

Aus der Klinik für Angeborene Herzfehler / Kinderkardiologie
des Deutschen Herzzentrums Berlin

DISSERTATION

*„Einfluss von Hypothermie
auf die Inflammationsreaktion nach
kardiopulmonalem Bypass im Säuglingsalter:
Von einer klinischen Studie zurück in die Zellkultur“*

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sonja Wollersheim

aus Langen

Gutachter: 1. PD Dr.med. Katharina R.L. Schmitt
2. Prof. Dr.med. Hashim Abdul-Khaliq
3. Prof. Dr. med. Sven Hendrix

Datum der Promotion: 30.11.2012

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|--|----|
| I. | Abstract | 4 |
| II. | Einleitung und Zielstellung | 5 |
| III. | Methodik | 6 |
| IV. | Ergebnisse und Diskussion | 9 |
| V. | Erklärung über Anteil an Publikationen | 15 |
| VI. | Publikationsliste | 17 |
| VII. | Erklärung über Selbstständigkeit | 19 |
| VIII. | Originalarbeiten | 20 |

I. Abstract

Hintergrund: Der kardiopulmonale Bypass (CPB) induziert besonders bei Neugeborenen und Säuglingen eine prolongierte, systemische Inflammationsreaktion während herzchirurgischer Interventionen. Hypothermie ist das älteste Verfahren zur Organprotektion und dafür bekannt, die durch den CPB entstehende Inflammation zu reduzieren. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde ein *in vitro* Kokulturmodell aus Endothelzellen und Makrophagen in Anlehnung an den CPB entwickelt. In einem nächsten Schritt wurden die Effekte der Hypothermie auf die Inflammationsreaktion dieser Zelltypen mit den Ergebnissen einer pädiatrischen, prospektiv randomisierten Studie verglichen. Ziel war es, ein kliniknahes Zellkulturmodell zu entwickeln, um zukünftig weitere durch den CPB getriggerte Inflammationsmechanismen zu untersuchen. In einem weiteren Zellkulturmodell aus Kardiomyozyten wurde der Einfluss der Hypothermie auf die Inflammationsreaktion und die Kardioprotektion untersucht.

Methoden: Das Kokulturmodell besteht aus humanen umbilikal-venösen Endothelzellen (HUVEC) und Monozyten (THP-1 Zelllinie). Die Zellen wurden mit Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α stimuliert, um die Inflammation durch den CPB zu simulieren. Die Kokultur wurde tiefer Hypothermie (20°C) oder Normothermie (37°C) ausgesetzt. Zur Darstellung der Morphologie und Zelldifferenzierung wurde eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Die Vitalität der Zellen wurde mittels des 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) Assay gemessen. In der prospektiv randomisierten Studie wurden 20 Patienten, die einen chirurgischen Verschluss eines Ventrikelseptumdefekts benötigten, unter normothermen (37°C) oder hypothermen (32°C) Bedingungen operiert. Im Zellkulturmodell und in der klinischen Studie wurden zu zwei vergleichbaren Zeitpunkten die proinflammatorischen Interleukine (IL) IL-6 und IL-8 mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) oder Multiplex Sandwich Immunoassay gemessen. Für Experimente an Kardiomyozyten wurde die kardiomyozytäre Zelllinie H9c2 verwendet. Die Proteinsekretion der phosphorylierten extrazellulär-regulierten Kinase (pERK) 1/2, der Cyclooxygenase-2 (COX-2) und des antiapoptotischen Proteins Akt wurde mittels Western Blot Technik analysiert.

Ergebnisse: In dem Kokulturmodell aus Endothelzellen und Makrophagen zeigte sich ein signifikanter IL-6 und IL-8 Anstieg 2 und 24 Stunden nach Versuchsbeginn. In der klinischen Studie waren die Interleukine ebenfalls direkt nach Abgang vom CPB sowie nach 24 Stunden erhöht. Zwischen der normothermen und der hypothermen Gruppe konnte weder in der Zellkulturstudie noch bei den Patienten ein Unterschied in der Interleukinausschüttung nach 24 Stunden gezeigt werden. Somit ist die Inflammationsreaktion im Kokulturmodell vergleichbar mit dem Interleukinanstieg im Blut der Kinder, die unter Verwendung der Herz-Lungen-Maschine operiert wurden. Interessanterweise zeigten die Kardiomyozyten eine signifikante Reduktion der Inflammation durch pERK 1/2 und COX-2 unter hypothermen Bedingungen.

II. Einleitung und Zielstellung

Verbesserte Frühdiagnostik sowie Fortschritte in der interventionellen Kinderkardiologie und der kongenitalen Herzchirurgie erhöhen die Überlebensrate der Patienten mit angeborenen Herzfehlern und lenken das Interesse auf die Lebensqualität sowie die Morbidität dieser Kinder. Der kardiopulmonale Bypass (CPB) induziert besonders bei Neugeborenen und Säuglingen eine prolongierte, systemische Inflammationsreaktion nach herzchirurgischen Korrekturoperationen. Verschiedene Faktoren wie die große Fremdkörperoberfläche (Schläuche, Reservoir) der Herz-Lungen-Maschine, mögliche Gewebeschäden und ischämische Reperfusionseignisse sowie Temperaturveränderungen beeinflussen diese Inflammationsreaktion. Folglich kann es zu einem Kapillar-Leck-Syndrom, zur Multiorgandysfunktion und zur Verschlechterung des klinischen Zustandes kommen. Diese pathophysiologischen Vorgänge werden unter anderem durch immunologische Zellaktivierung wie endotheliale Dysfunktion und Aktivierung von Makrophagen ausgelöst. Der Anstieg von proinflammatorischen Interleukinen, induziert durch den CPB, spielt hierbei eine zentrale Rolle. Somit ist die prä-, intra- und postoperative Organprotektion von großer Bedeutung. Hypothermie ist die älteste Methode zur Protektion unreifer Organe während Operationen mittels Herz-Lungen-Maschine. Trotz des großen Interesses an der klinischen Anwendung von Hypothermie und Wiedererwärmung sind die zellulären und molekularen Wirkmechanismen nicht vollständig geklärt. Es wurden bereits Monozellkulturmodelle aus Endothelzellen und Monozyten verwendet, um deren Verhalten unter hypothermen Bedingungen zu untersuchen. Da jedoch gerade die komplexe Interaktion dieser beiden Zelltypen zu den durch Hypothermie getriggerten Veränderungen beitragen könnte, ist es wichtig, beide Zellen im Verband zu sehen. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit ein Kokulturmodell aus Endothelzellen und Monozyten mit direktem Zell-Zellkontakt etabliert. Zur Validierung dieses Zellkulturmodells, basierend auf der Interleukinsekretion, wurde eine klinische, prospektiv randomisierte Studie durchgeführt, in die 20 pädiatrische Patienten eingeschlossen wurden, deren Ventrikelseptumverschluss chirurgisch unter hypothermen (32°C) oder normothermen (37°C) Bedingungen erfolgte. Die temperatur- und zeitabhängige Interleukinsekretion des Kokulturmodells wurde mit den Ergebnissen aus der klinischen Studie verglichen. Ziel war es, ein Zellkulturmodell in Analogie zur Klinik zu etablieren, um zukünftig intrazelluläre, durch Interleukine getriggerte Mechanismen zu untersuchen und den Einfluss der Hypothermie besser zu verstehen.

