

Aus der Klinik für angeborene Herzfehler - Kinderkardiologie  
des Deutschen Herzzentrums Berlin

DISSERTATION

Die Induktion von Inflammation und Apoptose durch  
Wiedererwärmung und Fieber nach Hypothermie in einer  
Kardiomyozyten-Zellkultur

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nalina Nancy Anna von Garlen  
aus Pforzheim, Deutschland

Datum der Promotion: 3. Dezember 2021

## **Vorwort**

Die im Folgenden dargestellten Daten wurden zum Teil am 21. November 2019 im Journal „Mediators of Inflammation“ in der Sonderedition „Regulation of Inflammation in Myocardial Ischemia-Reperfusion“ publiziert. Dr. Giang Tong und ich, Nalina N. A. von Garlen teilen die Erstautorenschaft der Publikation mit dem Titel „Post – TTM rebound pyrexia after ischemia-reperfusion injury results in sterile inflammation and apoptosis in cardiomyocytes“. Diese beinhaltet die Daten der mRNA-Expression von iNos, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , SOCS3 und RBM3, sowie die Protein-Expression von RBM3 und aktiver Caspase 3.

# Inhaltsverzeichnis

Vorwort.....	1
1 Tabellenverzeichnis.....	6
2 Abbildungsverzeichnis.....	7
3 Abkürzungsverzeichnis.....	8
4 Abstract.....	10
4.1 Die Induktion von Inflammation und Apoptose durch Wiedererwärmung und Fieber nach Hypothermie in einer Kardiomyozyten-Zellkultur.....	10
4.2 The induction of inflammation and apoptosis by rewarming and pyrexia after therapeutic hypothermia in a cardiomyocyte cell culture model .....	12
5 Einleitung.....	14
5.1 Myokardiale Ischämie.....	14
5.1.1 Klinischer Hintergrund.....	14
5.1.2 Akuter Myokardinfarkt.....	15
5.1.3 Pathomechanismen bei Ischämie/Reperfusion-Schädigung.....	15
5.2 Therapeutische Hypothermie.....	21
5.2.1 Definition der therapeutischen Hypothermie .....	21
5.2.2 Anwendungsgebiete der TH.....	21
5.3 Wirkmechanismen der Hypothermie.....	24
5.3.1 Verlangsamung des Metabolismus.....	25
5.3.2 Inhibition des apoptotischen Zelltodes.....	25
5.3.3 Inhibition der Inflammationsreaktion .....	26
5.3.4 Kälteschockprotein RBM3 .....	26
5.3.5 Unerwünschte Wirkungen der Hypothermie .....	28
5.4 Vorausgegangene Arbeiten .....	29
5.5 Ziele dieser Arbeit.....	30

6	Materialien.....	31
6.1	Geräte.....	31
6.2	Zellkultur.....	32
6.3	Chemikalien.....	33
6.4	Antikörper.....	35
6.5	TaqMan Gene Expression Assays.....	35
6.6	Kits.....	36
6.7	Programme / Softwares.....	36
6.8	Sonstige Materialien.....	37
7	Methoden.....	38
7.1	Kultivierung der HL-1 Kardiomyozyten.....	38
7.2	Simulation der Ischämie und Reperfusion.....	39
7.3	Zeit-Temperatur-Protokoll.....	40
7.4	Bestimmung der LDH-Konzentration.....	42
7.5	Western Blot.....	42
7.5.1	Proteingewinnung.....	42
7.5.2	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay.....	43
7.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	44
7.5.4	Western Blotting.....	45
7.5.5	Immundetektion und Densitometrie.....	45
7.6	Quantitative Echtzeit-PCR.....	47
7.6.1	Isolation der RNA.....	47
7.6.2	Beurteilung der RNA mittels Agarose-Gel.....	48
7.6.3	Transkription in komplementäre DNA.....	49
7.6.4	Quantitative Echtzeit-PCR.....	50

7.7	Statistische Analyse.....	51
8	Ergebnisse.....	52
8.1	Nekrotischer Zelltod.....	52
8.2	Oxidativer Stress.....	53
8.3	Pro-inflammatorische Signalmoleküle.....	55
8.3.1	TNF- $\alpha$ .....	55
8.3.2	IL-6.....	57
8.3.3	IL-1 $\beta$ .....	58
8.3.4	SOCS3.....	60
8.3.5	COX-2.....	62
8.3.6	MCP-1.....	63
8.4	Apoptotischer Zelltod.....	64
8.5	RBM3.....	66
9	Diskussion.....	70
9.1	Schädigungsmechanismen der simulierten I/R.....	70
9.1.1	Nekrotischer Zelltod.....	70
9.1.2	Oxidativer Stress.....	71
9.1.3	Sterile Inflammation.....	72
9.2	Wiedererwärmung auf Normothermie.....	75
9.3	Post-Hypothermie reaktives Fieber.....	77
9.3.1	Fieber induzierte die Inflammationsreaktion.....	78
9.3.2	Fieber induzierter apoptotischer Zelltod.....	82
9.4	RBM3 Expression.....	83
9.5	Die Bedeutung der "therapeutischen Normothermie".....	84
9.6	Limitationen.....	87
9.7	Schlussfolgerung.....	89

9.8	Ausblick.....	89
10	Bibliographie.....	91
11	Eidesstattliche Versicherung.....	108
11.1	Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen .....	110
12	Lebenslauf.....	111
13	Publikationsliste .....	114
13.1	Journalpublikationen in geteilter Erstautorenschaft oder als Koautorin ....	114
13.2	Vortragspublikation ohne Veröffentlichung des Abstracts .....	114
14	Danksagung .....	115

# 1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Definitionen der TH in Abhängigkeit der Zieltemperatur	21
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Geräte.	31
Tabelle 3: Auflistung der für die Zellkultur verwendeten Materialien und Lösungen.	32
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Lösungen.	33
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Antikörper.	35
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Taq-Man Gene Expression Assays.	35
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Kits.	36
Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Computerprogramme.	36
Tabelle 9: Auflistung sonstiger verwendeter Materialien.	37
Tabelle 10: Zusammensetzung des RIPA-Puffers	43
Tabelle 11: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel	44
Tabelle 12: Zusammensetzung der für die Antikörperfärbungen verwendeten Pufferlösungen.	47
Tabelle 13: Anwendung und Konzentrationen der verwendeten Antikörper.	47

## 2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lichtmikroskopische Aufnahme der HL-1 Zellen.	39
Abbildung 2: Zeit-Temperatur-Protokoll.	41
Abbildung 3: Übersicht über die verschiedenen Versuchsgruppen.	41
Abbildung 4: Exemplarische Darstellung der RNA in einem 1% Agarose-Gel.	49
Abbildung 5: Extrazelluläres LDH im Zellkulturüberstand.	53
Abbildung 6: Intrazelluläre Gen-Expression von iNOS.	54
Abbildung 7: Intrazelluläre Gen-Expression von TNF- $\alpha$ .	56
Abbildung 8: Intrazelluläre Gen-Expression von IL-6.	58
Abbildung 9: Intrazelluläre Gen-Expression von IL-1 $\beta$ .	60
Abbildung 10: Intrazelluläre Gen-Expression von SOCS3.	61
Abbildung 11: Intrazelluläre Gen-Expression von COX-2.	63
Abbildung 12: Intrazelluläre Gen-Expression von MCP-1.	64
Abbildung 13: Aktivierung von Caspase 3 als Marker für apoptotischen Zelltod.	66
Abbildung 14: Intrazelluläre RBM3-Expression auf (A) mRNA- und (B) Protein-Ebene.	69
Abbildung 15: Mechanismen und Signalwege der sterilen Inflamationsreaktion.	82



### 3 Abkürzungsverzeichnis

AIF	Apoptosis inducing factor
AMI	Akuter Myokardinfarkt
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
cDNA	Complementary DNA
CIRBP	Cold-inducible RNA-binding protein
COX-2	Cyclooxygenase 2
CK-MB	Creatin-Kinase Isoenzym MB
cTnT	kardiales Troponin T
Cyto C	Cytochrom C
DAMP	Damage-associated molecular patterns
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERC	European Resuscitation Council
FAM	6-Carboxyfluorescein
FBS	Fetal bovine Serum
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HIE	Hypoxisch-ischämische Encephalopathie
HKS	HerzKreislaufstillstand
HMGB1	High-mobility group box-1
IHK	Ischämische Herzkrankheit
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IL	Interleukin

iNOS	Inducible nitric oxide synthase
I/R	Ischämie/Reperfusion
LDH	Laktatdehydrogenase
MCP1	Monocyte chemotactic protein 1
MIP-1 $\alpha$	Macrophagen inflammatorisches Protein-1 $\alpha$
mPTP	Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
OGD	Oxygen-Glucose-Deprivation
OGD/R	OGD und Reperfusion
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PBS	Phosphate buffered saline
PCI	Perkutane Koronarintervention
PRRs	Pattern Recognition Receptors
RBM3	RNA-binding motif protein 3
RT-qPCR	Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline with Tween20
TH	Therapeutische Hypothermie
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor-alpha
TTM	Targeted temperature management

## 4 Abstract

### 4.1 Die Induktion von Inflammation und Apoptose durch Wiedererwärmung und Fieber nach Hypothermie in einer Kardiomyozyten-Zellkultur

**Hintergrund** Die therapeutische Hypothermie (TH) hat sich in der modernen Medizin zur Organprotektion nach ischämischen Ereignissen bewährt. Zahlreiche Wirkmechanismen der Kühlung wurden bereits untersucht, die zellulären und molekularen Mechanismen von Wiedererwärmung und reaktivem Fieber nach Kühlung bedürfen jedoch noch weiterer Forschung. Daher vertieft diese Arbeit die Effekte von Hypothermie mit anschließendem Fieber auf die Induktion von Inflammation und Zelltod in Ischämie/Reperfusion-geschädigten Kardiomyozyten.

**Methoden** Murine HL-1 Kardiomyozyten wurden einem Sauerstoff-Glukose-Entzug mit anschließender Reperfusion (oxygen-glucose-deprivation/reperfusion, OGD/R) für sechs Stunden unterzogen. Nach drei Stunden wurde eine intra-OGD Hypothermie (33,5 °C) initiiert und für 24 Stunden aufrechterhalten. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24 Stunden auf Normothermie (37 °C) oder auf Fieber (40 °C) erwärmt. Als Marker für Nekrose wurde LDH im Überstand gemessen. Proteinkonzentrationen von aktivierter Caspase 3 für Apoptose und dem protektiven Kälteschock-Protein RBM3 wurden durch Western Blot ermittelt. Die mRNA-Transkriptionen von RBM3, von iNOS für oxidativen Stress und den pro-inflammatorischen Zytokinen TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , SOCS3, COX-2 und MCP-1 wurden durch RT-qPCR bestimmt.

**Ergebnisse** Während der OGD zeigte sich signifikant gesteigertes iNOS. Dieser Anstieg von iNOS blieb auch nach Reperfusion und Wiedererwärmung in der ungekühlten OGD/R-Gruppe, nicht aber in der Gekühlten bestehen. Entsprechend inhibierte Hypothermie eine signifikante Erhöhung der LDH Konzentration während

der späten Reperfusionphase. Direkt nach der OGD waren die Zytokin-Transkriptionen gehemmt. In der frühen Reperfusionphase konnte ein signifikanter Anstieg von TNF- $\alpha$  in gekühlten und ungekühlten Kardiomyozyten ausgelöst werden. Während in der späteren Reperfusionphase die Transkriptionen von TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  und SOCS3 in der ungekühlten OGD/R-Gruppe signifikant erhöht waren, konnten Kühlung und Wiedererwärmung auf 37 °C keinen Anstieg bewirken. Dagegen wurde ein deutlicher signifikanter Anstieg der Zytokine durch die weitere Erwärmung OGD/R-geschädigter Zellen auf Fieber beobachtet. Dieser konnte zum Teil zu Beginn des Fiebers durch eine vorausgegangene Hypothermie inhibiert werden und war nicht in der ungeschädigten 40 °C Kontrolle zu sehen. Die mRNA- und Protein-Expression von RBM3 konnte durch Hypothermie auch über die Wiedererwärmung hinaus signifikant induziert und durch Fieber gehemmt werden. In Korrelation dazu steigert Fieber in OGD/R-geschädigten Kardiomyozyten und in der 40 °C Kontrolle die aktivierte Caspase 3.

**Schlussfolgerung** TH stellt nach OGD/R-Schädigung in Kardiomyozyten eine effektive Strategie zur Reduktion von nekrotischem und apoptotischen Zelltod, oxidativen Stress und einer Inflammationsreaktionen. Die Wiedererwärmung auf 37 °C konnte keine aversiven Effekte auslösen. Jedoch hebt Fieber die Protektion der Hypothermie auf und aggraviert sowohl Inflammation als auch Apoptose, sodass die Fiebervermeidung zur Reduktion des Zelluntergangs essentiell ist.

## **4.2 The induction of inflammation and apoptosis by rewarming and pyrexia after therapeutic hypothermia in a cardiomyocyte cell culture model**

**Introduction** In modern medicine therapeutic hypothermia (TH) has proven worth for organ protection after ischemic events. Multiple mechanisms of hypothermia have been explored, whereas the cellular and molecular kinetics of rewarming and reactive fever upon hypothermia remain to be elucidated. Therefore, this study aims to investigate the induction of inflammation and cell death by fever following hypothermia in ischemia/reperfusion injured cardiomyocytes.

**Methods** Murine HL-1 cardiomyocytes underwent an oxygen-glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) for six hours. Intra-OGD hypothermia (33.5 °C) was initiated after three hours and maintained for 24 hours, followed by warming to normothermia (37 °C) or fever (40 °C) for an additional 24 hours. LDH was measured in supernatant as marker for necrosis. Protein-concentrations of cleaved Caspase 3 as apoptosis marker and protective cold-shock protein RBM3 were assessed by Western Blot. QRT-PCR was used to determine mRNA transcriptions of RBM3, oxidative stress marker iNOS, and pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , SOCS3, COX-2, and MCP-1.

**Results** During OGD significantly elevated iNOS transcription was observed. This induction of iNOS continued throughout reperfusion and rewarming in uncooled but not in cooled OGD/R groups. Correspondingly, hypothermia inhibited a significant increase in LDH during late reperfusion phase. Right after OGD cytokine transcriptions were suppressed. In early reperfusion a significant spike in TNF- $\alpha$  transcription was seen in both cooled and uncooled cardiomyocytes. Whereas during late reperfusion significant increases in TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , and SOCS3

transcripts were observed, but were not elevated by cooling and rewarming. Upon further warming to fever cytokine transcriptions were significantly augmented in OGD/R-injured cells. These were partially attenuated by TH and not observable in the undamaged 40 °C control. Expression of RBM3 mRNA and protein was significantly induced by hypothermia throughout rewarming, and suppressed by fever. Correspondingly, fever led to increased cleavage of Caspase 3 in OGD/R-injured cardiomyocytes and 40 °C control.

**Conclusion** Therapeutic hypothermia is an effective strategy to reduce necrotic and apoptotic cell death, oxidative stress, and inflammatory reactions after ischemia/reperfusion-induced injury in cardiomyocytes. Rewarming to 37 °C did not cause any adverse effects. However, fever negates these protective effects and aggravates both inflammation and apoptosis. Therefore, mitigating fever is essential to reducing ischemia/reperfusion-induced tissue damage.

## **5 Einleitung**

### **5.1 Myokardiale Ischämie**

#### **5.1.1 Klinischer Hintergrund**

Die ischämische Herzkrankheit (IHK) ist weltweit führend in der Todesursachenstatistik der World Health Organisation. (1) Laut der Global Burden of Disease Study 2016 stiegen die Todesfälle durch die IHK zwischen 2006 und 2016 weltweit um 19% auf 9,48 Millionen. (2) Auch der Deutsche Herzbericht 2018 beziffert die kardiovaskulär bedingte Sterberate in Deutschland auf 37,2%, obwohl die Prävalenz von IHK in Deutschland um 2,2% im Vergleich zum Vorjahr abgenommen habe. (3) Die IHK kann einen akuten Verlauf, zum Beispiel bei einem Myokardinfarkt (AMI) und einem Herzkreislaufstillstand (HKS) oder einen chronischen Verlauf haben. Die Inzidenz für Erwachsene, einen kardial bedingten präklinischen HKS zu bekommen, lag laut einem Review von Studien zwischen 1990 und 2009 global bei 55:100.000 (35:100.000 in Europa) mit einer durchschnittlichen Überlebensrate von 7% (9% in Europa). (4) Durch weitreichendere und bessere Schulungen der Bevölkerung sowie die Optimierung und Aktualisierung der Notfallversorgung konnten Fothergill et al. jedoch eine Steigerung der Überlebensrate nach präklinischen HKS von 12 auf 32% innerhalb von fünf Jahren (2007 bis 2012) beobachten. (5) Dennoch lag in einer 2006 veröffentlichten großen prospektiven multizentrischen Studie in den USA und Kanada die Mortalität während des Krankenhausaufenthaltes nach erfolgreicher Reanimation noch bei 67% für Erwachsene und 55% für Kinder. (6) Aufgrund ihrer klinischen Relevanz bleibt die Optimierung von Therapiestrategien der IHK Gegenstand der Forschung, um sowohl der Mortalität, als auch der Morbidität der Patienten weiter entgegenzuwirken.

### **5.1.2 Akuter Myokardinfarkt**

Die ischämische Herzkrankheit, oder auch koronare Herzkrankheit (KHK), beruht auf einer atherosklerotischen Veränderung und damit einhergehenden Stenosierung der Koronararterien, die eine Minderperfusion des Myokards zur Folge hat. Je nach Art und Ausmaß der Stenose tritt diese Ischämie nur unter Belastung, bereits in Ruhe oder akut auf. Sie äußert sich meist in Angina Pectoris und Dyspnoe. Eine komplette Verlegung eines Herzkranzgefäßes wird als akuter Myokardinfarkt (AMI) bezeichnet und entsteht meist durch die Ruptur atherosklerotischer Plaques, aus welchen thrombogene Substanzen sowie inflammatorische Zellen austreten. (7) Dies führt zu einem akuten Mangel an Sauerstoff und Nährstoffen im nachgeschalteten Stromgebiet mit resultierendem Absterben des Myokards. Im Blutkreislauf bewirkt die myokardiale Nekrose einen Anstieg kardiogener Biomarker wie kardiales Troponin T (cTnT) oder Creatin-Kinase Isoenzym MB (CK-MB), sodass diese zur Diagnostik genutzt werden können. (8, 9)

Die Therapie eines AMI beruht vor allem auf der schnellstmöglichen Reperfusion des Myokards durch Rekanalisation des Gefäßes mittels perkutaner Koronarintervention (PCI), medikamentöser Fibrinolyse, oder koronarer Bypass-Operation. (9) Unterstützend erfolgt die standardmäßige medikamentöse Therapie durch eine Antikoagulation mit Heparin zusätzlich zu einer dualen Plättchenaggregationshemmung mit Acetylsalicylsäure und einem ADP-Rezeptor-Hemmer sowie einem Beta-Rezeptorblocker und einem Analgetikum wie Morphin. (7, 9) Die Reperfusion des Myokards ist essentiell, um den Infarkt einzugrenzen und Komplikationen zu vermeiden. Paradoxe Weise kann die einhergehende Reoxygenierung zu einer zweiten Schädigungswelle führen, den sogenannten Reperfusionsschaden, der bis zu 50% des Infarktareals ausmachen kann. (10)

### **5.1.3 Pathomechanismen bei Ischämie/Reperfusion-Schädigung**

Eine myokardiale Ischämie liegt vor, wenn die Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen nicht ausreicht, um den Metabolismus der Zellen aufrecht



zu erhalten. Bei einem akuten Myokardinfarkt ist die Perfusion eines kompletten Koronararterienasts unterbrochen. In der Konsequenz entsteht zum einen im nachgeschalteten Gewebe eine Hypoxie, die dort einen anaeroben Metabolismus mit mitochondrialer Dysfunktion und gestörter Ionenhomöostase bewirkt, zum anderen aber auch verhindert, dass anfallende Metabolite aus dem ischämischen Gewebe abtransportiert werden können und sukzessive akkumulieren. (11) Dies hat ein nekrotisches Absterben der Kardiomyozyten zur Folge, was sich unter anderem in einer kontraktilen Dysfunktion des Myokards äußert. (12) Obwohl die therapeutische Reperfusion die Wiederaufnahme des aeroben Metabolismus ermöglicht, geht diese mit einem gesteigerten oxidativen Stress einher, der die mitochondriale Integrität weiter beeinträchtigt und in apoptotischem Zelltod resultiert. Dieser Pathomechanismus kann zusammenfassend als Ischämie/Reperfusion (I/R)-Schädigung bezeichnet werden.

#### **5.1.3.1 Myokardialer Metabolismus unter Ischämie**

Das Herz ist das Organ mit dem höchsten Energiebedarf und besitzt einen obligat aeroben Metabolismus (13), der normalerweise über Adenosintriphosphat (ATP) durch die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren und durch oxidative Phosphorylierung gedeckt wird. (14) Bei einer akuten Ischämie sind bereits nach zehn Sekunden die Sauerstoffreserven der Zelle aufgebraucht. Der akute Energiemangel durch die schnell aufgebrauchten ATP-Reserven kann für wenige Minuten durch die Kreatinkinase-Reaktion kompensiert werden, bei der die Phosphatgruppe des intrazellulären Kreatinphosphats zum Recycling von ATP verwendet wird. (15) Um dem ATP-Mangel entgegenzuwirken, verschiebt sich der aerobe myokardiale Metabolismus zur weniger ertragreichen anaeroben Glykolyse, wobei die intrazellulären Glykogenspeicher als Substrat dienen. Durch die anaerobe Glykolyse reichern sich verschiedene Metabolite, insbesondere Laktat, anorganisches Phosphat und das Reduktionsäquivalent Nicotinamidadenindinukleotid (NADH), an, welche zu einer Reduktion des intrazellulären pH-Wertes führen. Dadurch wird jedoch

allmählich die Aktivität der glykolytischen Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase inhibiert. (11) Zusätzlich wird die Glykolyse bei ATP-Mangel gehemmt, da die Phosphorylierung von Fruktose-6-phosphat durch die Phosphofruktokinase ATP-abhängig verläuft, sodass schließlich der komplette Metabolismus zum Erliegen kommt. (15) Unter dem erniedrigten intrazellulären pH-Wert und dem ATP-Mangel können außerdem verschiedene Ionen-Transporter der Kardiomyozyten nicht mehr angetrieben werden, sodass die  $\text{Na}^+$ -,  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{K}^+$ -Homöostase nicht mehr aufrechterhalten werden kann. (15) Die gestörte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase wirkt sich auf die elektromechanische Kopplung der Kardiomyozyten aus und hat die zuvor beschriebene kontraktile Dysfunktion zur Folge, sodass klinisch Herzrhythmusstörungen, oder ein HKS möglich sind. In der Literatur wird beschrieben, dass nach 25% der AMI ein Herzversagen auftritt. (16, 17)

### **5.1.3.2 Nekrotischer Zelltod und sterile Inflammation**

Die Spaltung von ATP, Kreatinphosphat und Glykogen, die Akkumulation von Laktat, Metaboliten und Ionen sowie der proteolytische Abbau von zellulären Organellen resultiert in einem intrazellulären Anstieg osmotischer aktiver Teilchen. (18) Es kommt zum Anschwellen und schließlich zu einem Platzen der Zellen, dem sogenannten nekrotischen Zelltod. (15, 19) Unter Nekrose werden die ubiquitäre Laktatdehydrogenase (LDH) sowie verschiedene intrazelluläre Proteine, Metabolite und Signalmoleküle in den Extrazellularraum freigesetzt. (20) Diese werden unter dem Begriff „damage associated molecular patterns“ (DAMPs) zusammengefasst. DAMPs können wiederum an sogenannten „pattern recognition receptors“ (PRRs) auf der Oberfläche benachbarter Zellen binden und dadurch eine Inflammationsreaktion auslösen. So können die DAMPs Tumor necrosis factor-alpha ( $\text{TNF-}\alpha$ ) an den TNF-Rezeptor, Interleukin (IL)-6 an einen IL-Rezeptor, zytosolische Proteine an Toll-like-Rezeptoren (TLR), oder Adenosindiphosphat (ADP), das nach Abspaltung der Phosphatgruppe aus ATP entsteht, an purinerge Rezeptoren binden. (21) DAMPs werden nach I/R-Schädigung vornehmlich unter nekrotischem Zelltod, aber auch aus

Apoptosekörperchen (apoptotic bodies) im Rahmen des apoptotischen Zelltodes in den Extrazellularraum freigesetzt. Nach Aktivierung der PRRs werden über den Transkriptionsfaktor Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF-κB) inflammatorische Signalkaskaden in Gang gesetzt. NF-κB induziert die Transkription verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine, wie TNF-α, IL-6, IL-1β, Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) und das Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1). (22-25) Auch die Prostaglandinsynthese durch die Cyclooxygenase 2 (COX-2) wird angeregt. (23, 26) Die resultierenden Zytokine und Chemokine sollen Immunzellen locken, um das geschädigte Areal von Zellresten abgestorbener Zellen zu befreien. (27) Da hierbei keine Pathogene, sondern eine Gewebeschädigung ursächlich für die Inflamationsreaktion ist, spricht man auch von einer „sterilen Inflamationsreaktion“.

### **5.1.3.3 Reperfusionsschaden und oxidativer Stress**

Ist die Perfusion des Gewebes therapeutisch wiederhergestellt, wird zum einen das Myokard wieder mit Sauerstoff versorgt und zum anderen können die angefallenen Metabolite aus dem ischämischen Gewebe wieder abtransportiert werden, wodurch sich der pH-Wert und die Ionenkonzentrationsgradienten allmählich wieder normalisieren. Dadurch kann die mitochondriale Atmungskette wieder aufgegriffen werden und so das Überleben der übrigen Zellen sichern. (9) Allerdings können unter Ischämie irreversible Schädigungsmechanismen induziert worden sein, sodass Zellen durch verschiedene Mechanismen trotz Reperfusion absterben können. (10) Dieser „Reperfusionsschaden“ beruht auf der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Akkumulation, der raschen Normalisierung des pH-Wertes und der Ausbildung von oxidativem Stress durch verschiedene Oxidasen, darunter die induzierbare NO-Synthase (inducible nitric oxide synthase, iNOS), die Xanthin-Oxidase oder die NADPH-Oxidase. Diese bilden freie Radikale (reactive oxygen species, ROS) und Stickstoffmonoxid (NO), welche Membranen und DNA oxidativ schädigen, sowie Enzyme und Proteine denaturieren. (13, 28, 29) Nach der Bereitstellung von ATP führt die ischämisch entstandene  $\text{Ca}^{2+}$ -

Überlastung außerdem zu schädlichen Hyperkontraktionen der Kardiomyozyten, die Rupturen des Sarkolemms verursachen. (10, 30) Dabei ist die Manifestation weiterer Herzrhythmusstörungen und Arrhythmien möglich, unter anderem das Stunning, bei dem vitale Kardiomyozyten einer kontraktile Dysfunktion unterliegen. (31, 32) Zusätzlich können die  $\text{Ca}^{2+}$ -Überlastung zusammen mit der pH-Wert Verschiebung und dem durch die Reperfusion getriggerten oxidativen Stress die Bildung und Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) auslösen. (15, 33) Durch diese können pro-apoptotische Proteine, wie das Cytochrom C (Cyto C) und der Apoptose induzierende Faktor (AIF), in das Zytosol austreten, wo sie die Apoptose-Kaskade in Gang setzen. (18, 33, 34) Die Apoptose ist ein energieabhängiger kontrollierter Zelltodmechanismus, bei dem sich die Zellen über Apoptose-Kaskaden proteolytisch zersetzen, wobei ihre Nuklei kondensieren und sie zu Apoptose-Körperchen zusammenschrumpfen. (19) Die dabei hauptsächlich beteiligten Enzyme gehören der Caspase-Familie an, wobei die Caspase 3 ein Schlüsselenzym der intrinsischen und extrinsischen Apoptose-Kaskade ist. Ihr Substrat Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP-1) vermittelt schließlich die Fragmentierung der DNA, sodass die Caspase 3-Aktivität als Marker für den apoptotischen Zelltod genutzt werden kann. (18, 35) Während der Ischämie findet vor allem nekrotischer Zelltod statt, da die energieabhängigen Kaskaden der Apoptose zwar bereits induziert, unter ATP-Mangel jedoch nicht voll ausgeführt werden können. Erst nach der Reperfusion ist der Energieumsatz ausreichend wiederhergestellt. Somit ergibt sich unter I/R-Schädigung ein gemischtes Bild aus nekrotischem und apoptotischem Zelltod. (10, 36)

#### **5.1.3.4 Post-Resuscitation Syndrome**

Neben den akuten Folgen der I/R-Schädigung bilden Herzrhythmusstörungen mit nachfolgendem HKS eine häufige Komplikation des AMI. (37, 38) Bei Überlebenden eines HKS wurde in mehreren klinischen Studien ein Sepsis-ähnliches Krankheitsbild beobachtet, welches die Terminologie „Post-Cardiac Arrest Syndrome“ bzw. „Post-

Resuscitation Syndrome“ hat. (32, 39) Die Pathogenese ist ein komplexes Zusammenspiel aus einer myokardialen, neuronalen und systemischen Reaktion auf eine I/R-Schädigung des kompletten Organismus und ein Grund für die hohe Mortalität nach HKS, trotz der verbesserten medizinischen Versorgung. (32, 40) Beobachtet wurden neben Störungen der Blutgerinnung und myokardialen Dysfunktion auch erhöhte Plasmakonzentrationen von Cortisol und Endotoxinen. Außerdem wurden verschiedene Zytokine, darunter TNF- $\alpha$  und einige IL sowie Adhäsionsmoleküle beobachtet, die eine Migration von Makrophagen und anderen Immunzellen in geschädigtes Gewebe ermöglichen. (39, 41) Die systemische Inflamationsreaktion und Dysregulation der Leukozyten kann durch ischämisch entstandene Endotoxine vermittelt werden, zusätzlich aber auch durch eine Bakteriämie über den Verdauungstrakt oder eine Aspiration des Mageninhalts. (42, 43) Ähnlich einer Sepsis können die systemischen Reaktionen einer I/R-Schädigung in einem Schock mit Multiorganversagen resultieren. (23, 44) Fieber kann als Ausdruck einer systemischen Inflamationsreaktion durch die beschriebene immunologische Dysregulation oder durch eine Bakteriämie entstehen, allerdings ist auch eine hypoxische Schädigung des Hypothalamus mit resultierender gestörter Thermoregulation ätiologisch möglich. (45, 46) Die hohe Inzidenz von Fieber wird in mehreren klinischen Studien beschrieben und ist assoziiert mit einer erhöhten Mortalität und einem schlechteren neurologischen Outcome. (47-49) Laut Laver et al. verstarben zwei Drittel der Patienten mit präklinischem HKS an den neurologischen Folgeschäden. (50) Somit gewinnt die Optimierung der therapeutischen Möglichkeiten zur Vermeidung von Komplikationen und dem Post-Cardiac Arrest Syndrome weiter an Bedeutung. (51)

## 5.2 Therapeutische Hypothermie

### 5.2.1 Definition der therapeutischen Hypothermie

Die therapeutische Hypothermie (TH) ist definiert als gezieltes Herabsetzen der Körperkerntemperatur auf unter 36 °C als protektive therapeutische Maßnahme bei verschiedenen zellulären Schädigungen. Je nach Ausmaß der Kühlung unterscheidet man die tiefe TH von der moderat-tiefen, der moderaten oder milden TH (siehe Tabelle 1), wobei vor allem letztere klinische Anwendung findet. (52) Das Herabsenken der Körperkerntemperatur kann durch intravasale oder intraperitoneale kalte Infusionen, sowie durch oberflächliche Methoden, wie Kühldecken oder Kühlpads mit gekühlter Luft, Wasser und Hydrogelen erfolgen. (52, 53) Da jedoch nicht nur die Kühlung selbst, sondern die konstant kontrollierte und gezielte Regulation der Körperkerntemperatur im Fokus steht, wird der Begriff der therapeutischen Hypothermie zunehmend durch „targeted temperature management“ (TTM) ersetzt. TTM wird in drei Phasen unterteilt: die möglichst schnelle und frühzeitige Induktion der Kühlung, die Aufrechterhaltung der Kühlung, wobei die Fluktuationen 0,2 – 0,5 °C nicht überschreiten sollten, und die Wiedererwärmung, die stetig mit einer Geschwindigkeit von 0,2 – 0,5 °C/h erfolgen sollte. (52)

**Tabelle 1: Definitionen der TH in Abhängigkeit der Zieltemperatur.** (52)

Milde Therapeutische Hypothermie	34,0 – 35,9 °C
Moderate Therapeutische Hypothermie	32,0 - 33,9 °C
Moderat-tiefe Therapeutische Hypothermie	30,0 – 31,9 °C
Tiefe Therapeutische Hypothermie	< 30,0 °C

### 5.2.2 Anwendungsgebiete der TH

In der modernen Medizin finden die TH und das TTM zahlreiche Anwendungsgebiete zur Organprotektion. Insbesondere die Neuroprotektion und Kardioprotektion stehen hierbei nach aktuellem Kenntnisstand im Fokus. (54, 55) Die Überprüfung weiterer

Indikationen und Anwendungsmöglichkeiten für den klinischen Alltag bleibt Gegenstand der Forschung.

