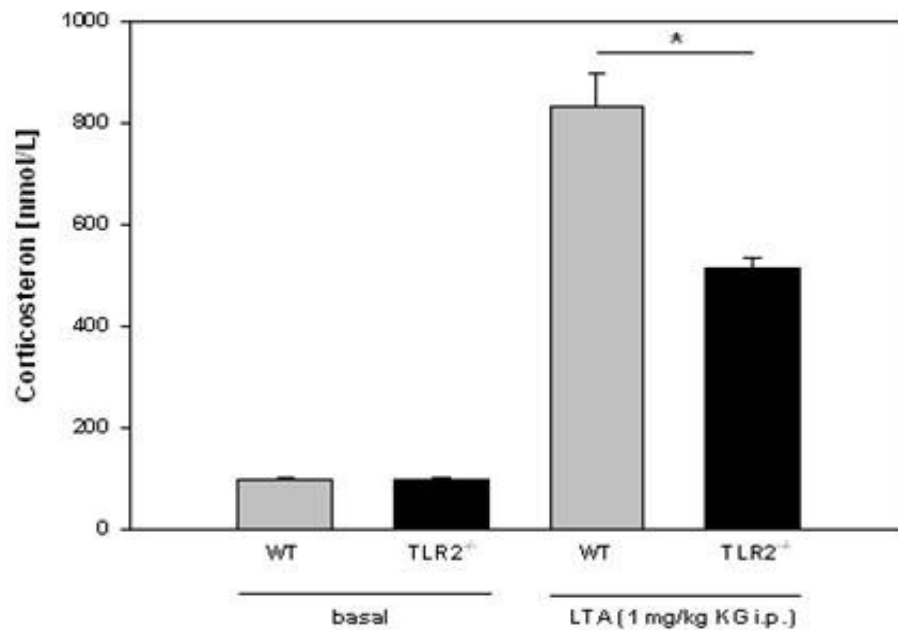


Abb. 12 Stimulationsversuch mit Lipoteichonsäure in WT und TLR2^{-/-}; *p < 0,05

LTA (Lipoteichonacid, Lipoteichonsäure) ist ein spezifischer Ligand für den TLR2. Die Stimulation der Tiere beider Gruppen bestätigte, dass der Rezeptor bei den TLR2^{-/-}-Tieren funktionell ausgeschaltet ist. Die gemessenen Konzentrationsanstiege von Corticosteron fielen bei den TLR2^{-/-}-Mäusen signifikant geringer aus als bei den ebenso stimulierten WT-Tieren, was für eine stark verminderte Aktivierbarkeit, bzw. für einen funktionellen Defekt spricht. Diese signifikant geringere Aktivierbarkeit wird auch von Bornstein et al. beschrieben [10].

3.1.3 Immunhistologie

In der Immunhistologie zeigte sich sowohl bei den WT-Tieren als auch bei den TLR2^{-/-}-Tieren eine Anfärbbarkeit der Zona fasciculata der Nebennierenrinde. Dies spricht dafür, dass die TLR2-defizienten Tiere den TLR2 exprimieren, dieser in Kombination mit den Ergebnissen der weiteren Untersuchungen jedoch funktionell ausgeschaltet bzw. defekt ist.

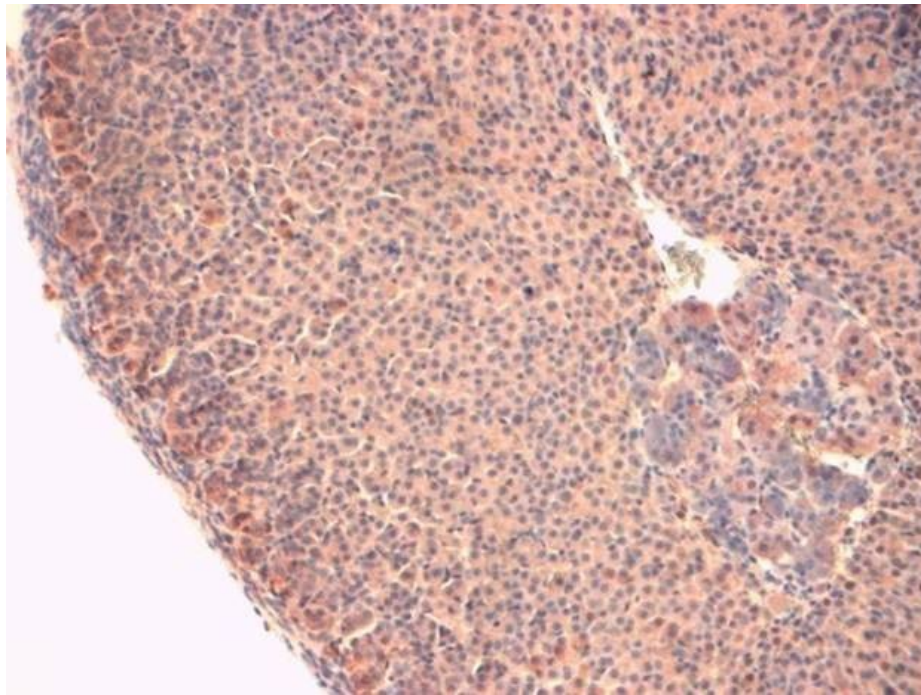


Abb. 13 TLR2 Expression der Zona fasciculata der Nebenniere

3.1.4 Gruppengröße/ Ausschlusskriterien

Kriterien für den Ausschluss eines Tieres waren Probleme während der Präparation, wie z.B. der Abriss der V. jugularis bei der Kathetereinlage, eine Präparationsdauer über 30 Minuten sowie eine akzidentelle Extubation oder Katheterdislokation unter Reanimation. Eine nicht erfolgreiche CPR war kein Ausschlusskriterium. Es ergaben sich folgende Gruppengrößen zur Auswertung:

Langzeitstudie			
1.) WT	CA/CPR 8 min	Überleben und Neurotests	n= 31
2.) TLR2 ^{-/-}	CA/CPR 8 min	Überleben und Neurotests	n= 30
3.) WT-AK2.5	CA/CPR 8 min	Überleben und Neurotests	n= 15
Kurzzeitstudie			
4.) WT	CA/CPR 8 min	Blutentnahme (BE) nach 8h	n= 6
5.) TLR2 ^{-/-}	CA/CPR 8 min	BE nach 8h	n= 6
6.) WT-AK2.5	CA/CPR 8 min	BE nach 8h	n= 6

Tab. 5 Gruppengrößen nach Ausschluss

3.2 ROSC und Zeit bis zur Extubation

Die Zeit bis zur Rückkehr des spontanen Kreislaufes wurde beginnend nach acht Minuten Herz-Kreislaufstillstand gemessen. Alle Tiere konnten primär erfolgreich reanimiert werden (ROSC 100%). Die Zeit zur Wiederherstellung des Spontankreislaufes verifiziert durch das EKG und die Pulscurve an der Schwanzarterie betrug für die Kontroll-Tiere 90 [70-120] Sekunden, für die TLR2^{-/-}-Tiere 68 [60-85] Sekunden und die Tiere der WT-AK2.5-Gruppe 60 [45-85] Sekunden.

Die Extubation der Tiere der Kontrollgruppe war im Median 150 [138-168] Minuten nach Beginn des Herz-Kreislaufstillstandes möglich, die der TLR2-defizienten Tiere nach 125 [120-136] Minuten. Die antikörperbehandelten Tiere brauchten durchschnittlich 113 [101-129] Minuten, bis sich eine suffiziente Spontanatmung sowie Abwehrreaktionen einstellten.

3.3 Überleben

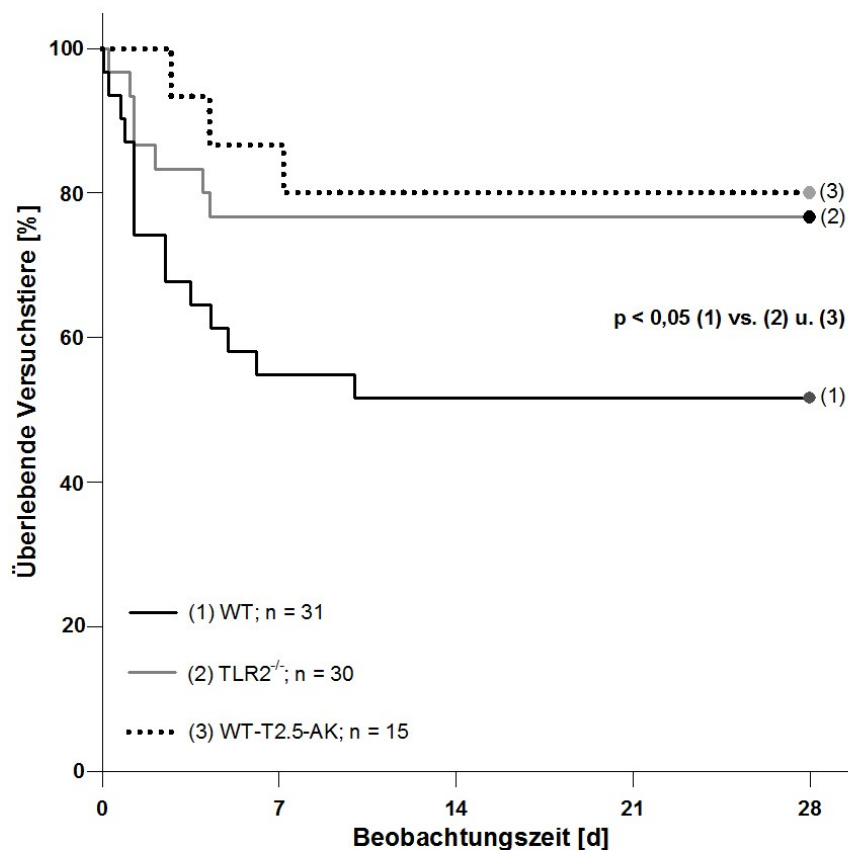


Abb. 14 Überlebenskurve nach 28 Beobachtungstagen WT vs. TLR2^{-/-} vs. WT-AK2.5

In einem Beobachtungszeitraum von 28 Tagen wiesen sowohl die TLR2^{-/-}-Tiere als auch die WT-AK2.5-Tiere einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber den WT-Tieren auf (WT 16/31, 51,6% vs. TLR2^{-/-}: 23/30, 76,7% vs. WT-AK2.5: 12/15, 80% p<0,05).

Bereits sieben Tage nach Reanimation stabilisierten sich alle bis dahin überlebenden TLR2^{-/-}-Tiere als auch die antikörperbehandelten Tiere so, dass aus dieser Gruppe nach der ersten Woche keines mehr verstarb. In der Gruppe der WT-Tiere verstarben bis zum zehnten Tag nach CA/CPR Tiere an den Folgen der Reanimation.

3.4 Funktionell-neurologische Untersuchung

3.4.1 Körpergewicht

relatives Körpergewicht [in % vom Ausgangsgewicht]			
Tag	WT	TLR2 ^{-/-}	WT-AK2.5
0	100	100	100
1	91,97 ± 0,95	91,12 ± 0,86	91,25 ± 1,03
2	82,96 ± 1,19	85,34 ± 0,86	83,68 ± 1,49
3	80,36 ± 1,25*	85,84 ± 1,17*	84,26 ± 1,79 [#]
4	82,31 ± 1,62*	87,04 ± 1,5*	84,22 ± 2,94 [#]
5	85,16 ± 1,85*	90,31 ± 1,41*	87,21 ± 2,45
6	88,55 ± 1,69	91,12 ± 1,36	88,28 ± 2,84
7	90,58 ± 1,52*	94,08 ± 1,31*	89,83 ± 2,51
14	94,75 [90,8-96,4]	96,00 [94,45-99,73]*	97,12 [93,41-100,42] [#]
28	99,22 ± 1,19*	104,18 ± 0,9*	102,69 ± 1,16 [#]

Tab. 6 relatives Körpergewicht der Versuchstiere, WT vs. TLR2^{-/-} *p<0,05; WT vs. WT-AK2.5 [#]p<0,05

Als Zeichen einer schweren Beeinträchtigung nach CA/CPR wiesen alle Tieren einen deutlichen Gewichtsverlust um fast 20% auf.

Bis Tag 2 zeigte sich eine Gewichtsreduktion in allen Gruppen (WT: 82,96% [±1,19]; TLR2^{-/-}: 85,34% [±0,855]; WT-AK2.5: 83,68% [±1,49]). Die WT-Tiere verloren auch

an Tag 3 weiter an Gewicht, während die Gewichtsreduktion der TLR2^{-/-}- und der Tiere mit AK-Behandlung stagnierte (WT: 80,36% [$\pm 1,25$]; TLR2^{-/-}: 85,84% [$\pm 1,17$]; WT-AK2.5: 84,26% [$\pm 1,79$]). Erst ab Tag 4 nahmen auch die überlebenden WT-Tiere wieder an Gewicht zu, jedoch zeigte sich weiterhin ein deutlicher Unterschied zwischen den Gruppen (WT: 82,31% [$\pm 1,62$]; TLR2^{-/-}: 87,04% [$\pm 1,5$]; WT-AK2.5: 84,22% [$\pm 2,94$]) ($p < 0,05$). Als Zeichen der Erholung der überlebenden Tiere stabilisierte sich im weiteren Verlauf des 4-wöchigen Beobachtungszeitraums das Gewicht der Versuchstiere. An Tag 28 nach Reanimation lag das relative Körpergewicht der Tiere der TLR2^{-/-}-Gruppe mit 104,18% [$\pm 0,9$] über dem Ausgangsgewicht, ebenso das der WT-AK2.5-Tiere mit 102,69% [$\pm 1,16$], das relative Körpergewicht der Kontrollgruppe aber mit 99,22% [$\pm 1,19$] bei etwa dem Ausgangsgewicht.