Bei herzchirurgischen Eingriffen mit Einsatz des CPB kommt es intraoperativ am Myokard zur Ischämie, die eine Inflammationsreaktion auslösen kann. Um das Herz vor Ischämie zu schützen, werden heute als wichtigste Methoden die therapeutische Hypothermie und die Administration von Kardioplegielösung eingesetzt. Daher wurde in einem Zellkulturmodell aus Kardiomyozyten die Kardioprotektion und Inflammation nach tiefem hypothermen Herzkreislaufstillstand auf zellulärer Ebene untersucht.

III. Methodik

Kokulturmodell aus Endothelzellen und Monozyten. Die humanen Endothelzellen wurden aus Nabelschnüren gewonnen. Die experimentelle Verwendung wurde von der Ethikkommission (EA2/076/06) der Charité- Universitätsmedizin Berlin genehmigt und ist übereinstimmend mit der Deklaration von Helsinki. Die Präparation der humanen umbilikal-venösen Endothelzellen (HUVEC) erfolgte enzymatisch aus der Nabelschnurvene nach der modifizierten Methode von E.A. Jaffe und M. Gräfe. Für die Experimente wurden die Passagen null bis drei aus mindestens drei verschiedenen Nabelschnüren verwendet, welche mit Monozyten der immortalen leukämischen monozytären Zelllinie THP-1 der American Type Culture Collection kokultiviert wurden. Alle Experimente wurden mit unterschiedlichen Stammkulturen und Passagen durchgeführt. Beide Zelltypen wurden unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Zu Beginn des direkten Kokulturversuchs wurden Monozyten (2×10^5) direkt auf den präkultivierten, adhärennten HUVEC-Zellrasen (2×10^5) gegeben. Zur Simulation der Inflammationsreaktion wurden die Zellen mit Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α (Aktivität 500 U/min) stimuliert. Das dynamische Zeit-Temperatur-Protokoll wurde in Analogie zu herzchirurgischen Interventionen unter Einsatz des CPB bei Neugeborenen und Säuglingen entwickelt (*Abbildung 1A*). Die Zellen wurden direkt nach Versuchsbeginn von 37°C mit Hilfe eines Kühlbrutschranks auf 20°C herabgekühlt, für 20 Minuten bei 20°C belassen und anschließend wiedererwärmt, wobei sie nach zwei Stunden die Ausgangstemperatur von 37°C erreichten. Während der Experimente betrug die Luftfeuchtigkeit 100% und der CO₂-Gehalt lag bei 5%. Das Kokulturmodell wurde zu den Zeitpunkten 0, 2 und 24 Stunden untersucht. Gleichzeitig wurden eine normotherme Versuchsgruppe bei 37°C sowie unstimulierte Zellen kontinuierlich als Kontrolle mitgeführt. Zur Charakterisierung des Kokulturmodells wurden Morphologie, Zelldifferenzierung und Vitalität untersucht. Zusätzlich wurde eine immunhistochemische Kombinationsfärbung des Zytoskeletts beider Zelltypen (CD31), der Nuclei (DAPI) und der Monozyten (CD11b) angefertigt. Diese Präparate wurden anschließend mittels Immunfluoreszenzmikroskopie fotografiert. Die Vitalität der Zellen wurde nach 24 Stunden mittels 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) untersucht. Dieser Test misst die mitochondriale Dehydrogenase-Aktivität und eignet sich somit zur Beurteilung der Zellvitalität. Zur Bestimmung der Interleukinsekretion von IL-6 und IL-8 wurde die Methode des Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assays (ELISA) verwendet. Auch diese Versuche wurden nach dem beschriebenen Zeit-Temperatur-Protokoll (*Abbildung 1A*) durchgeführt. Hierfür wurden Zellkulturüberstände zu den Untersuchungszeitpunkten 0, 2 und 24 Stunden gewonnen und die ELISA Methodik nach standardisierten Herstellerprotokollen durchgeführt. Die Absorption wurde bei 450 nm mit einem Plattenfotometer gemessen. Die Interleukinkonzentrationen (IL-6, IL-8) wurden anschließend unter Zuhilfenahme einer mitgeführten Standardreihe berechnet.

Studiendesign der klinischen Studie. Die pädiatrische, prospektiv randomisierte Studie wurde zwischen Mai 2008 und November 2009 an 20 Patienten mit einem medianen Alter von 8,3

(Spannweite 3,3 – 38,2) Monaten und einem medianen Körpergewicht von 7,3 (Spannweite 5,2 und 11,2) kg durchgeführt. Bei allen Patienten wurde ein Ventrikelseptumdefekt (VSD) mittels Echokardiographie diagnostiziert. Die Randomisierung der beiden Kohorten mit je 10 Patienten erfolgte anhand der klinischen Daten Lebensalter, Körpergewicht, kardiopulmonale Bypasszeit, Aortenklemmzeit und intraoperativ minimal erreichte Körpertemperatur (*Tabelle 1*). Die klinische Studie wurde von der Ethikkommission der Charité- Universitätsmedizin (EA2/082/07) Berlin genehmigt. Eine schriftliche Einverständniserklärung der Eltern lag für jeden Studienteilnehmer vor.

Tabelle 1: Darstellung der klinischen Daten zur Randomisierung der Patientenkohorten.

| Klinische Daten | Hypotherme Gruppe | Normotherme Gruppe |
|----------------------------------|-------------------|--------------------|
| Lebensalter (Monate) | 6,6 (3,3-37,2) | 4,3 (3,3-10,2) |
| Körpergewicht (kg) | 7,5 (5,2-11,7) | 7,1 (5,2-10,3) |
| Kardiopulmonale Bypasszeit (min) | 71,0 (33,0-154,0) | 67,5 (40,0-116,0) |
| Aortenklemmzeit (min) | 46,5 (18,0-98,0) | 44,0 (21,0-86,0) |
| Minimale Körpertemperatur (°C) | 31,8 (30,1-33,5) | 36,1 (34,9-37,0) |

