

Deutsches Herzzentrum Berlin

**Klinik für Angeborene
Herzfehler / Kinderkardiologie**

Dissertation

**Auswirkungen von tiefer Hypothermie und Wiedererwärmung
auf die morphologischen und funktionellen Eigenschaften
von humanen Endothelzellen**

**Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin**

von

**Jörg Rößler
aus Berlin, Deutschland**

Gutachter/in:

- 1. Prof. Dr. med. F. Berger**
- 2. Prof. Dr. H. Abdul-Khaliq**
- 3. Prof. Dr. med. B. Stiller**

Datum der Promotion: 19.11.2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
1.1 Klinischer Hintergrund: Hypothermie in der Kinderherzchirurgie.....	9
1.2 Zellkulturmodell mit humanen Endothelzellen.....	10
1.3 Strukturproteine: F-Aktin und Connexin	10
1.4 Die inflammatorische Antwort: Bedeutung der Zytokine und Chemokine.....	11
1.4.1 Interleukin-6.....	12
1.4.2 Interleukin-8.....	12
1.4.3 Monozyten Chemotaktisches Protein-1	12
1.5 Wichtige intrazelluläre Signalwege bei der Inflammation:	13
Mitogen-Aktivierende Proteinkinasen	13
1.6 Medikamentöse Intervention: Methylprednisolon und Tacrolimus.....	15
1.6.1 Methylprednisolon	15
1.6.2 Tacrolimus.....	15
1.7 Zielsetzung.....	17
2. Materialien	18
2.1 Geräte	18
2.2 Chemikalien	18
2.3 Zellkultur	19
2.4 Proteine, Antikörper, Medikamente	20
2.5 Sonstige Materialien.....	21
3. Methoden	22
3.1 Dynamische Temperaturveränderungen: Das Zeit-Temperatur-Protokoll.....	22
3.2 Gewinnung humaner Endothelzellen (HUVEC) aus Nabelschnurvenen.....	23
3.3 Zellpflege und Zellpassage	24
3.4 Vitalitätstests mittels MTT und Trypanblau-Färbung.....	24
3.5 Bestimmung der Zytokinkonzentrationen mittels ELISA.....	25
3.6 Zeitraffer-Videomikroskopie im <i>SlideReactor</i>	26
3.7 Immunzytochemische Färbungen mit anti- F-Aktin/DAPI.....	26
3.8 Adhäsions-Assay	27
3.9 Permeabilitätstest.....	27

3.10	Untersuchung der intrazellulären Signalwege mittels Western Blot Analysen ...	28
3.10.1	Gewinnung der Proteine.....	28
3.10.2	Bestimmung der Proteinkonzentrationen mit der BCA-Methode	28
3.10.3	Gelelektrophorese (SDS-Page).....	28
3.10.4	Transfer der Proteine mit der Tankblotting Transfermethode	30
3.10.5	Detektion der Proteine.....	30
3.11	Densitometrische Analyse.....	31
3.12	Statistische Analyse	31
4.	Ergebnisse	32
4.1	Hypothermie und Wiedererwärmung.....	32
4.1.1	Morphologie, Adhäsion und Permeabilität.....	32
4.1.1.1	Effekte unterschiedlicher Konzentrationen von Methylprednisolon und Tacrolimus auf die Zellvitalität.....	33
4.1.1.2	Beeinflussung morphologischer und funktioneller Veränderungen durch Methylprednisolon und Tacrolimus	34
4.1.2	Zellvitalität	38
4.1.2.1	Einfluss der Kühlung und Wiedererwärmung auf die Zellvitalität	38
4.1.2.2	Einfluss von Methylprednisolon und Tacrolimus auf die Zellvitalität während dynamischer Temperaturveränderungen	39
4.1.2.3	Einfluss spezifischer Inhibitoren der Mitogen-Aktivierenden Proteinkinasen auf die Zellvitalität.....	40
4.1.3	Inflammation.....	41
4.1.3.1	Interleukin-6	41
4.1.3.2	Einfluss von Methylprednisolon und Tacrolimus auf die erhöhte Interleukin-6 Sekretion nach Hypothermie und Wiedererwärmung.....	42
4.1.3.3	Effekte von tiefer Hypothermie und Wiedererwärmung auf die Interleukin-8 und die Monozyten Chemotaktisches Protein-1 Sekretion.....	43
4.1.4	Intrazelluläre Signalwege: Die Mitogen-Aktivierenden Proteinkinasen ERK 1/2, SAPK/JNK und p38	44
4.1.4.1	ERK 1/2	44
4.1.4.2	SAPK/JNK.....	46
4.1.4.3	p38.....	48

4.1.5 Beeinflussung inflammatorischer Vorgänge durch spezifische Inhibitoren der Mitogen-Aktivierenden Proteinkinasen	49
5. Diskussion	50
5.1 Veränderungen der HUVEC unter Hypothermie	50
5.1.1 Einfluss von tiefer Hypothermie und Wiedererwärmung auf morphologische Veränderungen.....	50
5.1.2 Einfluss von Methylprednisolon und Tacrolimus auf morphologischen Veränderungen.....	51
5.2 Einfluss von tiefer Hypothermie und Wiedererwärmung auf die Zellvitalität und das Inflammationsverhalten stimulierter HUVEC	52
5.2.1 Die Inflammationseigenschaften TNF- α stimulierter HUVEC	52
5.2.2 Einfluss von Methylprednisolon und Tacrolimus auf das Inflammationsverhalten stimulierter HUVEC	53
5.2.3 Einfluss der Hypothermie auf die Mitogen-Aktivierenden Proteinkinasen und deren spezifische Inhibition	54
6. Schlussfolgerung	56
7. Ausblick	57
8. Zusammenfassung.....	58
9. Abstract.....	59
10. Literaturangaben	60

Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Aktiviertes Protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovine Serum Albumine
Cox-2	Cyclooxygenase-2
CPB	Cardiopulmonary Bypass / kardiopulmonaler Bypass
CREB	CAMP Response Element-Binding protein
DAPI	4', 6-Diamidino-2-Phenylindol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
ELK-1	Ets LiKe gene-1
ERK	Extrazelluläre signalregulierende Kinase
FCS	Fetal Calf Serum
FGF-acid	Fibroblast Growth Factor-acid
GR-1	Glukokortikoidrezeptor
GR-2	Mineralokortikoidrezeptor
HRP	Horseradish Peroxidase
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFN- γ	Interferon-Gamma
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-6R	IL-6 Rezeptor
iNOS	induzierte NO-Synthetase
JAK-STAT	Janus-Kinase-Signal Transducers and Activators of Transcription
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	kilo-Dalton
LPS	Lipopolysaccharid
MAPKs	Mitogen-Aktivierende Proteinkinasen
MCP-1	Monozyten Chemotaktisches Protein-1
MP	Methylprednisolon

MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 - Diphenyltetrazoliumbromid
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NF-κB	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (kappa B)
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMSF	Phenylmethylsulphonyl Fluoride
rpm	rounds per minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
sIL-6R	soluble IL-6 Receptor
STAT1	Signal Transducer And Activator of Transcription 1
STAT3	Signal Transducer And Activator of Transcription 3
TAC	Tacrolimus
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidine
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
TRIS-Acetat	Tris Hydroxymethyl-aminomethan-acetat
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecules

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Regulationskaskade der MAPKs.....	14
Abbildung 2: Das Zeit-Temperatur-Protokoll.....	23
Abbildung 3: Morphologische Veränderungen der HUVEC unter Kühlung und Wiedererwärmung,	33
Abbildung 4: Zellvitalitätstest nach Gabe unterschiedlicher Konzentrationen von MP oder TAC.	34
Abbildung 5: Morphologische Veränderungen humaner Endothelzellen während Hypothermie und Wiedererwärmung.	35
Abbildung 6: Morphologische Veränderungen der HUVEC unter Kombinationsbehandlung mit MP und TAC während Kühlung und Wiedererwärmung .	36
Abbildung 7: Einfluss von Kühlung und Wiedererwärmung auf die Zelladhäsion und die Zellpermeabilität	37
Abbildung 8: Einfluss von Kühlung und Wiedererwärmung auf die Zellvitalität.	38
Abbildung 9: Einfluss von MP und TAC auf die Zellvitalität.....	39
Abbildung 10: Einfluss der unterschiedlichen MAPK-Inhibitoren auf die Zellvitalität....	40
Abbildung 11: IL-6 Sekretion TNF- α stimulierter HUVEC	41
Abbildung 12: IL-6 Sekretion nach Applikation von MP und/oder TAC.....	42
Abbildung 13: Sekretion der Chemokine IL-8 und MCP-1	
Abbildung 14: Veränderungen der pERK 1/2 Expression in der Phase der Wiedererwärmung	45
Abbildung 15: Veränderungen der pSAPK/JNK Expression in der Phase der Wiedererwärmung.	47
Abbildung 16: Veränderungen der pp38 Expression in der Phase der Wiedererwärmung	48
Abbildung 17: Beeinflussung der IL-6 Sekretion durch spezifische MAPK-Inhibitoren.	49

1 Einleitung

1.1 Klinischer Hintergrund: Hypothermie in der Kinderherzchirurgie

Hypothermie wird seit den 50iger Jahren eingesetzt und ist das älteste und bedeutendste Verfahren zur Organprotektion während kardiochirurgischer Operationen bei Neugeborenen und Säuglingen [1]. Hypothermie ist definiert als Senkung der Körpertemperatur unter 36°C. Es wird zwischen milder Hypothermie (35°C - 30°C), moderater Hypothermie (29°C - 25°C) und tiefer Hypothermie (<25°C) unterschieden. Im klinischen Alltag wird aktuell sowohl die therapeutische Hypothermie, z. B. nach ischämischen Insulten [2] oder bei der Neugeborenen-Hypoxämie [5], als auch die prophylaktische Hypothermie, z. B. während des Herz-Kreislaufstillstandes unter kardiopulmonalem Bypass (CPB) [3], eingesetzt. Im Falle komplexer kardialer Korrekturoperationen bei Neugeborenen und Kindern unter Verwendung des CPB ermöglicht die tiefe Hypothermie den Schutz unreifer Organsysteme durch Verlängerung der Ischämietoleranz während Phasen der Minderperfusion [6]. Die Wirkweise der Hypothermie ist vielseitig, aber relativ unspezifisch. Unter anderem reduziert Hypothermie den zerebralen Blutfluss, senkt den Zellmetabolismus [1] und vermindert die Akkumulation exzitatorischer Aminosäuren im Gehirn und anderer Stoffwechselprodukte im Körper [7]. Tiefe Hypothermie und Herz-Kreislaufstillstand haben sich als etablierte Verfahren während herzchirurgischer Eingriffe bei angeborenen komplexen Herzfehlern durchgesetzt. Jedoch sind prolongierte Inflammation und „Kapillar-Leck-Syndrom“ („capillary leakage“) häufige Komplikationen nach Korrekturoperationen unter tiefer Hypothermie bei Neugeborenen und Säuglingen [8, 4, 9, 3]. Durch die große nicht-endothelialisierte Oberfläche der Herz-Lungen-Maschine, mit der das zirkulierende Blut in Kontakt kommt, entsteht eine Entzündungsreaktion im Körper. Dieser Effekt ist bei Kindern besonders stark ausgeprägt, da hier die Fläche des CPB Systems besonders groß im Vergleich zu der sehr kleinen Körperoberfläche des Patienten selbst ist. Der Hypothermie wird in diesem Zusammenhang eine protektive Rolle bei der Reduktion der akuten Inflammation zugesprochen. Jedoch gibt es nur wenige Studien, die diesen schützenden Effekt auch belegen [10]. In Langzeitstudien wurde bei Kindern, die in der Neonatal- oder Säuglingsperiode am offenen Herzen unter Herzkreislaufstillstand in tiefer Hypothermie operiert wurden als negative Folge eine verzögerte psychomotorische Entwicklung beobachtet [11, 12].

1.2 Zellkulturmodell mit humanen Endothelzellen

Obwohl die induzierte Hypothermie eine große klinische Relevanz besitzt, ist relativ wenig über die zugrunde liegenden Einflüsse auf zelluläre und molekulare Mechanismen bekannt [13]. Aus diesem Grund wurden mit Hilfe eines Zellkulturmodells die durch Hypothermie induzierten zellulären Veränderungen an humanen Endothelzellen untersucht. Mit einem speziell dafür entwickelten Zeit-Temperatur-Protokoll konnten klinische Bedingungen in Anlehnung an Operationen unter CPB in der Zellkultur simuliert werden. Als Ausgangszellen für die nachfolgenden Experimente wurden Endothelzellen ausgewählt, da sie das Innere der Gefäße aller Organsysteme auskleiden und die Organisation von biologisch aktiven Mediatoren im Blut sowie die Blutzellen selbst beeinflussen [17, 18]. Des Weiteren nimmt das Endothel eine übergeordnete Stellung in der Interaktion der einzelnen Bestandteile des Blutes ein und beteiligt sich selbst aktiv an komplexen inflammatorischen Vorgängen [16]. Im Rahmen von Entzündungsreaktionen produzieren aktivierte Endothelzellen unter anderem Signalmoleküle, wie die induzierte Cyclooxygenase-2 (Cox-2), die an der vaskulären Inflammation sowie an der Proliferation beteiligt ist [43]. Weiterhin interagieren Endothelzellen während der Frühphase der Inflammation durch die Induktion von Adhäsionsmolekülen [z. B. E-Selektine, Vascular Cell Adhesion Molecules (VCAM), Intercellular Adhesion Molecules (ICAM), u.a.], Zytokinen und Chemokinen (IL-6, TNF- α , MCP-1, etc.) mit Leukozyten [16].

1.3 Strukturproteine: F-Aktin und Connexin

Unter physiologischen Bedingungen bildet das Endothel eine Barriere zwischen Blut und umliegenden Geweben. Dabei nimmt das Aktin-Strukturprotein eine Schlüsselrolle ein, indem es die Funktion der endothelialen Barriere aufrechterhält. Aktin bildet als Bestandteil des Zytoskeletts ein dichtes, steifes, dreidimensionales kortikales Netz unterhalb der Plasmamembran, das durch Verbindungsproteine vernetzt ist [19]. Die Aufrechterhaltung der Zellbarriere durch Aktin geschieht durch Stabilisierung der Zellform, durch Erleichterung der Zelladhäsion an das subendotheliale Gewebe und durch die Formation junktionaler Komplexe [20].

Im Falle einer akuten Entzündung müssen Leukozyten diese Barriere durchdringen, um eine effektive Abwehr gegen eingedrungene Mikroorganismen im Gewebe zu initiieren [21]. Dafür ändert sich die zytoskelettale Organisation und interzelluläre Verbindungen

zwischen den einzelnen Endothelzellen werden rasch eröffnet [22]. Einen Stimulus dafür bilden neben Endotoxinen [14] auch aktiviertes Komplement, Thrombin und sezernierte Proteasen [21]. Diese bewirken eine erhöhte Permeabilität und können zusätzlich die Entstehung eines Ödems im umliegenden Gewebe fördern. Normalerweise ist dieser komplexe Effekt innerhalb kürzester Zeit reversibel und das Endothel kann innerhalb von Minuten nach Aktivierung die interzellulären Verbindungen wieder herstellen [23]. Daher hat das Endothel nicht nur einen entscheidenden Anteil an der Aufrechterhaltung, sondern auch an der Beendigung inflammatorischer Reaktionen [25]. Die Zell-zu-Zell-Verbindungen, die dafür nötig sind, stellen sehr komplexe Strukturen dar und werden durch transmembranöse Adhäsionsmoleküle, die mit einem Netzwerk zytoplasmatischer und zytoskelettaler Proteine verbunden sind, gebildet [24]. Ein bedeutsames Adhäsionsmolekül ist das Transmembranprotein Connexin 43. Connexine bilden die Gap Junctions von Zellen und ermöglichen den direkten Austausch von Molekülen bis zu einer Größe von ca. 1 kDa zwischen benachbarten Zellen [26]. Vorangegangene Studien beschreiben die Bedeutung des Proteins Connexin 43 in der Aufrechterhaltung und Regulation der endothelialen Zellbarriere während Hypothermie und Wiedererwärmung [27]. Zusätzlich besteht ein aktiver und enger Zusammenhang zwischen den Connexinen und dem Zytoskelett, insbesondere der Aktin-Filamente [28].

1.4 Die inflammatorische Antwort: Bedeutung der Zytokine und Chemokine

Während der Inflammation kommt es zur Ausschüttung diverser Zytokine und Chemokine in den Blutstrom. Zytokine und Chemokine sind Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 15 - 25 kDa, die von den meisten Körperzellen nach Stimulation synthetisiert und sezerniert werden. Sie wirken in der Regel lokal über Oberflächenrezeptoren und aktivieren Signaltransduktionskaskaden, die zu veränderter Genexpression, Stoffwechselaktivität, Zelldifferenzierung, Proliferation, Migration und Apoptose führen können. Einige Zytokine können auf verschiedene Zellen einwirken und dabei unterschiedliche Antworten hervorrufen (Pleiotropie). Zytokine können weiterhin die Synthese anderer Zytokine beeinflussen und wirken dann entweder additiv, synergistisch oder antagonistisch [29]. Im Nachfolgenden werden das Zytokin IL-6 und die Chemokine IL-8 und MCP-1, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, näher beschrieben.

1.4.1 Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) ist ein Zytokin, das größtenteils von Makrophagen, T-Zellen und Endothelzellen gebildet wird [110]. Die Transkription wird unter anderem über die Transkriptionsfaktoren Nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ der aktivierten B-Zellen (NF- κ B), Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) und „Signal transducer and activator of transcription 3“ (STAT3) induziert [30, 29, 44]. Nach der Sezernierung kann IL-6 als aktivierender Ligand an zwei Rezeptortypen binden: Zum einen an einen membrangebundenen IL-6 Rezeptor (IL-6R), der nur auf Leberzellen und Leukozyten vorkommt, und zum anderen an einen löslichen IL-6 Rezeptor (sIL-6R) [29]. IL-6 ist aktiv an der Akute-Phase-Reaktion des Körpers, an der Hämatopoese, der Differenzierung und dem Wachstum von B- und T-Zellen sowie an der neuronalen Differenzierung beteiligt [110]. Es stimuliert die Antikörperproduktion und ist zusätzlich ein endogenes Pyrogen bei der Entstehung von Fieber [31, 15].

1.4.2 Interleukin-8

Interleukin-8 ist ein Chemokin, das überwiegend von Makrophagen, T-Zellen und Endothelzellen gebildet und sezerniert wird [3]. Die Proteinbiosynthese von IL-8 erfolgt über Stimulatoren wie IL-1, IL-3, IL-6, TNF- α und IFN- γ , die nachfolgend die Transkriptionsfaktoren Aktivator Protein-1 (AP-1) und NF- κ B aktivieren [29, 32]. Nach der Sezernierung vermittelt IL-8 seine Effekte über die Bindung an G-Proteingekoppelte Rezeptoren. Der wesentliche biologische Wirkort des Chemokins sind neutrophile Granulozyten. Das Chemokin fördert die Chemotaxis. Weiterhin wird die Expression von Adhäsionsmolekülen und freien Sauerstoffradikalen stimuliert [34]. Ein zusätzlicher wichtiger Effekt von IL-8 ist die pro-angiogenetische Wirkung auf Endothelzellen. Als chemotaktisch aktives Chemokin fördert IL-8 die Migration und Proliferation von Endothelzellen durch Bildung von Gefäßen [33, 35].

1.4.3 Monozyten Chemotaktisches Protein-1

Das Monozyten Chemotaktische Protein-1 (MCP-1) gehört ebenfalls zur Gruppe der Chemokine. MCP-1 wird von vielen Zelltypen wie beispielsweise Fibroblasten, Zellen der glatten Gefäßmuskulatur und Endothelzellen sezerniert [36, 37, 38]. Die Synthese wird unter anderem durch die Zytokine IL-1, IL-4 und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) stimuliert, die den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren [39]. MCP-1 wirkt über

die Aktivierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren [40] und ist bedeutend für die Abwehrmechanismen der angeborenen und der erworbenen Immunität. Es rekrutiert chemotaktisch Monozyten, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten an den Ort der Inflammation [41, 42].

1.5 Wichtige intrazelluläre Signalwege bei der Inflammation: Mitogen-Aktivierende Proteinkinasen

Die Mitogen-Aktivierenden Proteinkinasen (MAPKs) bestehen aus drei wichtigen Proteinen: der extrazellulär Signal-Regulierende Protein Kinase (ERK), der c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und der p38 Kinase (siehe Abbildung 1). Die genannten Proteine und deren intrazelluläre Signalwege beeinflussen und steuern sich gegenseitig und sind voneinander abhängig. Alle drei Proteine haben einen großen Anteil an der Regulation des intrazellulären Stoffwechsels und an der Genexpression verschiedener Botenstoffe, die Zellwachstum, Zellentwicklung und Apoptose steuern. Aktiviert werden die MAPKs durch verschiedene Zytokine, Wachstumsfaktoren oder durch Zellstress [45, 50]. Die MAPKs werden dabei durch Phosphorylierung aktiviert und stimulieren über unterschiedliche Transkriptionsfaktoren die Induktion inflammatorischer und antiinflammatorischer Gene [46, 45]. Der ERK-Signalweg wird primär durch Wachstumsfaktoren und Mitogene aktiviert. ERK 1 und ERK 2 werden über die MAPK/ERK-Kinase (MEK 1 und MEK 2) aktiviert. Die phosphorylierte ERK-Kinase wiederum aktiviert verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie z. B. das Ets Like gene1 (ELK-1), STAT3, etc. Im Allgemeinen fördert die Aktivierung des ERK 1/2 Signalweges Zellproliferation, Zellmigration und Zelldifferenzierung, und sie besitzt einen positiven Einfluss auf das Zellüberleben [46, 47].

