

Aus der Klinik für angeborene Herzfehler und Kinderkardiologie  
Deutsches Herzzentrum Berlin

## DISSERTATION

Kardioprotektion durch therapeutische Hypothermie und  
pharmakologische Intervention während simulierter Ischämie:  
Eine Zellkulturstudie mit kontraktilen HL-1 Kardiomyozyten

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Vivienne Gourdon (geb. Fabig)

aus Frankfurt (Oder)

Datum der Promotion: 25. November 2022

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Kurzzusammenfassung.....	IX
Abstract.....	XI
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Klinischer Hintergrund: der außerklinische Herz-Kreislauf-Stillstand.....	2
1.2 Pathomechanismen myokardialer Ischämie.....	2
1.3 Definition und Einteilung der therapeutischen Hypothermie.....	4
1.4 Klinische Anwendung der Hypothermie.....	5
1.4.1 Therapeutische Hypothermie zur Neuroprotektion.....	5
1.4.2 Therapeutische Hypothermie zur Kardioprotektion.....	9
1.5 Kardioprotektive Mechanismen therapeutischer Hypothermie.....	10
1.5.1 Hypothermie und Apoptose.....	10
1.5.2 Die extrazelluläre Signal-regulierte Kinase ERK1/2.....	11
1.5.3 Das Survival-Protein Akt .....	12
1.5.4 Die Hämoxigenase-1.....	13
1.6 Nebenwirkungen therapeutischer Hypothermie.....	13
1.7 Ansätze pharmakologischer Therapien zur Kardioprotektion.....	14
1.7.1 Das Opioid [D-Ala <sup>2</sup> , D-Leu <sup>5</sup> ] Enkephalin.....	14
1.7.2 Das Cannabinoid WIN-55,212-2.....	15
1.8 Hypothesen und Zielsetzung der Arbeit.....	16
<b>2 Material.....</b>	<b>18</b>
2.1 Geräte und Zubehör.....	19
2.2 Chemikalien.....	20

2.3 Zellkulturmaterialien.....	21
2.4 Antikörper und Fluoreszenzmarker.....	24
2.5 Software.....	24
<b>3 Methoden.....</b>	<b>25</b>
3.1 Zellkultur.....	26
3.1.1 HL-Kardiomyozyten.....	26
3.1.2 Zellpflege.....	26
3.2 In vitro Modell kardialer Ischämie nach außerklinischem Herzstillstand.....	28
3.3 Zellzählung mit Trypanblau-Färbung.....	29
3.4 Nachweis der Zellschädigung mittels LDH-Assay.....	29
3.5 Aussage über die Zellfunktion mittels ATP-Messung.....	30
3.6 Fluoreszenzmikroskopie zur Detektion früher Apoptose.....	31
3.7 Untersuchung intrazellulärer Proteine mittels Western-Blot-Technik.....	32
3.7.1 Proteingewinnung und Aufreinigung.....	32
3.7.2 Bestimmung der Proteinmenge mittels BCA-Protein-Assay.....	33
3.7.3 Proteintrennung mittels SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	33
3.7.4 Transfer mittels Tankblotting-Methode.....	35
3.7.5 Immundetektion spezifischer Proteine.....	35
3.8 Applikation von DADLE und WIN55,212-2.....	36
3.9 Darstellung und Statistische Auswertung.....	38
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>39</b>
4.1 Einfluss der Hypothermie auf das Zellüberleben.....	40
4.2 Einfluss der Hypothermie auf die Zellschädigung.....	41
4.3 Einfluss der Hypothermie auf den ATP-Gehalt.....	42
4.4 Einfluss der Hypothermie auf Apoptose.....	43
4.5 Untersuchung protektiver intrazellulärer Proteine.....	43
4.5.1 Einfluss der Hypothermie auf die ERK-Aktivierung.....	44
4.5.2 Einfluss der Hypothermie auf die Aktivierung von Akt.....	45
4.5.3 Einfluss der Hypothermie auf die Exprimierung der HO-1.....	46

4.6 Pharmakologischer Therapieansatz mit DADLE und WIN55,212-2.....	47
4.6.1 Zytotoxizitätsprüfung.....	47
4.6.2 Dosisfindung.....	49
4.6.3 Pharmakologische Therapie und Hypothermie.....	51
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>53</b>
5.1. Überprüfung des Modells.....	54
5.2. Kardioprotektion durch Hypothermie.....	55
5.2.1 Einfluss der Hypothermie auf Zellvitalität, Zellüberleben und metabolische Aktivität.....	55
5.2.2 Einfluss der Hypothermie auf intraintrischämische Apoptose.....	56
5.2.3 Durch Hypothermie induzierte antiapoptotische Signalwege.....	56
5.3 Pharmakologische Intervention und Hypothermie.....	58
5.3.1 DADLE.....	58
5.3.2 WIN55,212-2.....	60
5.4 Limitationen des Modells.....	61
5.5 Überlegungen zu Tiefe und Anwendungszeitpunkt der Hypothermie.....	63
5.6 Schlussfolgerung und Ausblick.....	64
 Bibliographie .....	66
Eidesstattliche Versicherung .....	78
Lebenslauf .....	79
Publikationsliste .....	81
Danksagung.....	83