Die Anästhesie und die extrakorporale Unterstützung während des chirurgischen Ventrikelverschlusses erfolgten in beiden Patientenkohorten nach den klinischen Standardbedingungen des Deutschen Herzzentrums Berlin. Während der Anlage des CPB wurden die Patienten entweder auf 32°C gekühlt oder unter normothermen Bedingungen (37°C) belassen. In der hypothermen Gruppe erfolgte die Wiedererwärmung nach Entfernung der Aortenklemme mit einer Geschwindigkeit von 2°C/min. Die Blutprobengewinnung für die nachfolgende Interleukinanalyse erfolgte aus zentralvenösen Kathetern zu folgenden Zeitpunkten: präoperativ, nach Induktion der Allgemeinanästhesie (Probe 1), direkt nach Abgang vom CPB (Probe 2) und 24 Stunden nach Beendigung des CPB (Probe 3) (*Abbildung 1B*). Zwei venöse Blutstropfen wurden hierfür auf eine Filterkarte, die normalerweise für das Neugeborenen-Screening genutzt wird, getropft und bei -80 °C eingefroren. Die Extraktion der Blutstropfen aus der Filterkarte erfolgte unmittelbar vor der Probenanalyse. Die Interleukinkonzentrationen von IL-6 und IL-8 wurde mittels Multiplex Sandwich Immunoassays gemessen und anschließend anhand mitgeführter Standardreihen berechnet. Die statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism 4 und SPSS durchgeführt. Es lag keine Normalverteilung der Daten vor, weshalb nichtparametrische Tests verwendet wurden. Alle Werte sind als Median angegeben. Die Unterschiede der Versuchsgruppen wurde mittels Mann-Whitney U Test berechnet und p-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

Zellkulturmodell aus Kardiomyozyten. Die Untersuchungen der Kardiomyozyten erfolgte an der Zelllinie H9c2 der American Type Culture Collection. Alle Experimente wurden mindestens dreimal mit unterschiedlichen Stammkulturen und Passagen durchgeführt. Die Zellen wurden unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den klinischen

Gegebenheiten wurden die Zellen vor dem Versuchsstart mit Mangelmedium für 24 Stunden synchronisiert. Anschließend durchliefen die Zellen das dynamische Zeit-Temperatur-Protokoll und wurden für 24 Stunden nachbeobachtet. Der oxidative Stress während der Kühlungsphase wurde mit H_2O_2 , einer in Zellkulturexperimenten häufig verwendeten Noxe, simuliert. Die Kardioplegielösung wird klinisch zur Induktion des Herzstillstandes appliziert. Durch den schnellen Wirkungseintritt werden die ATP-Speicher der Kardiomyozyten nicht geleert und somit eine kardioprotektive Wirkung erzielt. Es wurde die im Deutschen Herzzentrum Berlin klinisch verwendete Kirsch-Kardioplegielösung (Procain-haltig) für die Versuche genutzt und ebenfalls in der Kühlungsphase zugegeben (*Abbildung 1C*). Unstimulierte Kardiomyozyten wurden stets als Kontrolle bei $37^\circ C$ mitgeführt.

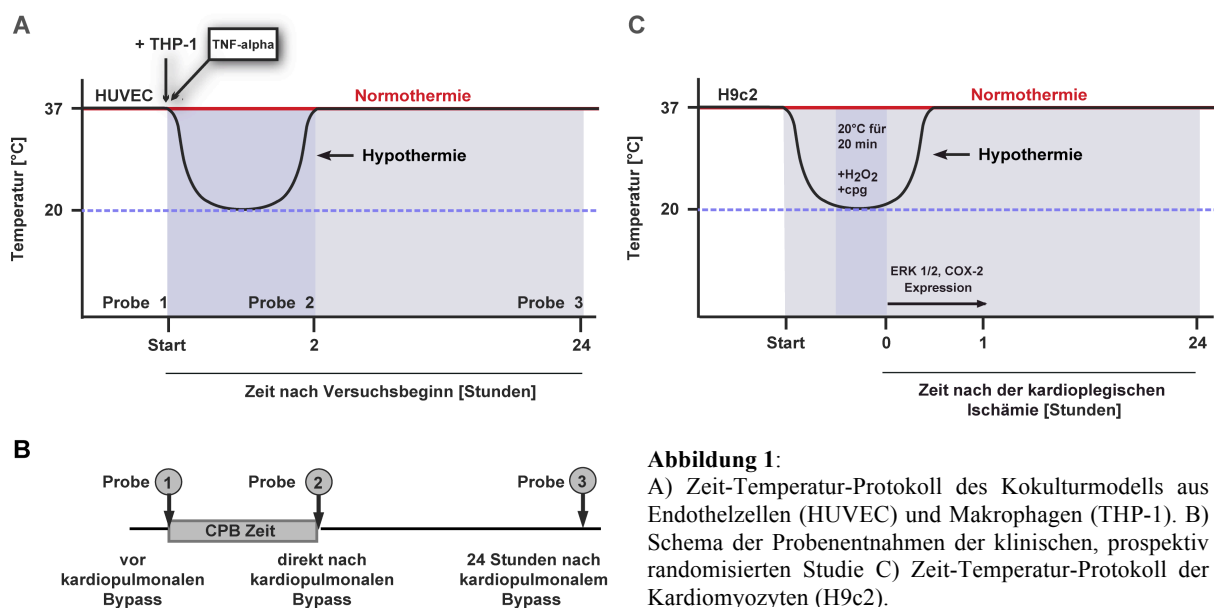


Abbildung 1:

A) Zeit-Temperatur-Protokoll des Kokulturmodells aus Endothelzellen (HUVEC) und Makrophagen (THP-1). B) Schema der Probenentnahmen der klinischen, prospektiv randomisierten Studie C) Zeit-Temperatur-Protokoll der Kardiomyozyten (H9c2).

Zur Untersuchung der Kardioprotektion und Inflammation wurden die Proteinsekretion der phosphorylierten extrazellulär-regulierten Kinase (pERK) 1/2, der Cyclooxygenase (COX-2) und des antiapoptotischen Proteins Akt mittels Western Blot Technik analysiert. Die Proteingewinnung erfolgte 10, 20, 30, 45 und 60 Minuten nach der kardioplegischen Ischämie. Dazu wurden die Stoffwechselprozesse und intrazellulären Signalkaskaden durch eiskaltes PBS abgestoppt, die Zellen mit Medium abgeschabt und die Zellsuspension mehrfach durch Zentrifugation bei 2.000 U/min mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet mit einem Proteinlysispuffer, welcher Proteaseinhibitoren enthielt, behandelt und bei $-80^\circ C$ eingefroren. Die spätere Proteinaufreinigung erfolgte bei $4^\circ C$ durch Resuspendierung sowie Zentrifugation bei 12.000 U/min für 10 Minuten und der Überstand wurde anschließend erneut bei $-80^\circ C$ gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit einem BCA-Protein-Assay gemäß Gebrauchsanweisung durchgeführt, mit einem Plattenfotometer bei 550 nm gemessen und anhand einer mitgeführten Standardreihe berechnet. Zur Auftrennung der Proteine in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Der Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte mit der