### **5.2.2.1 Hypothermie zur Kardioprotektion**

In den aktuellen Reanimationsleitlinien von 2015 empfiehlt das European Resuscitation Council (ERC) die Anwendung von TH mit individuell variablem Target zwischen 32 und 36 °C für mindestens 24 Stunden bei komatösen Patienten mit Spontankreislauf nach HKS mit initial schockbarem Rhythmus. (56) Diese Empfehlung beruht auf mehreren klinischen Studien. So zeigten Bernard et al., dass Patienten mit Spontankreislauf nach HKS unter TH zu 49% überlebten und mit einem guten neurologischen Outcome aus dem Krankenhaus entlassen werden konnten. Unter Normothermie war dies jedoch nur bei 26% möglich. (57) Die „Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group“ beobachtete zudem eine Reduktion der Sterberate sechs Monate nach HKS durch TH um 14%. (58) Neben der verminderten Mortalität reduzierte die TH bei komatösen Patienten nach HKS den durchschnittlichen Aufenthalt auf der Intensivstation von 21 Tagen auf 14 Tage. (59) Eine längere Hypothermie von 48 statt 24 Stunden brachte laut der multizentrischen prospektiven Studie von Kirkegaard et al. keinen signifikanten Vorteil in Bezug auf das neurologische Outcome und die Mortalität der Patienten mit präklinischen HKS. Die über 48 Stunden gekühlten Patienten erlitten dagegen sogar mehr Nebenwirkungen durch die Hypothermie und hatten im Durchschnitt einen längeren Aufenthalt auf der Intensivstation. (60) Im Gegensatz zu den ERC-Leitlinien von 2015 empfehlen die Leitlinien der American Heart Association die Anwendung von TH bei allen komatösen Patienten mit Spontankreislauf nach Kreislaufstillstand. (51) In der retrospektiven Studie von Perman et al. hatten komatöse Patienten mit initial nicht-schockbarem HKS durch TH eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 29% und ein gutes neurologisches Outcome zu 21%, während diese bei ungekühlten Patienten nur bei 15%, beziehungsweise 10% lag. (61) Ebenso belegen weitere Studien eine Steigerung des Überlebens und eine Reduktion neurologischer Folgeschäden durch

TH nach nicht-schockbarem HKS. (62, 63) Allerdings stellen auch einige Studien die protektiven Effekte der TH infrage, da sie keinen klinischen Vorteil für die Patienten beobachten konnten. Die retrospektive multizentrische Studie von Nichol et al. wies jedoch drauf hin, dass die Temperatur vieler Patienten nur unzureichend überwacht wurde und 35% der TH-Patienten wärmer oder kälter als ihre Zieltemperatur waren. (64) Damit wird die Bedeutung des konstanten Temperaturmanagements während des Einsatzes von TH deutlich, was auch in der TTM-Studie geschlussfolgert wird. (65) Nach diesem hatten Patienten mit kardialem HKS keinen Vorteil in Bezug auf Mortalität oder neurologisches Outcome durch eine TH von 33 °C, im Gegensatz zu 36 °C mit jeweils anschließender aktiver Fieberprävention (54% vs. 52%). Darauf wurde in den aktuellen Leitlinien Bezug genommen und die empfohlene Temperaturspanne auf 32 – 36 °C angepasst. (56, 66) Neben der Therapie von HKS kardiogenen Ursprungs findet die TH auch Anwendung bei HKS nach Trauma mit Hämorrhagie, um das Zeitfenster für Notfallmaßnahmen zu erweitern. (67, 68) Klinische Studien prüfen noch, ob Patienten nach AMI von TH profitieren könnten. (69, 70) Im Tiermodell reduzierte eine TH die Infarktgröße und die kontraktile Dysfunktion nach einem AMI. (71)

#### **5.2.2.2 Hypothermie nach perinataler Asphyxie**

Die perinatale Asphyxie beschreibt die Minderperfusion lebenswichtiger Organe beim Neugeborenen vor, während oder direkt nach der Geburt. Sie resultiert in einer systemischen Azidose und in Organdysfunktionen, wobei insbesondere die hypoxisch-ischämische Enzephalopathie (HIE) schwerwiegende neurologische Folgen haben kann. Eine TH von 33 - 34 °C über 72 Stunden, wie sie in den aktuellen Leitlinien der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin empfohlen wird, kann die für die Komplikationen verantwortlichen ischämischen, inflammatorischen und apoptotischen Vorgänge inhibieren und somit das Risiko für schwere Folgeschäden reduzieren. (72-75) In einer klinischen Studie von Shankaran et al. waren 62% der asphyktischen Neugeborenen nach 18 - 22 Monaten verstorben



oder wiesen eine moderate bis schwere Behinderung auf, während es bei der therapeutisch gekühlten Vergleichsgruppe nur 44% waren. Auch die Mortalität selbst wurde durch Einsatz von TH von 37% auf 24% gesenkt. (74) Der protektive Effekt der TH ließ sich bei denselben Kindern auch noch im Alter von sechs bis sieben Jahren nachweisen. Bis dahin waren unter TH nur 47% im Gegensatz zu 62% der Kinder ohne Kühlung verstorben oder hatten einen IQ von unter 70. (76) Auch Jacobs et al. stellten eine Reduktion der Todesfälle und sensorineuralen Behinderungen zwei Jahre nach HIE mit TH von 66% auf 51% fest. (75) Dagegen steigt das Risiko, zu versterben oder eine Behinderung zu entwickeln, mit jedem Grad Celsius über 37 °C um das bis zu Vierfache. (77)

### **5.2.2.3 Hypothermie zur Neuroprotektion**

Die TH ist eine wichtige therapeutische Strategie bei einer Vielzahl neurokranialer Krankheitsbilder. Diese umfassen traumatische und hypoxische Hirnschädigungen, subarandale Hämorrhagien, intrakranielle Druckzunahmen, spinale Verletzungen und die hepatische Encephalopathie. (70, 78) Hong et al. beobachteten in Patienten mit erfolgreicher Rekanalisation nach akutem ischämischen Schlaganfall unter TH seltener die Ausbildung von zerebralen Ödemen und hämorrhagischen Transformationen, was in einem besseren Outcome resultierte. (79) Zudem finden die TH und die dadurch induzierten Signalwege und Signalmoleküle breites Interesse bei der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson. (80) Auch bei chirurgischen Interventionen, welche die zerebrale Perfusion beeinträchtigen können, wird Hypothermie angewandt, so zum Beispiel bei Operationen am Aortenbogen. (81)

## **5.3 Wirkmechanismen der Hypothermie**

Die protektiven zellulären und molekularen Mechanismen der Hypothermie sind immer noch nicht vollständig verstanden. Generell wird die erhöhte Resistenz gegenüber I/R-Schädigung unter hypothermen Bedingungen zurückgeführt auf einen

geringeren metabolischen Sauerstoffverbrauch mit Erhalt der mitochondrialen Integrität, eine reduzierte Bildung von freien Radikalen und NO sowie eine schwächere Induktion des apoptotischen Zelltodes und der Inflammationsreaktion. Auch reduziert die TH die Exzitotoxizität im Gehirn, also neuronalen Zelluntergang durch eine persistente Reizüberflutung. (71, 78, 82-84) Interessanterweise werden unter Hypothermie trotz des verlangsamten Metabolismus einige sogenannte Kälteschockproteine hochreguliert, welche protektive Signalwege aktivieren. (85)

### **5.3.1 Verlangsamung des Metabolismus**

Die metabolische Rate und der damit einhergehende Verbrauch an Sauerstoff und Glukose verringert sich mit der Abnahme von jedem Grad Celsius um 6 – 10% und ist damit wesentlich an der protektiven Wirkung der TH beteiligt. (82, 84) Simkhovich et al. erreichten bei Kaninchenherzen durch den Einsatz von Hypothermie nach 20-minütiger koronarer Ischämie einen Erhalt von 43% der ATP- und 84% der Glukose-Reserven. (86) Otake et al. beobachteten im Tiermodell eine signifikante Reduktion des nekrotischen Areals (33% vs. 45%) nach koronarer I/R, sowie eine geringere Entwicklung nachfolgender Arrhythmien. (87) Auch in unserer Arbeitsgruppe führte der Einsatz von intranschämischer Hypothermie *in vitro* zu einer vermehrten Erhaltung der mitochondrialen Integrität mit erhöhtem intrazellulären ATP-Gehalt bei gleichzeitiger Reduktion des nekrotischen Zelltodes, gemessen am sezernierten LDH und cTnT. (88)

### **5.3.2 Inhibition des apoptotischen Zelltodes**

Eine Hypothermie greift sowohl in die intrinsische als auch in die extrinsische Apoptose-Kaskade ein. Über den intrinsischen Weg steigert TH unter anderem das Verhältnis zwischen anti-apoptotischem Protein B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) und proapoptotischem Protein Bcl-2-associated X protein (BAX), was der Bildung der mPTP entgegenwirkt. Somit werden weniger mitochondriales Cyto C und AIF in das Zytosol ausgeschüttet, die als Initiatoren der Apoptose-Kaskade fungieren. (34, 71, 89) Simultan inhibiert Hypothermie die Expression von Matrix-Metalloproteasen, die über

den Fas-Liganden die extrinsische Apoptose-Kaskade aktivieren können. (78) Zusätzlich wird die Apoptose durch eine verminderte Expression verschiedener Caspasen selbst gehemmt, sodass die Apoptose-Kaskade nicht mehr ablaufen kann. Im Tiermodell konnte eine insgesamt verminderte Aktivierung von Caspase 3 durch Hypothermie nach I/R-Schädigung festgestellt werden. (78, 90) Obwohl die zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht verstanden sind, wurde unter Hypothermie eine Hochregulation des Kälteschockproteins RBM3 einhergehend mit einer Reduktion des apoptotischen Zelltodes beobachtet, sodass diesem eine anti-apoptotische Wirkung zugeschrieben wird. (85, 91)

### **5.3.3 Inhibition der Inflammationsreaktion**

Hypothermie wirkt einer Inflammationsreaktion entgegen, indem sie zum einen die Infiltration von Immunzellen in das geschädigte Areal und zum anderen die Expression pro-inflammatorischer Zytokine hemmt, während anti-inflammatorische Proteine induziert werden. (78, 83, 92) Entsprechend erfassten Meybohm et al. in hypothermen Schweinen nach HKS mit erfolgreicher Reanimation eine reduzierte Expression von IL-1 $\beta$  und IL-6 sowie eine verminderte Infiltration von Immunzellen in das betroffene Gewebe als in der Vergleichsgruppe. Gleichzeitig waren sowohl die cTnT-Sekretion als auch die Induktion der Apoptose gesenkt, die Ventrikelfunktion aber verbessert. (92) Im Gehirn soll der Einsatz von TH zudem die Blut-Hirn-Schranke stabilisieren, wodurch die Ödemneigung abnimmt und weniger inflammatorische Zytokine oder freie Radikale ins Gewebe übergehen. (83)

### **5.3.4 Kälteschockprotein RBM3**

Das RNA-binding motif protein 3 (RBM3) gehört, ebenso wie das cold-inducible RNA-binding protein (CIRBP), zu einer kleinen Gruppe evolutionär konservierter RNA-bindender Proteine mit einem Glycin-reichen C-Terminus und einer RNA-Bindungs-Domäne am N-Terminus. (85) Obwohl die Proteinbiosynthese unter niedrigeren Temperaturen generell verlangsamt abläuft, zeigt RBM3 wie auch CIRBP unter milder bis moderater Hypothermie gesteigerte Expressionsmuster und zählen somit zu den

sogenannten Kälteschockproteinen (93) Ebenso können verschiedene Formen von Zellstress, wie Hypoxie oder UV-Strahlung, die RBM3-Expression induzieren. (94) RBM3 wurde ursprünglich in Tieren entdeckt, die Winterschlaf halten. Dieser Zustand bringt weitreichende metabolische Veränderungen zum Erhalt der Zellen mit sich. (95) Die protektive Funktion von RBM3 wird auf die Fähigkeit zurückgeführt mRNA in den Zellen durch Bindung zu stabilisieren und so deren Translation zu begünstigen. (96) So konnten Dresios et al. in RBM3-transfektierten Zellen eine Steigerung der globalen Proteinsynthese messen. Sie führten die Regulation der Translation auf eine Interaktion von RBM3 mit der ribosomalen 60S Untereinheit zurück. Zudem steigerte RBM3 den zellulären Gehalt an verschiedenen micro-RNAs (miRNA). (97) MiRNAs sind kleine, nicht-kodierende RNA-Stücke, die post-transkriptional an mRNA binden und deren Translation regulieren. Insbesondere eine kleine Gruppe temperatursensitiver miRNAs beeinflussen RBM3-vermittelt die Expression verschiedener Zytokine und nehmen darüber Einfluss auf die Thermoregulation des Körpers. (98) Auch während der frühkindlichen Gehirnentwicklung und in den ersten Wochen post partum wurde eine erhöhte RBM3-Expression festgestellt. (99) Ohne RBM3 erfolgte die neuronale Differenzierung im Tiermodell abnormal und die embryonale Gehirnentwicklung war eingeschränkt, sodass zudem ein Einfluss auf die Zellproliferation gemutmaßt wird. (100) Verschiedene Studien führen die protektiven Eigenschaften der Hypothermie unter I/R auf eine Hochregulation von RBM3 zurück, die durch Hypothermie oder RBM3-Transfektion induziert werden kann. So verringerte RBM3 unter I/R oder Staurosporin-induzierter Apoptose die Aktivität der Apoptose-Kaskade und die resultierende DNA-Fragmentierung, sowie die LDH-Ausschüttung. Ein RBM3-Knockdown dagegen hob diese protektiven Mechanismen wieder auf. (101) Wellmann et al. sahen eine Interaktion zwischen COX2 und RBM3. Sie stellten eine RBM3-vermittelte erhöhte Zellproliferation und ein verbessertes Überleben nach I/R fest, wobei ein RBM3-Knockdown unter Ischämie zu einem COX2-

und Caspase 3-unabhängigen Zelltod führte. (102) Zusätzlich bot RBM3 laut Yang et al. miRNA-vermittelt Schutz vor NO-indiziertem apoptotischem Zelltod. (103)

### **5.3.5 Unerwünschte Wirkungen der Hypothermie**

Neben den vielen protektiven Mechanismen, die durch Hypothermie induziert werden, können jedoch auch unerwünschte Wirkungen auftreten. Diese umfassen Arrhythmien, hämodynamische Veränderungen, Elektrolytstörungen, Hyperglykämien, Blutungen, Infektionen und Kältezittern. (54, 84, 104) Das Risiko für das Auftreten dieser Nebenwirkungen ist unter milder Hypothermie allerdings geringer als unter einer tieferen Hypothermie. (52) Außerdem wurde nach der Wiedererwärmung häufig das Auftreten von Post-Hypothermie reaktivem Fieber beobachtet. (105, 106) Eine retrospektive klinische Studie vom Kim et al. kam zu dem Schluss, dass typische Nebenwirkungen von TH und Wiedererwärmung wie Hypoglykämie, Hypokaliämie, Arrhythmien und Hypotension weniger entscheidend für ein schlechtes neurologisches Outcome waren, als andere Nebenwirkungen, die im Rahmen der Intensivmedizinischen Behandlung auftraten. Zu diesen zählten Pneumonien, Sepsis, Myoklonien, Krampfanfälle und Hypoglykämien in dem Beobachtungszeitraum von 72 Stunden. (107)

Im Gegensatz zu den verschiedenen protektiven Signalwegen wirkt sich eine passive oder spontan geringere Körperkerntemperatur nach präklinischem HKS nicht präventiv aus, sondern ist mit einer höheren Mortalität während des Krankenhausaufenthalts assoziiert. Diese könnte auf eine Dysfunktion der hypothalamischen Thermoregulation nach erfolgter Reanimation aufgrund eines hypoxischen Hirnschadens zurückzuführen sein. Auch gestörte periphere Regulationsmechanismen wie intradermale Vasospasmen sind ätiologisch möglich. (45)

### **5.3.5.1 Post-Hypothermie reaktives Fieber**

Eine weitere häufig zu beobachtende Komplikation der TH ist die nach der Wiedererwärmung einsetzende reaktive Fieber, meist definiert als Körpertemperatur  $\geq 38$  °C. Klinische Studien beziffern die Inzidenz von Fieber nach TH bei Patienten mit präklinischem HKS mit 20 - 52%. (105, 106, 108) Das Auftreten von Fieber nach HKS ist mit einer höheren Mortalität assoziiert. Mit dem Risiko eines schlechten neurologischen Outcomes korrelieren zusätzlich die Höchsttemperatur, der Zeitpunkt des Auftretens und die Dauer. (47, 49, 108) Hierbei hatte die Zunahme um jeden Grad Celsius über 37 °C eine Risikosteigerung um 31% zur Folge. (47) Laut Bro-Jeppesen et al. hatten 61% der Patienten mit schlechtem neurologischen Outcome Post-Hypothermie Fieber. Auch ein Jahr später wiesen 43% der Patienten mit Post-Hypothermie Fieber ein schlechtes neurologisches Outcome auf, im Gegensatz zu 27% der Patienten ohne Fieber. Zudem waren maximale Temperatur und Dauer von Fieber unabhängige Prädiktoren für die Mortalität. (108) Des Weiteren verlängerte Fieber nach TH die durchschnittliche Verweildauer im Krankenhaus. (109) Risikofaktoren, die das Auftreten von Fieber begünstigen, konnten in klinischen Studien noch nicht bestimmt werden. (109)

## **5.4 Vorausgegangene Arbeiten**

In vorausgegangenen Arbeiten konnten wir verschiedene zelluläre Schutzmechanismen durch den Einsatz von milder TH in I/R-geschädigten HL-1 Kardiomyozyten ausfindig machen. Tong et al. beobachtete durch die Induktion intranschämischer Hypothermie eine geringere Sekretion von LDH und cTNT als Marker für zelluläre Schädigung, während gleichzeitig der ATP-Gehalt der Zellen erhalten blieb und das zytoprotektive Kälteschockprotein RBM3 durch die Kühlung induziert wurde. (88) Krech et al. zeigte, dass durch den Einsatz von TH die mitochondriale Integrität aufrechterhalten und dadurch der durch I/R entstandene oxidative Stress der Zellen vermindert werden konnte. (34)

## 5.5 Ziele dieser Arbeit

Aufgrund der klinischen Relevanz ist die optimale Versorgung ischämischer Herzerkrankungen nach wie vor Gegenstand der Forschung. Zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Studien belegen den protektiven Effekt der therapeutischen Hypothermie auf die Mortalität und die Morbidität. Verschiedene protektive Wirkmechanismen in Bezug auf den Metabolismus, die mitochondriale Integrität und den Zelltod konnten während der eigentlichen Phase der Hypothermie nach I/R-Schädigung in zahlreichen Arbeiten, unter anderem von unserer Arbeitsgruppe, analysiert werden.

Forschungsbedarf besteht hinsichtlich der Auswirkungen der Wiedererwärmung auf Normothermie sowie des Einflusses von Fieber nach vorausgegangener Hypothermie in I/R-geschädigten HL-1 Kardiomyozyten.

In der vorliegenden Dissertation sollen daher folgende Fragestellungen behandelt werden:

1. Welche Auswirkung hat eine schnelle Wiedererwärmung auf I/R-geschädigte HL-1 Kardiomyozyten?
2. Bleibt der protektive Effekt der TH auch nach der Wiedererwärmung auf Normothermie in den HL-1 Kardiomyozyten bestehen?
3. Welche Effekte treten bei Induktion von Fieber als Komplikation nach I/R-Schaden auf die Inflammationsreaktion und den Zelltod in einer HL-1 Kardiomyozyten Zellkultur auf?
4. Kann eine vorausgegangene Hypothermie die aversiven Effekte von Fieber auf die Inflammationsreaktion und den Zelltod der HL-1 Kardiomyozyten inhibieren?

## 6 Materialien

### 6.1 Geräte

**Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Geräte.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller (Firma, Stadt, Land)</b>
Bio-Fuge primo / fresco (Zentrifugen)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Brutschrank CO <sub>2</sub> Inkubator, MCO-19AIC	Sanyo, USA
ChemiDoc XRSTM	Bio-Rad, München, Deutschland
CO <sub>2</sub> Inkubator mit O <sub>2</sub> -Regelung CB 60	Binder, Tuttlingen. Deutschland
Elektrophorese-/Blotting-Netzteil	Biometra, Göttingen, Deutschland
Elektrophorese-/Blotting-Netzteil	Bio-Rad, München, Deutschland
Elektrophorese-Kammer (Proteine)	Bio-Rad, München, Deutschland
Elektrophorese-Kammer (RNA)	VWR International, Darmstadt, Deutschland
GeneFlash Gel Documentation Darkroom UV Transilluminator	Syngene Bio Imaging, Cambridge, UK
Magnetrührer	Roth, München, Deutschland
Milli-Q® Direct Wasseraufbereitung	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Mikrowelle	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Multiskan Reader Ascent	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
NanoDrop 2000c Spektralphotometer	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Präzisionswaage BP4100S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Bio-Rad, München, Deutschland
Schüttler Promax	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Sicherheitswerkbank Lamin Air	Heraeus, Hanau, Deutschland
StepOne Plus Real-Time PCR-System	Applied Biosystems, Foster City, CA,



	USA
Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
Tiefkühlschrank (-20°)	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland
Tiefkühlschrank (-80°)	FRYKO, Esslingen, Deutschland
Vortex-2 Genie	Scientific Industries, Bohemia, NY USA
Wasserbad BD 10	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zellkulturmikroskop	Motic, Wetzlar, Deutschland

## 6.2 Zellkultur

**Tabelle 3: Auflistung der für die Zellkultur verwendeten Materialien und Lösungen.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller (Firma, Stadt, Land)</b>
Claycomb-Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) - FG 0435 (Vollmedium) w 3,7 g/L NaHCO <sub>3</sub> w 4,5 g/L D-Glucose w stable Glutamine	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) - F 0405 (Hungermedium) w 3,7 g/L NaHCO <sub>3</sub> w/o D-Glucose w/o L -Glutamine	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Fetal bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Fibronectin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Gelatine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	LO-Laboroptik Ltd, Lancing, UK
Norepinephrin ±-Arterenol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

L-Ascorbinsäure, Natrium-Salz	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin 200 mM	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Primocin™ (50mg/ml) Antibiotikum	Invivogen, San Diego, CA, USA
Trypsin-EDTA (0,5% trypsin in 0,02% EDTA-Na)	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Serologische Pipetten (2,5 – 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritzen Injekt® (10 ml)	Braun, Melsungen, Deutschland
Sterilfilter Filtropur S0.2	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Vakuumfilterflaschen (250 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Vakuumfilterflaschen (500 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen ( 75 und 175 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturröhrchen 15 ml und 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschalen (22 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber (25 cm)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

### 6.3 Chemikalien

**Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Lösungen.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller (Firma, Stadt, Land)</b>
Acrylamid [30%]	Roth, München, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, München, Deutschland
Bovines Serum Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, München, Deutschland
β-Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Mannheim, Deutschland
DEPC-treated Water	AMBION GmbH, Kassel, Deutschland
DMSO	Roth, München, Deutschland

Dura Super Signal West	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
EDTA [99%]	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Essigsäure [100%]	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethanol [70%]	Roth, München, Deutschland
Ethanol absolut für die Molekularbiologie [99%]	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Glycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Guanidin Hydrochlorid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
HCL [5M]	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Methanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Midori Green Direct	Nippon Genetics Europe, Düren, Deutschland
Natriumchlorid für die Molekularbiologie	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Pierce BCA-Protein-Assay, Reagent A+B	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Pierce Lane Marker Reducing Sample Buffer (5x)	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Ponceau S Pulver	Roth, München, Deutschland
SeaKEM® LE Agarose	Lonza Group, Basel, Schweiz
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Sodium Orthovanadath	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, München, Deutschland
Tris-aminomethan (TRIS)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Triton X-100	Roth, München, Deutschland
Trypanblau [0,5%]	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Tween 20	Roth, München, Deutschland

## 6.4 Antikörper

**Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Antikörper** für die semiquantitative Bestimmung der intrazellulären Proteinkonzentration mittels Western Blot.

Antikörper	Spezies	Hersteller	Katalog-Nr.
β-Actin	Rabbit, polyklonal	Cell Signaling, Boston, MA, USA	4967
Caspase 3	Rabbit, polyklonal	Cell Signaling, Boston, MA, USA	9662
RBM3	Rabbit, polyklonal	Proteintech Europe, Manchester, UK	14363-1-AP
F(ab') <sub>2</sub> anti-Rabbit IgG (H+L)	Donkey, polyklonal	dianova, Hamburg, Deutschland	7-11-036-152

## 6.5 TaqMan Gene Expression Assays

**Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Taq-Man Gene Expression Assays** für die quantitative Echtzeit-PCR.

Gen	Hersteller	Assay ID
COX-2	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland	Mm03294838_g1
GAPDH	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland	Mm99999915_g1
IL-1β	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland	Mm00434228_m1
IL-6	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland	Mm00446190_m1
MCP-1/ CCL2	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland	Mm00441242_m1
iNOS	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland	Mm00440502_m1
RBM3	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland	Mm01609819_g1
SOCS3	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland	Mm00545913_s1

TNF- $\alpha$	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland	Mm00443260_g1
---------------	---	---------------

## 6.6 Kits

**Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Kits.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller (Firma, Stadt, Land)</b>
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche, Mannheim, Deutschland
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Gene MATRIX Universal RNA Purification Kit	Roboklon, Berlin, Deutschland
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

## 6.7 Programme / Softwares

**Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Computerprogramme.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller (Firma, Stadt, Land)</b>
Ascent Software for Multiscan Ascent 2.6	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
ImageLab™-Software 5.2.1	Bio-Rad, München, Deutschland
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
NanoDrop 2000-Software	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Quantity One	Bio-Rad, München, Deutschland
StepOne Plus Real-Time PCR-System-Software	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

## 6.8 Sonstige Materialien

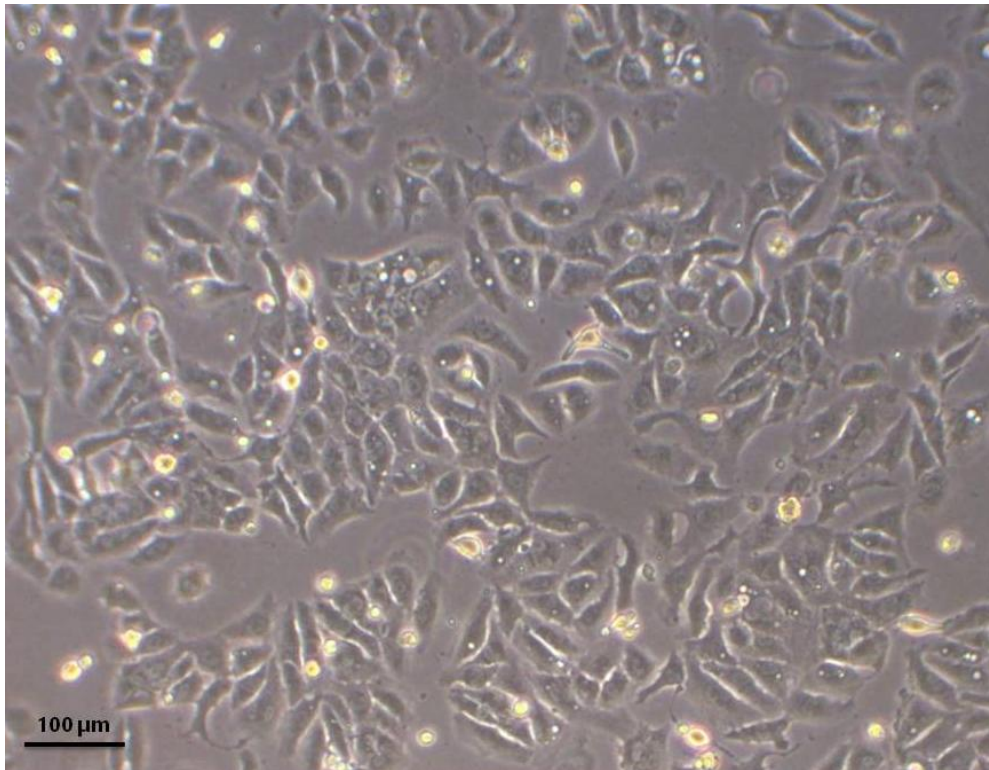
**Tabelle 9: Auflistung sonstiger verwendeter Materialien.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller (Firma, Stadt, Land)</b>
96 Fast PCR-Platte Halbrand	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96-well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Adhäsive qPCR-Folie	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Biosphere Filter Tip 2,5	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Biosphere Filter Tip 200	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Biosphere Filter Tip 1000	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Chromatography Paper, 3mm Chr	Whatman, Maidstone, UK
Eppendorf Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Gelkämme	Bio-Rad, München, Deutschland
Glasplatte (10,1x7,3cm) mit 15mm Spacer	Biostep, Burkhardtsdorf, Deutschland
Low Binding Reaktionsgefäße (DNA, Protein)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark Professional, Surrey, UK
PVDF Membranen Fluoro Trans®	PALL Life Sciences, Port Washington, NY

## 7 Methoden

### 7.1 Kultivierung der HL-1 Kardiomyozyten

Bei den HL-1 Kardiomyozyten handelt es sich um eine Tumorzelllinie aus atrialen AT1-Zellen einer weiblichen Jackson C57BL/6J Maus. (110) Diese wurden der Arbeitsgruppe freundlicherweise von Dr. Claycomb bereitgestellt. Die Zellkulturflaschen und Petrischalen für die Kultur und die Versuche der HL-1 Zellen wurden zuvor für eine Stunde mit  $0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Fibronectin und 0,02% Gelatine beschichtet. (110) Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Inkubatoren bei  $37^\circ\text{C}$ , 21%  $\text{O}_2$  und 5%  $\text{CO}_2$  mit Claycomb Vollmedium (Abbildung 1). Es beinhaltet neben Claycomb Medium: 10% FBS,  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  Primocin, 2 mM L-Glutamin sowie 0,1 mM Norepinephrin. Das Zellkulturmedium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt und bei einer geschätzten Zelldichte von 80-90% wurden die Zellen mittels einer Trypsin/EDTA-Mischung (0,05/0,02%) vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst und im Verhältnis 1:2 bis 1:6 auf neue Zellkulturflaschen verteilt. HL-1 Zellen verschiedener Passagen wurden vorrätig in flüssigem Stockstoff in HL-1 Gefrier-Medium aus 95% FBS und 5% DMSO gelagert.