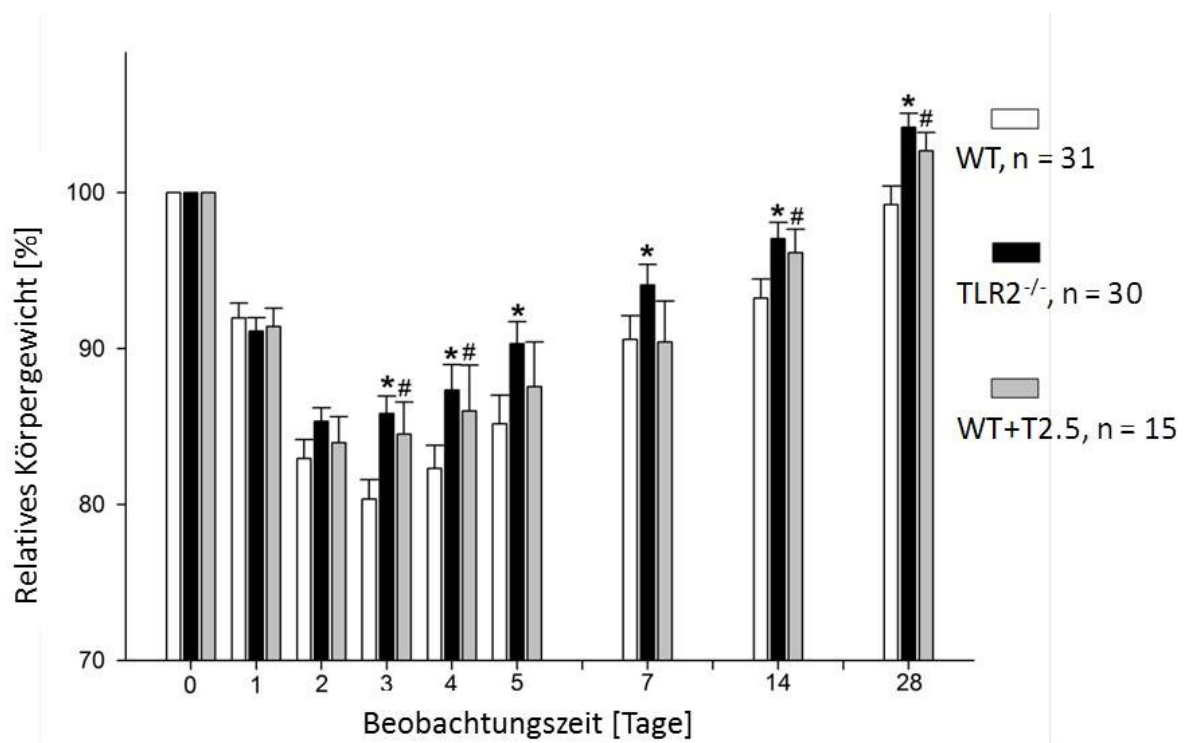


Abb. 15 Übersicht relatives Körpergewicht

WT vs. TLR2^{-/-}; * $p < 0,05$; WT vs. WT-AK2.5; # $p < 0,05$

3.4.2 NeuroScore

Alle Tiere waren vor der Reanimation neurologisch unbeeinträchtigt und wiesen im NeuroScore die komplette Punktzahl von zwölf auf. An Tag 1 nach der Reanimation erreichten die TLR2^{-/-}-Tiere im Median einen NeuroScore-Punktwert von durchschnittlich 12 [11-12]. Die Tiere in der Kontrollgruppe erhielten 11 Punkte [9-12]. Die WT-AK2.5-Tiere zeigten ebenso wie die TLR2-defizienten Tiere durchschnittlich kaum eine Veränderung des neurologischen Zustandes und erhielten 12 [11-12] Punkte. Auch an Tag 2 erreichten die TLR2^{-/-}-Tiere wie auch die Tiere mit Antikörperbehandlung höhere Punktwerte als die WT-Tiere. (WT: 12 [10-12]; TLR2^{-/-}: 12 [12-12]; WT-AK2.5: 12 [11-12]). Ein ähnliches Bild stellte sich an Tag 3 dar. Erst fünf Tage nach Reanimation zeigten die überlebenden WT-Tiere eine Besserung des neurologischen Zustandes und erreichten ebenso unauffällige NeuroScore-Werte wie die TLR2-defizienten bzw. antikörperbehandelten Tiere. Bis zum Ende des Beobachtungszeitraums erreichten alle überlebenden Tiere wieder einen NeuroScore von 12 Punkten.

Übersicht NeuroScore-Werte			
Tag	WT	TLR2 ^{-/-}	WT-AK2.5
0	12 [12-12]	12 [12-12]	12 [12-12]
1	11 [9-12]*	12 [11-12]*	12 [11-12] [#]
2	12 [10-12]*	12 [12-12]*	12 [11-12] [#]
3	12 [11-12]*	12 [12-12]*	12 [12-12] [#]
5	12 [12-12]	12 [12-12]	12 [12-12]
7	12 [12-12]	12 [12-12]	12 [12-12]
14	12 [12-12]	12 [12-12]	12 [12-12]
28	12 [12-12]	12 [12-12]	12 [12-12]

Tab. 7 NeuroScore-Werte der Versuchstiere WT vs. TLR2^{-/-} *p<0,05; WT vs. WT-AK2.5 [#]p<0,05

3.4.3 Allgemeinzustand

Der Allgemeinzustand wurde subjektiv durch zwei unabhängige und „verblindete“ Untersucher eingeschätzt. Am Tag der Reanimation waren alle Tiere der Kontrollgruppe, als auch die der TLR2^{-/-}- und WT-AK2.5-Gruppe in einem sehr guten Zustand und erhielten die Punktzahl 0. Am Tag 1 nach der Reanimation zeigten die WT-Tiere eine stärkere Beeinträchtigung ihres Allgemeinzustandes im Vergleich zu den TLR2^{-/-}-Tieren und der WT-AK2.5-Gruppe (WT: 1 [0- 3]; TLR2^{-/-}: 0 [0-1]; WT-AK2.5: 0 [0-1]). Auch am zweiten Tag nach CPR stellten sich die beiden Untersuchungsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe mit einem sehr guten bis guten AZ dar. (WT: 1 [0-2] TLR2^{-/-}: 0 [0-0]; WT-AK2.5: 0 [0-1]). Die WT-Tiere zeigten am dritten Tag nach Reanimation eine leichte Besserung ihres AZ. Der AZ der TLR2^{-/-}-Tiere als auch der der WT-AK2.5-Tiere zeigte zum Vortag keine Veränderungen auf. Erst ab Tag 5 erreichten die Tiere der Gruppen einen durchgängig gleichwertigen Allgemeinzustand, den sie bis zum Ende des Beobachtungszeitraums beibehielten.

3.4.4 RotaRod-Test

Beim ersten Kontakt mit dem Testdevice vor der CPR ließen sich kaum Unterschiede in der Geschicklichkeit, in der motorischen Kraft oder Koordination der Tiere feststellen. Die WT-Tiere erreichten 586 [388-709]s Laufzeit, die TLR2^{-/-}-Tiere im Median 708 [447-900]s und die WT-AK2.5-Tiere 605 [502-800]s. Auch am Tag der Reanimation wurden die Tiere vor Versuchsbeginn zunächst auf das RotaRod gesetzt. Im Vergleich zum Vortag zeigten alle Gruppen einen Lern- oder Gewöhnungseffekt. Die TLR2^{-/-}-Tiere erreichten dabei Laufzeiten von 900 [837-900]s, die Tiere der Kontrollgruppe 900 [723-900]s und die Mäuse mit späterer Antikörper-Applikation 900 [845-900]s Laufzeit. Zum Zeitpunkt der Reanimation gab es zwischen den Gruppen keine Laufzeitunterschiede.

Im RotaRod-Test zeigte sich an Tag 1 in allen Gruppen eine Reduktion der erreichten Laufzeit, die aber bei den TLR2^{-/-}-Tieren nur sehr gering ausgeprägt war. Die TLR2^{-/-}-Tiere erreichten Laufzeiten von 900 [697-900]s. Die WT-Tiere erreichten im Median nur sehr geringe Laufzeiten und zeigten auch innerhalb der Gruppe einen deutlichen Leistungsunterschied (WT: 74,5 [9-444]s). Die antikörperbehandelten Tiere ordneten sich mit ihren Laufzeiten zwischen die beiden anderen Gruppen ein

(WT-AK2.5: 629 [154,75-852,5]s). An Tag 2 nach Reanimation war es nahezu allen TLR2^{-/-}-Tieren möglich, die insgesamt 900 Sekunden Laufzeit zu absolvieren. Die Tiere der Kontrollgruppe hingegen erreichten nur 278 [51-448]s. Auch die Tiere der dritten Versuchsgruppe wiesen nur eine mäßige Besserung auf (WT-AK2.5: 580 [457,75-900]s). Ein ähnliches Bild zeigte sich an Tag 3 und 5 nach Reanimation. An Tag 7 erreichten nicht alle WT-Tiere, egal ob mit oder ohne AK-Behandlung, die 900 Sekunden (WT: 900 [871-900]s; WT-AK2.5: 900 [882,75-900]s). Im Vergleich zeigten die Tiere der TLR2^{-/-}-Gruppe unverändert lange Laufzeiten (TLR2^{-/-}: 900 [900-900]s). Ab Tag 11 erreichten die Tiere der Kontrollgruppe und ab Tag 9 die WT-AK2.5-Tiere ebenso lange Zeiten auf dem RotaRod, eine maximal gute Geschicklichkeit, Koordination und Ausdauer, welche bis Tag 28 unverändert blieben.

RotaRod-Laufzeiten [s]			
Tag	WT	TLR ^{-/-}	WT-AK2.5
-1	586 [388-709]	708 [447-900]*	626 [553-806]
0	900 [723-900]	900 [837-900]	900 [845-900]
1	74,5 [9-445]	900 [697-900]*	629 [155-853] [#]
2	291,5 [58-453]	900 [900-900]*	580 [457-900] [#]
3	379,5 [93-638]	900 [807-900]*	488 [322-900]
5	667 [356-900]	900 [900-900]*	900 [443-900]
7	900 [871-900]	900 [900-900]	900 [882-900]
14	900 [900-900]	900 [900-900]	900 [900-900]
28	900 [900-900]	900 [900-900]	900 [860-900]

Tab. 8 RotaRod-Laufzeiten der Versuchstiere

ANOVA/ Bonferroni *p<0,05 WT vs. TLR^{-/-}; [#]p<0,05 WT vs. WT-AK2.5

3.4.5 Elevated PlusMaze-Test

Zeiten im offenen und geschlossenen Arm

Alle Tiere zogen sich zunächst in den geschlossenen Arm, der in Blickrichtung lag, zurück. Erst danach begannen sie sich zu orientieren. Am Tag der Reanimation stellte sich kein deutlicher Unterschied zwischen den Zeiten im offenen und geschlossenen Teil zwischen den Gruppen dar.

Der Tag nach der Reanimation ergab, dass sich sowohl die TLR2^{-/-}-Tiere als auch die WT-AK2.5-Tiere etwas länger im offenen Bereich aufhielten. Am Tag 2 nach Reanimation hielten sich die TLR2-defizienten Tiere nur unwesentlich öfter im offenen Arm auf als die Tiere der Kontrollgruppe. Erst an Tag 3 zeigte sich ein Unterschied zwischen den Gruppen, wobei sich die WT-Tiere und antikörperbehandelten WT-Tiere etwas länger im offenen Arm aufhielten als die TLR2-defizienten. (WT: 0 [0-4]s; TLR2^{-/-}: 0 [0-2]s; WT-AK2.5: 0 [0-10]s) In den darauffolgenden Tagen stellten sich kaum Unterschiede zwischen den Tieren der einzelnen Gruppen dar. Am letzten Beobachtungstag (Tag 28) gingen weder die Tiere der TLR2^{-/-}-Gruppe, noch die der WT-Gruppe oder die der Gruppe mit Antikörperapplikation auf einen der offenen Arme und hielten sich über die zehn Minuten Beobachtungszeit komplett im geschlossenen Teil auf.

Zeit im offenen Arm [s]			
Tag	WT	TLR2 ^{-/-}	WT-AK2.5
0	5 [0-14]	2 [0-34]	8 [0-15]
1	0 [0-0]	0 [0-5]	0 [0-8]
2	0 [0-0]*	0 [0-3]	0 [0-1]
3	0 [0-5]	0 [0-2]	0 [0-10]
5	0 [0-0]	0 [0-7]	0 [0-2]
7	0 [0-2]	0 [0-7]	0 [0-0]
14	0 [0-8]	0 [0-7]	0 [0-5]
28	0 [0-0]	0 [0-0]	0 [0-0]

Tab.9 gelaufene Zeit der Versuchstiere im offenen Arm des Elevates Plus Maze-Tests;

WT vs. TLR2^{-/-} *p<0,05

Zurückgelegte Distanz

Es wurde die Strecke, die die Tiere sowohl im geschlossenen als auch offenen Arm zurücklegten, gemessen und als gesamt gelaufene Strecke ausgewertet. An Tag 0 legten die WT-Tiere eine Gesamtstrecke von 750 [540-935]cm zurück, die im Vergleich zu den TLR2^{-/-}-Tieren mit 645 [480-810]cm deutlich länger war. Sie hielten sich dabei sowohl in den offenen als auch geschlossenen Bereichen des Kreuzes auf, wobei Letzteres häufiger war. Die Tiere der WT-AK2.5-Gruppe liefen am Tag der Reanimation 870 [667-1031]cm innerhalb des geschlossenen und offenen Arms. An Tag 1 legten die WT-Tiere eine geringere Gesamtstrecke zurück als vor der Reanimation. Es zeigten sich bessere Ergebnisse bei den TLR2^{-/-}-Tieren (WT: 360 [30-1260]cm vs. TLR2^{-/-}: 820 [247-1305]cm). Auch die WT-AK2.5-Tiere zeigten mit einer zurückgelegten Strecke von 870 [592-1260]cm kaum einen Leistungsabfall. Am darauffolgenden Tag 2 war die Wegstrecke im Kreuz der TLR2-defizienten Tiere mit 450 [232-750]cm ebenfalls länger als die der WT-Tiere mit 285 [90-540]cm. Die Tiere mit Antikörperbehandlung zeigten an Tag 2 einen Rückgang der Laufaktivität, die an Tag 3 jedoch bereits wieder leicht anstieg. Fünf Tage nach Reanimation liefen die WT-Tiere eine etwas längere Strecke als die TLR2-defizienten, jedoch ergab sich in der statistischen Auswertung kein Unterschied (WT: 630 [540-840]cm vs. TLR2^{-/-}: 330 [225-555]cm). Bei den WT-AK2.5-Tieren war ein erneuter Anstieg der Laufstrecke zu verzeichnen (WT-AK2.5: 710 [435-850]cm). Auch in der zweiten Woche nach Reanimation verhielten sich die Gruppen im Laufverhalten ähnlich. Am Ende der Beobachtungszeit, Tag 28, erreichten wiederum die WT-Tiere etwas längere Laufstrecken als die TLR2^{-/-}-Tiere. Die AK-behandelten Tiere fielen bei der Laufstreckenweite stark ab und liefen geringere Distanzen als vor der Reanimation (WT: 570 [397-900] cm; TLR^{-/-}: 420 [330-570] cm; WT-AK2.5: 390 [292-532] cm). Im Vergleich zum Tag der Reanimation haben die Laufstrecken aber in allen Gruppen abgenommen.

