

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie  
der Universität Rostock

Direktorin: Frau Prof. Dr. med. G. Nöldge-Schomburg

**Pravastatin verbessert die Überlebensrate und die  
funktionell-neurologische Regeneration von Mäusen nach  
Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation**



Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Steffen Wagner

aus Pforzheim

Dekan: Prof. Dr. med. E. Reisinger MBA

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Patrick Meybohm, Frankfurt

2. Gutachter: PD Dr. med. M. Wittstock, Rostock

3. Gutachter: PD Dr. med. J. P. Roesner, Rostock

Eingereicht am: 20.01.2016

Tag der Verteidigung: 13.12.2016

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>3</b>
1.1. Der reanimationspflichtige Herz-Kreislaufstillstand.....	3
1.2. Herz-Kreislaufstillstand, Ischämie- und Reperfusionsschaden .....	4
1.3. Grundlagen .....	5
1.3.1. Cholesterin, Therapie mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren.....	5
1.3.2. Pleiotrope Eigenschaften der Statine.....	7
<b>2. Ziel der Studie.....</b>	<b>9</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>10</b>
3.1. Versuchstiere.....	10
3.2. Experimentelles Protokoll.....	10
3.2.1. Vorversuch .....	10
3.2.1.1. Lipoproteinuntersuchung .....	10
3.2.1.2. Beatmung.....	11
3.2.2. Präparation, Ablauf der Reanimation .....	11
3.3. Auszuwertende Parameter.....	15
3.3.1. Überleben.....	16
3.3.2. Körpergewicht .....	16
3.3.3. Neuroscore.....	17
3.3.4. Allgemeinzustand .....	18
3.3.5. RotaRod-Test .....	19
3.3.6. Water-Maze-Test.....	20
3.3.7. Elevated-Plus-Maze-Test .....	22
3.4. Histologie.....	22
3.5. Auswertung und Statistik.....	23
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>24</b>
4.1. Lipoproteinuntersuchung.....	24
4.2. Allgemeine Parameter der Reanimation.....	26

4.3. Überleben .....	27
4.4. Körpergewicht .....	28
4.5. Neuroscore .....	29
4.6. Allgemeinzustand .....	30
4.7. RotaRod-Test .....	31
4.8. Water-Maze-Test .....	33
4.9. Elevated-Plus-Maze-Test .....	35
4.10. Histologie .....	37
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>38</b>
5.1. Ergebnisse .....	38
5.1.1. Überleben .....	38
5.1.2. Körpergewicht .....	38
5.1.3. Neuroscore und Allgemeinzustand .....	39
5.1.4. Rotarod-Test .....	40
5.1.5. Water-Maze-Test .....	40
5.1.6. Elevated-Plus-Maze-Test .....	41
5.1.7. MRT .....	42
5.1.8. Histologie .....	42
5.2. Kleintiermodell zur kardiopulmonalen Reanimation .....	43
5.2.1. Geschlecht des Versuchstiers .....	44
5.2.2. Größe, Alter und Gewicht des Versuchstiers .....	45
5.2.3. Gruppengröße .....	45
5.3. Material und Methoden .....	45
5.3.1. Narkose und Beatmung .....	45
5.3.2. Blutdruckmessung .....	46
5.3.3. Temperaturmessung .....	46
5.3.4. Zentraler Venenkatheter .....	47
5.3.5. Kardiale Asystolie und Kardiopulmonale Reanimation .....	47
5.3.6. Nachbeobachtungszeitraum .....	48

5.4. Mögliche Mechanismen .....	49
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>50</b>
<b>7. Thesen.....</b>	<b>51</b>
<b>8. Anhang.....</b>	<b>52</b>
<b>9. Erklärung an Eides statt .....</b>	<b>56</b>
<b>10. Lebenslauf .....</b>	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
<b>11. Danksagung.....</b>	<b>57</b>
<b>12. Literaturangaben .....</b>	<b>58</b>

## Abkürzungsverzeichnis

∅	= Durchmesser
AED	= Automatisierter Externer Defibrillator
AF	= Atemfrequenz
ATP	= Adenosintri-phosphat
CA	= Herzstillstand
CoA	= Coenzym A
COX	= Cyclooxygenase
CPR	= Kardiopulmonale Reanimation
CRP	= C-reaktives Protein
DAMP	= Damage-associated molekular pattern
EKG	= Elektrokardiogramm
F <sub>i</sub> O <sub>2</sub>	= Inspiratorische Sauerstofffraktion
G	= Gauge
HDL	= High Density Lipoprotein
HE	= Hämatoxylin-Eosin
HMG	= 3-Hydroxyl-3-Methylglutaryl
HR	= Herzfrequenz
i.p.	= intraperitoneal
i.v.	= intravenös
I/R	= Ischämie/Reperfusion
ID	= Innendurchmesser
IL	= Interleukin
KG	= Körpergewicht
KHK	= koronare Herzkrankheit
LDL	= Low Density Lipoprotein
MAP	= Mittlerer arterieller Blutdruck

mmHG	= Millimeter Quecksilbersäule
MMP	= Matrix-Metalloproteasen
MTH	= Milde therapeutische Hypothermie
NaCl	= Natriumchlorid
NIBP	= Nichtinvasive Blutdruckmessung
O <sub>2</sub>	= Sauerstoff
P	= Partialdruck
PE	= Polyethylen
Pg	= Prostaglandin
PRR	= Pattern recognition receptor
PTCA	= Perkutane transluminale Koronarangioplastie
Ras	= Rat sarcoma
ROSC	= Return of spontaneous Circulation
SIRS	= Systemic inflammatory response syndrome
VLDL	= Very Low Density Lipoprotein
ZVK	= Zentraler Venenkatheter

# 1. Einleitung

## 1.1. Der reanimationspflichtige Herz-Kreislaufstillstand

Der reanimationspflichtige Herz-Kreislaufstillstand stellt aufgrund der damit verbundenen globalen Ischämie einen der zeitkritischsten Notfälle dar. Innerhalb weniger Minuten müssen Maßnahmen eingeleitet werden, um das Überleben der Patienten zu sichern. Die Zeit der Gewebsminderperfusion muss so gering wie möglich gehalten werden, um entstehende Schäden durch die Ischämie zu minimieren.

Jährlich erleiden ca. 350.000 Menschen in der Europäischen Union einen Herz-Kreislaufstillstand. Bei 50 % der betroffenen Patienten gelingt durch kardiopulmonale Reanimationsmaßnahmen die Wiederherstellung eines spontanen Kreislaufs. Von diesen 175.000 Patienten sterben jedoch ca. 70 % im Verlauf der Postreanimationsphase auf den Intensivtherapiestationen des jeweils aufnehmenden Krankenhauses [1]. In den Vereinigten Staaten von Amerika ist die Inzidenz der Herzstillstände pro Jahr mit 55 pro 100.000 Menschen sogar noch größer [2]. Eine in den Neunzigerjahren durchgeführte Studie zeigt, dass von 512 Herz-Kreislaufstillständen, bei denen eine Reanimation durchgeführt wurde, nur 12 % der Patienten das erste Jahr nach Entlassung aus dem Krankenhaus überlebten [3]. Diese Erfolgsrate hat sich während den letzten 30 Jahren nicht verbessert.

Trotz intensiver Forschung und Bemühungen im Bereich der Reanimation und des I/R-Schadens (Ischämie-/Reperfusionsschaden) ist das funktionell-neurologische Behandlungsergebnis, bezogen auf die Gesamtheit der Patienten nach wie vor unbefriedigend schlecht [4]. Nur 0,6 - 1,8 % der Patienten überleben ohne neurologisches Defizit [5], was nicht nur individuelle, sondern auch sozioökonomische Folgen hat.

Im klinischen Bereich stehen dem medizinischen Personal nach erfolgreicher Reanimation nur eine begrenzte Anzahl von Interventionen mit nachgewiesenem positiven Einfluss auf das Behandlungsergebnis des reanimierten Patienten zur Verfügung. Zu diesen Maßnahmen gehören eine milde therapeutische Hypothermie (MTH), Optimierung der Hämodynamik und eine frühzeitige percutane transluminale Angioplastie (PTCA).

Um den problemlosen und frühzeitigen Ablauf der Überlebenskette zu garantieren, wird versucht, die breite Bevölkerung in der Laienreanimation zu schulen und die flächendeckende Ausstattung öffentlicher Gebäude mit Automatischen Externen Defibrillatoren (AED)-Geräten zu realisieren [6].

## 1.2. Herz-Kreislaufstillstand, Ischämie- und Reperfusionsschaden

Der Herz-Kreislaufstillstand ist definiert durch die Beendigung der geordneten mechanischen Aktivität des Herzens. Klinisch imponiert dies durch das Fehlen von Lebenszeichen und Pulslosigkeit der großen Arterien. Das konsekutive Fehlen der Blutzirkulation führt zwangsläufig zur relativen oder absoluten Sauerstoffunterversorgung von Geweben und Organen [6, 7]. Die Ischämie kann passager ohne Folgen bleiben. Wird jedoch eine für das jeweilige Gewebe spezifische Zeit überschritten, führt die Sauerstoffunterversorgung direkt zum Gewebsuntergang und Organversagen. Die auf eine Ischämie nachfolgende Reperfusion ist nicht gleich bedeutend mit dem Beginn der Rekonvaleszenz, sondern kann für das Absterben von Zellen, die während einer passageren Ischämie noch vital waren, verantwortlich sein. Vielmehr kann sie Prozesse in Gang setzen, die einen umfangreichen, ggf. lang andauernden schädigenden Einfluss auf einen Organismus haben. Da die ablaufenden Prozesse nicht eindeutig der Ischämie- oder Reperusionsphase zugeordnet werden können, spricht man üblicherweise vom I/R-Schaden [8].

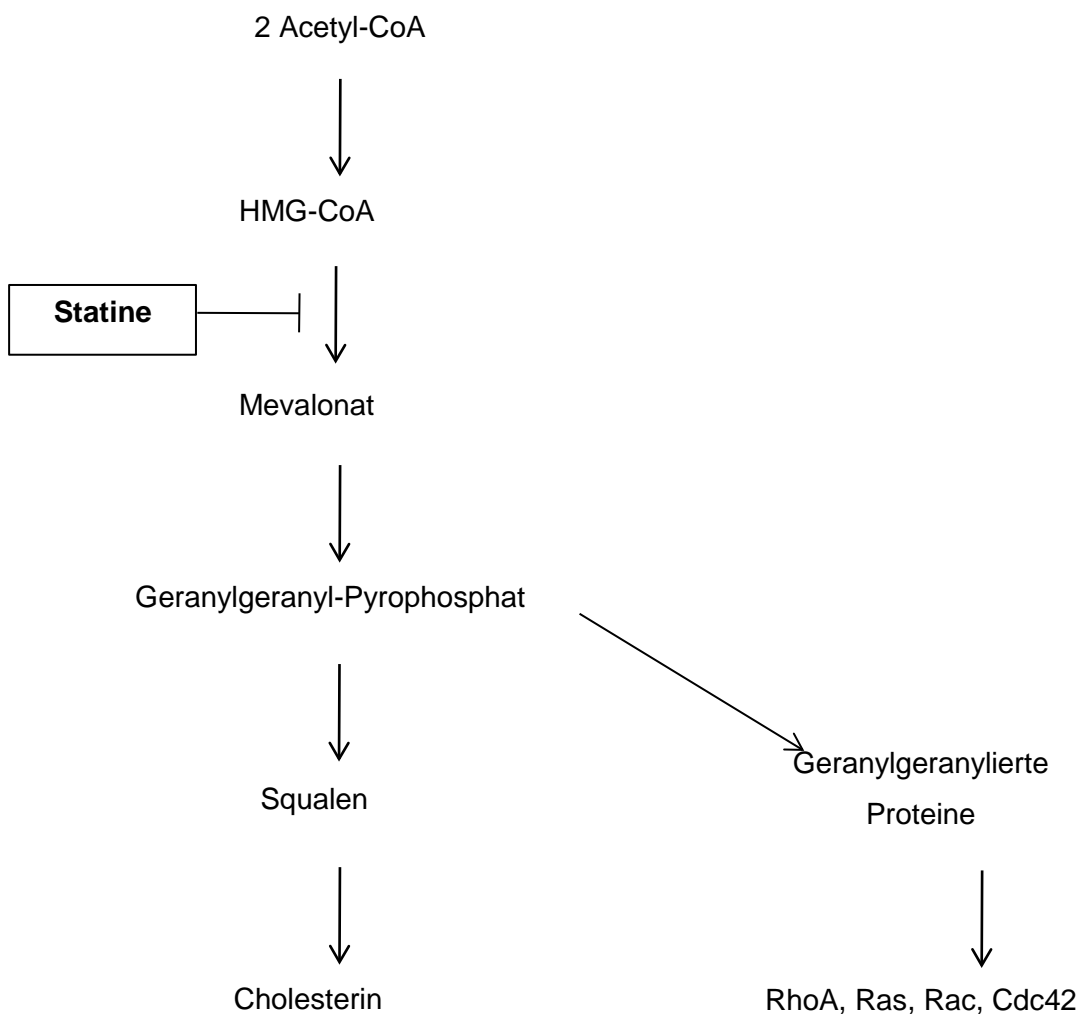
Die durch den ATP-Mangel und die darauffolgende Reperfusion entstandenen freien Sauerstoffradikale sind hochreaktiv und zerstören durch Oxidation Endothelien, Membranen, Enzyme und andere Proteine, welche zur Zellintegrität beitragen. Geschädigte Zellen setzen damage-associated molecular patterns (DAMPs) frei, eine Gruppe von Molekülen, welche das angeborene Immunsystem über sogenannte pattern recognition receptors (TLR2, TLR4, RAGE) aktivieren [9, 10]. Diese aktivierten Rezeptoren induzieren proinflammatorische Kaskaden, was eine Aktivierung von NFκB sowie die verstärkte Synthese von proinflammatorischen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen zur Folge hat. Die verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen erhöht die Viskosität des Blutes, die Aggregationsneigung der Zellen in der Blutbahn nimmt zu und das Gerinnungssystem wird aktiviert [8, 11–13]. Die Endstrecke im Sinne der rheologischen Eigenschaften des Blutes ist eine ausgeprägte Mikrozirkulationsstörung, welche als no-Reflow Phänomen bezeichnet wird [14, 15].

Auch wenn primär nur einzelne Organe betroffen sind, kann die Intensität dieser Entzündungsreaktion im postischämischen Gewebe so groß sein, dass sich die pathologische Reperusionsantwort in entfernten Organen und Geweben manifestiert. Tritt eine solche systemisch-sterile Inflammationsreaktion unter Beteiligung des Gerinnungssystems, des Immunsystems und der neuroendokrinen Achse auf, entwickelt sich das Bild eines Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). Im Rahmen eines Herz-Kreislaufstillstands und anschließender Reanimation kann diese sogenannte Postreanimationserkrankung unbehandelt zum Multiorganversagen führen [8, 14].

### 1.3. Grundlagen

#### 1.3.1. Cholesterin, Therapie mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren

Cholesterin ist essentieller Bestandteil jeder tierischen und menschlichen Zellmembran und wird außerdem zur Bildung von Gallensäuren und Steroidhormonen benötigt [16]. Im Rahmen einer Dyslipoproteinämie kann eine erhöhte intrazelluläre Aufnahme von cholesterinreichen Lipoproteinen jedoch u.a. zu Koronarer Herzkrankheit (KHK) oder anderen Gefäßerkrankungen führen [17].



Schematische Darstellung der Cholesterinbiosynthese

Abb. 1:

Die Wirkung von Statinen beruht auf einer dem Mevalonat ähnlichen chemischen Gruppe. Infolgedessen wirken sie mit sehr hoher Affinität als kompetitiver Inhibitor reversibel auf die

HMG-CoA-Reduktase und werden daher auch als HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren bezeichnet.

Statine sind aktuelle Standardtherapie der Hypercholesterinämie und Dyslipoproteinämie [18]. Sie werden sowohl in der primären als auch der sekundären Prävention gegen die KHK eingesetzt [19]. Kommerziell erhältliche und in der Arzneimitteltherapie verwendete Vertreter der Statine sind u.a. Simvastatin, Atorvastatin, Lovastatin, Rosuvastatin und Pravastatin. Die genannten Wirkstoffe weisen unterschiedliche chemische und pharmakodynamische Eigenschaften auf. Die überwiegende Zahl der Statine (Abb. 2) sind lipophil und können in ihrer normalen Form ohne Lösungsvermittler nur enteral appliziert werden. Rosuvastatin und Pravastatin sind hydrophil und könnten theoretisch in wässriger Lösung intravenös (i.v.) appliziert werden. Im Gegensatz zu den restlichen Statinen unterliegt Pravastatin nicht dem Metabolismus der Cytochrom P450-Superfamilie und gelangt weitestgehend ohne Interaktion mit anderen Medikamenten an den Wirkort [20]. Weiterhin unterscheiden sich alle Statine durch ihre Potenz und ihre Affinität zur HMG-CoA-Reduktase [21].

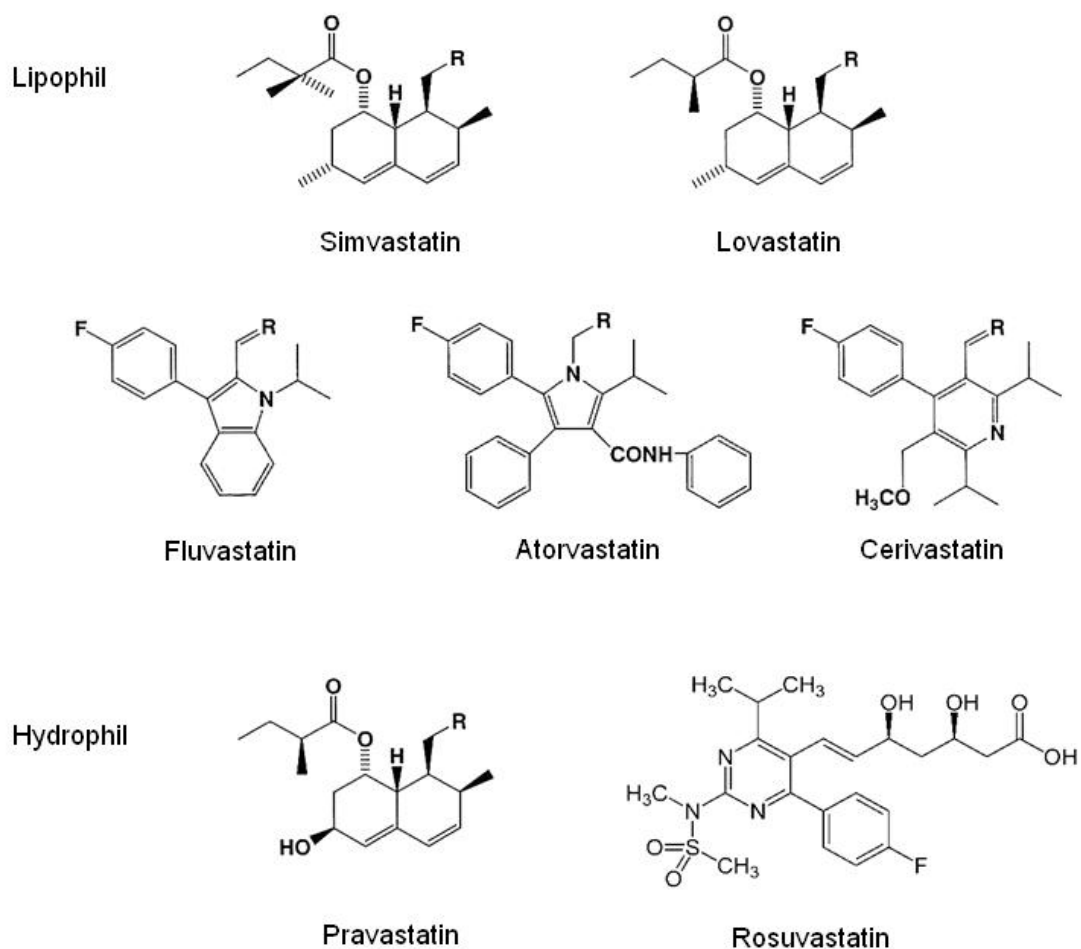


Abb. 2: Chemische Strukturen verschiedener Statine

### 1.3.2. Pleiotrope Eigenschaften der Statine

Als Pleiotropie bezeichnet man Eigenschaften eines Agens, die neben der eigentlich vorgesehenen therapeutischen Eigenschaft beobachtet werden können. Durch die Synthesehemmung der Mevalonsäure werden mehrere Nebenprodukte dieser Reaktion und komplexere Isoprenoide wie zum Beispiel Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) oder Farnesylpyrophosphat (FPP) nicht gebildet. Diese Isoprenoidderivate sind an der Modifizierung verschiedener Proteine (Ras, Ras-like-proteins, Rho, Rab, Rac, Cdc42) [22] beteiligt, welche durch das Fehlen von GGPP und FPP nicht fertiggestellt und aktiviert werden. Die GTPasen sind an einer Vielzahl von Reaktionen und Synthesewegen beteiligt, welche auf die verschiedensten Gewebe oder Organe einen Einfluss haben [23, 24].