**Abbildung 1: Lichtmikroskopische Aufnahme der HL-1 Zellen** in ca. 70% Konfluenz als exemplarische Dichte der Zellen zu Versuchsbeginn. Die Aufnahme erfolgte in 100-facher Vergrößerung.

## 7.2 Simulation der Ischämie und Reperfusion

Für die Versuche wurden jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen auf  $22 \text{ cm}^2$  Petrischalen 48 Stunden vor Versuchsbeginn ausplattiert. Um eine Ischämie am Herzen zu simulieren, wurden die HL-1 Zellen einer sechsstündigen Oxygen-Glukose-Deprivation (oxygen-glucose-deprivation, OGD) in  $\text{CO}_2$ -Inkubatoren mit 0,2%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$  und DMEM-Mangelmedium ausgesetzt (Abbildung 2). Das DMEM-Mangelmedium besteht aus glukosefreiem DMEM, 2 mM L-Glutamin und 0,1% Primocin. Um die Rest-Bindung von Sauerstoff im Mangelmedium zu minimieren, wurde das Versuchsmedium mindestens 24 Stunden vor Versuchsbeginn in einem  $\text{CO}_2$ -Inkubator bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und 0,2%  $\text{O}_2$  equilibriert. Zur Kontrolle wurden HL-1 Zellen unter 21%  $\text{O}_2$  und 5%  $\text{CO}_2$  mit DMEM-Vollmedium mitgeführt. Das DMEM-Vollmedium bestand aus DMEM mit Glukose, 10% FBS, 2 mM L-Glutamin und 0,1% Primocin. Um eine Reperfusion zu simulieren (oxygen-glucose-deprivation/reperfusion, OGD/R), wurden anschließend an die OGD-Phase alle Versuchsgruppen bis zum Versuchsende mit Claycomb-

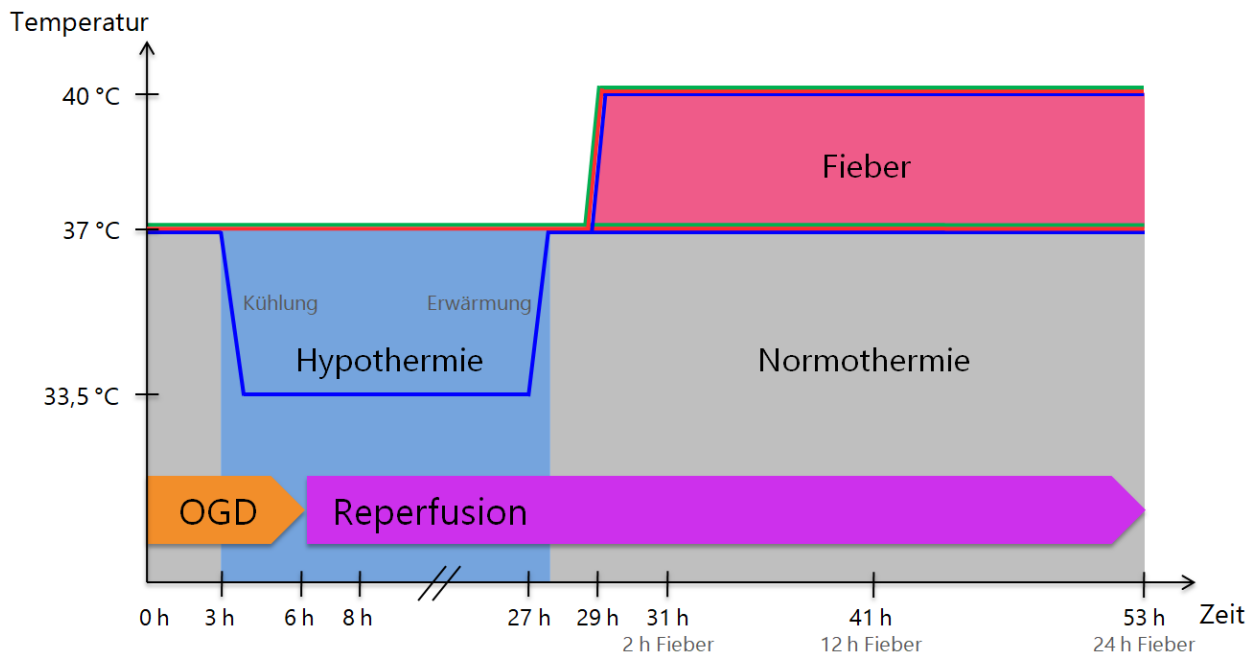


Reperusionsmedium aus Claycomb Medium +10% FBS, 2 mM L-Glutamin und 50 µg/ml Primocin versetzt und unter 21% O<sub>2</sub> sowie 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

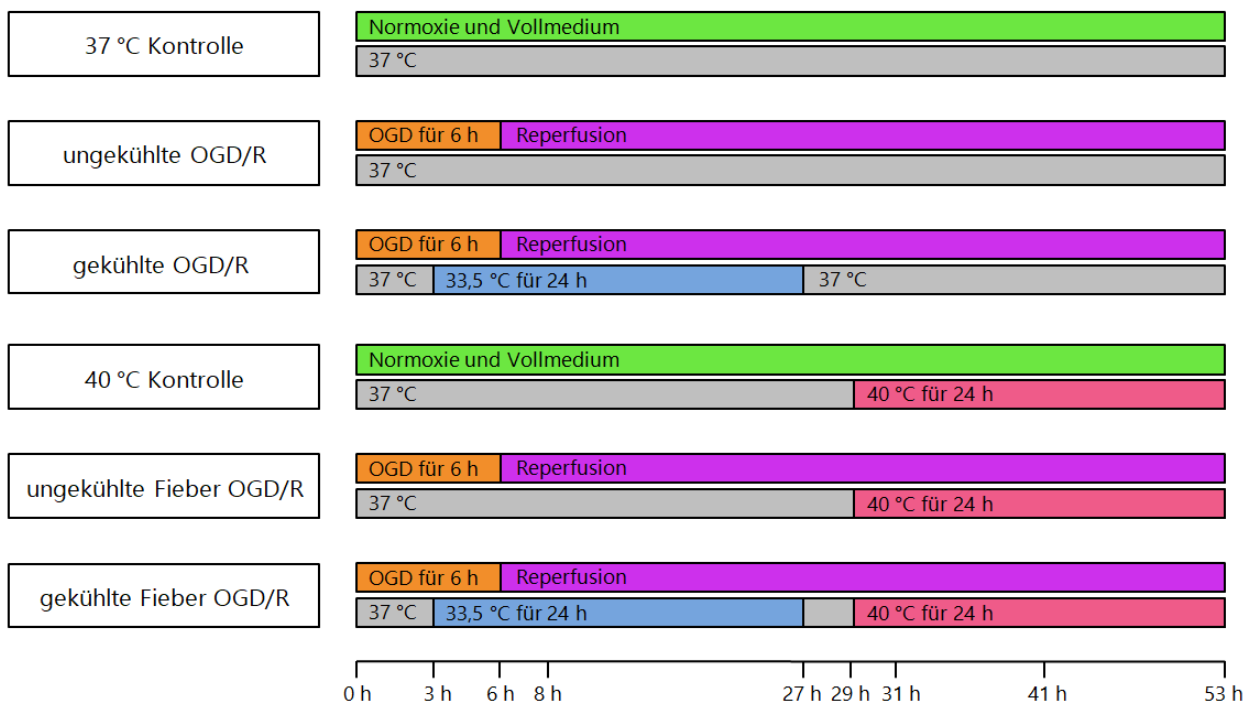
### **7.3 Zeit-Temperatur-Protokoll**

Das Zeit-Temperatur-Protokoll ist eine Erweiterung aus Erkenntnissen vorangegangener Arbeiten der Arbeitsgruppe und angelehnt an die Reanimationsleitlinien des European Resuscitation Council für die Behandlung komatöser Patienten mit Spontankreislauf nach präklinischem HKS. In vorherigen Arbeiten etablierte die Arbeitsgruppe für die HL-1 Zellen eine Schädigungsdauer von sechs Stunden OGD mit intranschämischen Beginn der Hypothermie nach drei Stunden. (34, 88) Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass eine milde TH von 33,5 °C einer tiefen Hypothermie von 17 °C überlegen ist. (93) Noch nicht untersucht wurde die Wiedererwärmung nach der Kühlung auf 37 °C, sowie eine weitere Erwärmung auf 40 °C, im Folgenden definiert als Fieber.

Die Versuchsgruppen wurden während der OGD entweder bei 37 °C belassen oder nach drei Stunden intranschämisch innerhalb von 45-55 Minuten auf 33,5 °C heruntergekühlt (Abbildungen 2 und 3). Diese Hypothermie wurde über die simulierte Reperfusion für 24 Stunden aufrechterhalten, bis die HL-1 Zellen 27 Stunden nach Versuchsbeginn auf 37 °C wiedererwärmt wurden. Die Wiedererwärmung erfolgte innerhalb von 16-19 Minuten in der technisch schnellstmöglichen Rate, um die dadurch hervorgerufenen Effekte möglichst deutlich analysieren zu können. Zwei Stunden nach Wiedererwärmung und 29 Stunden nach Versuchsbeginn wurden jeweils gekühlte und ungekühlte OGD/R-geschädigte HL-1 Kardiomyozyten sowie ungeschädigte Kardiomyozyten als Kontrolle von 37 °C innerhalb von 14-17 Minuten auf 40 °C weitererwärmt und für weitere 24 Stunden observiert. Die ungeschädigten normothermen HL-1 Kardiomyozyten werden im Folgenden als 37 °C Kontrolle, beziehungsweise nach weiterer Erwärmung auf Fieber als 40 °C Kontrolle bezeichnet.



**Abbildung 2: Zeit-Temperatur-Protokoll.** HL-1 Kardiomyozyten wurden einer sechsständigen Oxygen-Glucose-Deprivation (OGD) mit intranschämischer therapeutischer Hypothermie und anschließender Reperfusion (OGD/R) unterzogen. Nach 24-stündiger Hypothermie erfolgte die Wiedererwärmung auf 37 °C, nach weiteren zwei Stunden wurden die HL-1 Zellen auf 40 °C Fieber für weitere 24 Stunden erwärmt, während Kontrollgruppen bei 37°C kultiviert wurden.



**Abbildung 3: Übersicht über die verschiedenen Versuchsgruppen.**

## **7.4 Bestimmung der LDH-Konzentration**

Die LDH ist ein ubiquitär zytosolisch vorhandenes Enzym, das bei Membranschädigung und unter nekrotischem Zelltod in den Extrazellularraum gelangt. Die Zytotoxizität der verschiedenen Versuchsgruppen wurde zum jeweiligen Zeitpunkt mit Hilfe des Cytotoxicity Detection Kit durch die kolorimetrische Messung der LDH-Aktivität im Zellkultur-Überstand ermittelt. Das Kit funktioniert über die LDH-abhängige Reduktion des gelben Tetrazolium Salzes zum roten Formazan Salz, das anschließend photometrisch quantifiziert werden kann. Zur Messung wurde zu den jeweiligen Versuchszeitpunkten der Überstand der Versuchsgruppen abgenommen und für zehn Minuten bei 10.000 xg zentrifugiert. Anschließend wurden die zellfreien Überstände in neue Gefäße überführt. Entsprechend den Empfehlungen des Herstellers wurde eine Dreifachbestimmung vorgenommen, wobei jeweils 100 µl Probe zusammen mit 100 µl Reaktionslösung, bestehend aus der Farblösung INT und Natrium-Laktat sowie dem Katalysator Diaphorase/NAD<sup>+</sup> in einem Verhältnis 1:46, in Wells einer 96-Multiwellplatte gegeben wurde. Die photometrische Messung erfolgte zehn Mal alle zwei Minuten bei 492 nm. Zur Auswertung wurde ein Messzeitpunkt gewählt, bei dem die optische Dichte der Proben den Wert 1,5 nicht überschritt. Um die optische Dichte der Versuchsmedien zu berücksichtigen, wurden diese ebenfalls bestimmt und als Hintergrundaktivität von den Messdaten abgezogen. Die 37 °C Kontrolle diente bei der Auswertung als gesunde Bezugsgruppe, auf welche die anderen Versuchsgruppen des jeweiligen Zeitwertes normalisiert wurden. Die graphische Darstellung erfolgte im Säulendiagramm mit dem Programm GraphPad Prism 5.

## **7.5 Western Blot**

### **7.5.1 Proteingewinnung**

Für die Proteingewinnung wurden die Petrischalen zu den jeweiligen Versuchszeitpunkten auf Eis gelegt, um alle weiteren zellulären Vorgänge zu stoppen.

Die Überstände wurden für die LDH-Messung zur Bestimmung der Zytotoxizität verwendet. Nachdem die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen wurden, erfolgte mit einem Zellschaber die mechanische Ablösung von den Petrischalen in 1,5 ml PBS. Diese wurden in Reaktionsgefäße überführt und für zehn Minuten bei 4 °C und 10.000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Zellpellet je nach Größe in 50-120 µl RIPA Puffer resuspendiert. Der RIPA-Puffer wurde jeweils 1:100 mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren versetzt (siehe Tabelle 10). Hierdurch wurden die Zellmembranen aufgebrochen sowie die intrazellulären Proteine gelöst und stabilisiert. Die aufgelösten Zellpellets wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

**Tabelle 10: Zusammensetzung des RIPA-Puffers** mit den jeweiligen Protease-Inhibitoren zur Resuspension der Proteine.

<b>Zusammensetzung des RIPA-Puffers</b>	<b>1:100 zugesetzt mit</b>
50 mM Tris-HCl (pH 7,5)	Natriumorthovanadat
150 mM NaCl	
1% Trition-X-100	Phosphatase Inhibitor Cocktail 3
0,1% Natriumdodecylsulfat (SDS)	
0,5% Na-Deoxycholate	cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor, als Tablette aufgelöst in 1 ml dH <sub>2</sub> O
2 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (pH 8)	

### 7.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay

Das BCA Protein Assay dient der Bestimmung der Proteinkonzentration. Hierfür wurden die Proben in der RIPA Pufferlösung auf Eis aufgetaut, gevortext und für zehn Minuten bei 4 °C und 12.000 xg zentrifugiert. Die von unlöslichen Zellbestandteilen getrennten Proteinüberstände wurden anschließend zur Konzentrationsbestimmung 1:10 mit deionisiertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) verdünnt. Von diesen wurden jeweils 20 µl in einer Zweifachbestimmung in eine 96-Multiwell Platte pipettiert. Für die quantitative

Proteinbestimmung wurde eine Albumin-Standardreihe von 1000-62,5 µg/ml Albumin und dH<sub>2</sub>O in Zweifachbestimmung bei der Messung mitgeführt. Nach Angaben des Herstellers wurde die BCA-Reagenzmischung aus Reagenz 1 und Reagenz 2 im Verhältnis 1:51 angesetzt und jeweils 200 µl in jedes Well gegeben. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei 37 °C, erfolgte die Messung der Extinktion an einem Photometer bei 570 nm. Die Standardreihe diente anschließend zur Berechnung der Proteinkonzentrationen.

### 7.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Entsprechend der gemessenen Proteinkonzentration wurden je 20-35 µg Proteine mit dH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 25-42,5 µl gebracht und mit einem Dithiothreitol enthaltenden Probenpuffer (Pierce Lane Marker Reducing Sample Buffer, 5x) im Verhältnis 1:5 angesetzt. Anschließend wurden die Proben für fünf Minuten bei 95 °C gekocht, um die enthaltenen Proteine zu denaturieren und deren dreidimensionale Struktur aufzubrechen. Dabei werden die Disulfidbrücken der Tertiärstruktur durch Dithiothreitol aus dem Probenpuffer aufgebrochen und die Proteine werden durch SDS im Gel als anionisches Detergenz in ihre lineare Form überführt. Dies ist erforderlich, um die Proteine in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufzutrennen. Hierfür wurden ein 5% Sammelgel zur Bündelung der Proben auf einem 15% Trenngel zur Auftrennung der Proben verwendet. Die beiden Gelkomponenten setzten sich wie folgend zusammen:

**Tabelle 11: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel** für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Mengenangaben beziehen sich auf 2 Gele.

Gel	dH <sub>2</sub> O	Acrylamid	Puffer	10% SDS	10% APS	TEMED
<b>Sammelgel 5%</b>	4,5 ml	810 µl	1,9 ml 0,5M TRIS/HCL pH 6,8	75 µl	57 µl	19 µl
<b>Trenngel 15%</b>	4,8 ml	6 ml	3,8 ml 1,5M TRIS/HCL pH 8,8	150 µl	75 µl	30 µl

Neben den Proben wurden in jedem Gel 5 µl des PageRuler Prestained Protein Ladder als molekularen Größenmarker geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur zuerst für 15-20 Minuten bei 60 V, bis die Proteine im Trenngel angekommen waren und anschließend für 1,5-2,5 Stunden bei 100 V zur Auftrennung der Proteine. Der verwendete Elektrophoresepuffer bestand aus 25 mM TRIS, 250 mM Glycin und 0,1% SDS.

#### **7.5.4 Western Blotting**

Mithilfe der Tank-Blot-Methode wurden die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert, die zuvor für mindestens fünf Minuten in 100% Methanol aktiviert wurde. Zur Übertragung der Proteine wurden das Gel und die PVDF-Membran mit Filterpapieren und Schaumstoffschwämmen in eine Kunststoffkassette gespannt, die in die Blot-Kammer gesetzt werden konnte. Um Lufteinschlüsse zu vermeiden, wurden Filterpapiere und Schwämme zuvor in Blottingpuffer eingeweicht. Dieser bestand aus 192 mM Glycin, 25 mM TRIS sowie 20% Methanol. Das Blotten erfolgte über Nacht bei 4 °C und 30 V, oder für 2,5-3,5 Stunden bei 4 °C und 100 V. Anschließend wurden die Membranen aus der Kassette genommen, mit Leitungswasser abgespült und für fünf Minuten mit Ponceau-Lösung aus 0,1% Ponceau S, 5% reiner Essigsäure und dH<sub>2</sub>O gefärbt. Vor der weiteren Verarbeitung wurden die Membranen üblicherweise bei 55 kDa geschnitten.

#### **7.5.5 Immundetektion und Densitometrie**

Abhängig vom detektierenden Protein und dessen spezifischem Antikörper wurden die Membranen für mindestens eine Stunde geblockt in 5% bovines Serumalbumin (BSA) oder 5% Magermilchpulver, jeweils in einfachem TBST (siehe Tabelle 12) gelöst. Daraufhin inkubierten die Membranen auf einem Schüttler über Nacht bei 4 °C im Primärantikörper, der je nach Herstellerinformation in Konzentrationen von 1:500 bis 1:15.000 in der jeweiligen Blockierlösung angesetzt wurde (siehe Tabelle 13). Am

folgenden Tag wurden die Membranen auf dem Schüttler viermal für mindestens fünf Minuten in TBST gewaschen und für eine Stunde im Sekundärantikörper inkubiert, der 1:20.000 in TBST gelöst war. Nach vier weiteren Waschschritten von je fünf Minuten auf dem Schüttler wurden die Membranen auf Kunststofffolien gelegt und für fünf Minuten mit Super Signal Dura behandelt, um die Antikörper in der ChemiDoc detektieren zu können. Die Reagenzien im Super Signal Dura beinhalten Peroxid und Luminol. Letzteres wird durch das Enzym Meerrettichperoxidase am Sekundärantikörper oxidiert, wobei ein lumineszierendes Signal entsteht, das detektiert und quantifiziert werden kann. Mit dem Programm Quantity One<sup>TM</sup> wurden von den Membranen mehrere Aufnahmen mit steigender Belichtungszeit und außerdem ein Lichtbild für die Abgleichung des Signals mit dem molekularen Marker genommen. Da sich die Densitometrie direkt proportional zur Konzentration des jeweiligen Antikörpers verhält, gibt deren Analyse Aufschlüsse auf die relative Quantität des untersuchten Proteins in der jeweiligen Probe. Die densitometrische Auswertung der einzelnen Banden erfolgte mit dem Programm ImageLab, Version 5.2.1. Die so ermittelten Werte wurden jeweils auf  $\beta$ -Actin bezogen, ein ubiquitäres Strukturprotein des Zytoskeletts, dessen Expression nicht durch die verschiedenen Versuchsbedingungen beeinflusst wird. Außerdem wurden die Versuchsgruppen auf die 37 °C Kontrolle des jeweiligen Zeitwertes normalisiert, sodass die graphische Darstellung semiquantitativ als relative Änderung zur Kontrolle erfolgte.

Nach erfolgter Messung wurden die Membranen erneut viermal für fünf Minuten auf dem Schüttler gewaschen und entweder direkt für eine weitere Immunfärbung eingesetzt oder gestrippt, wobei alle an der Membran gebundenen Antikörper von dieser gelöst werden, um die Bindungsstellen für andere Antikörper freizugeben. Hierfür wurden die Membranen drei Mal für zehn Minuten mit jeweils 3 ml Stripping-Puffer (siehe Tabelle 12) behandelt. Nachdem die Membranen danach weitere vier Mal für fünf Minuten mit TBST auf dem Schüttler gewaschen wurden, konnten sie

erneut geblockt und mit einem neuen Primärantikörper inkubiert werden. Die Membranen wurden maximal sechs Mal gestrippt.

**Tabelle 12: Zusammensetzung der für die Antikörperfärbungen verwendeten Pufferlösungen.**

<b>1x TBST</b>	<b>Stripping-Puffer</b>
20 mM TRIS	Guanidin Hydrochlorid 6 M
140 mM NaCl	Triton X-100 0,3%
0,05% Tween20	Tris-Hcl 20 mM pH 7,5
dH <sub>2</sub> O	β-Mercaptoethanol 0,1 M
pH 7,6, eingestellt mit 5 M HCl	dH <sub>2</sub> O

**Tabelle 13: Anwendung und Konzentrationen der verwendeten Antikörper.**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Blockierung</b>	<b>Sekundärantikörper</b>
β-Actin	1:15.000 in 5% BSA in TBST	5% BSA in TBST	Donkey anti Rabbit 1:20.000
Caspase-3	1:500 in 5% Magermilch in TBST	5% Magermilch in TBST	Donkey anti Rabbit 1:20.000
RBM3	1:1.000 in 5% Magermilch in TBST	5% Magermilch in TBST	Donkey anti Rabbit 1:20.000

## 7.6 Quantitative Echtzeit-PCR

### 7.6.1 Isolation der RNA

Die Isolation der RNA erfolgte mit dem GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit nach einem Säulenprinzip entsprechend dem Protokoll für Zellkulturen des Herstellers. Hierfür wurden die Petrischalen zu den jeweiligen Versuchszeitpunkten aus den Inkubatoren direkt auf Eis gelegt. Die Überstände wurden für die LDH-Messung abgenommen und die Petrischalen mit je 2 ml PBS in mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem RNase-freiem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die HL-1 Zellen direkt in der Petrischale mit 400 µl RL Puffer mit 10 mM Dithiothreitol lysiert und einige Male resuspendiert. Das Lysat wurde in die

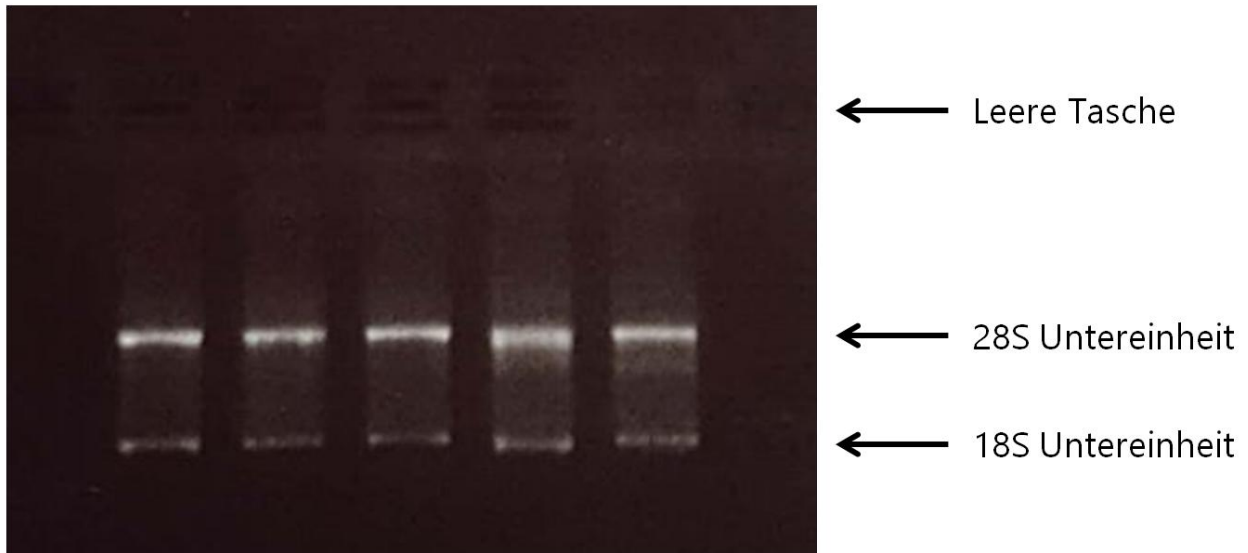


Homogenisierungssäulen überführt, die zuvor mit je 30 µl des Puffers A aktiviert wurden. Nachdem die Homogenisierungssäulen für zwei Minuten bei 11.000 xg zentrifugiert worden waren, wurden die Durchflüsse mit 250 µl 99% Ethanol resuspendiert und in RNA-bindende Säulen überführt, in denen sie erneut für eine Minute bei 11.000 xg zentrifugiert wurden. Der entstandene Durchfluss wurde dekantiert, ebenso nach einem Waschschrift mit 400 µl Wash DN1 Puffer und Zentrifugation für eine Minute bei 11.000 xg. Es folgten zwei weitere Waschschriffe der RNA-bindenden Säulen mit 600 µl und 300 µl Wash RBW Puffer und eine bzw. zwei Minuten Zentrifugation bei 11.000 xg. Nach diesem Schritt wurden die Auffangbehälter der Säulen durch frische RNase-freie Reaktionsgefäße ersetzt. Die RNA in den Membranen der Säulen wurde durch Zugabe von 40 µl RNase-freiem Wasser von diesen gelöst und beim Zentrifugieren für eine Minute bei 11.000 xg im Gefäß aufgefangen. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

### **7.6.2 Beurteilung der RNA mittels Agarose-Gel**

Um die Integrität und Reinheit der RNA zu beurteilen, wurde sie vor jeder Umschreibung in komplementäre DNA (cDNA) in einem Agarose Gel überprüft. Hierfür wurden die Proben auf Eis aufgetaut und deren Konzentration ermittelt. Die quantitative Messung erfolgte mit jeweils 2 µl RNA im NanoDrop 2000c Spektralphotometer bei 260 und 280 nm. Der Quotient aus den Messungen dieser beiden Wellenlängen gab Aufschluss auf die Reinheit der Proben, wobei ein Wert von näherungsweise zwei angestrebt wurde. Entsprechend der gemessenen Konzentrationen wurden je 200-400 ng RNA in DEPC-behandeltem Wasser und 1,5 µl Midori Green vorgelegt. Midori Green diente hier als nicht-toxische Alternative zu Ethidiumbromid zur Färbung von einzelsträngiger und doppelsträngiger DNA und RNA. Die Proben wurden für die RNA-Gelelektrophorese in ein 1% Agarosegel in einfachem TBE Puffer pipettiert. Die Elektrophorese lief für 15-25 Minuten bei 100 V in TBE Puffer. Der TBE Puffer setzte sich aus 44,5 mM Tris Base, 44,5 mM Borsäure und 2 ml EDTA 0,5 M (pH 8,0) in dH<sub>2</sub>O zusammen. Anschließend wurde das

Nucleinsäuresignal im Gel mit einem UV-Transilluminator angeregt und fotografiert. Die RNA wurde als rein und nicht degradiert erachtet, sofern die Geltaschen kein Signal aufwiesen und klare Banden für die 18S und 28S Untereinheiten der ribosomalen RNA zu sehen waren (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Exemplarische Darstellung der RNA in einem 1% Agarose-Gel** im UV-Transilluminator nach 20-minütiger Elektrophorese vom 26.04.2017 mit Proben des Versuchs n15. Zu sehen sind die Proben des Versuchszeitpunktes 53 Stunden. Das Bild wurde eingescannt und nachträglich zugeschnitten.

### 7.6.3 Transkription in komplementäre DNA

Für die Transkription in komplementäre DNA (cDNA) wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit nach Herstellerangaben verwendet. Entsprechend der Konzentrationen wurden idealerweise 2.000 ng RNA mit dH<sub>2</sub>O für die Umschreibung vorgelegt. Konnte die Menge von 2.000 ng RNA bei einem maximal möglichen Volumen von 13,2 µl nicht eingehalten werden, wurden die Mengen für den kompletten Versuch angepasst, sodass zwischen 448,5 ng und 2.000 ng RNA umgeschrieben wurde. Zu den Proben wurden gemäß den Herstellerangaben jeweils 2 µl 10x RT Puffer und 10x RT Random Primer, 1 µl Multiscribe RT und RNase Inhibitor sowie 0,8 µl 25x dNTP hinzugegeben und auf 20 µl mit DEPC Wasser aufgefüllt. Die RNA wurde im PTC-200 Peltier Thermal Cycler in cDNA

umgeschrieben. Dabei wurden die Proben für zehn Minuten bei 25 °C, gefolgt von 120 Minuten bei 37 °C und anschließend fünf Minuten bei 85 °C inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei 4 °C gelagert.

