

Deutsches Herzzentrum Berlin

**Klinik für Kinderkardiologie und angeborene
Herzfehler**

DISSERTATION

Neuroprotektion durch tiefe Hypothermie im neonatalen Hirngewebe

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charite- Universitätsmedizin Berlin

von Claudia Kern
aus Frankfurt/Oder, Deutschland

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H. Abdul - Khaliq
 2. Prof. Dr. med. K. Brockmeier
 3. Prof. Dr. med. L. Gortner

Datum der Promotion: 22.02.2008

1	<u>EINLEITUNG</u>	10
1.1	ZEREBRALE KOMPLIKATIONEN IN DER KINDERHERZCHIRURGIE	10
1.2	EINFLUSS DER HYPOTHERMIE	11
1.3	INFLAMMATORISCHE SCHÄDIGUNG DES HIRNGEWEBES	12
1.4	AUSGEWÄHLTE MEDIATOREN DER NEUROINFLAMMATION	14
1.4.1	IL-6	14
1.4.2	STICKSTOFFMONOXID	15
1.5	PROTEIN S-100B	15
1.6	KLINISCHE UND EXPERIMENTELLE ANWENDUNG DER STEROIDE	17
1.7	ZIELSTELLUNG	19
2	<u>MATERIALIEN</u>	20
2.1	CHEMIKALIEN	20
2.2	PROTEINE, ENZYME, ANTIKÖRPER, MEDIKAMENTE	21
2.3	ZELLKULTUR	21
2.4	ORGANOTYPISCHE HIPPOCAMPAL SCHNITTKULTUREN	22
2.5	SONSTIGE STOFFE UND MATERIALIEN	22
2.6	GERÄTE	23
3	<u>METHODEN</u>	24
3.1	ZEIT-TEMPERATUR-PROTOKOLL	24
3.2	KONTINUIERLICHE ÜBERWACHUNG DES SÄURE-BASE-HAUSHALTES	25
3.3	DIE ZELLKULTUREN	26
3.3.1	KULTIVIERUNG VON BV-2 MIKROGLIAZELLEN	26
3.3.2	PRÄPARATION UND KULTIVIERUNG PRIMÄRER NEURONE	27
3.3.3	ISOLIERUNG UND KULTIVIERUNG PRIMÄRER ASTROZYTEN	28
3.4	MESSUNGEN ZUR AXONALEN DICHTEN AUF HIPPOCAMPALEN SCHNITTKULTUREN	29
3.4.1	AUSWERTUNG DER AXONALEN DICHTEN	30
3.5	UNTERSUCHUNGEN ZUR NEURONALEN ZELLSCHÄDIGUNG AUF OHSK	31
3.5.1	PRÄPARATION ORGANOTYPISCHER HIPPOCAMPALER SCHNITTKULTUREN	31
3.5.2	INDUKTION DER EXZITOTOXISCHEN SCHÄDIGUNG MIT NMDA	32

3.5.3	UNTERSUCHUNGEN ZUM NEURONALEN ZELLSCHÄDIGUNG DURCH NMDA	32
3.6	VERSUCHE AM ZELLKULTURMODELL	33
3.6.1	ZELLZAHLBESTIMMUNG	33
3.6.2	VITALITÄTSTEST	33
3.6.3	ELISA	34
3.6.4	GRIESS - ASSAY	34
3.7	STATISTISCHE METHODEN	34
4	ERGEBNISSE	35
<hr/>		
4.1	HYPOTHERMIE VS. NORMOTHERMIE	35
4.1.1	ZYTOTOXIDITÄT	35
4.1.2	IL-6 FREISETZUNG	37
4.1.3	NO FREISETZUNG BEI DYNAMISCHEN TEMPRATURVERÄNDERUNGEN	39
4.2	EINFLUSS DES S100B AUF DIE ZELLKULTUREN UNTER HYPOTHERMIE	40
4.2.1	ZYTOTOXIDITÄT	40
4.2.2	EINFLUß DER HYPOTHERMIE AUF DIE IL-6 FREISETZUNG WÄHREND DYNAMISCHER TEMPERATURVERÄNDERUNGEN	42
4.2.3	NO FREISETZUNG	45
4.3	EINFLUSS VON METHYLPREDNISOLON IM ZELLKULTURMODELL	46
4.3.1	ZYTOTOXIDITÄT	46
4.3.2	EINFLUß DER METHYLPREDNISOLONGABE AUF DIE IL-6 FREISETZUNG	48
4.4	UNTERSUCHUNGEN IN HIPPOKAMPALEN SCHNITTKULTUREN	53
4.4.1	IL-6 FREISETZUNG	54
4.4.2	UNTERSUCHUNG ZUM NEURONALEN ZELLTOD IN OHSK	56
4.4.3	AXONALE AUSSPROSSUNG AM HIRNSCHNITT	61
5	DISKUSSION	64
<hr/>		
5.1	EINFLUSS DER TIEFEN HYPOTHERMIE	65
5.2	EINFLUSS VON S100B WÄHREND DER HYPOTHERMIE	66
5.3	EINFLUSS DER BEHANDLUNG MIT MP WÄHREND DER HYPOTHERMIE	69
5.4	UNTERSUCHUNGEN IM ZELLVERBAND AM MODELL DER OHSK	71
5.5	ZUSAMMENFASSUNG	74

Zusammenfassung

Die großen Fortschritte in der Senkung der Mortalitätsraten während kardiochirurgischer Eingriffe bei Kindern, haben die Aufmerksamkeit auf die Morbidität gelenkt. Neurologische Komplikationen nach solchen Operationen im Kindesalter sind auf Grund ihrer Konsequenzen bei den Überlebenden solcher Operationen von enormer Bedeutung. Tiefe Hypothermie ist eine gängige Methode zur Protektion neuronaler Schäden. Die genauen Mechanismen auf zellulärer Ebene sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss dynamischer Temperaturveränderungen an primären neuronalen und glialen Zellen sowie an Hirnschnitten in vivo zu untersuchen. Dazu wurden die Zellen nach einem Protokoll, das am Temperaturverlauf eines kardiochirurgischen Eingriffes orientiert ist, gekühlt: 2 Stunden Kühlung bei 17 °C und langsame Wiedererwärmung auf 37 °C. Bei allen Zellen wurden die LDH-Rate sowie die Freisetzung des proinflammatorischen IL-6 gemessen. In den Hirnschnitten wurde das neuronale Überleben nach NMDA-Schädigung ausgewertet. Das astrogliale Protein S100B wird mit neuronalen Schäden nach kardiochirurgischen Eingriffen in Verbindung gebracht, in dieser Arbeit wurden die Zellreihen mit S100B behandelt und die Veränderung der Interleukinfreisetzung gemessen. Eine andere bedeutende Methode zur Neuroprotektion ist der Einsatz von Steroiden vor und während der operativen Eingriffe. Aus diesem Grund wurde ebenfalls der Einfluss der Gabe von Methylprednisolon (MP) auf die Zellen vor Kühlung und Wiedererwärmung untersucht. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass tiefe Hypothermie die Freisetzung von IL-6 induziert, was durch die Applikation von MP unterdrückt wird. In Hirnschnitten, also im Zellverband, zeigte sich, dass sowohl tiefe Hypothermie als auch MP-Gabe den neuronalen Zelltod verringern.

Schlagwörter: IL-6, Hypothermie, S100B, Neuroprotektion

Abstract

The mortality rate of children with congenital heart disease has been significantly reduced during the last decade due to substantial progress in diagnostics and cardiac surgery. However, neurological complications are serious risk factors for the long-term development of children after corrective surgery. Deep hypothermia is a standard method for neuroprotection during cardiac surgery in children. However, the cellular mechanisms of neuroprotection have not been clearly established. The aim of this study was to investigate the impact of dynamic temperature changes mimicking temperature variation during cardiopulmonary bypass in vivo on neonatal primary astrocytes, BV-2 microglial cells and primary neurons as well as organotypic neonatal brain slice cultures. Primary astrocytes, BV-2 microglial cells, primary neurons and OSCs were treated according to a hypothermia protocol used during cardiac surgery in children: deep hypothermia (2h at 17 °C, phase 1), slow rewarming (2h up to 37 °C, phase 2), normothermia (20h at 37 °C, phase 3). In all brain cells LDH release (cytotoxicity) and the release of the pro-inflammatory cytokine IL-6 were investigated. In brain slices neuronal survival after NMDA-damage was quantified by propidium iodide staining. In OSCs, axonal outgrowth modulation as well as axonal attraction or repulsion were analyzed microscopically. S100B is related to cerebral damage after cardiac surgery, it is produced by astrocytes and known as stimulator for IL-6 release in neuronal cells. Therefore the cells were pretreated with S100B and the IL-6 levels were detected. Another major method for neuroprotection during CPB is the administration of steroids before and during corrective surgery. Therefore, we have investigated the impact of methylprednisolone (MP) administration. In conclusion deep hypothermia induces the secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-6 by astrocytes, microglial cells and neurons, which is suppressed by MP application. Furthermore, deep hypothermia and MP suppress NMDA-induced excitotoxicity in neonatal brain slices.

Keywords: IL-6, hypothermia, S100B, neuroprotection

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
CPB	Cardio-Pulmonaler Bypass
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FKS	Fetales Kälberserum
GFAP	Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein
HBSS	Hanks` balanced salts solution
HLM	Herz-Lungen-Maschine
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthetase
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysacharid
MEM	Modified EageL Medium
MP	Methylprednisolon
NBM	Neurobasalmedium
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
OHSK	Organotypische Hippokampale Schnittkulturen
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TNF	Tumornekrosefaktor
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: ZEIT-TEMPERATUR-PROTOKOLL	24
ABBILDUNG 2: PARATREND-SONDE UND MONITOR	25
ABBILDUNG 3: DARSTELLUNG DER VERWENDETEN ZELLINIEN	26
ABBILDUNG 4: AUSWERTUNG DES AXONALEN AUSWACHSENS AN OHSK	30
ABBILDUNG 5: ZELLTODRATE IN PROZENT BEI ASTROZYTEN NACH 2 H TIEFER HYPOTHERMIE	36
ABBILDUNG 6: ZELLTODRATE IN PROZENT BEI BV-2 MIKROGLIA NACH 2 H TIEFER HYPOTHERMIE	36
ABBILDUNG 7: LDH-FREISETZUNG BEI NEURONEN NACH 2 H TIEFER HYPOTHERMIE	37
ABBILDUNG 8: IL-6 FREISETZUNG BEI DYNAMISCHER TEMPERATURVERÄNDERUNG	38
ABBILDUNG 9: NO FREISETZUNG WÄHREND DYNAMISCHER TEMPERATURVERÄNDERUNG	39
ABBILDUNG 10: S100B REDUZIERT DIE DURCH HYPOTHERMIE INDUZIERTER IL-6 FREISETZUNG BEI BV-2-ZELLEN	42
ABBILDUNG 11: DURCH S100B REDUZIERTER IL-6 FREISETZUNG BEI PRIMÄREN NEURONEN	43
ABBILDUNG 12: S100B STIMULIERT DIE IL-6 FREISETZUNG BEI ASTROZYTEN IN DER WIEDERERWÄRMUNGSPHASE	44
ABBILDUNG 13: S100B INDUZIERTER IL-6 FREISETZUNG UNTER NORMOTHERMIE BEI PRIMÄREN ASTROZYTEN	44
ABBILDUNG 14: EINFLUSS VON S100B AUF DIE NO FREISETZUNG BEI GLIAZELLEN	45
ABBILDUNG 15: IL-6 FREISETZUNG NACH MP GABE BEI ASTROZYTEN UNTER HYPOTHERMIE	48
ABBILDUNG 16: IL-6 FREISETZUNG NACH MP GABE BEI ASTROZYTEN UNTER NORMOTHERMIE	49
ABBILDUNG 17: IL-6 FREISETZUNG NACH MP GABE BEI BV-2 MIKROGLIAZELLEN WÄHREND DYNAMISCHER TEMPERATURVERÄNDERUNGEN	50
ABBILDUNG 18: IL-6 FREISETZUNG NACH MP-GABE BEI BV-2 MIKROGLIAZELLEN UNTER NORMOTHERMIE	51
ABBILDUNG 19: IL-6 FREISETZUNG NACH MP GABE BEI PRIMÄREN NEURONEN WÄHREND DYNAMISCHER TEMPERATURVERÄNDERUNGEN	52
ABBILDUNG 20: IL-6 FREISETZUNG NACH MP GABE BEI PRIMÄREN NEURONEN	52
ABBILDUNG 21: REGIONEN DES HIPPOCAMPUS (QUERSCHNITT)	53
ABBILDUNG 22: REDUKTION DER IL-6 FREISETZUNG IN OHSK	54

ABBILDUNG 23: IL-6 FREISETZUNG AN OHSK BEI S100B APPLIKATION	55
ABBILDUNG 24: IL-6 FREISETZUNG IN OHSK NACH MP-GABE	55
ABBILDUNG 25: REDUKTION DES NEURONALEN ZELLTODES IN DER CA1 REGION	57
ABBILDUNG 26: PI-GEFÄRBTE HIRNSCHNITTKULTUREN NACH TIEFER HYPOTHERMIE	58
ABBILDUNG 27: NEURONALER ZELLTOD IN DER CA1 REGION DES HIPPOKAMPUS UNTER DYNAMISCHEN TEMPERATURVERÄNDERUNGEN UND S100B GABE	59
ABBILDUNG 28: NEURONALER ZELLTOD NACH APPLIKATION VON S100B IN OHSK	59
ABBILDUNG 29: PHOTOS PI-GEFÄRBTER CA1 REGIONEN NACH MP APPLIKATION	60
ABBILDUNG 30: PI-POSITIVE ZELLEN DER CA1 REGION NACH MP-GABE	61
ABBILDUNG 31: AXONALES AUSWACHSEN AN OHSK	62
ABBILDUNG 32: AXONALES AUSSPROSSEN NACH APPLIKATION VON S100B BZW. MP	63

1 Einleitung

1.1 Zerebrale Komplikationen in der Kinderherzchirurgie

Die großen Fortschritte auf dem Gebiet der Frühdiagnostik und Therapie angeborener Herzfehler haben zu einer signifikanten Senkung der Mortalitätsraten während und nach kardiochirurgischen Eingriffen bei Kindern geführt. Die Aufmerksamkeit wird aber zunehmend auf die Morbidität nach Korrekturoperationen solcher Herzfehler gelenkt. Neurologische Komplikationen nach solchen Operationen im Kindesalter sind auf Grund ihrer Konsequenzen von enormer Bedeutung. In einer Vielzahl von Studien werden die Häufigkeit und Pathogenese neurologischer Komplikationen nach Operationen bei angeborenen Herzfehlern beschrieben ⁽¹⁻⁴⁾. Mehrere klinische Studien konnten signifikante Einschränkungen in der psychomotorischen, mentalen und neurologischen Entwicklung dieser Kinder aufzeigen ⁽¹⁻⁴⁾. Insbesondere die Operationen, die unter Kreislaufstillstand und tiefer Hypothermie durchgeführt wurden, stellen ein ernst zu nehmendes Entwicklungsrisiko dar. Dies trifft vor allem auf Kinder mit schweren angeborenen Vitien, wie dem hypoplastischen Linksherzsyndrom ⁽⁵⁾ und der Transposition der großen Arterien zu ^(4,6), da diese Kinder bereits in der Neugeborenen-Periode unter tiefhypothermem Herz-Kreislaufstillstand operiert werden. Der zugrunde liegende Pathomechanismus der Schädigung im ZNS im Zusammenhang mit diesen Operationen scheint multifaktoriell zu sein. Während neurologische Komplikationen vorrangig mit intraoperativen Ereignissen verbunden sind, könnten aber auch perioperative Faktoren eine Rolle spielen ⁽⁷⁾. Intraoperativ werden ischämische und embolische Komplikationen als Ursachen diskutiert ⁽⁷⁾. Der Kreislaufstillstand unter tiefer Hypothermie stellt ein besonderes Risiko dar ^(8,9). Auf molekularer Ebene werden inflammatorische Kaskaden aktiviert, der Ionenhaushalt gestört, spezielle Mediatoren und Adhäsionsmoleküle experimentiert und freie Sauerstoffradikale und NO freigesetzt ⁽⁷⁾. Diese Kaskade von biochemischen und histopathologischen Ereignissen, verursacht durch Hypothermie, Ischämie, Reperfusion können über mehrere Tage oder Wochen anhalten und in einem histopathologischen Substrat resultieren⁽⁴⁾. Aber auch die besondere Situation des sich in der Entwicklung befindlichen unreifen ZNS von Neugeborenen könnte zur Pathologie beitragen.

1.2 Einfluss der Hypothermie

Hypothermie ist das älteste und bedeutendste Verfahren zur Neuroprotektion während kardiochirurgischer Operationen. Der positiv therapeutische Effekt einer solchen Behandlung nach ischämischem Hirninfarkt wurde erstmals 1959 beschrieben⁽¹⁰⁾. Hypothermie ist definiert als Senkung der Körpertemperatur unter 36° C. Man unterscheidet milde Hypothermie mit einer Temperatur von 35° bis 30° C, moderate Hypothermie mit Temperaturen von 29° bis 25° C und tiefe Hypothermie mit Temperaturen unter 25° C. Man unterscheidet je nach Anwendung die therapeutische Hypothermie, z. B. nach ischämischen Schlaganfällen oder bei Neugeborenen-Asphyxie und die prophylaktische Hypothermie, z. B. die Anwendung bei nicht pulsatiler low-flow Perfusion wie sie in der Herzchirurgie der Fall ist⁽¹¹⁾. Die tiefe Hypothermie ermöglicht die Induktion des Herzkreislaufstillstands zur Korrektur angeborener Malformationen am Herzen sowie den herznahen Gefäßen. Die Wirkungsweise der Hypothermie ist unspezifisch und multifokal. Pathophysiologisch führt die Hypothermie zu einer Senkung der metabolischen Rate und damit zu einer erhöhten ischämischen Toleranz. In zahlreichen experimentellen Studien an verschiedenen Tiermodellen konnte nachgewiesen werden, dass neurologische Schäden unter milder und moderater Hypothermie verringert werden können⁽¹²⁻¹⁴⁾. Es ist erwiesen, dass Hypothermie den Zellstoffwechsel reduziert⁽¹¹⁾, so sinkt zum Beispiel die Stoffwechselrate bei einer Temperatur von 18° C auf 10 % im Vergleich zur Rate bei 37° C. Dieser Mechanismus kann nicht allein für eine neuroprotektive Wirkung verantwortlich sein, da eine pharmakologisch induzierte Erniedrigung der metabolischen Rate von Sauerstoff nicht zu einer vergleichbaren ischämischen Toleranz führte⁽¹⁵⁾. Der Sauerstoffbedarf und Energiemetabolismus des Hirngewebes insbesondere in ischämischen Arealen wird unter hypothermen Bedingungen gesenkt⁽¹⁶⁾. Milde Hypothermie führt zur Reduktion von exzitatorischen Aminosäuren, Laktat und anderen Stoffwechselprodukten⁽¹⁷⁾. Eine bedeutende Rolle spielt hierbei das Glutamat. Glutamat ist ein Neurotransmitter und zugleich ein neurotoxisches Protein und kommt in den Nervenendigungen in millimolarer Konzentration vor. Sein extrazelluläres Vorkommen ist an eine Wiederaufnahme gebunden, die Ischämie führt dabei zu einer Erhöhung der extrazellulären Konzentration und einer Verschlechterung der Wiederaufnahme. Extrazelluläre Konzentrationen im mikromolaren Bereich sind neurotoxisch und führen über eine

NMDA-Rezeptor-Aktivierung und einen Calcium-Einstrom zu einem nekrotischen Zelltod. Im Gegensatz dazu konnten Bissonnette et al. zeigen, dass tiefe Hypothermie zu einem Anstieg von Glutamat mit sekundärem neuronalen Schaden führt⁽¹⁸⁾. Des Weiteren reduziert Hypothermie die ATP-Depletion in der Zelle^(19,20). Durch hypotherme Behandlung werden immunologische Reaktionen beeinflusst. Während der Kühlung ist die Komplement-Aktivierung und die zelluläre Antwort der Granulozyten deutlich abgeschwächt. In der Wiedererwärmungsphase jedoch zeigte sich eine verstärkte zelluläre Antwort der Granulozyten und eine globale Entzündungsreaktion^(21,22). Trotz all der Möglichkeiten, die sich durch die Anwendung der tiefen Hypothermie⁽¹⁸⁾ in der Herzchirurgie eröffnen, bleibt die abnorme Senkung der Körpertemperatur für längere Zeit eine nicht physiologische Situation. In klinischen Langzeitstudien konnte gezeigt werden, dass neurologische Affektionen nach CPB und tiefhypothermen Kreislaufstillstand ernst zu nehmende Komplikationen sind. Die psychomotorische und neurologische Entwicklung der operierten Kinder ist stark verzögert^(1,2,23). In diesen Studien zeigte sich ein Zusammenhang zwischen Dauer des Herz-Kreislaufstillstandes, der Tiefe der Hypothermie und den psychomotorischen Defiziten der Kinder. So bleibt weiter unklar, inwieweit sich protektive und schädigende Mechanismen der Hypothermie gegenseitig beeinflussen und wie groß die Risiken der Langzeitwirkungen eines solchen Eingriffes sind.

1.3 Inflammatorische Schädigung des Hirngewebes

Entzündungsreaktionen dienen dem Körper als Schutz gegen innere und äußere Angriffe. Das Ziel einer solchen Reaktion ist es, den Körper in Abwehrbereitschaft zu versetzen, die Immunantwort zu steigern und so die Integrität der Zellen wiederherzustellen. So soll der Zerstörung von Gewebe entgegengewirkt werden und Reparaturprozesse durch das Immunsystem initiiert werden. Im Allgemeinen zeigen Entzündungsreaktionen einen akuten Verlauf und kommen innerhalb einiger Tage oder weniger Wochen zum Stillstand. Chronische Entzündungen treten dann auf, wenn das schädigende Reagenz nicht eliminiert werden kann oder sich die Immunantwort gegen körpereigene Strukturen wendet.

Das ZNS galt lange als immunprivilegierte Region. Zum einen, weil es kein lymphatisches System innerhalb des Gehirns gibt, wobei Arachnoidea und Virchow-

Robin-Raum eine Ausnahme bilden, zum anderen durch das Vorhandensein der Blut-Hirn-Schranke. Beim Menschen wird die Blut-Hirn-Schranke von Astrozytenfortsätzen, den Endothelzellen der Kapillaren und der Basalmembran gebildet. Da diese Endothelzellen im Gegensatz zu Kapillarendothelien anderer Organe kaum transzelluläre Poren besitzen, schotten sie das Lumen gegen das Interstitium des Gehirns ab. Lipidlösliche Stoffe können durch diese Besonderheit ins Interstitium diffundieren, während Metabolite wie Glucose und manche Aminosäuren mit Transportproteinen ins Innere geschleust werden müssen. Serumbestandteile, Antikörper und immunkompetente Zellen aus der Peripherie haben nur einen extrem eingeschränkten Zutritt zum Hirngewebe ^(24,25). Im ZNS ist es von enormer Bedeutung, die Immunantwort so gering wie möglich ausfallen zu lassen, da bereits geringe Schädigungen weitreichende Auswirkungen haben können und die Möglichkeiten der neuronalen Regeneration sehr begrenzt sind. Trotz aller Schutzmaßnahmen können im ZNS inflammatorische Reaktionen beobachtet werden. Nach akuter neuronaler Schädigung beginnt eine Kaskade von Ereignissen, die zum neuronalen Zelltod führen kann. Als auslösende Faktoren kommen dabei Störungen in der Ionenverteilung und der Verlust des Membranpotentials in Frage ^(26,27). Durch den neuronalen Zelltod werden wiederum verschiedene Mediatoren, wie Nukleoside, Zytokine, Glutamat und Kalzium in den extrazellulären Raum freigesetzt. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung der immunkompetenten Zellen des Gehirns, der Mikroglia. Diese aktivierten Mikrogliazellen migrieren zu den geschädigten Gebieten ⁽²⁸⁻³⁰⁾. Durch die Produktion von Zytokinen ⁽³¹⁾, Chemokinen ⁽³²⁾, Adhäsionsmolekülen ⁽³³⁾, Sauerstoffradikalen ⁽³⁴⁾ und Stickstoffoxid ⁽³⁵⁾ greifen aktivierte Mikrogliazellen in alle Phasen der Neuroinflammation ein. Infolge der Freisetzung dieser zahlreichen Mediatoren entsteht zeitlich versetzt eine sekundäre Neuro- und Astrozytendegeneration im geschädigten Gebiet. Dieser Funktionsausfall resultiert einerseits aus der schlechten Regenerationsfähigkeit der Neurone und andererseits aus der Produktion zytotoxischer Komponenten der infiltrierenden Immunzellen ⁽³⁶⁻³⁸⁾. Der Verlauf einer Neuroinflammation ist immer von dem auslösenden Reiz, der Anzahl aktivierter Mikrogliazellen, Anzahl und Art anderer involvierter Zellen, sowie der Art des Gewebes abhängig ⁽³⁹⁾. Therapeutische Maßnahmen konzentrieren sich auf die Stimulation der Regeneration ^(40,41) und auf die Neuroprotektion initial überlebender Neurone, indem die Immunantwort unterdrückt wird ^(38,42). Die Rolle der Inflammation in Zusammenhang mit Kühlung und Wiedererwärmung ist wenig

untersucht. Während kardiochirurgischer Eingriffe kommt es unter den extremen Temperaturveränderungen möglicherweise zu Zellsignalveränderungen. Aus diesem Grund ist vor allem die grundlegende Untersuchung von inflammatorischen Kaskaden erforderlich.