## Abkürzungsverzeichnis

AIF	Apoptosis Inducing Factor
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion
CB1	Cannabinoid-1-Rezeptor
CB2	Cannabinoid-2-Rezeptor
CM	Claycomb-Medium
CO	Kohlenstoffmonoxid
Cyt c	Cytochrom c
$\Delta\Psi_m$	Mitochondriales Membranpotential
DADLE	[D Ala <sup>2</sup> , D Leu <sup>5</sup> ] Enkephalin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DOR	$\delta$ -opioid-Rezeptor
DMEM	Dulbeccos's modified Eagles' medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
DTT	Dithiothreitol
ERC	European Resuscitation Council
ERK	Extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
FBS	Fetales Rinderserum
HKS	Herz-Kreislauf-Stillstand
HCl	Salzsäure
HL-1	Murine atriale Kardiomyozyten-Tumorzelllinie
H <sup>+</sup>	Proton, Wasserstoff-Ion

HIE	Hypoxisch-ischämische Enzephalopathie
HIT	Hibernation Inducing Trigger
HO-1	Hämoxygenase-1
ILCOR	International Liaison Committee on Resuscitation
I/R	Ischämie/Reperfusion
K <sup>+</sup>	Kalium-Ion
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Mittelwert
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
mPTP	Mitochondrial permeability transition pore
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Na <sup>+</sup>	Natrium-Ion
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
O <sub>2</sub>	Dioxygen, molekularer Sauerstoff
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PBST	PBS mit 0,05 % Tween
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SD	Standardabweichung
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline with Tween20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TH	Therapeutische Hypothermie

TRIS	Tri Hydroxymethyl Aminomethan
TRIS-HCL	Tri-Hydroxymethyl-Aminomethan-Salzsäure
TTM	Targeted Temperature Management
WIN	WIN55,212-2

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b> Zeit-Temperatur-Protokoll Anwendung von moderater Hypothermie während simulierter Ischämie.....	28
<b>Abbildung 2</b> Zeit-Temperatur-Protokoll Zytotoxizität.....	37
<b>Abbildung 3</b> Zeit-Temperatur-Protokoll Dosisfindung.....	37
<b>Abbildung 4</b> Zeit-Temperatur-Protokoll Pharmaka und Hypothermie.....	38
<b>Abbildung 5</b> Einfluss simulierter Ischämie und Kühlung auf das Zellüberleben.....	40
<b>Abbildung 6</b> Einfluss simulierter Ischämie und Kühlung die LDH-Freisetzung.....	41
<b>Abbildung 7</b> Einfluss simulierter Ischämie und Kühlung auf den intrazellulären ATP-Gehalt.....	42
<b>Abbildung 8</b> Fluoreszenzfärbungen: Einfluss simulierter Ischämie und Kühlung auf Apoptose.....	43
<b>Abbildung 9</b> Relative Erhöhung der pERK/ERK Ratio mit korrespondierenden Western Blot Banden.....	44
<b>Abbildung 10</b> Relative Erhöhung der pAkt/Akt Ratio mit korrespondierenden Western Blot Banden.....	45
<b>Abbildung 11</b> Relative Erhöhung der HO-1 mit korrespondierenden Western Blot Banden.....	46
<b>Abbildung 12</b> Dezimale Konzentrationsreihen zur Bestimmung der Zytotoxizität... 48	
<b>Abbildung 13</b> Versuchsreihen zur Wirkung verschiedener Konzentrationen während simulierter Ischämie.....	50
<b>Abbildung 14</b> Wirkung verschiedener Konzentrationen während simulierter Ischämie und Kühlung.....	52



## **Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1</b> Einteilung der therapeutischen Hypothermie nach Zieltemperatur.....	5
<b>Tabelle 2</b> Zusammensetzung des Nährmediums für HL-1-Kardiomyozyten.....	27
<b>Tabelle 3</b> Versuchsgruppen.....	29
<b>Tabelle 4</b> Zusammensetzung der Gele.....	34
<b>Tabelle 5</b> Verwendete Antikörper.....	36

## Kurzzusammenfassung

**EINLEITUNG** Der außerklinische Herz-Kreislauf-Stillstand (HKS) hat global eine hohe Inzidenz und Mortalität. In der Behandlung nach HKS kommt therapeutische Hypothermie (TH) zur Anwendung, um das neurologische Outcome zu verbessern. TH hat darüber hinaus möglicherweise eine kardioprotektive Wirkung. Im ersten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von intraischämischer Anwendung von moderater TH (33,5 °C) auf Überleben, Metabolismus und Apoptose von Kardiomyozyten und die Rolle zugrundeliegender Signalproteine untersucht. Im zweiten Teil wurden die Zellen mit einem Opioid ([D Ala<sup>2</sup>, D Leu<sup>5</sup>] Enkephalin = DADLE) und einem Cannabinoid (WIN-55,212-2 = WIN) behandelt und deren Wirkung auf die Kardiomyozyten untersucht. Die Ergebnisse wurden mit denen des ersten Teils verglichen. Dabei wurde auch ein möglicher synergistischer Effekt der Kombination von pharmakologischer Therapie und TH geprüft.

**METHODEN** Unsere Studie basiert auf einem Zellkulturmodell mit murinen atrialen HL-1 Kardiomyozyten. Ischämie wurde in einer Hypoxiekammer (0,2 % O<sub>2</sub>) in glukose- und serumfreiem Medium für 6 Stunden simuliert. Nach 3 Stunden erfolgte die Einleitung von moderater TH, die über weitere 3 Stunden bei simulierter Ischämie fortgeführt wurde. Das Ausmaß der Zellschädigung wurde unter Anwendung der Zellzählung und der Erfassung von Laktatdehydrogenase (LDH) untersucht. Eine Aussage zur metabolischen Aktivität wurde über die Messung der intrazellulären ATP-Level getroffen. Mit Hilfe der M30 CytoDEATH Immunfärbung wurde frühe Apoptose und mit Western Blotting die Signalproteine ERK, Akt und HO-1 detektiert. Um die Wirkung von DADLE und WIN mit TH vergleichen zu können, wurde die LDH-Ausschüttung untersucht.