Die wichtigsten pleiotropen Wirkungen der Statine nach Liao&Laufs [24]:

- Verstärkte eNOS-Aktivität und -Aktivierung
- Hemmung der Freisetzung freier Radikale
- Hemmung von Endothelin-1
- Hemmung der Oxidation von LDL
- Verstärkte Mobilisierung von endothelialen Progenitorzellen
- Verminderung der Anzahl und Aktivität von Entzündungszellen und Entzündungsmediatoren (z.B. IL6, IL10, PgE II, NFκB) [13]
- Erniedrigung des CRP-Spiegels (C-reaktives Protein)
- Verminderte Produktion und Aktivität von Makrophagen und Matrix-Metalloproteasen (MMP)
- Verminderte Freisetzung von Thromboxan A<sub>2</sub>
- Hemmung der vermehrten Expression von Adhäsionmolekülen
- Verringerung der Plasminkonzentration

Durch die Wirkung der Statine verringert sich die Blutviskosität, die Gerinnungs- und Entzündungsantwort des Körpers wird gehemmt, atherosklerotische Plaques werden stabilisiert und das Endothel wird geschützt [24]. Neuere Studien belegen, dass diese von der Cholesterinsenkung unabhängigen Wirkungen der Statine kurz nach Applikation eintreten [25]. Nach Prinz et al. kann durch sofortige i.v. Applikation von Rosuvastatin das therapeutische Fenster nach ischämischem Stroke um wenigstens 4 Stunden verlängert

werden. Andere Applikationsformen wie intraperitoneal oder peroral sind im Akutfall nicht empfehlenswert (siehe Anhang Abb. 17) [26]. In einer weiteren Arbeit beschreibt Prinz et al., dass unter Statintherapie die cerebrale Infarktgröße nach Ischämie um 40 % verringert werden konnte. 2 Tage nach Beendigung der Statintherapie konnte dieser protektive Effekt nicht mehr beobachtet werden und die NO-Konzentration sank um 32 % unter das Ausgangsniveau ab [25]. Endres et al. postulierten 2008 eine mögliche Indikation für i.v.-Statine bei Patienten mit akuten Gefäßkrankheiten, kritisch-kranken Patienten ohne Möglichkeit einer enteralen Ernährung, Präventivversorgung von chirurgischen Patienten mit hohem kardiovaskulärem Risiko und perioperative Therapie von Patienten mit paroxysmalem Vorhofflimmern. Jedoch sind intravenös applizierbare Statine im klinischen Alltag nicht verfügbar [27].

## **2. Ziel der Studie**

Ziel der Arbeitsgruppe ist die Identifikation therapeutischer Optionen zur Verbesserung der Überlebensrate und der funktionell-neurologischen Regeneration nach I/R-Schaden im Tiermodell. Hierzu wurde ein hochstandardisiertes Kleintierreanimationsmodell etabliert [28]. Zur Quantifizierung der funktionell-neurologischen Regeneration nach Herzkreislaufstillstand und kardiopulmonaler Reanimation (CA/CPR) wurden mehrere neurophysiologische Tests durchgeführt. Aufgrund des 28-tägigen Beobachtungszeitraums können auch Veränderungen untersucht werden, welche sich erst spät im Verlauf des "postcardiac arrest syndromes" entwickeln.

Endres und Laufs postulierten 2005 die Notwendigkeit von i.v.-Statinen. Bevor diese Präparate im klinischen Alltag zugelassen werden, so die Autoren, müssen noch weitere Studien sowie pharmakologische Gutachten durchgeführt werden [27]. Im Rahmen der vorliegenden Tiermodell-Studie stellten wir uns die Frage, welchen Einfluss das Pravastatin auf das globale Behandlungsergebnis von Mäusen nach 10-minütigem Herz-Kreislaufstillstand und kardiopulmonaler Reanimation in einer Langzeitbeobachtung hat.

### **3. Material und Methoden**

Bei dieser Arbeit handelt es sich um einen prospektiv-randomisierte, tierexperimentelle Studie. Alle Tierexperimente wurden unter Einhaltung der gesetzlichen Tierschutzrichtlinien durchgeführt und durch das zuständige Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei, Mecklenburg-Vorpommern unter dem Zeichen LALLF MV/TSD/7221.3-1.1-073/10 genehmigt.

#### **3.1. Versuchstiere**

Für die Versuche wurden weibliche Mäuse des C57BL/6J Stammes (Charles River, Deutschland), jeweils mit einem Körpergewicht von 20-24g, nach eigener Aufzucht am Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie Rostock (IEC) verwendet und unter standardisierten Bedingungen in Gruppen von 5 Tieren pro Käfig gehalten. Futter und Wasser war allen Tieren ad libitum zugänglich. Die Versuchstiere akklimatisierten sich vor Versuchsbeginn 7 Tage in den Räumlichkeiten der Zentralen Versuchstierhaltung (Laborbedingungen: 12 stündiger Hell-Dunkelrhythmus, konstante Raumtemperatur von 22 °C und konstante Luftfeuchtigkeit von 45 %).

#### **3.2. Experimentelles Protokoll**

##### 3.2.1. Vorversuch

##### 3.2.1.1. Lipoproteinuntersuchung

Im Vorfeld der Langzeitstudie wurde überprüft, ob die intravenöse Medikamentengabe im Mausmodell den gleichen klinischen Effekt auf die Blutwerte des Versuchstiers hat wie beim Menschen. Für die Basalwerte wurden 10 mit Xylazin/Ketanest narkotisierte C57BL/6J Mäuse laparotomiert, die Vena cava inferior freipräpariert und 0,5 ml Blut entnommen. Nach der Blutentnahme, der Blutstillung sowie dem Wundverschluss wurden die Versuchstiere wieder in die Käfige gebracht. Die folgenden 7 Tage konnten sich die Mäuse von der Operation erholen. Im Anschluss wurde den Versuchstieren in Isofluran-Kurzarkose die Testsubstanz Pravastatin (2,0 mg/kgKG) 8 Tage lang jeweils morgens in den retrobulbären Venenplexus appliziert. Nach Abschluss des Interventionszeitraums wurden die Versuchstiere wieder laparotomiert und 0,5 ml Blut aus der Vena cava inferior entnommen. Das Blut wurde im Labor mittels enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) auf dessen

Gesamtcholesterin, high density lipoprotein (HDL) und low density lipoprotein/very low density lipoprotein (LDL/VLDL) hin untersucht.

### 3.2.1.2. Beatmung

Während der eigentlichen Reanimationsstudie war es aufgrund der notwendigen Invasivität nicht möglich arterielle Blutgasanalysen (BGA) durchzuführen. Deshalb wurde zu Beginn der Modelletablierung überprüft, ob die Beatmungseinstellungen korrekt und damit die Beatmung der Mäuse suffizient war. Hierzu wurde bei einer Gruppe von Mäusen eine arterielle Blutgasanalyse durchgeführt. Diese wurde nach einer zweistündigen Beatmung mit einer Beatmungsfrequenz von 130/min, einem Tidalvolumen von 10  $\mu$ l/g und einer inspiratorischen Sauerstofffraktion ( $F_{iO_2}$ ) von 0,21 durchgeführt. Des Weiteren wurden zur Bestimmung einer suffizienten Spontanatmung arterielle Blutgasanalysen 8 Stunden nach Reanimation entnommen.

### 3.2.2. Präparation, Ablauf der Reanimation

Um die nachfolgenden neurologischen Tests nicht negativ zu beeinflussen, mussten alle chirurgischen Interventionen so wenig invasiv und atraumatisch wie möglich ablaufen. Die Versuchstiere wurden durch eine intraperitoneale (i.p.) Injektion von Ketamin (12  $\mu$ g/gKG) und Xylazin (8  $\mu$ g/gKG) narkotisiert. Sie wurden auf dem Rücken unterhalb eines Mikroskops (Leica M651, Leica Microsystems Hamburg) gelagert. Um die Augen vor Austrocknung zu schützen, wurden diese mit Panthenolsalbe behandelt. Die Versuchstiere wurden mit einem 22 G Tubus orotracheal intubiert und mit einem Tidalvolumen von 10  $\mu$ l/gKG sowie einer Atemfrequenz (AF) von 130/min unter Zuhilfenahme eines mechanischen Ventilationssystems beatmet (MiniVent; Hugo Sachs, March-Hugstetten). Bis zur Induktion des Herzstillstands (CA) wurden die Mäuse mit Raumluft ( $F_{iO_2}$  0,21) beatmet. Zur Überwachung und Konstanthaltung der Körperkerntemperatur auf 36 °C wurden die Tiere auf einer rückgekoppelten Wärmeplatte mit rektaler Temperatursonde (Effenberg, Pfaffing, Deutschland) fixiert. Um den Körperwärmeverlust während der Narkose zu verringern, wurden die Mäuse mit Kompressen und Wärmeisolationsfolie abgedeckt.

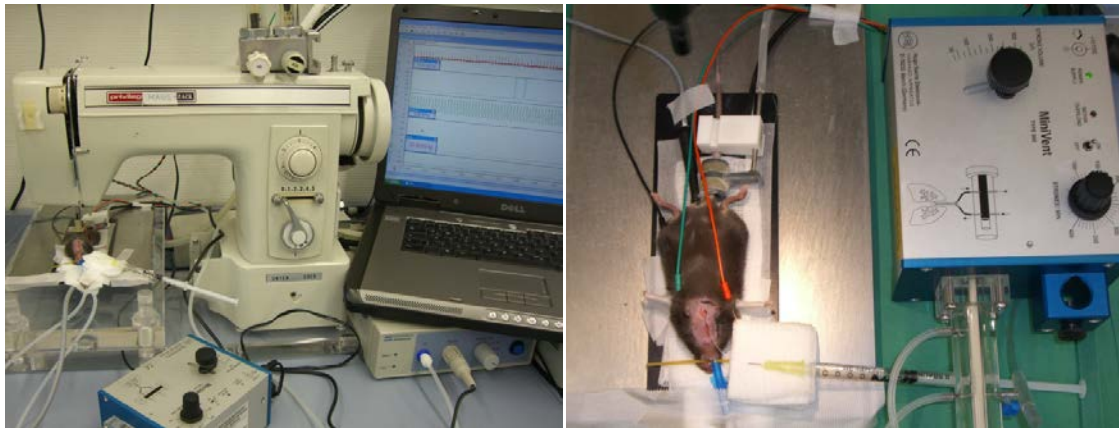


Abb. 3: Reanimationsarbeitsplatz mit intubiertem Versuchstier

Das hämodynamische Monitoring erfolgte über eine Elektrokardiogramm- (EKG) Ableitung, der Blutdruckmessung an der Schwanzwurzel und der plethysmografischen Pulscurvenmessung der Schwanzarterie (AD Instruments; Spechbach, Deutschland). Die Daten wurden mittels PC aufgezeichnet (AD Instruments; Spechbach, Deutschland). Nach erfolgreicher i.p. Anästhesie und Lagerung, wurde die zuvor enthaarte ventrale Halsregion der Maus medial eröffnet und die Vena jugularis externa dextra freipräpariert. In diese wurde ein Polyethylenkatheter als Zentraler Venenkatheter (ZVK) eingebracht und fixiert (PE 50; ID 0,28 mm; Portex, Hythe, Großbritannien).

Nach Instrumentierung des Tieres und einer Stabilisierungsphase von 15 Minuten erfolgte die Induktion des Herzstillstands durch die i.v. Gabe von 80 µg/kgKG Kaliumchlorid (KCl). Verifiziert wurde der Herzstillstand durch Asystolie im EKG und Pulslosigkeit der Schwanzarterie. Gleichzeitig wurde die Beatmung pausiert. 10 Minuten nach Induktion des Herz-Kreislaufstillstands, wurde mit der kardiopulmonalen Reanimation (CPR) begonnen. 400 µg/kgKG Adrenalin sowie 0,05 ml der Testsubstanzen (Pravastatin 0,5 mg/kgKG vs. NaCl 0,9 %) wurden über den ZVK appliziert, die mechanische Beatmung wurde wieder aufgenommen und die Maus mit 450 Thoraxkompressionen pro Minute reanimiert. Da hierbei Drucktiefe und Frequenz von entscheidender Bedeutung sind, wurden die Thoraxkompressionen maschinell durchgeführt und von einer umgebauten Nähmaschine übernommen (Privileg Typ Voll Zick Zack) [28]. Zu Beginn der Reanimation wurde mit einer  $F_{iO_2}$  von 1,0 (Tidalvolumen: 12 µl/gKG; AF: 200/min) beatmet, nach 2 min wurde auf eine  $F_{iO_2}$  von 0,6 und weitere 18 min später auf 0,4 reduziert.

Die erfolgreiche Reanimation der Maus stellte sich durch spontane, koordinierte Herzaktionen im EKG, einer Pulscurve über der Schwanzarterie und der sichtbaren Herzaktion durch die Thoraxwand dar.

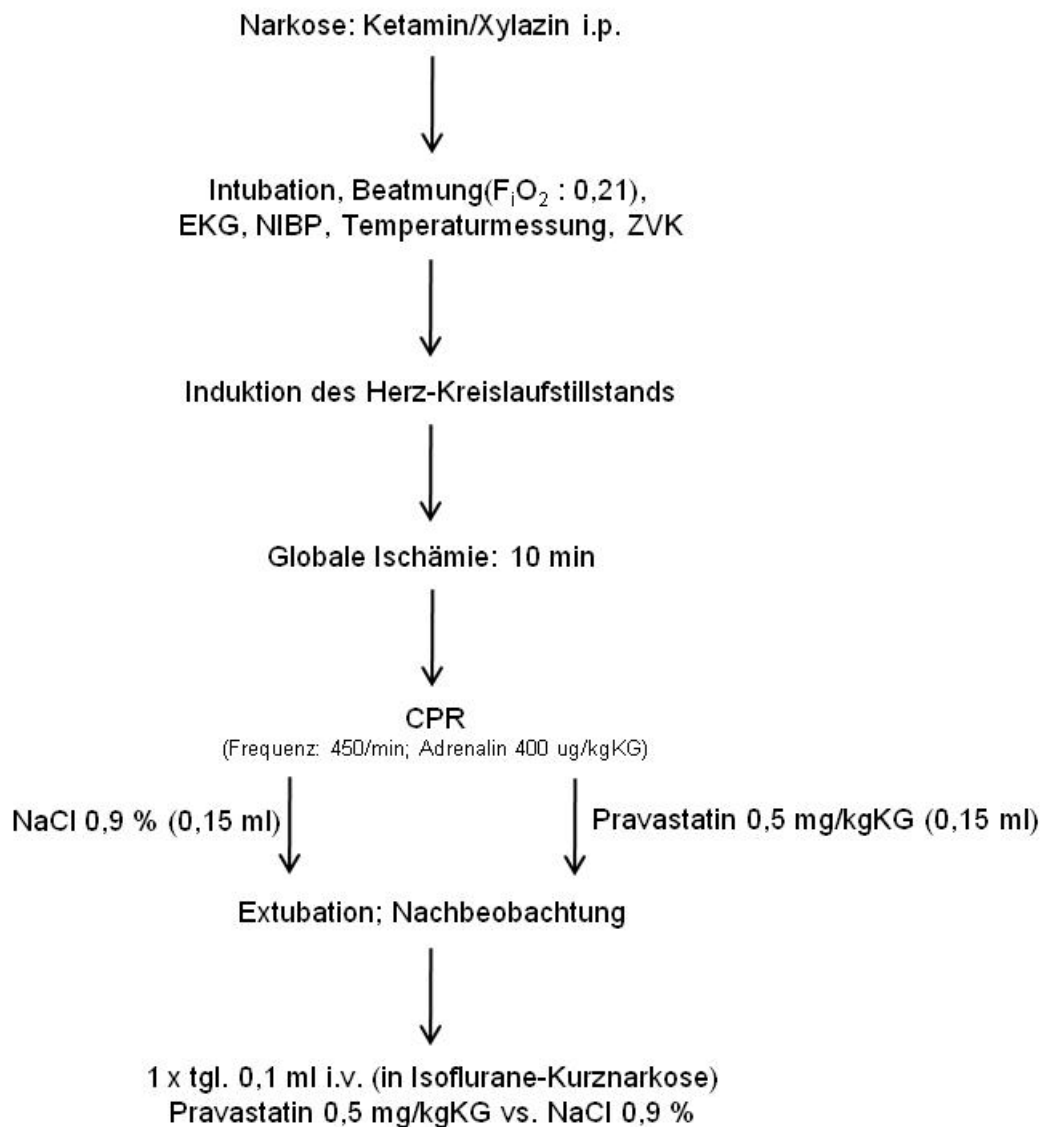


Abb. 4: Interventionsablaufschemata

Das Protokoll sah vor, dass die Reanimationsbemühungen eingestellt wurden, wenn nach 3-minütiger Reanimation und zweimaliger Nachinjektion von 200 µg/kgKG Adrenalin kein eigener Spontankreislauf erkennbar war.

Nach Erlangung eines Spontankreislaufs (ROSC) und weiteren 60 Minuten Stabilisierungsphase, wurde den Versuchstieren 0,1 ml der Testsubstanz (Pravastatin 0,5 mg/kgKG vs. NaCl 0,9 %) über den ZVK appliziert. Weitere 10 Minuten später wurde der ZVK entfernt, das Gefäß ligiert und die Haut durch Naht (Prolene 6.0 Firma: Ethicon Johnson&Johnson, Belgien) verschlossen. Im Anschluss konnte das Versuchstier extubiert werden, sofern Augenlidreflexe, suffiziente Spontanatmungsbemühungen und Reaktionen auf Pfotenstimulation aufweisbar waren.

Nach erfolgreicher Extubation wurden die Versuchstiere in ein gleichbleibend auf 30 °C erwärmtes Terrarium verbracht, um in Ruhe zu regenerieren. Die darauffolgenden Stunden wurden die Mäuse mittels einer Wärmebildkamera (siehe Anhang Abb. 18) überwacht. Zur postoperativen Schmerztherapie wurde dem Trinkwasser Metamizol (250 mg/dl) beigemischt.

An jedem der folgenden 5 Tage erhielten die überlebenden Versuchstiere in Isofluran-Kurzarkose eine intravenöse Injektion von entweder 0,1 ml NaCl 0,9 % (CA/CPR - NaCl 0,9 %) oder 0,1 ml Pravastatin 0,5 mg/kgKG (CA/CPR - Pravastatin) in den linken retrobulbären Venenplexus.

### 3.3. Auszuwertende Parameter

Der Beobachtungszeitraum dieser Untersuchung betrug 28 Tage. Die untersuchten Parameter waren:

- Überleben
- Körpergewicht
- Neuroscore
- Allgemeinzustand
- Funktionell-neurologische Tests
  - Rotarod-Test
  - Elevated-Plus-Maze-Test
  - Water-Maze-Test

Aufgrund des identischen Phänotyps der beiden Gruppen konnten die Tests der zuvor eingeteilten Gruppen weiterhin von einem verblindeten Untersucher durchgeführt werden.

<u>Neuro-physiologische Testverfahren</u>																	
Water-Maze-Test	x	x	x	x	x		?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	
RotaRod						x	x	x	x	x	x			x	x	x	x
Elevated-Plus-Maze						x	x	x	x	x	x			x	x	x	x
Neuroscore						x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Körpergewicht						x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

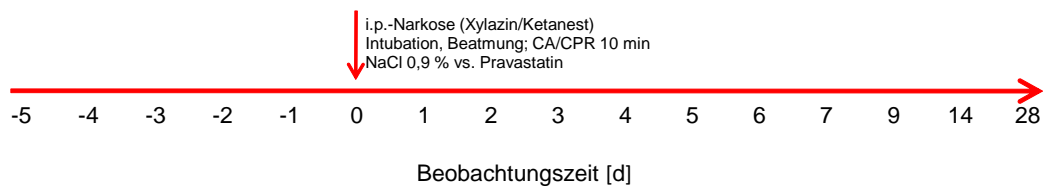


Abb. 5: Ablaufschema der neuro-physiologischen Testverfahren; vor Teilnahme an der postinterventionellen Testphase wurde die Eignung der Tiere neu evaluiert

### 3.3.1. Überleben

Das Überleben stellte den wichtigsten Verlaufsparmeter der Studie dar. Es wurde ein Beobachtungszeitraum von 28 Tagen gewählt. Innerhalb der ersten 12 Stunden nach Intervention wurde das Überleben der Tiere stündlich überprüft. An den folgenden Tagen wurden die Tiere dreimal pro Tag begutachtet.