Tankblotting-Methode. Mit den entsprechenden Antikörpern wurden die Proteine detektiert und anschließend densitometrisch analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 4. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardfehler angegeben. Die statistische Signifikanz wurde für nicht gepaarte Stichproben mit dem einseitigen Student t-Test ermittelt. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

IV. Ergebnisse und Diskussion

Charakterisierung des Kokulturmodells aus Endothelzellen und Monozyten. Kokulturmodelle sind insbesondere für experimentelle Studien geeignet, welche die Interaktion zwischen verschiedenen Zelltypen zum Ziel haben. Allerdings gibt es wenige Zellkulturmodelle, welche sich der zellulären Interaktion vor dem Hintergrund der Inflammationsreaktion nach kardiopulmonalem Bypass im Kindesalter zuwenden. Das Endothelium wird durch die Inflammationsreaktion aktiviert und interagiert mit dem zellulären Immunsystem. Neben Granulozyten werden besonders Monozyten aktiviert und schütten vermehrt Interleukine aus. Die Interaktionen sind bisher jedoch weitgehend unbekannt. Aus diesem Grund wurde ein Kokulturmodell aus Endothelzellen und Monozyten etabliert. Da im Allgemeinen in endothelialen Zellkulturmodellen TNF- α zur Zellstimulation genutzt wird und darüber hinaus in klinischen Studien gezeigt werden konnte, dass die TNF- α Konzentration bei Patienten nach herzchirurgischen Eingriffen erhöht ist, erfolgte die Stimulation in diesem Kokulturmodell aus Endothelzellen und Monozyten ebenfalls mit TNF- α . Zur Charakterisierung des Kokulturmodells wurde die Vitalität der Zellen nach 24 Stunden untersucht. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (unstimulierte Zellen + 37°C, unstimulierte Zellen + Hypothermie, TNF- α stimulierte Zellen + 37°C, TNF- α stimulierte Zellen + Hypothermie). Die morphologische Untersuchung und Zelldifferenzierung der beiden Zelltypen erfolgte mittels Immunhistochemie (*Abbildung 2*). Die adhärenenten Monozyten (*Abbildung 2b + d*) interagieren direkt mit dem konfluenten Endothelium, was zu einer Aktivierung der Monozyten zu Makrophagen führt.

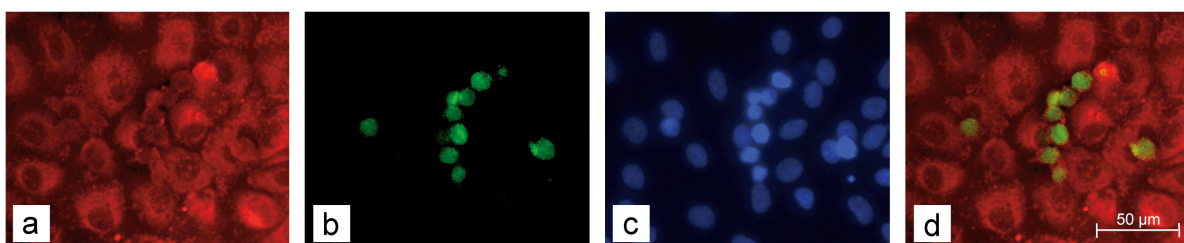


Abbildung 2: (a-d) Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung des Kokulturmodells aus Endothelzellen und Makrophagen. (a) Zytoskelett beider Zelltypen mit CD31 (rot), (b) Makrophagen mit CD11b (grün), (c) Nuclei mit DAPI (blau), (d) Überlagerung von CD31 (rot) und CD11b (grün).

Validierung des Kokulturmodells aus Endothelzellen und Monozyten. Zur Validierung des Kokulturmodells aus Endothelzellen und Monozyten wurden die proinflammatorischen Interleukine IL-6 und IL-8 ausgewählt. Der Anstieg der IL-6 Konzentration korreliert mit einer erhöhten Mortalität

und hämodynamischen Instabilität von pädiatrischen Patienten nach herzchirurgischer Korrekturoperation unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine. Das IL-8 beeinflusst die Chemotaxis sowie die Inflammation im Gewebe und steigt durch die systemische Inflammation durch den CPB an.

Zum Vergleich der Interleukinsekretion im Zellkulturmodell wurde eine pädiatrische, prospektiv randomisierte Studie an 20 Patienten, die einen chirurgischen Verschluss eines Ventrikelseptumdefekts benötigten, durchgeführt. Um die Einflussfaktoren der systemischen Inflammation durch den CPB zu verringern, wurde eine relativ homogene Patientenkohorte mit ähnlicher Behandlung, Operation und Bypasszeit ausgewählt. Es ist bekannt, dass die systemische Inflammationsreaktion nach CPB von der Art des kongenitalen Herzfehlers abhängt. Aus diesem Grund wurden in diese klinische Studie nur Kinder mit der gleichen Diagnose eingeschlossen, um die Unterschiede der Interleukinsekretion zu minimieren.

Die IL-6 und IL-8 Konzentrationen zeigten in der klinischen Studie einen Anstieg direkt nach Beginn des CPB (Probe 2), der sich bis zu 24 Stunden nach Beendigung des CPB (Probe 3) beobachten ließ. (*Abbildung 3 E-F*). Präoperativ (Probe 1) lagen die Messwerte nur etwas oberhalb der minimalen Messgrenze und sind deshalb nicht graphisch dargestellt. Im Kokulturmodell war eine vergleichbare Erhöhung über den gesamten Beobachtungszeitraum von 2 bis 24 Stunden zu verzeichnen. (*Abbildung 3 A-D*). Hier zeigte sich dieser Trend sowohl in den unstimulierten als auch den TNF- α stimulierten Zellen. Die Interleukinkonzentrationen der TNF- α stimulierten Versuchsgruppen lagen zu jedem Zeitpunkt über denen der unstimulierten Versuchsgruppen (*Abbildung 3 A-D*). Die Stimulation mit TNF- α im Kokulturmodell als Simulation einer Inflammationsreaktion wurde somit als erfolgreich bewertet.