**ERGEBNISSE** Intraischämische moderate TH (33,5 °C) führte zu einer signifikanten Reduktion der LDH-Ausschüttung, höheren Zellzahlen und einem höheren intrazellulären ATP-Gehalt verglichen mit der normothermen Ischämiegruppe (37 °C). Die Untersuchungen zeigten eine geringere M30 CytoDEATH Anfärbung für frühe Apoptose in der TH-Gruppe. ERK wird möglicherweise durch intraischämische TH induziert. DADLE zeigte sich in der Zytoprotektion bei Ischämie der TH überlegen und WIN ist potentiell kardioprotektiv. Es wurde kein synergistischer Effekt durch die

zeitgleiche Anwendung von DADLE und TH analysiert. Die Kombination von WIN und TH hob die zytoprotektive Wirkung auf.

**SCHLUSSFOLGERUNG** Zeitige Anwendung von TH vor Reperfusion ist eine vielversprechende Therapie zur Kardioprotektion nach außerklinischem HKS. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kardioprotektion von TH durch Verhinderung apoptotischer Prozesse während Ischämie vermittelt wird. Außerdem kann geschlussfolgert werden, dass zellschützende Effekte durch Behandlung mit DADLE und WIN erzielt werden können. Es erfordert weiterführende Forschung, um die Wirkmechanismen umfassender zu verstehen und um die laborexperimentellen Ergebnisse auf die klinische Arbeit am Patienten zu übertragen.

## Abstract

**INTRODUCTION** Out of hospital cardiac arrest (OHCA) has globally a high incidence and mortality. Therapeutic Hypothermia (TH) is mainly applied to improve neurological outcome and is most likely cardioprotective. In the first part of the study, the effects of intra-ischemic application of moderate TH (33.5 °C) on cardiomyocyte cell survival, metabolism and apoptosis were investigated. Furthermore, potential underlying signal proteins were examined. In the second part, we compared treatments of cardiomyocytes with an opioid ([D Ala<sup>2</sup>, D Leu<sup>5</sup>] enkephalin = DADLE) and a cannabinoid (WIN-55,212-2 = WIN) to the protective impact of TH. Each substance was also combined with TH to investigate potential synergistic effects.

**METHODS** Our study is based on a cell culture model of murine atrial HL-1 cardiomyocytes. Ischemia was simulated in a hypoxic chamber (0.2 % O<sub>2</sub>) in glucose and serum free medium for 6 hours. After 3 hours, moderate hypothermia (33.5 °C) was applied for the remaining 3 hours of simulated ischemia. Cell damage and viability was determined by lactate dehydrogenase (LDH) release and Trypan Blue cell staining. Cell metabolism was measured via intracellular ATP levels. Apoptosis was detected by M30 CytoDEATH immunostaining. Protein expression of ERK, Akt and HO-1 were assessed through Western Blotting. To compare the effect of DADLE and WIN to TH, we analyzed LDH release.

**RESULTS** Intra-ischemic moderate TH (33.5 °C) led to increased cell viability as demonstrated in significantly lower LDH release, higher cell number and higher intracellular ATP level in comparison to normothermic ischemia (37 °C). We obtained less M30 CytoDEATH staining for early apoptosis. ERK was likely to be induced by intra-ischemic TH. DADLE was more effective as TH and WIN potentially cardioprotective. There was no synergistic effect by combining DADLE and TH. The combination of WIN and TH abolished the cytoprotective effect.

**CONCLUSION** Early application of TH before reperfusion is a promising treatment for cardioprotection in OHCA. In this study, we demonstrated that cell survival is mediated by attenuating apoptotic pathways during ischemia. Also, we could show that the cell preserving effect of TH can be mimicked by treatment with DADLE or WIN. Pharmacological interventions are likely to be superior to TH regarding effectiveness

and side effects. Further studies are required to elucidate the mechanism of action and to transfer the results from bench to bedside.

# 1 Einleitung

### 1.1 Klinischer Hintergrund: der außerklinische Herz-Kreislauf-Stillstand

Die vorliegende Arbeit bezieht sich auf die frühzeitige Anwendung von Hypothermie bei außerklinischem Herz-Kreislauf-Stillstand (HKS). Dieser hat global eine hohe Inzidenz und Mortalität. In Europa sind jährlich etwa eine halbe Million Menschen betroffen. Der außerklinische HKS ist eine der führenden Todesursachen. [1] Die Überlebensraten variieren je nach Region und Land von 0,3 % – 20,4 %. Die mittlere Überlebensrate bis Krankenhausentlassung liegt bei 7,6 %. [2] Die Chancen für ein Überleben werden wesentlich beeinflusst durch möglichst sofortigen Beginn von Wiederbelebungsmaßnahmen und zeitige Defibrillation [1].

Der größte Teil der außerklinischen HKS ist kardial verursacht, 70 % allein sind ischämisch bedingt. Andere kardiale Ursachen sind strukturelle Herzerkrankungen und Leitungsstörungen. 5 – 12 % sind nicht-kardial bedingt, beispielsweise durch Elektrolytstörungen, neurologische Erkrankungen, pulmonale Embolien, Medikamente oder Infektionen. [3]

Etwa 25 – 50 % der Patienten präsentieren im Elektrokardiogramm initial ventrikuläre Fibrillation [1]. Weitere initiale Rhythmen können die pulslose ventrikuläre Tachykardie sowie Asystolie oder pulslose elektrische Aktivität sein [3].