### 3.3.2. Körpergewicht

Das Gewicht und dessen Verlauf während des Beobachtungszeitraums stellen einen sehr sensitiven Parameter für das Befinden der Versuchstiere dar. Um eine Vergleichbarkeit der Gruppen in Bezug auf das Körpergewicht zu ermöglichen und den Einfluss interindividueller Unterschiede zu verringern, wurde das relative Körpergewicht untersucht. Der Ausgangswert aller Mäuse war 100 % an Tag 0. Gemessen wurde täglich morgens um 7.00 Uhr (Waage: MXX-212, Denver Instruments, Göttingen, Deutschland).

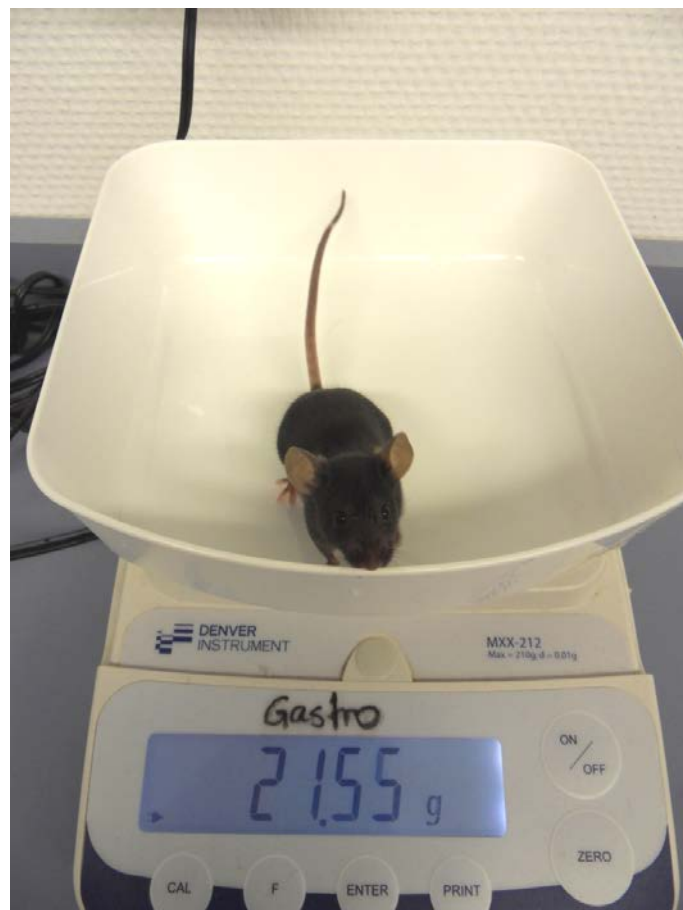


Abb. 6: Gewichtsmessung

### 3.3.3. Neuroscore

In Anlehnung an die Glasgow Coma Scale (GCS), die den neurologischen Status beim Menschen beschreibt, lässt sich auch der neurologische Score bei Mäusen und Ratten erheben [30]. Die vorliegende Einschätzung der Vigilanz und Motorik basiert auf einer Modifikation nach Abella et al. [31].

Hierbei werden, ähnlich der GCS, für verschiedene neurologische Qualitäten (Bewusstsein, Atmung, Koordination, Aktivität, Korneal- und Stellreflex) maximal 12 Punkte verteilt.

<b><u>Neuroscore</u></b>		
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, normales Atemmuster	2
Stellreflex	1. Keine Drehbewegung	0
	2. Langsames Umdrehen	1
	3. spontanes und schnelles Umdrehen	2
Koordination	1. keine Bewegung	0
	2. moderate Ataxie	1
	3. normale Koordination	2
Bewegung und Aktivität	1. keine spontane Bewegung	0
	2. verlangsamte Bewegung	1
	3. spontane Bewegung	2
maximal mögliche Punktzahl		12

Tab. 1: Neuroscore

### 3.3.4. Allgemeinzustand

Der Allgemeinzustand (AZ) der Tiere wurde an jedem Untersuchungstag erhoben. Klinisch auffällige Beeinträchtigungen der Maus aufgrund cerebraler Läsionen wurde in Anlehnung an das neurologische Gradingssystem von Bederson et al. [32] in vier verschiedene Schweregrade eingeteilt. Bei der Bewertung erhalten die Mäuse einen Punktwert zwischen 0-3, wobei 0 einen sehr guten und 3 einen sehr schlechten AZ beschreibt.

<b><u>Allgemeinzustand</u></b>		
Fellbeschaffenheit /-pflege	1. sauber, glänzend	0
	2. struppig, verklebt	1
Nahrungsaufnahme	1. Maus frisst	0
	2. Maus frisst nicht	1
Bewegung	1. normale Bewegung	0
	2. verlangsamte oder kein Bewegung	1
0 Punkte - keine Beeinträchtigung 1 Punkt - leichte Beeinträchtigung 2 Punkte - mässige Beeinträchtigung 3 Punkte - starke Beeinträchtigung		

Tab. 2: Bewertungskriterien zur Einschätzung des Allgemeinzustands

### 3.3.5. RotaRod-Test

Der RotaRod-Test ist im Rahmen der Verhaltensphysiologie ein etabliertes Modell zur Beurteilung der motorischen Kraft, Ausdauer, Geschicklichkeit, Gleichgewichtsempfinden und Koordination von Nagetieren. Der Test kann vor allem nach cerebraler und cerebellärer Schädigung eingesetzt werden [33]. Die Versuchstiere wurden auf einen rotierenden Zylinder gesetzt, der sich mit 12,5 Umdrehungen/min bewegte. Dabei stand der Zylinder 45 cm oberhalb des Bodens und wurde seitlich von 2 schwarzen Plastikplatten eingefasst, um die Maus daran zu hindern sich vom Untersuchungszyylinder zu entfernen (Abb. 7). Die Tiere mussten pro Untersuchungstag 3 x 5 min laufen. Zwischen den einzelnen Versuchen hatten die Mäuse eine einminütige Erholungsphase. Im Allgemeinen stellen neunhundert Sekunden für ein gesundes Versuchstier nach einer kurzen Lernphase keinerlei Problem dar.

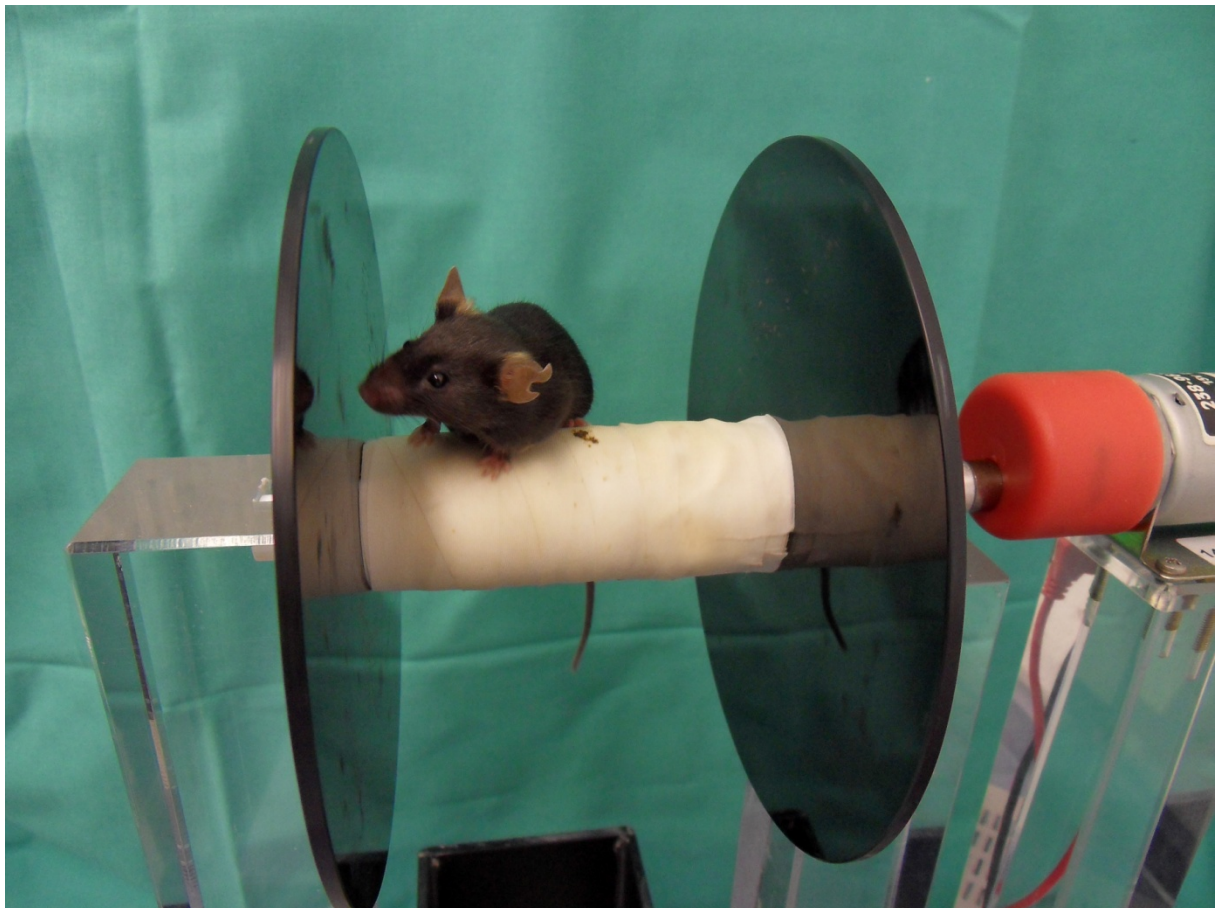


Abb. 7: RotaRod-Testaufbau

### 3.3.6. Water-Maze-Test

Aufgrund der hohen Hypoxiesensibilität erwartet man den größten Schaden bei plötzlichem Herzstillstand im Hirngewebe, wobei der Hippocampus und das Striatum zu den hypoxiesensibelsten Hirnregionen gehören [34]. Da die Hippocampusregion des Gehirns sehr stark in das Lernvermögen des Individuums eingebunden ist, kann eine Schädigung dieser Hirnregion zu verminderter Lern- und Gedächtnisleistung führen. Diese Lern- und Reproduzierfähigkeit des Gehirns lässt sich mit dem etablierten Versuchsaufbau des Water-Maze-Tests untersuchen [35]. Durch die Water-Maze-Testung wird festgestellt, ob den Versuchstieren das Erlernen einer bestimmten räumlichen Position möglich ist und ob sie sich nach einem zehnmütigen Herz-Kreislaufstillstand mit CPR an das zuvor Erlernete erinnern können. Im Verlauf der Nachbeobachtungsphase wird untersucht, ob räumliches Neulernen nach CA/CPR möglich ist [36, 37].

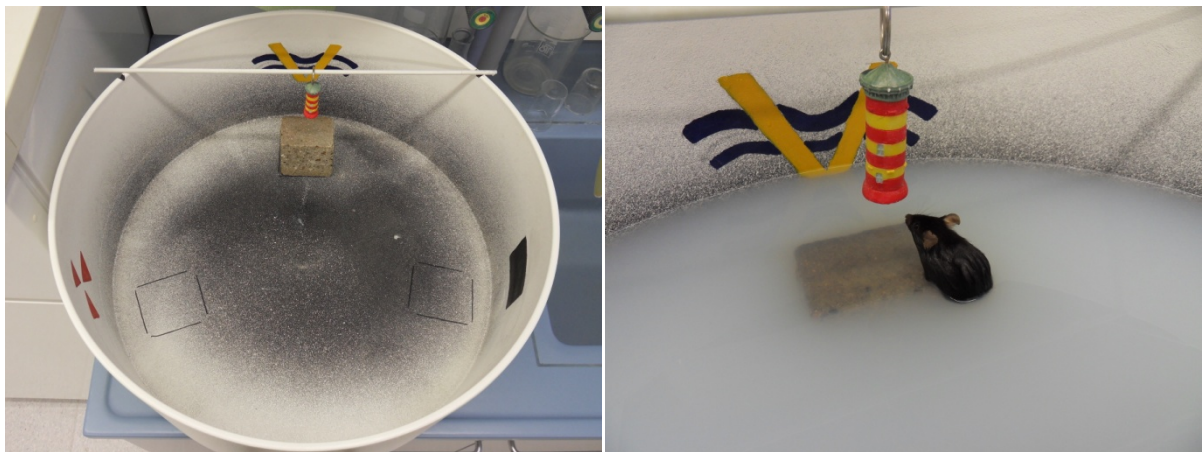


Abb. 8: Bassin des Water-Maze-Tests ( $\varnothing$  80 cm; Wassertiefe 15 cm; Wassertemperatur ca. 25 °C)

Der Test bestand aus einem gefüllten Bassin ( $\varnothing$  80 cm; Wassertiefe 15 cm; Wassertemperatur ca. 25 °C) und einem darin befindlichen Stein (5 cm x 5 cm x 14 cm), dessen Trittplattform ca. 1 cm unter der Wasseroberfläche lag, auf welcher sich die Tiere in Sicherheit bringen könnten. Die Position der Plattform war am Beckenrand mit gut sichtbaren Hinweisreizen optisch markiert (siehe Abb. 8).

Die Konditionierung der Tiere begann 5 Tage vor der geplanten Intervention. Sie wurde bis zum 1. Tag vor der Intervention morgens und abends mit 5 Versuchen fortgeführt. Das Versuchstier wurde immer an der gleichen Stelle (in Abb. 9 mit X markiert), und in gleicher Schwimmrichtung in das Bassin gegeben. Um auszuschließen, dass die Tiere den Stein durch die Oberfläche des Wassers sehen konnten, wurde dem Wasser laktosefreie Milch

zugeführt, sodass es sich trübte. Daher dienten nur noch die Markierungen an den Wänden als Orientierungspunkte.

Da dieser Test gerade nach einer Reanimation sehr anstrengend für die Tiere sein kann, mussten diese einen ausreichenden Grad der Erholung erreicht haben. Voraussetzungen für die Teilnahme waren ein Neuroscore von 12, ein Anstieg des Körpergewichts und mindestens einmal durchgängig absolvierte 300 Sekunden im RotaRod-Test. Um die Tiere nicht zu überlasten, wurde dieser Test an den ersten 3 postoperativen Schwimmtagen nur einmal täglich durchgeführt. Nach dem 3. Schwimmtag wurden die Versuchstiere neu konditioniert. Dies wurde realisiert, indem die Position der Plattform geändert wurde, entsprechend den Markierungen an der Bassinwand. Der neue Standort der Plattform wurde dann jeweils morgens und abends weitere fünf Tage angelernt.

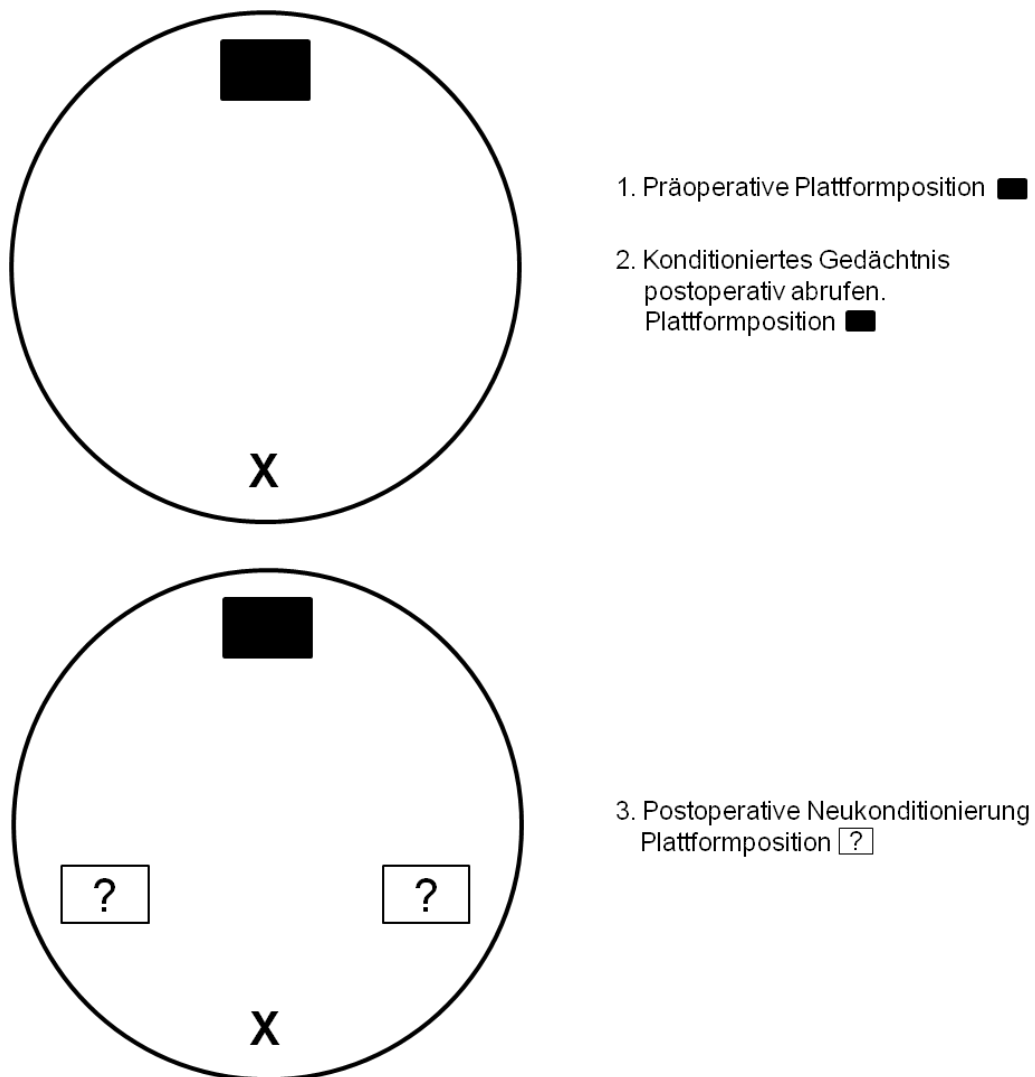


Abb. 9: Schematischer Water-Maze-Versuchsaufbau

### 3.3.7. Elevated-Plus-Maze-Test

Um die Verhaltensphysiologie der beiden Gruppen miteinander vergleichen zu können, wurde der Elevated-Plus-Maze-Test herangezogen. Er ist ein etabliertes neuro- und verhaltensphysiologisches Testverfahren zur Beurteilung von Aktivität, Ängstlichkeit und Neugier von Nagetieren.

Der Testaufbau besteht aus einem seitlich offenen und einem geschlossenen Arm, welche senkrecht zueinander stehen und mittig verbunden sind (siehe Abb. 10). Die Arme sind 5 cm breit und 30 cm lang. Um die Tiere daran zu hindern vom Testaufbau zu springen, steht das Kreuz 60 cm erhöht über dem Boden. Für die Mäuse ist es daher auf dem geschlossenen Steg sicherer, als auf dem offenen. Eine Kamera zeichnet das Verhalten während des zehnminütigen Tests auf.

Zu Beginn wurde die Maus in die Mitte des Kreuzes gesetzt und bewegte sich dann auf den Armen des Labyrinths. Der Untersucher ermittelte später anhand des Videos die zurückgelegte Strecke, die Anzahl, wie oft die Maus sich auf die Hinterläufe stellte um sich gegen die Wand zu stemmen und die Zeitdauer, welche auf dem offenen und dem geschlossenen Arm verbracht wurde [38].

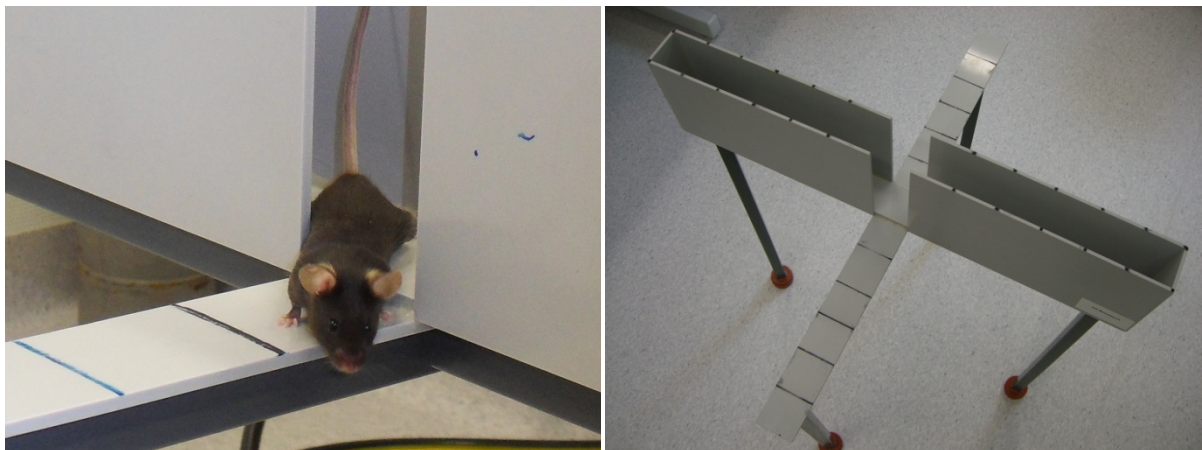


Abb. 10: Versuchsaufbau des Elevated-Plus-Maze-Tests

## 3.4. Histologie

Um die Auswirkung der Ischämie auch auf zellulärer Ebene nachzuweisen, wurden von der Arbeitsgruppe in Kooperation mit dem Rostocker Institut für Anatomie histologische Präparate aus dem Lungen-, Herz-, Leber- und Hirngewebe der toten Versuchstiere angefertigt. Die histologischen Präparate wurden einerseits von getöteten Mäusen, welche die Beobachtungsphase komplett beendet haben, aber auch von Mäusen, die prä mortal sehr

auffällige Anzeichen neurologischer Störungen aufwiesen, angefertigt. Die entnommenen Gewebe wurden unmittelbar nach Entnahme in 4 %igem Formalin fixiert, später gefärbt (HE-Färbung, Nissl-Färbung) und nach Einbettung in Paraffin im Mikrotom geschnitten. Die Begutachtung, Auswertung und Beurteilung erfolgte durch das Anatomische Institut Rostock.

