

Aus der Klinik für angeborene Herzfehler und Kinderkardiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Kardioprotektion durch therapeutische Hypothermie:
Eine Zellkulturstudie mit HL1-Kardiomyozyten**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christoph Julian Walker
aus Gießen

Datum der Promotion: 26.02.2016

Inhaltsverzeichnis

1	Kurzfassung	4
2	Einleitung	7
2.1	Myokardiale Ischämie	8
2.1.1	Klinischer Hintergrund	8
2.1.2	Pathomechanismus: Schädigung der Kardiomyozyten durch Ischämie und Reperfusion	9
2.2	Therapeutische Hypothermie	11
2.2.1	Begriffserläuterung Hypothermie	11
2.2.2	Anwendungsgebiete der therapeutischen Hypothermie	12
2.2.3	Hypothermie in der Kardioprotektion	13
2.2.4	Unerwünschte Wirkungen von therapeutischer Hypothermie	14
2.3	Wirkmechanismen der therapeutischen Hypothermie	14
2.3.1	Metabolismus	14
2.3.2	Oxidativer Stress	15
2.3.3	Apoptose	16
2.3.4	Inflammation	17
2.3.5	Kälteschockproteine	17
2.4	Der Arzneistoff Levosimendan	19
2.5	Ziele dieser Arbeit	20
3	Materialien	21
3.1	Geräte	22
3.2	Chemikalien	23
3.3	Zellkulturmaterialien	24
3.4	Antikörper	24
3.5	PCR-Materialien	25
3.6	Software	25
4	Methoden	26
4.1	Zellkultur	27
4.2	Simulation der kardialen Ischämie- und Reperfusions-Schädigung	27

4.3	Zeit-Temperatur-Protokolle	28
4.3.1	Post-Ischämische-Therapeutische-Hypothermie (PITH)	28
4.3.2	Intra-Ischämische-Therapeutische-Hypothermie (IITH)	28
4.4	Phasenkontrastmikroskopie	30
4.5	Messung der LDH-Aktivität als Zelltodmarker	30
4.6	Messung der Troponin T-Konzentration als Zelltodmarker	31
4.7	Messung mitochondrialer Aktivität: MTT	31
4.8	Messung des ATP-Gehalts	32
4.9	Messungen des intrazellulären Proteingehalts: Western Blot-Analysen	32
4.9.1	Gewinnung der Proteine	33
4.9.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA	33
4.9.3	Gelelektrophorese	33
4.9.4	Proteintransfer	34
4.9.5	Detektion spezifischer Proteine	34
4.9.6	Densitometrie	35
4.10	Messung von mRNA-Regulationen mittels quantitativer Echtzeit-PCR	35
4.10.1	RNA-Isolation	35
4.10.2	Reverse Transkription	36
4.10.3	Quantitative RT-PCR	36
4.11	Applikation von Levosimendan	36
4.12	Statistische Analyse	37
5	Ergebnisse	38
5.1	Etablierung von Ischämie- und Reperfusionsschädigung: Effekte von Nährstoffentzug und Hypoxie bei 37 °C	39
5.1.1	Einfluss auf die LDH-Freisetzung	39
5.1.2	Einfluss auf die MTT-Reduktion	40
5.2	Effekte von Post-Ischämischer-Therapeutischer-Hypothermie	41
5.2.1	Einfluss der simulierten Reperfusion unter PITH auf die Morphologie	41
5.2.2	Einfluss auf die LDH-Freisetzung	41
5.2.3	Einfluss auf die Troponin T-Freisetzung	41
5.2.4	Einfluss auf den ATP-Gehalt	44
5.3	Einfluss von Intra-Ischämischer-Therapeutischer-Hypothermie	44
5.3.1	Einfluss auf die Morphologie	44
5.3.2	Einfluss auf die LDH-Freisetzung	46
5.3.3	Einfluss auf die Troponin T-Freisetzung	47
5.3.4	Einfluss auf den ATP-Gehalt	47
5.3.5	Einfluss auf die MTT-Reduktion	48
5.3.6	Einfluss auf die Caspase 3-Aktivierung	49

5.3.7	Einfluss auf die ERK-Aktivierung	51
5.3.8	Einfluss auf die iNOS mRNA-Induktion	53
5.3.9	Einfluss auf die RBM3-Induktion	53
5.4	Effekte von Levosimendan	55
5.4.1	Einfluss von Levosimendan unter simulierter Ischämie und IITH auf die LDH-Freisetzung	55
5.4.2	Einfluss von Levosimendan unter simulierter I/R und IITH auf die LDH-Freisetzung	56
6	Diskussion	57
6.1	Etablierung des Ischämie- und Reperfusionsschadens	58
6.2	Effekte von Post-Ischämischer-Therapeutischer-Hypothermie	59
6.3	Effekte von Intra-Ischämischer-Therapeutischer-Hypothermie	61
6.3.1	Apoptose	63
6.3.2	iNOS-Regulation	65
6.3.3	RBM3-Regulation	66
6.4	Pharmakologische Interaktion mit Levosimendan	67
6.5	HL1-Zellkultur als Untersuchungsobjekt	68
6.6	Schlussfolgerungen und Ausblick	69
7	Bibliographie	71
8	Abbildungsverzeichnis	83
9	Abkürzungsverzeichnis	85
10	Eidesstattliche Versicherung	88
11	Lebenslauf	91
12	Publikationsliste	93
13	Danksagung	95

1 Kurzfassung

KURZFASSUNG

Einleitung Die ischämische Herzkrankheit ist weltweit die häufigste Todesursache. Therapeutische Hypothermie (TH) gilt als anerkannte Intervention zur Neuroprotektion bei Patienten mit einer durch Herzkreislaufstillstand oder perinatale Asphyxie bedingten Ischämie des Gehirns. Der Einfluss von TH auf die myokardiale Ischämie ist bisher nicht ausreichend geklärt. Auch wenn experimentelle in-vitro und in-vivo Studien auf kardioprotektive Eigenschaften hinweisen, konnte eine Verkleinerung des Infarktareals durch TH in klinischen Studien bisher nicht nachgewiesen werden. In dieser Arbeit soll ein auf HL1-Zellen beruhendes Ischämie-Reperfusion-Modell etabliert werden, um anschließend das protektive Potential und mögliche Wirkmechanismen von TH genauer zu untersuchen.

Methoden Die kardiale Ischämie wurde durch Inkubation von HL1-Zellen unter 0,2 % Sauerstoff und Serum/Glukose-Entzug simuliert. Nach sechs Stunden wurden die geschädigten Zellen zur Simulation der Reperfusion (I/R) 21 % Sauerstoff und Nährmedium ausgesetzt. Hypothermie wurde nach zwei verschiedenen Protokollen induziert. 1.) Post-ischämisch (PITH) mit 33,5 °C für 24 Stunden initiiert mit Beginn der simulierten Reperfusion 2.) Intra-ischämisch (IITH) mit 33,5 °C für 24 Stunden beginnend während der simulierten Ischämie und aufrechterhaltend bis zum Ende der I/R. Die Zellviabilität wurde anhand der Freisetzung von LDH und Troponin untersucht. Die mitochondriale Aktivität wurde mit Hilfe des ATP-Gehalts und der MMT-Reduktion analysiert. Regulationen der apoptotischen Faktoren Caspase3 und ERK1/2 sowie des Kälteschockproteins RBM3 wurden durch Western Blots analysiert und der mRNA-Gehalt von RBM3 und iNOS durch qRT-PCR gemessen.

Ergebnisse Die Simulation von Ischämie und I/R führte zu einem vermehrten Zelluntergang, welcher durch einen Anstieg der LDH- und Troponin-Freisetzung festgestellt wurde. Außerdem wurde eine mitochondriale Dysfunktion beobachtet, die sich durch einen erniedrigten ATP-Gehalt und erniedrigte MTT-Reduktion zeigte. IITH, nicht aber PITH, verminderte den durch die simulierte Ischämie und I/R ausgelösten Zelluntergang und führte zu einem erhöhten ATP-Gehalt und erhöhter MTT-Reduktion. Die Aktivierung der proapoptischen Caspase3 durch I/R wurde mittels IITH abgeschwächt. Weiterhin zeigte sich ein Trend zur RBM3-Induktion durch IITH. Der iNOS-mRNA-Gehalt wurde durch I/R erhöht und durch IITH vermindert.

Schlussfolgerungen Es wurde ein Modell aus ischämischen HL1-Kardiomyozyten zur Untersuchung des Einflusses von TH etabliert. IITH erwies sich als vielversprechende Intervention zum Schutz vor ischämischem Zelluntergang. Vermittelt wird der protektive Effekt vermutlich durch die Abschwächung der mitochondrialen Dysfunktion und der Apoptose. Die genaue Rolle der RBM3- und iNOS-Regulation sollte weiter erforscht werden. Die vorliegenden Daten unterstützen die Annahme, dass TH in den klinischen Studien bisher zu spät induziert wurde, um eine messbare Kardioprotektion zu bewirken.

ABSTRACT

Introduction Ischemic heart disease is the most common cause of death worldwide. Therapeutic hypothermia (TH) is an acknowledged intervention for neuroprotection for patients suffering from ischemic brain injury due to cardiac arrest or perinatal asphyxia. However, its effect on myocardial ischemia remains unclear. Albeit some experimental in-vitro and in-vivo studies have shown cardioprotective properties, clinical trials failed to show a decrease in infarct size by moderate hypothermia. The objective of this study is to introduce a model of ischemia/reperfusion injury in HL1-cardiomyocytes to further investigate the cardioprotective potential of TH and elucidate possible mechanisms in action.

Methods Cardiac ischemia was simulated by exposing HL1-cells to 0.2 % oxygen and serum-glucose-free medium. After 6 h, the injured cells were re-oxygenated with 21 % oxygen in complete medium to mimic reperfusion. Hypothermia was induced according to two different protocols: 1.) Post-ischemic cooling (PITH) to 33.5 °C for 24 h initiated at the start of simulated reperfusion. 2.) Intra-ischemic cooling (IITH) to 33.5 °C for 24 h initiated during simulated ischemia and maintained throughout the I/R-phase. Cell viability was determined by release of LDH and troponin. Mitochondrial activity was assessed by intracellular ATP-content and MTT-reduction. Regulation of apoptotic factors caspase3 and ERK1/2 and cold-shock protein RBM3 was analyzed by Western blot and iNOS- and RBM3-mRNA-levels were measured by qRT-PCR.

Results Simulation of ischemia and I/R resulted in increased cell death as seen in higher LDH- and troponin-releases and in mitochondrial impairment noted by decreased ATP-content and MTT-reduction. IITH, but not PITH, attenuated ischemia and I/R induced cell death and maintained higher ATP-contents and higher MTT-reduction levels. The activation of proapoptotic caspase3 was reduced by IITH. Furthermore, there was a trend for RBM3-upregulation by IITH. iNOS-mRNA content was elevated by I/R and decreased by TH.

Conclusions A suitable model of ischemic HL1-cells for the investigation of the impact of hypothermia was established. IITH is a promising intervention for the salvage of ischemic cardiomyocytes from cell death, which is apparently mediated by the prevention of mitochondrial dysfunction and apoptosis. Further research is needed to explore the role of RBM3- and iNOS-regulations. The presented data support the assumption that TH was induced to late in clinical trials to convey protection.

2 Einleitung

2.1 Myokardiale Ischämie

2.1.1 Klinischer Hintergrund

Jedes Jahr sterben weltweit circa 8,1 Millionen Menschen an den Folgen einer ischämischen Herzkrankheit (IHK).[1] Die Erkrankung ist für 14,8 % aller Todesfälle verantwortlich und somit global die Haupttodesursache.[1]

Zwar haben neue Interventionsstrategien mit beschleunigter Reperfusion des unterversorgten Myokards und ein optimiertes Management der auftretenden Komplikationen die Überlebensrate akuter Zustände der ischämischen Herzerkrankung in den vergangenen Jahrzehnten verbessert, die Prävalenz der Herzinsuffizienz als längerfristige Folge der kardialen Ischämie und die daraus resultierende Morbidität und Mortalität sind aber weiter ansteigend.[1–4] So erkranken etwa 25 % der Patienten mit akutem Myokardinfarkt (AMI) nachfolgend an einer Herzinsuffizienz.[2] 1990 nahm die ischämische Herzerkrankung auf der Global Burden of Disease Liste der WHO, die sowohl Sterblichkeit als auch Einschränkungen der Lebensqualität berücksichtigt, noch Rang vier ein. Im Jahre 2010 stand sie auf dem ersten Rang, was auf eine absolute Zunahme der durch Behinderung und Tod von der durchschnittlichen Lebenserwartung abweichenden Lebensjahre um 29 % zurückzuführen ist.[5]

Die ischämische Herzkrankheit beruht auf einer verminderten Versorgung des Myokards mit Blut. Wird die Durchblutungsstörung des Myokards nur bei vermehrter Belastung in Form von Brustschmerzen symptomatisch, so spricht man von einer stabilen Angina Pectoris. Als instabile Angina Pectoris bezeichnet man hingegen eine erstmals auftretende Angina Pectoris oder eine bei körperlicher Ruhe auftretende Symptomatik. Führt die Ischämie zu einem Gewebsuntergang, spricht man von einem Myokardinfarkt.

Die Hauptursache der ischämischen Herzkrankheit beruht auf einer Arteriosklerose der Koronargefäße. Auch ein Herzkreislaufstillstand (HKS) geht mit einer globalen Ischämie des Myokards einher.[6] Daraus kann nach erfolgreicher Wiederbelebung ein als Post-cardiac-arrest-myocardial-dysfunction-Syndrom bezeichneter Zustand resultieren, der zu den schlechten Überlebensraten des HKS beiträgt.[6] Klinisch kann sich das Syndrom unter anderem in einem verringerten Schlagvolumen, Hypotension und Herzrhythmusstörungen manifestieren.[6] Der Großteil der außerhalb des Krankenhauses stattfindenden HKS hat eine kardiale Genese, wobei die myokardiale Ischämie die Hauptursache darstellt.[7]

Im Vordergrund bisher etablierter Interventionsstrategien bei akuter Ischämie steht die möglichst frühe Reperfusion des ischämischen Myokards.[8] Hierzu wird je nach Situation neben der bevorzugten perkutanen Koronarintervention (PCI) eine pharmakologische Fibrinolyse oder eine Koronararterien-Bypass-Operation empfohlen.[8] Pharmakologisch konnte für verschiedene Arzneistoffe bei kurz- oder langfristiger Gabe ein positiver Effekt in Bezug auf die Senkung der Mortalität und Morbidität nachgewiesen werden. Hierzu gehört sowohl eine Antikoagulation als auch eine Plättchenaggregationshemmung sowie die Gabe von Nitroglycerin, Beta-Rezeptorenblocker, Sauerstoff, Morphin, ACE- bzw. Angiotensin-Rezeptor-Blockern

und Statinen.[8] Zusätzlich bietet das kontinuierliche Monitoring der Hämodynamik und Erregungsbildung (EKG) ein frühzeitiges Management von Komplikationen wie Herzrhythmusstörungen.[8]

2.1.2 Pathomechanismus: Schädigung der Kardiomyozyten durch Ischämie und Reperfusion

Das Herz ist ein obligat aerobes Organ mit dem größten Sauerstoffumsatz im menschlichen Organismus.[9] Der durch die Durchblutungsstörung verursachte anaerobe Substratmangel führt zum Erliegen grundlegender zellulärer Stoffwechselprozesse. Dadurch entsteht durch zwei aufeinander folgende Schädigungsmechanismen die ischämische Herzkrankheit. Aus der unterbrochenen Nährstoffversorgung geht eine direkte ischämische Schädigung hervor und nach Wiedereinsetzen der Durchblutung folgt sekundär die sogenannte Reperfusionsschädigung. Im Rahmen des AMI in Tierstudien werden die beiden Schädigungsmechanismen für jeweils ca. 50 % des Infarktareals verantwortlich gemacht.[2]

2.1.2.1 Ischämische Schädigung

Während der Ischämie verlagert sich in Folge der Hypoxie innerhalb kürzester Zeit die Energiegewinnung in den Kardiomyozyten von der oxidativen Phosphorylierung der Atmungskette auf die Seite der anaeroben Glykolyse, wobei die hier benötigte Glukose zunächst noch aus Glykogenspeichern rekrutiert werden kann.[10] Neben der anaeroben Glykolyse kann zu Beginn zusätzlich Kreatinphosphat als Phosphatspender in einer Kreatinkinase-Reaktion als Energielieferant dienen, um den Adenosintriphosphat (ATP)-Mangel abzuschwächen.[10] Die beschriebenen Ausweichmanöver des zellulären Stoffwechsels unter Hypoxie können nur kurzfristig die Energiebereitstellung sichern. Die Kreatinphosphat-Vorräte der Zelle genügen nur einige Minuten. Des Weiteren kommt es durch die in der anaeroben Glykolyse anfallenden Katabolite und deren Akkumulation zu einer enzymvermittelten Hemmung dieser Stoffwechselreaktion.[10] Vor allem reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid (NADH), anorganisches Phosphat, Laktat und die damit einhergehende Absenkung des pH-Wertes sind an der Hemmung der anaeroben Glykolyse beteiligt. Entscheidend scheint dabei die Hemmung der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase zu sein.[11] Nachdem auch das Schlüsselenzym der Glykolyse, die Phosphofruktokinase, nicht mehr auf ATP als Kofaktor der Fructose-1,6-bisphosphat-Produktion zurückgreifen kann, kommt der Stoffwechsel komplett zum Erliegen.

Die Stoffwechselumstellungen während der Ischämie gehen mit Veränderungen im Ionenhaushalt der Zelle einher. In den ersten Minuten der Ischämie kommt es zu einem intrazellulären Anstieg der Natriumionen (Na^+), woran sowohl die spannungsabhängigen Na^+ -Kanäle als auch Na^+ -Protonen (H^+)- und Na^+ -Calcium (Ca^{2+})-Austauscher beteiligt sind.[10, 12] Nach dem Wegfall der ATP-Reserven spielt auch der Ausfall der energieabhängigen Na^+ -Pumpe

eine Rolle.[10] Die hohen intrazellulären Na^+ -Spiegel bedingen einen Ausstrom von Kalium (K^+), der für Veränderungen im Elektrokardiogramm (EKG) und Herzrhythmusstörungen verantwortlich gemacht wird. Außerdem führt der kleiner werdende Natriumgradient über die sinkende Aktivität des Na^+ - Ca^{2+} -Austauschers zu einer intrazellulären Calcium-Akkumulation.[10–13] Diese unphysiologisch hohen Calciumkonzentrationen werden auch als „Calcium-overload“ bezeichnet und ziehen über verschiedene Wege Zellschäden nach sich. So werden calciumabhängige-Proteasen und Phospholipasen aktiviert, welche zur Degradierung verschiedener Zellbestandteile, vor allem des Sarkolemm und der Mitochondrien, führen.[10]

Die während der Ischämie stattfindenden Veränderungen sind zunächst noch reversibel. Ein anhaltendes Ausbleiben der Nährstoffversorgung kann zu einem direkten Absterben der Kardiomyozyten führen oder die Zellen so beeinträchtigen, dass die Wiederherstellung der Blutversorgung einen sekundären Zelluntergang bedingt (Reperfusionsschädigung).

2.1.2.2 Reperfusionsschädigung

Eine frühe Wiederdurchblutung des ischämischen Myokards durch PCI, Thrombolyse oder Wiederherstellung des Gesamtkreislaufes ist die Standardtherapie der akuten myokardialen Ischämie und wesentlich für die Begrenzung des Ausmaßes der ischämischen Zellschädigung.[3, 14, 15] Allerdings führt die Reperfusion auch zu einer weiteren Schädigung des Myokards, indem das Eintreffen von Sauerstoff und Nährstoffen in noch lebensfähigen, aber durch die Ischämie vorgeschädigten Zellen Prozesse auslöst, die zu teils reversiblen, aber auch zu irreversiblen Schäden in den Zellen führen.[16] Die Reperfusionsschädigung kann sich in Herzrhythmusstörungen, Stunning (akinetisches, vitales Myokard), mikrovaskulärer Dysfunktion und Absterben der Kardiomyozyten manifestieren.[2]

Pathophysiologisch führt das mit der Wiederdurchblutung des ischämischen Areale eintreffende Sauerstoff- und Nährstoffangebot zu einer Exazerbation des vorbestehenden Zellschadens. Die beteiligten Mechanismen umfassen oxidativen Stress, Calcium-Akkumulation („Calcium-overload“), Wiederherstellung des physiologischen pH-Wertes und die Entstehung einer Entzündungsreaktion.[2] Der mit der Reperfusion wiederkehrende Sauerstoff führt über die Wiederaufnahme der geschädigten Atmungskette und Aktivierung enzymatischer Quellen (Xanthin-Oxidase, NADPH-Oxidase, NO-Synthase u.a.) zu oxidativem Stress, der die Entstehung freier Radikale, wie Superoxidation, Hydrogenperoxid und Peroxynitrit, beinhaltet.[2] Die Radikale können direkt über Lipidperoxidation Membranen schädigen, Enzyme denaturieren und DNA oxidativ angreifen. Indirekt können die freien Radikale schädigend wirken, indem sie eine Entzündungsreaktion hervorrufen, eine Dysfunktion des sarkoplasmatischen Retikulums bewirken und zu weiterem Calcium-Einstrom führen. Außerdem wird die bereits während der Ischämie entstandene zytosolische Calcium-Akkumulation durch die Schädigung der Zellmembran und die umgekehrte Aktivität des Na^+ - Ca^{2+} -Austauschers verstärkt. Die in Kapitel ?? beschriebenen Faktoren führen während der Ischämie zu einer veränderten Permeabilität der mitochondrialen Membran. Die mitochondrial permeability transition pore

(MPTP), ein nicht-selektiver Kanal an der inneren Mitochondrienmembran, wird während der Ischämie allerdings durch den erniedrigten pH-Wert geschlossen gehalten. Das Überangebot an Calcium und die durch die Reperfusion eintreffenden freien Radikale führen in Verbindung mit der eingeleiteten Normalisierung des zellulären pH-Werts zu einer Öffnung der MPTP und dadurch zu einer freien Diffusion von Proteinen zwischen den Zellkompartimenten. Dies führt über das Einströmen osmotisch aktiver Stoffe zu einem Anschwellen der Mitochondrien und schließlich zu einem Platzen der äußeren Membran. Einerseits kommt durch den Verlust des Ionengradienten über der mitochondrialen Membran die oxidative Phosphorylierung zum Stillstand und zum anderen folgen Cythochrom c und weitere proapoptische Faktoren ins Zytoplasma.[17] Ein weiterer Pathomechanismus, der neben der Öffnung der MPTP eine Rolle beim Zelluntergang durch die Reperfusions-Schädigung spielt, wird mit dem Begriff „Hypercontracture“ bezeichnet. Durch den Wegfall des auf die Zellkontraktionen inhibierend wirkenden sauren pH-Wertes und das Überangebot an Calcium kommt es zu unkontrollierten und exzessiven Zellkontraktionen, die sowohl das Zytoskelett der kontrahierenden Zelle als auch die Membranen benachbarter Zellen verletzen können.[2]

2.2 Therapeutische Hypothermie

2.2.1 Begriffserläuterung Hypothermie

Der Begriff Hypothermie bezeichnet in der Medizin einen Zustand herabgesetzter Körpertemperatur. Der hypotherme Temperaturbereich beginnt beim Menschen ab dem fünften Lebensjahr bei einer Körperkerntemperatur unterhalb von 36 °C, bei unter fünf Jährigen unterhalb von 36,5 °C. Je nach Ausmaß der Unterkühlung unterscheidet man folgende Bereiche:[18]

milde Hypothermie	34 - 35,9 °C
moderate Hypothermie	32 - 33,9 °C
moderat-tiefe Hypothermie	30 - 31,9 °C
tiefe Hypothermie	< 30 °C

Wird die normale Körpertemperatur unbeabsichtigt durch Kälteexposition unterschritten, spricht man von „akzidentieller Hypothermie“. Wird die Körperkerntemperatur hingegen aktiv herabgesetzt, spricht man von „induzierter Hypothermie“. Nach dem zeitlichen Einsetzen der Kühlung differenziert man die induzierte Hypothermie weiterhin in „prophylaktische Hypothermie“, falls die Hypothermie vor Beginn der potentiellen Gewebsschädigung protektiv eingesetzt wird, und in „therapeutische Hypothermie“, falls die Kühlung nach Beginn der Schädigung eingesetzt wird. Klinisch findet der Begriff des „Time-Temperature-Managements“ (TTM) immer mehr Verwendung, welcher den zeitlichen Aspekt der Kühlung mit den Phasen der Induktion, Aufrechterhaltung und Wiedererwärmung betont.

2.2.2 Anwendungsgebiete der therapeutischen Hypothermie

Obwohl TH schon seit über 2000 Jahren in verschiedenen medizinischen Bereichen Anwendung findet, sind die Evidenz-basierten Einsatzgebiete weiterhin überschaubar.[19]

Der Durchbruch zur ersten etablierten Anwendung milder TH zur Neuroprotektion gelang 2002 in Folge der Veröffentlichung zweier Studien im New England Journal of Medicine.[20, 21] Mit Hilfe von randomisierten kontrollierten Studien (RCTs) wurde erstmals die Wirksamkeit der TH belegt. In beiden Studien führte eine Abkühlung der Körpertemperatur auf 32 - 34 °C für 12 bis 24 Stunden bei Erwachsenen nach Herzkreislaufstillstand direkt nach erfolgreicher Reanimation zu einer Senkung der neurologischen Morbidität und Mortalität.[20, 21] In der Studie der Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group wurden 273 Patienten mit HKS durch Kammerflimmern untersucht.[20] Bei 55 % der Patienten in der gekühlten Gruppe wurde ein guter neurologischer Zustand oder eine nur moderate neurologische Einschränkung beschrieben, im Vergleich zu nur 39 % der Patienten in der normothermen Kontrollgruppe. Nach sechs Monaten lebten in der gekühlten Gruppe noch 55 % der Patienten, in der Kontrollgruppe hingegen nur 41 %. Diese und ähnliche Ergebnisse der Studie von Bernard et al. führten daraufhin zur Aufnahme der milden therapeutischen Hypothermie als Therapieempfehlung sowohl in die Leitlinien der American Heart Association als auch in die des Europäischen Resuscitation Councils für bewusstlose erwachsene Patienten mit einem außerhalb des Krankenhauses erlittenen HKS mit ventrikulärer Tachykardie.[22, 23] Die routinemäßige Applikation von TH nach HKS wurde allerdings kürzlich durch die Veröffentlichung zweier RCTs hinterfragt.[24, 25] In einer Studie wurden bei 950 bewusstlosen, erwachsenen Überlebenden eines HKS keine Vorteile in der Gruppe der hypothermen Patienten (33 °C) im Vergleich zu den Patienten, bei denen eine Körpertemperatur von 36 °C aufrechterhalten wurde, gefunden. Die hier durchgeführte aktive Verhinderung hyperthermer Temperaturbereiche wird als mögliche Ursache für die unterschiedlichen Schlussfolgerungen der Studien diskutiert. In einer kürzlich publizierte Studie zur Anwendung von TH nach HKS bei Kindern wurde ebenfalls keine Verbesserung bezüglich der 1-Jahres Überlebensrate und des neurologischen Zustands durch 48-stündige Hypothermie (33 °C) gegenüber kontrollierter Normothermie (36,8 °C) festgestellt.[25] Allerdings zeigte sich bei einer begrenzten Stichprobengröße (n= 260) ein Trend zu höheren Überlebensraten und verbesserter neurologischer Klinik.