#### **7.6.4 Quantitative Echtzeit-PCR**

Die quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) ermöglicht es, Aussagen bezüglich der relativen Änderung der Genexpression zwischen den verschiedenen Proben in Echtzeit zu treffen. Hierfür wurden die Abschnitte der Ziel-Gene der umgeschriebenen cDNA mittels TaqMan Gene Expression Assays amplifiziert. Die enthaltenen TaqMan-Sonden besitzen ein Oligonukleotid, das einen Reporter mit fluoreszierendem Molekül am 5'-Ende (6-Carboxyfluorescein, FAM) und ein Quencher-Fluoreszenzmolekül am 3'-Ende (6-carboxy-tetramethylrhodamine, TAMRA) trägt. Bei spezifischer Bindung der Sonde an die cDNA-Einzelstränge, absorbiert das Quencher-Fluoreszenzmolekül das fluoreszierende FAM-Signal des Reporters durch ihre enge Lagebeziehung zueinander. Wird der cDNA-Strang dagegen durch die Taq-Polymerase dupliziert, kommt es zur Trennung von Quencher-Fluoreszenzmolekül und Reporter, das FAM-Signal wird wieder emittiert und kann detektiert werden. Da sich das FAM-Signal proportional zur Menge der amplifizierten cDNA verhält, konnte über den Zyklus, in dem ein überschwelliges Signal detektiert wurde, Rückschluss auf die relative Menge spezifischer RNA des Ziel-Gens in der ursprünglichen Probe gezogen werden. (111) Die Reaktionsschritte der qRT-PCR im StepOnePlus™ Real-Time PCR System umfassten zwei Minuten bei 50 °C mit anschließenden zehn Minuten bei 95 °C. Darauf folgten 40 Zyklen mit jeweils 15 Sekunden bei 95 °C und eine Minute bei 60 °C.

Die Messung der Proben erfolgte in Dreifachbestimmung. In jedes Well einer 96-well PCR-Platte wurden 5 µl TaqMan Gene Expression Master Mix, 0,5 µl des Sonden Mixs und 2 µl DEPC Wasser vorgelegt. Hinzugegeben wurden jeweils 11-50 ng cDNA aufgefüllt auf 2,5 µl mit DEPC Wasser. Die PCR-Platte wurde anschließend mit einer adhäsiven PCR-Folie versiegelt und kurz zentrifugiert, bevor die qRT-PCR im StepOne

Plus Real-Time PCR-System gestartet wurde. Als Referenz diente für alle Messungen das ubiquitäre Enzym Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), welches keinen Schwankungen der Gen-Expression unterliegt. Um die relative Änderung der Genexpression des Ziel-Gens zur 37 °C Kontrolle zu berechnen, wurde die delta-delta CT Methode verwendet. (112) So wurden die Expressionsmuster der pro-inflammatorischen Signalmoleküle TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , SOCS3, COX-2 und MCP-1 sowie des Markers für oxidativen Stress iNOS und des zytoprotektiven Kälteschockproteins RBM3 ermittelt.

## **7.7 Statistische Analyse**

Alle Versuche wurden mindestens drei Mal mit HL-1 Zellen unterschiedlicher Passage unabhängig voneinander wiederholt. Zur graphischen Darstellung und anschließender statistischen Analyse diente das Programm GraphPad Prism 5. Verwendet wurde der One-way ANOVA Test für den Vergleich multipler Gruppen mit Tuckey post Test. Statistisch signifikant wurden P-Werte < 0,05 angesehen und mit einem \* markiert, bzw. mit einem # bei signifikanter Differenz zur 37 °C Kontrolle. Alle Ergebnisse wurden mit  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

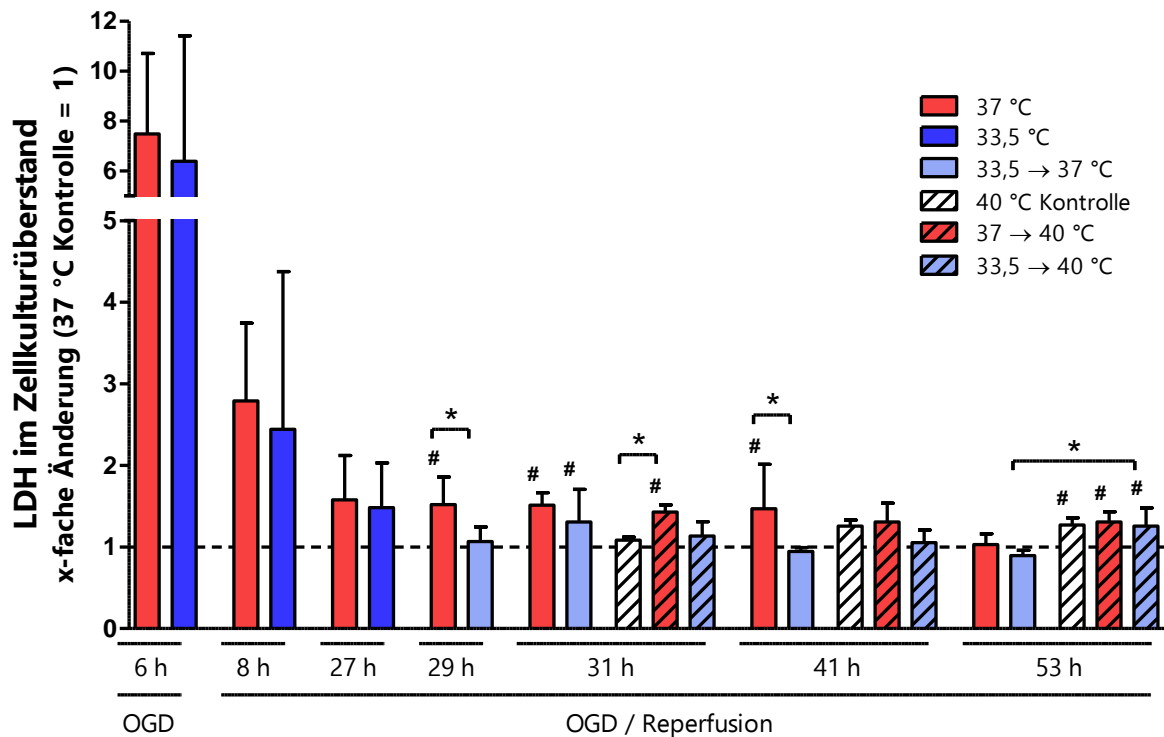
## 8 Ergebnisse

### 8.1 Nekrotischer Zelltod

Die im Überstand gemessene LDH-Konzentration diente als Marker für den nekrotischen Zelltod. (20) Nach sechsstündiger OGD (Versuchszeitpunkt sechs Stunden) zeigte sich ein nicht signifikanter Anstieg des extrazellulären LDH in sowohl gekühlten, als auch ungekühlten OGD/R-geschädigten Kardiomyozyten (Abbildung 5). Danach erfolgte ein Mediumwechsel um die Reperfusion *in vitro* zu simulieren, sodass der LDH-Gehalt während der Reperfusion nicht mit dem in der OGD sezernierten LDH akkumulieren konnte. So war zum Versuchszeitpunkt acht Stunden ebenso kein signifikanter Anstieg der LDH-Aktivität zu sehen. Der Einsatz von Hypothermie erbrachte bis zum Ende der Kühlungsphase (Versuchszeitpunkte sechs bis 27 Stunden) keinen Vorteil bezüglich des nekrotischen Zelltodes der gekühlten, gegenüber den ungekühlten OGD/R-geschädigten HL-1 Kardiomyozyten. In den ungekühlten OGD/R-geschädigten Zellen wurde signifikant gesteigerte LDH-Werte zu den Versuchszeitpunkten 29, 31 und 41 Stunden im Vergleich zu der 37 °C Kontrolle gemessen. Die Kühlung während der OGD/R konnte die LDH Ausschüttung nach der Wiedererwärmung auf 37 °C zu den Versuchszeitpunkten 29 und 41 Stunden signifikant im Vergleich zu den ungekühlten OGD/R-geschädigten Zellen vermindern. Dieser Effekt war 26 Stunden nach der Wiedererwärmung (Versuchszeitpunkt 53 Stunden) nicht mehr zu sehen.

Eine weitere Erwärmung der OGD/R-geschädigten Zellen auf 40 °C führte nach zwei Stunden (Versuchszeitpunkt 31 Stunden) zu einem signifikanten Anstieg der extrazellulären LDH bei den ungekühlten OGD/R-geschädigten Zellen. Während sich durch zwölfstündiges Fieber keine signifikante Steigerung der LDH zeigte, war diese nach 24 Stunden Fieber (Versuchszeitpunkt 53 Stunden) bei geschädigten Kardiomyozyten und bei der 40 °C Kontrolle erhöht. Zudem war die LDH nach 24-

stündigem Fieber bei den gekühlten OGD/R-geschädigten HL-1 Zellen signifikant gesteigert gegenüber der gleichen Gruppe, die auf 37 °C erwärmt wurde.



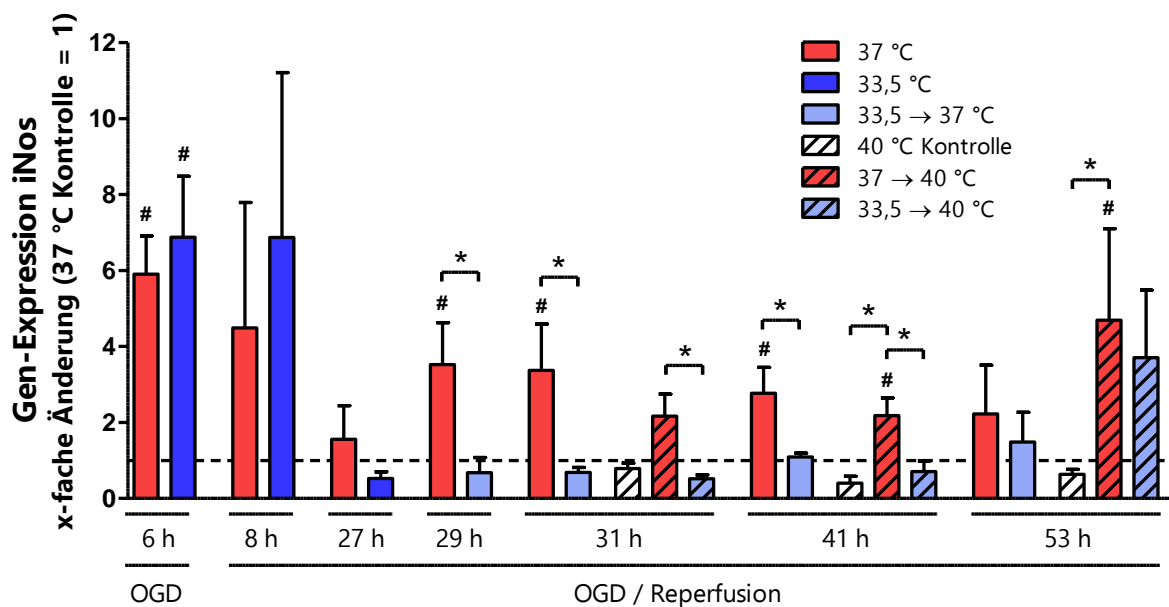
**Abbildung 5: Extrazelluläres LDH im Zellkulturüberstand.** HL-1 Kardiomyozyten wurden einer sechsständigen Oxygen-Glucose-Deprivation (OGD) mit intranschämischer therapeutischer Hypothermie und anschließender Reperfusion (OGD/R) unterzogen. Nach 24-stündiger Hypothermie erfolgte die Wiedererwärmung auf 37 °C, nach weiteren zwei Stunden wurden die HL-1 Zellen auf ein Fieber von 40 °C für weitere 24 Stunden erwärmt, während Kontrollgruppen bei 37 °C kultiviert wurden. Dargestellt wurde die x-fache Änderung zur 37 °C Kontrolle als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n = 3$ . \* $P < 0,05$  entsprach einer Signifikanz im Gruppenvergleich und # $P < 0,05$  im Vergleich zur 37 °C Kontrolle.

## 8.2 Oxidativer Stress

INOS synthetisiert NO und treibt den oxidativen Stress der Kardiomyozyten voran. (29) Während der sechsständigen OGD (Versuchszeitpunkt sechs Stunden) konnte ein Anstieg der Gen-Expression von iNOS in den gekühlten und ungekühlten OGD/R-geschädigten HL-1 Kardiomyozyten gegenüber der 37 °C Kontrolle festgestellt werden (Abbildung 6). In der frühen Reperfusion (Versuchszeitpunkte acht und 27 Stunden) war kein signifikanter Anstieg an iNOS detektierbar. Nach längerer Reperfusion (Versuchszeitpunkte 29 bis 41 Stunden) zeigte sich jedoch ein Anstieg in

den ungekühlten OGD/R-geschädigten Kardiomyozyten gegenüber der gekühlten geschädigten Zellen und der 37 °C Kontrolle. In den mit Hypothermie behandelten OGD/R-geschädigten Zellen zeigte sich auch nach der Wiedererwärmung auf 37 °C keine Induktion von iNOS (Versuchszeitpunkte 27 bis 53 Stunden).

Auch unter Fieber wurde nur in ungekühlten OGD/R-geschädigten Zellen ein Anstieg der iNOS-Expression gegenüber der 37 °C und der 40 °C Kontrolle festgestellt (Versuchszeitpunkte 41 und 53 Stunden). Unter 24-stündigem Fieber war die Hypothermie-vermittelte Inhibition der iNOS-Expression allerdings aufgehoben (Versuchszeitpunkt 53 Stunden). Die 40 °C Kontrolle zeigte unter Fieber keine Induktion der Expression von iNOS.



**Abbildung 6: Intrazelluläre Gen-Expression von iNOS.** HL-1 Kardiomyozyten wurden einer sechsstündigen Oxygen-Glucose-Deprivation (OGD) mit inraischämischer therapeutischer Hypothermie und anschließender Reperfusion (OGD/R) unterzogen. Nach 24-stündiger Hypothermie erfolgte die Wiedererwärmung auf 37 °C, nach weiteren zwei Stunden wurden die HL-1 Zellen auf ein Fieber von 40 °C für weitere 24 Stunden erwärmt, während Kontrollgruppen bei 37 °C kultiviert wurden. Dargestellt wurde die x-fache Änderung zur 37 °C Kontrolle als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n = 3-5$ . \* $P < 0,05$  entsprach einer Signifikanz im Gruppenvergleich und # $P < 0,05$  im Vergleich zur 37 °C Kontrolle.

## 8.3 Pro-inflammatorische Signalmoleküle

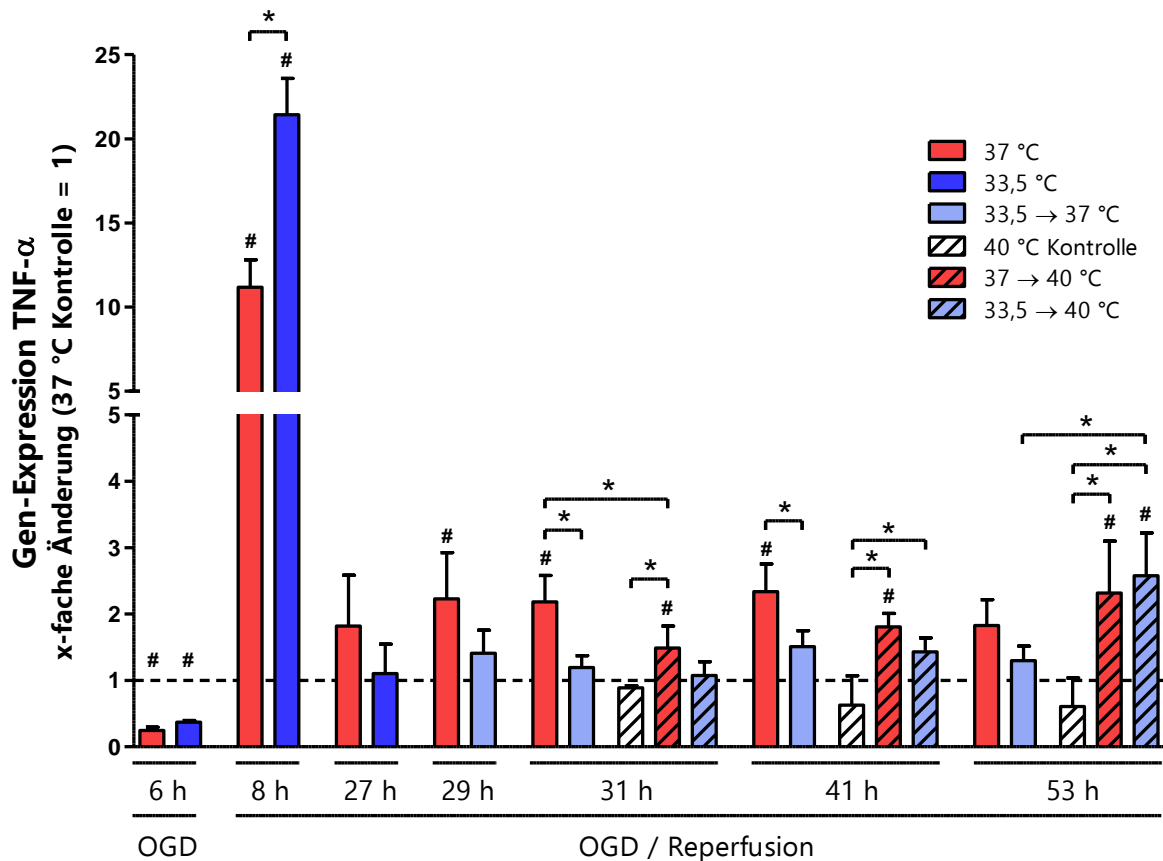
### 8.3.1 TNF- $\alpha$

Der pro-inflammatorische TNF- $\alpha$  spielt eine wesentliche Rolle an der Induktion und Progression inflammatorischer Prozesse und ist als endogenes Pyrogen an der Genese von Fieber beteiligt. (22, 23, 113) Die OGD (Versuchszeitpunkt sechs Stunden) inhibierte die Genexpression von TNF- $\alpha$  signifikant in gekühlten und ungekühlten OGD-geschädigten Kardiomyozyten gegenüber der 37 °C Kontrolle (Abbildung 7). In der frühen Reperfusion (Versuchszeitpunkt acht Stunden) zeigte sich ein signifikanter Anstieg in sowohl ungekühlten als auch gekühlten OGD/R-geschädigten Kardiomyozyten gegenüber der 37 °C Kontrolle. Eine Hypothermie bewirkte allerdings eine signifikant stärkere Gen-Expression von TNF- $\alpha$  als in ungekühlten OGD/R-geschädigten Kardiomyozyten. Dieser Effekt der Hypothermie war in der späten Reperfusion und nach der Wiedererwärmung auf 37 °C (Versuchszeitpunkte 27 bis 53 Stunden) in den gekühlten OGD/R-geschädigten HL-1 Zellen nicht mehr zu sehen. Die Wiedererwärmung auf 37 °C führte zu keinem Anstieg der Gen-Expression von TNF- $\alpha$ . Die ungekühlten OGD/R-geschädigten Kardiomyozyten wiesen in der späten Reperfusion eine signifikante Induktion von TNF- $\alpha$  gegenüber der 37 °C Kontrolle (Versuchszeitpunkte 29 bis 31 Stunden) sowie den gekühlten OGD/R-geschädigten Zellen (Versuchszeitpunkte 31 und 41 Stunden) auf. Nach 47 Stunden Reperfusion (Versuchszeitpunkt 53 Stunden) war die Expression von TNF- $\alpha$  weder in ungekühlten, noch gekühlten OGD/R-geschädigten Kardiomyozyten gesteigert.

Nach Induktion des Fiebers, zeigte sich zunächst nur in ungekühlten OGD/R-geschädigten Kardiomyozyten ein Anstieg der TNF- $\alpha$ -Expression (Versuchszeitpunkte 31 und 41 Stunden) im Vergleich zur 37 °C und 40 °C Kontrolle. In den OGD/R-geschädigten Zellen war nach zwölf- und 24-stündigem Fieber ein signifikanter Anstieg der TNF- $\alpha$ -Expression gegenüber der 40 °C Kontrolle zu beobachten. Zum Versuchszeitpunkt 53 Stunden wiesen die gekühlten OGD/R-geschädigten HL-1



Kardiomyozyten zudem eine signifikante Induktion gegenüber derselben Gruppe bei 37 °C auf. Somit war der protektive Effekt der Hypothermie nach 24-stündigem Fieber nicht mehr vorhanden. In der 40 °C Kontrolle konnte die Erwärmung auf Fieber über den gesamten Beobachtungszeitraum keine Induktion der Genexpression von TNF- $\alpha$  auslösen.

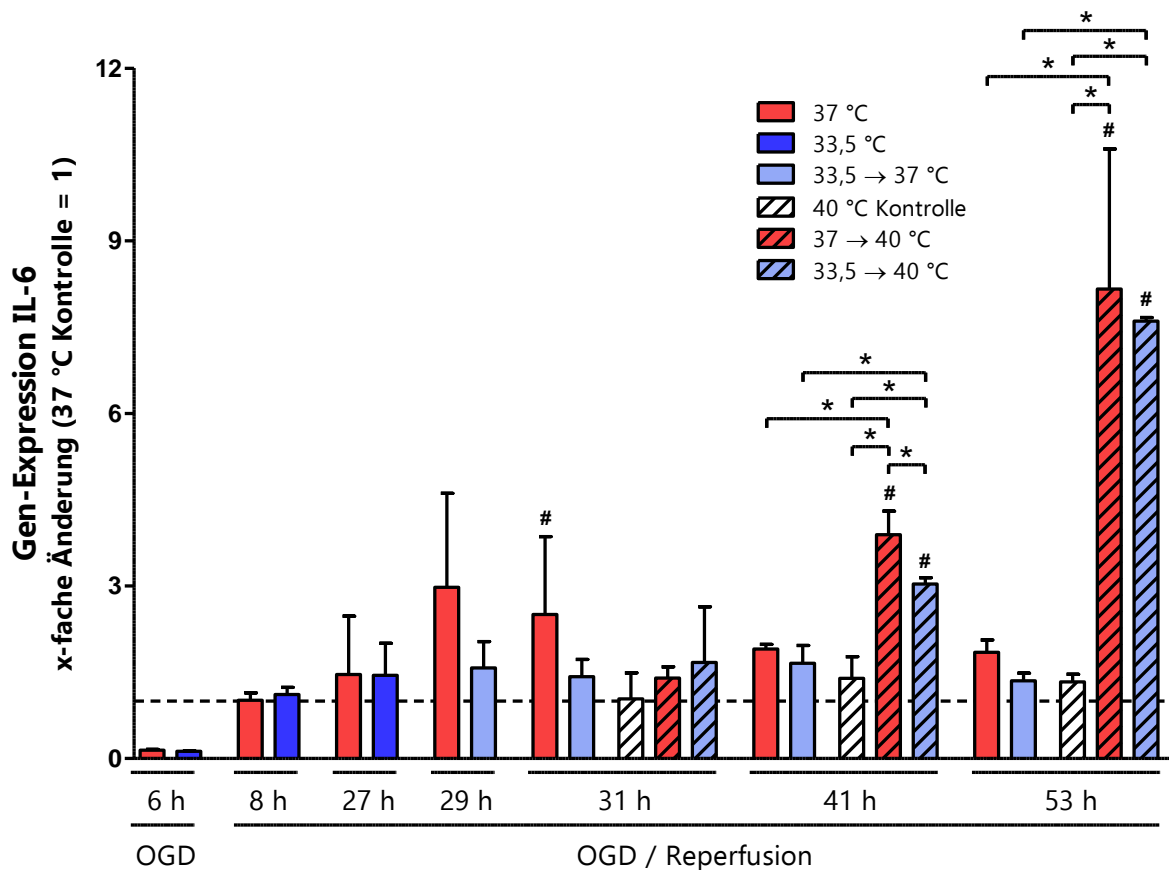


**Abbildung 7: Intrazelluläre Gen-Expression von TNF- $\alpha$ .** HL-1 Kardiomyozyten wurden einer sechsständigen Oxygen-Glucose-Deprivation (OGD) mit intraischämischer therapeutischer Hypothermie und anschließender Reperfusion (OGD/R) unterzogen. Nach 24-stündiger Hypothermie erfolgte die Wiedererwärmung auf 37 °C, nach weiteren zwei Stunden wurden die HL-1 Zellen auf ein Fieber von 40 °C für weitere 24 Stunden erwärmt, während Kontrollgruppen bei 37 °C kultiviert wurden. Dargestellt wurde die x-fache Änderung zur 37 °C Kontrolle als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n = 3-5$ . \* $P < 0,05$  entsprach einer Signifikanz im Gruppenvergleich und # $P < 0,05$  im Vergleich zur 37 °C Kontrolle.

### 8.3.2 IL-6

Das pro-inflammatorische IL-6 wird als Reaktion auf verschiedene endogene und exogene Schädigungsmechanismen exprimiert, um inflammatorische Prozesse und die Entstehung von Fieber zu vermitteln. (22, 23, 113) Wie TNF- $\alpha$  war auch die Genexpression des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 durch die OGD inhibiert (Versuchszeitpunkt sechs Stunden) (Abbildung 8). Während der ersten 25 Stunden der Reperfusion (Versuchszeitpunkt acht bis 29 Stunden) war weder in den ungekühlten, noch in den gekühlten OGD/R-geschädigten HL-1 Kardiomyozyten eine Induktion der IL-6-Expression zu beobachten. Erst in der späten Reperfusion (Versuchszeitpunkt 31 Stunden) zeigte sich in ungekühlten OGD/R-geschädigten Kardiomyozyten ein signifikanter Anstieg von IL-6 gegenüber der 37 °C Kontrolle. Durch den Einsatz von Hypothermie verblieb die Genexpression von IL-6 über die gesamte Reperfusiondauer, vor und auch nach der Wiedererwärmung auf 37 °C (Versuchszeitpunkte acht bis 53 Stunden) auf dem Niveau der 37 °C Kontrolle.

Eine weitere Erwärmung der OGD/R-geschädigten Zellen auf 40 °C führte nach zwölf und 24 Stunden Fieber (Versuchszeitpunkte 41 und 53 Stunden) zu einem signifikanten Anstieg in ungekühlten und gekühlten OGD/R-geschädigten HL-1 Zellen im Vergleich zu der 37 °C und 40 °C Kontrolle, sowie zu ihrem OGD/R-geschädigten Korrelat auf 37 °C. Nach zwölf Stunden Fieber (Versuchszeitpunkt 41 Stunden) war durch die vorausgegangene Hypothermie eine signifikante Reduktion der IL-6-Expression in den auf 40 °C erwärmten OGD/R-geschädigten Zellen zu verzeichnen. Nach 24-stündigem Fieber (Versuchszeitpunkt 53 Stunden) war dieser protektive Effekt der Hypothermie nicht mehr nachweisbar. Die IL-6 Expression der 40 °C Kontrolle zeigte auch nach 24 Stunden Fieber keine Induktion.



**Abbildung 8: Intrazelluläre Gen-Expression von IL-6.** HL-1 Kardiomyozyten wurden einer sechsstündigen Oxygen-Glucose-Deprivation (OGD) mit intraschämischer therapeutischer Hypothermie und anschließender Reperfusion (OGD/R) unterzogen. Nach 24-stündiger Hypothermie erfolgte die Wiedererwärmung auf 37 °C, nach weiteren zwei Stunden wurden die HL-1 Zellen auf ein Fieber von 40 °C für weitere 24 Stunden erwärmt, während Kontrollgruppen bei 37 °C kultiviert wurden. Dargestellt wurde die x-fache Änderung zur 37 °C Kontrolle als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n = 3-5$ . \* $P < 0,05$  entsprach einer Signifikanz im Gruppenvergleich und # $P < 0,05$  im Vergleich zur 37 °C Kontrolle.

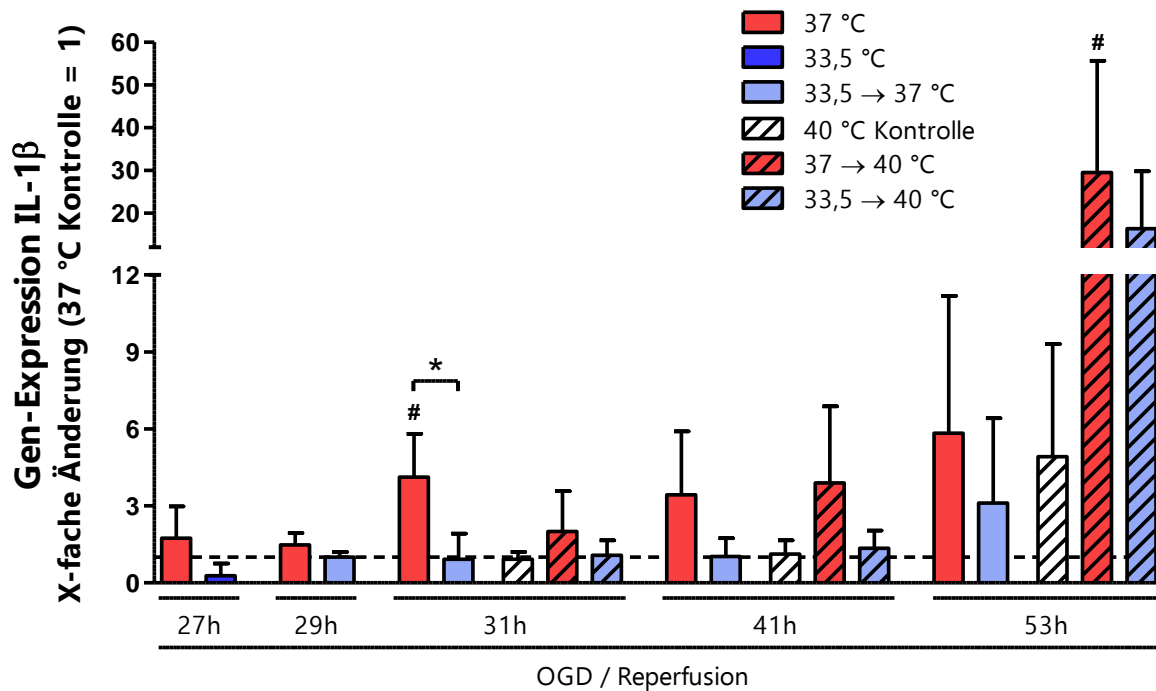
### 8.3.3 IL-1 $\beta$

Das pro-inflammatorische Zytokin IL-1 $\beta$  wird durch die Caspase 1 aus seiner Vorstufe Pro-IL-1 $\beta$  in seine aktive Form IL-1 $\beta$  überführt, um anschließend, neben TNF- $\alpha$  und IL-6, als Mediator von inflammatorischen Prozessen und als endogenes Pyrogen sezerniert zu werden. (23, 113, 114) Die Gen-Expression von IL-1 $\beta$  konnte während der OGD und der frühen Reperfusion nicht in der 37 °C Kontrolle und zum Teil nicht in den OGD/R-geschädigten Kardiomyozyten nachgewiesen werden, sodass keine Messung und Normalisierung der Ergebnisse möglich war. Daher wurden nur Werte

ab Versuchszeitpunkt 27 Stunden graphisch dargestellt, zu welchen eine durchgängige Messung erfolgreich war (Abbildung 9).

In der späten Reperfusion (Versuchszeitpunkte 27, 29, 41 und 53 Stunden) war weder in ungekühlten, noch in gekühlten OGD/R-geschädigten HL-1 Kardiomyozyten eine Induktion von IL-1 $\beta$  feststellbar. Zum Versuchszeitpunkt 31 Stunden war eine signifikant verstärkte Expression von IL-1 $\beta$  in ungekühlten OGD/R-geschädigten HL-1 Zellen gegenüber den gekühlten sowie gegenüber der 37 °C Kontrolle zu verzeichnen. Die gekühlten OGD/R-geschädigten Kardiomyozyten zeigten, ebenso wie bei TNF- $\alpha$  und IL-6, auch für IL-1 $\beta$  keine erhöhte Genexpression nach der Wiedererwärmung auf 37 °C.