### **3.5. Auswertung und Statistik**

Zur Darstellung der Daten wurden die Programme SigmaStat 3.5<sup>®</sup> und SigmaPlot 10.0<sup>®</sup> (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) verwendet. Die Daten für die Kaplan-Maier-Überlebenskurve wurden mittels survival log-rank Test analysiert. Alle Daten wurden mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung untersucht. Weiterhin wurden zur statistischen Auswertung der Ergebnisdaten, Rangsummentest nach Mann-Whitney zum Vergleich nicht parametrischer Daten durchgeführt. Zum Vergleich zweier normalverteilter Stichproben verwendete man den Student`s t-Test oder ANOVA. Für multiple Gegenüberstellungen wurde zur Analyse die Home-Sidak Methode verwendet. Der Unterschied der Teilnehmerzahl am Water-Maze-Test nach CA/CPR wurde durch den  $\chi^2$ -Test bewertet. Die Werte wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, bzw. bei Nichtnormalverteilung als Median und Interquartilabständen ([25 % - 75 %]) dargestellt.

Das Signifikanzniveau wurde grundsätzlich auf 5 % (\*p<0,05) festgelegt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Lipoproteinuntersuchung

Die tägliche intravenöse Applikation von 2 mg/kgKG Pravastatin zeigte eine signifikante Reduktion der Plasmakonzentration des Gesamtcholesterols im Vergleich zur Injektion von NaCl 0,9 % (Basal:  $101,8 \pm 4,2$ ; NaCl 0,9 %  $105,1 \pm 5,5$  vs. Pravastatin  $89,4 \pm 2,6^*$ ;  $*p < 0,05$ ). Nennenswerte Auswirkungen auf den HDL und LDL/VLDL-Stoffwechsel konnten nach 8 Tagen nicht nachgewiesen werden.

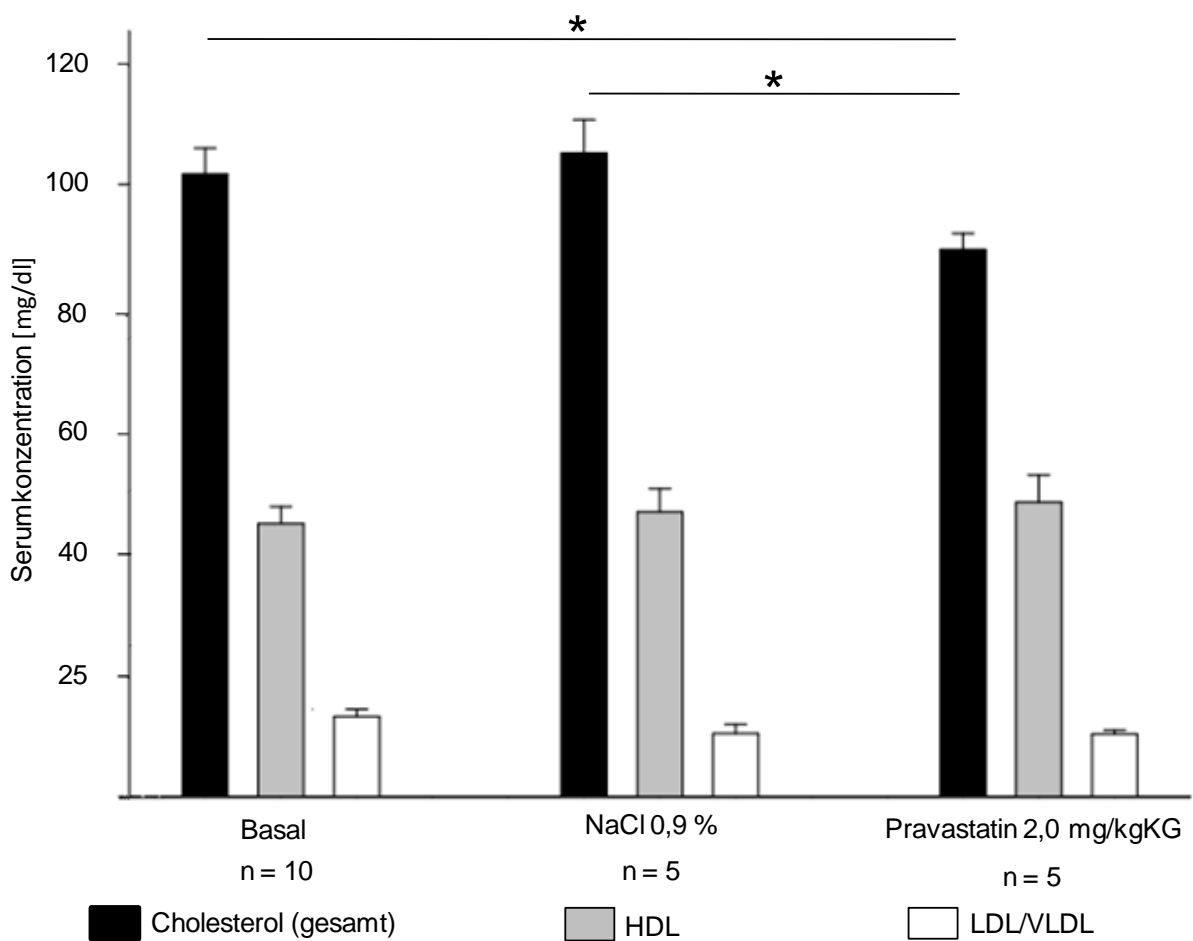


Abb. 11: Statinabhängige Veränderungen im Lipidstoffwechsel der Maus, Untersuchungszeitraum 8 Tage; Mittelwerte  $\pm$  SD

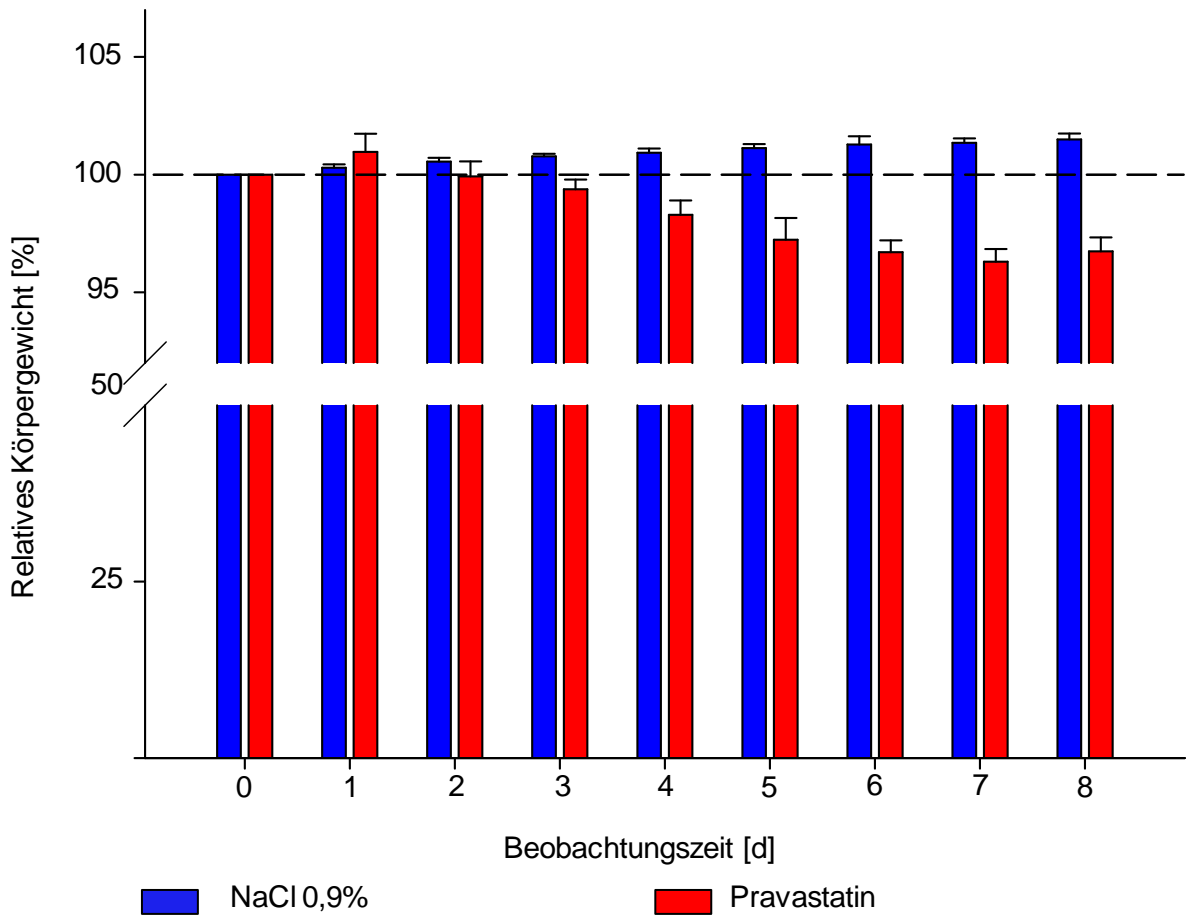


Abb. 12: Relative Körpergewichtsentwicklung der Versuchstiere, Tag 0 = 100 %, Beobachtungszeitraum 8 Tage, Mittelwerte  $\pm$  SD

Der Verlauf des täglich gemessenen Körpergewichts zeigt einen tendentiell deutlichen Gewichtsverlust bei den mit Pravastatin behandelten Tieren. Ausgehend von 100 % konnte bei der Pravastatingruppe am 8. Tag ein Gewicht von  $96,74 \pm 0,59$  vs. NaCl 0,9 %:  $101,5 \pm 0,25$  gemessen werden.

## 4.2. Allgemeine Parameter der Reanimation

Die insgesamt 70 Versuchstiere wurden am Morgen der Intervention per Losverfahren der CA/CPR - Pravastatin oder CA/CPR - NaCl 0,9 % -Gruppe zugeordnet. Aufgrund von Problemen bei der Reanimation (Präparationszeit >30 min, hoher intraoperativer Blutverlust, Venenabriss, Dislokation von Tubus- oder i.v. - Katheter während CPR) mussten 8 Tiere ausgeschlossen werden. Nach Reanimation konnte bei allen 62 Tieren ein Spontankreislauf hergestellt werden.

<b><u>Ausgangsbedingungen vor CA</u></b>		
Parameter	CA/CPR 10 min - NaCl 0,9 % n = 31	CA/CPR 10 min - Pravastatin n = 31
Körpergewicht [g]	20,65 [± 2,2]	21,8 [± 2,0]
Herzfrequenz [1/min]	245 [± 27]	238 [± 31]
MAP [mm Hg]	103 [± 10]	105 [± 12]
Körpertemperatur [°C]	36,0 [± 0,1]	36,0 [± 0,1]
<b><u>Parameter der kardiopulmonalen Reanimation</u></b>		
ROSC Zeit [s]	87 [± 25]	70 [± 25]
ROSC Rate	100 %	100 %
Adrenalin (µg)	15 [± 5]	15 [± 5]
Extubation (min)	138 [± 12]	133 [± 8]
<b>1 h post CA/CPR</b>		
Herzfrequenz [1/min]	440 [± 30]	430 [± 28]
MAP [mm Hg]	75 [± 10]	80 [± 12]
Körpertemperatur [°C]	36,3 [± 0,2]	36,4 [± 0,1]
<b>2 h post CA/CPR</b>		
Herzfrequenz [1/min]	320 [± 40]	305 [± 37]
MAP [mm Hg]	65 [± 7,5]	65 [± 8]
Körpertemperatur [°C]	36,0 [± 0,1]	36,0 [± 0,1]

Tab. 3: Ausgangsbedingungen und Parameter während sowie nach CA/CPR; Mittelwerte ± SD

### 4.3. Überleben

Der wichtigste Parameter in dieser Untersuchung war das Überleben der Versuchstiere in einem Beobachtungszeitraum von 28 Tagen. Wie in Abb. 13 dargestellt, wiesen die mit Pravastatin behandelten Tiere einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber den mit NaCl 0,9 % behandelten Tieren auf (CA/CPR - Pravastatin: 54,8 % vs. CA/CPR - NaCl 0,9 %: 29 %; \* $p < 0,05$ ). Ab dem dritten Tag nach Reanimation verstarb in der CA/CPR - Pravastatingruppe 1 Tier, im Gegensatz zur Kontrollgruppe in welcher 7 Tiere verstarben.

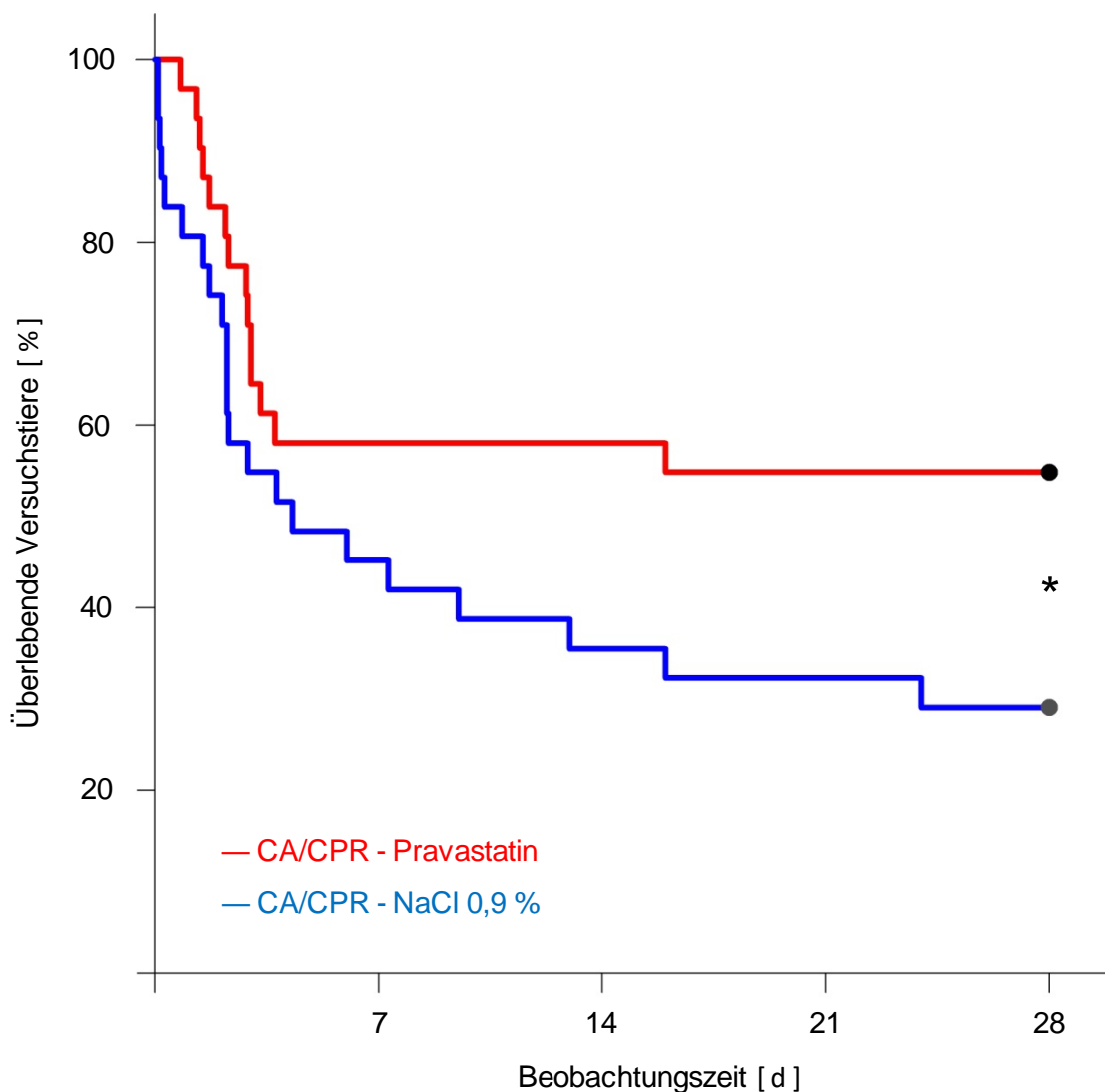


Abb. 13: Überleben der Versuchstiere CA/CPR - Pravastatin vs. CA/CPR - NaCl 0,9 %; Beobachtungszeitraum 28 Tage, Statistik: Kaplan-Meier logrank Analyse, \* $p < 0,05$

Am Ende des 28 tägigen Untersuchungszeitraums waren 17 Tiere aus der Pravastatin-Gruppe und 9 Tiere aus der Kontrollgruppe am Leben.

#### 4.4. Körpergewicht

Beide Gruppen zeigten einen deutlichen Gewichtsabfall an den ersten beiden postoperativen Tagen. Die Tiere der Kontrollgruppe nahmen am 2. und 3. postinterventionellen Tag deutlich mehr ab, als die Tiere der CA/CPR - Pravastatingruppe (2.: CA/CPR - NaCl 0,9 %:  $81,9 \pm 0,94$  vs. CA/CPR - Pravastatin:  $84,3 \pm 0,78$ ; 3.: CA/CPR - NaCl 0,9 %:  $79,2 \pm 1,54$  vs. CA/CPR - Pravastatin:  $83,2 \pm 1,49$ ). Nach dem 3. postinterventionellen Tag nahmen die Tiere der CA/CPR - Pravastatingruppe an Gewicht zu, wohingegen die Tiere der Kontrollgruppe immer noch abnahmen. Bei den Tieren der Kontrollgruppe wurde eine Gewichtszunahme am 5. postoperativen Tag beobachtet. Danach nahmen alle noch lebenden Tiere beider Gruppen an Gewicht zu, wobei die Tiere der Kontrollgruppe stärker zunahmen als jene mit Pravastatin behandelten Tiere. Am Ende des Beobachtungszeitraums waren die Tiere der Kontrollgruppe schwerer als die Versuchstiere der CA/CPR - Pravastatingruppe (CA/CPR - NaCl 0,9 %:  $102,0 \pm 2,04$  vs. CA/CPR - Pravastatin:  $97,8 \pm 1,09$ ). Die Gewichtsunterschiede der beiden Gruppen lagen bis zum Ende des Untersuchungszeitraums unterhalb des Signifikanzniveaus.