Von den SAPK/JNK Kinasen sind drei Unterformen bekannt: JNK 1 und JNK 2 sind in vielen Geweben und Zellen vorhanden, wohingegen JNK 3 Gehirn-spezifisch ist. JNKs reagieren auf eine große Anzahl von Stresssignalen, wie beispielsweise Hitze, proinflammatorische Zytokine, Ischämie und UV-Exposition. Die Proteinkinase aktiviert durch ihre Phosphorylierung eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren wie AP-1, ELK-1 und NFAT. Häufig bewirkt die Aktivierung der JNK eine Apoptose-Induktion [45]. Andererseits konnte gezeigt werden, dass unter bestimmten Bedingungen (z. B. kardiale Myozyten unter oxidativem Stress) ein Zellüberleben gefördert wird [48].

Des Weiteren ist die aktivierte JNK-Kinase an der Inflammation und der Tumorgenese beteiligt [46].

Von der p38 Kinase sind fünf Unterformen bekannt: p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ und p38-2. All diese Untergruppen sind substratspezifisch und reagieren auf unterschiedliche Stimuli. Die p38 Kinase wird durch Stressfaktoren in der Umgebung, wie beispielsweise Hitze, osmotischen und oxidativen Stress, Ischämie, TNF- α , sowie durch eine Vielzahl von Zytokinen, phosphoryliert. Der phosphorylierte p38 Signalweg löst die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1), ELK-1 und CAMP Response Element-binding Protein (CREB) aus. Zusammengefasst ist p38 an der Zellmotilität, der Apoptose, am Chromatinumlagerung, der Osmoregulation [45] und der Inflammation [49, 51] maßgeblich beteiligt.

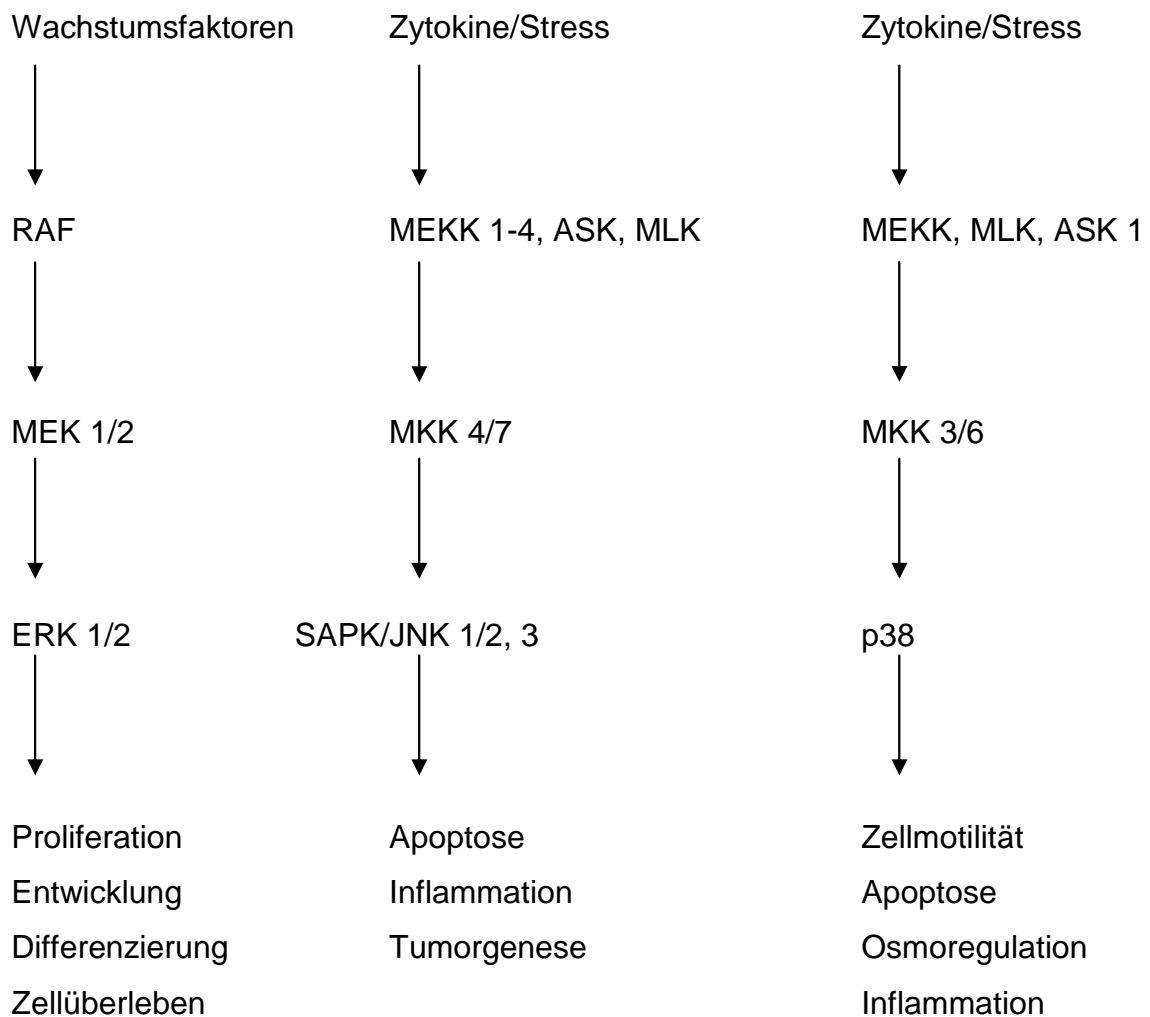


Abbildung 1: Schaubild der Regulationskaskade der drei MAPKs (ERK 1/2, SAPK/JNK, p38) mit entsprechenden Stimuli und den zellulären Antworten.

1.6 Medikamentöse Intervention: Methylprednisolon und Tacrolimus

1.6.1 Methylprednisolon

Steroide werden in einer Vielzahl von medizinischen Fachdisziplinen zur Vorbeugung und Behandlung akut inflammatorischer und chronisch entzündlicher Prozesse sowie bei posttraumatisch bedingter Ödembildung nach schwerem Schädel-Hirn Trauma eingesetzt. Seit langem wird eine neuroprotektive Wirkung der Steroide kontrovers diskutiert [98, 99]. Die Wirkweise der Steroide ist äußerst vielseitig und beinhaltet unter anderem ödemreduzierende, antioxidative und antiinflammatorische Effekte [52]. In der Herzchirurgie werden Steroide routinemäßig zur Prävention der postoperativen Inflammation nach CPB eingesetzt [53, 54, 55].

Die Applikation von Methylprednisolon vor Anlage des CPB reduziert die Entstehung von Endotoxinen, minimiert die Komplementaktivierung und reduziert postoperativ die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, wie beispielsweise IL-6, TNF- α und IL-8. Gleichzeitig erhöht es die Sekretion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-4 und IL-10 [3]. Die Wirkweise der Glukokortikoide ist an einen zytosolischen Glukokortikoidrezeptor (GR-1) sowie an einen ebenfalls im Zytosol gelagerten Mineralokortikoidrezeptor (GR-2) gebunden. Nach Bindung an den Glukokortikoidrezeptor können Glukokortikoide den Transkriptionsfaktor NF- κ B durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen dem Glukokortikoidrezeptor und der p65 Untereinheit hemmen. Auf diesem Weg inhibieren Glukokortikoide, über Hemmung der Cox-2, die Produktion von Prostaglandinen und die Synthese vieler inflammatorischer Zytokine (IL-2, IL-3, TNF- α , IL-6, u.a.). Nachteile der Glukokortikoidtherapie liegen in ihrer unspezifischen Wirkweise sowie in einem hohen Nebenwirkungsprofil während der Langzeittherapie. Hierzu gehören eine Glukoseintoleranz, Dyslipidämie, Osteoporose, Myopathie, Hypertonie, Katarakt und Psychosen. Aus diesen Gründen werden in der Transplantationsmedizin in zunehmendem Maße steroidsparende Kombinationstherapien eingesetzt [56].

1.6.2 Tacrolimus

Tacrolimus (FK506, Prograf[®]) gehört zur Gruppe der Makrolide und wird aus dem Bakterium *Streptomyces tsukubaensis* gewonnen [57]. FK506 wird seit Mitte der neunziger Jahre zum größten Teil als Immunsuppressivum gegen Abstoßungsreaktionen in der Transplantationsmedizin eingesetzt [58]. Es findet jedoch

zunehmend Anwendung bei atopischen Hauterkrankungen sowie als Reservepräparat bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis Ulzerosa [59]. Die Dosierung wird individuell anhand von Spiegelmessungen gesteuert. Tacrolimus gehört zusammen mit Cyclosporin A zu den Calcineurin-Inhibitoren und besitzt durch die Bindung an intrazelluläre Proteine, die so genannten Immunophiline, eine immunmodulatorische Wirkung. Dieser Komplex aus Immunophilin und Tacrolimus lagert sich an die Calcium-Calmodulin aktivierende Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin an und hemmt deren Aktivität [60]. Durch Hemmung dieser frühen Ereignisse in der T-Zellaktivierung wird sowohl die Produktion inflammatorischer Zytokine (z. B. IL-2, IL-3, TNF- α und IL-6) vermindert, als auch die Proliferation von T-Zellen unterdrückt [67, 68]. Auf die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen hat Tacrolimus hingegen kaum einen Einfluss [61]. Der Vorteil von Tacrolimus gegenüber Cyclosporin A ist, dass es bereits in niedrigerer Dosierung eine potentere Wirkung besitzt, ohne dabei eine höhere Nebenwirkungsrate aufzuweisen. Beide Immunsuppressiva wirken relativ unspezifisch und führen in der Langzeittherapie zu Nephro- und Neurotoxizität, arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus, Leukopenien und Thrombozytopenien [66, 62, 64, 65, 63].

Aufgrund seiner stark hemmenden Wirkung auf die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und der mittlerweile routinemäßigen Anwendung in der Transplantationsmedizin auch bei Kindern, wurden die Effekte von Tacrolimus auf Endothelzellen unter Kühlung und Wiedererwärmung in der vorliegenden Arbeit untersucht.

1.7 Zielsetzung

Gesamtziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Hypothermie auf die morphologischen und funktionellen Eigenschaften stimulierter und unstimulierter humaner Endothelzellen zu untersuchen. Dafür wurde ein Zellkulturmodell mit einem speziellen Kühlungs- und Wiedererwärmungsprotokoll entwickelt, das sich nach den realen Bedingungen in der Kinderherzchirurgie richtet.

Mit Hilfe des Zellkulturmodells sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- 1. Welchen Einfluss haben Hypothermie und Wiedererwärmung auf die Vitalität und die Morphologie humaner Endothelzellen?**
- 2. Kommt es zu Veränderungen der funktionellen Eigenschaften humaner Endothelzellen durch Kühlung und Wiedererwärmung?**
- 3. Welche intrazellulären Signalwege werden durch Hypothermie und Wiedererwärmung aktiviert?**
- 4. Wie können eventuelle Veränderungen medikamentös beeinflusst werden?**

2 Materialien

2.1 Geräte

Kühlbrutschrank (17°C - 37°C)	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Brutschrank (37°C)	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Kühlaggregat	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
Magnetrührer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Elektrophorese-Kammer	Bio-Rad, München, Deutschland
Blotting-Kammer	Bio-Rad, München, Deutschland
Bio-Fuge (Zentrifuge)	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Schüttler	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Elisa-Platten Reader	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Wasserbad	Biometra, Göttingen, Deutschland
Kühlzentrifuge	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Fluoreszenz Mikroskop	Zeiss/Axio, Göttingen, Deutschland
<i>SlideReactor</i>	Sauer et al., Berlin, Deutschland

2.2 Chemikalien

Isopropanol-Säure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIS-Acetat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
EGTA	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PMSF	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
BCA-Reagenz	Pierce, Rockford, USA
ECL-Detektionskit	Pierce, Rockford, USA
MTT-Reagenz	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Trypanblau	Biochrom, Berlin, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Alexa Fluor 568	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DAPI	Pierce, Rockford, USA
Kollagen	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Ponceau-Färbelösung	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Stripping Puffer	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
TMB	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
BSA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS	Serva, Heidelberg, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
APS-Lösung	Serva, Heidelberg, Deutschland
Acrylamid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HCl	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ethanol 70 %	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
2-Mercapto-Ethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Bromphenol-Blau	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Guaiacol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

2.3 Zellkultur

Medium 199 Earle	Biochrom, Berlin, Deutschland
FCS	Biochrom, Berlin, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin/Hepes	Biochrom, Berlin, Deutschland
FGF-acid	Biochrom, Berlin, Deutschland
Amphotericin B	Biochrom, Berlin, Deutschland
Gentamycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Hepes	Biochrom, Berlin, Deutschland
Serumfreies Medium	Biochrom, Berlin, Deutschland
Dispase	Boehringer, Ingelheim, Deutschland
Gelatine	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
PBS	Biochrom, Berlin, Deutschland

Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Gewebekulturflaschen T75	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Kombitipps	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multipipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
Pasteurpipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Venenverweilkanülen	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturschalen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
6-Well Platten	Nunc, Langenselbold, Deutschland
24-Well Platten	Nunc, Langenselbold, Deutschland
96-Well Platten	Nunc, Langenselbold, Deutschland
Eppendorf Gefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zellkultur-Röhrchen	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland

2.4 Proteine, Antikörper, Medikamente

Anti-IL-6 Elisa Kit	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Anti-IL-8 Elisa Kit	BD Bioscience , Heidelberg, Deutschland
Anti-MCP-1 Elisa Kit	BD Bioscience, , Heidelberg, Deutschland
Anti-pERK Antikörper	Cell Signaling, Boston, USA
Anti-ERK Antikörper	Cell Signaling, Boston, USA
Anti-pSAPK/JNK Antikörper	Cell Signaling, Boston, USA
Anti-SAPK/JNK Antikörper	Cell Signaling, Boston, USA
Anti-pp38 Antikörper	Cell Signaling, Boston, USA
Anti-p38 Antikörper	Cell Signaling, Boston, USA
Anti-Rabbit IgG Antikörper	Jackson Laboratory, Maine, USA
Anti-β-Aktin Antikörper	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
TNF-α (rekombinant)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Methylprednisolon	Sanofi Aventis, Frankfurt, Deutschland
Tacrolimus	Fujisawa Pharmaceut., München, Deutschland
U0126	Alexis Biochemicals, Lörrach, Deutschland
SB203580	Alexis Biochemicals, Lörrach, Deutschland
SP600125	Calbiochem, San Diego, USA

2.5 Sonstige Materialien

Hyperfilme	Bio-Rad, München, Deutschland
Blotting-Papier	Bio-Rad, München, Deutschland
Nitrozellulosemembran	Bio-Rad, München, Deutschland
Spritzen (10 und 20 ml)	B/Braun, Melsungen, Deutschland
Einmalskalpell	PFM AG, Köln, Deutschland
Zellschaber	TPP, Trasadingen, Schweiz
Spacer Platten	Biostep Gmbh, Jahnsdorf, Deutschland
Deckgläser	Biostep Gmbh, Jahnsdorf, Deutschland
Kämme	Bio-Rad, München, Deutschland
Klemmscheren	Bio-Rad, München, Deutschland
Stativständer	Bio-Rad, München, Deutschland
Sterile Kompressen	Bio-Rad, München, Deutschland
Deckgläser	VWR, Darmstadt, Deutschland
Semipermeable Membranen	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

3 Methoden

3.1 Dynamische Temperaturveränderungen: Das Zeit-Temperatur-Protokoll

Das Zeit-Temperatur-Protokoll wurde in Anlehnung an die Kühlungsbedingungen während kardiochirurgischer Korrekturoperationen bei Neugeborenen und Säuglingen unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine etabliert. Die Endothelzellen wurden in einem speziellen Brutschrank unter kontrollierten, dynamischen Temperaturveränderungen mit Kühlung und Wiedererwärmung bei 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zu Beginn der Experimente bei Normothermie (37°C) wurden die Zellen mit Methylprednisolon (1 mM) und/oder Tacrolimus (1 µM) oder mit den verschiedenen MAPK-Inhibitoren (alle in einer Konzentration von 20 µM): U0126 (ERK 1/2 Inhibitor), SB203580 (p38 Inhibitor), oder SP600125 (SAPK/JNK Inhibitor) behandelt. Anschließend wurden die Endothelzellen auf 17°C gekühlt und für zwei Stunden bei dieser Temperatur belassen. Danach erfolgte die zwei Stunden dauernde Wiedererwärmungsphase auf 37°C. Die Endothelzellen wurden zu folgenden festgelegten Zeitpunkten untersucht: t1 = Start, t2 = direkt vor der Wiedererwärmung, t3 = direkt nach der Wiedererwärmung, t4 = zwei Stunden nach Wiedererwärmung, t5 = 24 Stunden nach Versuchsbeginn. Gleichzeitig wurden TNF-α stimulierte und unstimulierte Endothelzellen kontinuierlich als Kontrolle bei 37°C belassen. Zu Beginn der Experimente (t1) wurden beide Versuchsgruppen, das heißt, die Zellen, die dynamischen Temperaturveränderungen ausgesetzt wurden und die Kontrollzellen (37°C), in sieben verschiedene Gruppen eingeteilt: Gruppe 1 = ohne Vorbehandlung, Gruppe 2 = Vorbehandlung mit Methylprednisolon, Gruppe 3 = Vorbehandlung mit Tacrolimus, Gruppe 4 = Vorbehandlung mit Methylprednisolon und Tacrolimus, Gruppe 5 = Vorbehandlung mit U0126, Gruppe 6 = Vorbehandlung mit SB203580, Gruppe 7 = Vorbehandlung mit SP600125. Zum Zeitpunkt t2 wurden alle Zellen mit TNF-α (500 U/ml) stimuliert (Abbildung 2). Die Experimente zur Zellmorphologie wurden an unstimulierten Endothelzellen durchgeführt. Somit konnte in den Zeitraffer-Videomikroskopiefilmen, durch den experimentellen Einsatz des *SlideReactors*, der alleinige Einfluss der Hypothermie auf die Morphologie untersucht werden.

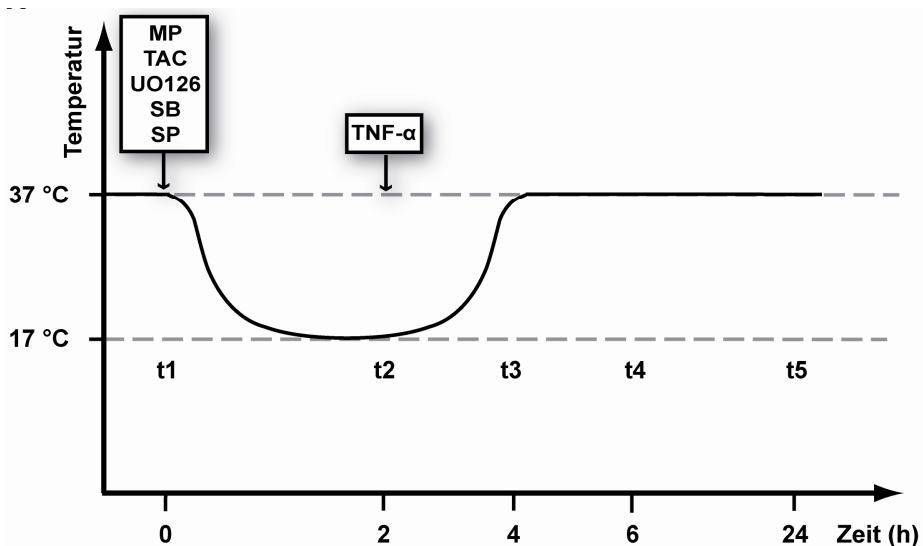


Abbildung 2: Das Zeit-Temperatur-Protokoll

MP = Methylprednisolon, TAC = Tacrolimus, U0126 = Blockade der Aktivierung der MAPK ERK, SB = Blockade der Aktivierung der MAPK p38, SP = Blockade der Aktivierung der MAPK SAPK/JNK.

3.2 Gewinnung humaner Endothelzellen (HUVEC) aus Nabelschnurvenen

Der Antrag für die experimentelle Verwendung humaner Nabelschnüre wurde von der Ethikkommission (EA2/076/06) der Charité-Universitätsmedizin Berlin genehmigt und ist übereinstimmend mit der Deklaration von Helsinki. Vor Nutzung der Nabelschnüre wurde von allen Spenderinnen eine schriftliche Einverständniserklärung unterzeichnet.