In der Post-Wiederbelebungsphase wird eine engmaschige Kontrolle von Blutgasen, Blutzucker und Temperatur empfohlen. Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid, sowie Glukose sollten im Normbereich gehalten und Fieber vermieden werden [4].

Das funktionelle Outcome nach HKS spielt eine entscheidende Rolle für die weitere Lebensqualität und Mortalität. Neben den vielen Einzelschicksalen ist auch die sozioökonomische Belastung groß. Die Kosten belaufen sich beispielsweise laut einer finnischen Studie auf 76.212 Euro pro 1-Jahr-Überlebenden [5]. Durch effektive, frühzeitige Interventionen könnten Mortalität und Morbidität sowie Kosten für das Gesundheitssystem gesenkt werden.

### 1.2 Pathomechanismen myokardialer Ischämie

Das Herz ist das Organ mit dem größten Sauerstoffverbrauch im Körper. Bis zu 90 % der für die Kardiomyozyten benötigten Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) wird normalerweise durch die oxidative Phosphorylierung aus freien Fettsäuren gewonnen. [6] Unter Ischämie stellen Kardiomyozyten ihren Stoffwechsel auf

anaerobe Glykolyse um. Als Substrat wird dabei Glukose aus den intrazellulären Glykogenspeichern verwendet. [7] Nach kurzer Zeit kommt es bei rein anaerobem Stoffwechselweg, also Entkopplung der Glykolyse von der oxidativen Phosphorylierung, über die Bildung von Laktat zu einer Senkung des intrazellulären pH-Wertes [8]. Sowohl die entstehenden Metaboliten als auch die Azidose führen zu einer Hemmung der anaeroben Glykolyse [7]. Mit Abnahme des pH-Wertes, nimmt die intrazelluläre Konzentration an  $H^+$ -Ionen zu. Über den  $Na^+/H^+$ -Ionenaustauscher kommt es zu einem Einstrom von  $Na^+$  in die Zelle [9]. Mit fehlendem ATP und anderen energiereichen Phosphaten kommt die Funktion der  $3Na^+-2K^+$ -ATPase zum Erliegen, was den Anstieg von intrazellulärem  $Na^+$  weiter begünstigt. Dadurch wird die Aktivität des  $2Na^+-Ca^{2+}$ -Ionenaustauschers umgekehrt, was zu einer intrazellulären Calciumüberladung führt. [8]

Etwa nach 60 Sekunden kommt es zum Erliegen der Kontraktilität der Kardiomyozyten. Es wird davon ausgegangen, dass die oben beschriebenen Effekte bei einer Ischämie unter 20 Minuten reversibel sind und erst danach irreversible Schäden auftreten. [10] Hierbei spielt die hohe intrazelluläre Calciumkonzentration eine wichtige Rolle. Calcium-abhängige Proteasen und Phospholipasen führen zur Degradierung von Zellbestandteilen wie Sarkolemm und Mitochondrien. Der Zusammenbruch einer integren Plasmamembran führt zum Verlust des osmotischen Gleichgewichts und Zellmetaboliten gelangen in den Extrazellularraum. Durch Schäden in der Mitochondrien-Membran ist die ATP-Regeneration auch nach Wiederherstellung der Sauerstoffversorgung gestört und mitochondriale Proteine aktivieren im Zytosol apoptotische Signalkaskaden. Bei gestörter mitochondrialer Funktion entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Sie führen zur Disruption der lysosomalen Membranen und zur Freisetzung von Enzymen, die Zellbestandteile abbauen und zu zellulärer Nekrose führen. [10, 11]

In Folge kommt es zu Relaxation der Myofilamente, Verlust der Ionenstabilität und Zellschwellung. Klinisch zeigen sich am Herzen dabei ein verringertes Schlagvolumen, Hypotension und Herzrhythmusstörungen. [12]

Die erste ischämische Schädigung wird gefolgt vom Reperfusionsschaden. Die Reperfusion setzt ein, wenn die spontane Zirkulation wiederhergestellt wird und trägt paradoxerweise in großem Maße zur Schädigung bei [13]. Im Tiermodell konnte



gezeigt werden, dass beim akuten Myokardinfarkt der Reperfusionsschaden bis zu 50 % der Infarktgröße ausmacht [14]. Der Reperfusionsschaden ist umso größer je länger die Ischämie bestand [15]. Mit der Reperfusion erreichen wieder Sauerstoff und Nährstoffe die Kardiomyozyten, die durch die Ischämie in unterschiedlichem Maße geschädigt wurden. Eine inadäquate oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien führt dabei zur Bildung von ROS vermittelt durch die Xanthin-Oxidase, NADPH-Oxidase und die NO-Synthase (NOS). ROS schädigen die Zellmembran, intrazelluläre Signalproteine und DNA, wirken proinflammatorisch und führen über die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran schließlich zu mitochondrialer Dysfunktion. [16] Durch eine extrazelluläre Normalisierung des pH-Wertes kommt es zu einem Protonengradienten, dem die H<sup>+</sup>-Ionen über den Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Ausstauscher folgen. Über den Natrium-Einstrom kommt es zur Umkehr des Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austauschers und Calcium wird weiter intrazellulär angehäuft. [17] ROS, Calcium-Overload, Abfall der ATP-Level und Anhäufung von inorganischen Phosphaten führen bereits in den ersten Minuten der Reperfusion zur Öffnung der mitochondrialen Pore (*mitochondrial permeability transition pore* = mPTP). Die mPTP lässt nicht-spezifisch lösliche Substanzen bis 1,5 kDa passieren, was zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führt. Der Einstrom von löslichen Teilchen und Wasser in die Mitochondrienmatrix führt zur Schwellung und schließlich Ruptur der äußeren Mitochondrien-Membran. Intramitochondriale Proteine wie Cytochrom c (Cyt c) und der *Apoptosis Inducing Factor* (AIF) gehen dadurch ins Zytosol über und induzieren Apoptose. [18]

Symptome der kardialen Dysfunktion während der Reperfusionsphase sind Akinese des reperfundierten Muskelareals (sog. Stunning), mikrovaskuläre Minderperfusion, sowie Reperfusionsarrhythmien [14].

