

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie

Direktor: Herr Prof. Dr. med. Daniel A. Reuter

Einfluss von Artesunate auf die Überlebensrate und die funktionell-neurologische Regeneration von Mäusen nach Herz-Kreislaufstillstand und kardiopulmonaler Reanimation

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock



vorgelegt von

Michael Wiebersinsky, geb. am 13.02.1985 in Nauen

aus Rostock

Rostock 2020

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

1. Gutachter Prof. Dr. med. Christian Zöllner
Zentrum für Anästhesiologie und Intensivmedizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
2. Gutachter Prof. Dr. med. J. P. Roesner
Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin
Klinikum Südstadt Rostock
3. Gutachter Prof. Dr. Thomas Noack
Oscar Langendorff Institut für Physiologie
Universität Rostock

Datum der Einreichung: 30.01.2020

Datum der Verteidigung: 05.05.2021

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------|---|
| A. | arteria |
| Aa. | arteriae |
| Abb. | Abbildung |
| AEDs | automatische externe Defibrillatoren |
| AG | Arbeitsgruppe |
| AK | Antikörper |
| art. | arteriell |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AZ | Allgemeinzustand |
| BE | Blutentnahme |
| BGA | Blutgasanalyse |
| °C | Grad Celsius |
| CA | cardiac arrest |
| ca. | circa |
| cm | Zentimeter |
| CPR | kardiopulmonale Reanimation |
| d | Tag |
| DAMP | damage associated molecular pattern |
| EF | Ejektionsfraktion |
| EK | Erstkontakt |
| EKG | Elektrokardiogramm |
| f | Frequenz |
| F _i O ₂ | Fraktion der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration |
| G | Gauge |

| | |
|-------|--|
| g | Gramm |
| GCS | Glasgow Coma Skale |
| h | Stunde |
| HE | Hämatoxylin Eosin- Färbung |
| ICAM | Intercellular Adhesion Molecule |
| IEC | Institut für Experimentelle Chirurgie |
| IL | Interleukin |
| i.p. | intraperitoneal |
| IRIS | Ischämie, Reperfusion, Inflammation und Sepsis |
| i.v. | intravenös |
| KCl | Kaliumchlorid |
| kg | Kilogramm |
| KG | Körpergewicht |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| MAP | mittlerer arterieller Druck |
| max | maximal |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| mm | Millimeter |
| mmHg | Millimeter Quecksilbersäule |
| MTH | milde therapeutische Hypothermie |
| MV | Mecklenburg- Vorpommern |
| n | Anzahl |
| NaBic | Natriumhydrogencarbonat |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NF-κB | nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' |

| | |
|--------------------------------|--|
| NIBP | non-invasive blood pressure |
| OHCA | out of hospital cardiac arrest |
| P _a O ₂ | arterieller Sauerstoffpartialdruck |
| P _a CO ₂ | arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck |
| PCI | percutaneous coronary intervention |
| PRR | pathogen recognition receptors |
| PVC | Polyvinylchlorid |
| rpm | rounds per minute |
| ROSC | return of spontaneous circulation |
| s | Sekunde |
| SEM | Standardfehler |
| SIRS | systemic inflammatory response syndrome |
| STAT-3 | Signal transducer and activator of transcription 3 |
| t | Zeit |
| Tab. | Tabelle |
| TLR | Toll-like-Rezeptor |
| TNF α | Tumor-Nekrose-Faktor Alpha |
| V. | vena |
| VF | ventricular fibrillation, Kammerflimmern |
| vs. | versus |
| WMT | WaterMaze-Test |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZVK | zentraler Venenkatheter |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|----------|--|----|
| Tab. 1: | Gruppenzuordnung der Versuchstiere vor Präparation | 16 |
| Tab. 2: | Punktvergabe für die Bewertung des Allgemeinzustandes | 24 |
| Tab. 3: | Punktvergabe für die Bewertung des neurologischen Zustandes | 25 |
| Tab. 4: | Voraussetzungen zur Teilnahme am WaterMaze-Test..... | 28 |
| Tab. 5: | Gruppenzuordnung der Versuchstiere nach Präparation..... | 32 |
| Tab. 6: | Zeit bis zum Eintritt des ROSC und Weaningzeit..... | 33 |
| Tab. 7: | Herzfrequenz nach Eintritt des ROSC | 33 |
| Tab. 8: | MAP nach Eintritt des ROSC | 34 |
| Tab. 9: | Körpertemperatur der Versuchstiere..... | 35 |
| Tab. 10: | Relatives Körpergewicht im Beobachtungszeitraum..... | 38 |
| Tab. 11: | Allgemeinzustand im Beobachtungszeitraum | 39 |
| Tab. 12: | Neuroscore im Beobachtungszeitraum | 40 |
| Tab. 13: | RotaRod-Ergebnisse im Beobachtungszeitraum | 42 |
| Tab. 14: | Zeiten und Teilnahme am WaterMaze-Test..... | 44 |
| Tab. 15: | zurückgelegte Strecke im Elevated Plus Maze | 45 |
| Tab. 16: | verbrachte Zeit im offenen Arm im Elevated Plus Maze | 45 |
| Tab. 17: | Anzahl der Streckungen im Elevated Plus Maze | 46 |
| Tab. 18: | Anzahl des Über-den-Rand-Schauens im Elevated Plus Maze | 47 |
| Tab. 19: | Zeit bis zum Kontakt mit dem Klebepunkt beim Adhesive-Removal-Test.. | 48 |
| Tab. 20: | Zeit bis zum Entfernen des Klebepunktes beim Adhesive-Removal-Test.. | 49 |
| Tab. 21: | Überleben in der Voruntersuchung mit NaBic 5% als Vehikellösung..... | 54 |
| Tab. 22: | Versuchsprotokolle weiterer Forschungsgruppen..... | 58 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abb. 1: Monitoring mit EKG und Pulskurve | 18 |
| Abb. 2: Maus mit Monitoring, Tubus und ZVK..... | 18 |
| Abb. 3: Versuchsprotokoll | 19 |
| Abb. 4: Arbeitsplatz für die Durchführung der Präparation und Reanimation..... | 20 |
| Abb. 5: Zeitliches Ablaufschema der neurophysiologischen Tests..... | 21 |
| Abb. 6: Temperaturmessung mittels Infrarotwärmebildkamera | 23 |
| Abb. 7: Maus auf dem RotaRod | 26 |
| Abb. 8: Maus in dem WaterMaze | 28 |
| Abb. 9: Maus nach dem Auffinden der Plattform..... | 28 |
| Abb. 10: Versuchstier vor Adhesive-Removal-Test..... | 29 |
| Abb. 11: Maus auf dem Elevated Plus Maze | 30 |
| Abb. 12: Kaplan-Meier-Kurve nach 28 Tagen | 36 |
| Abb. 13: Relatives Körpergewicht im Beobachtungszeitraum..... | 37 |
| Abb. 14: TLR4- PI3K - Signalweg | 51 |
| Abb. 15: Körpertemperatur von Mäusen in Narkose | 57 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1. Einleitung | 13 |
| 2. Fragestellung | 15 |
| 3. Material und Methoden..... | 16 |
| 3.1. Versuchstiere | 16 |
| 3.2. Versuchsaufbau | 17 |
| 3.3. Reanimation | 19 |
| 3.4. Nachbeobachtung | 21 |
| 3.4.1. Überleben..... | 21 |
| 3.4.2. Temperaturmanagement..... | 22 |
| 3.4.3. Allgemeinzustand | 23 |
| 3.4.4. Körpergewicht | 24 |
| 3.4.5. NeuroScore | 24 |
| 3.4.6. RotaRod-Test..... | 26 |
| 3.4.7. WaterMaze-Test..... | 27 |
| 3.4.8. Adhesive-Removal-Test | 28 |
| 3.4.9. Elevated Plus Maze..... | 30 |
| 3.4.10. Auswertung und Statistik..... | 31 |
| 4. Ergebnisse | 32 |
| 4.1. Gruppengröße/ Ausschlusskriterien | 32 |
| 4.2. Zeit bis ROSC und Extubation..... | 32 |
| 4.3. Herzfrequenz und MAP | 33 |
| 4.4. Temperaturmanagement | 34 |
| 4.5. Überleben..... | 36 |
| 4.6. Funktionell-neurologische Untersuchung | 37 |

| | | |
|--------|--|----|
| 4.6.1. | Körpergewicht | 37 |
| 4.6.2. | Allgemeinzustand | 39 |
| 4.6.3. | NeuroScore | 40 |
| 4.6.4. | RotaRod-Test | 41 |
| 4.6.5. | WaterMaze-Test | 43 |
| 4.6.6. | Elevated Plus Maze | 44 |
| 4.6.7. | Adhesive-Removal-Test | 47 |
| 5. | Diskussion | 50 |
| 5.1. | Versuchsgrundlage | 50 |
| 5.2. | Versuchstiere | 52 |
| 5.2.1. | Weibliche Tiere | 52 |
| 5.2.2. | Alter, Größe und Gewicht | 53 |
| 5.2.3. | Gruppengröße, Kontrollgruppen | 53 |
| 5.3. | Reanimationsmodell | 56 |
| 5.3.1. | Narkose | 56 |
| 5.3.2. | Beatmung | 57 |
| 5.3.3. | Blutdruckmessung | 58 |
| 5.3.4. | Temperaturmanagement | 58 |
| 5.3.5. | Zentraler Venenkatheter | 60 |
| 5.4. | Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation | 61 |
| 5.4.1. | Induktion des Herz-Kreislaufstillstandes | 61 |
| 5.4.2. | Dauer des Herz-Kreislaufstillstandes | 61 |
| 5.4.3. | Beobachtungszeitraum | 62 |
| 5.5. | Nachbeobachtung | 62 |
| 5.5.1. | Überleben | 62 |
| 5.5.2. | Körpergewicht | 63 |
| 5.5.3. | Allgemeinzustand | 63 |

| | | |
|--------|------------------------------------|----|
| 5.5.4. | NeuroScore | 64 |
| 5.5.5. | RotaRod-Test..... | 65 |
| 5.5.6. | WaterMaze-Test..... | 65 |
| 5.5.7. | Elevated Plus Maze Test..... | 67 |
| 5.5.8. | Adhesive-Removel-Test | 68 |
| 5.5.9. | Temperaturmanagement..... | 69 |
| 5.6. | Limitationen der Untersuchung..... | 70 |
| 6. | Schlussfolgerung..... | 71 |
| 7. | Literatur | 72 |
| 8. | Selbständigkeitserklärung | 81 |
| 9. | Lebenslauf..... | 82 |
| 10. | Thesen zur Dissertation | 83 |

1. Einleitung

Weltweit ist der reanimationspflichtige Herz-Kreislaufstillstand mit nachfolgender Krankenhauseinweisung ein häufiges Ereignis. In den USA erleiden jährlich etwa 350.000 Patienten einen Herz-Kreislaufstillstand außerhalb einer medizinischen Einrichtung – out of hospital cardiac arrest (OHCA) [1],[2]. In Europa belaufen sich die Zahlen, abhängig von der Region, auf 17-53 Ereignisse/1.000.000 Einwohner/Jahr [3]. In Großbritannien werden jährlich ca. 30.000 Patienten mit einem Herz-Kreislaufstillstand durch Rettungskräfte behandelt [4]. Die gesamte Rate an Patienten, die das Krankenhaus nach solch einem Ereignis wieder verlassen, ist weiterhin äußerst gering. Es konnte durch verschiedene Autoren gezeigt werden, dass insgesamt in nur 7-9% der Fälle die Patienten das Krankenhaus lebend verlassen [5], [6]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass in nur 3,2% der behandelten Fälle ein gutes neurologisches Ergebnis erreicht werden konnte [7]. Etwa 68% der Patienten, bei denen wieder ein Spontankreislauf erreicht wurde, verstarben an den neurologischen Folgen des Herz-Kreislaufstillstandes [8]. In Victoria, Australien, erlitten von 2010 bis 2012 insgesamt 15113 Personen einen reanimationspflichtigen Herz-Kreislaufstillstand. Hiervon konnten 927 (13,2%) der Betroffenen das Krankenhaus wieder verlassen und insgesamt 851 (12,2%) Personen überlebten mehr als 12 Monate nach dem Ereignis. Nach diesem Zeitraum konnten 74,2% der noch überlebenden Patienten, die vorher Erwerbstätig waren, wieder einen Beruf ausüben [9]. Untersuchungen konnten jedoch auch zeigen, dass die Zahl der Überlebenden nach einem Herz-Kreislaufstillstand in den vergangenen 10 Jahren durch forcierte Forschung und Trainingsmaßnahmen gesteigert werden konnte [10], [11].

Das primäre Therapieziel von Reanimationsmaßnahmen als Antwort auf einen Herz-Kreislaufstillstand ist die Wiederherstellung eines Spontankreislaufes. Allerdings entwickelt sich das Krankheitsbild der Patienten auch nach erfolgreichem ROSC weiter, es entstehen Folgeschäden durch die globale Ischämie sowie die anschließende Reperfusion aller Organsysteme. Diese Entwicklung kann aufgrund der komplexen Zusammenhänge des zentralen und vegetativen Nerven-, Immun-, Gerinnungs- und des endokrinen Systems zum Vollbild des Multiorganversages führen. In der Zusammenschau der komplexen Zusammenhänge wurde von Negovsky 1988 der Begriff Postreanimationskrankheit

geprägt [12]. Hierbei handelt es sich um Schäden an allen Organsystemen. Insbesondere stehen aber Herz und Gehirn als extrem sauerstoffabhängige Organe im Fokus. Im Gehirn kommt es als Folge des Sauerstoffmangels bereits nach wenigen Minuten zum Zusammenbruch der Ionenpumpen durch Mangel an Adenosintriphosphat (ATP) mit dem Ergebnis des Zusammenbruchs der zellulären Homöostase [13]. Dieses zeigt sich besonders in den vulnerablen Regionen Hippocampus und Nucleus reticularis thalami, mit zeitlich unterschiedlichen Verlaufsmustern [14]. Das Spektrum der klinischen Symptome reicht von einem geringen neurologischen Defizit bis hin zum anhaltenden Koma. Am Herzen lassen sich nach erfolgreicher Reanimation, jedoch ohne stattgehabte Koronarokklusion, regelhaft erhöhte Werte für kardiale Troponine im Blut nachweisen. Es gibt eine Assoziation zwischen deren Höhe und der Dauer des Herz-Kreislaufstillstandes [15]. Im Tiermodell konnte eine myokardiale Dysfunktion direkt nach Reanimation nachgewiesen werden. Hierbei fielen besonders eine Minderung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (EF) auf 20-30% sowie regionale Kinetikstörungen auf [16]. Insgesamt entwickelt sich bereits kurze Zeit nach erfolgreicher Reanimation eine systemische Entzündungsreaktion mit dem Anstieg verschiedener Zytokine, welche im Organismus für die Induktion von Abwehr- und Reparaturmechanismen verantwortlich sind. Daraus ergibt sich das Bild eines „systemic inflammatory response syndroms“ (SIRS) mit ansteigenden Werten für Interleukin (IL)-1a, IL-6, IL-8 und IL10 als Marker des SIRS [17].

Für die Aktivierung der inflamatorischen Antwort spielen die Toll-like-Rezeptoren (TLR) eine überragende Rolle. Im Rahmen des Ischämie-/Reperfusionsschadens kommt es zur Freisetzung diverser Metabolite aus dem geschädigten Gewebe, den sogenannten DAMP's (damage associated molecular pattern). Diese Strukturen dienen als endogene Liganden und können durch die TLR detektiert werden (PRR - pathogen recognition receptors). In der Folge kommt es zur Aktivierung proinflammatorischer Kaskaden und Signaltransduktionswege. Ein Beispiel hierfür ist der immunologische STAT3-Signalweg, vermittelt über den TLR-4 [18]. Der Rezeptor wurde durch verschiedene Studien als Mediator der Reperfusionsschadenskrankheit in Herz und Gehirn identifiziert [19], [20]. Es konnte gezeigt werden, dass die Blockade des TLR-4-Signalweges bei Mäusen den Reperfusionsschaden nach selektivem Verschluss der Arteria media cerebri minimiert [21].

Artesunate ist ein Antiprotozoikum welches aus der *Artemisia annua* gewonnen wird. Es wurde bereits vor 1500 Jahren in China als fiebersenkendes Mittel verabreicht [22]. Aktuell wird Artesunate zur Therapie der schweren Malaria verwendet und ist seit 2002 auf der Liste der unentbehrlichen Arzneimittel der Weltgesundheitsorganisation vertreten [23]. Es konnte gezeigt werden, dass Artesunate einen Einfluss auf das Immunsystem hat. So bewirkt es eine Hemmung der Entzündungsreaktion durch Senkung der NF- κ B - Translokation (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) und der nachfolgenden ICAM-1 Expression (intercellular adhesions molecule – 1) [24]. Weiterhin konnte auch eine direkte Minimierung von IL-6 und TNF- α (Tumornekrosefaktor) bei Ratten, sowie eine Downregulation des TLR-4 durch Artesunate gezeigt werden [25].

Untersuchungen von Sordi et al. zeigten, dass Artesunate einen protektiven Effekt auf den Organschaden und die -dysfunktion nach einem hämorrhagischen Schock bei Ratten hat [26]. Weiterhin wurde der Eingriff in die Immunmodulation nachgewiesen. Durch Khan et al. wurde die Substanz isoliert am Myokardinfarkt bei Ratten untersucht. Hier konnte eine deutliche Reduktion des Infarktareals am Herzen nach der Verabreichung von Artesunate nachgewiesen werden [27]. Als Erweiterung dieser Projekte der Arbeitsgemeinschaft um Prof. Thiemermann am William Harvey Research Institute in London zielte unser Experiment auf die Effekte nach globaler Ischämie bei Herz-Kreislaufstillstand ab.

2. Fragestellung

In der vorliegenden Untersuchung sollte der Einfluss von Artesunate auf das Überleben und die funktionell-neurologische Regeneration von Mäusen nach Herz-Kreislaufstillstand und kardiopulmonaler Reanimation untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1. Versuchstiere

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine prospektive, randomisierte und verblindete tierexperimentelle Studie. Die Versuche an lebenden Tieren wurden nach Antrag und dessen Bewilligung durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei, Mecklenburg-Vorpommern mit dem Aktenzeichen 7221.3-1.1-012/12 durchgeführt.

Für die Versuche wurden weibliche C57BL/6J Mäuse (n=96 Tiere) verwendet. Die Tiere entstammten der hauseigenen Zucht des Institutes für Experimentelle Chirurgie (IEC) der Universität Rostock. Sie waren zum Zeitpunkt der Versuche 12-16 Wochen alt und wogen 17-23 g. Die Mäuse wurden während der gesamten Versuchszeit in Käfigen des IEC gehalten. Sieben Tage vor Versuchsbeginn wurden die Tiere in den Interventionsbereich des IEC verbracht um eine Gewöhnung an die Räumlichkeiten zu ermöglichen. Es lag eine kontinuierliche Raumtemperatur von 22°C sowie ein automatisierter 12-stündiger Tag-Nacht-Rhythmus vor. Die Mäuse hatten dauerhaft und unbegrenzt Zugang zu Frischwasser und Nagetierfutter.

Zur Beantwortung der Fragestellung wurden die Tiere in 3 Gruppen eingeteilt. Es wurden zwei Kontrollgruppen mit den Vehikellösungen NaCl 0,9% und ClinOleic 20% untersucht. Die Interventionsgruppe erhielt 1,2mg/kg KG Artesunate, gelöst in ClinOleic 20%. Diese Aufteilung ergab sich aus der sehr begrenzten Wasserlöslichkeit von Artesunate.

| Gruppenzuordnung der Versuchstiere vor Präparation | | | | |
|--|---------------|------------------------|--------------------------|------|
| NaCl | CA/CPR 10 min | NaCl 0,9% | Überleben und Neurotests | n=38 |
| ClinOleic | CA/CPR 10 min | ClinOleic 20% | Überleben und Neurotests | n=41 |
| Artesunate | CA/CPR 10 min | Artesunate 1,2 mg/kgKG | Überleben und Neurotests | n=38 |

Tab. 1: Gruppenzuordnung der Versuchstiere vor Präparation

Nach der Vorbereitungszeit von sieben Tagen erfolgte der Reanimationsversuch mit der darauf folgenden Beobachtung verschiedener Parameter über 28 Tage. Tiere, welche nicht den gesamten Beobachtungszeitraum überlebten, wurden seziiert und für die histologische Aufarbeitung asserviert. Nach Ablauf der 28 Tage wurden die überlebenden Tiere euthanasiert und Einzelorgane ebenfalls histologisch aufgearbeitet.