Die Endothelzellen wurden nach der von E. A. Jaffe [69] und M. Gräfe [70] modifizierten Methode enzymatisch aus der Nabelschnurvene präpariert. Zuerst wurde die Nabelschnur unmittelbar postpartal an beiden Enden abgeklemmt, um das Innere vor einer Kontamination zu schützen. Nach der äußerlichen Reinigung mit 70 %-igem Ethanol wurden die beiden Enden mit einem sterilen Einmalskalpell abgetrennt und die Blutreste vorsichtig aus der Nabelschnur gedrückt. Anschließend wurde die Nabelschnurvene mit einer sterilen Kanüle sondiert. Danach wurde die Nabelschnur auf einen Stativständer gehängt, zweimal mit sterilem PBS vorsichtig durchgespült und gewaschen. Nachfolgend wurden ca. 10 ml Dispase (2,4 U/ml) eingefüllt und das untere Ende der Nabelschnur mit einer Klemmschere verschlossen. Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei 37°C und 5 % CO₂ wurde die Nabelschnur erneut desinfiziert und mit einer sterilen Kompresse leicht massiert, um die Zellen von der Venenwand zu lösen. Am Ende der Präparation wurde die Nabelschnur mit 10 ml 199 Earle Mediums

gespült und anschließend mit 20 ml Luft vollständig entleert. Das austretende Dispase-Endothel-Gemisch wurde in einem sterilen 50 ml Röhrchen aufgefangen. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1200 rounds per minute (rpm) wurde das Zellpellet in Medium resuspendiert und in eine mit 0,2 % Gelatinelösung gecoatete Zellkulturflasche überführt.

3.3 Zellpflege und Zellpassage

Das Zellkulturmedium wurde regelmäßig alle zwei Tage gewechselt. Das Kulturmedium bestand aus Medium 199 Earle mit dem Zusatz von 20 % Fetal Calf Serum (FCS), 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin/Hepes, Amphotericin (250 µg/ml), Gentamycin (10 mg/ml) und 0,5 % Fibroblasten Growth Factor (FGF-acid).

Bei Erreichen eines konfluenten Zellrasens wurde die Kultur 1:3/1:4 passagiert. Für die einzelnen Experimente wurden Zellen aus mindestens drei unterschiedlichen Nabelschnüren in der dritten oder vierten Zellpassage verwendet.

3.4 Vitalitätstests mittels MTT und Trypanblau-Färbung

Die Ermittlung der Zellvitalität erfolgte mittels MTT-Test. Vitale Zellen reduzieren in diesem Test den gelben, wasserlöslichen Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu blau-violetterem, wasserunlöslichen Formazan. Zu Beginn wurden die HUVEC auf eine mit Gelatine gecoatete 96-Well Mikrotiterplatte in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen/Well ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die zu testenden Substanzen (MP, TAC, MAPK- Inhibitoren, etc.) in serumfreiem Medium verdünnt und mit 200 µl/Well auf die Mikrotiterplatte verteilt. Zu den Zeitpunkten t₄ (zwei Stunden nach Wiedererwärmung) und t₅ (24 Stunden nach Versuchsbeginn) des Zeit-Temperatur-Protokolls wurde in Medium verdünntes MTT-Reagenz (1:10) auf die Zellen pipettiert (200 µl/Well) und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Um den Farbumschlag bei 570 nm im ELISA-Reader messen zu können, wurden die Zellen 20 Minuten mit einem Lysispuffer bestehend aus Isopropanol mit 0,04 % HCl inkubiert.

Als weitere Methode der Vitalitätsmessung dient die Trypanblau-Färbemethode. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Das Trypanblau dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Zytosol und färbt diese Zellen tiefblau. Vitale Zellen hingegen stellen sich unter dem Mikroskop leuchtend

hell dar. Zu Beginn wurden die HUVEC auf eine gecoatete 6-Well Zellkulturplatte in einer Konzentration von 2×10^5 ausgesät. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden die Zellen mit verdünntem Trypanblau (0,25 %) in einer 96-Well Rundbodenplatte gefärbt und anschließend mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Da die Zellen aus dem Überstand mitgezählt wurden, wurden sowohl die vitalen und adhärenen als auch die vitalen, jedoch nicht mehr zur Adhäsion fähigen Zellen in die Ergebnisse miteinbezogen.

3.5 Bestimmung der Zytokinkonzentrationen mittels ELISA

Die Endothelzellen wurden über Nacht auf eine mit Gelatine gecoatete 24-Well Platte in einer Konzentration von 4×10^4 Zellen/Well ausgesät. Nach Erreichen der Adhärenz wurden die Zellen sowohl in serumfreiem Medium als auch unter der Zugabe der einzelnen Substanzen (MP, TAC, MAPK-Inhibitoren, etc.) inkubiert. Zu den festgelegten Zeitpunkten (t1, t2, t3, t4, t5 des Zeit-Temperatur-Protokolls) wurde der Zellüberstand abgenommen und bei 1200 rpm für drei Minuten zentrifugiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C für maximal eine Woche. Zur Bestimmung der Zytokinkonzentrationen (IL-6, IL-8, MCP-1) wurde die Methode des Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) angewandt. Das Prinzip beruht auf dem sogenannten Sandwich System. 24 Stunden vor Versuchsbeginn wurde eine 96-Well Mikrotiterplatte mit einem Primärantikörper gegen das jeweilige Zytokin beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Proben hinzugefügt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Das nachzuweisende Zytokin bindet dabei spezifisch an den Erstantikörper. Im nächsten Schritt wurde ein Zweitantikörper, der spezifisch an den Erstantikörper bindet, hinzugegeben. Durch Zugabe des Substrats Tetramethylbenzidine (TMB), das durch das Enzym des Sekundärantikörpers umgesetzt wird, erfolgte ein Farbumschlag, dessen Extinktion im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden konnte. Anhand einer mitgeführten Standardreihe konnte nach Erstellung einer Eichkurve die Farbreaktion direkt in die Antikörperkonzentration umgerechnet werden.

3.6 Zeitraffer-Videomikroskopie im *SlideReactor*

Zur Analyse der morphologischen Veränderungen der HUVEC unter tiefer Hypothermie und anschließender Wiedererwärmung wurden die zellulären Veränderungen in Echtzeit untersucht. Die Versuche wurden in einem perfundierbaren Bioreaktor, dem *SlideObserver* [71, 116], in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. Igor Maximilian Sauer aus der Abteilung für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie durchgeführt. Der *SlideObserver* besteht aus einem *SlideReactor*, dessen Prinzip auf Hohlfaserkapillaren beruht: Die Kapillaren durchziehen das Zellkompartiment, in welchem die Zellen adhärent kultiviert werden. Der Aufbau des Systems ermöglicht die mikroskopische Beurteilung der Zellen sowie das Erstellen von Zeitraffervideos, die der Charakterisierung der Kulturen unter Studienbedingungen dienen. Vor Beginn des Experiments, zur verbesserten Adhäsion der HUVEC, wurde der Boden des *SlideReactors* mit 10 % Kollagen gecoatet. Eine Zellzahl von 4×10^5 in zwei Milliliter Medium wurde in das Kompartiment infundiert. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde das Zeit-Temperatur-Protokoll (siehe Abbildung 2) durchgeführt. Die verwendeten Medikamente Methylprednisolon und Tacrolimus wurden dem Mediumreservoir vor Versuchsbeginn hinzugefügt.

3.7 Immunzytochemische Färbungen mit anti- F-Aktin/DAPI

Zur genaueren Analyse intrazellulärer Veränderungen der HUVEC unter Kühlung und Wiedererwärmung wurde das Strukturprotein F-Aktin angefärbt und mit Immunfluoreszenz-Mikroskopie ausgewertet. Dafür wurden 8×10^4 HUVEC auf gecoatete Cover Slides in einer 24-Well Platte ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Applikation des Zeit-Temperatur-Protokolls (siehe Abbildung 2). Im Anschluss wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd (pH 7,4) fixiert. Vor Beginn der Färbung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und zum Permeabilisieren mit 0,1 % Triton X-100 in PBS für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen und für 30 Minuten in PBS mit 1 % BSA inkubiert. Für die Färbung wurden die Zellen für 30 Minuten mit dem Farbstoff Alex Fluor 568, der in PBS + 1 % BSA (Verdünnung 1:40) gelöst wurde, im Dunkeln inkubiert. Danach wurde der Rest der Färbelösung in fünf Waschschritten mit PBS entfernt und anschließend wurden die Kerne der HUVEC mit DAPI (1 mg/ml), verdünnt

in PBS (1:1000), gefärbt. Nach erneutem mehrmaligen Waschen mit PBS konnten die Zellen schließlich mit Mowiol eingedeckelt, mikroskopiert und dokumentiert werden.

3.8 Adhäsions-Assay

Um das Adhäsionsverhalten der Endothelzellen unter Kühlung und Wiedererwärmung näher untersuchen zu können, wurden die HUVEC zu Beginn auf Petrischalen ausplattiert, zu bestimmten Zeitpunkten des Zeit-Temperatur-Protokolls (siehe Abbildung 2) trypsinisiert und auf eine gecoatete 96-Well Platte in einer Konzentration von 3×10^4 Zellen/Well ausgesät. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C wurden die Platten ausgeschlagen und anschließend mit 100 µl 4 % Paraformaldehyd für fünf Minuten fixiert. Nach erneutem Ausschlagen der Platte wurden die adhärennten Zellen mit 100 µl 0,05 % Toluidinblau in 4 % Paraformaldehyd angefärbt und nach dreimaligem Waschen anschließend mit 100 µl 1 % SDS/Well für 30 Minuten inkubiert. Der Farbumschlag wurde bei einer Wellenlänge von 620 nm im ELISA-Plattenreader gemessen.

3.9 Permeabilitätstest

Zur Analyse der Zellpermeabilität unter Kühlung und Wiedererwärmung wurde die Diffusion der Horseradish Peroxidase (HRP) durch den konfluenten Zellrasen gemessen. Dafür wurden einen Tag vor Versuchsbeginn HUVEC in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen auf drei Mikrometer dicke und mit 0,2 % Gelatine gecoatete semipermeable Membranen in einer 24-Well Platte ausgesät. Zu definierten Zeitpunkten wurde das Kompartiment unterhalb der Membran mit 500 µl Zellkulturmedium und das Kompartiment oberhalb der Membran mit verdünntem HRP (0,34 mg/ml in Zellkulturmedium) aufgefüllt. Jedes Well innerhalb der 24-Well Platte repräsentierte einen anderen Zeitpunkt im Zeit-Temperatur-Protokoll. Nach einer Minute Inkubationszeit wurden die Membranen entfernt und 60 µl Medium aus dem Well mit 860 µl Reaktionspuffer (50 mM NaH_2PO_4 , 5 mM Guaiacol) plus 100 µl H_2O_2 (0,6 mM in H_2O) gemischt. Nach 15 minütiger Inkubationszeit im Dunkeln wurde der Farbumschlag bei einer Wellenlänge von 470 nm im Elisa-Plattenreader photometrisch gemessen.

3.10 Untersuchung der intrazellulären Signalwege mittels Western Blot Analysen

3.10.1 Gewinnung der Proteine

Zu Beginn der Experimente wurden die HUVEC in einer Konzentration von $1,5 \times 10^6$ Zellen auf gecoatete Petrischalen (Durchmesser 5 cm) ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde das Zellmedium abgesaugt und durch serumfreies Medium ersetzt, wobei die jeweiligen Medikamente oder MAPK-Inhibitoren hinzugefügt wurden. Im Anschluss erfolgten die Hypothermieexperimente (siehe Abbildung 2). Zu definierten Zeitpunkten wurden die Versuche unterbrochen und die Zellen zuerst mit eiskaltem PBS gewaschen, um weitere Stoffwechselprozesse und intrazelluläre Signalkaskaden zu stoppen. Anschließend wurde ein spezieller Proteinlysis-Puffer, bestehend aus 20 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 1 mM PMSF und einem speziellen Protease Inhibitor Cocktail (PIC), auf die Petrischalen pipettiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die HUVEC mit einem Zellschaber abgelöst, das Zellpellet in ein Eppendorf-Gefäß überführt, bei -80°C eingefroren und für maximal einen Monat gelagert.

3.10.2 Bestimmung der Proteinkonzentrationen mit der BCA-Methode

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde ein BCA-Protein Assay gemäß der Gebrauchsanweisung verwendet, wobei die Proben auf einer 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert und für 30 Minuten bei 37°C mit der BCA-Lösung inkubiert wurden. Anschließend konnten die Proteinkonzentrationen im ELISA-Plattenreader bei 550 nm gemessen und anhand einer mitgeführten Standardreihe berechnet werden.

3.10.3 Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zur Vorbereitung der Gelelektrophorese erfolgte der Aufbau der Gieskammern aus Spacer- und Deckplatte. Danach wurde das Trenngel angesetzt. Die Menge des benötigten Acrylamid-Anteils wurde nach einer standardisierten Formel für die Prozentigkeit der Gele ausgerechnet, da diese abhängig von der nachzuweisenden Proteingröße ist. Durch Radikalketten-Polymerisation von Acrylamid und dem vernetzenden Bisacrylamid wurde eine poröse Gelmatrix erzeugt. Der Polymerisierungsstart erfolgte durch die Zugabe von APS und TEMED, die die

gebildeten Radikale stabilisieren und so eine gleichmäßige Polymerisation bewirken. Das Trenngel wurde in die vorbereitete Kammer gegossen und zur Verhinderung des Austrocknens mit Wasser bis zum oberen Rand überschichtet. Anschließend wurde das Sammelgel angesetzt. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das Wasser abgegossen und das Sammelgel vorsichtig auf das Trenngel pipettiert. Dann wurde ein Kamm in das Sammelgel gesteckt, um die Taschen für die zu analysierenden Proteinproben zu formen. Zur Vorbereitung der Elektrophorese wurde zuerst ein Elektrophorese-Puffer angesetzt und in die Elektrophorese-Kammer gegossen. Die Proben in den Eppendorf-Gefäßen wurden mit Proben-Puffer (5-fach konzentriert) 1:5 verdünnt und für 5 Minuten bei 95°C gekocht. Das im Probenpuffer enthaltene SDS bewirkt ein Denaturieren der Proteine, und das ebenfalls enthaltene 2-Mercapto-Ethanol reduziert die vorhandenen Disulfid-Brücken. Nach Auspolymerisierung des Sammelgels wurde der Kamm aus dem Gel gezogen. Die Probentaschen wurden mit Wasser gespült, und das Gel in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt. Anschließend wurden die Proben und die Marker (mit definierten Proteinbanden) vorsichtig in die Taschen pipettiert. Zum Auftrennen der Proteine wurde für ca. 2 Stunden eine Spannung von 80 V und 400 mA appliziert.

Elektrophorese-Puffer:

TRIS-Base, 25 mM

Glycin, 250 mM

SDS 0,1 %

Proben-Puffer (einfach):

Tris-Base, 312,5 mM

SDS 10 %

Glycerol 50 %

2-Mercapto-Ethanol 25 %

Bromphenol-Blau 0,25 %

Trenngel:

Trenngelpuffer, 1,5 M (pH 8,8)

SDS-Lösung 10 %

APS-Lösung 10 %

Acrylamid (nach Gel-Prozentigkeit)

TEMED (nach Gel-Prozentigkeit)

H₂O (nach Gel-Prozentigkeit)

Sammelgel:

Sammelgelpuffer, 1 M (pH 6,8)

SDS-Lösung 10 %

APS-Lösung 10%

Acrylamid (nach Gel-Prozentigkeit)

TEMED (nach Gel-Prozentigkeit)

H₂O (nach Gel-Prozentigkeit)

3.10.4 Transfer der Proteine mit der Tankblotting Transfermethode

Für den anschließenden Transfer auf eine Nitrocellulosemembran wurde der Tankblotter gemäß Herstellerangaben in einer Transferkassette zusammengebaut. Bei 100 V und 400 mA wurden die Proteine in einem speziell angesetzten Blotting-Puffer auf die Nitrocellulosemembran transferiert. Nach erfolgreichem Transfer wurde die Membran als Transferkontrolle mit dem Farbstoff Ponceau S (20 %) angefärbt. Zur Vermeidung späterer unspezifischer Bindungen wurden diese durch Zugabe eines Reagenz aus PBS und 0,05 % Tween + 5 % Magermilchpulver für eine Stunde blockiert.

Blotting-Puffer:

Glycin, 192 mM

Tris-Base, 25 mM

Methanol 20 %

3.10.5 Detektion der Proteine

Der Primärantikörper wurde gemäß Herstellerangaben in PBS-Tween verdünnt und bei 4°C über Nacht unter leichtem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran mindestens viermal für 10 Minuten mit PBS-Tween gewaschen, bevor ein enzymgekoppelter Sekundärantikörper (Donkey anti-Rabbit) in einer Verdünnung von 1:10000 in PBS-Tween hinzugefügt werden konnte. Dieser inkubierte für 90 Minuten. Als Substrat für das Enzym des Sekundärantikörpers wurden die Reagenzien 1 und 2 des Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Kits 1:2 angesetzt (ca. 3 ml pro Blot). Nach dem vorsichtigen Abtupfen der Flüssigkeit wurde das Nachweisreagenz des ECL-Kits auf die Membran gegeben und für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut vorsichtig abgetupft, mit einer zweiten Folie abgedeckt und in eine Filmkassette gelegt. In einer Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm aufgelegt, wobei das vom Enzym umgewandelte Substrat mit seiner Lumineszenz den Film belichtete. Anschließend wurde der Film in einen Entwickler gegeben und nach kurzer Zeit wurden die belichteten Proteinbanden sichtbar. Pro Nitrocellulosemembran konnte jeweils eine phosphorylierte Form des Proteins, eine Gesamtform des Proteins und eine β -Aktin Ladekontrolle detektiert werden.

3.11 Densitometrische Analyse

Die einzelnen Western Blot Filme wurden eingescannt und anschließend Fotodensitometrisch durch das Programm ImageJ [111] vermessen und ausgewertet. In den einzelnen Diagrammen wurden dann jeweils die Bandendensitäten dargestellt, miteinander verglichen und statistisch auf Signifikanzen geprüft.

3.12 Statistische Analyse

Für die Errechnung der Ergebnisse wurden die Daten von mindestens drei Versuchen zusammengefasst und in den einzelnen Gruppen als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Die Überprüfung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem einseitigen Student-t-Test für nicht gepaarte Stichproben und dem Mann-Whitney-U-Test. Als Programm für die statistische Auswertung wurde „GraphPad Prism“ gewählt. P-Werte kleiner 0,05 *, kleiner 0,01 ** und kleiner 0,001 *** wurden als statistisch signifikant gewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Hypothermie und Wiedererwärmung

4.1.1 Morphologische Veränderungen unter Kühlung und Wiedererwärmung

Morphologische Veränderungen humaner Endothelzellen während tiefer Hypothermie und anschließender Wiedererwärmung konnten mit Hilfe des perfundierbaren *SlideReactors* im *SlideObserver* beobachtet und dokumentiert werden. Aus einzelnen Sequenzbildern wurden dafür Videos erstellt.

Zu Beginn des Experiments zeigten die untersuchten Endothelzellen bei 37°C einen geschlossenen Zellverband mit polygonalen und dachziegelartig angeordneten Einzelzellen (Abbildung 3 a). Während der Phase des Herunterkühlens konnte eine Auflockerung des konfluenten Zellverbands beobachtet werden (Abbildung 3 b). Mit abnehmenden Temperaturen bildeten sich zwischen den Zellen Lücken aus, die bei einer Temperatur von 17°C (Zeitpunkt t₂ des Zeit-Temperatur-Protokolls) am deutlichsten zu erkennen waren (Abbildung 3 c). Zusätzlich veränderte die Einzelzelle ihre Form, indem sie längliche Zellausläufer ausbildete, die jedoch untereinander noch in Kontakt standen. Während der anschließenden Wiedererwärmung schlossen sich die Lücken temperaturabhängig wieder und die anfängliche Integrität der Endothelzellen war bei 37°C (Zeitpunkt t₃ des Zeit-Temperatur-Protokolls) wieder hergestellt (Abbildung 3 d). Die Zellen wiesen erneut ihre ursprünglich polygonale Zellform in dachziegelartiger Anordnung auf.

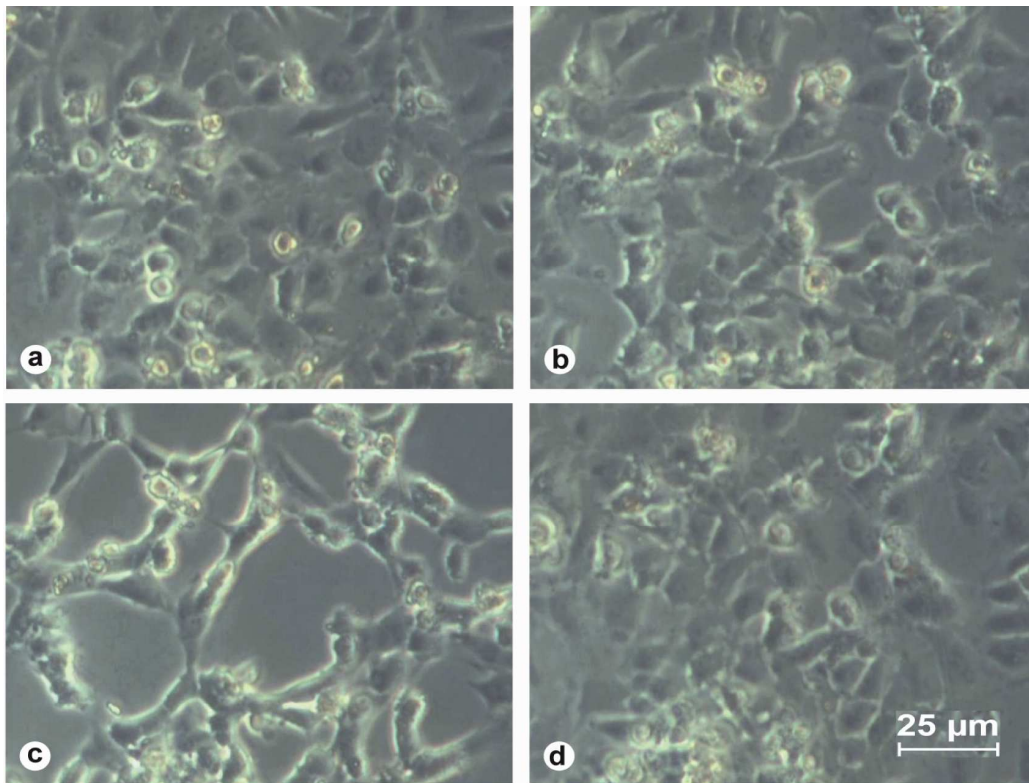


Abbildung 3: Einzelne Sequenzbilder der morphologischen Veränderungen der HUVEC unter Kühlung und Wiedererwärmung, aufgenommen im *SlideObserver*.

a = 37°C, b = 32°C, c = 17°C, d = 37°C.