### 1.3 Definition und Einteilung der therapeutischen Hypothermie

Als therapeutische Hypothermie (TH) wird die gezielte, kontrollierte Reduktion der Körperkerntemperatur unter 36 °C bezeichnet [19]. In der Literatur findet sich mittlerweile vermehrt der Begriff Targeted Temperature Management (TTM). Dieser beschreibt eine engmaschige Überwachung und zielgerichtete Einstellung der Körpertemperatur mit Verhinderung von posthypothermischem Fieber. [20]

**Tabelle 1** Einteilung der therapeutischen Hypothermie nach Zieltemperatur [19]

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

## 1.4 Klinische Anwendung der Hypothermie

### 1.4.1 Therapeutische Hypothermie zur Neuroprotektion

Die Beobachtung, dass Lawinen- und Ertrinkungsopfer, die akzidentieller Hypothermie ausgesetzt waren, auch nach längeren Kreislaufstillständen ein besseres neurologisches Outcome aufwiesen, führte zur Erforschung der protektiven Eigenschaften der Hypothermie. In den 1950er Jahren wurde die therapeutische Hypothermie zur Neuroprotektion mit Hilfe von Tiermodellen untersucht [21-23]. Williams und Spencer veröffentlichten 1958 vier Fallberichte, in denen TH einen positiven Einfluss auf das Outcome nach HKS hatte [24]. Im Jahr 1959 folgte dann die Veröffentlichung einer klinischen Studie der gleichen Arbeitsgruppe, die zeigte dass Hypothermie nach HKS die Mortalität senkt [25]. Thauer et al. postulierte 1962 nach Experimenten an Hunden, dass die Ischämietoleranz mit sinkender Körpertemperatur umgekehrt proportional zum Absinken des Sauerstoffverbrauchs ist. Bei 15 – 10 °C erreicht der Organismus die Hypothermietoleranzgrenze und eine Verlängerung der möglichen Wiederbelebenszeit wird durch zerebralen Schaden limitiert (sog. Kältetod). [26] Die niedrigste bis dato überlebte Körpertemperatur, die beim Erwachsenen gemessen wurde, betrug 13,7 °C. Die schwedische Ärztin Anna Bågenholm war 1999 beim Skifahren ins Eis eingebrochen. Sie konnte erst nach 80 Minuten klinisch tot geborgen werden und erlangte 2,5 Stunden nach ihrer Bergung nach langsamer, kontrollierter Wiedererwärmung über kardiopulmonalen Bypass einen eigenständigen Kreislauf wieder. Sie überlebte ohne Hirnschäden und war noch im Jahr des Unfalls wieder im alten Beruf arbeitsfähig. Der Fall wurde wissenschaftlich diskutiert und regte weitere Forschung zur Hypothermie an. [27]

Im Jahr 2002 publizierte die *Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group*, dass die Anwendung milder Hypothermie (32 – 34 °C für 24 Stunden) eine signifikante Senkung der Mortalität nach sechs Monaten sowie ein besseres neurologisches Outcome

bewirkte. Die entsprechende Studie mit 274 HKS-Patienten war multizentrisch, randomisiert und kontrolliert mit verblindeter Outcome-Begutachtung. [28] Auch Bernard et al. veröffentlichtem im selben Jahr eine Studie mit 77 Patienten. Bei den Patienten, die eine Kühlung bei 33 °C für 12 Stunden erhielten, zeigte sich ein besseres neurologisches Outcome sowie eine höhere Überlebensrate bei Krankenhausentlassung. [29] Daraufhin wurde 2005 die Empfehlung einer TH von 32 – 34 °C in die Leitlinie des *International Liaison Committee on Resuscitation* (ILCOR) aufgenommen [30]. Nielsen et al. verglichen im TTM-Trial, dessen Ergebnisse 2013 veröffentlicht wurden, die Kühlung von 33 °C mit einer kontrollierten Körpertemperatur von 36 °C. Dabei fanden sie vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf Mortalität und Morbidität. Die Studie mit 950 Patienten zeigte vor allem die Wichtigkeit eines kontrollierten TTM. [31] In der HYPERION-Studie (*Therapeutic Hypothermia After Cardiac Arrest in Non Shockable Rhythm*) mit 581 Patienten konnten Lascarrou et al. 2019 zeigen, dass ein TTM mit Zieltemperatur von 33 °C zu einem besseren neurologischen Outcome führt als mit einer Zieltemperatur von 37 °C (beide für 24 h). Die Mortalität nach 90 Tagen unterschied sich dabei nicht signifikant. [32] Laut den aktuellen Empfehlungen des *European Resuscitation Councils* (ERC) von 2021 sollen für Patienten unabhängig vom initialen Rhythmus, die nach Wiederherstellung des Kreislaufs nicht ansprechbar bleiben, eine konstante Zieltemperatur zwischen 32 °C und 36 °C für mindestens 24 Stunden gehalten werden. Es ist noch nicht hinreichend untersucht, welche Subgruppen eher von niedrigeren (32 – 34 °C) und welche von höheren Temperaturen (36 °C) profitieren. Es wird ein frühzeitiges TTM empfohlen, sobald ein Monitoring des Patienten möglich ist. [20] Die jüngsten Ergebnisse des TTM-2-Trials (*Targeted Hypothermia Versus Targeted Normothermia After Out-of-Hospital Cardiac Arrest*) aus der Arbeitsgruppe um Niklas Nielsen haben eine Diskussion über Nutzen und Risiken von TH angestoßen. In der Studie mit 1900 eingeschlossenen Patienten konnte kein Vorteil eines TTM mit Kühlung auf 33 °C im Vergleich zum normothermen TTM in Bezug auf funktionellen Outcome und Mortalität nach 6 Monaten festgestellt werden. Außerdem traten mehr Arrhythmien in der hypothermen Gruppe auf. [33] Die multizentrische open-label-Studie zeichnet sich durch das randomisierte, kontrollierte Studiendesign mit einer verblindeten Auswertung aus. Auch ist die Stichprobe wesentlich größer als bei bisherigen Studien,

