

Aus dem
Deutschen Herzzentrum Berlin
Klinik für Angeborene Herzfehler / Kinderkardiologie
Direktor: Professor Dr. med. Felix Berger

Habilitationsschrift

Hypothermie zur Organprotektion

Zur Erlangung der Lehrbefähigung
für die Experimentelle Kardiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katharina Rose Luise Schmitt
Geboren am 29.08.1972 in Fulda

Eingereicht:	Februar 2011
Dekanin:	Professor Dr. med. Annette Grüters-Kieslich
1. Gutachter:	Professor Dr. med. Hashim Abdul-Khaliq
2. Gutachter:	Professor Dr. med. Konrad Brockmeier

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
1.1	Grundlagen der therapeutischen Hypothermie	1
1.1.1	Definition der Hypothermie	1
1.1.2	Klinische Indikationsbereiche der therapeutischen Hypothermie	1
1.3.	Physiologische Aspekte der Zellprotektion durch Hypothermie	3
1.3.1	Reduktion des Zellstoffwechsel	3
1.3.2	Beeinflussung der Inflammation und Neuroprotektion	3
1.3.3	Reduktion des Reperfusionsschadens	4
1.3.4	Aktivierung protektiver Enzyme und Reduktion der Apoptose	5
1.4	Nebenwirkungen der Hypothermiebehandlung	6
1.5	Phasen der Hypothermiebehandlung	7
II.	Darstellung der eigenen Arbeiten	9
2.1	Etablierung eines <i>in vitro</i> Zellkulturmodells	9
2.2	Hypothermie zur Neuroprotektion	10
2.2.1	Einzelzellkulturmodelle: Mikrogliazellen, Astrozyten und Neurone	10
2.2.1.1	Inflamationsverhalten und funktionelle Eigenschaften der Gehinzellen	10
2.2.2	Hypothermie und Wiedererwärmung führen zu axonalem Auswachsen in Organotypischen Hirnschnitten	13
2.3	Auswirkungen der Hypothermie auf Endothelzellen	15
2.3.1	Morphologische Veränderungen von Endothelzellen unter Hypothermie und Wiedererwärmung sowie deren medikamentöse Beeinflussung	15
2.3.2	Effekte der Hypothermie auf das Inflamationsverhalten von Endothelzellen	20
2.4.	Hypothermie führt zur Kardioprotektion während oxidativem Stress	22
2.4.1	Hypothermie schützt Kardiomyozyten vor Apoptose und DNA Schaden	22
2.4.2	Kardioprotektion durch kalte Kardioplegielösung während oxidativem Stress	29
III.	Diskussion und Ausblick	31
IV.	Zusammenfassung	34
V.	Literatur	36
VI.	Danksagung	41
VII.	Eidesstattliche Erklärung	42

1.1 Grundlagen der therapeutischen Hypothermie

1.1.1 Definition der Hypothermie

Hypothermie bezeichnet das Herabsinken der Körpertemperatur auf unter 37°C. Bei der Anwendung der therapeutischen Hypothermie werden eine milde (34 – 35,9°C), moderate (32 – 33,9°C), moderat-tiefe (30 – 31,9°C) und tiefe Hypothermie (< 30°C) unterschieden ¹.

1.1.2 Klinische Indikationsbereiche der therapeutischen Hypothermie

Seit den 50iger Jahren des letzten Jahrhunderts wird die therapeutische Hypothermie in verschiedenen klinischen Bereichen als bedeutendes Verfahren zur Organprotektion vor allem nach einem Ischämieereignis genutzt. Zelluläre Abläufe, die nach einer Ischämie und anschließender Reperfusion beginnen, werden als Reperfusionsschaden oder sekundärer Gewebeschaden bezeichnet. Diese Abläufe sind alle temperaturabhängig. Hieraus resultieren die umfangreichen Effekte der Hypothermiebehandlung. Das Gehirn ist das Organ mit der kürzesten Ischämietoleranzzeit und die therapeutische Hypothermie heutzutage eine der wichtigsten Methoden zur Neuroprotektion.

In der Klinik kommen verschiedene Formen der therapeutischen Hypothermie zur Anwendung: die tief-hypotherme Perfusion während herzchirurgischer Eingriffe ², die moderate Hypothermie nach perinataler Asphyxie ³ oder Apoplex ⁴ sowie die milde Hypothermiebehandlung nach HerzKreislaufstillstand ⁵. Da die therapeutische Hypothermie nach HerzKreislaufstillstand in großen Studien das klinische Resultat der Patienten deutlich verbesserte, wurde die Hypothermiebehandlung in die Leitlinien des „European Resuscitation Council“ und der „American Heart Association“ aufgenommen.

Es zeigte sich aber, dass Hypothermie bei manchen Krankheitsbildern bisher keinen Nutzen brachte – z. B. beim Schädel-Hirn-Trauma - oder gar zu einer Verschlechterung des Krankheitszustandes führte – z. B. bei intrakranialem Aneurysma ⁶. Momentan (Start April 2010) läuft eine große prospektiv randomisierte multizentrische Studie zur Untersuchung der Effektivität von Hypothermie (32-35°C) hinsichtlich der Reduktion des intrakraniellen Druckes nach Schädel-Hirn-Trauma. Morbidität und Mortalität sollen sechs Monate nach dem Schädel-Hirn-Trauma der Patienten (1800 Patienten) untersucht werden ⁷.

Klinische Indikation	Evidenzlevel	Studienlage
Kardiopulmonale Reanimation: - initialer Rhythmus VT / VF - initiale Asystolie	I III	Randomisierte klinische Studien und zahlreiche Tierversuche
Perinatale Asphyxie	I	Randomisierte klinische Studien Unterstützende Hinweise
Schädel-Hirn-Trauma	Widersprüchliche Datenlage	Studien einzelner Zentren, zwei Metaanalysen mit pos. Ergebnis; eine Multicenterstudie mit neg. Ergebnis; drei Metaanalysen mit keinem signifikantem Trend zum Erfolg
Apoplex Infarkt der A. cerebri media	III	Sieben kleine unkontrollierte einzelne Studien, pos. Ergebnisse
Intraoperative Hypothermie - Intrazerebrale Aneurysmachirurgie - Thorakal- und Bauchaaortenaneurysmachirurgie - Herzchirurgie	IIa III III	Keine signifikante Verbesserung Überzeugende Daten tierexperimenteller Arbeiten, nur unkontrollierte, nicht randomisierte Studien Widersprüchliche Studienergebnisse, schnelle Wiedererwärmung in einigen Studien als mögliche Ursache für schlechte klinische Verläufe
Reduktion des intrakraniellen Druckes bei Hirnödem	I	Viele klinische Studien, jedoch führt reduzierter intrakranieller Druck nicht zwangsläufig zu besseren klinischen Ergebnissen
Reduktion der Größe des Myokardinfarktareals	IV	Positive Vordaten, Subgruppenanalyse, überzeugende tierexperimentelle Daten

Tabelle 1: Potentielle Indikationsbereiche und Studienlage der therapeutischen Hypothermie zur Organprotektion (modifiziert nach Polderman)⁸.

1.3 Physiologische Aspekte der Zellprotektion durch Hypothermie



Abbildung 1: Schematische Darstellung der protektiven Mechanismen induziert durch milde und moderate Hypothermie. Weiße Kästchen = Reduktion durch Hypothermie, graue Kästchen = Hochregulation durch Hypothermie (modifiziert nach Polderman 2009) ¹

1.3.1 Reduktion des Zellstoffwechsels

Bei den ersten klinischen Anwendungen therapeutischer Hypothermie in den 50iger Jahren ⁹ war die gängige Lehrmeinung, dass protektive Effekte der Hypothermieanwendung ausschließlich auf einem reduzierten Zellstoffwechsel des Gehirns und folglich auf einem reduzierten Sauerstoff- und Glukoseverbrauch beruhen würden. Die Ursprünge der therapeutischen Hypothermie kommen aus dem Erfahrungsbereich der Hibernation wechselwarmer Tiere. Tiere im Winterschlaf reduzieren ihre Sollwertkörperkerntemperatur, Zellkernaktivität und damit ihren Stoffwechsel. Auf niedrigerem Niveau wird eine neue Balance zwischen Energiebedarf und -versorgung hergestellt. Bei Reduktion der Temperatur um ein Grad Celsius wird der Zellstoffwechsel um 6-10% reduziert.

1.3.2 Beeinflussung der Inflammation und Neuroprotektion

Gehirnschädigungen führen in den meisten Fällen zu einer andauernden entzündlichen Antwort bereits eine Stunde nach der Schädigung. Pro-inflammatorische Zytokine wie der Tumornekrosefaktor- alpha (TNF- α) und Interleukin-1 (IL-1) werden dabei in großen Mengen durch Astrozyten, Mikrogliazellen und Endothelzellen ausgeschüttet. Dieser Anstieg bleibt bis zu fünf Tage bestehen ^{10, 11}. Darauf folgt die Chemotaxis und Migration von aktivierten Leukozyten durch die Blut-Hirn Schranke, die zu einer Anhäufung von Entzündungszellen im verletzten Gewebe führen. Gleichzeitig erfolgt eine Aktivierung des Komplementsystems,

das in der sehr frühen Phase nach einer Gehirnschädigung die Passage von Neutrophilen und (in späteren Stufen) Monozyten und Makrophagen initiiert ¹¹. Diese inflammatorische Immunantwort entsteht vor allem während der Reperfusion und wird begleitet durch die Produktion freier Radikale. In der Folge kann es zu einer ausgeprägten additiven Zellschädigung durch Makrophagen - induzierte Phagozytose kommen. Es entsteht die Neusynthese toxischer Produkte, und eine weitere Stimulation der immunologischen Antwort. In geringem Ausmaß ist diese entzündliche Antwort physiologisch und kann Reparaturmechanismen einleiten ¹¹⁻¹⁴. Entscheidend ist hierbei, dass die anhaltende Produktion von Zytokinen und die Leukozyteninfiltration die Gefahr des Gehirnzellschadens und der Verletzung signifikant erhöhen ¹⁵⁻¹⁷. Diese Abläufe sind zeitabhängig, so dass im Verlauf der Inflammationsreaktion die zerstörenden Aspekte die potenzielle Protektion - insbesondere in den späteren Phasen der Verletzung – dominieren ¹¹⁻¹⁴. Hierdurch entsteht ein Zeitfenster für therapeutische Interventionen, in dem die Inflammation abgeschwächt oder gestoppt werden soll, um einer weiteren Schädigung und dem Zelluntergang entgegen zu wirken ¹. Tierversuche und klinische Studien zeigten hierzu, dass Hypothermie die Ischämie induzierte Inflammationsreaktion und die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine unterdrückt ¹⁸⁻²⁰.

1.3.3 Reduktion des Reperfusionsschadens

Hypothermie reduziert den durch Reperfusion- induzierten DNA-Schaden, die Lipidperoxidation und Leukotrienproduktion ²¹⁻²³. Darüber hinaus kommt es zu einer verminderten Produktion von Stickstoffmonoxid, einem Schlüsselmolekül in der Entwicklung der post-ischämischen Gehirnverletzung ²⁴. Ferner kann die therapeutische Hypothermie zu einer Verschlechterung der Neutrophilen- und Makrophagenfunktion sowie zu einer Abnahme der Leukozytenzahl führen.

Ein weiterer zerstörender Prozess im Anschluss an ein Ischämie-Reperfusionereignis sind die gesteigerte Ausschüttung von freien Sauerstoffradikalen und das Entstehen eines sekundären Schadens. Hierbei spielen Superoxid (O_2^-), Peroxynitrite (NO_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), sowie Hydroxylradikale (OH^-) eine wichtige Rolle in der Determination, ob verletzte Zellen genesen oder sterben ²³⁻²⁶. Freie Radikale können durch Oxidationsprozesse Zellbestandteile beschädigen. Gehirnzellen besitzen verschiedene Antioxidationsmechanismen, die unter physiologischen Bedingungen die Schädigung verhindern. Im Anschluss an ein Ischämie-Reperfusionereignis ist die Produktion freier Sauerstoffradikale so stark erhöht, dass diese zellulären Abwehrmechanismen nicht ausreichen. Es entsteht durch die Peroxidation von Lipiden ein sekundärer Schaden. Unter hypothermen Bedingungen ist die Produktion von freien Radikalen dagegen bedeutsam reduziert ²³⁻²⁶. Durch endogene antioxidative Schutzmechanismen ist ein effektiverer Abbau

der freien Radikale besser gewährleistet. Hierbei kann der oxidative Schaden durch eigene Zellreparaturmechanismen verhindert oder bedeutend abgeschwächt werden ².

Tierversuche belegten, dass Hypothermie das Ausmaß der Gehirnschädigung und die Infarktgröße durch Abschwächung oder Unterbrechung des oxidativen Schadens durch freie Sauerstoffradikale bedeutsam verringert ²⁴. Sämtliche enzymatische Prozesse sind temperaturabhängig, so dass die therapeutische Hypothermie die Produktion freier Sauerstoffradikale und toxischer Metabolite während der Reperfusion beeinflussen kann. Somit beinhaltet die Hypothermiebehandlung ein herausragendes Potenzial zur Verbesserung der post-ischämischen Ergebnisse. Die entzündliche Antwort beginnt nach frühestens einer Stunde im Anschluss an das Ischämie-Reperfusionereignis. Durch das Verständnis der Pathophysiologie eines Ischämie-Reperfusionereignisses entsteht ein definiertes therapeutisches Fenster für die Anwendung der Hypothermie ¹.

1.3.4 Aktivierung protektiver Enzyme und Reduktion der Apoptose

Eine weitere Form des Zelluntergangs nach einer Ischämie und Reperfusion ist der programmierte Zelltod, die Apoptose. Der Beginn der Apoptose in der Zelle wird durch zelluläre Prozesse wie mitochondriale Dysfunktion, Veränderungen im zellulären Energiehaushalt und Enzymaktivität der Caspasen eingeleitet. Untersuchungen zur Apoptose an Neuronen haben gezeigt, dass durch Kühlung eine reduzierte mitochondriale Cytochrom C-Ausschüttung und eine Inhibition der Caspase-3-Aktivität in den Zellen erfolgt ²⁷. Das antiapoptotische Signalmolekül Bcl-2 wird durch Hypothermie verstärkt exprimiert ²⁸. ²⁹. Ein charakteristisches Merkmal der Frühphase eines neuronalen Schadens ist die Oxidation biologischer Makromoleküle in der Zellwand. Die dabei entstehenden Oxidations- und Degenerationsprodukte sind oft langlebig genug, um in den geschädigten Neuronen zu akkumulieren und mit intrazellulären Molekülen wie Proteinen, Lipiden und der DNA zu reagieren. Hypothermie vermindert dagegen die Ausschüttung exzitatorischer Aminosäuren wie beispielsweise Glutamat, die Stickstoffmonoxidbildung (NO) und die Hydroxylradikalbildung (OH[•]). In der Folge wird der Kalziumeinstrom in die Zellen vermindert und Neurone können vor dem Zelltod geschützt werden ^{30, 31}. Die Hypothermie scheint vor allem auf die Initialisierung und die frühe Phase der Apoptose einen Einfluss zu nehmen. Tierexperimente und Zellkulturstudien belegen, dass Hypothermie des Weiteren durch Hochregulation der Serin/Thyrosinkinase AKT zur Hemmung der Apoptose und somit zum Zellüberleben führen kann ³²⁻³⁴.

1.4 Nebenwirkungen der therapeutischen Hypothermie

Die Anwendung von Hypothermie führt zu vielen Veränderungen im gesamten Körper. Die bedeutendsten physiologischen Veränderungen und deren Nebeneffekte sowie Konsequenzen für die Behandlung der Patienten sind im Nachfolgenden zusammengefasst.