4.1.1.1 Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Methylprednisolon und Tacrolimus auf die Zellvitalität

Vor dem experimentellen Einsatz von Methylprednisolon und Tacrolimus wurde die Zytotoxizität der beiden Medikamente getestet. Die HUVEC wurden dafür zunächst 24 Stunden bei 37°C mit verschiedenen Konzentrationen von MP oder TAC inkubiert. Die Zellvitalität wurde nach MP-Gabe in Konzentrationen von 100 µM bis 300 mM untersucht, wobei MP ab einer Konzentration von 10 mM signifikant zytotoxisch wirkte. Daher wurde für die nachfolgenden Versuche eine Konzentration von 1 mM MP ausgewählt (Abbildung 4 A). TAC wurde dem Kulturmedium in Konzentrationen von 1 nM bis 500 µM zugefügt. Die Zugabe von 500 µM resultierte in einem signifikanten Zelltod (Abbildung 4 B). Für die weiteren Versuche wurde die nicht-toxische Dosis von 1 µM TAC eingesetzt.

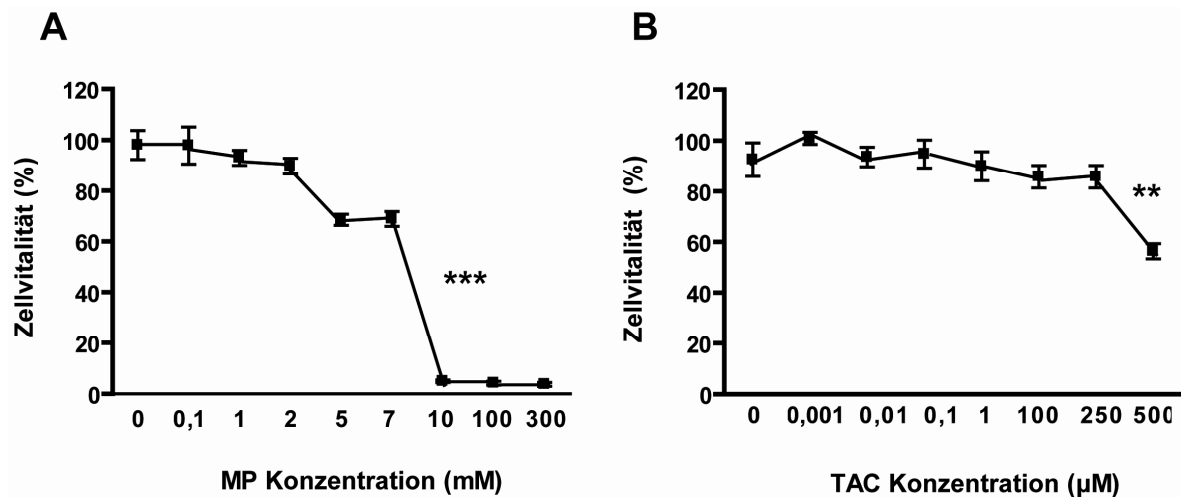


Abbildung 4: Zellvitalitätstest unstimulierter HUVEC nach Gabe unterschiedlicher Konzentrationen von MP (100 µM bis 300 mM) oder TAC (1 nM bis 500 µM) 24 Stunden nach Versuchsbeginn. **p<0,01, ***p<0,001.

4.1.1.2 Morphologische Veränderungen durch Methylprednisolon und Tacrolimus

Zur genaueren Charakterisierung der molekularen Veränderungen, welche die Ausbildung interzellulärer Lücken im konfluenten Zellrasen und die Änderung der morphologischen Strukturen in der Einzelzelle während tiefer Hypothermie bewirken, wurde das zytoskelettale Protein F-Aktin analysiert. Des Weiteren wurde der Einfluss der beiden immunsuppressiven Medikamente MP und TAC auf die morphologischen Veränderungen untersucht. Es zeigte sich eine strahlenförmige Kondensation des F-Aktin Proteins sowie die Ausbildung sogenannter Stressfasern (Abbildung 5 a) während der Kühlung. Die alleinige Anwendung von MP (Abbildung 5 c) oder TAC (Abbildung 5 d) reduzierte zwar die Ausbildung der Lücken im Zellverband, führte jedoch ebenfalls zur Bildung von Stressfasern. Nach kombinierter Zugabe von MP und TAC bildeten sich zwar Stressfasern aus, der Zellverband blieb jedoch geschlossen und intakt (Abbildung 5 b).

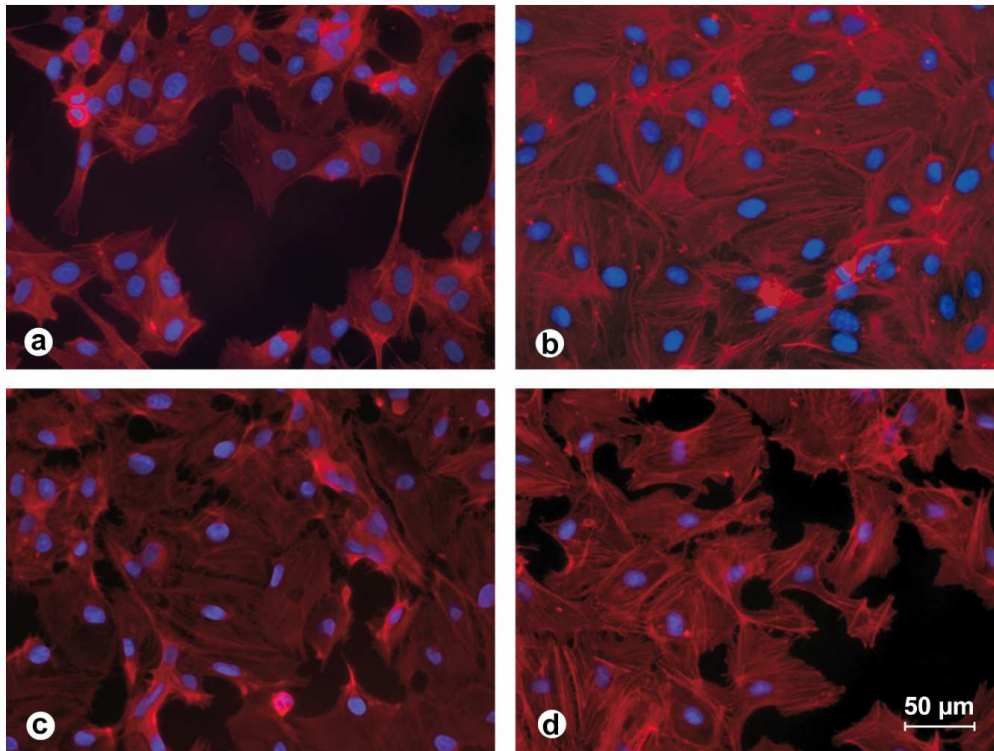


Abbildung 5: Morphologische Veränderungen humaner Endothelzellen während tiefer Hypothermie. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der F-Aktin/DAPI Färbung. a = unbehandelte HUVEC, b = HUVEC mit Zugabe von MP und TAC, c = HUVEC mit Zugabe von MP, d = HUVEC mit Zugabe von TAC.

Nachdem sich in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie gezeigt hatte, dass der kombinierte Einsatz von MP und TAC das Ausbilden interzellulärer Lücken während tiefer Hypothermie verhinderte, wurde dieser Effekt mit dem *SlideReactor* geprüft und konnte bestätigt werden. Während der gesamten Phase der Kühlung und der Wiedererwärmung blieb die Integrität des konfluenten Zellrasens unter Behandlung mit MP und TAC erhalten (Abbildung 6 a-d).

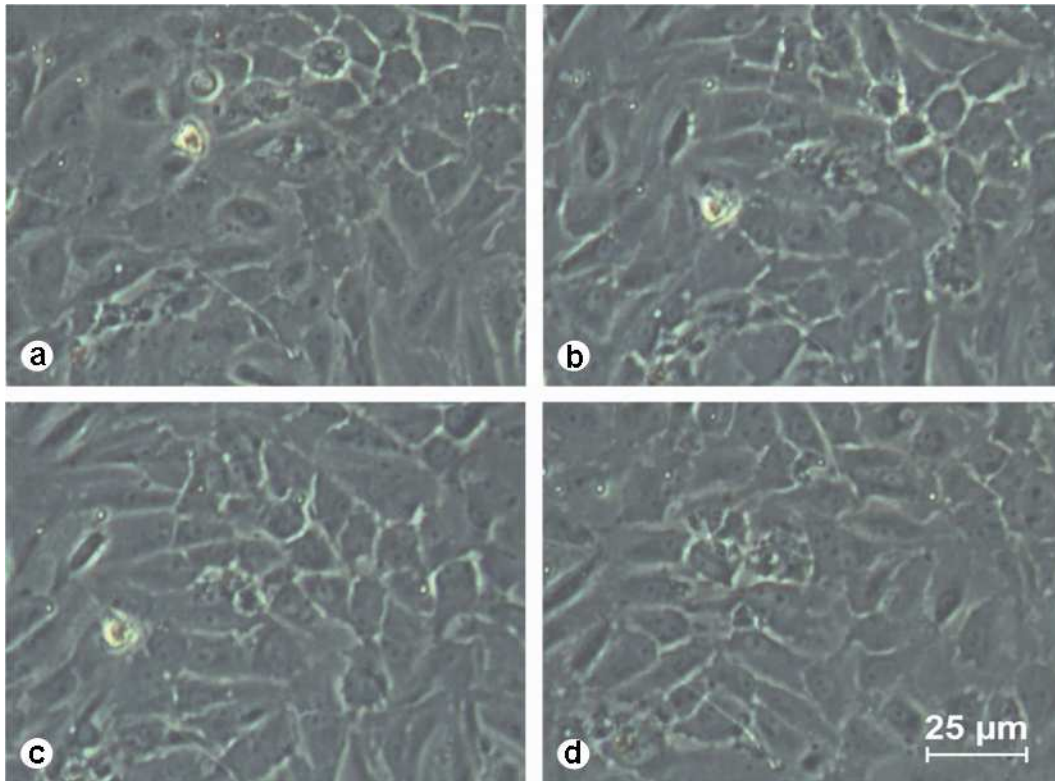


Abbildung 6: Zellmorphologie der HUVEC unter Kombinationsbehandlung mit MP und TAC während Kühlung und Wiedererwärmung, aufgenommen im *SlideObserver*.
a = 37°C, b = 32°C, c = 17°C, d = 37°C

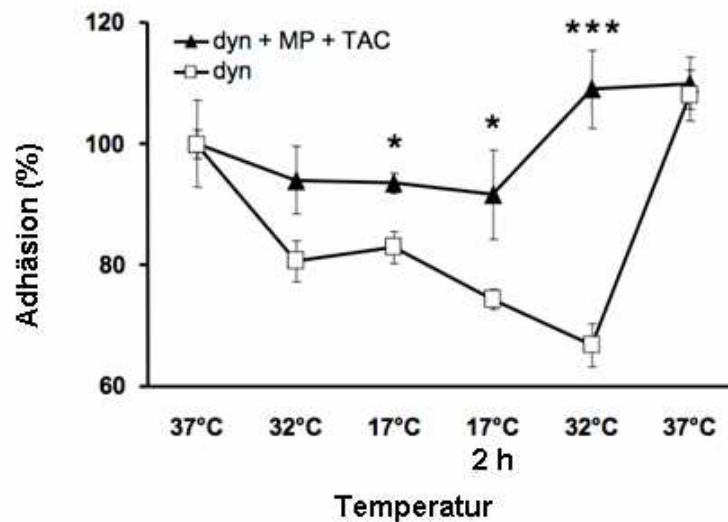
4.1.1.3 Funktionelle Veränderungen: Permeabilität und Adhäsion

Zur spezifischeren Beurteilung der Beeinflussung der endothelialen Barrierefunktion unter Kühlung und Wiedererwärmung wurden weiterhin die Zelladhäsion und die Zellpermeabilität der HUVEC untersucht (Abbildung 7 A und B). Es zeigte sich, dass bereits ab einer Temperatur von 32°C HUVEC eine signifikant verminderte Zelladhäsion aufwies (Abbildung 7 A). Im Kühlungsverlauf nahm dieser Adhäsionsverlust weiter zu, wobei noch bei 32°C in der Wiedererwärmungsphase die Menge adhärenter Zellen signifikant reduziert war. Erst die vollständige Wiedererwärmung auf 37°C führte zu einem Adhäsionsverhalten von 100 %, das mit dem der Zellen zu Beginn des Versuchs vergleichbar war.

Zu Beginn der tiefen Hypothermie (17°C) und verstärkt nach zwei Stunden Inkubationszeit bei 17°C kam es zu einem Verlust der Zellbarriere im Endothelzellverband, wodurch die Zellpermeabilität signifikant gesteigert wurde (Abbildung 7 B). Im Laufe der Wiedererwärmungsphase, in der sich die interzellulären Lücken wieder schlossen (siehe Abbildung 3), wurde auch die Zellbarriere wieder

hergestellt und die Zellpermeabilität signifikant reduziert. Die Inkubation der Zellen mit MP und TAC verhinderte nicht nur den Adhäsionsverlust unbehandelter HUVEC, sondern auch eine erhöhte Permeabilität. Während des gesamten Verlaufs des Zeit-Temperatur-Protokolls war die Zellbarriere MP und TAC behandelter Zellen intakt.

A



B

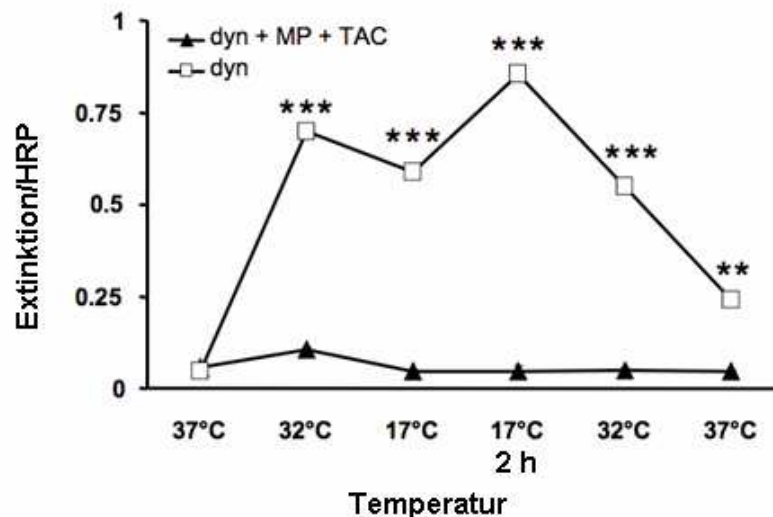


Abbildung 7: Veränderungen der Zelladhäsion (A) und der Zellpermeabilität (B) unter Kühlung und Wiedererwärmung. dyn = gekühlte und wiedererwärmte Zellen, MP = Methylprednisolon, TAC = Tacrolimus, HRP = Horseradish Peroxidase, 2 h = 2 Stunden nach Wiedererwärmung. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

4.1.2 Zellvitalität

4.1.2.1 Einfluss der Kühlung und Wiedererwärmung auf die Zellvitalität

Hypothermie und Wiedererwärmung hatten keinen Einfluss auf die Vitalität unstimulierter HUVEC 24 Stunden nach Versuchsbeginn (Zeitpunkt t5 des Zeit-Temperatur-Protokolls). Die Zellen zeigten die gleiche Vitalität wie die Kontrollgruppe (Abbildung 8). Jedoch führte die vorherige Stimulation der HUVEC mit TNF- α (500 U/ml) 24 Stunden nach Versuchsbeginn (Zeitpunkt t5 des Zeit-Temperatur-Protokolls) sowohl in der Gruppe der gekühlten und wiedererwärmten Zellen als auch in der Kontrollgruppe bei 37°C zu einem signifikanten Vitalitätsverlust.

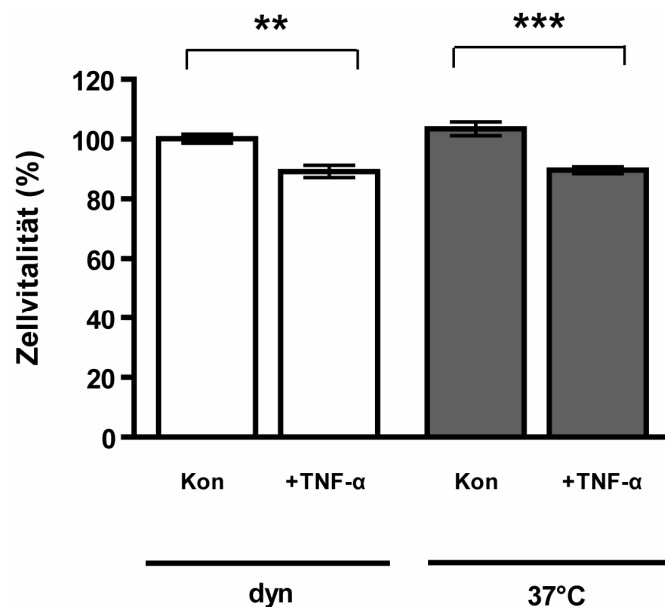


Abbildung 8: Einfluss von Kühlung und Wiedererwärmung auf die Vitalität humaner Endothelzellen mit und ohne TNF- α Stimulation 24 Stunden nach Versuchsbeginn (Zeitpunkt t5 des Zeit-Temperatur-Protokolls).

Kon = unbehandelte Kontrollzellen, dyn = gekühlte und wiedererwärmte Zellen, 37°C = normotherme Zellgruppe, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

4.1.2.2 Einfluss von Methylprednisolon und Tacrolimus auf die Zellvitalität während dynamischer Temperaturveränderungen

Im Anschluss wurde die Vitalität der HUVEC zum Zeitpunkt t4 des Zeit-Temperatur-Protokolls mit der Konzentration von 1 mM MP und 1 μ M TAC untersucht. Abgebildet sind mit TNF- α (500 U/ml) stimulierte Endothelzellen, die entweder mit MP oder TAC oder der Kombination (MP plus TAC) zu Versuchsbeginn behandelt wurden. Beide Gruppen, sowohl die gekühlten und wiedererwärmten HUVEC als auch die normothermen Zellen, wiesen zum Zeitpunkt t4 des Zeit-Temperatur-Protokolls die gleiche, unverminderte Vitalität im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe auf (Abbildung 9).

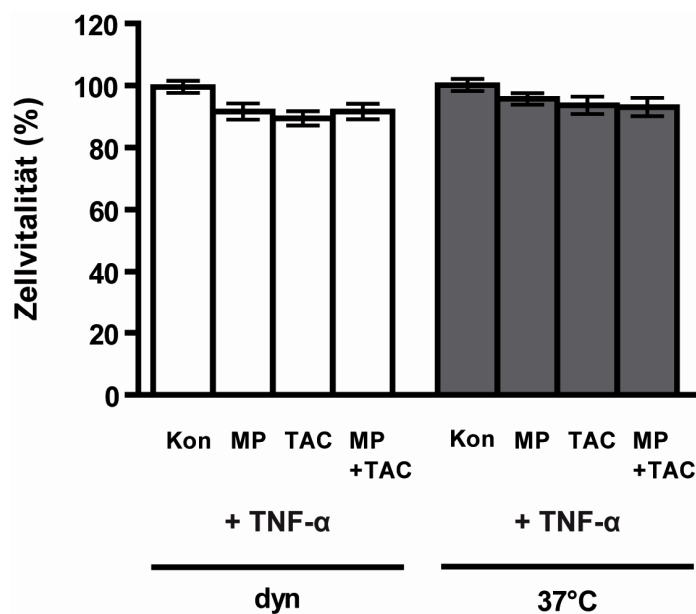


Abbildung 9: Vitalität von TNF- α stimulierten und mit MP und/oder mit TAC behandelten HUVEC sechs Stunden nach Versuchsbeginn (Zeitpunkt t4 des Zeit-Temperatur-Protokolls). Kon = unbehandelte Kontrollzellen, dyn = gekühlte und wiedererwärmte Zellen, 37°C = normotherme Zellgruppe, MP = Methylprednisolon, TAC = Tacrolimus.

4.1.2.3 Einfluss spezifischer Inhibitoren der Mitogen-Aktivierenden Proteinkinasen auf die Zellvitalität

Der Vitalitätstest der mit den MAPK-Inhibitoren U0126, SB203580 und SP600125 behandelten HUVEC wurde sechs Stunden nach Versuchsbeginn (Zeitpunkt t4 des Zeit-Temperatur-Protokolls) durchgeführt. Abgebildet sind mit TNF- α (500 U/ml) stimulierte HUVEC, die jeweils mit den verschiedenen Inhibitoren zu Versuchsbeginn behandelt wurden. Beide Gruppen, sowohl die gekühlten und wiedererwärmten als auch die normothermen Zellen, wiesen zum Zeitpunkt t4 des Zeit-Temperatur-Protokolls die gleiche Vitalität wie die unbehandelte Kontrollgruppe auf (Abbildung 10).