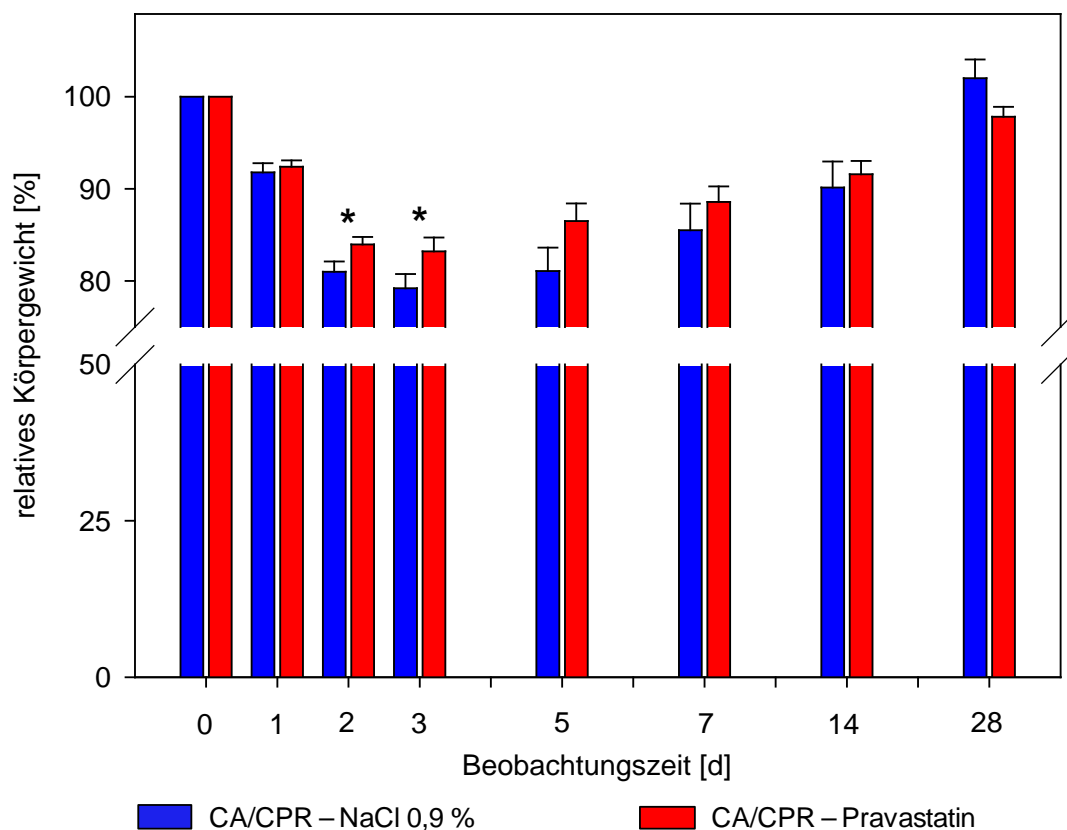


Abb. 14: Relative Körpergewichtsentwicklung der Versuchstiere, Tag 0 = 100 %, Beobachtungszeitraum 28 Tage; Mittelwerte  $\pm$  SD



## 4.6. Allgemeinzustand

Am Tag der Reanimation wurde der Zustand aller in die Auswertung eingeflossenen Tiere mit sehr gut beurteilt. Dies entsprach dem Zahlwert 0. Am 1. Tag nach der Reanimation war eine Verschlechterung des Allgemeinzustands beider Gruppen klar erkennbar (CA/CPR - NaCl 0,9 %: 1,5 [1 - 3] vs. CA/CPR - Pravastatin: 1 [1 - 2]). Während sich der Ausgangszustand der Kontrollgruppe ab dem Tag 7 einstellte, war der Ausgangszustand der CA/CPR - Pravastatingruppe 3 Tage früher realisiert (CA/CPR - NaCl 0,9 %: 0,5 [0 - 1] vs. CA/CPR - Pravastatin: 0 [0 - 0]). Ab dem 7. Tag präsentierten sich die noch lebenden Versuchstiere in einem subjektiv sehr guten Allgemeinzustand.

<b>Allgemeinzustand</b>		
	CA/CPR - NaCl 0,9 % n = 31	CA/CPR - Pravastatin n = 31
<b>Tag</b>		
<b>0</b>	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]
<b>1</b>	1,5 [1 - 3]	1 [1 - 2]
<b>2</b>	1 [0 - 2]	1 [0 - 2]
<b>3</b>	1 [0 - 1]	0 [0 - 1]
<b>4</b>	0,5 [0 - 1]	0 [0 - 0]
<b>5</b>	0 [0 - 1]	0 [0 - 0]
<b>7</b>	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]
<b>9</b>	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]
<b>11</b>	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]
<b>14</b>	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]
<b>28</b>	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]

Tab. 4: Allgemeinzustand der Versuchstiere, Beobachtungszeitraum 28 Tage, Median [25 - 75 Perzentile], Statistik: Student's t-Test

## 4.7. RotaRod-Test

Die Ergebnisse des Rotarod-Tests sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Am Tag 1 vor der Reanimation wurden die Tiere an den Versuch gewöhnt. Die Tiere beider Gruppen waren am ersten präoperativen Tag fast identisch im RotaRod-Test (CA/CPR - NaCl 0,9 %: 603 [324 - 669] vs. CA/CPR - Pravastatin: 618 [310 - 900]) genau wie am Operationstag selber (CA/CPR - NaCl 0,9 %: 851 [671 - 900] vs. CA/CPR - Pravastatin: 900 [682 - 900]). Die gelaufenen Zeiten des ersten postoperativen Tages waren in beiden Gruppen deutlich reduziert (CA/CPR - NaCl 0,9 %: 38 [5 - 620] vs. CA/CPR - Pravastatin 41 [7 - 382]).

<b>Rotarod-Test</b>		
Zeit [s]		
	CA/CPR - NaCl 0,9 % n = 31	CA/CPR - Pravastatin n = 31
<b>Tag</b>		
<b>-1</b>	603 [324 – 669]	618 [310 – 900]
<b>0</b>	851 [671 – 900]	900 [682 – 900]
<b>1</b>	38 [5 – 620]	41 [7 – 382]
<b>2</b>	391 [98 – 599]	309 [16 – 696]
<b>3</b>	401 [138 – 733]	670 [321 – 890]
<b>4</b>	610 [227 – 900]	900 [723 – 900]*
<b>5</b>	810 [578 – 894]	900 [696 – 900]*
<b>7</b>	900 [712 – 900]	900 [820 – 900]
<b>9</b>	900 [900 – 900]	900 [900 – 900]
<b>11</b>	900 [900 – 900]	900 [900 – 900]
<b>14</b>	900 [900 – 900]	900 [900 – 900]
<b>28</b>	900 [900 – 900]	900 [900 – 900]

Tab. 5: Ergebnisse während des Rotarod-Tests, Beobachtungszentrum 28 Tage, Median [25 - 75 Perzentile], Statistik: Students t-Test

Nach den ersten 3 Tagen konnte ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (CA/CPR - NaCl 0,9 %: 401 [138 - 733] vs. CA/CPR - Pravastatin: 670 [321 - 890]), welcher in den zwei Folgetagen signifikant wurde (Tag 4: CA/CPR - NaCl 0,9 %: 610 [227 - 900] vs. CA/CPR - Pravastatin: 900 [723 - 900]\*; Tag 5: CA/CPR - NaCl 0,9 %: 810 [578 - 894] vs. CA/CPR - Pravastatin: 900 [696 - 900]\*). Ab dem 7. postinterventionellen Tag waren die gelaufenen Zeiten der überlebenden Tiere beider Gruppen fast identisch.

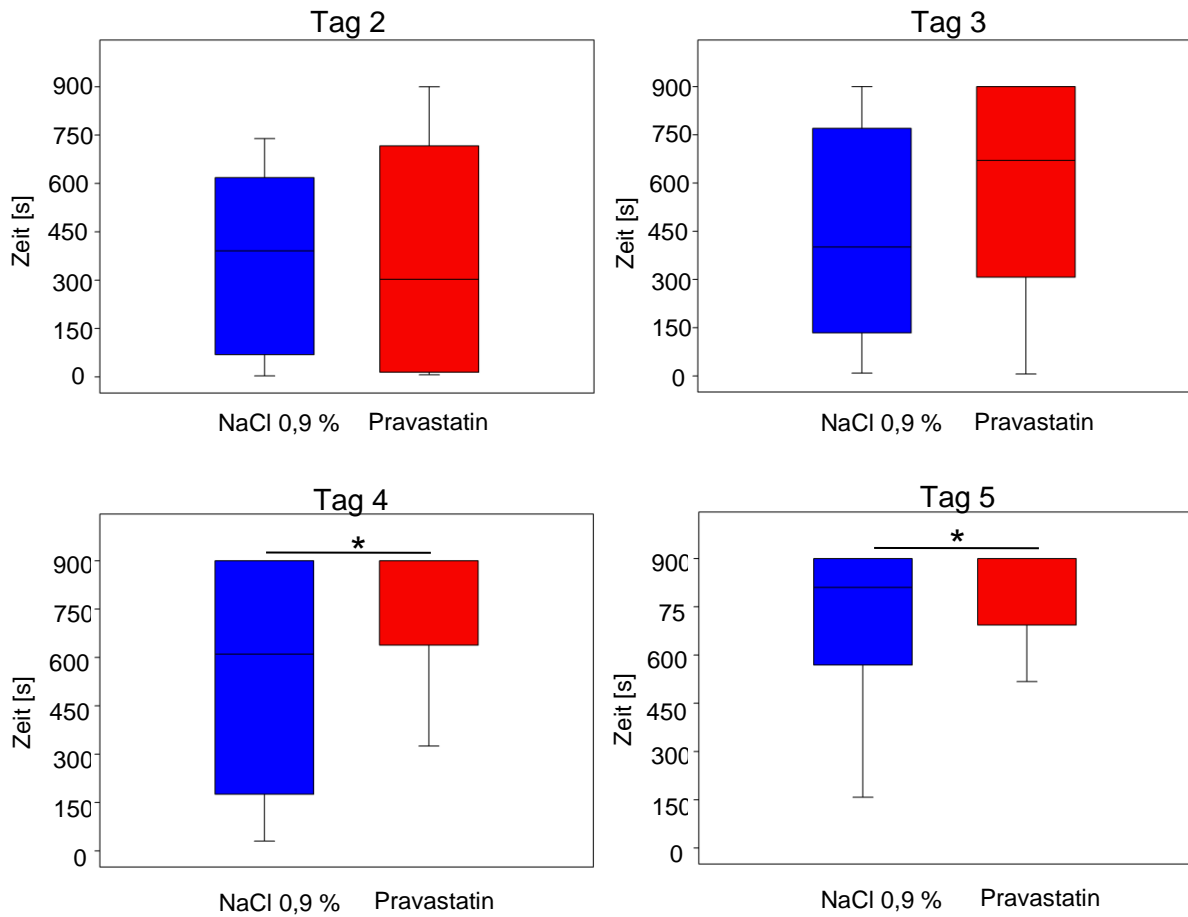


Abb. 16: RotaRod-Test der Tage 2 - 5, Beobachtungszeitraum 28 Tage, Median [25 - 75 Perzentile], Statistik: Student`s t-Test

#### 4.8. Water-Maze-Test

Am Test nahmen 17 von 31 Tieren der CA/CPR - Pravastatingruppe teil, sowie 8 von 31 Tieren aus der Kontrollgruppe (CA/CPR - Pravastatin: 54,8 % vs. CA/CPR - NaCl 0,9 %: 25,8 %). Die Auswertung der Testdaten ergab, dass die Versuchstiere vor der Randomisierung das Auffinden der Plattform erlernen konnten. Beim ersten Versuch brauchten die Tiere 14 [7 - 30]s, um die Plattform zu finden, wohingegen sie am letzten Konditionierungstag 6 [2 - 17] s benötigten. Nach Randomisierung, Präparation und Reanimation zeigten die Zeiten des postinterventionellen Schwimmens im direkten Vergleich der beiden Gruppen keinen deutlichen Unterschied. (Tag X: CA/CPR - NaCl 0,9 %: 11 [4 - 27] vs. CA/CPR - Pravastatin: 10 [5 - 18]; Tag X+3: CA/CPR - NaCl 0,9 %: 7 [4 - 13] vs. CA/CPR - Pravastatin: 5 [3 - 14]).

Die überlebenden Tiere beider Gruppen wiesen die Fähigkeit zum Neuerlernen der Position der Plattform im Wasser auf. Am 1. Tag der Neukonditionierung konnte im Gruppenvergleich bei der CA/CPR - Pravastatingruppe ein besseres Ergebnis festgestellt werden (CA/CPR - NaCl 0,9 %: 18 [10 - 32] vs. CA/CPR - Pravastatin: 13 [7 - 25]; \* $p < 0,05$ ). Bis zum Ende des Tests fand die CA/CPR - Pravastatingruppe die Rettungsplattform schneller als die Kontrollgruppe (CA/CPR - NaCl 0,9 %: 8 [4 - 12] vs. CA/CPR - Pravastatin: 5 [3 - 10]; \* $p < 0,05$ ).

<b><u>Water-Maze-Test</u></b>		
	CA/CPR - NaCl 0,9 % n = 31	CA/CPR - Pravastatin n=31
<b>Lernphase vor CA/CPR</b>	<b>Zeit in s - Median [25 - 75 Perzentile]</b>	
Erster Kontakt (Tage X-5)	14 [7 - 30]	
Tag vor Reanimation (Tag X-1)	6 [2 - 17]*	
*p<0,05 Tag -5 vs Tag -1		
<b>Teilnahme am Test nach CA/CPR (überlebende Tiere; Eingangskriterien)</b>		
<b>Teilnehmer nach CA/CPR</b>		
n (%)	25,8 %	54,8 %*
		*p<0,05
<b>Frühestmöglicher Tag der Teilnahme am Test (Tag X)</b>	<b>Zeit in d - Median [25 - 75 Perzentile]</b>	
	5 [3 - 8]	3 [2 - 5]*
		*p<0,05 NaCl vs. Pravastatin
<b>Test nach CA/CPR</b>	<b>Zeit in s - Median [25 - 75 Perzentile]</b>	
Erster Versuch nach Reanimation (Tag X)	11 [4 - 27]	10 [5 - 18]
Dritter Versuch nach Reanimation (Tag X+3)	7 [4 - 13]	5 [3 - 14]
Erster Versuch der Neukonditionierung	18 [10 - 32]	13 [7 - 25]
Letzter Versuch der Neukonditionierung	8 [4 - 12]*	5 [3 - 10]*
	*p<0,05 CA/CPR - NaCl 0,9 % Tag 10 vs. Tag 15	*p<0,05 CA/CPR - Pravastatin Tag 10 vs. Tag 15

Tab. 6: Ergebnisse Water-Maze-Test, Statistik: Student's t-Test,  $\chi^2$ -Test; \*p<0,05

## 4.9. Elevated-Plus-Maze-Test

Der Elevated-Plus-Maze-Test zeigte in keiner der getesteten Qualitäten einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen.

<b><u>Elevated-Plus-Maze</u></b>		
	CA/CPR - NaCl 0,9 % n = 31	CA/CPR - Pravastatin n = 31
<b>Tag 0</b>		
gelaufene Strecke [cm]	761 ± 43,3	645 ± 35,1
Zeit auf dem offenen Arm [s]	0 [0 – 18]	7 [0 – 15]
Aufrichten	16,5 ± 1,4	13,9 ± 1,2
<b>Tag 1</b>		
gelaufene Strecke [cm]	210 [30 – 600]	450 [82 – 840]
Zeit auf dem offenen Arm [s]	0 [0 – 0]	0 [0 – 0]
Aufrichten	0 [0 – 2]	0 [0 – 6]
<b>Tag 2</b>		
gelaufene Strecke [cm]	315 [120 – 450]	240 [83 – 570]
Zeit auf dem offenen Arm [s]	0 [0 – 0]	0 [0 – 0]
Aufrichten	1 [0 – 4]	1 [0 – 7]
<b>Tag 3</b>		
gelaufene Strecke [cm]	210 [98 – 480]	285 [90 – 450]
Zeit auf dem offenen Arm [s]	0 [0 – 5]	0 [0 – 0]
Aufrichten	2 [0 – 7]	4 [0 – 7]
<b>Tag 5</b>		
gelaufene Strecke	456 ± 64,8	500 ± 53,1
Zeit auf dem offenen Arm [s]	0 [0 – 4,5]	0 [0 – 1]
Aufrichten	7 [0 – 13]	8 [5 – 16]
<b>Tag 7</b>		
gelaufene Strecke [cm]	618 ± 66,8	591 ± 77,4
Zeit auf dem offenen Arm [s]	0 [0 – 12]	0 [0 – 2]
Aufrichten	10 ± 1,2	9,7 ± 1,4

Tab. 7: Ergebnisse des Elevated -Plus-Maze-Tests; Tag 0 - 7, Median [25 - 75 Perzentile]; Statistik: Student's t-Test

<b><u>Elevated-Plus-Maze</u></b>		
	CA/CPR - NaCl 0,9 % n = 31	CA/CPR - Pravastatin n = 31
<b>Tag 9</b>		
gelaufene Strecke [cm]	450 [390 – 570]	510 [435 – 885]
Zeit auf dem offenen Arm [s]	0 [0 – 8]	0 [0 – 5]
Aufrichten	8 [5 – 15]	10,5 [8 – 17]
<b>Tag 11</b>		
gelaufene Strecke	390 [330 – 645]	450 [315 – 690]
Zeit auf dem offenen Arm [s]	0 [0 – 1]	0 [0 – 2]
Aufrichten	11 [6 – 15]	9 [6 – 12]
<b>Tag 14</b>		
gelaufene Strecke [cm]	450 [360 – 540]	570 [360 – 750]
Zeit auf dem offenen Arm [s]	0 [0 – 3]	0 [0 – 8]
Aufrichten	13 ± 2,7	11,4 ± 1,5
<b>Tag 28</b>		
gelaufene Strecke [cm]	420 [292 – 945]	450 [292 – 608]
Zeit auf dem offenen Arm [s]	0 [0 – 0]	0 [0 – 6]
Aufrichten	7 [3 – 14]	9 [4 – 16]

Tab. 8: Ergebnisse des Elevated-Plus-Maze-Tests; Tag 9 - 28, Median [25 - 75 Perzentile]; Statistik: Student's t-Test

Die gelaufene Distanz aller Mäuse verkürzte sich am ersten Tag nach der Intervention stark. Vor allem bei den Tieren der Kontrollgruppe war eine verminderte Aktivität am ersten postoperativen Tag zu erkennen, jedoch ohne statistische Signifikanz (CA/CPR - NaCl 0,9 %: 210 [30 – 600] vs. CA/CPR - Pravastatin: 450 [82 – 840]). In den folgenden Tagen der Studie gab es keine Unterschiede im Laufverhalten der Versuchsgruppen, die am letzten Tag der Untersuchung fast identische Laufdistanzen aufwiesen (CA/CPR - NaCl 0,9 %: 420 [292 – 945] vs. CA/CPR - Pravastatin: 450 [292 - 608]). Auch der Gruppenvergleich, wie oft sich die Mäuse auf ihre Hinterbeine stellten, ließ keine signifikanten Unterschiede zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe erkennen. Ebenso die gemessene Zeit, welche die Mäuse auf dem offenen Steg des Elevated-Plus-Maze-Tests verbrachten, zeigte zwischen den Gruppen keinen eindeutigen Unterschied.

## 4.10. Histologie

Im Lungengewebe gestorbener Tiere beider Gruppen zeigte sich eine Verdickung der Basalmembran, sowie leukozytäre Infiltrate. Das Lebergewebe stellte sich mit vakuolisierten Hepatozyten dar, sowie mit sich in Apoptose befindlichen Zellkernen. Die Gewebeprobe aus Niere und Herz zeigten sich unauffällig (siehe Anhang Abb. 19+20).

In den durchgeführten histologischen Schnitten durch die Hippocampusregion, erkennt man deutlich die Neurodegeneration nach Herz-Kreislaufstillstand im Vergleich der beiden histologischen Präparate vor allem in der CA-1 Region. Nicht ganz so eindrucksvoll aber dennoch bemerkenswert, ließ sich in den CA-2 und CA-3 Regionen eine Reduktion der Neuronendichte nachweisen (siehe Anhang Abb. 21).

Zusammengefasst entstanden deutliche hypoxieinduzierte Veränderungen im Gehirn-, Lungen- und Lebergewebe in beiden Gruppen nach CA/CPR.

In den angefertigten Gewebepreparaten getöteter Tiere, die den gesamten Beobachtungszeitraum von 28 Tagen überlebten, zeigten sich nach Ende des Beobachtungszeitraums keine pathologischen Veränderungen.

## 5. Diskussion

### 5.1. Ergebnisse

#### 5.1.1. Überleben

Nach dem gesamten Beobachtungszeitraum von 28 Tagen weist die CA/CPR - Pravastatingruppe eine signifikant höhere Überlebensrate als die CA/CPR - NaCl 0,9 % - Gruppe auf. In den ersten 4 Tagen der Postreanimationsphase starben in den beiden Gruppen fast identisch viele Tiere. Das Versterben dieser Tiere kann auf die Ischämie durch den CA und der anschließenden CPR zurückgeführt werden. Das darauffolgende Zeitintervall ist für die Ergebnisinterpretation der vorliegenden Studie das eigentlich Wichtige. Ab dem 4. Tag entstand eine deutliche Divergenz zwischen den beiden Versuchsgruppen. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe, in welcher 7 Tiere verstarben, starb in der CA/CPR - Pravastatingruppe nur noch 1 Tier (CA/CPR - Pravastatin: 3 % vs. CA/CPR - NaCl 0,9 %: 23 %; \* $p < 0,05$ ). Es kann davon ausgegangen werden, dass der protektive Effekt des Pravastatins der Grund für diesen signifikanten Unterschied der beiden Überlebenskurven ist. Weiterhin liegt der Schluss nahe, dass der protektive Effekt des Pravastatins nicht sofort, sondern mit einer Latenz auftritt. Somit ist ein nicht gemessener oder nicht dargestellter positiver Effekt auf z.B. die Hämodynamik als Ursache für eine initiale bessere Phase unwahrscheinlich.