- Muskelzittern und kutane Vasokonstriktion

Bei wachen Patienten kommt es während Hypothermie zu Muskelzittern und kutaner Vasokonstriktion. Dadurch entsteht eine Zunahme des Sauerstoffverbrauchs und eine Erhöhung der Stoffwechselrate, ein gesteigerter Atemantrieb, eine höhere Herzfrequenz mit konsekutiv erhöhtem myokardialen Sauerstoffverbrauch³⁵⁻³⁷. Durch Sedierung und gegebenenfalls auch Relaxierung der Patienten kann das Muskelzittern therapiert werden.

- Reduzierter Metabolismus, Veränderungen in Glukose- und Elektrolytkonzentration

Die Reduktion der Körpertemperatur um ein Grad Celsius induziert eine Abnahme des Zellmetabolismus um ca. 6-10%. Parallel entsteht eine Abnahme des Sauerstoffverbrauchs mit Reduktion der Produktion von Kohlendioxyd. Besonders in der Induktionsphase der Hypothermie ist es von großer Bedeutung, die maschinelle Beatmung so durchzuführen, dass einer möglichen Hyperventilation mit zerebraler Vasokonstriktion entgegengewirkt wird. Hypothermie vermindert die Insulinsensitivität an den Rezeptoren sowie die Ausschüttung des Insulins durch die Bauchspeicheldrüse. Es können Hyperglykämien und ein gesteigerter Insulinbedarf entstehen³⁸.

Bei der Gabe von Medikamenten während der therapeutischen Hypothermie ist eine deutlich veränderte Pharmakokinetik und -dynamik zu beachten³⁹.

Das Abkühlen der Patienten kann weiterhin den Elektrolythaushalt im Blut beeinflussen. Eine Kombination aus Hypothermie-induzierten intrazellulären Verschiebungen und tubulären Funktionsstörungen führt hierbei zu einer gesteigerten Ausscheidung von Elektrolyten einhergehend mit dem Verlust von Magnesium, Kalium und Phosphat⁴⁰. Diese Elektrolytverschiebungen können zu Arrhythmien und Myklonien führen⁴¹.

- Kardiovaskuläre und hämodynamische Effekte

Hypothermie kann zu Hypotension und Bradykardie mit einem verringerten Herzzeitvolumen und eingeschränkter Myokardfunktion führen^{42, 43}.

- Beeinflussung der Blutgerinnung

Temperaturen unter 35°C können zu Thrombozytenfunktionsstörungen mit einer geringen Abnahme der Thrombozytenzahl führen. Bei Temperaturen unter 33°C kommt es zu Funktionsstörungen in der Gerinnungskaskade mit verstärktem Blutungsrisiko⁴⁴.

- Infektionsrisiko

Hypothermie beeinflusst die pro-inflammatorische Antwort durch die Hemmung der Leukozytenmigration, Phagozytose und verminderte Synthese von pro-inflammatorischen Zytokinen⁴⁵. Einerseits ist dies ein protektiver Mechanismus, doch andererseits kommt es durch ein Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen zu einer vergrößerten Infektionsgefahr. In den meisten klinischen Studien wird deshalb über eine Zunahme der Infektionsgefahr während der Hypothermie berichtet⁸.

1.5 Phasen der Hypothermiebehandlung

Bei der Anwendung therapeutischer Hypothermie werden drei verschiedene Phasen diskriminiert (siehe Abb.2). Wichtig ist hierbei das Verständnis der Besonderheiten der jeweiligen Phase der Hypothermie.

1. Induktionsphase: Das Herabkühlen sollte so schnell wie möglich nach Beginn der Ischämie oder des Traumas stattfinden. Temperaturen unter 34°C sollten schnell erreicht werden. Eine sichere und sehr effektive Methode stellt hierbei die Gabe kalter (4°C) Infusionslösungen dar. Unter Hypothermie sinkt das Herzzeitvolumen und gleichzeitig der Zellstoffwechsel, so dass eine Verbesserung des Gleichgewichtes zwischen Sauerstoffangebot und – nachfrage entsteht.
2. Erhaltungsphase: Die Kühlungsphase ist abhängig von der Schwere der Ischämie und dem Zeitintervall bis zum Erreichen der Zieltemperatur. In dieser Phase sollte die Temperatur mit geringfügigen Abweichungen (0,2 - 0,5°C) möglichst konstant niedrig gehalten werden.
3. Wiedererwärmungsphase: Ein kontrolliertes und langsames (maximal 0,2 - 0,5°C/min) Wiedererwärmen sollte angestrebt werden, damit die Schadensmechanismen nicht reinitiiert werden. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass während des schnellen Erwärmens unter anderem das Risiko einer Hyperkaliämie besteht. Es kann in dieser Phase zu erhöhtem Sauerstoffverbrauch bei verminderter Perfusion des Gehirns kommen⁴.

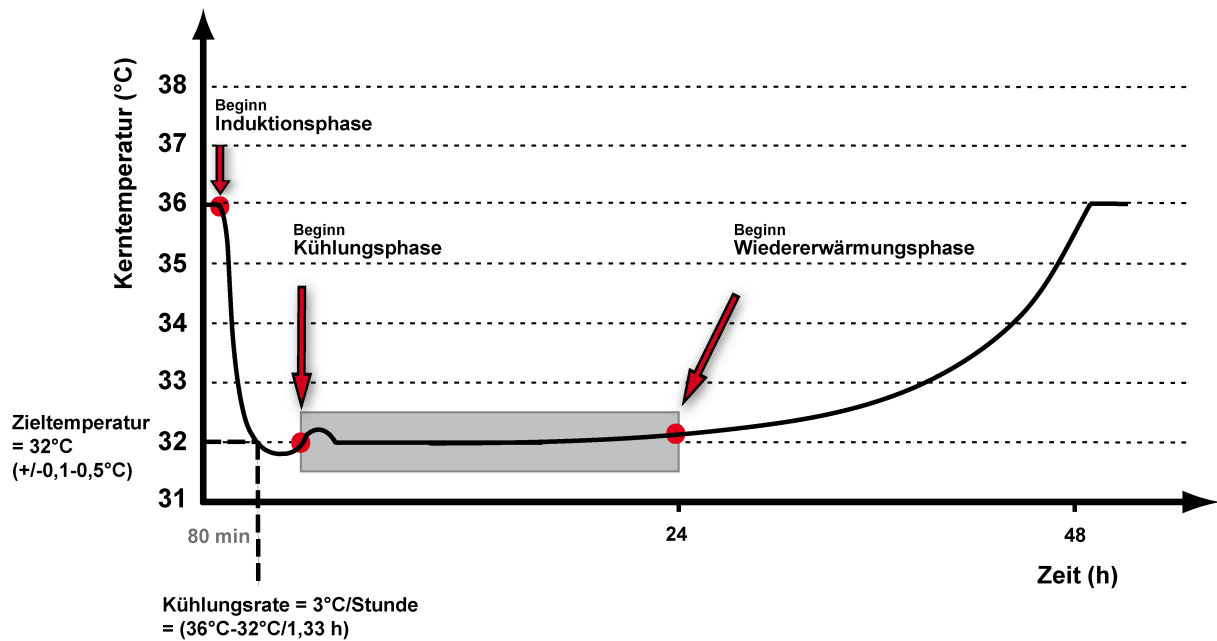


Abbildung 2: Graphische Darstellung der drei Phasen der Hypothermiebehandlung. Die Induktionsphase sollte 30 - 120 min dauern; schnelles Herabkühlen führt zum Unterschreiten der Zieltemperatur. Dies ist bis zu einem Grad Celsius Differenz akzeptabel. Die Kühlungsphase nach Herz-Kreislaufstillstand dauert 24 h (bei anderen Indikationen auch länger) und ist charakterisiert durch minimale Temperaturfluktuationen. Die Wiedererwärmungsphase sollte langsam und kontrolliert ablaufen mit Wiedererwärmungsraten um 0,2 - 0,5°C/min (modifiziert nach Poldermann CM 2009)¹.

II Darstellung der eigenen Arbeiten

2.1 Etablierung eines *in vitro* Zellkulturmodells

Tiefe Hypothermie ist seit über 50 Jahren die wichtigste Methode der Neuroprotektion bei Korrekturoperationen von angeborenen Herzfehlern im Neugeborenen- und Säuglingsalter, insbesondere wenn intraoperativer Herzkreislaufstillstand notwendig ist². Trotz des großen Interesses an der klinischen Anwendung von Hypothermie sind zelluläre und molekulare Wirkmechanismen der Hypothermie und Wiedererwärmung weitestgehend ungeklärt. Unerwünschte Nebenwirkungen wie z. B. perioperative Krampfanfälle und psychomotorische Entwicklungsstörungen, die nach Korrekturoperationen unter Einsatz der Herzlungen-Maschine im Neonatalen- und Säuglingsalter gehäuft auftreten, sind bisher unverstanden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Zellkulturmodell etabliert, in dem morphologische, biochemische, immunphänotypische und funktionelle Auswirkungen der therapeutischen Hypothermie auf Endothelzellen, Myokardzellen, Gehirnzellen und unreifes Gehirngewebe untersucht wurden. In Analogie zum operativen Prozedere in der Kinderherzchirurgie wurde zuerst ein Zeit-Temperatur-Protokoll erstellt, das der klinischen Situation sehr nahe kommt (siehe Abb.3).

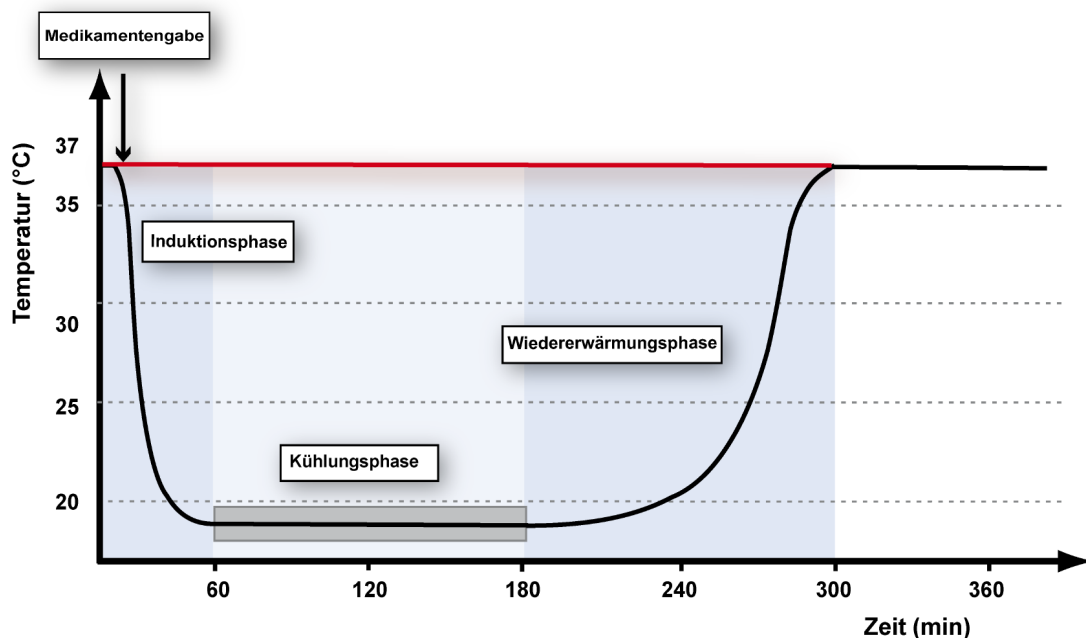


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Zeit-Temperatur-Protokolls in Analogie zur Hypothermie während kardiochirurgischer Eingriffe im Neugeborenen- und Säuglingsalter.

2.2 Hypothermie zur Neuroprotektion

2.2.1 Einzelzellkulturmodelle: Mikrogliazellen, Astrozyten und Neurone

2.2.1.1 *Inflammtionsverhalten und funktionelle Eigenschaften der Gehirnzellen*

K.R.L. Schmitt, A. Diestel, S. Lehnhardt, R. Schwartlander, O. Ullrich, P.E. Lange, F. Berger, H. Abdul-Khaliq: Hypothermia suppresses inflammation via ERK signalling pathway in stimulated microglial cells. Journal of Neuroimmunology 2007 September; 189(1-2): 7-16.

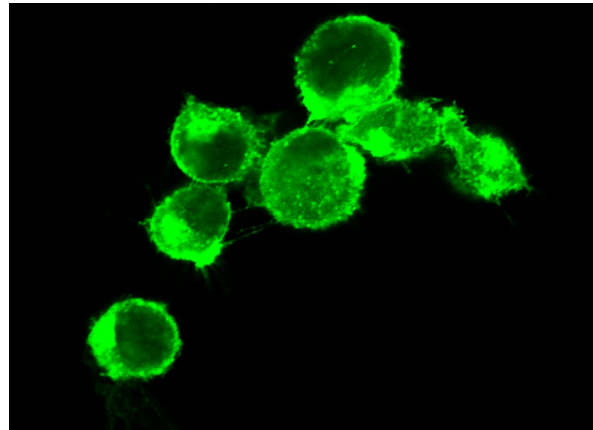
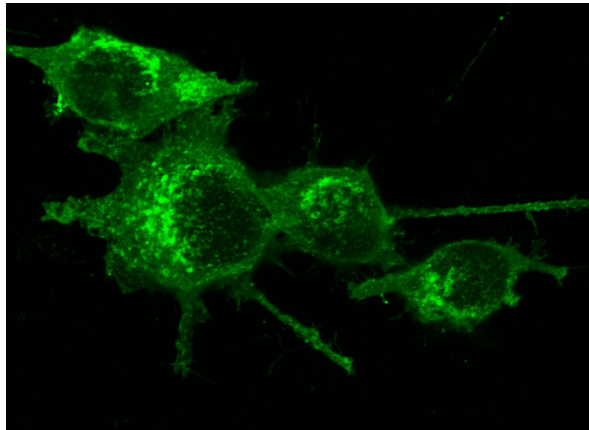
K.R.L. Schmitt, C. Kern, P.E. Lange, F. Berger, H. Abdul-Khaliq and S. Hendrix: S100B modulates IL-6 release and cytotoxicity from hypothermic brain cells and inhibits hypothermia-induced axonal outgrowth. Neuroscience research 2007; 59: 68-73.

A. Diestel, S. Troeller, N. Billecke, I.M. Sauer, F. Berger, K.R.L. Schmitt: Mechanisms of hypothermia-induced cell protection mediated by microglial cells in vitro. European Journal of Neuroscience 2010 March; 31(5): 779-87.

Die Untersuchungen zur Neuroprotektion verfolgten das Ziel, den Einfluss der Hypothermie auf Veränderungen der Zellmorphologie und der intrazellulären Signaltransduktion in Mikrogliazellen, Astrozyten und Neuronen zu untersuchen. Ferner wurde die Ausschüttung pro-inflammatorischer Faktoren von Gehirnzellen und neonatalem Hirngewebe im Hinblick auf protektive Effekte und potentielle nachfolgende Regenerationsprozesse charakterisiert.