womit möglicherweise der Einfluss zufälliger Messabweichungen und Bias geringer ist. Die TTM-2-Studienautoren postulierten, dass sich seit 2002 die intensivmedizinische Standardversorgung verändert hat und dies den Effekt der Hypothermiebehandlung beeinflusste. Auch wurde die Herzlungen-Wiederbelebung bei einem großen Anteil (82 %) der eingeschlossenen Patienten durch anwesende Laien initiiert. [33] Dies hatte möglicherweise zu reduzierter Ischämieexposition und bei den überlebenden Patienten zu einem besseren neurologischen Outcome geführt.

Die Effekte von therapeutischer Hypothermie nach HKS in der pädiatrischen Subgruppe werden kontrovers diskutiert und sind Gegenstand aktueller Forschung. Nennenswert sind hier besonders zwei multizentrische, randomisierte, prospektive Studien von 2015 und 2017. Hierbei wurde die Anwendung von TH an pädiatrischen Patienten bei außerklinischem HKS (THAPCA-OH) und bei HKS im Krankenhaus (THAPCA-IH) untersucht. Es wurden jeweils Zieltemperaturen von 33,0 °C für 48 Stunden (Hypothermie) versus 36,8 °C (Normothermie) verglichen. [34, 35] Die Studie mit 295 pädiatrischen Patienten nach außerklinischem HKS konnte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen in Bezug auf Überleben und neurologischen Outcome nach einem Jahr zeigen. Lediglich in der Überlebenszeit über 365 Tage zeigte sich die TH überlegen [34]. Die Studie zur Anwendung von therapeutischer Hypothermie bei Kindern nach HKS im Krankenhaus wurde nach dem Einschluss von 329 Kindern abgebrochen, da sich ebenfalls kein Vorteil durch Kühlung zeigte [35]. 2018 veröffentlichten Lin et al. Daten, die einen protektiven Effekt von TH bei  $33 \pm 0,5$  °C über 72 Stunden zeigen. Die Kinder in der TH-Gruppe hatten ein höheres 1-Monats-Überleben sowie ein besseres neurologisches Outcome nach 6 Monaten verglichen mit der normothermen Gruppe. Das Studiendesign war retrospektiv und es wurden 64 Kinder eingeschlossen. [36] Buick et al. kamen 2019 in einem Review mit Meta-Analyse von zwölf Studien mit insgesamt 2060 Patienten zu dem Schluss, dass nach aktueller Datenlage die Anwendung von TTM bei 32 – 34 °C nach HKS bei Kindern weder empfohlen noch abgelehnt werden kann und es weiterer Forschung bedarf [37]. Dem folgend wird aktuell laut ILCOR für pädiatrische Patienten lediglich dazu geraten, bei außerklinischem HKS die Zieltemperatur  $< 37,5$  °C zu halten [38].

Eine Indikation für TH im Bereich 33 – 34 °C ist die perinatale Asphyxie, die zur hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie (HIE) führen kann. Die Anwendung von TH wird hier bei klinischen oder biochemischen Anzeichen für moderate oder schwere HIE nach Wiederbelebung empfohlen. [39] Shankaran et al. veröffentlichten 2005 eine Studie, die die Anwendung von TH bei 33,5 °C für 72 Stunden untersuchte. Es konnte dabei eine gesenkte Mortalität und ein verbessertes neurologisches Outcome der Neugeborenen gezeigt werden. [40] In der TOBY Studie (*Total Body Hypothermia for Neonatal Encephalopathy*) mit 325 eingeschlossenen Säuglingen war ein neuroprotektiver Effekt von TH (33 – 34 °C für 72 Stunden) nachweisbar. Die Kinder der TH-Gruppe wiesen einen höheren Intelligenzquotienten sowohl mit 18 Monaten als auch bei der Verlaufskontrolle mit 6 – 7 Jahren auf. [41, 42]

Im Jahr 2013 veröffentlichten Jacobs et al. ein Cochrane Review, das 11 randomisierte kontrollierte Studien mit insgesamt 1505 Neugeborenen beinhaltete. In ihrer Berechnung zeigte sich, dass Neugeborene mit sich entwickelnder moderater bis schwerer HIE durch den Einsatz von TH eine signifikante und klinisch relevante Reduktion im kombinierten Outcome von Mortalität und Gehirneinschränkungen bis zum achtzehnten Monat hatten. [43] Kariholu et al. kommen in ihrem systematischen Review und ihrer Meta-Analyse 2020 zu dem Schluss, dass die Datenlage noch unzureichend sei, um TH für Neugeborene mit milder HIE zu empfehlen [44].