#### 5.1.2. Körpergewicht

Da das Körpergewicht tageszeitlichen Schwankungen unterworfen ist, wurde die Gewichtsmessung jeden Tag zur gleichen Zeit durchgeführt. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Gewichtsmessung durch die zirkadiane Rhythmik des Gewichtverlaufs verfälscht wurde. Ist der AZ der Tiere beeinträchtigt fressen und trinken sie weniger, was zur Gewichtsreduktion führt. Demnach korrelieren das Gewicht und der Allgemeinzustand der Tiere. Im Hinblick auf das höhere Gewicht der CA/CPR - Pravastatingruppe in der frühen Postreanimationsphase kann nun postuliert werden, dass mit Pravastatin behandelte Versuchstiere schneller regenerieren als jene Tiere, die nur Trägerlösung appliziert bekommen haben.

Nach 28 Tagen lagen die Tiere der CA/CPR - Pravastatingruppe noch unterhalb ihres Ausgangsgewichts, wohingegen die Kontrollgruppe schon mehr als 100 % erreicht hatte. Bei Betrachtung der Ergebnisse aus den Vorversuchen (Abb.12 und Abb.14) zeigt sich, dass die Therapie mit Pravastatin eine Reduktion des Körpergewichts zur Folge hat [39]. Dies lässt

den Schluss zu, dass die Wirkung der Statine wahrscheinlich für das niedrige Gewicht am Tag 28 verantwortlich ist.

### 5.1.3. Neuroscore und Allgemeinzustand

Da die Bederson-Kriterien genau definiert und gut anwendbar sind, kann davon ausgegangen werden, dass der Neuroscore den Zustand der Maus annähernd genau widerspiegelt. Des Weiteren nahm ein verblindeter Untersucher die Werte auf, was eine zusätzliche Fehlerquelle ausschloss. Allerdings ist die Diskriminierung dezenter Unterschiede bei dieser Einschätzung sehr schwer und womöglich kein geeignetes Hilfsmittel unmittelbar nach der Reanimation. Die Ergebnisse zeigen, dass die CA/CPR - Pravastatingruppe bis zum 4. postoperativen Tag im Durchschnitt höhere Neuroscore Werte aufwies als die Kontrollgruppe. Die schnellere neuronale Erholung der mit Pravastatin behandelten Tiere war bis zum 5. Tag zu beobachten. Eine Erklärung dafür ist, dass Pravastatin nicht nur das Überleben der Tiere verbessert, sondern auch die akut schädigenden Mechanismen inhibiert und somit weniger neuronales Gewebe zerstört wird.

Im Vergleich zum „Neuroscoring“ ist der Einfluss des Bewerbers bei der Erhebung des Allgemeinzustands deutlich höher, da die Grenzen nicht starr definiert sind. Durch Verblindung und eine große Anzahl von Versuchstieren konnte der AZ der Tiere als grobe Einschätzung für den Gesundheitszustand der Versuchstiere nach der Intervention gut verwendet werden. Trotz weiterhin kritischer Betrachtungsweise war ersichtlich, dass vom 1. bis zum 4. Tag in beiden Tests ähnliche Ergebnisse erzielt wurden. So zeigten die Tiere der CA/CPR - Pravastatingruppe im Zeitraum kurz nach Reanimation AZ - und Neuroscorewerte, die auf eine schnellere Regenerationsfähigkeit schließen ließen. Ab Tag 7 zeigte sich keine Veränderung des Allgemeinzustands der überlebenden Tiere beider Gruppen. Eine Erklärung könnte sein, dass sich die nicht gestorbenen Tiere beider Gruppen sich fast vollständig erholten.

Ein großer Nachteil bei der Verwendung der beiden Bewertungsmethoden ist, dass nur die überlebenden Tiere untersucht werden konnten, und den toten Versuchstieren kein Wert zugeordnet wurde. Die Konsequenz daraus war, dass sich die CA/CPR - NaCl 0,9 % - Gruppe falsch positiv darstellte. Die erste Einstufung wurde erst 24 Stunden nach CPR durchgeführt, was ein weiterer Kritikpunkt ist. In zukünftigen Untersuchungen sollte eine Änderung des Vorgehens erfolgen und 4, 8, 12 sowie 24 Stunden nach CPR der Neuroscore und der Allgemeinzustand des Versuchstieres erhoben werden.

#### 5.1.4. Rotarod-Test

Am Tag 0 (= Ausgangswert) waren alle Versuchstiere identische Zeiten gelaufen. Auch am ersten postoperativen Tag erzielten alle Tiere ähnliche Ergebnisse. An diesem Punkt der Untersuchung war noch kein Effekt des Pravastatins auf die Regeneration der Versuchstiere darstellbar. Die identischen Ergebnisse im Rotarod-Test kurz nach CA/CPR war eine direkte Folge des Herzstillstands, der globalen Ischämie und der kardiopulmonalen Reanimation. Am dritten Tag nach Reanimation begannen sich die mit Pravastatin behandelten Tiere schneller zu regenerieren als die Kontrollgruppe. Dies konnte bis zum 7. Tag durch die längeren Laufstrecken im Rotarod-Test objektiviert werden und ließ darauf schließen, dass die Eigenschaften des Pravastatins einen frühzeitigen, positiven Effekt auf die globale Regeneration haben. Die genauen Mechanismen müssen noch aufgeklärt werden.

Im Rahmen des Versuchsaufbaus konnte sich ab Tag 7 die Motorik, Ausdauer und Geschicklichkeit aller Tiere, die bis dahin überlebt haben, nicht mehr verbessern und blieben im Durchschnitt auf einem sehr hohen Niveau.

#### 5.1.5. Water-Maze-Test

Um zu vermeiden, dass bereits reanimierte Versuchstiere aufgrund neurologischer und motorischer Defizite im Bassin ertrinken bzw. Wasser aspirieren, wurden Kriterien aufgestellt, die erfüllt sein mussten, bevor ein Versuchstier für den Test wieder zugelassen wurde. Die Zahl der Versuchstiere, die in den jeweiligen Gruppen zum Water-Maze-Test postoperativ zugelassen und ausgewertet werden konnte, betrug in der CA/CPR - Pravastatingruppe 17 Tiere und in der Kontrollgruppe 8. Es gab keine Verluste von Versuchstieren aufgrund von Ertrinken.

Präoperativ und in der ersten postoperativen Phase des Tests zeigten beide Gruppen ähnliche Zeiten. Die wichtigste Frage war, ob die Tiere nach der Reanimation neu konditioniert werden können, also schon Gelerntes vergessen und Neues erlernen können. In diesem Fall stellte die Neukonditionierung die neue Position des rettenden Plateaus dar. Am ersten Tag der Neukonditionierung waren die Zeiten beider Gruppen identisch. An den Folgetagen zeigte die CA/CPR - Pravastatingruppe eine bessere Lernfähigkeit als die Kontrollgruppe, wobei aber auch den Tieren der CA/CPR - NaCl 0,9 % - Gruppe ein Lerneffekt nachgewiesen werden konnte.

Aus der CA/CPR - Pravastatingruppe konnten mehr Tiere zum Water-Maze-Test zugelassen werden und deren Zeiten bis zum Auffinden der Rettungsplattform waren kürzer als jene der Kontrollgruppe. Bei allen Versuchstieren konnte eine progrediente Verbesserung der

Funktionalität hypoxie-sensibler Areale des Gehirns vermutet werden, was sich in den kürzeren Schwimmzeiten im Water-Maze-Tests zeigte [35]. Einen klaren Vorteil der Therapie mit Pravastatin in Bezug auf die Prozesse im Striatum und Hippocampus können aus den gewonnenen Ergebnissen nicht getätigt werden. Jedoch kann man aus den Daten folgern, dass bei den Tieren, die einen solchen anstrengenden Test antreten und komplett absolvieren können, wenig neuronaler Schaden induziert wurde.

#### 5.1.6. Elevated-Plus-Maze-Test

Die Grundüberlegung zum Elevated-Plus-Maze-Test ist die Annahme, dass gesunde, nicht physisch oder psychisch eingeschränkte Tiere, neugieriger sind als Kranke und sich mehr bewegen, eine längere Zeit auf den offenen Armen verbringen und auch öfter vom geschlossenen auf den offenen Arm laufen. Auch das Strecken erfordert mehr Energie als das Herumkrabbeln auf Vorder- und Hinterlauf.

Der Elevated-Plus-Maze-Test ist, wie im Vorfeld beschrieben, ein etablierter Versuchsaufbau. Im Rahmen der Studie war er jedoch weniger aussagekräftig als erhofft. Der Test ist sehr störanfällig auf Reize von außen wie zum Beispiel Bewegungen des Personals und Geräusche im und außerhalb des Untersuchungszimmers, die das Versuchstier ablenken und einschüchtern. Darüber hinaus ist es möglich, dass der Versuchsaufbau mit nur 4 Armen den Nagetieren nach mehreren aufeinanderfolgenden Testtagen zu monoton wurde und sie daher nach und nach die Motivation verloren, sich in dem beschränkten Bereich zu bewegen und zu strecken.

Eigentlich sollte der Test mögliche Verhaltensänderungen aufzeigen, die Mäuse nach CA/CPR entwickeln [40]. Am ersten Tag der Untersuchung liefen alle Tiere sehr lange Strecken und streckten sich oft entgegen der Wand und häufig über den Rand des offenen Stegs, was als natürliche Neugierde der Nagetiere interpretiert wurde. Im Verlauf der Nachbeobachtung hatten Mäuse beider Gruppen an verschiedenen Tagen, unterschiedliche Laufstrecken als auch unterschiedliche Aufenthaltszeiten auf dem offenen und geschlossenen Steg. Teilweise verbrachte eine Maus am 5. postoperativen Tag 3 Minuten auf dem offenen Steg und am 9. Tag keine einzige Sekunde, was im Widerspruch dazu stand, dass sie zum späteren Zeitpunkt einen höheren Neuroscore aufwies und längere Strecken im Rotarod-Test lief. Somit konnte kein verwertbares Ergebnis erzielt werden.

Aufgrund der beschriebenen Fehler des Tests und Einflüsse, die unvorhersehbar auf ihn einwirkten, können die beiden Versuchsgruppen anhand der Ergebnisse des Elevated-Plus-Maze-Tests nicht aussagekräftig verglichen werden. Möglicherweise ist dieser Test kein geeignetes Testverfahren für Reanimationsstudien.

Ein Ansatz zur Verbesserung der Aussagekraft des Tests wäre, den Test nicht so oft wie im vorliegenden Versuch durchzuführen. So würde möglicherweise die angeborene Neugier der Nagetiere auf neue und „spannende“ Versuche bestehen bleiben. Auch sollte das Versuchskreuz in einem Raum aufgebaut werden, in welchem es keinerlei Ablenkung für die Maus gibt, was leider in dem hier vorliegenden Versuch aufgrund der Räumlichkeiten des Instituts nicht realisiert werden konnte.

#### 5.1.7. MRT

Die Untersuchung mittels Magnetresonanztomographen wurde im Institut für Neuroradiologie in Greifswald durchgeführt. Das Team versprach sich von der Untersuchung Bilder wie bei einem menschlichen Gehirn, in welchem ischämische Areale leicht darstellbar sind: parenchymale ödematöse Veränderungen, verschmälerte Ventrikel, hyperintense Strukturen in Arealen, die auch peripher motorische und sensible Störungen erklären [41]. Im Gegensatz zu den post mortem angefertigten histologischen Schnitten konnten lebende Versuchstiere sequenziell untersucht werden.

Da in mehreren Mäusehirnen pathologisch veränderte Areale gefunden wurden, lässt dies den Schluss zu, dass bei Mäusen ähnliche Abläufe stattfinden wie beim Menschen (siehe Anhang Abb. 22). Allerdings konnten nicht bei allen untersuchten Tieren solch aussagekräftigen Pathologien festgestellt werden, obwohl sie auch motorische Defizite aufwiesen. Die Gründe hierfür können vielfältig sein. Möglicherweise war die Zeit zwischen Auftreten des Defizits und dem Tod der Maus so kurz, dass eine intracerebrale Veränderung im 7 Tesla MRT noch nicht sichtbar war. Eine andere Erklärung ist, dass die motorischen Defizite nicht cerebralen Ursprungs waren, sondern direkt durch die Ischämie des Bewegungsapparats verursacht wurden (z.B. spinale Ischämie mit konsekutiver Paraparese der Hinterläufe).

#### 5.1.8. Histologie

Wie beschrieben, zeigten sich bei einigen wenigen ausgewählten Tieren im Leber-, Nieren- und Lungengewebe Veränderungen, die auf eine Ischämie zurückzuführen sind. Aufgrund der multiplen Gewebsuntergänge innerhalb eines Organismus war es beim Eröffnen und der Begutachtung des Tierkörpers meist nicht möglich ein einzelnes Organ für das frühzeitige Versterben eines Versuchstieres verantwortlich zu machen.

In den angefertigten Präparaten der hippocampalen Region der Mäusehirne ließen sich, wie gezeigt, Veränderungen nachweisen, welche als neuronale Gewebsuntergänge nach Ischämie zu interpretieren sind. Wie dargestellt, zeigte sich die CA-1 Region des Hippocampus verschmälert, was auf einen ischämieinduzierten Neuronenuntergang hindeutet [42]. Somit ist histologisch gesichert, dass der Herz-Kreislaufstillstand und die Reanimation zu Zelluntergängen in der Region führen können. Diese sind jedoch nur bei einigen Tieren deutlich erkennbar gewesen. Die Unterschiede im Water-Maze-Test sind wohl eher Ausdruck für die bessere globale Erholung der mit Pravastatin behandelten Tiere [35, 36].

## **5.2. Kleintiermodell zur kardiopulmonalen Reanimation**

Die Pathophysiologie der Postreanimationserkrankung und die damit verbundenen Reaktionen und Interaktionen in den Geweben und Organen sind hochkomplex. Es interagieren das Immunsystem, das neuroendokrine System sowie das Gerinnungssystem miteinander. Daher können Aussagen über das globale Behandlungsergebnis nicht im Rahmen von in-vitro-, oder Einzelorganuntersuchungen getroffen werden. Die einzig zufriedenstellende Lösung scheint die Untersuchung eines ganzen Individuums zu sein. Das Kleintiermodell mit Ratte oder Maus ist in der Grundlagenforschung ein sehr wichtiges Instrument und im Rahmen der Reanimationsforschung fest etabliert. Im Gegensatz zu Großtieren wie Schwein oder Hund, haben Mäuse einen sehr schnellen Vermehrungszyklus, sind kosten- und platzgünstig zu halten und eignen sich somit sehr gut zur Zucht für experimentelle Studien.

Während der postinterventionellen Beobachtungsphase werden im vorgestellten Modell die Versuchstiere neurokognitiven Tests unterzogen. Mit deren Hilfe kann die Regeneration in verschiedenen Bereichen, wie z.B. dem Allgemeinzustand, der Ausdauer und der Kognition quantifiziert werden. Durch die Verwendung dieser Methoden werden die erzielten Ergebnisse dieser Untersuchung mit anderen Studien vergleichbar. Neben den etablierten neurophysiologischen Tests für Nagetiere gibt es auch eine Vielzahl kommerziell erhältlicher Sets zur Kleintierlabordiagnostik. Durch gentechnische Einflussnahme der Züchter stehen heutzutage eine große Vielfalt an Nagetieren zur Verfügung. Speziell gezüchtete Knock-out- oder rezeptor-depletierte Versuchstiere finden vielfach Verwendung in der heutigen Forschung. Sie eröffnen die Möglichkeit zur Untersuchung sowohl verschiedener therapeutischer Interventionen als auch genetischer Einflüsse.

Wichtig für die Aussagekraft der Versuche ist die Vergleichbarkeit zwischen Maus und Mensch. Das Mäuseherz weist eine ähnliche Anatomie wie die des Menschen auf. Es besitzt

Vorhöfe und Ventrikel und der MAP (Mittlerer arterieller Druck) liegt bei narkotisierten Mäusen zwischen 70 mmHg und 90 mmHg vergleichbar mit dem des Menschen [29]. Das Herz-Kreislaufsystem der Maus ist in Aufbau und Funktion gut mit dem des Menschen zu vergleichen, weshalb ähnliche Reaktionen auf einen Herz-Kreislaufstillstand mit anschließender Reanimation zu erwarten sind [43]. Da die Postreanimationserkrankung nach ROSC nur ungenügend auf zellulärer und molekularbiologischer Ebene erfasst werden kann, muss im Rahmen der Reanimationsforschung auch auf ein lebendes Versuchsobjekt zurückgegriffen werden.

#### 5.2.1. Geschlecht des Versuchstiers

Es wurden ausschließlich weibliche Tiere für die Reanimationsversuche verwendet. In vorangegangenen Studien mit männlichen Mäusen des C57BL/6J Stammes (Charles River, Deutschland) ergaben sich schwerwiegende Probleme, welche die Forschungsgruppe dazu zwang die weiteren Versuche mit weiblichen Versuchstieren fortzuführen. In Pilotversuchen zeigte der Großteil der männlichen Versuchstiere ab dem 4. bis zum 10. postoperativen Tag deutliche Anzeichen einer obstruktiven Harnblasenentleerungsstörung mit postrenalem Nierenversagen (siehe Anhang Abb. 23). Im Rahmen der Zustandsverschlechterung der Tiere konnten die gesammelten Ergebnisse zur neuronalen Regeneration nicht ausgewertet werden. Da es nicht möglich war die genaue Problemursache zu eliminieren, ein verkürzter Beobachtungszeitraum jedoch nicht erwünscht war, wurde auf die Verwendung weiblicher Tiere zurückgegriffen. Bei der Entscheidung weibliche Versuchstiere zu verwenden, wurden mögliche positive Einflüsse des Östrogens in Kauf genommen. Dieses wirkt sich nachweislich positiv auf die ischämieinduzierten Apoptosevorgänge im Hippocampus aus [44]. Gibson et al. beschrieben 2004, dass eine Behandlung mit Progesteron das Auftreten und die Ausdehnung von postischämischen Hirnödemen reduziert [45]. Weiterhin wird Progesteron in der Literatur als Radikalfänger beschrieben, wodurch weniger peroxidativer Gewebsschaden verursacht wird [46].

Um die Versuchsgruppen trotz dieser möglichen zyklusbedingten positiven Effekte auf das Überleben und die kognitiven Fähigkeiten der weiblichen Maus vergleichen zu können, wurde eine große Versuchstierzahl verwendet. Somit ist es statistisch möglich, aufgrund der kurzen Zyklusdauer der weiblichen Maus (4 Tage) und der an verschiedensten Zeitpunkten des Zyklus stattfindenden Intervention, den möglichen hormonellen Einfluss zu minimieren.

### 5.2.2. Größe, Alter und Gewicht des Versuchstiers

Im Mittel erreichten die Tiere nach einer Lebenszeit von 12 - 16 Wochen ein Körpergewicht von 20 - 24g am Tag 0 der Untersuchung. Tiere, welche das erforderliche Gewicht unter- oder überschritten, waren nicht geeignet, da die Präparation und Beatmung durch abnorm verteiltes Fettgewebe erschwert wurde, und keine gleichbleibenden Versuchsbedingungen erreicht werden konnten. Da es sich bei den Versuchstieren um junge, vitale Mäuse ohne wesentliche Organerkrankungen handelte, ist die Vergleichbarkeit mit einer Reanimations-situation beim vorerkrankten Menschen reduziert (Arteriosklerose, KHK etc.).

### 5.2.3. Gruppengröße

Vor der Aufnahme der Versuche wurde eine statistische Poweranalyse durchgeführt. Mit der zuvor festgelegten Gruppengröße von jeweils  $n = 35$  Mäusen wurde der Versuch im Vergleich zu anderen Reanimationsstudien groß geplant [31, 47, 48]. Ziel dieser erheblichen Gruppengrößen war es, dass möglichst viele Störfaktoren beseitigt und Abweichungen in den Analysen ausgeglichen werden konnten. In die finale Auswertung gelangten 31 Tiere pro Gruppe aufgrund der Ausschlusskriterien, die angewandt wurden.

## 5.3. Material und Methoden

### 5.3.1. Narkose und Beatmung

Das in dieser Untersuchung durchgeführte Anästhesieverfahren ist etabliert und üblich bei Nagetierexperimenten. Aufgrund des protektiven Effekts volatiler Anästhetika und der nicht auszuschließenden Beeinflussung auf das Untersuchungsergebnis, wurde auf diese Art der Anästhesie während der Intervention verzichtet [49]. Die Narkose, bestehend aus Ketamin und Xylazin, wurde zu Beginn der Intervention i.p. eingeleitet. Die Intubation der Tiere ermöglichte die Kontrolle der Atemfrequenz und des Atemzugvolumens, um somit physiologische  $pO_2$ - und  $pCO_2$ -Werte in der Lunge der Tiere zu schaffen und aufrechtzuhalten, die sich bei Spontanatmung unter Narkose verändern würden [50]. Um eine möglichst reale Ausgangssituation für die Reanimation zu schaffen, wurde das Versuchstier nach Narkoseeinleitung und Intubation zunächst mit Raumluft ( $F_{iO_2}$ : 0,21) beatmet. Eine höhere präinterventionelle Sauerstoffkonzentration würde einer Präoxygenierung gleichkommen und hätte somit eine Verfälschung der Hypoxiezeit zur Folge. In anderen Reanimationsmodellen wurde über den gesamten Zeitraum des Versuches eine  $F_{iO_2}$  über 0,21 verwendet, teilweise sogar 100 %iger Sauerstoff insuffliert

(Zusammenfassung siehe Anhang Tab. 9). Um möglichst kongruent mit den Vorgaben der American Heart Association zu arbeiten, wurde in der vorliegenden Arbeit erst nach 10 minütigem CA und zu Beginn der CPR mit Einschalten des Beatmungsgeräts eine  $F_{iO_2}$  von 1,0 verwendet.