Bei der Ausbildung eines neuronalen Schadens spielen Mikrogliazellen eine wichtige Rolle⁴⁶. Die Aktivierung der Mikroglia ist dabei durch ein typisches Muster gekennzeichnet, bestehend aus morphologischen Veränderungen, Zellproliferation, Freisetzung von Mediatoren, Migration zu den Orten neuronaler Aktivität, Expression immunologisch relevanter Oberflächenproteine und Phagozytose geschädigter Neurone⁴⁷. Bei neuro-inflammatorischen Vorgängen im Gehirn steigt die Produktion von Oxidantien durch aktivierte Mikrogliazellen deutlich an⁴⁸. Superoxidradikale werden von Mikrogliazellen beispielsweise bei der Synthese von Prostanoiden während der Zyklisierung von Arachidonsäure durch das Enzym Cyklooxygenase (COX) gebildet. Neben den reaktiven Sauerstoffspezies zählt auch Stickstoffmonoxid (NO) zu den Faktoren, die bei entzündlichen Erkrankungen des Gehirns von Bedeutung sind. NO wird enzymatisch über Stickstoffmonoxid-Synthetasen (NO-Synthetasen) im Gehirn gebildet⁴⁹. In Makrophagen und Mikrogliazellen ist die induzierbare NO-Synthetase¹⁸ lokalisiert, die durch LPS und andere inflammatorische Mediatoren aktiviert wird⁵⁰. Wir konnten nachweisen, dass Hypothermie (30°C) zu einer signifikanten Reduktion der NO Ausschüttung über verminderte Aktivierung der Enzyme iNOS, MEK und ERK führte. Mikrogliazellen produzieren nach ihrer Aktivierung Chemokine wie IL-8, MIB-1 α und MCP-1, wobei die genannten Chemokine vermutlich an der intrazerebralen Rekrutierung von T-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen beteiligt sind⁴⁷. Zu den pro-inflammatorischen Zytokinen gehören u. a. TNF- α , IL-6 und IL-1 β ⁵¹. Durch Hypothermie kommt es zu einer Reduktion pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine (TNF- α , IL-6 und MCP-1), wohingegen IL-10 und IL-1ra als anti-inflammatorische Zytokine über den Zeitverlauf nach Hypothermie und Wiedererwärmung signifikant verstärkt

ausgeschüttet werden. Nach der Zugabe von pro-inflammatorischen Zytokinen bilden Mikrogliazellen verstärkt das Oberflächenprotein ICAM-1⁵². Nach moderater und tiefer Hypothermie kam es in unserem Modell zu morphologischen Veränderungen (siehe Abb.4) verbunden mit einer Abnahme der ICAM-1 und CD-11a Expression.



A) Normothermie (37°C)

B) Hypothermie (17°C)

Abbildung 4: Unter Normothermie zeigen die BV-2 Mikrogliazellen eine ramifizierte Morphologie mit Zellausläufern (A). Unter Hypothermie (17°C) kommt es zu einer amoeboiden runden Zellform (B). Konfokale Aufnahme, IB4 Färbung

Mikrogliazellen besitzen eine duale Funktion: Einerseits können die Zellen die Eigenschaften immunkompetenter Makrophagen annehmen und an inflammatorischen Prozessen partizipieren, andererseits sind sie in der deaktivierten Form als reine Gliazellen in der Lage, Neurone zu schützen und zu unterstützen^{53, 54}. Die duale Funktion der Mikroglia führt dazu, dass aktivierte Mikrogliazellen selbst zur Ursache eines neuronalen (Sekundär-) Schadens werden können⁵⁵. Daher ist es von grundsätzlichem Interesse, ob ein Mikroglia-aktivierender Signalweg nach Hypothermie und Wiedererwärmung zu einer eher neuroprotektiven oder neurotoxischen Reaktion im Gewebeverband führt. Kenntnisse über die Regulation der intrazellulären mikroglialen Signalwege insbesondere in Folge von tiefer Hypothermie und Wiedererwärmung sind daher von großer klinischer Relevanz, da die Inhibition zytotoxischer und die Förderung zytoprotektiver bzw. - regenerativer Signalwege als bedeutende Mechanismen der neuronalen Zellprotektion angesehen werden müssen. Wir konnten hierzu zeigen, dass Hypothermie und Wiedererwärmung zu einer Aktivierung der Mikrogliazellen führen, die Phagozytose steigern und eine Verschiebung des Zytokingleichgewichtes in Richtung anti-inflammatorische Zytokine bewirken. Der MAP-Kinasen-Signalweg wird während der Kühlung reduziert, Ikappa-B-alpha verzögert und vermindert degradiert. Die Gabe von Methylprednisolon (MP) führte in Mikrogliazellen zu einem gesteigerten Zellüberleben und einer Inhibierung der durch Hypothermie induzierten IL-6- Sekretion. Das astrogliale Protein S100B verminderte den Zelltod nach tiefer Hypothermie in Neuronen, Astrogliazellen und in Mikrogliazellen. Hypothermie führt zu signifikant erhöhtem axonalen

Auswachsen in hippocampalen Hirnschnittkulturen. Interessanterweise kam es nach externer Zugabe von S100B zu einer Reduktion des axonalen Auswachsens.

2.2.2 Hypothermie und Wiedererwärmung führen zu axonalem Auswachsen in organotypische Hirnschnittkulturen

K.R.L. Schmitt, F. Boato, A. Diestel, D. Hechler, A. Kruglov, F. Berger, S. Hendrix: Hypothermia-Induced Neurite Outgrowth is Mediated by Tumor Necrosis Factor-Alpha. Brain Pathology 2010 July; 20(4): 771-9.

Ein fester Bestandteil der Neuroprotektion im Zusammenhang mit einem Schädelhirntrauma ist die sofortige Anwendung der systemischen Hypothermie, mit dem Ziel der Reduktion einer sekundären Gehirnschädigung⁵⁶.

In unserem Zellkulturmodell wurden organohippocampale Hirnschnitte aus C57/Bl6 Mäusen für zwei Stunden auf 17°C abgekühlt und über eine Zeitdauer von zwei Stunden auf 37°C wiedererwärmt. Tiefe Hypothermie und Wiedererwärmung führten dabei zu einem verstärkten axonalen Auswachsen nach 24 h (siehe Abb. 5 und 6). Im Gegensatz zu früheren Studien, die hauptsächlich die neuroprotektiven Effekte der Hypothermie untersuchten, wurde in unserem Projekt untersucht, ob Hypothermie das axonale Auswachsen über Neurotrophine und/oder entzündungsassoziierte Zytokine wie IL-1 β , IL-6, IL-10 und TNF- α induziert. Da NT-3 und NT-4 als Neurotrophine verantwortlich für das axonale Auswachsen in organohippocampalen Hirnschnitten sind, untersuchten wir, ob diese Neurotrophine auch die Hypothermie-induzierte Zunahme des axonalen Auswachsens beeinflussen. Überraschenderweise induziert Hypothermie das axonale Wachstum auch in organotypischen Hirnschnitten von NT-3 heterozygoten und NT-4 homozygoten defizienten Mäusen. Darüber hinaus verwendeten wir K252a, einen starken Hemmstoff der Neurotrophin Rezeptoren TrkA, TrkB und TrkC. Trotz der Inhibition der Rezeptoren kam es nach tiefer Hypothermie zu einem gesteigerten axonalen Auswachsen. Diese Daten zeigen, dass die Zunahme des axonalen Auswachsens durch die Hypothermie unabhängig von der Neurotrophin-Nachrichtenübermittlung ist. In einem nächsten Schritt untersuchten wir, ob das durch Hypothermie induzierte axonale Auswachsen über die Modulation des Zytokinmilieus beeinflusst wird. Die Analyse der Konzentrationen von IL-1 β , IL-6, IL-10 und TNF- α zeigte, dass ausschließlich die TNF- α Konzentration nach der tiefen Hypothermie und Wiedererwärmung signifikant (vierfach) erhöht war. Nach Inkubation mit dem TNF- α -Inhibitor Etanercept sowie in Hirnschnitten von TNF- α -defizienten Mäusen konnten wir den Hypothermie induzierten Auswachseffekt nicht mehr nachweisen. Diese Studie beweist erstmalig, dass Hypothermie nicht nur protektive Effekte im Zentralen Nervensystem ausübt, sondern auch das axonale Auswachsen über die TNF- α -Regulierung als einen möglichen Mechanismus der Regeneration unterstützt.

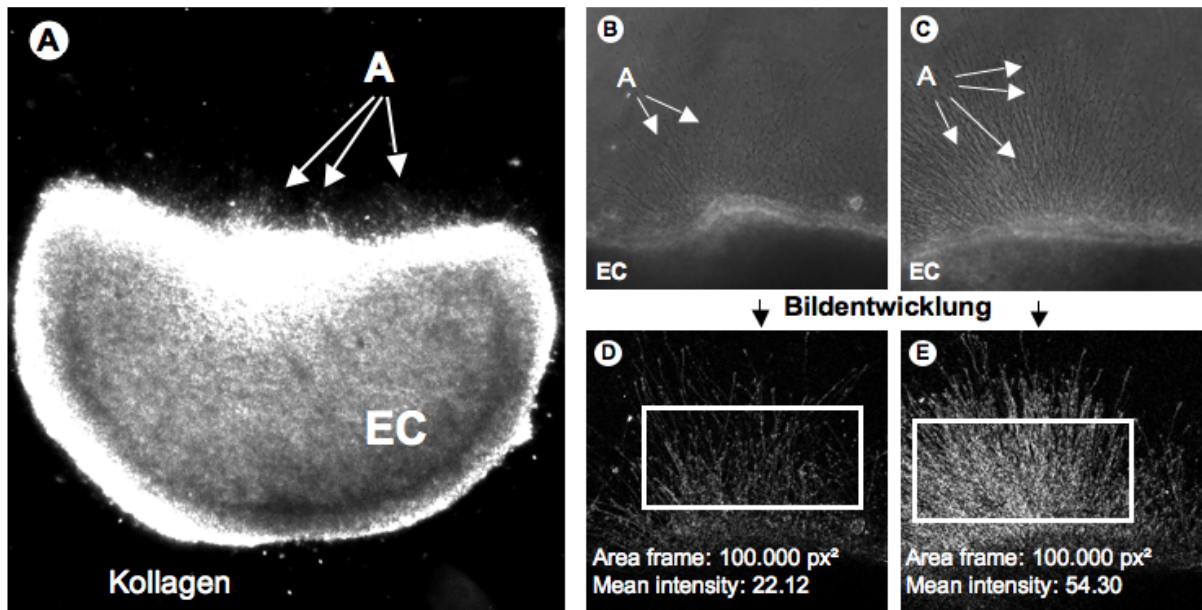


Abbildung 5: Exemplarische Darstellung der Methode des Auswachsassays. EC = Entorhinaler Cortex der in Kollagen eingebetteten Hirnschnitte von C 57/Bl6 Mäusen (p2-3) (A) Die Pfeile zeigen auf neu gebildete axonale Ausläufer (B, C).

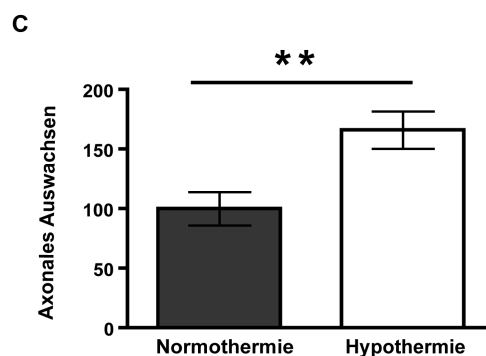
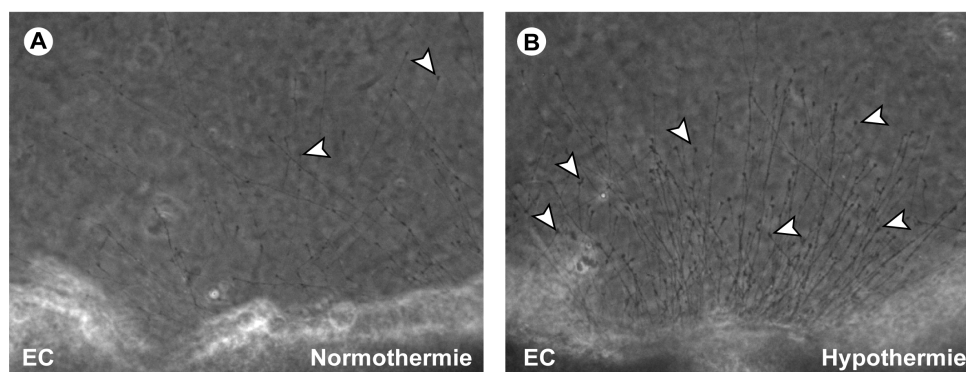


Abbildung 6: Hypothermie und Wiedererwärmung führen zu einem signifikant erhöhten axonalen Auswachsen. A) Kontrolle bei 37°C; B) 24 h nach Hypothermie und Wiedererwärmung; C) Densitometrische Analyse des axonalen Auswachsens zeigt die signifikante Erhöhung in der Hypothermiegruppe im Vergleich zur Normothermiegruppe. ** $p < 0,001$.

2.3 Auswirkungen der Hypothermie auf Endothelzellen

2.3.1 Morphologische Veränderungen von Endothelzellen unter Hypothermie und Wiedererwärmung sowie deren medikamentöse Beeinflussung

A. Diestel, N. Billecke, J. Roessler, B. Schmitt, S. Troeller, R. Schwartlander, F. Berger, I.M. Sauer, K.R.L. Schmitt: *Methylprednisolone and Tacrolimus prevent hypothermia-induced endothelial dysfunction. Journal of Heart and Lung Transplantation 2009 July. 28(7): 718-24.*

Zum Schutz unreifer Organsysteme während kardiochirurgischer Eingriffe unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine bei Neugeborenen und Säuglingen werden die Patienten auf eine minimale Körpertemperatur von 17°C heruntergekühlt. Prolongierte Inflammation und das Kapillarleck-Syndrom sind jedoch häufige Komplikationen nach Korrekturoperationen bei Neugeborenen und Säuglingen.

Ziel der *in vitro* Experimente war es, morphologische Veränderungen von humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVEC) unter Kühlung und Wiedererwärmung zu charakterisieren und mögliche medikamentöse Interventionsstrategien zu finden.

Im Rahmen von Entzündungsreaktionen produzieren aktivierte Endothelzellen Signalmoleküle, wie die induzierte Cyclooxygenase-2 (Cox-2), die an der vaskulären Inflammation sowie an der Proliferation beteiligt ist^{57, 58}. Weiterhin interagieren Endothelzellen während der Frühphase der Inflammation mit Leukozyten durch die Induktion von Adhäsionsmolekülen sowie die Produktion von Zytokinen und Chemokinen⁵⁷.

Morphologische Veränderungen humaner Endothelzellen während tiefer Hypothermie und anschließender Wiedererwärmung konnten mit Hilfe des perfundierbaren *SlideReactors* im *SlideObserver*⁵⁹ mikroskopisch beobachtet und cinematographisch dokumentiert werden (siehe Abb.7). Eine kontinuierliche Messung klinisch wichtiger Routineparameter wie pO₂, pH-Wert und Temperatur konnte dabei automatisiert durchgeführt werden. Durch höhere Zelldichten sowie die Möglichkeit einer freien dreidimensionalen Reorganisation der Zellen im *SlideReactor* konnte ein Mikrohabitat geschaffen werden, das den physiologischen Bedingungen der Zellen *in vivo* näher kommt. Der Zell/Zell-Kontakt und Mediumaustausch innerhalb der Aggregate ermöglichte sowohl die Reorganisation wichtiger funktioneller Komplexe als auch die Orientierung des Zytoskeletts und der Zellorganellen *in vitro*.