1.4 Ausgewählte Mediatoren der Neuroinflammation

1.4.1 IL-6

In der angeborenen und der erworbenen Immunantwort spielen Zytokine eine Schlüsselrolle. Im Rahmen einer Immunantwort werden im ZNS Zytokine vor allem von Mikrogliazellen, aber auch von Astrozyten und Neuronen gebildet. Die mikrogliale und astrozytäre Immunantwort führt vorrangig zu einer Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF-alpha und IL-1 und des immunregulatorischen Zytokines IL-6. Das Interleukin-6 wird im ZNS vorrangig von Astrozyten und Mikroglia produziert ⁽⁴³⁾. Des Weiteren sind Neurone im Rahmen der Immunantwort befähigt, IL-6 zu produzieren ⁽⁴⁴⁾. Auffällig ist die Pluripotenz des Zytokins, denn es ist an vielen biologischen Prozessen beteiligt, wie z. B. als Induktor von Akute Phase Proteinen, als Differenzierungs- und Wachstumsfaktor im Blutbildungs- und Nervensystem. Im Zentralnervensystem ist IL-6 an einer Vielzahl von Funktionen destruktiver, aber auch protektiver Art beteiligt. In einer Vielzahl von in vivo und in vitro Studien konnte die Beteiligung von IL-6 beim Schutz von Neuronen, an der neuronalen Differenzierung und an neuronalem Wachstum gezeigt werden ^(45,46). Loddick et al. konnten zeigen, dass direkt in ein ischämisches Hirnareal injiziertes IL-6 das Ausmaß der Schädigung reduziert ⁽⁴⁷⁾. Jedoch konnten bei neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Alzheimer, Multipler Sklerose sowie inflammatorisch, neurologischen Erkrankungen wie Meningitis erhöhte IL-6 Spiegel im Liquor nachgewiesen werden ⁽⁴⁸⁾. IL-6 beeinflusst die Ausschüttung von neurotrophischen und inflammatorischen Molekülen. Viele Studien konnten zeigen, dass die übermäßige Expression von IL-6 in einer zentralen Produktion inflammatorischer Zytokine resultiert ⁽⁴⁹⁻⁵²⁾. Darüber hinaus wirkt IL-6 als endogenes Pyrogen in der Fieberentstehung ⁽⁵³⁾. Es konnte im ZNS gezeigt werden, dass die intraventrikuläre Injektion von Lipopolysacchariden zu einer erhöhten Ausschüttung von IL-6 im Liquor führt ⁽⁵⁴⁾. Andere Aktivatoren der IL-6 Produktion sind TNF-alpha, Prostaglandin E2

und IL-6⁽⁴⁸⁾. Des Weiteren können Neurotransmitter wie Serotonin, Adenosin und „second Messenger,, zu einer Überexpression von IL- 6 führen. Hervorzuheben ist, dass bei viralen Erkrankungen die IL-6 Konzentrationen im Liquor ansteigen. Dies konnte bereits für das Masernvirus, HIV und Hepatitis nachgewiesen werden. Die genauen Wirkmechanismen des IL-6 bei inflammatorischen Reaktionen im ZNS sind vielfältig und noch nicht genau erforscht.

1.4.2 Stickstoffmonoxid

Mikrogliazellen und Astrozyten verfügen im Rahmen der Immunantwort über die Möglichkeit, auf direktem Weg zytotoxische Agenzien freizusetzen, darunter die bereits erwähnten Zytokine (Kapitel 1.5.1), radikale Sauerstoffspezies, Stickstoffradikale, Glutamat und Stickstoffmonoxid. Bei neuroinflammatorischen Vorgängen steigt die Oxidationproduktion durch aktivierte Mikrogliazellen an. Dieser als „Oxidative Burst,, bezeichnete Vorgang dient dazu, Infektionsherde zu bekämpfen und aufzulösen. Stickstoffmonoxid (NO) zählt zu den bedeutenden Mediatoren bei entzündlichen und neurodegenerativen Prozessen im Gehirn. NO wird enzymatisch über Stickstoff-Synthetasen (NO- Synthetasen) im Gehirn gebildet. In Mikrogliazellen und Astrozyten ist die induzierbare NO-Synthetase lokalisiert, die durch Lipopolysaccharide und andere inflammatorische Mediatoren induziert wird. Das instabile NO reagiert sehr schnell zum Superoxidanion-Radikal. Bei dieser Reaktion entsteht Peroxynitrit (ONOO⁻), ein sehr potentes Oxidants, das Proteine zu Nitrotyrosin oxidieren kann. Diese oxidierten Proteine können kumulieren, Entzündungen hervorrufen und schließlich zum neuronalen Zelltod führen^(55,56).

1.5 Protein S-100B

Die S-100-Familie der Calcium-bindenden Proteine enthält mittlerweile 20 verschiedene Proteine mit unterschiedlicher Organexpression, intra- und extrazellulären Funktionen. Das Protein S-100 wurde bereits 1965 von Moore aus Rinderhirn isoliert und erhielt seinen Namen aufgrund seiner Löslichkeit (Solubility) in 100-prozentigem Ammoniumsulfat. Es liegt in drei isomeren Formen in den verschiedensten Organen und Geweben vor. Nach der neuesten Nomenklatur, die vom HUGO-Komitee 2004 veröffentlicht wurde, werden die S100 Proteine mit Hilfe von lateinischen Buchstaben klassifiziert⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾. Die Proteine der S100-Familie sind

strukturell verwandt mit anderen EF-Hand Bindungsproteinen wie Calmodulin, Troponin C und Parvalbumin. Das Dimer S-100B hat ein Molekulargewicht von ca. 21 kDa und ist vor allem im Zentralnervensystem lokalisiert ⁽⁵⁸⁾. Es ist eines der am besten charakterisierten S100 Proteine. Es liegt zum größten Teil intrazellulär in Astrozyten (80 %), sowie extrazellulär, unter physiologischen als auch pathophysiologischen Bedingungen, vor. Dem Protein werden vielfältige Funktionen im Zentralnervensystem zugeschrieben. Es reguliert die intrazelluläre Kalzium-Homeostase ⁽⁵⁹⁾ und stabilisiert das Zytoskelett ⁽⁵⁹⁾. Vor allem extrazelluläre Funktionen sind von entscheidender Bedeutung für das Verständnis der Rolle, die S100B in der Genese neurodegenerativer und neuroregenerativer Prozesse spielt. Diese gegensätzlichen Eigenschaften des Proteins S100B sind abhängig von der Konzentration, in der das Protein im jeweiligen Milieu vorliegt. In pM bis nM Konzentration induziert S100B neuronales Auswachsen ⁽⁶⁰⁾, stimuliert neuronale Proliferation ⁽⁶¹⁾ und zeigt neuroprotektive Effekte nach inflammatorischen Stimuli ⁽⁵⁸⁾. Konzentrationen von S100B im µM Bereich sind neurotoxisch. Studien konnten *in vivo* und *in vitro* zeigen, dass S100B zur Mikrogliaaktivierung führt ⁽⁶²⁻⁶⁴⁾. Es kommt zur Induktion der iNOS und konsekutiv zum neuronalen Zelltod ⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾. Außerdem induziert S100B die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL1B, IL-6 and TNFa ^(68,69). Diese Fähigkeit, inflammatorische Zytokine zu induzieren, hat eine direkte Bedeutung für die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen. Die beschriebene Dualität in der Wirkungsweise des S100B, sowohl reparativ als auch degenerativ, beruht auch auf Messungen von S100B im Blut bzw. Liquor bei Patienten mit verschiedenen neurologischen Affektionen bzw. Verletzungen ⁽⁵⁸⁾. Erhöhte S100B Konzentrationen wurden im Serum und/oder Liquor bei Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen, wie M. Alzheimer, psychiatrischen Erkrankungen, nach Schädel-Hirn-Trauma, sowie Kindern mit Meningitis gefunden ⁽⁷⁰⁾. Ferner konnten bei Patienten nach ischämischen Insulten oder nach kardiochirurgischen Eingriffen erhöhte S100B Konzentrationen im Serum gemessen werden ⁽⁷⁰⁻⁷²⁾. Es wird vermehrt diskutiert, dass S100B ein wichtiger und aussagekräftiger Marker für ein cerebrales Schadensereignis sein könnte. Gemessene Konzentrationen von S100B korrelieren mit dem Ausmaß der Schädigung und haben möglicherweise einen prädiktiven Aussagewert in Bezug auf neurologische Folgeschäden ^(58,73,74). Infolgedessen hat mittlerweile die Messung von S100B bei Neugeborenen mit Verdacht auf Hypoxie Eingang in den klinischen Alltag gefunden.

1.6 Klinische und experimentelle Anwendung der Steroide

Steroide werden in vielen unterschiedlichen medizinischen Fachdisziplinen zur Vorbeugung und Behandlung inflammatorisch bedingter Zellveränderungen, endothelialer Permeabilitätsveränderungen und einer posttraumatischen oder ischämischen Ödembildung angewandt. In der Herzchirurgie werden Steroide vorrangig zur Immunsuppression und bereits seit den sechziger Jahren routinemässig während CPB eingesetzt.

Eine neuroprotektive Wirkung der Steroide wird seit langem vermutet, vor allem im Zusammenhang mit einer ischämisch-entzündlichen Genese der neuronalen Schädigung im zentralen Nervensystem. Experimentelle Studien im Zusammenhang mit kardiochirurgischen Eingriffen konnten die Reduktion inflammatorischer Parameter sowie eine verbesserte regionale zerebrale Perfusion zeigen. Trotzdem wird die Fähigkeit der Steroide zur Prävention einer neuronalen Schädigung und einer zerebralen Ödembildung nach einem traumatischen oder ischämischen Einfluss seit langem kontrovers diskutiert (⁷⁵⁻⁸⁰).

Die pathophysiologischen Grundlagen des Einsatzes von Steroiden zur Neuroprotektion beruhen auf vielfältigen Effekten, wie einem ödemreduzierenden Effekt (⁷⁵), einer antioxidativen, einer antinflammatorischen sowie einer antiexzitatorischen Wirkung (^{81,82}). Hierbei ist vor allem die durch den Einsatz von Steroiden bedingte Reduktion der inflammatorischen Zytokine TNF-alpha, IL-6 und IL-8, sowie die Hemmung der Makrophagenfunktion zu erwähnen (⁸³⁻⁸⁶).

Der Wirkmechanismus der Steroide ist an einen zytosolischen Glukokortikoidrezeptor (GR-I) sowie einen ebenfalls im Zytosol gelagerten Mineralkortikoidrezeptor (GR-II) gebunden. Für diese Rezeptoren sind unterschiedliche zelluläre Wirkungen und unterschiedliche Affinitäten für die einzelnen endogenen und exogenen Steroide beschrieben. Für den GR-I, den klassischen Rezeptor, existieren zwei isomere Formen: Eine alpha und eine beta Form. Nur die alpha Isoform ist in der Lage, durch Bindung von Glukokortikoiden die entsprechende Wirkung zu entfalten. Die beta Form kann nicht mit den Steroiden interagieren und ist als Antagonist der alpha Form bekannt. Der zytosolische Rezeptor ist ein 770 Aminosäuren umfassendes Protein, mit einem Molekulargewicht von 94 kDa.

Der Einsatz von Steroiden in der Herzchirurgie wird zunehmend kontrovers diskutiert (^{87,88}). In einer tierexperimentellen Studie mit tief hypothermen Kreislaufstillstand

zeigte sich, dass die präoperative Gabe von Methylprednisolon zu einer signifikant erhöhten neuronalen Apoptoserate führt, dies vor allem in den besonders vulnerablen Regionen des Hippokampus. In der Literatur wird die Prämedikation mit hochdosierten Steroiden (30 mg/kg Körpergewicht) als antiinflammatorisch und zur möglichen Vermeidung von Hirnödemen nach kardiochirurgischen Eingriffen mit Herz-Lungen-Maschine eingesetzt. Klinische Studien zeigen eine Reduktion der Komplement-Aktivierung während CPB unter einmaliger intravenöser, hochdosierter Steroidtherapie (^{89,87}). Es zeigte sich jedoch kein Unterschied im klinischen Outcome. Im Gegensatz zu dieser Studie zeigten Boscoe et al., dass der Einsatz von Steroiden beim CPB die Komplement-Aktivierung nicht beeinflusst (^{90,91}). Seit kurzem wird auch durch klinische Studien auf eventuelle Nebenwirkungen einer Steroidtherapie hingewiesen, gerade im Bereich der postnatalen Steroidapplikation. Es konnten Störungen der neurologischen Entwicklung und des Verhaltens nach Steroidgabe beobachtet werden. Eine Meta-Analyse aus Kanada zeigte einen direkten Zusammenhang zwischen neurologischen Störungen und postnataler Steroidapplikation (⁹²).

1.7 Zielstellung

In den letzten Jahrzehnten ist der Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie eine unverzichtbare Methode für die operative Korrektur angeborener Herzfehler im Säuglings- und Kleinkindalter geworden. Durch die sich ständig verbessernde Technik und Methodik in Chirurgie und Anästhesie konnte die Mortalität in vielen Zentren auf unter 5 % gesenkt werden. Heute gilt deshalb das Augenmerk verstärkt der Prävention neurologischer und psychomotorischer Komplikationen, die diesen Korrekturoperationen oftmals folgen. In der vorliegenden Arbeit sollen Fragestellungen auf dem Gebiet der Neuroprotektion/Neurodegeneration unter tiefer Hypothermie bearbeitet werden. Ein besonderer Schwerpunkt wurde auf die Rolle der tiefen Hypothermie als inflammatorischer Stimulus im ZNS gelegt. Im Zellkulturmodell und an Hirnschnittkulturen sollen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- 1. Ist tiefe Hypothermie neuroprotektiv?**
- 2. Hemmt tiefe Hypothermie die Gliazellaktivierung?**
- 3. Wie beeinflusst S100B die durch Hypothermie vermittelten Effekte?**
- 4. Unterstützt die Gabe von Methylprednisolon neuroprotektive Effekte?**

2 Materialien

2.1 Chemikalien

β- Mercapthoethanol	Fluka
Millipore H ₂ O	selbst hergestellt
Bromphenolblau	Sigma
Natriumacetat	Fluka
Phosphatpuffer	Sigma
Natriumhydroxid	Sigma
Tris-Acetate	Sigma
Tris-Base	Sigma
Milchpulver	Roth
Lipopolysaccharid (E.coli Serotyp?)	Sigma
Tween 20	Sigma
Isopropanol	Roth
Natriumcitrat	Sigma
Salzsäure	Sigma
Schwefelsäure	Sigma
Griess Reagenz	Fluka
MTT	Sigma
Natriumacetat	Fluka
Bovine Albumine Serum (BSA)	Serva
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva
Methanol	Roth
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Fluka
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Acrylamid	Sigma
Trichloressigsäure	Roth
Temed	Roth
Kaliumchlorid	Fluka
Natriumvanadat	Fluka
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma

Triton X-100	Sigma
Natriumpyrophosphat	Sigma
Glycerolphosphat	Sigma
Leupeptin	Sigma
Kollagen	Sigma

2.2 Proteine, Enzyme, Antikörper, Medikamente

Anti-IL-6 Elisa Kit	Pharmingen
S-100 beta	Calbiochem
IL-6 (rekombinant)	Pharmingen
Methylprednisolon	

2.3 Zellkultur

DMEM-Medium	Gibco
Cytosine Arabinosid	Sigma
Glutamin	Gibco
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom
Haemocytometer	Merck
HBSS (ohne Ca ₂₊ und Mg ²⁺)	Gibco
HBSS (mit Ca ₂₊ und Mg ²⁺)	Gibco
Neurobasalmedium (NBM)	Gibco
Zellkulturflaschen	Nunc
Pasteurpipetten (steril)	Brand
Penicillin	Sigma
Poly-D-Lysin	Sigma
Streptomycin	Sigma
Trypsin	Boeringer
Trypanblau	Sigma

Streptomycin	Sigma
Zellschaber	Biochrom
6-Lochplatten	Nunc
96-Lochplatten	Nunc

2.4 Organotypische hippocampale Schnittkulturen

Präparierbesteck	Aeskulap
Petrischalen (steril 35x10mm)	Becton Dickinson/Falcon
Glucose 20	Braun
MEM 25MM Hepes	Gibco
Natriumbicarbonat	Gibco
Trisbase	Sigma
L-Ascorbinsäure	Sigma
Insulin	Gibco
Pferdeserum (steril)	Gibco
6-Lochplatten	Becton Dickinson/Falcon
Filtermembranen	Becton Dickinson/Falcon
NMDA	Sigma
Propidiumjodid	Sigma

2.5 Sonstige Stoffe und Materialien

BCA-Reagenz	Pierce
ECL-Detektions-Kit	Amersham
ECL-Hyperfilm	Amersham
Kanülen, 0,45 mm	Braun
Blotpapier	Bio-Rad
96-Lochplatten	Nunc
Nitrozellulosemembran	Biorad
Spritzen, 1 ml	Braun

Spritzen, 5 ml

Braun

2.6 Geräte

Binokular	Olympus
Brutschrank für 17-30° C Inkubation	Hereus Instruments
Brutschrank für 35° C Inkubation	Hereus Instruments
Brutschrank für 37° C Inkubationen	Hereus Instruments
Elektrophorese- und Blottingapparaturen	Bio-Rad
Photometer, Ultraspec. 2000	Pharmacia Biotech
Wasserbad	GFL
UV Illuminator	Intas
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf
Schüttler	Eppendorf
Vibratom	Technical Products International
Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop	Olympus
Fluorescence activated cell sorter (Software: CellQuest)	Becton Dickinson
Digitale Kamera (Software: SensiCam 3.0)	Olympus
Plattenreader (ELX 800)	Biotech Instruments
pH-Meter(pH 537)	WTW

3 Methoden

3.1 Zeit-Temperatur-Protokoll

In Anlehnung an das Perfusionsprozedere während kardiochirurgischer Eingriffe mit Hilfe der HLM bei Kindern wurde ein Zeit-Temperatur-Protokoll erstellt. In einem speziellen Inkubator, begast mit 5 % CO₂, an dem kontinuierliche Temperaturveränderungen durchgeführt wurden, wurden die Zellkulturen und die organotypischen Hirnschnitte gekühlt. Das Untersuchungsprotokoll orientierte sich an den realen dynamischen Temperaturveränderungen während herzchirurgischer Operationen bei Kindern.

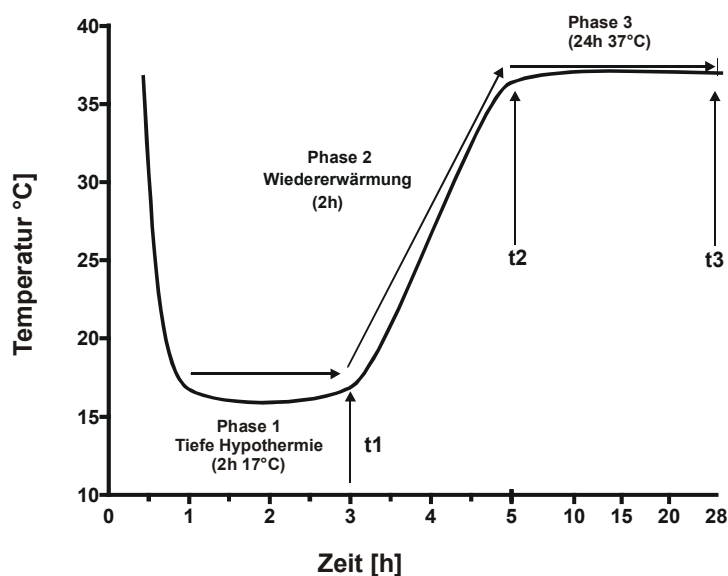


Abbildung 1: Zeit-Temperatur-Protokoll

Das Zeit-Temperatur-Protokoll simuliert die *in vivo* Temperatursituation, die während kardiochirurgischer Eingriffe mit CPB angewendet wird. Die Zellkulturen bzw. die OHSK werden in einem speziellen Brutschrank untergebracht, der verschiedene dynamische Temperaturveränderungen zulässt. Die Zellen werden zu drei Zeitpunkten untersucht. Am Ende von Phase 1 (2 h 17° C) werden die Zellen zum Zeitpunkt t1 untersucht. Am Ende von Phase 2 (Wiedererwärmung auf 37° C) werden die Zellen wieder untersucht (t2). Nach weiteren 24 h Normothermie bei 37° C (Phase 3) werden die Zellen abschließend zum Zeitpunkt t3 untersucht. Die jeweiligen Kontrollen, die den gesamten Versuchszeitraum bei 37° C belassen wurden, werden zu den gleichen Zeitpunkten entnommen.

Die Reihenfolge der Temperaturveränderung ist wie folgt: Beginn mit Normothermie für 2 h, schnelle Kühlung ($3^{\circ}\text{C}/\text{min}$) bis auf 17°C , 120 min tiefe Hypothermie (17°C), gefolgt von einer Wiederwärmungsphase ($3.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$) bis 37°C und nachfolgend 24 h Normothermie (37°C). Während des gesamten Versuchsablaufes wurden im Zellmedium mit Hilfe einer Paratrend-Sonde (siehe unten) der Säure-Base-Haushalt und die Temperatur in einer extra für diesen Versuch hergestellten Zellkulturvorrichtung kontinuierlich gemessen. Die Daten wurden digital erfasst und ausgewertet. Zu festgelegten Zeitpunkten wurde die Expression von Aktivitätsmarkern (IL-6, NO, LDH) gemessen (Abb. 1).

3.2 Kontinuierliche Überwachung des Säure-Base-Haushaltes

Mit einer Paratrend-Sonde ist eine kontinuierliche Messung von Blutgaswerten bei Patienten auf Intensivstationen möglich. Durch intravasale Lage ist eine ständige Überwachung physiologischer Vitalparameter möglich. Das Gerät ist in der Lage, Sauerstoffsättigung, Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalt, pH-Wert sowie Temperatur im Medium zu messen. Die Daten wurden an einen Trendcare-Monitor weitergeleitet und im Patientenmodul gespeichert. Für jede Versuchsreihe wurde eine Sonde kalibriert und in einem Gefäß mit frischem Medium platziert. Es konnten der Verlauf der Temperatur über die Zeit, sowie der pH-Wert des Mediums kontinuierlich überwacht werden und so vergleichbare Versuchsbedingungen sichergestellt werden (Abb. 2).



Abbildung 2: Paratrend-Sonde und Monitor

Mit Hilfe der Sonde konnten in Mediumproben kontinuierlich der Verlauf der Temperatur und der pH-Wert gemessen werden.

3.3 Die Zellkulturen

Die Zellkulturexperimente mit primären Zellen (primäre Astrozyten, primäre Neurone) und die mikrogliale Zelllinie (BV-2 Zellen) stellen ein geeignetes Einzelzellkultursystem dar, um komplexe zelluläre Vorgänge und Regulationsmechanismen zu betrachten. Diese Versuche in der Einzelzellkultur wurden durch Versuche am Modell der organotypischen hippocampalen Schnittkultur ergänzt. Dadurch konnte die funktionelle Bedeutung des Zellverbandes herausgearbeitet werden.

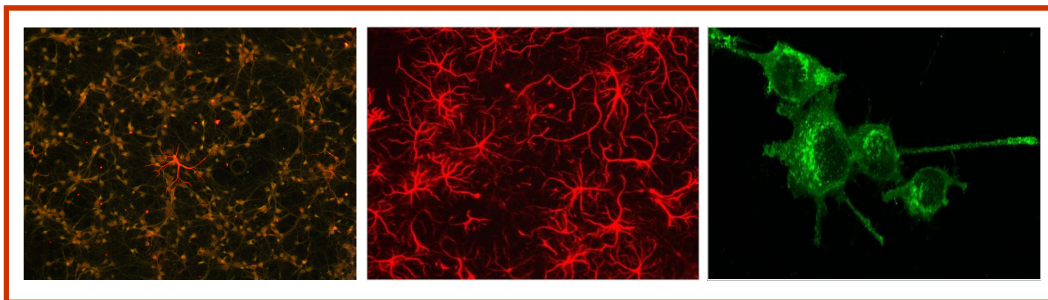


Abbildung 3: Darstellung der verwendeten Zelllinien

Von links nach rechts sind dargestellt: Primäre Neurone; primäre Astrozyten in GFAP-Färbung; sowie BV-2 Mikrogliazellen

3.3.1 Kultivierung von BV-2 Mikrogliazellen

BV-2 Zellen wurden 1990 durch die Infektion primärer muriner Mikroglia mit einem v-raf/v-myc onkogen tragenden Retrovirus (J2) von Blasi et al. (⁹³) generiert. Sie sind deshalb gut als Modellsystem für in vitro Studien geeignet, da ihre morphologischen, immunphänotypischen und biochemischen Eigenschaften mit denen primärer Mikroglia vergleichbar sind (⁹⁴). BV-2 Zellen zeigen nach ihrer Aktivierung, ähnlich primärer Mikroglia, eine amöboide Morphologie. Des Weiteren exprimieren sie typische mikrogliale Marker wie proinflammatorische Zytokine IL-6, TNF alpha, MHC-II- Moleküle, die Protease Cathepsin B und CD 40.

Die Zellen wurden in DMEM bei 37° C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Bei Konfluenz wurden die adhären wachsenden Zellen mit einem sterilen Zellschaber vom Boden der Kulturflasche gelöst, gezählt und für die Versuche in Konzentrationen von $1 \cdot 10^3$ Zellen/ml ausgesät bzw. verdünnt weiterkultiviert.

Kulturmedium für	DMEM mit 3,7 g/l NaHCO ₃ ; 4,5 g/L D- Glucose
BV-2 Zellen	10 % FCS (hitzeinaktiviert); 1 % L-Glutamin
	100 U/ml Penicillin; 0,1 mg/ml Streptomycin

3.3.2 Präparation und Kultivierung primärer Neurone

Primärzellen sind Zellen, die frisch aus dem Gewebe isoliert werden und unter Kulturbedingungen nur eine begrenzte Lebensdauer erreichen. Primärzellen werden bei vielen Fragestellungen oft etablierten Zelllinien vorgezogen, da gezeigt werden konnte, dass Primärzellen auch unter *in vitro* Bedingungen die Aktivitäten und Funktionen ihrer physiologischen Umgebung widerspiegeln. Die primären, neuronalen Zellkulturen wurden aus den Großhirnrinden (Kortex) von C57BL6 Mäusen am Embryonaltag E15 präpariert. Das Mäuseweibchen wurde durch Genickbruch getötet und das Fell mit 70 % Ethanol desinfiziert. Der Bauchraum der Maus wurde eröffnet und der Uterus mit den Embryonen entnommen und in eine sterile Petrischale mit gekühltem Ca²⁺- und Mg²⁺-freien HBSS überführt. Alle weiteren Schritte wurden unter sterilen Bedingungen und auf Eis durchgeführt. Die Embryonen wurden aus dem Uterus entnommen, dekapitiert und unter dem Mikroskop wurde das Gehirn durch Öffnen des Schädels entlang der Fontanelle vom Genick bis zu den Augenhöhlen entnommen. Die Hirnhäute wurden entfernt, die Kortexhälften wurden abgetrennt und der Rest verworfen. Nachfolgend wurden die Kortexhälften dreimal mit Ca²⁺- und Mg²⁺-freien HBSS in 15 ml Falcon Tubes gespült und 5 min bei 37° C mit Trypsin (2,5 %) inkubiert. Anschließend wurde das Trypsin mit FCS neutralisiert und wiederum dreimal mit HBSS gespült, anschließend wurde dreimal mit NBM gespült.