Eine weitere durch Leitlinien anerkannte Anwendung der TH findet sich im Bereich der Neonatologie bei der durch perinatale Asphyxie verursachten Enzephalopathie. Wegweisende Studien wurden 2005 von Shankaran et al. und Gluckman et al. publiziert.[26, 27] Diese zeigten positive Effekte einer für 72 Stunden anhaltenden Kühlung auf 33,5 °C bezogen auf Mortalität und neurologische Morbidität. Die protektiven Effekte ließen sich später in größeren Studien reproduzieren und somit bildet die TH heute einen festen Bestandteil im Management der perinatalen Asphyxie.[28]

Kein Konsens herrscht über die Absenkung der Körpertemperatur von Schlaganfall-Patienten und Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma.[29–32] Vielversprechende Ergebnisse kleinerer Studien konnten sich in Folgearbeiten bisher nicht bestätigen. Daher ist die Anwendung der TH in diesem Bereich zum jetzigen Zeitpunkt Gegenstand klinischer Studien und wissenschaftlicher Diskussion.[29–32]

2.2.3 Hypothermie in der Kardioprotektion

In der Herzchirurgie ist die Abkühlung der Kardioplegielösung in Bereichen unter 10 °C eine seit den frühen 1950er Jahren verwandte Methode zum Schutz des Myokards vor ischämischen Schädigung während der Operation.[33] Die in den 1980er Jahren auftretende Erkenntnis, dass durch den elektromechanischen Arrest alleine auch bei Normothermie der Sauerstoffbedarf um 90 % gesenkt werden kann und dass die Hypothermie mit einer enzymatischen Dysfunktion der Herzenzyme einhergeht, die eine postoperativen Pumpfunktionsstörung bedingen kann, führte zu einer bis heute anhaltenden Kontroverse und einem klinischen Nebeneinander von hypothermer und normothermer Kardioplegie.[33] Die Evidenz der präventiven Anwendung von tiefer Hypothermie konnte bisher trotz einer Vielzahl von RCTs bisher nicht geklärt werden.[33]

Die therapeutische Hypothermie findet im Gegensatz zur präventiven Hypothermie außerhalb von Studien bisher keine klinische Anwendung zur Kardioprotektion. Die Ergebnisse aus experimentellen und klinischen Studien lassen keine abschließenden Aussagen über die Wirksamkeit der TH zur Protektion von ischämischen Myokard zu.[34, 35] In randomisierten klinischen Studien, in denen AMI-Patienten mit TH behandelt wurden, konnte keine Reduktion der Größe des Infarktareals im Vergleich zur normothermen Kontrollgruppe gezeigt werden.[36–40] Allerdings wurde bei der Reanalyse von Subpopulationen, welche nur Betroffene mit Vorderwandinfarkt beinhalteten, die vor der Reperfusion einen Temperaturbereich unter 35 °C erreichten, eine signifikante Reduktion des Infarktareals und/oder der Freisetzung biochemischer Marker festgestellt.[37–39] Zum gleichen Ergebnis kamen auch darauf folgende Studien, die mit Hilfe intensiverer Kühlungstechniken unter Verwendung gekühlter Infusionen und endovaskulärer Katheter den angestrebten Temperaturbereich zügiger erreichten.[40, 41] Die Studien belegten weiterhin die gefahrlose Durchführbarkeit der zügigen Temperaturabsenkung bei erwachsenen Patienten.[40, 41] Vergleichbar mit den Schlussfolgerungen aus diesen primär kardiologischen Studien, wurde bei einer Reanalyse der Studie der Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group, welche einen entscheidenden Beitrag zur etablierten Anwendung der TH nach Herzkreislaufstillstand leistete, eine verbesserte kardiologische Situation bei den Patienten beobachtet, die innerhalb von acht Stunden den angestrebten (32 – 34 °C) Temperaturbereich erreichten.[42] In verschiedenen Tierstudien über die Anwendung von TH bei AMI oder HKS konnte ebenfalls eine Reduktion der Infarktgröße und/oder eine Verbesserung der kardialen Funktion gezeigt werden, wenn der herabgesetzte

Temperaturbereich vor Einsetzen der Reperfusion erreicht wurde.[43–48]

2.2.4 Unerwünschte Wirkungen von therapeutischer Hypothermie

Die unerwünschten Wirkungen moderater Hypothermie fallen im Vergleich zu tieferen Temperaturbereichen relativ mild aus.[49] Zusätzlich tragen die Fortschritte in der Etablierung geeigneter Kühlmethoden, welche unkontrollierte und schnelle Temperatursprünge verhindern können, zur klinischen Verträglichkeit der TH bei.[49]

Dennoch ist in einigen Bereichen erhöhte Aufmerksamkeit gefordert. So kann es bei Temperaturen unter 35 °C zu einer Störung der Thrombozytenfunktion und der Blutgerinnung kommen.[18, 50] Trotzdem wurde in keiner der großen klinischen Hypothermie-Studien ein erhöhtes Blutungsrisiko beobachtet, so dass nur bei Patienten mit schon bestehenden Blutungen auf ein gesondertes Management zu achten sei.[49, 50]

Hämodynamische Veränderungen bei Patienten, die TH ausgesetzt werden, sind häufig.[49] Es kann zu einem Anstieg des Blutdrucks bei gleichzeitigem Abfall des Herzminutenvolumens kommen. Durch das gleichzeitige Absinken der metabolischen Umsatzrate unter TH ist eine Therapie in der Regel nicht nötig.[18] Bradykardien und andere milde EKG-Veränderungen sind ebenfalls häufig. Behandlungsbedürftige Rhythmusstörungen wie Vorhofflimmern oder Kammerflimmern werden aber erst bei Temperaturen unterhalb von 30 °C beobachtet.[49]

Elektrolytverschiebungen und eine durch vermehrte Diurese bedingte Hypovolämie zählen ebenfalls zu den regelmäßig beobachteten unerwünschten Wirkungen von TH. Besonders während der Wiedererwärmungsphase besteht ein erhöhtes Risiko für eine Hyperkaliämie.[49]

Der antiinflammatorische Effekt der TH (siehe Kap. ??) geht mit einem erhöhten Infektionsrisiko, vor allem im Atemwegs- und Wundbereich, einher. Dies scheint klinisch allerdings erst bei Kühlungsperioden von länger als 24 Stunden eine Rolle zu spielen.[49]

Immer wieder kommt es während der Anwendung von Hypothermie zu Hyperglykämien.[49, 51] Eine Verminderung der Insulin-Sensitivität und Insulin-Produktion macht eine Insulintherapie zu einem wichtigen Bestandteil des TH-Managements.[49, 51]

2.3 Wirkmechanismen der therapeutischen Hypothermie

Die am protektiven Effekt von TH beteiligten Mechanismen sind vielfältig und im Verlauf der Schädigung durch Ischämie und Reperfusion von wechselnder Relevanz.

2.3.1 Metabolismus

Der am längsten bekannte Wirkmechanismus liegt in einer Absenkung der zellulären Stoffwechselrate. Polderman fasste in einer Übersichtsarbeit Studien zusammen, aus denen er eine 6 -10 %-ige Reduktion der zerebralen metabolischen Rate pro 1 °C Temperaturabsenkung ableitete.[52] Auch für die Situation am Myokard gibt es Tierstudien, die eine Verlangsamung

des Stoffwechsels durch TH zeigen. So berichteten Ning et al. anhand von Experimenten mit aus Hasen isolierten Herzen, dass man durch eine Absenkung der Perfusions-Temperatur auf 31 °C zwei Stunden vor Beginn einer globalen Ischämie höhere ATP-Spiegel aufrechterhalten könnte.[53] Ebenso gelang Simkhovich et al. durch intraoperative Platzierung von Eis auf das Myokard von Hasen 15 Minuten vor der Okklusion eines Koronargefäßes eine 43 %-ige Steigerung des ATP-Gehalts.[54] Der Beeinflussung der metabolischen Rate durch TH wird vor allem zu Beginn der Ischämie eine entscheidende Rolle zugesprochen.[55]

2.3.2 Oxidativer Stress

In der Abschwächung des oxidativen Stresses, welcher bei der Entstehung des Ischämie- und Reperfusionsschadens eine wichtige Rolle spielt und in Kapitel ?? beschrieben wird, liegt ein weiterer Ansatzpunkt der TH-Wirkung. Verschiedene Zell- und Tierstudien berichten, dass die Zunahme von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bei Ischämie und Reperfusion durch eine Absenkung der Temperatur abgeschwächt werden könnte.[56–58] Selbst wenn die Entstehung freier Radikale nicht komplett aufgehoben werden kann, erlaubt die geringere Konzentration zumindest eine effektivere Funktion der zelleigenen Schutzsysteme und Reperaturmechanismen.[18]

2.3.2.1 Die Rolle von Stickstoffmonoxid und iNOS

Die in Endothel, Endokard, Neuronen und Kardiomyozyten vorkommenden Stickstoffmonoxid (NO)-Synthasen dienen als Quellen für die basale Produktion von NO. [59] Das Molekül nimmt eine wichtige Rolle in der Steuerung der physiologischen Herzfunktion ein, indem es Vasodilatation, Antioxidation, Kontraktilität, Sauerstoffverbrauch, Inflammation und Thrombozytenaggregation beeinflusst.[59] Die Produktion von NO wird dabei fein reguliert. Ein Subtyp der Synthasen, die induzierbare NO-Synthase (iNOS), wird in fast allen kernhaltigen Zellen auf Ebene der Transkription als Reaktion auf verschiedene Stimuli wie Ischämie und Reperfusion vermehrt exprimiert.[60] Die Bedeutung von NO im Zusammenhang von Ischämie und Reperfusion wird kontrovers diskutiert. Einige ex- und in-vivo Studien konnten kardioprotektive Auswirkungen von einer geringen Anhebung des NO-Spiegels im Zusammenhang von Ischämie und Reperfusion darlegen. Dabei werden verschiedene Wirkmechanismen angenommen. Diese umfassen antioxidative Wirkungen, eine verringerte Calciumbelastung durch Aktivierung der Guanylatcyclase und eine direkte Beeinflussung der Atmungskette und der Apoptose-Kaskade.[59] Andere Studien berichten, wie eine exzessive Ansammlung von NO toxisch wirken kann.[59] Die zell-zerstörerische Wirkung wird dabei vor allem auf die Verbindung von NO mit Superoxid zu Peroxynitrit (ONOO-) zurückgeführt.[59] Bei physiologisch geringer NO-Konzentration überwiegt die antioxidative Wirkung der Superoxiddismutase durch die katalysierte Reaktion von Superoxid zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid. Bei höherer NO-Konzentration folgt der vermehrten Entstehung von Superoxid jedoch eine höhere

Peroxynitrit-Konzentration. Die oxidierende Eigenschaft des Peroxynitrits führt zu einem Verbrauch antioxidativer Schutzenzyme wie Glutathion und einem Angriff auf Proteine, Lipide und DNA. Verschiedener Enzyme der mitochondrialen Atmungskette werden dadurch gestört.[59] Die energieaufwendige Reparatur von entstandenen DNA-Strangbrüchen durch die Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) verstärkt den entstehenden Substratmangel. Darüber hinaus konnten Okamoto et al. zeigen, dass Peroxynitrit eine Aktivierung von Matrixmetalloproteasen bewirken kann.[61] Diese bewirken neben der Zersetzung von extrazellulärer Matrix auch eine Spaltung von Troponin I, was vermutlich zur kontraktilen Dysfunktion im Zuge von Ischämie und Reperfusion beiträgt.[59]

2.3.3 Apoptose

Zellen, die im Laufe von Ischämie und Reperfusion weder im Rahmen eines nekrotischen Zelltodes absterben, noch sich komplett von der Schädigung erholen, können vom apoptotischen Zelltod betroffen werden. Mittlerweile wird von einem gleichberechtigten Nebeneinander des nekrotischen und apoptotischen Zelltodes im Rahmen von Ischämie und Reperfusion ausgegangen.[62–64] Die Aktivierung von Signalkaskaden, die im apoptotischen Zelltod münden, kann durch TH abgeschwächt oder verhindert werden.[18] Die antiapoptotische Wirkung der Hypothermie, welche auf unterschiedlichen Ebenen sowohl innerhalb der intrinsischen als auch der extrinsischen Signalkaskade greifen kann, wurde in Zell- und Tierstudien belegt.[47, 58, 65] So konnten beispielsweise Meybohm et al. in einer Studie zeigen, dass Schweine, bei denen ein akuter Myokardinfarkt ausgelöst wurde und die daraufhin kardiopulmonal wiederbelebt wurden, einen geringeren Gehalt an apoptotischen Markern im ischämischen Myokard aufwiesen, wenn diese zum Ende der Ischämie auf 33 °C abgekühlt wurden.[47] Das reduzierte Ausmaß der Apoptose-Aktivierung ist zumindest teilweise auf Veränderungen der Gen-Expression zurückzuführen. Ning et al. fanden im ischämischen Myokard von Hasen mit Hilfe eines cDNA-Microarrays sechs durch Hypothermie regulierte Gene, die in den Signalkaskaden der Apoptose eine Rolle spielen.[65]

2.3.3.1 Die Bedeutung der Protease Caspase 3

Da die Protease Caspase 3 als Effektor-Caspase weit am Ende der Apoptose-Kaskade steht und sowohl vom intrinsischen als auch vom extrinsischen Aktivierungsweg angesteuert wird, stellt sie einen geeigneten Marker für einen Überblick über das Ausmaß der Apoptose-Aktivierung dar.[66]

Wie die anderen Enzyme der Caspasen-Familie gehört die Caspase 3 zu den Cysteinproteasen, die Zielproteine am Aspartat schneiden. Die Regulation der Caspasen findet posttranslational statt, indem die nativen Caspasen als inaktive Proenzyme mittels Proteolysen einer Prodomäne in die aktive Form überführt werden. So wird die Caspase 3 von den Caspasen 8, 9 und 10 prozessiert und aktiviert selbst die Caspasen 6, 7 und 9. Als

Effektor-Caspase greift sie aber auch direkt Schlüsselproteine der Zelle an und induziert so den programmierten Zelltod. Dazu gehören beispielsweise das DNA-Reparaturenzym Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase, das an der Stabilisierung der Kernmembran beteiligte Lamin-A und der Endonuklease-Inhibitor ICAD (Inhibitor of Caspase Activated Desoxyribonuclease). Kommt es unter der Wirkung von Caspase 3 zu einer Abspaltung der ICAD, wird die Endonuklease aktiv und leitet eine DNA-Fragmentierung ein.

Die Möglichkeit einer Caspase 3-Regulation durch Hypothermie wurde beispielsweise durch Shao et al. anhand eines Ischämie-Reperfusion-Modell an aus Küken gewonnen Kardiomyozyten präsentiert.[67] Die Temperaturabsenkung auf 25 °C senkte die Caspase-3 Aktivierung signifikant.

2.3.3.2 Die Bedeutung der p42 / p44 MAPK

Die in der Gruppe der mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK) gehörende extrazelluläre signal-regulierte Kinase 1/2 (ERK1/2 oder p42/p44 MAPK) wird unter anderem von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Zellstress aktiviert und spielt neben der Beeinflussung von Proliferation und Zelldifferenzierung eine Rolle in der Kontrolle der Apoptose.[68] Dabei werden der ERK1/2 überwiegend zellprotektive Wirkungen zugeschrieben, die beispielsweise über eine Translokation in den Zellkern und dortige Beeinflussung der Transkription mit einer erhöhten Bereitstellung des antiapoptotischen BCL-2 vermittelt wird. [69]

2.3.4 Inflammation

Weiterhin kann TH vor einer übermäßigen auf die Ischämie und Reperfusion folgenden Entzündungsreaktion schützen. Sowohl die Einwanderung der Leukozyten als auch die Produktion der proinflammatorischen Zytokine wird unter dem Einfluss der erniedrigten Temperatur vermindert.[18, 47, 55, 70–72] Diestel et. al konnten eine vermehrte Freisetzung von antiinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin(IL)-10 und IL-1-Rezeptor-Antagonist unter hypothermen Bedingungen aus Mikrogliazellen nachweisen.[72] Dementsprechend beobachteten Meybohm et al. in den oben erwähnten Experimenten bei mit TH behandelten Schweinen neben der abgeschwächten Apoptose-Aktivierung eine histologisch sichtbar verminderte Einwanderung von Immunzellen und einen geringeren mRNA-Gehalt von IL-1 β und IL-6.[47] Die relativ spät auf die Ischämie und Reperfusion folgende Entwicklung der Inflammations-Reaktion ermöglicht eine praktikable Interventionsstelle für die Anwendung der TH.

2.3.5 Kälteschockproteine

Die Temperaturabhängigkeit enzymatischer Reaktionen und die Verlangsamung des Metabolismus sorgen für eine allgemeine Einschränkung der Proteinsynthese unter hypothermen

Bedingungen.[73] Eine kleine Untergruppe von Proteinen, so genannte Kälteschockproteine, werden hingegen kurz nach Beginn einer moderaten Hypothermie verstärkt exprimiert.[74, 75] Die Kälteschockproteine unterstützen vermutlich die Adaptation der Zelle an den veränderten Temperaturbereich.

Der entscheidende Wirkmechanismus scheint dabei die Beschleunigung der Translation einer Reihe von mRNA-Ketten im Sinne einer Chaperon-Wirkung zu sein. Dabei binden die Kälteschockproteine an den 5' oder 3'- untranslatierten Bereich der mRNA, erhöhen dadurch deren Stabilität, verbessern die ribosomale Bindung und erhöhen somit letztlich die Translationsrate.[76–78] So zeigten Dresios et al. in einem Zellmodell aus murinen Neuroblastomzellen, dass die Überexpression eines Kälteschockproteins durch Transfektion oder Hypothermie zu einem globalen Anstieg der Proteinsynthese führte.[77] Eine weitere Regulation der Translation durch RBM3 geschieht vermutlich durch eine Beeinflussung der mikro RNA (miRNA) Synthese.[79] MiRNA sind nicht-codierende RNAs, die durch Bindung komplementärer Sequenzen der mRNA die Genexpression auf der posttranskriptionellen Ebene regulieren. Eine Bindung an die 3'- untranslatierte Region (3'-UTR) der mRNA kann entweder zu einer Translationshemmung oder einer Degradierung der mRNA führen. [79]

Die beiden Hauptvertreter der Kälteschockproteine, Cold Inducible RNA binding protein (CIRP) und RNA binding Motif Protein 3 (RBM3), weisen einen ähnlichen, im Säugerbereich evolutionär stark konservierten Aufbau aus einem Glycin-reichen C-Terminus und einer RNA-Bindungs-Domäne am N-Terminus auf. Die Erhöhung der Expressionsrate von Kälteschockproteinen durch moderate Hypothermie geschieht vermutlich auf der Transkriptions-Ebene.[80] Ein cold response element im Promotorbereich und/oder eine sogenannte interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) werden für die Induktion verantwortlich gemacht.[76, 81]

Die pathophysiologische Rolle der Kälteschockproteine ist bisher nicht ausreichend geklärt. Neben der Induktion durch Hypothermie wurde eine verstärkte Expression nach Zellstress unterschiedlicher Genese gefunden. So zeigte sich beispielsweise eine erhöhte Expression von Kälteschockproteinen in Zellen, die UV-Strahlung ausgesetzt wurden.[82] In diesen Zellen konnte eine direkte Interaktion zwischen CIRP und dem 3'- untranslatierten Bereich von mRNAs gezeigt werden, welche für Proteine codieren, die für protektive Wirkung nach Zellstress verantwortlich gemacht werden. Dementsprechend reagierten Zellen, die eine reduzierten CIRP-Gehalt aufwiesen, sensibler auf die UV-Bestrahlung.[82] Andere Arbeitsgruppen berichten über eine Induktion von RBM3 durch Hypoxie. So zeigten Wellmann et al. in verschiedenen murinen und humanen Zelllinien eine HIF-1 α -unabhängige Induktion von RBM3 durch Hypoxie.[80] Eine derartige Reduktion der Sauerstoffversorgung herrscht in schnell wachsenden soliden Tumoren. Dementsprechend wurden erhöhte RBM3-Expressionsraten in verschiedenen Tumorzellen gefunden, weshalb eine Rolle des Kälteschockproteins als Protoonkogen diskutiert wird. Sureban et al. erreichten durch eine Überproduktion von RBM3 in Fibroblasten und Kolonkarzinomzellen eine erhöhte Proliferationsrate. Diese war in den

Kolonkarzinomzellen durch einen RBM3-knockout umkehrbar. Es wurde ein Zusammenhang zwischen der gesteigerten Proliferationsrate und einer durch RBM3 ausgelösten mRNA modulierenden Wirkung von wachstumsfördernden Proteinen wie COX-2, IL-8 und VEGF hergestellt.[83] Darüber hinaus führte der RBM3-knockout zu einem Anstieg an Caspase 3-vermittelter Apoptose.[83] Wellmann et al. fanden ebenfalls eine RBM3-abhängige Proliferation in Fibroblasten und humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293). Während die Inkubation in Mangelmedium bei RBM3-defizienten Zellen zu vermehrtem Zelluntergang führte, konnte durch RBM3-Überexpression die Zellviabilität trotz Mangelmediums erhalten werden.[78]

2.4 Der Arzneistoff Levosimendan

Levosimendan (Simdax[®]) ist ein zur Behandlung der akuten Dekompensation bei schwerer chronischer Herzinsuffizienz zugelassener Arzneistoff.[84] Auch bei Dekompensation nach AMI hat sich die Anwendung als wirksam erwiesen.[84]

Levosimendan erhöht die Calcium-Sensitivität von Troponin C am Troponin-Komplex in Kardiomyozyten.[84, 85] Die erleichterte Bindung von Calcium führt zu einem positiv inotropen Effekt ohne Einschränkung der Ventrikel-Relaxation bei gleichbleibenden Sauerstoffverbrauch.[84] Darüber hinaus öffnet Levosimendan ATP-abhängige Kaliumkanäle, welche gewöhnlich durch hohe ATP-Konzentrationen inhibiert und durch hohe Adenosindiphosphat (ADP)-Konzentrationen aktiviert werden.[84, 85] Die Öffnung der Kanäle an den Zellmembranen der glatten Muskelzellen von Gefäßen führt zu einer Vasodilatation. Dadurch kommt es zu einer Absenkung des Widerstandes im arteriellen und venösen Systemkreislauf und den Koronararterien. Der erniedrigte Widerstand ermöglicht eine Senkung sowohl der Vor- als auch der Nachlast und eine Steigerung der Durchblutung der Koronarien.[84] Desweiteren wird über einen direkten zell-protectiven Effekt spekuliert, der durch die Öffnung der mitochondrial gelegenen ATP-abhängigen Kaliumkanäle in Kardiomyozyten vermittelt werden könnte.[84, 85] Eine Öffnung dieser Kanäle ist von dem protectiven Effekt der ischämischen Präkonditionierung bekannt.[84] Darunter versteht man den Effekt, dass wiederholte kurze Ischämie-Phasen das Myokard vor einer später folgenden Ischämie-Schädigung schützen können.[86] Kersten et al. zeigten in einem Tierexperiment mit Hunden, die einer 4-stündigen Phase aus Ischämie und Reperfusion ausgesetzt wurden, dass die Infusion von Levosimendan neben einer Erhöhung des linksventrikulären Drucks zu einer signifikanten Verkleinerung des geschädigten Myokardareals führte.[87] Dieser antiischämische Effekt konnte durch ein Vorbehandlung mit dem ATP-abhängigen Kaliumkanal-Antagonist Glibenclamid aufgehoben werden.

2.5 Ziele dieser Arbeit

Therapeutische Hypothermie ist eine vielversprechende Intervention in der Therapie der myokardialen Ischämie und der Prävention ihrer Folgeerkrankungen. Mit dieser experimentellen Arbeit soll das zellprotektive Potential einer abgesenkten Umgebungstemperatur in Bezug auf Kardiomyozyten analysiert werden. Außerdem sollen mögliche Wirkmechanismen der TH aufgedeckt werden. Neben der Schaffung von Grundlagen für weitergehende experimentelle Forschung ist es das Ziel, Anregungen für die klinische Studienarbeit zur Optimierung der Anwendung von TH zu liefern.

Erste tierexperimentelle und klinische Studien weisen auf positive Effekte von TH im Zusammenhang von myokardialer Ischämie hin. (siehe Kap. ??) Ein Durchbruch zur routinemäßigen klinischen Anwendung steht allerdings noch aus. Die Vereinfachung der komplexeren Situation in-vivo durch ein Zellkulturmodell mit einer reduzierten Anzahl an Störfaktoren bietet die Möglichkeit, neue Kenntnisse über die während Hypothermie auf zellulärer Ebene stattfindenden Vorgänge zu erlangen. Die hier verwendeten HL1-Zellen teilen wesentliche Charakteristika adulter, differenzierter Kardiomyozyten und könnten sich künftig als kardiales Untersuchungsobjekt in der Grundlagenforschung der Hypothermie etablieren.

In der vorliegenden Dissertation sollen folgende Fragen anhand einer Zellkultur mit HL1-Kardiomyozyten beantwortet werden:

- 1.) Können Kardiomyozyten durch therapeutische Hypothermie geschützt werden?
- 2.) Welcher Zeitpunkt der TH-Induktion in Beziehung zur Reperfusion ist optimal?
- 3.) Welche Mechanismen sind an der Protektion beteiligt?
- 4.) Welche Interaktionen bestehen zwischen TH und dem Calcium-Sensitiver Levosimendan?

3 Materialien

3.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Blotting-Kammer: Mini-Trans-Blot®	Bio-Rad, München, Deutschland
Brutschrank (37 °C)	Sanyo Electric Biomedical Co., Tokyo, Japan
Brutschrank (33,5 °C)	Sanyo Electric Biomedical Co., Tokyo, Japan
Chemilumineszenz Bildentwickler: ChemiDoc XRS	Bio-Rad, München, Deutschland
Elektrophorese-Kammer: Mini Protean® 3	Bio-Rad, München, Deutschland
Fluoreszenz-Mikroskop: Axio Image M1	Zeiss/Axio, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenz-Mikroskop Kamera: AxioCam mRC	Zeiss/Axio, Göttingen, Deutschland
Hypoxiekammer	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Magnetrührer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Plattenfluorometer / -luminometer: Fluoroskan Ascent FL	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Plattenphotometer: Multiskan Reader Ascent	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
PCR System: StepOnePlus™	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Schüttler	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Sterile Werkbank: LaminAir	Heraeus Instruments, Berlin, Deutschland
Stromversorgungsgerät: Power Pac 300	Bio-Rad, München, Deutschland
Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermozykler PTC 200	MJ Research, St. Bruno, Kanada
Wasserbad	P-D Ind.-Gesellschaft, Dresden, Deutschland
Zentrifuge 1: Bio-Fuge primo	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge 2: Bio-Fuge fresco	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zellkulturmikroskop	Motic, Wetzlar, Deutschland
Zellkulturmikroskop (Axiovert 40 CFL)	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Zellkulturmikroskop Kamera: uEye	IDS, Obersulm, Deutschland

3.2 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid [30 %]	Roth, München, Deutschland
APS-Lösung	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
BCA Reagenz	Pierce, Rockford, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
CellTiter-Glo Cell Viability Assay	Promega, Madison, USA
Chloroform	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
DAPI	Pierce, Rockford, USA
ECL-Detektionskit	Pierce, Rockford, USA
Ethanol [99 %]	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Methanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
MTT	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Norepinephrin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 und 2	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
PMSF	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ponceau S 0,1%, 5 % Essigsäure	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Probenpuffer, reduzierend	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Protein-Gewichts Marker	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Salzsäure	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
SDS	Roth, München, Deutschland
TEMED	Roth, München, Deutschland
Tris-Acetat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

3.3 Zellkulturmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
96-Well Mikrotiter-Platten	Nunc, Langenselbold, Deutschland
96-Well Mikrotiter-Platten, weiß	Nunc, Langenselbold, Deutschland
Claycomb Medium	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
DMEM Flüssigmedium	Biochrom, Berlin, Deutschland
DMEM Flüssigmedium ohne D-Glukose	Biochrom, Berlin, Deutschland
DMEM Flüssigmedium ohne Phenolrot	Biochrom, Berlin, Deutschland
FBS	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Gelatine	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Gewebekulturflaschen 75 cm ² , 175 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Petrischalen 22 cm ² , 55 cm ²	TPP, Trasadingen, Schweiz
Serologische Pipetten, 5-50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Trypsin / EDTA-Lösung	Biochrom, Berlin, Deutschland
Zellkultur-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Norepinephrin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

3.4 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
Anti- β -Actin	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-Caspase 3	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-p44/42-MAPK (ERK 1/2)	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-Phospho-p44/42-MAPK (pERK 1/2)	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-RBM3	Cell Signaling, Danvers, USA
Donkey-Anti-Rabbit 2. AK	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA

3.5 PCR-Materialien

Bezeichnung	Hersteller
DNA-Polymerase (Moloney Murine Leukemia Reverse Transcriptase)	Promega, Madison, USA
Primer	Promega, Madison, USA
Master Mix	Peqlab Biotech., Erlangen, Deutschland
Peq Gold RNA Pure	Peqlab Biotech., Erlangen, Deutschland
PCR MicroAmp 96-Well Platte	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Taqman-Sonden GAPDH (Mn99999915 g1) iNOS (Mn00440502 m1) RBM3 (Mn01609819 g1))	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

3.6 Software

Bezeichnung	Hersteller
ImageLabTM-Software	Bio-Rad, München, Deutschland
Numbers ´09	Apple Inc., Cupertino, USA
Prism 5 Version 5.0d	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
Quantity One	Bio-Rad, München, Deutschland
uEye – Software	IDS, Obersulm, Deutschland

4 Methoden

4.1 Zellkultur

Als Untersuchungsgrundlage aller Experimente diente ein Zellkulturmodell aus HL1-Kardiomyozyten. Die murinen Zellen wurden von William C. Claycomb, Ph.D (LSU Health Sciences Center New Orleans) bereit gestellt. Es handelt sich um Abkömmlinge von AT-1 Zellen aus dem Vorhof einer transgenen, weiblichen Jackson C57BL/6J-Maus.[88] Die Zellen besitzen einen Phänotyp, welcher differenzierter Kardiomyozyten ähnelt. Außerdem weisen sie spontane kontraktile Aktivität auf.[88] Im Gegensatz zu AT-1-Zellen können HL1-Zellen unbegrenzt passagiert werden und aus Kryokulturen rekultiviert werden. Dabei bleiben die morphologischen, biochemischen und elektrophysiologischen Eigenschaften differenzierter Kardiomyozyten erhalten.[88] HL1-Zellen haben sich als kardiales Untersuchungsmodell beispielsweise in den Bereichen Hypoxie, oxidativer Stress, Zellsignalübertragung, Elektrophysiologie, Calciumhaushalt, Apoptose und Zellzyklusregulation bewährt.[89–94]

Die Kryokultur wurde zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und mit Kulturmedium gewaschen, um im Gefriermedium enthaltenes DMSO zu entfernen. Das Kulturmedium wurde vor der Inkubation stets an die Bedingungen im Inkubator (5 % CO₂, 37 °C) angepasst.