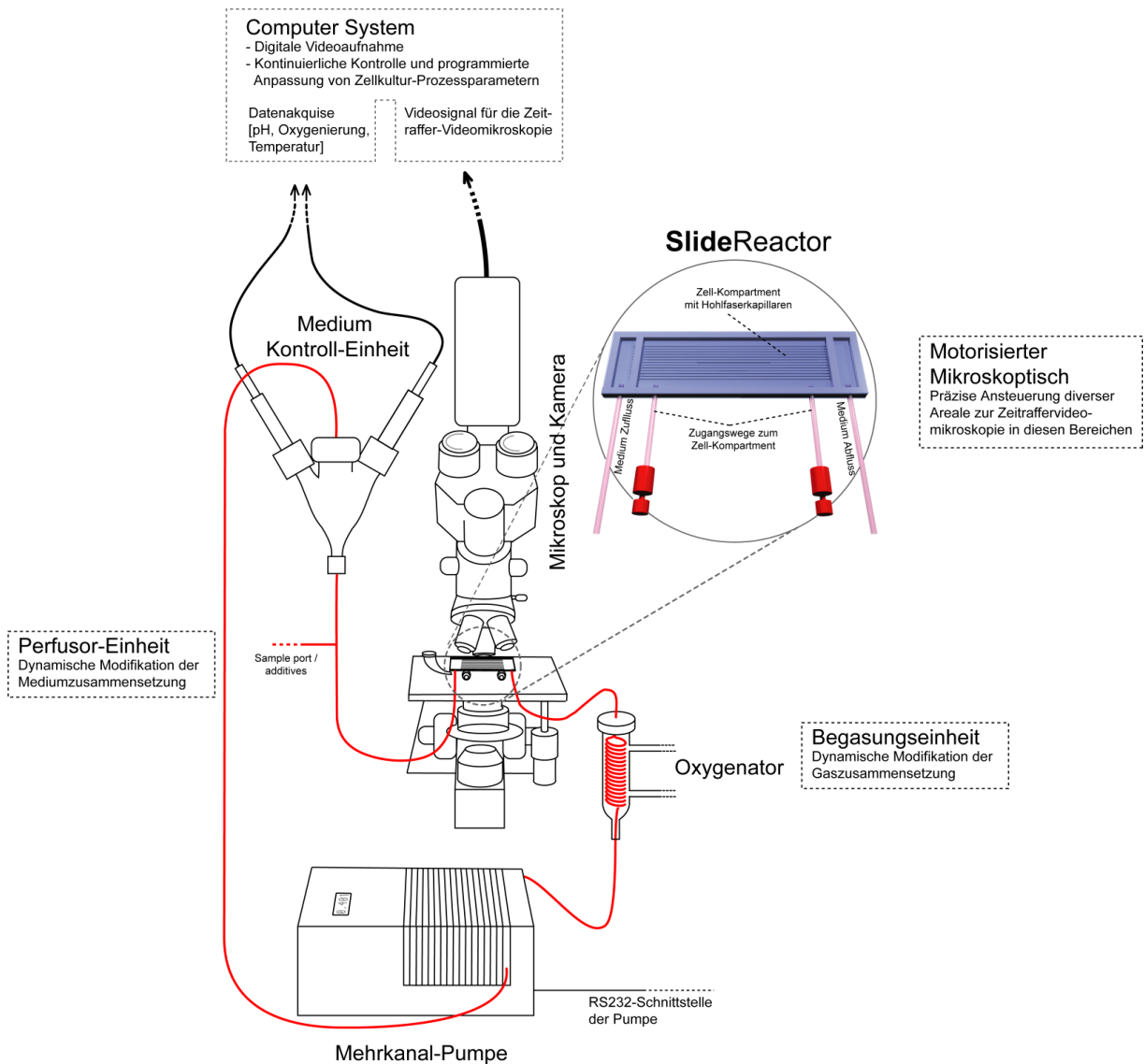


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Betriebskonzepts *SlideObserver* für *SlideReactor*-Bioreaktoren⁵⁹

Während des Herabkühlens kam es bereits nach 15 Minuten bei einer Temperatur von ca. 32°C zu Veränderung der Endothelzellmorphologie. Die einzelnen Endothelzellen lösten sich aus dem Verband, verlängerten ihren Zellkörper, was zur Ausbildung interzellulärer Lücken führte (siehe Abb.8). Es kam bei 17°C zu einem „Ruhe der Zellen“. Gleichzeitig kam es zu einem Verlust der Zellbarriere und einer Abnahme der Adhäsion der Endothelzellen mit signifikant gesteigerter Permeabilität. Somit konnten wir belegen, dass die veränderte Zellmorphologie eine direkte Auswirkung auf die funktionellen Eigenschaften der Endothelzellen hatte. Während der Wiedererwärmungsphase veränderte sich die Zellmorphologie. Die Endothelzellen gewannen erneut ihre *in vitro* bekannte dachziegelartige Anordnung zurück. Die interzellulären Lücken wurden wieder geschlossen und die Permeabilität durch den Endothelzellverband signifikant reduziert. Einen möglichen zugrunde liegenden Mechanismus stellte die Expression des Transmembranproteins Connexin 43 dar.

In der Kühlungsphase kam es zu einer Herabregulation des Proteins. Ein erneuter Anstieg der Proteinexpression konnte bereits ab 32°C in der Wiedererwärmungsphase gesehen werden. Durch die kombinierte Behandlung der Endothelzellen mit Methylprednisolon (MP) und Tacrolimus (TAC) während der Temperaturveränderungen blieb die Endothelzellbarriere konstant erhalten.

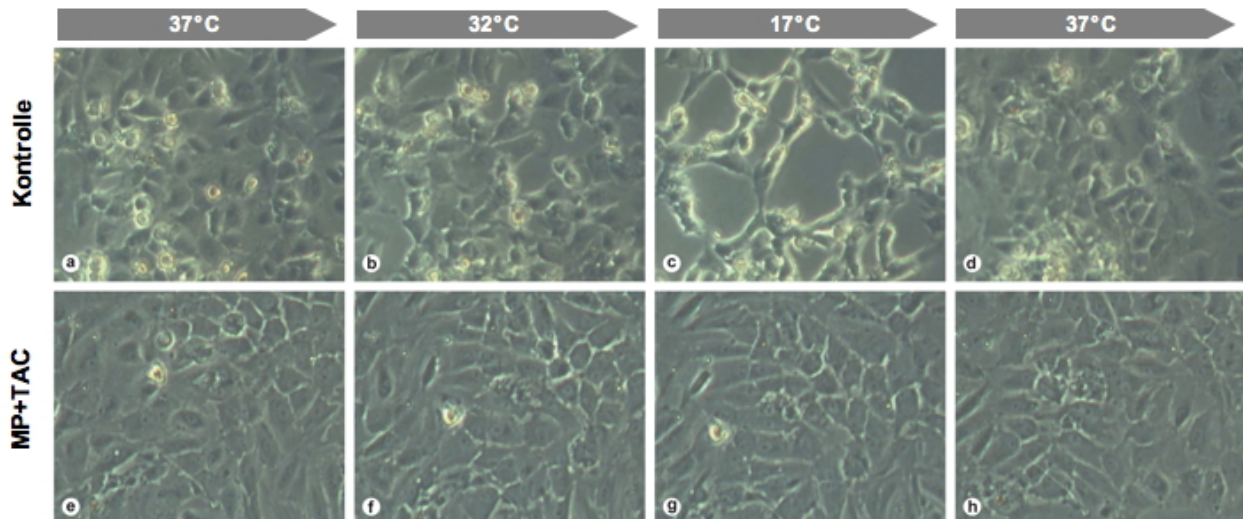


Abbildung 8: Sequenzbilder der morphologischen Veränderungen der Endothelzellen unter Kühlung und Wiedererwärmung, aufgenommen im *SildeReactor*, a = 37°C, b = 32°C, c = 17°C, d = 37°C. e bis h = Kühlung und Wiedererwärmung unter Behandlung mit Methylprednisolon und Tacrolimus haben keinen Einfluß auf die Endothelzellmorphologie.

Hypothermie führte zudem zu einer Kondensation von F-actin und Ausbildung von Stressfasern. Gleichzeitig löste sich der geschlossene Zellverband der Endothelzellen auf. Die alleinige Gabe von Methylprednisolon oder Tacrolimus hatte dagegen keinen Einfluss auf die durch Hypothermie und Wiedererwärmung induzierten zellulären Veränderungen. Endothelzellen, die gleichzeitig mit MP und TAC behandelt wurden, bildeten ebenfalls Stressfasern aus, der Zellverband blieb jedoch intakt (siehe Abb.9).

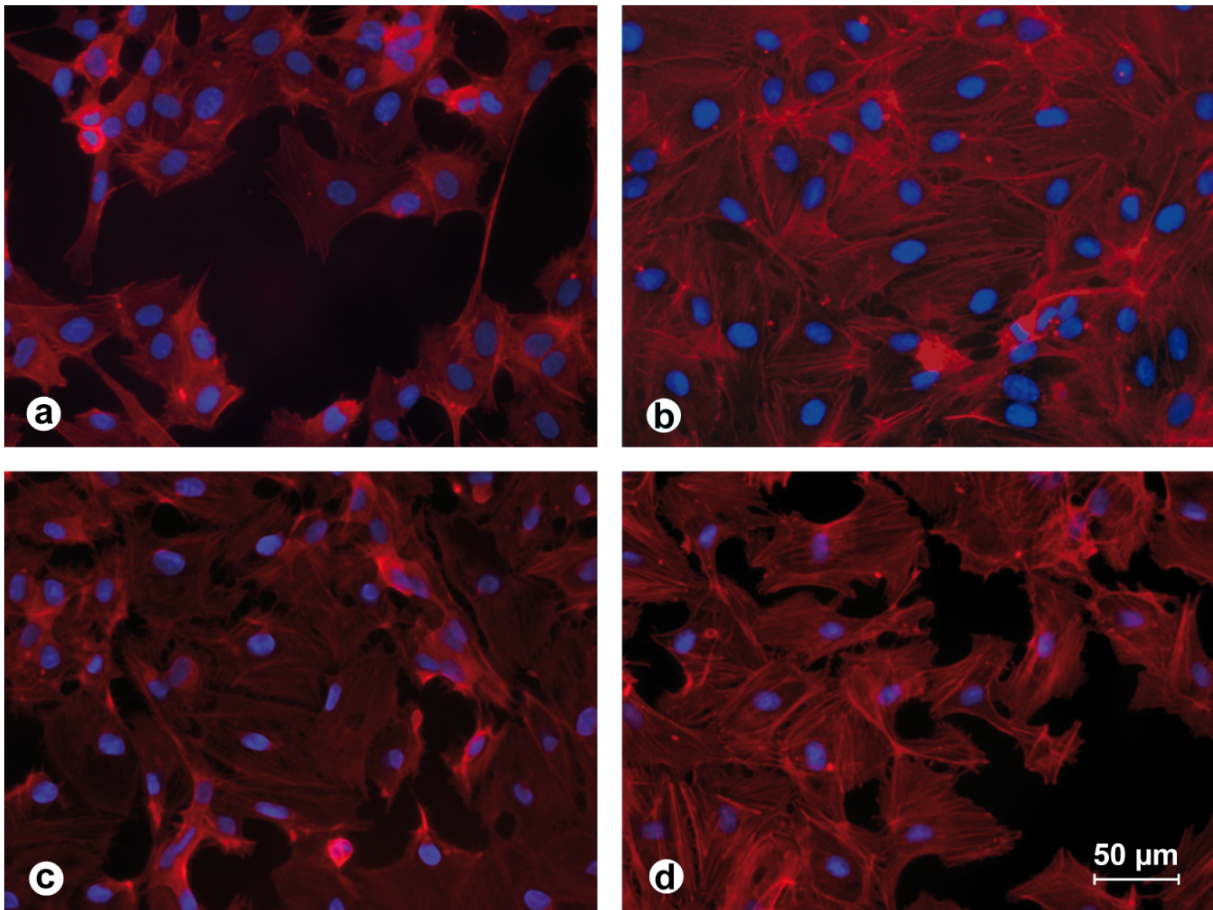


Abbildung 9: Hypothermie (17°C) erzeugt die Ausbildung von Stressfasern und bewirkt eine interzelluläre Lückenbildung (a). Die Behandlung der Zellen mit MP oder TAC alleine führt ebenfalls zur Bildung von Stressfasern und der Auflösung des geschlossenen Zellverbandes (c und d). Die kombinierte Behandlung der Zellen mit MP und TAC verhindert die Ausbildung interzellulärer Lücken, erzeugt jedoch Stressfasern (b). (F-actin = rot, Dapi = blau).

Mögliche Signalwege der morphologischen Veränderungen während Hypothermie und Wiedererwärmung könnten eine ERK 1/2 Aktivierung in der Herabkühlungs – und Wiedererwärmungsphase sowie die Verringerung des Connexin 43 Gehalts während der Hypothermie darstellen. Die endotheliale Zellpermeabilität wird durch F-Aktin und durch junctionale Proteine organisiert und reguliert⁶⁰⁻⁶². Hypothermie führte zu einer Aktivierung spezifischer Membranrezeptoren, die nachfolgend eine intrazelluläre Signalkaskade über die Aktivierung der ERK 1/2 Proteinkinase in Gang setzen. Diese kann zu einer zytoskelettalen Umstrukturierung führen. Die aktivierte MAPK ERK 1/2 reguliert unter anderem die Organisation des zytoskelettalen Proteins F-Aktin und kann eine Degradation des Proteins Connexin 43 bewirken⁶². Somit könnte die durch Herabkühlung und Wiedererwärmung induzierte Phosphorylierung von ERK 1/2 mit konsekutiver Degradation des Proteins Connexin 43 direkt an der Ausbildung der interzellulären Lücken im Zellverband beteiligt sein⁶³.

Als klinisch relevantes Ergebnis dieser Studie ist hervorzuheben, dass nur die kombinierte Gabe aus Methylprednisolone und Tacrolimus die morphologischen Veränderungen der gekühlten und wiedererwärmten Endothelzellen verhindern können. Dies könnte ein sehr neuer Therapieansatz zur Verhinderung des postoperativen Kapillarleck-Syndroms sein. Die verwendeten Konzentrationen der Medikamente sind gering, die Anwendungsdauer auf den Verlauf des Experimentes beschränkt.

2.3.2 Effekte der Hypothermie auf das Inflamationsverhalten von Endothelzellen

A. Diestel, J. Roessler, C. Drescher, A. Pohl-Schickinger, A. Koster, F. Berger, K.R.L. Schmitt: Specific p38 inhibition in stimulated endothelial cells: A possible new anti-inflammatory strategy after hypothermia and rewarming. Vascular Pharmacology 2009 October. 51(4): 246-52.

Tiefe Hypothermie und anschließende Wiedererwärmung führen in Endothelzellen zu einer Vielzahl von intrazellulären Veränderungen, die aufgrund ihrer Komplexität bisher noch unzureichend verstanden sind. Die Analyse des Inflamationsverhaltens von Endothelzellen unter Temperaturveränderungen ist wichtig für das Verständnis der Pathophysiologie unerwünschter Nebenwirkungen während der Hypothermiebehandlung. Durch die medikamentöse Beeinflussung mit immunsuppressiven Medikamenten sollen diese negativen Auswirkungen der Kühlung abgeschwächt oder gezielt inhibiert werden.

Es wurden stimulierte und unstimulierte Endothelzellen in Analogie zu den klinischen Bedingungen gekühlt und anschließend wiedererwärmt. Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen vor Versuchsbeginn mit Methylprednisolon und/oder Tacrolimus sowie mit spezifischen MAPK-Inhibitoren (U0126, SB203580 und SP600125) vorbehandelt. Die Ausschüttung von IL-6, IL-8 und MCP-1 sowie die Aktivierung der MAPKs ERK 1/2, SAPK/JNK und p38 wurden untersucht. Mit TNF- α stimulierte Endothelzellen wiesen zwei Stunden nach der Wiedererwärmungsphase eine signifikant höhere IL-6 Sekretion auf (siehe Abb.10).

IL-6 ist ein vielseitiges Zytokin, welches für eine frühe inflammatorische Antwort in entzündeten Geweben verantwortlich ist und die „Akute-Phase Proteine“ aktiviert. Klinische Daten korrelieren mit den im Zellkulturmodell gewonnenen Erkenntnissen über eine vermehrte IL-6 Sekretion 6 h nach der Operation mit tiefer Hypothermie und kardiopulmonalem Bypass. Die signifikant erhöhte Ausschüttung des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 könnte an der Pathophysiologie des Kapillarleck-Syndroms beteiligt sein. Es konnte eine Korrelation zwischen postoperativer Mortalität nach kardiopulmonalem Bypass und erhöhtem IL-6 Serumspiegel nachgewiesen werden ⁶⁵.