Einfluss der Hypothermie auf die klinische Studie und das Kokulturmodell. Der Einfluss der Hypothermie auf die Inflammation wurde in einem weiteren Schritt sowohl in der klinischen Studie als auch dem Kokulturmodell untersucht. Nach 24 Stunden zeigten die IL-6 und IL-8 Konzentrationen keine temperaturabhängigen Unterschiede. Hypothermie wird eine protektive Wirkung bei akuter Entzündungsreaktion zugeschrieben, allerdings sind wenige Daten zur signifikanten Verbesserung durch Anwendung von therapeutischer Hypothermie am CPB bekannt. Zur Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Entzündungsdepression wurde tiefe Hypothermie (20°C) für die Experimente am Kokulturmodell und moderate Hypothermie (32°C) für die klinische Studie ausgewählt. Interessanterweise wurde zwei Stunden nach Versuchsbeginn im Kokulturmodell eine verminderte IL-6 Konzentration in der hypothermen, TNF- α stimulierten Versuchsgruppe beobachtet. Möglicherweise liegt die Ursache hierfür an der niedrigeren Temperatur (20°C). Nach 24 Stunden zeigte die IL-6 Sekretion eine Temperaturunabhängigkeit in beiden Untersuchungsmodellen. Die IL-8 Sekretion der normothermen und hypothermen Versuchsgruppen unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt signifikant voneinander. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die frühe IL-6 Sekretion temperaturabhängig ist, die IL-8 Sekretion jedoch unabhängig von Temperatureinflüssen abläuft.

Einige Limitationen müssen hinsichtlich des *in vitro* Zellkulturmodells zur Untersuchung der systemischen Inflammationsreaktion durch den CPB berücksichtigt werden. Die Inflammation ist ein komplexer Vorgang, der durch verschiedene immunologische und hämostatische Mechanismen beeinflusst wird. Die gewählte TNF- α Stimulation kann somit keine umfassende Simulation der komplexen Vorgänge liefern. Jedoch bietet das gewählte Kokulturmodell die Möglichkeit, die zellulären Mechanismen der einzelnen Zelltypen zu analysieren. In weiteren Studien soll dieses Modell zur Untersuchung von Interleukin-getriggerten, intrazellulären Mechanismen verwendet werden. Neben Monozyten sind auch neutrophile Granulozyten und Erythrozyten in die Initiierung der systemischen Inflammation involviert. Basierend auf den hier vorgestellten Ergebnissen mit einem Kokulturmodell aus lediglich zwei Zelltypen sollen zukünftig komplexere Modelle mit mehreren Zelltypen des Vollblutes sowie Endothelzellen etabliert werden.

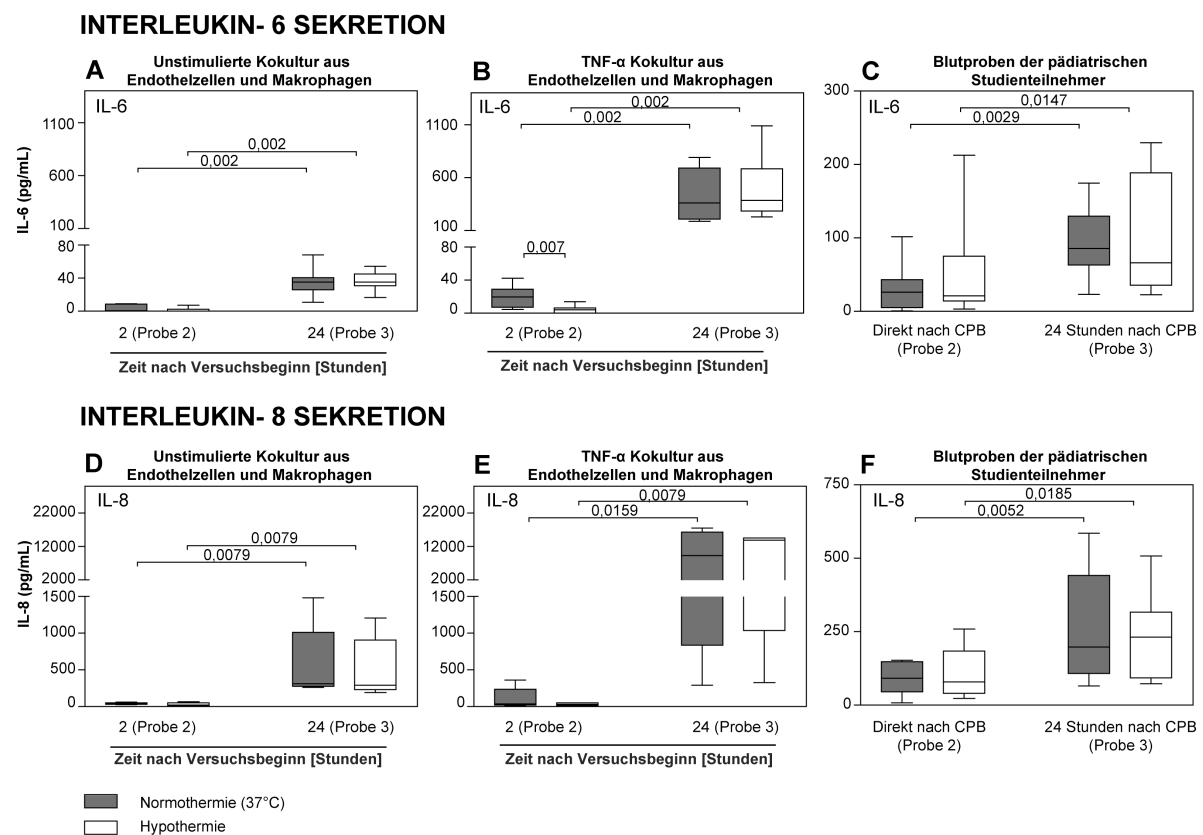


Abbildung 3: Interleukinsekretion (IL-6 und IL8) des Kokulturmodells (A-D) und der Blutproben der Studienteilnehmer (E-F). x-Achse: Untersuchungszeitpunkte, wie in Abbildung 1A + B erläutert. Y-Achse: Interleukinkonzentration in pg/mL dargestellt. P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet. Die oberen drei Graphen zeigen die IL-6 Konzentrationen (A-C), die unteren drei Graphen die IL-8 Konzentrationen (D-F) der unstimulierten Kokultur aus Endothelzellen und Monozyten (A+D), der TNF- α stimulierten Zellen (B+E) und der klinischen Studie (C+F).