Die Anwendung von TH nach akutem ischämischem Schlaganfall ist noch nicht etabliert, wobei im Tiermodell eine Reduktion des Infarktareals und ein verbessertes neurologisches Outcome nach ischämischen zerebralem Insult nachgewiesen werden konnte [45]. In den Studien am Menschen zeigte sich kein eindeutig protektiver Effekt der TH und zusätzlich ein erhöhtes Risiko für Infektionen [46-48] In der Leitlinie der *American Stroke Association* zur Behandlung von Patienten mit akutem ischämischem Schlaganfall von 2018 wird daher therapeutische Hypothermie aktuell außerhalb von klinischer Forschung nicht empfohlen [49]. Als weitere Indikation für TH kommt das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) in Frage. Obwohl bekannt ist, dass TH den intrakraniellen Druck senken kann, wird sie zur Behandlung des SHT in den Guidelines der *Brain Trauma Foundation* aber nicht empfohlen, da die Studienlage nicht eindeutig ist. [50, 51] Weitere diskutierte Anwendungsbereiche ohne ausreichende Studienlage sind z.B. bakterielle Meningitis, Status epilepticus sowie Schock [52-55].

#### 1.4.2 Therapeutische Hypothermie zur Kardioprotektion

Im Rahmen der bereits o.g. Hypothermia after Cardiac Arrest Study wurden auch Ergebnisse zum kardialen Outcome bei Anwendung therapeutischer Hypothermie nach HKS veröffentlicht. Es zeigte sich eine verbesserte kardiologische Situation bei Patienten, bei denen innerhalb von acht Stunden eine Körpertemperatur von 32 – 34 °C erreicht wurde. [28]

In der Kardiochirurgie wurde bereits in den 50er Jahren Kardioplegielösung in Form von kalter Kristalloidlösung zur Kardioprotektion eingesetzt. In den 70ern wurde dann warme Blutkardioplegielösung verwendet, mit welcher ebenfalls gute Ergebnisse erzielt wurden. In einer großen Meta-Analyse von Fan et al. wurde 2010 kein signifikanter Unterschied zwischen warmer und kalter Kardioplegielösung im Hinblick auf das kardiale Outcome gefunden. Es wurden hierbei 41 randomisierte kontrollierte Studien mit 5897 Patienten einbezogen. [56]

Auch im Rahmen der Therapie des akuten Myokardinfarktes wird die Anwendung von TH diskutiert. Eine Studie von Haendchen et al. konnte Anfang der 80er Jahre zeigen, dass die Retroperfusion mit hypothermen Blut die Infarktgröße beim Hund reduziert [57] Weitere Studien zeigten kardioprotektive Effekte von Kühlung im Tiermodell nach akutem Myokardinfarkt. Die Infarktgröße war dabei geringer bei tiefer Hypothermie. [58-60] In einer 42 Patienten umfassenden Studie von Dixon et al. wiesen die Daten tendenziell darauf hin, dass eine endovaskuläre Kühlung mittels Herzkatheter zu einem kleineren Infarktareal führen könnte. Die statistische Analyse erreichte dabei jedoch keine Signifikanz. [61] Die Daten der beiden größeren randomisierten Studien ICE-T (n = 204, 33 °C für sechs Stunden) und COOL-MI (n = 325, 33 °C für drei Stunden) zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen Hypothermie-Gruppe und Kontrolle. In beiden Studien gestaltete es sich schwierig, die Zieltemperatur schnell genug zu erreichen. Jeweils in der Subgruppe mit Vorderwandinfarkt, in denen eine schnelle Kühlung auf < 35 °C vor Reperfusion erreicht wurde, zeigte sich jedoch eine signifikante Reduktion der Infarktgröße. [62, 63] In einer 2010 veröffentlichten Pilotstudie (RAPID MI-ICE) mit 20 Patienten wurde die Zieltemperatur durch Kombination von endovaskulärer Kühlung und Infusion von kalter Kochsalzlösung zügig erreicht [64]. In der 2014 folgenden CHILL-MI Studie ließ sich zwar keine signifikante Reduktion der Infarktgröße feststellen, jedoch zeigte sich nach  $45 \pm 15$

Tagen eine geringere Inzidenz von Herzversagen [65]. Daneben kann auch mit der Peritoneallavage bei Patienten nach HKS schnell und nebenwirkungsarm die Körperkerntemperatur abgesenkt werden [66, 67]

In der Pilotstudie COOL AMI EU mit 50 Patienten mit Vorderwandinfarkt wurde mit einem neuen Device intravaskulär schneller auf 33,6 °C gekühlt. In der Hypothermiegruppe zeigte sich eine geringere Infarktgröße sowie bessere linksventrikuläre Ejektionsfraktion. [68] Die weiterführende Studie mit einer geplanten größeren Studienpopulation wurde vorzeitig abgebrochen, da es in der Gruppe, die mittels Device gekühlt wurde, logistisch zu Verzögerungen und damit längerer Ischämiezeit kam. Die Analyse der gesammelten Daten zeigte keinen Unterschied der Infarktgröße zwischen beiden Gruppen, jedoch eine erhöhte Neigung zu unerwünschten Ereignissen in der gekühlten Gruppe. [69]

### 1.5 Kardioprotektive Mechanismen therapeutischer Hypothermie

Nach der RGT-Regel kommt es bei einem Abfall der Temperatur um 10 °C zu einer Reduktion der metabolischen Rate zwischen 1/2 und 1/3 des ursprünglichen Wertes, wobei der Temperaturkoeffizient  $Q_{10}$  je nach Enzym variiert.