Diese inflammatorische Antwort konnte durch kombinierte Applikation von MP und TAC unterdrückt werden. Am effektivsten wurde die vermehrte IL-6 Sekretion durch die spezifische Blockade der p38 Kinase mittels des selektiven Inhibitors SB203580 gesenkt. Deshalb könnte eine kombinierte Therapie aus Methylprednisolon und Tacrolimus vor Beginn der Operation eine durch IL-6 induzierte überschießende Entzündungsreaktion im Organismus positiv beeinflussen.

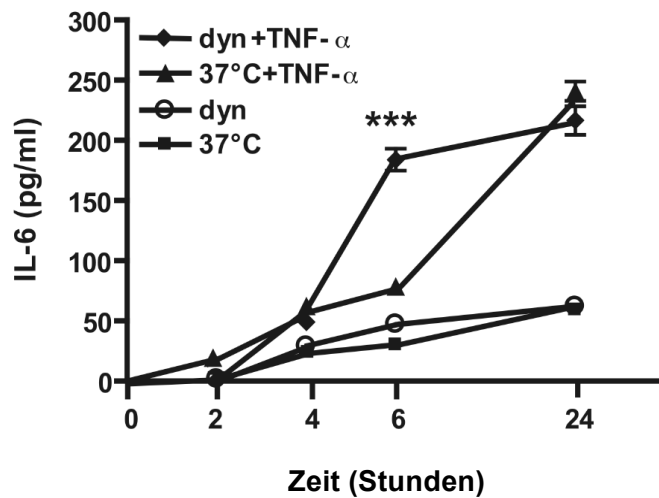


Abbildung 10: IL-6 Ausschüttung unstimulierter und mit TNF- α stimulierter Endothelzellen. dyn = gekühlte und wiedererwärmte Zellen, 37°C = normotherme Gruppe, ***p<0,001.

Die Konzentrationen von IL-8 und MCP-1 waren jedoch unter Hypothermie signifikant reduziert. Beide Zytokine stimulieren die Migration von Entzündungszellen durch die Endothelbarriere in das umliegende Gewebe, welche den Zellverband durch aktive Sezernierung von Proteasen und Oxidantien schädigen. Durch die Reduktion der Chemokine könnte die Hypothermie somit auch ein Schutzeffekt auf die Endothelzellbarriere ausüben.

2.4 Hypothermie führt zur Kardioprotektion während oxidativem Stress

2.4.1 Hypothermie schützt Kardiomyozyten vor Apoptose und DNA Schaden

Diestel, C. Drescher, F. Berger, K.R.L. Schmitt: Hypothermia protects cardiomyocytes from H₂O₂ induced apoptosis. Cryobiology 2011 February; 62(1): 53-61.

Während kardiochirurgischer Interventionen im Neonatalen- und Säuglingsalter wird durch Hypothermie und Kardioplegielösung das schlagende Herz angehalten und entsprechend der geplanten Operation eröffnet. Es kommt zum direkten Schaden der Kardiomyozyten. Hierzu untersuchen wir in einem Zellkulturmodell den Einfluss der Hypothermie auf die geschädigten Kardiomyozyten.

In dem *in vitro* Zellkulturmodellsystem wurden ausdifferenzierte Kardiomyozyten einer stabilen Zelllinie (H9c2) mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) geschädigt. Dadurch wurden ein direkter Schaden sowie ein Reperfusionsschaden nachgeahmt. Ein Reperfusionsschaden wird durch die wiederhergestellte Durchblutung nach einer Minderdurchblutung (Ischämie) des Herzens ausgelöst. Der Sauerstoffmangel während der Ischämie führt dabei innerhalb weniger Minuten zu einem nahezu vollständigen Abbau von Adenosintriphosphat (ATP), was zu einem Anstieg von Hypoxanthin führt. Gleichzeitig kommt es, aufgrund des Funktionsstopps der ATP-abhängigen Ionentransporter zu Kalziumeinstrom und Kaliumausstrom. Dies und der Anstieg von Hypoxanthin führen zu einer Umwandlung des Enzyms Xanthindehydrogenase zu Xanthinoxidase, welches das Hypoxanthin zu Xanthin oxidiert. Bei dieser Umwandlung entstehen freie Sauerstoffradikale (ROS, reactive oxygen species) wie zum Beispiel Superoxid und Hydroxyl-Radikale. Diese Sauerstoffradikale entstehen dabei im Myokard in verschiedenen Zellkompartimenten. Beteiligt an der Bildung freier Sauerstoffradikale sind unter anderem Mitochondrien und Myozytenmembranen, sowie Leukozyten, Endothelzellen, Makrophagen und Erythrozyten. H₂O₂ gehört zu diesen reaktiven Sauerstoffspezies. Es spielt eine zentrale Rolle im Sauerstoffmetabolismus, da es mit einer Vielzahl von organischen und anorganischen Stoffen in Gegenwart von Enzymen, metallhaltigen Porphyrinen, Semichinonen oder Metallionen weiterreagieren kann. Freie Sauerstoffradikale können über unspezifische Oxidationsvorgänge zu DNA-, Protein- und Membranschäden führen und sind somit bedeutsam für die Entstehung eines post-ischämischen Reperfusionsschadens.

Wir untersuchten den Einfluß der Hypothermie und Wiedererwärmung auf die Ausbildung des Reperfusionsschadens und die zugrunde liegenden Mechanismen.

Während des H₂O₂-induzierten oxidativen Stresses wurden die Kardiomyozyten gekühlt auf 20°C und wiedererwärmt. Im Anschluss wurden die Zellvitalität, die Ausschüttung der Laktatdehydrogenase (LDH) und als Zeichen der Apoptose die Spaltung der Caspasen 3 und 9, die Bax-Bcl2 Ratio und die M30 CytoDEATH Expression analysiert sowie die Konzentration intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und Veränderungen der

mitochondrialen Aktivität und der intrazellulären ATP-Produktion untersucht. Mögliche DNA-Schädigungen wurden anhand der Phosphorylierung von p53 und dem nukleären Enzym PARP, welches für Reparaturprozesse nach einer DNA-Schädigung aktiviert wird, analysiert. Zusätzlich wurde der Schädigungsgrad der DNA nach Hypothermie und H₂O₂-Inkubation im Vergleich zu normothermen Kontrollzellen ermittelt. Hierfür verwendeten wir einen Antikörper gegen das phosphorylierte Histon H2AX, welches bei einem Schaden der DNA im Kern hochreguliert wird.

Hypothermie verminderte den durch H₂O₂ ausgelösten Schaden in Kardiomyozyten (siehe Abb.11). Nach zusätzlicher Behandlung der mit H₂O₂ geschädigten Kardiomyozyten mit Kardioplegielösung kam es zu einem weiteren Zelluntergang. Dieser war signifikant verstärkt unter Normothermie (37°C) im Vergleich zu geschädigten Kardiomyozyten, die gekühlt wurden (siehe Abb.11).

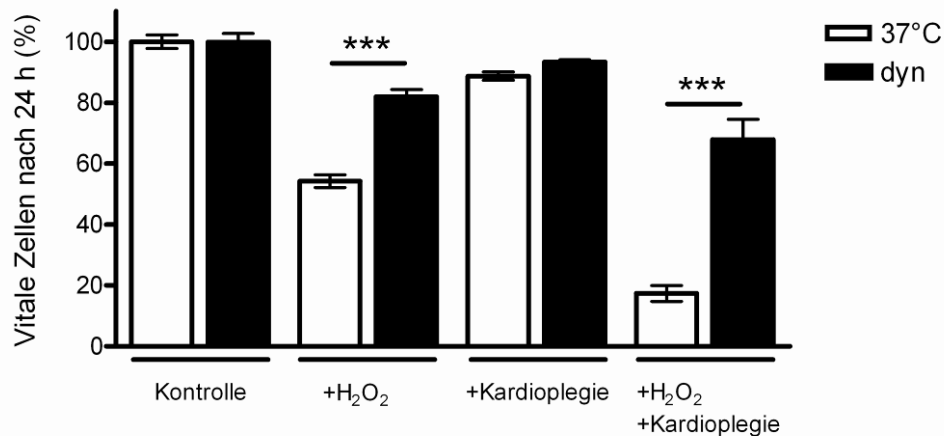


Abbildung 11: Einfluss der Hypothermie auf die Zellvitalität 24 h nach Kühlung und Stimulation. dyn = gekühlte und wiedererwärmte Zellen.

Die Endstrecke der Apoptose-Signalkaskade und der Einfluss der Caspase 3 wurden untersucht, in dem die H9c2-Zellen direkt (nach 20 min H₂O₂-Schädigung) und sechs Stunden nach H₂O₂-Schädigung mit dem M30 CytoDEATH-Kit angefärbt wurden (siehe Abb. 12). Der Antikörper weist Neoepitope des Cytokeratins 18 nach Spaltung durch Caspase 3 nach. Zur Darstellung des Zytoskeletts wurden die Zellen mit F-Actin gefärbt, die Kerne wurden mit DAPI sichtbar gemacht.

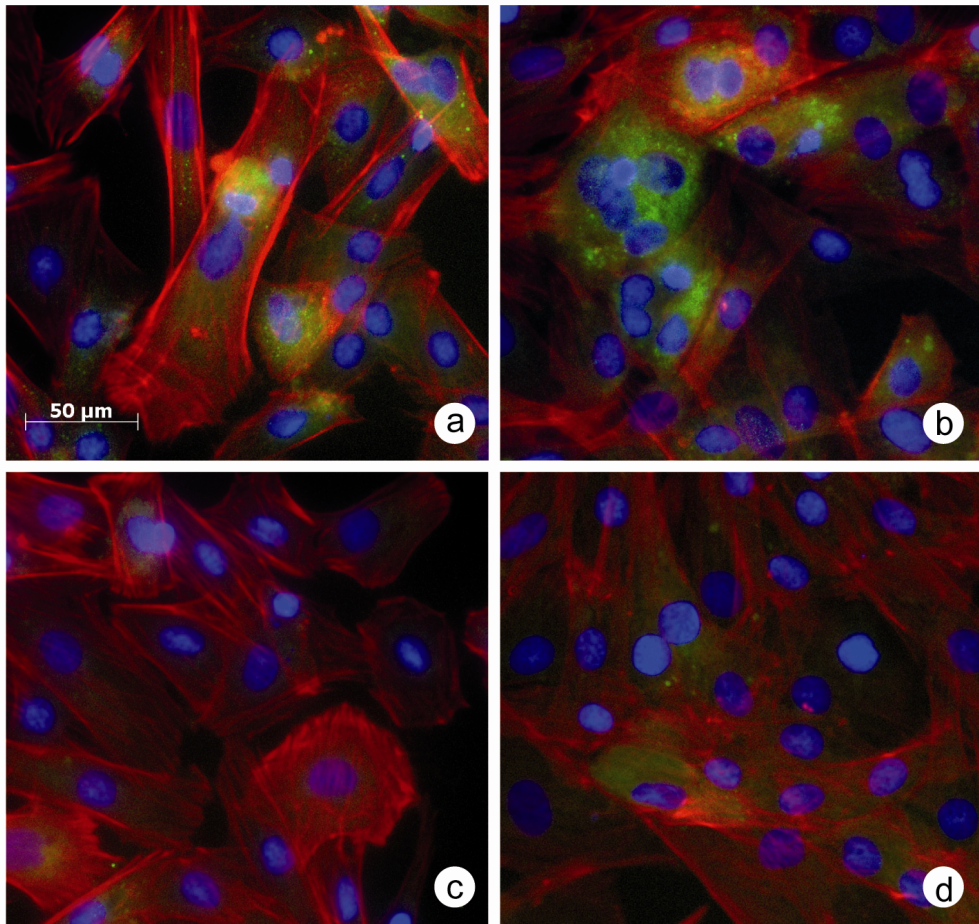


Abbildung 12: M30 CytoDEATH-Färbung von H9c2-Zellen 20 min (a, c) und 6 h (b, d) nach 2 mM H₂O₂-Schädigung. a) Zellen, die bei 37°C belassen wurden, direkt nach Schädigung, b) Zellen, die bei 37°C belassen wurden, 6 h nach Schädigung mit H₂O₂, c) gekühlte Zellen direkt nach Schädigung, d) gekühlte Zellen 6 h nach Schädigung. Grün = M30 CytoDEATH, Cytokeratin 18; rot = F-Actin, Zytoskelett; blau = DAPI, Zellkerne.

Direkt nach der Schädigung waren bei den gekühlten Zellen wesentlich weniger M30-positive Zellen nachzuweisen als in der normothermen geschädigten Gruppe. Nach sechs Stunden waren in beiden Gruppen M30-positive Zellen zu finden, nach Hypothermie konnten jedoch signifikant weniger angefärbte Zellen gesehen werden (siehe Abb.12).

Zur Quantifizierung der Aktivierung der Caspase 3 wurde die Western Blot Technik verwendet. Die H9c2-Zellen, die während der Stimulation mit 2 mM H₂O₂ gekühlt wurden, zeigten nach acht und 24 Stunden signifikant weniger Spaltprodukte als die Zellen der normothermen Gruppe, wobei die Werte der hypothermen Zellen über den gesamten Beobachtungszeitraum niedriger waren als die der bei 37°C belassenen Zellen (siehe Abb.13).

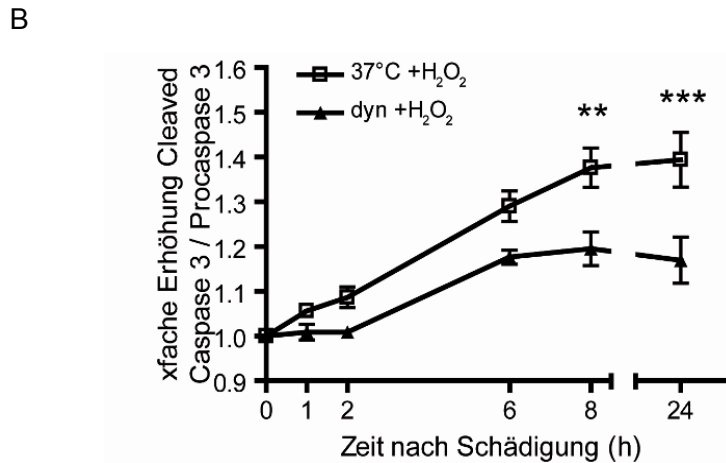
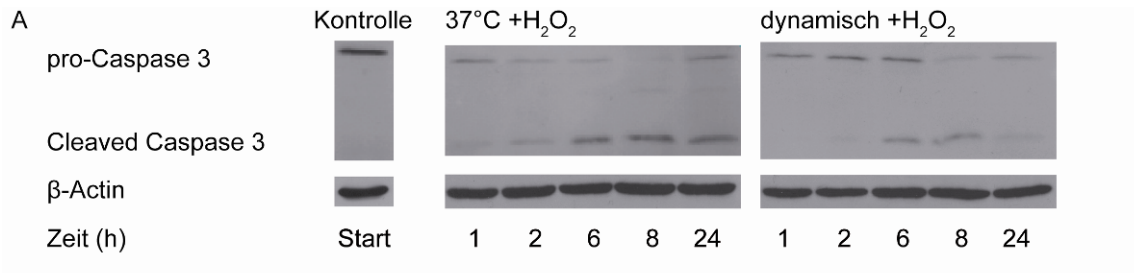
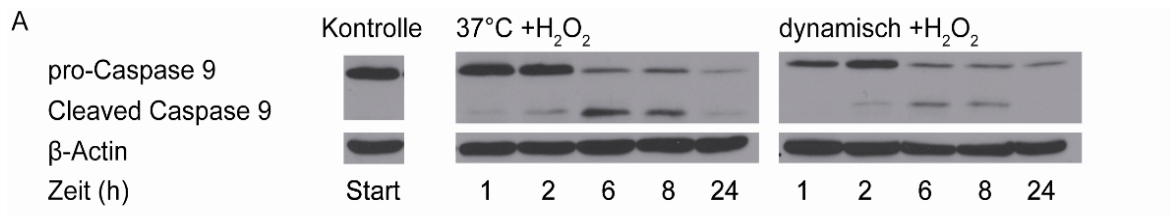


Abbildung 13: Western Blot (A) und densitometrische Analysen (B) der Caspase 3 nach H₂O₂-Schädigung, dyn = gekühlte und wiedererwärmte Zellen, 37°C = normotherme Zellgruppe, ** p<0,01, * p<0,001.**

Um den weiteren intrazellulären Signalweg der Apoptose zu verfolgen, wurde die Aktivität der Caspase 9 untersucht (siehe Abb.14). Pro-apoptotische Proteine wie Bax und Bad führen zur Freisetzung von Cytochrom C aus dem Intermembranraum des Mitochondriums. Durch die Bindung von Cytochrom C und dATP an Apaf-1 wird eine Konformationsänderung des Proteins initiiert, wodurch Procaspase 9 an den Komplex binden und autolytisch aktiviert werden kann. Der gesamte Komplex wird Apoptosom genannt und stellt die aktive Form der Caspase 9 dar.