Das gesamte Gewebe wurde mit einer Glaspasteurpipette in diesem Medium vorsichtig homogenisiert. Danach wurde das Homogenisat mit NBM resuspendiert und in mit Poly-D-Lysin beschichtete Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen ausgesät. Bei 37° C und 5 % CO₂ wurden die primären Zellen im Brutschrank kultiviert.

24 h vor Versuchsbeginn (am 5. Tag nach der Präparation) wurde das Medium komplett erneuert, diesmal wurde NBM mit B 27 Supplement ohne Antioxidantien verwendet.

Präparationsmedium:	HBSS (Hanks` balanced salts solution) mit Ca^{2+} und Mg^{2+}
Dissoziationsmedium:	HBSS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}
Kulturmedium zur Anzucht:	NBM (Neurobasalmedium); 1 % L-Glutamin, 2 % B27 Supplement mit Antioxidanz, 100U/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin
Kulturmedium (Versuch):	NBM (Neurobasalmedium) mit 1 % L-Glutamin,; 2 % B27 Supplement ohne Antioxidanz, 100 U/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin,

Für die Beschichtung mit Poly-D-Lysin wurde 0,01 % Poly-D-Lysin in *a.dest* (steril) gelöst und jeweils 1 ml des Ansatzes auf einer Vertiefung der Zellkulturplatte über Nacht im Brutschrank inkubiert und anschließend zweimal mit *a.dest* (steril) gespült.

3.3.3 Isolierung und Kultivierung primärer Astrozyten

Für die Präparation von Astrozyten wurden die Großhirnrinden von zwei Tage alten C57BL6-Mäusen verwendet. Nach der Dekapitation der Maus wurden Kopfhaut und Schädelkalotte entfernt. Das freiliegende Gehirn wurde nun entnommen und in eine Petrischale mit gekühltem Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freien HBSS überführt und von den Meningen befreit. Das Kleinhirn wurde entfernt und die Großhirne dreimal mit Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freien HBSS gespült. Danach wurden die Gehirne dreimal in Kulturmedium gespült und dann mit einer feuerpolierten Glaspipette homogenisiert. Danach wurde das Homogenisat bei 300 g für 10 min bei 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in frischem Nährmedium homogenisiert und anschließend auf Zellkulturplatten mit sechs Vertiefungen ausgesät.

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO_2 kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle 3 bis 4 Tage. Bei vermehrtem Wachstum von Mikroglia wurde diese durch leichtes manuelles Schütteln abgelöst und mit dem Überstand entfernt. Die noch verbliebenen Mikrogliazellen wurden durch 3 h Inkubation mit 8 μM Cytosine Arabinosid inhibiert. Es entstand eine homogene, zu 95 % reine Astrozytenkultur, die nach 10 bis 14 Tagen für den Versuch eingesetzt werden konnte. Eine Auswahl von Zellen wurde immunhistochemisch mit GFAP und PI

angefärbt, um die Reinheit der Kultur zu überprüfen.

Präparationsmedium: HBSS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}

Kulturmedium: DMEM mit 3,7 g/l NaHCO_3 ; 4,5 g/L D- Glucose
10 % FCS (hitzeinaktiviert); 1 % L-Glutamin
100 U/ml Penicillin; 0,1 mg/ml Streptomycin

3.4 Messungen zur axonalen Dichte auf hippocampalen Schnittkulturen

Zur Präparation von organotypischen Schnittkulturen (⁹⁵) wurden zehn Tage alte C57BL6-Mäuse (P10) dekapitiert und die Gehirne unter sterilen Bedingungen entnommen. Anschließend wurde der den Hippokampus und den entorhinalen Kortex enthaltene Anteil abpräpariert und in eiskaltes Medium überführt.

Anschließend wurden sie mit einem Tissue Schopper in 350 μm dicke Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden mit Hilfe von Kollagen, das in einer Endkonzentration von 2 mg/ml in 0.1 M Essigsäure gelöst wurde, auf Objektträgern fixiert. Die Objektträger wurden in sterilem Kulturmedium, entsprechend dem Zeit-Temperaturprotokoll bei 5 % CO_2 , im Brutschrank inkubiert. Um die Wirkung von S100B und/oder Methylprednisolon auf das Auswachsen von Axonen zu beurteilen, wurde dem Kollagentropfen S100B [40 $\mu\text{g/ml}$] bzw. Methylprednisolon [3 $\mu\text{L/1M}$] einseitig neben dem Schnitt platziert. Das Explantat und der Kollagentropfen wurden von einem weiteren Kollagentropfen überschichtet.

Kulturmedium: 25 % HBSS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , 0.8 % MEM HEPES
25 % Pferdeserum (hitzeinaktiviert), 2.4 mg/ml D- Glucose
10 % FCS (hitzeinaktiviert); 100 U/ml Penicillin;
0,1 mg/ml Streptomycin, 1 $\mu\text{g/ml}$ Insulin, 4 mM L-Glutamin,
80 ng/ml Vitamin C , pH 7.35

3.4.1 Auswertung der axonalen Dichte

Die Auswertung der Schnitte erfolgte nach einem leicht modifizierten, standardisierten Protokoll nach Galko et al. (⁹⁶). Um die Explantate lichtmikroskopisch auszuwerten, wurden die Schnitte in Quadranten unterteilt: Zwei vordere (R1+R2) und zwei hintere Regionen (R3+R4). Die zwei vorderen Regionen waren zum S100B-Tropfen bzw. Methylprednisolontropfen orientiert. In den vier Regionen wurde die axonale Dichte mit Hilfe präzise definierter Kriterien bestimmt (Grad 0 < 3 Axone in der Region; Grad 1 > 3 Axone in der Region; Grad 2 multiple Axone, wobei der Abstand zwischen zwei Axonen so klein ist, dass kein weiteres Axon dazwischen wachsen kann; Grad 3 multiple Axone, parallel ausgerichtet). Die axonale Dichte wurde für die Vorderseite und Rückseite getrennt und mehrfach verblindet ausgewertet.

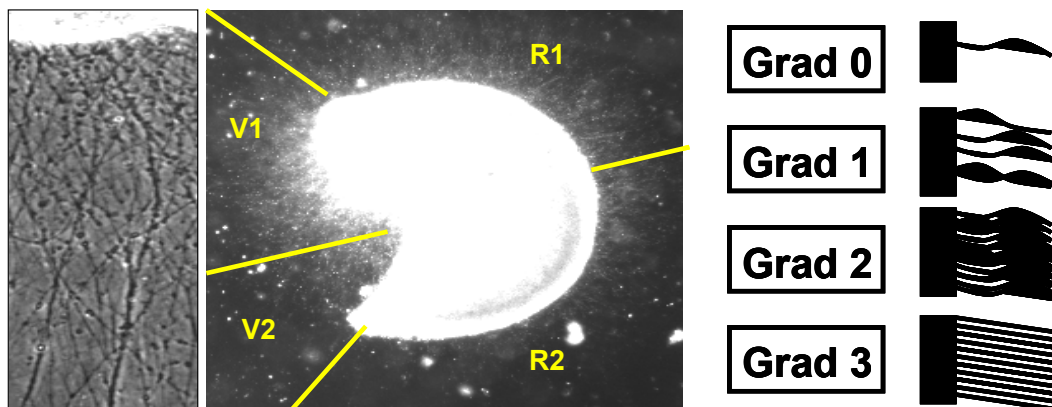


Abbildung 4: Auswertung des axonalen Auswachsens an OHSK

In der vorliegenden Abbildung ist links eine lichtmikroskopische Aufnahme auswachsender Axone (Grad 2) dargestellt. Im mittleren Bild ist ein lichtmikroskopisches Explantat unter Durchlicht dargestellt, sowie die mit Hilfslinien vorgenommene Einteilung der Regionen. Die rechte Abbildung zeigt schematisch die evaluierbaren Grade des Auswachsens von Axonen an, die während der Auswertung vergeben werden können.

3.5 Untersuchungen zur neuronalen Zellschädigung auf organotypischen hippocampalen Schnittkulturen (OHSK)

3.5.1 Präparation organotypischer hippocampaler Schnittkulturen

Zur Präparation von organotypischen hippocampalen Schnittkulturen (⁹⁷) wurden 10 Tage alte C57BL6 Mäuse (P10) dekapitiert und die Gehirne unter sterilen Bedingungen entnommen. Anschließend wurde der den Hippokampus und den entorhinalen Kortex enthaltene Anteil abpräpariert und in eiskaltes Präparationsmedium überführt. Das Hirngewebe wurde auf einem Sektionsblock befestigt, anschließend wurden mit einem Vibratom 350 µm dicke Koronarschnitte angefertigt, wobei der Sektionsblock und das Gewebe immer vom Präparationsmedium bedeckt waren. Nach dem Schneiden wurden die Schnitte mit einer Pasteurpipette in Petrischalen, die eiskaltes Präparationsmedium enthielten, überführt. Unter dem Binokular wurden die Schnitte so präpariert, dass sie nur noch aus Hippokampus und entorhinalen Kortex bestanden. Anschließend wurden je 3 Schnitte mit Hilfe einer Pasteurpipette auf Filtermembranen (Porengröße 0,1 µm) transferiert und in die Vertiefung einer 6-Lochkulturplatte mit vorgewärmtem Kulturmedium (37° C) gebracht. Die Inkubation der Schnitte erfolgte bei 35° C, 5 % CO₂ und 95 % Raumluft im Brutschrank für 9 Tage. In dieser Vorinkubationszeit wurden viele Aktivitätsmarker auf Mikrogliazellen herunterreguliert. Nach dieser Zeit kommt es zur Wiederherstellung organotypischer Bedingungen (⁹⁸). Nach dieser Regenerationszeit verhalten sich die inneren Schichten des Schnittes wie nahezu unverletztes Gewebe. Der Mediumwechsel erfolgte direkt einen Tag nach der Präparation und dann jeden zweiten Tag.

Präpariermedium:	HBSS, 10 % FK
Kulturmedium:	1,0 ml Penicillin/Streptomycin (Stammlsg. 0,1 mg/ml)
	1,2 ml Glucose 20 (Stammlsg. 200 mg/ml)
	2 ml L-Glutamat (Stammlsg. 200 mM),
	0,8 g MEM 25MM Hapes
	580 µl Natriumbikarbonat (Stammlsg. 00,75 %/ml)
	500 µl Tris-Base (Stammlsg. 1M)

80 µl Vitamin C (Stammlsg. 1 µg/ml)
100 µl Insulin (Stammlsg. 1 mg/ml)
25 ml Pferdeserum, 25 ml HBSS, ad 100 ml *a. Bidest*

3.5.2 Induktion der exzitotoxischen Schädigung mit NMDA

Nach der neuntägigen Vorinkubation der Schnittkulturen wurden diese bis auf die Kontrolle für 4 h mit 5 µM NMDA inkubiert und damit exzitotoxisch geschädigt. NMDA löst eine neuronale Zellschädigung durch die Überaktivierung exzitatorischer Glutamatrezeptoren aus. Während der ersten 2 h der vierstündigen Inkubation wurde die Versuchsgruppe bei 17° C gekühlt und dann langsam wiedererwärmt, während die Kontrollgruppen bei 37° C verblieben. Zur vollständigen Entfernung des überschüssigen NMDA wurden die hippokampalen Schnittkulturen anschließend mit Medium gespült. Bis zur Auswertung nach 24 h wurden sie in frischem Medium im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO₂ belassen. 24 h nach NMDA Schädigung wurde der neuronale Zelltod am intakten Schnitt fluoreszenz- und lichtmikroskopisch dokumentiert.

3.5.3 Untersuchungen zum neuronalen Zellschädigung durch NMDA

Für die Untersuchungen zum neuronalen Zelltod wurden die Schnitte mit NMDA geschädigt, NMDA löst dabei durch die Überaktivierung exzitatorischer Aminosäurerezeptoren eine neuronale Zellschädigung aus (Primärschaden). Kontrollgruppen wurden ohne NMDA belassen. 48 h nach der NMDA Schädigung wurden die Schnitte mit Propidiumjodid (PI) gefärbt. Propidiumjodid ist ein roter Fluoreszenzfarbstoff, der durch die geschädigte Membranen toter Zellen gelangt. Er interkaliert mit den Basenpaaren der DNA und färbt die Zellen auf diese Weise rot an. PI wird in einer Konzentration von 5 µg/ml direkt in das Kulturmedium der Hirnschnitte gegeben und dann für 15 min bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde jeder Zellkultureinsatz dreimal in frisches Kulturmedium, das sich in einer sterilen Petrischale befand, getaucht, um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Danach wurden die Kultureinsätze in eine neue 6-Lochplatte mit frischem Medium überführt. Die Schnitte wurden dann unter dem Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop betrachtet und digital dokumentiert (⁹⁹).

3.6 Versuche am Zellkulturmodell

3.6.1 Zellzahlbestimmung

Um die Anzahl der vitalen Zellen in einer Zellkultur zu bestimmen, wurden die Zellen mit einem Zellschaber aus den Kulturflaschen gelöst und im Medium mit Trypanblau gelöst. Dieser Farbstoff wird durch die Plasmamembran energieunabhängig befördert. Vitale Zellen werden nicht angefärbt, während das Zytoplasma toter Zellen eine intensive Blaufärbung erhält. Gleiche Volumina der Zellsuspension und des Farbstoffes werden gemischt und in einem Hämocytometer mit einer Einteilung nach Neubauer gezählt. Die Zahl der Zellen wurde in den äußeren vier Quadranten bestimmt und die Zellkonzentration je Milliliter wie folgt berechnet: Zellzahl x 2 (Verdünnungsfaktor) x 10^4 .

3.6.2 Vitalitätstest

Als Parameter für Zytotoxizität und damit für die Vitalität der Zellen während des Versuchs wurde die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) gemessen. Die LDH ist ein zytosolisches Enzym, das ubiquitär in jeder Zelle vorliegt. Die LDH Ausschüttung gilt als Maß für die Desintegrität der Zellmembran. Der LDH Anstieg ist unabhängig von der Art des Zelluntergangs zu beobachten und lässt somit keinen Rückschluss auf Apoptose oder Nekrose der Zellen zu, korreliert aber direkt mit der Zahl der untergegangenen Zellen (¹⁰⁰).

Zur Messung der LDH Aktivität wurde das LDH-Cytotoxicity-Kit von Roche verwendet. Hierbei wurden in Doppelbestimmungen jeweils 100 µl des Überstandes aus jeder Vertiefung entnommen und in die Vertiefung einer Mikrotiterplatte gegeben. Es wurden jeweils 100 µl der Reaktionslösung in eine Vertiefung gegeben, diese Lösung bestand aus einem Katalysator (Diaphorase/NAD⁺) und dem INT-Farbstoff in einem Mischungsverhältnis von 1:45. Die Mikrotiterplatte wurde dann bei Raumtemperatur, lichtgeschützt für 30 min inkubiert und die Reaktion wurde mit 1N HCL-Lösung gestoppt. Nachfolgend wurde die Platte innerhalb von 15 min bei 485 nm photometrisch gemessen. Als Vergleichswert diente die Messung der LDH Freisetzung im Kulturmedium. Dieser Leerwert wurde von allen Extinktionen subtrahiert. Als

Kontrollen dienten die maximale LDH Ausschüttung (100 %). Hierzu wurde eine Vertiefung der Zellkulturplatte mit 2 % Triton X-100 Lsg. lysiert und die minimale Ausschüttung von LDH (basale Freisetzung), d. h. der Überstand unbehandelter Zellen zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns, verwendet. Daraus konnte mit Hilfe der vom Hersteller vorgegebenen Formel die Zytotoxizität in Prozent berechnet werden.

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = \frac{\text{Messwert} - \text{minimale LDH Freisetzung}}{\text{Maximale LDH Freisetzung} - \text{minimale LDH Freisetzung}} * 100$$

3.6.3 ELISA

Das Medium der verschiedenen Zellkulturen wurde auf IL-6 und TNF-alpha getestet. Der Nachweis der Zytokine wurde mit Hilfe eines kommerziell erworbenen Testsystems der Firma Pharmingen, der Gebrauchsanweisung folgend, erbracht.

3.6.4 Griess - Assay

Mit Hilfe des Griess-Assay kann indirekt das von den Zellen freigesetzte NO im Überstand, durch den Nachweis des aus dem sehr kurzlebigen NO entstanden Nitrits, bestimmt werden. Als Referenz wurde eine Standardreihe mit Natriumnitrit (0- 50 µM) gewählt. Der Überstand der Zellen wurde in Doppel- oder Dreifachbestimmung auf eine Mikrotiterplatte pipetiert und dann mit dem gleichen Volumen Griess-Reagenz gemischt. Dieser Ansatz wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Platte bei einer Messwellenlänge von 540 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm gemessen.

3.7 Statistische Methoden

Die Werte wurden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Vergleiche wurden zwischen den einzelnen Gruppen mit Hilfe des T-Test und dem Mann-Whitney- Test überprüft. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet

4 Ergebnisse

4.1 Hypothermie vs. Normothermie

Primäre Astrozyten, BV-2 Mikrogliazellen und primäre Neurone wurden entsprechend dem Zeit-Temperaturprotokoll gekühlt. Bei den einzelnen Versuchsreihen gab es keine Unterschiede in der Dauer der Abkühlung sowie der Wiedererwärmung, dies wurde mittels einer Paratrendsonde überwacht. Von allen Zelllinien wurde die IL-6 Konzentration im Überstand mit Hilfe eines ELISA-Sets gemessen, das Ausmaß der Zytotoxizität wurde über die freigesetzte LDH-Konzentration bestimmt. Diese Daten wurden miteinander korreliert, um vergleichbare Werte in Bezug auf die noch lebenden Zellen zu erhalten.

4.1.1 Zytotoxizität

Primäre Astrozyten

Nach 2 h tiefer Hypothermie lag die Zelltodrate in der Versuchsgruppe bei 32 %, aber in der Kontrollgruppe auch bereits bei 18 %. Direkt nach der Wiedererwärmung hatte sich die Zelltodrate auf 48,6 % in der Versuchsgruppe und 26,5 % in der Kontrollgruppe erhöht. Nach der Wiedererwärmung erhöhten sich die Zelltodraten in keiner der beiden Gruppen weiter. Diese Unterschiede waren zu keinem Zeitpunkt signifikant (Abb. 5).

BV-2 Zellen

Tiefe Hypothermie für 2 h führte zu einem Zelltod von 22 % im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 4,5 %. Im Anschluss an die Wiedererwärmung waren bereits 39 % der Zellen im Gegensatz zu 10,5 % in der Kontrolle tot. Nach weiteren 24 h Normothermie waren in der Kontrollgruppe 18 %, in der Versuchsgruppe 42 % der Zellen tot. Die Unterschiede waren zu jedem Zeitpunkt signifikant (Abb.6).

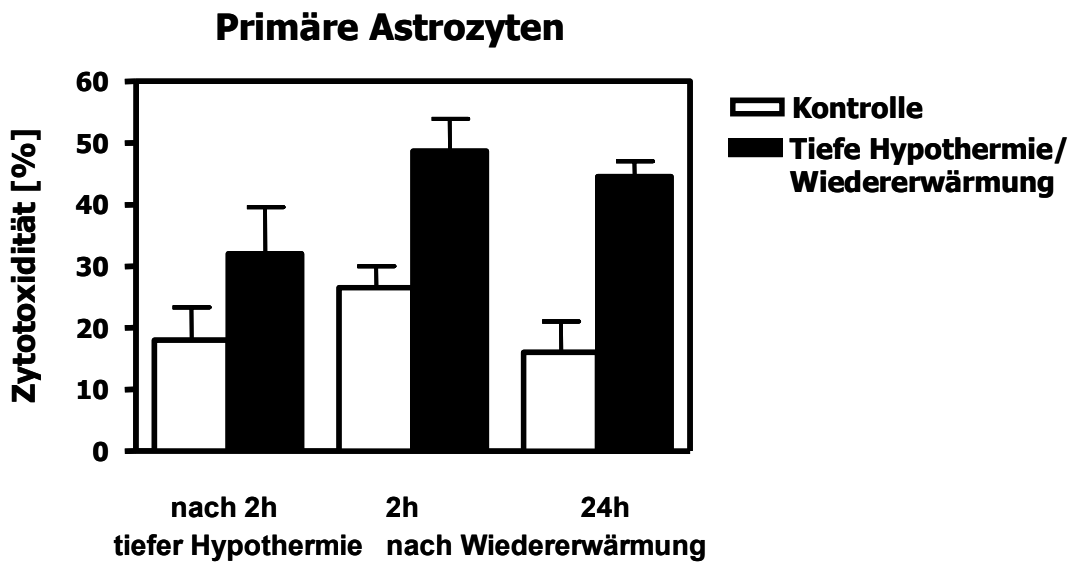


Abbildung 5: Zelltodrate in Prozent bei Astrozyten nach 2 h tiefer Hypothermie

In der obigen Abbildung zeigt sich eine deutliche erhöhte Zelltodrate bei Astrozyten alleine durch tiefe Hypothermie und anschließende Wiedererwärmung

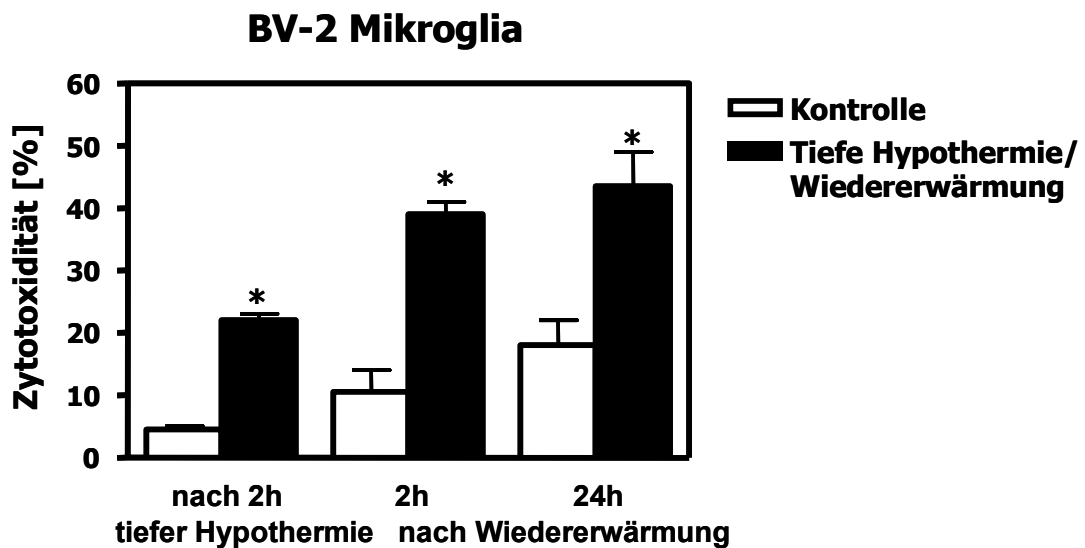


Abbildung 6: Zelltodrate in Prozent bei BV-2 Mikroglia nach 2 h tiefer Hypothermie

In Abbildung 6 wird die signifikante Steigerung des Zelltodes durch Hypothermie und Wiedererwärmung im Vergleich zur normothermen Kontrolle in Mikrogliazellen gezeigt.

Primäre Neurone

Innerhalb der 2 h tiefen Hypothermie starben 30 % der Zellen, in der Kontrollgruppe aber nur 4,5 %. Die Wiedererwärmung führte in der Versuchsgruppe nur zu einer Erhöhung der Zelltodrate auf 32 %. 24 h nach Wiedererwärmung erhöhte sich die Zelltodrate in der Versuchsgruppe auf 33 % und in der Kontrollgruppe auf 8,3 %. Die Unterschiede waren zu jedem Zeitpunkt signifikant (Abb. 7).

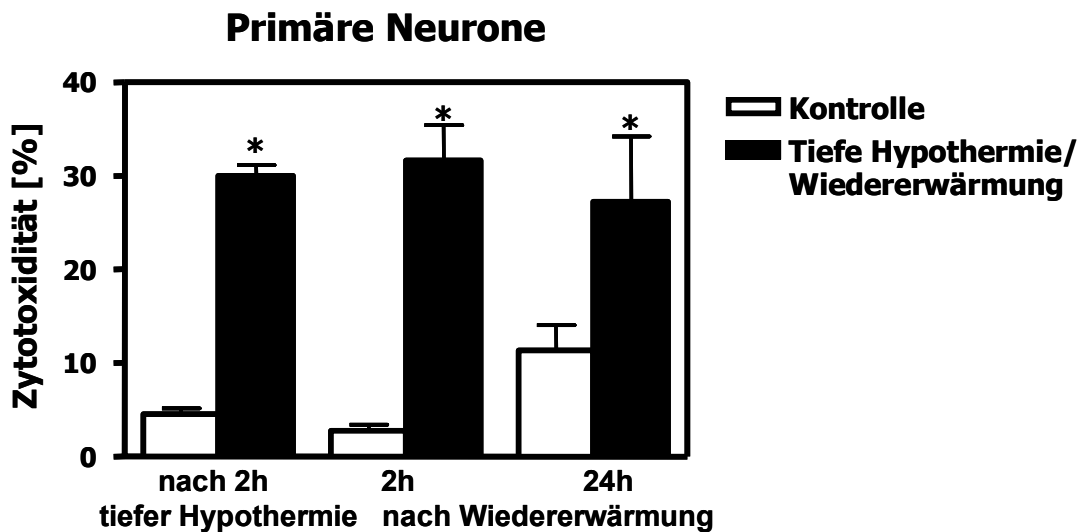


Abbildung 7: LDH-Freisetzung bei Neuronen nach 2 h tiefer Hypothermie

Dargestellt ist die signifikant erhöhte Zelltodrate allein durch tiefe Hypothermie in einer neuronalen Zellkultur

4.1.2 IL-6 Freisetzung

Primäre Astrozyten

Direkt nach der zweistündigen Kühlungsphase stieg die die IL-6 Konzentration gegenüber den normothermen Kontrollen signifikant an ($p < 0,01$). Dieser Anstieg des proinflammatorischen Zytokins ist auch nach 24 h Wiedererwärmung signifikant (Abb. 8, $p < 0,01$).