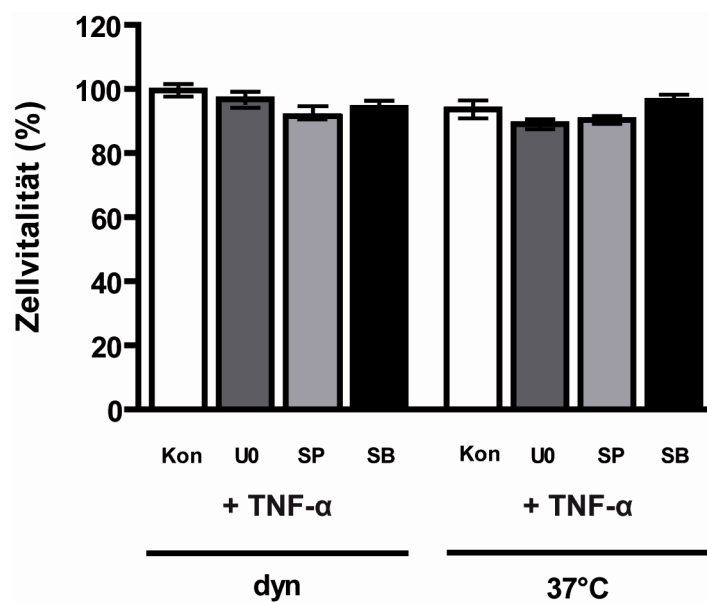


Abbildung 10: Einfluss der unterschiedlichen MAPK-Inhibitoren auf die Zellvitalität TNF- α stimulierter HUVEC sechs Stunden nach Versuchsbeginn (Zeitpunkt t4 des Zeit-Temperatur-Protokolls). Kon = unbehandelte Kontrollzellen, dyn = gekühlte und wiedererwärmte Zellen, 37°C = normotherme Zellgruppe, U0 = U0126 /pERK Inhibitor, SB = SB203580/pp38 Inhibitor, SP = SP600125/pSAPK/JNK Inhibitor

4.1.3 Inflammation

4.1.3.1 Interleukin-6

Die IL-6 Sekretion unstimulierter und TNF- α (500 U/ml) stimulierter HUVEC wurde über einen Zeitverlauf von 24 Stunden gemessen. Die stimulierten gekühlten und wiedererwärmten Zellen wiesen sechs Stunden nach Versuchsbeginn (Zeitpunkt t4 des Zeit-Temperatur-Protokolls) eine signifikant höhere IL-6 Sekretion als die stimulierten Kontrollzellen bei 37°C auf. Nach 24 Stunden (Zeitpunkt t5 des Zeit-Temperatur-Protokolls) glich sich die IL-6 Sekretion beider mit TNF- α stimulierter Gruppen an. In der Kontrollgruppe (37°C) lag die IL-6 Sekretion dabei etwas höher als die der Zellen, die gekühlt und wiedererwärmt wurden. Bei den unstimulierten Zellen beider Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied der IL-6 Sekretion festgestellt werden (Abbildung 11).

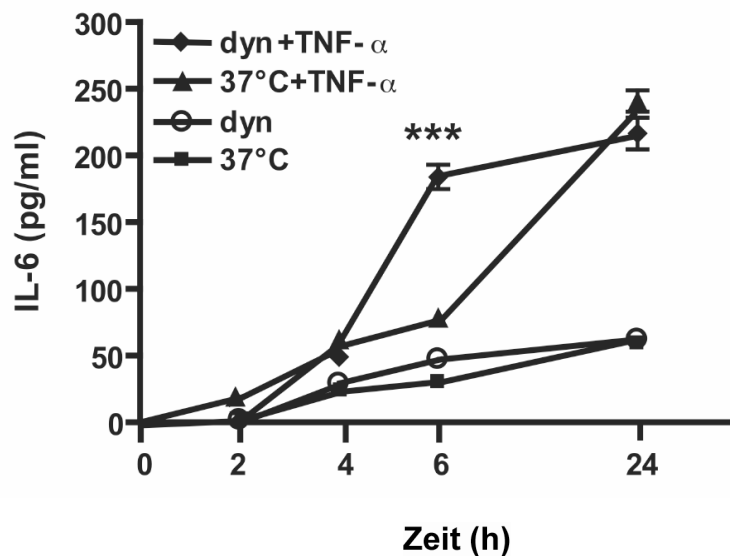


Abbildung 11: IL-6 Sekretion unstimulierter und mit TNF- α stimulierter HUVEC.

dyn = gekühlte und wiedererwärmte Zellen, 37°C = normotherme Zellgruppe, ***p<0,001.

4.1.3.2 Einfluss von Methylprednisolon und Tacrolimus auf die erhöhte Interleukin-6 Sekretion nach Hypothermie und Wiedererwärmung

Der Einfluss von Methylprednisolon und/oder Tacrolimus auf die IL-6 Sekretion wurde sechs Stunden nach Versuchsbeginn (Zeitpunkt t4 des Zeit-Temperatur-Protokolls) getestet. Der kombinierte Einsatz von MP und TAC reduzierte die durch Hypothermie und Wiedererwärmung induzierte IL-6 Sekretion von TNF- α (500 U/ml) stimulierten HUVEC. Hierbei konnte das Ausgangsniveau der stimulierten Zellen, die bei 37°C inkubiert wurden, erreicht werden. MP und TAC in alleiniger Gabe senkten die induzierte IL-6 Sekretion weniger effektiv (Abbildung 12).

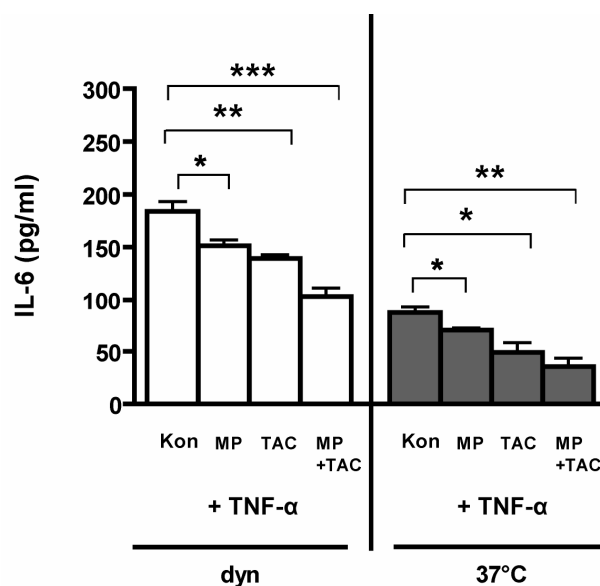


Abbildung 12: IL-6 Sekretion TNF- α stimulierter HUVEC nach Applikation von MP (1 mM) und TAC (1 μ M) oder MP und TAC in Kombination, sechs Stunden nach Versuchsbeginn (Zeitpunkt t4 des Zeit-Temperatur-Protokolls).

dyn = gekühlte und wiedererwärmte Zellen, 37°C = normotherme Zellgruppe, Kon = unbehandelte Kontrollzellen, MP = Methylprednisolon, TAC = Tacrolimus, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.1.3.3 Effekte von tiefer Hypothermie und Wiedererwärmung auf die Interleukin-8 und die Monozyten Chemotaktisches Protein-1 Sekretion

Zur weiterführenden Analyse der inflammatorischen Antwort der humanen Endothelzellen, wurde die Ausschüttung der Chemokine IL-8 und MCP-1 sechs Stunden nach Versuchsbeginn (Zeitpunkt t4 des Zeit-Temperatur-Protokolls) ermittelt. Weiterhin wurde die medikamentöse Beeinflussung durch MP (1 mM) oder TAC (1 μ M) allein oder die Kombination von MP plus TAC auf den Einfluss der Chemokin-Freisetzung untersucht. Im Gegensatz zur beobachteten erhöhten IL-6 Sekretion nach Kühlung und Wiedererwärmung waren die Sekretionen der Chemokine IL-8 und MCP-1 von mit TNF- α (500 U/ml) stimulierten HUVEC zum Zeitpunkt t4 des Zeit-Temperatur-Protokolls in den gekühlten und wiedererwärmten HUVEC geringer als in den normothermen Zellen (37°C). Die Applikation der Immunsuppressiva MP und TAC zeigte keinen Einfluss auf die IL-8 und MCP-1 Sekretion, weder einzeln noch in Kombination (Abbildung 13).

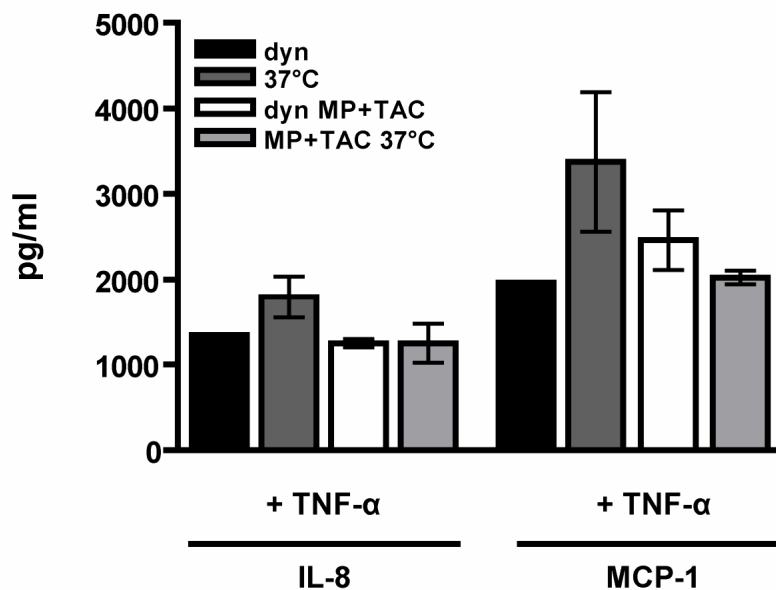


Abbildung 13: Sekretion der Chemokine IL-8 und MCP-1, mit und ohne Applikation der Medikamente MP und TAC, sechs Stunden nach Versuchsbeginn (Zeitpunkt t4 des Zeit-Temperatur-Protokolls) von TNF- α stimulierten HUVEC. dyn = gekühlte und wiedererwärmte Zellen, 37°C = normotherme Zellgruppe, MP = Methylprednisolon, TAC = Tacrolimus

4.1.4 Intrazelluläre Signalwege: Die Mitogen-Aktivierenden Proteinkinasen ERK 1/2, SAPK/JNK und p38

4.1.4.1 ERK 1/2

Zur Analyse der zugrunde liegenden intrazellulären Signalwege, die an einer verstärkten IL-6 Sekretion von gekühlten und wiedererwärmten HUVEC sechs Stunden nach Versuchsbeginn (Zeitpunkt t4 des Zeit-Temperatur-Protokolls) beteiligt sind, wurde die Phosphorylierung der Proteinkinasen ERK 1/2, SAPK/JNK und p38 in TNF- α (500 U/ml) stimulierten HUVEC nach 15 Minuten, 30 Minuten und 60 Minuten in der Wiedererwärmung untersucht.

Die Zellen wurden in vier Gruppen aufgeteilt: Die erste Gruppe wurde nicht behandelt, die zweite wurde mit Methylprednisolon (1 mM), die dritte wurde mit Tacrolimus (1 μ M) und die vierte mit der Kombination beider Medikamente inkubiert. Zusätzlich ist die Gesamt-ERK 1/2 Konzentration als Ladekontrolle abgebildet (Abbildung 14 A).

Die pERK 1/2 Expression in den gekühlten und wiedererwärmten Endothelzellen war nach 15 Minuten in der Wiedererwärmung (bei 27°C) halb so stark wie bei der normothermen Kontrolle (Abbildung 14 B), stieg dann aber nach 30 Minuten in der Wiedererwärmung (bei 34°C) signifikant an (Abbildung 14 C). Nach 60 Minuten in der Wiedererwärmung (bei 36,5°C) glichen sich die pERK 1/2 Expressionen beider Gruppen wieder an (Abbildung 14 D). Die Applikation von MP oder TAC reduzierte signifikant die verstärkte pERK 1/2 Phosphorylierung in den gekühlten und wiedererwärmten Zellen. Interessanterweise führte die Kombination beider Medikamente in den gekühlten und wiedererwärmten Zellen jedoch zu einer Hochregulation der pERK 1/2 Expression nach 30 Minuten in der Wiedererwärmung (bei 34°C) im Vergleich zur Monoapplikation in beiden Temperaturgruppen (Abbildung 14 C).

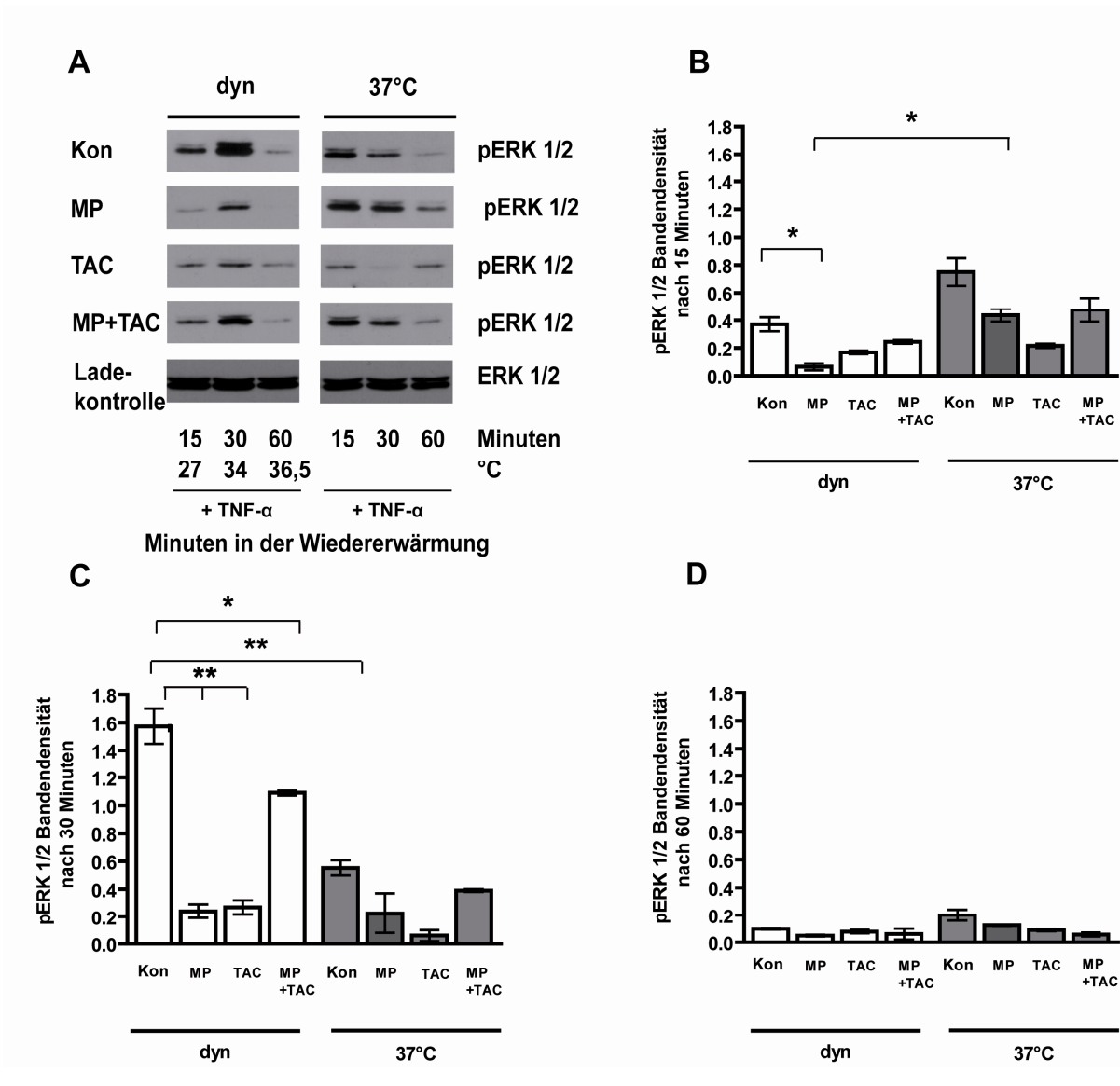


Abbildung 14: pERK Expression nach 15, 30 und 60 Minuten in der Wiedererwärmung in TNF- α stimulierten HUVEC.

A = Western Blot Analysen, B = densitometrische Auswertungen der pERK Expression nach 15 Minuten, C = densitometrische Auswertungen nach 30 Minuten, D = densitometrische Auswertungen nach 60 Minuten. dyn = gekühlte und wiedererwärmte Zellen, 37°C = normotherme Zellgruppe, Kon = unbehandelte Kontrollzellen, MP = Methylprednisolon, TAC = Tacrolimus. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

4.1.4.2 SAPK/JNK

Die Proteinkinase SAPK/JNK stellt eine weitere wichtige intrazelluläre Schaltstelle für die Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren dar. Nach Phosphorylierung kann die SAPK/JNK an inflammatorischen Prozessen aber auch an der Apoptose und der Differenzierung von Zellen beteiligt sein. Abgebildet sind die Ergebnisse der SAPK/JNK Expression in TNF- α (500 U/ml) stimulierten HUVEC nach 15 Minuten, 30 Minuten und 60 Minuten in der Wiedererwärmung (Abbildung 15 A, B, C, D).

Die SAPK/JNK war nach 15 Minuten in der Wiedererwärmung (bei 27°C) in den gekühlten und wiedererwärmten Zellen halb so stark exprimiert wie in der normothermen Kontrolle (Abbildung 15 B). Nach 30 Minuten in der Wiedererwärmung (bei 34°C) stieg die Expression signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 15 C) an, sank jedoch nach 60 Minuten (bei 36,5°C) signifikant unter die Expression der Kontrollgruppe ab (Abbildung 15 D). Sowohl MP (1 mM) und TAC (1 μ M) in der Monoapplikation als auch die Kombination der beiden Medikamente inhibierten signifikant die SAPK/JNK Phosphorylierung während der gesamten Phase der Wiedererwärmung (Abbildung 15 B, C, D).

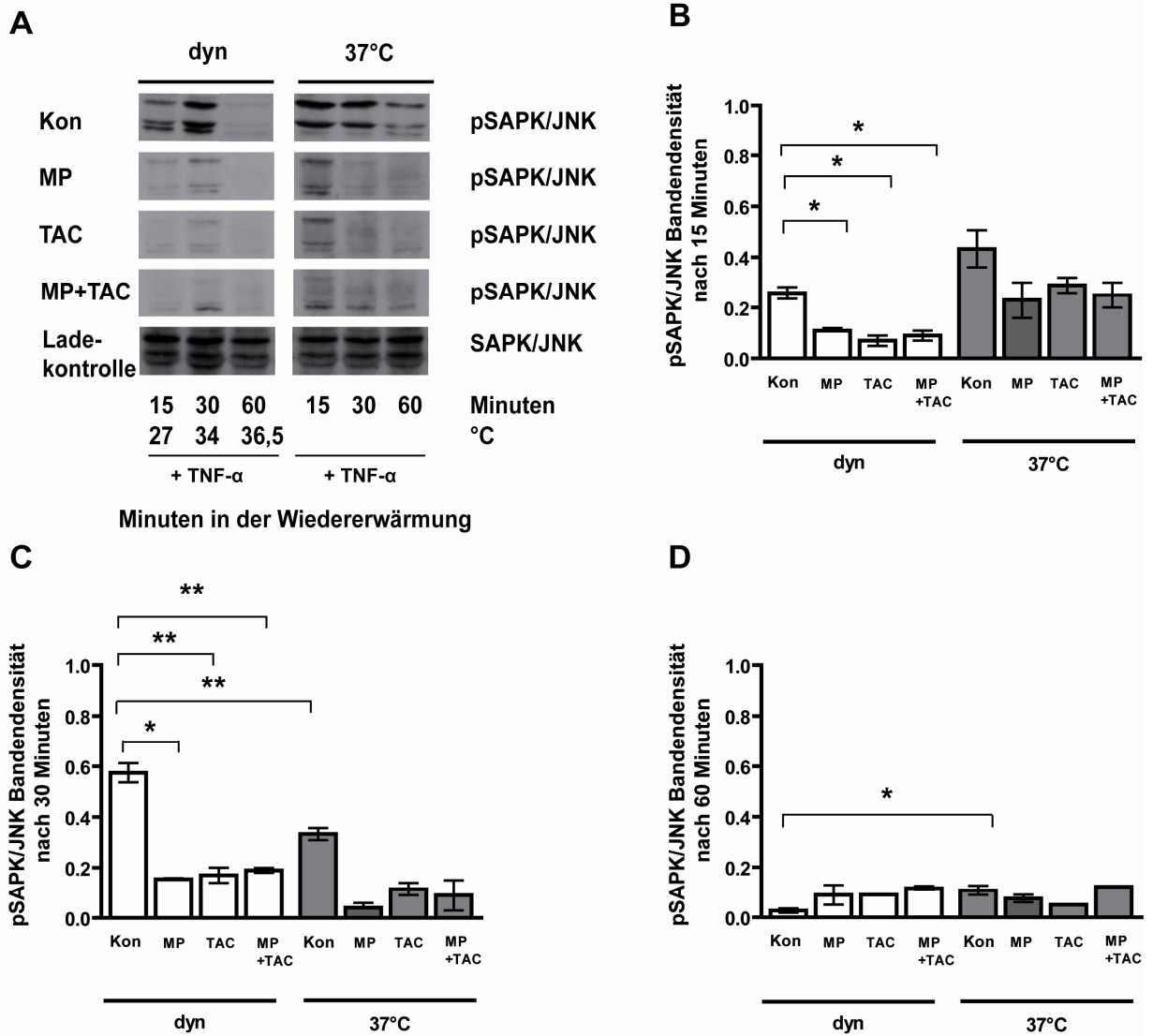


Abbildung 15: pSAPK/JNK Expression nach 15, 30 und 60 Minuten in der Wiedererwärmung in TNF- α stimulierten HUVEC.