3.2. Versuchsaufbau

Der durchgeführte Reanimationsversuch basiert auf dem weiterentwickelten Versuchsprotokoll von Menzebach et al. [28] sowie Bergt et al. [29]. Nach erfolgter 7-tägiger Gewöhnungsphase sowie Übungstagen der neurophysiologischen Tests wurden die Tiere am Tag des Versuches nach 1-stündiger Ruhephase narkotisiert. Hierfür verwendeten wir ein Gemisch aus Ketamin (12µg/g KG) und Xylazin (8µg/g KG). Die Applikation erfolgte intraperitoneal (i.p.). Die Tiere wurden in Rückenlage positioniert, an allen Extremitäten mittels Pflasterstreifen fixiert und anschließend orotracheal intubiert (modifizierter 22G B. Braun Vasofix® Venenverweilkatheter, Braun Melsungen AG, Deutschland). Nachfolgend fand die kontrollierte maschinelle Beatmung mit den Parametern F_{iO_2} 0,21, Atemfrequenz 130/min und Tidalvolumen 10µl/g statt (MiniVent Ventilator Typ 845, Hugo Sachs; March-Hugstetten). Wir verwendeten eine rektale Temperatursonde (Effenberger, Pfaffing, Deutschland) um mittels Rückkopplungsfunktion der Heizplatte die Körpertemperatur der Versuchstiere konstant bei 36,0°C zu halten. Um zusätzliche Wärmeverluste über Konvektion, Strahlung und Verdunstung zu minimieren, wurden die Mäuse mit einer Kompresse (10x10cm) sowie einer zugeschnittenen Rettungsdecke (Gold-Silber-Folie) abgedeckt. Zur hämodynamischen Überwachung etablierten wir eine EKG-Ableitung mittels drei Nadelstichelektroden in der Haut. Die Blutdruckmessung erfolgte unter Verwendung einer pneumatischen Manschette (AD Instruments, Spechbach) am Schwanz des Versuchstiers, über welche die Ableitung einer Pulsdruckkurve an der Schwanzarterie möglich war. Zur weiteren Temperaturüberwachung sowie zur Präparation des i.v. Zuganges befreiten wir die Versuchstiere am ventralen Hals sowie oberhalb der Leber mittels Enthaarungscreme von Fell. Als intravenöser (i.v.) Zugang diente ein Polyethylen-Katheter mit dem Innendurchmesser von 0,28mm (PE50, Portex, Hythe, Großbritannien), welcher mikrochirurgisch unter einem binokularen OP-Mikroskop in die rechte V. jug. externa gelegt und fixiert wurde.

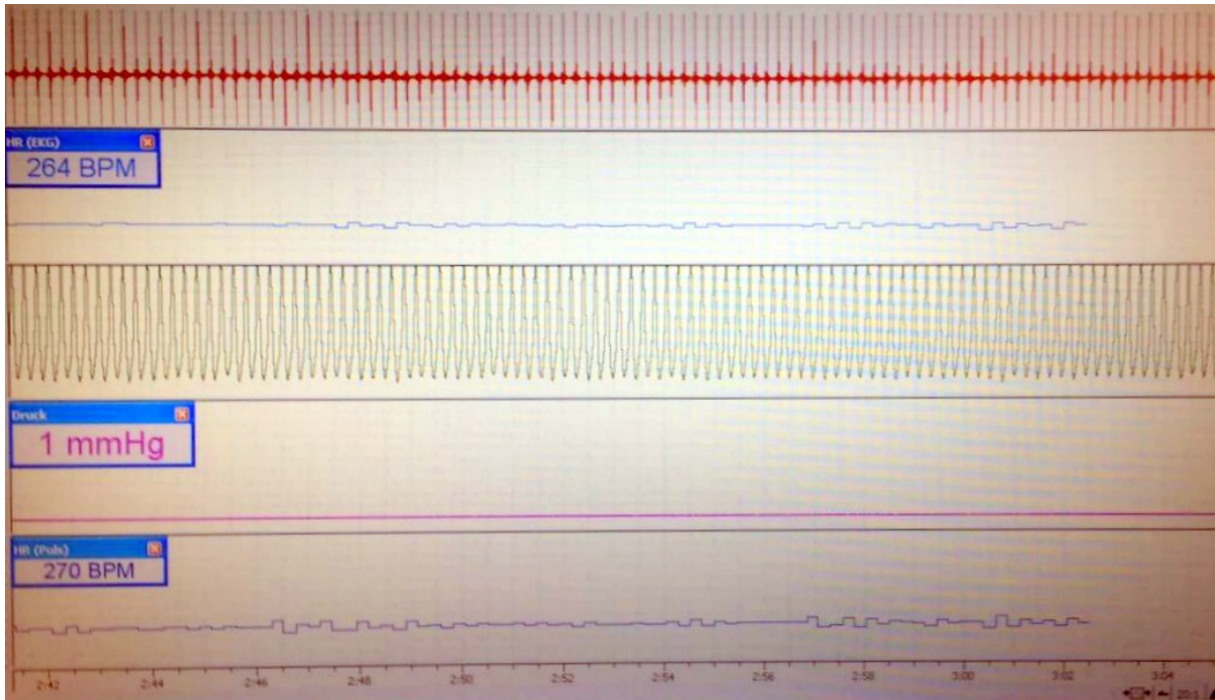


Abb. 1: Monitoring mit EKG und Pulscurve

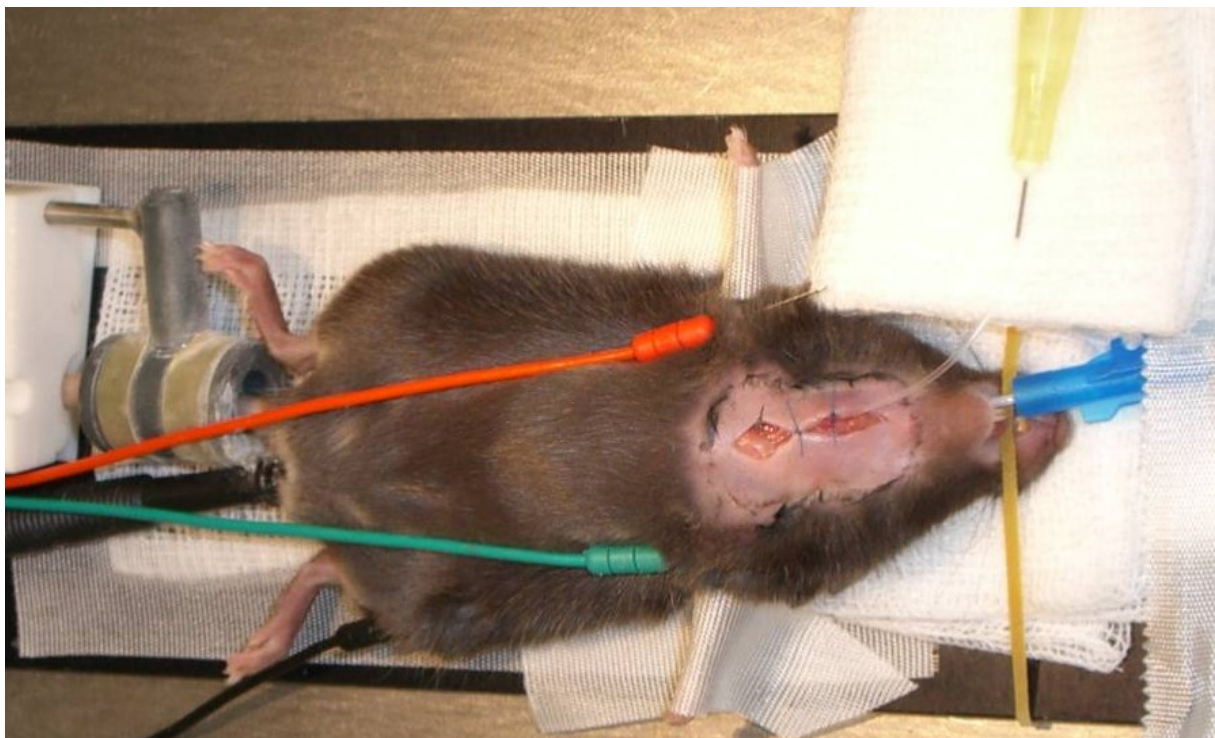


Abb. 2: Maus mit Monitoring, Tubus und ZVK

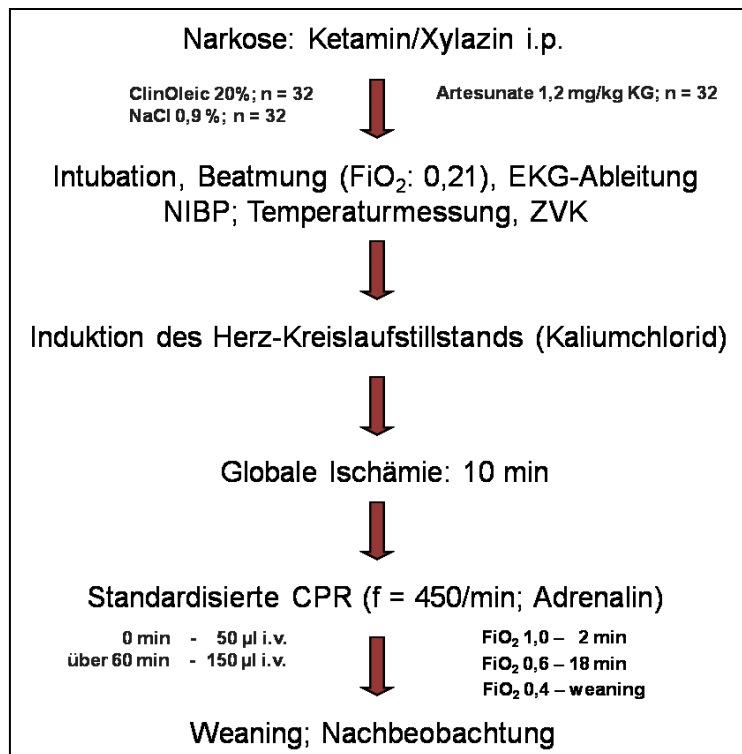


Abb. 3: Versuchsprotokoll

3.3. Reanimation

Nach abgeschlossener Präparation und Stabilisierungsphase der Tiere erfolgte die Induktion des Herz-Kreislaufstillstandes mittels einer 0,1ml Kaliumchloridinjektion (80µg/g KG) über den zentralvenösen Katheter (ZVK). Zeitgleich pausierten wir die maschinelle Beatmung. Der Herz-Kreislaufstillstand konnte sowohl im EKG anhand einer Asystolie als auch an der fehlenden Pulsdruckkurve der Schwanzarterie verifiziert werden. Der induzierte Herz-Kreislaufstillstandes wurde exakt 10 Minuten beibehalten. Nach Ablauf dieser Zeit begann die standardisierte kardiopulmonale Reanimation und die Applikation von Adrenalin (0,4g/g KG). Weiterhin wurden je nach Versuchsgruppe 0,05ml der Vehikellösung (NaCl 0,9% oder ClinOleic 20%) bzw. Artesunate (1,2mg/kg KG) in ClinOleic 20% gelöst über den ZVK verabreicht. Die standardisierte Herzdruckmassage mit 450 Kompressionen/min realisierten wir mit Hilfe einer modifizierten Nähmaschine (Privileg, Typ VVZ). Die Beatmung wurde mit einem F_{iO_2} von 1,0, einer Atemfrequenz von 200/min und einem Tidalvolumen von 12µl/g KG durchgeführt. Nach 45 Sekunden unterbrachen wir die Herzdruckmassage, um den Reanimationserfolg zu überprüfen. Konnte kein return of spontaneous circulation (ROSC) festgestellt werden erfolgte erneut eine Injektion

von Adrenalin und die Herz-Druckmassage wurde fortgeführt. Stellte sich binnen 3 Minuten kein ROSC ein, wurde der Reanimationsversuch abgebrochen. Nach erfolgreichem ROSC injizierten wir in den folgenden 60min zusätzlich 0,15ml Vehikellösung bzw. das untersuchte Medikament (Artesunate 1,2mg/kg KG in ClinOleic 20%) mittels Spritzenpumpe (Injectomat c-PS, Fresenius AG, Schweinfurt) über den ZVK. Zwei Minuten nach Einsetzen eines Spontankreislaufes verringerten wir die F_iO_2 auf 0,6, nach 20 Minuten auf 0,4. Nach Injektion der 0,15ml Vehikellösung wurde der ZVK entfernt, die V. jug. ext. ligiert und der Situs nach Desinfektion mittels Einzelknopf-Hautnaht (Prolene 6.0, Ethicon Johnson & Johnson, Belgien) verschlossen. Binnen der folgenden 2 Stunden fand die Entwöhnung vom Beatmungsgerät statt, so dass die Tiere nach spätestens 180 Minuten bei suffizienter Spontanatmung und Reaktion auf taktile Reize extubiert werden konnten. Im Anschluss erhielten alle Tiere eine subkutane Injektion von 0,5ml balancierter Vollelektrolytlösung (Sterofundin[®], Braun Melsungen AG, Deutschland) unter die Nackenhaut zur Volumensubstitution. Diese Injektion wiederholten wir 12 Stunden nach erfolgter Reanimation. Anschließend wurden die Tiere für 24 Stunden in einem temperierten Terrarium belassen. Die restliche Beobachtungszeit von 27 Tagen verbrachten die Tiere in der zentralen Tierhaltung des Institutes für Experimentelle Chirurgie.

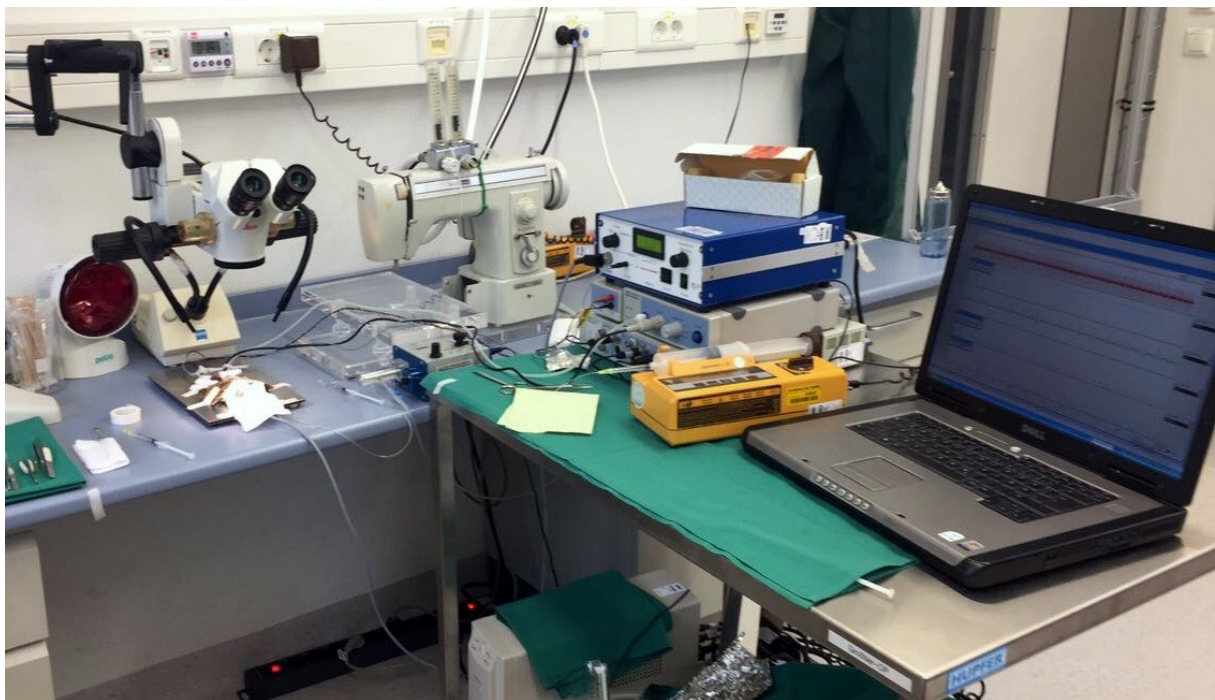


Abb. 4: Arbeitsplatz für die Durchführung der Präparation und Reanimation

3.4. Nachbeobachtung

Der Focus der Untersuchung lag einerseits auf dem Langzeitüberleben der Versuchstiere nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation und andererseits auf dem neurologischen Behandlungsergebnis. Als Beobachtungszeitraum wurden 28 Tage gewählt. Nach einem zuvor festgelegten Protokoll durchliefen die Tiere im Beobachtungszeitraum die neurophysiologische Testbatterie sowie regelmäßige Evaluation von Gewicht und Allgemeinzustand.

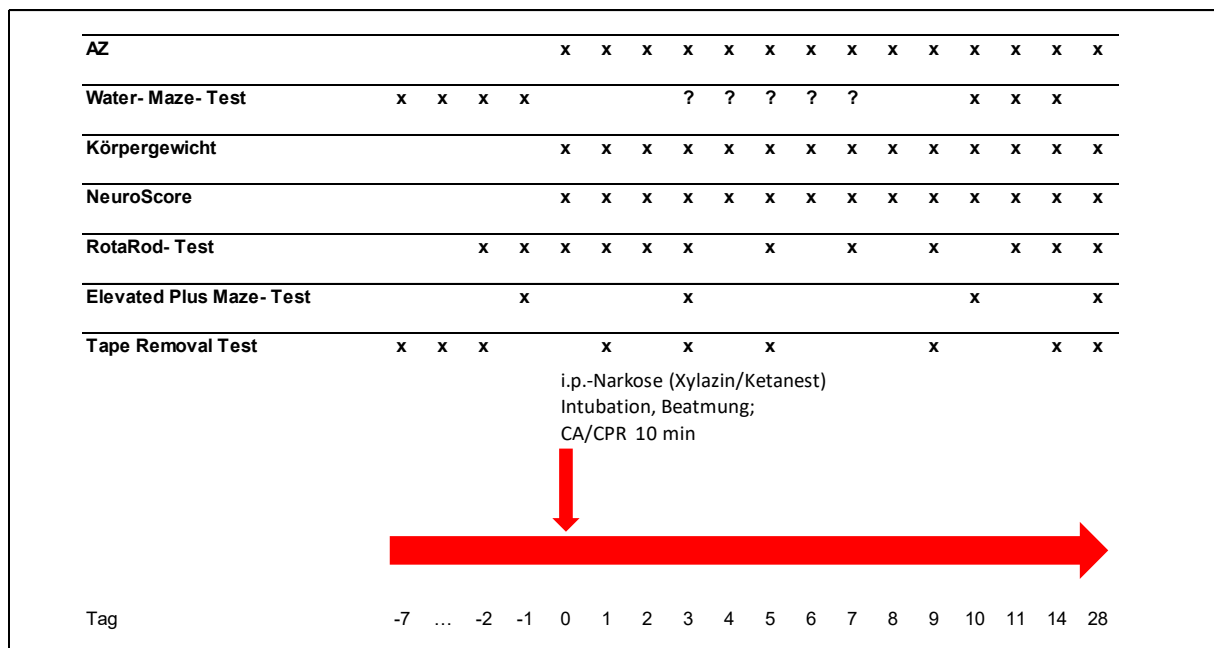


Abb. 5: Zeitliches Ablaufschema der neurophysiologischen Tests

3.4.1. Überleben

Durch regelmäßiges Untersuchen der Versuchstiere erhoben wir die Daten zum Überleben. Als Überlebenszeit veranschlagten wir die Zeit, nach welcher das Tier letztmalig lebendig gesehen wurde. In den ersten 24 Stunden nach Reanimation untersuchten wir die Versuchstiere in 4-stündlichen Abständen und erhoben den Allgemeinzustand, den Neuroscore und die Temperatur. Ab dem 1. Tag nach Reanimation wurden die Tiere für 4 Tage 12-stündlich gesehen und bewertet. Ab Tag 5 nach Reanimation visitierten wir die Tiere einmal täglich und begutachteten den aktuellen körperlichen Status. Kam es zu einer akuten Verschlechterung des Zustandes der Tiere wurden die Visitenabstände, in Übereinstimmung mit den Regeln des Tierschutzes, individuell verkürzt.

3.4.2. Temperaturmanagement

Während der eigentlichen Präparation sowie der Reanimations- und Entwöhnungsphase wurde die Körpertemperatur der Versuchstiere mittels einer rektalen Temperatursonde kontinuierlich gemessen. Eine rückgekoppelte Wärmeplatte diente dazu, eine Körpertemperatur von 36,0°C beizubehalten. Um ein Absinken der Körpertemperatur zu vermeiden, verbrachten die Tiere die ersten 24 Stunden nach Extubation in einem handelsüblichen Terrarium mit zwei rückgekoppelten Temperaturfühlern, bei einer Temperatur von ca. 28°C. Während dieser Zeit fanden alle 4 Stunden Temperaturmessungen über eine Wärmebildkamera (FLIR ThermaCAM® B20HS, FLIR Systems GmbH, Frankfurt a. Main, Deutschland) auf Höhe der Leber statt. Die Auswertung der entstandenen Bilder erfolgte mit Hilfe spezieller Software (FLIR Quick Report, FLIR Systems GmbH, Frankfurt a. Main, Deutschland). Um eine Fehlmessung durch Fellisolation zu vermeiden, enthaarten wir die Mäuse in der Präparationsphase am linken Oberbauch. Nach 24 Stunden verbrachten wir die Tiere wieder in die Zentrale Tierhaltung und kontrollierten die Körpertemperatur im Abstand von 12 Stunden für die nächsten 2 Tage. Wurde ein erneuter Abfall der Temperatur unter 34°C beobachtet, verbrachten wir die Tiere wieder ins Terrarium und die Messungen wurden auf 4 Stunden Abstände minimiert. In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Temperaturdifferenz zwischen der rektalen Sonde und der Wärmebildmessung maximal 0,1°C betrug.