BV-2 Mikrogliazellen

Nach 2 h tiefer Hypothermie kommt es zur signifikanten IL-6 Erhöhung ($p < 0,01$) im Vergleich zur 37° C Kontrolle. Nach 24 h Nachbeobachtungszeit bei 37° C ist die IL-6 Ausschüttung im Vergleich zur normothermen Kontrollgruppe wieder signifikant erhöht (Abb. 8, $p < 0,01$).

Primäre Neurone

Die IL-6 Ausschüttung war über den gesamten Versuchszeitraum bei den gekühlten Zellen signifikant erhöht gegenüber den normothermen Kontrollen ($p < 0,01$). Die normothermen Kontrollen zeigten über den gesamten Versuchszeitraum eine gleichbleibende basale IL-6 Freisetzung (Abb. 8).

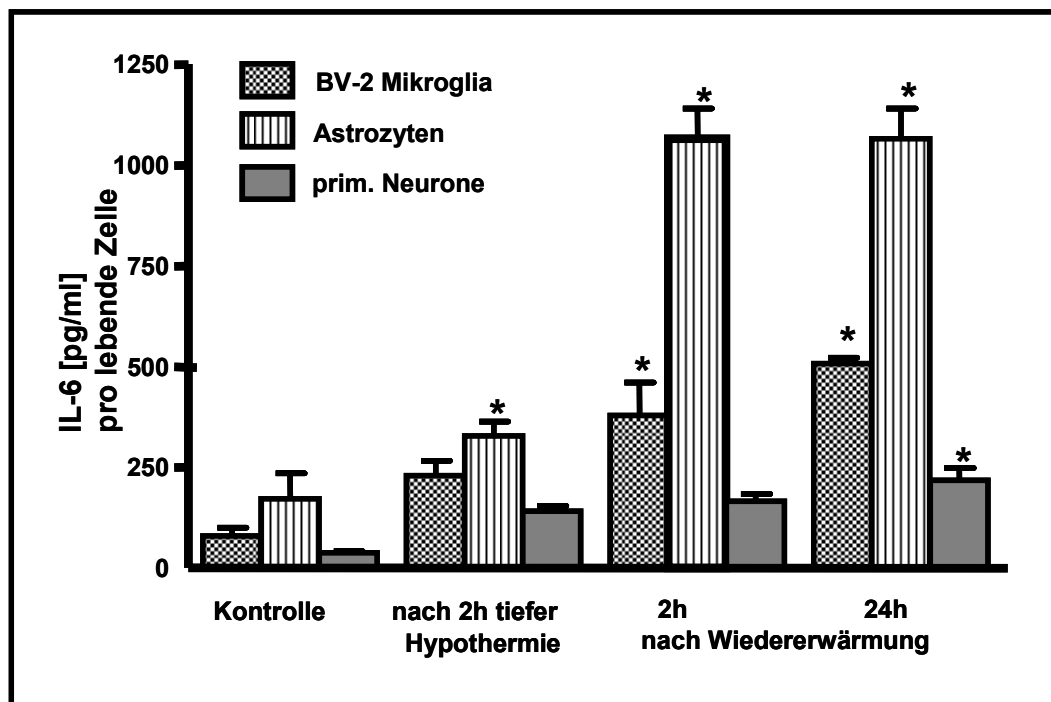


Abbildung 8: IL-6 Freisetzung bei dynamischer Temperaturveränderung

*Dargestellt sind die IL-6 Konzentrationen in den verschiedenen Zellkulturen, zu allen untersuchten Messzeitpunkten. Ein * entspricht $p < 0,01$ jeweils im Vergleich zur Kontrolle der Zellreihe.*

4.1.3 NO Freisetzung bei dynamischen Temperaturveränderungen

Primäre Astrozyten und BV-2 Mikroglia

Ein weiterer Zellmediator, der unter solch unphysiologischen Bedingungen wie der tiefen Hypothermie und Wiedererwärmung eine Rolle spielen könnte, ist NO. Bei unseren Versuchen scheint die Freisetzung von NO weder in der Kontrollgruppe, noch durch 2 h tiefe Hypothermie und anschließende Wiedererwärmung beeinflusst zu sein (Abb.9).

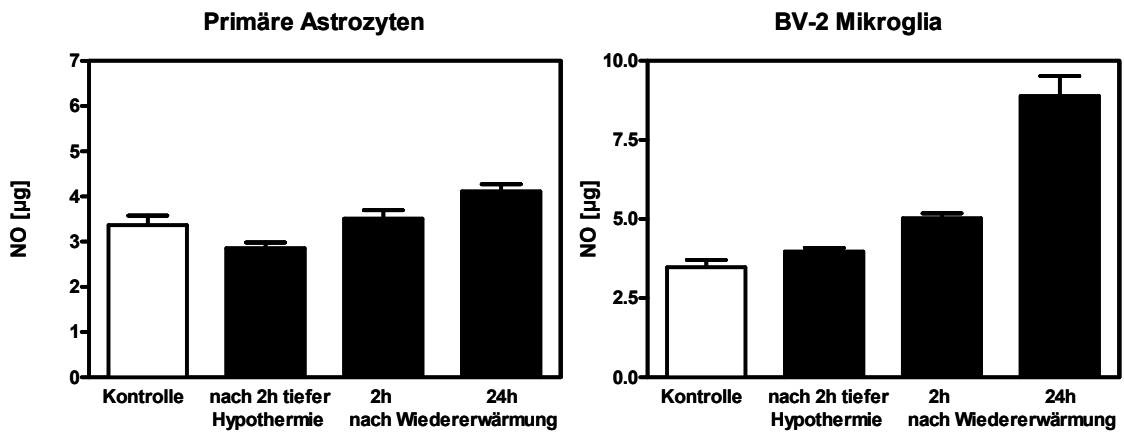


Abbildung 9: NO Freisetzung während dynamischer Temperaturveränderung

In den beiden dargestellten Graphiken zeigt sich keine signifikante Änderung der NO-Freisetzung während der dynamischen Temperaturveränderung

4.2 Einfluss des S100B auf die Zellkulturen unter Hypothermie

S100B ist ein wichtiges Ca-bindendes Protein, das im ZNS von Astrozyten verstärkt unter unphysiologischen Bedingungen, wie Ischämie, Degeneration oder Trauma, freigesetzt wird. In unserer Versuchsreihe haben wir die primären Astrozyten, primären Neurone und die BV-2 Mikrogliazellen wieder nach dem schon beschriebenen Zeit-Temperatur-Protokoll gekühlt (Vergleich 4.1). Um eine Stresssituation für die Zellen zu simulieren, wurden die Versuchsgruppen mit S100B in den jeweiligen Konzentrationen (siehe Unterabschnitt) versetzt. Vor Beginn des Versuches wurde das Medium komplett gewechselt und die zu kühlenden Zellen wurden direkt mit vorgekühltem Medium (17° C) versetzt. Als Kontrollgruppen dienten sowohl die normothermen Zellen, als auch die hypothermen Zellen ohne S100B Zusatz. Die Morphologie, sowie die Freisetzung verschiedener Mediatoren wurde gemessen.

4.2.1 Zytotoxizität

Primäre Astrozyten

Direkt in der Kühlungsphase sowie in der anschließenden Wiedererwärmung senkt die Zugabe von S100B die Zelltodrate in den untersuchten Astrozyten. Unter Normothermie kann die zusätzliche Gabe von S100B die Zelltodrate innerhalb der ersten 4 h ebenfalls senken.

Tabelle 4.1: Dargestellt ist der prozentuale Anteil toter Zellen nach S100B Zugabe bzw. in der Kontrollgruppe. Die Zugabe von S100B führt zur Zellprotektion während der tiefen Hypothermie und nach Wiedererwärmung ($p < 0.05$)*

	Normothermie			Hypothermie	
	Astrozyten ohne S100B	Astrozyten + S100B		Astrozyten ohne S100B	Astrozyten + S100B
2 h	18 %	14 %	nach 2 h tiefer Hypothermie	32 %	16 %
4 h	26,5 %	18 % *	nach Wiedererwärmung	48,6 %	31,5 % *
24 h	16 %	25 % *	24 h nach Wiedererwärmung	43,5 %	44 %

Mikrogliale Zelllinie BV-2

Die Zugabe von S100B bewirkt eine signifikante Verringerung der LDH-Ausschüttung zu den Zeitpunkten in der Wiedererwärmungsphase. In der 37° C Gruppe führt die Gabe von S100B zu allen Zeitpunkten zu einer erhöhten Zellzytotoxizität.

*Tabelle 4.2: Die Tabelle zeigt den prozentualen Anteil toter Mikrogliazellen nach S100B Zugabe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Zugabe von S100B führt unter tiefer Hypothermie zur signifikanten Reduktion der Zytotoxizität [%] in der mikroglialen Zelllinie BV-2. (*p<0,05)*

	Normothermie			Hypothermie	
	BV-2 Zellen ohne S100B	BV-2 Zellen + S100B		BV-2 Zellen ohne S100B	BV-2 Zellen + S100B
2 h	4,5 %	19 %	nach 2 h tiefer Hypothermie	22 %	27 %
4 h	10,5 %	20 %	nach Wiedererwärmung	39 %	26 % *
24 h	18 %	19 %	24 h nach Wiedererwärmung	42 %	37 % *

Primäre Neurone

*Tabelle 4.3: Dargestellt ist der prozentuale Anteil an toten Neuronen nach S100B Zugabe bzw. in der Kontrollgruppe. (*p<0,05)*

	Normothermie			Hypothermie	
	Neurone ohne S100B	Neurone + S100B		Neurone ohne S100B	Neurone + S100B
2 h	4,5 %	7 %*	nach 2 h tiefer Hypothermie	30 %	7 % *
4 h	3 %	12 %	nach Wiedererwärmung	32 %	19 %
24 h	8,3 %	18 %	24 h nach Wiedererwärmung	33 %	30 %

Die Applikation von S100B und die 2-stündige hypotherme Behandlung führen zu einer Reduktion der LDH-Freisetzung zu allen Versuchszeitpunkten. Die Gabe von S100B unter Normothermie erhöht die LDH-Freisetzung während des gesamten Versuches.

4.2.2 Einfluß der Hypothermie auf die IL-6 Freisetzung während dynamischer Temperaturveränderungen

Mikrogliale Zelllinie BV-2

Unter Hypothermie führte die zusätzliche Applikation des Proteins S100B (100 µg/ml) während der Kühlungsphase, der Wiedererwärmung und 24 Stunden nach Wiedererwärmung zu einer Suppression der IL-6 Freisetzung (Abb. 10). Unter Normothermie hat die Applikation von S100B keinen Effekt auf die mikrogliale Zelllinie (keine Abbildung).

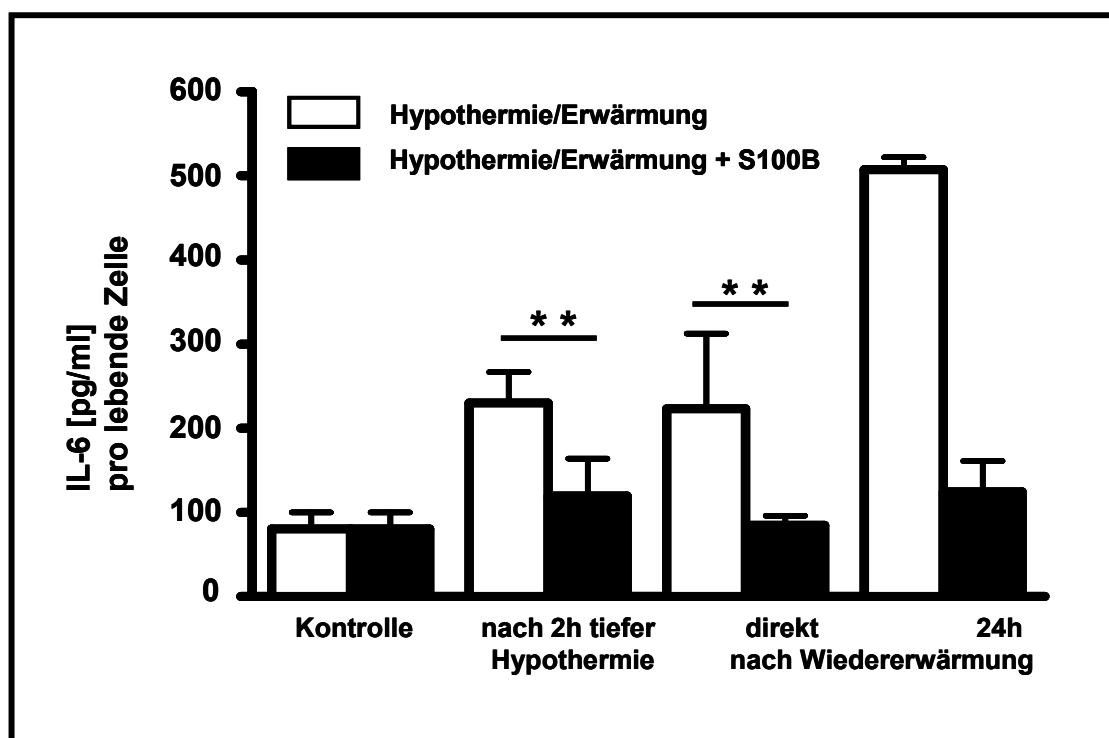


Abbildung 10: S100B reduziert die durch Hypothermie induzierte IL-6 Freisetzung bei BV-2-Zellen (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

Primäre Neurone

In der primären Neuronenkultur zeigte sich, dass S100B (10 ng/ml) direkt nach der Kühlungsphase und nach Wiedererwärmung zu reduzierten IL-6 Konzentrationen, im Vergleich zu den Kontrollgruppen, führt. Bei den Neuronen, die unter normothermen Bedingungen mit S100B inkubiert wurden, konnten keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden (Abb. 11).

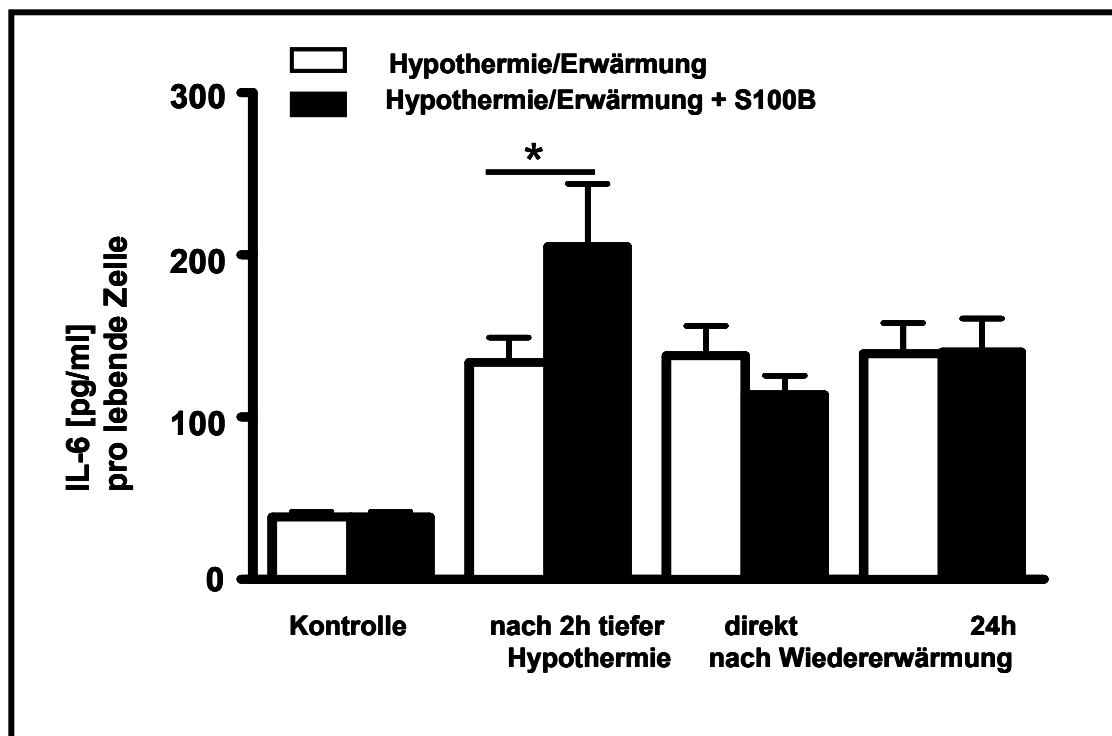


Abbildung 11: Durch S100B reduzierte IL-6 Freisetzung bei primären Neurone (* $p < 0,05$)

Primäre Astrozyten

Die astrozytäre Kultur wurde mit 100 ng/ml S100B inkubiert. Zellen, die für 2 h bei 17° C gekühlt wurden, produzierten über den gesamten Versuchszeitraum mehr IL-6 als die Kontrollen. Nach tiefer Hypothermie und nach 24 h Wiedererwärmung zeigte sich eine signifikant erhöhte IL-6 Freisetzung nach Applikation von S100B gegenüber dem Versuchsbeginn (Abb. 12). Im Gegensatz dazu zeigte sich unter kontinuierlichen normothermen Bedingungen zu allen Messzeitpunkten eine signifikant erhöhte IL-6

Freisetzung nach S100B Applikation (Abb. 13).

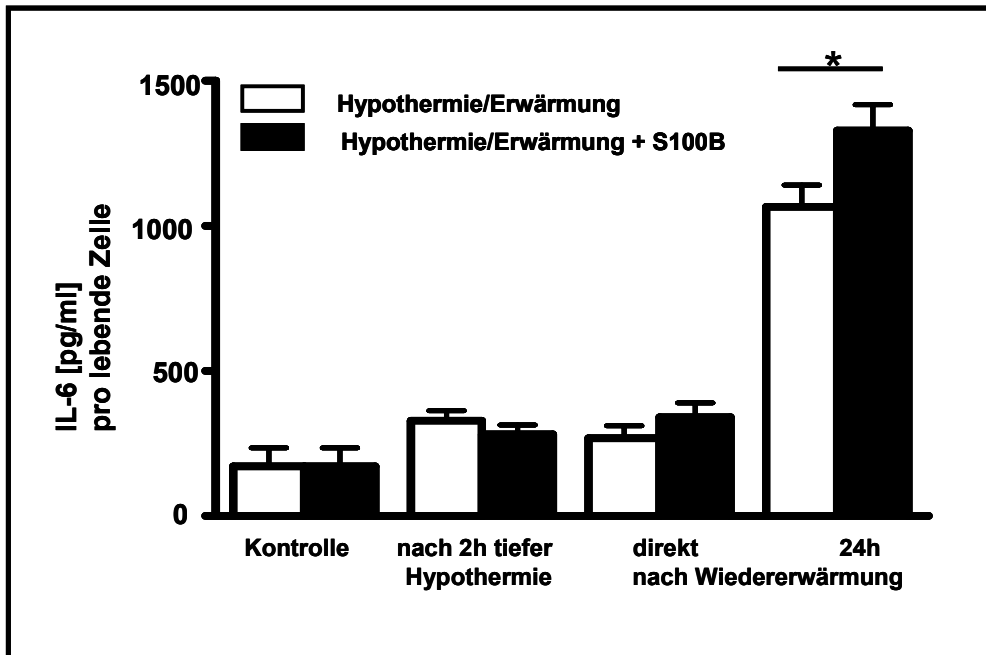


Abbildung 12: S100B stimuliert die IL-6 Freisetzung bei Astrozyten in der Wiedererwärmungsphase (* $p < 0,05$)

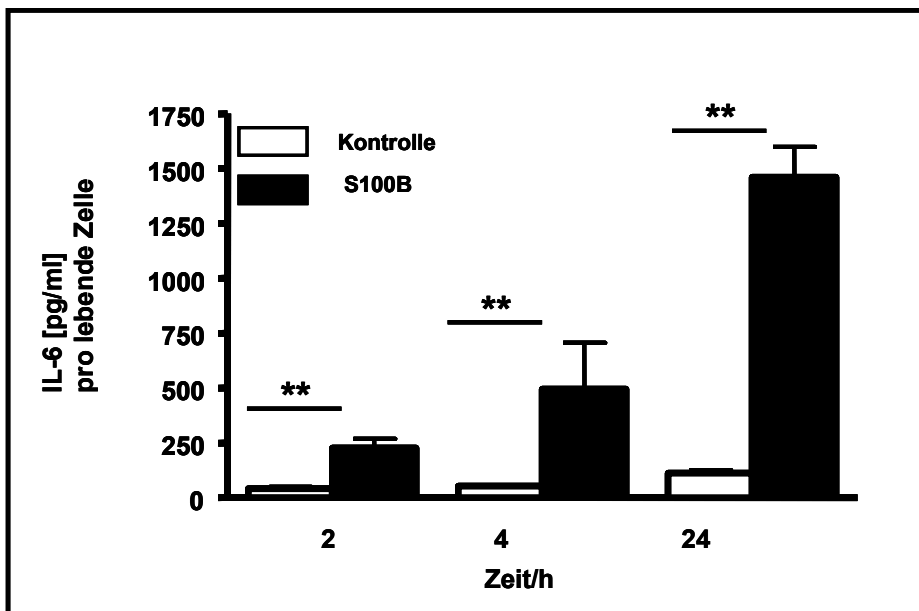


Abbildung 13: S100B induzierte IL-6 Freisetzung unter Normothermie bei primären Astrozyten (** $p < 0,01$)

4.2.3 NO Freisetzung

Primäre Astrozyten und BV-2 Mikrogliä

Die Freisetzung von NO wird durch die Zugabe von S100B weder unter Normothermie, noch nach 2 h tiefer Hypothermie beeinflusst.

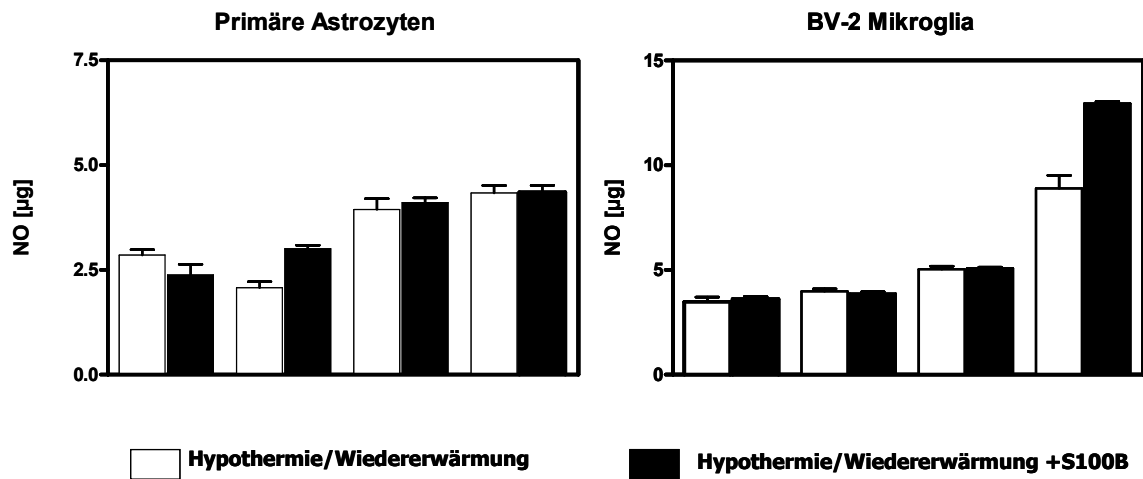


Abbildung 14: Einfluss von S100B auf die NO Freisetzung bei Gliazellen

Dargestellt ist die NO-Freisetzung bei Gliazellen in Abhängigkeit von S100B Stimulation im Vergleich von 2 h tiefer Hypothermie und Normothermie. Zu keinem Zeitpunkt lässt sich ein signifikanter Unterschied feststellen

4.3 Einfluss von Methylprednisolon im Zellkulturmodell

Der Versuchsaufbau war identisch zu allen bisherigen Versuchen. Methylprednisolon (MP), als Trockensubstanz vorliegend, wurde direkt vor Versuchsbeginn in frischem Kulturmedium gelöst. In einer Konzentration von 100 mM wurden die Zellkulturen direkt mit diesem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gekühlt, das MP verblieb über den gesamten Versuchszeitraum auf den Zellen. Als Kontrollen dienten Zellen, die bei 37° C belassen wurden, sowie eine Gruppe normothermer Zellen, die ebenfalls mit MP behandelt wurden.

4.3.1 Zytotoxizität

Primäre Astrozyten

Durch die Zugabe von Methylprednisolon sterben bereits während der Kühlungsphase signifikant weniger Zellen, dieser Effekt bleibt bis zum Ende des Versuches bestehen. Die Gabe von Methylprednisolon bei 37° C bleibt ohne Effekt.

*Tabelle 4.4: Die Gabe von MP zu Versuchsbeginn führte zu einer signifikanten Reduktion der Zytotoxizität der Astrozyten unter normothermen und während dynamischer Temperaturveränderungen (*p<0,05)*

	Normothermie			Hypothermie	
	Astrozyten ohne MP	Astrozyten + MP		Astrozyten ohne MP	Astrozyten + MP
2 h	18 %	6 %*	nach 2 h tiefer Hypothermie	32 %	14 % *
4 h	26,5 %	14 %*	nach Wiedererwärmung	48,6 %	21 %*
24 h	16 %	14 %	24 h nach Wiedererwärmung	43,5 %	25 %

BV-2 Mikroglia

Bereits nach der Kühlung sinkt die Zelltodrate durch MP-Gabe signifikant ab, dies bleibt über den gesamten Versuchszeitraum erhalten. Die zusätzliche Gabe von MP bei den normothermen Kontrollen zeigte keinen Effekt.

Tabelle 4.5: Die Gabe von MP zu BV-2 Mikrogliazellen führte unter normothermen Bedingungen zu keinem protektiven Effekt auf die Zytotoxizität. Unter hypothermen Bedingungen kam es nach Vorbehandlung mit MP zu einer Reduktion der Zytotoxizität, diese war aber zu keinem Zeitpunkt signifikant.