Einfluss der Hypothermie auf die Kardiomyozyten. Der Einsatz der Herz-Lungen-Maschine bei Korrekturoperationen von angeborenen Herzfehlern führt neben einer systemischen Inflammationsreaktion auch zu Veränderungen am Myokard. Intraoperativ kommt es nach Anschluss des CPB zum Herzstillstand und zur Unterbrechung der Koronarperfusion. Dies induziert eine Myokardischämie. Nach Beendigung des CPB entsteht ein Ischämie/Reperfusionsschaden durch ein intrazelluläres Überangebot von Sauerstoff, welches über eine vermehrte Bildung von freien

Sauerstoffradikalen zu oxidativem Stress führt. Diese Ereignisse lösen Apoptose und Inflamationsreaktionen aus. Aus diesem Grund werden zur Kardioprotektion die therapeutische Hypothermie eingesetzt und Kardioplegielösung appliziert. Der Einfluss dieser Methoden auf ein ischämisch geschädigtes Herz ist auf zellulärer Ebene nicht vollständig verstanden. Um diese Mechanismen besser zu erklären, wurde ein kardiomyozytäres Zellkulturmodell genutzt. Zur Simulation des Ischämie/Reperfusionsschadens wurden die Kardiomyozyten mit H_2O_2 geschädigt und mit Hypothermie ($20^\circ C$) und Kardioplegie behandelt (*Abbildung 1C*). Die Vitalität der gekühlten Versuchsgruppe war nach kardioplegischer Ischämie im Vergleich zur normothermen Versuchsgruppe deutlich verbessert. Die Reduzierung von Apoptose durch den Einfluss der Hypothermie an H_2O_2 geschädigten Kardiomyozyten wurde bereits in mehreren Studien nachgewiesen. Ein möglicher Schutzmechanismus ist die Aktivierung des antiapoptotischen Akt-Proteins durch Phosphorylierung unter hypothermen Versuchsbedingungen. Die H_2O_2 geschädigten Kardiomyozyten zeigten eine vermehrte Akt-Phosphorylierung unter Hypothermie, was die geringere Apoptoserate erklären könnte. Neben der Bestimmung des Zellüberlebens wurde die Inflamationsreaktion der H_2O_2 geschädigten Kardiomyozyten unter dem Einfluss von Hypothermie und Kardioplegie untersucht. Der CPB induziert eine Vasokonstriktion und führt zu einer Phosphorylierung des Proteins ERK 1/2. Durch die vermehrte Sekretion von phosphoryliertem ERK 1/2 kann unter anderem die Produktion von COX-2 heraufreguliert werden. Dies wiederum führt zu einem Anstieg des Zytokins IL-6. In diesem kardiomyozytären Zellkulturmodell zeigte sich eine verminderte Sekretion dieser Proteine pERK und COX-2 direkt, 10, 20 und 30 Minuten nach der H_2O_2 Schädigung und nach Applikation der Kardioplegielösung (*Abbildung 4*). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Hypothermie nach kardioplegischer Ischämie eine protektive Wirkung auf Vitalität und Inflammation der Kardiomyozyten hat. Dennoch muss an dieser Stelle auf einige Einschränkungen hingewiesen werden, die auch das kardiomyozytäre Zellkulturmodell gegenüber der klinischen Situation aufweist. So können sich die Temperaturverhältnisse von denen unter chirurgischen Bedingungen unterscheiden und auch die Verwendung von H_2O_2 zur Simulation eines hypoxischen Schadens kann selbstverständlich nicht alle vielfältig verknüpften biochemischen und zellulären Mechanismen eines Ischämie/Reperfusionsschadens widerspiegeln. Darüber hinaus ist die klinische Situation rund um kardiochirurgische Korrekturoperationen mit Einsatz der Herz-Lungen-Maschine wesentlich komplexer, als das Zellkulturmodell es wiedergeben kann. Die klinische Gesamtsituation des Patienten und die Wechselwirkung von Faktoren wie Alter und Schwere der Grunderkrankung, Operationsdauer und weitere Vorerkrankungen beeinflussen maßgeblich den postoperativen Verlauf und die zellulären Effekte. Dennoch ist das kardiomyozytäre Zellkulturmodell ein anerkanntes Modell, das gut zur Untersuchung der intrazellulären Signalkaskaden geeignet ist.

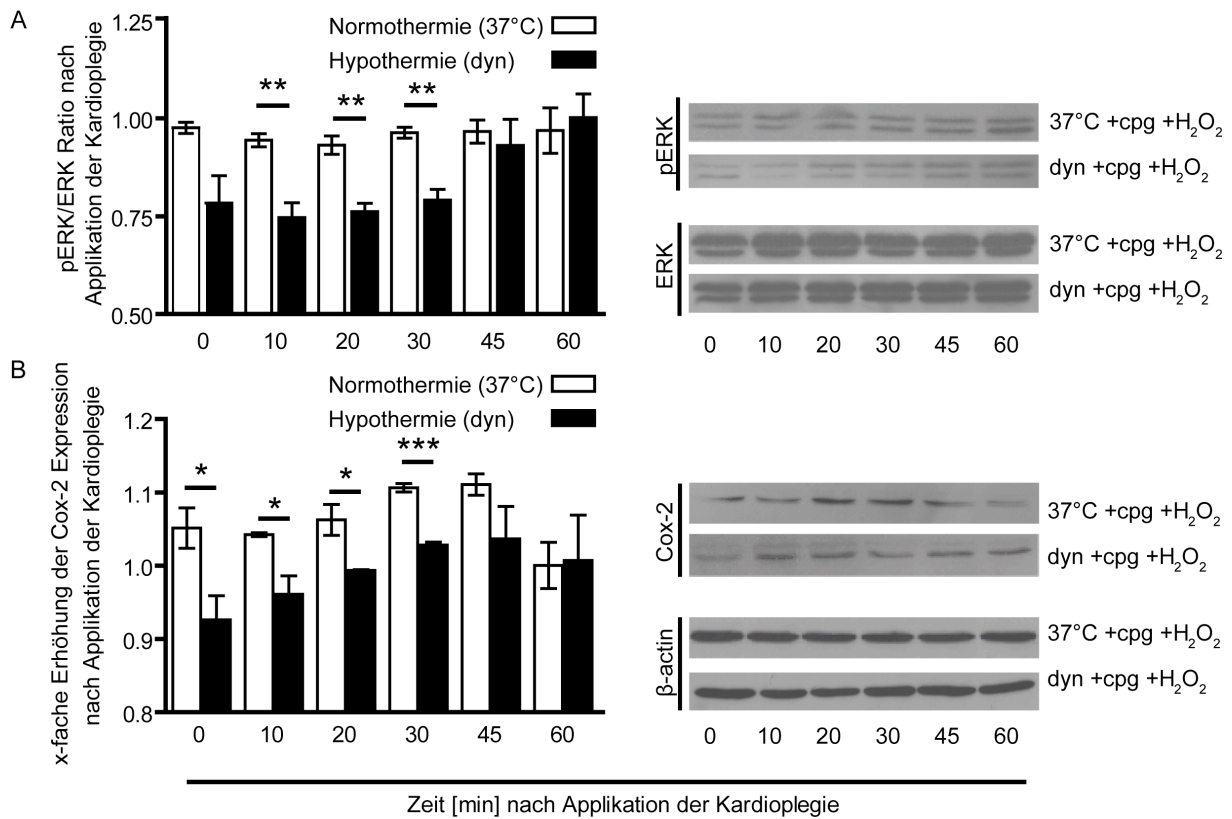


Abbildung 4: (A) Densitometrie (links) und Western Blot Analyse (rechts) der ERK 1/2 Phosphorylierung bis 60 min nach kardioplegischer Ischämie. Die hypotherme Versuchsgruppe zeigte eine verminderte Phosphorylierung von ERK 1/2 innerhalb der ersten 30 min. (B) Densitometrie (links) und Western Blot Analyse (rechts) der COX-2 Ausschüttung bis 60 min nach kardioplegischer Ischämie. Die hypotherme Versuchsgruppe zeigte eine verminderte COX-2 Sekretion innerhalb der ersten 30 min. p-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet. Balkendiagramm: Mittelwert +/- Standardabweichung der geschädigten Zellen bei unterschiedlichen Temperaturen. cpg: Kardioplegie. 37°C: normotherme Zellen + H₂O₂ Schädigung + cpg. dyn: gekühlte und wiedererwärmte Zellen + H₂O₂ Schädigung + cpg.