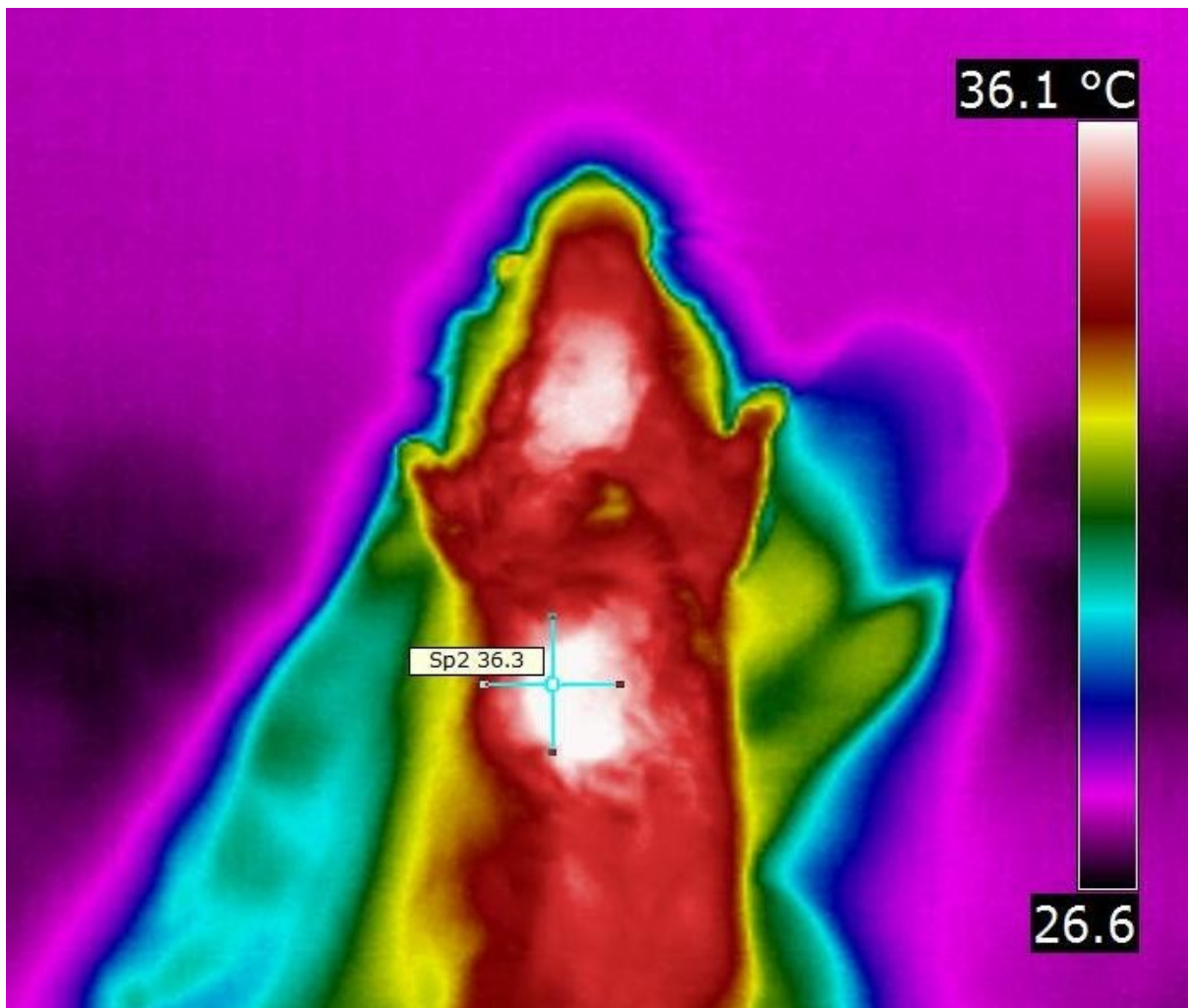


Abb. 6: Temperaturmessung mittels Infrarotwärmekamera

3.4.3. Allgemeinzustand

Der Allgemeinzustand der Versuchstiere ist ein subjektiver Parameter welcher vom Untersucher anhand von drei Einzelkriterien bewertet wurde. Insgesamt konnte das Tier einen Wert zwischen 0 - 3 Punkten erreichen, wobei 0 ohne Einschränkungen, 3 mit starker Einschränkung bedeutet. Bewertet wurden jeweils die Kategorien Fellbeschaffenheit, Nahrungsaufnahme und Bewegung des Versuchstieres.

| Punktevergabe für die Bewertung des Allgemeinzustandes – AZ | | | |
|--|----|----------------------------------|----------|
| Fellbeschaffenheit | 1. | sauber, glänzend | 0 |
| | 2. | struppig, verklebt | 1 |
| Nahrungsaufnahme | 1. | Maus frisst/trinkt | 0 |
| | 2. | Maus frisst/trinkt nicht | 1 |
| Bewegung | 1. | normale Bewegung | 0 |
| | 2. | verlangsamte oder keine Bewegung | 1 |
| Beurteilung | | keine Beeinträchtigung bei | 0 |
| | | leichte Beeinträchtigung bei | 1 |
| | | mäßige Beeinträchtigung bei | 2 |
| | | starke Beeinträchtigung bei | 3 |

Tab. 2: Punktevergabe für die Bewertung des Allgemeinzustandes

3.4.4. Körpergewicht

Das Körpergewicht der Versuchstiere ist ein einfach zu erhebender und vergleichender Verlaufsparemeter für das allgemeine Wohlbefinden. Als Ausgangswert wurde das Gewicht vor Reanimation gemessen. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den Tieren zu erreichen, wurde das jeweilige aktuelle Körpergewicht in Relation zum Ausgangsgewicht betrachtet und in Prozent angegeben. Die Messungen fanden jeweils morgens mit einer geeichten Präzisionswaage (MMX-212, Denver Instruments, Göttingen, Deutschland) statt. Die ersten 14 Tage erfolgte die Gewichtsmessung täglich sowie zusätzlich am 28. Tag nach Reanimation.

3.4.5. NeuroScore

Der NeuroScore ist ein verhaltensphysiologisches Messinstrument zur Beurteilung von Nagetieren. Er ist ähnlich der Glasgow Coma Scale (GCS) [30] beim Menschen aufgebaut. In dem verwendeten Test prüften wir 6 Qualitäten, die jeweils mit 0 - 2 Punkten bewertet wurden. In der Summe sind als bester zu erreichender Wert

12 Punkte möglich [31]. Um sicher zu stellen, dass primär keine Einschränkungen vorlagen, wurde die Untersuchung mit jedem Versuchstier vor Beginn des Reanimationsversuches durchgeführt. Während der Nachbeobachtung erfolgte die NeuroScore Bewertung nach 4, 8 und 12 Stunden, sowie an den Tagen 1-14 und 28 nach Reanimation. Die Untersuchung fand jeweils morgens statt.

| Punktevergabe für die Bewertung des neurologischen Zustandes – NeuroScore | | | |
|--|----|--|-----------|
| Bewusstsein | 1. | keine Reaktion auf Kniff in den Schwanz | 0 |
| | 2. | geringe Reaktion auf Kniff in den Schwanz | 1 |
| | 3. | normale Reaktion auf Kniff 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 -Muster | 1 |
| | 3. | normale Atemfrequenz, normales -Muster | 2 |
| Stellreflex | 1. | keine Drehbewegung | 0 |
| | 2. | langsames Drehen | 1 |
| | 3. | spontanes und schnelles Drehen | 2 |
| Koordination | 1. | keine Bewegung | 0 |
| | 2. | moderate Ataxie | 1 |
| | 3. | normale Koordination | 2 |
| Bewegung / Aktivität | 1. | keine spontane Bewegung | 0 |
| | 2. | verlangsamte Bewegung | 1 |
| | 3. | normale Bewegung | 2 |
| maximal mögliche Punktzahl | | | 12 |

Tab. 3: Punktvergabe für die Bewertung des neurologischen Zustandes

3.4.6. RotaRod-Test

Der RotaRod-Test ist ein neurophysiologischer Test, bei dem muskuläre Kraft, Ausdauer, Koordination und Lernvermögen bei Nagetieren getestet werden. Beim RotaRod handelt es sich um eine Walze in 45cm Höhe, welche per Motor mit 12 Umdrehungen pro Minute angetrieben wird. Um ein Herunterspringen sowie visuelle Ablenkung zu verhindern, sind an den Außenseiten PVC (Polyvinylchlorid)-Scheiben verbaut. Wir untersuchten, wie lange sich das Tier auf der rotierenden Walze halten konnte. Im Versuch wurde das Tier in 3 Durchläufen für je maximal 5 Minuten (300 Sekunden) auf die Walze gesetzt und die Zeit bis zum Herunterfallen gemessen. Nach 300 Sekunden hoben wir das Tier von der Walze und gewährten ihm 60 Sekunden Pause. Dann erfolgten der 2. bzw. 3. Durchlauf nach demselben Muster. Die Summe der erreichten Zeiten ergab die Gesamtzeit in Sekunden. Zur Gewöhnung wurden die Tiere bereits 2 Tage vor Reanimation sowie am Reanimationstag mit dem Test konfrontiert. Nach erfolgreicher Reanimation fand der Test an den Tagen 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 14 und 28 statt. Nach jedem Versuch wurde die Walze zur Minimierung von Irritation durch Gerüche mit 70%igem Ethanol gereinigt.

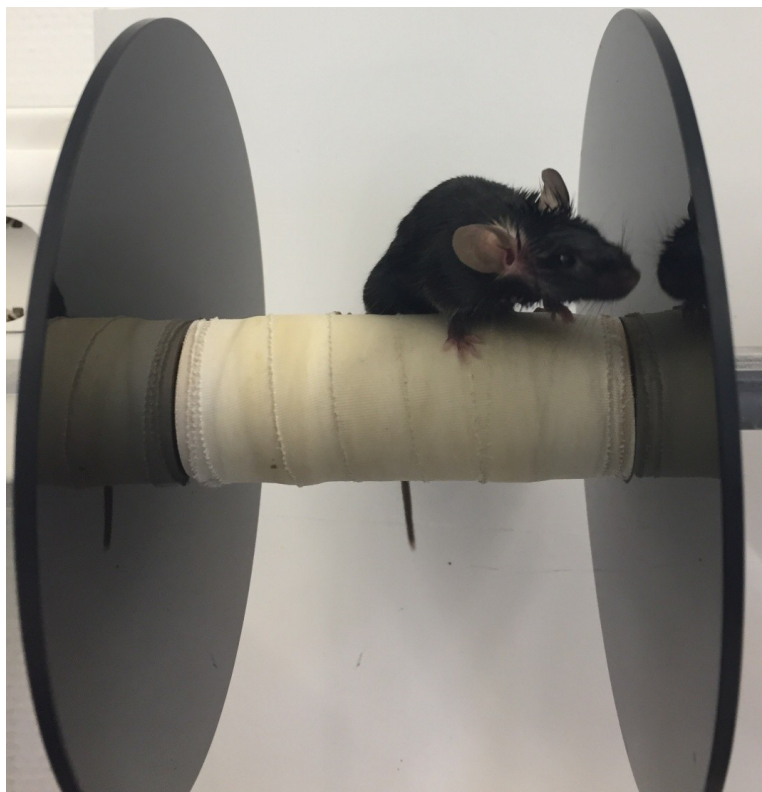


Abb. 7: Maus auf dem RotaRod

3.4.7. WaterMaze-Test

Der WaterMaze-Test ist eine Untersuchungsmethode für Nagetiere zur Bewertung des räumlichen Lernvermögens sowie der Reproduzierbarkeit des Erlernten [32]. Es handelt sich um einen Schwimmtest, bei welchem die Versuchstiere binnen einer bestimmten Zeit eine Plattform erreichen sollen. Als Schwimmbecken diente uns ein Bassin mit 60cm Durchmesser. Dieses wurde bis zu einer Höhe von 15cm mit Wasser gefüllt. Somit war es den Versuchstieren unmöglich sich vom Boden des Beckens abzustützen. Als Plattform verwendeten wir einen Stein mit einer Oberfläche von 5x5cm, welcher sich 1cm unterhalb der Wasseroberfläche befand. Der Rand des Bassins war an 3 verschiedenen Stellen visuell markiert. Das Versuchsprotokoll bestand aus einer Vorbereitungsphase von 6 Tagen, welche eine Woche vor dem Reanimationsversuch begann. Am Versuchstag durchliefen die Tiere 5 aufeinander folgende Schwimmversuche, von jeweils maximal 120 Sekunden Dauer. Gemessen wurde die Zeit vom Einsetzen in das Wasser, Blickrichtung von der Plattform weggerichtet, bis zum Sitzen auf der Plattform. Sollte dies nicht binnen 120 Sekunden erreicht worden sein, wurde das Tier vorsichtig Richtung Plattform geschoben und eine Orientierungszeit von 10 Sekunden (s) gewährt. Zwischen den Versuchen erhielten die Tiere eine Minute (min) Pause. Ab dem 4. Tag der Vorbereitung wurde das Wasser zusätzlich durch das Hinzufügen von Milch eingefärbt. Hierdurch konnte die Plattform nicht mehr gesehen werden und eine Orientierung war nur noch anhand der Außenmarkierungen möglich. Nach erfolgtem Herz-Kreislaufstillstand wurden die überlebenden Tiere für eine erneute Durchführung dieses Tests evaluiert. Als Teilnahmekriterien nach der Reanimation galt für alle Tiere eine absolute Gewichtszunahme zum Vortag, das Vorhandensein eines guten AZ mit 0 Punkten und eines NeuroScores von 12. Weiterhin mussten die Versuchstiere mindestens 1mal 300s ununterbrochen auf dem RotaRod verbracht haben. Sollte eines dieser Kriterien nicht erfüllt sein, wurde zum Schutz des Tieres vom Versuch abgesehen und am nächsten Tag neu evaluiert. Es wurde unter denselben Voraussetzungen die frühestmögliche erneute Versuchsteilnahme ausgewertet, um die Reproduzierbarkeit bereits erlernten Wissens abzuprüfen. Am 10.-15. Tag nach Reanimation wurde die Plattform auf eine neue Position versetzt und der Versuch unter sonst gleichen Bedingungen durchgeführt. Diese abgeänderte Versuchsanordnung sollte die Frage beantworten

ob die überlebenden Tiere in der Lage sind, eine neue Position der rettenden Plattform zu erlernen.



Abb. 8: Maus in dem WaterMaze

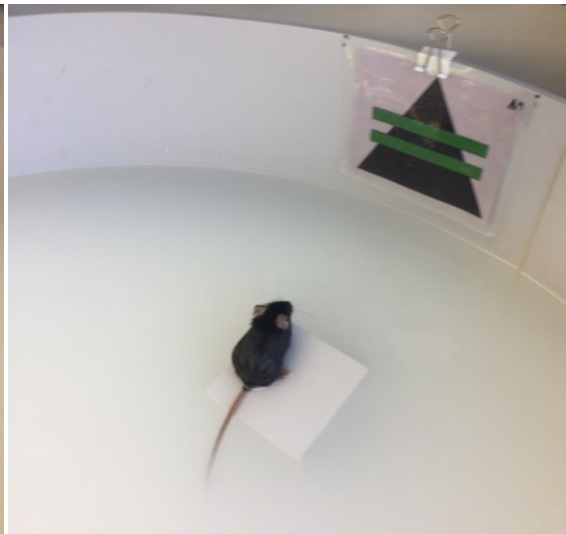


Abb. 9: Maus nach dem Auffinden der Plattform

| Voraussetzung zur Teilnahme am WaterMaze-Test | |
|--|------------------|
| volle Punktzahl im NeuroScore | 12 von 12 Punkte |
| einer von drei Versuchen im RotaRod-Test ohne Herunterfallen | [300]s |
| Zunahme des Körpergewichts | |
| Keine subjektiven Zeichen von Beeinträchtigung (AZ) | 0 |

Tab. 4: Voraussetzungen zur Teilnahme am WaterMaze-Test

3.4.8. Adhesive-Removal-Test

Der Adhesive-Removal-Test ist eine Untersuchungsmethode, um Langzeitfolgen nach Hirnschäden bei Mäusen festzustellen. Hierzu wurde dem Versuchstier ein rundes Pflaster (Omnifix elastic, Hartmann Group, Heidenheim, Deutschland) mit einem Durchmesser von 0,5x0,5cm auf die Innenseite der linken Vorderpfote geklebt. Die Maus wurde in die Versuchswanne (60x60cm Durchmesser, 45cm Höhe) gesetzt und zunächst die Zeit gemessen, die das Tier benötigt, um das erste Mal das Pflaster zur Schnauze zu führen (time-to-contact). Im Anschluss stoppten wir die Zeit, die das Tier benötigte, um sich selbständig das Pflaster von der Pfote zu entfernen (time-to-removal). Um zusätzlichen Ablenkungen zu minimieren, wurden die Tiere vor Versuchsbeginn bereits 5 Minuten an die

Versuchswanne gewöhnt. Um sicher zu stellen, dass die Versuchstiere grundsätzlich in der Lage sind, diese Aufgabe durchzuführen, wurde an den Tagen 7 bis 2 vor der Reanimation eine Trainingsphase durchlaufen, in der jeweils eine Messung durchgeführt wurde. Konnte das Pflaster nicht binnen 300 Sekunden entfernt werden, wurde der Durchlauf abgebrochen und am nächsten Tag erneut durchgeführt. Im Anschluss an die Reanimation wurde der Versuch an den Tagen 1, 3, 5, 9, 14 und 28 unter denselben Bedingungen durchgeführt. Nach jedem Versuchsdurchlauf wurde die Wanne mit 70%igem Ethanol gereinigt um Irritation durch Fremdgerüche zu vermeiden.



Abb. 10: Versuchstier vor Adhesive-Removal-Test

3.4.9. Elevated Plus Maze

Der Elevated Plus Maze ist ein weit verbreiteter Test zur Untersuchung von Neugierde und Angstverhalten bei Nagetieren, speziell Mäusen [33]. Die Tiere wurden hierbei auf ein Kreuz aus Plastikstreben gesetzt, welches sich in 50cm Höhe befand. Jeder der vier Arme hat eine Länge von 50cm. Zwei sich gegenüberliegende Arme waren offen, die anderen beiden mit 20cm hohen Wänden umschlossen. Das Verhalten der Tiere wurde mit einer Videokamera dokumentiert und anschließend ausgewertet. Das Versuchstier wurde mit Blickrichtung zu einem geschlossenen Arm in der Mitte des Kreuzes platziert. Die Testzeit betrug pro Versuch 5 Minuten, in denen das Tier sich frei auf dem Kreuz bewegen konnte. Es wurde ausgewertet, wieviel Wegstrecke das Tier insgesamt auf dem Kreuz zurück legte, sowie die Zeit, die es auf den offenen Armen verbrachte. Als Betreten galt ein Bereich dann, wenn sich alle vier Pfoten auf dem jeweiligen Arm befanden. Weiterhin zählten wir, wie oft das Tier sich über den Rand des offenen Armes beugte und wie häufig es sich im geschlossenen Arm aufrichtete. Nach Abschluss jedes Durchlaufes reinigten wir das Kreuz mit 70%igem Ethanol. Der Versuch wurde zur Ermittlung eines Ausgangswertes einen Tag vor sowie an den Tagen 3, 10 und 28 nach der Reanimation durchgeführt.

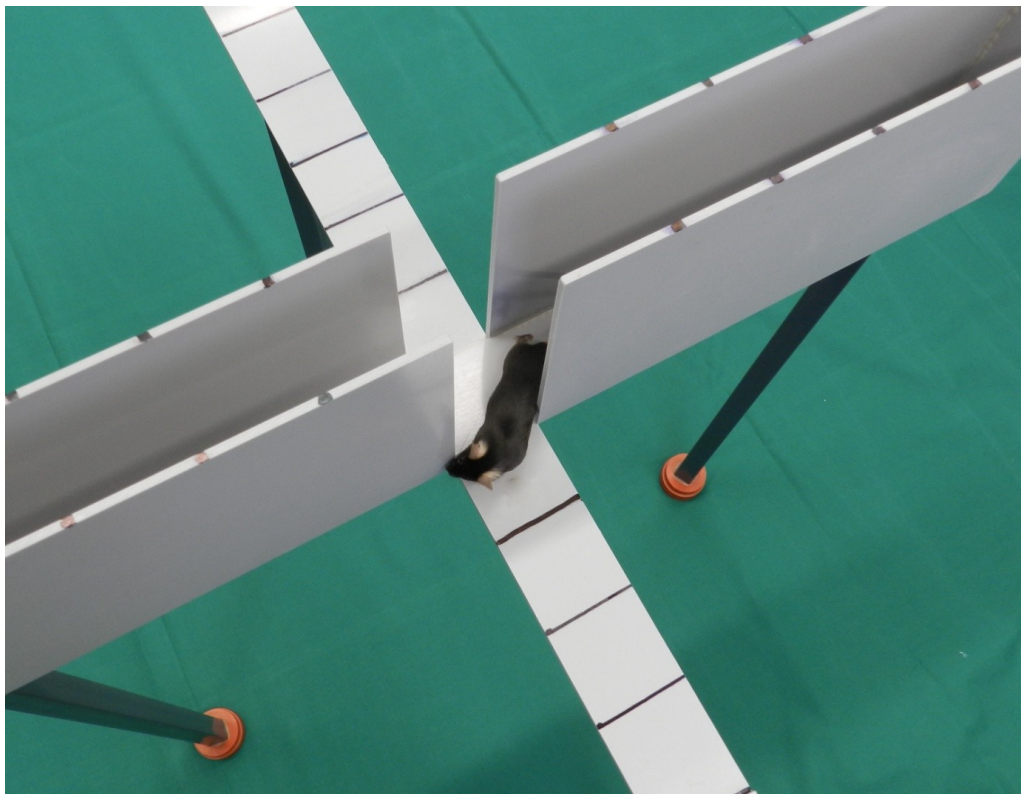


Abb. 11: Maus auf dem Elevated Plus Maze

3.4.10. Auswertung und Statistik

Mittels log-rank wurden die Daten für die Kaplan-Meier-Überlebenskurve bewertet. Mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests wurden alle Werte auf Normalverteilung geprüft. Weiterhin wurden der Student's t-Test, der ANOVA- Test und der Rangsummentest nach Mann- Whitney verwendet.