A = Western Blot Analysen, B = densitometrische Auswertungen nach 15 Minuten, C = densitometrische Auswertungen nach 30 Minuten, D = densitometrische Auswertungen nach 60 Minuten. dyn = gekühlte und wiedererwärmte Zellen, 37°C = normotherme Zellgruppe, Kon = unbehandelte Kontrollzellen, MP = Methylprednisolon, TAC = Tacrolimus. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.1.4.3 p38

Eine dritte und weitere wichtige intrazelluläre MAPK stellt p38 dar. Die Aktivierung dieser spezifischen Proteinkinase bewirkt ähnlich wie SAPK/JNK eine verstärkte Inflammation. P38 spielt aber auch eine Rolle bei der Zelldifferenzierung und Apoptose. Abgebildet ist die aktivierte, phosphorylierte p38 Kinase in mit TNF- α (500 U/ml) stimulierten HUVEC nach 15 Minuten, 30 Minuten und 60 Minuten in der Wiedererwärmung (Abbildung 16 A, B). Die Western Blot Analysen (Abbildung 16 A) und die densitometrische Auswertungen (Abbildung 16 B) zeigen eine konstante, signifikant höhere pp38 Expression nach 15 Minuten (bei 27°C), 30 Minuten (bei 34°C) und 60 Minuten (bei 36,4°C) in der Wiedererwärmung im Vergleich zur normothermen Kontrolle. Sowohl die Applikation von MP (1 mM) oder TAC (1 μ M) allein als auch die Kombination beider Medikamente inhibierten die Aktivierung der p38 Kinase komplett und sind aus diesem Grund nicht abgebildet.

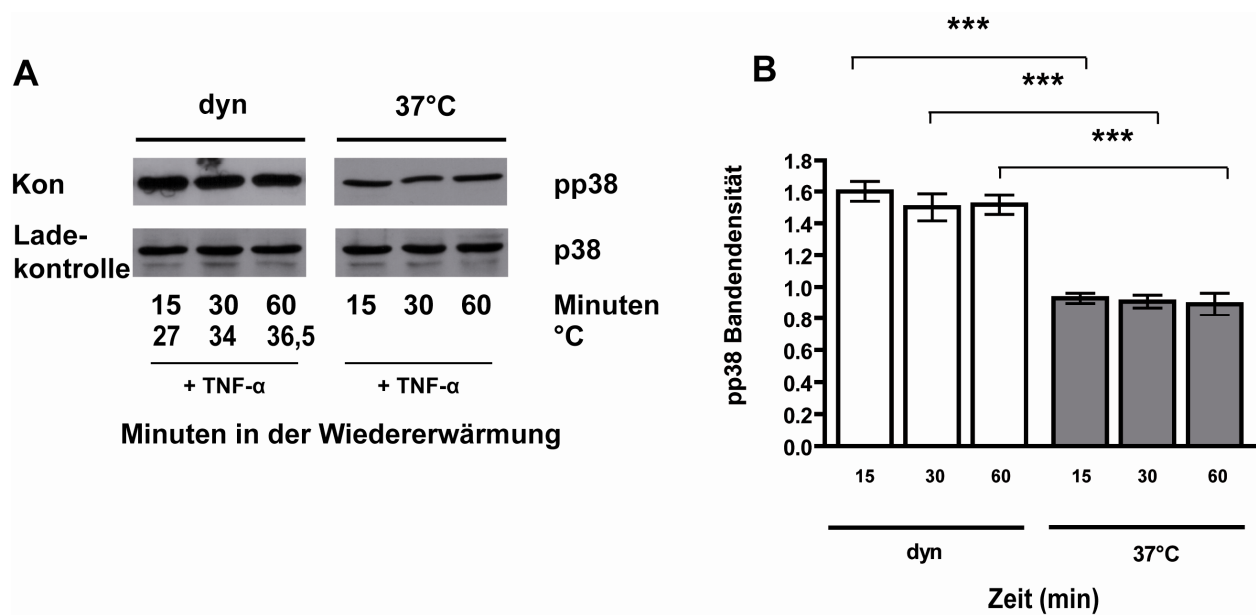


Abbildung 16: pp38 Expression nach 15, 30 und 60 Minuten in der Wiedererwärmung in TNF- α stimulierten HUVEC. Abbildung A = Western Blot Analysen, B = densitometrische Vermessungen nach 15 Minuten, 30 Minuten und 60 Minuten. dyn = gekühlte und wiedererwärmte Zellen, 37°C = normotherme Zellgruppe, ***p<0,001

4.1.5 Beeinflussung inflammatorischer Vorgänge durch spezifische Inhibitoren der Mitogen-Aktivierenden Proteinkinasen

Die Western Blot Analysen haben verstärkte Expressionen aller drei MAPKs in der Phase der Wiedererwärmung gezeigt, welche durch MP und TAC inhibiert werden konnten. Da die intrazellulären MAPKs maßgeblich an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind und MP und TAC die verstärkte IL-6 Sekretion nach Kühlung und Wiedererwärmung inhibieren konnten, wurde durch spezifische Blockade der einzelnen Proteinkinasen versucht, ebenfalls eine Suppression der IL-6 Ausschüttung zu erzielen. Die IL-6 Sekretion der HUVEC wurde nach Blockade der einzelnen MAPKs mit Hilfe spezifischer Inhibitoren sechs Stunden nach Versuchsbeginn (Zeitpunkt t4 des Zeit-Temperatur-Protokolls) gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass durch die gezielte Blockade der Phosphorylierung von ERK 1/2, SAPK/JNK und p38 eine signifikant niedrigere IL-6 Sekretion im Vergleich zu den unbehandelten, mit TNF- α (500 U/ml) stimulierten gekühlten und wiedererwärmten Zellen erzielt werden konnte. Die größte Inhibition der IL-6 Sekretion konnte bei den Zellen, die mit dem pp38 Blocker SB203580 vorbehandelt wurden, erzielt werden. Die IL-6 Sekretion konnte sogar unter die IL-6 Konzentration der normothermen Zellen herunterreguliert werden (Abbildung 17).

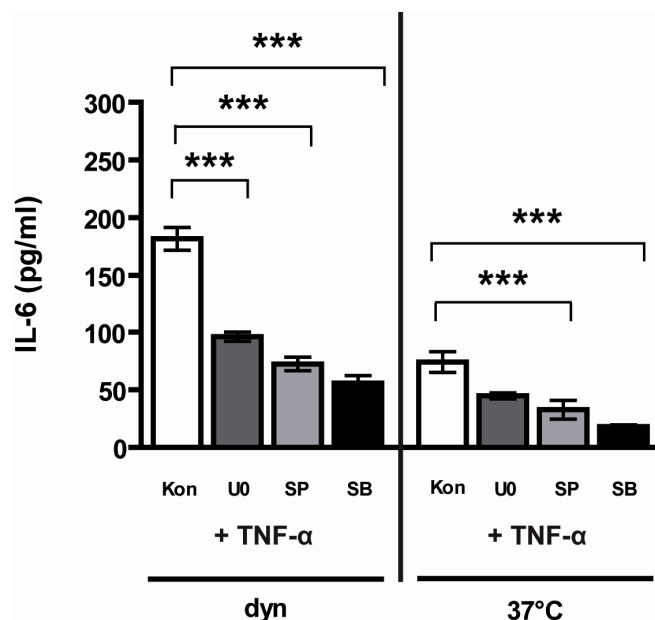


Abbildung 17: IL-6 Sekretion TNF- α stimulierter HUVEC sechs Stunden nach Versuchsbeginn (Zeitpunkt t4 des Zeit-Temperatur-Protokolls) und nach Inkubation mit spezifischen MAPK- Inhibitoren. Kon = unbehandelte Kontrollzellen, 37°C = normotherme Zellgruppe, U0126 = pERK Inhibitor, SB = SB203580/pp38 Inhibitor, SP = SP600125/pSAPK/JNK Inhibitor. ***p<0,001.

5. Diskussion

5.1 Veränderungen der HUVEC unter Hypothermie

Milde und tiefe Hypothermie werden zum Schutz der Organsysteme in vielen verschiedenen klinischen Indikationsbereichen, wie nach perinataler Hypoxie [72], nach Schlaganfällen [2], bei traumatischen Hirnschäden [115] oder im Rahmen des Herz-Kreislaufstillstandes während kardiopulmonalem Bypass bei Neugeborenen und Säuglingen, angewandt [3]. Im Falle komplexer kardialer Korrekturoperationen unter Einsatz des CPB wird die Hypothermie genutzt, um den Zellmetabolismus zu verlangsamen und um die verfügbare Operationszeit zu verlängern [6]. Trotz der protektiven Wirkung der Hypothermie sind prolongierte Inflammation und das Kapillar-Leck-Syndrom Beispiele für unerwünschte postoperative Nebeneffekte nach Korrekturoperationen in der Neonatalperiode und im Säuglingsalter [8, 4, 9, 3]. Deren genaue zelluläre Pathomechanismen sind bisher weitgehend ungeklärt [73]. Zum Verständnis der durch die Hypothermie induzierten zellulären Auswirkungen wurde in unserer Arbeitsgruppe (im Forschungslabor der Abteilung für Pädiatrie m. S. Kardiologie) ein spezielles Zellkulturmodell entwickelt [95, 96, 97]. In diesem wurden humane Endothelzellen, in Analogie an die Bedingungen in der Kinderherzchirurgie, gekühlt und wiedererwärmt. Dabei wurden die morphologischen und funktionellen Veränderungen sowie der Einfluss der beiden immunsuppressiven Medikamente Methylprednisolon und Tacrolimus analysiert.

5.1.1 Einfluss von tiefer Hypothermie und Wiedererwärmung auf morphologische Veränderungen

Tiefe Hypothermie führte im konfluenten Zellverband unstimulierter Endothelzellen zur Ausbildung interzellulärer Lücken und zu einer veränderten Morphologie der Einzelzelle. Dies war durch die Ausbildung länglicher Zellausläufer gekennzeichnet. Während der anschließenden Wiedererwärmung schlossen sich die Lücken im Zellrasen wieder und die anfängliche Integrität des Endothels wurde bei 37°C wieder hergestellt. Auch die Einzelzelle zeigte erneut ihre ursprüngliche polygonale Form. Ähnliche Effekte konnten bereits in früheren Studien beobachtet werden. Brinkkoetter et al. berichtet über eine Zunahme der Zellpermeabilität in Endothelzellen sowie über eine Umstrukturierung zytoskelettaler und junktionaler Proteine (Occludine und Kadherine) während der Kühlung von Organen auf 4°C [20]. In diesem Zusammenhang zeigte sich, dass

Hypothermie die Expression junctionaler Proteine signifikant verminderte, wodurch die Zelladhäsion abnahm und die Barrierefunktion des Endothels verloren ging [20]. Obwohl die Temperatur von 4°C weit unter der in der vorliegenden Arbeit induzierten Hypothermie von 17°C lag, konnten wir ebenfalls eine deutliche Ausbildung von Lücken im Zellverband, eine verminderte Zelladhäsion, eine erhöhte zelluläre Permeabilität sowie die Induktion von Aktin-Stressfasern beobachten.

Die endotheliale Zellpermeabilität wird durch F-Aktin und durch junctionale Proteine organisiert und reguliert [75, 76, 120]. Hypothermie könnte dabei zu einer Aktivierung spezifischer Membranrezeptoren führen, die nachfolgend eine intrazelluläre Signalkaskade über die Aktivierung der ERK 1/2 Proteinkinase in Gang setzen. Dieses wiederum könnte zu einer zytoskelettalen Umstrukturierung führen [77]. Da die aktivierte MAPK ERK 1/2 die Organisation des zytoskelettalen Proteins F-Aktin reguliert und eine Degradation des Proteins Connexin 43 bewirkt [78], könnte eine Phosphorylierung von ERK 1/2 mit konsekutiver Degradation des Proteins Connexin 43 direkt an der Ausbildung der interzellulären Lücken im Zellverband beteiligt sein [79].

5.1.2 Einfluss von Methylprednisolon und Tacrolimus auf morphologische Veränderungen

Die kombinierte Behandlung der HUVEC mit Methylprednisolon und Tacrolimus verhinderte signifikant die Ausbildung der beobachteten Lücken im konfluenten Zellrasen. Dies konnte mit der Monoapplikation von Methylprednisolon oder Tacrolimus nicht erzielt werden. Daher liegt ein kombinierter Effekt der beiden Medikamente vor, der vermutlich Auswirkungen auf verschiedene Signalwege hat. Zytoskelettale Veränderungen im Endothel können über die Suppression von Prostaglandin E2 (PGE2) und Prostazyklin (PGI2) minimiert werden [80, 81]. Durch die Hemmung der Cyclooxygenase-2 reduziert Methylprednisolon maßgeblich sowohl PGE2 als auch PGI2 [115] und könnte somit direkten, inhibierenden Einfluss auf die beobachtete interzelluläre Lückenbildung unter Hypothermie haben. Ein weiterer Effekt, der während tiefer Hypothermie zu Veränderungen des Zytoskeletts und zu einer vermehrten interzellulären Lückenbildung führen könnte, ist ein erhöhter intrazellulärer Calciumspiegel [82, 83]. Tacrolimus inhibiert Calcineurin und supprimiert die calciumabhängige Signaltransduktion [84]. In alleiniger Gabe war es aber nicht ausreichend wirksam, um die durch Hypothermie induzierte erhöhte Zellpermeabilität zu

verhindern. Thomale et al. zeigte ebenfalls, dass TAC abgesehen von der Suppression proinflammatorischer Zytokine keinen anti-ödematösen Effekt im Tiermodell aufwies [85]. Die erzielten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine kombinierte Gabe von MP und TAC sich als effektive Therapie zur Vermeidung der Entstehung erhöhter endothelialer Permeabilität durch therapeutisch induzierte Hypothermie erweisen könnte.

5.2 Einfluss von tiefer Hypothermie und Wiedererwärmung auf die Zellvitalität und das Inflammationsverhalten stimulierter HUVEC

5.2.1 Die Inflammationseigenschaften TNF- α stimulierter HUVEC

Tiefe Hypothermie und nachfolgende Wiedererwärmung hatten keinen Einfluss auf die Vitalität der Endothelzellen. Diese blieb im gesamten Verlauf des Experiments in unstimulierten HUVEC konstant. Nach TNF- α (500 U/ml) Stimulation kam es nach 24 Stunden zu einem signifikanten Vitalitätsverlust. Dieser pro-apoptotische Effekt von TNF- α auf Endothelzellen ist bereits bekannt und wird vor allem über die Aktivierung der pro-apoptotischen Caspase-3 gesteuert [86, 87]. Weiterhin wurde der Verlauf der IL-6 Sekretion während dynamischer Temperaturveränderungen untersucht. Es zeigte sich, dass Hypothermie und Wiedererwärmung eine signifikant höhere IL-6 Ausschüttung sechs Stunden nach Versuchsbeginn in TNF- α stimulierten HUVEC induzierten. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen klinischer Studien [88]. Die Plasma-IL-6 Spiegel steigen konstant innerhalb von zwei bis sechs Stunden nach Anlage des CPB an und erreichen ihren höchsten Wert sowohl vier bis sechs Stunden postoperativ als auch 12-18 Stunden nach Beendigung der extrakorporalen Zirkulation [88]. IL-6 ist ein Beispiel für ein proinflammatorisches Zytokin, das sowohl zytoprotektive als auch zytotoxische Eigenschaften aufweist. Im zentralen Nervensystem zum Beispiel konnten Studien eine Beteiligung von IL-6 beim Schutz von Neuronen, bei der neuronalen Differenzierung und beim neuronalem Wachstum nachweisen [89]. Zusätzlich wird dem Zytokin eine unterstützende Rolle bei der neuronalen Regeneration nach traumatischen und hypoxischen Hirnschäden zugeschrieben [90, 91]. Auf der anderen Seite sind erhöhte IL-6 Serumspiegel nach pädiatrischen Herzoperationen mit einer höheren postoperativen Mortalität assoziiert [92]. Eine weitere klinische Studie weist darauf hin, dass erwachsene Patienten mit schwerer Sepsis, deren Körpertemperatur gesenkt wurde, höhere IL-6 Serumspiegel und eine zweifach höhere

Mortalitätsrate aufwiesen, als eine Vergleichsgruppe mit schwerer Sepsis und Fieber [93]. Die gewonnenen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass eine erniedrigte Körpertemperatur mit anschließender Wiedererwärmung allein für eine überschüssige IL-6 Sekretion verantwortlich sein könnte. Infolge dieser starken Zytokin-Reaktion kann es zu Endothelschäden und zu konsekutiver Organdysfunktion kommen. Vergleichbares wurde in Studien gezeigt, in denen die Körpertemperatur erniedrigt wurde, zum Beispiel im Rahmen akzidenteller Erfrierungen, intraoperativ induzierter Hypothermie und des hypothermen Herz-Kreislaufstillstandes in der Kinderherzchirurgie (Körpertemperaturen von 16 bis 20°C). Alle diese Patienten wiesen erhöhte Zytokin-Sekretionen (IL-2, IL-6, TNF- α , u.a.), eine schlechteren Immunabwehrlage und eine erhöhte Mortalitätsrate auf [94, 113].

Bei der Analyse der proinflammatorischen Chemokine IL-8 und MCP-1 zeigte sich, dass die Sekretion in den gekühlten und wiedererwärmten stimulierten Endothelzellen im Vergleich zur normothermen Kontrollgruppe eher erniedrigt war. Dieser Effekt könnte als zytoprotektiv gewertet werden, da sowohl IL-8 als auch MCP-1 polymorphonukleäre Zellen aktivieren und deren Migration durch die Endothelzellbarriere begünstigen [34, 74]. Dieser Prozess spielt bei der Schädigung des umliegenden Gewebes durch zytotoxische Proteasen und Oxidanzien während der Inflammation eine entscheidende Rolle [10].

5.2.2 Einfluss von Methylprednisolon und Tacrolimus auf das Inflammationsverhalten stimulierter HUVEC

Verschiedene Maßnahmen, um die durch den CPB induzierte inflammatorische Antwort zu minimieren oder sogar zu unterbinden, wie beispielsweise eine veränderte Perfusion, Ultrafiltration und pharmakologische Strategien, erbrachten bisher nicht den gewünschten Erfolg [3]. Die Gabe von Methylprednisolon vor Anlage des CPB gehört hierbei weiterhin zur klinische Routine [98, 99]. Low-dose Methylprednisolon wird der „prime solution“ des CPB hinzugefügt, um einem myokardialen Zellschaden und systemisch inflammatorischen Reaktionen (SIRS) entgegenzuwirken [3, 100, 101].

Nach Bindung an den spezifischen Rezeptor hemmen Glukokortikoide den Transkriptionsfaktor NF- κ B und damit die Sekretion proinflammatorischer Zytokine (IL-2, IL-6, TNF- α , u.a.) [56]. Studien über die genauen molekularen Effekte der

Kortikosteroide auf die endotheliale Zellfunktion unter hypothermen Bedingungen gibt es wenige [102, 91].

Als weiteres immunsuppressives Medikament wurde Tacrolimus, welches die Calcium/Calmodulin abhängige Calcineurin-Aktivierung hemmt, in die Versuche eingesetzt. Es zeigte sich, dass die inhibitorischen Effekte auf die erhöhte IL-6 Sekretion in der Kombinationsgabe aus Methylprednisolon und Tacrolimus deutlich stärker ausgeprägt waren als in der Einzelapplikation. Dieser therapeutische Effekt könnte auch in der Klinik von Interesse sein.