B

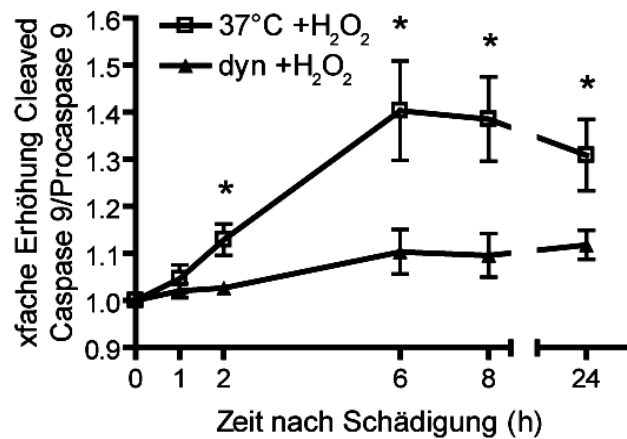


Abbildung 14: Western Blot (A) und densitometrische Analysen (B) der Caspase 9 nach H₂O₂-Schädigung. dyn = gekühlte und wiedererwärmte Zellen, 37°C = normotherme Zellgruppe, * p<0,05.

Normothermie mit H₂O₂-geschädigte Zellen zeigten nach zwei Stunden eine signifikant stärkere Spaltung der Caspase 9 im Vergleich zur Hypothermiegruppe (siehe Abb.15). Die aktive Caspase 9 ist in der Lage, Procaspase 3, eine der sogenannten Effektorcaspasen, zu aktivieren. Caspase 3 spaltet viele Schlüsselenzyme, z.B. PARP, und Zytoskelettbestandteile, z.B. Lamin und Actin, was letztendlich zur Apoptose der Zelle führt.

Ein weiterer Mechanismus, der zu einer erhöhten Überlebensrate der hypothermen Kardiomyozyten führte, war die Hochregulation des anti-apoptischen Proteins Bcl-2 (siehe Abb.15).

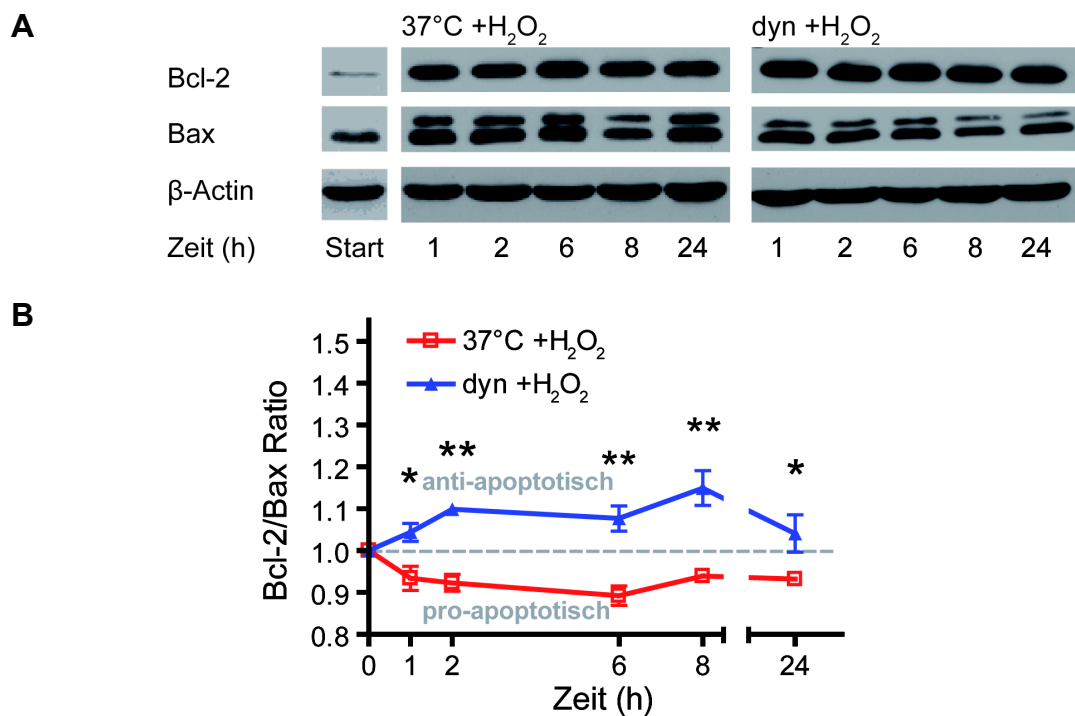


Abbildung 15: Western Blot und densitometrische Analyse der Bcl-2 / Bax Expression (A, B). Die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 war nach Hypothermie signifikant erhöht, wobei die Expression des pro-apoptotischen Proteins Bax erniedrigt war. Somit war die Bcl-2 / Bax Ratio in den gekühlten und wiedererwärmten Zellen (dyn +H₂O₂) signifikant erhöht im Vergleich zur normothermen Gruppe (37°C +H₂O₂). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert ± SEM, n = 3; *** p<0.001 vs. Zellen bei unterschiedlichen Temperaturen. dyn = gekühlte und wiedererwärmte Kardiomyozyten

Ein möglicher DNA-Schaden, der durch die PARP-1 Spaltung und die H2AX Phosphorylation nachgewiesen werden kann, wurde durch die Hypothermie deutlich reduziert.

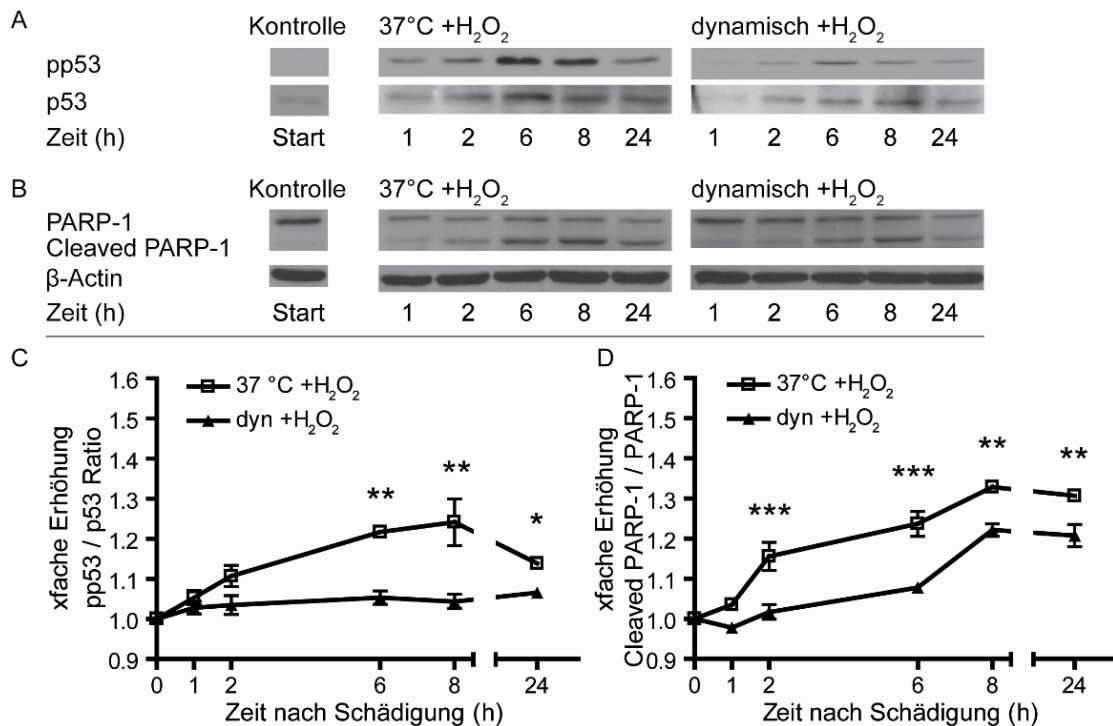


Abbildung 16: Western Blot (A, B) und densitometrische Analysen (C, D) der Phosphorylierung von p53 (A, C) und der Spaltung von PARP-1 (B, D) nach H₂O₂-Schädigung. dyn = gekühlte und wiedererwärmte Zellen, 37°C = normotherme Zellgruppe. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

Nach dem Wiedererwärmen der H₂O₂ geschädigten Kardiomyozyten kam es zu signifikant niedrigeren intrazellulären ROS-Konzentrationen im Vergleich zur normothermen, geschädigten Gruppe. Dies ist übereinstimmend mit einer bedeutsam größeren mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität und einem signifikant höheren intrazellulären ATP-Gehalt in gekühlten und wiedererwärmten Zellen (siehe Abb.16).

2.4.2 Kardioprotektion durch kalte Kardioplegielösung während oxidativem Stress

C. Drescher, A. Diestel, F. Berger, K.R.L. Schmitt: *How does hypothermia protect cardiomyocytes during cardioplegic ischemia?* *European Journal of Cardiothoracic Surgery*. 2011 Januar 15. Epub ahead of print.

Unzureichende Kardioprotektion während herzchirurgischer Eingriffe führt zu erhöhter Krankenhausmortalität bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern. Die beiden wichtigsten Methoden zur Kardioprotektion während der Operation sind Hypothermie und die Administration von Kardioplegielösung⁶⁶. Die Zusammensetzung, Menge und Temperatur der Kardioplegielösung richtet sich nach den Erfahrungen des Operateurs und der Komplexität des zu operierenden Herzfehlers.

Wir untersuchten in dem Zellkulturmodell durch Hypothermie und Kardioplegie induzierte Schutzmechanismen der Kardiomyozyten.

Ein möglicher zugrunde liegender protektiver zellulärer Mechanismus war die Hochregulation des Transkriptionsfaktors AKT unter hypothermer Kardioplegieadministration (siehe Abb.17).

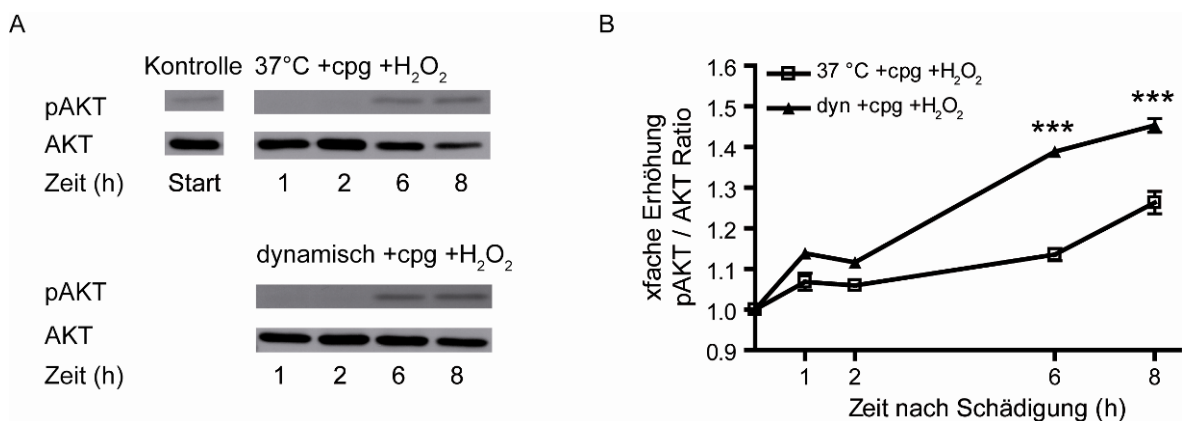
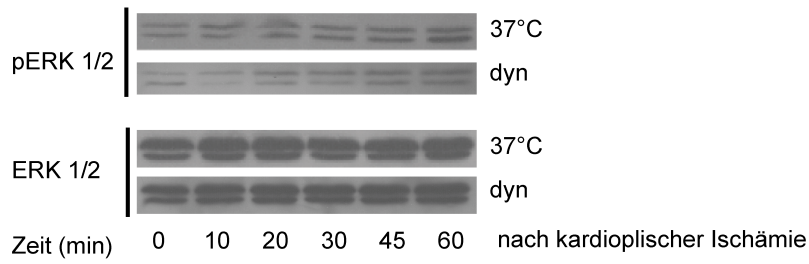


Abbildung 17: Western Blot (A) und densitometrische Analysen (B) der Phosphorylierung von AKT nach H₂O₂-Schädigung. dyn = gekühlte und wiedererwärmte Zellen, 37°C = normotherme Zellgruppe, cpg = Kardioplegielösung. *** p<0,001.

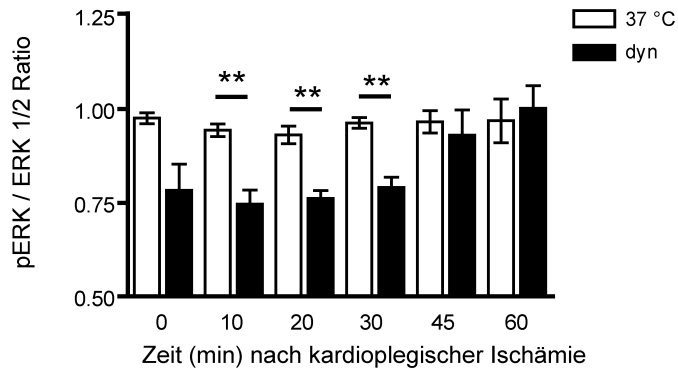
Darüber hinaus konnten wir eine signifikante Reduktion der MAP-Kinase ERK 1/2 sowie des pro-inflammatorischen Proteins Cox-2 nach hypothermer Kardioplegielösung im Vergleich zu normothermer Kardioplegieadministration sehen. Durch komplette Inhibition von ERK 1/2 oder Cox-2 kam es zu einer signifikanten Abnahme lebender Zellen in der gekühlten und wiedererwärmten Gruppe (siehe Abb.18).

Hypothermie schützt Kardiomyozyten während oxidativem Stress sowie während kardioplegischer Ischämie durch reduzierte Apoptose sowie reduzierte Cox-2 Expression.