Alle Zellkulturflaschen, Petrischalen und 96-Well-Platten wurden vor der Zugabe der Zellen stets mit 0,2 µg/cm² Fibronectin in 0,02 %-iger Gelatine für mindestens eine Stunde bei 37 °C beschichtet.

Als Kulturmedium wurde Claycomb Medium verwendet, welches mit 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 10% FBS, 0,1 mM Noradrenalin und 2 mM L-Glutamin angereichert wurde. Das Medium wurde alle 2 bis 3 Tage gewechselt. Bei 70 bis 90 %-iger Konfluenz wurden die Zellen im Verhältnis 1:3, 1:4 oder 1:5 unter der Verwendung einer Trypsin-EDTA-Lösung (0,05% / 0,02 %) passagiert. Für alle Experimente wurden Zellen zwischen der 48. und 65. Zellpassage verwendet.

48 Stunden vor Versuchsbeginn und während des Versuchs wurde durch geringe Konfluenz und Entzug von Noradrenalin aus dem Medium gewährleistet, dass die HL1-Zellen nicht anfangen zu schlagen. Ein unkontrollierter Kontraktions-Status mit damit einhergehendem unterschiedlichem Energieverbrauch zwischen den Versuchsgruppen sollte so verhindert werden.

4.2 Simulation der kardialen Ischämie- und Reperfusions-Schädigung

Um die Vorgänge einer kardialen Ischämie zu simulieren, wurden die Zellen einer Kombination aus Nährstoffentzug und physikalischer Hypoxie ausgesetzt. Der Nährstoffentzug wurde durch Inkubation in Mangelmedium erreicht, welches sich aus glukosefreiem DMEM ohne FBS mit 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin und 2 mM L-Glutamin zusammensetzte. Die Reduktion des Sauerstoffanteils auf 0,2 % fand in einer Hypoxie-Kammer statt, in der Stickstoffgas

den Sauerstoffanteil aus dem Inkubator verdrängt. Das Mangelmedium wurde über Nacht in der Hypoxie-Kammer an den niedrigen Sauerstoffgehalt äquilibriert. Bei Versuchsstart wurden das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit Mangelmedium gewaschen und dann mit hypoxischen Mangelmedium für sechs Stunden in der Hypoxie-Kammer inkubiert.

Für normoxe (nicht-ischämische) Kontrollen wurde statt Mangelmedium DMEM mit 4,5 g/l Glukose, 10 % FKS, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin und 2 mM L-Glutamin verwendet. Die Petrischalen wurden mit dem genannten Medium gewaschen und dann in normoxen Inkubations-Bedingungen belassen.

Zur Simulation der Ischämie-Reperfusionsschädigung (I/R) wurde in allen Versuchsgruppen das Medium durch Nährmedium (Claycomb Medium mit 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 10% FBS und 2 mM L-Glutamin) ersetzt und in normoxen Bedingungen für die Dauer des Nachbeobachtungs-Zeitraums weiter inkubiert.

4.3 Zeit-Temperatur-Protokolle

Zur Untersuchung der Hypothermie-Effekte auf Herzmuskelzellen wurden zwei verschiedene Zeit-Temperatur-Protokolle verwendet, die sich im Induktionszeitpunkt der moderaten Hypothermie unterscheiden.

4.3.1 Post-Ischämische-Therapeutische-Hypothermie (PITH)

Das PITH-Protokoll orientiert sich an dem klinisch etablierten Time-Temperature-Management zur Neuroprotektion nach Herzkreislaufstillstand. Dieses sieht laut Leitlinien eine auf die Reanimation folgende 12 bis 24 Stunden andauernde Herabsetzung der Körperkerntemperatur auf 32 - 34 °C vor.[22, 23] Demnach folgte in den Experimenten auf die sechsstündige normotherme Ischämie-Phase eine möglichst zügige Abkühlung der Inkubations-Temperatur auf 33,5 °C mit Beginn der simulierten Reperfusion.(Abb. ??) Hierzu wurde das Nährmedium auf 33,5 °C vorgewärmt. Die hypotherme Inkubations-Temperatur wurde für 24 Stunden aufrechterhalten. In der normothermen Kontrollgruppe wurden alle Versuchsschritte wie in der hypothermen Gruppe ausgeführt, nur wurde das Nährmedium auf 37 °C vorgewärmt und die Inkubations-Temperatur verblieb bei 37 °C.

4.3.2 Intra-Ischämische-Therapeutische-Hypothermie (IITH)

Zusätzlich wurden Versuchsreihen mit einem modifizierten Zeit-Temperatur-Protokoll durchgeführt.(Abb. ??) Die Abkühlung auf 33,5 °C begann hier während der Ischämie mit 1 °C pro 20 Minuten. Die Hypothermie wurde ebenfalls über einen 24-stündigen Zeitraum aufrechterhalten. Die simulierte Reperfusion erfolgte mit auf die entsprechende Temperatur vorgewärmtem Versuchsmedium.

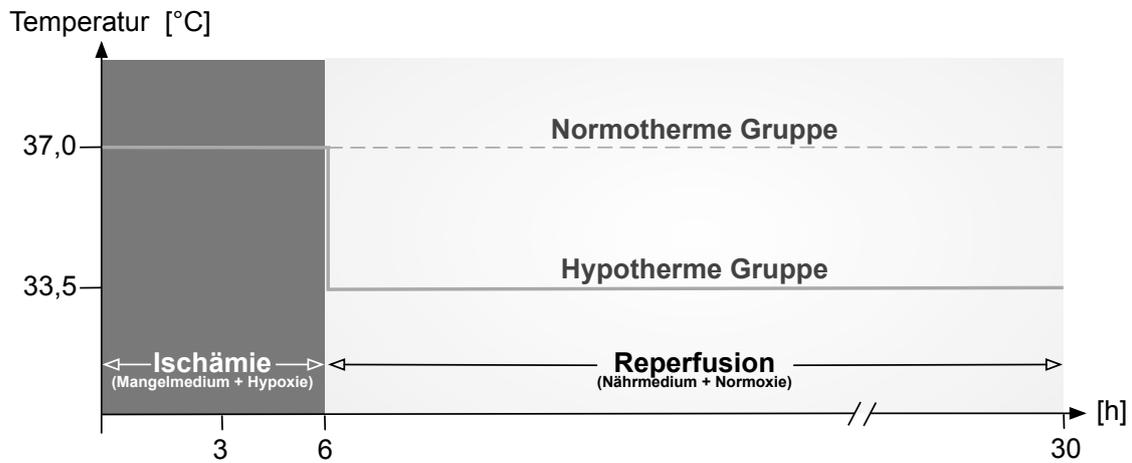


Abb. 4.1: Zeit-Temperatur-Protokoll: Post-Ischämische-Therapeutische Hypothermie (PITH) Induktion der moderaten Hypothermie nach der simulierten Ischämie; Ischämie= 6-stündige Inkubation in Hypoxie (0,2 % O₂) und Mangelmedium (Kulturmedium ohne Glukose und ohne FKS); Reperfusion= 24-stündige Inkubation unter Normoxie (21 % O₂) und Nährmedium (Kulturmedium mit Glukose und FKS)

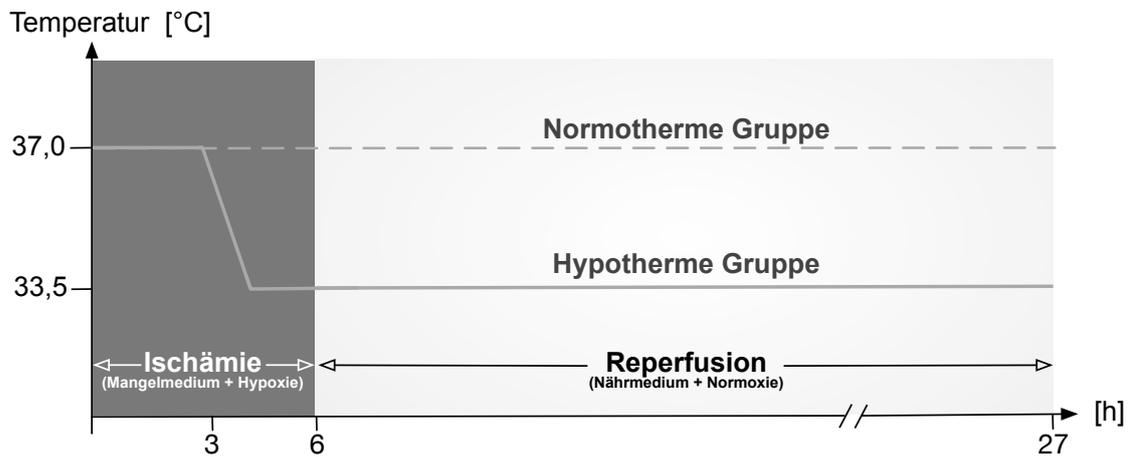


Abb. 4.2: Zeit-Temperatur-Protokoll: Intra-Ischämische-Therapeutische Hypothermie (IITH) Induktion der moderaten Hypothermie während der simulierten Ischämie; Ischämie= 6-stündige Inkubation in Hypoxie (0,2 % O₂) und Mangelmedium (Kulturmedium ohne Glukose und ohne FKS); Reperfusion= 21-stündige Inkubation unter Normoxie (21 % O₂) und Nährmedium (Kulturmedium mit Glukose und FKS)

4.4 Phasenkontrastmikroskopie

Morphologische Veränderungen durch Simulation der Ischämie, I/R und Anwendung der Hypothermie wurden mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops beobachtet und mit Hilfe einer digitalen Kamera dokumentiert. Dazu wurden die Zellen 48 Stunden vor Versuchsbeginn in einer Dichte von $2,7 \times 10^4$ Zellen/cm² in Petrischalen ausplattiert und entsprechend der Versuchsprotokolle nach ?? und ?? behandelt. Zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt wurden die Zellen in 400-facher Vergrößerung fotografiert und in die uEye-Software (IDS) importiert.

4.5 Messung der LDH-Aktivität als Zelltodmarker

Die Messung der LDH-Aktivität erfolgte nach den Herstellerangaben von Roche zum Cytotoxicity Detection Kit (Version 10, 05-2012). Die folgende Beschreibung des Testprinzips beruht ebenfalls auf den dort zu findenden Angaben.

Die Freisetzung des zytoplasmatischen Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) aus Zellen mit defekter Zellmembran wurde in einer gekoppelten Enzymreaktion mit anschließender spektralphotometrischer Messung zur Quantifizierung der aufgetretenen Zellschädigung genutzt. Die Aktivität des außerhalb der Zellen im Zellüberstand befindlichen LDHs korreliert mit dem Ausmaß des stattgefundenen Zelltodes.[95] Die Aktivitätsmessung beruht auf der von LDH katalysierten Reaktion von Laktat zu Pyruvat, wobei in einer gekoppelten Reaktion NADH/H⁺ entsteht. Dieses NADH/H⁺ wird von dem in der Testreagenz enthaltenen Enzym NADH-Dehydrogenase genutzt um Protonen auf das ebenfalls in der Testreagenz enthaltene farblose Tetrazoliumsalz INT zu übertragen, welches dadurch zum rötlichen Formazan mit einem Absorptionsmaximum bei ca. 500 nm wird. Die Absorption ist proportional zur LDH-Aktivität und somit auch proportional zur Anzahl lysierter Zellen.[95]

Die Zellen wurden 48 Stunden vor Versuchsbeginn in Petrischalen in einer Dichte von $2,7 \times 10^4$ Zellen/cm² bzw. 3×10^5 Zellen/ml Medium in Kulturmedium ausplattiert. Wie in ?? beschrieben wurde dann eine Ischämie bzw. I/R simuliert und nach den in ?? beschriebenen Zeit-Temperatur-Protokollen die Versuche durchgeführt. Zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt wurde Zellüberstand aus der Petrischale in ein Eppendorfgefäß überführt und durch Zentrifugation bei 500 g von zellulären Bestandteilen gereinigt. Der Überstand wurde im Verhältnis 1:3 in bidestilliertem Wasser verdünnt. Die verdünnten Proben wurden in Triplikaten à 100 µl pro Well auf eine 96-Well-Platte pipettiert und jeweils mit 100 µl des Testreagenz kombiniert. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit Hilfe von 50 µl 1 M HCL pro Well gestoppt. In einem Plattenphotometer wurde anschließend die Extinktion bei 492 nm bestimmt. Die LDH-Aktivität des Versuchsmediums wurde separat in gleicher Weise wie die LDH-Aktivität der Zellüberstände bestimmt und als Hintergrundkontrolle von allen Versuchswerten subtrahiert. Die Extinktionswerte aller Proben wurden zur

Auswertung in Relation zur normoxen (nicht-ischämischen), normothermen Versuchsgruppe (=1) des jeweiligen Versuchsansatzes gesetzt.

4.6 Messung der Troponin T-Konzentration als Zelltodmarker

Die quantitative Bestimmung des von den Zellen in den Überstand freigesetzten kardialen Troponin T (cTNT) erfolgte extern durch das Labor Berlin (Charité Vivantes GmbH). Die Messungen wurden dort mit Hilfe eines Elektrochemilumineszenz-Immunoassays wie in den Herstellerangaben von Roche Diagnostics zum Elecsys (hochsensitiven) Troponin-T Test (Version 5, 06-2012) beschrieben, durchgeführt. Die unten folgende Beschreibung des Testprinzips beruht auf den dort zu findenden Angaben.

Der Überstand wurde wie in ?? ausgeführt gewonnen und von Zellbestandteilen gereinigt. Nach dem ELISA-Sandwichprinzip erfolgte in einem ersten Schritt die Inkubation von 50 µl Überstand mit Biotin-konjugierten monoklonalen cTNT-spezifischen Antikörpern und Ruthenium(Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)-Komplex)-markierten cTNT-spezifischen Antikörpern. Bei Anwesenheit von cTNT bildet sich ein Komplex aus dem Antigen und den beiden Antikörpern. Im nächsten Schritt wurden mit Streptavidin beschichtete paramagnetische Mikropartikel hinzugegeben, welche an die Biotinkomponente des Antigen-Antikörper-Komplexes binden können. Anschließend wurde das Gemisch in eine Messzelle überführt, in der die mit Streptavidin gebundenen Komplexe an einer Elektrode magnetisch zurückgehalten werden, während die Ruthenium-konjugierten Antikörper ohne Troponin T-Bindung mit Hilfe von ProCell/ProCell M Lösung ausgespült werden. Durch Anlegen einer Spannung wird der Ruthenium-Komplex zunächst oxidiert, um kurz darauf wieder reduziert zu werden. Dabei entsteht ein angeregter Zustand, der wiederum durch Abgabe eines Photons der Wellenlänge 620 nm verlassen wird. Die daraus resultierende Chemilumineszenz wurde mit einem Photomultiplier gemessen. Die ermittelte Lumineszenz ist proportional zur im Überstand enthaltenen cTNT-Konzentration und kann so über eine Kalibrierungsfunktion berechnet werden.

4.7 Messung mitochondrialer Aktivität: MTT

Die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase wurde mit Hilfe eines MTT Assays quantifiziert. Dazu wurden die Herstellerangaben von Sigma-Aldrich zum „In Vitro Toxicology Assay Kit, MTT based“ (Zugriff 05-2012 auf <https://www.sigmaaldrich.com>) befolgt. Die Beschreibung des folgenden Testprinzips beruht gleichfalls auf den dort zu findenden Angaben.

Der Test beruht auf der Dehydrogenasen-abhängigen Umsetzung des gelblichen, wasserlöslichen 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zum bläulichen, was-

serunlöslichen Formazan, welches anschließend photometrisch quantifiziert wird. Hierzu wurden die Zellen 48 Stunden vor Versuchsbeginn in einer Dichte von 2×10^4 Zellen pro Well in 96-Well-Platten ausgesät und die Versuche wie in ?? und ?? beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde das Versuchsmedium vorsichtig mit einer Pipette entfernt, durch 0,5 mg/ml MTT enthaltendes Kulturmedium ersetzt und 120 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das intrazellulär entstandene Formazan wurde durch 0,04 M HCl in 100 % Isopropanol gelöst. Die Extinktion der Lösung wurde bei 570 nm und 630 nm im Plattenphotometer gemessen. Nach Subtraktion der Extinktion bei 630 nm von den Werten bei 570 nm wurde der Mittelwert der Triplikate zur normoxen (nicht-ischämischen), normothermen Versuchsgruppe (=1) normalisiert.

4.8 Messung des ATP-Gehalts

Die Quantifizierung des ATP-Gehaltes fand nach den Herstellerangaben von Promega zum „CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay“ (03-2013) statt. Die folgende Erläuterung des Testverfahrens stammt ebenso aus den dort zu findenden Informationen.

Der zur Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehalts verwendete CellTiter Glo[®]-Test beruht auf der Entstehung eines Lumineszenzsignals in Folge einer ATP-abhängigen Luciferase-Reaktion. Die Zellen werden zunächst lysiert und zelluläre Enzyme (u.a. ATPasen) gehemmt, bevor proportional zur vorhandenen ATP-Menge das lumineszierende Endprodukt Oxyluciferin gebildet wird.

48 Stunden vor Versuchsbeginn wurden 2×10^4 Zellen pro Well in Triplikaten auf einer weißen 96-Well-Platte ausgesät. Der Versuch wurde wie in ?? und ?? beschrieben durchgeführt. Zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt wurden die Platten aus den Inkubatoren entnommen um sie für 30 Minuten der Zimmertemperatur anzupassen. In jedes Well wurden zu 100 µl Versuchsmedium 100 µl CellTiter-Glo[®]-Reagenz hinzugefügt. Anschließend wurden die Platten für zwei Minuten auf dem Schüttler zur Unterstützung der Zelllyse zügig rotiert, bevor sie nach zehn-minütiger Inkubation bei Zimmertemperatur im Luminometer mit 500 ms Integrationszeit gemessen wurden. Die Intensitätswerte aller Proben wurden zur Auswertung in Relation zur normoxen (nicht-ischämischen), normothermen Versuchsgruppe (=1) des jeweiligen Versuchsansatzes gesetzt.

4.9 Messungen des intrazellulären Proteingehalts: Western Blot-Analysen

Die Messung des spezifischen Proteingehalts wurde nach dem in der Arbeitsgruppe bewährten Western-Blot-Verfahren durchgeführt, wie es zuvor bereits beschrieben wurde.[72, 75]

4.9.1 Gewinnung der Proteine

Die Zellen wurden 48 Stunden vor Versuchsbeginn in einer Dichte von $2,7 \times 10^4$ Zellen/cm² in Petrischalen ausgesät und die Versuche wie in ?? und ?? beschrieben durchgeführt. Alle Schritte zur Proteingewinnung wurden bei 4 °C ausgeführt, um eine Fortsetzung der Stoffwechselfvorgänge zu verhindern. Das Versuchsmedium wurde aus den Petrischalen in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und bei 500 g fünf Minuten zentrifugiert, um nicht adhärente Zellbestandteile vom Versuchsmedium zu trennen. Das überstehende Medium wurde aus den Eppendorfgefäßen aspiriert. Die in den Petrischalen befindlichen adhären Zellen wurden mit PBS bedeckt, von der Petrischalenoberfläche abgeschabt und anschließend als Suspension zu den in den Eppendorfgefäßen enthaltenen Zellbestandteilen überführt. Es folgte ein erneuter fünf-minütiger Zentrifugationsschritt bei 500 g um alle Zellbestandteile am Boden des Eppendorfgefäßes zu sammeln. Das erhaltene Pellet wurde in Zellyse-Puffer (20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF) und Proteinase- und Phosphataseinhibitoren resuspendiert. Nach zehn-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Reaktionsgefäße bei 13500 g zentrifugiert um sonstige Zellbestandteile zu entfernen. Der die Proteine enthaltende Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

4.9.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA

Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden photometrisch nach den Herstellerangaben des von Pierce erworbenen „BCA Protein Assay Kits“ (2013) bestimmt. Der Test beruht auf einer Reduktion von Kupferionen unter Anwesenheit von Proteinen in eine einwertige Form, die wiederum mit Bicinchoninsäure (BCA) als Chelatkomplex einen violetten Farbstoff bilden. Die Proteinproben wurden 1:10 in bidestilliertem Wasser verdünnt und in Duplikaten zusammen mit einer Standardreihe aus bekannten Proteinkonzentrationen auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Nach Zugabe der BCA-Reagenz folgte ein 30-minütiger Inkubationsschritt bei 37 °C. Schließlich wurde die Extinktion bei 570 nm gemessen und daraus mit Hilfe der Standardreihe die Proteinkonzentration berechnet.

4.9.3 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine wurde das SDS-PAGE Verfahren verwendet. In einem Natrium-laurylsulfat (SDS) enthaltenden Polyacrylamidgel wandern die Proteine in Abhängigkeit ihrer Polypeptidkettenlänge entlang eines elektrischen Feldes. Die Proteinproben wurden auf Eis aufgetaut. Die gleiche Menge Protein jeder Probe wurde mit SDS enthaltendem Probenpuffer versetzt und dann zur vollständigen Denaturierung fünf Minuten bei 95 °C inkubiert, bevor sie in die Taschen des Polyacrylamidgels überführt wurde. Im Sammelgelbereich des Gels wurden die Proben zunächst bei einer Spannung von 60 V angehäuft und anschließend bei

100 V aufgetrennt, bis die kleinsten Proteine das Ende des Gels erreichten.

Die Gele wurden aus folgender Rezeptur gegossen:

	Trenngel 15%ig	Sammelgel x%ig
Aqua dest.	4,8 ml	4,5 ml
1,5 M Tris / HCL ph 8,8	3,8 ml	/
0,5 M Tris / HCL ph 6,8	/	1,9 ml
Acrylamidlösung 30%	6 ml	810 µl
SDS 10%	150 µl	75 µl
TEMED	30 µl	19 µl
APS 10%	75 µl	57 µl

Die Elektrophorese-Kammer wurde zur Sicherung der Leitfähigkeit mit Puffer bestehend aus 25 mM TRIS-Base, 192 mM Glycin und 3,47 mM SDS befüllt.

4.9.4 Proteintransfer

Die Proteine wurden mit der Tankblotting-Methode auf PVDF-Membranen übertragen. Die Membranen wurden für eine Minute in Methanol getränkt und dann luftdicht auf die die Proteine enthaltenden Gele gelegt. In einer mit Blottingpuffer gefüllten Kammer wurden die Proteine bei 30 V und 4 °C über Nacht auf die Membran überführt. Eine erfolgreiche Übertragung der Proteine wurde durch eine Ponceau-Färbung bestätigt.

Der Blottingpuffer setzte sich aus 25 mM TRIS-Base, 192 mM Glycin und 439 mM Methanol zusammen.

4.9.5 Detektion spezifischer Proteine

Die proteinbeladene PVDF-Membran wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur in TBST mit je nach Herstellerangaben 5 % Magermilch oder 5 % Albumin inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen in der darauffolgenden Detektion zu unterbinden. Anschließend wurde die Membran mit den jeweiligen Primärantikörpern, die entsprechend den Herstellerangaben mit TBST verdünnt wurden, über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreifacher Waschung der Membran mit TBST zur Primärantikörperentfernung wurde der mit Meerrettichperoxidase konjugierte Sekundärantikörper (Donkey anti Rabbit, 1:10000 in TBST) für eine Stunde bei Raumtemperatur appliziert. Ein erneute dreifache Waschung folgte. Schließlich wurde die Membran für eine Minute bei Zimmertemperatur mit einer Peroxid und Luminol enthaltenden Reagenz (enhanced chemiluminescence) bedeckt. Das Reagenz dient als Substrat für die an den Sekundärantikörper gebundene Meerrettichperoxidase. Die Reaktion des Luminols mit

dem Peroxid als Oxidationsmittel führt zur Emission eines Chemilumineszenzsignals, welches mit Hilfe einer auf der ChemidDoc(TM) installierten CCD-Kamera aufgenommen wurde und in die Quantity One(TM)-Software importiert wurde.

4.9.6 Densitometrie

Die photodensitometrische Analyse der detektierten Banden wurde mit der Software Image Lab (TM) durchgeführt. Neben der Expression des zu untersuchenden Proteins wurde als Kontrolle gleicher Proteinmengenladung auf jeder Membran die Intensität von β -Aktin mitbestimmt. Um Schwankung in der beladenen Proteingesamtmenge auszugleichen wurde die Bandenintensität des jeweiligen Proteins durch die Intensität der Aktinbande dividiert. Die durch Aktin dividierten Intensitätswerte aller Proben wurden zur Auswertung in Relation zur normoxen (nicht-ischämischen), normothermen Versuchsgruppe (=1) des jeweiligen Versuchsansatzes gesetzt.

4.10 Messung von mRNA-Regulationen mittels quantitativer Echtzeit-PCR

Die einzelnen Schritte der quantitativen Echtzeit-PCR (qRT-PCR) wurden nach der in der Arbeitsgruppe etablierten Methodik durchgeführt, wie sie zuvor bereits dargelegt wurde.[75]

4.10.1 RNA-Isolation

Die Isolation der RNA erfolgte mit peqGOLD RNAPure™ nach den Angaben des Herstellers Peqlab. Dazu wurden Zellen 48 Stunden vor Versuchsbeginn in einer Dichte von $2,7 \times 10^4$ Zellen/cm² in Petrischalen ausgesät und nach der Beschreibung in ?? und ?? behandelt. Zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt wurden das Versuchsmedium aspiriert und die Petrischalen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden durch Zugabe von peqGOLD RNA-Pure™ mit anschließender Resuspension von der Oberfläche der Petrischale abgelöst und zur vollständigen Lyse bei Zimmertemperatur fünf Minuten inkubiert. Zur RNA-Extraktion wurde 0,2 ml Chloroform/ml peqGOLD RNAPure™ hinzugefügt, die Probe geschüttelt und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt bei 12000 g und 4 °C. Die obere klare Schicht jeder Probe wurde in ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und zur Ausfällung der RNA mit der gleichen Menge Isopropanol kombiniert. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis folgte eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 12000 g und 4 °C. Das entstandene Pelett wurde in 75 %-igem Ethanol geschwaschen und in RNase-freiem bidestillierten Wasser resuspendiert.