Länge der zurückgelegten Distanz [cm]			
Tag	WT	TLR2 ^{-/-}	WT-AK2.5
0	785,33 ± 59,57*	626,17 ± 49,26	838,67 ± 50,5
1	360[30-1260]	820 [248-1305]	870 [593-1260]
2	285 [90-540]	450 [233-750]	300 [150-450]
3	350 [165-623]	340 [240-573]	405 [330-540]
5	623,33 ± 75,29	424,25 ± 71,95	632,3 ± 84,32
7	618,82 ± 92,72	488,91 ± 61,40	606,15 ± 90,44
14	585 [480-750]	480 [353-660]	465 [345-680]
28	570 [398-900]	420 [330-570]	390 [293-533]

Tab. 10 gesamte Länge der zurückgelegten Distanz der Versuchstiere im Elevated Plus Maze-Test;

WT vs. TLR2^{-/-} *p<0,05

Anzahl des Hochstreckens

An Tag 0, dem Tag der Reanimation, streckten sich die WT- und die WT-AK2.5-Gruppe im geschlossenen Teil des Kreuzes häufiger nach oben als die TLR2^{-/-}-Tiere. Am Tag nach der Reanimation hingegen stellte sich ein umgekehrtes Bild dar. Ebenso wie in den anderen beiden Gruppen zeigten die Tiere mit AK-Behandlung einen Aktivitätsabfall am Tag nach der Reanimation. Bereits an Tag 2 und 3 zeigten sich jedoch keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Fünf Tage nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation stellte sich ein ähnliches Bild wie vor der Reanimation dar. Die WT-Tiere waren nun wieder aktiver und auch die antikörperbehandelten Tiere zeigten einen weiteren Aktivitätsanstieg. Auch an den nachfolgenden Tagen bis zum Ende des Beobachtungszeitraums zeigten die Kontrollgruppe und die WT-AK2.5-Gruppe eine höhere Anzahl des Hochstreckens.

Anzahl des Hochstreckens			
Tag	WT	TLR2 ^{-/-}	WT-AK2.5
0	11,40 ± 1,05 *	8,23 ± 0,91	18,60 ± 1,95
1	0 [0-2]*	2 [1-5]	5 [1-16]
2	2 [0-4]	2 [1-5]	4 [0-101]
3	3 [1-6]	3 [1-6]	8 [1-12]
5	10 [3-18]*	3 [2-4]	11 [8-15]
7	11 [7-15]*	5 [3-9]	13 [9-17]
14	9,88 ± 1,06*	4,7 ± 0,47	12,5 ± 2,14
28	9 [3-13]	3 [2-7]	9 [6-12]

Tab. 11 Anzahl des Hochstreckens der Versuchstiere im Elevated Plus Maze-Test;

WT vs. TLR2^{-/-} *p<0,05

Anzahl des Über-den-Rand-Schauens (Maß der Neugierde)

Anzahl des über den Randschauens			
Tag	WT	TLR2 ^{-/-}	WT-AK2.5
0	13,87 ± 1,14*	18,43 ± 1,49	17,53 ± 1,43
1	5,50 [0-11]*	12[4-19]	3 [2-7]
2	2,5 [0-6]*	5 [2-10]	2 [0-8]
3	5,95 ± 1,14	7,08 ± 1,02	5,54 ± 3,2
5	7 [3-10]	6 [2-10]	6 [4-10]
7	9,47 ± 1,63	9,17 ± 1,54	6,85 ± 1,56
14	6,81 ± 1,1	8,30 ± 1,03	9,08 ± 1,95
28	5 [3-11]	6 [4-10]	5 [2-7]

Tab. 12 Anzahl des über den Randschauens der Versuchstiere im Elevated Plus Maze-Test; WT vs.

TLR2^{-/-} *p<0,05

Schon am Tag der Reanimation schauten die TLR2-defizienten Mäuse mit einem Wert von 18,43 [\pm 1,49] häufiger über den Rand der offenen Arme auf den Boden als die Tiere ohne TLR2-Defekt (WT: 13,87 [\pm 1,14]). Auch am Tag nach der Reanimation schauten sie zwar im Vergleich zu Tag 0 seltener, aber dennoch öfter als die WT-Mäuse und auch häufiger als die WT-AK2.5-Tiere über den Rand des ElevatedPlus (WT: 5 [0-11]; TLR2^{-/-}: 12 [4-19]; WT-AK2.5: 3 [2-7]). Ähnliche Werte ergaben sich an Tag 2 nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation. Ab Tag 3 waren zwischen den Gruppen keine Unterschiede mehr sichtbar. Die Aktivität der Tiere reduzierte sich bis zum Tag 28 auf 5 [3-11] mal Über-den-Rand-Schauen in der WT-Gruppe, 6 [4-10] mal bei den TLR2^{-/-}-Tieren und 5 [2-7] mal bei den WT-AK2.5-Tieren.

3.4.6 WaterMaze-Test

Beim ersten Wasserkontakt (EK) benötigten die WT-Tiere, egal ob sie später der WT-Gruppe oder der WT-AK2.5-Gruppe zugeordnet wurden, nach fünf Versuchen im Median 13 [8-28]s, um den Stein zu finden. Die TLR2^{-/-}-Tiere benötigten dafür 14 [9-19]s. Bereits am zweiten Tag war eine Verkürzung der Zeiten zu beobachten. Die WT-Tiere schwammen nur noch 11 [4-36]s und die TLR2^{-/-}-Tiere 12 [6-36]s, bis sie den Stein gefunden hatten. Bis zum Tag vor der Reanimation war nur in der WT-Gruppe der Nachweis eines Lerneffektes möglich.

Nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation konnten die TLR2-defizienten Tiere auf Grund der schnelleren funktionell-neurologischen Regeneration früher am WaterMaze-Test teilnehmen. Bereits an Tag 3 [3-6] nach Reanimation hatten sie die nötigen Kriterien erfüllt. Die WT-Tiere erreichten im Schnitt erst an Tag 5 [3-11] nach Reanimation die Voraussetzungen zur Teilnahme. Wie auch die TLR2^{-/-}-Tiere durften die antikörperbehandelten Tiere bereits an Tag 3 [3-4] nach Reanimation wieder am Test teilnehmen.

Beim ersten Wasserkontakt nach Reanimation zeigte sich, unabhängig davon wie früh oder spät die Tiere nach der Reanimation wieder zum Test zugelassen wurden, dass die Tiere beider Gruppen das Auffinden der Plattform nicht verlernt hatten, wenn man vorher einen Lerneffekt beobachten konnte. Den WT-Tieren reichte eine Schwimmzeit von 9 [4-21]s um, den Stein zu erreichen. Die der TLR2^{-/-}-Gruppe benötigten, wie auch schon vor der Reanimation, längere Zeit (TLR2^{-/-}: 16 [7-23]s). Die antikörperbehandelten Tiere benötigten 8 [7-30]s um sich auf den Stein zu

setzen. Auch beim zweiten Wasserkontakt nach CA/CPR erreichten die Tiere der Gruppen ähnliche Werte. (WT: 9 [5-92]s vs. TLR2^{-/-}: 17 [8-37]s; WT-AK2.5: 5 [4-62]s)

Die TLR2^{-/-}-Tiere benötigten auch am fünften Tag nach dem ersten Schwimmversuch nach Reanimation (Tag X+5) im WaterMaze-Test länger, um den Stein zu finden, als die AK-behandelten und auch länger als die unbehandelten WT-Tiere. Die WT-Gruppen-Tiere brauchten 6 [3-11]s, die WT-AK2.5-Tiere 2 [2-7]s und zeigten somit eine weitere Verbesserung der benötigten Zeit.

			WT n=31	WT- AK2.5 n=15	TLR2 ^{-/-} n=30
Trainingsphase vor CA/CPR					
erster Versuch vor CA/CPR	Tag -5	Zeit [s]		13 [8-28]	14 [9-19]
letzter Versuch vor CA/CPR	Tag -1	Zeit [s]		9 [3-23] *	16 [9-39]
nach CA/CPR					
erster Versuch nach CA/CPR	Tag X	Zeit [s]	9 [4-21]	8 [7-30]	16 [7-23]
letzter Versuch nach CA/CPR	Tag X+5	Zeit [s]	6 [3-11]	2 [2-7] §	16 [6-31]
Teilnahme am Water Maze Test nach CA/CPR					
Teilnahme nach CA/CPR		n [%]	16/31 [51,6]	12/15 [80] [#]	23/30 [76,6] ^{&}
erster Tag der Teilnahme nach CA/CPR (Tag X)		Tag	5 [3-11]	3 [3-4] [#]	3 [3-6] ^{&}

Tab. 13 Zeiten und Teilnahme WaterMaze-Test nach CA/CPR

ANOVA/Bonferri/Chi-Quadrat-Test für die Teilnahme nach CA/CPR; p<0,05

WT Tag -5 vs. TLR2^{-/-} Tag -1; WT-AK2.5 Tag X vs. Tag X + 5; [#]WT vs. WT-Ak2.5; [&]WT vs. TLR2^{-/-}

3.5 Inflammationsparameter

Die erhobenen Basalwerte betrugen für Corticosteron (WT: 96,53 [±2,726]nmol/l vs. TLR2^{-/-}: 96,85 [±2,88]nmol/l), IL-1β (WT: 0,46 [±0,144]pg/ml vs. TLR2^{-/-}: 0,24 [±0,09]pg/ml) und IL-6 (WT: 18 [±11]pg/ml vs. TLR2^{-/-}: 46,14 [±12,7]pg/ml). Acht Stunden nach Reanimation wiesen die Tiere aller Gruppen einen ausgeprägten Anstieg der Corticosteron-Plasmakonzentration im Vergleich zum Basalwert auf. (WT: 932,05 [±124,85]nmol/l; TLR2^{-/-}: 1268,68 [±66,26]nmol/l; WT-AK2.5: 800,52 [±95,1]nmol/l)

Beim IL-1 β stellte sich für die TLR2^{-/-}-Gruppe nur ein unwesentlich geringerer Konzentrationsanstieg zum Basalwert im Vergleich zu den WT-Tieren und auch den WT-AK2.5-Tieren dar (WT: 0,72 [\pm 0,24]pg/ml; TLR2^{-/-}: 0,42 [\pm 0,28]pg/ml; WT-AK2.5: 0,88 [\pm 0,21]pg/ml).

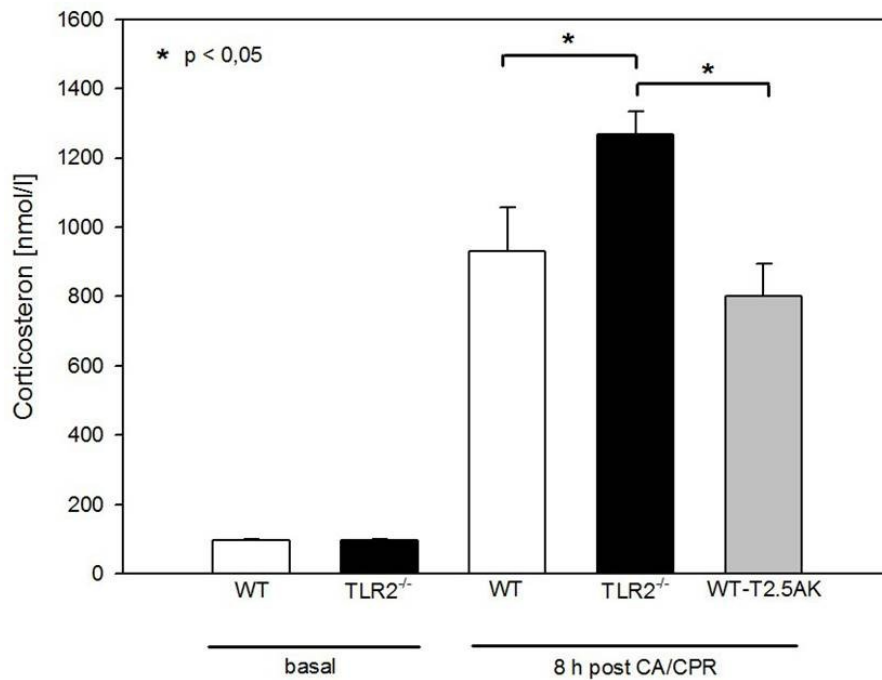


Abb. 16 Plasmakonzentrationen von Corticosteron 8h nach CA/CPR

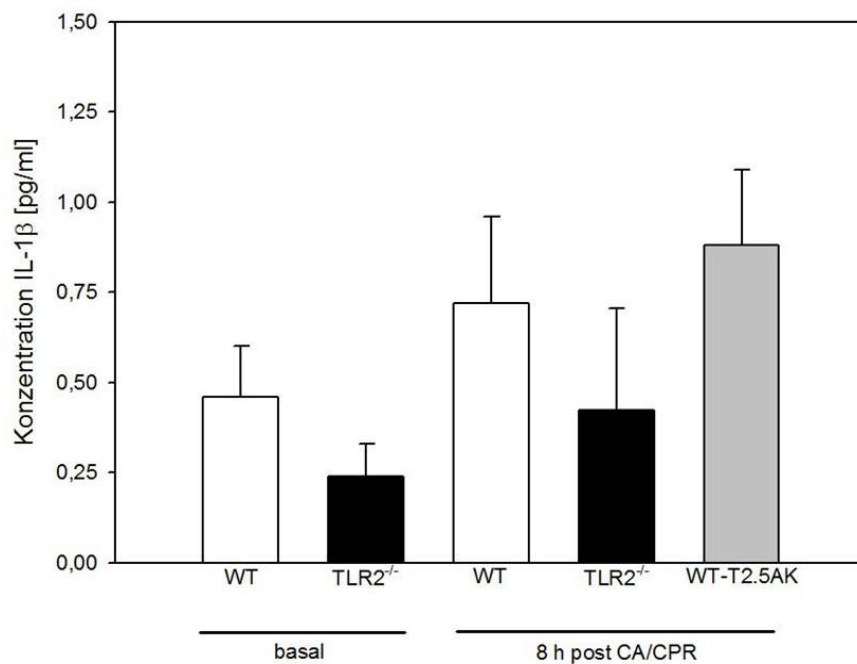


Abb. 17 Plasmakonzentration von IL-1 β 8h nach CA/CPR

Anders beim IL-6. Hier stieg die Konzentration des Interleukin bei den TLR2-defizienten Tieren nur unwesentlich im Vergleich zum Basalwert auf 237,04 [\pm 48,4]pg/ml an. Die WT-Tiere, egal ob mit oder ohne Antikörperbehandlung, hingegen reagierten acht Stunden nach Reanimation mit einem sehr starken Anstieg des IL-6 (WT: 1949,04 [\pm 449,28]pg/ml; WT-AK2.5: 2167,02 [\pm 307,2]pg/ml).