	Normothermie			Hypothermie	
	BV-2 Zellen ohne MP	BV-2 Zellen + MP		BV-2 Zellen ohne MP	BV-2 Zellen + MP
2 h	4,5 %	7 %	nach 2 h tiefer Hypothermie	22 %	12 %
4 h	10,5 %	10 %	nach Wiedererwärmung	39 %	13 %
24 h	18 %	8 %	24 h nach Wiedererwärmung	42 %	23 %

Primäre Neurone

Bei den Neuronen, die unter normothermen Bedingungen mit MP inkubiert wurden, konnten keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden. Jedoch scheint unter hypothermer Temperatur die Gabe von MP neuroprotektiv zu wirken, die Gabe von MP führte zu allen Versuchszeitpunkten zu einer signifikant reduzierten LDH-Freisetzung.

Tabelle 4.6: Bei primären Neuronen führt die Gabe von MP unter hypothermen Bedingungen zu einer zu jedem Versuchszeitpunkt signifikanten Reduktion der LDH-Freisetzung. Unter normothermen Bedingungen zeigten sich zwischen den Versuchsgruppen keine Unterschiede. ($p < 0,05$)*

	Normothermie			Hypothermie	
	Neurone ohne MP	Neurone + MP		Neurone ohne MP	Neurone + MP
2 h	4,5 %	3 %	nach 2 h tiefer Hypothermie	30 %	6,3 % *
4 h	3 %	4 %	nach Wiedererwärmung	32 %	12 % *
24 h	8 %	8 %	24 h nach Wiedererwärmung	33 %	16 % *

4.3.2 Einfluß der Methylprednisolongabe auf die IL-6 Freisetzung

Primäre Astrozyten

Bei primären Astrozyten führte die Zugabe von Methylprednisolon bereits während der Kühlungsphase zu einer signifikanten Reduzierung der IL-6 Freisetzung. Dieser Effekt war sowohl direkt als auch 24 Stunden nach Wiedererwärmung sichtbar (Abb. 15 +16).

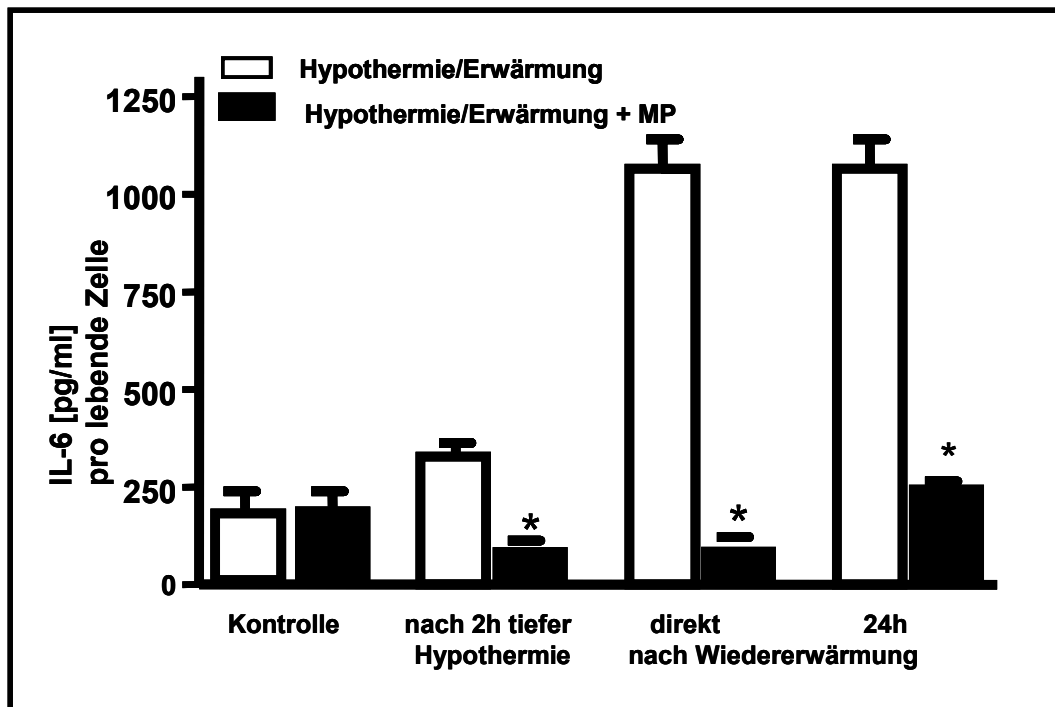


Abbildung 15: IL-6 Freisetzung nach MP Gabe bei Astrozyten unter Hypothermie

Die Abbildung zeigt deutlich die signifikante Reduktion des Zytokines IL-6 nach Gabe von MP zu Versuchsbeginn. Dieser Effekt ist über den gesamten Kühlungs- und Wiedererwärmungszeitraum sichtbar. ($p < 0,01$)*

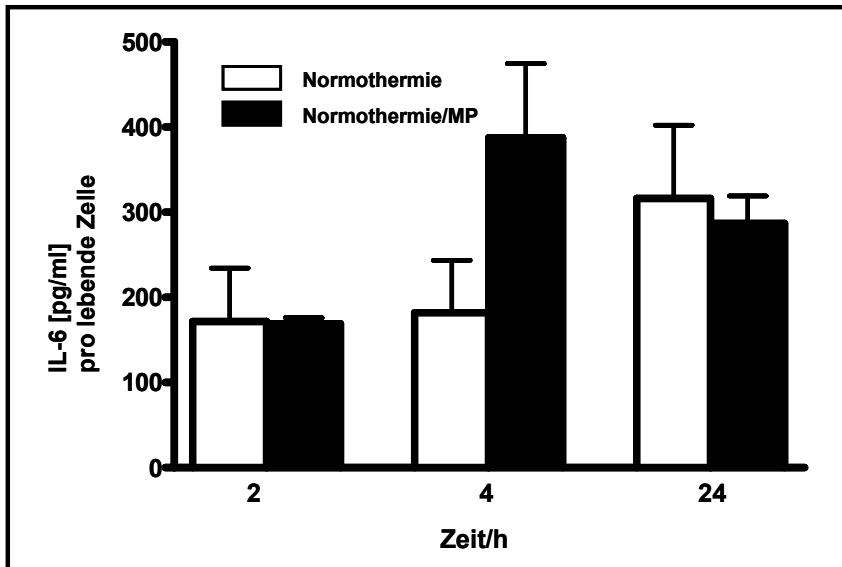


Abbildung 16: IL-6 Freisetzung nach MP Gabe bei Astrozyten unter Normothermie

Die Gabe von MP unter normothermen Bedingungen führte zu keiner Veränderung der IL-6 Freisetzung bei primären Astrozyten.

BV-2 Mikrogliazellen

Die Gabe von Methylprednisolon führte nach der Wiedererwärmung zu einer signifikanten Reduktion der IL-6 Freisetzung im Vergleich zu den ebenfalls gekühlten Kontrollen (Abb.17). Die Applikation von Methylprednisolon hat unter normothermen Bedingungen keinen Effekt auf die IL-6 Freisetzung (Abb. 18).

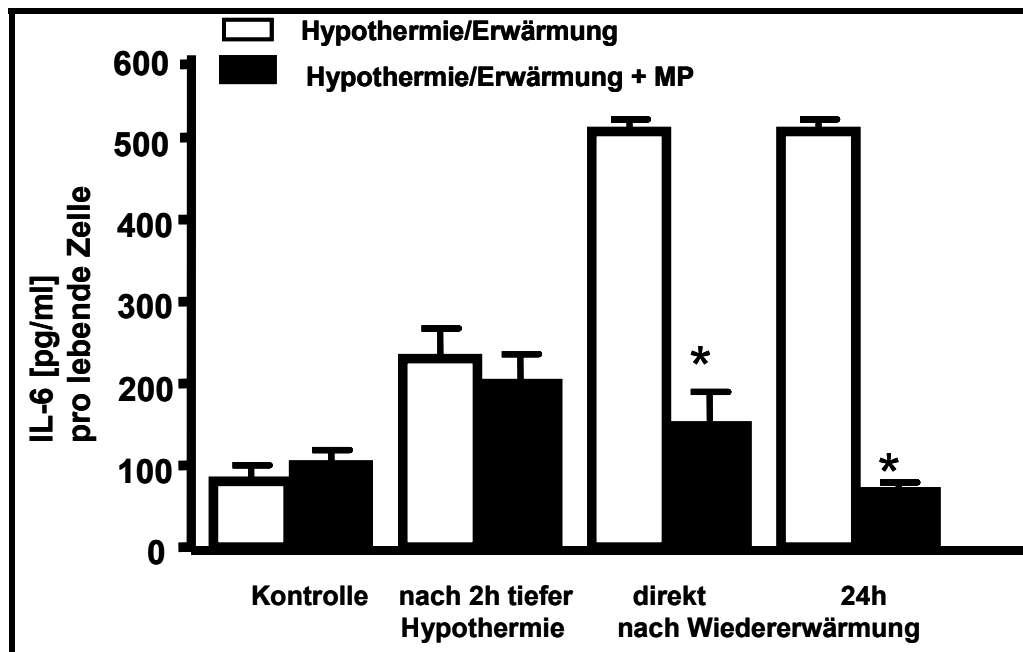


Abbildung 17: IL-6 Freisetzung nach MP Gabe bei BV-2 Mikrogliazellen während dynamischer Temperaturveränderungen

In der Abbildung 17 ist deutlich die Reduktion der IL-6 Freisetzung durch Methylprednisolongabe in der Wiedererwärmungsphase sichtbar. ($p < 0,01$)*

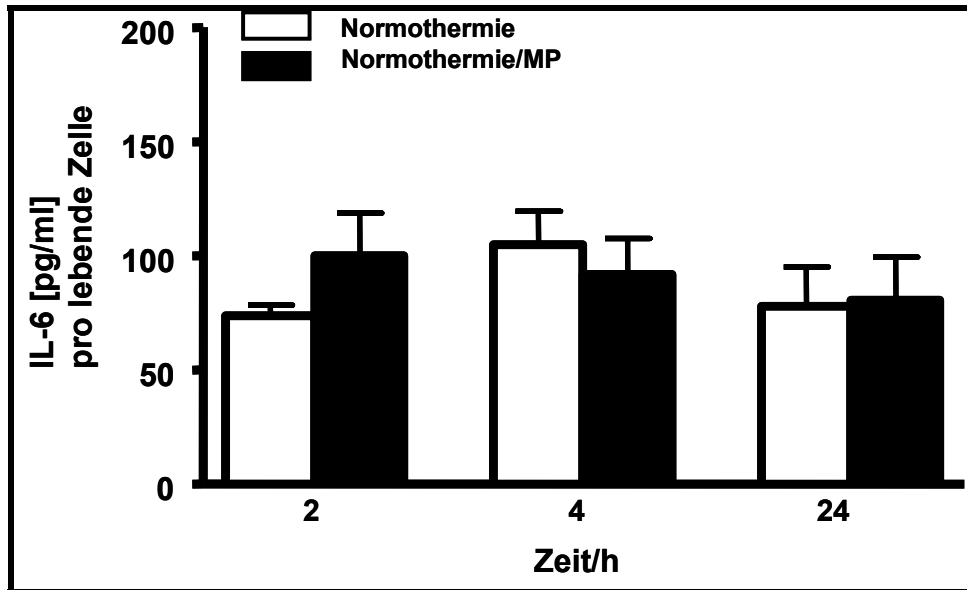


Abbildung 18: IL-6 Freisetzung nach MP-Gabe bei BV-2 Mikrogliazellen unter Normothermie

Unter normothermen Bedingungen hat Methylprednisolon keinen Einfluss auf die IL-6 Freisetzung in BV-2 Mikrogliazellen.

Primäre Neurone

Durch die gleichzeitige Gabe von Methylprednisolon konnte die Freisetzung von IL-6 in der Wiedererwärmungsphase deutlich reduziert werden. Direkt nach und 24 h nach Wiedererwärmung konnte durch die zusätzliche Gabe von MP die IL-6 Freisetzung deutlich reduziert werden. Bei der bei 37° C verbliebenen Kontrollgruppe hatte die Gabe von Methylprednisolon keinen Effekt auf die IL-6 Freisetzung (Abb. 19+ 20).

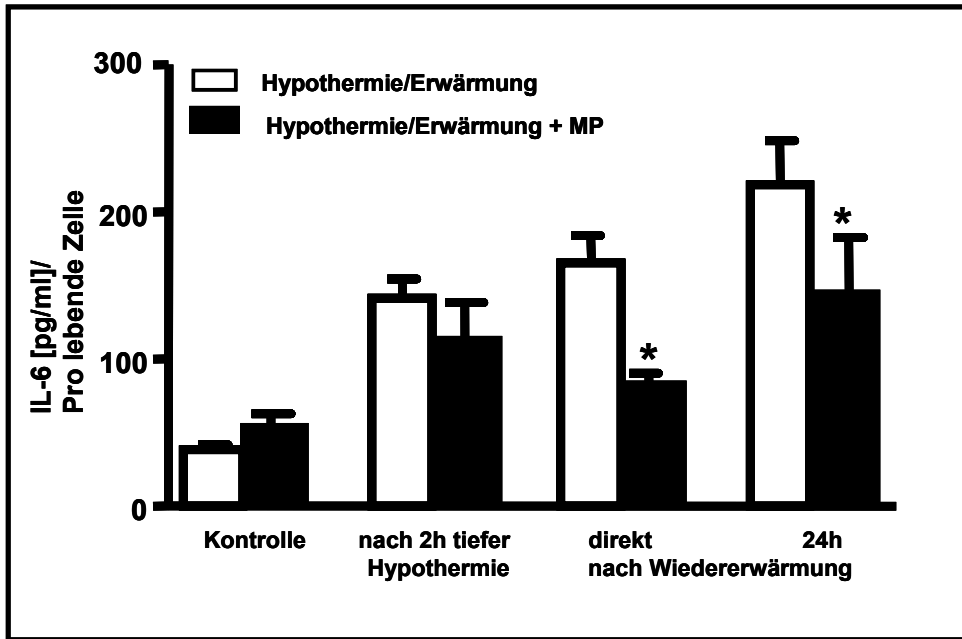


Abbildung 19: IL-6 Freisetzung nach MP Gabe bei primären Neuronen während dynamischer Temperaturveränderungen

Die Gabe von Methylprednisolon führte während der Wiedererwärmungsphase zu einer signifikanten Reduktion der IL-6 Freisetzung, dieser effekt ist auch 24 Stunden nach Wiedererwärmung noch signifikant ($p < 0,01$).*

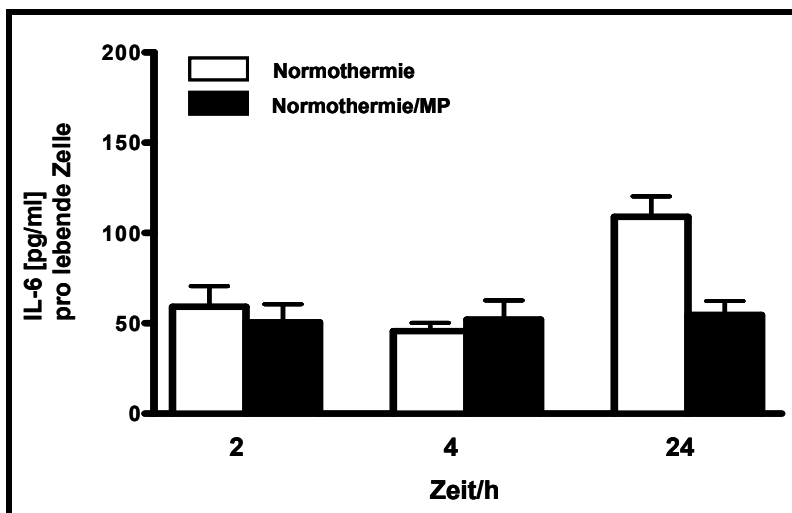


Abbildung 20: IL-6 Freisetzung nach MP Gabe bei primären Neuronen

Die Gabe von Methylprednisolon führte zu keinem Zeitpunkt zu signifikanten Veränderungen der IL-6 Freisetzung unter normothermen Bedingungen

4.4 Untersuchungen in hippocampalen Schnittkulturen

Die morphologische Auswertung wurde für die CA1 Region des Hippocampus unter Berücksichtigung seiner anatomisch-morphologischen Strukturen durchgeführt. Studien haben gezeigt, dass diese Region im Fokus neuronaler Schädigungen liegt, v. a. für hypoxische und hypoglykämische Schädigungen sind die Neurone dieser Region besonders sensibel. Die Schnitte wurden sowohl unter Fluoreszenz als auch unter Durchlicht fotografiert, um eine genaue Eingrenzung der CA1 Region vornehmen zu können.

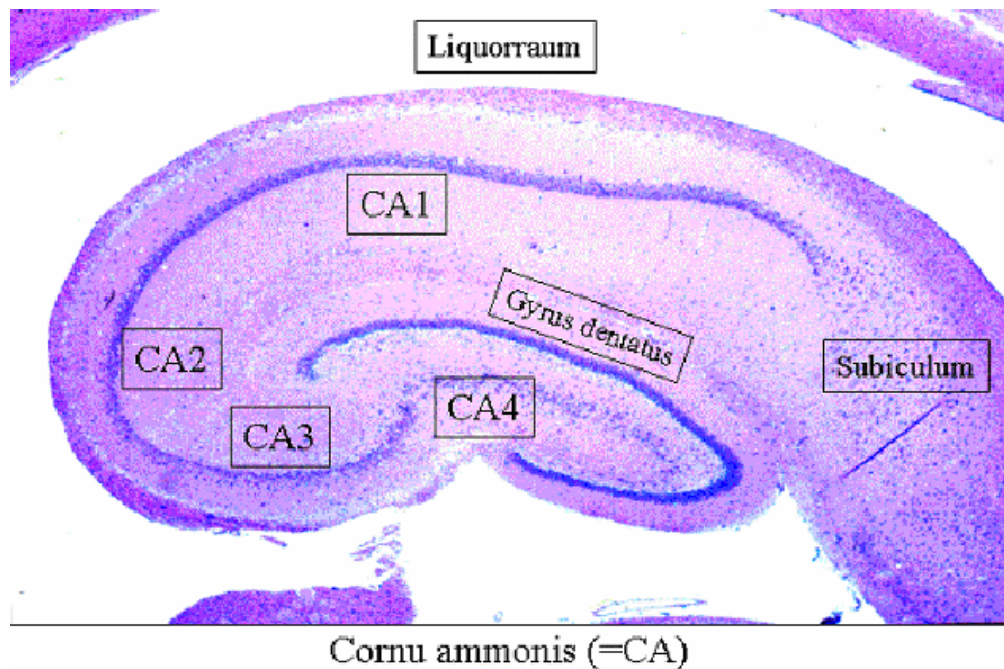


Abbildung 21: Regionen des Hippocampus (Querschnitt)

Dargestellt sind die Regionen des Hippocampus im Querschnitt. Die für die Auswertung des neuronalen Zellschadens ausgewählte Region ist mit CA1 bezeichnet.

Die Hirnschnitte wurden für 4 h mit NMDA geschädigt und zeitgleich für 2 h bei 17° C (siehe 4.1) gekühlt und anschließend wiedererwärmt. NMDA löst eine neuronale Zellschädigung durch die Überaktivierung exzitatorischer Glutamatrezeptoren aus. Nach 48h Wiedererwärmung wurde das Ausmaß der Schädigung evaluiert. Hierzu wurden in den Überständen des Kulturmediums die IL-6 Konzentrationen bestimmt.

Außerdem wurde mit Hilfe einer von Propidiumiodid avitale Zellen angefärbt.

4.4.1 IL-6 Freisetzung

Die IL-6-Freisetzung wird im Medium 24 h nach Wiedererwärmung gemessen. Hierbei zeigte sich eine Reduktion der IL-6 Freisetzung nach Hypothermie, sowohl in den MDA geschädigten OHSK als auch in den ungeschädigten Kontrollen (Abb. 24).

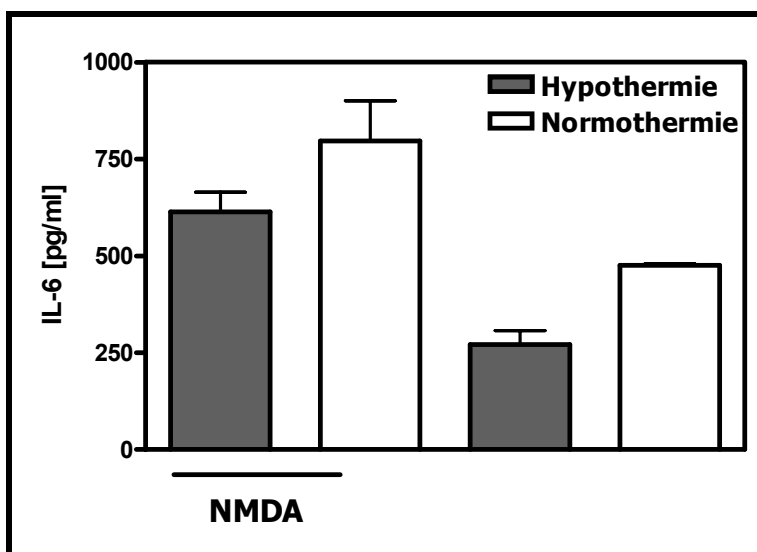


Abbildung 22: Reduktion der IL-6 Freisetzung in OHSK

Dargestellt ist die IL-6 Freisetzung 24 h nach Wiedererwärmung bzw. nach 48 h Kultivierung bei 37° C. Hierbei zeigt sich deutlich, dass tiefe Hypothermie bereits isoliert zu einer Reduktion der IL-6 Freisetzung in OHSK führt.

Die Applikation von S100B auf die NMDA geschädigten Schnitte führt nur unter keinen Bedingungen zu einer Reduktion der IL-6 Freisetzung (Abb. 25). Bei den nicht mit NMDA geschädigten Schnitten zeigte sich, dass S100B die Freisetzung von IL-6 in der Kontrollgruppe erhöht, dieser Effekt war aber nicht signifikant.

Die Gabe von MP zu den NMDA geschädigten Hirnschnittkulturen des Hippokampus führt zu einer signifikanten Reduktion der IL-6 Freisetzung, dieser Effekt zeigt sich sowohl nach Hypothermie und Wiedererwärmung, als auch unter physiologischen Temperaturen (Abb.26).

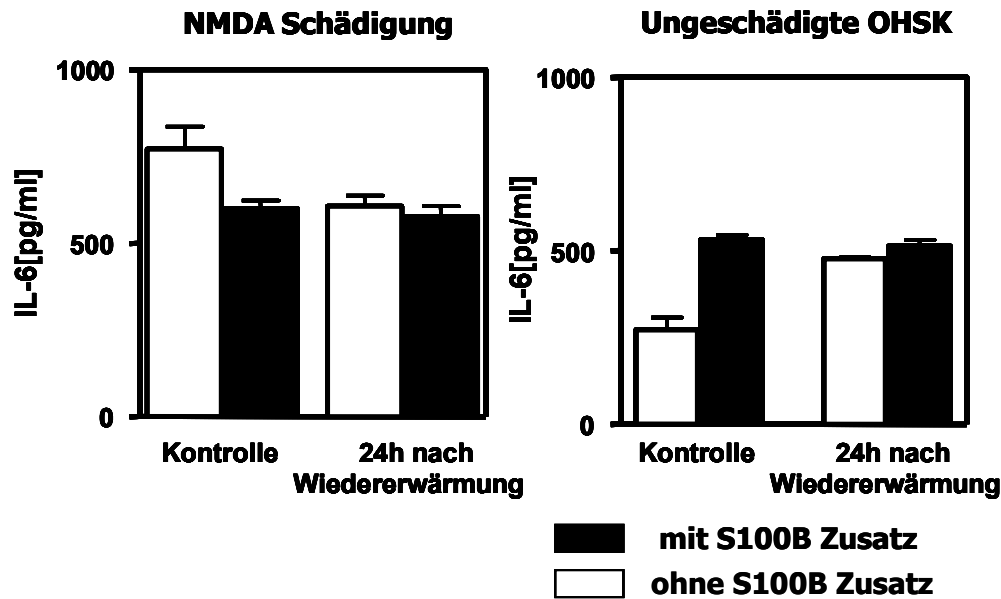


Abbildung 23: IL-6 Freisetzung an OHSK bei S100B Applikation

Dargestellt ist die IL-6 Freisetzung in OHSK 24h nach S100B Zusatz und dynamischen Temperaturveränderungen im Vergleich zu normothermen Kontrollen. Durch S100B Zusatz kann die IL-6 Freisetzung in unserem Modell nicht beeinflusst werden

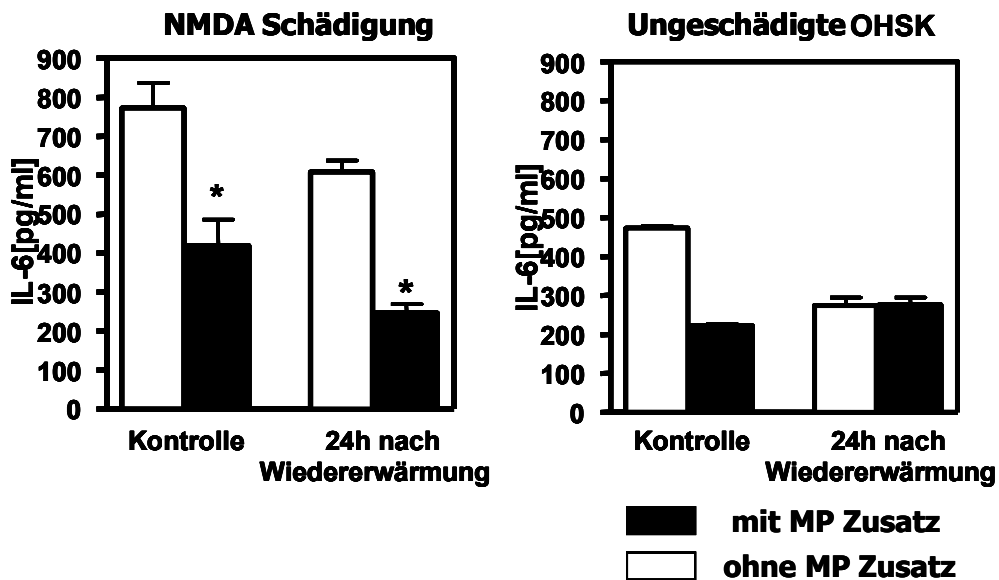


Abbildung 24: IL-6 Freisetzung in OHSK nach MP-Gabe

Dargestellt ist die IL-6 Freisetzung in OHSK 24h nach Methylprednisolonzusatz und dynamischen Temperaturveränderungen im Vergleich zu normothermen Kontrollen. Durch Zusatz von MP zeigt sich eine signifikante Reduktion der IL-6 Freisetzung in allen Versuchsgruppen

4.4.2 Untersuchung zum neuronalen Zelltod in OHSK

Die für 48 Stunden kultivierten Schnitte wurden mit Propidiumiodid gefärbt. Propidiumjodid ist ein roter Fluoreszenzfarbstoff, der durch die geschädigte Membranen toter Zellen gelangt. Er interkaliert mit den Basenpaaren der DNA und färbt die Zellen auf diese Weise rot an. Die Schnitte wurden dann unter dem Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop betrachtet und digital dokumentiert (⁹⁹).