Die Werte sind mit Mittelwert \pm Standardabweichung (σ) bei Normalverteilung angegeben. Bei Nichtnormalverteilung wurden die Ergebnisse mit Median und Interquartilabständen (25% - 75%) angegeben. Die unterschiedliche Versuchstierzahl nach Reanimation beim WaterMaze-Test wurde durch den Chi-Quadrat-Test bewertet.

Für die statistische Auswertung und Darstellung wurden die Programme SigmaStat 4.0 und SigmaPlot 13.0 (Jandel Corporation, San Rafale, CA, USA) verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Gruppengröße/ Ausschlusskriterien

In die Untersuchung zu Langzeitüberleben und funktionell-neurologischem Outcome nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation wurden insgesamt 96 Tiere eingeschlossen. Die Tiere der zwei Kontrollgruppen NaCl und ClinOleic sowie der Interventionsgruppe Artesunate. In jeder der drei Gruppen wurden 32 Tiere ausgewertet. Nach vorher festgelegten Kriterien wurden insgesamt 21 Tiere aus dem Versuch ausgeschlossen. Dazu gehörten Probleme während der Präparation, wie Fehlintonation, Abriss der V. jug. externa, erhöhter Blutverlust, oder Katheterdislokation unter Reanimation. Eine erfolglose Reanimation zählte nicht zu den Ausschlusskriterien. Bei allen eingeschlossenen Tieren konnte nach Reanimation ein Spontankreislauf erzielt und die Nachfolgeuntersuchungen durchgeführt werden.

| Gruppenzuordnung der Versuchstiere nach Präparation | | | | |
|---|---------------|------------------------|--------------------------|------|
| NaCl | CA/CPR 10 min | NaCl 0,9% | Überleben und Neurotests | n=32 |
| ClinOleic | CA/CPR 10 min | ClinOleic 20% | Überleben und Neurotests | n=32 |
| Artesunate | CA/CPR 10 min | Artesunate 1,2 mg/kgKG | Überleben und Neurotests | n=32 |

Tab. 5: Gruppenzuordnung der Versuchstiere nach Präparation

4.2. Zeit bis ROSC und Extubation

Zehn Minuten nach eingetretenem Herz-Kreislaufstillstand wurde begonnen, die Zeit bis zum Wiedereinsetzen des Spontankreislaufes zu messen. Primär konnten alle Tiere der 3 Versuchsgruppen erfolgreich wiederbelebt werden (ROSC-Rate 100%). Die Zeit bis zum Wiedereintritt des Spontankreislaufes konnte mittels EKG-Ableitung und Pulsdruckkurve über der Schwanzarterie verifiziert werden. Die Zeit vom eingetretenen ROSC bis zur Extubation wurde als Weaningzeit gemessen. Zwischen den Untersuchungsgruppen konnte kein deutlicher Unterschied nachgewiesen werden.

| Zeit bis zum Eintritt des ROSC [s] und Weaningzeit [min] | | | |
|--|-------------------|-------------------|-----------------|
| | NaCl | ClinOleic | Artesunate |
| t bis ROSC (s) | 62,5 [45 - 83,75] | 60 [45 - 75] | 65 [60 - 83,75] |
| Weaningzeit (min) | 150 [135 - 165] | 143,5 [135 - 180] | 150 [135 - 165] |

Tab. 6: Zeit bis zum Eintritt des ROSC und Weaningzeit; Statistik ANOVA

4.3. Herzfrequenz und MAP

Herzfrequenz

Vor Herz-Kreislaufstillstand ergab die Messung der Herzfrequenz bei allen Tieren einen ähnlichen Ausgangswert. 60 Minuten nach eingetretenem ROSC zeigte sich bei allen Gruppen insgesamt ein Frequenzanstieg. Bei der NaCl-Gruppe wurde die geringste ($346 \pm 12,93_{1/\text{min}}$), bei der Artesunate-Gruppe ($401 \pm 14,22_{1/\text{min}}$) der höchste Herzfrequenz gemessen. Auch in den Folgemessungen nach 120 und 240 Minuten zeigten die Artesunate-Tiere die höchste Herzfrequenz, mit deutlichem Unterschied zur NaCl-Gruppe bei 120min nach ROSC.

| Herzfrequenz nach Eintritt des ROSC [1/min] | | | |
|---|-----------------|-----------------|-------------------|
| Zeit nach ROSC (h) | NaCl | ClinOleic | Artesunate |
| 0 | 225 [208 - 243] | 220 [205 - 234] | 230 [200 - 280] |
| 1 | 323 [300 - 390] | 395 [320 - 430] | 410 [367 - 455]* |
| 2 | 250 [208 - 313] | 280 [220 - 330] | 325 [250 - 405]** |
| 3 | 305 [203 - 345] | 315 [275 - 423] | 445 [340 - 480] |

Tab. 7: Herzfrequenz nach Eintritt des ROSC; Statistik ANOVA

1h Artesunate vs. NaCl *p<0,05; 2h Artesunate vs. NaCl **p<0,05

MAP

Die Blutdruckmessung nach erfolgreicher Reanimation zeigte in allen Gruppen einen Abfall des Mitteldrucks im Vergleich zu den Messungen vor Herz-Kreislaufstillstand. Ein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen konnte nicht nachgewiesen werden.

| MAP nach Eintritt des ROSC [mmHg] | | | |
|-----------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| Zeit nach ROSC (h) | NaCl | ClinOleic | Artesunate |
| 0 | 80 [75 - 90] | 80 [75 - 85] | 75 [70 - 90] |
| 1 | 60 [55 - 68] | 60 [58 - 68] | 65 [58 - 70] |
| 2 | 60 [58 - 70] | 60 [55 - 65] | 55 [50 - 60] |
| 3 | 65 [61 - 69] | 55 [51 - 74] | 63 [60 - 65] |

Tab. 8: MAP nach Eintritt des ROSC; Statistik ANOVA

4.4. Temperaturmanagement

Vor und während der Reanimation erfolgte bis zur Extubation die Temperaturmessung über eine rektale Temperatursonde. Die Temperaturmessung nach CA/CPR erfolgte wie beschrieben mit einer Infrarotkamera. Der leichte Abfall der Körpertemperatur nach ca. 3 Stunden war bedingt durch den Umgebungswechsel des Tieres von der rückgekoppelten Heizplatte in das temperaturregulierte Terrarium. Die Messungen ergaben, dass die Tiere durch den Aufenthalt im beheizten Terrarium auch nach Reanimation nicht mit ihrer Körpertemperatur abfielen. Zwischen den Gruppen ergaben sich im gesamten Verlauf keine Unterschiede in der Körpertemperatur.

| Körpertemperatur der Versuchstiere [°C] | | | |
|--|-------------------|------------------|-------------------|
| | NaCl | ClinOleic | Artesunate |
| prä CPR | 35,8 [35,5-36,0] | 36 [35,2-36,4] | 35,7 [34,8-35,9] |
| Zeit nach ROSC [h] | | | |
| 0 | 36,0 [35,7-36,0] | 36,0 [35,8-36,0] | 35,8 [35,8-36,0] |
| 1 | 36,0 [36,0-36,1] | 36,0 [35,9-36,1] | 36,0 [36,0-36,1] |
| 2 | 36,0 [36,0-36,0] | 36,0 [36,0-36,1] | 36,0 [36,0-36,1] |
| 3 | 35,9 [34,6-36,1] | 36,0 [34,6-36,2] | 35,8 [35,2-36,1] |
| 4 | 35,3 [34,7-36,0] | 35,3 [34,2-36,3] | 35,7 [34,8-35,9] |
| 8 | 35,2 [34,0-35,7] | 35,2 [33,6-35,6] | 34,7 [33,9-35,3] |
| 12 | 34 ,5 [34,0-35,8] | 34,6 [34,3-35,9] | 35,0 [34,5-36,2] |
| 24 | 35,9 [34,7-36,6] | 35,0 [33,5-36,7] | 35,5 [34,2-36,5] |
| 36 | 34,9 [33,1-35,9] | 35,5 [34,4-37,1] | 35,4 [34,5-36,7] |
| 48 | 34,9 [31,2-35,5] | 35,4 33,2-36,7] | 35,6 [34,1-37,1] |
| 60 | 35,7 [35,0-36,4] | 36,4 [36,4-36,4] | 35,1 [34,4-36,8] |
| 72 | 36,1 [32,9-36,9] | 36,9 [32,2-37,6] | 36,1 [33,1-36,5] |

Tab. 9: Körpertemperatur der Versuchstiere; Statistik ANOVA

4.5. Überleben

Im Nachbeobachtungszeitraum von 28 Tagen ergab sich im Überleben der Versuchstiere kein Unterschied zwischen den Gruppen (NaCl 12/32, 37,5% vs. ClinOleic 9/32, 28,1% vs. Artesunate 8/32, 25,0% $p>0,05$).

Die nicht überlebenden Tiere der NaCl-Gruppe verstarben mit einer Ausnahme binnen der ersten vier Tage nach Reanimation. Das letzte Tier erlag am 22. Tag den Folgen der Reanimation. Die Tiere der ClinOleic-Gruppe verstarben bis zum 10. Tag, die der Artesunate-Gruppe bis einschließlich dem 20. Tag nach Reanimation.

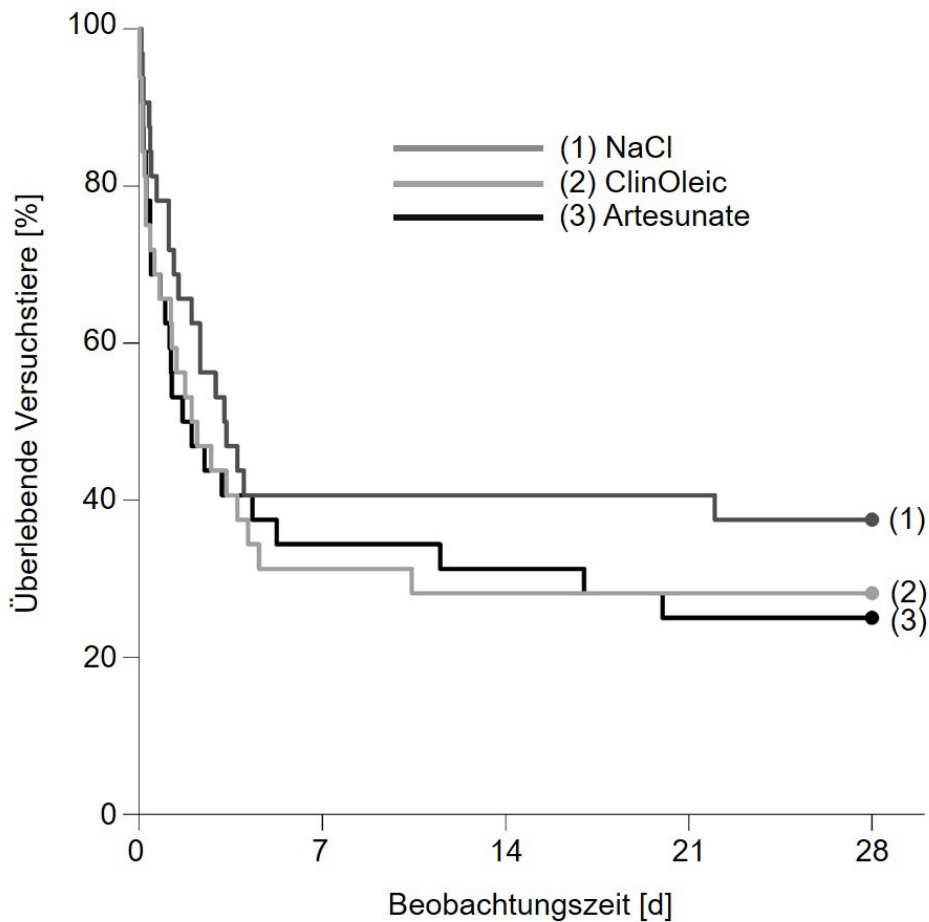


Abb. 12: Kaplan-Meier-Kurve nach 28 Tagen; Statistik Log-Rank-Test

4.6. Funktionell-neurologische Untersuchung

4.6.1. Körpergewicht

In den täglichen Messungen zeigte sich ein Verlust des relativen Körpergewichtes in allen Gruppen in den ersten 3 Tagen nach Reanimation um ca. 20% des Ausgangsgewichtes (NaCl $80,62 \pm 1,38\%$ vs. ClinOleic $80,09 \pm 1,98\%$ vs. Artesunate $80,36 \pm 1,81\%$;). Ab dem vierten Tag legten die überlebenden Tiere aller Gruppen wieder an Gewicht zu. Ab Tag 4 zeigte sich ein Rückstand des Körpergewichtes bei den Tieren der Artesunate-Gruppe ($82,70$ [$73,5-89,8$])% verglichen mit der ClinOleic-Gruppe ($83,70$ [$70,38-89,20$])% und der NaCl-Gruppe ($86,65$ [$80,15-88,73$])%, welcher als Tendenz auch im Verlauf der Untersuchung beobachtet werden konnte. Im 4-wöchigen Verlauf der Untersuchung stieg das relative Körpergewicht bei den überlebenden Tieren in allen drei Gruppen als Zeichen der Erholung wieder an und erreichte annähernd den Ausgangswert. Nach 28 Tagen war kein Unterschied mehr zwischen den Gruppen festzustellen. Die Artesunate-Gruppe erreichte $98,50$ [$95,35-100,98$]%, die ClinOleic-Gruppe $97,80$ [$93,95-103,40$]% und die NaCl-Gruppe $97,25$ [$93,58-99,93$]% ihres Ausgangsgewichtes.

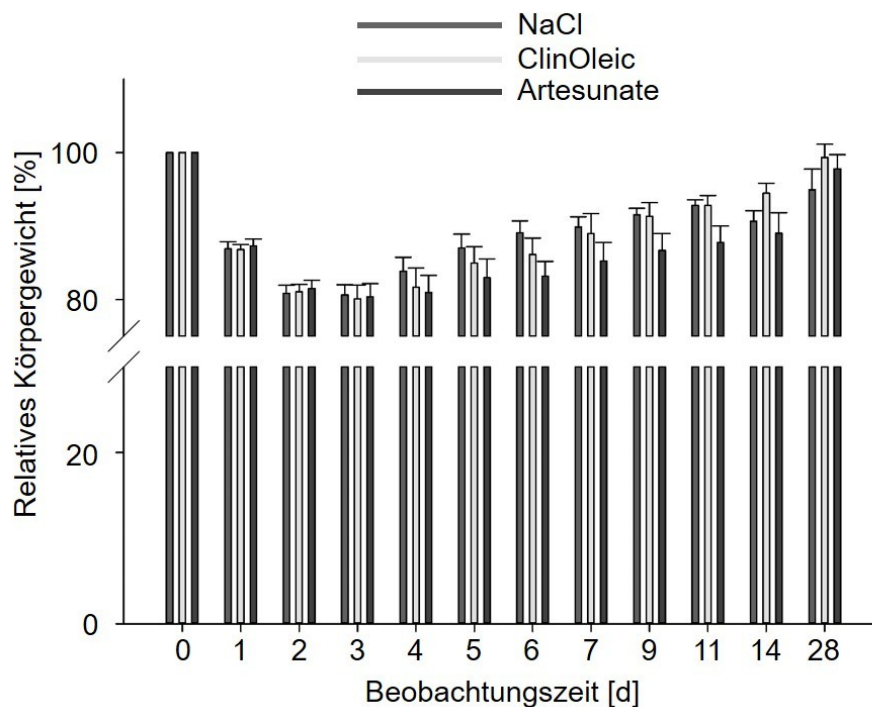


Abb. 13: Relatives Körpergewicht im Beobachtungszeitraum

| Relatives Körpergewicht im Beobachtungszeitraum | | | |
|--|---------------------|----------------------|----------------------|
| [% zum Ausgangsgewicht] | | | |
| Tag | NaCl | ClinOleic | Artesunate |
| 0 | 100 | 100 | 100 |
| 1 | 87,00 [84,13-90,53] | 86,80 [84,93-89,20] | 87,00 [84,60-88,65] |
| 2 | 79,20 [76,98-84,33] | 80,10 [77,60-84,78] | 80,70 [77,70-84,40] |
| 3 | 81,10 [77,00-85,30] | 79,10 [75,90-87,60] | 78,30 [75,70-85,70] |
| 4 | 86,65 [80,15-88,73] | 83,70 [70,38-89,2] | 82,70 [73,5-89,80] |
| 5 | 88,80 [86,45-90,35] | 86,75 [81,55-88,63] | 82,70 [73,50-89,80] |
| 6 | 90,80 [87,50-93,20] | 86,75 [82,08-90,00] | 83,80 [76,20-89,40] |
| 7 | 90,75 [87,50-93,93] | 89,50 [82,13-97,60] | 89,90 [76,30-92,80] |
| 9 | 91,90 [88,55-94,10] | 92,50 [85,5-95,98] | 88,1 [78,70-92,30] |
| 11 | 90,50 [89,05-92,65] | 92,40 [91,50-95,85] | 90,80 [83,20-92,70] |
| 14 | 92,00 [88,90-94,00] | 94,20 [92,50-97,85] | 91,50 [85,60-95,08] |
| 28 | 97,25 [93,58-99,93] | 97,80 [93,95-103,40] | 98,50 [95,35-100,98] |

Tab. 10: Relatives Körpergewicht im Beobachtungszeitraum; Statistik ANOVA

4.6.2. Allgemeinzustand

Der Allgemeinzustand der Tiere wurde jeden Tag als subjektiver Parameter des Wohlbefindens erhoben. Am Tag der Reanimation waren alle Tiere in einem sehr guten Zustand und erhielten die Punktzahl 0. Am Tag 1 nach Reanimation zeigten alle überlebenden Tiere der 3 Gruppen einen eingeschränkten Allgemeinzustand (Artesunate 1 [1-2]; ClinOleic 1 [1-2]; NaCl 1 [1-2]) als Zeichen ihrer Beeinträchtigung. Am Tag 5 nach CA/CPR erreichten bereits alle drei Gruppen ein gutes bis sehr gutes Ergebnis (Artesunate 0 [0-1]; ClinOleic 0 [0-0]; NaCl 0 [0-0]). Ab dem 7. Tag nach Reanimation erreichten die überlebenden Tiere aller Gruppen ein sehr gutes Ergebnis.

| Allgemeinzustand im Beobachtungszeitraum [Punkte] | | | |
|---|---------|-----------|------------|
| Tag | NaCl | ClinOleic | Artesunate |
| 0 | 0 [0-0] | 0 [0-0] | 0 [0-0] |
| 1 | 1 [1-2] | 1 [1-2] | 1 [1-2] |
| 2 | 1 [0-2] | 1 [1-2] | 1 [1-2] |
| 3 | 1 [0-2] | 1 [0-2] | 1 [0-2] |
| 5 | 0 [0-0] | 0 [0-0] | 0 [0-1] |
| 7 | 0 [0-0] | 0 [0-0] | 0 [0-0] |
| 9 | 0 [0-0] | 0 [0-0] | 0 [0-0] |
| 11 | 0 [0-0] | 0 [0-0] | 0 [0-1] |
| 14 | 0 [0-0] | 0 [0-0] | 0 [0-1] |
| 28 | 0 [0-0] | 0 [0-0] | 0 [0-0] |

Tab. 11: Allgemeinzustand im Beobachtungszeitraum; Statistik ANOVA

4.6.3. NeuroScore

Alle Tiere wurden vor der Reanimation neurologisch untersucht und zeigten kein Defizit. 4 Stunden nach CA/CPR erreichte die ClinOleic-Gruppe mit 3 [3-4] Punkten das schlechteste Ergebnis mit deutlichem Unterschied zur NaCl-Gruppe 4 [4-5] *p<0,05. Bereits 8 Stunden nach Reanimation glichen sich die Messwerte der Gruppen mit jeweils 8 Punkten im Median wieder an. Im Verlauf des 1. Tages nach CA/CPR kam es zu einer weiteren Zunahme der erreichten Punkte in allen Gruppen. Die Tiere der Artesunate-Gruppe erreichten mit 10 [10-12] Punkten das schlechteste Ergebnis. Ab Tag 7 nach Reanimation erreichten alle untersuchten Tiere einen NeuroScore von 12 Punkten. Über den gesamten Beobachtungszeitraum konnte kein Unterschied in den Ergebnissen nachgewiesen werden.

| Neuroscore im Beobachtungszeitraum [Punkte] | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|
| Zeit nach ROSC | NaCl | ClinOleic | Artesunate |
| 4 h | 4 [4 – 5]* | 3 [3 – 4] | 4 [3 – 5] |
| 8 h | 8 [6 – 9] | 8 [7 – 9] | 8 [6 – 8] |
| 12 h | 10 [9 – 10] | 10 [9 – 11] | 10 [8 – 11] |
| 1 d | 11 [10 – 12] | 11 [10 – 12] | 10 [10 – 12] |
| 2 d | 11 [11 – 12] | 12 [10 – 12] | 12 [10 – 12] |
| 3 d | 12 [11 – 12] | 12 [11 – 12] | 12 [12 – 12] |
| 5 d | 12 [12 – 12] | 12 [12 – 12] | 12 [12 – 12] |
| 7 d | 12 [12 – 12] | 12 [12 – 12] | 12 [12 – 12] |
| 9 d | 12 [12 – 12] | 12 [12 – 12] | 12 [12 – 12] |
| 11 d | 12 [12 – 12] | 12 [12 – 12] | 12 [12 – 12] |
| 14 d | 12 [12 – 12] | 12 [12 – 12] | 12 [12 – 12] |
| 28 d | 12 [12 – 12] | 12 [12 – 12] | 12 [12 – 12] |

Tab. 12: Neuroscore im Beobachtungszeitraum; Statistik ANOVA

4h NaCl vs. ClinOleic *p<0,05

4.6.4. RotaRod-Test

In der Vorbereitungsphase zeigten die Tiere aller drei Gruppen keine Unterschiede in Laufzeit, Geschicklichkeit, motorischer Kraft und Ausdauer auf dem Prüfstand. Weiterhin konnte eine Verbesserung der Ergebnisse über 3 Tage bis zur Reanimation beobachtet werden. 2 Tage vor CA/CPR erreichten die Tiere der Artesunate-Gruppe 397 [135-608]s, die der ClinOleic Gruppe 297 [44-592]s und die der NaCl-Gruppe 192 [55-453]s Laufzeit. Am Tag der Reanimation zeigte sich der Gewöhnungs- und Lerneffekt indem alle Gruppen im Median die volle Laufzeit (Artesunate 900 [851-900]s; ClinOleic 900 [788-900]s; NaCl 900 [762-900]s) absolvieren konnten.