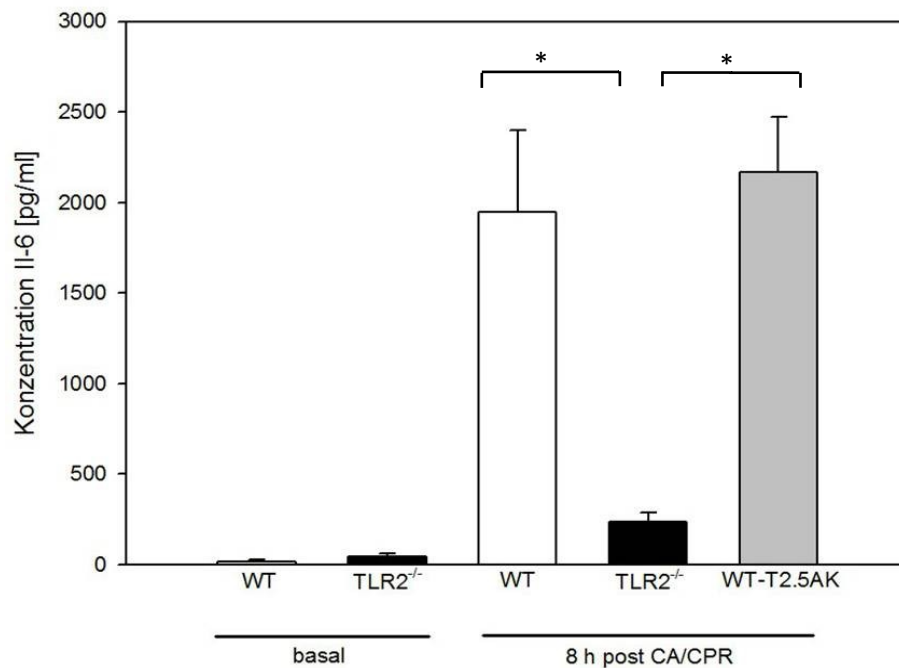


Abb. 18 Plasmakonzentration von IL-6 8h nach CA/CPR;

WT vs. TLR2^{-/-} und WT-AK2.5 *p<0,05

3.6 Histologie

Es wurden histologische Schnitte von Herz, Lunge, Leber, Nieren und Gehirn angefertigt. In die Untersuchungen wurden die Organe der innerhalb des Beobachtungszeitraums frisch verstorbenen Tiere, Organe zufällig ausgewählter Tiere, die den Zeitraum von 28 Tagen überlebt hatten sowie die der Tiere, an denen 8 Stunden nach CA/CPR eine Blutentnahme erfolgte, einbezogen.

Abbildung 19 (Hippocampus-Kontrolle 50x) zeigt die Hippocampusregion einer gesunden Maus in Nisselfärbung. Exemplarisch ist darunter die Hippocampusregion einer am fünften Tag nach CPR verstorbenen Maus dargestellt. Es ist zu erkennen, dass vor allem die hippocampale CA-1-Region in der Maus nach CA/CPR schmaler ist als in der gesunden. Aber auch in CA-2, CA-3 und CA-4 ist eine Reduktion der Neuronendichte, vor allem in stärkerer Vergrößerung sichtbar.

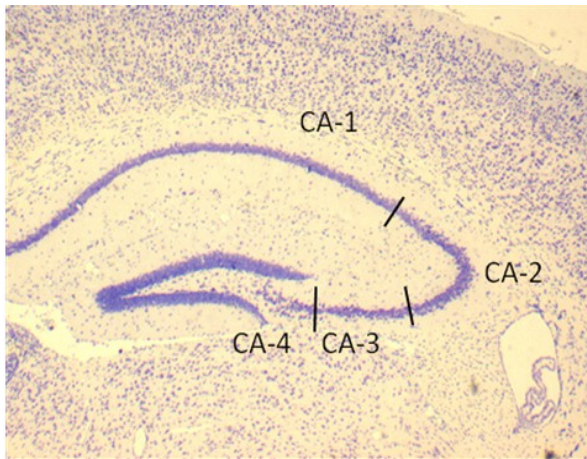


Abb. 19 Hippocampus - Kontrolle, 50-fache Vergrößerung, Nissl

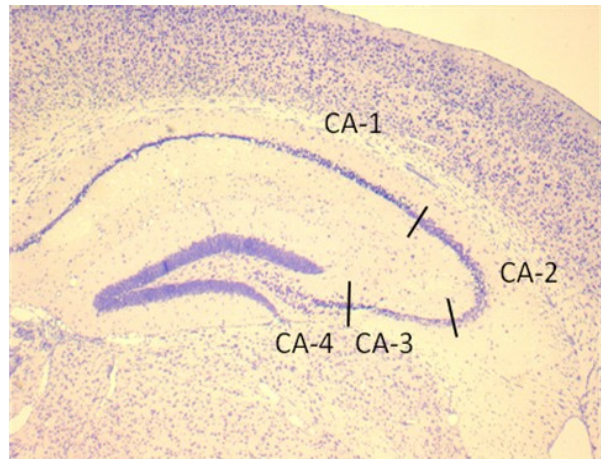


Abb. 20 Hippocampus – fünfter Tag nach CA/CPR, 50-fache Vergrößerung, Nissl

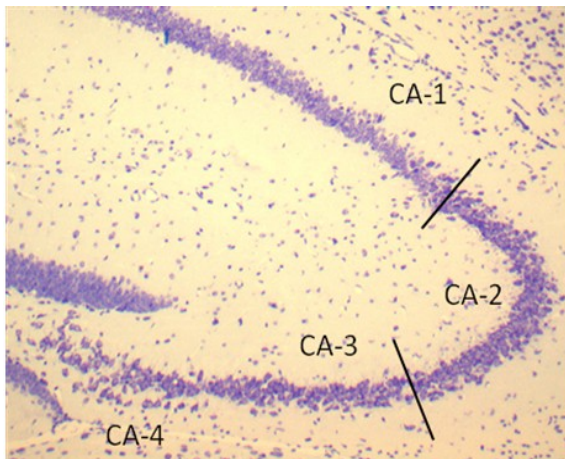


Abb. 21 Hippocampus - Kontrolle, 100-fache Vergrößerung, Nissl

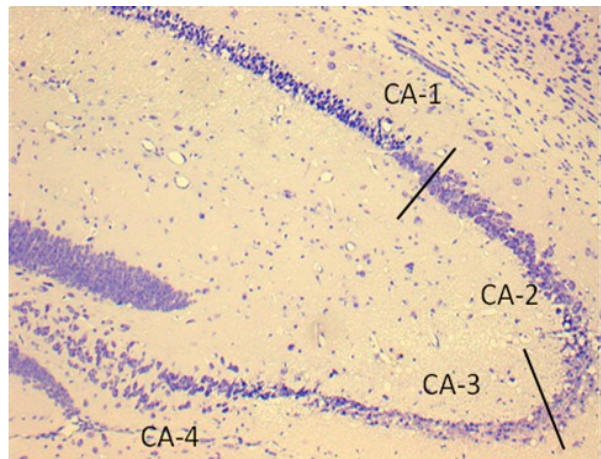


Abb. 22 Hippocampus – fünfter Tag nach CA/CPR, 100-fache Vergrößerung, Nissl

In der Histologie der Lunge konnten nach CA/CPR eine Verdickung der Basalmembran sowie leukozytäre Infiltration gesehen werden. In der Leber stellten sich eine Vakuolisierung der Hepatozyten sowie apoptotische Zellkerne dar. Nieren und Herz erschienen im Vergleich zur Kontrolle unauffällig.

Zusammengefasst zeigten sich deutliche Hypoxie-induzierte Veränderungen an Gehirn, Lunge und Leber. Die Niere und das Herz stellten sich ohne histologisch-morphologisch nachweisbare Veränderungen dar.

In den histologischen Schnitten der Organe von ausgewählten Tieren, die den Beobachtungszeitraum von 28 Tagen überlebt hatten, zeigten sich keine pathologischen Veränderungen.

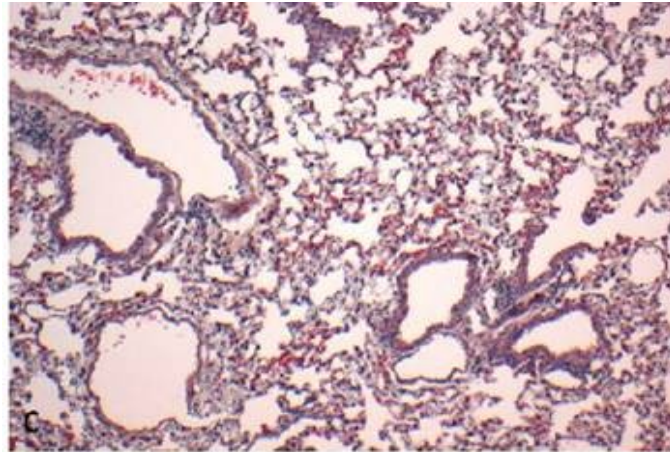


Abb. 23 Lunge – fünfter Tag nach CA/CPR, 50-fache Vergrößerung CAE

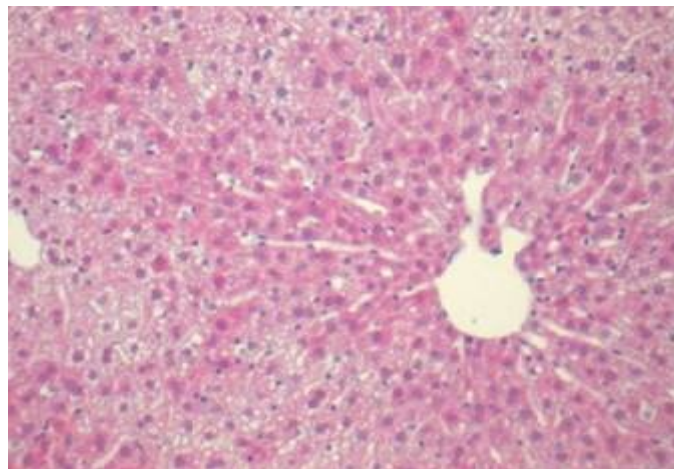


Abb. 24 Leber – fünfter Tag nach CA/CPR, 50-fache Vergrößerung HE

4. Diskussion

4.1 Versuchstiere

Im Rahmen der Reanimationsforschung liegt der Hauptschwerpunkt in der Verbesserung der funktionell-neurologischen Regeneration. Aufgrund der Komplexität der Postreanimationserkrankung und der Wichtigkeit von neurologischen Funktionstests ist nur das Tierexperiment geeignet, diesbezüglich verwertbare Aussagen zu treffen. Versuche an Zellkulturen oder Computermodellen sind nicht in der Lage, die komplexen Zusammenhänge zwischen den unterschiedlichen Systemen wie z.B. Gerinnung, Inflammation und Funktionen von Hypophyse, Thalamus oder Nebennieren darzustellen.

Kleintiermodelle mit Ratte oder Maus sind im Rahmen der Reanimationsforschung fest etabliert. Durch die Möglichkeit zur Integration von funktionell-neurologischen Tests sind sie besonders gut geeignet, die funktionelle Regeneration nach Reanimation, aber auch die Auswirkung therapeutischer Interventionen zu untersuchen.

Mäuse weisen einen schnellen Vermehrungszyklus sowie eine kosten- und platzgünstige Haltung auf und sind somit besser geeignet als Großtiere, wie z.B. Hunde oder Schweine. Im Bereich der Mäusezucht sind – im Gegensatz zu Ratten – zahlreiche genetische Varianten verfügbar. Bereits erprobte Antikörper, die sich möglicherweise therapeutisch nutzen lassen, sind kommerziell erhältlich.

Hinzu kommt, dass das kardiopulmonale System der Mäuse in Aufbau und Funktion gut mit dem des Menschen zu vergleichen ist. Mäuse weisen, ebenso wie der Mensch, ein Herz mit vier Kammern, einer atrialen und einer ventrikulären Ebene auf. Während der Narkose liegt ihr mittlerer arterieller Blutdruck auch zwischen 70 mmHg und 90 mmHg. Einen deutlichen Unterschied stellt die höhere Herzfrequenz der Mäuse dar [27].

4.1.1 Weibliche Maus

In dem verwendeten Reanimationsmodell wurden weibliche Tiere verwendet. In bereits früher durchgeführten Studien der Arbeitsgruppe IRIS mit männlichen Tieren traten Probleme auf, die zu dieser Entscheidung führten. Ab etwa dem siebenten Tag nach CPR zeigten viele der männlichen Tiere Anzeichen von abdominellen

Schmerzen und eine verminderte Bewegung innerhalb ihres Käfigs. Bei der Untersuchung von verstorbenen Tieren, die eine solche Symptomatik aufwiesen, zeigte sich nach Eröffnung des Abdomens eine prallgefüllte Harnblase. Der Urin in der Blase war klar und zeigte keine weiteren pathologischen Befunde. Die anderen Organe der untersuchten Tiere, welche zuvor scheinbar unter einer Miktionsstörung litten, waren unauffällig. Die genauen Ursachen dieses Problems zu eruieren und zu eliminieren, war nicht möglich. Ein kürzerer Beobachtungszeitraum war auf Grund der Fragestellung nicht wünschenswert, weshalb auf die Verwendung weiblicher Tiere zurückgegriffen wurde. Bei der Entscheidung für weibliche Versuchstiere wurden mögliche Einflüsse von Östrogen auf das Überleben in Kauf genommen. In der Literatur ist der protektive Effekt von Östrogen auf eine verminderte Schädigung von neuronalem Gewebe nach globaler Ischämie und besonders auch auf apoptotische Vorgänge in der Hippocampusregion beschrieben [28]. Von Gibson und Murphy wurde gezeigt, dass eine Progesteronbehandlung die Ödementstehung nach Ischämie des Gehirns bei Mäusen mindert [29]. Roof et al. publizierten, dass Progesteron durch das Abfangen von Radikalen in der Lage ist, den peroxidativen Schaden in den Geweben zu vermindern [30].