5.2.3 Einfluss der Hypothermie auf die Mitogen-Aktivierenden Proteinkinasen und deren spezifische Inhibition

Zur Analyse der zugrunde liegenden intrazellulären Signalwege wurden die aktivierten drei MAPKs ERK 1/2, SAPK/JNK und p38 in der Phase der Wiedererwärmung in TNF- α stimulierten Endothelzellen untersucht. Diese intrazellulären Proteinkinasen werden unter anderem während Infektionen durch proinflammatorische Stimulatoren wie IL-6, TNF- α , IL-2, u.a. phosphoryliert und somit aktiviert [103]. Alle drei Signalproteine wurden in der Wiedererwärmungsphase in stimulierten Endothelzellen signifikant stärker aktiviert als in der normothermen Zellgruppe. Die Ergebnisse zeigen, dass Hypothermie und Wiedererwärmung die Induktion proinflammatorischer Proteinkinasen verstärken. Durch den experimentellen Einsatz spezifischer MAPK-Inhibitoren konnte unabhängig voneinander die erhöhte IL-6 Sekretion der gekühlten und wiedererwärmten Endothelzellen signifikant reduziert werden. Dabei wurde die effektivste Inhibition durch SB203580, einen selektiven p38 Blocker, erzielt. Das legt die Vermutung nahe, dass die aktivierte Proteinkinase p38 maßgeblich an der vermehrten IL-6 Sekretion in gekühlten und wiedererwärmten Endothelzellen beteiligt ist. Andere Studien unterstreichen die Wichtigkeit des p38 Signalwegs während der Inflammation [49]. So spielt die Aktivierung dieses Signalwegs eine entscheidende Rolle in der Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF- α , und IL-1 β , u.a. [104], bei der Induktion von Enzymen wie Cox-2 und iNOS [105] und bei der Expression von Adhäsionsmolekülen wie beispielsweise VCAM-1 [106]. Aus diesem Grund könnte die spezifische Blockade der p38 Kinase eine alternative pharmakologische Strategie zur Vermeidung einer überschießenden inflammatorischen Antwort nach tiefer Hypothermie und Wiedererwärmung darstellen. Herkömmliche Immunsuppressiva sind unspezifisch

in ihrer Wirkweise und zeigen ein hohes Nebenwirkungsprofil in der Langzeittherapie. Die unerwartete Hochregulation der aktivierten ERK 1/2 Kinase in mit Methylprednisolon und Tacrolimus behandelten, TNF- α stimulierten Endothelzellen nach 30 Minuten in der Wiedererwärmung könnte unter anderem durch die unspezifische Wirkweise der beiden Medikamente erklärt werden. Einen aktivierenden Effekt von Methylprednisolon und Calcineurin-Inhibitoren in humanen Endothelzellen beschreibt auch Trapp et al. in einer Studie [107]. Auf der anderen Seite könnte eine Phosphorylierung der ERK 1/2 Kinase unter der Kombinationsapplikation auch als Schutzmechanismus der Zelle gegenüber dem zusätzlichen medikamenten-assoziierten Zellstress verstanden werden. Beide Medikamente senken unspezifisch nicht nur die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, sondern beeinflussen auch den Zelluntergang und die Zellproliferation [108]. Im Gegensatz dazu weist Hetman et al. auf den protektiven Effekt der aktivierten ERK 1/2 Kinase hin, die neben ihrer Bedeutung an inflammatorischen Vorgängen auch einen positiven Einfluss auf das Zellwachstum und das Zellüberleben ausübt [109].

6. Schlussfolgerung

In der vorliegenden laborexperimentellen Arbeit wurde mit Hilfe eines *in vitro* Zellkulturmodells aus humanen umbilikal venösen Endothelzellen der Einfluss von Hypothermie und Wiedererwärmung auf die morphologischen und funktionellen Eigenschaften von humanen Endothelzellen analysiert. Zusammenfassend zeigte sich, dass Hypothermie einen komplexen Einfluss auf eine Vielzahl intrazellulärer Signalwege hat. Diese verändern wiederum sowohl die morphologischen Charakteristika der Einzelzelle und des gesamten Zellverbands als auch die funktionellen Zelleigenschaften. Ein kombinierter medikamentöser Einsatz von Methylprednisolon und Tacrolimus konnte sowohl die durch Hypothermie induzierte gesteigerte Zellpermeabilität mit interzellulärer Lückenbildung im konfluenten Zellverband verhindern, als auch die erhöhte IL-6 Sekretion sechs Stunden nach Wiedererwärmung in humanen Endothelzellen supprimieren. Ein Nachteil dieser immunsuppressiven Therapie ist, neben einem breiten Nebenwirkungsprofil, die unspezifische Wirkweise auf intrazelluläre Signalwege. Deshalb wurden darüber hinaus die intrazellulären MAPKs durch spezifische Inhibitoren blockiert, wobei der Einsatz des Blockers SB203580 die effektivste IL-6 Suppression bewirkte. Dieses Ergebnis könnte eine neue therapeutische Strategie in der durch die Herz-Lungen-Maschine ausgelösten inflammatorischen Antwort darstellen.

Es ist jedoch zu beachten, dass die gewonnenen Erkenntnisse zum jetzigen Zeitpunkt nur bedingt klinisch übertragbar sind. Der Mensch ist ein komplexer Organismus und der Effekt der Hypothermie im Rahmen von herzchirurgischen Eingriffen bei Neonaten und im Säuglingsalter ist vielseitig. Multiple Faktoren wie die Operationsdauer, die Schwere des zugrunde liegenden Herzfehlers, das Alter und das Gewicht des Patienten spielen eine große Rolle für den postoperativen Verlauf des Patienten. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich der Effekt der Hypothermie in einem Zellkulturmodell mit primären Endothelzellen untersucht. Trotz der geschilderten Limitationen des artifiziellen *in vitro* Modells entstehen daraus Vorteile. Für die Analyse des grundlegenden zellulären Mechanismus der Hypothermie auf die Morphologie und das Aktivitätsverhalten der Zellen ist ein Zellkulturmodell ideal. Das daraus folgende detaillierte Verständnis der zugrunde liegenden intrazellulären Stoffwechselmechanismen der Einzelzelle ist die Basis zur Entwicklung weiterer Modellsysteme von der Kokultur über den Tierversuch bis hin zu klinischen Studien.

Denn nur durch die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien können frühzeitig bekannte postoperative Komplikationen behandelt oder sogar vermieden werden.

7. Ausblick

Aus dieser Arbeit sind weitere Ideen zu neuen Experimenten und Folgestudien hervorgegangen. In einem aktuellen Projekt werden die Auswirkungen der Hypothermie auf Endothelzellen in der Kokultur mit Makrophagen untersucht. Dabei wird ein Schwerpunkt auf die Interaktion beider Zelltypen gelegt, da Makrophagen im Besonderen an der Entstehung und Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion beteiligt sind. Gleichzeitig wurde eine klinische Studie begonnen, in deren Rahmen randomisiert Neugeborene und Säuglinge einer Gruppe zugeordnet werden, in der sie während der Korrekturoperation entweder gekühlt oder unter normothermen Bedingungen operiert werden. Perioperativ werden den Patienten zu festgelegten Zeitpunkten Blut zur Zytokinbestimmung entnommen. Durch diese weiterführenden Untersuchungen könnte sich einer klinischen Übertragbarkeit der gewonnenen Daten angenähert werden, um folglich therapeutische Alternativen zur Verbesserung der Prognose des Patienten entwickeln und modifizieren zu können.

Die Vielzahl neuer Studien und die zunehmend kürzere Dauer komplexer chirurgischer Eingriffe führen zu einer kritischen Überprüfung der Vor- und Nachteile der prophylaktischen Hypothermie bei kardiochirurgischen Eingriffen im Kindesalter. Patienten, die unter normothermen CPB operiert wurden, waren postoperativ unter anderem geringerem oxidativen Stress ausgesetzt [112], wiesen eine geringere Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Komplementfaktoren auf [113] und es zeigte sich eine geringere Beeinträchtigung des Gerinnungssystems und der Thrombozytenfunktion als bei Operationen unter hypothermen CPB [114]. Somit bleibt kritisch zu entscheiden, inwieweit sich positive und negative Effekte der induzierten Hypothermie gegenseitig beeinflussen und wie groß die Risiken und Langzeitfolgen eines solchen Eingriffes letztendlich für den individuellen Patienten sind.

8. Zusammenfassung

Zum Schutz unreifer Organsysteme während kardiochirurgischer Eingriffe unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine bei Neugeborenen und Säuglingen werden die Patienten auf eine minimale Körpertemperatur von 17°C heruntergekühlt. Jedoch sind prolongierte Inflammation und das „Kapillar-Leck-Syndrom“ häufige Komplikationen nach Korrekturoperationen bei Neugeborenen und Säuglingen. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von tiefer Hypothermie und Wiedererwärmung auf humane Endothelzellen sowie deren medikamentöse Beeinflussung zu untersuchen. Dazu wurden stimulierte und unstimulierte humane umbilikal venöse Endothelzellen (HUVEC) nach einem speziellen Zeit-Temperatur-Protokoll, in Analogie zu den klinischen Bedingungen, gekühlt und anschließend wiedererwärmt. Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen vor Versuchsbeginn mit Methylprednisolon (MP) und/oder Tacrolimus (TAC) sowie mit spezifischen MAPK-Inhibitoren (U0126, SB203580 und SP600125) vorbehandelt. Es wurden die morphologischen Veränderungen und die Zellvitalität analysiert. Außerdem wurde die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-6 und der Chemokine IL-8 und MCP-1 sowie die Aktivierung der MAPKs ERK 1/2, SAPK/JNK, p38 untersucht. Tiefe Hypothermie führte im Zellverband unstimulierter Endothelzellen zur Ausbildung interzellulärer Lücken, die sich jedoch während der Wiedererwärmung zurückbildeten. Nur die kombinierte Gabe von MP und TAC verhinderte diese Hypothermie-bedingten morphologischen Veränderungen vollständig. Mit TNF- α stimulierte HUVEC wiesen zwei Stunden nach Wiedererwärmung eine signifikant höhere IL-6 Sekretion auf. Diese inflammatorische Antwort konnte durch kombinierte Applikation von MP und TAC unterdrückt werden. Am Effektivsten wurde die vermehrte IL-6 Sekretion durch die spezifische Blockade der p38 Kinase mittels des selektiven Inhibitors SB203580 gesenkt. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass die kombinierte Gabe von MP und TAC sowie die spezifische Blockade von p38 *in vitro* potentiell neue Therapiemöglichkeiten zur Vermeidung von Endothelzell-Dysfunktionen und zur Reduktion einer gesteigerten Inflammation nach Hypothermie und Wiedererwärmung darstellen.

9. Abstract

To protect immature organ systems during corrective cardiac surgery, patients are cooled to a minimal body temperature of 17°C. However, prolonged inflammation and “capillary leakage” are common unwanted effects after corrective cardiac surgery in newborns and infants. The aim of this study was to investigate the effect of deep hypothermia and rewarming on human endothelial cells, as well as the treatment with Methylprednisolone and/or Tacrolimus. Stimulated and unstimulated human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were exposed to a dynamic temperature protocol analogous to clinical settings. Furthermore, endothelial cells were pretreated with Methylprednisolone and/or Tacrolimus as well as with Mitogen-Activated Protein Kinase-inhibitors (U0126, SB203580 and SP600125). Morphological changes, cell viability, expression of the pro-inflammatory cytokine IL-6 and the chemokines IL-8 and MCP-1 and ERK 1/2, SAPK/JNK and p38 activation were investigated. Hypothermia led to intercellular gap formation and elongated cell shapes in unstimulated endothelial cells. Upon rewarming, endothelial cell integrity was restored. Only the combined treatment with MP and TAC inhibited these hypothermia-induced changes. Stimulated endothelial cells secreted significantly higher IL-6 protein two hours after rewarming. The combined pretreatment with MP and TAC served to inhibit the increased IL-6 secretion. SB203580 as specific p38 inhibitor most effectively down regulated the unwanted IL-6 release after cooling and rewarming.

These results suggest that the combined treatment of MP and TAC, as well as the inhibition of p38 or components of the p38 pathway could be a promising and selective therapeutic target to prevent endothelial dysfunction and prolonged inflammation after deep hypothermia and rewarming.

10. Literaturangaben

1. Bernard SA, Buist M: Induced hypothermia in critical care medicine: a review. *CritCareMed*. 2003 Jul;31(7):2041-51.
2. Olsen, T. S., U. J. Weber & L. P. Kammergaard: Therapeutic hypothermia for acute stroke. *Lancet Neurol* 2003, 2, 410-6
3. Laffey, J. G., J. F. Boylan & D. C. Cheng: The systemic inflammatory response to cardiac surgery: implications for the anesthesiologist. *Anesthesiology* 2002, 97, 215-52.
4. Chew, M. S., I. Brandslund, V. Brix-Christensen, H. B. Ravn, V. E. Hjortdal, J. Pedersen, K. Hjortdal, O. K. Hansen & E. Tonnesen: Tissue injury and the inflammatory response to pediatric cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: a descriptive study. *Anesthesiology* 2001, 94, 745-53; discussion 5A.
5. Gunn, A. J., T. Hoehn, G. Hansmann, C. Buhner, G. Simbruner, J. Yager, M. Levene, S. E. Hamrick, S. Shankaran & M. Thoresen: Hypothermia: an evolving treatment for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 2008, 121, 648-9; author reply 649-50.
6. Polderman KH: Induced hypothermia and fever control for prevention and treatment of neurological injuries. *Lancet*. 2008 Jun 7;371(9628):1955-69
7. McCullough JN, Zhang N, Reich DL, Juvonen TS, Klein JJ, Spielvogel D, Ergin MA, Griep RB: Cerebral metabolic suppression during hypothermic circulatory arrest in humans. *Ann Thorac Surg*. 1999 Jun;67(6):1895-9; discussion 1919-21.
8. Abrahamov D, Erez E, Tamariz M, Dagan O, Pearl E, Abrahamov Y. et al: Plasma vascular endothelial growth factor level is a predictor of the severity of postoperative capillary leak syndrome in neonates undergoing cardiopulmonary bypass. *Pediatr Surg Int* 2002;18:54-59.
9. Schroth M, Plank C, Meissner U, Eberle KP, Weyand M, Cesnjevar R, Dötsch J, Rascher W: Hypertonic-hyperoncotic solutions improve cardiac function in children after open-heart surgery. *Pediatrics*. 2006 Jul;118(1):e76-84. Epub 2006 Jun 2.

10. Gundersen Y, Vaagenes P, Pharo A, Valø ET, Opstad PK: Moderate hypothermia blunts the inflammatory response and reduces organ injury after acute haemorrhage. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2001 Sep;45(8):994-1001.
11. Jonas RA, Wypij D, Roth SJ, Bellinger DC, Visconti KJ, du Plessis AJ, Goodkin H, Laussen PC, Farrell DM, Bartlett J, McGrath E, Rappaport LJ, Bacha EA, Forbess JM, del Nido PJ, Mayer JE Jr, Newburger JW: The influence of hemodilution on outcome after hypothermic cardiopulmonary bypass: results of a randomized trial in infants. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003 Dec;126(6):1765-74.
12. Bellinger DC, Jonas RA, Rappaport LA, Wypij D, Wernovsky G, Kuban KC, Barnes PD, Holmes GL, Hickey PR, Strand RD, et al. Developmental and neurologic status of children after heart surgery with hypothermic circulatory arrest or low-flow cardiopulmonary bypass. *N Engl J Med.* 1995;332:549-55.
13. T.N. Hansen, P.E. Dawson, K.G. Brockbank, Effects of hypothermia upon endothelial cells: mechanisms and clinical importance, *Cryobiology* 31 (1994) 101–106.
14. Zheng YJ, Tang YQ, Liu W, Mao EQ, Li L, Wu J, Zhang RY, Zhang SD: [A study on increased permeability and morphological changes in actin cytoskeleton and tight junction of vascular endothelial cells induced by tumor necrosis factor-alpha. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.* 2009 Mar;21(3):160-3.
15. K.D. Fairchild, I.S. Singh, S. Patel, B.E. Drysdale, R.M. Viscardi, L. Hester, H.M. Lazusky, J.D. Hasday, Hypothermia prolongs activation of NF-kappa B and augments generation of inflammatory cytokines, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287 (2004) C422–431.
16. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM: Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* 1998 May 15;91(10):3527-61.
17. von Hundelshausen P, Koenen RR, Weber C: Platelet-mediated enhancement of leukocyte adhesion. *Microcirculation.* 2009 Jan;16(1):84-96.
18. D.B. Cines, E.S. Pollak, C.A. Buck, J. Loscalzo, G.A. Zimmerman, R.P. McEver, J.S. Pober, T.M. Wick, B.A. Konkle, B.S. Schwartz, Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders, *Blood* 91 (1998) 3527–3561.

19. Prasain N, Stevens T: The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. *Microvasc Res.* 2009 Jan;77(1):53-63. Epub 2008 Oct 26.
20. Brinkkoetter PT, Beck GC, Gottmann U, Loesel R, Schnetzke U, Rudic B et al.: Hypothermia-induced loss of endothelial barrier function is restored after dopamine pretreatment: role of p42/p44 activation. *Transplantation* 2006;82:534-542
21. Okajima K: [Regulation of inflammatory responses by endothelial cells-- understanding the molecular mechanism(s) and its therapeutic application to sepsis] *Masui.* 2008 Mar;57(3):311-20.
22. van Nieuw Amerongen GP, Vermeer MA, Negre-Aminou P, Lankelma J, Emeis JJ et al.: Simvastatin improves disturbed endothelial barrier function. *Circulation* 2000;102:2803-2809.
23. Dejana E, Corada M, Lampugnani MG: Endothelial cell-to-cell junctions. *Faseb J* 1995;9:910-918.
24. Schnittler HJ: Structural and functional aspects of intercellular junctions in vascular endothelium. *Basic Res Cardiol* 1998;93 Suppl 3:30-39.
25. Kadl A, Leitinger N: The role of endothelial cells in the resolution of acute inflammation. *Antioxid Redox Signal.* 2005 Nov-Dec;7(11-12):1744-54.
26. Wang HX, Tong D, El-Gehani F, Tekpetey FR, Kidder GM: Connexin expression and gap junctional coupling in human cumulus cells: contribution to embryo quality. *J Cell Mol Med* 2008.
27. Trocha SD, Kevil CG, Mancini MC, Alexander JS: Organ preservation solutions increase endothelial permeability and promote loss of junctional proteins. *Ann Surg* 1999;230:105-113.
28. Yamane Y, Shiga H, Asou H, Ito E: GAP junctional channel inhibition alters actin organization and calcium propagation in rat cultured astrocytes. *Neuroscience* 2002;112:593-603.
29. Löffler, Petrides. *Biochemie und Pathobiochemie.* Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York. 7. Auflage, 2003:814-827
30. S.P. Gao, K.G. Mark, K. Leslie, W. Pao, N. Motoi, W.L. Gerald, W.D. Travis, W. Bornmann, D. Veach, B. Clarkson, J.F. Bromberg, Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 3846–3856

31. Chen Q, Fisher DT, Clancy KA, Gauguet JM, Wang WC, Unger E, Rose-John S, von Andrian UH, Baumann H, Evans SS: Fever-range thermal stress promotes lymphocyte trafficking across high endothelial venules via an interleukin 6 trans-signaling mechanism. *Nat Immunol.* 2006 Dec;7(12):1299-308.
32. Fenske D, Dersch K, Lux C, Zipse L, Suriyaphol P, Dragneva Y, Han SR, Bhakdi S, Husmann M: Enzymatically hydrolyzed low-density lipoprotein modulates inflammatory responses in endothelial cells. *Thromb Haemost.* 2008 Dec;100(6):1146
33. Waugh DJ, Wilson C: The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 2008 Nov 1;14(21):6735-41.
34. K. Nyhlen, M. Linden, R. Andersson, S. Uppugunduri, Corticosteroids and interferons inhibit cytokine-induced production of IL-8 by human endothelial cells, *Cytokine* 12 (2000) 355–360.
35. Matsuo Y, Ochi N, Sawai H, Yasuda A, Takahashi H, Funahashi H, Takeyama H, Tong Z, Guha S: CXCL8/IL-8 and CXCL12/SDF-1alpha co-operatively promote invasiveness and angiogenesis in pancreatic cancer. *Int J Cancer.* 2009 Feb 15;124(4):853-61.
36. Cheng HT, Yang T, Zhao J: [Effects of TNF-alpha on MCP-1 and IL-8 mRNA expression in human umbilical vein endothelial cells]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2009 Apr;17(2):479-82.
37. Sutcliffe AM, Clarke DL, Bradbury DA, Corbett LM, Patel JA, Knox AJ: Transcriptional regulation of monocyte chemotactic protein-1 release by endothelin-1 in human airway smooth muscle cells involves NF-kappaB and AP-1. *Br J Pharmacol.* 2009 Jun;157(3):436-50. Epub 2009 Apr 9.
38. Distler JH, Akhmetshina A, Schett G, Distler O: Monocyte chemoattractant proteins in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford).* 2009 Feb;48(2):98-103. Epub 2008 Nov 4.
39. Ju Y, Hua J, Sakamoto K, Ogawa H, Nagaoka I. Modulation of TNF-alpha-induced endothelial cell activation by glucosamine, a naturally occurring amino monosaccharide. *Int J Mol Med.* 2008 Dec;22(6):809-15.
40. Cullen JP, Morrow D, Jin Y, Curley B, Robinson A, Sitzmann JV, Cahill PA, Redmond EM: Resveratrol, a polyphenolic phytoestrogen, inhibits endothelial monocyte chemotactic protein-1 synthesis and secretion. *J Vasc Res.* 2007;44(1):75-84. Epub 2006 Dec 21.