An Tag 1 nach Reanimation zeigte sich eine deutliche Einschränkung der Laufleistung, verglichen mit den Ausgangswerten. Die Artesunate-Tiere erreichten 49 [6-459]s, die NaCl-Tiere im Median 53 [14-433]s. Die Tiere der ClinOleic-Gruppe erreichten eine Laufzeit von 113 [13-330]s. Innerhalb aller Gruppen zeigte sich ein deutlicher Leistungsunterschied der Versuchstiere. In den Folgetagen ergab sich für alle Gruppen eine Steigerung der Gesamtlaufzeit, allerdings weiterhin mit messbaren Unterschieden innerhalb der Gruppen. Am Tag 3 nach Reanimation erreichten bereits die ersten Tiere die volle Laufzeit von 900 Sekunden (Artesunate 491 [10-900]s; ClinOleic 697 [79-900]s; NaCl 521 [188-874]s). Am 7. Tag nach Reanimation kam es in der Artesunate-Gruppe (517 [29-900]s) zu einem deutlichen Einbruch der Laufleistung im Vergleich zum Vortag an dem die Tiere im Median bereits 900 [333-900] Sekunden schafften. Am 9. Beobachtungstag erzielten alle Gruppen die volle Laufzeit (Artesunate 900 [636-900]s; ClinOleic 900 [523-900]s; NaCl 900 [900-900]s). Diese Leistung in Bezug auf Geschicklichkeit, motorische Kraft und Ausdauer blieb über den gesamten Verlauf konstant. Ein Unterschied zwischen den Gruppen war nicht nachweisbar.

| RotaRod-Ergebnisse im Beobachtungszeitraum [s] | | | |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|
| Tag | NaCl | ClinOleic | Artesunate |
| -1 | 756 [603 – 900] | 900 [526 – 900] | 900 [705 – 900] |
| 0 | 900 [782 – 900] | 900 [792 – 900] | 900 [854 – 900] |
| 1 | 52 [14 – 433] | 113 [13 – 330] | 49 [6 – 459] |
| 2 | 301 [81 – 404] | 251 [11 – 575] | 207 [9 – 574] |
| 3 | 521 [188 – 874] | 697 [79 – 900] | 491 [10 – 900] |
| 5 | 858 [496 – 900] | 635 [125 – 850] | 900 [333 – 900] |
| 7 | 900 [855 – 900] | 795 [322 – 900] | 517 [29 – 900] |
| 9 | 900 [900 – 900] | 900 [523 – 900] | 900 [636 – 900] |
| 11 | 900 [900 – 900] | 900 [767 – 900] | 900 [201 – 900] |
| 14 | 900 [900 – 900] | 900 [900 – 900] | 900 [390 – 900] |
| 28 | 900 [696 – 900] | 900 [900 – 900] | 900 [698 – 900] |

Tab. 13: RotaRod-Ergebnisse im Beobachtungszeitraum; Statistik ANOVA

4.6.5. WaterMaze-Test

In der Vorbereitungsphase von 7 Tagen vor CA/CPR durchliefen alle Tiere den Watermaze-Test. Am 1. Versuchstag benötigten die Tiere im Median 15 [7-30]s für das Auffinden der Plattform. Im Verlauf der Trainingsphase erreichten die Tiere den Stein langsamer, mit einer Zeit von 20 [6-120]s * $p < 0,05$. Es konnte somit kein Lernerfolg festgestellt werden. Die Tiere zeigten in ihrem Schwimmverhalten jedoch eine Entwicklung innerhalb der Vorbereitungsphase. Es zeigte sich, dass die Tiere mit zunehmenden Schwimmversuchen häufiger nur im Wasser trieben und umherschauten ohne Anstrengungen zu unternehmen auf die Plattform zu gelangen. Hierdurch wurde vermehrt das Abbruchkriterium von 120 Sekunden erreicht.

Nach dem Herz-Kreislaufstillstand erfüllten die überlebenden Tiere aller Gruppen im Median ab dem fünften Tag wieder die Kriterien zur Teilnahme am Watermaze-Test. Am ersten Versuchstag nach Reanimation zeigte sich eine deutliche Leistungssteigerung der NaCl-Tiere (15 [12-49]s; § $p < 0,05$) verglichen mit den Ergebnissen vor der Reanimation. Die Tiere der Artesunate-Gruppe (24 [10-120]s) und der ClinOleic-Gruppe (20 [7-106]s) erreichten ähnliche Werte wie in den Voruntersuchungen. An den folgenden Versuchstagen entwickelten die Artesunate-Tiere (103 [9-120]s) tendenziell eine verlängerte Zielzeit, verglichen mit den Vorwerten und den Kontrollgruppen (ClinOleic 41 [18-120]s; NaCl 18 [5-118]s).

Am Tag der ersten Konfrontation mit einer neuen Position der Plattform nach Reanimation erreichten die Artesunate-Tiere den Stein nach 28 [14-120]s, die ClinOleic-Tiere nach 51 [14-120]s und die NaCl-Tiere nach 18 [13-31]s. Tendenzuell zeigte sich in der NaCl-Gruppe ein besseres Ergebnis. Am 2. Tag des Schwimmens mit neuer Position setzte sich diese Tendenz mit einer Verbesserung der NaCl-Tiere auf 9 [6-23]s und einer deutlichen Verschlechterung der Artesunate-Tiere auf 120 [84-120]s fort. Die Zielzeit der ClinOleic-Tiere blieb konstant. In den Folgetagen blieben die Ergebnisse der Gruppen im Verhältnis unverändert. Die Artesunate-Tiere erreichten die Plattform am Versuchstag 5 mit 120 [83-120] Sekunden. Damit waren sie langsamer als die ClinOleic-Tiere (38 [12-92]s) und deutlich langsamer als die NaCl-Tiere (10 [4-34]s; § $p < 0,05$). Insgesamt zeigte sich zum Ende der Untersuchung kein deutlicher Lernerfolg einer der drei Gruppen. Eine Tendenz ist jedoch in den Gruppen NaCl und ClinOleic auszumachen.

| Zeiten [s] und Teilnahmetage [d] am WaterMaze-Test | | | | |
|--|--|-------------------------|-------------|--------------|
| vor CA/CPR | | Tiere aller Gruppen | | |
| Tag -7 (Zeit [s]) | | 15 [7-30] | | |
| Tag -2 (Zeit [s]) | | 20 [6-120]* | | |
| nach CA/CPR | | NaCl | ClinOleic | Artesunate |
| Tag X (Zeit [s]) | | 15 [12-49] [§] | 20 [7-106] | 24 [10-120] |
| Tag X + 2 (Zeit [s]) | | 18 [5-118] | 41 [18-120] | 103 [9-120] |
| Tag 10 (Zeit [s]) | | 18 [13-31] | 51 [14-120] | 28 [14-120] |
| Tag 14 (Zeit [s]) | | 10 [4-34] [§] | 38 [12-92] | 120 [83-120] |
| Tag 15 (Zeit [s]) | | 10 [4-55] | 15 [5-80] | 68 [9-120] |
| Teilnahme insg. (n) | | 13 | 10 | 8 |
| Tag X (d) | | 5 [5-5] | 5 [5-7] | 5 [5-5] |

Tab. 14: Zeiten und Teilnahme am WaterMaze-Test; Statistik ANOVA und Wilcoxon signed-rank Test

Tag -7 vs Tag -2 * $p < 0,05$; NaCl Tag X vs. Tag -2 [§] $p < 0,05$;
 Tag 14 NaCl vs. Artesunate [§] $p < 0,05$

4.6.6. Elevated Plus Maze

Zurückgelegte Distanz

Zur Erfassung der Distanz wurde die Strecke in cm gemessen, welche die Tiere sowohl in den offenen als auch in den geschlossenen Bereichen des Kreuzes gelaufen sind. An Tag 1 vor Reanimation erreichten die Tiere aller drei Gruppen vergleichbare Distanzen (Artesunate 370 [245-430]cm; ClinOleic 300[225-385]cm; NaCl 295 [186-388]cm). Dabei wurden sowohl offene als auch geschlossene Bereiche durchlaufen, wobei insgesamt eine längere Distanz in den geschlossenen Teilen des Mazes zurückgelegt wurde. Am 3. Tag nach CA/CPR durchliefen die überlebenden Tiere erneut das Elevated Plus Maze. Die Tiere aller drei Gruppen erreichten im Median eine deutlich geringere Laufstrecke als vor der Reanimation. Am 10. Tag nach Reanimation blieben die erreichten Laufstrecken der Artesunate- (143 [75-421]cm) und der ClinOleic-Tiere (215 [88-320]cm) annähernd gleich. Die Tiere der NaCl-Gruppe verbesserten sich auf 215 [101-301]cm Gesamtstrecke. Die Werte der beiden Kontrollgruppen zeigten sich am letzten Tag der Nachbeobachtung

weiter konstant. Die Artesunate-Tiere verbesserten sich im Verlauf der Nachbeobachtung auf eine Gesamtstrecke von 260 [105-435]cm. Alle Gruppen blieben in der Nachbeobachtung unter den Laufstrecken, welche sie vor Reanimation erreichten.

| zurückgelegte Strecke im Elevated Plus Maze [cm] | | | |
|--|---------------|---------------|---------------|
| Tag | NaCl | ClinOleic | Artesunate |
| -1 | 295 [186-388] | 300 [225-385] | 370 [245-430] |
| 3 | 155 [28-268] | 218 [95-343] | 150 [50-440] |
| 10 | 215 [101-310] | 215 [88-320] | 143 [75-421] |
| 28 | 225 [138-341] | 200 [125-402] | 260 [105-435] |

Tab. 15: zurückgelegte Strecke im Elevated Plus Maze; Statistik ANOVA

Zeit im offenen Arm

Vor Reanimation konnte kein Unterschied in den Zeiten festgestellt werden, die sich die Tiere auf den offenen Armen aufhielten. Es zeigte sich bei allen Gruppen nur ein geringes Interesse am Betreten der offen Arme. Am 3. Tag nach CA/CPR zeigte sich ein unverändertes Ergebnis der Zeiten im offenen Teil verglichen mit den Zeiten vor Reanimation (Artesunate 0 [0-2]s; ClinOleic 0 [0-0]s; NaCl 0 [0-0]s). Die Zeiten blieben auch an den folgenden Untersuchungstagen bei den Tieren aller Gruppen kurz.

| verbrachte Zeit im offenen Arm im Elevated Plus Maze [s] | | | |
|--|---------|-----------|------------|
| Tag | NaCl | ClinOleic | Artesunate |
| -1 | 0 [0-4] | 0 [0-0] | 0 [0-2] |
| 3 | 0 [0-0] | 0 [0-0] | 0 [0-2] |
| 10 | 0 [0-0] | 0 [0-4] | 0 [0-0] |
| 28 | 0 [0-0] | 0 [0-0] | 0 [0-1] |

Tab. 16: verbrachte Zeit im offenen Arm im Elevated Plus Maze; Statistik ANOVA

Anzahl des Hochstreckens

Gezählt wurden die Häufigkeit mit der sich ein Tier im geschlossenen Arm des Kreuzes aufstellte. Am Tag vor der Reanimation zeigten die Tiere aller Gruppen ein vergleichbares Ergebnis in der Häufigkeit des Aufstellens (Artesunate 9 [4-13]; ClinOleic 7 [5-11]; NaCl 9 [4-11]). Nach erfolgter Reanimation zeigten die Tiere aller drei Untersuchungsgruppen am 3. Tag einen Abfall ihrer Aktivität, wobei sich die Artesunate-Tiere (6 [0-9]) noch häufiger aufrichteten als die Tiere der Kontrollgruppen (ClinOleic 5 [1-13]; NaCl 3 [1-8]). Am 10. Tag nach CA/CPR verringerte sich die Anzahl des Hochstreckens bei den Artesunate-Tieren (2 [0-13]) und erhöhte sich bei den ClinOleic- (9 [5-18]) und NaCl-Tieren (8 [2-11]). Am letzten Untersuchungstag erreichten alle Gruppen annähernd den Wert wie vor der Reanimation.

| Anzahl der Streckungen im Elevated Plus Maze [n] | | | |
|---|-------------|------------------|-------------------|
| Tag | NaCl | ClinOleic | Artesunate |
| -1 | 9 [4-11] | 7 [5-11] | 9 [4-13] |
| 3 | 3 [1-8] | 5 [1-13] | 6 [0-9] |
| 10 | 8 [2-11] | 9 [5-18] | 2 [0-13] |
| 28 | 7 [4-8] | 7 [5-15] | 7 [2-12] |

Tab. 17: Anzahl der Streckungen im Elevated Plus Maze; Statistik ANOVA

Anzahl des Über-den-Rand-Schauens

Als Maß für die Neugierde der Tiere zeigte sich beim Über-den-Rand-Schauen des offenen Armes am Tag vor der Reanimation zwischen den drei Untersuchungsgruppen kein Unterschied. Am 3. Tag nach CA/CPR zeigten die Artesunate-Tiere (6 [2-11]) ein größeres Interesse an ihrer Umgebung als die Tiere der Kontrollgruppen (ClinOleic 4 [1-11]; NaCl 3 [0-7]). Am Tag 10 kam es zu einem Abfall bei der Artesunate-Gruppe (2 [1-7]), wobei die anderen beiden Gruppen konstante Werte erreichten. Auch am letzten Beobachtungstag blieb die Anzahl des Über-den-Rand-Schauens bei den überlebenden Tieren in allen Gruppen konstant

auf diesem Niveau. Insgesamt zeigte sich in allen Gruppen eine Verringerung der Neugierde, verglichen zu den Werten vor Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation.

| Anzahl des Über-den-Rand-Schauens im Elevated Plus Maze [n] | | | |
|---|----------|-----------|------------|
| Tag | NaCl | ClinOleic | Artesunate |
| -1 | 8 [4-12] | 7 [5-10] | 8 [6-10] |
| 3 | 3 [0-7] | 4 [1-11] | 6 [2-11] |
| 10 | 2 [1-5] | 3 [1-6] | 2 [1-7] |
| 28 | 2 [0-4] | 4 [2-5] | 2 [0-4] |

Tab. 18: Anzahl des Über-den-Rand-Schauens im Elevated Plus Maze; Statistik ANOVA

4.6.7. Adhesive-Removal-Test

Time-to-Contact

In der siebentägigen Trainingsphase vor Reanimation zeigten alle Tiere einen Lerneffekt im Bereich von Sensorik und Motorik sowie der resultierenden Koordination. Benötigten die Tiere am ersten Versuchstag noch 43 [26-67]s um den Pflasterstreifen zu berühren, waren es zwei Tage vor der Reanimation nur noch 19 [9-56]s (* $p < 0,05$).

Am 1. Tag nach erfolgtem Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation zeigte sich eine Verschlechterung der koordinativen Leistung in allen drei Gruppen, wobei das Ergebnis der NaCl-Tiere (35 [4-130]s) am besten ausfiel. Die Artesunate-Tiere benötigten 232 [13-300]s zum Berühren des Klebepunktes. Die ClinOleic-Tiere erreichten im Median eine Zeit von 119 [16,5-300]s. An Tag 3 nach Reanimtaion zeigte sich bereits eine deutliche Verbesserung aller Untersuchungsgruppen, welche sich am 5. Tag fortsetzte. Die Tiere der NaCl-Gruppe (3 [2-13]s; $^{\$}p < 0,05$) erreichten hier weiterhin das beste Ergebnis mit einem deutlichen Unterschied im Vergleich zu der Artesunate-Gruppe (16,5 [9-230]s). Im weiteren Verlauf konnte dieser nicht mehr nachgewiesen werden. Am letzten Beobachtungstag zeigte sich eine Verbesserung der ClinOleic- (6 [2-23]s) und der Artesunate-Gruppe (7 [6-22]s) gegenüber den NaCl-Tieren (11 [2-24]s). Insgesamt war in allen Untersuchungsgruppen während

der Nachbeobachtungszeit eine Verbesserung der koordinativen Fähigkeiten von Pfoten und Schnauze zu beobachten.

| Time-to-Contact beim Adhesive-Removal-Test [s] | | | |
|---|-----------------------|----------------------------|-------------------|
| Tag vor CPR | | Tiere aller Gruppen | |
| -7 | | 43 [26-67] | |
| -2 | | 19 [9-56]* | |
| Tag nach CPR | NaCl | ClinOleic | Artesunate |
| 1 | 35 [4-130] | 119 [17-300] | 232 [13-300] |
| 3 | 10 [2-136] | 12 [2-286] | 22 [8,5-190] |
| 5 | 3 [2-13] [§] | 11 [8-20] | 17 [9-230] |
| 9 | 4 [2-9] | 11 [5-16] | 9 [5-47] |
| 14 | 6 [3-21] | 3 [3-8] | 10 [4-122] |
| 28 | 11 [2-24] | 6 [2-23] | 7 [6-22] |

Tab. 19: Zeit bis zum Kontakt mit dem Klebepunkt beim Adhesive-Removal-Test; Statistik ANOVA und Mann-Whitney Rank sum Test

Tag -7 vs. Tag -2 *p<0,05; Tag 5 Kontrollgruppe vs. Artesunate [§]p<0,05;

Time-to-Remove

Zu Beginn der Trainingsphase zeigten die Tiere aller Gruppen die Fähigkeit, den Klebepunkt von Ihrer Pfote zu entfernen. Auch hier zeigte sich ein deutlicher Lerneffekt mit einer Verbesserung der Zeit von 72 [48-141]s am Tag -7 bis auf 57 [23-116]s (*p<0,05) am Tag -2 vor Reanimation.

Am Tag 1 nach Reanimation durchliefen die überlebenden Tiere den Test erneut mit einer deutlichen Verlängerung der Time-to-Remove, wobei bei einem Teil der Tiere aus allen Gruppen der Versuch nach 300 Sekunden abgebrochen wurde. Die längste Zeit benötigte die Artesunate-Gruppe im Median mit 300 [60-300]s. Tendenziell kürzere Zeiten erreichten die Tiere der Kontrollgruppen (ClinOleic 246 [20-300]s; NaCl 138 [19-300]s). Ab dem 3. Tag nach CA/CPR kam es zu einer Verbesserung, der Fähigkeit den Klebepunkt zu entfernen, wobei die Tiere der Artesunate-Gruppe

(52 [15-300]s) weiterhin etwas langsamer abschnitten als die der Kontrollgruppen. Zum Abschluss der Untersuchung zeigten alle Gruppen eine deutliche Besserung in der erreichten Zeit bis zum Entfernen des Klebepunktes. Die ClinOleic-Gruppe benötigte 29 [15-42]s; ([#]p<0,05) und die Artesunate-Gruppe 15 [11-178]s (^{##}p<0,05)

| Time-to-Remove beim Adhesive-Removal-Test [s] | | | |
|--|--------------|----------------------------|---------------------------|
| Tag vor CPR | | Tiere aller Gruppen | |
| -7 | | 72 [48-141] | |
| -2 | | 57 [23-116]* | |
| Tag nach CPR | NaCl | ClinOleic | Artesunate |
| 1 | 138 [19-300] | 246 [20-300] | 300 [97-300] |
| 3 | 23 [10-163] | 41 [11-300] | 52 [15-300] |
| 5 | 18 [6-29] | 19 [15-37] | 32 [15-241] |
| 9 | 13 [7-21] | 22 [9-35] | 19 [14-99] |
| 14 | 22 [11-41] | 7 [6-26] | 28 [14-130] |
| 28 | 22 [12-56] | 29 [15-42] [#] | 15 [11-178] ^{##} |

Tab. 20: Zeit bis zum Entfernen des Klebepunktes beim Adhesive-Removal-Test; Statistik ANOVA und Mann-Whitney Rank sum Test

Tag -7 vs. Tag -2 *p<0,05; ClinOleic Tag 1 vs Tag 28 [#]p<0,05; Artesunate Tag 1 vs Tag 28 ^{##}p<0,05

5. Diskussion

5.1. Versuchsgrundlage

Nach wie vor stellt der Herz-Kreislaufstillstand weltweit eine medizinische, soziale und sozio-ökonomische Herausforderung dar. Diese liegt in der Tatsache begründet, dass ein Großteil der Patienten, welche einen Herz-Kreislaufstillstand überleben, einen bleibenden neurologischen Schaden davontreten [34], hilfs- bis pflegebedürftig werden und aus der Arbeitswelt ausscheiden [35]. Aus diesem Grund liegt das Hauptaugenmerk der Reanimationsforschung - neben der Verbesserung des Überlebens - in der Verbesserung der funktionell-neurologischen Regeneration. Da es sich hierbei um ein komplexes Zusammenspiel verschiedenster Parameter, wie z.B. Inflammation und Funktion von bestimmten Hirnarealen handelt, ist eine Computersimulation kaum denkbar. Weiterhin erfassen Experimente in reiner Zellkultur keine Lern- und Bewältigungsstrategien und somit nicht die Neurologie der Patienten. Hieraus resultiert, dass sich einzig das Tierexperiment zur Erfassung all dieser Parameter eignet.