Das Fieber führte nach zwei und zwölf Stunden (Versuchszeitpunkte 31 und 41 Stunden) noch zu keiner Induktion von IL-1 $\beta$  in OGD/R-geschädigten Kardiomyozyten. Erst nach 24-stündigem Fieber (Versuchszeitpunkt 53 Stunden) zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Genexpression in den ungekühlten OGD/R-geschädigten HL-1 Zellen gegenüber der 37 °C Kontrolle. Auch die zuvor gekühlten OGD/R-geschädigten Kardiomyozyten wiesen nach 24 Stunden bei 40 °C eine Induktion von IL-1 $\beta$  auf, welche jedoch nicht signifikant war. In Übereinstimmung mit TNF- $\alpha$  und IL-6 war in der 40 °C Kontrolle kein signifikanter Anstieg der Expression von IL-1 $\beta$  zu beobachten.

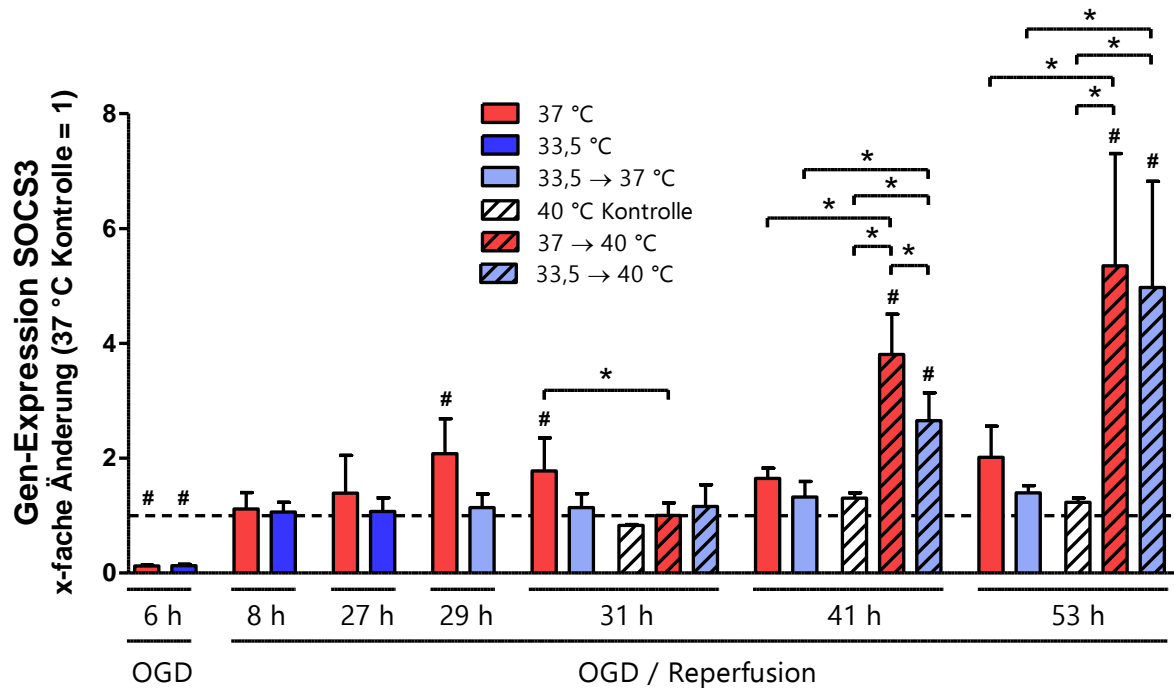


**Abbildung 9: Intrazelluläre Gen-Expression von IL-1β.** HL-1 Kardiomyozyten wurden einer sechsstündigen Oxygen-Glucose-Deprivation (OGD) mit intraintrischämischer therapeutischer Hypothermie und anschließender Reperfusion (OGD/R) unterzogen. Nach 24-stündiger Hypothermie erfolgte die Wiedererwärmung auf 37 °C, nach weiteren zwei Stunden wurden die HL-1 Zellen auf ein Fieber von 40 °C für weitere 24 Stunden erwärmt, während Kontrollgruppen bei 37 °C kultiviert wurden. Dargestellt wurde die x-fache Änderung zur 37 °C Kontrolle als Mittelwert ± SD aus n = 3-4. \*P < 0,05 entsprach einer Signifikanz im Gruppenvergleich und #P < 0,05 im Vergleich zur 37 °C Kontrolle.

### 8.3.4 SOCS3

SOCS3 beeinflusst die Signalwege verschiedener Zytokine und kann somit anti- wie auch pro-inflammatorische Eigenschaften haben. (25, 115) Die mRNA-Expression von SOCS3 verhielt sich äquivalent zu der des Zytokins IL-6 (Abbildung 10). Die OGD (Versuchszeitpunkt sechs Stunden) inhibierte die SOCS3-Expression signifikant in ungekühlten und gekühlten geschädigten Kardiomyozyten. Nach zwei- und 21-stündiger Reperfusion (Versuchszeitpunkte acht und 27 Stunden) war keine Steigerung der Expression von SOCS3 in den ungekühlten und gekühlten OGD/R-geschädigten HL-1 Zellen zu sehen. Erst in der späten Reperfusion (Versuchszeitpunkte 29 und 31 Stunden) zeigte sich ein signifikanter Anstieg in ungekühlten OGD-geschädigten HL-1 Zellen gegenüber der 37 °C Kontrolle. Diese

Induktion der SOCS3-Expression war zu den Versuchszeitpunkten 41 und 53 Stunden allerdings nicht mehr zu sehen. Durch Hypothermie konnte in den OGD/R-geschädigten Kardiomyozyten auch nach der Wiedererwärmung auf 37 °C keine gesteigerte SOCS3-Expression erfasst werden.



**Abbildung 10: Intrazelluläre Gen-Expression von SOCS3.** HL-1 Kardiomyozyten wurden einer sechsstündigen Oxygen-Glucose-Deprivation (OGD) mit intraintravasculärer therapeutischer Hypothermie und anschließender Reperfusion (OGD/R) unterzogen. Nach 24-stündiger Hypothermie erfolgte die Wiedererwärmung auf 37 °C, nach weiteren zwei Stunden wurden die HL-1 Zellen auf ein Fieber von 40 °C für weitere 24 Stunden erwärmt, während Kontrollgruppen bei 37 °C kultiviert wurden. Dargestellt wurde die x-fache Änderung zur 37 °C Kontrolle als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n = 1-5$ . \* $P < 0,05$  entsprach einer Signifikanz im Gruppenvergleich und # $P < 0,05$  im Vergleich zur 37 °C Kontrolle.

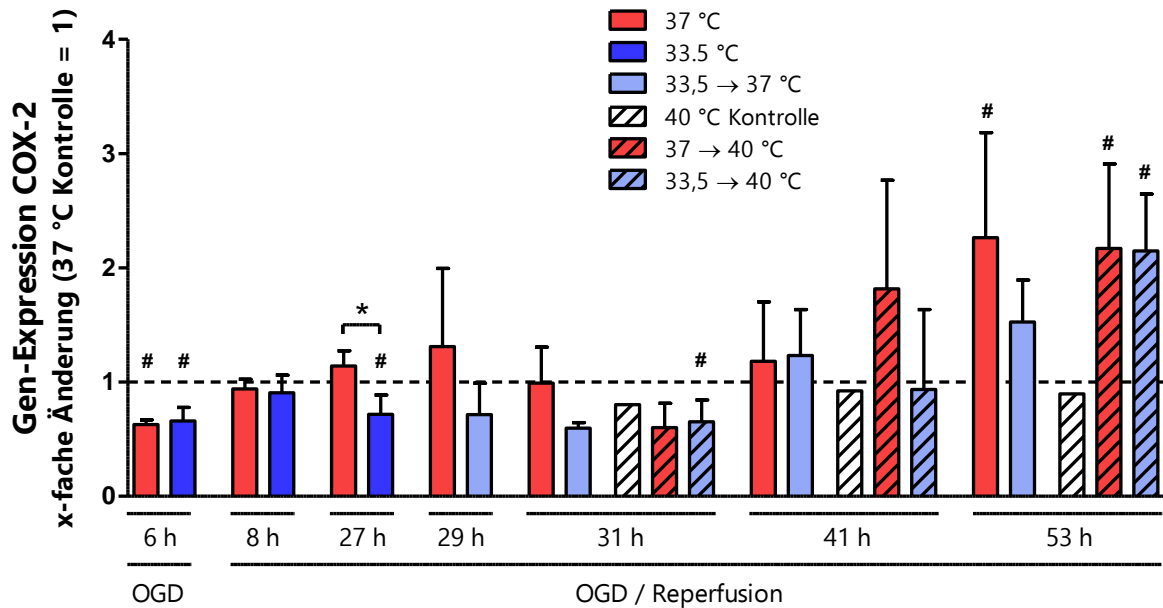
Ähnlich der Gen-Expression von IL-6, war auch die Expression von SOCS3 nach einem Fieber von zwölf und 24 Stunden (Versuchszeitpunkte 41 und 53 Stunden) signifikant induziert in ungekühlten und gekühlten OGD/R-geschädigten Kardiomyozyten verglichen zu den korrelierenden OGD/R-geschädigten Zellen auf 37 °C wie auch zu der 37 °C und 40 °C Kontrolle. Die vorausgegangene Hypothermie konnte nach zwölfstündigem Fieber die Expression von SOCS3 in den gekühlten OGD/R-

geschädigten Zellen gegenüber den ungekühlten hemmen. Nach 24-stündigem Fieber (Versuchszeitpunkt 53 Stunden) war diese Protektion durch Hypothermie aufgehoben. Entsprechend dem Expressionsmuster der anderen Zytokine blieb bei der 40 °C Kontrolle unter Fieber eine Induktion aus.

### **8.3.5 COX-2**

Die COX-2 spielt durch die Synthese von Prostaglandin-H<sub>2</sub> bei inflammatorischen Prozessen eine wichtige Rolle. Anders als die Cyclooxygenase 1 wird sie nicht konstitutiv, sondern als direkte Reaktion auf verschiedene zelluläre Stress- und Schädigungsmechanismen sowie als Reaktion auf die Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  exprimiert. (26) Entsprechend den Expressionsmustern der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-6 zeigte sich die Gen-Expression von COX-2 durch die OGD in gekühlten und ungekühlten OGD/R-geschädigten Kardiomyozyten signifikant vermindert (Abbildung 11). Nach zweistündiger Reperfusion (Versuchszeitpunkt acht Stunden) blieb die Gen-Expression von COX-2 in OGD/R-geschädigten Kardiomyozyten auf dem Niveau der 37 °C Kontrolle. Nach 24-stündiger Hypothermie (Versuchszeitpunkt 27 Stunden) war die Expression von COX-2 in gekühlten gegenüber ungekühlten OGD/R-geschädigten HL-1 Zellen sowie gegenüber der 37 °C Kontrolle signifikant reduziert. Nach der Wiedererwärmung auf 37 °C war kein Unterschied zwischen den Behandlungen messbar (Versuchszeitpunkte 29 bis 41 Stunden). Erst zum Versuchszeitpunkt 53 Stunden war ein signifikanter Anstieg in den ungekühlten OGD/R-geschädigten Kardiomyozyten, jedoch nicht in den gekühlten, gegenüber der 37 °C Kontrolle zu beobachten.

Ein 24-stündiges Fieber (Versuchszeitpunkt 53 Stunden) führte in OGD/R-geschädigten Kardiomyozyten zu einer signifikanten Induktion von COX-2, die durch TH nicht aufgehoben werden konnte. Die 40 °C Kontrolle wies unter Fieber keine Steigerung der Expression von COX-2 auf.



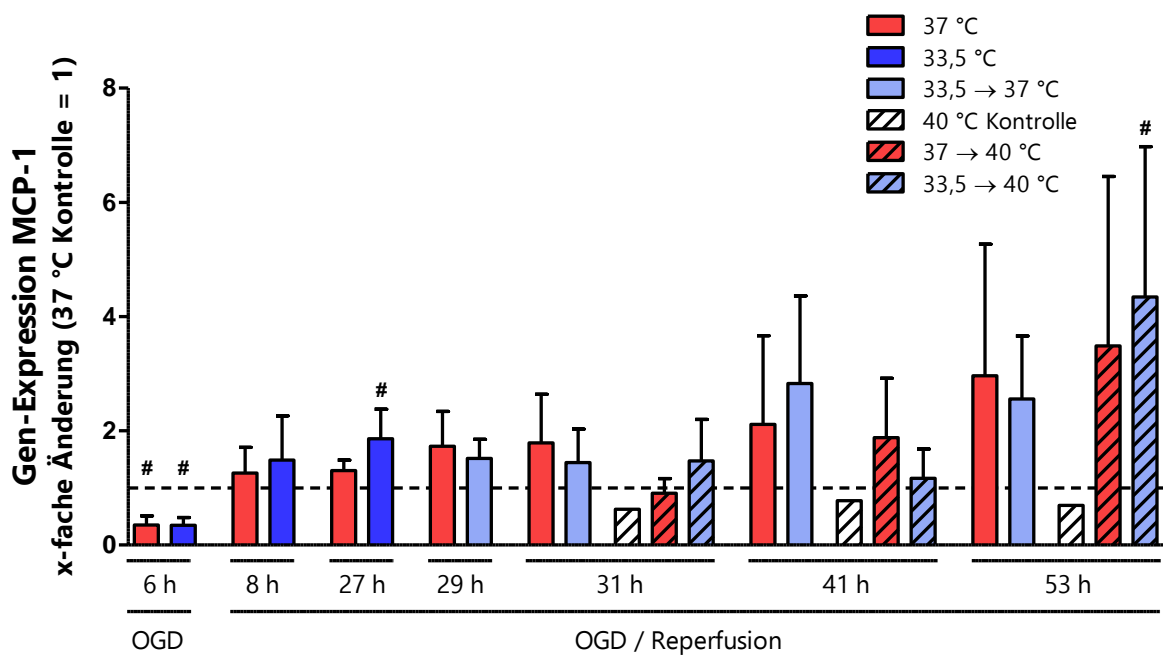
**Abbildung 11: Intrazelluläre Gen-Expression von COX-2.** HL-1 Kardiomyozyten wurden einer sechsstündigen Oxygen-Glucose-Deprivation (OGD) mit intraintrischämischer therapeutischer Hypothermie und anschließender Reperfusion (OGD/R) unterzogen. Nach 24-stündiger Hypothermie erfolgte die Wiedererwärmung auf 37 °C, nach weiteren zwei Stunden wurden die HL-1 Zellen auf ein Fieber von 40 °C für weitere 24 Stunden erwärmt, während Kontrollgruppen bei 37 °C kultiviert wurden. Dargestellt wurde die x-fache Änderung zur 37 °C Kontrolle als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n = 1-5$ . \* $P < 0,05$  entsprach einer Signifikanz im Gruppenvergleich und # $P < 0,05$  im Vergleich zur 37 °C Kontrolle.

### 8.3.6 MCP-1

MCP1, oder auch CC-Chemokinligand 2 (CCL2) dient der Rekrutierung von Immunzellen, insbesondere Makrophagen in ein geschädigtes Areal. (27) Es war während der OGD (Versuchszeitpunkt sechs Stunden) signifikant vermindert (Abbildung 12). Auch die frühe Reperfusion (Versuchszeitpunkt acht Stunden) zeigte keine signifikant gesteigerte Expression. Nach 24-stündiger Hypothermie (Versuchszeitpunkt 27 Stunden) zeigte sich in gekühlten OGD/R-geschädigten Zellen eine signifikante Induktion von MCP-1 gegenüber der 37 °C Kontrolle. Während der späteren Versuchszeitpunkte der Reperfusion (Versuchszeitpunkte 29 bis 53 Stunden) war die Expression von MCP-1 in den OGD/R geschädigten Zellen nicht mehr signifikant erhöht.



Ebenso konnte die Erwärmung der OGD/R-geschädigten Zellen auf 40 °C zunächst keine Steigerung der Expression von MCP-1 hervorrufen (Versuchszeitpunkte 31 und 41 Stunden). Erst nach 24-stündigem Fieber ließ sich eine signifikante Induktion der MCP-1 Expression in gekühlten OGD/R-geschädigten HL-1 Kardiomyozyten im Vergleich zur 37 °C Kontrolle feststellen. In der 40 °C Kontrolle war kein Anstieg der Gen-Expression zu beobachten.



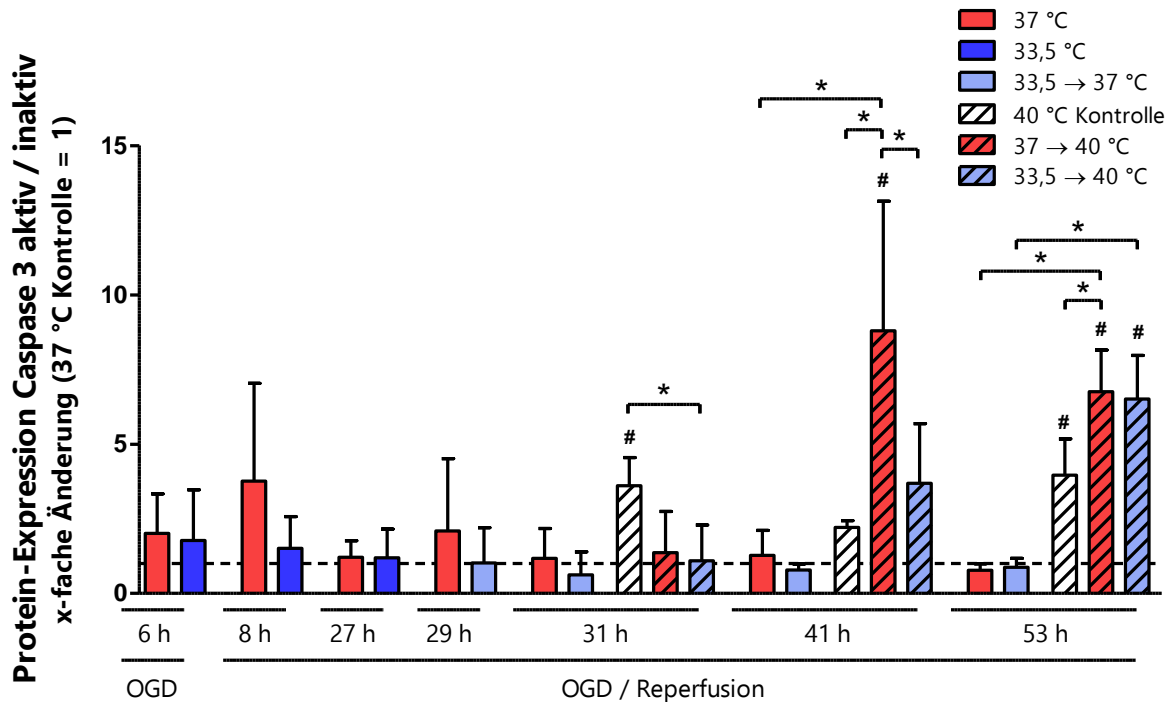
**Abbildung 12: Intrazelluläre Gen-Expression von MCP-1.** HL-1 Kardiomyozyten wurden einer sechsständigen Oxygen-Glucose-Deprivation (OGD) mit intraschämischer therapeutischer Hypothermie und anschließender Reperfusion (OGD/R) unterzogen. Nach 24-stündiger Hypothermie erfolgte die Wiedererwärmung auf 37 °C, nach weiteren zwei Stunden wurden die HL-1 Zellen auf ein Fieber von 40 °C für weitere 24 Stunden erwärmt, während Kontrollgruppen bei 37 °C kultiviert wurden. Dargestellt wurde die x-fache Änderung zur 37 °C Kontrolle als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n = 1-5$ . \* $P < 0,05$  entsprach einer Signifikanz im Gruppenvergleich und # $P < 0,05$  im Vergleich zur 37 °C Kontrolle.

## 8.4 Apoptotischer Zelltod

Das Enzym Caspase 3 ist ein Schlüsselenzym Apoptose-Kaskade, da es nach Aktivierung über PARP-1 die Fragmentierung der DNA vermittelt. Somit kann die Aktivität der Caspase 3 als Marker für den apoptotischen Zelltod genutzt werden. (18, 35) In der OGD sowie während der Reperfusion (Versuchszeitpunkte sechs bis 53

Stunden) ließ sich keine signifikante Aktivierung der Caspase 3 in OGD/R-geschädigten HL-1 Kardiomyozyten feststellen (Abbildung 13). In der frühen Reperfusion (Versuchszeitpunkt acht Stunden) ist keine signifikante Steigerung der Aktivität von Caspase 3 in den OGD/R-geschädigten Kardiomyozyten zu sehen. Auch durch die schnelle Wiedererwärmung der gekühlten OGD/R-geschädigten Zellen auf 37 °C wurde keine gesteigerte Induktion der Apoptose erfasst.

Die Erwärmung auf Fieber dagegen führte nach zwei und 24 Stunden (Versuchszeitpunkte 31 und 53 Stunden) zu einer signifikanten Aktivierung von Caspase 3 in der 40 °C Kontrolle gegenüber der 37 °C Kontrolle. In den OGD/R-geschädigten HL-1 Zellen ließ sich hingegen erst nach zwölf und 24 Stunden Fieber (Versuchszeitpunkte 41 und 53 Stunden) eine signifikante Induktion der Apoptose im Vergleich zu dem OGD/R-geschädigten Korrelat auf 37 °C sowie im Vergleich zur 37 °C und 40 °C Kontrolle nachweisen. Eine vorausgegangene Hypothermie zeigte zum Versuchszeitpunkt 41 Stunden in gekühlten gegenüber ungekühlten OGD/R-geschädigten Zellen eine signifikant geringere Aktivierung der Caspase 3. Nach 24-stündige Fieber (Versuchszeitpunkt 53 Stunden) war dieser Effekt nicht mehr vorhanden. Obwohl unter Fieber keine Steigerung in der Zytokin-Expression in der 40 °C Kontrollen ermittelt wurde, zeigte sich in dieser eine signifikante Induktion von Apoptose gegenüber der 37 °C Kontrolle (Versuchszeitpunkte 31 und 53 Stunden). Diese fiel jedoch geringer aus, als in OGD/R-geschädigten Kardiomyozyten.



**Abbildung 13: Aktivierung von Caspase 3 als Marker für apoptotischen Zelltod.** HL-1 Kardiomyozyten wurden einer sechsstündigen Oxygen-Glucose-Deprivation (OGD) mit intraischämischer therapeutischer Hypothermie und anschließender Reperfusion (OGD/R) unterzogen. Nach 24-stündiger Hypothermie erfolgte die Wiedererwärmung auf 37 °C, nach weiteren zwei Stunden wurden die HL-1 Zellen auf ein Fieber von 40 °C für weitere 24 Stunden erwärmt, während Kontrollgruppen bei 37 °C kultiviert wurden. Dargestellt wurde die x-fache Änderung zur 37 °C Kontrolle als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n = 3-5$ . \* $P < 0,05$  entsprach einer Signifikanz im Gruppenvergleich und # $P < 0,05$  im Vergleich zur 37 °C Kontrolle.

## 8.5 RBM3

Die Expression des zytoprotektiven Kälteschockproteins RBM3 wird durch Hypothermie und verschiedene zelluläre Stresssituationen induziert. (85, 91) Während der OGD und der frühen Reperfusion (Versuchszeitpunkte sechs und acht Stunden) zeigte sich die RBM3-Genexpression in OGD/R-geschädigten HL-1 Kardiomyozyten gegenüber der 37 °C Kontrolle signifikant reduziert (Abbildung 14 A). Eine 24-stündige Hypothermie (Versuchszeitpunkt 27 Stunden) konnte bis vier Stunden nach der Wiedererwärmung auf 37 °C (Versuchszeitpunkte 29 und 31 Stunden) die mRNA-Expression von RBM3 in gekühlten OGD/R-geschädigten HL-1 Zellen signifikant induzieren im Vergleich zu ungekühlten geschädigten sowie zu 37 °C

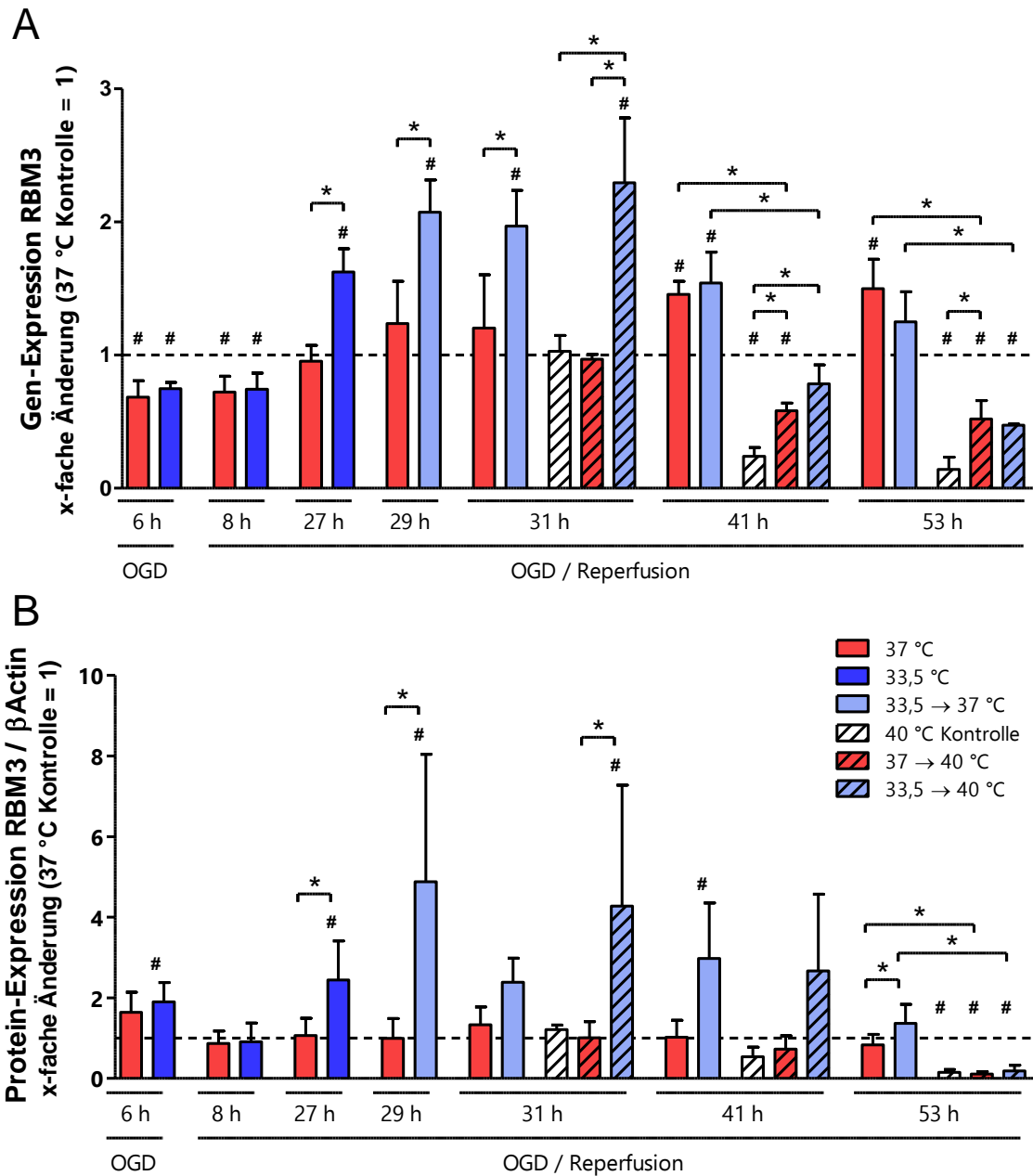
Kardiomyozyten. Zum Versuchszeitpunkt 41 Stunden wurde eine gegenüber der 37 °C Kontrolle gesteigerte RBM3 Expression sowohl in gekühlten, wie auch in ungekühlten, nach weiteren zwölf Stunden (Versuchszeitpunkt 53 Stunden) nur noch in ungekühlten OGD/R-geschädigten Kardiomyozyten festgestellt.

Zwei Stunden nach der weiteren Erwärmung auf 40 °C wiesen die gekühlten OGD/R-geschädigten Zellen eine signifikante Induktion von RBM3 im Vergleich zu ungekühlten geschädigten Kardiomyozyten sowie zu der 37 °C und 40 °C Kontrolle auf. Ein zwölf- und 24-stündiges Fieber (Versuchszeitpunkte 41 und 53 Stunden) inhibierte die Gen-Expression von RBM3 in fast allen auf 40°C erwärmten Zellen signifikant gegenüber der 37 °C Kontrolle und den korrelierenden OGD/R-geschädigten Zellen auf 37 °C. Lediglich in den gekühlten OGD/R-geschädigten Kardiomyozyten war die RBM3-Expression zum Versuchszeitpunkt 41 Stunden noch auf dem Niveau der 37 °C Kontrolle. Ein Fieber über 24 Stunden hemmte die RBM3-Expression in allen HL-1 Kardiomyozyten signifikant.

Auf Proteinebene war RBM3 durch die OGD nur in gekühlten OGD/R-geschädigten HL-1 Zellen gegenüber der 37 °C Kontrolle erhöht (Abbildung 14 B). In der frühen Reperfusion (Versuchszeitpunkt acht Stunden) zeigte sich jedoch korrelierend zu den Daten der Gen-Expression kein Anstieg von RBM3 in OGD/R-geschädigten HL-1 Zellen, ungeachtet ihrer Temperatur. Am Ende der Hypothermie (Versuchszeitpunkt 27 Stunden) und nach der Wiedererwärmung auf 37 °C (Versuchszeitpunkt 29 Stunden) war die RBM3-Protein-Expression in gekühlten gegenüber den ungekühlten OGD/R-geschädigten Kardiomyozyten sowie gegenüber der 37 °C Kontrolle signifikant erhöht. 14 Stunden nach der Wiedererwärmung auf 37 °C (Versuchszeitpunkt 41 Stunden) zeigte sich die Protein-Expression von RBM3 in gekühlten OGD/R-geschädigten Kardiomyozyten signifikant gegenüber der 37 °C Kontrolle gesteigert. Auch nach weiteren zwölf Stunden (Versuchszeitpunkt 53

Stunden) konnte die vorausgegangene Hypothermie die RBM3-Proteinexpression in gekühlten gegenüber ungekühlten OGD/R-geschädigten Zellen signifikant erhöhen.

Die Erwärmung auf 40 °C bewirkte nach zwei Stunden (Versuchszeitpunkt 31 Stunden), entsprechend der Gen-Expression, eine signifikante Induktion der Proteinexpression von RBM3 in gekühlten, verglichen mit ungekühlten OGD/R-geschädigten HL-1 Zellen, sowie mit der 37 °C Kontrolle. Nach zwölf Stunden Fieber (Versuchszeitpunkt 41 Stunden) war die dieser Anstieg der RBM3-Protein-Expression nicht mehr zu sehen. Ein 24-stündiges Fieber (Versuchszeitpunkt 53 Stunden) resultierte in einer, gegenüber der 37 °C Kontrolle signifikanten, fast vollständigen Inhibition der RBM3-Protein-Expression in allen auf 40 °C erwärmten Zellen. Durch ein 24-stündiges Fieber ließ sich also ein RBM3-Knockdown in den HL-1 Kardiomyozyten induzieren, welcher sich antiproportional zum Anstieg aktivierter Caspase 3 verhielt.