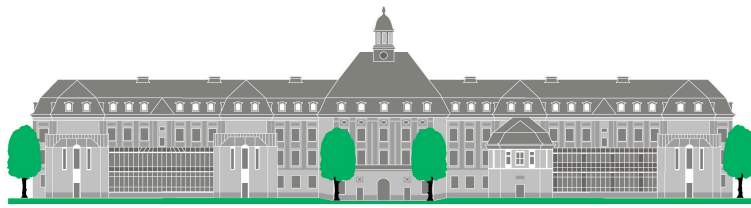
Zusammenfassung. Die Ziele dieser experimentellen Studie konnten entsprechend der Planung erreicht werden. Der Einsatz der Herz-Lungen-Maschine nach Korrekturoperation von angeborenen Herzfehlern beeinflusst den menschlichen Körper auf vielfältige Art und Weise. Das Verständnis der Protektion durch Hypothermie wurde vor zwei verschiedenen klinischen Hintergründen untersucht.

Die Etablierung eines Kokulturmodells aus Endothelzellen und Monozyten wurde anhand einer pädiatrischen, prospektiv randomisierten Studie validiert. Es kann zukünftig zur Erforschung intrazellulärer Mechanismen der systemischen Inflammation eingesetzt werden. Hierbei zeigte sich nach 24 Stunden keine veränderte Zytokinausschüttung durch die therapeutische Hypothermie.

Das Zellkulturmodell aus Kardiomyozyten wurde zum besseren Verständnis des Ischämie/Reperfusionsschadens und der Effekte therapeutischer Hypothermie und Kardioplegie verwendet. In diesem *in vitro* Modell zeigte Hypothermie einen deutlichen protektiven Effekt hinsichtlich Vitalität und Inflammation.

Die ersten Ergebnisse des Kokulturmodells konnten auf dem 44th Annual Meeting of the Association for European Paediatric Cardiology (AEPC) in Innsbruck 2010 (Wollersheim S et al.: *Deep hypothermia prevents inflammation but leads to cellular stress in a co-culture model of endothelial cells and macrophages.*), dem XXXVIIth Annual Meeting of the European Society for Artificial Organs (ESAO) in Skopje (Wollersheim S et al.: *Deep hypothermia leads to cellular stress and endothelial dysfunction in a co-culture model of endothelial cells and macrophages.*), dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie (DGPK) in Weimar, 2010 (Wollersheim S et al.: *Deep hypothermia leads to cellular stress and endothelial dysfunction in a co-culture model of endothelial cells and macrophages.*) und im Rahmen des 45th Annual Meeting of the Association for European Paediatric Cardiology (AEPC) in Granada 2011 (Wollersheim S et al.: *A co-culture model that simulates cardiopulmonary bypass induced systemic inflammation: From bench to bedside.*) vorgestellt werden. Die ersten Versuche des Kokulturmodells wurden im Jahr 2011 zur Veröffentlichung akzeptiert (Wollersheim S, Fedarava K, Huebler M, Berger F, Miera O, Schmitt KR: *Establishment of a co-culture model for studying inflammation after pediatric cardio-pulmonary bypass: From bench to bedside*; Journal of Interferon and Cytokine Research 2012 Apr 27; als Epub veröffentlicht).

Die Ergebnisse der Untersuchungen des kardiomyozytären Zellkulturmodells konnten 2009 auf dem 3rd International Hypothermia Symposium in Lundt (Drescher et al.: *Hypothermia protects cardiomyocytes from H₂O₂ induced oxidative stress*) und 2010 auf dem XXXVIIth Annual Meeting of the European Society for Artificial Organs (ESAO) in Skopje (Drescher et al.: *Cardioplegia reduces hypothermia induced cardioprotective Mechanisms*) präsentiert werden. Ein weiterer Artikel wurde im European Journal of Cardio- Thoracic Surgery 2011 veröffentlicht (Drescher C, Diestel A, Wollersheim S, Berger F, Schmitt KR: *How does hypothermia protect cardiomyocytes during cardioplegic ischemia?* 40(2):352-9).



DEUTSCHES HERZZENTRUM BERLIN

STIFTUNG DES BÜRGERLICHEN RECHTS

Deutsches Herzzentrum Berlin, Postfach 6505 05, 13305 Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. R. Hetzer (hetzer@dhzb.de)
Herz, Thorax- und Gefäßchirurgie

An die
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Virchow – Klinikum
Promotionskommission
Augustenburger Platz 1
13353 Berlin

Prof. Dr. E. Fleck (fleck@dhzb.de)
Innere Medizin-Kardiologie

Prof. Dr. H. Kuppe (kuppe@dhzb.de)
Anästhesiologie

Prof. Dr. F. Berger (berger@dhzb.de)
Angeborene Herzfehler-Kinderkardiologie

Berlin, den 28.03.2012

Durchwahl: +49 30/4593-2800

Erklärung über den Anteil an den Publikationen

Frau Sonja Wollersheim hatte folgenden Anteil an den eingereichten Publikationen:

Publikation 1: Wollersheim S, Fedarava K, Huebler M, Berger F, Miera O*, Schmitt KR*. *Establishment of a co-culture model for studying inflammation after pediatric cardio-pulmonary bypass: From bench to bedside*. Journal of Interferon and Cytokine Research 2011; im Druck. *contributed equally to this work

85 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Präparation der humanen umbilikal venösen Nabelschnüre zur Gewinnung von Endothelzellen, Ansatz und Betreuung von Endothelzellen, Kultivierung der monozytären Zelllinie THP-1, Durchführung der Experimente anhand des Zeit-Temperatur-Protokolls, Probeentnahmen für biochemische Analysen, immunhistochemische Färbung, fluoreszenzmikroskopische Begutachtung, Durchführung eines Vitalitätstests (MTT-Test), Bestimmung der Interleukinkonzentrationen mittels ELISA, Auswertung der klinischen Daten, Erstellen der Graphiken und Tabellen, Durchführung der statistischen Auswertung, Schreiben und Einreichen des Papers, Antwort auf die Fragen der Reviewer, Revision und Wiedereinreichen, Korrespondenz mit den Editoren bis zur Veröffentlichung.