Als Grundlage für die durch uns ausgeführte Untersuchung galten zum damaligen Zeitpunkt noch unveröffentlichte Ergebnisse der Forschungsgruppe um Prof. Thiernemann des William Harvey Research Institutes an Einzelgeweben im Zusammenhang mit einem Ischämie-/Reperfusionsschaden. Die damals vorläufigen Ergebnisse zeigten eine deutliche Reduktion im Infarkt-Areal bei Ratten mit Akutem Myokardinfarkt nach 25 minütigem LAD-Verschluss. Als Endpunkt wurde eine antiinflammatorische Wirkung über eine Senkung von IL-6 bzw. TNF- α vermutet wie sie durch Souza et al. beschrieben wird [24]. Als weiterer molekularer Wirkmechanismus für den protektiven Effekt von Artesunate auf das Überleben und funktionell-neurologische Outcome wurde die Aktivierung des PI3K-AKT-Survival-Pathways angenommen. Dieser wird über verschiedene Phosphorylierungswege unter anderem über den TLR-4 Rezeptor aktiviert [36].

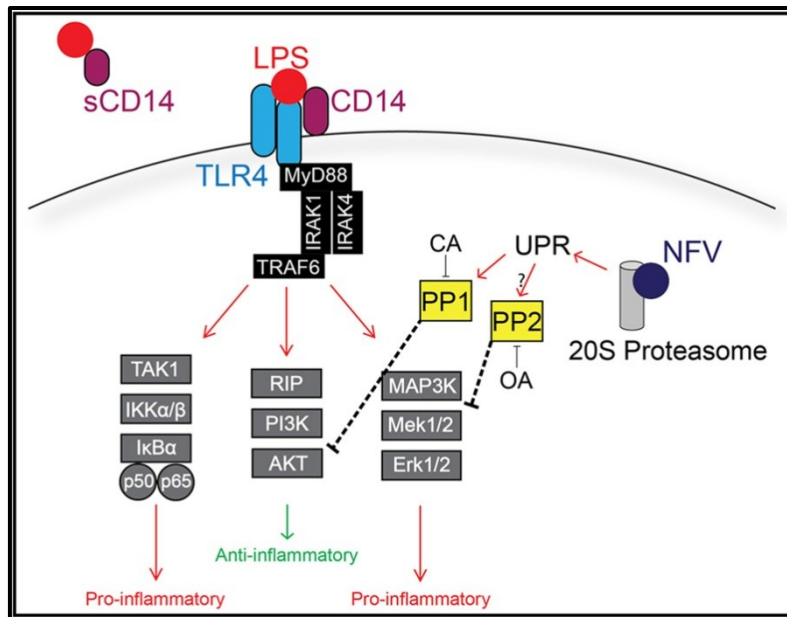


Abb. 13: TLR4- PI3K - Signalweg (aus Wallet et al. 2012)

In der Arbeit von Yang et al. wurde nochmals die Rolle des TLR-4 Rezeptors auf die Immunantwort speziell beim Herzinfarkt herausgearbeitet. Hier wurde als zweiter wichtiger Signalweg der pro-inflammatorische Weg dargestellt, welcher über MyD88 und NF-κB zu einer vermehrten Expression von IL-6 führt. Der PI3K-AKT-Signaling-Pathway wird hier als möglicher negativer Feedback Regulator gesehen [37]. Die später veröffentlichten Ergebnisse der Gruppen um Sordi et al. und Khan et al. haben im Verlauf den protektiven Effekt von Artesunate in verschiedenen Modellen zum Ischämie-/Reperfusionsschaden an einzelnen Organen dargestellt [26,27]. Im Rahmen dieser Ergebnisse wurde der Arbeitsgruppe die Substanz Artesunate zur Untersuchung bei globaler Ischämie und Reperfusion überlassen.

5.2. Versuchstiere

Als besonders praktikabel hat sich hier das Kleintiermodell mit Maus und Ratte für die Reanimationsforschung erwiesen. Durch vielfach etablierte funktionell-neurologische Tests sind diese Tiere besonders gut geeignet, um funktionelle Schädigungen und Regeneration zu untersuchen. Verglichen mit Großtieren eignen sich Mäuse durch ihren schnelle und kostengünstige Beschaffung sowie Haltung besonders gut. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Mäuse eine ähnliche Organanatomie wie Menschen aufweisen und sich physiologische und pathophysiologische Abläufe vergleichbar darstellen lassen. So besteht z.B. das Herz ebenfalls aus 4 Kammern mit Vorhof- und Ventrikel Ebene und der arterielle Blutdruck in Narkose ist vergleichbar. Ein deutlicher Unterschied zeigt sich jedoch in der höheren Herzfrequenz der Nagetiere [38].

Grundsätzlich sind Ergebnisse aus der tierexperimentellen Forschung trotz der oben genannten Gemeinsamkeiten mit großer Vorsicht zu interpretieren. Die Übertragung auf die humanmedizinische Situation ist durch folgende Punkte erschwert: Patienten weisen im Vergleich zu den gesunden Versuchstieren Komorbiditäten auf, jeder Patient ist individuell in seinen physiologischen und immunologischen Voraussetzungen, wohingegen die verwendeten Versuchstiere zur besseren Vergleichbarkeit möglichst ähnliche phäno- und genotypische Ausprägungen haben. Des Weiteren werden in geplanten Experimenten immer gleiche Voraussetzungen und Protokolle geschaffen, was im klinischen Alltag nicht umsetzbar ist.

5.2.1. Weibliche Tiere

In den durchgeführten Untersuchungen wurden ausschließlich weibliche Mäuse verwendet. In Voruntersuchungen der AG IRIS, bei welchen männliche Tiere verwendet wurden, zeigte sich in den ersten Tagen nach erfolgter Reanimation das klinische Bild von Schmerzen und eingeschränkter Mobilität. Bei der Untersuchung verstorbener Tiere stellte sich nach Eröffnung des Abdomens eine deutlich gefüllte Harnblase als Folge einer Miktionsstörung dar. Der Pathomechanismus dieser Miktionsstörung ist bis heute nicht geklärt. Bei weiblichen Versuchstieren trat diese Harnblasenobstruktion jedoch nicht auf.

Der vorbeschriebene Aspekt der Neuroprotektion durch Progesteron [39], [40], welches hauptsächlich in der zweiten Zyklushälfte produziert wird, kann nicht ausgeschlossen werden. Durch die hohe Zahl an Versuchstieren (n=32 je Gruppe) wurde versucht zyklusbedingte positive Effekte zu minimieren. Bei relativ kurzen Zyklen vom 3-6 Tagen gleichen sich Unterschiede innerhalb der Gruppen aus und machen somit einen Einfluss auf das Ergebnis der Untersuchungen eher unwahrscheinlich.

5.2.2. Alter, Größe und Gewicht

Für die Untersuchung wurden 12-16 Wochen alte C57BL/6J Mäuse verwendet. Zu diesem Zeitpunkt wogen die Tiere etwa 20-24g. Dieses Gewicht eignete sich besonders zum Präparieren der V. jugularis und der damit verbundenen ZVK Anlage. Sind die Tiere zu leicht erschwert dies die Katheteranlage in der V. jugularis. Sind die Tiere deutlich schwerer ist die Präparation durch die subkutane Fettschicht erschwert.

Um den Einfluss von Nebenerkrankungen auf das Reanimationsergebnis zu minimieren wurden ausschließlich gesunde Tiere in den Versuch eingeschlossen. Ebenso wurden so die Einflussfaktoren Adipositas und Alter minimiert.

5.2.3. Gruppengröße, Kontrollgruppen

Um statistisch verlässliche Aussagen treffen zu können, wurde eine Poweranalyse durchgeführt, um die notwendige Gruppengröße zu ermitteln.

Das Datenblatt der zur Verfügung gestellten Substanz sah eine Lösung in Natriumbicarbonat 5%ig (NaBic 5%) vor. Hier zeigten sich unter sonst gleichen Rahmenbedingungen in Voruntersuchungen deutlich schlechtere Ergebnisse im Bezug auf den Reanimationserfolg.

| Voruntersuchung mit NaBic 5% als Vehikellösung | | | |
|---|------------|----------------------|-----------------------|
| Anzahl der Versuchstiere [n] – Überleben [%] | | | |
| Gruppe | Anzahl (n) | 7 Tage Überleben (%) | 28 Tage Überleben (%) |
| NaBic 5% | 12 | 17 | 17 |
| NaCl 0,9% | 8 | 63 | 38 |
| Artesunate 1,2mg/kg | 11 | 9 | 9 |

Tab. 21: Überleben in der Voruntersuchung mit NaBic 5% als Vehikellösung

Das Puffern mit Natriumbicarbonat während der Reanimation wird beispielsweise in den USA bei ca. 20% der Patienten mit einem Herz-Kreislaufstillstand außerhalb eines Krankenhauses angewandt [41]. Natriumbicarbonat in der Reanimation wird in der Literatur seit langem kontrovers diskutiert. Eine Studie von Kawano et al. zu diesem Vorgehen hat gezeigt, dass das Behandlungsergebnis durch blindes Puffern sowohl im Überleben an sich, also auch in Hinsicht auf das neurologische Ergebnis deutlich verschlechtert wird [42]. Unsere Ergebnisse sowie die in der Literatur beschriebenen Aspekte haben zur Abänderung des Versuchsaufbaus mit der Etablierung von ClinOleic 20% als Vehikellösung geführt.

Die Notwendigkeit für zwei Kontrollgruppen ergab sich aus der Trägerlösung ClinOleic 20% für den Wirkstoff Artesunate, welcher laut Herstellerangaben nur schwer wasserlöslich ist [43]. Es lag die Befürchtung nahe, dass ClinOleic z.B. durch Fettembolisationen bzw. eigene Einflüsse auf Stoffwechselprozesse einen eigenen negativen Effekt auf die Überlebensrate haben könnte. Um zu zeigen, dass die Vehikellösung keinen Einfluss auf Überleben und Neurologie hat, wurde als Vergleichssubstanz in der zweiten Kontrollgruppe NaCl-Lösung verwendet. Die Untersuchungen haben gezeigt das sich weder im Überleben noch in der Neurologie signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kontrollgruppen ergaben.

Da alle Tiere den gleichen Phänotyp aufwiesen, war es möglich, alle neurologischen Tests in Bezug auf den Untersucher „verblindet“ durchzuführen. Des Weiteren war dem Untersucher nicht bekannt, welche Vehikellösung dem Tier während der

Reanimation verabreicht wurde, sodass auch hier eine Beeinflussung ausgeschlossen werden konnte.

5.3. Reanimationsmodell

5.3.1. Narkose

Vor Beginn der Präparation wurden die Tiere mit einem Ketamin/Xylazin-Gemisch narkotisiert. Die Narkose wurde intraperitoneal verabreicht und war in ihrer Dosis ausreichend, um die Tiere für die Zeit des operativen Versuchsteils adäquat zu betäuben. In ihrer Arbeit haben Arras et al. neben den Kreislaufveränderungen unter Narkose auch ein Absinken der Körpertemperatur um ca. 2°C beschrieben [44]. Dies liegt wahrscheinlich in einer Veränderung der hypothalamischen Thermoregulation begründet, ähnlich der des Menschen in Narkose. Hierbei werden sowohl die Schwellen für das Schwitzen als auch für die Vasokonstriktion sowie das Kältezittern verstellt, wodurch eine Konstanthaltung der Körperkerntemperatur nicht mehr möglich ist [45]. Mittels rückgekoppelter rektaler Temperatursonde konnte in unserem Versuch dieser Veränderung entgegengewirkt werden. Unveröffentlichte Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten einen Temperaturabfall von narkotisierten Mäusen bis auf ca. 27°C wenn auf eine aktive Wärmezufuhr verzichtet wurde. Weiterhin wurde durch Arras et al. gezeigt, dass die P_aO_2 -Werte während der Narkose keine starken Veränderungen zeigen, der P_aCO_2 jedoch deutlich ansteigt und zu einem Abfall des pH-Wertes führt. Da die Tiere in diesem Versuch kurz nach Narkoseeinleitung intubiert und maschinell beatmet wurden, konnten die Beatmungsparameter so eingestellt werden, dass normale P_aO_2 - und P_aCO_2 -Werte erreicht wurden [28]. Auf den Einsatz von volatilen Anästhetika wurde verzichtet da diese bei herzchirurgischen Eingriffen einen kardioprotektiven Effekt gezeigt haben [46]. Kopic et al. zeigten jedoch, dass dieser Effekt bei allgemeinchirurgischen Eingriffen nicht nachweisbar war [47]. Weitere Studien ergaben, dass sich bei Patienten nach Herz-Kreislaufstillstand die Beatmungszeit und die Krankenhausverweildauer bei der Verwendung von volatilen Anästhetika deutlich verkürzte, verglichen zu einer i.v. Sedierung. Das neurologische Behandlungsergebnis zeigte in diesen Studien jedoch keinen Unterschied [48,49].

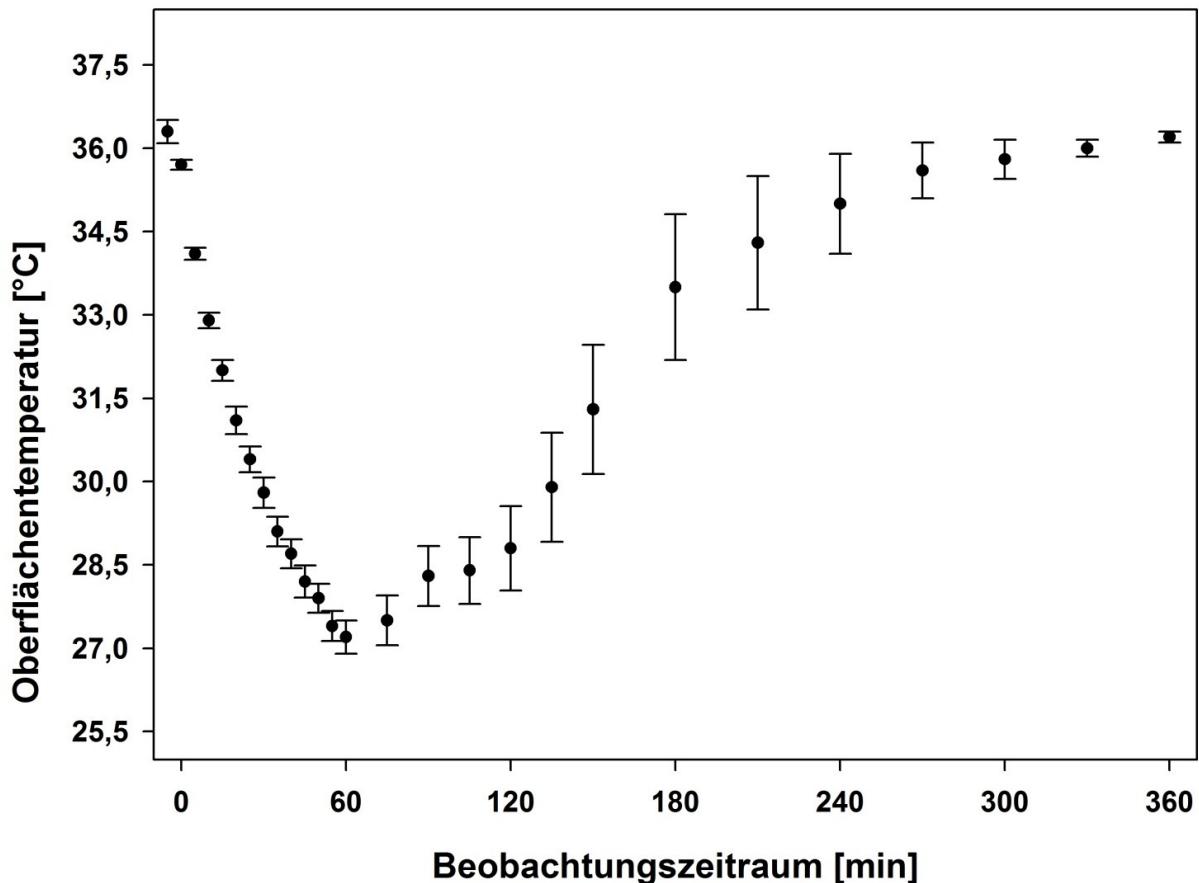


Abb. 14: Körpertemperatur von Mäusen in Narkose ohne zusätzliche Wärmezufuhr

5.3.2. Beatmung

Um eine möglichst realitätsnahe Ausgangssituation vor Reanimation zu erreichen, verwendeten wir eine F_{iO_2} von 0,21 während der Präparation. Erleidet ein Patient, entsprechend dem klinischen Alltag, einen Herz-Kreislaufstillstand auf der Straße oder im Haushalt geschieht dieses ebenso unter Raumluft. Eine höhere F_{iO_2} würde einer Präoxygenierung entsprechen und somit eine Protektion gegenüber dem ischämischen Schaden darstellen. Reanimationsmodelle anderer Forschungsgruppen verwenden verschiedenste Einstellungen bis hin zu einer F_{iO_2} von 1,0 über den gesamten Versuchsablauf. Zu Beginn der Herz-Lungenwiederbelebung wurde eine F_{iO_2} von 1,0 eingestellt, ebenso wie es bei Eintreffen des Rettungsdienstes erfolgen würde, und im Verlauf laut Weaning-Protokoll gesenkt.

| Versuchsprotokolle weiterer Forschungsgruppen | | | |
|--|---------|------------------|----------------------|
| Autor | Zeit CA | FiO ₂ | Nachbeobachtungszeit |
| Abella et al. [31] | 8 min | 1,0 | 72h |
| Nakano et al. [50] | 10 min | 1,0 | 3d |
| Neigh et al. [51] | 8 min | 1,0 | 5d |
| Böttiger et al. [52] | 5 min | 0,3 | 7d |
| Dezfulian et al. [53] | 12 min | 0,5 | 24h |

Tab. 22: Versuchsprotokolle weiterer Forschungsgruppen

5.3.3. Blutdruckmessung

Die Blutdruckmessung wurde im dargestellten Versuch mittels der plethysmographischen Ableitung der Pulsdruckkurve über die Schwanzarterie realisiert. Hierbei handelt es sich um ein nichtinvasives Verfahren. Als Alternative steht die Messung des Blutdruckes mittels invasiven Messkatheters zur Verfügung. Dieser wird über die Arteria carotis communis oder die Arteria femoralis eingebracht. Somit ist das Versuchstier zusätzlichem Stress durch die Präparation ausgesetzt. Ein weiteres Problem bei diesem Messverfahren ist die Gefäßligatur nach Entfernen des Katheters. Diese kann zu einer Minderperfusion von Hirn oder Hinterlauf, je nach Katheterlage, führen und einen Einfluss auf die Neurologie und somit die funktionell-neurologischen Tests der Versuchstiere haben. Dieser Einfluss liegt bei der nicht invasiven Blutdruckmessung nicht vor. Nachteil der nicht invasiven Blutdruckmessung ist allerdings eine Lageabhängigkeit. Der Druckaufnehmer muss während der Untersuchung gut fixiert sein, um ein Messergebnis zu liefern. Weiterhin erhält man keine kontinuierliche Druckmessung, was jedoch mangels therapeutischer Konsequenz im hier dargestellten Versuch keine Relevanz hat.

5.3.4. Temperaturmanagement

Als eine Säule zur Verbesserung des Überlebens und des neurologischen Ergebnisses nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation hat sich das Konzept der milden therapeutischen Hypothermie (MTH) in der Klinik etabliert [54]. Sowohl von

der American Heart Association (AHA) als auch dem European Resuscitation Council (ERC) wird diese in den jeweiligen Leitlinien zur Behandlung nach stattgehabtem Herz-Kreislaufstillstand und erfolgreicher Reanimation bei anhaltender Bewusstlosigkeit empfohlen [55], [56]. Um diese Variable zu minimieren, wurden die Versuchstiere binnen 72 Stunden nach Herzkreislauf-Stillstand in Bezug auf ihre Körpertemperatur überwacht und gegebenenfalls gewärmt. Im Rahmen der Untersuchungen der Versuchstiere wurden zwei Varianten der Temperaturmessung etabliert. Direkt nach Narkoseeinleitung wurde die Körpertemperatur der Tiere über eine Rektalsonde gemessen, welche mit einem Heiztisch rückgekoppelt war, um die Temperatur während der Präparation und des Weanings bei 36°C konstant zu halten. Hierbei handelt es sich im Rahmen der zirkadianen Rhythmik um die normale Temperatur bei C57BL/6J-Tieren [57]. Vor Extubation wurde die Rektalsonde entfernt und die weitere Temperaturmessung mittels Infrarotkamera durchgeführt. Dieses Verfahren ermöglichte die stressfreie Messung der Körpertemperatur über die Leber als gut durchblutetes Organ direkt unter der Haut. In Vorversuchen wurden Vergleichsmessungen zwischen der gemessenen Rektal- und der Infrarottemperatur durchgeführt. Diese führten zu einer gemessenen Differenz von maximal 0,1°C. Nach Extubation wurden die Tiere für 24 Stunden in einem beheizten Terrarium gehalten um den protektiven Effekt der milden therapeutischen Hypothermie zu vermeiden [58]. Als Zieltemperatur für die Hypothermie wurde 2010 in den ERC Guidelines 32 – 34°C festgelegt [59]. Mit Hilfe einer Terrariumtemperatur von 28°C konnte die Körpertemperatur der Tiere oberhalb dieses Zielbereiches gehalten werden. Im Rahmen weiterer Untersuchungen wurde in den Reanimationsleitlinien von 2015 die Zieltemperatur auf 35-36°C verändert, was in der hier dargestellten Untersuchung jedoch nicht berücksichtigt wurde [55]. Tiere, deren Temperatur dennoch unter 34°C absank wurden zusätzlich per Rotlichtlampe gewärmt, verstarben aber binnen kurzer Zeit an den Folgen des Herz-Kreislaufstillstandes und der Reanimation. Es wurde durch Miao et al. bereits ein Zusammenhang zwischen massiver Hypothermie und dem Versterben eines Versuchstieres in der Sepsis gestellt und gezeigt, dass eine Körperkerntemperatur <32°C als Prädiktor für das Versterben angesehen werden kann [60].