Durch eine entsprechend hohe Anzahl an Versuchstieren (WT n=31; TLR2^{-/-} n=30; WT-AK2.5 n=15) wurde versucht mögliche zyklusbedingte positive Einflüsse auf das Überleben und das funktionell-neurologische Behandlungsergebnis auszugleichen. Auf eine Synchronisation der Zyklen der Tiere wurde verzichtet. Durch die hohe Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe und die relativ kurze Zyklusdauer von 3-6 Tagen gleichen sich interindividuelle Unterschiede im Zyklus innerhalb der Gruppen aus. Somit ist dessen Einfluss auf das Reanimationsergebnis einer ganzen Gruppe eher unwahrscheinlich.

4.1.2 Größe, Alter, Gewicht

Es wurden 12-16 Wochen alte C57BL/6J-Mäuse verwendet. In diesem Alter haben die Tiere durchschnittlich ein Körpergewicht von 20-24 g erreicht. An diesen entsprechend adulten Tieren ist es gut möglich, die nötigen Präparationen für das Legen des ZVKs durchzuführen. Sind die Tiere zu klein und leicht (unter 20 g), erschwert dies die genaue Platzierung des Katheters in die V. jugularis, da diese der Größe des Tieres entsprechend ausgeprägt ist. Liegt das Körpergewicht über 24 g, ist die Präparation durch vermehrtes Fettgewebe in den Halsweichteilen erschwert.

Als deutlicher Unterschied zur präklinischen Reanimationssituation beim Menschen ist zu erwähnen, dass ausschließlich gesunde Jungtiere verwendet wurden, wodurch der Einfluss von Nebenerkrankungen auf das Reanimationsergebnis deutlich geringer ist. Zusätzlich haben die Einflüsse von Alter und Adipositas im Rahmen der Reanimationsforschung eine eigenständige Bedeutung und werden von dieser Arbeit getrennt untersucht.

4.1.3 Gruppengröße

Um statistisch und biologisch verlässliche Aussagen treffen zu können, wurde eine Poweranalyse zur Ermittlung der notwendigen Gruppengröße durchgeführt. Die geringe Gruppenstärke der WT-AK2.5-Tiere ist der Tatsache geschuldet, dass die Kosten für den applizierten Antikörper pro Tier extrem hoch sind.

4.2 Voruntersuchungen

Durch Immunhistochemie, PCR-Analyse und Stimulationsversuch wurde der TLR2-Status in den Versuchstieren zunächst vor Beginn der Reanimationsexperimente überprüft. Die Anfärbbarkeit des TLR2 in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde zeigte, dass beide Tierstämme den untersuchten Rezeptor exprimieren. In menschlichem Gewebe konnten Borstein et al. bereits darstellen, dass die TLR2-Expression in der Nebennierenrinde stark ausgeprägt ist, hier vor allem in der Zona glomerulosa, aber auch in der Zona fasciculata [10]. Die PCR-Analyse zeigte das unterschiedliche Genom der Tierstämme. Die funktionelle Überprüfung des Rezeptorstatus mittels Stimulation durch LTA ergab im nächsten Schritt den sicheren funktionellen Defekt des TLR2 in den TLR2^{-/-}-Mäusen. LTA ist ein spezifischer Ligand des TLR2, der natürlicherweise in den Zellwänden von gram-positiven Bakterien nachzuweisen ist. Der, wenn auch geringe Anstieg der Corticosteronplasmaspiegel bei den TLR2-defizienten Mäusen lässt sich dadurch belegen, dass diese ebenso wie die WT-Tiere durch die Narkose und Injektion eine Stressreaktion erfahren, auf die sie reagieren. Dies weist darauf hin, dass es neben dem TLR2 noch alternative Wege zur Stimulation der Corticosteronausschüttung gibt.

Der Rezeptor wird also in der TLR2^{-/-}-Vergleichsgruppe exprimiert und in die Zellmembranen eingebaut, ist jedoch funktionell ausgeschaltet.

Eine von Borstein et al. beschriebene relative Nebenniereninsuffizienz von TLR2- defizienten septischen Mäusen konnte in diesem Modell zur kardiopulmonalen Reanimation nicht bestätigt werden [10]. Nach CA/CPR kam es zu einem suffizienten Anstieg der Corticosteronspiegel.

4.3 Reanimationsmodell

4.3.1 Narkose

Die Tiere wurden vor Präparationsbeginn mit einer intraperitonealen Injektion eines Ketamin/Xylacin-Gemisches narkotisiert. Dies ist eine gängige Methode zur Narkotisierung von kleinen Nagetieren. Die verwendete Dosierung war ausreichend, sodass die Versuchstiere für die Dauer des Akutversuches adäquat betäubt waren [31]. Unter dieser Narkose kommt es bei den Tieren zu einem leichten Abfall der Herzfrequenz und einem regulatorischen Anstieg des Blutdruckes. Die Atemfrequenz der Tiere steigt im Vergleich zum wachen Bewusstseinszustand um etwa zehn Atemzüge pro Minute an. Die rektale Temperatur fällt während dieser Zeit ohne Einsatz wärmender Maßnahmen um ca. 2°C ab [31]. Begründet ist dies unter anderem durch eine fehlende Muskelaktivität, sowie niedrige Umgebungstemperaturen. Des Weiteren wurde durch Arras et al. beschrieben, dass der PaO₂ während der Narkose keine starken Veränderungen zeigt, der PaCO₂ jedoch deutlich ansteigt und ein Abfall des pH-Wertes zu beobachten ist. Durch den Einsatz eines EKGs, einer Blutdruckmessung und der rückgekoppelten rektalen Temperatursonde konnten diese Veränderungen überwacht werden. Durch die Intubation der Tiere war es möglich, die Atemfrequenz und das Volumen zu kontrollieren und somit normale PaO₂- und PaCO₂-Werte aufrecht zu erhalten. Auf Grund des protektiven Effekts von volatilen Anästhetika wurde auf deren Einsatz verzichtet, da eine positive Beeinflussung des Reanimationsergebnisses durch sie nicht ausgeschlossen werden konnte [32]. Des Weiteren sollte der Versuchsaufbau nah am klinischen Alltag einer Intensivtherapiestation sein, auf der aus verschiedenen Gründen, wie negativer Inotropie und vasodilatatorischer Wirkung, keine Inhalationsanästhesie durchgeführt wird.

4.3.2 Beatmung

Da das Reanimationsmodell an der realen Reanimationssituation orientiert ist, wurden die Tiere vor Induktion des Herz-Kreislaufstillstandes mit einer F_iO_2 von 0,21 beatmet. Erleidet ein Patient einen Herzstillstand in der Häuslichkeit, auf der Straße oder einer normalen Krankenstation, geschieht dies im klinischen Alltag in den meisten Fällen unter Raumlufbedingungen. Eine höhere Sauerstoffkonzentration würde einer Präoxygenierung und somit einer Protektion gegenüber dem ischämischen Schaden gleichkommen. In verschiedenen anderen Reanimationsmodellen finden sich unterschiedlich hohe verwendete F_iO_2 . In den meisten Modellen wird über den gesamten Zeitraum des Versuches eine F_iO_2 von 1.0 verwendet.

In der hier dargestellten Untersuchung wurde zum Beginn der CPR eine F_iO_2 von 1,0 verwendet. Diese entspricht den aktuellen Reanimationsleitlinien [33].

Autor	Zeit CA	FiO_2	Nachbeobachtungszeit
Abella et al. [23]	8 min	1.0	72 h
Norman et al. [54]	-	-	7 d
Nakano et al. [55]	10 min	1.0	3 d
Neight et al. [48]	8 min	1.0	5 d
Menzebach et al. [21]	3 min	0.4	72 h
Böttiger et al. [56]	5 min	0.3	7 d
Dezfulian et al. [57]	12 min	0.5	24 h

Tab. 14 vergleichende Übersicht verschiedener Reanimationsmodelle

4.3.3 Blutdruckmessung

Die Blutdruckmessung bei Nagetieren kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Zum einen besteht die Möglichkeit der nicht invasiven Blutdruckmessung durch plethysmographisches Ableiten einer Pulsdruckkurve an der Schwanzarterie. Zum anderen besteht die Option einer invasiven arteriellen Blutdruckmessung. Hierfür können spezielle Katheter verwendet werden, die die Messung der Herzfrequenz und des mittleren arteriellen Druckes (MAP) ermöglichen. Zum Teil können auch weitere Parameter wie der Druckanstieg im linken Ventrikel oder die Pulsdruckvariation beschrieben werden. Während des ganzen Reanimationsvorganges wurde eine nicht invasive Blutdruckmessung an der Schwanzarterie vorgenommen. Bereits vor Beginn

der hier beschriebenen Untersuchung fand eine interne, bisher nicht publizierte Versuchsreihe statt, in welcher der Einfluss einer invasiven Blutdruckmessung mittels eines Millar-Tip-Katheters gegenüber einer nicht invasiven Blutdruckmessung, wie sie in der Etablierung dieses Kleintiermodells verwendet wurde, auf das Überleben der Tiere getestet wurde. Die Länge des Kreislaufstillstandes betrug drei Minuten. Dabei zeigte sich, dass allein schon die Einlage des Millar-Tip-Katheters in die Arteria (A.) carotis communis der Maus das Überleben sieben Tage nach Reanimation deutlich verschlechtert. Ein weiteres Problem ist, dass die Punktion und Ligatur des Gefäßes nach Entfernung des Katheters zu einer Ischämie führen kann. Diese Ischämie des Hirns bei Kathetereinlage in die A. carotis communis bzw. die Ischämie des Hinterlaufs bei Verwendung der A. femoralis kann zu Verfälschungen der Ergebnisse der funktionell-neurologischen Tests führen. Die nicht-invasive Messung stellt, ebenso wie der Millar-Tip-Katheter, eine gute Möglichkeit dar, den Parameter Blutdruck ohne invasive Maßnahme für das Tier zu überwachen. Nach CA ist keine Pulskurve mehr messbar. Durch Gabe des vasokonstriktiv wirkenden Adrenalins war es zum Teil direkt nach der Reanimation nicht zu jedem Zeitpunkt möglich, eine suffiziente Blutdruckmessung an der Schwanzarterie durchzuführen. Erst nach Normalisierung der Kreislaufverhältnisse, die sich 45-60 Minuten nach Reanimation einstellte, war eine zuverlässige Blutdruckmessung wieder möglich. Dennoch ist durch das ebenfalls für das hämodynamische Monitoring zur Verfügung stehende EKG eine Überwachung des Tieres während der ganzen Untersuchung gewährleistet. Ein Feststellen von sehr hohen oder niedrigen Messwerten direkt nach der Reanimation durch einen Millar-Tip-Katheter hätte keine Konsequenz im Sinne einer therapeutischen Maßnahme am Tier. Auch in anderen Reanimationsmodellen wurden solche Veränderungen ausschließlich dokumentiert, aber keine Interventionen durchgeführt. Lediglich in Arbeitsgruppen mit Großtiermodellen erfolgt eine Stabilisierung des MAP durch Volumen- und Katecholamintherapie. In diesem Punkt liegt eine Limitierung des Kleintiermodells vor [34].

4.3.4 Temperaturmessung

Die Temperaturmessung erfolgte während des Präparationsvorganges und während und nach der CA/CPR ausschließlich über eine rektale Temperatursonde. Diese ist rückkoppelnd an eine Wärmeplatte angeschlossen, sodass es möglich ist, das Tier

auf eine Temperatur von konstant 36°C einzustellen, eine normale rektale Temperatur bei Nagern [35]. Allerdings unterliegt auch die Körpertemperatur einer zirkadianen Rhythmik und schwankt zwischen 35,5-38,2°C [36]. Die protektive Wirkung der Hypothermie durch extra- oder intrakorporale Kühlung bei Herz-Kreislaufstillstand ist bereits ausführlich beschrieben [37]. Bei den Versuchen wurde streng auf eine Normothermie der Tiere geachtet. Eine Erhebung der Körpertemperatur mittels Platzierung einer Sonde unter der Leber hätte alternativ gewählt werden können. Diese Methode wäre jedoch nicht ohne ein Eröffnen des Abdomens umsetzbar, was ein zusätzliches Trauma für das Tier bedeutet hätte. Ein Einfluss auf das Überleben der Tiere durch diese invasivere Methode könnte somit nicht ausgeschlossen werden. Nach Beendigung der Reanimation und Extubation des Tieres wurde die rektale Temperatursonde entfernt. Ab diesem Zeitpunkt erfolgte keine Kontrolle der Körpertemperatur mehr. In der Literatur ist beschrieben, dass es bei Nagetieren nach Herz-Kreislaufstillstand eher zu einer Hypothermie als zu einem Anstieg der Körpertemperatur kommt [38] [39]. Dies steht im Gegensatz zur Reaktion von Großtieren, oder auch Menschen, auf das Ereignis einer Reanimation. Hier ist tendenziell eher die Ausbildung einer Hyperthermie zu beobachten [40] [41]. Das Einstellen einer Hypothermie, die das Überleben der Tiere positiv beeinflusst und somit auch eine Erklärung für dieses gute Überleben nach langem Herz-Kreislaufstillstand sein könnte, ist daher nicht auszuschließen. Da die Tiere alle unter den gleichen räumlichen Bedingungen gehalten wurden, würde sich eine Verminderung der Körpertemperatur bei allen Tieren etwa gleich stark einstellen und könnte als systemischer Fehler gewertet werden. Das Messen der Temperatur der Mäuse nach der Reanimation ist schwer umzusetzen, ohne die Tiere weiterem Stress auszusetzen. Eine nicht invasive Möglichkeit der Temperaturmessung ist die Verwendung einer Infrarotkamera, welche in späteren Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe zur Anwendung kam.