4.10.2 Reverse Transkription

Die RNA wurde mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) in cDNA transkribiert. Dazu wurde zunächst die RNA-Konzentration spektralphotometrisch bestimmt und deren Reinheit mittels des Quotienten der Messerwerte bei 260nm und 280nm überprüft. Im darauffolgenden Schritt wurden 500 ng RNA mit 200 U der DNA-Polymerase und einer Mischung aus einzelsträngigen Hexanukleotiden zufälliger Sequenz (random Primer) kombiniert. Der Reaktionsansatz wurde in einem Thermozykler für eine Stunde bei 42 °C transkribiert.

4.10.3 Quantitative RT-PCR

Im PCR-Ansatz wurde die cDNA unter gleichzeitiger Quantifizierung der Produkte amplifiziert. Dazu wurden Hydrolysesonden (TaqMan) mit zur untersuchten Nukleinsäure komplementären Basenfolge verwandt, die am 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein (FAM) und am 3'-Ende mit 6-carboxy-tetramethylrhodamine (TAMRA) markiert sind. Kommt es während der PCR zum Einbau der Sonde, wird das am 3'-Ende befindliche TAMRA abgespalten, wodurch die Wirkung des Förster-Resonanzenergietransfers zwischen FAM und TAMRA aufgehoben wird und so das durch FAM ausgesandte Fluoreszenzsignal nicht weiter unterdrückt wird.[96]

Die PCR wurde in Triplikaten à 11 µl bestehend aus 5 µl 2x KAPA PROBE FAST qPCR Mastermix, 2,5 µl 2,5 µM Oligonukleotid Mix, 0,5 µl Probe und 3 µl in Aqua bidest gelösten TaqMan-Sonden (RBM3, iNOS, GAPDH) auf 96-Well PCR-Platten pipettiert. In einem StepOnePlus™ Real-Time PCR-System durchliefen die Platten 40 Zyklen à 15 Sekunden bei 94 °C und eine Minute bei 60 °C. Mit Hilfe der StepOnePlus™ Software wurden die Fluoreszenzwerte in CT-Werte überführt und unter Rücksicht der internen GAPDH-Ladekontrolle in RQ-Werte umgerechnet, so dass die Werte zur normoxen (nicht-ischämischen), normothermen Versuchsgruppe (=1) normalisiert wurden.[75, 96]

4.11 Applikation von Levosimendan

Levosimendan (Simdax®) wurde als steriles 2,5mg/ml Konzentrat von der Firma Orion Pharma erworben und bei 4 °C gelagert. Direkt vor Beginn der Versuche wurde das Konzentrat im jeweiligen Versuchsmedium entsprechend der gewünschten Konzentration verdünnt. Die Zellen wurden während des gesamten Versuchsdurchlaufes mit Levosimendan in der jeweiligen Konzentration inkubiert. Das Medium zur Simulation der Reperfusion wurde mit frischem Levosimendan entsprechender Konzentration angesetzt. Eine Vorbehandlung mit Levosimendan vor Versuchsbeginn fand nicht statt.

4.12 Statistische Analyse

Alle Daten wurden zur statistischen Analyse und grafischen Darstellung in GraphPad Prism 5 importiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt. Alle Experimente wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander mit unterschiedlichen Zellpassagen durchgeführt. Für alle Daten wurde eine Normalverteilung angenommen und parametrische Signifikanztests gewählt. Bei Experimenten bei denen genügend Replikate zur Verfügung standen ($n > 6$), wurde die Normalverteilung mit Hilfe des Shapiro-Wilk Tests überprüft. Zur Untersuchung der Signifikanz zwischen Mittelwerten von mehr als zwei Gruppen wurde der One-way ANOVA-Test genutzt und anschließend mit der Bonferroni-Korrektur zur Vermeidung der Kumulation des Alphafehlers die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppe spezifiziert. P-Werte $< 0,05$ werden als statistisch signifikant angesehen und grafisch mit * markiert. P-Werte $< 0,01$ sind mit ** und p-Werte $< 0,001$ mit *** markiert.

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung von Ischämie- und Reperfusionsschädigung: Effekte von Nährstoffentzug und Hypoxie bei 37 °C

Zur Etablierung der Simulation von Ischämie und I/R wurden zunächst Versuche bei 37 °C ausgeführt, bei denen die Effekte der beiden Ischämiekomponenten (Nährstoffentzug und Hypoxie) einzeln und in Kombination untersucht wurden.

5.1.1 Einfluss auf die LDH-Freisetzung

Zur Quantifizierung des Zelluntergangs durch die Simulation von Ischämie und I/R wurde die Aktivität von LDH im Zellüberstand bestimmt.

5.1.1.1 Einfluss der simulierten Ischämie auf die LDH-Freisetzung

Eine 6-stündige Inkubation unter normoxen Bedingungen in Mangelmedium führte lediglich zu einem leichten Anstieg der LDH-Aktivität im Überstand im Vergleich zur Gruppe mit kompletter Nährstoffversorgung. (Abb. ??) Die Simulation der Ischämie aus der Kombination von Mangelmedium und Hypoxie erhöhte die extrazelluläre LDH-Aktivität signifikant.

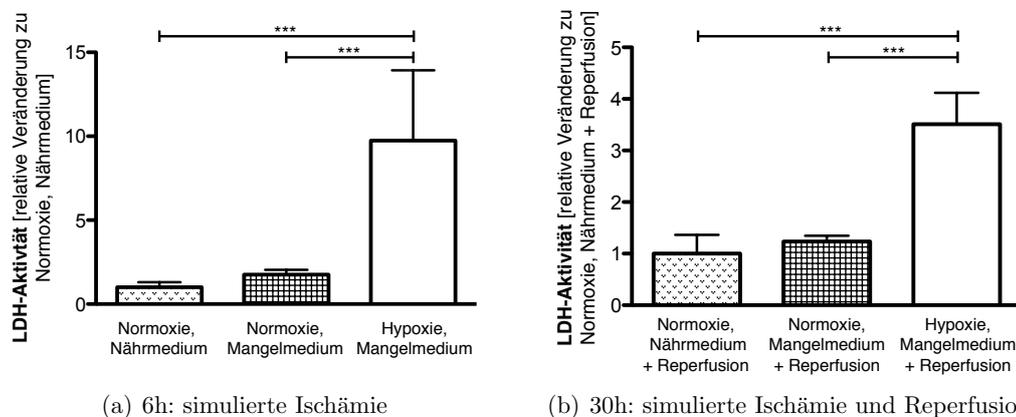


Abb. 5.1: LDH-Freisetzung nach simulierter Ischämie (a) und I/R (b) bei 37 °C
 Normoxie= 21 % O₂; Hypoxie= 0,2 % O₂; Nährmedium= Kulturmedium mit Glukose und FKS; Mangelmedium= Kulturmedium ohne Glukose und ohne FKS; Reperfusion= 24-stündige Inkubation in Normoxie und Nährmedium; simulierte Ischämie= 6-stündige Inkubation in Hypoxie und Mangelmedium; simulierte Ischämie und Reperfusion (I/R)= 6-stündige Inkubation in Hypoxie und Mangelmedium mit darauf folgender 24-stündiger Inkubation unter Normoxie und Nährmedium; ***= p<0,001; (a) n=7, (b) n=5

5.1.1.2 Einfluss der simulierten Reperfusion auf die LDH-Freisetzung

Ähnliche Ergebnisse traten bei der simulierten Reperfusionsschädigung (I/R) auf. Die Gruppe, die vor der 24-stündigen normoxen Inkubation in Nährmedium der Kombination

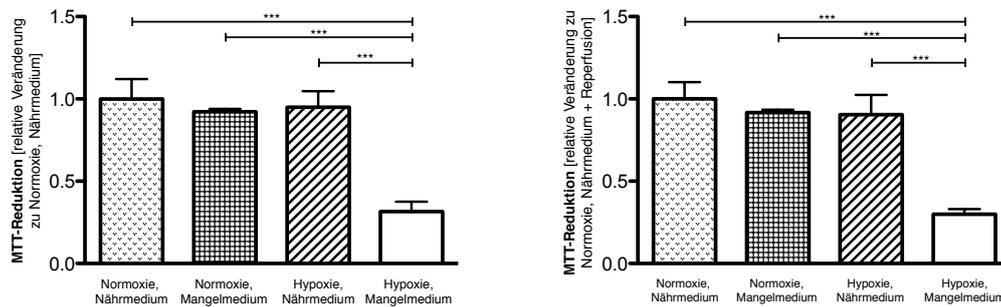
aus Hypoxie und Mangelmedium ausgesetzt wurde, hatte eine im Vergleich zur vollständig versorgten Kontrollgruppe signifikant höhere LDH-Aktivität im Überstand.(Abb. ??) Im Vergleich der vollständig versorgten Kontrollgruppe zu der Gruppe, die vor der simulierten Reperfusion lediglich Mangelmedium bei Normoxie exponiert wurde, zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied.

5.1.2 Einfluss auf die MTT-Reduktion

Zur Einschätzung der mitochondrialen Aktivität wurde das Ausmaß der MTT-Reduktion ermittelt.

5.1.2.1 Einfluss der simulierten Ischämie auf die MTT-Reduktion

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der LDH-Freisetzung (??) wurde eine signifikante Einschränkung der Zellvitalität nur durch die komplette Simulation der Ischämie durch die Kombination von Nährstoffentzug und Hypoxie erreicht.(Abb. ??) Isolierter Nährstoffentzug oder alleinige Hypoxie führten zu keiner signifikanten Herabsetzung der MTT-Reduktion im Vergleich zur normoxen, nährstoffversorgten Gruppe.



(a) 6h: simulierte Ischämie

(b) 30h: simulierte Ischämie und Reperfusion

Abb. 5.2: MTT-Reduktion nach simulierter Ischämie (a) und I/R (b) bei 37 °C Normoxie= 21 % O₂; Hypoxie= 0,2 % O₂; Nährmedium= Kulturmedium mit Glukose und FKS; Mangelmedium= Kulturmedium ohne Glukose und ohne FKS; Reperfusion= 24-stündige Inkubation in Normoxie und Nährmedium; simulierte Ischämie= 6-stündige Inkubation in Hypoxie und Mangelmedium; simulierte Ischämie und Reperfusion= 6-stündige Inkubation in Hypoxie und Mangelmedium mit darauf folgender 24-stündiger Inkubation unter Normoxie und Nährmedium; ***= p<0,001; n= 4

5.1.2.2 Einfluss der simulierten Reperfusion auf die MTT-Reduktion

Weder die alleinige Unterbrechung der Nährstoffversorgung noch der Entzug von Sauerstoff vor Simulation der Reperfusion führt zu einer signifikant geringeren MTT-Reduktion gegenüber den vollständig versorgten Zellen.(Abb. ??) Die Kombination aus Hypoxie und Mangelmedium

vor der simulierten Reperfusion, also die vollständige Simulation der Reperfusions-Schädigung (I/R), führten hingegen zu einer signifikanten Reduktion des MTT-Umsatzes.

5.2 Effekte von Post-Ischämischer-Therapeutischer-Hypothermie

5.2.1 Einfluss der simulierten Reperfusion unter PITH auf die Morphologie

Zunächst wurden die Effekte der Post-Ischämischen-Therapeutischen-Hypothermie (PITH) auf die Morphologie der HL-1 Zellen im Vergleich zur normoxen Kontrolle und der normothermen I/R-Gruppe mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops untersucht.(Abb.??)

Gegenüber der normoxen Kontrolle (Abb. ??) führte I/R bei 37 °C (Abb. ??) zu einer verringerten Konfluenz durch eine vermehrte Ablösung der geschädigten Zellen. Die abgelösten Zellen erschienen rundlich und durch die veränderte Lichtbrechung hell leuchtend. Das Zytoplasma der adhären Zellen in der I/R-Gruppe wirkte fragmentiert und die Zellränder weniger glatt. Die Zellkerne waren nicht mehr deutlich vom Zytoplasma abgegrenzt oder eingeschrumpft. Zell-Zell-Kontakte waren stark vermindert. Die beschriebenen Veränderungen trafen auch auf die PITH-Gruppe zu.(Abb. ??) Demzufolge wurde keine Veränderung in der Morphologie durch nach der simulierten Ischämie einsetzende moderate Hypothermie beobachtet.

5.2.2 Einfluss auf die LDH-Freisetzung

Zur Quantifizierung des in der Morphologie beobachteten Zellschadens durch I/R bei 37 °C und PITH (??) diente die Messung von freigesetztem LDH im Zellkulturmedium.

I/R bei 37 °C führte zu einem signifikanten Anstieg der LDH-Aktivität gegenüber der normoxen Kontrolle.(Abb. ??) Nur unwesentlich niedriger erfolgte der Anstieg der LDH-Aktivität in der PITH-Gruppe. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der normothermen I/R-Gruppe und der PITH-Gruppe.

5.2.3 Einfluss auf die Troponin T-Freisetzung

Als spezifischer Schädigungsmarker von Kardiomyozyten wurde die Troponin T (cTNT)-Konzentration im Zellüberstand nach Simulation der Reperfusion bestimmt. Die Messungen bestätigten die Ergebnisse der relativen LDH-Aktivität. So stieg die cTNT-Konzentration gegenüber der normoxen Kontrolle durch I/R sowohl bei 37 °C als auch unter PITH signifikant an.(Abb. ??) Der Unterschied zwischen I/R bei 37 °C und PITH ist nur gering und nicht signifikant.

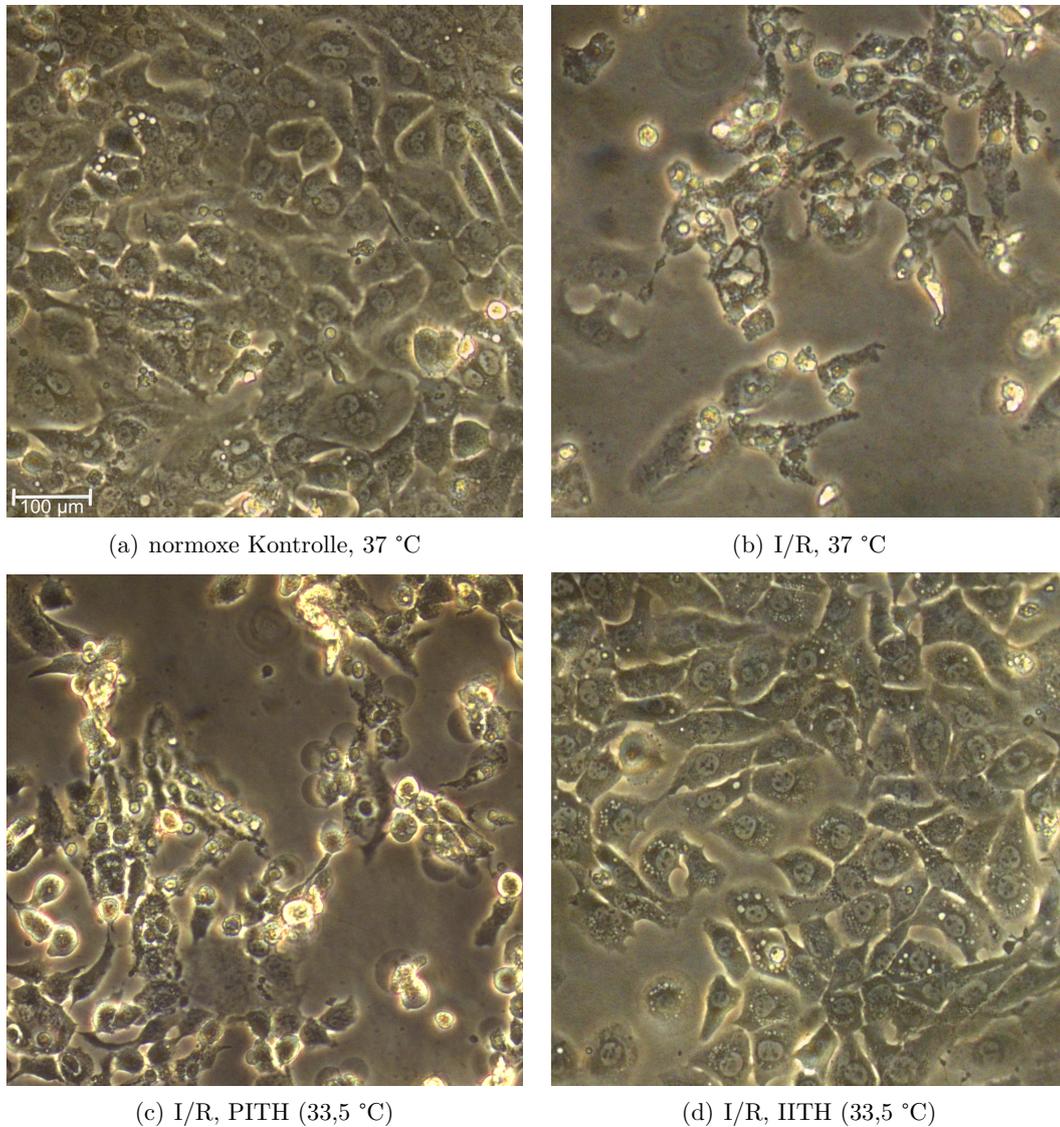


Abb. 5.3: Phasenkontrastaufnahmen nach I/R bei 37°C (b), PITH (c) und IITH (d) 400-fache Vergrößerung; a) normoxie Kontrolle= Inkubation in Normoxie (21 % O₂) und Nährmedium (Kulturmedium mit Glukose und FKS) bei 37 °C; b) I / R= simulierte Ischämie und Reperfusion durch 6-stündige Inkubation in Hypoxie (0,2 % O₂) und Mangelmedium (Kulturmedium ohne Glukose und ohne FKS) mit darauf folgender 24-stündiger Inkubation unter Normoxie und Nährmedium bei 37 °C; c) I/R unter Post-Ischämischer-Therapeutischen-Hypothermie (PITH, 33,5 °C); d) I/R unter Intra-Ischämischer-Therapeutischen-Hypothermie (IITH, 33,5 °C)

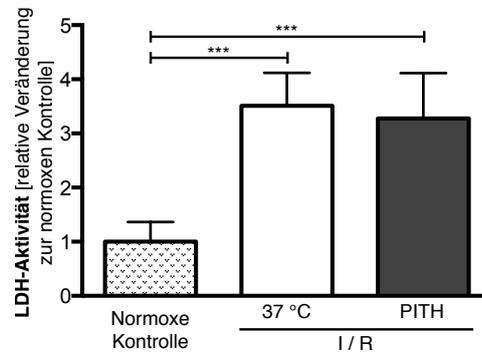


Abb. 5.4: LDH-Freisetzung nach I/R bei 37 °C und PITH normoxie Kontrolle= Inkubation bei 37 °C in Normoxie (21 % O₂) und Nährmedium (Kulturmedium mit Glukose und FKS); I/R= simulierte Ischämie und Reperfusion durch 6-stündige Inkubation in Hypoxie (0,2 % O₂) und Mangelmedium (Kulturmedium ohne Glukose und ohne FKS) mit darauf folgender 24-stündiger Inkubation unter Normoxie und Nährmedium; PITH= Post-Ischämische-Therapeutische-Hypothermie (33,5 °C); ***= p<0,001; n= 5

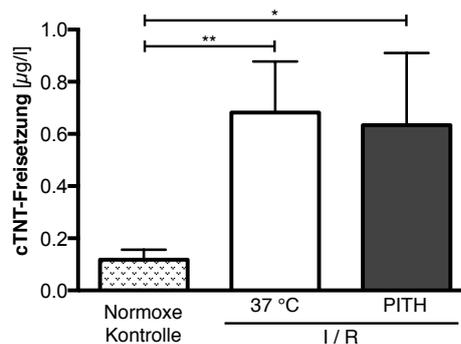


Abb. 5.5: Troponin T-Freisetzung nach I/R bei 37 °C und PITH normoxie Kontrolle= Inkubation bei 37 °C in Normoxie (21 % O₂) und Nährmedium (Kulturmedium mit Glukose und FKS); I/R= simulierte Ischämie und Reperfusion durch 6-stündige Inkubation in Hypoxie (0,2 % O₂) und Mangelmedium (Kulturmedium ohne Glukose und ohne FKS) mit darauf folgender 24-stündiger Inkubation unter Normoxie und Nährmedium; PITH= Post-Ischämische-Therapeutische-Hypothermie (33,5 °C); **= p<0,01; *= p<0,05; n= 4

5.2.4 Einfluss auf den ATP-Gehalt

Der intrazelluläre ATP-Gehalt wurde relativ zur normoxen Kontrolle (= 1) gemessen. Es zeigte sich durch I/R sowohl bei 37 °C als auch unter PITH ein signifikant niedrigerer ATP-Gehalt.(Abb. ??) Es besteht kein signifikanter Unterschied im Abfall des ATP-Spiegels zwischen I/R bei 37 °C und PITH.

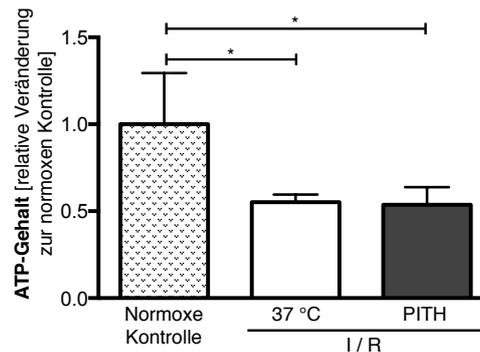


Abb. 5.6: ATP-Gehalt nach I/R bei 37 °C und PITH normoxie Kontrolle= Inkubation bei 37 °C in Normoxie (21 % O₂) und Nährmedium (Kulturmedium mit Glukose und FKS); I/R= simulierte Ischämie und Reperfusion durch 6-stündige Inkubation in Hypoxie (0,2 % O₂) und Mangelmedium (Kulturmedium ohne Glukose und ohne FKS) mit darauf folgender 24-stündiger Inkubation unter Normoxie und Nährmedium; PITH= Post Ischämische Therapeutische Hypothermie (33,5 °C); *= p<0,05; n= 4

5.3 Einfluss von

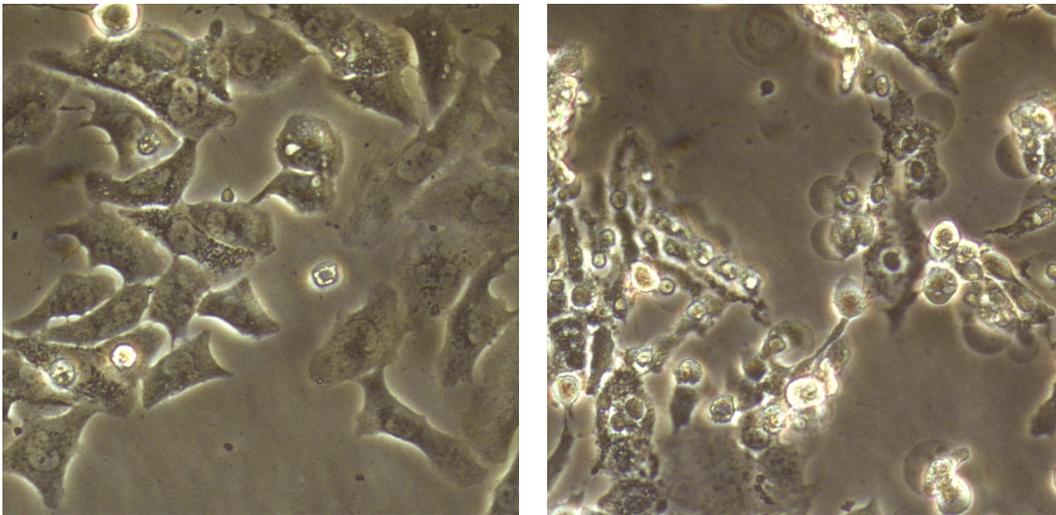
Intra-Ischämischer-Therapeutischer-Hypothermie

Die Effekte der während der simulierten Ischämie induzierten moderaten Hypothermie (IITH) wurden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten untersucht, nämlich zur Evaluation des Einflusses auf die ischämische Schädigung nach sechs Stunden und zur Einschätzung der Veränderungen der Reperfusionsschädigung nach 27 Stunden.

5.3.1 Einfluss auf die Morphologie

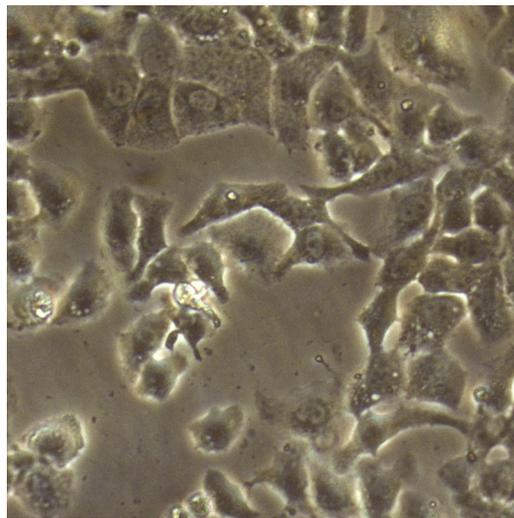
5.3.1.1 Einfluss der simulierten Ischämie unter IITH auf die Morphologie

Nach sechs Stunden simulierter Ischämie bei 37 °C waren deutliche morphologische Veränderungen gegenüber der normoxen Kontrolle sichtbar.(Abb. ?? ??) Die Zellen wirkten geschrumpft und abgerundet. Die durch die veränderte Lichtbrechung beeinflusste Aufhellung weist möglicherweise auf eine beginnende Ablösung der Zellen hin. Die Konfluenz war unverändert. Die beschriebene Veränderungen durch I/R bei 37 °C traten unter IITH-Bedingungen nicht auf.(Abb.??)



(a) normoxie Kontrolle, 37 °C

(b) simulierte Ischämie, 37 °C



(c) simulierte Ischämie, IITH (33,5 °C)

Abb. 5.7: Phasenkontrastaufnahmen simulierter Ischämie bei 37 °C (b) und IITH (c) 400-fache Vergrößerung; a) normoxie Kontrolle= Inkubation in Normoxie (21 % O₂) und Nährmedium (Kulturmedium mit Glukose und FKS) bei 37 °C; b) simulierte Ischämie= 6-stündige Inkubation in Hypoxie (0,2 % O₂) und Mangelmedium (Kulturmedium ohne Glukose und ohne FKS) bei 37 °C; c) simulierte Ischämie unter Intra-Ischämischer-Therapeutischen-Hypothermie (IITH, 33,5 °C)

5.3.1.2 Einfluss der simulierten Reperfusion unter IITH auf die Morphologie

Die in Abschnitt ?? beschriebenen morphologischen Veränderungen durch I/R bei 37 °C und PITH wurden unter IITH nicht beobachtet. Die Zellen ähnelten in Konfluenz, Anteil adhärenter Zellen und in der ovalen Zellform mit deutlich abgrenzbarem Zellkern der Gruppe der normoxen Kontrollen. (Abb. ??, ??) Die Zellkontakte zwischen den Kardiomyozyten blieben erhalten.