5.3.5. Zentraler Venenkatheter

Zur sicheren Applikation von Medikamenten wurde im Rahmen der Präparation ein zentraler Venenkatheter in den V. jugularis externa angelegt. Hierüber konnten Medikamente sicher appliziert werden. Die V. jugularis ist bei der Maus ein gut zugängliches Gefäß. Die Präparation unter Narkose ist zwar ein zusätzlicher Stressfaktor für das Tier jedoch im Rahmen dieser Untersuchung als sicherer i.v.-Zugang unumgänglich. Die Präparation nahm etwa 10-15 Minuten in Anspruch. Der Blutverlust während der Anlage ist als gering einzuschätzen, so dass kein größerer Einfluss auf das Outcome der Tiere zu erwarten war. Nach erfolgter CA/CPR wurde der Katheter wieder entfernt, die Wunde desinfiziert und genäht, so dass die Tiere in ihrer Bewegungsfreiheit nicht beeinträchtigt waren.

5.4. Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation

5.4.1. Induktion des Herz-Kreislaufstillstandes

Der Herz-Kreislaufstillstand wurde in der hier dargestellten Arbeit mittels einer Kaliumchloridinjektion, ähnlich der Kardioplegielösung bei kardiochirurgischen Eingriffen, erreicht. Sicher nachgewiesen wurde die eingetretene Asystolie mittels kontinuierlicher EKG-Überwachung. Untersuchungen während der Modelletablierung haben gezeigt, dass die erhöhten Serum-Kaliumwerte 10 Minuten nach Erreichen des Spontankreislaufes nicht mehr nachweisbar waren [28].

Als Unterschied zum klinischen Alltag ist zu nennen, dass beim Menschen nicht die Asystolie, sondern das Kammerflimmern (Ventricular Fibrillation - VF) die häufigste Ursache eines Herz-Kreislaufstillstandes ist [61]. Bei Mäusen konnte jedoch die spontane Kardioversion vom Kammerflimmern in den Sinusrhythmus beobachtet werden [38]. Um der Spontankonversion vorzubeugen, müsste ein kontinuierlicher Stromfluss zur Aufrechterhaltung des VF anliegen [62]. Die Möglichkeit eines kardioprotektiven Effektes der Asystolie gegenüber dem Kammerflimmern wurde in dieser Arbeit nicht näher untersucht [63]. Jedoch ginge aus einem 10 minütigem Kammerflimmern ein erhöhter kardialer Stress hervor, der aufgrund des vermehrten Sauerstoffverbrauches zu einem Herzversagen führen könnte. Hierdurch wäre die neurologische Langzeituntersuchung, auf welcher unser Hauptaugenmerk lag, deutlich erschwert.

5.4.2. Dauer des Herz-Kreislaufstillstandes

Der induzierte Herz-Kreislaufstillstand wurde 10 Minuten unbehandelt belassen bis die Reanimation und maschinelle Beatmung einsetzte. Dieses gewählte Zeitfenster orientiert sich an Zeiten vom Eingehen eines Notrufes in der Leitstelle bis zum Einsetzen der Hilfsmaßnahmen durch das Rettungsdienstpersonal [64], [65]. In anderen Tiermodellen wurden Herz-Kreislaufstillstandzeiten von unterschiedlicher Länge beschrieben, bis hin zu einer Dauer von 14 Minuten [66].

Voruntersuchungen der AG IRIS haben gezeigt, dass ein Einsetzen der Reanimation nach 8 Minuten ein Überleben der Kontrollgruppen von 51,6% der Tiere erbrachte [29]. Die in dieser Arbeit gewählte Ischämiezeit führte zu einem Überleben

der NaCl-Kontrollgruppe von 37,5% sowie 28,1% in der ClinOleic-Gruppe. Sie ist somit groß genug um entstandene funktionell-neurologische Schäden zu detektieren und einen möglichen protektiven Effekt in anderen Versuchsgruppen herauszustellen.

5.4.3. Beobachtungszeitraum

Als Beobachtungszeitraum wählten wir 28 Tage nach erfolgter Reanimation. Dieser Zeitraum ist verglichen mit anderen Forschungsgruppen, welche teilweise Beobachtungszeiten zwischen 24 Stunden und 7 Tagen veranschlagten [67], [50], [52], einer der längsten in der Literatur beschriebenen. Untersuchungen an Nagern haben gezeigt, dass die Regenerationsprozesse am Gehirn bis zu 28 Tage andauern [68]. Durch den vergleichsweise langen Beobachtungszeitraum können auch Effekte ausgewertet werden, welche aus dem Remodeling, speziell im Gehirn, nach Reperfusion hervorgehen und bis zu 28 Tage andauern [68]. Beim Menschen beträgt die neurologische Regeneration nach einer Ischämie nach Erfahrungen von Reha-Einrichtungen bis zu zwei Jahre was in Bezug auf das funktionell-neurologische Outcome eine längere Beobachtungszeit erforderlich macht.

5.5. Nachbeobachtung

5.5.1. Überleben

In der dargestellten Untersuchung zeigte sich, dass die Tiere der Artesunate-Gruppe mit einer Überlebensrate von 25,0% gegenüber den Kontrollgruppen keinen Überlebensvorteil erreichten. Es zeichnete sich die Tendenz eines Vorteils der NaCl-Tiere gegenüber den beiden anderen untersuchten Gruppen ab, welcher sich allerdings in der vorhandenen Gruppengröße nicht als signifikant herausstellte. Das Versterben der Untersuchungstiere setzte in allen drei Gruppen binnen der ersten Tage nach Reanimation am stärksten ein, welches wir als Zeichen der akuten Zellschädigung werteten. Nach der ersten Woche verstarben in allen Gruppen weitere Tiere. Dieses zeigt, dass Langzeitfolgen zu beobachten sind welche Einfluss auf den Untersuchungsfaktor Überleben haben.

5.5.2. Körpergewicht

Das Körpergewicht kann als Marker für das Wohlbefinden und den Allgemeinzustand eines Tieres herangezogen werden. Ist das Tier geschwächt, zeigt es weniger Aktivität, frisst und trinkt weniger und verliert in der Folge an Gewicht. Um allen Tieren nach erfolgter Reanimation die Möglichkeit zu geben, Futter und Wasser trotz motorischer Einschränkungen zu erreichen, wurde beides in Schalen auf Bodenniveau bereitgestellt. Um eine zirkadiane Rhythmik des Gewichtsverlaufes der Tiere zu minimieren, wurden die Messungen immer zur selben Tageszeit durchgeführt. In allen Untersuchungsgruppen zeigte sich binnen der ersten 3 Untersuchungstage ein Abfall des Körpergewichtes auf ca. 80% des Ausgangsgewichtes. Es fiel jedoch auf, dass Tiere, welche binnen der ersten ein bis zwei Tage nach erfolgter Reanimation verstarben, primär einen geringeren Gewichtsverlust darboten. Diese Feststellung könnte in der körperlichen Schwäche der Tiere begründet sein mit folglich eingeschränkter Mobilität und Anstrengung nach stattgehabter Reanimation. Insgesamt konnte im Vergleich des Gewichtsverlaufes der 3 Untersuchungsgruppen über den gesamten Beobachtungszeitraum kein Unterschied festgestellt werden.

5.5.3. Allgemeinzustand

Der Allgemeinzustand der Versuchstiere wird durch den Untersucher subjektiv beurteilt. Die Beurteilung erfolgte nach Punktwerten zwischen 0 und 3 Punkten anhand einer Bewertungsskala von insgesamt 3 Parametern. Aufgrund der ungenauen Trennschärfe bei nicht klar definierten Grenzen zwischen den einzelnen Punktwerten ist dieser Test jedoch stark untersucherabhängig. Der Allgemeinzustand der Tiere ist dennoch ein geeigneter Parameter als erste Überblicksbewertung für den Zustand der Tiere nach Reanimation. Im Vergleich zwischen unterschiedlichen Gruppen und Versuchen muss das Ergebnis jedoch im Rahmen der subjektiven Bewertung durch unterschiedliche Untersucher kritisch betrachtet werden.

In der hier durchgeführten Arbeit gab es nur einen einzelnen Untersucher, um diesen Aspekt zu minimieren. Insgesamt zeigte sich binnen der ersten 3 Tage nach Reanimation in allen Gruppen eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes, am ehesten bedingt durch die Stresssituation nach Herz-Kreislaufstillstand. Es stellte

sich im Verlauf eine tendenziell schnellere Verbesserung des Allgemeinzustandes bei den Tieren der NaCl-Gruppe, verglichen mit den beiden anderen Untersuchungsgruppen, dar. Die Verschlechterung der Artesunate-Gruppe an den Tagen 11 und 14 geht mit dem Versterben eines Tieres am Tag 20 einher. Hier zeigt sich jedoch der subjektive Charakter dieser Bewertung, da das Tier anhand der objektiven Parameter, wie dem Körpergewicht bereits schlechtere Ergebnisse erzielte als die Vergleichstiere.

5.5.4. NeuroScore

Der NeuroScore ist eine etablierte Methode, um standardisiert das neurologische Befinden von Mäusen und Ratten beurteilen zu können. Für beide Tierarten stehen modifizierte Varianten dieses Testes zur Verfügung. In der von uns verwendeten Variante konnte das Versuchstier maximal 12 Punkte in unterschiedlichen Kategorien erreichen. Um auch einen möglichen Regenerationsunterschied kurz nach Reanimation ausmachen zu können begannen wir mit der Evaluation im 4-Stunden Rhythmus nach erfolgter Reanimation. Hier zeigte sich binnen der ersten 12 Stunden ein gleichmäßiger Anstieg der neurologischen Fähigkeiten in allen 3 Gruppen auf 10 von 12 möglichen Punkten, ab Tag 3 erreichten alle Gruppen 12 von 12 Punkten. Auch im Verlauf konnte kein Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen nachgewiesen werden. Da alle Parameter in diesem Test mit derselben Wertigkeit in die Gesamtpunktzahl eingehen, muss jedoch hinterfragt werden, ob die Trennschärfe gerade in den ersten Stunden nach Reanimation nicht noch zu gering ist, um eine genaue Beurteilung der Tiere zu ermöglichen. So können Tiere mit einer motorischen Einschränkung denselben Gesamtpunktwert erreichen wie Tiere mit einer Einschränkung des Atemmusters, welches jedoch zu einer größeren klinischen Beeinträchtigung führt. In Kombination mit anderen funktionell-neurologischen Tests kann der NeuroScore jedoch durchaus verwendet werden, um eine schnelle orientierende neurologische Einschätzung des Tieres zu erreichen.

5.5.5. RotaRod-Test

Der RotaRod-Test prüft die Koordination, Geschicklichkeit, Kraft und Ausdauer der Versuchstiere. So konnte von Lalonde et al. gezeigt werden, dass die Großhirnfunktion eine essenzielle Rolle beim Ausführen des RotaRod Testes spielt [69]. Es ergab sich in den ersten Tagen nach Reanimation kein Unterschied im Ergebnis der Gruppen zueinander. Innerhalb der einzelnen Gruppen zeigten die Tiere in ihren Laufzeiten starke Unterschiede. Auch im weiteren Untersuchungsverlauf konnte kein Unterschied zwischen den Ergebnissen der Gruppen nachgewiesen werden. Die kürzeren Laufzeiten einzelner Tiere im Verlauf erklären sich zum Teil mit dem Versuch der Tiere sich auf der Walze zu drehen. Hierunter verloren die Mäuse dann das Gleichgewicht und fielen von der Walze. Es wäre daher zu diskutieren, die Begrenzungen der Walze enger zu gestalten um ein reines Vorwärtslaufen der Tiere zu erzwingen. Einzelne Mäuse sprangen aktiv während des Versuches von der Walze, was zum Abbruch des Durchlaufes führte. Beide Varianten sollten allerdings nicht zwangsläufig als Beeinträchtigung von Koordination oder Ausdauer betrachtet werden und müssen daher als Verfälschung der Ergebnisse in Betracht gezogen werden [70].

5.5.6. WaterMaze-Test

Wir verwendeten eine abgewandelte Form des 1984 publizierten Morris WaterMaze-Tests [71]. Dieser untersucht, ob die Mäuse in der Lage sind, nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation bereits gelerntes Wissen zu reproduzieren. Es werden somit Qualitäten getestet, welche mit der hippokampalen Hirnregion in Verbindung stehen [72]. Nach erfolgtem Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation kann somit ermittelt werden, ob die Tiere in der Lage sind, bereits vorher erlerntes Wissen zu reproduzieren und zusätzlich wie stark ihre motorischen Fähigkeiten beeinträchtigt sind. Die Lernphase durchliefen alle Tiere eine Woche vor Reanimation. Hier zeigte sich im Vergleich von Tag -7 zu Tag -2 eine Verschlechterung der Ergebnisse. Dies scheint möglicherweise zum Teil in der Tatsache begründet zu sein, dass die Tiere nach den ersten Versuchen weniger Stress entwickeln, sich an den Test gewöhnen und sich im Verlauf nur im Wasser treiben lassen, ohne aktiv zu schwimmen. Ein weiterer Störeffekt für diesen Test sind

Geräusche in der Umgebung des Versuchsaufbaus, welche die Tiere vom eigentlichen Ziel ablenken und nicht komplett unterbunden werden können. Die Untersuchung der Wiederaufnahme des WaterMaze-Testes nach Reanimation zeigte keinen Unterschied zwischen den Tieren der einzelnen Gruppen. Als Einschlusskriterien galten hier die Ergebnisse des NeuroScore und RotaRod-Tests zur Beurteilung der körperlichen Befähigung der Tiere, diesen Test wieder durchzuführen. Aus den erreichten Zielzeiten am 1. Kontakttag verglichen mit den Zeiten vor Reanimation lässt sich ableiten, dass die Tiere einmal Gelerntes reproduzieren können. Diese Erkenntnis macht einen ausgeprägten neurologischen Schaden durch Ischämie während des Herz-Kreislaufstillstandes im Areal des Hippocampus, welches für das Lernen verantwortlich ist, unwahrscheinlich. In den Untersuchungen zum erneuten Lernerfolg nach Reanimation mit neuer Position ergab sich die Tendenz eines Lernerfolges bei den Tieren der Kontrollgruppen aus NaCl und ClinOleic, welche am 5. Tag mit neuer Position eine bessere Zielzeit erreichten. Die Tiere der Artesunate-Gruppe erreichten die Plattform hier tendenziell langsamer, verglichen zum Erstkontakt, ohne jedoch eine statistische Signifikanz auszumachen.

Die Annahme, dass weibliche Mäuse in dem hier durchgeführten Test grundsätzlich schlechter abschneiden als männliche Mäuse, konnte in verschiedenen Studien widerlegt werden. So zeigten Fritz et al. dass sich kein Unterschied in den Ergebnissen zwischen den Geschlechtern zeigt [73]. Somit hat die Verwendung von ausschließlich weiblichen Mäusen in der hier vorliegenden Untersuchung keinen Einfluss auf das Ergebnis dieses Tests.

Für Folgeuntersuchungen empfiehlt sich zur besseren Auswertbarkeit die Auswertung der gesamt geschwommenen Strecke sowie die digitale Zeitmessung mit Hilfe einer Kameraaufzeichnung und Computerauswertung. Somit kann die Aktivität der Tiere in den einzelnen Gruppen genauer erfasst werden. Den bestehenden Kontrast zwischen dem mit Milch getrübten Wasser und der schwarzen Maus kann man sich hierbei zunutze machen. Innerhalb der AG IRIS wurde diese Art der maschinellen Auswertung mittlerweile erprobt und etabliert.

5.5.7. Elevated Plus Maze Test

Nach kurzer Orientierungszeit im Zentrum des Mazes zogen sich die Tiere in den geschlossenen Arm zurück, auf welchen sie schauten. Im Anschluss begannen sie sich auf den verschiedenen Armen zu bewegen und ihre Umgebung zu erkunden.

Bei den Tieren aller Gruppen war nach Reanimation eine geringere Aktivität zu beobachten. Im Verlauf des Untersuchungszeitraumes nahm diese leicht zu, blieb aber unter dem Ausgangswert. Ein Unterschied zwischen den Gruppen war nicht festzustellen.

Die Arbeitsgruppe um Neigh et al. stellte 2004 fest, dass es nach CA/CPR bei Mäusen zu einer vermehrten Ängstlichkeit der Tiere kommen kann [74]. Diese begründet die Autorin 2009 in einer Aktivierung von Mikrogliazellen im Hippocampus, ohne dass sich ein weiterer neurologischer Schaden darstellt [51].

Eine weitere mögliche Erklärung für dieses Ergebniss ist die Gewöhnung an den Test im Laufe des Untersuchungszeitraumes und einem damit verbundenen Abfall des Interesses der Tiere. Eine Ablenkung durch Umgebungsgeräusche ist bei diesem sehr störanfälligen Test nicht auszuschließen, da sich das Elevated Plus nicht in einem abgeschirmten Raum befand. Es wurde jedoch streng darauf geachtet, dass die Umgebung möglichst reizarm war.

5.5.8. Adhesive-Removal-Test

Es handelt sich hierbei um einen Test bei welchem sowohl die sensorische als auch die motorische Verarbeitung eines Reizes untersucht werden und mit hoher Sensitivität Schäden aufgedeckt werden können, welche der klinischen Untersuchung entgehen [75], [76]. Somit konnte sowohl die sensorische Fähigkeit der Mäuse im Bereich der Vorderpfoten als auch der Schnauze bewertet werden (Time-to-Contact), sowie die motorische Fähigkeit zielgerecht die Vorderpfote zur Schnauze zu führen und mit einem gewissen Kraftaufwand das Pflaster zu entfernen (Time-to-Remove). Ebenso mussten die Tiere in der Lage sein sich auf den Hinterbeinen sitzend zu halten um das Pflaster zu entfernen ohne dabei das Gleichgewicht zu verlieren.

In der Lernphase vor Reanimation zeigt sich anhand signifikanter Lernerfolge sowohl auf der sensorischen als auch der motorischen Ebene, dass der Test gut für die Beurteilung der Fähigkeiten der Tiere geeignet ist. Nach Herz-Kreislaufstillstand waren sowohl die sensorischen als auch die motorischen Fähigkeiten der Tiere stark eingeschränkt. Dieses geht wiederum mit einer Verlängerung der Time-to-Contact sowie der Time-to-Remove Ergebnisse einher. Mit zunehmender Erholung der Tiere im Untersuchungszeitraum zeigte sich auch eine Verbesserung der Zeiten. Da sich bei den überlebenden Tieren kein bleibendes neurologisches Defizit eingestellt hat, glichen die Zeiten am 28. Beobachtungstag den Werte vor CA/CPR.

5.5.9. Temperaturmanagement

Durch eine regelmäßige Überwachung der Körpertemperatur war es in dieser Untersuchung möglich, diese innerhalb des Normbereiches für Nagetiere bei 36°C einzustellen [57]. Jedoch ist in der Literatur auch beschrieben, dass die Körpertemperatur, ebenso wie die des Menschen, einer zirkadianen Rhythmik unterliegt und zwischen 35,5 – 38,2°C schwankt [77]. Durch den Einsatz der rückgekoppelten Wärmeplatte sowie des Terrariums und der Infrarotwärmebildmessung wurde ein Auskühlen und Überhitzen der Tiere vermieden. Ein positiver therapeutischer Effekt durch Hypothermie sowie ein zu starker Temperaturanstieg konnten somit ausgeschlossen werden. Die Kontrolle der Körpertemperatur über die rektale Temperatursonde erfolgte in Narkose, sodass es keine weitere Beeinträchtigung des Tieres gab. Das Auskühlen der Tiere konnte somit auch während der Narkose verhindert werden. Als weitere Methode zur Messung der Temperatur in Narkose wäre eine Sonde unterhalb der Leber denkbar gewesen. Dieses hätte jedoch eine Eröffnung des Abdomens und somit einen weiteren invasiven Eingriff mit möglichem Einfluss auf das Outcome vorausgesetzt.

Nach Extubation erfolgte die Körpertemperaturmessung über eine Infrarotkamera auf Höhe der Leber. Durch die zuvor durchgeführte Enthaarung wurden Isolationseffekte vermieden.

Aus früheren Untersuchungen ist bereits bekannt, dass es nach CA/CPR eher zur Ausbildung einer Hypothermie bei Nagetieren kommt [78], [79]. Dieses steht im Gegensatz zu bekannten Daten beim Menschen. Hier entwickelt sich als Reaktion nach einem Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation eher eine Hyperthermie. Die Untersuchungstiere wurden auf Grund dieser Daten direkt nach Extubation in ein beheiztes Terrarium gelegt um eine Normothermie zu gewährleisten.