4.3.5 Zentraler Venenkatheter

Um während des ganzen Reanimationsvorganges einen sicheren Zugang gewährleisten zu können, wurde ein ZVK verwendet. Trotz des zusätzlichen Eingriffs an dem Tier zur CA/CPR stellt die Einlage des Katheters nur einen minimal invasiven Vorgang dar. Die Anlage dauert bei einem Tier mit entsprechender Größe nur etwa

10-15 Minuten und geht mit keinem größeren Blutverlust einher. Der ZVK ist unverzichtbar. Über ihn kann eine sichere intravenöse Applikation von Kalium zur Induktion der Asystolie und zur Injektion des Adrenalins zur Reanimation gewährleistet werden. Die V. jugularis ist bei der Maus das am besten geeignete Gefäß. Durch gutes Fixieren des Katheters kann eine Dislokation verhindert werden. Die nach Entfernung des Katheters resultierende Wunde beeinträchtigt die Tiere nicht.

4.4 Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation

4.4.1 Induktion des Herz-Kreislaufstillstandes

Die sichere Induktion des Herz-Kreislaufstillstandes erfolgte mittels intravenöser Gabe von Kaliumchlorid, ähnlich kardiochirurgischen Eingriffen mittels Kardioplegielösung. Die erhöhte Kaliumzufuhr, die das Tier durch die Injektion erhält, hat jedoch nach der Reanimation keinen Einfluss auf das weitere Überleben. Untersuchungen haben ergeben, dass sich etwa zehn Minuten nach Wiedereinstellen des spontanen Kreislaufes keine erhöhten Konzentrationen von Kalium im Blut befinden [21]. Aufgrund der begrenzten Blutmenge von Mäusen wurde auf eine standardisierte Erhebung des Kaliumwertes nach der Reanimation verzichtet.

Die häufigste Ursache eines Her-Kreislaufstillstandes beim Menschen ist nicht die Asystolie, sondern ein Kammerflimmern (Ventricularfibrillation VF) [42]. Des Weiteren ist eine häufige spontane Kardioversion von VF in einen Sinusrhythmus bei Nagetieren zu beobachten. Es besteht die Möglichkeit eines kardioprotektiven Effektes einer Asystolie gegenüber einer VF [43]. Da in unserer Arbeitsgruppe keine Möglichkeit zur Induktion einer VF bestand und unser Hauptaugenmerk auf den neurologischen Ergebnissen lag, verwendeten wir KCL.

4.4.2 Zeit des Herz-Kreislaufstillstandes

Nach einer Herz-Kreislaufstillstandzeit von acht Minuten wurde die kardiopulmonale Reanimation begonnen. In verschiedenen anderen Reanimationsmodellen an Mäusen wurden unterschiedlich lange Zeiten des CA gewählt. So sind Zeiten von

drei Minuten bis zu einer maximalen Dauer von 12 Minuten beschrieben worden. In unserem Modell wurden acht Minuten verwendet, da sich nach dieser Zeitspanne ein deutlicher Schaden an den Tieren zeigte, der dazu führte, dass nur 51,6 % der Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe (WT) überlebten. Diese Intensität der Ischämiezeit ist somit groß genug, um eine mögliche Protektion in anderen Untersuchungsgruppen gut erfassen zu können und liegt im Bereich der klinischen Studien mit der Zielstellung in urbanen Gebieten einen ROSC von weniger als zehn Minuten zu erreichen.

4.4.3 Beobachtungszeitraum

Der gewählte Beobachtungszeitraum von 28 Tagen ist einer der längsten im Vergleich zu bisher in der internationalen Literatur beschriebenen Kleintier-Reanimationsmodellen. So wählten die meisten Arbeitsgruppen Nachbeobachtungszeiträume zwischen 24 Stunden und sieben Tagen. Für die Beurteilung und Erfassung akut ablaufender Prozesse nach der Reanimation kann dies auch durchaus genügen. Die meisten Patienten haben nach CA/CPR jedoch einen mehr als 7-tägigen Krankenhausaufenthalt. Vor und vor allem nach dem Zeitraum von sieben Tagen zeigen sich bei ihnen Symptome der Postreanimationserkrankung. Daher ist es durchaus von Bedeutung, eine deutlich längere Zeitspanne zu wählen. Umbauvorgänge der neuronalen Gewebe sind auch Monate nach einem solchen Ereignis noch nicht abgeschlossen, was weiterhin für eine lange Nachbeobachtung spricht [44]. Bei einem früheren Beenden der Untersuchung würden die später verstorbenen Tiere dementsprechend nicht erfasst werden. Auch in dieser Untersuchung sind zwischen Tag sieben und 14 in den verschiedenen Gruppen Tiere an den Folgen der Reanimation verstorben.

Ein Überlebenszeitraum von einem Monat bei Mäusen entspricht etwa zwei Jahren beim Menschen. Dies ist der übliche Zeitraum in dem nach Erfahrungen der Reha-Kliniken noch mit Fortschritten in der neurologischen Regeneration zu rechnen ist.

4.5 Nachbeobachtung

4.5.1 Überleben

In unserer Untersuchung wiesen die TLR2^{-/-}-Tiere und die WT-AK2.5-Tiere einen deutlichen Überlebensvorteil gegenüber den WT-Tieren auf. Ein großer Anteil der Tiere verstarb in den drei Langzeitversuchsgruppen innerhalb der ersten sieben Tage nach Reanimation. Nach diesem Zeitraum verstarben in der WT-Gruppe, anders als in der TLR2^{-/-}-Gruppe, bis zum zehnten Tag nach CA/CPR Tiere. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen stellt sich mit $p < 0,05$ als signifikant dar. Da die Gruppen die gleichen Voraussetzungen in Geschlecht, Alter, Größe, Tierhaltung und im Ablauf der Reanimation hatten, kann die TLR2-Defizienz bzw. ein effektiver Wirkeffekt des applizierten Antikörpers als möglicher Grund des besseren Überlebens gesehen werden.

4.5.2 Körpergewicht

Das Gewicht ist ein sensibler Parameter für die Beurteilung des Allgemeinzustandes eines Versuchstieres. Geht es dem Tier schlecht, frisst und trinkt es nicht oder weniger und verliert somit an Gewicht. Damit auch schwächere Tiere die Möglichkeit hatten, an genügend Futter zu gelangen, wurde allen Tieren das Futter und Wasser so zugänglich gemacht, dass sie es auch ohne Hochstrecken erreichen konnten. Da die Körpergewichtsmessung immer zur gleichen Tageszeit durchgeführt wurde, kann die Beeinflussung der Messungen durch zirkadiane Schwankungen nahezu ausgeschlossen werden.

Auffällig war, dass Tiere die innerhalb der ersten 48 Stunden nach Reanimation verstarben, nur einen sehr geringen Abfall des Körpergewichts aufwiesen, was durch muskuläre Schwäche und einer damit einhergehende geringere Bewegung der Tiere begründet sein könnte. Tiere, die sich als neurologisch gut darstellten, zeigten innerhalb der ersten 24 Stunden in der Regel eine Gewichtsreduktion von 1-2g im Vergleich zum Ausgangsgewicht auf. Dies könnte durch eine stressbedingt erhöhte Stoffwechsellaage und zusätzlich gute aktive Bewegung der Tiere erklärt werden.

Auch beim Parameter des Körpergewichts zeigten sich sowohl die TLR2^{-/-}-Tiere als auch die WT-AK2.5-Tiere deutlich widerstandsfähiger gegen den Herz-Kreislaufstillstand und die nachfolgende Reanimation als die Gruppe der WT-Tiere. Bis zum dritten Tag nach CA/CPR verloren die Tiere signifikant weniger

Gewicht. Die WT-Tiere hatten einen körperlich deutlich schlechteren Zustand. Insgesamt zeigten die TLR2^{-/-}-Tiere wie auch die mit dem Antikörper behandelten Wildtypiere einen deutlich geringeren Gewichtsverlust und ebenso eine schnellere Gewichtszunahme nach CA/CPR als die unbehandelten WT-Tiere.

4.5.3 NeuroScore

Der NeuroScore ist eine etablierte Methode, um schnell und standardisiert das neurologische Befinden der Maus einzuschätzen und es mit anderen vergleichen zu können. Es besteht die Möglichkeit, modifizierte Varianten dieses Tests bei Mäusen und Ratten einzusetzen [45] [46]. Bei der in dieser Untersuchung verwendeten Variante konnten die Tiere eine Maximalpunktzahl von zwölf erreichen. Da sich bereits am ersten Tag nach Trauma bei den TLR2-defizienten und den antikörperbehandelten Tieren etwas höhere NeuroScore-Werte im Vergleich zu den WT-Tieren zeigten, kann man hier auf eine bessere Erholung der Tiere nach dem Eingriff schließen. Diese Überlegenheit des neurologischen Zustandes hielt bis zum fünften Beobachtungstag an. Erst danach zeigten auch alle Tiere der WT-Kontrollgruppe gute NeuroScore-Werte. Die Beurteilung der Tiere erfolgte auch hier, ohne dass der Untersucher wusste, zu welcher Versuchsgruppe das Tier gehörte. Der Test beinhaltet außerdem eine genaue Definition der Punktevergabe und ist somit objektiviert.

Da die Unterschiede der NeuroScore-Werte zwischen den Gruppen im Vergleich zu den Unterschieden in den anderen Tests in der Nachbeobachtungsphase eher gering waren, stellt sich die Frage, ob der NeuroScore alle Defizite der Tiere ausreichend erfasst. Beurteilt wurden Koordination und Bewegungsaktivität, verschiedene Reflexe sowie die Atmung. Eine Maus, die nach CA/CPR einen schlechten AZ zeigte, erreichte auch im NeuroScore eine deutlich verminderte Punktzahl. Alle Unterpunkte des Testes wurden mit derselben Wertigkeit beurteilt. Ein Tier mit unregelmäßigem Atemmuster ist jedoch deutlich stärker beeinträchtigt als ein Tier mit geringerer Bewegungsaktivität. Hier könnte man die Wertigkeit entsprechend der Beeinträchtigung anpassen, um eine noch genauere Abstufung zu erhalten. Desweiteren wäre es sinnvoll die Erhebung des Testes in den ersten 48 Stunden häufiger, z.B. zu den Zeitpunkten 4h, 8h, 12h 24h und 36h nach Reanimation, durchzuführen. In Kombination mit den anderen neurologisch

funktionellen Tests kann der NeuroScore durchaus als Mittel genutzt werden, um einen schnellen ersten Eindruck des Tieres verifizieren zu können.

4.5.4 Allgemeinzustand

Anders als beim NeuroScore erfolgte die Bewertung des Allgemeinzustandes der Tiere subjektiv durch den Untersucher. Bewertet wurde anhand einer Bewertungsskala von 0 bis 3 mit insgesamt drei Parametern. Allerdings ist der Einfluss der bewertenden Person deutlich höher als bei anderen Tests der Batterie, da die Grenzen nicht starr definiert sind. Trotzdem kann der Allgemeinzustand der Tiere als erste orientierende Einschätzung für den Gesundheitszustand dieser nach der Reanimation gut verwendet werden. Beim Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen ist dieser Test trotz „Verblindung“ kritisch zu betrachten.

4.5.5 RotaRod-Test

Der RotaRod-Test als Maß für Koordination, Geschicklichkeit, Kraft und Ausdauer der Tiere zeigte, dass sowohl die TLR2^{-/-}-Tiere als auch die antikörperbehandelten Tiere (WT-AK2.5) bereits am ersten Tag nach Reanimation deutlich längere Laufzeiten im Vergleich zu den WT-Tieren erreichten. Die Tiere der WT-Gruppe zeigten bis zu Tag 11 nach Reanimation deutliche Defizite in Geschicklichkeit und Koordination und erreichten erst spät die maximale Zeit von 900 Sekunden. Bereits 1994 wurde von Hamm et al. in einem von unserem etwas modifizierten Test an Ratten dargestellt, dass der RotaRod-Test eine hohe Sensitivität hat, um mögliche motorische Schäden nach einem Hirntrauma zu identifizieren [47]. Eine Erklärung dafür, dass kaum ein Tier am ersten Tag nach dem Trauma die maximale Laufzeit von 900 Sekunden erreichte, ist die ischämische Schädigung verantwortlicher Hirnareale und somit eine möglicherweise folgende Abschwächung der maximalen Kraft der Muskulatur der Tiere [11]. Auch der insgesamt deutlich beeinträchtigte Allgemeinzustand der Versuchstiere nach Reanimation kann als möglicher Grund gesehen werden.

4.5.6 Elevated Plus Maze-Test

In dieser neurologischen Untersuchung wurde die Aktivität, die Neugierde, aber auch die Ängstlichkeit der Mäuse untersucht. Es fiel auf, dass die Tiere beim ersten Kontakt mit dem Elevated Plus Maze-Test im Vergleich eine ähnlich starke Aktivität beim Laufen auf dem Kreuz zeigten. Sie liefen dabei fast immer die komplette Länge eines Kreuzabschnittes bevor sie sich umdrehten. Die Tiere der TLR2^{-/-}-Gruppe waren allerdings etwas zurückhaltender. Am Tag nach CA/CPR hingegen waren sowohl die TLR2-defizienten Tiere als auch die WT-AK2.5-Tiere deutlich aktiver und neugieriger als die der WT-Gruppe. Es zeigte sich jedoch in allen drei Gruppen eine deutlichere Zurückhaltung im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Reanimation. Alle Tiere bewegten sich ausschließlich im geschlossenen Teil des Elevated Plus. Zu diesem Zeitpunkt kann dies noch als direkter Einfluss der Reanimation und der nötigen körperlichen Erholung angesehen werden. Betrachtet man jedoch die Werte der darauffolgenden Tage, so zeigt sich, dass die TLR2^{-/-}-Mäuse, die sich neurologisch-funktionell – wie im RotaRod-Test und NeuroScore gesehen – gut erholen, in der Anzahl des Hochstreckens, des Über-den-Rand-Schauens, aber vor allem auch in der zurückgelegten Strecke deutlich zurückfallen. Bei der WT-Gruppe sowie der WT-AK2.5-Gruppe hingegen ist eine Annäherung an die vor der Reanimation erreichten Werte zu beobachten. Da in den anderen funktionell-neurologischen Tests eine deutliche Besserung des körperlichen Zustandes aller Tiere der Gruppen zu sehen ist, kann dieses Bild als eine ängstliche Verhaltensänderung in allen Gruppen, vor allem aber in der TLR2^{-/-}-Gruppe gewertet werden.