**Abbildung 14: Intrazelluläre RBM3-Expression auf (A) mRNA- und (B) Protein-Ebene.** HL-1 Kardiomyozyten wurden einer sechsständigen Oxygen-Glucose-Deprivation (OGD) mit intranschämischer therapeutischer Hypothermie und anschließender Reperfusion (OGD/R) unterzogen. Nach 24-stündiger Hypothermie erfolgte die Wiedererwärmung auf 37 °C, nach weiteren zwei Stunden wurden die HL-1 Zellen auf ein Fieber von 40 °C für weitere 24 Stunden erwärmt, während Kontrollgruppen bei 37 °C kultiviert wurden. Dargestellt wurde die x-fache Änderung zur 37 °C Kontrolle als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n = 3-5$ . \* $P < 0,05$  entsprach einer Signifikanz im Gruppenvergleich und # $P < 0,05$  im Vergleich zur 37 °C Kontrolle.

## 9 Diskussion

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass durch eine OGD/R-Schädigung einer Kardiomyozyten-Monozellkultur oxidativer Stress sowie nekrotischer und apoptotischer Zelleruntergang ausgelöst werden und diese in der Induktion einer sterilen Inflammationsreaktion resultieren. Durch die Applikation von TH konnten diese Schädigungsmechanismen abgemildert werden. Dieser protektive Effekt blieb wider Erwarten auch nach einer schnellen Wiedererwärmung bestehen. Ein anschließend simuliertes Fieber führte in OGD/R-geschädigten Zellen zu einer Exazerbation der pro-inflammatorischen Zytokin-Expressionen und zudem zu einer gesteigerten Induktion von Apoptose durch Aktivierung von Caspase 3. Auch eine alleinige Temperaturerhöhung in ungeschädigten Zellen steigerte den apoptotischen Zelltod. Somit wird die Frage aufgeworfen, ob die aktive Fiebervermeidung für die Zellprotektion nicht von größerer Relevanz ist, als die Protektion durch TH.

### 9.1 Schädigungsmechanismen der simulierten I/R

#### 9.1.1 Nekrotischer Zelltod

Zahlreiche Studien beschreiben einen nekrotischen Zelltod unter anaeroben Bedingungen durch die Störung der Ionenhomöostase mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Überlastung und Akkumulation osmotisch wirksamer Teilchen mit konsekutivem Zerplatzen der Zellen. (15, 18, 116) Der extrazelluläre LDH-Gehalt hat sich hierfür als ein Marker für Nekrose etabliert und fand auch in vorausgegangenen Projekten der Arbeitsgruppe Anwendung. (20, 88, 117) Entsprechend wurde in dieser Arbeit der stärkste relative Anstieg der extrazellulären LDH-Menge direkt im Anschluss der sechsstündigen OGD als simulierte Ischämie beobachtet. Dieser Anstieg war jedoch nicht signifikant. In primären Kardiomyozyten zeigte sich in einem vergleichbaren Versuchsaufbau ein signifikant gesteigerter nekrotischer Zelltod mit zunehmender Dauer und nach sechs Stunden zudem eine signifikante Reduktion durch TH. (117) Auch diese Protektion durch Kühlung ist direkt nach der OGD (Versuchszeitpunkt sechs Stunden) noch nicht

zu sehen. Möglicherweise sind hierbei die HL-1 Kardiomyozyten als Tumor-Zelllinie bei diesem Schädigungsmechanismus resistenter als primäre Kardiomyozyten. Nach der simulierten Reperfusion kam es zu einem Abfall des LDH-Spiegels zwischen den Versuchszeitpunkten sechs und acht Stunden. Dieser ist unter anderem durch einen Mediumwechsel unmittelbar nach der OGD zu erklären und zudem stellt unter wiederhergestellten aeroben Bedingungen nicht mehr die Nekrose den primären Zelltodmechanismus dar, sondern die Apoptose. (116)

### **9.1.2 Oxidativer Stress**

Unter der I/R-Schädigung erfolgt ein oxidativer Zellstress unter anderem durch eine von iNOS gesteigerte NO-Synthese, die eine oxidative Schädigung von Membranen und DNA, Denaturierung von Enzymen und Proteinen sowie eine mitochondriale Dysfunktion bedingt. (13, 28, 118) Trotz anaeroben Verhältnissen während der OGD war unmittelbar danach (Versuchszeitpunkt sechs Stunden) eine signifikant gesteigerte Induktion von iNOS in gekühlten und ungekühlten Zellen zu sehen. Auch nach zweistündiger Reperfusion (Versuchszeitpunkt acht Stunden) konnte eine erhöhte iNOS-Transkription in den OGD/R geschädigten Zellen gemessen werden. Im Tiermodell reduzierte ein iNOS-Knockout im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen die Mortalität und die myokardiale Dysfunktion nach akuter koronarer Ischämie. (119) Dies legt nahe, dass die NO Produktion durch iNOS und der resultierende oxidative Stress wesentlich am kardialen I/R-Schaden beteiligt ist. Auch in dieser Arbeit stellte der oxidative Stress einen wichtigen Schädigungsmechanismus der OGD/R in den HL-1-Zellen dar. Auffällig ist hierbei, dass entgegen unserer Erwartungen die iNOS-Transkription durch den Einsatz von Hypothermie zu den Versuchszeitpunkten sechs und acht Stunden jeweils tendenziell höher lag, jedoch nicht in einem signifikanten Maße. Dies wirft Zweifel auf an der Effektivität der Zytoprotektion durch TH während der OGD und frühen Reperfusion. Dagegen konnten Han et al. in Gehirnen von Ratten unter dem Einsatz einer TH von 33 °C eine signifikant reduzierte Expression von iNOS einhergehend mit einer geringeren NO-Synthese nach akuter Ischämie



beobachten. Zudem führte TH zu einem kleineren Infarktareal. (120) Auch Baikoussis et al. betonen die Bedeutung vom NO-Ausgleich gegen oxidativen Stress bei Operationen am offenen Herzen für die myokardiale Protektion. (121) In diesem Modell inhibierte die TH die iNOS-Transkription erst nach 24-stündiger Hypothermie, Versuchszeitpunkt 27 bis 53 Stunden. Die iNOS-Transkription war dagegen in den ungekühlten OGD/R-geschädigten Zellen in der späteren Reperfusionphase signifikant gegenüber der in der zuvor gekühlten Vergleichsgruppe zu beobachten (Versuchszeitpunkte 29 bis 41 Stunden). Der protektive Effekt der TH war somit insbesondere nach der Wiedererwärmung auf Normothermie ersichtlich.

Der durch iNOS gesteigerte oxidative Stress der HL-1 Kardiomyozyten trägt zur mitochondrialen Dysfunktion durch Bildung der mPTP bei. (13, 118) Auch in vorausgegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe wurde eine mitochondriale Dysfunktion unter OGD/R-Schädigung mit nachfolgendem apoptotischen Zelltod in den HL-1 Kardiomyozyten festgestellt. Der Einsatz von milder therapeutischer Hypothermie konnte die mitochondriale Integrität erhalten, was zu einer geringeren zytosolischen Ausschüttung der apoptotischen Proteine Cyto C und AIF durch die mPTP führte. (34, 88) Marek-Iannucci et al. konnten in Schweinen mit myokardialer I/R-Schädigung durch TH eine gesteigerte Rate an Autophagie und Mitophagie, sowie eine höhere mitochondriale Integrität und Masse beobachten. Vier Wochen später stellten sie in den Schweinen mit TH neben einer verbesserten systolischen und diastolischen Herzfunktion eine Reduktion des zellulären Stresses, der Inflammation und Fibrose fest. (122)

### **9.1.3 Sterile Inflammation**

Das initiale nekrotische Platzen der Kardiomyozyten und der oxidative Stress durch die I/R induziert die Transkription inflammatorischer Zytokine und Enzyme. (18) Neben LDH werden andere intrazelluläre Proteine freigesetzt, die an benachbarten Zellen an oberflächliche PRRs binden und somit über den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B die Zytokin-Transkription auslösen (siehe Abbildung 15). (123, 124) So konnte diese

Arbeitsgruppe in primären Kardiomyozyten extrazellulär erhöhte Spiegel verschiedener DAMP's nach der OGD messen. (117) Unmittelbar nach der OGD (Versuchszeitpunkt sechs Stunden) war die Transkription der untersuchten pro-inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6 und SOCS3 sowie des Chemokins MCP-1 und des Enzyms COX-2 zunächst inhibiert. In der frühen Reperfusion (Versuchszeitpunkt acht Stunden) zeigte sich jedoch mit iNOS einhergehend eine signifikant gesteigerte Gen-Expression von TNF- $\alpha$  in OGD/R-geschädigten HL-1 Kardiomyozyten. Hierbei fällt auf, dass TNF- $\alpha$  entgegen der Erwartung unter TH signifikant höher exprimiert wurde als in den ungekühlten Zellen und der 37 °C Kontrolle. Im Tiermodell führte eine TH in septischen Ratten zu einer verminderten Expression von TNF- $\alpha$ . (125) Lee et al. stellten im Tiermodell nach zerebraler Ischämie im Peri-Infarktareal eine unter TH signifikant geringere Expression von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  fest, die sie auf eine verminderte Ausschüttung des DAMPs High-mobility group box-1 (HMGB1) zurückführten. (126) Möglicherweise könnte die schnelle Temperaturveränderung durch die Kühlung hier einen weiteren Stressfaktor für die Zellen dargestellt haben. Die unter TH gesteigerten Induktion von TNF- $\alpha$  in dieser Arbeit steht im Widerspruch zu anderen Erkenntnissen und der ursächliche Mechanismus ist noch nicht abschließend geklärt.

Mehrere Studien belegen dem pro-inflammatorischen Zytokin einen schädlichen Effekt auf die Kardiomyozyten und legen nahe, dass TNF- $\alpha$  neben dem oxidativen Stress einen weiteren Schädigungsmechanismus darstellt. Erhöhte Plasmaspiegel von TNF- $\alpha$  wurden bei verschiedenen kardialen Erkrankungen nachgewiesen, darunter bei der ischämischen Herzkrankheit, bei Herzinsuffizienzen und nach akuter I/R-Schädigung. (127-129) Dabei wurde TNF- $\alpha$  nicht nur aus immunologischen, sondern auch aus myokardialen Zellen sezerniert. (22, 130) Auch die membranständigen Rezeptoren für TNF- $\alpha$ , TNFR1 und TNFR2 werden von Kardiomyozyten exprimiert und enthalten eine Todesdomäne, worüber diese nach Bindung von TNF- $\alpha$  die extrinsische Apoptose-Kaskade aktivieren können. (127, 128) Eine Inhibition von TNF-

$\alpha$  nach akuter I/R-Schädigung führte dagegen zu einem verminderten nekrotischen Zelltod und oxidativem Zellstress mit einer besseren myokardialen Kontraktilität. (131-133) Von allen gemessenen Zytokinen zeigte sich nur bei TNF- $\alpha$  eine signifikante Induktion der Gen-Expression als direkte Reaktion auf die Reperfusion (Versuchszeitpunkt acht Stunden). Nach 24-stündiger Hypothermie war TNF- $\alpha$  nicht mehr gegenüber der 37 °C Kontrolle erhöht (Versuchszeitpunkte 27 bis 53 Stunden). Ungekühlte OGD/R-geschädigte Zellen zeigten dagegen immer wieder signifikant gesteigerte Transkriptionen. Während der späten Reperfusionsphase (Versuchszeitpunkte 27 bis 53 Stunden) wurde neben dem Anstieg von TNF- $\alpha$  zudem eine Induktion der Zytokine IL-6, IL-1 $\beta$  und SOCS3 gemessen, die zum Teil durch den Einsatz von Hypothermie inhibiert wurde. Dieses korrelierende Transkriptionsmuster könnte auf eine Beteiligung von TNF- $\alpha$  an der Genexpression der anderen pro-inflammatorischen Zytokine hindeuten. Im Tiermodell wurde nachgewiesen, dass TNF- $\alpha$  über den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B die Transkription verschiedener Zytokine nach I/R-Schädigung induziert. (134) Die ausbleibende Zytokin-Antwort auf den frühen und unter TH verstärkten Anstieg von TNF- $\alpha$  zum Versuchszeitpunkt acht Stunden steht dem jedoch entgegen. TNF- $\alpha$  ging lediglich mit einer Induktion von iNOS einher, dessen Transkriptionsmuster auch über den restlichen Versuchsablauf miteinander korrelierten. Song et al. ermittelten im Tiermodell durch TNF- $\alpha$  einen iNOS vermittelten apoptotischen Zelltod. (135) Jedoch war auch keine gesteigerte Aktivierung der apoptotischen Caspase 3 zum Versuchszeitpunkt acht Stunden ersichtlich. Möglicherweise konnte die TH die tatsächliche Induktion des apoptotischen Zelltodes auf einer anderen Ebene der Signalkaskaden verhindern. Weitere Messungen zwischen den Versuchszeitpunkten acht und 27 Stunden würden eine genauere Aussage erlauben und sollten in weiteren Projekten genauer analysiert werden.

## 9.2 Wiedererwärmung auf Normothermie

Durch die Wiedererwärmung der gekühlten OGD/R-geschädigten HL-1 Kardiomyozyten auf Normothermie (37 °C) konnte für keines der untersuchten pro-inflammatorischen Zytokine und Chemokine (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , SOCS3 und MCP-1), sowie für die Enzyme Cox-2 und iNOS eine gesteigerte Genexpression und zudem keine erhöhte Aktivierung von Caspase 3 in den HL-1 Zellen nachgewiesen werden.

Vor der Wiedererwärmung (bis einschließlich Versuchszeitpunkt 27 Stunden) der OGD/R-geschädigten HL-1 Kardiomyozyten zeigte sich die Expression aller Zytokine und Chemokine, sowie die Aktivität der apoptotischen Caspase 3 unserem Zellkulturmodell größtenteils auf dem Niveau der 37 °C Kontrolle. Die einzige Ausnahme bildete hier die stark gesteigerte Expression von TNF- $\alpha$  nach zweistündiger Reperfusion einhergehend mit einer unter Hypothermie in der OGD und frühen Reperfusion höheren Gen-Expression von iNOS (Versuchszeitpunkte sechs und acht Stunden). Sowohl für TNF- $\alpha$ , als auch für iNOS ließ sich nach 24-stündiger Hypothermie (Versuchszeitpunkt 27 Stunden) keine erhöhte Genexpression mehr nachweisen. Im Gegensatz dazu führte eine ungekühlte OGD/R-Schädigung in HL-1 Zellen während der Reperfusion (Versuchszeitpunkte acht bis 53 Stunden) zu verschiedenen Versuchszeitpunkten zur Induktion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1- $\beta$  und SOCS3, sowie der Enzyme iNOS und COX-2. Auch im Tiermodell konnte TH die Expression inflammatorischer Zytokine reduzieren. Bei Schweinen mit Spontankreislauf nach HKS und zwölfstündiger TH bei 33 °C wurden im Vergleich zur Normothermie niedrigere Serumspiegel von IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  gemessen. Auch hier blieb die Inhibition der Zytokin-Expression über die Wiedererwärmung hinaus bestehen. (136) Im Ratten-Tiermodell konnte eine TH von 32 °C nach I/R -Schädigung durch Legierung der Koronararterie die Genexpression von MCP-1, TNF- $\alpha$  und iNOS reduzieren. Zusätzlich wurde das Remodeling über die Expression von Matrix Metalloproteasen und deren Inhibitoren positiv beeinflusst und der kardiale Funktionserhalt gefördert. (137)

Sowohl in den aktuellen Leitlinien für Erwachsene mit Kreislaufstillstand, wie auch für Kinder mit perinataler Asphyxie wird eine Wiedererwärmungsrate von 0,5 – 0,25 °C/h empfohlen. (56, 72) Gordan et al. konnten in Ratten mit HKS unter tiefer Hypothermie am ersten postoperativen Tag eine höhere Expression von NF-κB im Gehirn nachweisen, wenn die Wiedererwärmung auf Normothermie über 20 Minuten statt über 40 Minuten erfolgt war. Beide Geschwindigkeiten zeigten jedoch ein im Vergleich zur gesunden Kontrolle gesteigertes NF-κB-Expressionsmuster im Kortex und im Hippocampus. (138) Obwohl in der vorliegenden Arbeit nach der milden Hypothermie von 33,5 °C eine maximal schnelle Wiedererwärmung durchgeführt wurde, konnte durch die Wiedererwärmung auf 37 °C kein inflammatorischer oder apoptotischer Effekt in den HL-1 Zellen nachgewiesen werden. In unserem Modell zeigte sich erst durch die weitere Erwärmung auf 40 °C ein Anstieg der Zytokin-Expression. Somit lässt sich die Bedeutung der endgültigen Temperatur gegenüber der Geschwindigkeit, mit der diese erreicht wird, infrage stellen.

Zu berücksichtigen ist, dass in dieser Arbeit eine Kardiomyozyten-Monokultur verwendet wurde, die keine Interaktion zwischen verschiedenen Zelltypen oder systemische Auswirkungen berücksichtigen kann. Polderman et al. analysierten in einer klinischen Studie die Effekte von TH auf die Serumkonzentration der Elektrolyte  $Mg^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  und  $K^+$ . Insbesondere während der ersten sechs Stunden der Kühlung kam es zu einem Abfall aller untersuchten Elektrolyte, der entweder auf eine erhöhte renale Exkretion, oder eine Verschiebung in den Intrazellularraum zurückzuführen war. Insbesondere der Kaliumspiegel fiel durchschnittlich von 4,2 auf 3,6 mmol/L, sodass engmaschige Kontrollen und Substitutionen nötig waren. (104) Die unter Hypothermie abgefallene  $K^+$ -Konzentration könne jedoch unter einer schnellen Wiedererwärmungsrate wieder rapide steigen, sodass zu einer sehr langsamen Geschwindigkeit für die Wiedererwärmung geraten wurde, um Herzrhythmusstörungen und andere Komplikationen einer Hyperkaliämie zu vermeiden. (52, 104) Auch eine nachträgliche Subgruppen-Analyse der B-HYPO-

Studie zum Temperaturmanagement bei Patienten mit traumatischer Kopfverletzung und entlastetem Hämatom verglich verschiedene Geschwindigkeiten der Wiedererwärmung. Demnach hatten 65% der Patienten mit einer Wiedererwärmung aus milder TH über mehr als 48 Stunden ein gutes neurologisches Outcome, während dieses bei Patienten mit Wiedererwärmung über weniger als 48 Stunden nur 22% hatten. (139) Daraus lässt sich schließen, dass systemische Interaktionen und Reaktionen wesentlich durch die Wiedererwärmung angeregt werden, welche weiterer Studien *in vivo* bedürfen, da die Aussagekraft dieser Arbeit hierbei begrenzt ist.

### **9.3 Post-Hypothermie reaktives Fieber**

In unserem Zellkultur-Modell erfolgte eine passive Induktion von Fieber, sodass es nicht möglich war, eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit des Auftretens oder die Ätiologie des Fiebers zu treffen. Somit ließen sich die Auswirkungen von Fieber zwar begrenzt beurteilen, nicht aber der zugrundeliegende Pathomechanismus. Nach der Wiedererwärmung auf Normothermie beziffern klinische Studien bei Erwachsenen eine Inzidenz von Fieber nach TH zwischen 41% und 79,6%, was mit einem schlechteren neurologischen Outcome und einer erhöhten Mortalität assoziiert ist. (47, 105, 106, 140) Die starken Schwankungen in der beschriebenen Inzidenz lassen sich unter anderem durch verschieden lange Zeiträume zur Nachbeobachtung erklären. So beobachteten Picetti et al. das Auftreten von Fieber im Durchschnitt erst nach 7,5 Tagen. (47) Laut Bro-Jepesen et al. beeinflusste neben der maximalen Temperatur und dem späten Beginn des Fiebers (elf Stunden) insbesondere eine Dauer des Fiebers von über sieben Stunden die Mortalität. (140) Ebenso konnte in dieser Arbeit eine Exazerbation der sterilen Inflammationsreaktion in den OGD/R-geschädigten HL-1 Kardiomyozyten beobachtet werden. Diese nahm mit der Dauer des Fiebers zu. So zeigte sich die Gen-Expression von IL-6 in ungekühlten OGD/R-geschädigten Zellen erst nach zwölf Stunden Fieber signifikant erhöht

(Versuchszeitpunkt 41 Stunden), von IL-1 $\beta$  erst nach 24 Stunden Fieber (Versuchszeitpunkt 53 Stunden). Im Ratten-Tiermodell mit Sepsis nach Ischämie und Perforation des Kolons konnte eine TH von 34 °C das Überleben signifikant verbessern. Dieser Effekt war auch noch nach einer vorausgegangenen Fieberperiode von 38 °C zu beobachten, nahm jedoch ab, je später die Kühlung einsetzte. (125) Die Auswirkungen verschiedener Fiebertemperaturen im Vergleich sowie Temperaturverläufe mit intermittierenden Fieberperioden waren nicht Gegenstand dieser Arbeit und bedürfen noch weiterer Forschung.

### **9.3.1 Fieber induzierte die Inflammationsreaktion**

Durch eine OGD/R-Schädigung war es möglich, eine NF- $\kappa$ B-vermittelte sterile Inflammationsreaktion in einer Kardiomyozyten-Monokultur auszulösen, die zudem thermoregulatorischen Einflüssen unterlag. Die OGD/R-geschädigten HL-1 Kardiomyozyten wiesen unter Exposition von TH eine verminderte, von Fieber eine verstärkte Induktion der Gen-Expression pro-inflammatorischer Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  und SOCS3 auf. Letztere konnte zu Beginn durch eine vorausgegangene TH aufgehalten werden, jedoch war dieser protektive Effekt bei allen Zytokinen nach 24-stündigem Fieber aufgehoben (Versuchszeitpunkt 53 Stunden). Ohne die vorausgegangene OGD/R-Schädigung ließ sich unter Fieber keine gesteigerte Zytokin-Expression in der 40 °C Kontrolle nachweisen. Somit stellt die initiale OGD/R-Schädigung mit Freisetzung von DAMP's eine essentielle Rolle bei der Induktion dieser sterilen Inflammationsreaktion dar, die unter Fieber eine Exazerbation erfährt (Abbildung 15). Bei primären Kardiomyozyten führte eine OGD-Schädigung mit zunehmender Dauer zu einer Erhöhung der extrazellulären Proteinkonzentration verschiedener DAMPs wie HMGB1, das Hitzeschockprotein 70 oder das Kälteschockprotein CIRBP. (117) Obwohl diese Expression in Kardiomyozyten im Vergleich zu Immunzellen deutlich geringer ausgeprägt ist, spielt sie eine entscheidende Rolle bei der Invasion von Immunzellen in das geschädigte Areal und der Induktion einer Inflammationsreaktion. (22, 27)

Wie bereits beschrieben, wird TNF- $\alpha$  als Reaktion auf verschiedene zelluläre Stress- und Schädigungsmechanismen exprimiert. (27, 127-129) Dabei kann TNF- $\alpha$  Ausdruck wie auch Mediator der Schädigung sein, da TNF- $\alpha$  NF- $\kappa$ B-vermittelt die Zytokin-Transkription induziert, den oxidativen Stress verstärkt und als Pyrogen Fieber induziert. (113, 123, 134) Nach dem starken Anstieg nach zweistündiger Reperfusion (Versuchszeitpunkt 8 Stunden) war eine weitere signifikante Induktion von TNF- $\alpha$  unter Fieber in OGD/R-geschädigten Kardiomyozyten zu beobachten. Diese konnte zu Beginn (Versuchszeitpunkte 31 und 41 Stunden) durch eine vorausgegangene Hypothermie gehemmt werden. Nach 24-stündigem Fieber zeigte sich die TNF- $\alpha$ -Expression jedoch in allen OGD/R-geschädigten Zellen (Versuchszeitpunkt 53 Stunden).

IL-6 ist ein zentraler Mediator systemischer Inflammationsreaktionen und, neben IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , als endogenes Pyrogen an der Genese von Fieber beteiligt. (113) So wiesen Chai et al. die Entstehung von Fieber nach Stimulation mit Lipopolysacchariden oder IL-1 $\beta$  im Tiermodell nach, welche bei IL-6-defizienten Mäusen jedoch ausblieb. (141) Die Rolle von IL-6 in der Genese eines Fiebers konnte in dieser Arbeit nicht untersucht werden. Jedoch wurde als Reaktion auf die passive Erwärmung auf 40 °C nach zwölf Stunden (Versuchszeitpunkte 41 und 53 Stunden) eine signifikante Induktion der IL-6-Expression in OGD/R-geschädigten HL-1 Zellen gemessen. Eine vorausgegangene Hypothermie konnte diesen Anstieg von IL-6 verlangsamen, jedoch nicht aufhalten. Während ein kurzzeitiger Anstieg von IL-6 als Reaktion auf eine akute Schädigung von wichtiger Bedeutung ist, kann eine erhöhte IL-6 Konzentration über einen längeren Zeitraum schädlich sein und das kardiovaskuläre Risiko erhöhen. (142) Eine andauernde Exposition von IL-6 wurde zudem im Tiermodell als ursächlich für die Entstehung verschiedener chronisch inflammatorischer Erkrankungen herausgestellt. (143)

Während der OGD/R-Schädigung mit oder ohne Hypothermie war keine verstärkte Expression von IL-1 $\beta$  in den HL-1 Zellen zu sehen. Insbesondere in der 37 °C Kontrolle

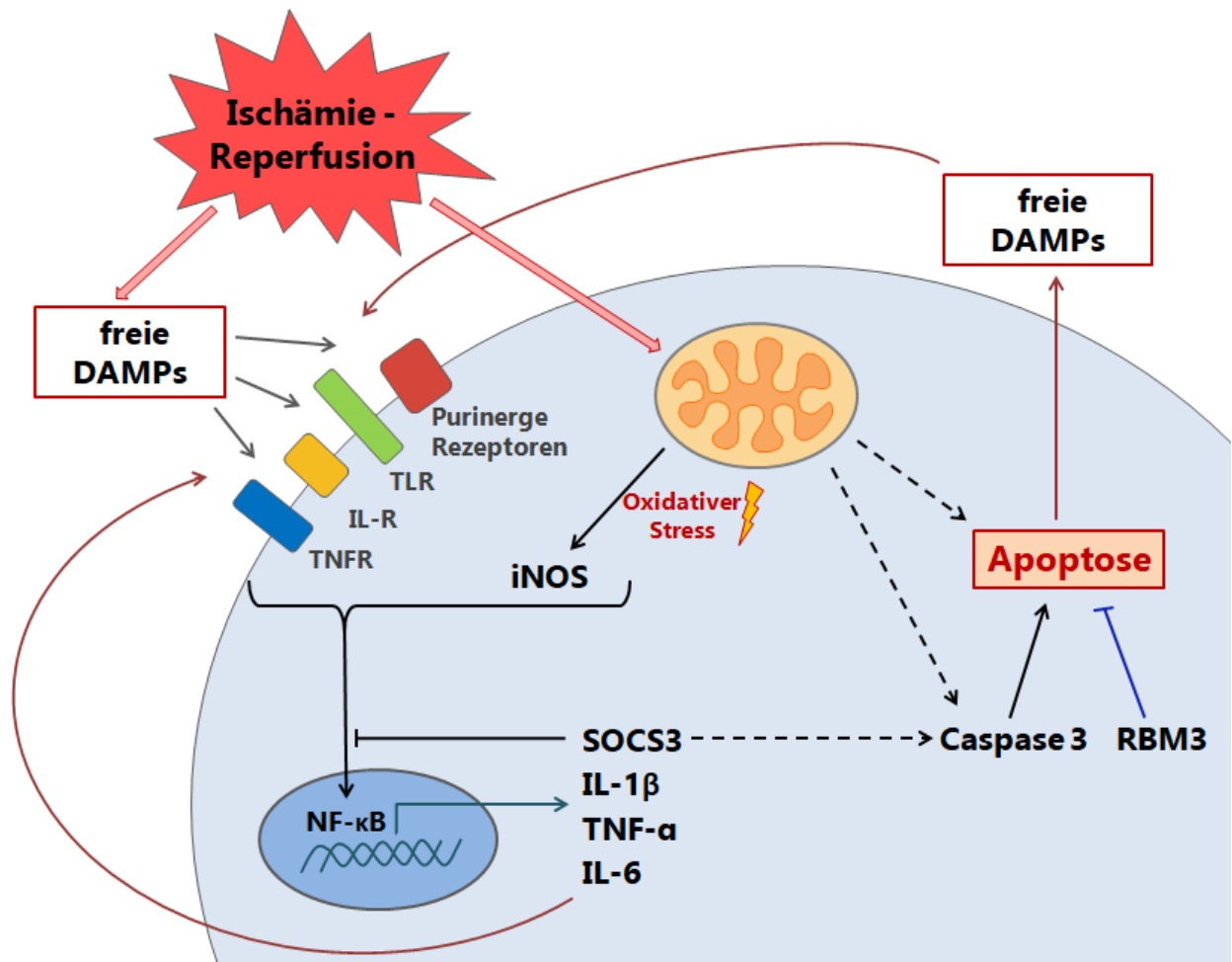


und zu den frühen Versuchszeitpunkten (Versuchszeitpunkte sechs und acht Stunden) war die Genexpression von IL-1 $\beta$  nicht messbar. Auch Aoyagi et al. konnten kein IL-1 $\beta$  in Kardiomyozyten nachweisen. (22) IL-1 $\beta$  wird durch die Caspase 1 des sogenannten Inflammasoms aus seiner Vorstufe Pro-IL-1 $\beta$  in seine aktive Form überführt. Das Inflammasom ist ein Multiproteinkomplex, der NF- $\kappa$ B-vermittelt exprimiert wird und inflammatorische Reaktionen vermittelt. Zudem fördert IL-1 $\beta$  die Migration verschiedener Immunzellen in geschädigtes Gewebe. (114) Mezzaroma et al. fanden heraus, dass die Aktivität des Inflammasoms das kardiale Remodeling nach AMI begünstigt, was einen myokardialen Funktionsverlust und die vermehrte Entstehung von Herzinsuffizienzen zur Folge hatte. (144) Neben der Induktion einer Inflammasomreaktion kann die Caspase 1 über eine Aktivierung von Caspase 3 die Apoptose induzieren. (145) Dies geht mit den Ergebnissen dieser Arbeit einher, da neben einer unter Fieber gesteigerten IL-1 $\beta$ -Transkription auch eine zunehmende Aktivierung der Caspase 3 vorlag. Unter alleiniger I/R-Schädigung wurde dieser Signalweg in Kardiomyozyten in diesem Modell wie auch in anderen Studien nicht oder nur schwach aktiviert. (146) Die Expression von IL-1 $\beta$  fiel in den Messungen dieser Arbeit unter TH zudem geringer aus als unter Normothermie. In Korrelation dazu wurden im Tiermodell und in Serumproben von Patienten mit ischämischem Schlaganfall durch TH niedrigere Konzentrationen von IL-1 $\beta$  gemessen. (147) Erst die Erwärmung auf 40 °C bewirkte einen deutlichen Anstieg von IL-1 $\beta$  in den OGD/R-geschädigten Zellen. Wie bereits erwähnt, ist IL-1 $\beta$  als Pyrogen wesentlich an der Entstehung von Fieber beteiligt. (113, 141) Zudem fanden Sanders et al. eine verstärkte Expression von iNOS in HL-1 Zellen nach Stimulation mit IL-1 $\beta$ . (148) Diesen Zusammenhang konnte diese Arbeit in den auf Fieber erwärmten Versuchsgruppen bestätigen, jedoch nicht nach der OGD und in der frühen Reperfusion (Versuchszeitpunkte sechs und acht Stunden).