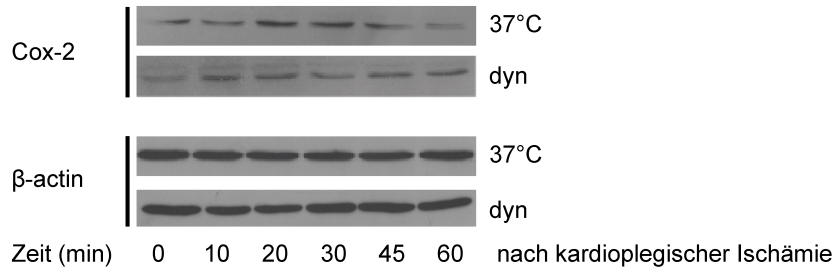
A



B



C



D

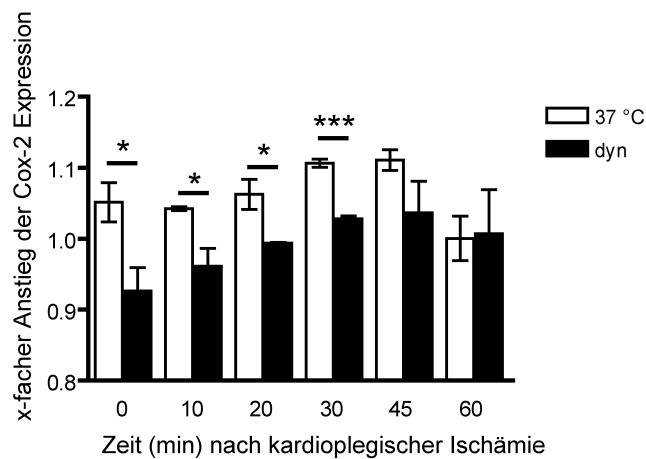


Abbildung 18: Western Blot (A) und densitometrische Analysen (B) der Phosphorylierung von ERK 1/2 und Expression von Cox-2 nach kardioplegischer Ischämie. dyn = gekühlte und wiedererwärmte Zellen, 37°C = normotherme Zellgruppe. * p<0,05, **p<0,01, *** p<0,001.

III Diskussion und Ausblick

Durch verbesserte Frühdiagnostik und Fortschritte in der kongenitalen Herzchirurgie ist die Mortalität bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern drastisch gesunken⁶⁷. Die damit verbundene erhöhte Überlebensrate lenkt das Interesse auf die Lebensqualität sowie Morbidität dieser Kinder^{68, 69}. Tiefe Hypothermie ist hierbei die wichtigste und älteste Methode der Organprotektion bei Korrekturoperationen von angeborenen Herzfehlern im Neugeborenen- und Säuglingsalter, insbesondere wenn intraoperativer Herz-Kreislaufstillstand notwendig ist².

Trotz des großen Interesses an der klinischen Anwendung von Hypothermie sind die zellulären und molekularen Wirkmechanismen der Hypothermie und Wiedererwärmung weitestgehend ungeklärt. Unerwünschte Nebenwirkungen wie z. B. perioperative Krampfanfälle und psychomotorischen Entwicklungsstörungen, die nach Korrekturoperationen unter Einsatz der Herz-Lungenmaschine im Neonatalen und Säuglingsalter gehäuft auftreten sind bisher unverstanden. Die Pathophysiologie dieser neurologischen Veränderungen und nachfolgende Beeinträchtigung der psychomotorischen Entwicklung bei Kindern nach herzchirurgischen Eingriffen scheint multifaktoriell zu sein. Globale oder fokal lokalisierte hypoxisch-ischämische Ereignissen während und nach der extrakorporalen Zirkulation werden als Ursachen diskutiert². Die Schwankungen in den unterschiedlichen physiologischen Parametern während der extrakorporalen Zirkulation können mehrere inflammatorische Kaskaden aktivieren sowie die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen auf den Leukozyten und Endothelzellen begünstigen².

Um hierbei den alleinigen und exklusiven Einfluss der therapeutischen Hypothermie zu untersuchen, entwickelten wir ein Zellkulturmodell. Durch die Analyse der Auswirkungen von Hypothermie und Wiedererwärmung auf zellulärer Ebene können Mechanismen untersucht und aufgedeckt werden, die zum Verständnis der Wirkungsweise der Hypothermie beitragen. Die Ergebnisse könnten wiederum Grundlagen für mögliche Interventionsmöglichkeiten (pharmakologisch oder temperaturbedingt) bilden und zu einer Verbesserung der Zellprotektion führen.

Es war das Gesamtziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluss der therapeutischen Hypothermie auf morphologische, funktionelle und immunhistochemische Charakteristika verschiedener Zellen zu untersuchen. Hierbei wurde der Einfluss der Hypothermie auf neonatale Gehirnzellen und Gehirngewebe, Kardiomyozyten und Endothelzellen in Zellkulturmodellen untersucht. Die Auswirkungen der Hypothermie auf die verschiedenen Zellarten waren sehr divergent. Die Kühlung förderte das Überleben der Gehirnzellen in der Einzelzellsuspension und in organotypischen Hirnschnitten. Darüber hinaus führte die

Hypothermie zu einer verminderten Neuroinflammation nach LPS Stimulation. Überraschenderweise zeigte sich auch, dass tiefe Hypothermie nicht nur das Zellüberleben sondern auch die axonale Reorganisation und Regeneration unterstützt, die entscheidend für Erhalt und Wiederherstellung der Hirnfunktion sind. Auf der Basis unserer bisherigen Ergebnisse werden momentan die Auswirkungen von Hypothermie und Wiedererwärmung auf die direkte Interaktion der Mikrogliazellen mit Neuronen untersucht. Durch direkte und indirekte Kokultivierung von aktivierten und nicht aktivierten Mikrogliazellen mit primären Neuronen soll aufgeklärt werden, ob Hypothermie und Wiedererwärmung zur Neuroprotektion oder Neurotoxizität in der Kokultur führen. Durch pharmakologische Intervention werden identifizierte Signalmoleküle und Signalwege blockiert und hinsichtlich ihrer Neuroprotektion evaluiert. Langfristiger Ausblick wäre hierbei, frühzeitig postoperative neurologische Komplikationen nach tief hypothermen kardiopulmonalem Bypass über die Schaltstelle Mikroglia-Neuron zu behandeln oder gegebenenfalls verhindern zu können.

Untersuchungen an humanen Endothelzellen belegten, dass Hypothermie auch zu unerwünschten Effekten wie beispielsweise einer endothelialen Dysfunktion und prolongierten Inflammation führen kann. Auf der Basis der Ergebnisse aus der Einzelzellkultur werden momentan die Auswirkungen von tiefer Hypothermie und Wiedererwärmung auf Endothelzellen und Makrophagen untersucht. Durch Kokultivierung von Endothelzellen mit aktivierten Makrophagen soll aufgeklärt werden, inwieweit Hypothermie die Interaktion und das Zusammenspiel der Endothelzellen mit Leukozyten beeinflusst.

Auf oxidativ geschädigte Kardiomyozyten hatten die systemische Hypothermie und Wiedererwärmung hingegen eine protektive Wirkung. Die therapeutische Hypothermie während oxidativem Stress reduzierte die Apoptose und ein DNA Schaden konnte durch die Kühlung signifikant vermindert werden.

Einige wichtige Limitationen der Übertragbarkeit der *in vitro* Ergebnisse auf die Situation *in vivo* sind zu diskutieren. In der vorliegenden Arbeit wurden Kühlungsexperimente an Gehirnzellen, Endothelzellen und Kardiomyozyten in einem Zellkulturmodell in Analogie zu klinischen Kühlungs- und Wiedererwärmungsbedingungen während kardiochirurgischer Interventionen durchgeführt. Die Inflammationsreaktion nach Herzoperationen unter Einsatz der Herz-Lungenmaschine ist deutlich komplexer. In der Zellkultur wurden die komplexen Zellinteraktionen pharmakologisch durch eine Behandlung der einzelnen Zellen mit TNF- α oder LPS simuliert. Wir konnten nachweisen, dass Hypothermie und Wiedererwärmung alleine bereits zu endothelialer Dysfunktion und einem Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen führen kann. Das Zellkulturmodell ist wertvoll, um die alleinigen Effekte der Hypothermie und Wiedererwärmung auf die inflammatorische Antwort

und intrazelluläre Signalwege zu analysieren, auch wenn Rückschlüsse auf die klinische Anwendung mit Vorsicht erfolgen sollten.

Somit sind die Ergebnisse aus Zellkulturstudien von großer Bedeutung, da durch das Verständnis der Wirkungsweise der Hypothermie auf zelluläre Mechanismen eine Basis für weitere therapeutische Interventionsmöglichkeiten gegeben ist. Dies ist von großem klinischem Interesse, da neuronale und kardiale Schäden im Neonatalen- und Kleinkindalter weit reichende Folgen für das spätere Leben der Patienten mit einem angeborenen Herzfehler haben.

IV Zusammenfassung

Zur Protektion unreifer Organsysteme während herzchirurgischer Eingriffe unter Herzkreislaufstillstand wird die Körpertemperatur der Patienten durch systemische Kühlung auf minimal 16°C reduziert. Hypothermie reduziert den Gewebestoffwechsel und erhöht dadurch möglicherweise den Zellschutz während Phasen der Minderperfusion der Gewebe. Trotzdem wird vermutet, dass neurologische Komplikationen und psychomotorische Entwicklungsstörungen, Kapillarleck-Syndrom und prolongierte Inflammation gehäuft nach tief hypothermem Herzkreislaufstillstand auftreten^{70, 71}. Die Pathophysiologie dieser Komplikationen sowie der molekularbiologische Mechanismus der tiefen Hypothermie in diesem klinischen Kontext sind bisher nahezu ungeklärt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeiten wurden deshalb folgende Aspekte der therapeutischen Hypothermiebehandlung in Zellkulturmodellen adressiert:

1. Neuroprotektion – Neuroregeneration durch Hypothermie und Analyse der Hypothermie-induzierten morphologischen, funktionellen und immunhistochemischen Veränderungen auf Neurone, Mikrogliazellen, Astrozyten sowie axonales Auswachsen in Hirnschnittkulturen.
2. Untersuchungen zu den Auswirkungen der Hypothermie auf die Funktionalität und die Morphologie der Endothelzellbarriere, auf das Inflamationsverhalten von Endothelzellen sowie Interventionsmöglichkeiten mit Methylprednisolon und Tacrolimus.
3. Analyse des Einflusses der Hypothermie und Applikation von Kardioplegielösung auf Kardiomyozyten während oxidativem Stress.

Hypothermie hat auf neuronale Zellen und die umgebenden immunmodulatorischen Gliazellen eine protektive Wirkung. Dies konnte in der Einzelzellkultur primärer Neurone, Mikrogliazellen und Astrozyten gezeigt werden. Darüber hinaus führte die Hypothermie in aktivierten Mikrogliazellen zu einer Verschiebung des Zytokingleichgewichtes in Richtung anti-inflammatorische Zytokine bei reduzierter Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und gesteigerter Expression anti-inflammatorischer Proteine. Weiterhin kam es 72h nach der Wiedererwärmung zu einer verminderten Zellproliferation. Unstimulierte Mikrogliazellen zeigten direkt nach der Wiedererwärmung eine gesteigerte Aktivität und Phagozytose. In organotypischen Hirnschnittkulturen induzierte eine zweistündige Kühlung bei 17°C ein signifikant verstärktes axonales Auswachsen. Diese Ergebnisse belegen, dass Hypothermie nicht nur Schutzeffekte im Zentralen Nervensystem ausübt, sondern zusätzlich das axonale Auswachsen über die TNF- α -Regulierung als einen möglichen Mechanismus der

Regeneration unterstützt.

In Untersuchungen an humanen Endothelzellen konnten wir feststellen, dass als Zellprotektionsmechanismus unter Dauerkühlung das antiapoptotische Protein Bcl-2 verstärkt gebildet wird. Gekühlte Endothelzellen sind nicht in der Lage, ihre grundlegenden Funktionen wie Proliferation und Zellaktivierung aufrechtzuerhalten. Andererseits sahen wir als positiven Effekt unter Dauerkühlung eine generalisiert verminderte Inflammation. Des Weiteren zeigten auch unstimulierte Endothelzellen nach Kühlung und Wiedererwärmung starke Veränderungen in der Zellmorphologie unter Kühlungsbedingungen. Hypothermie induziert eine endotheliale Dysfunktion bestehend aus gesteigerter Permeabilität und verminderter Adhäsion der Zellen. Intrazellulär wurden die morphologischen Veränderungen während Hypothermie und Wiedererwärmung über eine ERK 1/2-Aktivierung und über Connexin 43-Degradation in der Kühlungsphase gesteuert. Die morphologischen Veränderungen während der Kühlungsphase korrelieren mit dem klinischen Bild des Kapillarleck-Syndroms, welches vor allem nach langen Operationszeiten unter tiefen Kühlungsbedingungen gesehen wird. Interessanterweise führte die Wiedererwärmung der Endothelzellen zu einem Verschluss der Lücken. Beim Erreichen von 37°C bestand erneut eine geschlossene Endothelzellbarriere. Darüber hinaus kam es nach der Wiedererwärmung der Endothelzellen zu gesteigerter IL-6-Sekretion.

Als klinisch relevante Ergebnisse dieser Studie konnten wir zeigen, dass nur die kombinierte Therapie aus Methylprednisolon und Tacrolimus die Hypothermie-induzierte endotheliale Dysfunktion und IL-6-Ausschüttung reduzierte. Dies könnte ein sehr interessanter neuer Therapieansatz zur Verhinderung des postoperativen Kapillarleck-Syndroms und der prolongierten Inflammation nach Hypothermie sein.

In den Arbeiten an Kardiomyozyten konnten wir belegen, dass Hypothermie Kardiomyozyten während oxidativen Stresses vor Apoptose, DNA - Schaden und mitochondrialer Dysfunktion schützt. Hypothermie reduzierte signifikant die Ausschüttung der Laktatdehydrogenase, die Spaltung von Caspase 3 und 9. Ferner konnten weniger M30-CytoDEATH-positive Zellen nach Hypothermie und Wiedererwärmung in den geschädigten Kardiomyozyten gesehen werden. Nach dem Wiedererwärmen der H₂O₂ geschädigten Kardiomyozyten kam es zu signifikant niedrigeren intrazellulären ROS Konzentrationen bei gesteigerter mitochondrialer Dehydrogenaseaktivität und höherem intrazellulären ATP-Gehalt. Weitere Mechanismen, die zu einer erhöhten Überlebensrate der hypothermen Kardiomyozyten führte, war die Hochregulation des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 und die Verminderung der Phosphorylierung von p53. DNA-Schaden, der durch die PARP-1-Spaltung und die H2AX-Phosphorylation nachgewiesen werden kann, wurde durch die Hypothermie deutlich reduziert.

V Literaturverzeichnis

1. Polderman KH. Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Critical care medicine*. 2009 Jul;37(7 Suppl):S186-202.
2. Su XW, Undar A. Brain protection during pediatric cardiopulmonary bypass. *Artificial organs*. 2010 Apr;34(4):E91-102.
3. Zanelli S, Buck M, Fairchild K. Physiologic and pharmacologic considerations for hypothermia therapy in neonates. *J Perinatol*. 2010 Dec 23.
4. Yenari MA, Hemmen TM. Therapeutic hypothermia for brain ischemia: where have we come and where do we go? *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2010 Oct;41(10 Suppl):S72-4.
5. HACA. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *The New England journal of medicine*. 2002 Feb 21;346(8):549-56.
6. Finkelstein RA, Alam HB. Induced hypothermia for trauma: current research and practice. *J Intensive Care Med*. 2010 Jul;25(4):205-26.
7. Andrews PJ, Sinclair HL, Battison CG, Polderman KH, Citerio G, Mascia L, et al. European society of intensive care medicine study of therapeutic hypothermia (32-35 degrees C) for intracranial pressure reduction after traumatic brain injury (the Eurotherm3235Trial). *Trials*. 2011;12:8.
8. Polderman KH. Induced hypothermia and fever control for prevention and treatment of neurological injuries. *Lancet*. 2008 Jun 7;371(9628):1955-69.
9. Laborit H. [Therapeutic generalized hypothermia]. *Presse Med*. 1951 May 5;59(30):606-8.
10. Small DL, Morley P, Buchan AM. Biology of ischemic cerebral cell death. *Progress in cardiovascular diseases*. 1999 Nov-Dec;42(3):185-207.
11. Schmidt OI, Heyde CE, Ertel W, Stahel PF. Closed head injury--an inflammatory disease? *Brain research*. 2005 Apr;48(2):388-99.
12. Asensio VC, Campbell IL. Chemokines in the CNS: plurifunctional mediators in diverse states. *Trends in neurosciences*. 1999 Nov;22(11):504-12.
13. Merrill JE, Benveniste EN. Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends in neurosciences*. 1996 Aug;19(8):331-8.
14. Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Stahel PF, Kossmann T. Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Current opinion in critical care*. 2002 Apr;8(2):101-5.
15. Schoettle RJ, Kochanek PM, Magargee MJ, Uhl MW, Nemoto EM. Early polymorphonuclear leukocyte accumulation correlates with the development of posttraumatic cerebral edema in rats. *Journal of neurotrauma*. 1990 Winter;7(4):207-17.
16. Patel HC, Boutin H, Allan SM. Interleukin-1 in the brain: mechanisms of action in acute neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 May;992:39-47.
17. Dietrich WD, Busto R, Globus MY, Ginsberg MD. Brain damage and temperature: cellular and molecular mechanisms. *Advances in neurology*. 1996;71:177-94; discussion 94-7.