5.3.2 Einfluss auf die LDH-Freisetzung

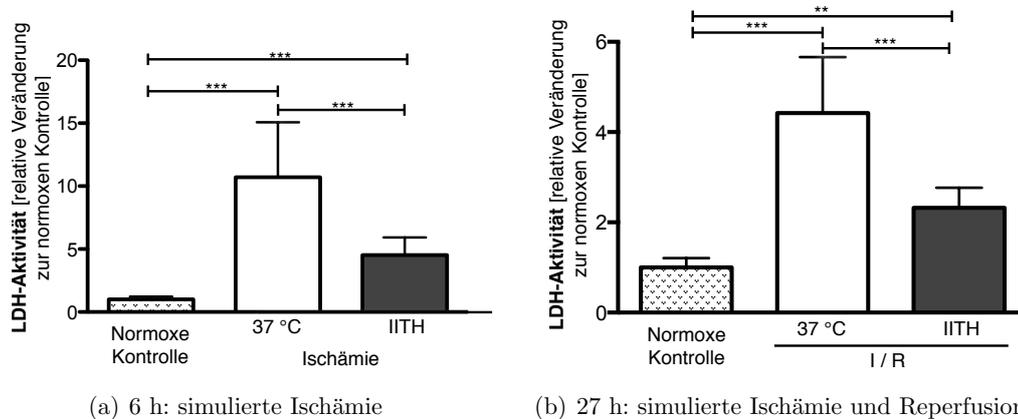


Abb. 5.8: LDH-Freisetzung nach simulierter Ischämie (a) und I/R (b) bei 37 °C und IITH normoxe Kontrolle= Inkubation bei 37 °C in Normoxie (21 % O₂) und Nährmedium (Kulturmedium mit Glukose und FKS); Ischämie= 6-stündige Inkubation in Hypoxie (0,2 % O₂) und Mangelmedium (Kulturmedium ohne Glukose und ohne FKS); I/R= simulierte Ischämie und Reperfusion durch 6-stündige Inkubation in Hypoxie und Mangelmedium mit darauf folgender 24-stündiger Inkubation unter Normoxie und Nährmedium; IITH= Intra-Ischämische-Therapeutische-Hypothermie (33,5 °C); ***= p<0,001; **= p<0,01; n= 9

5.3.2.1 Einfluss der simulierten Ischämie unter IITH auf die LDH-Freisetzung

Die 6-stündige Simulation der Ischämie führte bei 37 °C zu einem signifikanten Anstieg der LDH-Freisetzung im Vergleich zur normoxen Kontrolle. (Abb. ??) Der Anstieg der LDH-Freisetzung fiel unter IITH gegenüber der normothermen I/R-Gruppe signifikant geringer aus.

5.3.2.2 Einfluss der simulierten Reperfusion unter IITH auf die LDH-Freisetzung

Durch die Intervention mit IITH während der Simulation von I/R wurde eine signifikante Reduktion des LDH-Anstiegs gegenüber der normothermen I/R-Gruppe erreicht. (Abb. ??)

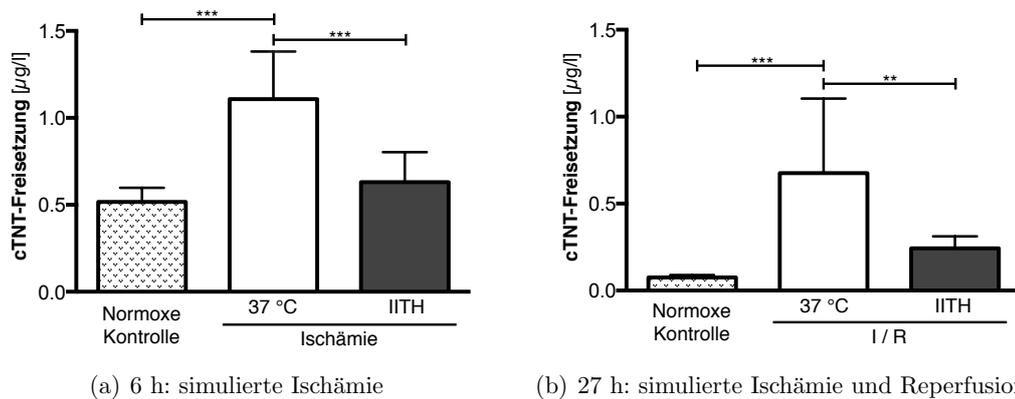


Abb. 5.9: Troponin T-Freisetzung nach simulierter Ischämie (a) und I/R (b) bei 37 °C und IITH normoxie Kontrolle= Inkubation bei 37 °C in Normoxie (21 % O₂) und Nährmedium (Kulturmedium mit Glukose und FKS); Ischämie= 6-stündige Inkubation in Hypoxie (0,2 % O₂) und Mangelmedium (Kulturmedium ohne Glukose und ohne FKS); I/R= simulierte Ischämie und Reperfusion durch 6-stündige Inkubation in Hypoxie und Mangelmedium mit darauf folgender 24-stündiger Inkubation unter Normoxie und Nährmedium; IITH= Intra-Ischämische-Therapeutische-Hypothermie (33,5 °C); ***= p<0,001; **= p<0,01; n= 8

5.3.3 Einfluss auf die Troponin T-Freisetzung

5.3.3.1 Einfluss der simulierten Ischämie unter IITH auf die Troponin T-Freisetzung

Die cTNT-Konzentration in der normoxen Kontrolle nach sechs Stunden belief sich auf 0,52 µg/l. Die Simulation der Ischämie führte bei 37 °C demgegenüber zu einer signifikanten Erhöhung der cTNT-Konzentration auf 1,11 µg/l und bei IITH zu einer nicht-signifikanten Erhöhung auf 0,63 µg/l. (Abb. ??) Die Konzentration in der IITH-Gruppe ist im Vergleich zur normothermen I/R-Gruppe signifikant geringer.

5.3.3.2 Einfluss der simulierten Reperfusion unter IITH auf die cTNT-Freisetzung

Die cTNT-Konzentration der normoxen Kontrolle betrug nach dem Zeitraum der simulierten Ischämie und Reperfusion 0,075 µg/l. (Abb. ??) Unter normothermer I/R stieg die Konzentration signifikant auf 0,676 µg/l. Unter IITH kam es zu einem nicht-signifikanten Anstieg auf 0,243 µg/l. Der Anstieg der cTNT-Konzentration fiel in der IITH signifikant geringer aus als in der I/R-37°C-Gruppe.

5.3.4 Einfluss auf den ATP-Gehalt

5.3.4.1 Einfluss der simulierten Ischämie unter IITH auf den ATP-Gehalt

Die Simulation der Ischämie bei 37 °C und unter IITH führte im Vergleich zur normoxen Kontrolle (=1) zu einer signifikanten Herabsetzung des ATP-Gehalts. (Abb. ??) Der ATP-Gehalt in der IITH-Gruppe ist signifikant höher in der normothermen Ischämie-Gruppe.

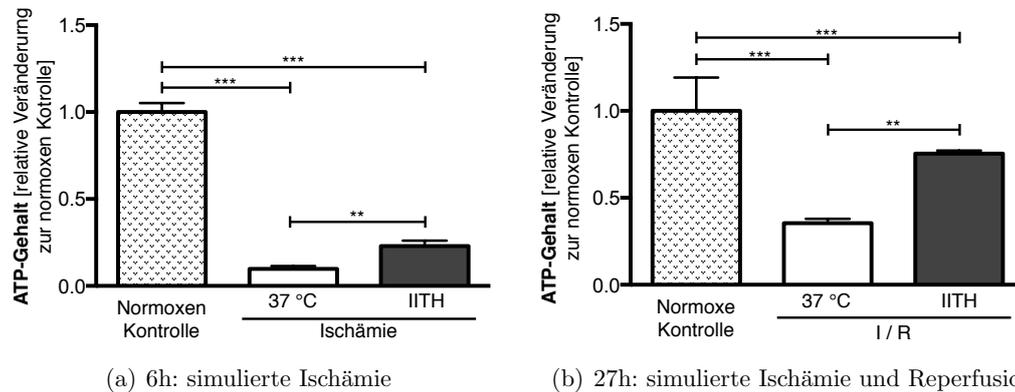


Abb. 5.10: ATP-Gehalt nach simulierter Ischämie (a) und I/R (b) bei 37 °C und IITH normoxe Kontrolle= Inkubation bei 37 °C in Normoxie (21 % O₂) und Nährmedium (Kulturmedium mit Glukose und FKS); Ischämie= 6-stündige Inkubation in Hypoxie (0,2 % O₂) und Mangelmedium (Kulturmedium ohne Glukose und ohne FKS); I/R= simulierte Ischämie und Reperfusion durch 6-stündige Inkubation in Hypoxie und Mangelmedium mit darauf folgender 24-stündiger Inkubation unter Normoxie und Nährmedium; IITH= Intra-Ischämische-Therapeutische-Hypothermie (33,5 °C); ***= p<0,001; **= p<0,01; n= 4

5.3.4.2 Einfluss der simulierten Ischämie und Reperfusion unter IITH auf den ATP-Gehalt

Im Vergleich zur normoxen Kontrolle (= 1) kam es durch I/R bei 37 °C und unter IITH zu einer signifikanten Absenkung des ATP-Gehalts.(Abb. ??) Die ATP-Reduktion verlief unter IITH gegenüber Normothermie allerdings abgeschwächt. Der ATP-Abfall unterscheidet sich signifikant zwischen den beiden I/R-Gruppen.

5.3.5 Einfluss auf die MTT-Reduktion

Nachdem sich protektive Hinweise im Bereich der Morphologie, des Zelluntergangs und des ATP-Gehalts ergeben hatten, wurde der Einfluss der Hypothermie-Behandlung während Ischämie und I/R auf die mitochondriale Aktivität in Form der MTT-Reduktion gemessen.

5.3.5.1 Einfluss der simulierten Ischämie unter IITH auf die MTT-Reduktion

Die simulierte Ischämie führte sowohl in der normothermen als auch in der IITH-Gruppe zu einer signifikanten Absenkung der MTT- Reduktion gegenüber der normoxen Kontrolle (= 1).(Abb. ??) Die Einschränkung der MTT-Reduktion fiel allerdings in der IITH-Gruppe signifikant geringer aus.

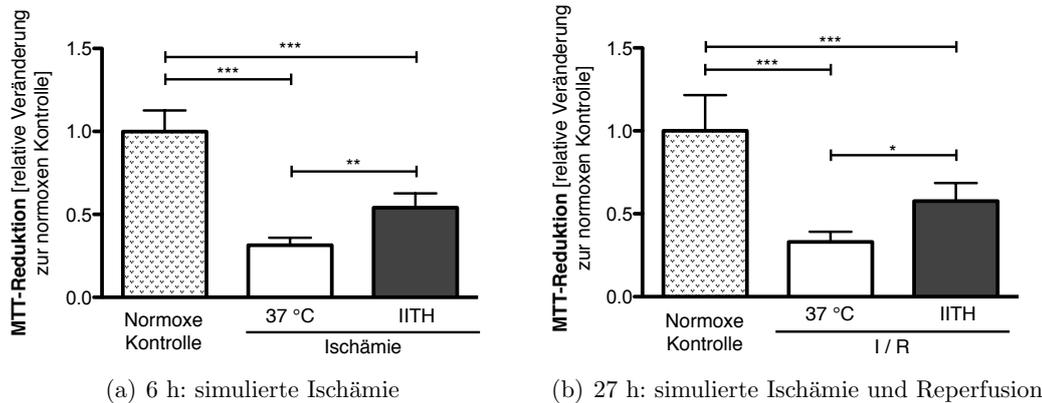


Abb. 5.11: MTT-Reduktion nach simulierter Ischämie (a) und I/R (b) bei 37 °C und IITH normoxe Kontrolle= Inkubation bei 37 °C in Normoxie (21 % O₂) und Nährmedium (Kulturmedium mit Glukose und FKS); Ischämie= 6-stündige Inkubation in Hypoxie (0,2 % O₂) und Mangelmedium (Kulturmedium ohne Glukose und ohne FKS); I/R= simulierte Ischämie und Reperfusion durch 6-stündige Inkubation in Hypoxie und Mangelmedium mit darauf folgender 24-stündiger Inkubation unter Normoxie und Nährmedium; IITH= Intra-Ischämische-Therapeutische-Hypothermie (33,5 °C); ***= p<0,001; *= p<0,05; n= 7

5.3.5.2 Einfluss der simulierten Ischämie und Reperfusion unter IITH auf die MTT-Reduktion

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch nach der Simulation von Ischämie und Reperfusion. So kam es bei 37 °C und unter IITH zu einer signifikanten Absenkung der MTT-Reduktion im Vergleich zur normoxen Kontrolle (=1).(Abb. ??) Die MTT-Werte in der IITH-Gruppe fielen signifikant höher aus als in der normothermen I/R- Gruppe.

5.3.6 Einfluss auf die Caspase 3-Aktivierung

Zur Beurteilung des Apoptoseverhaltens wurde auf Proteinebene die Spaltung der Procaspase 3 in die aktive Caspase 3 untersucht. Dazu wurde das Verhältnis der densitometrisch gewonnenen Intensitätswerte von gespaltenener Caspase 3 zu ungespaltenener Procaspase 3 bestimmt und zur 6 Stunden normoxen Kontrolle als Startwert der simulierten Reperfusion normalisiert (6h normoxe Kontrolle= 1).

5.3.6.1 Einfluss der simulierten Ischämie unter IITH auf die Caspase 3-Aktivierung

Die sechsstündige Simulation der Ischämie führte weder bei 37 °C noch unter IITH zu einem Anstieg der gespaltenen Caspase 3. Im Vergleich zur normoxen Kontrolle (=1) kam es durch die simulierte Ischämie unter Normothermie und IITH zu einer Verminderung der Caspase-Spaltung. Das Verhältnis von Normothermie und IITH unterscheidet sich nach simulierter Ischämie nicht signifikant.

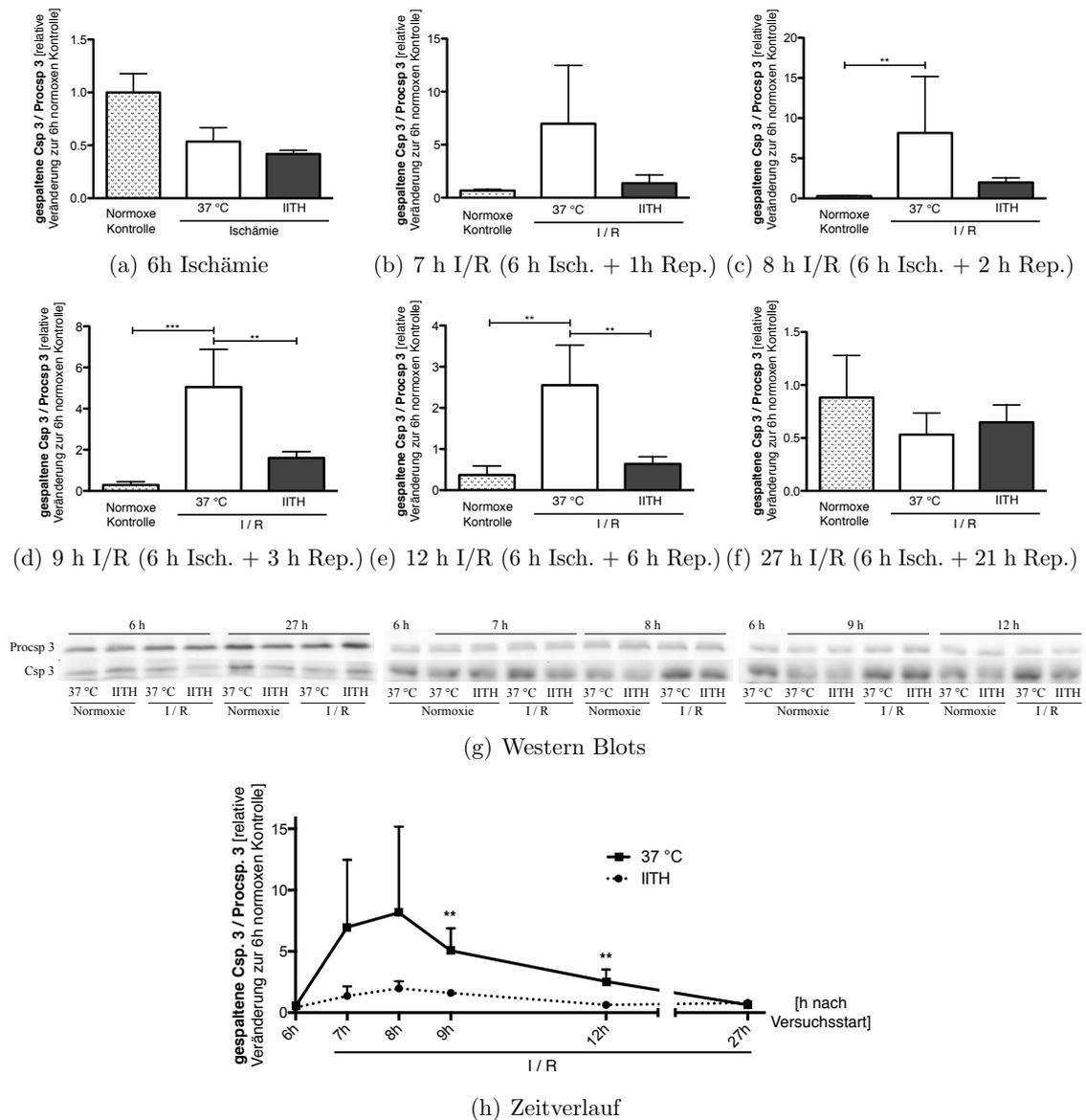


Abb. 5.12: Caspase 3 Aktivierung nach simulierter Ischämie (a) und I/R (b-f) bei 37 °C und IITH Densitometrische Quantifizierung nach 6, 7, 8, 9, 12 und 27 h (a-f), Beispiel-aufnahmen der Banden (g), Darstellung im Zeitverlauf (h); normoxie Kontrolle= Inkubation bei 37 °C in Normoxie (21 % O₂) und Nährmedium (Kulturmedium mit Glukose und FKS); Ischämie= 6-stündige Inkubation in Hypoxie (0,2 % O₂) und Mangelmedium (Kulturmedium ohne Glukose und ohne FKS); I/R= simulierte Ischämie und Reperfusion durch 6-stündige Inkubation in Hypoxie und Mangelmedium mit darauf folgender 24-stündiger Inkubation unter Normoxie und Nährmedium; Normoxie= Inkubation in 21 % O₂ und Nährmedium; IITH= Intra-Ischämische-Therapeutische-Hypothermie (33,5 °C); ***= p<0,001; **= p<0,01; a) und f) n=3, b)- e) n= 4

5.3.6.2 Einfluss der simulierten Ischämie und Reperfusion unter IITH auf die Caspase 3-Aktivierung

Die auf die simulierte Ischämie folgende Reperfusion führte bei 37 °C in den ersten Stunden (7 h, 8 h, 9 h, 12 h) zunächst zu einer Aktivierung der Caspase 3, wobei sich das Verhältnis bis zum 27 Stunden-Zeitpunkt wieder auf die Seite der inaktiven Procaspase zurückentwickelte.(Abb. ??)

Nach sieben Stunden (6 h Ischämie + 1 h Reperfusion) kam es durch I/R bei 37 °C zu einem deutlichen, aber nicht-signifikanten Anstieg des Caspase-Quotienten (Caspase 3 / Procaspase 3) im Vergleich zur 6 Stunden normoxen Kontrolle. Unter IITH stieg der Quotient nur gering an.(Abb. ??)

Nach acht Stunden (6 h Ischämie + 2 h Reperfusion) erreichte der Anstieg des Caspase-Quotienten durch I/R unter Normothermie gegenüber der normoxen Kontrolle Signifikanzniveau, während der Anstieg unter IITH weiterhin klein blieb und sich nicht signifikant von der normoxen Kontrolle unterscheidet.(Abb. ??)

Das Verhältnis des Apoptose-Quotienten beginnt sich zum neun Stunden-Wert (6 h Ischämie + 3 h Reperfusion) wieder der normoxen Kontrolle anzunähern, der Unterschied bleibt signifikant. Der Anstieg des Caspase-Quotienten unterschied sich signifikant zwischen der normothermen I/R- Gruppe und der IITH-Gruppe.

Nach zwölf Stunden (6 h Ischämie + 6 h Reperfusion) zeigte sich der Quotient durch I/R bei 37 °C gegenüber der 6 Stunden normoxen Kontrolle nach wie vor signifikant erhöht. Der Anstieg des Quotienten wurde durch IITH weiterhin unterdrückt. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen I/R bei 37°C und IITH.

Nach 27 Stunden war keine Aktivierung der Apoptose mehr zu beobachten.

5.3.7 Einfluss auf die ERK-Aktivierung

Nachdem sich bei der Caspase 3-Aktivierung die der simulierten Reperfusion zeitnah folgenden Stunden als relevant bei der Apoptoseaktivierung herausgestellt hatten (??), wurde die ERK-Aktivierung in diesem Zeitraum (7h, 8h, 9h 12h) analysiert um einen genaueren Einblick in mögliche Veränderungen der Apoptosekaskade durch IITH zu gewinnen.

5.3.7.1 Einfluss der simulierten Ischämie und Reperfusion auf die ERK-Aktivierung unter IITH

Zu allen untersuchten Zeitpunkten wurde durch I/R eine nicht-signifikante Steigerung des phosphorylierten (aktivierten) ERK-Anteils beobachtet.(Abb. ??) Eine Stunde nach Reperfusion (7 Stunden nach Versuchsstart) fand dieser Anstieg sowohl in der normothermen als auch in der IITH Gruppe statt.(Abb. ??) An den darauf folgenden Zeitpunkten (8h, 9h, 12h) wurde durch IITH eine nicht-signifikant abgeschwächte ERK Aktivierung beobachtet. (Abb. ??, ??, ??)

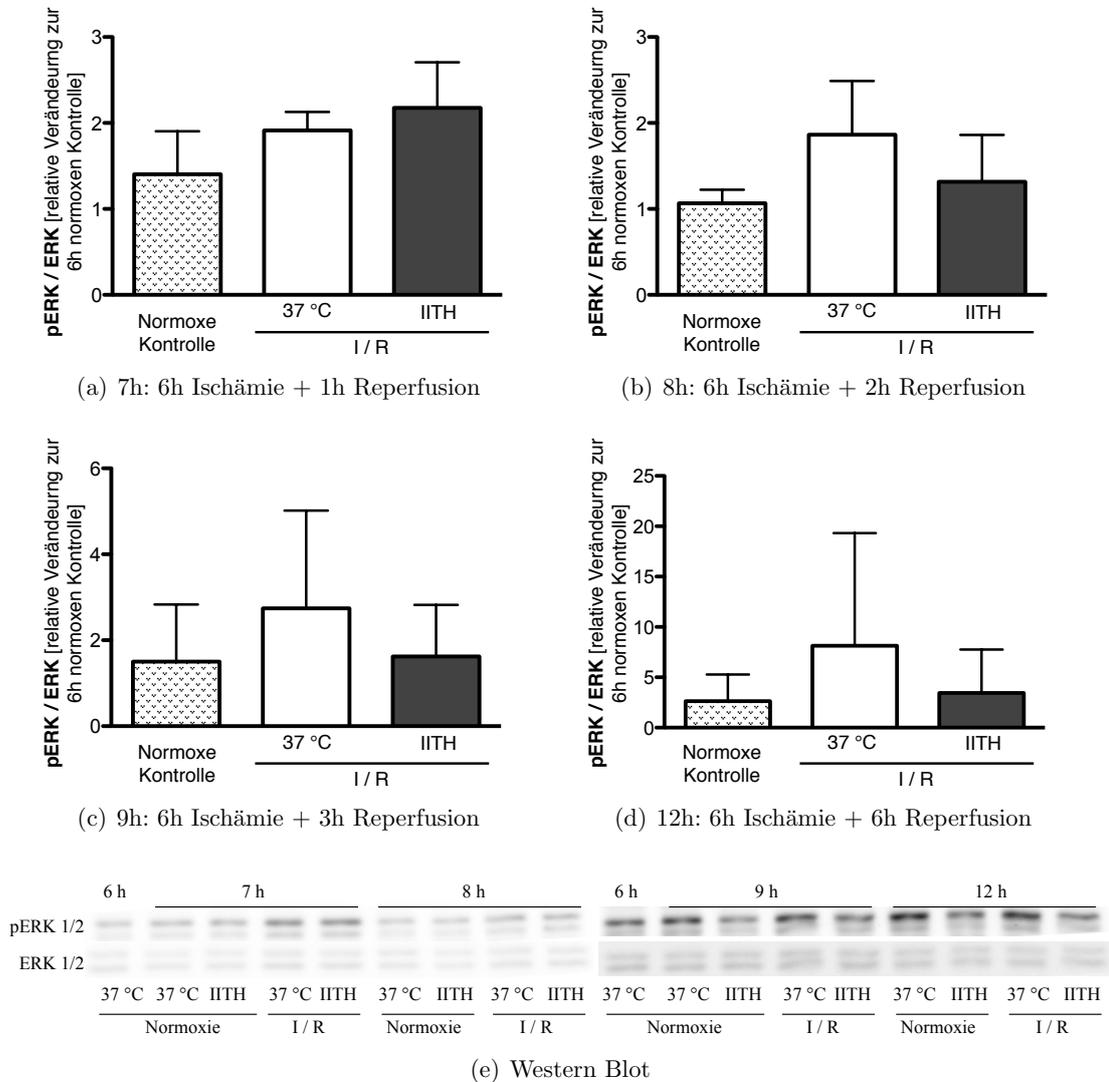


Abb. 5.13: ERK 1/2-Phosphorylierung nach simulierter I/R bei 37 °C und IITH
 Densitometrische Quantifizierung nach 7,8,9 und 12h (a-d), Beispielaufnahmen der Banden (e), normoxie Kontrolle= Inkubation bei 37 °C in Normoxie (21 % O₂) und Nährmedium (Kulturmedium mit Glukose und FKS); Ischämie= 6h Inkubation in Hypoxie (0,2 % O₂) und Mangelmedium (Kulturmedium ohne FKS und ohne Glukose); Reperfusion= Inkubation in Normoxie und Nährmedium; I/R= simulierte Ischämie und Reperfusion durch 6-stündige Inkubation in Hypoxie und Mangelmedium mit darauf folgender 24-stündiger Inkubation unter Normoxie und Nährmedium; Normoxie= Inkubation in 21 % O₂ und Nährmedium; IITH= Intra-Ischämische-Therapeutische-Hypothermie (33,5 °C); n=4

5.3.8 Einfluss auf die iNOS mRNA-Induktion

Das Enzym induzierbare-NO-Synthase (iNOS) ist entscheidend an der Regulation des NO-Haushalts der Zellen beteiligt. Wie in ?? beschrieben, kann eine übermäßige NO-Konzentration toxische Auswirkung haben. Auf mRNA-Ebene wurde die Induktion von iNOS während I/R untersucht. Der Gehalt der iNOS-mRNA direkt nach der Phase der simulierten Ischämie blieb in allen Gruppen unterhalb der Detektionsgrenze.

5.3.8.1 Einfluss der simulierten Ischämie und Reperfusion unter IITH auf die iNOS Induktion

Nach Simulation von I /R bei 37 °C wurde ein signifikanter Anstieg des mRNA-Gehalts von iNOS in den HL-1 Zellen beobachtet.(Abb. ??) Die mRNA-Induktion durch I/R fand unter IITH-Bedingungen nicht statt. Der Anstieg des iNOS-Gehalts in der IITH-Gruppe ist im Vergleich zur normothermen I/R-Gruppe signifikant geringer.

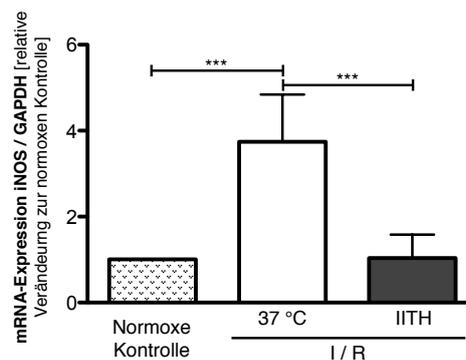


Abb. 5.14: INOS Gen-Expression (mRNA) nach I/R bei 37 °C und IITH normoxie Kontrolle= Inkubation bei 37 °C in Normoxie (21 % O₂) und Nährmedium (Kulturmedium mit Glukose und FKS); I / R= simulierte Ischämie und Reperfusion durch 6-stündige Inkubation in Hypoxie (0,2 % O₂) und Mangelmedium (Kulturmedium ohne Glukose und ohne FKS) mit darauf folgender 24-stündiger Inkubation unter Normoxie und Nährmedium; IITH= Intra-Ischämische-Therapeutische-Hypothermie (33,5 °C); ***= p<0,001; n= 5

5.3.9 Einfluss auf die RBM3-Induktion

Das Kälteschockprotein RBM3 wird in unterschiedlichen Geweben und Zellen unter hypothermen Bedingungen hochreguliert.(Kap. ??) Eine protektive Signalfunktion von RBM3 wird diskutiert. Die Regulation von RBM3 durch moderate Hypothermie in nicht-geschädigten und in durch simulierte Ischämie und I/R geschädigten HL1-Kardiomyozyten wurde sowohl auf Protein als auch mRNA-Ebene untersucht.