SOCS3 fungiert nicht selbst als Zytokin, sondern reguliert über die Interaktion mit Zytokin-Rezeptoren inflammatorische Signalkaskaden. So wird unter anderem der

Signalweg des Zytokins IL-6 beeinflusst. (25) Nagata et al. hoben die Bedeutung von SOCS3 an der kardialen I/R-Schädigung hervor. Bei SOCS3-Knockout Mäusen stellten sie nach I/R ein kleineres Infarktareal, eine geringere Aktivierung der apoptotischen Caspase 3 und eine Induktion des anti-apoptotischen Proteins myeloidcell leukemia-1 (Mcl-1) aus der Bcl-2-Familie fest. (115) Dies steht in Korrelation mit den Ergebnissen dieser Arbeit, da eine durch Fieber gesteigerte Expression von SOCS3 mit simultaner Aktivierung von Caspase 3 gezeigt wurde.

Das Chemokin MCP-1 bewirkt die Invasion von Makrophagen und anderen Immunzellen in geschädigtes Gewebe. Diese phagozytieren, neben Pathogenen, die Reste zugrunde gegangener Zellen, wodurch Makrophagen dem Voranschreiten der Inflammation entgegenwirken. (27) So beseitigen sie beispielsweise Apoptose-Körperchen, welche sonst eine Expression von Zytokinen durch Freisetzung von DAMPs induzieren würden. (124, 149) MCP-1 zeigte sich in klinischen Studien nach I/R-Schädigung verstärkt exprimiert. (24) Interessanterweise wurde eine signifikante Steigerung der Expression von MCP-1 in OGD/R-geschädigten Kardiomyozyten nachgewiesen, nachdem diese über 24 Stunden gekühlt wurden (Versuchszeitpunkt 27 Stunden) sowie nach der Wiedererwärmung und 24-stündigem Fieber (Versuchszeitpunkt 53 Stunden). Somit könnte eine erhöhte MCP-1 Expression einen Mechanismus darstellen, über welchen die Hypothermie dem Voranschreiten der Inflammationsreaktion durch I/R-Schädigung entgegenwirkt. Entgegen den Beobachtungen dieser Arbeit wurde in einer Zellkultur mit primären Neuronen und BV2-Mikrogliazellen nach OGD-Schädigung und sechsständiger TH von 33 °C eine reduzierte Expression von MCP-1 und dem Chemokin Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) gemessen. Diese verursachte eine geringere Aktivierung und Migration von Mikrogliazellen und wirkte somit anti-inflammatorisch. (150) Ob es sich hierbei um organspezifische Unterschiede in den Signalwegen von MCP-1 oder um dessen Interaktion mit MIP-1 $\alpha$  handelt, bedarf noch weiterer Forschung.



**Abbildung 15: Mechanismen und Signalwege der sterilen Inflamationsreaktion** in I/R-geschädigten Kardiomyozyten. Abbildung modifiziert nach Tong und von Garlen et al. 2019. (151)

### 9.3.2 Fieber induzierter apoptotischer Zelltod

Nach Beginn des Fiebers wurde eine mit der Dauer zunehmende signifikante Steigerung der Caspase 3-Aktivität beobachtet. Diese erfolgte unabhängig der vorausgegangenen Temperatur oder davon, ob die Kardiomyozyten einer OGD/R-Schädigung unterzogen wurden. So konnte, anders als bei der Genexpression proinflammatorischer Zytokine, eine unter Fieber signifikant gesteigerte Aktivität von Caspase 3 in der 40 °C Kontrolle zu den Versuchszeitpunkten 31 und 53 Stunden gemessen werden. Die Apoptose fiel in der ungeschädigten 40 °C Kontrolle jedoch geringer aus, als zu Beginn des Versuchs in den OGD/R-geschädigten Zellen. Dagegen konnte eine *in vitro* Fieber-Simulation von 40 °C in ungeschädigten THP-1-

Makrophagen keinen erhöhten Zelltod nachweisen, gemessen mittels Annexin V/ PI- oder Trypanblau-Färbungen, die als Marker für apoptotischen und allgemeinen Zelltod genutzt werden können. (98) Interessanterweise zeigte sich in Korrelation zu der gesteigerten Aktivität der Caspase 3 in allen auf 40 °C erwärmten Zellen eine simultan verringerte RBM3-Expression. Somit könnte die gesteigerte Apoptose zum Teil auf das Ausbleiben der RBM3-vermittelten anti-apoptotischen Effekte zurückzuführen sein. (101-103) Zusätzlich zeigte sich in ungekühlten OGD/R-geschädigten auf 40 °C erwärmten Zellen eine Induktion von iNOS. Somit ist ein NO-indizierter apoptotischer Zelltod durch die Öffnung der mPTP als Reaktion auf oxidativen Zellstress möglich. (103) Nagata et al. stellten im Tierversuch eine vermehrte Induktion der Apoptose unter erhöhter Expression von SOCS3 fest. (115) Ebenso ging bei den OGD/R-geschädigten HL-1 Zellen unter längerem Fieber (Versuchszeitpunkte 41 und 53 Stunden) eine vermehrte Genexpression von SOCS3 mit einer gesteigerten Aktivierung von Caspase 3 einher.

#### **9.4 RBM3 Expression**

In unserem Versuchsmodell konnte in OGD/R-geschädigten HL-1 Kardiomyozyten eine verzögerte Induktion der RBM3 Gen- und Protein-Expression durch Hypothermie beobachtet werden. So zeigte sich die Hochregulation noch nicht nach fünfstündiger (Versuchszeitpunkt acht Stunden), sondern erst nach 24-stündiger Hypothermie (Versuchszeitpunkt 27 Stunden), blieb aber auch über 14 Stunden nach der Wiedererwärmung (Versuchszeitpunkt 41 Stunden) erhalten. Wurden die Zellen jedoch einem Fieber von 40 °C ausgesetzt, war die RBM3-Expression nach weiteren 24 Stunden (Versuchszeitpunkt 53 Stunden) sowohl auf mRNA-, als auch auf Protein-Ebene stark herabgesetzt. Wie bereits beschrieben, ging ein RBM3-Knockdown mit einer unter Fieber erhöhten Induktion von Apoptose einher. (101-103) Auch in einer klinischen Studie von Wong et al. zeigten Kinder mit Fieber, unabhängig einer Infektion, eine verringerte RBM3 Expression auf mRNA- und Protein-Ebene. Zudem

waren thermoregulierende miRNAs durch Fieber zunehmend hochreguliert. Diese miRNAs regulierten und reduzierten verschiedene Pyrogene, darunter das Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), sowie IL-6 und TNF- $\alpha$  und wirkten dem Fieber somit als negativen Feedback-Mechanismus über RBM3 entgegen. (98) Ushio et al. brachten die Hochregulation der RBM3-Expression unter Hypothermie mit einer gesteigerten Aktivität der NF- $\kappa$ B Untereinheit p65 unter Hypothermie in Verbindung. (91) Im Gegensatz dazu war in den HL-1 Kardiomyozyten unter OGD/R und Hypothermie keine gesteigerte Expression der ebenfalls NF- $\kappa$ B-abhängigen pro-inflammatorischen Zytokine nachweisbar. Dagegen wurde eine fast vollständig aufgehobene RBM3-Expression unter Fieber beobachtet, während die inflammatorische Zytokin-Expression in allen OGD/R-geschädigten HL-1 Zellen stark induziert war. Diese gegenläufige Regulation von RBM3 und pro-inflammatorischen Zytokinen in unserem Versuchsmodell könnte einen inhibitorischen Einfluss von RBM3 auf die Zytokin-Regulation andeuten, wobei die Rolle von NF- $\kappa$ B weiterer Forschung bedarf. Im Widerspruch dazu konnten Rosenthal et al. in einer klinischen Studie mit Kindern mit angeborenen Herzfehlern nach kardiopulmonaler Bypass-Operation unter TH erhöhte RBM3-Spiegel im Serum feststellen. Diese gingen jedoch einher mit erhöhten Konzentrationen der Zytokine und Chemokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-16, IL-18, MCP-1, CC-chemokine ligand 3 (CCL3), CCL4 und dem intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). (24) Ob die Inflamationsreaktion nach dem Eingriff ohne TH oder mit niedrigeren RBM3-Werten ausgeprägter ausgefallen wäre, bleibt hierbei offen.

## **9.5 Die Bedeutung der "therapeutischen Normothermie"**

Seit dem TTM-Trial von Nielsen et al., in dem keine Verbesserung der Überlebensrate oder des neurologischen Outcomes nach präklinischem HKS durch milde TH gegenüber kontrollierter Normothermie bei 36 °C festgestellt wurde, wird der protektive Einsatz von Hypothermie immer wieder diskutiert. (65) In dieser Arbeit konnte durch den Einsatz von TH eine Steigerung des oxidativen Stresses während

der OGD und nach Beginn der Reperfusion (Versuchszeitpunkte sechs und acht Stunden) festgestellt werden. Diese Steigerung der iNOS-Expression ging mit einer unter Hypothermie verstärkten Induktion von TNF- $\alpha$  einher. Obwohl TNF- $\alpha$  sowohl den oxidativen Zellstress wie auch die Transkription weiterer pro-inflammatorischer Zytokine vorantreiben kann, wurde in den gekühlten Kardiomyozyten keine verstärkte Induktion über den weiteren Versuchsverlauf gemessen. Im Verlauf war weder die Zytokin-Expression noch der oxidative Stress oder der nekrotische Zelltod unter Hypothermie und folgender Wiedererwärmung auf 37 °C erhöht. Die Expressionsmuster entsprachen denen der 37 °C Kontrollen und waren zudem teilweise signifikant reduziert gegenüber denen ungekühlter OGD/R-geschädigter Zellen. Somit konnten wir einen Vorteil durch TH feststellen.

Im Gegensatz dazu stehen einige klinischen Studien deren Ergebnisse die des TTM-Trials unterstützen. In einer multizentrischen Studie wurde der Unterschied zwischen einer TH von 33 °C mit einer therapeutischen Normothermie von 36 °C bei Patienten mit HKS verglichen. Hierbei zeigte sich kein Unterschied in Bezug auf die Mortalität oder das neurologische Outcome durch TH. (152) Die B-HYPO-Studie konnte bei Patienten mit traumatischer Kopfverletzung keinen Vorteil durch die Applikation milder TH über drei Tage mit anschließender sehr langsamer Wiedererwärmung (1 °C/Tag) gegenüber einer aktiver Fieberprävention feststellen. (139) Auch Rungatscher et al. untersuchten in einer retrospektiven Studie die durchschnittliche Körpertemperatur 24 Stunden nach Operation des Aortenbogens und setzten diese mit der 30-Tage-Mortalität, der Schlaganfall-Inzidenz und dem neurologischen Outcome in Korrelation. Während eine Durchschnittstemperatur von > 37 °C im Vergleich zu 36 – 37 °C die Mortalität von 10,9% auf 28,6% steigerte, das Schlaganfall-Risiko von 9,1% auf 64,3% und das Risiko eines schlechten neurologischen Outcomes von 39,6% auf 68,8%, war durch eine Temperatur von < 36 °C kein Vorteil gegeben. (153) Somit hatte die Vermeidung einer schädlichem postoperativen Fieber weitreichendere Konsequenzen, als die Applikation von TH

selbst. Zudem traten in einer anderen klinischen Studie weniger Komplikationen bei therapeutischer Normothermie im Vergleich zu TH auf. Neben weniger Zitter- sowie Fieberepisoden wurde auch ein geringerer Bedarf an Sedativa und Muskelrelaxantien gezählt. (154) Eine klinische Studie untersuchte den Medikamentenbedarf und die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine bei Kindern nach Kardiopulmonaler Bypass-OP, die über die Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation und die Beatmungszeit auf 32 °C oder 36 °C gehalten wurden. Die hypothermen Kinder bedurften signifikant mehr und höher dosierte inotropische medikamentöse Unterstützung, während bei den Zytokin-Spiegeln kein Unterschied festgestellt wurde. (155) In den gekühlten HL-1 Zellen wurde durch die signifikant gesteigerte Gen-Expression des Zytokins TNF- $\alpha$  nach zweistündiger Reperfusion möglicherweise doch ein schädlicher Effekt der TH beobachtet.

Auch wurde in dieser Arbeit eine Exazerbation der Inflammationsreaktion und des apoptotischen Zelltodes durch OGD/R-Schädigung unter Induktion von Fieber beobachtet, die trotz TH deutlich schwerwiegender war als die OGD/R-Schädigung unter Normothermie. Ob das Auftreten von Fieber in einem Organismus nach I/R-Schädigung jedoch Ausdruck einer Bakteriämie ist, oder einer besonders schwerwiegenden zerebralen oder systemischen Schädigung bleibt zu untersuchen. Ebenso wird diskutiert, ob die Komplikationen des Fiebers durch eine passive, physikalische Verringerung der Körpertemperatur verringert werden können. (156) Dennoch haben bereits einige Protokolle für die TH bzw. das TTM eine post-Hypothermie-Phase über 36 Stunden aufgenommen, in welcher der Erhalt der Normothermie im Fokus steht. (157)

Das TTM-Trial und die daraus gefolgerte Bedeutung der therapeutischen Normothermie wird jedoch auch kritisch diskutiert. So haben Poldermann und Varon in einem Review die Frage aufgeworfen, warum im TTM-Trial die TH im Vergleich zu den vielen vorausgegangenen klinischen Studien keinen protektiven Effekt vorweisen könne und verwiesen auf möglicherweise mangelhaft durchgeführte

Kühlungsprotokolle, die das Ergebnis verfälscht haben könnten. (158) Bray et al. verglichen in einer retrospektiven klinischen Studie die Patientendaten in der Intensivstation vor und nach Umstellung der Zieltemperatur von 33 °C auf 36 °C. Sie konnten die Vorteile des TTM Trials von 36 °C nicht reproduzieren. Stattdessen wurden häufigere Fieberepisoden, eine schlechtere Compliance der Temperatur und resultierend ein schlechterer klinischer Verlauf für die Patienten beobachtet, sodass sie als Konklusion eine Warnung an andere Kliniken aussprachen. (159) Diese Breite unterschiedlicher Ergebnisse könnte an der Verwendung von nach wie vor sehr unterschiedlichen Temperaturprotokollen liegen. Möglicherweise wäre die Einführung eines High Quality TTM Protokolls ein Lösungsansatz, wie es von Taccone et al. vorgeschlagen wird. (160)

Die TTM Study Group hat mittlerweile Protokolle für die derzeit laufende TTM2-Studie veröffentlicht. Dieses soll mit einer größeren Patientenzahl von rund 1900 Studienteilnehmern und standardisierten Protokollen vorherigen Problemen entgegenwirken und eine bessere Aussagekraft erzielen. (161) Zudem sind Folgeuntersuchungen der Patienten des ursprünglichen TTM-Trials geplant, um die Langzeiteffekte nach bis zu 24 Monaten auf deren neurokognitive Funktionen und sozialer Partizipation zu beurteilen. (162)

## **9.6 Limitationen**

Alle Versuche dieser Arbeit wurden mit der murinen HL-1-Kardiomyozyten Tumorzelllinie durchgeführt. Diese sollen physiologischen Kardiomyozyten in ihren morphologischen, biochemischen und elektrophysiologischen Eigenschaften gleichen. (110) Dennoch können mit zunehmenden Passagen keine beeinträchtigenden Mutationen ausgeschlossen werden. Zudem können die Ergebnisse aus Versuchen mit Zellen tierischen Ursprungs nur begrenzt auf den Menschen übertragen werden.



Es ist gelungen, in einer Kardiomyozyten Monokultur durch eine I/R-Schädigung eine sterile Inflamationsreaktion auszulösen, die zudem thermoregulatorischen Einflüssen unterlagen. Es erfolgte jedoch kein sicherer Beleg des zugrundeliegenden Pathomechanismus der „sterilen Inflamationsreaktion“, da keine extrazellulären Proteine und Zytokine gemessen wurden. Ebenso konnten die Interaktionsmuster mit anderen lokalen kardialen Zellen, wie Fibroblasten oder Endothelzellen, sowie mit immunkompetenten einwandernden Zellen, wie Makrophagen, Monozyten oder Leukozyten, nicht berücksichtigt werden. Dadurch könnten die vorliegenden Ergebnisse durch den Ausfall essentieller interzellulärer Funktionen verfälscht sein, da die verantwortlichen Zellen nicht am Versuch beteiligt waren. So war beispielsweise die Phagozytose der pro-inflammatorischen Apoptose-Körperchen durch invadierte Makrophagen nicht möglich, was die starke Induktion der inflammatorischen Zytokine weiter bestärkt haben könnte. (149)

Eine weitere Limitation stellt der nekrotische Zelltod als Nachweis der erfolgreichen Zellschädigung während und nach der Ischämie dar. Nach einer sechsständigen Ischämie war ein deutlicher, jedoch nicht signifikanter Anstieg der extrazellulären LDH-Konzentration nachweisbar.

In diesem Versuchsmodell wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Auftreten eines Fiebers die protektiven Effekte der TH aufhebt. Allerdings konnten wir keine Aussage über die Wahrscheinlichkeit treffen, dass Fieber überhaupt entsteht. In der Klinik werden die Ursachen von Fieber nach I/R-Schaden vielfältig beschrieben, u. a. durch eine Bakteriämie aus dem Darm, Aspiration des Mageninhalts, sowie durch Akkumulation von Endotoxinen, oder pro-inflammatorischen Zytokinen. (42, 43) Die Einflüsse des eigentlichen Ursprungs des Fiebers in einem Organismus konnten in dem Versuchsaufbau nicht berücksichtigt werden.

## 9.7 Schlussfolgerung

Wir konnten in dieser Arbeit die Induktion einer sterilen Inflammationsreaktion durch I/R-Schädigung in einer Kardiomyozyten-Monozellkultur feststellen. Diese wurde durch den Einsatz milder TH von 33,5 °C für 24 Stunden inhibiert, was in einer zeitweise verminderten Genexpression der pro-inflammatorischen Zytokine zu sehen war.

Die Wiedererwärmung auf Normothermie (37 °C) resultierte weder in erhöhtem apoptotischen oder nekrotischen Zelltod, noch in einer gesteigerten Transkription der oben genannten Zytokine, obwohl sie deutlich schneller als nach Empfehlung der Leitlinien durchgeführt wurde. Die Protektion der vorangegangenen Hypothermie blieb somit über die Wiedererwärmung hinaus bestehen.

Eine weitere Erwärmung der Kardiomyozyten auf Fieber (40 °C) führte zu einem signifikanten Anstieg der Genexpression der inflammatorischen Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  und SOCS3) und von iNOS, was einen erhöhten oxidativen Stress der Zellen zur Folge hat. Zudem wurde durch die Applikation von Fieber der apoptotische Zelltod induziert. Die durch Fieber ausgelösten Effekte waren zum Teil durch die vorausgegangene Hypothermie abgeschwächt. Spätestens nach 24-stündigem Fieber war die Protektion der Hypothermie jedoch nicht mehr nachweisbar.

Zusammenfassend stellt der Einsatz von TH eine effektive therapeutische Strategie zur Protektion OGD/R-geschädigter Kardiomyozyten dar. Die anschließende aktive Fiebertvermeidung hat jedoch noch größere Bedeutung bei der Reduktion der lokalen Inflammationsreaktion und des apoptotischen Zelltodes nach akuter I/R, als die eigentliche Hypothermie selbst.

## 9.8 Ausblick

Um die für die Inflammationsreaktion verantwortlichen Signalmoleküle zu ermitteln, sollte in weiteren Experimenten die Zusammensetzung der extrazellulären DAMPs mit

den zugehörigen PRRs untersucht werden. Die Herausarbeitung der aktivierten Signalwege könnte weitere therapeutische Interventionsstrategien ermöglichen.

Außerdem sollten die Interaktionsmuster der Kardiomyozyten mit anderen, insbesondere immunkompetenten Zellen in einer Ko-Kultur analysiert werden. Da die Versuchsreihe mit einer Tumorzelllinie nur über eine limitierte Aussagekraft verfügt, sollte das Modell zudem auf primäre Zellen und in einem weiteren Schritt auf ein Tierexperiment übertragen werden. Somit könnten die komplexen Interaktionsmuster zwischen verschiedenen kardialen Zellen und immunkompetenten Zellen weiter analysiert und verstanden werden.

## 10 Bibliographie

1. The top 10 causes of death 2019. 2020.  
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death/>  
Accessed February 20, 2021.
2. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2017;390(10100):1151-210.
3. Katus HA, Hamm CW, Zeiher AM. Deutscher Herzbericht: Rückgang der Sterberate aber weitere Zunahme von Herzerkrankungen. 2019.
4. Berdowski J, Berg RA, Tijssen JG, Koster RW. Global incidences of out-of-hospital cardiac arrest and survival rates: Systematic review of 67 prospective studies. *Resuscitation*. 2010;81(11):1479-87.
5. Fothergill RT, Watson LR, Chamberlain D, Viridi GK, Moore FP, Whitbread M. Increases in survival from out-of-hospital cardiac arrest: a five year study. *Resuscitation*. 2013;84(8):1089-92.
6. Nadkarni VM, Larkin GL, Peberdy MA, Carey SM, Kaye W, Mancini ME, Nichol G, Lane-Truitt T, Potts J, Ornato JP, Berg RA. First documented rhythm and clinical outcome from in-hospital cardiac arrest among children and adults. *JAMA*. 2006;295(1):50-7.
7. Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *N Engl J Med*. 2013;368(21):2004-13.
8. Reed GW, Rossi JE, Cannon CP. Acute myocardial infarction. *Lancet*. 2017;389(10065):197-210.
9. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, Caforio ALP, Crea F, Goudevenos JA, Halvorsen S, Hindricks G, Kastrati A, Lenzen MJ, Prescott E, Roffi M, Valgimigli M, Varenhorst C, Vranckx P, Widimsky P. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2018;39(2):119-77.

10. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007;357(11):1121-35.
11. Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med*. 1991;42:225-46.
12. Murphy E, Steenbergen C. Ion transport and energetics during cell death and protection. *Physiology (Bethesda)*. 2008;23:115-23.
13. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest*. 2005;115(3):500-8.
14. Jafri MS, Dudycha SJ, O'Rourke B. Cardiac energy metabolism: models of cellular respiration. *Annu Rev Biomed Eng*. 2001;3:57-81.
15. Lee S-H, Kim Y-D. Death and Survival of Cardiomyocytes in Acute Ischemia. *Korean Circ J*. 2006;36(3):165-77.
16. Minicucci MF, Azevedo PS, Polegato BF, Paiva SA, Zornoff LA. Heart failure after myocardial infarction: clinical implications and treatment. *Clin Cardiol*. 2011;34(7):410-4.
17. Jhund PS, McMurray JJ. Heart failure after acute myocardial infarction: a lost battle in the war on heart failure? *Circulation*. 2008;118(20):2019-21.
18. Marunouchi T, Tanonaka K. Cell Death in the Cardiac Myocyte. *Biol Pharm Bull*. 2015;38(8):1094-7.
19. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*. 1995;146(1):3-15.
20. Chan FK-M, Moriwaki K, De Rosa MJ. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2013;979:65-70.
21. Stachon P, Heidenreich A, Merz J, Hilgendorf I, Wolf D, Willecke F, von Garlen S, Albrecht P, Hardtner C, Ehrat N, Hoppe N, Reinohl J, von Zur Muhlen C, Bode C, Idzko M, Zirlik A. P2X7 Deficiency Blocks Lesional Inflammasome Activity and Ameliorates Atherosclerosis in Mice. *Circulation*. 2017;135(25):2524-33.
22. Aoyagi T, Matsui T. The Cardiomyocyte as a Source of Cytokines in Cardiac Injury. *J Cell Sci Ther*. 2011;2012(S5).

23. Mongardon N, Dumas F, Ricome S, Grimaldi D, Hissem T, Pene F, Cariou A. Postcardiac arrest syndrome: from immediate resuscitation to long-term outcome. *Ann Intensive Care*. 2011;1(1):45.
24. Rosenthal LM, Tong G, Wowro S, Walker C, Pfitzer C, Bottcher W, Miera O, Berger F, Schmitt KRL. A Prospective Clinical Trial Measuring the Effects of Cardiopulmonary Bypass Under Mild Hypothermia on the Inflammatory Response and Regulation of Cold-Shock Protein RNA-Binding Motif 3. *Ther Hypothermia Temp Manag*. 2019.
25. Carow B, Rottenberg ME. SOCS3, a Major Regulator of Infection and Inflammation. *Front Immunol*. 2014;5:58.
26. Ackerman WEt, Zhang XL, Rovin BH, Kniss DA. Modulation of cytokine-induced cyclooxygenase 2 expression by PPARG ligands through NFkappaB signal disruption in human WISH and amnion cells. *Biol Reprod*. 2005;73(3):527-35.
27. Ghigo A, Franco I, Morello F, Hirsch E. Myocyte signalling in leucocyte recruitment to the heart. *Cardiovasc Res*. 2014;102(2):270-80.
28. Zhou T, Chuang CC, Zuo L. Molecular Characterization of Reactive Oxygen Species in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Biomed Res Int*. 2015;2015:864946.
29. Schulz R, Kelm M, Heusch G. Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2004;61(3):402-13.
30. Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Inserte J, Rodriguez-Sinovas A, Piper HM. Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovasc Res*. 2012;94(2):168-80.
31. Hearse DJ, Bolli R. Reperfusion induced injury: manifestations, mechanisms, and clinical relevance. *Cardiovasc Res*. 1992;26(2):101-8.
32. Nolan JP, Neumar RW, Adrie C, Aibiki M, Berg RA, Bottiger BW, Callaway C, Clark RS, Geocadin RG, Jauch EC, Kern KB, Laurent I, Longstreth WT, Merchant RM, Morley P, Morrison LJ, Nadkarni V, Peberdy MA, Rivers EP, Rodriguez-Nunez A, Sellke FW, Spaulding C, Sunde K, Hoek TV. Post-cardiac arrest syndrome: epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication. A Scientific Statement from the International Liaison Committee on Resuscitation; 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; the Council on Stroke. Resuscitation. 2008;79(3):350-79.

33. Ong SB, Samangouei P, Kalkhoran SB, Hausenloy DJ. The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;78:23-34.

34. Krech J, Tong G, Wowro S, Walker C, Rosenthal LM, Berger F, Schmitt KRL. Moderate therapeutic hypothermia induces multimodal protective effects in oxygen-glucose deprivation/reperfusion injured cardiomyocytes. *Mitochondrion.* 2017;35:1-10.

35. Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999;6(2):99-104.

36. McCully JD, Wakiyama H, Hsieh YJ, Jones M, Levitsky S. Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286(5):H1923-35.

37. Conley MJ, McNeer JF, Lee KL, Wagner GS, Rosati RA. Cardiac arrest complicating acute myocardial infarction: predictability and prognosis. *Am J Cardiol.* 1977;39(1):7-12.

38. Spaulding CM, Joly LM, Rosenberg A, Monchi M, Weber SN, Dhainaut JF, Carli P. Immediate coronary angiography in survivors of out-of-hospital cardiac arrest. *N Engl J Med.* 1997;336(23):1629-33.

39. Adrie C, Laurent I, Monchi M, Cariou A, Dhainaut JF, Spaulding C. Postresuscitation disease after cardiac arrest: a sepsis-like syndrome? *Curr Opin Crit Care.* 2004;10(3):208-12.

40. Wong MK, Morrison LJ, Qiu F, Austin PC, Cheskes S, Dorian P, Scales DC, Tu JV, Verbeek PR, Wijeyesundera HC, Ko DT. Trends in short- and long-term survival among out-of-hospital cardiac arrest patients alive at hospital arrival. *Circulation.* 2014;130(21):1883-90.

41. Adrie C, Adib-Conquy M, Laurent I, Monchi M, Vinsonneau C, Fitting C, Fraise F, Dinh-Xuan AT, Carli P, Spaulding C, Dhainaut JF, Cavaillon JM. Successful cardiopulmonary resuscitation after cardiac arrest as a "sepsis-like" syndrome. *Circulation.* 2002;106(5):562-8.

42. Cerchiari EL, Safar P, Klein E, Diven W. Visceral, hematologic and bacteriologic changes and neurologic outcome after cardiac arrest in dogs. The visceral post-resuscitation syndrome. *Resuscitation*. 1993;25(2):119-36.
43. Gaussorgues P, Gueugniaud PY, Vedrinne JM, Salord F, Mercatello A, Robert D. Bacteremia following cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation. *Intensive Care Medicine*. 1988;14(5):575-7.
44. Jentzer JC, Chonde MD, Dezfulian C. Myocardial Dysfunction and Shock after Cardiac Arrest. *Biomed Res Int*. 2015;2015:314796.
45. Benz-Woerner J, Delodder F, Benz R, Cueni-Villoz N, Feihl F, Rossetti AO, Liaudet L, Oddo M. Body temperature regulation and outcome after cardiac arrest and therapeutic hypothermia. *Resuscitation*. 2012;83(3):338-42.
46. Saper CB, Breder CD. The neurologic basis of fever. *N Engl J Med*. 1994;330(26):1880-6.
47. Picetti E, Antonini MV, Bartolini Y, DeAngelis A, Delaj L, Florindo I, Villani F, Caspani ML. Delayed Fever and Neurological Outcome after Cardiac Arrest: A Retrospective Clinical Study. *Neurocrit Care*. 2016;24(2):163-71.
48. Takasu A, Saitoh D, Kaneko N, Sakamoto T, Okada Y. Hyperthermia: is it an ominous sign after cardiac arrest? *Resuscitation*. 2001;49(3):273-7.
49. Zeiner A, Holzer M, Sterz F, Schorkhuber W, Eisenburger P, Havel C, Kliegel A, Laggner AN. Hyperthermia after cardiac arrest is associated with an unfavorable neurologic outcome. *Arch Intern Med*. 2001;161(16):2007-12.
50. Laver S, Farrow C, Turner D, Nolan J. Mode of death after admission to an intensive care unit following cardiac arrest. *Intensive Care Med*. 2004;30(11):2126-8.
51. Callaway CW, Donnino MW, Fink EL, Geocadin RG, Golan E, Kern KB, Leary M, Meurer WJ, Peberdy MA, Thompson TM, Zimmerman JL. Part 8: Post-Cardiac Arrest Care: 2015 American Heart Association Guidelines Update for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation*. 2015;132(18 Suppl 2):S465-82.
52. Polderman KH, Herold I. Therapeutic hypothermia and controlled normothermia in the intensive care unit: practical considerations, side effects, and cooling methods. *Crit Care Med*. 2009;37(3):1101-20.