18. Aibiki M, Maekawa S, Ogura S, Kinoshita Y, Kawai N, Yokono S. Effect of moderate hypothermia on systemic and internal jugular plasma IL-6 levels after traumatic brain injury in humans. *Journal of neurotrauma*. 1999 Mar;16(3):225-32.
19. Kimura A, Sakurada S, Ohkuni H, Todome Y, Kurata K. Moderate hypothermia delays proinflammatory cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. *Critical care medicine*. 2002 Jul;30(7):1499-502.
20. Suehiro E, Fujisawa H, Akimura T, Ishihara H, Kajiwara K, Kato S, et al. Increased matrix metalloproteinase-9 in blood in association with activation of interleukin-6 after traumatic brain injury: influence of hypothermic therapy. *Journal of neurotrauma*. 2004 Dec;21(12):1706-11.
21. Globus MY, Busto R, Lin B, Schnippering H, Ginsberg MD. Detection of free radical activity during transient global ischemia and recirculation: effects of intras ischemic brain temperature modulation. *Journal of neurochemistry*. 1995 Sep;65(3):1250-6.
22. Dempsey RJ, Combs DJ, Maley ME, Cowen DE, Roy MW, Donaldson DL. Moderate hypothermia reduces postischemic edema development and leukotriene production. *Neurosurgery*. 1987 Aug;21(2):177-81.
23. Busto R, Dietrich WD, Globus MY, Valdes I, Scheinberg P, Ginsberg MD. Small differences in intras ischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1987 Dec;7(6):729-38.
24. Siesjo BK, Bengtsson F, Grampp W, Theander S. Calcium, excitotoxins, and neuronal death in the brain. *Ann N Y Acad Sci*. 1989;568:234-51.
25. Raghupathi R, McIntosh TK. Pharmacotherapy for traumatic brain injury: a review. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*. 1998;41:241-6.
26. Novack TA, Dillon MC, Jackson WT. Neurochemical mechanisms in brain injury and treatment: a review. *Journal of clinical and experimental neuropsychology*. 1996 Oct;18(5):685-706.
27. Ohmura A, Nakajima W, Ishida A, Yasuoka N, Kawamura M, Miura S, et al. Prolonged hypothermia protects neonatal rat brain against hypoxic-ischemia by reducing both apoptosis and necrosis. *Brain & development*. 2005 Oct;27(7):517-26.
28. Diestel A, Drescher C, Miera O, Berger F, Schmitt KR. Hypothermia protects H9c2 cardiomyocytes from H₂O₂ induced apoptosis. *Cryobiology*. 2010 Dec 17.
29. Liu RG, Wang WJ, Song N, Chen YQ, Li LH. Diazoxide preconditioning plus subsequent hypothermia increased resistance of rat cultured hippocampal neurons against hypoxia-reoxygenation injury. *Chinese medical journal*. 2006 Jun 5;119(11):887-93.
30. Fujisawa H, Koizumi H, Ito H, Yamashita K, Maekawa T. Effects of mild hypothermia on the cortical release of excitatory amino acids and nitric oxide synthesis following hypoxia. *Journal of neurotrauma*. 1999 Nov;16(11):1083-93.
31. Hashimoto T, Yonetani M, Nakamura H. Selective brain hypothermia protects against hypoxic-ischemic injury in newborn rats by reducing hydroxyl radical production. *The Kobe journal of medical sciences*. 2003;49(3-4):83-91.
32. Shuja F, Tabbara M, Li Y, Liu B, Butt MU, Velmahos GC, et al. Profound hypothermia decreases cardiac apoptosis through Akt survival pathway. *J Am Coll Surg*. 2009 Jul;209(1):89-99.
33. Shao ZH, Sharp WW, Wojcik KR, Li CQ, Han M, Chang WT, et al. Therapeutic hypothermia cardioprotection via Akt- and nitric oxide-mediated attenuation of mitochondrial oxidants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 Jun;298(6):H2164-73.

34. Beiser DG, Wojcik KR, Zhao D, Orbelyan GA, Hamann KJ, Vanden Hoek TL. Akt1 genetic deficiency limits hypothermia cardioprotection following murine cardiac arrest. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 Jun;298(6):H1761-8.
35. Frank SM, Fleisher LA, Breslow MJ, Higgins MS, Olson KF, Kelly S, et al. Perioperative maintenance of normothermia reduces the incidence of morbid cardiac events. A randomized clinical trial. *Jama*. 1997 Apr 9;277(14):1127-34.
36. Frank SM, Beattie C, Christopherson R, Norris EJ, Perler BA, Williams GM, et al. Unintentional hypothermia is associated with postoperative myocardial ischemia. The Perioperative Ischemia Randomized Anesthesia Trial Study Group. *Anesthesiology*. 1993 Mar;78(3):468-76.
37. De Witte J, Sessler DI. Perioperative shivering: physiology and pharmacology. *Anesthesiology*. 2002 Feb;96(2):467-84.
38. Povlishock JT. Traumatically induced axonal damage without concomitant change in focally related neuronal somata and dendrites. *Acta neuropathologica*. 1986;70(1):53-9.
39. Hasegawa M, Ogihara T, Tamai H, Hiroi M. Hypothermic inhibition of apoptotic pathways for combined neurotoxicity of iron and ascorbic acid in differentiated PC12 cells: reduction of oxidative stress and maintenance of the glutathione redox state. *Brain Res*. 2009 Aug 4;1283:1-13.
40. Polderman KH, Peerdeman SM, Girbes AR. Hypophosphatemia and hypomagnesemia induced by cooling in patients with severe head injury. *Journal of neurosurgery*. 2001 May;94(5):697-705.
41. Polderman KH, van Zanten AR, Girbes AR. The importance of magnesium in critically ill patients: a role in mitigating neurological injury and in the prevention of vasospasms. *Intensive care medicine*. 2003 Jul;29(7):1202-3.
42. Tripathi M, Singh PK, Kumar N, Pant KC. Induced mild hypothermia in post-cardiopulmonary bypass vasoplegia syndrome. *Annals of cardiac anaesthesia*. 2009 Jan-Jun;12(1):49-52.
43. Lewis ME, Al-Khalidi AH, Townend JN, Coote J, Bonser RS. The effects of hypothermia on human left ventricular contractile function during cardiac surgery. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002 Jan 2;39(1):102-8.
44. Rizzotti A, Bas J, Cuestas E. [Efficacy and security of therapeutic hypothermia for hypoxic ischemic encephalopathy: a meta-analysis.]. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba*. 2010 Mar;67(1):15-23.
45. Polderman KH, Herold I. Therapeutic hypothermia and controlled normothermia in the intensive care unit: practical considerations, side effects, and cooling methods. *Critical care medicine*. 2009 Mar;37(3):1101-20.
46. Diestel A, Aktas O, Hackel D, Hake I, Meier S, Raine CS, et al. Activation of microglial poly(ADP-ribose)-polymerase-1 by cholesterol breakdown products during neuroinflammation: a link between demyelination and neuronal damage. *The Journal of experimental medicine*. 2003 Dec 1;198(11):1729-40.
47. Aloisi F. Immune function of microglia. *Glia*. 2001 Nov;36(2):165-79.
48. Koutsilieri E, Scheller C, Tribl F, Riederer P. Degeneration of neuronal cells due to oxidative stress--microglial contribution. *Parkinsonism & related disorders*. 2002 Sep;8(6):401-6.
49. Calabrese V, Copani A, Testa D, Ravagna A, Spadaro F, Tendi E, et al. Nitric oxide synthase induction in astroglial cell cultures: effect on heat shock protein 70 synthesis and oxidant/antioxidant balance. *Journal of neuroscience research*. 2000 Jun 1;60(5):613-22.

50. Dawson VL, Brahmabhatt HP, Mong JA, Dawson TM. Expression of inducible nitric oxide synthase causes delayed neurotoxicity in primary mixed neuronal-glial cortical cultures. *Neuropharmacology*. 1994 Nov;33(11):1425-30.
51. Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg GW. Cytotoxicity of microglia. *Glia*. 1993 Jan;7(1):111-8.
52. Lee SJ, Benveniste EN. Adhesion molecule expression and regulation on cells of the central nervous system. *Journal of neuroimmunology*. 1999 Aug 3;98(2):77-88.
53. Aldskogius H. Microglia in neuroregeneration. *Microscopy research and technique*. 2001 Jul 1;54(1):40-6.
54. Streit WJ. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia*. 2002 Nov;40(2):133-9.
55. Heppner FL, Skutella T, Hailer NP, Haas D, Nitsch R. Activated microglial cells migrate towards sites of excitotoxic neuronal injury inside organotypic hippocampal slice cultures. *The European journal of neuroscience*. 1998 Oct;10(10):3284-90.
56. Christian E, Zada G, Sung G, Giannotta SL. A review of selective hypothermia in the management of traumatic brain injury. *Neurosurgical focus*. 2008 Oct;25(4):E9.
57. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998 May 15;91(10):3527-61.
58. Eligini S, Arenaz I, Barbieri SS, Faleri ML, Crisci M, Tremoli E, et al. Cyclooxygenase-2 mediates hydrogen peroxide-induced wound repair in human endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2009 May 15;46(10):1428-36.
59. Sauer IM, Schwartlander R, Schmid J, Efimova E, Vondran FW, Kehr D, et al. The SlideReactor--a simple hollow fiber based bioreactor suitable for light microscopy. *Artificial organs*. 2005 Mar;29(3):264-7.
60. Schwarze MM, Hawley RG. Prevention of myeloma cell apoptosis by ectopic bcl-2 expression or interleukin 6-mediated up-regulation of bcl-xL. *Cancer Res*. 1995 Jun 1;55(11):2262-5.
61. Zhu L, Yu Y, Chua BH, Ho YS, Kuo TH. Regulation of sodium-calcium exchange and mitochondrial energetics by Bcl-2 in the heart of transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2001 Dec;33(12):2135-44.
62. He Q, Montalbano J, Corcoran C, Jin W, Huang Y, Sheikh MS. Effect of Bax deficiency on death receptor 5 and mitochondrial pathways during endoplasmic reticulum calcium pool depletion-induced apoptosis. *Oncogene*. 2003 May 1;22(17):2674-9.
63. Nechushtan A, Smith CL, Lamensdorf I, Yoon SH, Youle RJ. Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol*. 2001 Jun 11;153(6):1265-76.
64. Slikker W, 3rd, Desai VG, Duhart H, Feuers R, Imam SZ. Hypothermia enhances bcl-2 expression and protects against oxidative stress-induced cell death in Chinese hamster ovary cells. *Free Radic Biol Med*. 2001 Aug 1;31(3):405-11.
65. Abrahamov D, Erez E, Tamariz M, Dagan O, Pearl E, Abrahamov Y, et al. Plasma vascular endothelial growth factor level is a predictor of the severity of postoperative capillary leak syndrome in neonates undergoing cardiopulmonary bypass. *Pediatr Surg Int*. 2002 Jan;18(1):54-9.
66. Jungwirth B, de Lange F. Animal models of cardiopulmonary bypass: development, applications, and impact. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*. 2010 Jun;14(2):136-40.

67. Lindinger A, Schwedler G, Hense HW. Prevalence of congenital heart defects in newborns in Germany: Results of the first registration year of the PAN Study (July 2006 to June 2007). *Klin Padiatr.* 2010 Sep;222(5):321-6.
68. Jacobs JP. Introduction--databases and the assessment of complications associated with the treatment of patients with congenital cardiac disease. *Cardiology in the young.* 2008 Dec;18 Suppl 2:1-37.
69. Leblanc JG. New surgery for better outcomes: shaping the field of congenital heart disease. *World J Pediatr.* 2009 Aug;5(3):165-8.
70. Eke CC, Gundry SR, Baum MF, Chinnock RE, Razzouk AJ, Bailey LL. Neurologic sequelae of deep hypothermic circulatory arrest in cardiac transplant infants. *Ann Thorac Surg.* 1996 Mar;61(3):783-8.
71. Forbess JM, Visconti KJ, Hancock-Friesen C, Howe RC, Bellinger DC, Jonas RA. Neurodevelopmental outcome after congenital heart surgery: results from an institutional registry. *Circulation.* 2002 Sep 24;106(12 Suppl 1):I95-102.

VI Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Felix Berger, Direktor der Klinik für Angeborene Herzfehler / Kinderkardiologie Deutsches Herzzentrum Berlin, für seine stets großzügige und wohlwollende Unterstützung meiner wissenschaftlichen und klinischen Tätigkeiten, für zahlreiche Anregungen sowie die Bereitstellung optimaler Arbeitsbedingungen.

Großer Dank gilt meiner langjährigen treuen Kollegin Frau Dr. rer. nat. Antje Diestel. Wesentlich zum Erfolg der Arbeitsgruppe haben die Doktoranden Herr Dr. Jörg Rössler, Frau Cornelia Drescher, Frau Sonja Wollersheim und Herr Dipl. Ing. Nils Billecke beigetragen. Für die stets optimistische Stimmung und professionelle Unterstützung im Labor möchte ich mich ganz besonders bei Frau Chantel Spencer-Hänsch und Frau Franka Brey bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Sven Hendrix möchte ich mich für die produktive und freundschaftliche Zusammenarbeit über viele Jahre hinweg bedanken. Überdies bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Oliver Ullrich für den enthusiastischen Einstieg in die Grundlagenforschung.

Herrn Prof. Dr. med. Richard Jonas und PD Dr. med. Lennart Duebener, damals Children`s Hospital Boston, bin ich für hervorragende Einführung ganz zu Beginn meiner wissenschaftlichen Tätigkeiten zu Dank verpflichtet.

Besonderer Dank für die uneingeschränkte hervorragende Förderung zu Beginn meiner Forschungsarbeit und klinischen Tätigkeit gilt Herrn Prof. Dr. med. Peter Lange und Herrn Prof. Dr. med. Hashim Abdul-Khaliq. Für stets neue große Ideen und die Begeisterung an der Forschung bin ich Ihnen zu herausragendem Dank verpflichtet.

Bedanken möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung der wissenschaftlichen Untersuchungen durch die Deutsche Gesellschaft für pädiatrischen Kardiologie, die Fördergemeinschaft Kinderherzzentren e.V. Bonn, die Deutsche Stiftung für Herzforschung sowie für die Bereitstellung der Mittel des europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE) durch die Investitionsbank Berlin.

Mein abschließender Dank geht an Herrn PD Dr. Igor Maximilian Sauer.

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Datum

Unterschrift