5.6. Limitationen der Untersuchung

Die erzielten Ergebnisse, welche im Einklang mit Ergebnissen aus der Literatur stehen, zeigen, dass das von uns praktizierte Model des Herz-Kreislaufstillstandes und der kardiopulmonalen Reanimation in diesem Forschungsgebiet sehr gut einsetzbar und reproduzierbar ist. Dies sollte auch in kommenden Untersuchungen zu einer deutlichen Stärkung der Ergebnisse führen.

Insgesamt muss bei der Betrachtung der uns vorliegenden Ergebnisse der neurophysiologischen Tests jedoch bedacht werden, dass eine Verfälschung in Richtung falsch-positiver Ergebnisse vorliegt. Primär werden in die Tests nur Tiere eingeschlossen, die auch überlebt haben. Weiterhin haben an bestimmten Untersuchungen, z.B. dem WaterMaze-Test nur Tiere mit einem ausreichend hohen NeuroScore bzw. AZ teilgenommen. Somit fehlen Daten von Tieren, die aufgrund ihrer körperlichen Einschränkungen zwar in der Überlebenskurve berücksichtigt wurden, jedoch an speziellen Tests nicht teilnehmen konnten. Zum Schutz der Versuchstiere mussten diese Ausschlusskriterien jedoch eingehalten werden.

Weiterhin war es uns, anders als im klinischen Alltag, nicht möglich eine längerfristige intensivmedizinische Betreuung zu gewährleisten. Somit sind Tiere mit einem schlechten AZ nach Herz-Kreislaufstillstand und kardiopulmonaler Reanimation frühzeitig im Beobachtungszeitraum verstorben. Nach den ersten Tagen waren somit nur noch Tiere mit einer guten Erholungswahrscheinlichkeit Teil der Untersuchung.

6. Schlussfolgerung

Abschließend bleibt zu sagen, dass die Verwendung von Artesunate im Reanimationsmodell an Mäusen gegenüber der herkömmlichen kardiopulmonalen Reanimation keinen Überlebensvorteil erbringt.

Weiterhin zeichnet sich die Tendenz ab, dass das funktionell-neurologische Outcome mit Artesunate sogar schlechter ausfällt als beim Verzicht auf die Verwendung der Substanz.

Daraus schließen wir, das Artesunate bis zum Vorliegen eines besseren pharmakodynamischen Verständnisses sowie der grundlegenden molekularen Mechanismen vorerst keine weitere Anwendung im Reanimationsmodell der Maus finden sollte. Eine Begründung hierfür findet sich auch in den 3-R-Prinzipien für Tierversuche durch Russell und Burch von 1959 [80]. Wir verzichteten daher auf geplante Kurzzeitversuche zur Untersuchung von Inflammationsparametern 1,5 und 8 Stunden nach Reanimation und Anwendung von Artesunate.

Die Daten des hier vorliegenden, auf funktionell-neurologische Parameter orientierten Versuchsmodells zeigen klar, dass keine Verbesserung der Überlebensrate und der funktionell-neurologischen Regeneration nach kardio-pulmonaler Reanimation bei Herz-Kreislaufstillstand durch Artesunate zu erwarten ist.

7. Literatur

1. Aghababian RV, Mears G, Ornato JP, Kudenchuk PJ, Overton J. Cardiac arrest management. Prehospital emergency care : official journal of the National Association of EMS Physicians and the National Association of State EMS Directors 2001;5:237–246.
2. Zipes DP, Wellens HJJ. Sudden Cardiac Death. Circulation 1998;98:2334–2351.
3. Gräsner J-T, Bossaert L. Epidemiology and management of cardiac arrest: What registries are revealing. Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology 2013;27:293–306.
4. Perkins GD, Brace-McDonnell SJ. The UK Out of Hospital Cardiac Arrest Outcome (OHCAO) project. BMJ open 2015;5:e008736.
5. Abrams HC, McNally B, Ong M, Moyer PH, Dyer KS. A composite model of survival from out-of-hospital cardiac arrest using the Cardiac Arrest Registry to Enhance Survival (CARES). Resuscitation 2013.
6. Pell JP, Sirel JM, Marsden AK, Ford I, Walker NL, Cobbe SM. Presentation, management, and outcome of out of hospital cardiopulmonary arrest: comparison by underlying aetiology. Heart (British Cardiac Society) 2003;89:839–842.
7. Albaeni A, Eid SM, Akinyele B, Kurup LN, Vaidya D, Chandra-Strobos N. The association between post resuscitation hemoglobin level and survival with good neurological outcome following Out Of Hospital cardiac arrest. Resuscitation 2015;99:7–12.
8. Püttgen HA, Pantle H, Geocadin RG. Management of cardiac arrest patients to maximize neurologic outcome. Current opinion in critical care 2009;15:118–124.
9. Smith K, Andrew E, Lijovic M, Nehme Z, Bernard S. Quality of life and functional outcomes 12 months after out-of-hospital cardiac arrest. Circulation 2015;131:174–181.

10. Nehme Z, Bernard S, Cameron P, Bray JE, Meredith IT, Lijovic M, et al. Using a cardiac arrest registry to measure the quality of emergency medical service care: decade of findings from the Victorian Ambulance Cardiac Arrest Registry. *Circulation. Cardiovascular quality and outcomes* 2015;8:56–66.
11. Daya MR, Schmicker RH, Zive DM, Rea TD, Nichol G, Buick JE, et al. Out-of-hospital cardiac arrest survival improving over time: Results from the Resuscitation Outcomes Consortium (ROC). *Resuscitation* 2015;91:108–115.
12. Negovsky VA. Postresuscitation disease. *Critical care medicine* 1988;16:942–946.
13. Tanaka E, Yamamoto S, Kudo Y, Mihara S, Higashi H. Mechanisms underlying the rapid depolarization produced by deprivation of oxygen and glucose in rat hippocampal CA1 neurons in vitro. *Journal of neurophysiology* 1997;78:891–902.
14. Böttiger 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;18:1077–1087.
15. Schneider A, Albertsmeier M, Böttiger BW, Teschendorf P. Postreanimationssyndrom. Rolle der Entzündung nach Herz-Kreislauf-Stillstand. *Anaesthesist* 2012;61:424–436.
16. Kern KB, Hilwig RW, Rhee KH, Berg RA. Myocardial dysfunction after resuscitation from cardiac arrest: An example of global myocardial stunning. *Journal of the American College of Cardiology* 1996;28:232–240.
17. Adrie C. Successful Cardiopulmonary Resuscitation After Cardiac Arrest as a "Sepsis-Like" Syndrome. *Circulation* 2002;106:562–568.
18. Greenhill CJ, Rose-John S, Lissilaa R, Ferlin W, Ernst M, Hertzog PJ, et al. IL-6 trans-signaling modulates TLR4-dependent inflammatory responses via STAT3. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2011;186:1199–1208.

19. Chong AJ, Shimamoto A, Hampton CR, Takayama H, Spring DJ, Rothnie CL, et al. Toll-like receptor 4 mediates ischemia/reperfusion injury of the heart☆. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2004;128:170–179.
20. Sun P, Xu L, Zhang Q, Zhang Q-S, Li Q, Han J-Y. Improved Survival and Neurological Outcomes after Cardiopulmonary Resuscitation in Toll-like Receptor 4-mutant Mice. *Chin Med J* 2015;128:2646.
21. Lv Y, Qian Y, Fu L, Chen X, Zhong H, Wei X. Hydroxysafflor yellow A exerts neuroprotective effects in cerebral ischemia reperfusion-injured mice by suppressing the innate immune TLR4-inducing pathway. *European Journal of Pharmacology* 2015;769:324–332.
22. Woodrow CJ, Haynes RK, Krishna S. Artemisinins. *Postgraduate medical journal* 2005;81:71–78.
23. WHO. WHO Model Lists of Essential Medicines: ADULTS -- 19th edition (April 2015) -- Rev. August 2015; 2015. <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>.
24. Souza MC, Paixão FHM, Ferraris FK, Ribeiro I, Henriques MdGMO. Artesunate Exerts a Direct Effect on Endothelial Cell Activation and NF-κB Translocation in a Mechanism Independent of Plasmodium Killing. *Malar Res Treat* 2012;2012:679090.
25. Lai L, Chen Y, Tian X, Li X, Zhang X, Lei J, et al. Artesunate alleviates hepatic fibrosis induced by multiple pathogenic factors and inflammation through the inhibition of LPS/TLR4/NF-κB signaling pathway in rats. *European Journal of Pharmacology* 2015;765:234–241.
26. Sordi R, Nandra KK, Chiazza F, Johnson FL, Cabrera CP, Torrance HD, et al. Artesunate Protects Against the Organ Injury and Dysfunction Induced by Severe Hemorrhage and Resuscitation. *Annals of surgery* 2017;265:408–417.
27. Khan AI, Kapoor A, Chen J, Martin L, Rogazzo M, Mercier T, et al. The Antimalarial Drug Artesunate Attenuates Cardiac Injury in A Rodent Model of Myocardial Infarction. *Shock* 2018;49:675–681.

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* 2010;33:189–196.
29. Bergt S, Güter A, Grub A, Wagner N-M, Beltschany C, Langner S, et al. Impact of Toll-Like Receptor 2 Deficiency on Survival and Neurological Function after Cardiac Arrest: A Murine Model of Cardiopulmonary Resuscitation. *PLoS ONE* 2013;8:e74944.
30. Teasdale G, Jennett B. ASSESSMENT OF COMA AND IMPAIRED CONSCIOUSNESS. *The Lancet* 1974;304:81–84.
31. Abella BS, Zhao D, Alvarado J, Hamann K, Vanden Hoek TL, Becker LB. Intra-arrest cooling improves outcomes in a murine cardiac arrest model. *Circulation* 2004;109:2786–2791.
32. Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* 2006;1:848–858. <http://www.nature.com/nprot/journal/v1/n2/full/nprot.2006.116.html>.
33. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2007;2:322–328. <http://www.nature.com/nprot/journal/v2/n2/full/nprot.2007.44.html>.
34. Schneider A, Bottiger BW, Popp E. Cerebral resuscitation after cardiocirculatory arrest. *Anesthesia and analgesia* 2009;108:971–979.
35. Wachelder EM, Moulaert, V R M P, van Heugten C, Verbunt JA, Bekkers, S C A M, Wade DT. Life after survival: long-term daily functioning and quality of life after an out-of-hospital cardiac arrest. *Resuscitation* 2009;80:517–522.
36. Wallet MA, Reist CM, Williams JC, Appelberg S, Guiulfo GL, Gardner B, et al. The HIV-1 protease inhibitor nelfinavir activates PP2 and inhibits MAPK signaling in macrophages: a pathway to reduce inflammation. *Journal of leukocyte biology* 2012;92:795–805.
37. Yang Y, Lv J, Jiang S, Ma Z, Wang D, Hu W, et al. The emerging role of Toll-like receptor 4 in myocardial inflammation. *Cell death & disease* 2016;7:e2234.

38. 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;42:265–276.
39. Gibson CL, Coomber B, Murphy SP. Progesterone is neuroprotective following cerebral ischaemia in reproductively ageing female mice. *Brain : a journal of neurology* 2011;134:2125–2133.
40. 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;24:805–813.
41. Nichol G, Leroux B, Wang H, Callaway CW, Sopko G, Weisfeldt M, et al. Trial of Continuous or Interrupted Chest Compressions during CPR. *The New England journal of medicine* 2015;373:2203–2214.
42. Kawano T, Grunau B, Scheuermeyer FX, Gibo K, Dick W, Fordyce CB, et al. Prehospital sodium bicarbonate use could worsen long term survival with favorable neurological recovery among patients with out-of-hospital cardiac arrest. *Resuscitation* 2017;119:63–69.
43. TOKU-E. Artesunate Product Data Sheet; 2017. <https://www.toku-e.com/Artesunate-P1968.aspx>.
44. Arras M, Autenried P, Rettich A, Spaeni D, Rulicke T. Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. *Comparative medicine* 2001;51:443–456.
45. Lenhardt R. Body temperature regulation and anesthesia. *Handbook of clinical neurology* 2018;157:635–644.
46. Landoni G, Fochi O, Torri G. Cardiac protection by volatile anaesthetics: a review. *Current vascular pharmacology* 2008;6:108–111.
47. Kopic J. Volatile anaesthetics and cardiac protection in abdominal surgery. *Wiener klinische Wochenschrift* 2015;127:543–548.

48. Bellgardt M, Bomberg H, Herzog-Niescery J, Dasch B, Vogelsang H, Weber TP, et al. Survival after long-term isoflurane sedation as opposed to intravenous sedation in critically ill surgical patients: Retrospective analysis. *European journal of anaesthesiology* 2016;33:6–13.
49. Krannich A, Leithner C, Engels M, Nee J, Petzinka V, Schröder T, et al. Isoflurane Sedation on the ICU in Cardiac Arrest Patients Treated With Targeted Temperature Management: An Observational Propensity-Matched Study. *Critical care medicine* 2017;45:e384-e390.
50. Nakano T, Hurn PD, Herson PS, Traystman RJ. Testosterone exacerbates neuronal damage following cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in mouse. *Brain research* 2010;1357:124–130.
51. Neigh GN, Karelina K, Glasper ER, Bowers SLK, Zhang N, Popovich PG, et al. Anxiety after cardiac arrest/cardiopulmonary resuscitation: exacerbated by stress and prevented by minocycline. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2009;40:3601–3607.
52. Bottiger BW, Teschendorf P, Krumnikl JJ, Vogel P, Galmbacher R, Schmitz B, et al. Global cerebral ischemia due to cardiocirculatory arrest in mice causes neuronal degeneration and early induction of transcription factor genes in the hippocampus. *Brain research. Molecular brain research* 1999;65:135–142.
53. Dezfulian C, Shiva S, Alekseyenko A, Pendyal A, Beiser DG, Munasinghe JP, et al. 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.
54. Silverman MG, Scirica BM. Cardiac arrest and therapeutic hypothermia. *Trends in cardiovascular medicine* 2015.
55. Callaway CW, Donnino MW, Fink EL, Geocadin RG, Golan E, Kern KB, et al. Part 8: Post-Cardiac Arrest Care: 2015 American Heart Association Guidelines Update for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation* 2015;132:S465-82.

56. Nolan JP, Soar J, Cariou A, Cronberg T, Moulaert VRM, Deakin CD, et al. European Resuscitation Council and European Society of Intensive Care Medicine Guidelines for Post-resuscitation Care 2015: Section 5 of the European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2015. *Resuscitation* 2015;95:202–222.
57. 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. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985) 2002;92:870–877.
58. Bernard SA, Gray TW, Buist MD, Jones BM, Silvester W, Gutteridge G, et al. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *The New England journal of medicine* 2002;346:557–563.
59. Deakin CD, Nolan JP, Soar J, Sunde K, Koster RW, Smith GB, et al. European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2010 Section 4. Adult advanced life support. *Resuscitation* 2010;81:1305–1352.
60. Miao P, Kong Y, Ma Y, Zeng H, Yu Z. Hypothermia predicts the prognosis in colon ascendens stent peritonitis mice. *The Journal of surgical research* 2013;181:129–135.
61. Tung RT, Shen WK, Hammill SC, Gersh BJ. Idiopathic ventricular fibrillation in out-of-hospital cardiac arrest survivors. *Pacing and clinical electrophysiology : PACE* 1994;17:1405–1412.
62. Song L, Weil MH, Tang W, Sun S, Pellis T. Cardiopulmonary resuscitation in the mouse. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985) 2002;93:1222–1226.
63. Salcido DD, Menegazzi JJ, Suffoletto BP, Logue ES, Sherman LD. Association of intramyocardial high energy phosphate concentrations with quantitative measures of the ventricular fibrillation electrocardiogram waveform. *Resuscitation* 2009;80:946–950.

64. Sefrin P, Distler K. Stellenwert der Zugangszeit in der Rettungskette. *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie* : AINS 2001;36:742–748.
65. Sladjana A, Gordana P, Ana S. Emergency response time after out-of-hospital cardiac arrest. *European journal of internal medicine* 2011;22:386–393.
66. Kofler J, Hattori K, Sawada M, DeVries AC, Martin LJ, Hurn PD, et al. Histopathological and behavioral characterization of a novel model of cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in mice. *Journal of neuroscience methods* 2004;136:33–44.
67. Abella BS, Zhao D, Alvarado J, Hamann K, Vanden Hoek TL, Becker LB. Intra-arrest cooling improves outcomes in a murine cardiac arrest model. *Circulation* 2004;109:2786–2791.
68. Lapi D, Vagnani S, Sapio D, Mastantuono T, Sabatino L, Paterni M, et al. Long-term remodeling of rat pial microcirculation after transient middle cerebral artery occlusion and reperfusion. *Journal of vascular research* 2013;50:332–345.
69. Lalonde R, Bensoula AN, Filali M. Rotorod sensorimotor learning in cerebellar mutant mice. *Neuroscience Research* 1995;22:423–426.
70. Kennard JA, Woodruff-Pak DS. Age sensitivity of behavioral tests and brain substrates of normal aging in mice. *Frontiers in aging neuroscience* 2011;3:9.
71. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods* 1984;11:47–60.
72. Bromley-Brits K, Deng Y, Song W. Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. *J Vis Exp* 2011.
73. Fritz A-K, Amrein I, Wolfer DP. Similar reliability and equivalent performance of female and male mice in the open field and water-maze place navigation task. *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics* 2017;175:380–391.
74. Neigh GN, Kofler J, Meyers JL, Bergdall V, La Perle, Krista M D, Traystman RJ, et al. Cardiac arrest/cardiopulmonary resuscitation increases anxiety-like

behavior and decreases social interaction. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2004;24:372–382.

75. Bouet V, Boulouard M, Toutain J, Divoux D, Bernaudin M, Schumann-Bard P, et al. The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice. *Nat Protoc* 2009;4:1560–1564.
76. Freret T, Bouet V, Leconte C, Roussel S, Chazalviel L, Divoux D, et al. Behavioral deficits after distal focal cerebral ischemia in mice: Usefulness of adhesive removal test. *Behav. Neurosci.* 2009;123:224–230.
77. Wither RG, Colic S, Wu C, Bardakjian BL, Zhang L, Eubanks JH. Daily rhythmic behaviors and thermoregulatory patterns are disrupted in adult female MeCP2-deficient mice. *PLoS ONE* 2012;7:e35396.
78. Ebong S, Call D, Nemzek J, Bolgos G, Newcomb D, Remick D. Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. *Infection and immunity* 1999;67:6603–6610.
79. Warn PA, Brampton MW, Sharp A, Morrissey G, Steel N, Denning DW, et al. Infrared body temperature measurement of mice as an early predictor of death in experimental fungal infections. *Laboratory animals* 2003;37:126–131.
80. Russell WMS, Burch R. L. *The principles of humane experimental technique.*; 1959.

8. Selbständigkeitserklärung

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

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

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

Rostock, 30.01.2020

Michael Wiebersinsky

9. Lebenslauf

Name Michael Wiebersinsky
Geburtstag 13.02.1985 in Nauen
Anschrift Bleicherstraße 5, 18055 Rostock
Familienstand ledig
Staatsangehörigkeit deutsch

Wissenschaftliche Vorträge

Dezember 2015 NAT (Norddeutsche Anästhesietage) Hamburg: *„Einfluss von Artesunate auf die Überlebensrate und die funktionell-neurologisch Regeneration von Mäusen nach Herz-Kreislaufstillstand und kardiopulmonaler Reanimation“*

Beruflicher Werdegang

Seit Januar 2016 Assistenzarzt in der Klinik und Poliklinik für Anästhesie und Intensivtherapie der Universitätsmedizin Rostock
2007 – 2009 Rettungssanitäter bei der Ambulanz Millich, Kessin

Studium

2009 – 2015 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock

Ausbildung

2006 – 2007 Ausbildung zum Rettungssanitäter an der Sanitätsschule Nord, Hutzfeld

Schulbildung

2002 – 2005 Allgemeine Hochschulreife (Note 1,8) am Goethe-Gymnasium, Nauen
2001 – 2002 Polson High School, Polson MT, USA
1997 – 2001 Goethe-Gymnasium, Nauen
1991 – 1997 Gebrüder Grimm Grundschule, Nauen

Rostock, 30.01.2020

Michael Wiebersinsky

10. Thesen zur Dissertation

1. Trotz anhaltender Forschung der Therapiestrategien bei Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation ist das funktionell-neurologische Behandlungsergebnis schlecht
2. Zur Verbesserung der funktionell-neurologischen Behandlungsergebnisse nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation sind weiterführende klinische und experimentelle Studien unabdingbar
3. Für eine Beurteilung der funktionell-neurologischen Regeneration sind Langzeitstudien unbedingt notwendig
4. Tierexperimentelle Untersuchungen sind für die Grundlagenforschung zur Therapieentwicklung unabdingbar
5. Artesunate hat sich in verschiedenen Studien an Einzelorganen bei Ischämie/Reperusionsmodellen als protektiv gezeigt
6. Artesunate hat einen direkten Einfluss auf die Immunantwort nach Ischämie/Reperfusion
7. Artesunate hat keinen positiven Einfluss auf Überleben und funktionell-neurologisches Langzeitergebnis nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation
8. Der medikamentöse Einsatz von Artesunate im Rahmen der Reanimationsforschung bedarf aktuell keiner weiteren tierexperimentellen Untersuchung