41. Maus U, Huwe J, Ermert L, Ermert M, Seeger W, Lohmeyer J: Molecular pathways of monocyte emigration into the alveolar air space of intact mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Jan 1;165(1):95-100.
42. Wang T, Dai H, Wan N, Moore Y, Dai Z: The role for monocyte chemoattractant protein-1 in the generation and function of memory CD8+ T cells. *J Immunol.* 2008 Mar 1;180(5):2886-93.
43. Eligini S, Arenaz I, Barbieri SS, Faleri ML, Crisci M, Tremoli E, Colli S: Cyclooxygenase-2 mediates hydrogen peroxide-induced wound repair in human endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2009 Mar 6.
44. Chen L, Frister A, Wang S, Ludwig A, Behr H, Pippig S, Li B, Simm A, Hofmann B, Pilowski C, Koch S, Buerke M, Rose-John S, Werdan K, Loppnow H: Interaction of vascular smooth muscle cells and monocytes by soluble factors synergistically enhances interleukin-6 and MCP-1 production. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009 Jan 23.
45. Cowan KJ, Storey KB: Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol.* 2003 Apr;206(Pt 7):1107-15.
46. D'Cruz BJ, Logue ES, Falke E, DeFranco DB, Callaway CW: Hypothermia and ERK activation after cardiac arrest. *Brain Res.* 2005 Dec 7;1064(1-2):108-18. Epub 2005 Nov 14.
47. Roux, P. P. & J. Blenis: ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004, 68, 320-44.
48. Dougherty CJ, Kubasiak LA, Prentice H, Andreka P, Bishopric NH, Webster KA: Activation of c-Jun N-terminal kinase promotes survival of cardiac myocytes after oxidative stress. *Biochem J.* 2002 Mar 15;362(Pt 3):561-71
49. Curtis AM, Wilkinson PF, Gui M, Gales TL, Hu E, Edelberg JM: p38 mitogen-activated protein kinase targets the production of proinflammatory endothelial microparticles. *J Thromb Haemost.* 2009 Apr;7(4):701-9. Epub 2009 Jan 22.
50. Löffler, Petrides. *Biochemie und Pathobiochemie.* Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York. 7. Auflage, 2003:825-826.
51. Wang YX, Xu XY, Su WL, Wang Q, Zhu WX, Chen F, Jin G, Liu YJ, Li YD, Sun YP, Gao WC, Ruan CP: Activation and Clinical Significance of p38 MAPK Signaling Pathway in Patients With Severe Trauma. *J Surg Res.* 2008 Dec 3.

52. Simard M, Couldwell WT, Zhang W, Song H, Liu S, Cotrina ML, Goldman S, Nedergaard M: Glucocorticoids-potent modulators of astrocytic calcium signaling. *Glia*. 1999;28:1-12.
53. Chaney JC, Jones K, Grathwohl K, Olivier KN: Implementation of an oxygen therapy clinic to manage users of long-term oxygen therapy. *Chest* 2002;122:1661-1667
54. Liu J, Ji B, Long C, Li C, Feng Z: Comparative effectiveness of methylprednisolone and zero-balance ultrafiltration on inflammatory response after pediatric cardiopulmonary bypass. *Artif Organs*. 2007 Jul;31(7):571-5.
55. Chaney MA: Corticosteroids and cardiopulmonary bypass: a review of clinical investigations. *Chest* 2002;121:921-931.
56. Löffler, Petrides. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York. 7. Auflage, 2003:884
57. Vigil SV, de Liz R, Medeiros YS, Fröde TS: Efficacy of tacrolimus in inhibiting inflammation caused by carrageenan in a murine model of air pouch. *Transpl Immunol*. 2008 Apr;19(1):25-9. Epub 2008 Jan 24.
58. Chakkerla HA, Chertow GM, O'Hare AM, Amend WJ Jr, Gonwa TA: Regional variation in kidney transplant outcomes: trends over time. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009 Jan;4(1):152-9. Epub 2008 Oct 15.
59. Benson A, Barrett T, Sparberg M, Buchman AL: Efficacy and safety of tacrolimus in refractory ulcerative colitis and Crohn's disease: a single-center experience. *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Jan;14(1):7-12.
60. Ryeom S, Baek KH, Rioth MJ, Lynch RC, Zaslavsky A, Birsner A et al.: Targeted deletion of the calcineurin inhibitor DSCR1 suppresses tumor growth. *Cancer Cell* 2008;13:420-431.
61. Heidt S, Roelen DL, Eijsink C, van Kooten C, Claas FH, Mulder A: Effects of immunosuppressive drugs on purified human B cells: evidence supporting the use of MMF and rapamycin. *Transplantation*. 2008 Nov 15;86(9):1292-300.
62. Chitlur, M., E. Abella, T. P. Singh & S. Savasan: Severe neutropenia and thrombocytopenia following cardiac transplantation in a child. *Pediatr Transplant* 2005, 9, 94-6.
63. Dani, C., V. Vestri, G. Bertini, S. Pratesi & F. F. Rubaltelli: Toxicity of corticosteroids and catecholamines for mice neuronal cell cultures: Role of preservatives. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2007, 20, 325-33.

64. Jacquet, A., H. Francois, C. Frangie, L. Ahmad, B. Charpentier & A. Durrbach: Prevention of calcineurin inhibitor nephrotoxicity in renal transplantation. *Transpl Immunol* 2008, 20, 29-31.
65. Roesler, R., G. Schwartzmann & F. Dal Pizzol: Bombesin protection against FK506 neurotoxicity. *J Pediatr Surg* 2007, 42, 750; author reply 751.
66. Cağdaş DN, Paç FA, Cakal E: Glucocorticoid-induced diabetic ketoacidosis in acute rheumatic fever. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2008 Dec;13(4):298-300.
67. Liu Z, Yuan X, Luo Y, He Y, Jiang Y, Chen ZK, Sun E: Evaluating the effects of immunosuppressants on human immunity using cytokine profiles of whole blood. *Cytokine.* 2009 Feb;45(2):141-7. Epub 2009 Jan 9.
68. Batten P, McCormack AM, Page CS, Yacoub MH, Rose ML: Human T cell responses to human and porcine endothelial cells are highly sensitive to cyclosporin A and FK506 in vitro. *Transplantation.* 1999 Nov 27;68(10): 1552-60.
69. Jaffe, E. A., R. L. Nachman, C. G. Becker und C. R. Minick: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest,* 52(11): 2745-2756, 1973
70. Gräfe, M., W. Auch-Schwelk und K. graf: Isolation and characterization of Macrovascular and microvascular endothelial cells from human hearts. *Am. J. Physiol.,* 267: H2138-H2148,1994.
71. Sauer, I.M., et al., The *SlideReactor*-a simple hollow fiber based bioreactor suitable for light microscopy. *Artif Organs,* 2005. 29(3): p. 264-7.
72. Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D, Ballard R, Edwards AD, Ferriero DM, Polin RA, Robertson CM, Thoresen M, Whitelaw A, Gunn AJ: Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet.* 2005 Feb 19-25;365(9460):663-70.
73. Yoshihiro Hamada, MD, Kanji Kawachi, MD, Nobuo Tsunooka, MD, Yoshitsugu Nakamura, MD, Shinji Takano, MD, Hiroshi Imagawa, MD: Capillary Leakage in Cardiac Surgery with Cardiopulmonary Bypass. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 2004;12:193-197

74. Ichiki T, Jougasaki M, Setoguchi M, Imamura J, Nakashima H, Matsuoka T, Sonoda M, Nakamura K, Minagoe S, Tei C: Cardiotrophin-1 stimulates intercellular adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in human aortic endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Feb;294(2):H750-63. Epub 2007 Nov 30.
75. Bindewald K, Gunduz D, Hartel F et al: Opposite effect of cAMP signaling in endothelial barriers of different origin. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:C1246-1255.
76. van Nieuw Amerongen GP, Musters RJ, Eringa EC, Sipkema P, van Hinsbergh VW. Thrombin-induced endothelial barrier disruption in intact microvessels: role of RhoA/Rho kinase-myosin phosphatase axis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 May;294(5):C1234-41. Epub 2008 Mar 19.
77. Borbiev, Verin, A.D. Birukova, A. Liu, F. Crow, M.T. Garcia, J.G.N.: Role of CaM kinase II and ERK activation in thrombin-induced endothelial cell barrier dysfunction. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* Volume 285, Issue 1 29-1, 1 July 2003, Pages L43-L54
78. Park JH, Lee MY, Heo JS, Han HJ: A potential role of connexin 43 in epidermal growth factor-induced proliferation of mouse embryonic stem cells: involvement of Ca²⁺/PKC, p44/42 and p38 MAPKs pathways. *Cell Prolif*. 2008 Oct;41(5):786-802.
79. Pacheco-Dominguez RL, Palma-Nicolas JP, Lopez E, Lopez-Colome AM: The activation of MEK-ERK1/2 by glutamate receptor-stimulation is involved in the regulation of RPE proliferation and morphologic transformation. *Exp Eye Res* 2008;86:207-219.
80. Kadi A, de Isla N, Lacolley P, Stoltz JF, Menu P.: Potential relation between cytoskeleton reorganization and e-NOS activity in sheared endothelial cells (Effect of rate and time of exposure). *Clin Hemorheol Microcirc*. 2007;37(1-2):131-40.
81. Fyfe AI, Rosenthal A, Gotlieb AI: Immunosuppressive agents and endothelial repair. Prednisolone delays migration and cytoskeletal rearrangement in wounded porcine aortic monolayers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1166-1171.

82. Zhou X, Wen K, Yuan D, Ai L, He P: Calcium influx-dependent differential actions of superoxide and hydrogen peroxide on microvessel permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Apr;296(4):H1096-107. Epub 2009 Feb 6.
83. Zeng Q, Lagunoff D, Masaracchia R, Goeckeler Z, Côté G, Wysolmerski R: Endothelial cell retraction is induced by PAK2 monophosphorylation of myosin II. *J Cell Sci*. 2000 Feb;113 (Pt 3):471-82.
84. Zoetewij JP, Moses AV, Rinderknecht AS, Davis DA, Overwijk WW, Yarchoan R, Orenstein JM, Blauvelt A: Targeted inhibition of calcineurin signaling blocks calcium-dependent reactivation of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *Blood*. 2001 Apr 15;97(8):2374-80
85. Thomale UW, Bender M, Casalis P et al: Tacrolimus depresses local immune cell infiltration but fails to reduce cortical contusion volume in brain-injured rats. *Immunobiology* 2007;212:567-576.
86. Si H, Liu D: Isoflavone genistein protects human vascular endothelial cells against tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis through the p38beta mitogen-activated protein kinase. *Apoptosis*. 2009 Jan;14(1):66-76.
87. Antonova OA, Loktionova SA, Golubeva NV, Romanov YA, Mazurov AV.: Damage and activation of endothelial cells during in vitro hypoxia. *Bull Exp Biol Med*. 2007 Oct;144(4):504-6.
88. Celik, J. B., N. Gormus, S. Okesli, Z. I. Gormus & H. Solak: Methylprednisolone Prevents inflammatory reaction occurring during cardiopulmonary bypass: effects on TNF-alpha, IL-6, IL-8, IL-10. *Perfusion* 2004, 19, 185-91.
89. Penkowa, M., J. Camats, H. Hadberg, A. Quintana, S. Rojas, M. Giralt, A. Molinero, I. L. Campbell & J. Hidalgo: Astrocyte-targeted expression of interleukin-6 protects the central nervous system during neuroglial degeneration induced by 6aminonicotinamide. *J Neurosci Res* 2003, 73, 481-96.
90. Cafferty, W. B., N. J. Gardiner, P. Das, J. Qiu, S. B. McMahon & S. W. Thompson: Conditioning injury-induced spinal axon regeneration fails in interleukin-6 knock-out mice. *J Neurosci* 2004, 24, 4432-43.
91. Schmitt, K. R., C. Kern, F. Berger, O. Ullrich, S. Hendrix & H. Abdul-Khaliq: Methylprednisolone attenuates hypothermia- and rewarming-induced cytotoxicity and IL-6 release in isolated primary astrocytes, neurons and BV-2 microglia cells. *Neurosci Lett* 2006, 404, 309-14.

92. Hauser, G. J., J. Ben-Ari, M. P. Colvin, H. J. Dalton, J. H. Hertzog, M. Bearb, R. A. Hopkins & S. M. Walker: Interleukin-6 levels in serum and lung lavage fluid of children undergoing open heart surgery correlate with postoperative morbidity. *Intensive Care Med* 1998, 24, 481-6.
93. Arons, M. M., A. P. Wheeler, G. R. Bernard, B. W. Christman, J. A. Russell, R. Schein, W. R. Summer, K. P. Steinberg, W. Fulkerson, P. Wright, W. D. Dupont & B. B. Swindell: Effects of ibuprofen on the physiology and survival of hypothermic sepsis. *Ibuprofen in Sepsis Study Group. Crit Care Med* 1999, 27, 699-707.
94. Biswas, A. K., D. A. Bruce, F. H. Sklar, J. L. Bokovoy & J. F. Sommerauer: Treatment of acute traumatic brain injury in children with moderate hypothermia improves intracranial hypertension. *Crit Care Med* 2002, 30, 2742-51.
95. Diestel A, Roessler J, Berger F, Schmitt KR: Hypothermia downregulates inflammation but enhances IL-6 secretion by stimulated endothelial cells. *Cryobiology*. 2008 Dec;57(3):216-22. Epub 2008 Aug 29.
96. Diestel A, Billecke N, Roessler J, Schmitt B, Troeller S, Schwartlander R, Berger F, Sauer IM, Schmitt KR: Methylprednisolone and tacrolimus prevent hypothermia-induced endothelial dysfunction. *J Heart Lung Transplant*. 2009 Jul;28(7):718-24. Epub 2009 May 13.
97. Diestel A, Roessler J, Pohl-Schickinger A, Koster A, Drescher C, Berger F, Schmitt KR: Specific p38 inhibition in stimulated endothelial cells: A possible new anti-inflammatory strategy after hypothermia and rewarming. *Vascul Pharmacol*. 2009 Jul 1.
98. Farstad, M., J. K. Heltne, S. E. Rynning, H. Onarheim, A. Mongstad, F. Eliassen & P. Husby: Can the use of methylprednisolone, vitamin C, or alpha-trinositol prevent cold-induced fluid extravasation during cardiopulmonary bypass in piglets? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004, 127, 525-34.
99. Zimmerman, J. J.: A history of adjunctive glucocorticoid treatment for pediatric sepsis: moving beyond steroid pulp fiction toward evidence-based medicine. *Pediatr Crit Care Med* 2007,
100. Butler, J., V. L. Pathi, R. D. Paton, R. W. Logan, K. J. MacArthur, M. P. Jamieson & J. C. Pollock: Acute-phase responses to cardiopulmonary bypass in children weighing less than 10 kilograms. *Ann Thorac Surg* 1996, 62, 538-42.

101. Yilmaz, M., S. Ener, H. Akalin, K. Sagdic, O. A. Serdar & M. Cengiz: Effect of low-dose methylprednisolone on serum cytokine levels following extracorporeal circulation. *Perfusion* 1999,14, 201-6.
102. Florian, M. & S. Magder: Estrogen decreases TNF-alpha and oxidized LDL induced apoptosis in endothelial cells. *Steroids* 2008, 73, 47-58.18
103. Wu SH, Liao PY, Dong L, Chen ZQ: Signal pathway involved in inhibition by lipoxin A(4) of production of interleukins induced in endothelial cells by lipopolysaccharide. *Inflamm Res.* 2008 Sep;57(9):430-7.
104. Kim JH, Studer RK, Vo NV, Sowa GA, Kang JD: p38 MAPK inhibition selectively mitigates inflammatory mediators and VEGF production in AF cells co-cultured with activated macrophage-like THP-1 cells. *Osteoarthritis Cartilage.* 2009 Jun 24.
105. Badger, A. M., M. N. Cook, M. W. Lark, T. M. Newman-Tarr, B. A. Swift, A. H. Nelson, F. C. Barone & S. Kumar: SB203580 inhibits p38 mitogen-activated protein kinase, nitric oxide production, and inducible nitric oxide synthase in bovine cartilage-derived chondrocytes. *J Immunol* 1998, 161, 467-73.
106. Pietersma, A., B. C. Tilly, M. Gaestel, N. de Jong, J. C. Lee, J. F. Koster & W. Sluiter: p38 mitogen activated protein kinase regulates endothelial VCAM-1 expression at the post-transcriptional level. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 230, 44-8.
107. Trapp A, Weis M: The impact of immunosuppression on endothelial function. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005 Jan;45(1):81-7.
108. Yoon JS, Kim HH, Han JW, Lee Y, Lee JS: Effects of intravenous immunoglobulin and methylprednisolone on human umbilical vein endothelial cells in vitro. *Immunobiology.* 2006;211(5):351-7. Epub 2006 Mar
109. Hetman M, Gozdz A: Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival. *Eur J Biochem.* 2004 Jun;271(11):2050-5.
110. Tuttolomondo A, Di Raimondo D, di Sciacca R, Pinto A, Licata G: Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke. *Curr Pharm Des.* 2008;14(33):3574-89.
111. Cathelin R, Lopez F, Klopp Ch: AGScan: a pluggable microarray image quantification software based on the ImageJ library. *Bioinformatics.* 2007 Jan 15;23(2):247-8. Epub 2006 Nov 8.

112. Caputo M, Bays S, Rogers CA, Pawade A, Parry AJ, Suleiman S, Angelini GD: Randomized comparison between normothermic and hypothermic cardiopulmonary bypass in pediatric open-heart surgery. *Ann Thorac Surg.* 2005 Sep;80(3):982-8.
113. Han PL, Fu QL, Dong JF, Zhang J, Qin YX, Cui Y, Li Q: Effects of open heart surgery under normothermic and hypothermic cardiopulmonary bypass on cytokines and complements. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.* 2003 Dec;23(12):1317-8, 1322.
114. Chauhan S, Gaurishankar R, Choudhary SK, Kumar L, Kumar AS: Normothermic cardiopulmonary bypass & post-operative blood loss. *Indian J Med Res.* 1998 Aug;108:66-70.
115. Santini G, Patrignani P, Sciulli MG, Seta F, Tacconelli S, Panara MR, Ricciotti E, Capone ML, Patrono C: The human pharmacology of monocyte cyclooxygenase 2 inhibition by cortisol and synthetic glucocorticoids. *Clin Pharmacol Ther.* 2001 Nov;70(5):475-83.
116. Schwartlander R, Schmid J, Brandenburg B, Katenz E, Vondran FW, Pless G, Cheng X, Pascher A, Neuhaus P, Sauer IM: Continuously microscopically observed and process-controlled cell culture within the SlideReactor: proof of a new concept for cell characterization. *Tissue Eng.* 2007 Jan;13(1):187-96.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Veröffentlichungen

Publikationen

1. Diestel A, Roessler J, Berger F, Schmitt KR:
Hypothermia downregulates inflammation but enhances IL-6 secretion by stimulated endothelial cells. Cryobiology. 2008 Dec;57(3):216-22. Epub 2008 Aug 29.
2. Diestel A, Billecke N, Roessler J, Schmitt B, Troeller S, Schwartlander R, Berger F, Sauer IM, Schmitt KR:
Methylprednisolone and tacrolimus prevent hypothermia-induced endothelial dysfunction. J Heart Lung Transplant. 2009 Jul;28(7):718-24. Epub 2009 May 13.
3. Diestel A, Roessler J, Pohl-Schickinger A, Koster A, Drescher C, Berger F, Schmitt KR:
Specific p38 inhibition in stimulated endothelial cells: A possible new anti-inflammatory strategy after hypothermia and rewarming. Vascul Pharmacol. 2009 Jul 1.

Vorträge

1. Diestel A, Roessler J, Berger F, Schmitt KR: Moderate hypothermia and methylprednisolone suppress inflammatory response in human endothelial cells: 18th European Student's Conference, 10/07 Berlin, Germany.
Awarded second best presentation during the Pediatrics II Session.

Poster

1. Schmitt KR, Diestel A, Roessler J, Billecke N, Sauer I, Berger F:
FK506 and methylprednisolone reduce inflammation after hypothermia and rewarming in endothelial cells
Posterpräsentation: American society for artificial organs (ASAIO), June 19.-21.2008 San Fransisco, USA
2. Schmitt KR, Diestel A, Roessler J, Berger F:
Effekte von Hypothermie auf humane Endothelzellen (HUVEC)
Posterpräsentation: Neu-Ulm DGPK Jahrestagung, Oktober 2008

3. Diestel A, Roessler J, Spencer-Hänsch C, Berger F, Tröller S, Billecke N, Sauer I.M, Schmitt K.R.L:
Combined treatment of Methylprednisolone and Tacrolimus prevent hypothermia induced gap formation in endothelial cells
Posterpräsentation: 8th International Symposium on endovascular Therapeutics;
Barcelona 7-9.05.09

Erklärung

„Ich, Jörg Rößler, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:
Auswirkungen von tiefer Hypothermie und Wiedererwärmung auf die morphologischen
und funktionellen Eigenschaften von humanen Endothelzellen selbst verfasst und keine
anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige)
Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt
habe.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt vor Allem:

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Felix Berger für die Überlassung des interessanten Themas und die uneingeschränkte Unterstützung des gesamten Projektes.

Frau Dr. med. Katharina Schmitt und Frau Dr. rer. nat. Antje Diestel für ihre erstklassige fachliche Betreuung und ihre große Unterstützung während der gesamten Zeit im Labor und insbesondere bei der Erstellung dieser Arbeit.

Frau Chantel Spencer-Hänsch für ihre gute Einarbeitung in das laborexperimentelle Arbeiten und für ihre Unterstützung und Aufmunterung bei nicht immer einfachen, praktischen Arbeiten im Labor.

Der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Charité Campus Virchow-Klinikums und besonders Frau Dr. Anja Pohl-Schickinger aus der Klinik für Neonatologie des Campus Virchow-Klinikums für die zuverlässige und regelmäßige Bereitstellung sämtlicher Nabelschnüre, die für diese Arbeit verwendet wurden.

Meiner gesamten Familie für ihre uneingeschränkte Unterstützung während meines Studiums und insbesondere im Rahmen dieser Arbeit.

Zum Schluss geht noch ein besonderer Dank an meine Freundin Cornelia, die mich ausnahmslos zu jeder Zeit moralisch und kompetent fachlich in allen Bereichen meiner Promotionsarbeit unterstützt und damit gestärkt hat.