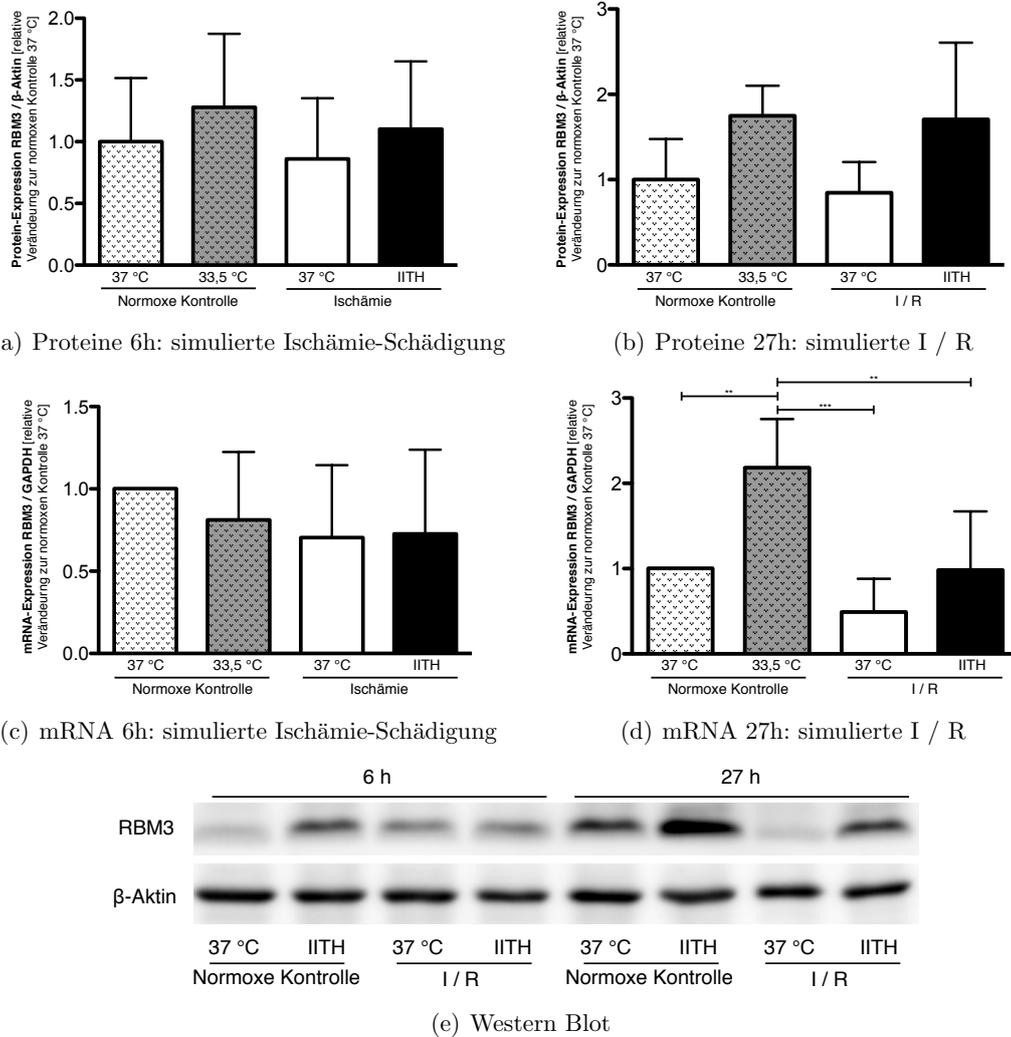


Abb. 5.15: RBM3 Protein- und Gen-Expression (mRNA) nach simulierter Ischämie (a, c) und I/R (b, d) normoxe Kontrolle= Inkubation bei 37 °C in Normoxie (21 % O₂) und Nährmedium (Kulturmedium mit Glukose und FKS); Ischämie= 6-stündige Inkubation in Hypoxie (0,2 % O₂) und Mangelmedium (Kulturmedium ohne Glukose und ohne FKS); I / R= simulierte Ischämie und Reperfusion durch 6-stündige Inkubation in Hypoxie und Mangelmedium mit darauf folgender 24-stündiger Inkubation unter Normoxie und Nährmedium; IITH= Intra-Ischämische-Therapeutische-Hypothermie (33,5 °C); *= p<0,001; **= p<0,01; a) und c) n=4, b) und d) n=5**

5.3.9.1 Regulation von RBM3 unter simulierter Ischämie und IITH

Nach der 6-stündigen Periode der simulierten Ischämie wurde weder auf Protein- noch auf mRNA-Ebene eine signifikante Induktion von RBM3 durch IITH beobachtet.(Abb. ??, ??) Vielmehr zeigte sich eine Tendenz zu einer verminderten RBM3-Synthese unter simulierter Ischämie.

5.3.9.2 Regulation von RBM3 unter I/R und IITH

Die am Ende der I/R-Periode gewonnenen Proben zeigten in den IITH-Gruppen nicht-signifikant erhöhte RBM3 Protein- und mRNA-Spiegel.(Abb. ??, ??) In allen Versuchsansätzen kam es durch IITH in etwa zu einer Verdopplung des Protein- und mRNA-Gehalts im Vergleich zur normothermen I/R-Gruppe. Nur bei Applikation der therapeutischen Hypothermie in der nicht geschädigten normoxen Kontrolle erreicht die Induktion der mRNA-Synthese ein signifikantes Niveau.(Abb. ??) Die I/R-Simulation führte bei 37 °C zu einer nicht-signifikanten Reduktion des Protein- und mRNA-Gehalts im Vergleich zur normoxen Kontrolle.

5.4 Effekte von Levosimendan

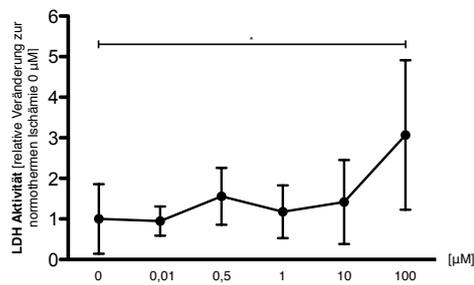
Neben der bekannten positiv inotropen Wirkung von Levosimendan werden in der Literatur zellprotektive (antiapoptotische) Effekte des Wirkstoffs beschrieben.[84] Die Effekte von Levosimendan auf das Zellsterben von HL1-Kardiomyozyten unter simulierten Bedingungen von Ischämie und I/R wurden in Konzentrationen von 0,01 µM, 0,5 µM, 1 µM, 10 µM und 100 µM bei Normothermie untersucht. Darüber hinaus wurde die Interaktion mit IITH im klinisch relevanten Konzentrationsbereich von 0,05 µM und 1 µM analysiert.[85]

5.4.1 Einfluss von Levosimendan unter simulierter Ischämie und IITH auf die LDH-Freisetzung

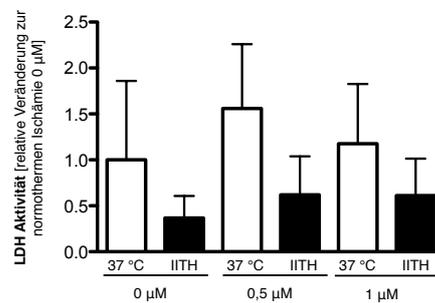
Die Zugabe von Levosimendan zum Versuchsmedium führte bei der hohen Konzentration von 100 µM zu einem signifikanten Anstieg der LDH-Freisetzung gegenüber der Gruppe der simulierten Ischämie ohne Levosimendan.(Abb. ??) Im übrigen Konzentrationsbereich zeigte sich keine signifikanten Veränderungen der LDH-Aktivität im Zellüberstand. In Kombination mit IITH wurde weder eine Aufhebung noch eine Potenzierung des protektiven Effekts der herabgesetzten Temperatur während simulierter Ischämie beobachtet.(Abb. ??)

5.4.2 Einfluss von Levosimendan unter simulierter I/R und IITH auf die LDH-Freisetzung

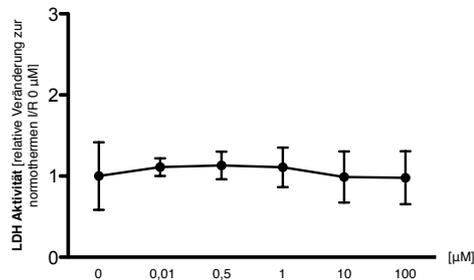
Unter den Bedingungen von I/R wurde im gesamten Konzentrationsbereich von Levosimendan bei Normothermie keine signifikante Veränderungen der LDH-Freisetzung aus den HL1-Zellen beobachtet. (Abb. ??) Interessanterweise führte auch die hohe Konzentration von 100 μM während der langen Reperfusionphase keine toxischen Schäden zu, wie sie während der kürzeren Phase der simulierten Ischämie beobachtet wurden. Wie bei der simulierten Ischämie zeigten sich auch bei I/R unter IITH keine signifikanten Veränderungen der LDH-Freisetzung zwischen den Konzentrationsbereichen. (Abb. ??)



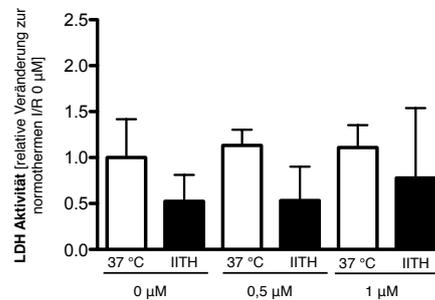
(a) 6h: Levosimendan-Wirkung unter simulierter Ischämie bei 37 °C



(b) 6h: Levosimendan-Wirkung unter simulierter Ischämie und IITH



(c) 27h: Levosimendan-Wirkung unter I/R bei 37 °C



(d) 27h: Levosimendan-Wirkung unter I/R und IITH

Abb. 5.16: Wirkung von Levosimendan auf die LDH-Freisetzung nach Ischämie (a, b) und Ischämie + Reperfusion (c, d) Ischämie= 6-stündige Inkubation in Hypoxie (0,2 % O_2) und Mangelmedium (Kulturmedium ohne Glukose und ohne FKS); I / R= simulierte Ischämie und Reperfusion durch 6-stündige Inkubation in Hypoxie und Mangelmedium mit darauf folgender 24-stündiger Inkubation unter Normoxie und Nährmedium; IITH= Intra-Ischämische-Therapeutische-Hypothermie (33,5 °C); * = $p < 0,05$; n = 3

6 Diskussion

Therapeutische Hypothermie als Intervention zur Abschwächung der Ischämie- und Reperfusionsschädigung ist seit Längerem im Blick der experimentellen und klinischen Forschung. Während sich zur Neuroprotektion ein Kühlungsprotokoll auch in klinischen Studien durchgesetzt und in der Praxis bei Erwachsenen nach Herzkreislaufstillstand und bei Neugeborenen nach perinataler Asphyxie etabliert hat, ist die Rolle der TH zur Kardioprotektion bisher unklar. Die aktuell vorliegenden Daten ermöglichen keine abschließenden Schlussfolgerungen zum Nutzen der TH zur Kardioprotektion. Positive Ergebnisse aus experimentellen Arbeiten ließen sich unter ähnlichen Versuchsbedingungen häufig nicht reproduzieren und konnten bisher nicht in klinischen Studien bestätigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden daher zwei unterschiedliche Kühlungsprotokolle (PITH und IITH) in einem Ischämie und einem Ischämie-Reperfusion-Modell aus HL1-Kardiomyozyten mit dem Ziel untersucht, weitere Einsichten in das zellprotektive Potential und mögliche Wirkmechanismen der moderaten Hypothermie zu gewinnen. In der Zusammenschau mit anderen Forschungsarbeiten könnten neue Erkenntnisse zu einer Optimierung der klinischen Anwendung der TH beitragen und so zu einer Reduktion der Mortalität und Morbidität der ischämischen Herzerkrankung beitragen.

6.1 Etablierung des Ischämie- und Reperfusionsschadens

Zur Evaluation von zellprotektiven Interventionen sollten Zellen soweit beeinträchtigt werden, dass die Mehrheit der Zellen die Schwelle zum unausweichlichen Zelltod nicht überschritten hat, sich aber dennoch in der Nähe dieser Überlebensschwelle befinden. Daher wurde zunächst ein Modell aus HL1-Zellen entwickelt, das sowohl die Charakteristika einer Ischämie und der darauf folgenden Reperfusionsschädigung möglichst genau widerspiegelt, als auch die Zellen in einem Ausmaß schädigt, welches eine gute Beurteilung der moderaten Hypothermie als protektive Intervention zulässt.

Im vorgestellten Modell konnte durch die 6-stündige Inkubation von HL1-Kardiomyozyten unter Nährstoffentzug und Hypoxie zur Simulation einer myokardialen Ischämie erfolgreich eine morphologisch sichtbare und durch Biomarker (LDH und cTNT) quantifizierbare Zellschädigung induziert werden. (Abb. ??, Kap. ??, ??) Die verminderten Messwerte der MTT-Reduktion und des ATP-Gehalts nach simulierter Ischämie weisen auf eine mitochondriale Beeinträchtigung hin. (Kap. ??, ??) Diese Beobachtungen passen zu dem in Kapitel ?? erläuterten Pathomechanismus von Ischämie und Reperfusion. Die beschriebenen Veränderungen fanden auch bei der Simulation der Reperfusionsschädigung statt. (Abb. ??, Kap. ??, ??, ??, ??)

Weder die Inkubation in Mangelmedium bei Normoxie noch die Inkubation in Nährmedium bei Hypoxie schränkten im gleichen Zeitraum die Zellviabilität ein. (Kap. ??) Diese Ergebnisse stimmen mit denen der Arbeit von Åström-Olsson et al. überein. [97] Sie zeigten, dass bei HL1-Zellen unter ähnlichen Simulationsbedingungen der Ischämie während der ersten fünf

Stunden kein vermehrter Zelluntergang stattfindet. Zum sechs-Stunden-Wert wurde eine Reizschwelle überschritten, so dass eine verringerte Zellviabilität gemessen wurde. Hypoxie bei ansonsten bestehender Nährstoffversorgung führte erst nach 18 Stunden zu einem messbaren Zellsterben.[97]

Bei der Betrachtung der höheren Toleranz der HL1-Zellen gegenüber der (simulierten) Ischämie im Vergleich zu primären Kardiomyozyten *in vitro* und Kardiomyozyten *in vivo* muss man folgendes berücksichtigen: Bei HL1-Zellen handelt es sich um eine Tumorzelllinie, welche unter physiologischen Bedingungen *per definitionem* als unsterblich gilt. Als Tumorzelllinie ist sie an Wachstum unter mangelhafter Versorgung gewöhnt. Außerdem befinden sich die HL-1 Zellen in der Petrischale in Form einer Monoschicht und müssen somit nicht gegen einen Widerstand schlagen. Dies ermöglicht eine Art Ruhezustand, der im Vergleich zum Arbeitsmyokard *in vivo* mit einem reduzierten Nährstoffbedarf einhergeht.

Eines der für die Ischämie typischen Charakteristika findet in der hier verwendeten Methodik zur Ischämie-Simulation keine Berücksichtigung: Die bei der Ischämie anfallenden Katabolite führen normalerweise zu einem Abfall des pH-Wertes. Dieser Abfall wurde in unserem Modell durch Natriumhydrogencarbonat, das als Puffersubstanz in dem für die HL1-Zellen optimierten Zellkulturmedium enthalten ist, unterbunden. Mögliche Auswirkungen der pH-Veränderungen bleiben daher in den vorgestellten Versuchsreihen verdeckt. Andersen et al. zeigten mit Hilfe von HL-1 Kardiomyozyten, dass ein abgesenkter pH von 7,4 auf 6,0 zu einer reduzierten Caspase 3-Aktivierung und reduzierter Cytochrom C-Freisetzung führte, was auf eine verringerte Apoptose-Aktivierung durch das azidotische Milieu hinweist.[98] Das Ausmaß des nekrotischen Zelltodes bei Simulation von Ischämie und Reperfusion blieb in den Versuchen von Anderesen et al. durch die Einstellung des pH-Wertes auf 6,0 allerdings unverändert.[98]

6.2 Effekte von

Post-Ischämischer-Therapeutischer-Hypothermie

Die Absenkung der Temperatur mit Beginn der simulierten Reperfusion nach dem PITH-Protokoll, welches in ?? beschrieben wurde und Anlehnung an das zur Neuroprotektion nach Herzkreislaufstillstand etablierte Protokoll fand, führte im vorgestellten Modell zu keinem Schutz der HL1-Zellen. Weder morphologisch noch in den Messwerten der Biomarker LDH und Troponin T fanden wir im Vergleich zur normothermen Gruppe signifikante Unterschiede. Auch die anhand des ATP-Gehaltes einzuschätzende mitochondriale Aktivität wurde durch PITH nicht verbessert.

Die Unwirksamkeit von kurz vor oder mit der Reperfusion einsetzender Hypothermie auf das Absterben von Kardiomyozyten entspricht anderen zell-experimentellen, tier-experimentellen und klinischen Studien.[42, 46, 48, 99] Tissier et al. fassten in einem Review experimentelle

in-vivo-Studien zusammen, die den Einfluss von um den Zeitpunkt der Reperfusion einsetzender TH auf die Größe des Infarktareals nach AMI untersuchten.[100] Nur eine der Tierstudien ergab positive Ergebnisse der TH, welche allerdings bei nur 30-minütiger Ischämiezeit eine immerhin fünf Minuten vor der Reperfusion einsetzende Abkühlung beinhaltete.[101] Vergleichbar mit den hier vorgestellten Zellviabilitäts-Daten wurde in den anderen Studien kein signifikanter Unterschied zwischen der Größe des Infarktareals mit und ohne TH festgestellt. Eine in-vitro Studie von Shao et al. beschreibt einen positiven Effekt von PITH bei von Küken abstammenden Kardiomyozyten.[67] Diese zeigten bei simulierter Ischämie und Reperfusion unter Temperaturabsenkung auf 25 °C bei Beginn der Reperfusion eine geringere Einschränkung der Zellviabilität im Vergleich zur normothermen Versuchsgruppe. Der Unterschied zu unseren Resultaten könnte beispielsweise in der tieferen Absenkung der Temperatur oder der Verwendung einer nicht von Säugetieren abstammenden Zelllinie begründet sein. Des Weiteren fanden Shao et al. ein höheres protektives Potential bei Vorverlagerung der Hypothermie-Induktion in die Ischämiephase, auch wenn dadurch die Gesamtzeit der simulierten Ischämie verlängert wurde.[67] Möglicherweise greift die TH vor allem in Mechanismen ein, die während der Ischämie stattfinden und den späteren Reperfusionsschaden in die Wege leiten. Sind diese Mechanismen bereits vor Einsetzen der TH in Gange, zeigte sich TH sowohl in unserem Modell als auch in anderen Forschungsarbeiten als unwirksam in der Abschwächung der Reperfusionsschädigung. In einem Review zum myokardialen Stunning bezeichnete Roberto Bolli dieses „priming“ (die Vorbereitung des Reperfusionsschaden während der Ischämie) als kritisch in Bezug auf die Möglichkeit der Abschwächung der postischämischen Dysfunktion.[102]

Es ist zu berücksichtigen, dass man durch den in unserem Modell beobachteten fehlenden Schutz der PITH einen protektiven Einflusses der spät einsetzenden Temperaturabsenkung nicht vollständig ausschließen kann. So zeigten Hale et al. in einem AMI-Modell mit Hasen, dass die nach der Ischämie einsetzende Hypothermie zwar nicht direkt die Infarktgröße beeinflusste, sehr wohl aber das Ausmaß der Mikroangiopathie abmilderte und somit den „no-reflow“-Bereich verkleinerte.[103] Dieser Bereich wiederum gilt als Prädiktor für die Langzeitprognose nach AMI.[104] Solche vaskulären Auswirkungen der TH können in einer Kardiomyozyten-Monokultur nicht untersucht werden. Darüber hinaus können wir in einem isolierten Kardiomyozyten-Verbund nur bedingt Aussagen über die inflammatorische Komponente des Ischämie- und Reperfusionsschaden machen. Schließlich ist bekannt, dass die Akkumulation von neutrophilen Leukozyten während der Reperfusion auch Stunden nach der Ischämie eine Rolle im Pathomechanismus spielt.[105, 106] Toyoda et al. zeigten mit Hilfe eines Rattenmodells, dass die neutrophile Infiltration in ischämisches Hirngewebe durch Hypothermie abgeschwächt werden konnte. In unserem HL1-Modell ohne Leukozyten fand dieser möglicherweise protektive Aspekt der PITH keine Berücksichtigung.

6.3 Effekte von Intra-Ischämischer-Therapeutischer-Hypothermie

Nachdem die Unwirksamkeit der PITH bezüglich Zellviabilität und mitochondrialer Aktivität festgestellt worden war, untersuchten wir den Einfluss einer während der simulierten Ischämie einsetzende Temperaturabsenkung nach dem IITH-Protokoll (Kap. ??). Neben der Beeinflussung der simulierten Reperfusionsschädigung wurden auch die Unterschiede direkt nach simulierten Ischämie ohne sich anschließende Reperfusion analysiert.

Es zeigten sich protektive Effekte in allen Bereichen, in denen die PITH unwirksam blieb. Morphologisch entsprachen die Zellen unter IITH nach simulierter Ischämie und I/R weitestgehend denen der nährstoffversorgten Kontrollgruppe. (Abb. ??, ??) Der Anstieg der Biomarker für Zelluntergang (LDH und cTNT) fiel sowohl nach simulierter Ischämie, als auch nach I/R gegenüber der normothermen Kontrolle signifikant geringer aus. (Kap. ??, ??) Das Ergebnis des signifikant geringeren Abfalls der ATP-Konzentration bei simulierter Ischämie und I/R unter IITH wurde durch einen MTT-Assay ergänzt, um den positiven Effekt auf die mitochondriale Funktion zu bestätigen. (Kap. ??) Auch hier zeigten sich zu beiden Versuchszeitpunkten protektive Effekte der IITH. (Kap. ??)

Das zuvor erwähnte Review von Tissier et al. umfasst auch in-vivo Forschungsarbeiten, die während der Ischämie einsetzende Hypothermie (mindestens fünf Minuten vor der Reperfusion) im Hinblick auf die Infarktgröße in AMI-Modellen untersuchten. Bei verschiedenen Tierarten und Kühlungsmethoden ergaben sich in allen Studien signifikant kleinere Infarktareale in den hypothermen Gruppen. Die relative Verkleinerung des Infarktareals schwankte dabei zwischen 12 und 90 %. Vergleichbar mit diesen Werten befanden sich die Biomarker nach simulierter Ischämie und Reperfusion in unserem Modell mit 47,5 %-iger Reduktion für LDH und 64,1 %-iger Reduktion für Troponin T im Mittelfeld dieses Bereiches.

Die vorgestellten experimentellen Zellkulturdaten und die Ergebnisse aus den Tierstudien zu myokardialer Ischämie unterstützen die Annahme, dass die Zieltemperatur in klinischen Studien zu spät erreicht wurde um einen kardioprotektiven Effekt zu vermitteln und dass der Einsatz intensiverer Kühlungsmethoden zu einer Verbesserung des klinischen Verlaufs bei AMI-Patienten führen könnte. (Kap. ??, 36–42) Die Auffassung, dass eine frühe intra-ischämische Temperaturabsenkung nur nötig sei, damit zum Zeitpunkt der Reperfusion das Blut bzw. das Myokard die Zieltemperatur bereits erreicht habe, können wir hingegen nicht unterstützen. [107] Schließlich wurden bei unseren Versuchsreihen die Zellen direkt bei Beginn der simulierten Reperfusion mit Medium der gewünschten Temperatur inkubiert.

Vom sekundären Ischämie-Schaden (bzw. Reperfusionsschaden) wird angenommen, dass er vor allem durch oxidativen Stress verursacht wird und durch moderate Hypothermie abgemildert werden könnte. [18, 108] Im vorgestellten Modell ist nur die vor der Reperfusion einsetzende TH, nicht aber die mit der Reperfusion simultan beginnende TH in der Lage, den Reperfusionsschaden zu bremsen. Das spricht dafür, dass TH in Vorgänge eingreift, die

während der Ischämie stattfinden und die mit der Reperfusion folgende Schädigung initiieren. In verschiedenen zellulären Organellen können freie Radikale entstehen. Forschungsarbeiten weisen allerdings darauf hin, dass vor allem die mitochondriale Elektronentransportkette für die auf die Reperfusion folgende freie Radikal-Akkumulation verantwortlich ist.[109, 110] Die von uns unter IITH gemessenen höheren ATP-Spiegel im Vergleich zur Normothermie nach I/R sprechen für eine verbesserte mitochondriale Funktion unter moderater Hypothermie. Auch die erhöhte MTT-Reduktion unter IITH im Vergleich zur Normothermie weisen auf eine bessere mitochondriale Funktion hin. Wir halten daher die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Integrität durch IITH für einen wichtigen Mechanismus bei der Abmilderung des Reperfusionsschadens. Auch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen weisen darauf hin, dass schon während der Ischämie, also vor Beginn der Reperfusion, die Störung der Mitochondrien initiiert wird.[98, 111] So zeigten Brady et al. morphologisch mit Hilfe Mitochondrien-spezifischer Fluoreszenz-Marker (mito-DsRed2 und mito-ECFP) eine Fragmentierung der Mitochondrien in HL1-Zellen während einer simulierten Ischämie.[111] Andersen et al. stellten dar, wie sich während einer simulierten Ischämie in den Mitochondrien von HL1-Zellen Cytochrom c Proteine verdichten und werteten dies wiederum als Anzeichen einer Fragmentierung.[98] Erst nach simulierter Reperfusion zeigte sich das Cytochrom c dann extramitochondrial, wo es als Aktivator der apoptotischen Caspasen-Kaskade wirken kann.

Unsere Beobachtung über die Aufrechterhaltung der ATP-Speicher in HL1-Zellen unter IITH stimmt mit der grundsätzlichen Überlegung überein, dass unter abgesenkten Temperaturen der zelluläre Metabolismus verlangsamt ist, der Sauerstoffbedarf sinkt und so Energiereserven erhalten bleiben.(Kap. ??) Der ansonsten unter Ischämie stattfindende Wechsel vom aeroben zum anaeroben Stoffwechsel wird so vermutlich unnötig oder verzögert. Die negativen Folgen der anaeroben Entgleisung mit Akkumulation von Kataboliten (NADH, Laktat, Phosphat, Protonen), Abfall des pH-Wertes, intrazellulärem Natrium-Anstieg und darauf folgender Kalzium-Überladung der Zellen werden so unterbunden.