Bereits 2004 wurde von Neigh et al. beschrieben, dass es nach CA/CPR zu einer vermehrten Ängstlichkeit und Veränderungen im sozialen Umgang bei Mäusen kommt [25]. 2009 folgte dann eine weitere Publikation, laut der die beschriebene Verhaltensänderung nach kardio-pulmonaler Reanimation durch eine Aktivierung von Microgliazellen im Hippocampus auch ohne nachweisbaren neurologischen Schaden erklärt werden kann [48]. Dies kann eine mögliche Erklärung für das oben beschriebene Verhalten der Tiere sein. Des Weiteren ist dieser Test im Allgemeinen sehr störanfällig und schon kleinste Geräusche oder Bewegungen im Umfeld des Kreuzes können die Tiere in ihrem Verhalten beeinflussen. Es wurde jedoch darauf geachtet, dass die Umgebung, in der der Test durchgeführt wurde, möglichst reizarm war.

Eine weitere Möglichkeit für die geringere Aktivität der Tiere könnte die Gewöhnung der Tiere an den Test sein, der in regelmäßigen Abständen durchgeführt wurde. Da im Verlauf des Beobachtungszeitraumes keine neuen Reize während dieser Untersuchung, in der generell bereits reizarmen Umgebung des Elevated Plus, auf die Tiere einwirken, befinden sich diese in keiner ungewohnten Situation mehr und zeigen einen Aktivitätsrückgang, der möglicherweise durch Langeweile hervorgerufen wird. Für spätere Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurde aus diesem Grund mit weniger Testtagen gearbeitet.

4.5.7 WaterMaze-Test

Um zu testen, ob Mäuse in der Lage sind, nach Herz-Kreislaustillstand und Reanimation gelernte Dinge zu reproduzieren, wurde eine abgewandelte Form des 1984 publizierten Morris WaterMaze-Tests verwendet [49]. Eine Woche vor Beginn der Reanimation mussten die Tiere das Auffinden eines Steins in einem Wasserbassin erlernen. In der Gruppe der WT-Tiere zeigte sich ein signifikanter Lerneffekt vom ersten zum letzten Versuch, wobei nach vier Tagen durch Zugabe von Milch in das Wasser das Auffinden zusätzlich erschwert wurde. Um mögliche schädliche Einflüsse von chemisch färbenden Pudern auszuschließen, erfolgte die Verwendung von laktosefreier Milch, gegen die keine Unverträglichkeiten bei Mäusen bekannt sind.

Die TLR2^{-/-}-Tiere benötigten am ersten Tag 14 [9-19]s, am letzten 16 [9-39]s. Damit lässt sich für diese Gruppe kein Lerneffekt darstellen. Die WT-AK2.5-Tiere zeigten einen Lerneffekt. Nach Reanimation zeigte sich, dass alle Tiere der Gruppen, die zuvor in der Lage waren, den Stein schnell zu finden, dies auch nach CA/CPR noch konnten, also keine kognitiven Defizite aufwiesen. Beim Lernprozess vor der Reanimation war auffällig, dass sich einige Tiere nur treiben ließen, anstatt zu schwimmen. Auch bei diesem Test besteht das Problem der Beeinflussung der Tiere von außen durch Störgeräusche und Bewegungen, ähnlich wie beim Elevated Plus Maze-Test. Auch bei diesem Test könnte Gewöhnung ein Problem sein.

Da die Hippocampusregion für das Lernen verantwortlich ist und die Tiere zumindest teilweise einen Lerneffekt zeigten bzw. das Gelernte nach der Reanimation noch erinnern konnten, ist ein ausgeprägter neurologischer Schaden durch die Ischämie

während des Herz-Kreislaufstillstandes bei den Tieren, die an diesem Test teilnehmen konnten, unwahrscheinlich.

Ein weiterer wichtiger Punkt, der im Zusammenhang mit diesem Test untersucht wurde, ist der Zeitpunkt, an dem die Tiere nach der Reanimation wieder zum Schwimmen zugelassen wurden. Wie bereits beschrieben, mussten sie dazu bestimmte Kriterien in Bezug auf das Körpergewicht und den RotaRod-Test erfüllen. Diese Parameter stellen also nicht die Lernfähigkeit der Tiere, sondern ihren körperlichen Zustand dar. Die TLR2^{-/-}-Tiere sowie auch die Tiere der WT-AK2.5-Gruppe durften signifikant früher wieder am WaterMaze-Test teilnehmen, also zu einem höheren Anteil als die Tiere der WT-Kontrollgruppe. Dies spricht für eine deutlich schnellere Erholung der Tiere.

Auf Grund des scheinbaren Nichtlernens der TLR2^{-/-}-Tiere vor der Reanimation installierten wir eine weitere Versuchsgruppe von jeweils n=10 WT- und TLR2^{-/-}-Tieren. Hierbei sollte nochmals geprüft werden, ob die Tiere in der Lage sind, innerhalb von sieben Tagen die Position eines Steines zu merken und ob es ihnen möglich ist, im Anschluss eine neue Position der Plattform zu begreifen. Die Tiere dieser Gruppen erhielten keine CA/CPR. Der Versuchsaufbau war dem der Tiere identisch, die der Reanimation zugeführt wurden.

Die Untersuchung zeigte, dass die WT-Tiere in der Lage waren, die Position des Steines zu lernen. Anders als die TLR2-defizienten Tiere, die am letzten Tag (Tag -1) länger für das Finden des Steines benötigten als beim ersten Kontakt (EK). Nach drei Tagen Testteilnahme wurde das Neulernen getestet. Dabei veränderte man die Position des Steins im Bassin – für alle Tiere jedoch gleich. Die WT-Tiere zeigten auch hier einen guten Lerneffekt vom EK bis zum letzten Kontakt. Die TLR2^{-/-}-Tiere fanden die Plattform nach mehreren Schwimmtagen erneut nicht schneller.

	WT n = 10	TLR2 ^{-/-} n = 10
1. Position der Plattform		
Erstkontakt	16,5 [8 - 26]	23,5 [10 - 50]
letzter Versuch	4,5 [2 - 16] *	120 [37 - 120] &
2. Position der Plattform		
Erstkontakt	18 [7 - 61]	29 [7 - 81]
letzter Versuch	7 [2 - 23] §	25 [5 - 120]

Tab.15 WaterMaze-Test mit nicht reanimierten Tieren;

p<0,05 WT EK vs. WT Tag-1*; WT NL EK vs. NL Tag -1§; TLR2^{-/-} EK vs. TLR2^{-/-} Tag-1 &;

EK=Erstkontakt; NL=Neulernen; Tag -1=letzter Versuch

Rolls et al. beschrieben in ihrem Artikel über Toll-like Rezeptoren und hippocampale Neurogenese, dass adulte Mäuse mit TLR2-Defizienz eine gestörte hippocampale Neurogenese aufweisen [50]. Durch diese Einschränkung ist eine Verankerung von Neugelerntem, wofür oben genanntes unerlässlich ist, nicht ausreichend möglich. Damit könnte das Nichtlernen bzw. ein verzögertes Lernen der TLR2^{-/-}-Tiere während des WaterMaze-Testes erklärt werden. Dieser Test wäre somit für TLR2-defiziente Tiere gänzlich ungeeignet.

4.5.8 Stress- und Inflammationsparameter

Separaten Versuchsgruppen wurden acht Stunden nach CA/CPR Blut entnommen und die Plasmakonzentration der Inflammationsparameter Corticosteron, IL-1 β und IL-6 wurden bestimmt. Die WT-Tiere reagierten mit einem deutlichen Anstieg des proinflammatorischen IL-1 β und IL-6. Die TLR2^{-/-}-Tiere hingegen nur mit einem sehr geringen Anstieg. Die WT-AK2.5-Tiere verhielten sich wie die WT-Tiere.

Die basalen Plasmakonzentrationen von Corticosteron bei TLR2^{-/-}-Mäusen waren deutlich geringer ausgeprägt, sodass der Verdacht besteht, dass eine Nebenniereninsuffizienz vorliegt [10]. Die antikörperbehandelten Tiere WT-AK2.5 hingegen verhielten sich wie die WT-Tiere und zeigten eine Zunahme der Plasmakonzentration von Corticosteron nach Reanimation.

Bereits Samborska-Sablik et al. konnten 2010 in ihrer Arbeit über die Rolle von Entzündungsparametern bei Patienten nach CA/CPR darstellen, dass eine Erhöhung vor allem des IL-6 mit einem deutlich schlechteren Überleben einhergeht [51].

Da die WT-AK2.5-Tiere einen deutlichen Überlebensvorteil gegenüber der unbehandelten WT-Gruppe aufweisen, aber sich beim Verlauf der Inflammationsparameter nahezu identisch verhielten, scheint es eher unwahrscheinlich, dass dies der entscheidende Mechanismus für das bessere Behandlungsergebnis der Tiere ist. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass der Antikörper nicht alle TLR2-Rezeptoren im Tier erfasst, d.h. in einer zu niedrigen Dosierung gegeben wurde oder die Zytokinfreisetzung offensichtlich nicht beeinflusst hat.

4.5.9 Histologie

In der Histologie der Hippocampusregion zeigte sich eine deutliche Veränderung in der Darstellung der CA1-Region nach der Reanimation. Diese kann durch den Untergang von neuronalen Zellen begründet werden. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits von Jover et al. bei der Untersuchung des Östrogeneinflusses auf Ischämie-induzierten neuronalen Untergang nach Unterbindung der A. carotis beschrieben [28]. Diese Veränderungen konnten jedoch nur bei innerhalb des Beobachtungszeitraumes verstorbenen Tieren festgestellt werden. Da sich diese Tiere nicht ausreichend vom CA/CPR erholt hatten, erfüllten sie auch nicht die nötigen Kriterien, um am WaterMaze-Test teilzunehmen. Daher konnte nicht überprüft werden, ob diese histologischen Veränderungen auch mit Problemen in der Reproduzierbarkeit des Gelernten einhergehen.

Bei verstorbenen Tieren zeigten sich sowohl Leber- als auch Lungenveränderungen, sodass es nicht einfach ist, eine genaue Todesursache festzustellen. Es scheint sich eher um ein multifaktorielles Geschehen wie bei einem Multiorganversagen zu handeln, eine Pathologie, wie wir sie in der Klinik nach Reanimationen häufig beobachten.

4.6 Theorie zum Pathomechanismus

In der Forschung um den TLR2^{-/-} sind bereits positive Einflüsse auf den Ventrikelaufbau nach Myokardinfarkt und auch geringere Schäden des neuronalen Gewebes nach Ischämie des Hirns beschrieben worden [19] [52]. Ein genauer Wirkungsmechanismus ist bis heute jedoch nicht bekannt. Auch in dieser Untersuchung ließ sich ein deutlicher Vorteil für die Tiere mit TLR2-Defizienz sowie für die Tiere, die einen blockierenden TLR2-Antikörper appliziert bekamen, darstellen. Sie zeigten nach einem Ischämie-/Reperfusionsschaden ein deutlich besseres Überleben und ein deutlich besseres funktionell-neurologisches Befinden. Wagner et al. beschrieben 2013 einen möglichen Mechanismus dieses protektiven Effektes. Hierbei lässt sich in der Methodik ein in-vitro-Abschnitt, der die Untersuchung von humanen Endothelzellen beinhaltet, ebenso wie ein in vivo Hinterlaufischämiemodell der Maus unterscheiden. Bei TLR2-Blockade stellten sich sowohl in vitro also auch im Musculus gastrocnemius deutlich höhere

Kapillardichten dar. Als möglicher Mechanismus wird hier eine Interaktion des TLR2 mit dem SDF-1/CXCR4-System beschrieben [53].

Durch diese vermehrte Kapillarneubildung bei einem bestehenden TLR2-Defekt bzw. bei einer TLR2-Blockierung wäre es möglich, die durch Ischämie und Reperfusion geschädigten Zellen und Gewebe mit genügend Nährstoffen zu versorgen. Geschieht dies schnell genug und ist die Zelle noch nicht zu stark geschädigt, bestünde hier eventuell eine Möglichkeit, den Untergang dieser aufzuhalten. Über den Weg der Endothelprotektion gäbe es somit die Option einen möglichen Schaden zu verringern, was in der Folge zu einer weniger starken Inflammationsreaktion führen könnte.

5. Schlussfolgerung

Das in dieser Arbeit vorgestellte Reanimationsmodell ist ein innovatives, standardisiertes und gut an großen Versuchsgruppen reproduzierbares Modell. Durch die verwendete F_iO_2 von 0,21 und die Herzstillstandzeit von acht Minuten kommt es der präklinischen Realität einer Reanimationsstudie sehr nahe. Die Applikation von Medikamenten bzw. anderen therapeutischen Substanzen ist durch den sicheren Gefäßzugang problemlos und sicher umsetzbar. Durch Modifikationen wie der geringeren Initialen F_iO_2 , im Vergleich mit dem bereits etablierten Modell von Menzebach et al., ist die Realität besser abgebildet. [21]

In dieser Studie hat sich gezeigt, dass TLR2-defiziente Mäuse im Vergleich zur C57BL/6J-Wildtyp-Maus nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation einen deutlichen Überlebensvorteil haben. Das funktionell-neurologische Behandlungsergebnis stellt sich vor allem innerhalb der ersten Woche bei diesen Tieren deutlich besser dar. Die therapeutische Behandlung mit einem TLR2 antagonisierenden Antikörper ging mit einem signifikant höheren Überleben und einem im Vergleich zu den WT-Tieren besseren funktionell-neurologischen Zustand einher.

Anhand von histologischen Untersuchungen und bildgebenden Verfahren konnte ein Schaden vor allem in der Hippocampusregion der Tiere aufgezeigt werden. Dieser ging, wie im Morris WaterMaze-Test geprüft, jedoch nicht mit einem Lern- oder Erinnerungsdefizit einher.

Die Vermutung des protektiven Effekts auf Ebene der Inflammationsparameter konnte nicht bestätigt werden. Wiesen die TLR2^{-/-}-Tiere einen stärkeren Anstieg des antiinflammatorischen Parameters Corticosteron nach Reanimation auf als die WT-Tiere, welche hingegen einen stärkeren Anstieg des proinflammatorischen IL-6 zeigten, war ein solcher Effekt bei den antikörperbehandelten Tieren der Gruppe WT-AK2.5 nicht zu beobachten. Die Untersuchungsergebnisse der TLR2-defizienten und die der antikörperbehandelten Tiere waren jedoch gleich gut. Als möglicher Mechanismus des protektiven Effektes einer TLR2-Blockade nach Ischämie und Reperfusion sollte allerdings die beschriebene Erhöhung der Kapillardichte über Interaktion mit dem SDF-1/CXCR4-System, sowie ein allgemeiner protektiver Effekt auf das Endothel näher untersucht werden.