Dabei zeigte sich, dass 2 h tiefe Hypothermie und Wiedererwärmung zu einer deutlichen Reduktion des neuronalen Zelltodes führten. Ohne Vorschädigung durch NMDA zeigten sich keine Unterschiede im neuronalen Überleben in den unterschiedlich behandelten Hirnschnitten (Abb.27-28).

Tabelle 4.7 PI-positive Zellen in CA1 Region

Die Tabellen 4.7 und 4.8 zeigen die quantitative Auswertung der Anzahl PI positiven Zellen in der CA1 Region der Hippokampusformation. Tiefe Hypothermie führt zu einer signifikanten Reduktion des neuronalen Zelltodes in der CA1 Region des Hippokampus.

	Normothermie + NMDA	Hypothermie +NMDA
Kontrollen	93,76 ± 13,16	25,93 ± 4,98 *
Methylprednisolon	20,46 ± 7,27	21,87 ± 8,96
S100B	23,27 ± 7,18	22,73 ± 2,06

Tabelle 4.8 PI-positive Zellen in CA1 Region

	Normothermie	Hypothermie
Kontrollen	13,71 ± 5,38	13,17 ± 6,42
Methylprednisolon	9,65 ± 0,53	10,0 ± 1,1
S100B	9,15 ± 4,52	12,1 ± 0,61

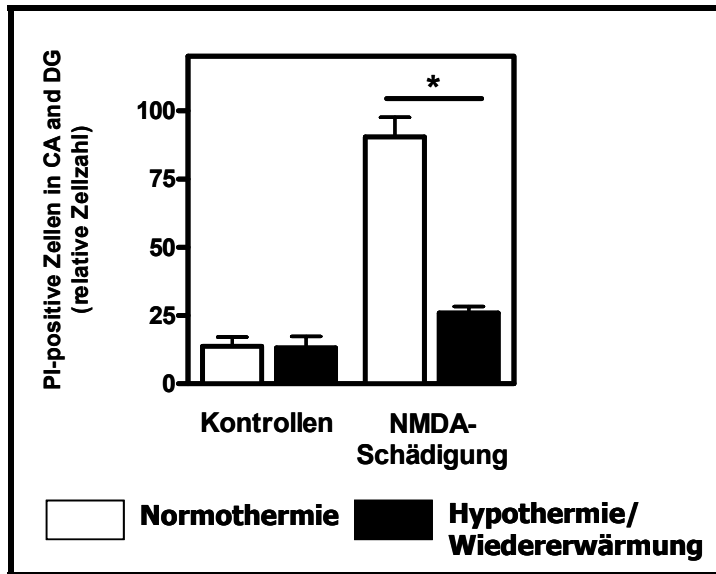


Abbildung 25: Reduktion des neuronalen Zelltodes in der CA1 Region

In der Graphik ist deutlich die signifikante Reduktion des neuronalen Zelltodes durch tiefe Hypothermie in der CA1 Region der OHSK zu sehen. In den oben dargestellten Experimenten ist die besonders wichtige Phase der Wiedererwärmung ebenfalls dokumentiert ($p < 0,01$).*

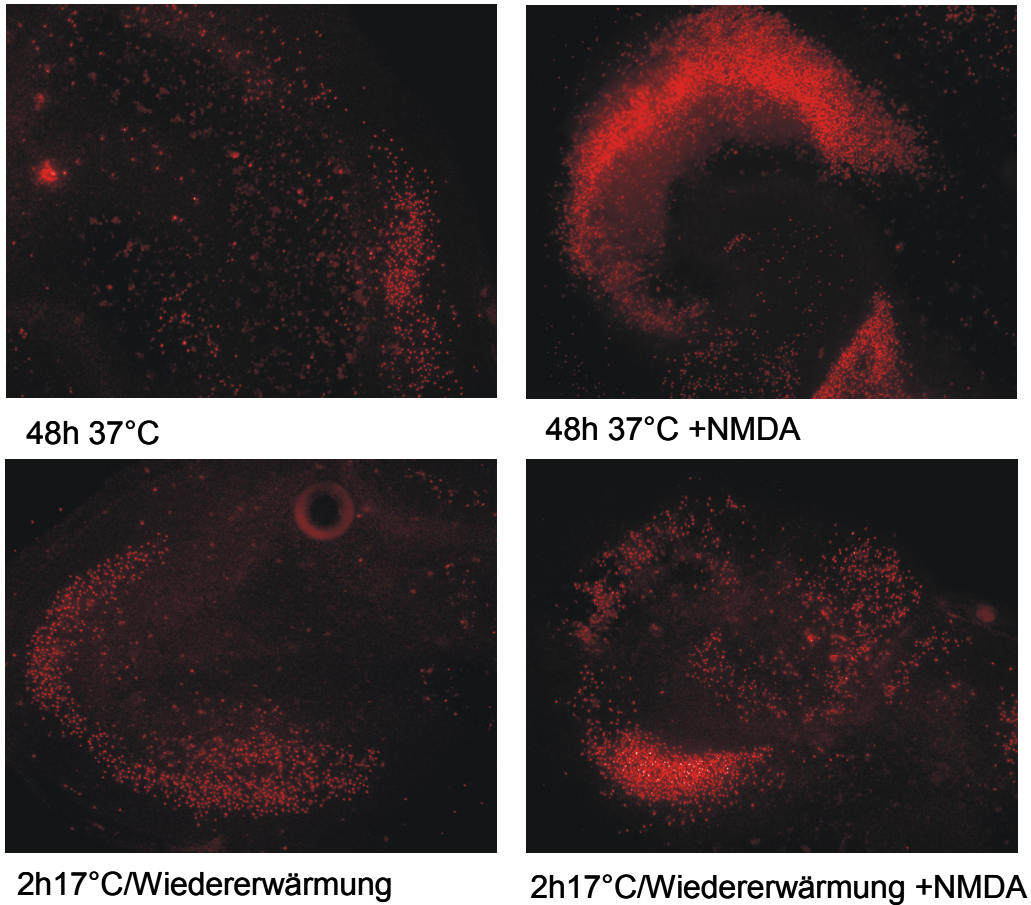


Abbildung 26: PI-gefärbte Hirnschnittkulturen nach tiefer Hypothermie

Dargestellt ist eine PI-Färbung der CA1 Region der Hippokampusformation, rotgefärbt stellen sich avitale Neurone dar, deutlich sichtbare Reduktion des neuronalen Zelltodes durch Hypothermie nach NMDA-Schädigung.

Die Applikation von S100B auf NMDA geschädigten Schnitten führte zu einer signifikanten Reduktion des neuronalen Zelltodes. Dieses Ergebnis ist in den 2 h hypotherm behandelten Schnitten, sowie in den normothermen geschädigten Schnitten zu sehen. Unter normothermen Bedingungen war dieser Effekt ausgeprägter. S100B konnte die durch die Hypothermie getriggerte Reduktion des neuronalen Zelltodes nicht mehr steigern. (Abb. 26-27).

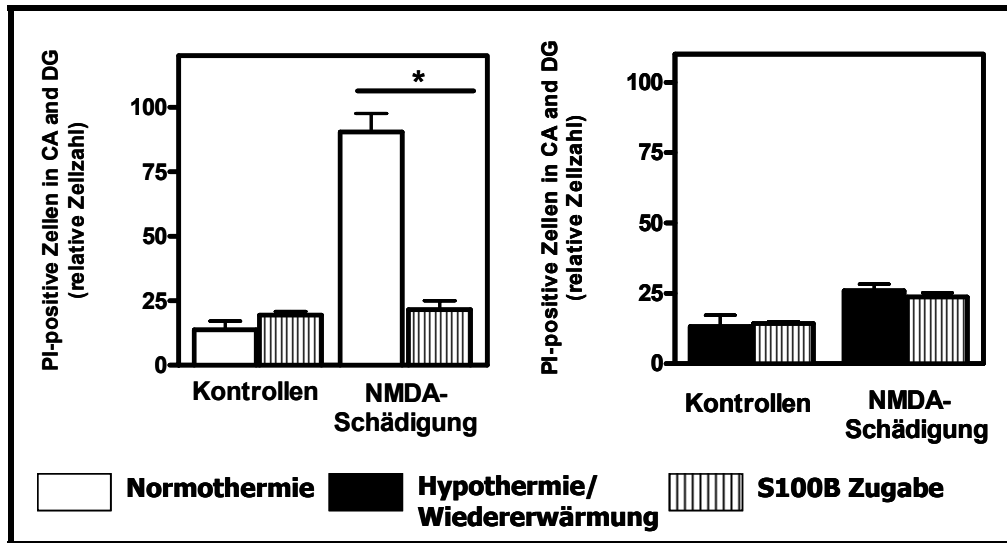


Abbildung 27: Neuronaler Zelltod in der CA1 Region des Hippokampus unter dynamischen Temperaturveränderungen und S100B Applikation

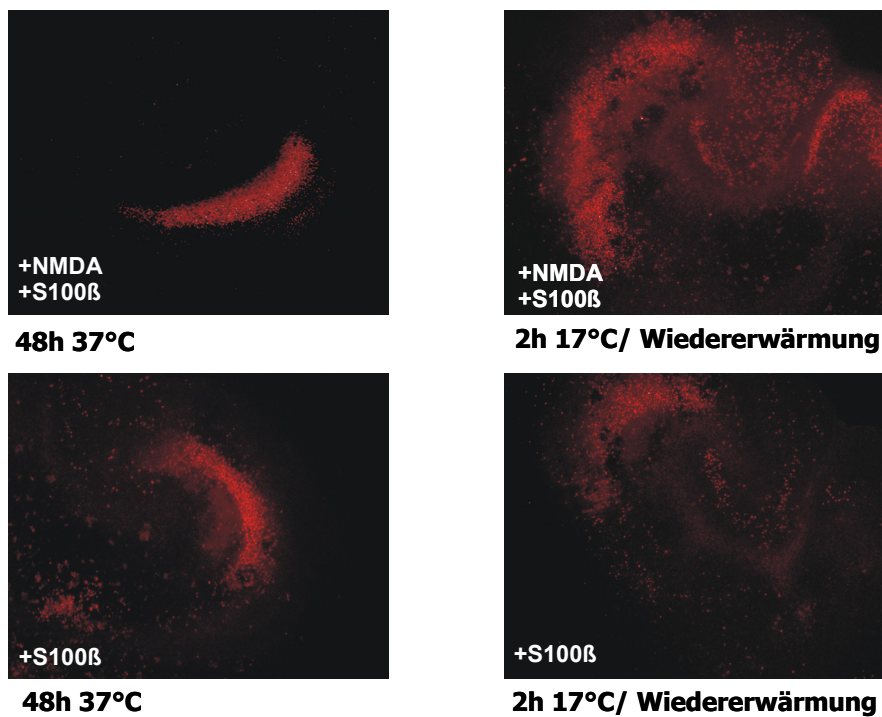


Abbildung 28: Neuronaler Zelltod nach Applikation von S100B in OHSK

Dargestellt sind sowohl PI-gefärbte avitale Zellen der CA1 Region sowie eine graphische Darstellung. S100B reduziert an NMDA geschädigten Neuronen deutlich die Zelltodrate im Vergleich zu den geschädigten normothermen Schnitten.

Die Zugabe von Methylprednisolon bereits während der NMDA Schädigung führt zu einer deutlichen Reduktion des neuronalen Zelltodes, dieser Effekt ist temperaturunabhängig ($p < 0,05$). Bei den ungeschädigten OHSK führt Methylprednisolon zu keiner weiteren Senkung des neuronalen Zelltodes (Abb. 28 +29).

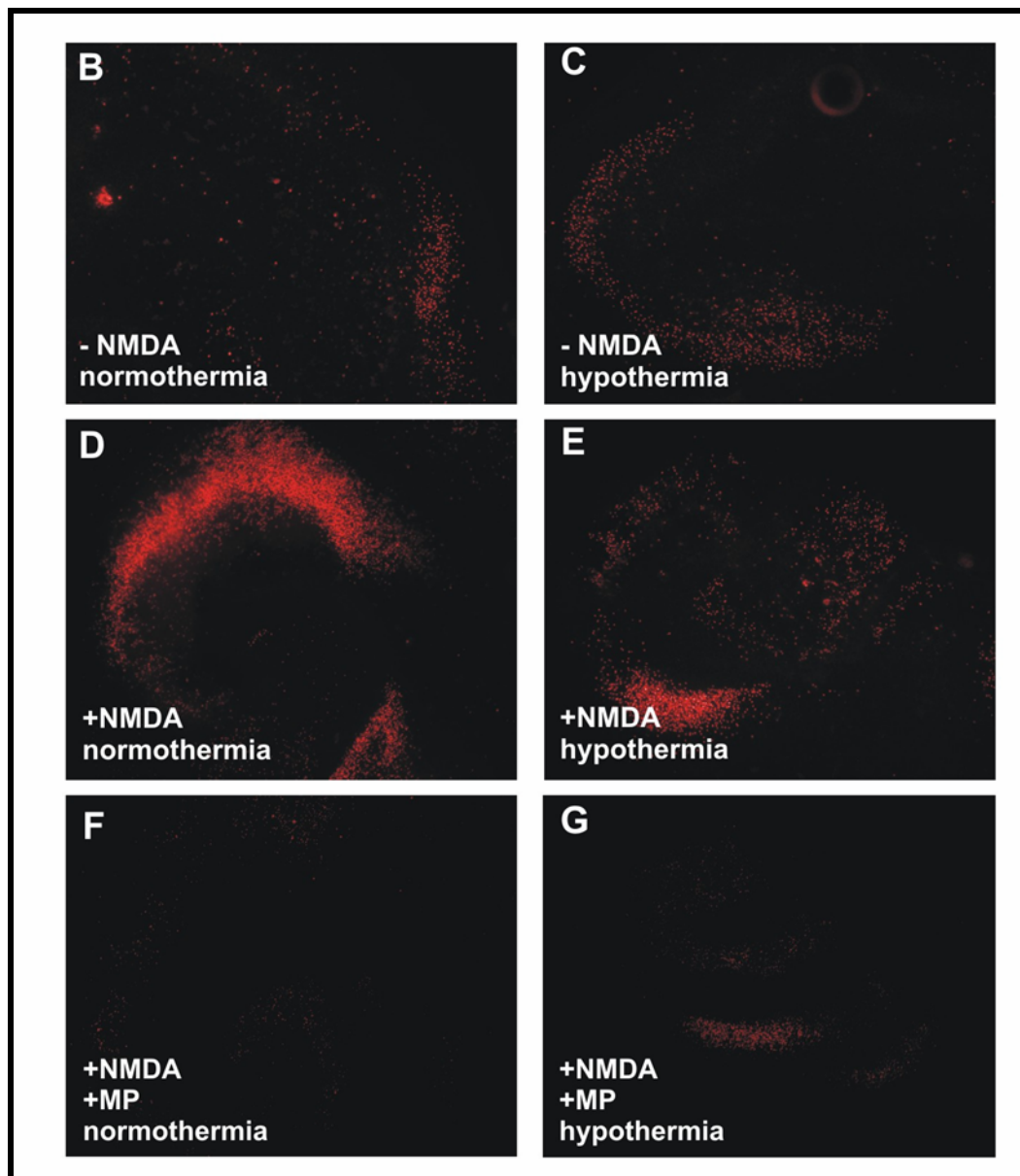


Abbildung 29: Photos PI-gefärbter CA1 Regionen nach MP Applikation

In den oben abgebildeten Fotos zeigt sich in den mit MP behandelten Hirnschnitten eine deutliche Reduktion des neuronalen Zelltodes nach NMDA-Schädigung, sowohl unter Hypothermie, als auch unter normothermen Temperaturen:

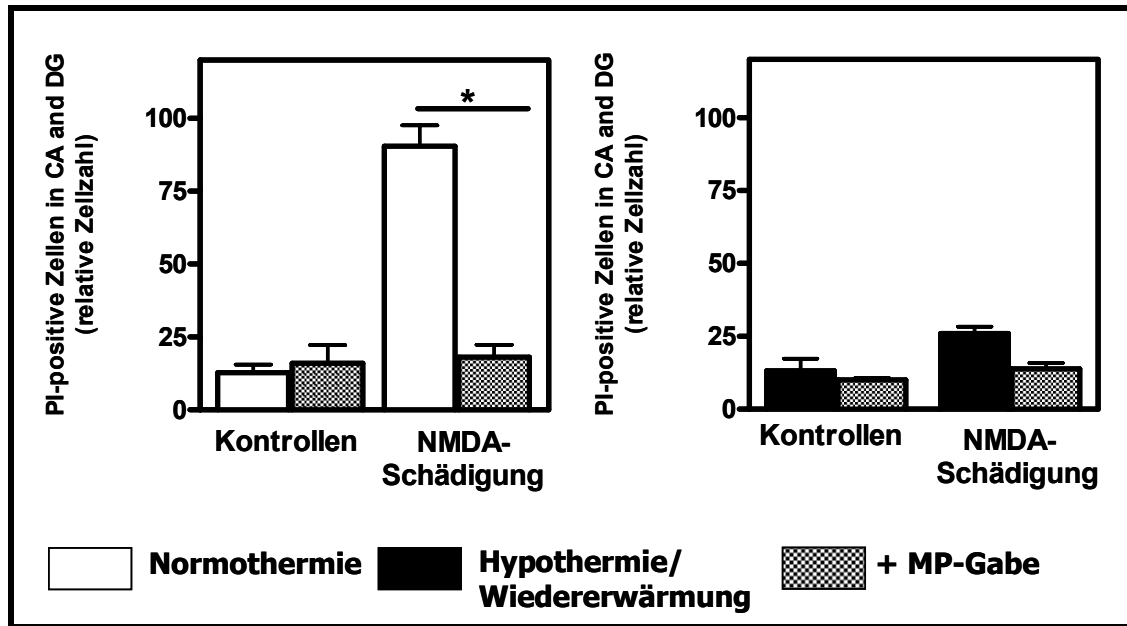


Abbildung 30: PI-positive Zellen der CA1 Region nach Methylprednisolon-Gabe

Deutliche Reduktion der avitalen Neurone nach MP-Gabe in NMDA geschädigten OHSK.

4.4.3 Axonale Aussprossung am Hirnschnitt

Zusätzlich zu den Untersuchungen des neuronalen Zelltodes wollten wir mit Hilfe das axonale Auswachsen in organotypischen Hirnschnittkulturen untersuchen. Die Schnitte wurden in Kollagen fixiert und analog dem Zeit-Temperaturprotokoll zwei Stunden bei 17° C gekühlt und dann nach 24 h bei 37° C mikroskopisch ausgewertet. Die Auswertung erfolgte nach einem festgelegten, etablierten Schema (siehe 3.4). Dazu wurden die Schnitte unter dem Mikroskop betrachtet und in zwei vordere und zwei hintere Regionen eingeteilt. Für jede einzelne Region wurden Punkte nach der Anzahl und Ausrichtung der Axone vergeben. Die Auswertung erfolgte verblindet durch mindestens zwei Personen.

In der Auswertung der axonalen Dichte wurden die vergebenen Punktzahlen des gesamten Schnittes addiert. In dieser Phase der Regeneration reagieren die Neurone in den Hirnschnitten sehr empfindlich auf äussere Einflüsse.

Isolierte tiefe Hypothermie für 2 Stunden führt zu einer signifikanten Steigerung des axonalen Auswachsens ($p < 0.05$) im Vergleich zu den Kontrollschnitten die für 24h bei 37° C kultiviert wurden (Abb. 31).

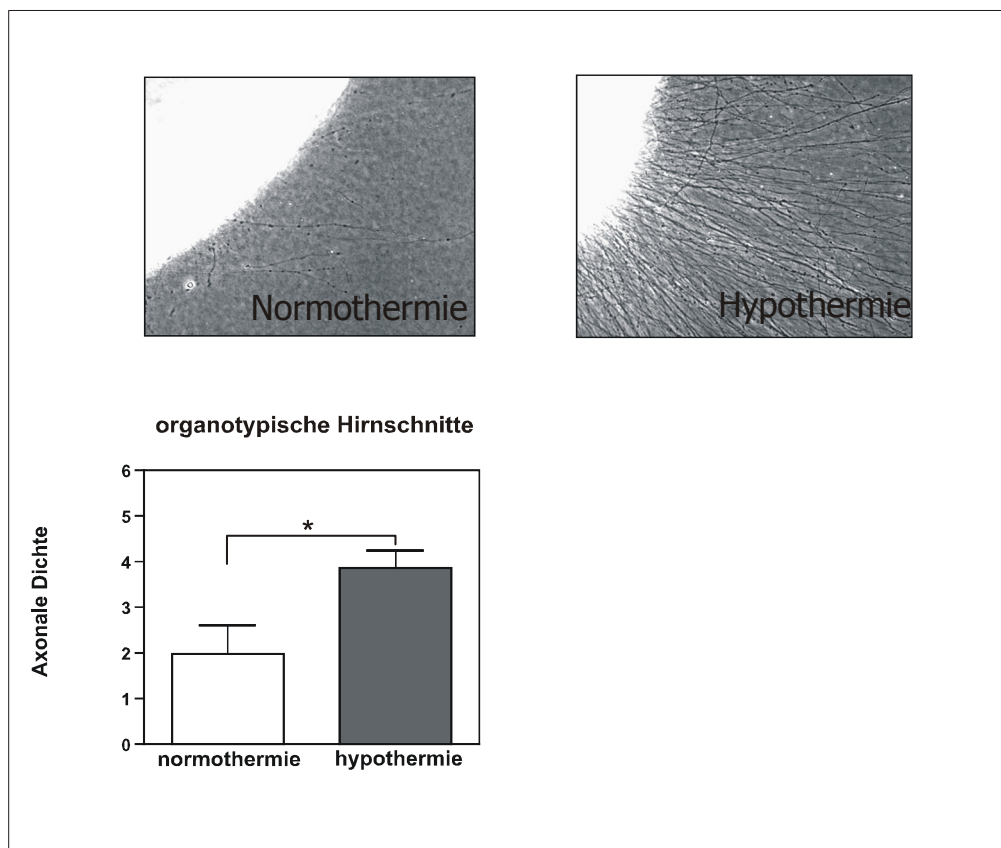


Abbildung 31: Axonales Auswachsen an OHSK

In den oben abgebildeten Photos zeigt sich nach Hypothermie und Wiedererwärmung eine deutlich gesteigerte Anzahl an ausgewachsenen Axonen als nach 24h bei 37° C. Dieser Unterschied war wie in der Graphik dargestellt signifikant ($p < 0,05$).

In den Kollagentropfen den man zum fixieren der Schnitte verwendete konnten beliebig Zusätze hinzugefügt werden, die so in direktem Kontakt mit den Schnittkulturen standen.

Unter hypothermen Bedingungen führte die Applikation von S100B zu einer signifikanten Reduktion des axonalen Auswachsens ($p < 0,05$) im Vergleich zur hypothermen, unstimulierten Gruppe. Dies ist ein Effekt, der unabhängig von der Hypothermie selbst ist, da auch in der normothermen Vergleichsgruppe das axonale Auswachsen durch S100B Gabe gehemmt wird (Abb. 32 $p < 0,05$).

Die Zugabe von Methylprednisolon direkt neben den Hirnschnitt, innerhalb des Kollagentropfens führte zu einer Reduktion des axonalen Auswachsens im Gesamtschnitt bei den gekühlten Schnitten gegenüber den gekühlten Kontrollen ($p < 0,05$). Der Unterschied zwischen den normothermen Kontrollen und den gekühlten Schnitten mit Zugabe von Methylprednisolon bleibt signifikant (Abb. 32, $p < 0,05$). Bei 37° C hat die Gabe von Methylprednisolon keinen Effekt.

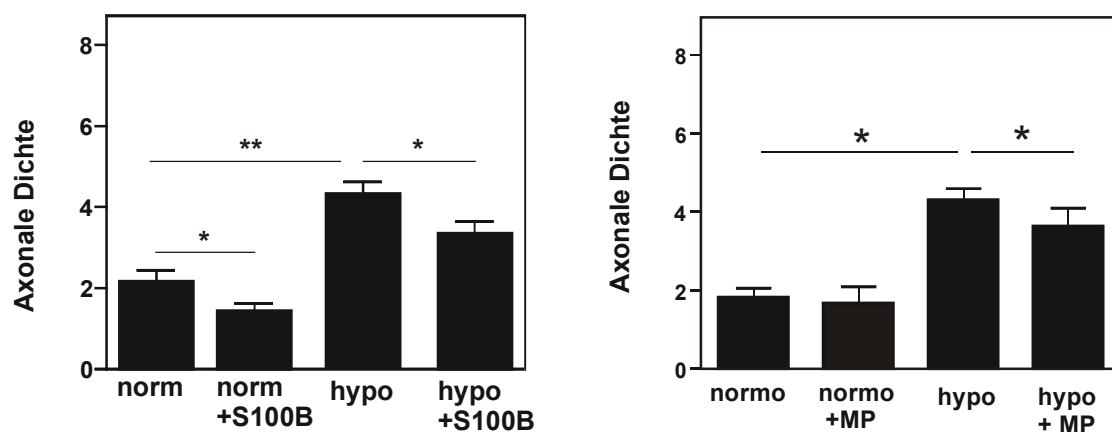


Abbildung 32: Axonales Aussprossen nach Applikation von S100B bzw. MP

Linke Grafik: Die Applikation von S100B reduziert das Aussprossen von Axonen in OHSK signifikant, dieser Effekt ist temperaturunabhängig. ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Rechte Grafik: MP reduziert das hypothermie induzierte Aussprossen von Axonen in OHSK signifikant. (* $p < 0,05$)*

5 Diskussion

Der Pathomechanismus neurologischer Komplikationen im Zusammenhang mit hypothermer Perfusion und tiefhypothermem Kreislaufstillstand ist multifaktoriell und beruht in erster Linie auf abnormen Veränderungen der Gewebepfusion und Störungen der O₂ Verfügbarkeit auf zellulärer Ebene (^{1,2,101,102}).