Publikation 2: Drescher C*, Diestel A*, [Wollersheim S](#), [Berger F](#), [Schmitt KR](#). *How does hypothermia protect cardiomyocytes during cardioplegic ischemia?* European Journal of Cardio–Thoracic Surgery 2011;40(2):352-9. *contributed equally to this work

30 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Ansatz und Betreuung der kardiomyozytären Zelllinie H9c2, Probeentnahmen für biochemische Analysen, lichtmikroskopische Begutachtung, Proteinbestimmung mittels Western Blot Technik, Durchführung der statistischen Auswertung, Erstellen der Graphiken und Tabellen, Schreiben und Einreichen des Papers.

Publikation 3: Billecke N, Raschzok N, Rohn S, Morgul MH, Schwartlander R, Mogl M, [Wollersheim S](#), Schmitt KR*, Sauer IM*. *Continuous and process-controlled cell cultivation within the SlideObserver - an operational concept for cinemicrography of cells in mono- and co-culture.* Journal of Biotechnology 2012; als Epub veröffentlicht. *contributed equally to this work

10 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Präparation der humanen umbilikal venösen Nabelschnüre zur Gewinnung von Endothelzellen, Ansatz und Betreuung von Endothelzellen, Kultivierung der monozytären Zelllinie THP-1, Überarbeitung und Korrekturlesen des Manuskripts.

PD Dr. K.R. Schmitt

S. Wollersheim

VI. Publikationsliste

Publikationen

- **Wollersheim S**, Fedarava K, Huebler M, Berger F, Miera O*, Schmitt KR*. *Establishment of a co-culture model for studying inflammation after pediatric cardiopulmonary bypass: From bench to bedside.* Journal of Interferon and Cytokine Research 2012; als Epub veröffentlicht. (Impact Factor: 2,576 im Jahr 2011)
- Drescher C*, Diestel A*, **Wollersheim S**, Berger F, Schmitt KR. *How does hypothermia protect cardiomyocytes during cardioplegic ischemia?* European Journal of Cardio-Thoracic Surgery 2011 Aug;40(2):352-9. Epub 2011 Jan 15. (Impact Factor: 2,293 im Jahr 2011)
- Billecke N, Raschzok N, Rohn S, Morgul MH, Schwartlander R, Mogl M, **Wollersheim S**, Schmitt KR*, Sauer IM*. *Continuous and process-controlled cell cultivation within the SlideObserver - an operational concept for cinemicrography of cells in mono- and co-culture.* Journal of Biotechnology 2012 May 31;159(1-2):83-9. Epub 2012 Feb 10. (Impact Factor: 2,970 im Jahr 2011)

*contributed equally

Kongressbeiträge

- 45th Annual Meeting of the Association for European Paediatric Cardiology (AEPC), Granada, Spanien, 2011:
 - A co-culture model that simulates cardiopulmonary bypass induced systemic inflammation: From bench to bedside.* **Wollersheim S**, Miera O, Fedarava K, Berger F, Schmitt KR. (Poster)
 - Hypothermia suppresses inflammation via NFκB and pSTAT3 signalling pathway in stimulated microglial cells.* Krauss A, **Wollersheim S**, Soltani P, Tong G, Berger F, Schmitt KR. (Vortrag)
- 9th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen, Deutschland, 2011:
 - Deep hypothermia induces morphological changes and decreases IL-6 and MCP-1 releases in LPS stimulated BV-2 microglia cells.* Krauss A, **Wollersheim S**, Soltani P, Tong G, Berger F, Schmitt KR. (Poster)
- Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie (DGPK), Weimar, 2010:
 - Deep hypothermia leads to cellular stress and endothelial dysfunction in a co-culture model of endothelial cells and macrophages.* **Wollersheim S**, Drescher C, Soltani P, Berger F, Schmitt KR. (Vortrag)
- XXXVIIth Annual Meeting of the European Society for Artificial Organs (ESAO), Skopje, Mazedonien, 2010:
 - Deep hypothermia leads to cellular stress and endothelial dysfunction in a co-culture model of endothelial cells and macrophages.* **Wollersheim S**, Drescher C, Soltani P, Berger F, Schmitt KR. (Vortrag)
 - Cardioplegia reduces hypothermia- induced cardioprotective mechanisms.* Drescher C, **Wollersheim S**, Soltani P, Berger F, Schmitt KR. (Poster)

- Is mild hypothermia (34°C) cool enough to protect cardiomyocytes from ischemic injury?*
Soltani P, **Wollersheim S**, Drescher C, Berger F, Schmitt KR. (Poster)
- 44th Annual Meeting of the Association for European Paediatric Cardiology (AEPC), Innsbruck, Österreich, 2010:
Deep hypothermia prevents inflammation but leads to cellular stress in a coculture model of endothelial cells and macrophages. **Wollersheim S**, Diestel A, Berger F, Schmitt KR. (Poster)
 - 3rd International Hypothermia Symposium Lundt, Schweden, 2009:
Hypothermia induces reversible morphological changes in neurons.
Troeller S, Diestel A, Sauer IM, Billecke N, Drescher C, **Wollersheim S**, Berger F, Schmitt KR. (Poster)
Hypothermia protects cardiomyocytes from H₂O₂ induced oxidative stress. Drescher C, Troeller S, **Wollersheim S**, Diestel A, Berger F, Schmitt KR. (Poster)

VII. Erklärung über Selbstständigkeit

„Ich, Sonja Wollersheim, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: *„Einfluss von Hypothermie auf die Inflammationsreaktion nach kardiopulmonalem Bypass im Säuglingsalter: Von einer klinischen Studie zurück in die Zellkultur“* selbst verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 30.11.2012

Sonja Wollersheim

VIII. Originalarbeiten

Wollersheim S, Fedarava K, Huebler M, Berger F, Miera O*, Schmitt KR*.

Establishment of a co-culture model for studying inflammation after pediatric cardiopulmonary bypass: From bench to bedside.

J Interferon Cytokine Res. 2012 Apr 27; als Epub veröffentlicht.

Drescher C*, Diestel A*, Wollersheim S, Berger F, Schmitt KR.

How does hypothermia protect cardiomyocytes during cardioplegic ischemia?

Eur J Cardiothorac Surg. Aug;40(2):352-9. Epub 2011 Jan 15.

Billecke N, Raschok N, Rohn S, Morgul MH, Schwartlander R, Mogl M, Wollersheim S, Schmitt KR*, Sauer IM*.

Continuous and process-controlled cell cultivation within the SlideObserver - an operational concept for cinemicrography of cells in mono- and co-culture.

J Biotechnol. 2012 May 31;159(1-2):83-9. Epub 2012 Feb 10.

*contributed equally to this work