53. Song SS, Lyden PD. Overview of therapeutic hypothermia. *Curr Treat Options Neurol.* 2012;14(6):541-8.
54. Omairi AM, Pandey S. Targeted Hypothermia Temperature Management. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.; 2020.
55. Palmers PJ, Hiltrop N, Ameloot K, Timmermans P, Ferdinande B, Sinnaeve P, Nieuwendijk R, Malbrain ML. From therapeutic hypothermia towards targeted temperature management: a decade of evolution. *Anaesthesiol Intensive Ther.* 2015;47(2):156-61.
56. Nolan JP, Soar J, Cariou A, Cronberg T, Moulaert VRM, Deakin CD, Bottiger BW, Friberg H, Sunde K, Sandroni C. European Resuscitation Council and European Society of Intensive Care Medicine Guidelines for Post-resuscitation Care 2015: Section 5 of the European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2015. *Resuscitation.* 2015;95:202-22.
57. Bernard SA, Gray TW, Buist MD, Jones BM, Silvester W, Gutteridge G, Smith K. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N Engl J Med.* 2002;346(8):557-63.
58. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *N Engl J Med.* 2002;346(8):549-56.
59. Storm C, Steffen I, Schefold JC, Krueger A, Oppert M, Jorres A, Hasper D. Mild therapeutic hypothermia shortens intensive care unit stay of survivors after out-of-hospital cardiac arrest compared to historical controls. *Crit Care.* 2008;12(3):R78.
60. Kirkegaard H, Soreide E, de Haas I, Pettila V, Taccone FS, Arus U, Storm C, Hassager C, Nielsen JF, Sorensen CA, Ilkjaer S, Jeppesen AN, Grejs AM, Duez CHV, Hjort J, Larsen AI, Toome V, Tiainen M, Hastbacka J, Laitio T, Skrifvars MB. Targeted Temperature Management for 48 vs 24 Hours and Neurologic Outcome After Out-of-Hospital Cardiac Arrest: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2017;318(4):341-50.
61. Perman SM, Grossestreuer AV, Wiebe DJ, Carr BG, Abella BS, Gaieski DF. The Utility of Therapeutic Hypothermia for Post-Cardiac Arrest Syndrome Patients With an Initial Nonshockable Rhythm. *Circulation.* 2015;132(22):2146-51.
62. Testori C, Sterz F, Behringer W, Haugk M, Uray T, Zeiner A, Janata A, Arrich J, Holzer M, Losert H. Mild therapeutic hypothermia is associated with favourable

outcome in patients after cardiac arrest with non-shockable rhythms. *Resuscitation*. 2011;82(9):1162-7.

63. Schenone AL, Cohen A, Patarroyo G, Harper L, Wang X, Shishehbor MH, Menon V, Duggal A. Therapeutic hypothermia after cardiac arrest: A systematic review/meta-analysis exploring the impact of expanded criteria and targeted temperature. *Resuscitation*. 2016;108:102-10.

64. Nichol G, Huszti E, Kim F, Fly D, Parnia S, Donnino M, Sorenson T, Callaway CW. Does induction of hypothermia improve outcomes after in-hospital cardiac arrest? *Resuscitation*. 2013;84(5):620-5.

65. Nielsen N, Wetterslev J, Cronberg T, Erlinge D, Gasche Y, Hassager C, Horn J, Hovdenes J, Kjaergaard J, Kuiper M, Pellis T, Stammer P, Wanscher M, Wise MP, Aneman A, Al-Subaie N, Boesgaard S, Bro-Jeppesen J, Brunetti I, Bugge JF, Hingston CD, Juffermans NP, Koopmans M, Kober L, Langorgen J, Lilja G, Moller JE, Rundgren M, Rylander C, Smid O, Werer C, Winkel P, Friberg H. Targeted temperature management at 33 degrees C versus 36 degrees C after cardiac arrest. *N Engl J Med*. 2013;369(23):2197-206.

66. Donnino MW, Andersen LW, Berg KM, Reynolds JC, Nolan JP, Morley PT, Lang E, Cocchi MN, Xanthos T, Callaway CW, Soar J. Temperature Management After Cardiac Arrest: An Advisory Statement by the Advanced Life Support Task Force of the International Liaison Committee on Resuscitation and the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee and the Council on Cardiopulmonary, Critical Care, Perioperative and Resuscitation. *Circulation*. 2015;132(25):2448-56.

67. Kutcher ME, Forsythe RM, Tisherman SA. Emergency preservation and resuscitation for cardiac arrest from trauma. *Int J Surg*. 2016;33(Pt B):209-12.

68. Wu X, Drabek T, Kochanek PM, Henchir J, Stezoski SW, Stezoski J, Cochran K, Garman R, Tisherman SA. Induction of profound hypothermia for emergency preservation and resuscitation allows intact survival after cardiac arrest resulting from prolonged lethal hemorrhage and trauma in dogs. *Circulation*. 2006;113(16):1974-82.

69. Kang IS, Fumiaki I, Pyun WB. Therapeutic Hypothermia for Cardioprotection in Acute Myocardial Infarction. *Yonsei Med J*. 2016;57(2):291-7.

70. Polderman KH. Induced hypothermia and fever control for prevention and treatment of neurological injuries. *Lancet*. 2008;371(9628):1955-69.

71. Tissier R, Couvreur N, Ghaleh B, Bruneval P, Lidouren F, Morin D, Zini R, Bize A, Chenoune M, Belair MF, Mandet C, Douheret M, Dubois-Rande JL, Parker JC, Cohen MV, Downey JM, Berdeaux A. Rapid cooling preserves the ischaemic myocardium against mitochondrial damage and left ventricular dysfunction. *Cardiovasc Res.* 2009;83(2):345-53.
72. Flemmer AW, Maier RF, Hummler H. [Treatment of neonatal asphyxia with a special focus on therapeutic hypothermia]. *Klin Padiatr.* 2014;226(1):29-37.
73. Silveira RC, Procianoy RS. Hypothermia therapy for newborns with hypoxic ischemic encephalopathy. *J Pediatr (Rio J).* 2015;91(6 Suppl 1):S78-83.
74. Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA, Tyson JE, McDonald SA, Donovan EF, Fanaroff AA, Poole WK, Wright LL, Higgins RD, Finer NN, Carlo WA, Duara S, Oh W, Cotten CM, Stevenson DK, Stoll BJ, Lemons JA, Guillet R, Jobe AH. Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *N Engl J Med.* 2005;353(15):1574-84.
75. Jacobs SE, Morley CJ, Inder TE, Stewart MJ, Smith KR, McNamara PJ, Wright IM, Kirpalani HM, Darlow BA, Doyle LW. Whole-body hypothermia for term and near-term newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy: a randomized controlled trial. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2011;165(8):692-700.
76. Shankaran S, Pappas A, McDonald SA, Vohr BR, Hintz SR, Yolton K, Gustafson KE, Leach TM, Green C, Bara R, Petrie Huitema CM, Ehrenkranz RA, Tyson JE, Das A, Hammond J, Peralta-Carcelen M, Evans PW, Heyne RJ, Wilson-Costello DE, Vaucher YE, Bauer CR, Dusick AM, Adams-Chapman I, Goldstein RF, Guillet R, Papile LA, Higgins RD. Childhood outcomes after hypothermia for neonatal encephalopathy. *N Engl J Med.* 2012;366(22):2085-92.
77. Laptook A, Tyson J, Shankaran S, McDonald S, Ehrenkranz R, Fanaroff A, Donovan E, Goldberg R, O'Shea TM, Higgins RD, Poole WK. Elevated temperature after hypoxic-ischemic encephalopathy: risk factor for adverse outcomes. *Pediatrics.* 2008;122(3):491-9.
78. Sun YJ, Zhang ZY, Fan B, Li GY. Neuroprotection by Therapeutic Hypothermia. *Front Neurosci.* 2019;13:586.
79. Hong JM, Lee JS, Song HJ, Jeong HS, Choi HA, Lee K. Therapeutic hypothermia after recanalization in patients with acute ischemic stroke. *Stroke.* 2014;45(1):134-40.

80. Jackson TC, Kochanek PM. A New Vision for Therapeutic Hypothermia in the Era of Targeted Temperature Management: A Speculative Synthesis. *Ther Hypothermia Temp Manag.* 2019;9(1):13-47.
81. Tian DH, Wan B, Bannon PG, Misfeld M, LeMaire SA, Kazui T, Kouchoukos NT, Elefteriades JA, Bavaria J, Coselli JS, Griep RB, Mohr FW, Oo A, Svensson LG, Hughes GC, Yan TD. A meta-analysis of deep hypothermic circulatory arrest versus moderate hypothermic circulatory arrest with selective antegrade cerebral perfusion. *Ann Cardiothorac Surg.* 2013;2(2):148-58.
82. Flynn LMC, Rhodes J, Andrews PJD. Therapeutic Hypothermia Reduces Intracranial Pressure and Partial Brain Oxygen Tension in Patients with Severe Traumatic Brain Injury: Preliminary Data from the Eurotherm3235 Trial. *Therapeutic hypothermia and temperature management.* 2015;5(3):143-51.
83. Maier CM, Sun GH, Cheng D, Yenari MA, Chan PH, Steinberg GK. Effects of mild hypothermia on superoxide anion production, superoxide dismutase expression, and activity following transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis.* 2002;11(1):28-42.
84. Polderman KH. Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Crit Care Med.* 2009;37(7 Suppl):S186-202.
85. Zhu X, Buhner C, Wellmann S. Cold-inducible proteins CIRP and RBM3, a unique couple with activities far beyond the cold. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(20):3839-59.
86. Simkhovich BZ, Hale SL, Kloner RA. Metabolic mechanism by which mild regional hypothermia preserves ischemic tissue. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2004;9(2):83-90.
87. Otake H, Shite J, Paredes OL, Shinke T, Yoshikawa R, Tanino Y, Watanabe S, Ozawa T, Matsumoto D, Ogasawara D, Yokoyama M. Catheter-based transcatheter myocardial hypothermia attenuates arrhythmia and myocardial necrosis in pigs with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(2):250-60.
88. Tong G, Walker C, Buhner C, Berger F, Miera O, Schmitt KR. Moderate hypothermia initiated during oxygen-glucose deprivation preserves HL-1 cardiomyocytes. *Cryobiology.* 2015;70(2):101-8.
89. Eberspacher E, Werner C, Engelhard K, Pape M, Laacke L, Winner D, Hollweck R, Hutzler P, Kochs E. Long-term effects of hypothermia on neuronal cell death and the

concentration of apoptotic proteins after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2005;49(4):477-87.

90. Fukuda H, Tomimatsu T, Watanabe N, Mu JW, Kohzuki M, Endo M, Fujii E, Kanzaki T, Murata Y. Post-ischemic hypothermia blocks caspase-3 activation in the newborn rat brain after hypoxia-ischemia. *Brain Res*. 2001;910(1-2):187-91.

91. Ushio A, Eto K. RBM3 expression is upregulated by NF-kappaB p65 activity, protecting cells from apoptosis, during mild hypothermia. *J Cell Biochem*. 2018;119(7):5734-49.

92. Meybohm P, Gruenewald M, Albrecht M, Zacharowski KD, Lucius R, Zitta K, Koch A, Tran N, Scholz J, Bein B. Hypothermia and postconditioning after cardiopulmonary resuscitation reduce cardiac dysfunction by modulating inflammation, apoptosis and remodeling. *PLoS One*. 2009;4(10):e7588.

93. Tong G, Endersfelder S, Rosenthal LM, Wollersheim S, Sauer IM, Buhner C, Berger F, Schmitt KR. Effects of moderate and deep hypothermia on RNA-binding proteins RBM3 and CIRP expressions in murine hippocampal brain slices. *Brain Res*. 2013;1504:74-84.

94. Leonart ME. A new generation of proto-oncogenes: cold-inducible RNA binding proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1805(1):43-52.

95. Williams DR, Epperson LE, Li W, Hughes MA, Taylor R, Rogers J, Martin SL, Cossins AR, Gracey AY. Seasonally hibernating phenotype assessed through transcript screening. *Physiol Genomics*. 2005;24(1):13-22.

96. Smart F, Aschrafi A, Atkins A, Owens GC, Pilotte J, Cunningham BA, Vanderklish PW. Two isoforms of the cold-inducible mRNA-binding protein RBM3 localize to dendrites and promote translation. *Journal of Neurochemistry*. 2007;101(5):1367-79.

97. Dresios J, Aschrafi A, Owens GC, Vanderklish PW, Edelman GM, Mauro VP. Cold stress-induced protein Rbm3 binds 60S ribosomal subunits, alters microRNA levels, and enhances global protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(6):1865-70.

98. Wong JJ, Au AY, Gao D, Pinello N, Kwok CT, Thoeng A, Lau KA, Gordon JE, Schmitz U, Feng Y, Nguyen TV, Middleton R, Bailey CG, Holst J, Rasko JE, Ritchie W. RBM3 regulates temperature sensitive miR-142-5p and miR-143 (thermomiRs), which target immune genes and control fever. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(6):2888-97.

99. Pilotte J, Cunningham BA, Edelman GM, Vanderklish PW. Developmentally regulated expression of the cold-inducible RNA-binding motif protein 3 in euthermic rat brain. *Brain Research*. 2009;1258:12-24.
100. Xia W, Su L, Jiao J. Cold-induced protein RBM3 orchestrates neurogenesis via modulating Yap mRNA stability in cold stress. *J Cell Biol*. 2018;217(10):3464-79.
101. Chip S, Zelmer A, Ogunshola OO, Felderhoff-Mueser U, Nitsch C, Buhner C, Wellmann S. The RNA-binding protein RBM3 is involved in hypothermia induced neuroprotection. *Neurobiol Dis*. 2011;43(2):388-96.
102. Wellmann S, Truss M, Bruder E, Tornillo L, Zelmer A, Seeger K, Buhner C. The RNA-binding protein RBM3 is required for cell proliferation and protects against serum deprivation-induced cell death. *Pediatr Res*. 2010;67(1):35-41.
103. Yang HJ, Ju F, Guo XX, Ma SP, Wang L, Cheng BF, Zhuang RJ, Zhang BB, Shi X, Feng ZW, Wang M. RNA-binding protein RBM3 prevents NO-induced apoptosis in human neuroblastoma cells by modulating p38 signaling and miR-143. *Sci Rep*. 2017;7:41738.
104. Polderman KH, Peerdeman SM, Girbes AR. Hypophosphatemia and hypomagnesemia induced by cooling in patients with severe head injury. *J Neurosurg*. 2001;94(5):697-705.
105. Leary M, Grossestreuer AV, Iannaccone S, Gonzalez M, Shofer FS, Povey C, Wendell G, Archer SE, Gaieski DF, Abella BS. Pyrexia and neurologic outcomes after therapeutic hypothermia for cardiac arrest. *Resuscitation*. 2013;84(8):1056-61.
106. Cocchi MN, Boone MD, Giberson B, Giberson T, Farrell E, Saliccioli JD, Talmor D, Williams D, Donnino MW. Fever after rewarming: incidence of pyrexia in postcardiac arrest patients who have undergone mild therapeutic hypothermia. *J Intensive Care Med*. 2014;29(6):365-9.
107. Kim YM, Youn CS, Kim SH, Lee BK, Cho IS, Cho GC, Jeung KW, Oh SH, Choi SP, Shin JH, Cha KC, Oh JS, Yim HW, Park KN. Adverse events associated with poor neurological outcome during targeted temperature management and advanced critical care after out-of-hospital cardiac arrest. *Crit Care*. 2015;19(1):283.
108. Suffoletto B, Peberdy MA, van der Hoek T, Callaway C. Body temperature changes are associated with outcomes following in-hospital cardiac arrest and return of spontaneous circulation. *Resuscitation*. 2009;80(12):1365-70.

109. Winters SA, Wolf KH, Kettinger SA, Seif EK, Jones JS, Bacon-Baguley T. Assessment of risk factors for post-rewarming "rebound hyperthermia" in cardiac arrest patients undergoing therapeutic hypothermia. *Resuscitation*. 2013;84(9):1245-9.
110. Claycomb WC, Lanson NA, Jr., Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ, Jr. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(6):2979-84.
111. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*. 2006;27(2-3):95-125.
112. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
113. Mackowiak PA. Concepts of fever. *Arch Intern Med*. 1998;158(17):1870-81.
114. Rider P, Carmi Y, Guttman O, Braiman A, Cohen I, Voronov E, White MR, Dinarello CA, Apte RN. IL-1alpha and IL-1beta recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. *J Immunol*. 2011;187(9):4835-43.
115. Nagata T, Yasukawa H, Kyogoku S, Oba T, Takahashi J, Nohara S, Minami T, Mawatari K, Sugi Y, Shimozono K, Pradervand S, Hoshijima M, Aoki H, Fukumoto Y, Imaizumi T. Cardiac-Specific SOCS3 Deletion Prevents In Vivo Myocardial Ischemia Reperfusion Injury through Sustained Activation of Cardioprotective Signaling Molecules. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127942.
116. de Groot H, Rauen U. Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a review. *Transplant Proc*. 2007;39(2):481-4.
117. Tong G, Lam PD, Brey F, Krech J, Wowro SJ, von Garlen NNA, Berger F, Schmitt KRL. The Effects of Targeted Temperature Management on Oxygen-Glucose Deprivation/Reperfusion-Induced Injury and DAMP Release in Murine Primary Cardiomyocytes. *Mediators of Inflammation*. 2020;2020:1234840.
118. Milei J, Grana DR, Forcada P, Ambrosio G. Mitochondrial oxidative and structural damage in ischemia-reperfusion in human myocardium. Current knowledge and future directions. *Front Biosci*. 2007;12:1124-30.

119. Feng Q, Lu X, Jones DL, Shen J, Arnold JM. Increased inducible nitric oxide synthase expression contributes to myocardial dysfunction and higher mortality after myocardial infarction in mice. *Circulation*. 2001;104(6):700-4.
120. Han HS, Qiao Y, Karabiyikoglu M, Giffard RG, Yenari MA. Influence of mild hypothermia on inducible nitric oxide synthase expression and reactive nitrogen production in experimental stroke and inflammation. *J Neurosci*. 2002;22(10):3921-8.
121. Baikoussis NG, Papakonstantinou NA, Verra C, Kakouris G, Chounti M, Hountis P, Dedeilias P, Argiriou M. Mechanisms of oxidative stress and myocardial protection during open-heart surgery. *Ann Card Anaesth*. 2015;18(4):555-64.
122. Marek-Iannucci S, Thomas A, Hou J, Crupi A, Sin J, Taylor DJ, Czer LS, Esmailian F, Mentzer RM, Jr., Andres AM, Gottlieb RA. Myocardial hypothermia increases autophagic flux, mitochondrial mass and myocardial function after ischemia-reperfusion injury. *Sci Rep*. 2019;9(1):10001.
123. Maass DL, Hybki DP, White J, Horton JW. The time course of cardiac NF-kappaB activation and TNF-alpha secretion by cardiac myocytes after burn injury: contribution to burn-related cardiac contractile dysfunction. *Shock*. 2002;17(4):293-9.
124. Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol*. 2014;11(5):255-65.
125. Léon K, Pichavant-Rafini K, Ollivier H, Monbet V, L'Her E. Does induction time of mild hypothermia influence the survival duration of septic rats? *Ther Hypothermia Temp Manag*. 2015;5(2):85-8.
126. Lee JH, Yoon EJ, Seo J, Kavoussi A, Chung YE, Chung SP, Park I, Kim CH, You JS. Hypothermia inhibits the propagation of acute ischemic injury by inhibiting HMGB1. *Mol Brain*. 2016;9(1):81.
127. Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand JB, Bies RD, Young JB, Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation*. 1996;93(4):704-11.
128. Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, Young JB, White BG, Mann DL. Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST). *Circulation*. 2001;103(16):2055-9.



129. Kleinbongard P, Heusch G, Schulz R. TNF $\alpha$  in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure. *Pharmacology & Therapeutics*. 2010;127(3):295-314.
130. Gurevitch J, Frolkis I, Yuhas Y, Paz Y, Matsa M, Mohr R, Yakirevich V. Tumor necrosis factor-alpha is released from the isolated heart undergoing ischemia and reperfusion. *J Am Coll Cardiol*. 1996;28(1):247-52.
131. Damas JK, Gullestad L, Aukrust P. Cytokines as new treatment targets in chronic heart failure. *Curr Control Trials Cardiovasc Med*. 2001;2(6):271-7.
132. Pei H, Song X, Peng C, Tan Y, Li Y, Li X, Ma S, Wang Q, Huang R, Yang D, Li D, Gao E, Yang Y. TNF-alpha inhibitor protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via Notch1-mediated suppression of oxidative/nitrative stress. *Free Radic Biol Med*. 2015;82:114-21.
133. Squadrito F, Altavilla D, Zingarelli B, Iocolano M, Calapai G, Campo GM, Miceli A, Caputi AP. Tumor necrosis factor involvement in myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Eur J Pharmacol*. 1993;237(2-3):223-30.
134. Gu Q, Yang XP, Bonde P, DiPaula A, Fox-Talbot K, Becker LC. Inhibition of TNF- $\alpha$  Reduces Myocardial Injury and Proinflammatory Pathways Following Ischemia-Reperfusion in the Dog. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2006;48(6):320-8.
135. Song W, Lu X, Feng Q. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces apoptosis via inducible nitric oxide synthase in neonatal mouse cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*. 2000;45(3):595-602.
136. Yuan W, Wu JY, Zhao YZ, Li J, Li JB, Li ZH, Li CS. Effects of Mild Hypothermia on Cardiac and Neurological Function in Piglets Under Pathological and Physiological Stress Conditions. *Ther Hypothermia Temp Manag*. 2019;9(2):136-45.
137. Shi J, Dai W, Kloner RA. Therapeutic Hypothermia Reduces the Inflammatory Response Following Ischemia/Reperfusion Injury in Rat Hearts. *Ther Hypothermia Temp Manag*. 2017;7(3):162-70.
138. Gordan ML, Kellermann K, Blobner M, Nollert G, Kochs EF, Jungwirth B. Fast rewarming after deep hypothermic circulatory arrest in rats impairs histologic outcome and increases NFkappaB expression in the brain. *Perfusion*. 2010;25(5):349-54.

139. Kaneko T, Fujita M, Yamashita S, Oda Y, Suehiro E, Dohi K, Kasaoka S, Kuroda Y, Kobata H, Maekawa T. Slow rewarming improved the neurological outcomes of prolonged mild therapeutic hypothermia in patients with severe traumatic brain injury and an evacuated hematoma. *Scientific reports*. 2018;8(1):11630-.
140. Bro-Jeppesen J, Hassager C, Wanscher M, Soholm H, Thomsen JH, Lippert FK, Moller JE, Kober L, Kjaergaard J. Post-hypothermia fever is associated with increased mortality after out-of-hospital cardiac arrest. *Resuscitation*. 2013;84(12):1734-40.
141. Chai Z, Gatti S, Toniatti C, Poli V, Bartfai T. Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: a study on IL-6-deficient mice. *J Exp Med*. 1996;183(1):311-6.
142. Fontes JA, Rose NR, Cihakova D. The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure. *Cytokine*. 2015;74(1):62-8.
143. Tanaka T, Kishimoto T. Targeting interleukin-6: all the way to treat autoimmune and inflammatory diseases. *Int J Biol Sci*. 2012;8(9):1227-36.
144. Mezzaroma E, Toldo S, Farkas D, Seropian IM, Van Tassell BW, Salloum FN, Kannan HR, Menna AC, Voelkel NF, Abbate A. The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(49):19725-30.
145. Merkle S, Frantz S, Schon MP, Bauersachs J, Buitrago M, Frost RJ, Schmitteckert EM, Lohse MJ, Engelhardt S. A role for caspase-1 in heart failure. *Circ Res*. 2007;100(5):645-53.
146. Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, Izawa A, Takahashi Y, Masumoto J, Koyama J, Hongo M, Noda T, Nakayama J, Sagara J, Taniguchi S, Ikeda U. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2011;123(6):594-604.
147. Sun H, Cai J, Shen S, Ren X. Hypothermia treatment ameliorated cyclin-dependent kinase 5-mediated inflammation in ischemic stroke and improved outcomes in ischemic stroke patients. *Clinics (Sao Paulo)*. 2019;74:e938.
148. Sanders DB, Larson DF, Hunter K, Gorman M, Yang B. Comparison of tumor necrosis factor-alpha effect on the expression of iNOS in macrophage and cardiac myocytes. *Perfusion*. 2001;16(1):67-74.

149. Szondy Z, Sarang Z, Kiss B, Garabuczi E, Koroskenyi K. Anti-inflammatory Mechanisms Triggered by Apoptotic Cells during Their Clearance. *Front Immunol.* 2017;8:909.
150. Lee JH, Wei ZZ, Cao W, Won S, Gu X, Winter M, Dix TA, Wei L, Yu SP. Regulation of therapeutic hypothermia on inflammatory cytokines, microglia polarization, migration and functional recovery after ischemic stroke in mice. *Neurobiol Dis.* 2016;96:248-60.
151. Tong G, von Garlen NNA, Wowro SJ, Lam PD, Krech J, Berger F, Schmitt KRL. Post-TTM Rebound Pyrexia after Ischemia-Reperfusion Injury Results in Sterile Inflammation and Apoptosis in Cardiomyocytes. *Mediators Inflamm.* 2019;2019:6431957.
152. Chandrasekaran PN, Dezfulian C, Polderman KH. What is the right temperature to cool post-cardiac arrest patients? *Crit Care.* 2015;19:406.
153. Rungatscher A, Luciani GB, Linardi D, Milani E, Gottin L, Walpoth B, Faggian G. Temperature Variation After Rewarming from Deep Hypothermic Circulatory Arrest Is Associated with Survival and Neurologic Outcome. *Ther Hypothermia Temp Manag.* 2017;7(2):101-6.
154. Casamento A, Minson A, Radford S, Mårtensson J, Ridgeon E, Young P, Bellomo R. A comparison of therapeutic hypothermia and strict therapeutic normothermia after cardiac arrest. *Resuscitation.* 2016;106:83-8.
155. Schmitt KR, Fedarava K, Justus G, Redlin M, Böttcher W, Delmo Walter EM, Hetzer R, Berger F, Miera O. Hypothermia During Cardiopulmonary Bypass Increases Need for Inotropic Support but Does Not Impact Inflammation in Children Undergoing Surgical Ventricular Septal Defect Closure. *Artif Organs.* 2016;40(5):470-9.
156. De Deyne C. Post-cooling fever in post-cardiac arrest patients: post-cooling normothermia as part of target temperature management? *BMC Emerg Med.* 2015;15(Suppl 1):A8-A.
157. Brugger H, Paal P. Does untreated post-cardiac-arrest fever counteract the benefit of therapeutic hypothermia? *Resuscitation.* 2013;84(12):1650-1.
158. Polderman KH, Varon J. Interpreting the results of the targeted temperature management trial in cardiac arrest. *Ther Hypothermia Temp Manag.* 2015;5(2):73-6.

159. Bray JE, Stub D, Bloom JE, Segan L, Mitra B, Smith K, Finn J, Bernard S. Changing target temperature from 33°C to 36°C in the ICU management of out-of-hospital cardiac arrest: A before and after study. *Resuscitation*. 2017;113:39-43.
160. Taccone FS, Picetti E, Vincent JL. High Quality Targeted Temperature Management (TTM) After Cardiac Arrest. *Crit Care*. 2020;24(1):6.
161. Dankiewicz J, Cronberg T, Lilja G, Jakobsen JC, Bělohávek J, Callaway C, Cariou A, Eastwood G, Erlinge D, Hovdenes J, Joannidis M, Kirkegaard H, Kuiper M, Levin H, Morgan MPG, Nichol AD, Nordberg P, Oddo M, Pelosi P, Rylander C, Saxena M, Storm C, Taccone F, Ullén S, Wise MP, Young P, Friberg H, Nielsen N. Targeted hypothermia versus targeted Normothermia after out-of-hospital cardiac arrest (TTM2): A randomized clinical trial-Rationale and design. *Am Heart J*. 2019;217:23-31.
162. Lilja G, Nielsen N, Ullén S, Blennow Nordstrom E, Dankiewicz J, Friberg H, Heimburg K, Jakobsen JC, Levin H, Callaway C, Cariou A, Eastwood GM, Helbok R, Hovdenes J, Kirkegaard H, Leithner C, Morgan MPG, Nordberg P, Oddo M, Pelosi P, Rylander C, Saxena M, Taccone FS, Siranec M, Wise MP, Young PJ, Cronberg T. Protocol for outcome reporting and follow-up in the Targeted Hypothermia versus Targeted Normothermia after Out-of-Hospital Cardiac Arrest trial (TTM2). *Resuscitation*. 2020;150:104-12.

## 11 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Nalina Nancy Anna von Garlen, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Induktion von Inflammation und Apoptose durch Wiedererwärmung und Fieber nach Hypothermie in einer Kardiomyozyten-Zellkultur“/ "The induction of inflammation and apoptosis by rewarming and pyrexia after therapeutic hypothermia in a cardiomyocyte cell culture model" 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

[Für den Fall, dass Sie die Forschung für Ihre Promotion ganz oder teilweise in Gruppenarbeit durchgeführt haben:] Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass

ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

## 11.1 Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Nalina Nancy Anna von Garlen hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

### **Publikation 1:**

**Autoren:** Giang Tong, Nalina N. A. von Garlen, Sylvia J. Wowro, Phoung D. Lam, Jana Krech, Felix Berger, Katharina R. L. Schmitt

**Titel:** „Post – TTM rebound pyrexia after ischemia-reperfusion injury results in sterile inflammation and apoptosis in cardiomyocytes“

**Zeitschrift:** Mediators of Inflammation, Special Issue „Regulation of Inflammation in Myocardial Ischemia-Reperfusion“, vol. 2019, Article ID 6431957, 10 pages.

**Erscheinungsjahr:** 2019

**Beitrag:** Geteilte Erstautorenschaft, Mitwirkung an der Projektplanung und an der Anfertigung des Manuskripts. Außerdem Durchführung aller Experimente im Labor, Messung der Proben, statistische Auswertung der Ergebnisse, graphische Darstellung der Ergebnisse, Erstellung der Schaubilder zum Zeit-Temperatur-Protokoll und zu den Signalwegen der sterilen Inflammation.

---

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **12 Lebenslauf**

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







## 13 Publikationsliste

### 13.1 Journalpublikationen in geteilter Erstautorenschaft oder als Koautorin

1. Tong G, **von Garlen NNA**, Wowro SJ, Lam PD, Krech J, Berger F, Schmitt KRL. Post – TTM rebound pyrexia after ischemia-reperfusion injury results in sterile inflammation and apoptosis in cardiomyocytes. Mediators of Inflammation. 2019;2019:6431957.
2. Tong G, Lam PD, Brey F, Krech J, Wowro SJ, **von Garlen NNA**, Berger F, Schmitt KRL. The Effects of Targeted Temperature Management on Oxygen-Glucose Deprivation/Reperfusion-Induced Injury and DAMP Release in Murine Primary Cardiomyocytes. Mediators of Inflammation. 2020;2020:1234840

### 13.2 Vortragspublikation ohne Veröffentlichung des Abstracts

1. **von Garlen NNA**, Tong G, Wowro SJ, Lam PD, Krech J, Berger F, Schmitt KRL. HEART ON FIRE: Die Effekte von Fieber nach Ischämie/Reperfusion in HL-1 Kardiomyozyten. Forschungskolloquium der Klinik für angeborene Herzfehler - Kinderkardiologie. Mai 2018

## **14 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Katharina Schmitt für die hilfsbereite Betreuung und Unterstützung, für ihr großes Engagement sowie den richtungsweisenden Austausch während meiner Zeit als Doktorandin.

Auch danke ich Dr. Giang Tong für die Hilfe und Ideen bei der Projektplanung, die Diskussionen der Ergebnisse und die Beratung bei kleinen wie auch bei großen Problemen während der gesamten Promotion.

Einen großen Dank möchte ich der ganzen Arbeitsgruppe Schmitt aussprechen. Besonders danke ich Dr. Sylvia Wowro und Nora Ebermann für die freundschaftliche Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft, Beratung und Unterstützung während der unzähligen Stunden im Labor.

Vielen Dank auch für das aufmerksame und geduldige Korrekturlesen von Dr. Sylvia Wowro, Tobias Mayer, Sunaina von Garlen, Phuong Lam, Viola Förster von der Lühe und Christoph Heine.

Von Herzen danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich über die gesamte Zeit liebevoll unterstützt und motiviert haben und jederzeit ein offenes Ohr für mich haben.