Seit Einführung der extrakorporalen Perfusion zur Korrektur intrakardialer Malformationen im Säuglings- und Kleinkindesalter galt die Hypothermie als Mittel erster Wahl zur Neuro- und Kardioprotektion. In der Tat, ohne Hypothermie sind eine low-flow Perfusion oder ein totaler Kreislaufstillstand während dieser Korrekturoperationen nicht möglich. Die Störung der zerebralen Oxygenation und Perfusion wurde in den letzten 10 Jahren experimentell und klinisch untersucht, der isolierte Effekt der Hypothermie auf zerebraler Zellebene ist jedoch noch wenig untersucht (¹⁰³⁻¹⁰⁸). Zusätzlich zu vorangegangenen klinischen und tierexperimentellen Untersuchungen zu diesem Thema wurde zur genaueren Untersuchung des Effektes der dynamischen Temperaturveränderungen auf Hirnzellen ein Zellkulturmodell mit solitären Zelllinien etabliert. Neben der quantitativen Evaluation der Zellschädigung wurden definierte Zellsignalveränderungen, z. B. des inflammatorischen Zytokines IL-6, sowie die Freisetzung von Stickstoffmonoxid untersucht. TNF-alpha wurde initial ebenfalls bei den glialen Zellen untersucht, es zeigte sich jedoch während der Versuche, dass unter den gewählten Bedingungen keine wesentliche Veränderung der TNF-alpha Freisetzung messbar war.

IL-6 ist ein proinflammatorisches Zytokin, von dem bekannt ist, dass es sowohl von Astrozyten (^{43,109}), Mikrogliazellen (^{43,109}) als auch Neuronen (⁴⁴) produziert wird. Auffällig ist die Pluripotenz des Zytokins, denn es ist an vielen biologischen Prozessen beteiligt, z. B. als Induktor von Akute Phase Proteinen und als Differenzierungs- und Wachstumsfaktor im Blutbildungs- und Nervensystem. Im Zentralnervensystem ist IL-6 an einer Vielzahl von Funktionen destruktiver, aber auch neurotropher Art beteiligt. Eine Vielzahl von *in vivo* und *in vitro* Studien konnte die Beteiligung von IL-6 beim Schutz von Neuronen, an der neuronalen Differenzierung und dem neuronalen Wachstum zeigen (^{45,46}). Bei den verschiedenen neurologischen Erkrankungen (z. B. Meningitis, M. Alzheimer, MS) werden erhöhte IL-6 Spiegel im Liquor gefunden (⁴⁸). IL-6 beeinflusst die Ausschüttung von neurotrophischen, aber auch inflammatorischen

Molekülen. Es ist bekannt, dass die verstärkte Expression von IL-6 in einer zentralen Produktion inflammatorischer Zytokine resultiert (⁴⁹⁻⁵²).

5.1 Einfluss der tiefen Hypothermie

Tief hypotherme Perfusion ist klinisch weiterhin bei Korrekturoperationen komplexer, angeborener Vitien verbreitet. Es wird angenommen, dass tiefe Hypothermie den Zellstoffwechsel reduziert und so die ischämische Toleranz der Hirnzellen erhöht wird. Das vorliegende Modell zeigt, dass isolierte tiefe Hypothermie (17° C) für 2 h zu einer signifikanten Erhöhung der IL-6 Konzentrationen sowohl bei Astrozyten, BV-2 Mikroglia, als auch bei primären Neuronen im Vergleich zu den normothermen Kontrollen führt. Wir konnten zeigen, dass Astrozyten bereits nach 2 h tiefer Hypothermie vermehrt IL-6 ausschütten. Für IL-6 werden sowohl neuroregenerative, als auch destruktive Effekte beschrieben. Es ist also möglich, dass die durch Hypothermie induzierte IL-6 Ausschüttung ein Kompensationsmechanismus für die erhöhte Zelltodrate darstellt.

In einer Studie von Bissonette et al. konnte gezeigt werden, dass tiefe Hypothermie (17° C) inklusive der darauffolgenden Wiedererwärmung zu erhöhten extrazellulären Glutamatkonzentrationen und zu erniedrigten intrazellulären Glykogenkonzentrationen in primären Astrozytenkulturen führt. Diese Effekte gelten als Indikatoren für Zellaktivierung von Astrozyten (¹⁸). Direkt nach der Wiedererwärmung gab es bei Astrozyten keine signifikanten Unterschiede zu den normothermen Kontrollen. Dies impliziert, dass die Aktivierung der Zellen trotz des verringerten Zellstoffwechsels direkt während der Kühlung erfolgt.

Si et al. konnten zeigen, dass moderate Hypothermie (30° C) initial zu einer Suppression der NO- und Superoxid-Produktion in primärer Mikroglia und zu einer verminderten Mikrogliaaktivierung führt. Diese Suppression der Zellaktivität ist aber nur nach vorheriger Stimulation mit LPS sichtbar (^{110,111}). Gibbons et al. konnten diese Erkenntnisse an mit LPS stimulierten BV-2 Zellen bei 33° C zeigen. Sie wiesen aber auch nach, dass milde Hypothermie allein keinen Effekt auf die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine hat (¹¹²). In den vorliegenden Studien konnten wir zeigen, dass unstimulierte BV-2 Zellen unter Hypothermie mehr IL-6 ausschütten und so eine erhöhte Mikrogliazellaktivierung anzunehmen ist. Dieser Effekt ist somit allein

auf die Veränderung der Temperatur zurückzuführen. Im Gegensatz zu vergleichbaren Studien (^{112,113}) konnte keine Reduktion der NO Produktion in Mikrogliazellen gezeigt werden. Hypothermie als alleiniger Stimulus führt zu keiner Veränderung der NO-Ausschüttung. NO zeigt durch seine Eigenschaft als freies Radikal eine Vielzahl neurotoxischer Effekte und Mechanismen. Eine der wichtigsten Reaktionen dabei ist die Entstehung von Peroxynitrit, das direkt zytotoxisch wirkt. NO als Mediator bei inflammatorischen Prozessen kann also durch Hypothermie nicht in seiner Freisetzung gehemmt werden und kann so über Kumulation zu einer inflammatorischen Begleitreaktion führen. Die inflammatorische Reaktion kann durch die erhöhte Freisetzung von IL-6 weiter angestoßen werden und so zu einer Schädigung vor allem neuronaler Zellen führen.

5.2 Einfluss von S100B während der Hypothermie

Das Protein S100B ist eines der wichtigsten Ca-bindenden Proteine im ZNS und spielt eine Rolle in trophischen Prozessen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen (⁵⁸). Durch die Entwicklung von neuen, sensiblen Messsystemen konnte das Protein S100B im Serum und im Liquor quantitativ bestimmt werden. Erhöhte Freisetzung in Liquor und Serum wurden nach zerebraler Schädigung durch Traumata und nach herzchirurgischen Eingriffen gemessen (^{70,73,74}). Insbesondere zeigte sich ein Zusammenhang zur hypothermen Perfusion. Bei S100B Messung in klinischen Studien wurden im Serum der Patienten Konzentrationen von 2-10 ng/l gemessen. Für die Messung im Liquor von Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma liegen ausgewählte Werte im Bereich von 2,7-81,4 ng/l vor (⁷⁰). Aus diesem Grund haben wir eine S100B Konzentration von 40 ng bzw. 100 ng/ml ausgewählt, da diese Konzentrationen auch *in vivo* im Extrazellulärraum des Gehirns erreicht werden können. Basierend auf experimentellen Studien, nach welchen Hypothermie mit astroglialen Schädigungen und erhöhten S100B Werten einhergeht (⁷²), haben wir die Rolle des S100B unter hypothermen und normothermen Temperaturen in verschiedenen Zellkulturen evaluiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter hypothermen Bedingungen sowohl bei Astrozyten, Mikrogliazellen als auch bei Neuronen die IL-6 Freisetzung modifiziert wird. Nach 2 h tiefer Hypothermie zeigt sich bei Astrozyten

nach Inkubation der Zellen mit S100B ein synergistischer Effekt in der Verstärkung der IL-6 Ausschüttung. Interessanterweise stimuliert S100B auch in der normothermen Astrozytenkultur die Ausschüttung von IL-6. Die Induktion der NO Freisetzung konnte für mikromolare Konzentrationen für Astrozyten nachgewiesen werden (^{66,67}). In den Experimenten wurde gezeigt, dass die Gabe von S100B die Ausschüttung von NO weder unter normothermen, noch nach 2 h tiefer Hypothermie beeinflusst. Dies lässt darauf schließen, dass S100B zwar zur Ausschüttung des immunmodulatorischen Zytokins IL-6 führt, aber andere zytotoxische Mediatoren, wie z. B. die Freisetzung von Stickstoffmonoxid, nicht beeinflusst.

Li et al. (¹¹⁴) zeigten, dass S100B dosisabhängig die Ausschüttung von IL-6 in der Neuronenkultur induziert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nanomolare Konzentrationen von S100B unter normothermen Bedingungen keinen Effekt auf die IL-6 Freisetzung bei Neuronen haben. Der durch Hypothermie induzierte IL-6 Anstieg bei Neuronen konnte durch Preinkubation mit S100B signifikant verringert werden. Ahlemeyer et al. konnten zeigen, dass S100B [1-10 ng/ml] Neurone vor glutamat- und staurophorininduziertem Zelltod schützt (¹¹⁵). Ebenso schützt S100B in nM Konzentrationen vor neuronalem Zelltod durch Glucosedeprievation (¹¹⁶). In der Neuronenkultur konnte gezeigt werden, dass S100B in einer nanomolaren Konzentration den durch Hypothermie vermittelten Zelltod reduziert. Dies ist auch nach quantitativer Auswertung in einer Reduktion der Zelltodrate zu sehen (vgl. LDH Daten 4.2.2).

In den BV-2 Mikrogliazellen führt die Gabe von S100B nach Hypothermie zu einer Suppression der IL-6-Freisetzung. Die NO Freisetzung ist auch bei Mikrogliazellen nach S100B Gabe unbeeinflusst. In anderen Studien konnte ein Anstieg der NO Freisetzung nur in Kombination mit TNF-alpha gezeigt werden (¹¹⁷). In der vorliegenden Arbeit beeinflusste die Preinkubation mit S100B zwar die durch Hypothermie vermittelte Zytotoxizität nicht, wohingegen die Freisetzung von IL-6 deutlich gesenkt wurde. Zusammenfassend kann man sagen, dass S100B die Mikrogliaaktivierung suppremiert. Dies stützt die Annahme eines reaktiven neuroprotektiven Effektes von S100B in nM Konzentrationen. Diese Ergebnisse und Schlussfolgerungen müssen aber in weiterreichenden Experimenten bestätigt werden.

Die Untersuchung der neuronalen Aussprossung von Axonen in OHSK diene der Bestimmung von äußeren Einflussfaktoren in dieser vulnerablen Phase der Zellen. Die Schnitte werden dazu in einem Kollagentropfen fixiert, innerhalb des Kollagens befindet sich das S100B. Bei der lichtmikroskopischen Auswertung kann nun evaluiert werden, ob dieser Zusatz zu einer Beeinflussung des Axonenwachstums führt.

In den mit S100B präparierten OHSK zeigte sich eine deutliche Reduktion des axonalen Auswachsens. Dieser Reduktionseffekt hinsichtlich der Neuroregeneration ist sowohl in den normothermen Schnitten, als auch in den gekühlten Schnitten zu sehen. Winnigham et al. (¹¹⁸) zeigten, dass in einer Einzelzellkultur von Neuronen nach S100B Gabe die Anzahl von „Neurit Bearing Cells“ erhöht war. Am Modell des peripheren Nervens konnte gezeigt werden, dass die Injektion von S100B axonale Regeneration nach Verletzung fördert (⁶⁰). Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass S100B in organotypischen Hirnschnitten das Auswachsen von Axonen unterdrückt. S100B kann in nanomolaren Konzentrationen die durch Hypothermie vermittelte Zellaktivierung in Mikrogliazellen und Neuronen reduzieren. Hu et al. konnten ebenfalls zeigen, dass S100B in einer Einzelzellkultur mit Neuronen zu keiner Veränderung der Morphologie oder zur Erhöhung der Apoptoserate führt (⁶⁷). In der gleichen Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass S100B über die Induktion der iNOS zu einer erhöhten Apoptoserate bei Neuronen führt. In der hier vorliegenden Arbeit konnte keine signifikant erhöhte Freisetzung von NO bei primären Astrozyten durch S100B Gabe nachgewiesen werden, wohingegen sich die Ausschüttung von IL-6 erhöhte. In den OHSK zeigte sich, dass S100B nach NMDA-Schädigung den neuronalen Zelltod und die IL-6 Freisetzung reduziert. Diese Effekte sind vor allem unter normothermen Bedingungen nachweisbar.

In den vorliegenden Studien scheint vor allem die Konzentration von S100B eine große Rolle zu spielen. Die in dieser Arbeit genutzte Konzentration scheint in der isolierten Zellkultur nur zu einer Freisetzung von IL-6 zu führen und den neuronalen Zelltod im OHSK nicht zu beeinflussen.

Diese Ergebnisse können zum Teil die Funktion und die Auswirkungen von S100B unter Kühlung und Erwärmung erklären. Die genauere Funktion bleibt aber weiter unklar und bedarf weiterer Untersuchungen der Zellsignale und der Interaktion zwischen Astrozyten und Neuronen unter nichtphysiologischen Bedingungen.

5.3 Einfluss der Behandlung mit Methylprednisolon während der Hypothermie

Methylprednisolon (MP) ist eines der am häufigsten verwendeten Pharmaka zur Prävention systemisch inflammatorischer Reaktionen (SIRS) bei kardiochirurgischen Eingriffen⁽⁸⁸⁾. Die extrakorporale Zirkulation stellt mit der Herz-Lungen-Maschine, den Schläuchen und der damit sehr großen Fremdoberfläche, durch die das Blut gepumpt wird, ein großes Risiko für eine inflammatorische Reaktion dar. Eine systemische Inflammation führt zu einer massiven Freisetzung inflammatorischer Mediatoren und zu einer Aktivierung des Komplementsystems, all dies erfolgt ebenso im ZNS.

MP reduziert die Freisetzung inflammatorischer Zytokine während kardiochirurgischer Eingriffe. Der genaue Mechanismus des neuroprotektiven Einflusses von MP ist noch nicht völlig aufgeklärt. Verschiedene Mechanismen scheinen hierbei eine Rolle zu spielen. MP reduziert die Freisetzung von excitatorischen Aminosäuren⁽⁷⁹⁾, der zerebrale Blutfluss wird verbessert^(119 120). Des Weiteren hat MP einen ödemreduzierenden Effekt⁽⁷⁵⁾ und inhibiert die Mikrogliazellaktivierung und verringert so die zelluläre Immunantwort im ZNS^(121,122). Trotz dieser nachgewiesenen Effekte, zeigen Studien nach Gabe von MP keine oder gegenteilige Effekte⁽⁸⁸⁾ im klinischen Outcome nach kardiochirurgischen Eingriffen. Die preoperative Gabe von MP in hohen Dosen ist, unabhängig von den kontrovers diskutierten Effekten, klinischer Standard bei kardiochirurgischen Eingriffen im Kindes- und Erwachsenenalter⁽⁸⁸⁾. Der Zeitpunkt und die Art der Applikation sowie die Dosierung von MP variierten in diesen Studien stark und dies könnte eine Erklärung für die divergierenden Ergebnisse sein. Vor allem wurde häufig vermutet, dass normotherme Temperaturen die inflammatorische Reaktion induzieren. Aus diesem Grund wird die preoperative Gabe von MP vor allen herzchirurgischen Eingriffen empfohlen.

Unsere Arbeitsgruppe hat bereits in einem klinisch äquivalenten Tiermodell keinen Vorteil der systemischen Vorbehandlung hinsichtlich der Verminderung der neuronalen Zellschädigung in neonatalen Ferkeln durch Methylprednisolongabe nachweisen können. Im Gegensatz: In dieser Studie zeigte sich eine erhöhte Apoptoserate der Neurone im Hippokampus der mit MP vorbehandelten Tiere^(72,89).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von MP Applikation unter hypothermen

Bedingungen auf isolierte neuronale und gliale Zellkulturen untersucht.

In der neuronalen Zellkultur zeigte sich, dass sowohl die Überlebensrate der Neurone nach MP-Gabe signifikant gestiegen war als auch die Freisetzung von IL-6 reduziert wurde. Gleiche zelluläre Effekte zeigten sich auch in der astrozytären Zellkultur und bei den BV-2 Mikrogliazellen. Die Reduktion von IL-6 durch MP ist ein gut bekannter, nachgewiesener Wirkmechanismus bei inflammatorischen Reaktionen. Yilmaz et al. konnten zeigen, dass bereits "low dose,, Gaben von MP (1 mg/kg), welches systemisch appliziert wurde, zu einer Reduktion der IL-6 Konzentrationen im Blut führte (¹²³). Dieses Ergebnis konnten wir bei direkter Applikation in die Zellkultur für alle Zelllinien bestätigen. Es zeigt sich, dass MP in der Lage ist, das Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen nach CPB und Hypothermie im Serum der Patienten wiederherzustellen (^{88,123}). Aber dies scheint keine Auswirkung auf das klinische Gesamtbild des Patienten oder die Langzeitfolgen nach CPB zu haben (^{83,88}). In den wenigen Studien, die Zellmorphologie, Apoptose und Nekrose untersuchten, konnten negative Effekte im Sinne einer erhöhten Apoptoserate der Neurone nach systemischer MP Gabe gezeigt werden (⁸⁹). So stellt sich die Frage nach den längerfristigen Auswirkungen der MP-Gabe sowie der Applikationsform. Die Wirkung des systemisch verabreichten MP erreicht erst nach zwei Stunden ihre maximale Wirkung und bei einmaliger Gabe sinkt die Wirkkonzentration bereits nach 4 h wieder ab (¹²⁴). Systemisch verabreicht erreicht die Liquorkonzentration nur zirka 1/10 der Serumkonzentration (¹²⁵).

In der vorliegenden Arbeit wurde MP direkt in das Zellkulturmedium appliziert. Diese Darreichungsform entspricht *in vivo* der intrathekalen Gabe. Deshalb wurde eine niedrige MP Konzentration verwendet.

In den OHSK konnte MP die neuronale Zelltodrate nach NMDA Schädigung signifikant senken. Interessanterweise zeigte sich, dass die Gabe von MP keinen zusätzlichen neuroprotektiven Effekt nach 2-stündiger Hypothermie hatte. Dies könnte einerseits zu der Annahme führen, dass die durch Hypothermie ausgelöste Reduktion der IL-6 Ausschüttung über einen ähnlichen Mechanismus vermittelt wird wie durch MP selbst und dies nicht mehr steigerbar ist. Andererseits könnte ebenso der stark reduzierte Stoffwechsel der Zelle durch fehlende zytosolische Rezeptorexpression keine Möglichkeit zur Wirkungsentfaltung bieten.

In Anbetracht der Ergebnisse in den Einzelzellkulturen zeigt sich aber, dass weiterführende Experimente an Zellverbänden nötig sind, um eine exaktere Aussage treffen zu können. In der Einzelzellkultur zeigte sich nämlich nach Wiedererwärmung, dass MP in der Lage war, die ansteigenden Zelltodraten und die IL-6 Ausschüttung im Vergleich zur alleinigen Hypothermie zu reduzieren. In den in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten tierexperimentellen Studien an neonatalen Ferkeln zeigte sich, dass Methylprednisolon die Apoptoserate von Neuronen in ausgewählten Hirnregionen steigert und so ein eindeutig negativer Effekt zu verzeichnen war ⁽⁸⁹⁾.

Interessanterweise zeigte sich in den Hirnschnitten, dass das axonale Auswachsen durch MP gehemmt wurde. Dies könnte ein Zeichen für eine durch MP gehemmte neuronale Regeneration sein. Das Wirkprinzip, das zu diesem Effekt führt, ist nicht erforscht und könnte einen weiteren Ansatzpunkt in der Erforschung der Effekte von MP auf neuronale Strukturen bieten.

5.4 Untersuchungen im Zellverband am Modell der OHSK

Die entorhinal-hippokampale Formation dient als ein weit verbreitetes Modellsystem, um die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen zu untersuchen. Die Gründe dafür sind zum einen die klinische Relevanz, da sich neuronale Schädigungen sehr früh im Hippokampus zeigen und Schädigungen zu bleibenden kognitiven und anamnestischen Ausfällen führen können und zum anderen die relativ einfache Zytoarchitektur, die charakteristische Eigenschaften der kortikalen Organisation aufweist ^(97,126,127). In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem organotypischen hippokampalen Schnittkulturmodell gearbeitet. In diesen Schnittkulturen liegen nach neun Tagen *in vitro* in den inneren Zonen auch bezüglich nicht-neuronaler Zellen organotypische Verhältnisse vor. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, einen neuronalen Degenerationsprozess in organotypischen hippokampalen Schnittkulturen zu induzieren: Durch die *in vitro* durchgeführte Läsion des entorhinalen Kortex kann eine experimentelle Deafferenzierung der äußeren Molekularschicht des Gyrus dentatus erreicht werden. Der Einsatz verschiedener Noxen, wie beispielsweise NMDA oder Kainat, bewirkt eine chemische Läsion des Gewebes. NMDA vermittelte neuronale Zellschädigung kommt in experimentellen Studien auch nach herzchirurgischen Eingriffen vor.

In dieser Arbeit wurde NMDA verwendet, um in den hippokampalen Schnittkulturen eine exzitotoxische Schädigung hervorzurufen. NMDA ist ein Aminosäureanalogon und Agonist für den NMDA-Rezeptor und kann somit die ionotropen Glutamatrezeptoren aktivieren. NMDA kommt normalerweise nicht im Gehirn vor. Es löst einen Primärschaden im Gewebe durch Überaktivierung der exzitatorischen Aminosäurerezeptoren (NMDA-Rezeptoren) aus. Dies führt, wie bei der Glutamaterexzitotoxizität, zu einem massiven Kalziumeinstrom durch NMDA-aktivierte Kanäle in die Zelle (¹²⁸). Als Folge davon werden intraneuronal Sauerstoffradikale gebildet, die mit Makromolekülen reagieren und akkumulieren können und letztlich zum neuronalen Zelltod führen können. Tiefe Hypothermie führt nach exzitotoxischer Schädigung in OHSC zu einer Verringerung des neuronalen Schadens. Die Freisetzung von IL-6 wird ebenfalls reduziert. Im Gegensatz zur Einzelzellkultur führt tiefe Hypothermie im organotypischen Gewebsverband nicht zu einer erhöhten Zelltodrate. Möglicherweise schützt dieser organotypische Gewebsverband Neurone vor einem durch Hypothermie induzierten Zelltod.

In OHSK konnte gezeigt werden, dass S100B den neuronalen Schaden nach NMDA Schädigung reduziert. Somit kann der durch Hypothermie vermittelte Effekt nicht weiter positiv verstärkt werden. S100B führt hier zu einer Reduktion des neuronalen Zelltodes. Dies ist als Bestätigung des Ergebnisses der neuronalen Einzelzellkultur zu sehen. Da im organotypischen Hirnschnitt sowohl neuronale als auch gliale Zellen vorliegen, kann vermutet werden, dass die Verringerung des neuronalen Schadens einerseits direkt, andererseits über eine Reduktion der Mikrogliaaktivierung erfolgt. Durch die Applikation von S100B wird die IL-6 Freisetzung in den normotherm behandelten Schnitten gesenkt und kann den Effekt der Hypothermie nicht weiter verstärken.

Bei Gabe von MP in das Kulturmedium konnte gezeigt werden, dass der neuronale Zelltod nach NMDA-Schädigung verringert wurde, dieser Effekt war temperaturunabhängig. Die direkte Gabe von MP in das Kulturmedium führt, vergleichbar mit der intrathekalen Gabe, zu einer Reduktion des durch NMDA vermittelten Zellschadens und zu einer Reduktion der IL-6 Freisetzung durch alle im Schnitt vorhandenen Zellen. Dies stützt die Aussagen, dass die intrathekale Gabe von MP die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine reduziert und so neuroprotektiv wirkt. Da diese Ergebnisse aber nur 24 h nach Schadensinduktion evaluiert wurden,

können keine Aussagen über die weiteren Auswirkungen und die Langzeiteffekte der MP-Applikation gemacht werden.

5.5 Zusammenfassung

Diese laborexperimentelle Arbeit wurde mit dem Ziel durchgeführt, den Einfluss dynamischer Temperaturveränderungen isoliert in der Zellkultur sowie im Zellverband am Model der OHSK zu untersuchen.

Im Falle einer Unterbrechung der Circulation ist Hypothermie die einzig verfügbare Methode zur Erhöhung der Ischämieschwelle und Protektion gegen den Zelltod durch Drosselung des zellulären Stoffwechsels.

Hypothermie als ein nichtphysiologischer Zustand, scheint möglicherweise mit einer inflammatorischen Antwort auch in allen untersuchten Hirnzellen einherzugehen. Unser Augenmerk galt der Freisetzung des proinflammatorischen Zytokines IL-6 und der NO-Freisetzung der untersuchten Hirnzellen. Hierbei zeigte sich, dass die gekühlten Zellen nach tiefer Hypothermie und Wiedererwärmung eine deutliche inflammatorische Antwort zeigten. Im Verband aller Zellen in organotypischen Hirnschnitten zeigte sich aber, dass tiefe Hypothermie den neuronalen Zelltod reduzieren kann. Über den alleinigen Effekt der tiefen Hypothermie hinaus haben wir die Einflüsse von S100B und Methylprednisolon in der Zellkultur getestet. Hierbei zeigte sich, dass MP auf zellulärer Ebene die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine reduziert und den neuronalen Zelltod im Zellverband des Hirnschnittes reduziert. Hinsichtlich der klinischen Übertragbarkeit der Ergebnisse bedarf es sicher noch weiterführender in vitro und in vivo Studien, da in der vorliegenden Arbeit nur der Effekt der Hypothermie und Wiedererwärmung ohne Perfusion untersucht wurde. Wie komplex die Interaktionen zwischen den einzelnen Zellverbänden sein müssen, zeigt sich auch in den nicht ganz eindeutigen Ergebnissen. Für die weitere klinische Anwendbarkeit der Hypothermie und der Neuroprotektion durch Steroide sollten noch weitere Studien folgen.