### 5.3.2. Blutdruckmessung

Bei Nagetieren wie auch beim Menschen kann die Blutdruckmessung invasiv, mittels arteriellem Katheter oder nichtinvasiv mittels Blutdruckmanschette erfolgen. In dieser Untersuchung wurde die nichtinvasive Messmethode mittels pneumatischer Manschette verwendet. Der zeitliche Aufwand und das Trauma einer Katheterinstallation stand in keiner Relation zur möglicherweise genaueren Blutdruckerfassung mittels invasiver Methode [54].

Bereits vor Beginn dieser Untersuchung wurde durch die Arbeitsgruppe eine Versuchsreihe durchgeführt, in welcher der Einfluss einer invasiven Blutdruckmessung mittels eines Millar-Tip-Katheters gegenüber einer nicht invasiven tail-cuff Blutdruckmessung auf das Überleben der Tiere getestet wurde. Die Länge des Kreislaufstillstandes betrug 3 Minuten. Dabei zeigte sich, dass schon die Einlage des Millar-Tip-Katheters in den arteriellen Kreislauf der Maus das Überleben bereits 7 Tage nach Reanimation deutlich verschlechtert (siehe Anhang Abb. 24). Ein weiteres Problem ist, dass es durch die Punktion und Ligatur des arteriellen Gefäßes nach Entfernung des Katheters zu einer zusätzlichen fokalen Ischämie kommen kann. Diese Ischämie und deren Folgen kann in beiden Gruppen die Ergebnisse der motorischen und neurologischen Tests verfälschen.

### 5.3.3. Temperaturmessung

Nach Lagerung der narkotisierten Maus konnte eine Temperatursonde rektal eingebracht werden. Somit war es möglich, die Körperkerntemperatur während des gesamten Interventionszeitraums aufzuzeichnen. Die Sonde war mit einer als Lagerungstisch dienenden Wärmeplatte rückgekoppelt, wodurch die Körpertemperatur des Versuchstiers konstant bei 36 °C eingestellt werden konnte [55]. Im durchgeführten Versuch wurde eine durchgängige Normothermie der Versuchstiere aufrechterhalten, aufgrund der protektiven Auswirkungen der Hypothermie durch extra- oder intrakorporale Kühlung bei Herz-Kreislaufstillstand [6, 56]. Ähnlich genaue Möglichkeiten der Temperaturmessung wurden aufgrund deren Invasivität und den damit verbundenen Risiken, nicht in Betracht gezogen. Im Gegensatz zu Großtieren oder auch Menschen, werden Nagetiere nach CA/CPR hypotherm [57–60]. Die Hypothermie bei Nagern ist eine Erklärung für deren gutes Outcome

nach längerem Herz-Kreislaufstillstand. Da die Tiere alle unter den gleichen räumlichen Bedingungen gehalten wurden, würde sich eine Verminderung der Körpertemperatur bei allen Tieren gleich stark einstellen und kann als systemischer Fehler gewertet werden. Die Ergebnisse der Gruppen bleiben daher vergleichbar.

Nach Beendigung der Reanimation und Extubation des Tieres wurde auch die Temperatursonde entfernt, da die Temperaturmessung nicht mehr möglich war ohne das Tier einem erheblichen Stress in der Aufwachphase auszusetzen. Das Tier wurde in ein 30 °C warmes Terrarium gebracht und die ersten 24 Stunden nach Reanimation mit einer Wärmebildkamera überwacht. Somit konnte die Körperkerntemperatur von 36 °C aufrechterhalten werden (siehe Anhang Abb. 18).

#### 5.3.4. Zentraler Venenkatheter

Nach i.p.-Injektion der Narkosemedikamente und der anschließenden Lagerung wurde begonnen einen ZVK in der rechten *Vena jugularis externa* zu installieren. Somit wurde sichergestellt, dass während des gesamten Reanimationsversuchs ein i.v.-Zugang zur Verfügung stand, über welchen die Substanzapplikation durchgeführt werden konnte. Dies geschieht ohne größeren Blutverlust und ist aufgrund des nur ca. 8 mm langen Hautschnitts und einer durchschnittlichen Installationsdauer von 10 Minuten minimalinvasiv. In vielen vorangegangenen Studien wurden Medikamente über den Magendarmtrakt appliziert ohne zu kontrollieren, wie viel Prozent des Wirkstoffs wirklich resorbiert, respektive eliminiert wurde. Mit der Installation eines Venenkatheters hat man die Sicherheit, dass 100 % der applizierten Substanz in den Blutkreislauf gelangt.

Im Anschluss an die CPR wurde der Katheter explantiert und das Gefäß ligiert. Die nach Explantation mit Nahtmaterial versorgte Wunde beeinträchtigte die Versuchstiere in den Folgetagen nicht.

#### 5.3.5. Kardiale Asystolie und Kardiopulmonale Reanimation

Wie auch in kardiochirurgischen Operationen am Menschen, erfolgte die Induktion der kardialen Asystolie durch Kaliumchlorid. Die kardioplegische Lösung wurde über den ZVK appliziert, welche ca. 10 Sekunden später zum Herzstillstand führte. Die Kaliumzufuhr selbst hatte jedoch keinen weiteren Einfluss auf das Outcome der Tiere, wie man in vorangegangenen Studien feststellen konnte. Etwa 10 Minuten nach ROSC befand sich keine erhöhte Konzentration von Kalium mehr im Blutkreislauf [28]. Da die neurologische

Regeneration im Fokus der Untersuchung stand, stellte die Kardioprotektion durch Kaliumchlorid keinen Fehler im Versuchsaufbau dar. Eine alternative Methode wäre die Induktion von Kammerflimmern, was eher der präklinischen Situation vor CPR entspricht. Dies konnte nicht realisiert werden, da die technischen Voraussetzungen fehlten. Weiterhin wurde in diversen Studien bewiesen, dass Kammerflimmern bei Nagetieren häufig spontan in einen Sinusrhythmus konvertiert.

Wie in den Abschnitten zuvor beschrieben, wurde nach 10-minütigem Herzstillstand mit der CPR begonnen. In vorangegangenen Untersuchungen wurde die Dauer der Asystolien variiert (siehe Anhang Tab. 9). Es ist davon auszugehen, dass der Schaden den die einzelnen nicht versorgten Organe davontragen umso größer ist, je länger die Asystolie und somit die globale Ischämie ist. Aufgrund der im Verlauf des gesamten Reanimationsprojekts verbesserten Operationstechnik und der daraus resultierenden verkürzten Eingriffszeiten, konnte die CA - Zeit auf 10 Minuten verlängert werden, um eine 29 %ige Sterberate in der Kontrollgruppe zu erreichen. Die Ischämie ist somit genügend lang, um einen möglichen Nutzen von Pravastatin im vorliegenden Versuch untersuchen zu können.

#### 5.3.6. Nachbeobachtungszeitraum

Die vorliegende Untersuchung war explizit als Langzeituntersuchung angelegt worden, um die längerfristigen Auswirkungen des I/R-Schadens genauer beurteilen zu können. Da Umbauvorgänge in neuronalen Gewebe langsam voranschreiten und sich auch noch Monate nach einer Ischämie Zellen in der Regeneration befinden, ist es wichtig, nicht nur die Akutsituation nach CA/CPR auszuwerten. Die meisten Arbeitsgruppen wählten Nachbeobachtungszeiträume von 24 Stunden bis 7 Tage (siehe Anhang Tab. 9). Da Patienten nach überlebtem CA/CPR mehr als 7 Tage unter ärztlicher Kontrolle verbleiben, und sich die Auswirkungen des Reperfusionsschaden auch noch weit länger als 7 Tage zeigen, ist es wichtig, die Beobachtungszeitspanne so lange wie möglich zu wählen. Im Gegensatz zu dem hier durchgeführten Modell, hätte man innerhalb einer kürzer angelegten Beobachtungsphase die 8 Tiere, welche nach dem 7. Tag verstarben, nicht erfasst. Dies unterstreicht die Wichtigkeit einer langen postinterventionellen Beobachtungsphase.

## 5.4. Mögliche Mechanismen

Im Vorfeld dieser Untersuchung wurde von den meisten Arbeitsgruppen, welche sich mit globaler Ischämie befassten, dargestellt, dass Statine neben ihrer Funktion als Cholesterinsyntheseinhibitoren auch andere, sogenannte pleiotrope Eigenschaften besitzen. Die Ursache hierfür sind vermutlich die verringerte Synthese von Ras, Ras-ähnlichen Proteinen, RhoA und Rac als Nebenprodukte der Cholesterinbiosynthese [23, 24, 61, 62]. Dies bedeutet für das ischämische Gewebe weniger apoptotische Zellen, verbesserte Gefäßwandprotektion, verminderte Entzündungsreaktion durch Immunmodulation, weniger freie Radikale und vermindertes Auftreten von Thrombosen der Mikrozirkulation [61].

Laboranalysen, um die Mechanismen der Statinwirkung aufzuklären, waren kein Bestandteil dieser Langzeituntersuchung. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Fr. PD Dr. Wagner wurden in-vitro Analysen zur Wirkung von Pravastatin auf Endothelzellen durchgeführt (Matrigel -Angiogenese-Assay; Sphäroid-Assay). Es zeigte sich ein positiver Effekt des Pravastatins auf die Netzbildung von humanen Endothelzellen. Intensive Grundlagenforschung ist zukünftig nötig um sowohl die genauen Prozesse in Endothelien als auch die protektiven Mechanismen der Statine während einer Inflammationsreaktion darzustellen. Diese Arbeit liefert in diese Richtung nur erste Hinweiszeichen.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde speziell die globale funktionell-neurologische Regeneration nach CA/CPR untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung weisen deutlich auf die Notwendigkeit von i.v.-Pravastatin und der Aufdeckung seiner zugrundeliegenden protektiven Mechanismen im Rahmen der Postreanimationserkrankung hin.

## 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von wasserlöslichem Pravastatin auf das Überleben und die funktionell-neurologische Regeneration von Mäusen nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation untersucht. Man ging durch vorbestehende Studien davon aus, dass sich pleiotrope Effekte des hydrophilen HMG-CoA-Reduktaseinhibitors positiv auf die Postreanimationserkrankung des Versuchstiers auswirken könnten. Während des 28-tägigen Versuchs wurden Parameter wie Körpergewicht, Überleben, Allgemeinzustand und Neuroscore der Versuchstiere von einem verblindeten Beobachter aufgezeichnet und ausgewertet. Zur Evaluation von motorischen und kognitiven Fähigkeiten wurden etablierte Testverfahren, wie der Rotarod-Test, der Water-Maze-Test und der Elevated-Plus-Maze-Test hinzugezogen. Als herausragendes und aussagekräftigstes Testkriterium wurde die Überlebenskurve bewertet, in welcher sich anschaulich das signifikant bessere Überleben der Pravastatingruppe darstellen ließ (Pravastatin: 54,8% vs. NaCl: 29%; \* $p < 0,05$ ) und somit die gestellte Hypothese beweist. Auch im Rahmen der Gewichtsmessung und der neurologisch-kognitiven Tests wurden Unterschiede zu Gunsten der CA/CPR - Pravastatingruppe herausgefunden.

Wir folgern somit aus den gewonnen Daten, dass die Pravastatingabe nach CA/CPR eine Verbesserung des Überlebens und der neurologisch-kognitiven Fähigkeiten bewirkt. Im Hinblick auf den klinischen Alltag könnte das multimodale Therapiekonzept nach CA/CPR um die Pravastatingabe erweitert werden.

## 7. Thesen

1. Pravastatin verbessert die Überlebensrate und die funktionell-neurologische Regeneration von Mäusen nach CA/CPR.
2. Im Gegensatz zu den cholesterinsenkenden Effekten haben die pleiotropen Effekte des Pravastatins einen früheren Wirkungseintritt.
3. Tiermodelle sind im Rahmen der Grundlagenforschung zu Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation unabdingbar.
4. Nach Herzstillstand und Reanimation kommt es zu einer systemisch-sterilen Entzündungsreaktion unter Beteiligung des Gerinnungs- und Immunsystems.
5. Weitere Untersuchungen zur Verbesserung der Überlebensrate und der neurologischen Regeneration nach CA/CPR sind notwendig.
6. Um die neurologisch-funktionelle Regeneration nach CA/CPR zu beurteilen sind Langzeitstudien unverzichtbar.
7. Eine intravenöse Formulierung für Statine wäre wünschenswert und sollte entwickelt werden.
8. Enterale Medikamentenapplikation nach CA/CPR ist im Mausmodell aufgrund auftretender Magendarmatonie ungeeignet.
9. Männliche C57BL/6J Mäuse scheinen im Rahmen von Langzeituntersuchungen zur Postreanimationserkrankung ungeeignet zu sein.
10. Weitere Untersuchungen sind notwendig um die genauen Mechanismen der pleiotropen Effekte von Pravastatin aufzudecken.

## 8. Anhang

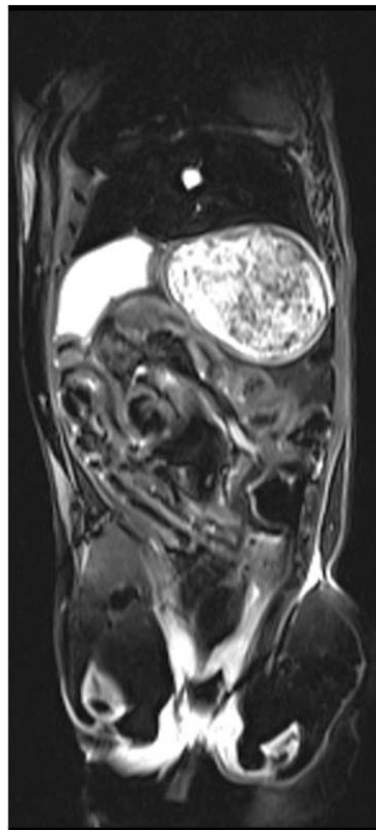
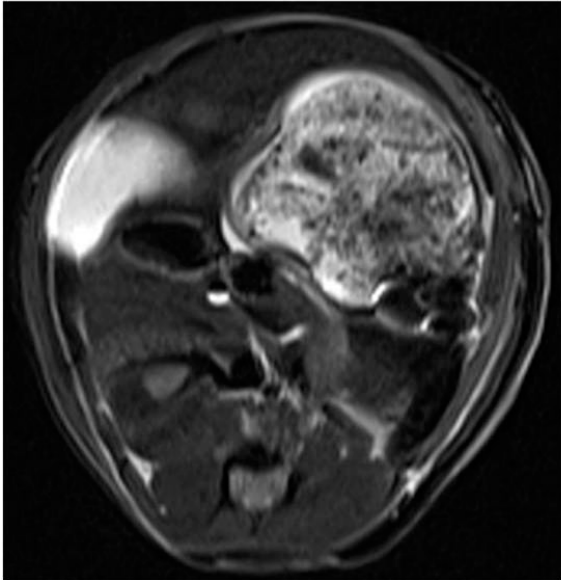


Abb. 17: Gefüllter Magen bei einer Maus nach CA/CPR. Deutlich zu erkennende gastrointestinale Pese mit Magenentleerungsstörung.

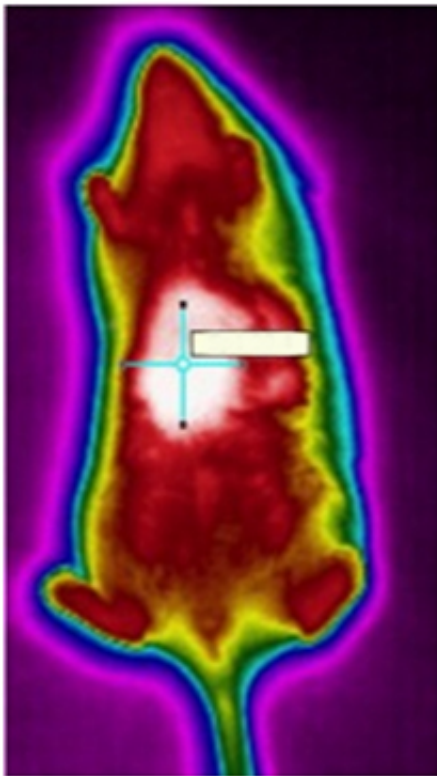


Abb. 18: Kontrolle der Körperkerntemperatur während der Postreanimationsphase mittels Wärmebildkamera

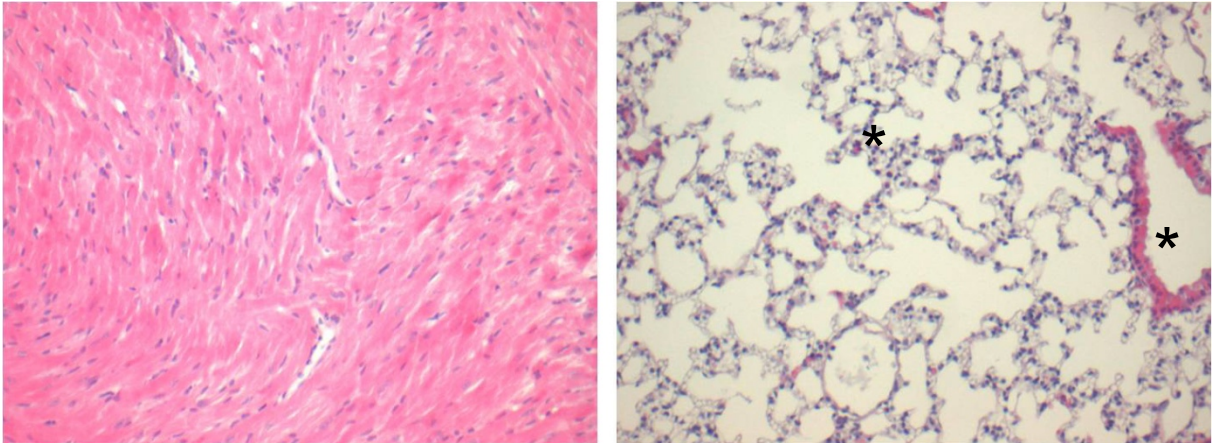


Abb. 19: Histologische Schnitte (HE-Färbung) durch Herzmuskel (links) und Lungengewebe (rechts) einer Maus nach CA/CPR. Deutlich erkennt man im Lungenpräparat die verdickte Basalmembran und die leukozytären Infiltrate.

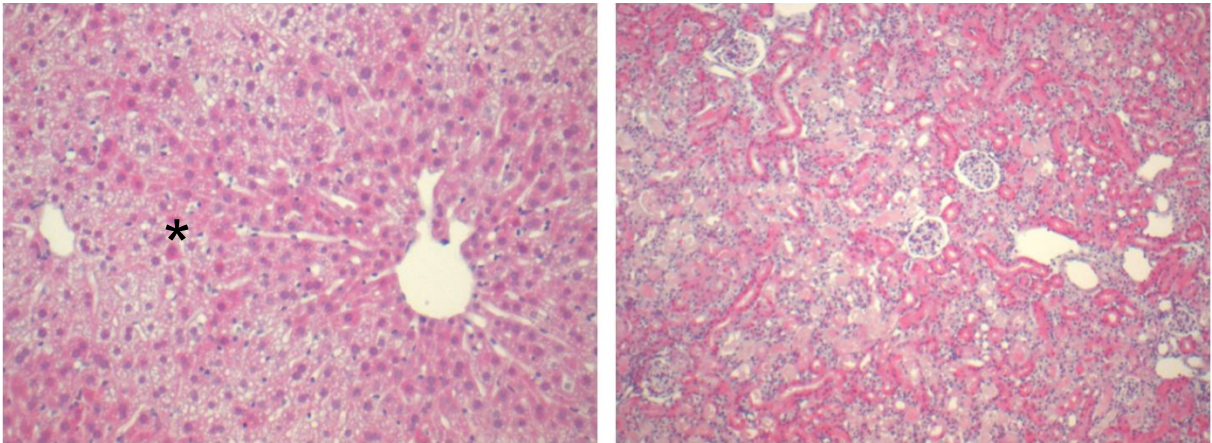


Abb. 20: Histologische Schnitte (HE-Färbung) durch das Leber-(links) und Nierengewebe (rechts) einer Maus nach CA/CPR. Im Rahmen der ischämischen Hepatitis lassen sich im Lebergewebe nekrotische und azidophile Körper (apoptotische Zellen) nachweisen.