Auch wenn die vorgestellten Daten Hinweise auf Möglichkeiten einer Optimierung des Zeit-Temperatur-Managements geben, bleiben einige Fragen in diesem Zusammenhang unbeantwortet. So beschränkt sich der gewählte Versuchsaufbau auf eine TH-Dauer von 24 Stunden. Der in experimentellen Studien zur Überprüfung der kardioprotektiven Wirkung verwendete Hypothermie-Zeitraum schwankt stark und es existiert bisher keine systematische Studie, die sich dieser Frage der optimalen Anwendungsdauer der TH bei myokardialer Ischämie widmet. Die Annahme einer Zunahme von unerwünschten Nebenwirkungen mit längerer Anwendung von TH konkurriert mit der Auffassung, dass die destruktiven Vorgänge der Apoptose und Nekrose, welche durch TH abgemildert werden könnten, auch lange nach Beginn der Reperfusion stattfinden können.[107] Der hier verwendete TH-Zeitraum von 24 Stunden fand Anlehnung an die Empfehlungen zur Neuroprotektion bei Herzkreislaufstillstand. Ob dieser Zeitrahmen auch im Bereich der Kardioprotektion sinnvoll ist, sollte Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

Ebenfalls keine Berücksichtigung findet in der Studie das umstrittene Thema der Wiedererwärmung, welche klinisch als kritische Phase der TH gilt.[112] Während der Wiedererwärmung kann es mit dem Wiederanstieg des metabolischen Umsatzes bei noch bestehender Einschränkung der kardialen Auswurfleistung zu einer Fehlanpassung des Sauerstoff-Bedarfs an die Sauerstoff-Verfügbarkeit kommen, welche bis zu einem von Bigelow et al. als „re-warming shock“ bezeichneten Zustand von akuter Azidose, Ateminsuffizienz, Hypotonie und Tachykardie führen kann.[112] Darüber hinaus liegen experimentelle Daten vor, die auf schlechtere Ergebnisse bei schneller, unkontrollierter Wiedererwärmung durch ein plötzliches Wiederauftreten der durch die TH zuvor unterdrückten inflammatorischen Prozesse hinweisen.[112] Die Rückkehr der inflammatorischen Reaktion während der Wiedererwärmung könnte möglicherweise durch die Gabe von Immunsuppressiva verhindert werden, wie beispielweise Schmitt et al. in Versuchen mit verschiedenen Zelllinien des Zentralnervensystems zeigen konnten.[113] Eine zu diesem Zweck angestrebte Messung von IL-6 im Zellüberstand der HL1-Zellen nach simulierter Ischämie und I/R scheiterte leider an den unter der Nachweisgrenze des ELISA-Assays ($<2\text{pg/ml}$) befindlichen Werten. Ein weiterer kritischer Aspekt der Wiedererwärmung besteht im Vorkommen von Elektrolytverschiebungen, besonders im Auftreten von Hyperkaliämien, welche als Überkompensation der während der TH bestehenden Hypokaliämie verstanden werden kann.[112] Klinische Studien weisen darauf hin, dass die systemischen Effekte der Wiedererwärmung von Bereichen der moderaten Hypothermie bei langsamer und kontrollierter Anhebung der Körpertemperatur als nicht problematisch einzuschätzen seien.[112]

6.3.1 Apoptose

Da Kardiomyozyten, die Ischämie und Reperfusion ausgesetzt werden, typische morphologische Charakteristika des nekrotischen Zelltodes aufweisen, wurde diese Art des Zelltodes lange als wesentlicher Mechanismus des Zelluntergangs begriffen.[62] Dabei kommt es neben einer Zellschwellung zu einer Disruption der Zellmembran und daraus folgender Freisetzung des Zellinhalts in die Umgebung. Die von uns genutzten Biomarker LDH und Troponin T sind daher gut geeignete Parameter zur Quantifizierung des Zelltodes. Verschiedene Forschungsarbeiten führten zu der Erkenntnis, dass neben dem nekrotischen Zelltod auch die Apoptose eine entscheidene Rolle im Pathomechanismus des ischämischen Zelltodes spielt, so dass man mittlerweile von einem gleichzeitigen Abläufen beider Mechanismen ausgeht.[62–64]

Zur Untersuchung der Beteiligung des apoptotischen Zelltodes im HL1-Modell wurden die Zellen zu den jeweiligen Versuchszeitpunkten auf den Proteingehalt der aktiven und inaktiven Form der Caspase 3 analysiert. Dabei ergab sich zunächst weder direkt nach der Simulation der Ischämie noch am Ende der simulierten Reperfusion eine Caspase 3-Aktivierung.(Kap. ??) Da eine strenge Zeitabhängigkeit der Caspase 3-Regulation bekannt ist, führten wir weitere Untersuchungszeitpunkte ein. Infolgedessen stellten wir eine Aktivierung der Caspase

3 zu Beginn der Reperfusion fest, die sich bis zum Ende des Versuchsdurchlaufs wieder legte. (Kap. ??). Signifikanzniveau erreicht die Caspase 3-Aktivierung zwei, drei und sechs Stunden nach Beginn der simulierten Reperfusion. Das Ausbleiben der Apoptose-Induktion bei alleiniger Simulation der Ischämie in unserem Modell entspricht dem Kenntnisstand, der die Apoptose als ATP-abhängigen Prozess begreift. [64, 114] Spekulationen, dass durch höhere ATP-Spiegel während der Ischämie unter IITH eine Apoptose-Aktivierung ablaufen könnte, ließen sich entkräften. Den Mitochondrien wird eine wesentliche Rolle bei der Apoptose-Regulation zugesprochen, wobei sie Informationen aus dem Zytoplasma über Energiebedarf, Substratverfügbarkeit, Elektrolytverschiebungen und enzymatischen Signalen integrieren und gegebenenfalls den programmierten Zelltod einleiten. [115] Wie oben beschrieben, finden mitochondrialen Veränderungen im Sinne einer Fragmentation bereits während der Ischämie statt. Weitere Modifikationen, die die mitochondriale Apoptose-Kaskade einleiten, sistieren dann allerdings bis zum Beginn der Reperfusion. [111, 115] Die Reperfusion führt zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und einer gesteigerten ROS-Produktion, was die Öffnung der Mitochondrialen-Permeabilitäts-Pore und die Freisetzung proapoptischer Faktoren wie Cytochrom c bedingt und schlussendlich die Caspasen-Kaskade (u.a. Caspase 3) aktiviert. [111, 115] Die Anwendung von IITH führte zu den Zeitpunkten, an denen ein Anstieg des gespaltenen Caspasen 3-Anteils gemessen wurde, zu einer deutlichen Reduktion des Anteils gespaltenener (aktiver) Caspase 3. An welcher Stelle genau die IITH in den Apoptosevorgang eingreift, kann leider mit den vorliegenden Daten nicht geklärt werden, da die von uns analysierte Caspase 3 als Effektorcaspase am Ende der Kaskade steht und sowohl den intrinsischen als auch den extrinsischen Aktivierungsweg einschließt. Weiterhin kann aus den vorliegenden Daten nicht beurteilt werden, ob die Regulation auf Ebene der Genexpression der in der Apoptose-Kaskade beteiligten Faktoren stattfindet, wie sie von Ning et al. im ischämischen Myokard von Hasen durch cDNA Microarrays nachgewiesen wurde. [65]

Die zu den MAP-Kinasen zählende Extrazelluläre Signal-regulierte Kinase 1/2 (ERK1/2 bzw. p42/p44 MAPK) wurde als weiterer in apoptotische Vorgänge eingreifender Faktor in den ersten sechs Stunden der Reperfusion untersucht. Mit einem antiapoptotischen Effekt wird der ERK1/2 unter anderem eine Rolle in der Signaltransduktion der ischämischen Präkonditionierung zugeschrieben. [86] Darunter versteht man den protektiven Effekt einer passageren Ischämiephase in Bezug auf einen darauf folgenden längeren ischämischen Schädigungsreiz. [86] Wie auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, fanden wir einen (nicht-signifikanten) Trend zu einer verstärkten Aktivierung von ERK1/2 durch Ischämie mit anschließender Reperfusion. [116] (Kap. ??) Die Hypothese, dass TH selbst zu einer Aktivierung der ERK1/2 führen könnte, bestätigte sich allerdings nicht. Viel mehr stellten wir sogar eine Tendenz zu niedrigeren pERK1/2-Spiegeln unter IITH fest. Eine mögliche Erklärung könnte die Funktion von ROS als Hauptaktivierungsmechanismus der Proteinkinasen darstellen. ROS entstehen gewöhnlich im Verlauf von Ischämie und Reperfusion. Auch wenn wir ROS im vorgestellten Modell nicht direkt nachgewiesen haben, passt die oben beschriebene mitochon-

driale Dysfunktion gut als Vorläufer zur ROS-Entstehung im Verlauf der Reperfusion.[116] Eine Abmilderung der ROS-Produktion ist wiederum ein anerkannter Wirkmechanismus der Hypothermie, womit eine Korrelation der ERK1/2-Aktivierung mit intrazellulärem ROS plausibel scheint und eine verminderte pERK-Aktivierung unter IITH erklären könnte.(Kap. ??)

6.3.2 iNOS-Regulation

Die Simulation von Ischämie und Reperfusion führte zu einem signifikanten Anstieg des iNOS-mRNA-Gehalts.(Kap. ??) Diese Beobachtung entspricht Ergebnissen von anderen Arbeitsgruppen.[59, 117, 118] Lui et al. fanden beispielsweise in einem Tiermodell, in dem männliche Ratten einer 20-minütigen Koronarligatur unterzogen wurden, auf welche eine fünfstündige Reperusions-Phase folgte, dass die iNOS-Expression im ischämischen im Vergleich zum nicht-ischämischen Myokard-Bereich 6,7-fach erhöht war.[117] Dieser iNOS-Anstieg im Ratten-Myokard ging mit erhöhten Messwerten von NO und Peroxynitrit einher. Taimor et al. zeigten anhand isolierter Ratten-Kardiomyozyten, dass NO in der Lage ist Apoptose auszulösen und deckten dazu passende Signalkaskaden auf.[118] Mittels IITH gelang es in den vorgestellten HL1-Versuchsreihen, die iNOS-Induktion durch I/R zu unterbinden. Hierin besteht möglicherweise ein weiterer protektiver Wirkmechanismus der IITH. Eine überschießende NO-Konzentration als Reaktion auf Ischämie und Reperfusion bleibt unter IITH vermutlich aus und somit möglicherweise auch die Entstehung größerer Mengen Peroxynitrits. Der schädliche Einfluss von Peroxynitrit ist in Kapitel ?? beschrieben. Eine direkte Quantifizierung sowohl von NO als auch Peroxynitrit wäre wünschenswert, um die Annahme über die beschriebenen Kausalkette zu bekräftigen. Der protektive Effekt einer NOS-Inhibition wird schon länger diskutiert. Die Verwendung des NOS-Inhibitors NG-monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) führte in Versuchen mit Ischämie und Reperfusion ausgesetzten isolierten Ratten-Kardiomyozyten zu geringeren Peroxynitrit-Mengen und verbesserter myokardialer Funktion.[119] Auch eine Hypothermie-induzierte NOS-Inhibition in anderen Organsystemen wurde von Arbeitsgruppen untersucht. In einem zerebralen Hirninfarkts Modell mit Ratten führte die Absenkung der Temperatur auf 33 °C sowohl zu einem verkleinerten Infarktareal als auch zu einer verminderten iNOS Expression.[120] Die iNOS Regulation fand vor allem in Mikrogliazellen statt, so dass auf einen immunmodulatorischen Effekt geschlossen wurde. Ebenfalls in Ratten wurde der Effekt von Hypothermie auf Endotoxin-vermittelten Lungenschaden untersucht.[121] Durch Abkühlung der Ratten auf 18-24 °C wurden der NO-Gehalt in der expiratorischen Atemfraktion und die iNOS-Expression im Lungengewebe gesenkt.

Die Regulation von iNOS im Zusammenhang von Ischämie und Reperfusion ist ein interessantes Ziel für organprotektive Interventionen. Hypothermie scheint eine wirkungsvolle Alternative zu pharmakologischen Inhibitoren dazustellen. Dabei ist eine empfindliche Konzentrationsabhängigkeit von NO in Bezug auf deren schützenden oder schädlichen Einfluss

bekannt, so dass weitere Forschungsarbeit nötig scheint, bis sich die Rolle von NO und deren Regulations-Möglichkeiten zur Organprotektion abschließend klären lässt.

6.3.3 RBM3-Regulation

Die in der Literatur für verschiedenen Zellarten beschriebene Hypothermie-induzierte Induktion des Kälteschockproteins RBM3 konnten wir in HL1-Zellen nachweisen. Auch wenn die RBM3-Induktion durch TH nur in den ungeschädigten Zellen ein signifikantes Niveau erreichte, zeigte sich eine klare Tendenz zur Verdopplung des RBM3 Protein- und mRNA-Gehalts auch in der Gruppe der simulierten Ischämie und Reperfusion. Die kurze Kühlperiode von zwei bis drei Stunden, welche zum Ende der Ischämiephase durchlaufen wurde, reichte nicht zur RBM3-Induktion in HL1-Zellen aus. Danno et al. beobachteten eine RBM3 Induktion in Nierenkarzinomzellen nach sechs-stündiger Hypothermie, wobei nach 18 Stunden die maximale Expression erreicht wurde.[74] Inwieweit RBM3 kausal an der beobachtete Protektion der HL1-Zellen vor Ischämie und Reperfusion durch IITH beteiligt ist, lässt sich mit den vorliegenden Daten nicht beantworten. Ein mittels siRNA versuchter Knockout des RBM3-Gens in HL1-Zellen ist bisher nicht gelungen. In der Zusammenschau mit anderen Forschungsarbeiten scheint ein kausaler Zusammenhang aber nicht unwahrscheinlich. Die Gruppe um Ferry et al. induzierten in Skelettmuskel-Myoblasten sowohl durch sechsstündige Hypothermie (32 °C) als auch durch Transfektion eines myc-markierten Expressionsvektors eine RBM3-Hochregulation.[122] Beide Methoden führten nach Zellschädigung mittels Wasserstoffperoxid zu einer Aufrechterhaltung von Zellmorphologie und Zellviabilität im Vergleich zu Myoblasten mit geringerem RBM3-Gehalt. Interessanterweise reduzierte sich in den Zellen mit hohem RBM3-Gehalt unter anderem der Anteil aktivierter Caspase 3 und damit einhergehend auch der apoptotische Zelltod. Dazu passend beobachteten Sureban et al. bei anderen Zelllinien (Fibroblasten und Kolonkarzinomzellen) einen Anstieg der Caspase 3-vermittelten Apoptose bei RBM3-Knockout.[83]

Dass Hypothermie auch unabhängig von den Kälteschockproteinen zellprotektiv wirkt, scheint schon allein durch die spät einsetzende RBM3-Induktion bei bereits vorher einsetzender Wirksamkeit der Hypothermie plausibel. So beobachten wir direkt nach der simulierten Ischämie protektive IITH-Effekt ohne dass eine RBM3-Induktion auf mRNA- oder Proteinebene zu messen war. Die Hinweise mehren sich allerdings, dass Kälteschockproteine bei der spät einsetzenden Protektion eine entscheidende Rolle spielen könnten. Während die Forschung der Kälteschockproteine im Feld der Neuroprotektion schon weiter fortgeschritten ist, befindet sie sich in der Kardioprotektion noch am Anfang.[75]

6.4 Pharmakologische Interaktion mit Levosimendan

Der positiv inotrop wirkender Arzneistoff Levosimendan gilt als potentes Mittel bei akuter Dekompensation einer chronischen Herzinsuffizienz oder eines AMI. Neben der anerkannt inotropen Wirkung berichten andere Arbeitsgruppen über einen direkt zellprotektiven Einfluss, der über die Öffnung ATP-abhängiger Kaliumkanäle vermittelt werde. (Kap. ??)

Das Auftreten einer myokardialen Dysfunktion durch das ischämische Ereignis einerseits und als mögliche Nebenwirkung der TH (verminderte Auswurfleistung) andererseits, machen Levosimendan zu einem interessanten Akteur im klinischen Szenario von Ischämie und Reperfusion. Darüber hinaus ist die Interaktion von Levosimendan und Hypothermie in Bezug auf das zellprotektive Potential nicht erforscht. Da - nach unserem Kenntnisstand - keine Berichte von der Applikation Levosimendans auf HL1-Zellen unter Ischämie und Reperfusion existieren, wurden zunächst unterschiedliche Konzentrationen des Wirkstoffs bei Normothermie auf deren Beeinflussung des Zelluntergangs mittels LDH-Freisetzung getestet. Die als klinisch relevant eingeschätzten Konzentrationen von 0,5 μM und 1 μM wurden außerdem mit IITH kombiniert. Die Einschätzung beruhte auf der Messung von Plasma-Konzentrationen bei Herzinsuffizienz-Patienten (NYHA II-IV) in einer klinischen Studien in der Levosimendan-Werte bis 0,35 μM gemessen wurden. [85]

Die Exposition der HL1-Zellen mit 0,01 μM , 0,5 μM , 1 μM und 10 μM während der 6-stündigen simulierten Ischämie führte zu keinen signifikanten Veränderungen in der LDH-Freisetzung. (Kap. ??) Die hohe Konzentration von 100 μM in Kombination mit simulierter Ischämie wirkte allerdings toxisch, wie im signifikanten LDH-Anstieg gegenüber der Levosimendan-freien Gruppe beobachtet werden konnte. Über den 27 Stunden umfassenden Zeitraum von simulierter Ischämie und Reperfusion führte Levosimendan in keiner der gewählten Konzentrationen zu signifikanten Veränderungen in der LDH-Freisetzung. Interessanterweise tolerierten die nährstoffversorgten, bei Normoxie inkubierten HL1-Zellen auch die hohe Levosimendan-Konzentration von 100 μM , welche während der sechs-stündigen simulierten Ischämie noch toxisch wirkte. Es muss berücksichtigt werden, dass die Kontrollen der Levosimendan-Experimente nicht in den im Arzneistoff (Simdax[®]) neben Levosimendan enthaltenen Lösungsmitteln (Povidon, Zitronensäure und Ethanol) inkubiert wurden. Die Tatsache, dass Levosimendan unter normoxen Kontrollbedingungen zu keinem Zelluntergang führte, spricht allerdings dagegen, dass der bei 100 μM beobachtete toxische Effekt auf die Lösungsmittel alleine zurückzuführen wäre. Ein antiapoptotischer Effekt von Levosimendan, wie er beispielsweise von Maytin und Colucci an oxidativem Stress ausgesetzten isolierten Ratten-Kardiomyozyten nachgewiesen wurde, konnten wir in unserem HL1-Modell nicht reproduzieren. [123] Sie zeigten, wie auch Kersten et al. in einem in-vivo Modell mit Hunden, dass dieser Effekt über ATP-abhängige Kaliumkanäle vermittelt wird. [87] Die Expression eines ATP-abhängigen Kaliumkanals in HL-1 Zellen ist beispielsweise aus Versuchen der Delta-Opioid Präkonditionierung bekannt. [90] Der Grund der fehlenden kardioprotektiven

Wirkung kann somit nicht ausreichend beantwortet werden. Eine nicht auf Levosimendan ansprechende Kalium-Kanalvariante in HL-1 Zellen wäre beispielsweise denkbar.

Die ihm Rahmen der Levosimendan-Experimente wiederholten LDH-Messungen unter IITH nach simulierter Ischämie und I/R bei 0 μ M erreichen im Gegensatz zu den in Kapitel ?? vorgestellten Daten keine Sigifikanzniveau. Das Ausmaß der LDH-Reduktion durch IITH liegt allerdings in einem ähnlichen Bereich. Die fehlende Signifikanz dieser Versuchsgruppen in den Levosimendan-Experimenten ist auf hohe Standardabweichungen bei nur geringer Stichprobengröße (n=3) zurückzuführen.

6.5 HL1-Zellkultur als Untersuchungsobjekt

Die Verwendung einer Zellkultur bringt neben Vorteilen, wie beispielsweise der praktischen Handhabung und einer begrenzten Anzahl an Störfaktoren, auch einige Probleme mit sich, die neben den bereits genannten Limitationen Erwähnung finden sollen.

Zwar entsprechen HL1-Zellen in vielerlei Hinsicht morphologisch, biochemisch und elektrophysiologisch differenzierten adulten Kardiomyozyten, allerdings gibt es auch einige Abweichungen.[88, 124] Bei HL1-Zellen handelt es sich um eine Tumorzelllinie, die dadurch unbegrenzt passagiert werden kann. Diese Eigenschaft der potentiellen Unsterblichkeit bringt bei der Untersuchung von Nekrose und Apoptose Probleme mit sich. Gegenüber Studien mit primären Kardiomyozyten und der Situation in vivo ist eine größere ischämische Reizdauer nötig, um eine geeignete Schädigung zu simulieren.(Kap.??) Die tumoröse Eigenschaft der HL1-Zellen geht mit metabolischen Unterschieden einher. Im Vergleich zu primären Kardiomyozyten überwiegt in HL-1-Zellen die Energiegewinnung durch Glykolyse mit durch Hexokinase vermittelter oxidativer Phosphorylierung.[125] Diese glykolytische Priorisierung der Energiegewinnung entspricht dem bei Tumorzellen zu findenden „Warburg Effekt“.[124] Eine unzureichende Funktion der oxidativen Phosphorylierung der Atmungskette wird durch eine erhöhte Hexokinase-Aktivität ersetzt, welche eine direkte Verwendung des mitochondrialen ATPs zur Glukose-Phosphorylierung mit Laktat-Entstehung zur Folge hat.[124] Hieraus ist sowohl ein erniedrigter Sauerstoffbedarf der HL1-Zellen als auch ein höherer Glukose-Verbrauch abzuleiten. Zieht man in Betracht, dass bei adulten Kardiomyozyten die Verstoffwechselung freier Fettsäuren zur Energiegewinnung eine große Rolle spielt, scheint der unterschiedliche Metabolismus der verwendeten HL1-Zellen noch schwerer zu wiegen.[124] Als strukturelles Korrelat des Warburg-Effekts in HL1-Zellen werten Kuznetsov et al. einen Mangel an Beta-Tubulin-II, welches ansonsten durch eine direkte Bindung an Mitochondrien über die Beeinflussung eines Spannungsabhängigen-Anionen-Kanals an der Regulation der Atmungskette beteiligt sei.[124] Dies und das bei HL-1-Zellen beobachtete morphologische Vorliegen eines mitochondrialen Netzwerkes sei typisch für kanzeröse Zellen.[124]

Zur Gewährleistung eines ähnlichen Energieverbrauchs zwischen den Versuchsgruppen wurden in den Experimenten nicht-schlagende HL-1-Zellen verwendet. Dazu wurde das Ver-

suchsmedium ohne Noradrenalin angesetzt. Mögliche metabolische Effekte des Noradrenalin-Entzugs wurden nicht untersucht. Die unzuverlässige Kontraktilität nach Passagierung der Zellen und die starke Abhängigkeit von der Konfluenz gestalten die systematischen Untersuchungen des Kontraktionsverhaltens schwierig und fand daher in der vorliegenden Arbeit keine Berücksichtigung.

6.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass Ischämie und Reperfusion ausgesetzte Kardiomyozyten durch moderate Hypothermie vor Zelluntergang geschützt werden können, wenn diese intra-ischämisch, also vor Beginn der Reperfusion, einsetzt. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderen experimenteller Arbeiten sowie den Analysen von klinischen Studien. (Kap. ??) Der Evidenzgrad der vorliegenden Daten reicht allerdings bisher noch nicht zur klinischen Etablierung einer hypothermen Intervention bei Patienten mit myokardialer Ischämie aus. Eine zunehmende Anzahl klinischer Studien widmet sich zur Zeit dem Thema der frühen, vor der Reperfusion stattfindenden Induktion von Hypothermie in Patienten mit akutem Koronarsyndrom. Sie sind unter anderem darauf ausgerichtet zu untersuchen, durch welche Methodik zuverlässig und sicher die Zieltemperatur vor Beginn der perkutanen Koronarintervention erreicht werden kann. [126–129] Bei einer kürzlich veröffentlichten Studie (COOL-MI) und Analysen von Subpopulationen zuvor durchgeführter Studien, bei der Patienten mit ST-Hebungs Mykoardinfarkt die Zieltemperatur unter 35 °C vor PCI erreichten, konnte eine Verkleinerung des Infarktareals nur bei Patienten mit Vorderwandinfarkt festgestellt werden. [37–40] Daher werden die Ergebnisse einer zweiten randomisiert-kontrollierten Studie (COOL-MI II) mit Spannung erwartet, bei der ebenfalls Temperaturen unter 35 °C vor PCI erreichen werden sollen, aber nur Patienten mit Vorderwandinfarkt eingeschlossen werden. [130]

Zur weiteren Optimierung der TH-Anwendung sollte die klinischen Studienarbeit auch zukünftig durch experimentelle Grundlagenforschung begleitet werden. Die HL1-Zellkultur scheint ein geeignetes Modell zu sein, um zusätzliche Einblicke in zeitliche Einflüsse von verschiedenen Zeit-Temperatur-Protokollen auf die Zellviabilität zu bekommen. Ein wichtiger Schritt wäre die Auswirkungen der Wiedererwärmung zu analysieren sowie unterschiedliche Hypothermie-Zeiträume zu untersuchen. (Kap. ??) Außerdem ist es anzustreben, tiefer in die Wirkmechanismen der Hypothermie einzutauchen. So würde die Untersuchung der Proteinregulation weiterer Faktoren der apoptotischen Signalkaskade helfen, genauere Kenntnisse über die Schnittstellen und den Mechanismus der Apoptose-Inhibition zu erlangen. Außerdem sollte die in der Arbeit aufgezeigte Induktion des bisher wenig erforschten RBM3 durch 24-stündige Hypothermie weiter untersucht werden. Falls ein Knockout mittels siRNA in der HL1-Zelllinie weiterhin nicht gelingt, sollte auf ein anderes Modell zurückgegriffen werden, um einen kausalen Zusammenhang zu überprüfen. Zusätzlich gilt es die iNOS-Regulation

auf RNA-Ebene durch die direkte Messung von NO und Peroxynitrit zu komplementieren und Versuche mit iNOS-Inhibitoren, beispielsweise mit dem hochsensiblen Inhibitor 1400W Dihydrochlorid, durchzuführen. Unter Anerkennung der Unterschiede von HL-1 Zellen, wie sie für den Metabolismus in Kapitel ?? beschrieben sind, scheint eine Reproduktion der Hauptergebnisse in primären Zellen sinnvoll.

Wenn weiterhin intensive Forschung im Bereich der Kardioprotektion durch TH betrieben wird und die Erkenntnisse aus experimentellen und klinischen Studienergebnisse zusammengeführt werden, scheint eine Etablierung der therapeutischen Hypothermie in der Klinik zur Abmilderung einer ischämischen Myokard-Schädigung in naher Zukunft möglich.

7 Bibliographie

Bibliography

1. Naghavi M, Wang H, Lozano R, et al. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet* 2015;385:117–171.
2. Yellon DM and Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *New England Journal of Medicine* 2007;357:1121–1135.
3. Steg PG, James SK, Atar D, et al. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation The Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal* 2012;33:2569–2619.
4. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics–2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2012;125:188.
5. Murray CJ, Vos T, Lozano R, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet* 2013;380:2197–2223.
6. Neumar RW, Nolan JP, Adrie C, et al. Post-Cardiac Arrest Syndrome Epidemiology, Pathophysiology, Treatment, and Prognostication A Consensus Statement From the International Liaison Committee on Resuscitation (American Heart Association, Australian and New Zealand Council on Resuscitation, European Resuscitation Council, Heart and Stroke Foundation of Canada, InterAmerican Heart Foundation, Resuscitation Council of Asia, and the Resuscitation Council of Southern Africa); the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee; the Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council on Clinical Cardiology; and the Stroke Council. *Circulation* 2008;118:2452–2483.
7. Wolfrum S, Radke PW, Pischon T, Willich SN, Schunkert H, and Kurowski V. Mild therapeutic hypothermia after cardiac arrest—a nationwide survey on the implementation of the ILCOR guidelines in German intensive care units. *Resuscitation* 2007;72:207–213.