Desweiteren sollte in folgenden Untersuchungen der mögliche protektive Faktor der

Hypothermie ausgeschlossen werden.

Unter diesen Gesichtspunkten könnte die Blockade des TLR2 eine therapeutische Methode darstellen, um bei Patienten nach CA/CPR die Anzahl der Überlebenden zu erhöhen, das Ausmaß der beobachteten Postreanimationskrankheit zu vermindern und das funktionell-neurologische Behandlungsergebnis zu verbessern.

6. Literatur

1. Schneider A., Popp E., Böttiger B. Postreanimationstherapie-
Therapiekonzepte und Prognosestellung. *Anästhesiologie Intensivmedizin
Notfallmedizin Schmerztherapie* 2007;(6): 408-414
2. Silbernagl S. Agamemnon D. – Taschenatlas der Physiologie. 7. Aufl.,
Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2007
3. Parks DA., Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal
lesion formation. *American Journal of Physiology* 1986; 250(6): 749-753
4. Sasson C., Rogers MAM., Dahl J. Predictors of survival from out-of-hospital
cardiac arrest: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Circ Cardiovasc Qual
Outcomes* 2010; (3): 63-81
5. Laver S., Farrow C., Turner D. Mode of death after admission to an intensive
care unit following cardiac arrest. *Intensive Care Med* 2004; 30(11): 2126-2128
6. Gaieski DF., Band RA., Abella BS. Early goal-directed hemodynamic
optimization combined with therapeutic hypothermia in comatose survivors of
out-of-hospital cardiac arrest. *Resuscitation* 2009; 80(4): 418-424
7. Spaulding CM., Joly LM., Dhainaut JF. Immediate coronary angiography in
survivors of out-of-hospital cardiac arrest. *N. Engl. J. Med* 1997;
336(23): 1629-1633
8. Vollmar B., Menger MD. Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory
pathology and functional consequences. *Langenbeck's Archives of Surgery*
2011; 396(1): 13-29
9. Rezkalla SH., Kloner RA. No-Reflow Phenomenon *Circulation* 2002;
105: 656-662
10. Bornstein SR., Schumann RR., Zacharowski K. Toll-like receptor 2 and
Toll-like receptor 4 expression in human adrenals. *Hormone and Metabolic
Research* 2004; 36(7): 470-473
11. Geocadin RG., Koenig MA., Jia X. Management of brain injury after
resuscitation from cardiac arrest. *Neurologic Clinics* 2008; 26(2): 487-506

12. Gay NJ., Keith FJ. Drosophila Toll and IL-1 receptor. Nature 30-5 1991; 351: 355-356
13. Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway CA. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature 24-71997; 388: 394-397
14. Arumugam TV., Okun E., Tang S. Toll-like receptors in ischemia-reperfusion injury. Shock Journal 2009; 32(1): 4-16
15. Löffler G., Petrides PE., Heinrich PC. Biochemie und Pathobiochemie. 8. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2007.
16. Beutler B., Hoebe K., Georgel P. Genetic analysis of innate immunity: identification and function of the TLR adapter proteins. Adv EXP Med Biol 2005; 560: 29-39
17. Beutler B., Tabeta K., Georgel P. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. Proc Natl AcadSci USA 9-3 2004; 101: 3516-3521
18. Favre J., Musette P. Richard V. Toll-like receptors 2-deficient mice are protected against postischemic coronary endothelial dysfunction. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol 2007; 27(5): 1064-1071
19. Tang SC., Arumugam TV., Mattson MP. Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007; 104(34): 13798-13803
20. Rusai K., Sollinger D., Baumann M. Toll-like receptors 2 and 4 in renal ischemia/reperfusion injury. Pediatr. Nephrol 2010; 25(5): 853-860
21. Menzebach A., Bergt S., Vollmar B. A comprehensive study of survival, tissue damage and neurological dysfunction in a murine model of cardiopulmonary resuscitation after potassium-induced cardiac arrest. Shock Journal 2010; 33(2): 189-196
22. Bergt S., Boehm O., Heidrich M. Hydrocortison reduziert das Überleben von TLR2-defizienten Mäusen in einem Modell der polymikrobiellen Sepsis. Anästh Intensivmed 2010; 51: 370

23. Abella BS., Zhao D., Becker LB. Intra-arrest cooling improves outcomes in a murine cardiac arrest model. *Circulation* 2004; 109(22): 2786-2791
24. Pritchett K., Mulder GB. The rotarod. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2003; 42(6): 49
25. Neigh GN., Kofler J. Meyers JL. Cardiac arrest/cardiopulmonary resuscitation increases anxiety-like behavior and decreases social interaction. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 2004; 24(4): 372-382
26. Silverthorn DU. *Physiologie*. 4. Aufl. München [u.a.]: Pearson Education. 2009
27. Papadimitriou D., Xanthos T., Dontas I. The use of mice and rats as animal models for cardiopulmonary resuscitation research. *Lab. Anim* 2008; 42(3): 265-276
28. Jover T., Tanaka H., Calderone A. Estrogen protects against global ischemia-induced neuronal death and prevents activation of apoptotic signaling cascades in the hippocampal CA1. *J. Neurosci* 2002; 22(6): 2115-2124
29. Gibson CL., Murphy SP. Progesterone enhances functional recovery after middle cerebral artery occlusion in male mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 2004; 24(7): 805-813
30. Roof RL., Hoffman SW., Stein DG. Progesterone protects against lipid peroxidation following traumatic brain injury in rats. *Mol. Chem. Neuropathol* 1997; 31(1): 1-11
31. Arras M., Autenried P., Rettich A., Spaeni D., Rülcke T. Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. *Comp. Med* 2001; 51(5): 443-456
32. Landoni G., Fochi O., Torri G. Cardiac protection by volatile anaesthetics: a review. *Curr Vasc Pharmacol* 2008; 6(2): 108-111
33. Schneider A., Böttiger B. Reanimation: Update 2014. *Deutsches Ärzteblatt* 2014; 111(39): 14

34. Zhongguo W., Zhong B. The impact of quality of cardio pulmonary resuscitation on post-resuscitation inflammatory reaction in a porcine cardiac arrest model. *CCRM* 2008 Aug; 20(8): 469-471
35. Tankersley CG., Irizarry R., Flanders S. Circadian rhythm variation in activity, body temperature, and heart rate between C3H/HeJ and C57BL/6J inbred strains. *J. Appl. Physiol* 2002; 92(2): 870-877
36. Wither R., Coloc S., Wu C. Daily rhythmic behaviors and therm regulatory patterns are disrupted in adult female MECP2-deficient mice. *PLoS ONE* 7(4)
37. Nolan JP., Morley PT., Van den Hoek TL. Therapeutic hypothermia after cardiac arrest: an advisory statement by the advanced life support task force of the International Liaison Committee on Resuscitation. *Circulation* 2003; 108(1): 118-121
38. Ebong S., Call D., Nemzek J. Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. *Infect. Immun* 1999; 67(12): 6603-6610
39. Warn PA., Brampton MW., Sharp A. Infrared body temperature measurement of mice as an early predictor of death in experimental fungal infections. *Lab. Anim* 2003; 37(2): 126-131.
40. Bembea MM., Nadkarni VM., Diener-West M. Temperature patterns in the early postresuscitation period after pediatric in-hospital cardiac arrest. *Pediatr Crit Care Med* 2010; 11(6): 723-730
41. Wang H., Barbut D., Tsai M. Intra-arrest selective brain cooling improves success of resuscitation in a porcine model of prolonged cardiac arrest. *Resuscitation* 2010; 81(5): 617-621
42. Tung RT., Shen WK., Hammill SC. Idiopathic ventricular fibrillation in out-of-hospital cardiac arrest survivors. *Pacing Clin Electrophysiol.* 1994; 17(8):1405-12
43. Salcido, D., Menegazzi, J., Suffoletto, B. Association of intramyocardial high energy phosphate concentrations with quantitative measures of the ventricular fibrillation electrocardiogram waveform. *Resuscitation* 2009; 80(8): 946-950

44. Butterworth RJ., Wassif WS., Sherwood RA. Serum neuron-specific enolase, carnosinase, and their ratio in acute stroke. An enzymatic test for predicting outcome? *Stroke* 1996; 27(11): 2064-2068
45. Baker CJ., Onesti ST., Solomon RA. Reduction by delayed hypothermia of cerebral infarction following middle cerebral artery occlusion in the rat: a time-course study. *J. Neurosurg* 1992; 77(3): 438-444
46. Maier CM., Ahern KV., Cheng ML. Optimal depth and duration of mild hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia: effects on neurologic outcome, infarct size, apoptosis, and inflammation. *Stroke* 1998; 29(10): 2171-2180
47. Hamm RJ., Pike BR., O'Dell DM. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 1994; 11(2): 187-196
48. Neigh GN., Karelina K., Glasper ER. Anxiety after cardiac arrest/cardiopulmonary resuscitation: exacerbated by stress and prevented by minocycline. *Stroke* 2009; 40(11): 3601-3607
49. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* 1984; 11(1): 47-60
50. Rolls A., Shechter R., London A. Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nat Cell Biol* 2007; 9(9): 1081-1088
51. Samborska-Sablik A., Sablik Z., Gaszynski W. The role of the immune-inflammatory response in patients after cardiac arrest. *Arch Med Sci* 2010; 7(4): 619-626
52. Shishido T., Nozaki N., Yamaguchi S. Toll-like receptor-2 modulates ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 2003; 108(23): 2905-2910
53. Wagner N., Bierhansl L., Roesner JP. Der Toll-like Rezeptor 2 moduliert Endothelzellfunktionen und Gefäßneubildungsprozesse: Bedeutung der Interaktion von TLR2 mit dem SDF-1/CXCR4 System. *Anästh Intensivmed* 2012; 53: 405

54. Norman GJ., Zhang N., Morris JS. Social interaction modulates autonomic, inflammatory, and depressive-like responses to cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(37): 16342-16347
55. Nakano T., Hurn PD., Herson PS. Testosterone exacerbates neuronal damage following cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in mouse. *Brain Res*. 2010; 1357: 124-130
56. Bottiger BW., Teschendorf P., Krumnikl JJ. Global cerebral ischemia due to cardiocirculatory arrest in mice causes neuronal degeneration and early induction of transcription factor genes in the hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; 65(2): 135-142
57. Dezfulian C., Shiva S., Alekseyenko A. Nitrite therapy after cardiac arrest reduces reactive oxygen species generation, improves cardiac and neurological function, and enhances survival via reversible inhibition of mitochondrial complex I. *Circulation* 2009; 120(10): 897-905
58. Simon J., Arthur C., Lay S.C. Mitogen-activated protein kinase in innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 2013; 13: 679-692
59. Tina Rich. Toll and Toll-like receptors. *An Immunologic Perspective*; Springer US; 2005
60. Weingart SD., Levitan RM. Preoxygenation and prevention of desaturation during emergency airway management. *Ann Emerg Med* 2012; 59(3): 165-175

7. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Weitere Personen waren an der geistigen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Teilergebnisse wurden vor der Promotion publiziert:

Bergt S, Güter A, Grub A, Wagner NM, Beltschany C, Langner S, Wree A, Hildebrandt S, Nöldge-Schomburg G, Vollmar B, Roesner JP; Impact of Toll-like receptor 2 deficiency on survival and neurological function after cardiac arrest: a murine model of cardiopulmonary resuscitation.; PLoS One. 2013 Sep 16; 8 (9)

Rostock, 30.11.2015

Anne Güter

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Anne Güter
Geburtstag: 25.06.1988 in Hagenow
Anschrift: Bleicherstraße 5, 18055 Rostock
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Mutter: Helga Güter
Vater: Horst Güter

Schulbildung

1994-1998 Besuch der Grundschule am Amtsberg, Wittenburg
1998-2007 Besuch des Christian-Ludwig-Liscow-Gymnasiums, Wittenburg
Abschluß Abitur (Durchschnittsnote: 1,2)

Ausbildung

2007-2009 vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
1. Staatsexamen (Durchschnittsnote: 2,5)
2009-2013 klinisches Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock

Praktika

2010 5-wöchige Famulatur auf der Station für Kardiologie an der Universität Rostock
4-wöchige Famulatur auf der Station für Unfallchirurgie an der Universität Rostock
3-wöchige Famulatur im Bereich der Anästhesie an der Universität Rostock

2011	<p>2-wöchige Famulatur in der Praxis des Facharztes für Anästhesie und Schmerztherapie Dr. Zunft, Rostock</p> <p>2-wöchige Famulatur in der Praxis für Allgemein- und Sportmedizin Dr. Neundorf, Rostock</p> <p>2-wöchige Famulatur im Bereich der Inneren Medizin im Kreiskrankenhaus Hagenow</p>
2012	<p>Praktisches Jahr</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Terial Anästhesie Güstrow 2. Terial Innere Medizin Universität Rostock 3. Terial Chirurgie Heliosklinik Schwerin
Nov. 2013	Ärztliche Prüfung (Note: gut)
Seit 01/14	Arzt in Weiterbildung – Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin Universität Rostock

Rostock, 30.11.2015

Anne Güter

9. Thesen zur Dissertation

1. Trotz jahrelanger Forschung auf dem Gebiet des Herz-Kreislaufstillstandes und der Reanimation sowie der Therapie ihrer Folgen ist das funktionell-neurologische Behandlungsergebnis sehr schlecht.
2. TLR2-Defizienz hat sich in verschiedenen Studien in der isolierten Betrachtung von Schäden an einzelnen Organsystemen in Mäusen nach Ischämie und Reperfusion als protektiv erwiesen.
3. TLR2-Defizienz hat einen positiven Einfluss auf das Überleben und das funktionell neurologische Behandlungsergebnis von Mäusen nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation.
4. Die Blockade des murinen TLR2 mittels eines intravenös injizierten Antikörpers hat einen positiven Einfluss auf das Überleben und das funktionell-neurologische Behandlungsergebnis nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation.
5. Die medikamentöse Hemmung des TLR2 ist ein potentieller Therapieansatz nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation der im Großtiermodell geprüft werden muss.
6. Durch TLR2-Defizienz kommt es zu einem verminderten Anstieg proinflammatorischer Zytokine.
7. Tierexperimentelle Langzeitstudien sind zur Beurteilung der funktionell-neurologischen Regeneration unverzichtbar.