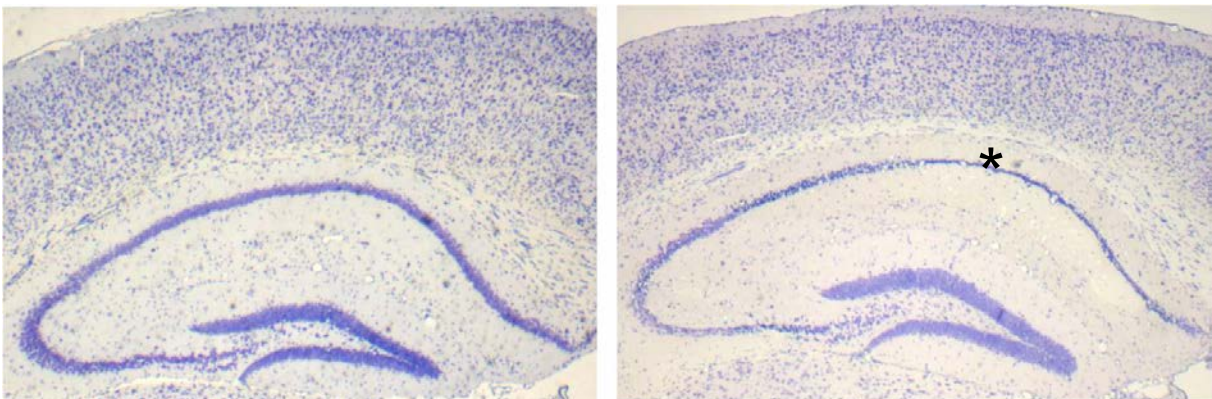


Abb. 21: Histologische Schnitte (Nissl-Färbung) durch die Hippocampusregion einer Maus vor CA/CPR (links) und nach CA/CPR. Deutlich lässt sich in der CA-1 Region (mit \* markiert) die verminderte Neuronendichte nachweisen.

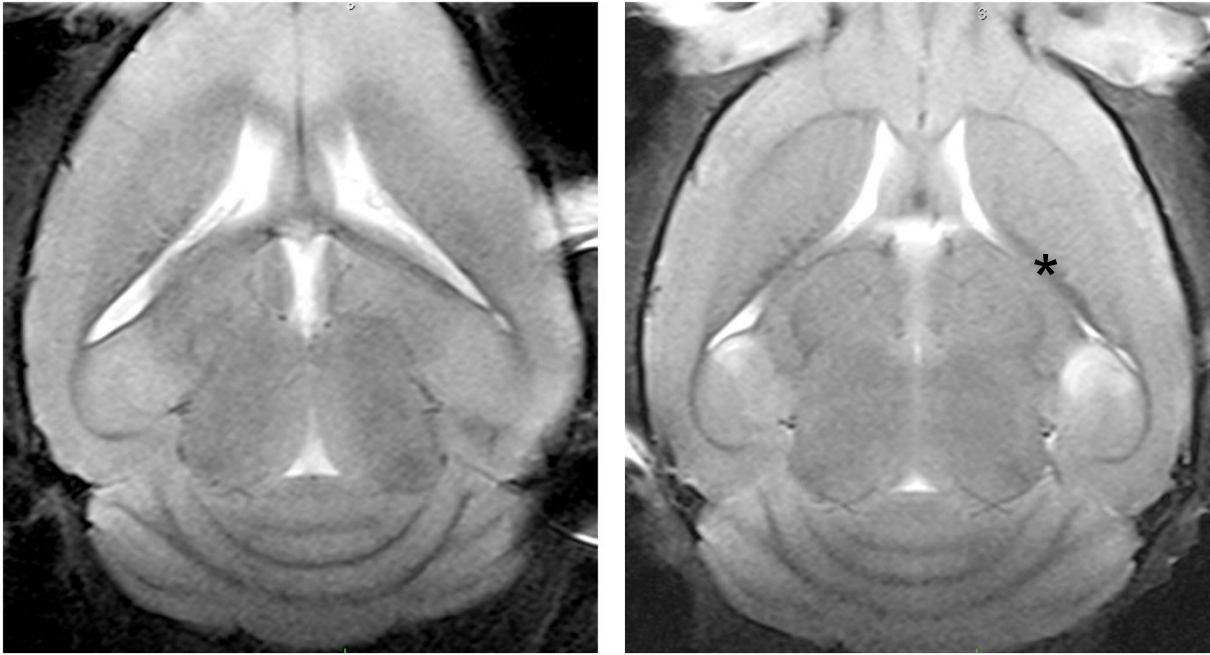
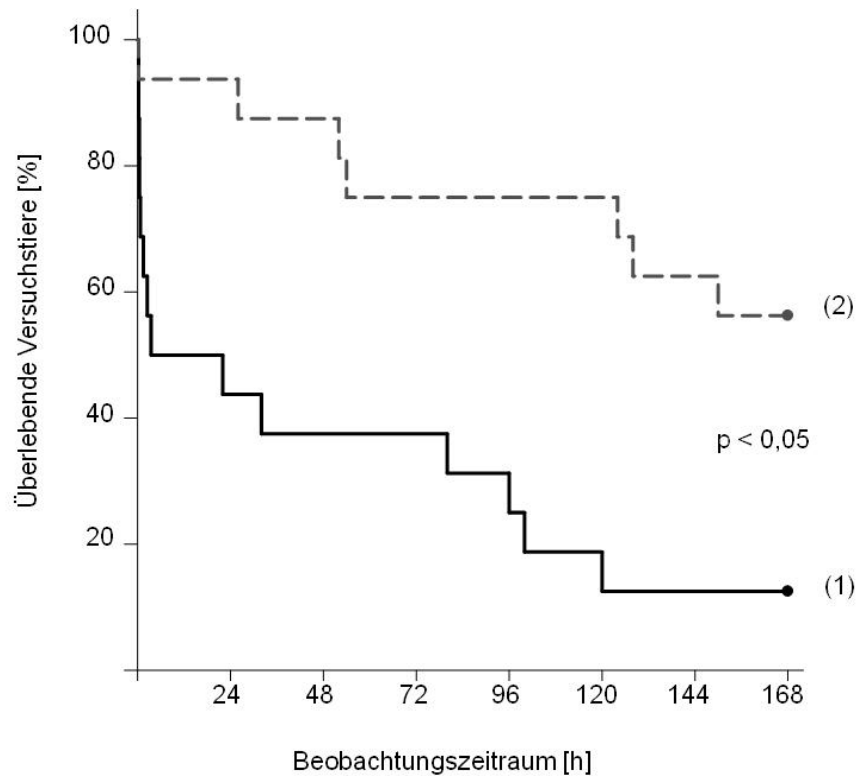


Abb. 22: Schädeluntersuchung im 7 Tesla - MRT; links: gesunde Maus; rechts: Maus nach CA/CPR mit neurologischen Defiziten: deutlich sind die ödematösen Areale und die verschmälerten Ventrikel zu erkennen (mit \* markiert).



Abb. 23: Obstruktive Harnblase nach CA/CPR bei männlichen C57BL/6J Mäusen (Charles River, Deutschland)



(1) invasive Blutdruckmessung; n = 16

(2) nichtinvasive Blutdruckmessung; n = 16

Abb. 24: Vergleich invasiver und nichtinvasiver Blutdruckmessung nach 3 minütigem CA und CPR

<b><u>Reanimationsmodelle</u></b>			
<b>Autor</b>	<b>Zeit CA</b>	<b>F<sub>i</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Nachbeobachtung</b>
Abella et. al [31]	8 min	1.0	72 Stunden
Böttiger et. al [48]	5 min	0.3	7 Tage
Dezfulian et. al [51]	12 min	0.5	24 Stunden
Menzebach et. al [28]	3 min	0.4	72 Stunden
Nakano et. al [52]	10 min	1.0	3 Tage
Neigh et. al [37]	8 min	1.0	5 Tage
Norman et. al [53]	8 min	-	7 Tage

Tab. 9: Vergleich verschiedener Reanimationsmodelle

## **9. Erklärung an Eides statt**

„Ich, Steffen Wagner, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Pravastatin verbessert die Überlebensrate und die funktionell-neurologische Regeneration von Mäusen nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Zürich, den 20.01.2016

Steffen Wagner

## **11. Danksagung**

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Jan-Patrick Roesner für die Überlassung des Themas und die Unterstützung, die er mir zukommen ließ.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Stefan Bergt der durch seine intensive Arbeit am IEC und an dieser Studie meine Dissertation ermöglichte. Er stand mir zu jeder Zeit mit konstruktiver Kritik zur Seite und war immer und zu jeder Zeit ein sehr guter Betreuer. Gleichzeitig bedanke ich mich bei Frau Dr. Andrea Grub, ohne deren Arbeit diese Studie nicht möglich gewesen wäre. Vielen Dank auch an Frau Prof. Dr. Brigitte Vollmar für die Überlassung der Räumlichkeiten am IEC.

Der größte Dank geht an meine Familie und Freunde, welche mir in den letzten Jahren zur Seite standen.

## 12. Literaturangaben

- 1 Schneider A, Popp E, Böttiger BW: Postreanimationstherapie: Therapiekonzepte und Prognosestellung. *Anästhesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie AINS* 2007;42:408–14.
- 2 Cooper JA, Cooper JD, Cooper JM: Cardiopulmonary resuscitation: history, current practice, and future direction. *Circulation* 2006;114:2839–49.
- 3 Böttiger BW, Grabner C, Bauer H, Bode C, Weber T, Motsch J, Martin E: Long term outcome after out-of-hospital cardiac arrest with physician staffed emergency medical services: the Utstein style applied to a midsized urban/suburban area. *Heart (British Cardiac Society)* 1999;82:674–9.
- 4 Sasson C, Rogers, Mary A M, Dahl J, Kellermann AL: Predictors of survival from out-of-hospital cardiac arrest: a systematic review and meta-analysis. *Circulation. Cardiovascular quality and outcomes* 2010;3:63–81.
- 5 Laver S, Farrow C, Turner D, Nolan J: Mode of death after admission to an intensive care unit following cardiac arrest. *Intensive care medicine* 2004;30:2126–8.
- 6 Hazinski MF, Nolan JP, Billi JE, Böttiger BW, Bossaert L, de Caen, Allan R, Deakin CD, Drajer S, Eigel B, Hickey RW, Jacobs I, Kleinman ME, Kloeck W, Koster RW, Lim SH, Mancini ME, Montgomery WH, Morley PT, Morrison LJ, Nadkarni VM, O'Connor RE, Okada K, Perlman JM, Sayre MR, Shuster M, Soar J, Sunde K, Travers AH, Wyllie J, Zideman D: Part 1: Executive summary: 2010 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science With Treatment Recommendations. *Circulation* 2010;122:S250-75.
- 7 Perkins GD, Jacobs IG, Nadkarni VM, Berg RA, Bhanji F, Biarent D, Bossaert LL, Brett SJ, Chamberlain D, de Caen, Allan R, Deakin CD, Finn JC, Gräsner J, Hazinski MF, Iwami T, Koster RW, Lim SH, Ma MH, McNally BF, Morley PT, Morrison LJ, Monsieurs KG, Montgomery W, Nichol G, Okada K, Ong, Marcus Eng Hock, Travers AH, Nolan JP: Cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation outcome reports: Update of the Utstein resuscitation registry templates for out-of-hospital cardiac arrest. *Resuscitation* 2014.
- 8 Adrie C, Laurent I, Monchi M, Cariou A, Dhainaou J, Spaulding C: Postresuscitation disease after cardiac arrest: a sepsis-like syndrome? *Current opinion in critical care* 2004;10:208–12.
- 9 Bianchi ME: DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology* 2007;81:1–5.

- 10 Takeuchi O, Akira S: Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010;140:805–20.
- 11 Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P: Apoptosis in the failing human heart. *The New England journal of medicine* 1997;336:1131–41.
- 12 Homer-Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MJ: Post-ischaemic organ dysfunction: a review. *European journal of vascular and endovascular surgery the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 1997;14:195–203.
- 13 Yang J, Huang C, Yang J, Jiang H, Ding J: Statins attenuate high mobility group box-1 protein induced vascular endothelial activation: A key role for TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Molecular and cellular biochemistry* 2010;345:189–95.
- 14 Carden DL, Granger DN: Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *The Journal of pathology* 2000;190:255–66.
- 15 Rezkalla SH: No-Reflow Phenomenon. *Circulation* 2002;105:656–62.
- 16 Goldstein JL, Brown MS: Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990;343:425–30.
- 17 Gordon T, Kannel WB: Premature mortality from coronary heart disease. The Framingham study. *JAMA* 1971;215:1617–25.
- 18 Löffler G., H.P.E., Petrides P.C.: Stoffwechsel von Phosphoglyceriden, Sphingolipiden und Cholesterin, in *Biochemie und Pathobiochemie*. Heidelberg, Axel Springer Verlag, 2007.
- 19 Mihos CG, Santana O: Pleiotropic effects of the HMG-CoA reductase inhibitors. *International journal of general medicine* 2011;4:261–71.
- 20 Neuvonen PJ, Backman JT, Niemi M: Pharmacokinetic comparison of the potential over-the-counter statins simvastatin, lovastatin, fluvastatin and pravastatin. *Clinical pharmacokinetics* 2008;47:463–74.
- 21 Istvan ES, Deisenhofer J: Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science (New York, N.Y.)* 2001;292:1160–4.
- 22 Takai Y, Sasaki T, Matozaki T: Small GTP-binding proteins. *Physiological reviews* 2001;81:153–208.
- 23 van Aelst L, D'Souza-Schorey C: Rho GTPases and signaling networks. *Genes & development* 1997;11:2295–322.

- 24 Liao JK, Laufs U: Pleiotropic effects of statins. *Annual review of pharmacology and toxicology* 2005;45:89–118.
- 25 Prinz V, Endres M: The acute (cerebro)vascular effects of statins. *Anesthesia and analgesia* 2009;109:572–84.
- 26 Prinz V, Laufs U, Gertz K, Kronenberg G, Balkaya M, Leithner C, Lindauer U, Endres M: Intravenous rosuvastatin for acute stroke treatment: an animal study. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2008;39:433–8.
- 27 Endres M, Laufs U: The medical case for the development of an intravenous statin formulation--beyond ischemic stroke. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)* 2008;25:593–4.
- 28 Menzebach A, Bergt S, Waldthausen P von, Dinu C, Nöldge-Schomburg G, 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 (Augusta, Ga.)* 2010;33:189–96.
- 29 Papadimitriou D, Xanthos T, Dontas I, Lelovas P, Perrea D: The use of mice and rats as animal models for cardiopulmonary resuscitation research. *Laboratory animals* 2008;42:265–76.
- 30 Maier CM, Ahern Kv, Cheng ML, Lee JE, Yenari MA, Steinberg GK: 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; a journal of cerebral circulation* 1998;29:2171–80.
- 31 Abella BS, Zhao D, Alvarado J, Hamann K, Vanden Hoek, Terry L, Becker LB: Intra-arrest cooling improves outcomes in a murine cardiac arrest model. *Circulation* 2004;109:2786–91.
- 32 Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H: Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 1986;17:472–6.
- 33 Hamm RJ, Pike BR, O'Dell DM, Lyeth BG, Jenkins LW: The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 1994;11:187–96.
- 34 Acker T, Acker H: Cellular oxygen sensing need in CNS function: physiological and pathological implications. *The Journal of experimental biology* 2004;207:3171–88.

- 35 Gilbert TH, McNamara RK, Corcoran ME: Kindling of hippocampal field CA1 impairs spatial learning and retention in the Morris water maze. *Behav Brain Res* 1996;82:57–66.
- 36 Morris R: Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984;11:47–60.
- 37 Neigh GN, Glasper ER, Kofler J, Traystman RJ, Mervis RF, Bachstetter A, DeVries AC: Cardiac arrest with cardiopulmonary resuscitation reduces dendritic spine density in CA1 pyramidal cells and selectively alters acquisition of spatial memory. *Eur J Neurosci* 2004;20:1865–72.
- 38 Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M: Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985;14:149–67.
- 39 Faheem M, Qureshi S, Ali J, Hameed, Zahoor, Abbas F, Gul AM, Hafizullah M: Does BMI affect cholesterol, sugar, and blood pressure in general population? *J Ayub Med Coll Abbottabad* 2010;22:74–7.
- 40 Neigh GN, Karelina K, Glasper ER, Bowers, Stephanie L K, Zhang N, Popovich PG, DeVries AC: Anxiety after cardiac arrest/cardiopulmonary resuscitation: exacerbated by stress and prevented by minocycline. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2009;40:3601–7.
- 41 Weiss N, Galanaud D, Carpentier A, Naccache L, Puybasset L: Clinical review: Prognostic value of magnetic resonance imaging in acute brain injury and coma. *Critical care (London, England)* 2007;11:230.
- 42 Nitatori T, Sato N, Waguri S, Karasawa Y, Araki H, Shibana K, Kominami E, Uchiyama Y: Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J Neurosci* 1995;15:1001–11.
- 43 Wessels A, Sedmera D: Developmental anatomy of the heart: a tale of mice and man. *Physiol Genomics* 2003;15:165–76.
- 44 Jover T, Tanaka H, Calderone A, Oguro K, Bennett, Michael V L, Etgen AM, Zukin RS: Estrogen protects against global ischemia-induced neuronal death and prevents activation of apoptotic signaling cascades in the hippocampal CA1. *J Neurosci* 2002;22:2115–24.
- 45 Gibson CL, Murphy SP: Progesterone enhances functional recovery after middle cerebral artery occlusion in male mice. *Journal of cerebral blood flow and metabolism official*

- journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism 2004;24:805–13.
- 46 Roof RL, Hoffman SW, Stein DG: Progesterone protects against lipid peroxidation following traumatic brain injury in rats. *Mol Chem Neuropathol* 1997;31:1–11.
  - 47 Bottiger BW, Schmitz B, Wiessner C, Vogel P, Hossmann KA: Neuronal stress response and neuronal cell damage after cardiocirculatory arrest in rats. *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1998;18:1077–87.
  - 48 Bottiger BW, Teschendorf P, Krumnikl JJ, Vogel P, Galmbacher R, Schmitz B, Motsch J, Martin E, Gass P: 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;65:135–42.
  - 49 Landoni G, Fochi O, Tritapepe L, Guarracino F, Belloni I, Bignami E, Zangrillo A: Cardiac protection by volatile anesthetics. A review. *Minerva Anesthesiol* 2009;75:269–73.
  - 50 Arras M, Autenried P, Rettich A, Spaeni D, Rulicke T: Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. *Comp Med* 2001;51:443–56.
  - 51 Dezfulian C, Shiva S, Alekseyenko A, Pendyal A, Beiser DG, Munasinghe JP, Anderson SA, Chesley CF, Vanden Hoek T L, Gladwin MT: 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;120:897–905.
  - 52 Nakano T, Hurn PD, Herson PS, Traystman RJ: Testosterone exacerbates neuronal damage following cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in mouse. *Brain Research* 2010;1357:124–30.
  - 53 Norman GJ, Zhang N, Morris JS, Karelina K, Berntson GG, DeVries AC: Social interaction modulates autonomic, inflammatory, and depressive-like responses to cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:16342–7.
  - 54 Krege JH, Hodgkin JB, Hagaman JR, Smithies O: A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. *Hypertension* 1995;25:1111–5.

- 55 Tankersley CG, Irizarry R, Flanders S, Rabold R: Circadian rhythm variation in activity, body temperature, and heart rate between C3H/HeJ and C57BL/6J inbred strains. *J Appl Physiol* (1985) 2002;92:870–7.
- 56 Nolan JP, Soar J: Does the evidence support the use of mild hypothermia after cardiac arrest? Yes. *BMJ* (Clinical research ed.) 2011;343:d5830.
- 57 Ebong S, Call D, Nemzek J, Bolgos G, Newcomb D, Remick D: Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. *Infect Immun* 1999;67:6603–10.
- 58 Warn PA, Brampton MW, Sharp A, Morrissey G, Steel N, Denning DW, Priest T: Infrared body temperature measurement of mice as an early predictor of death in experimental fungal infections. *Laboratory animals* 2003;37:126–31.
- 59 Bembea MM, Nadkarni VM, Diener-West M, Venugopal V, Carey SM, Berg RA, Hunt EA: Temperature patterns in the early postresuscitation period after pediatric in-hospital cardiac arrest. *Pediatric critical care medicine a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies* 2010;11:723–30.
- 60 Wang H, Barbut D, Tsai M, Sun S, Weil MH, Tang W: Intra-arrest selective brain cooling improves success of resuscitation in a porcine model of prolonged cardiac arrest. *Resuscitation* 2010;81:617–21.
- 61 Laufs U, Fata VL, Liao JK: Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase blocks hypoxia-mediated down-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *The Journal of biological chemistry* 1997;272:31725–9.
- 62 Hernández-Perera O, Pérez-Sala D, Navarro-Antolín J, Sánchez-Pascuala R, Hernández G, Díaz C, Lamas S: Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *The Journal of clinical investigation* 1998;101:2711–9.