8. O’Gara PT, Kushner FG, Ascheim DD, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology* 2013;61:e78–e140.
9. Giordano FJ et al. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *Journal of Clinical Investigation* 2005;115:500–508.
10. Lee SH and Kim YD. Death and survival of cardiomyocytes in acute ischemia. *Korean Circulation Journal* 2006;36:165–177.
11. Jennings RB and Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annual review of medicine* 1991;42:225–246.
12. Piper H, Balser C, Ladilov Y, et al. The role of Na⁺/H⁺ exchange in ischemia-reperfusion. *Basic research in cardiology* 1996;91:191–202.
13. Chiong M, Wang Z, Pedrozo Z, et al. Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. *Cell death & disease* 2011;2:e244.
14. Simoons ML, Serruys PW, Brand M van den, et al. Early thrombolysis in acute myocardial infarction: limitation of infarct size and improved survival. *Journal of the American College of Cardiology* 1986;7:717–728.
15. Laurent I, Monchi M, Chiche JD, et al. Reversible myocardial dysfunction in survivors of out-of-hospital cardiac arrest. *Journal of the American College of Cardiology* 2002;40:2110–2116.
16. Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, and Libby P. *Braunwald’s Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*, Eighth Edition. Elsevier Health Sciences, 2011.
17. Halestrap AP, Clarke SJ, and Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—a target for cardioprotection. *Cardiovascular research* 2004;61:372–385.
18. Polderman KH. Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Critical care medicine* 2009;37:S186–S202.
19. Polderman KH. Application of therapeutic hypothermia in the ICU: opportunities and pitfalls of a promising treatment modality. Part 1: Indications and evidence. *Intensive care medicine* 2004;30:556–575.
20. Cardiac Arrest Study Group TH after. Mild Therapeutic Hypothermia to Improve the Neurologic Outcome after Cardiac Arrest. *New England Journal of Medicine* 2002;346. PMID: 11856793:549–556.
21. Bernard SA, Gray TW, Buist MD, et al. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *New England Journal of Medicine* 2002;346:557–563.

22. Peberdy MA, Callaway CW, Neumar RW, et al. Part 9: Post-Cardiac Arrest Care 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation* 2010;122:S768–S786.
23. Deakin CD, Nolan JP, Soar J, et al. European resuscitation council guidelines for resuscitation 2010 section 4. Adult advanced life support. *Resuscitation* 2010;81:1305–1352.
24. Nielsen N, Wetterslev J, Cronberg T, et al. Targeted temperature management at 33 C versus 36 C after cardiac arrest. *New England Journal of Medicine* 2013;369:2197–2206.
25. Moler FW, Silverstein FS, Holubkov R, et al. Therapeutic hypothermia after out-of-hospital cardiac arrest in children. *New England Journal of Medicine* 2015;372:1898–1908.
26. Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA, et al. Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *New England Journal of Medicine* 2005;353:1574–1584.
27. Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D, et al. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *The Lancet* 2005;365:663–670.
28. Jacobs S, Berg M, Hunt R, Tarnow-Mordi W, Inder T, and Davis P. Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database of Syst Rev* 2013;1.
29. Worp HB van der, Macleod MR, and Kollmar R. Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: ready to start large randomized trials? *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2010;30:1079–1093.
30. Hemmen TM, Raman R, Guluma KZ, et al. Intravenous thrombolysis plus hypothermia for acute treatment of ischemic stroke (ICTuS-L) final results. *Stroke* 2010;41:2265–2270.
31. Sydenham E, Roberts I, and Alderson P. Hypothermia for traumatic head injury. *Cochrane Database Syst Rev* 2009;2.
32. Urbano L and Oddo M. Therapeutic hypothermia for traumatic brain injury. *Current neurology and neuroscience reports* 2012;12:580–591.
33. Fan Y, Zhang AM, Xiao YB, Weng YG, and Hetzer R. Warm versus cold cardioplegia for heart surgery: a meta-analysis. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 2010;37:912–919.
34. Holzer M and Behringer W. Therapeutic hypothermia after cardiac arrest and myocardial infarction. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* 2008;22:711–728.

35. Parham W, Edelstein K, Unger B, and Mooney M. Therapeutic hypothermia for acute myocardial infarction: past, present, and future. *Critical care medicine* 2009;37:S234–S237.
36. Dixon SR, Whitbourn RJ, Dae MW, et al. Induction of mild systemic hypothermia with endovascular cooling during primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 2002;40:1928–1934.
37. O'Neill WW. Cooling as an adjunct to primary PCI for myocardial infarction. In: Presented at The Transcatheter Cardiovascular Therapeutics conference Washington DC, USA, 2003. Available at: <http://www.tctmd.com/show.aspx?id??59364>. Accessed November 16, 2013.
38. Grines CL. Intravascular cooling adjunctive to percutaneous coronary intervention (part 1). In: Presented at The Transcatheter Cardiovascular Therapeutics conference Washington DC, USA, 2004. Available at: <http://www.scribd.com/cooldoc25/d/40117148-ICE-IT-Presentation-TCT2004>. Accessed November 14, 2013.
39. Erlinge D, Götberg M, Grines C, et al. A pooled analysis of the effect of endovascular cooling on infarct size in patients with ST-elevation myocardial infarction. *EuroIntervention: journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology* 2013;8:1435–1440.
40. Erlinge D, Götberg M, Lang I, et al. Rapid Endovascular Catheter Core Cooling combined with cold saline as an Adjunct to Percutaneous Coronary Intervention For the Treatment of Acute Myocardial Infarction (The CHILL-MI trial). *Journal of the American College of Cardiology* 2014.
41. Götberg M, Olivecrona GK, Koul S, et al. A pilot study of rapid cooling by cold saline and endovascular cooling before reperfusion in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Circulation: Cardiovascular Interventions* 2010;3:400–407.
42. Koreny M, Sterz F, Uray T, et al. Effect of cooling after human cardiac arrest on myocardial infarct size. *Resuscitation* 2009;80:56–60.
43. Hale SL and Kloner RA. Myocardial temperature reduction attenuates necrosis after prolonged ischemia in rabbits. *Cardiovascular research* 1998;40:502–507.
44. Dae MW, Gao DW, Sessler DI, Stillson CA, et al. Effect of endovascular cooling on myocardial temperature, infarct size, and cardiac output in human-sized pigs. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2002;282:H1584–H1591.
45. Zhao D, Abella BS, Beiser DG, et al. Intra-arrest cooling with delayed reperfusion yields higher survival than earlier normothermic resuscitation in a mouse model of cardiac arrest. *Resuscitation* 2008;77:242–249.

46. Götberg M, Olivecrona GK, Engblom H, et al. Rapid short-duration hypothermia with cold saline and endovascular cooling before reperfusion reduces microvascular obstruction and myocardial infarct size. *BMC cardiovascular disorders* 2008;8:7.
47. Meybohm P, Gruenewald M, Albrecht M, et al. Hypothermia and postconditioning after cardiopulmonary resuscitation reduce cardiac dysfunction by modulating inflammation, apoptosis and remodeling. *PLoS One* 2009;4:e7588.
48. Mæng M, Mortensen UM, Kristensen J, Kristiansen SB, and Andersen HR. Hypothermia during reperfusion does not reduce myocardial infarct size in pigs. *Basic research in cardiology* 2006;101:61–68.
49. Polderman KH and Herold I. Therapeutic hypothermia and controlled normothermia in the intensive care unit: Practical considerations, side effects, and cooling methods. *Critical care medicine* 2009;37:1101–1120.
50. Stockmann H, Krannich A, Schroeder T, and Storm C. Therapeutic temperature management after cardiac arrest and the risk of bleeding: Systematic review and meta-analysis. *Resuscitation* 2014;85:1494–1503.
51. Forni AA, Rocchio MA, Szumita PM, Anger KE, Avery KR, and Scirica BM. Evaluation of Glucose Management during Therapeutic Hypothermia at a Tertiary Academic Medical Center. *Resuscitation* 2015.
52. Polderman KH. Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Critical care medicine* 2009;37:S186–S202.
53. Ning XH, Xu CS, Song YC, et al. Hypothermia preserves function and signaling for mitochondrial biogenesis during subsequent ischemia. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 1998;43:H786.
54. Simkhovich BZ, Hale SL, and Kloner RA. Metabolic mechanism by which mild regional hypothermia preserves ischemic tissue. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics* 2004;9:83–90.
55. Hale SL and Kloner RA. Mild hypothermia as a cardioprotective approach for acute myocardial infarction: laboratory to clinical application. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics* 2011;16:131–139.
56. Globus MYT, Busto R, Lin B, Schnippering H, and Ginsberg MD. Detection of free radical activity during transient global ischemia and recirculation: effects of intransischemic brain temperature modulation. *Journal of neurochemistry* 1995;65:1250–1256.
57. Otake H, Shite J, Paredes OL, et al. Catheter-based transcatheter myocardial hypothermia attenuates arrhythmia and myocardial necrosis in pigs with acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 2007;49:250–260.

58. Diestel A, Drescher C, Miera O, Berger F, and Schmitt KRL. Hypothermia protects H9c2 cardiomyocytes from H₂O₂ induced apoptosis. *Cryobiology* 2011;62:53–61.
59. Ferdinandy P and Schulz R. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. *British journal of pharmacology* 2003;138:532–543.
60. Mungrue IN, Gros R, You X, et al. Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death. *The Journal of clinical investigation* 2002;109:735–743.
61. Okamoto T, Akaike T, Sawa T, Miyamoto Y, Vliet A van der, and Maeda H. Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276:29596–29602.
62. Pedersen S, O'donnell M, Anderson S, and Cala P. Physiology and pathophysiology of Na⁺/H⁺ exchange and Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport in the heart, brain, and blood. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2006;291:R1–R25.
63. James TN. The variable morphological coexistence of apoptosis and necrosis in human myocardial infarction: significance for understanding its pathogenesis, clinical course, diagnosis and prognosis. *Coronary artery disease* 1998;9:291–308.
64. Zhao ZQ and Vinten-Johansen J. Myocardial apoptosis and ischemic preconditioning. *Cardiovascular research* 2002;55:438–455.
65. Ning XH, Chen SH, Xu CS, et al. Selected Contribution: Hypothermic protection of the ischemic heart via alterations in apoptotic pathways as assessed by gene array analysis. *Journal of applied physiology* 2002;92:2200–2207.
66. Porter AG and Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell death and differentiation* 1999;6:99–104.
67. Shao ZH, Chang WT, Chan KC, et al. Hypothermia-induced cardioprotection using extended ischemia and early reperfusion cooling. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2007;292:H1995–H2003.
68. Cargnello M and Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2011;75:50–83.
69. Balmanno K and Cook S. Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death & Differentiation* 2009;16:368–377.
70. Schmitt KRL, Diestel A, Lehnardt S, et al. Hypothermia suppresses inflammation via ERK signaling pathway in stimulated microglial cells. *Journal of neuroimmunology* 2007;189:7–16.

71. Kimura A, Sakurada S, Ohkuni H, Todome Y, and Kurata K. Moderate hypothermia delays proinflammatory cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. *Critical care medicine* 2002;30:1499–1502.
72. Diestel A, Troeller S, Billecke N, Sauer IM, Berger F, and Schmitt KR. Mechanisms of hypothermia-induced cell protection mediated by microglial cells in vitro. *European Journal of Neuroscience* 2010;31:779–787.
73. Burdon R. Temperature and animal cell protein synthesis. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 1986;41:113–133.
74. Danno S, Nishiyama H, Higashitsuji H, et al. Increased transcript level of RBM3, a member of the glycine-rich RNA-binding protein family, in human cells in response to cold stress. *Biochemical and biophysical research communications* 1997;236:804–807.
75. Tong G, Endersfelder S, Rosenthal LM, et al. Effects of moderate and deep hypothermia on RNA-binding proteins RBM3 and CIRP expressions in murine hippocampal brain slices. *Brain research* 2013;1504:74–84.
76. Leonart M. A new generation of proto-oncogenes: cold-inducible RNA binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* 2010;1805:43–52.
77. Dresios J, Aschrafi A, Owens GC, Vanderklish PW, Edelman GM, and Mauro VP. Cold stress-induced protein Rbm3 binds 60S ribosomal subunits, alters microRNA levels, and enhances global protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:1865–1870.
78. Wellmann S, Truss M, Bruder E, et al. The RNA-binding protein RBM3 is required for cell proliferation and protects against serum deprivation-induced cell death. *Pediatric research* 2010;67:35–41.
79. Pilotte J, Dupont-Versteegden EE, and Vanderklish PW. Widespread regulation of miRNA biogenesis at the Dicer step by the cold-inducible RNA-binding protein, RBM3. *PloS one* 2011;6:e28446.
80. Wellmann S, Bühner C, Moderegger E, et al. Oxygen-regulated expression of the RNA-binding proteins RBM3 and CIRP by a HIF-1-independent mechanism. *Journal of cell science* 2004;117:1785–1794.
81. Schaller B and Graf R. Hypothermia and stroke: the pathophysiological background. *Pathophysiology* 2003;10:7–35.
82. Yang C and Carrier F. The UV-inducible RNA-binding protein A18 (A18 hnRNP) plays a protective role in the genotoxic stress response. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276:47277–47284.
83. Sureban S, Ramalingam S, Natarajan G, et al. Translation regulatory factor RBM3 is a proto-oncogene that prevents mitotic catastrophe. *Oncogene* 2008;27:4544–4556.

84. Papp Z, Csapó K, Pollesello P, Haikala H, and Édes I. Pharmacological mechanisms contributing to the clinical efficacy of levosimendan. *Cardiovascular drug reviews* 2005;23:71–98.
85. Toller WG and Stranz C. Levosimendan, a new inotropic and vasodilator agent. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 2006;104:556–569.
86. Schulz R, Cohen MV, Behrends M, Downey JM, and Heusch G. Signal transduction of ischemic preconditioning. *Cardiovascular research* 2001;52:181–198.
87. Kersten JR, Montgomery MW, Pagel PS, and Warltier DC. Levosimendan, a new positive inotropic drug, decreases myocardial infarct size via activation of KATP channels. *Anesthesia & Analgesia* 2000;90:5.
88. Claycomb WC, Lanson NA, Stallworth BS, et al. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998;95:2979–2984.
89. Nguyen SV and Claycomb WC. Hypoxia regulates the expression of the adrenomedullin and HIF-1 genes in cultured HL-1 cardiomyocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 1999;265:382–386.
90. Seymour EM, Wu SYJ, Kovach MA, et al. HL-1 myocytes exhibit PKC and K(ATP)-channel-dependent delta opioid preconditioning. *Journal of Surgical Research* 2003;114:187–194.
91. Akhavan A, Atanasiu R, and Shrier A. Identification of a COOH-terminal segment involved in maturation and stability of human ether-a-go-go-related gene potassium channels. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:40105–40112.
92. George CH, Higgs GV, and Lai FA. Ryanodine receptor mutations associated with stress-induced ventricular tachycardia mediate increased calcium release in stimulated cardiomyocytes. *Circulation research* 2003;93:531–540.
93. Kitta K, Day RM, Ikeda T, and Suzuki YJ. Hepatocyte growth factor protects cardiac myocytes against oxidative stress-induced apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine* 2001;31:902–910.
94. Lanson Jr NA, Egeland DB, Royals BA, and Claycomb WC. The MRE11-NBS1-RAD50 pathway is perturbed in SV40 large T antigen-immortalized AT-1, AT-2 and HL-1 cardiomyocytes. *Nucleic acids research* 2000;28:2882–2892.
95. Decker T and Lohmann-Matthes ML. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of immunological methods* 1988;115:61–69.
96. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, and Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. 2005.

97. Olsson K ?ström, Li L, Olofsson CS, Borén J, Öhlin H, and Grip L. Impact of hypoxia, simulated ischemia and reperfusion in HL-1 cells on the expression of FKBP12/FKBP12.6 and intracellular calcium dynamics. *Biochemical and biophysical research communications* 2012;422:732–738.
98. Andersen AD, Poulsen KA, Lambert IH, and Pedersen SF. HL-1 mouse cardiomyocyte injury and death after simulated ischemia and reperfusion: roles of pH, Ca²⁺-independent phospholipase A₂, and Na⁺/H⁺ exchange. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2009;296:C1227–C1242.
99. Hale S, Dave R, and Kloner R. Regional hypothermia reduces myocardial necrosis even when instituted after the onset of ischemia. *Basic research in cardiology* 1997;92:351–357.
100. Tissier R, Chenoune M, Ghaleh B, Cohen MV, Downey JM, and Berdeaux A. The small chill: mild hypothermia for cardioprotection? *Cardiovascular research* 2010;88:406–414.
101. Kanemoto S, Matsubara M, Noma M, et al. Mild hypothermia to limit myocardial ischemia-reperfusion injury: importance of timing. *The Annals of thoracic surgery* 2009;87:157–163.
102. Bolli R and Marbán E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiological reviews* 1999;79:609–634.
103. Hale SL, Herring MJ, and Kloner RA. Delayed Treatment With Hypothermia Protects Against the No-Reflow Phenomenon Despite Failure to Reduce Infarct Size. *Journal of the American Heart Association* 2013;2:e004234.
104. Ito H. No-reflow phenomenon and prognosis in patients with acute myocardial infarction. *Nature clinical practice Cardiovascular medicine* 2006;3:499–506.
105. Smith E, Egan JW, Bugelski PJ, Hillegass LM, Hill DE, and Griswold D. Temporal relation between neutrophil accumulation and myocardial reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 1988;255:H1060–H1068.
106. Hansen PR. Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1995;91:1872–1885.
107. Lampe JW and Becker LB. State of the art in therapeutic hypothermia. *Annual review of medicine* 2011;62:79–93.
108. Huang CH, Chen HW, Tsai MS, et al. Antiapoptotic cardioprotective effect of hypothermia treatment against oxidative stress injuries. *Academic Emergency Medicine* 2009;16:872–880.
109. Turrens JF, Beconi M, Barilla J, Chavez UB, and McCord JM. Mitochondrial generation of oxygen radicals during reoxygenation of ischemic tissues. *Free Radical Research* 1991;13:681–689.

110. Freeman BA and Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1982;47:412.
111. Brady NR, Hamacher-Brady A, and Gottlieb RA. Proapoptotic BCL-2 family members and mitochondrial dysfunction during ischemia/reperfusion injury, a study employing cardiac HL-1 cells and GFP biosensors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 2006;1757:667–678.
112. Scaravilli V, Bonacina D, and Citerio G. Rewarming: facts and myths from the systemic perspective. *Critical Care* 2012;16:1–42.
113. Schmitt KR, Kern C, Berger F, Ullrich O, Hendrix S, and Abdul-Khaliq H. Methylprednisolone attenuates hypothermia-and rewarming-induced cytotoxicity and IL-6 release in isolated primary astrocytes, neurons and BV-2 microglia cells. *Neuroscience letters* 2006;404:309–314.
114. Eguchi Y, Shimizu S, and Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer research* 1997;57:1835–1840.
115. Gottlieb RA. Mitochondrial signaling in apoptosis: mitochondrial daggers to the breaking heart. *Basic research in cardiology* 2003;98:242–249.
116. Armstrong SC. Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovascular research* 2004;61:427–436.
117. Liu P, Hock C, Nagele R, and Wong P. Formation of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 1997;272:H2327–H2336.
118. Taimor G, Hofstaetter B, and Piper H. Apoptosis induction by nitric oxide in adult cardiomyocytes via cGMP-signaling and its impairment after simulated ischemia. *Cardiovascular research* 2000;45:588–594.
119. Yasmin W, Strynadka KD, and Schulz R. Generation of peroxynitrite contributes to ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts. *Cardiovascular research* 1997;33:422–432.
120. Han HS, Qiao Y, Karabiyikoglu M, Giffard RG, and Yenari MA. Influence of mild hypothermia on inducible nitric oxide synthase expression and reactive nitrogen production in experimental stroke and inflammation. *The Journal of neuroscience* 2002;22:3921–3928.
121. Scumpia PO, Sarcia PJ, DeMarco VG, Stevens BR, and Skimming JW. Hypothermia attenuates iNOS, CAT-1, CAT-2, and nitric oxide expression in lungs of endotoxemic rats. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2002;283:L1231–L1238.

122. Ferry AL, Vanderklish PW, and Dupont-Versteegden EE. Enhanced survival of skeletal muscle myoblasts in response to overexpression of cold shock protein RBM3. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2011;301:C392–C402.
123. Maytin M and Colucci WS. Cardioprotection: a new paradigm in the management of acute heart failure syndromes. *The American journal of cardiology* 2005;96:26–31.
124. Kuznetsov AV, Javadov S, Sickinger S, Frotschnig S, and Grimm M. H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 2015;1853:276–284.
125. Monge C, Beraud N, Tepp K, et al. Comparative analysis of the bioenergetics of adult cardiomyocytes and nonbeating HL-1 cells: respiratory chain activities, glycolytic enzyme profiles, and metabolic fluxes. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 2009;87:318–326.
126. Testori C, Sterz F, Delle-Karth G, et al. Strategic target temperature management in myocardial infarction—a feasibility trial. *Heart* 2013;99:1663–1667.
127. McMullan P. CHIPAHA: Can hypothermia be incorporated into primary angioplasty for heart attack. *ClinicalTrials.gov*: NCT00763828 accessed April 21, 2015 at <https://clinicaltrials.gov>.
128. Testori C. Strategic Target Temperature Management in Myocardial Infarction. *ClinicalTrials.gov*: NCT01777750 accessed April 21, 2015 at <https://clinicaltrials.gov>.
129. COOL-AMI EU Case Series Clinical Study: A Single-Center Case Series Clinical Study to Assess the Feasibility of Integrating Therapeutic Hypothermia Using the ZOLL IVTM System as an Adjunctive Therapy to Percutaneous Coronary Intervention in Patients With Acute Myocardial Infarction. *ClinicalTrials.gov*: NCT02070913 accessed April 21, 2015 at <https://clinicaltrials.gov>.
130. Carrozza P and Dixon S. COOL MI II: Cooling as an adjunctive therapy to percutaneous intervention in patients with acute myocardial infarction. *ClinicalTrials.gov*: NCT00248196 accessed April 21, 2015 at <https://clinicaltrials.gov>.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

4.1	Zeit-Temperatur-Protokoll: Post-Ischämische-Therapeutische-Hypothermie (PITH)	29
4.2	Zeit-Temperatur-Protokoll: Intra-Ischämische-Therapeutische-Hypothermie (IITH)	29
5.1	LDH-Freisetzung nach simulierter Ischämie und I/R bei 37 °C	39
5.2	MTT-Reduktion nach simulierter Ischämie und I/R bei 37 °C	40
5.3	Phasenkontrastaufnahmen nach I/R bei 37 °C, PITH und IITH	42
5.4	LDH-Freisetzung nach I/R bei 37 °C und PITH	43
5.5	Troponin T-Freisetzung nach I/R bei 37 °C und PITH	43
5.6	ATP-Gehalt nach I/R bei 37 °C und PITH	44
5.7	Phasenkontrastaufnahmen nach simulierter Ischämie bei 37 °C und IITH	45
5.8	LDH Freisetzung nach simulierter Ischämie und I/R bei 37 °C und IITH	46
5.9	Troponin T-Freisetzung nach simulierter Ischämie und I/R bei 37 °C und IITH	47
5.10	ATP-Gehalt nach simulierter Ischämie und I/R bei 37 °C und IITH	48
5.11	MTT-Reduktion nach simulierter Ischämie und I/R bei 37 °C und IITH	49
5.12	Caspase 3-Aktivierung nach simulierter Ischämie und I/R bei 37 °C und IITH	50
5.13	ERK 1/2-Phosphorylierung nach I/R bei 37 °C und IITH	52
5.14	INOS Gen-Expression (mRNA) nach I/R bei 37 °C und IITH	53
5.15	RBM3 Protein- und Gen-Expression (mRNA) nach simulierter Ischämie und I/R bei 37 °C und IITH	54
5.16	Wirkung von Levosimendan auf die LDH-Freisetzung nach Ischämie und I/R	56

9 Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
ADP	Adenosindiphosphat
AMI	Akuter Myokardinfarkt
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serum Albumin
CIRP	Cold inducible RNA binding protein
cTNT	Kardiales Troponin T
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EKG	Elektrokardiogramm
ERK	Extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
et al.	Et alii (lat.: und andere)
FKS	Fetales Kälberserum
HEPES	Hydroxyethylpiperazinoethansulfonsäure
HKS	Herz-Kreislauf-Stillstand
IHK	Ischämische Herzkrankheit
IITH	Intra Ischämische Therapeutische Hypothermie
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase
I/R	Simulation von Ischämie und Reperfusion
LDH	Lactatdehydrogenase
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
miRNA	Mikro-Ribonucleinsäure
MPTP	Mitochondrial permeability transition pore
mRNA	Messenger-Ribonucleinsäure
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

NADH	Nicotinamidadeninukleotid
NF κ B	Nuclear factor kappa enhancer binding protein
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCI	Perkutane Koronarintervention
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PITH	Post Ischämische Therapeutische Hypothermie
PMSF	Phenylmethyldisulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RCT	Randomisierte kontrollierte Studie
RBM3	RNA-binding motif protein 3
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
rpm	Rotations per minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TBST	Tris gepufferte Salzlösung mit Polysorbat 20
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

10 Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Christoph Julian Walker, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Kardioprotektion durch Therapeutische Hypothermie: Eine Zellkulturstudie mit HL1-Kardiomyozyten“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Christoph J. Walker hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Moderate hypothermia initiated during oxygen-glucose deprivation preserves HL-1 cardiomyocytes. Tong G, Walker C, Bühner C, Berger F, Miera O, Schmitt KR. Cryobiology, 2014

Ca. 40 %

Beitrag im Einzelnen: Geteilte Erstautorenschaft, Beteiligt an Projektplanung, Drittmittel-erwerbung (Fördergemeinschaft Deutsche Kinderherzzentren e.V.), Datenerhebung, Niederschrift von Einführung, Ergebnisse und Teilen der Diskussion

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden

11 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

12 Publikationsliste

Journalpublikation

Moderate hypothermia initiated during oxygen-glucose deprivation preserves HL-1 cardiomyocytes. Tong G, Walker C, Bühner C, Berger F, Miera O, Schmitt KR. *Cryobiology*, 2014

Posterpräsentationen mit Abstract-Veröffentlichungen

Intra-Ischemia Vs Post-Ischemia Hypothermia-Induced Neurological and Cardiac Protection via the Up-Regulation of Rbm3. Tong G, Feldmann M, Walker C, Berger F, Schmitt KRL. 5th International Hypothermia Symposium. Edinburgh, Schottland, September 2014

Moderate hypothermia diminishes death of cardiomyocytes following ischemia. Walker C, Tong G, Wollersheim D, Berger F, Schmitt KRL. 45. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie e.V. Weimar, November 2013

Cardioprotective Effect of Early Moderate Hypothermia during Ischemia. Fabig V, Drescher C, Krauss A, Tong G, Walker C, Berger F, Schmitt KRL. 45. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie e.V. Weimar, November 2013

Moderate hypothermia: minimizing impairment in HL-1 cardiomyocytes following ischemia. Walker C, Tong G, Berger F, Schmitt KRL. 39. Kongress der European Society for Artificial Organs. Rostock, September 2012

Moderate hypothermia: minimizing impairment in HL-1 cardiomyocytes following ischemia. Walker C, Wollersheim S, Tong G, Berger F, Schmitt KRL. 23. European Students´ Conference. Berlin, September 2012

Vortragsveröffentlichungen mit Abstract-Veröffentlichungen

Intra-Ischemia Vs Post-Ischemia Hypothermia-Induced Neurological and Cardiac Protection via the Up-Regulation of Rbm3. Tong G, Feldmann M, Walker C, Berger F, Schmitt KRL. 46. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie e.V. Weimar, Oktober 2014

Moderate hypothermia diminishes death of cardiomyocytes following ischemia. Walker C, Tong G, Wollersheim S, Berger F, Schmitt KRL. Symposium des European Resuscitation Councils. Krakau, Polen, October 2013

13 Danksagung

Mein großer Dank gilt meiner Doktormutter Katharina Schmitt für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die allzeit professionelle sowie herzliche Betreuung in den vergangenen Jahren.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Schmitt, insbesondere Giang Tong und Lisa-Maria Rosenthal für die ständige Unterstützung bei praktischen Laborarbeiten und für die geistreichen Diskussionen der Daten bedanken. Weiterhin schulde ich Stephan Winnik, der mit vielen hilfreichen Anregungen und Denkanstößen die Forschungsarbeit vorangebracht hat, und meiner Schwester Janina Walker für orthografische und emotionale Unterstützung Dank.