Referenzen

1. **Bellinger DC, Wernovsky G, Rappaport LA, Mayer JE, Jr., Castaneda AR, Farrell DM, Wessel DL, Lang P, Hickey PR, Jonas RA, et al. Cognitive development of children following early repair of transposition of the great arteries using deep hypothermic circulatory arrest. *Pediatrics*. 1991;87:701-7.**
2. **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.**
3. **Newburger JW, Jonas RA, Wernovsky G, Wypij D, Hickey PR, Kuban KC, Farrell DM, Holmes GL, Helmers SL, Constantinou J, et al. A comparison of the perioperative neurologic effects of hypothermic circulatory arrest versus low-flow cardiopulmonary bypass in infant heart surgery. *N Engl J Med*. 1993;329:1057-64.**
4. **Wernovsky G, Wypij D, Jonas RA, Mayer JE, Jr., Hanley FL, Hickey PR, Walsh AZ, Chang AC, Castaneda AR, Newburger JW, et al. Postoperative course and hemodynamic profile after the arterial switch operation in neonates and infants. A comparison of low-flow cardiopulmonary bypass and circulatory arrest. *Circulation*. 1995;92:2226-35.**
5. **Kern JH, Hinton VJ, Nereo NE, Hayes CJ, Gersony WM. Early developmental outcome after the Norwood procedure for hypoplastic left heart syndrome. *Pediatrics*. 1998;102:1148-52.**
6. **Dunbar-Masterson C, Wypij D, Bellinger DC, Rappaport LA, Baker AL, Jonas RA, Newburger JW. General health status of children with D-transposition of the great arteries after the arterial switch operation. *Circulation*. 2001;104:1138-42.**
7. **Scallan MJ. Brain injury in children with congenital heart disease. *Paediatr Anaesth*. 2003;13:284-93.**
8. **Jonas RA. Hypothermia, circulatory arrest, and the pediatric brain. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 1996;10:66-74.**
9. **Greeley WJ, Kern FH, Ungerleider RM, Boyd JL, 3rd, Quill T, Smith LR, Baldwin B, Reves JG. The effect of hypothermic cardiopulmonary bypass and total circulatory arrest on cerebral metabolism in neonates, infants, and children. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1991;101:783-94.**
10. **Fay T. Early experiences with local and generalized refrigeration of the human brain. *J Neurosurg*. 1959;16:239-59; discussion 259-60.**
11. **Bernard SA, Buist M. Induced hypothermia in critical care medicine: a review. *Crit Care Med*. 2003;31:2041-51.**
12. **Colburn RW, Rickman AJ, DeLeo JA. The effect of site and type of nerve injury on spinal glial activation and neuropathic pain behavior. *Exp Neurol*. 1999;157:289-304.**

13. Hickey RW, Kochanek PM, Ferimer H, Graham SH, Safar P. Hypothermia and hyperthermia in children after resuscitation from cardiac arrest. *Pediatrics*. 2000;106:118-22.
14. Hickey RW, Ferimer H, Alexander HL, Garman RH, Callaway CW, Hicks S, Safar P, Graham SH, Kochanek PM. Delayed, spontaneous hypothermia reduces neuronal damage after asphyxial cardiac arrest in rats. *Crit Care Med*. 2000;28:3511-6.
15. Sano T, Drummond JC, Patel PM, Grafe MR, Watson JC, Cole DJ. A comparison of the cerebral protective effects of isoflurane and mild hypothermia in a model of incomplete forebrain ischemia in the rat. *Anesthesiology*. 1992;76:221-8.
16. Kawamura S, Suzuki A, Hadeishi H, Yasui N, Hatazawa J. Cerebral blood flow and oxygen metabolism during mild hypothermia in patients with subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)*. 2000;142:1117-21; discussion 1121-2.
17. Illievich UM, Zornow MH, Choi KT, Scheller MS, Strnat MA. Effects of hypothermic metabolic suppression on hippocampal glutamate concentrations after transient global cerebral ischemia. *Anesth Analg*. 1994;78:905-11.
18. Bissonnette B, Pellerin L, Ravussin P, Daven VB, Magistretti PJ. Deep hypothermia and rewarming alters glutamate levels and glycogen content in cultured astrocytes. *Anesthesiology*. 1999;91:1763-9.
19. Stocker F, Herschkowitz N, Bossi E, Stoller M, Cross TA, Aue WP, Seelig J. Cerebral metabolic studies in situ by ³¹P-nuclear magnetic resonance after hypothermic circulatory arrest. *Pediatr Res*. 1986;20:867-71.
20. Yager JY, Brucklacher RM, Mjuscic DJ, Vannucci RC. Cerebral oxidative metabolism during hypothermia and circulatory arrest in newborn dogs. *Pediatr Res*. 1992;32:547-52.
21. Moore FD, Jr., Warner KG, Assousa S, Valeri CR, Khuri SF. The effects of complement activation during cardiopulmonary bypass. Attenuation by hypothermia, heparin, and hemodilution. *Ann Surg*. 1988;208:95-103.
22. Sorensen HR, Husum B, Waaben J, Andersen K, Andersen LI, Gefke K, Kaarsen AL, Gjedde A. Brain microvascular function during cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1987;94:727-32.
23. Jonas RA. Neurological protection during cardiopulmonary bypass/deep hypothermia. *Pediatr Cardiol*. 1998;19:321-30.
24. Fabry Z, Raine CS, Hart MN. Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS. *Immunol Today*. 1994;15:218-24.
25. Lassmann H, Zimprich F, Rossler K, Vass K. Inflammation in the nervous system. Basic mechanisms and immunological concepts. *Rev Neurol (Paris)*. 1991;147:763-81.
26. Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*. 2001;18:685-716.

27. Koutsilieris E, Scheller C, Tribl F, Riederer P. Degeneration of neuronal cells due to oxidative stress--microglial contribution. *Parkinsonism Relat Disord.* 2002;8:401-6.
28. Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg GW. Cytotoxicity of microglia. *Glia.* 1993;7:111-8.
29. Kreutzberg GW. Microglia, the first line of defence in brain pathologies. *Arzneimittelforschung.* 1995;45:357-60.
30. Campanella M, Sciorati C, Tarozzo G, Beltramo M. Flow cytometric analysis of inflammatory cells in ischemic rat brain. *Stroke.* 2002;33:586-92.
31. Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia.* 2002;40:140-55.
32. Ransohoff RM. The chemokine system in neuroinflammation: an update. *J Infect Dis.* 2002;186 Suppl 2:S152-6.
33. Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev.* 1999;30:77-105.
34. Floyd RA. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999;222:236-45.
35. Liu B, Gao HM, Wang JY, Jeohn GH, Cooper CL, Hong JS. Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;962:318-31.
36. Faden AI. Experimental neurobiology of central nervous system trauma. *Crit Rev Neurobiol.* 1993;7:175-86.
37. Povlishock JT, Jenkins LW. Are the pathobiological changes evoked by traumatic brain injury immediate and irreversible? *Brain Pathol.* 1995;5:415-26.
38. Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Stahel PF, Kossmann T. Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr Opin Crit Care.* 2002;8:101-5.
39. Schwartz M. Macrophages and microglia in central nervous system injury: are they helpful or harmful? *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003;23:385-94.
40. Caroni P, Schwab ME. Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *J Cell Biol.* 1988;106:1281-8.
41. Neumann S, Woolf CJ. Regeneration of dorsal column fibers into and beyond the lesion site following adult spinal cord injury. *Neuron.* 1999;23:83-91.
42. Benveniste EN. Cytokines: influence on glial cell gene expression and function. *Chem Immunol.* 1997;69:31-75.
43. Frei K, Malipiero UV, Leist TP, Zinkernagel RM, Schwab ME, Fontana A. On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. *Eur J Immunol.* 1989;19:689-94.

44. Schobitz B, Holsboer F, Kikkert R, Sutanto W, De Kloet ER. Peripheral and central regulation of IL-6 gene expression in endotoxin-treated rats. *Endocr Regul.* 1992;26:103-9.
45. Hirota H, Kiyama H, Kishimoto T, Taga T. Accelerated Nerve Regeneration in Mice by upregulated expression of interleukin (IL) 6 and IL-6 receptor after trauma. *J Exp Med.* 1996;183:2627-34.
46. Gadiant RA, Otten UH. Interleukin-6 (IL-6)--a molecule with both beneficial and destructive potentials. *Prog Neurobiol.* 1997;52:379-90.
47. Loddick SA, Turnbull AV, Rothwell NJ. Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998;18:176-9.
48. Van Wagoner NJ, Benveniste EN. Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. *J Neuroimmunol.* 1999;100:124-39.
49. Campbell IL, Stalder AK, Chiang CS, Bellinger R, Heyser CJ, Steffensen S, Masliah E, Powell HC, Gold LH, Henriksen SJ, Siggins GR. Transgenic models to assess the pathogenic actions of cytokines in the central nervous system. *Mol Psychiatry.* 1997;2:125-9.
50. Barnum SR, Jones JL, Muller-Ladner U, Samimi A, Campbell IL. Chronic complement C3 gene expression in the CNS of transgenic mice with astrocyte-targeted interleukin-6 expression. *Glia.* 1996;18:107-17.
51. Heyser CJ, Masliah E, Samimi A, Campbell IL, Gold LH. Progressive decline in avoidance learning paralleled by inflammatory neurodegeneration in transgenic mice expressing interleukin 6 in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:1500-5.
52. Fattori E, Lazzaro D, Musiani P, Modesti A, Alonzi T, Ciliberto G. IL-6 expression in neurons of transgenic mice causes reactive astrocytosis and increase in ramified microglial cells but no neuronal damage. *Eur J Neurosci.* 1995;7:2441-9.
53. Chai Z, Gatti S, Toniatti C, Poli V, Bartfai T. Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: a study on IL-6-deficient mice. *J Exp Med.* 1996;183:311-6.
54. Benveniste EN. Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998;9:259-75.
55. Calabrese V, Copani A, Testa D, Ravagna A, Spadaro F, Tendi E, Nicoletti VG, Giuffrida Stella AM. Nitric oxide synthase induction in astroglial cell cultures: effect on heat shock protein 70 synthesis and oxidant/antioxidant balance. *J Neurosci Res.* 2000;60:613-22.
56. Calabrese V, Bates TE, Stella AM. NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance. *Neurochem Res.* 2000;25:1315-41.

57. Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;322:1111-22.
58. Van Eldik LJ, Wainwright MS. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci.* 2003;21:97-108.
59. Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech.* 2003;60:540-51.
60. Haglid KG, Yang Q, Hamberger A, Bergman S, Widerberg A, Danielsen N. S-100beta stimulates neurite outgrowth in the rat sciatic nerve grafted with acellular muscle transplants. *Brain Res.* 1997;753:196-201.
61. Selinfreund RH, Barger SW, Pledger WJ, Van Eldik LJ. Neurotrophic protein S100 beta stimulates glial cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:3554-8.
62. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33:637-68.
63. Barger SW, Van Eldik LJ. S100 beta stimulates calcium fluxes in glial and neuronal cells. *J Biol Chem.* 1992;267:9689-94.
64. Barger SW, Wolchok SR, Van Eldik LJ. Disulfide-linked S100 beta dimers and signal transduction. *Biochim Biophys Acta.* 1992;1160:105-12.
65. Hu J, Van Eldik LJ. S100 beta induces apoptotic cell death in cultured astrocytes via a nitric oxide-dependent pathway. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1313:239-45.
66. Hu J, Castets F, Guevara JL, Van Eldik LJ. S100 beta stimulates inducible nitric oxide synthase activity and mRNA levels in rat cortical astrocytes. *J Biol Chem.* 1996;271:2543-7.
67. Hu J, Ferreira A, Van Eldik LJ. S100beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *J Neurochem.* 1997;69:2294-301.
68. Hu J, Van Eldik LJ. Glial-derived proteins activate cultured astrocytes and enhance beta amyloid-induced glial activation. *Brain Res.* 1999;842:46-54.
69. Koppal T, Lam AG, Guo L, Van Eldik LJ. S100B proteins that lack one or both cysteine residues can induce inflammatory responses in astrocytes and microglia. *Neurochem Int.* 2001;39:401-7.
70. Rothermundt M, Peters M, Prehn JH, Arolt V. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech.* 2003;60:614-32.
71. Abdul-Khaliq H, Schubert S, Fischer T, Bottcher W, Harke C, Alexi-Meskishvili V, Lange PE, Blasig IE. The effect of continuous treatment with sodium nitroprusside on the serum kinetics of the brain marker protein S-100beta in neonates undergoing corrective cardiac surgery by means of hypothermic cardiopulmonary bypass. *Clin Chem Lab Med.* 2000;38:1173-5.

72. Abdul-Khaliq H, Schubert S, Stoltenburg-Didinger G, Troitzsch D, Bottcher W, Hubler M, Meissler M, Grosse-Siestrop C, Alexi-Meskishvili V, Hetzer R, Lange PE. Protein S-100beta in brain and serum after deep hypothermic circulatory arrest in rabbits: relationship to perivascular astrocytic swelling. *Clin Chem Lab Med.* 2000;38:1169-72.
73. Abdul-Khaliq H, Blasig IE, Baur MO, Hohlfeld M, Alexi-Meskishvili V, Lange PE. Release of the cerebral protein s-100 into blood after reperfusion during cardiac operations in infants: is there a relation to oxygen radical-induced lipid peroxidation? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999;117:1027-8.
74. Abdul-Khaliq H, Alexi-Meskishvili V, Lange PE. Serum S-100 protein levels after pediatric cardiac surgery: a possible new marker for postperfusion cerebral injury. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999;117:843-4.
75. 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.
76. Braugher JM, Hall ED, Means ED, Waters TR, Anderson DK. Evaluation of an intensive methylprednisolone sodium succinate dosing regimen in experimental spinal cord injury. *J Neurosurg.* 1987;67:102-5.
77. Hall ED. Neuroprotective actions of glucocorticoid and nonglucocorticoid steroids in acute neuronal injury. *Cell Mol Neurobiol.* 1993;13:415-32.
78. Hall ED. Methylprednisolone, head trauma, and brain protection. *Anesth Analg.* 1993;77:639-41.
79. Liu D, McAdoo DJ. Methylprednisolone reduces excitatory amino acid release following experimental spinal cord injury. *Brain Res.* 1993;609:293-7.
80. Liu Y, Cousin JM, Hughes J, Van Damme J, Seckl JR, Haslett C, Dransfield I, Savill J, Rossi AG. Glucocorticoids promote nonphlogistic phagocytosis of apoptotic leukocytes. *J Immunol.* 1999;162:3639-46.
81. Jamshidi J, Yoshimine T, Ushio Y, Hayakawa T. Effects of glucocorticoid and chemotherapy on the peritumoral edema and astrocytic reaction in experimental brain tumor. *J Neurooncol.* 1992;12:197-204.
82. Marzatico F, Gaetani P, Buratti E, Messina AL, Ferlenga P, Rodriguez y Baena R. Effects of high-dose methylprednisolone on Na(+)-K+ ATPase and lipid peroxidation after experimental subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurol Scand.* 1990;82:263-70.
83. Schurr UP, Zund G, Hoerstrup SP, Grunenfelder J, Maly FE, Vogt PR, Turina MI. Preoperative administration of steroids: influence on adhesion molecules and cytokines after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 2001;72:1316-20.

84. Tabardel Y, Duchateau J, Schmartz D, Marecaux G, Shahla M, Barvais L, Leclerc JL, Vincent JL. Corticosteroids increase blood interleukin-10 levels during cardiopulmonary bypass in men. *Surgery*. 1996;119:76-80.
85. Buttini M, Mir A, Appel K, Wiederhold KH, Limonta S, Gebicke-Haerter PJ, Boddeke HW. Lipopolysaccharide induces expression of tumour necrosis factor alpha in rat brain: inhibition by methylprednisolone and by rolipram. *Br J Pharmacol*. 1997;122:1483-9.
86. Kim JS, Chopp M, Gautam SC. High dose methylprednisolone therapy reduces expression of JE/MCP-1 mRNA and macrophage accumulation in the ischemic rat brain. *J Neurol Sci*. 1995;128:28-35.
87. Schubert S, Stoltenburg-Didinger G, Wehsack A, Troitzsch D, Boettcher W, Huebler M, Redlin M, Kanaan M, Meissler M, Lange PE, Abdul-Khaliq H. Large-dose pretreatment with methylprednisolone fails to attenuate neuronal injury after deep hypothermic circulatory arrest in a neonatal piglet model. *Anesth Analg*. 2005;101:1311-8.
88. Chaney MA. Corticosteroids and cardiopulmonary bypass : a review of clinical investigations. *Chest*. 2002;121:921-31.
89. Abdul-Khaliq H, Schubert S, Stoltenburg-Didinger G. Neuroprotective effects of pre-treatment with systemic steroids in a neonatal piglet model of cardiopulmonary bypass with deep hypothermic circulatory arrest. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2000;18:729-31.
90. Andersen LW, Baek L, Thomsen BS, Rasmussen JP. Effect of methylprednisolone on endotoxemia and complement activation during cardiac surgery. *J Cardiothorac Anesth*. 1989;3:544-9.
91. Boscoe MJ, Yewdall VM, Thompson MA, Cameron JS. Complement activation during cardiopulmonary bypass: quantitative study of effects of methylprednisolone and pulsatile flow. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1983;287:1747-50.
92. Barrington KJ. The adverse neuro-developmental effects of postnatal steroids in the preterm infant: a systematic review of RCTs. *BMC Pediatr*. 2001;1:1.
93. Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F. Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol*. 1990;27:229-37.
94. Laurenzi MA, Arcuri C, Rossi R, Marconi P, Bocchini V. Effects of microenvironment on morphology and function of the microglial cell line BV-2. *Neurochem Res*. 2001;26:1209-16.
95. Wolf SA, Gimsa U, Bechmann I, Nitsch R. Differential expression of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 on microglial cells induced by Th1 and Th2 cells in organotypic brain tissue. *Glia*. 2001;36:414-20.
96. Galko MJ, Tessier-Lavigne M. Function of an axonal chemoattractant modulated by metalloprotease activity. *Science*. 2000;289:1365-7.

97. Frotscher M, Zafirov S, Heimrich B. Development of identified neuronal types and of specific synaptic connections in slice cultures of rat hippocampus. *Prog Neurobiol.* 1995;45:vii-xxviii.
98. Hailer NP, Jarhult JD, Nitsch R. Resting microglial cells in vitro: analysis of morphology and adhesion molecule expression in organotypic hippocampal slice cultures. *Glia.* 1996;18:319-31.
99. Ullrich O, Diestel A, Eyupoglu IY, Nitsch R. Regulation of microglial expression of integrins by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Nat Cell Biol.* 2001;3:1035-42.
100. Koh JY, Choi DW. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J Neurosci Methods.* 1987;20:83-90.
101. Bellinger DC, Wypij D, Kuban KC, Rappaport LA, Hickey PR, Wernovsky G, Jonas RA, Newburger JW. Developmental and neurological status of children at 4 years of age after heart surgery with hypothermic circulatory arrest or low-flow cardiopulmonary bypass. *Circulation.* 1999;100:526-32.
102. Jonas RA. Brain protection during cerebral perfusion. *Ann Thorac Surg.* 1994;58:912.
103. Battin MR, Dezoete JA, Gunn TR, Gluckman PD, Gunn AJ. Neurodevelopmental outcome of infants treated with head cooling and mild hypothermia after perinatal asphyxia. *Pediatrics.* 2001;107:480-4.
104. Battin MR, Penrice J, Gunn TR, Gunn AJ. Treatment of term infants with head cooling and mild systemic hypothermia (35.0 degrees C and 34.5 degrees C) after perinatal asphyxia. *Pediatrics.* 2003;111:244-51.
105. Gunn AJ, Gunn TR, de Haan HH, Williams CE, Gluckman PD. Dramatic neuronal rescue with prolonged selective head cooling after ischemia in fetal lambs. *J Clin Invest.* 1997;99:248-56.
106. Gunn AJ, Gunn TR. The 'pharmacology' of neuronal rescue with cerebral hypothermia. *Early Hum Dev.* 1998;53:19-35.
107. Gunn AJ, Battin M. Hypothermic centralization: new use for old knowledge? *Pediatrics.* 2000;106:133-4.
108. Gunn AJ. Cerebral hypothermia for prevention of brain injury following perinatal asphyxia. *Curr Opin Pediatr.* 2000;12:111-5.
109. Benveniste EN, Sparacio SM, Norris JG, Grenett HE, Fuller GM. Induction and regulation of interleukin-6 gene expression in rat astrocytes. *J Neuroimmunol.* 1990;30:201-12.
110. Si QS, Nakamura Y, Kataoka K. Hypothermic suppression of microglial activation in culture: inhibition of cell proliferation and production of nitric oxide and superoxide. *Neuroscience.* 1997;81:223-9.
111. Petrova TV, Hu J, Van Eldik LJ. Modulation of glial activation by astrocyte-derived protein S100B: differential responses of astrocyte and microglial cultures. *Brain Res.* 2000;853:74-80.

112. Gibbons H, Sato TA, Dragunow M. Hypothermia suppresses inducible nitric oxide synthase and stimulates cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide stimulated BV-2 cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003;110:63-75.
113. Nakamura T, Miyamoto O, Kawai N, Negi T, Itano T, Nagao S. Long-term activation of the glutamatergic system associated with N-methyl-D-aspartate receptors after postischemic hypothermia in gerbils. *Neurosurgery.* 2001;49:706-13; discussion 713-4.
114. Li Y, Barger SW, Liu L, Mrak RE, Griffin WS. S100beta induction of the proinflammatory cytokine interleukin-6 in neurons. *J Neurochem.* 2000;74:143-50.
115. Ahlemeyer B, Beier H, Semkova I, Schaper C, Krieglstein J. S-100beta protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Res.* 2000;858:121-8.
116. Barger SW, Van Eldik LJ, Mattson MP. S100 beta protects hippocampal neurons from damage induced by glucose deprivation. *Brain Res.* 1995;677:167-70.
117. Adami C, Sorci G, Blasi E, Agneletti AL, Bistoni F, Donato R. S100B expression in and effects on microglia. *Glia.* 2001;33:131-42.
118. Winningham-Major F, Staecker JL, Barger SW, Coats S, Van Eldik LJ. Neurite extension and neuronal survival activities of recombinant S100 beta proteins that differ in the content and position of cysteine residues. *J Cell Biol.* 1989;109:3063-71.
119. Langley SM, Chai PJ, Jagers JJ, Ungerleider RM. Preoperative high dose methylprednisolone attenuates the cerebral response to deep hypothermic circulatory arrest. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2000;17:279-86.
120. Farstad M, Heltne JK, Rynning SE, Onarheim H, Mongstad A, Eliassen F, Husby P. 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.
121. Koedel U, Pfister HW, Tomasz A. Methylprednisolone attenuates inflammation, increase of brain water content and intracranial pressure, but does not influence cerebral blood flow changes in experimental pneumococcal meningitis. *Brain Res.* 1994;644:25-31.
122. Elovaara I, Ukkonen M, Leppakynnas M, Lehtimaki T, Luomala M, Peltola J, Dastidar P. Adhesion molecules in multiple sclerosis: relation to subtypes of disease and methylprednisolone therapy. *Arch Neurol.* 2000;57:546-51.
123. Yilmaz M, Ener S, Akalin H, Sagdic K, Serdar OA, Cengiz M. Effect of low-dose methyl prednisolone on serum cytokine levels following extracorporeal circulation. *Perfusion.* 1999;14:201-6.
124. Thompson MA, Broadbent MP. Methylprednisolone prior to cardiopulmonary bypass. *Anaesthesia.* 1980;35:345-53.

125. Uete T, Nishimura S, Oya H, Shimomura T, Tatebayashi Y. Corticosteroid levels in blood and cerebrospinal fluid in various diseases. *J Clin Endocrinol Metab.* 1970;30:208-14.
126. Cotman CW, Geddes JW, Kahle JS. Axon sprouting in the rodent and Alzheimer's disease brain: a reactivation of developmental mechanisms? *Prog Brain Res.* 1990;83:427-34.
127. Stoppini L, Buchs PA, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods.* 1991;37:173-82.
128. Mody I, MacDonald JF. NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca²⁺ release. *Trends Pharmacol Sci.* 1995;16:356-9.

ANHANG

Lebenslauf

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

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Dissertation selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe. Sie stellt, auch nicht in Teilen, keine Kopie anderer Arbeiten dar.

Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Claudia Kern

Danksagung

Ein ganz besonderer Dank gilt hier in erster Linie meiner Schwester Anja, die mir vor allem durch moralische, aber auch durch gekonnte fachliche Unterstützung sehr geholfen hat, Danke.

Ein ganz lieber Dank auch meinen Eltern die mich während meines Studiums und insbesondere bei dieser Arbeit jede mögliche Unterstützung gaben.

Vielen, vielen lieben Dank auch an meine Betreuerin Dr. Katharina Schmitt, die mir immer zur Seite stand und mit ihrer unermüdlichen Begeisterung und ihrem Ehrgeiz die Vollendung dieses Projektes ermöglichte. Vielen Dank auch für die sehr persönliche Unterstützung und den Einblick in wissenschaftliches Arbeiten und seine Tücken.

Vielen lieben Dank auch an meinen Doktorvater PD Dr. Hashim Abdul-Khaliq, der mir mit seiner Idee zu dieser Arbeit verhalf und mich immer wieder ermutigte, diese komplexe Arbeit zu vollenden.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei dem Leiter der Kinderkardiologie des DHZB Herrn Prof. Dr. Felix Berger für die uneingeschränkte Unterstützung des gesamten Projektes bedanken.

Vielen lieben Dank auch an all die wunderbaren Mitarbeiter der AG Nitsch der Anatomie der Charite, die mit ihrem Rat und ihrer Tat so manches Experiment retteten.

Und natürlich auch ein großes Dankeschön an all meinen Freunden und Liebsten, die mich in jeder Phase tatkräftig unterstützt haben.