Hypothermie führt zur Einsparung von ATP, Glykogen und Sauerstoff sowie zur verzögerten Umstellung auf die anaerobe Glykolyse. Die Absenkung des intrazellulären pH-Wertes wird vermindert, wodurch die Membranstabilität länger aufrechterhalten werden kann. Ein Erhalt der Ionenhomöostase wird begünstigt, ein Calciumoverload wird hinausgezögert. [70] Ein therapeutischer Effekt der Hypothermie ist der Erhalt der Mitochondrienfunktion. Hierbei führen verminderte ROS und balancierte intrazelluläre Calciumwerte zu einer Inhibition der mPTP-Öffnung am Ende der ischämischen Periode und konsekutiv zur Stabilität der mitochondrialen Membran. Mit erhaltener mitochondrialer Funktion kann Energie in Form von ATP bereitgestellt werden. [11]

#### 1.5.1 Hypothermie und Apoptose

Im Zelluntergang nach myokardialer Ischämie spielen verschiedene Mechanismen eine Rolle: Nekrose, Autophagen-Zelltod, Nekroptose und Apoptose [71].

Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltodes und hat am Herzen eine wichtige physiologische Funktion während der Embryogenese sowie bei der Elimination defekter und infizierter Zellen [71, 72]. Aber auch pathophysiologisch im Rahmen von myokardialen Ischämie- und Reperfusionsschaden, Chemotherapie-induzierter Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz führt sie zu einem kontrollierten Zelltod [71]. Es handelt sich um einen aktiven Vorgang, der Energie verbraucht [73].

Der extrinsische Weg der Apoptose führt durch Stresssignale außerhalb der Zelle zur Aktivierung von Transmembranrezeptoren, den Todesrezeptoren, und konsekutiv zu einer intrazellulären Aktivierung der Caspase 8 [71].

Der intrinsische oder mitochondriale Pathway wird über intrazellulären Stress, wie oxidativen Stress, Calciumüberladung oder DNA-Schäden ausgelöst. Apoptose wird dabei über die Öffnung der mPTP und dem damit verbundenen Abfall des Membranpotentials an der inneren Mitochondrienmembran ( $\Delta\psi_m$ ) und Freiwerden von Cyt c ins Zytosol vermittelt. Cyt c, der Apoptose-Protease aktivierende Faktor 1 (Apaf-1), Procaspase 9 und ATP bilden zusammen das Apoptosom, das die Proteolyse von Procaspase 9 katalysiert, wobei die aktive Caspase 9 entsteht. [74]

Sowohl die aktivierte Caspase 9 als auch die aktivierte Caspase 8 können weitere Effektorcaspasen (3, 6, 7) in ihre aktive Form überführen und damit den Zelltod herbeiführen [71].

Die Regulation von kontrolliertem Untergang versus Zellüberleben ist hochkomplex und wird über pro- und antiapoptotische Signalwege vermittelt. Obwohl Hypothermie global den Zellmetabolismus hemmt, wurden Proteine identifiziert, die durch Kühlung vermehrt exprimiert werden [75]. Das genaue Verständnis der antiapoptotischen Pathways könnte zur Entwicklung potentieller neuer Pharmaka genutzt werden. Drei potentiell antiapoptotische Proteine sollen im Folgenden näher beleuchtet werden: die extrazelluläre signalregulierte Kinase 1/2 (ERK1/2), die Proteinkinase B (= Akt) und die Hämoxigenase-1 (HO-1).

### 1.5.2 Die extrazelluläre Signal-regulierte Kinase ERK1/2

Die extrazelluläre signalregulierte Kinase ERK1/2 (p44/p42 MAPK) gehört zur Gruppe



der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) und ist eine Serin/Threonin-Kinase. Bei der Aktivierung von MAPK-Pathways erfolgt eine dreiteilige Kaskadenphosphorylierung über eine MAP Kinase Kinase Kinase (MAP-3K oder MAP-KKK), eine MAP Kinase Kinase (MAP-2K oder MAP-KK) und eine MAP Kinase (MAP-K) [76]. Die MAPK/ERK-Signalkaskade kann über unterschiedliche extrazelluläre Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Zytokine sowie zellulären Stress aktiviert werden und erfolgt über eine sequentielle Phosphorylierung von Raf (MAP-3K), MEK 1/2 (MAP-2K) und schließlich ERK (MAP-K). Ziele von ERK sind weitere Kinasen und Transkriptionsfaktoren. Der MAPK/ERK-Pathway ist physiologisch an Zellwachstums- und Überlebensvorgängen beteiligt und spielt u.a. bei der Onkogenese eine Rolle. Diverse Phosphorylasen können ERK negativ regulieren. [71] ERK zeigte im Rahmen von Ischämie und Reperfusion eine kardioprotektive Wirkung [77].

### 1.5.3 Das Survival-Protein Akt

Akt oder auch Proteinkinase B ist eine Serin/Threonin-Kinase. Der PI3K-Akt-Pathway wird über verschiedene extrazelluläre Signale, wie Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone vermittelt und spielt eine wichtige Rolle für Zellvorgänge wie Wachstum, Zellproliferation, Zellzyklus und Stoffwechsel [71]. Durch extrazelluläre Signale, die an einem Rezeptor an der Zelloberfläche binden, wird Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) aktiviert und bildet aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>). Akt wird zur Plasmamembran transloziert und bindet dort mit ihrer PH-Domäne an PIP<sub>3</sub>. Die Aktivierung von Akt erfolgt über Phosphorylierungen der Serin- und Threonin-Regulationsstellen. [78] Das aktivierte Akt phosphoryliert diverse weitere Downstream-Moleküle wie z.B. das proapoptotische BAD, dass dadurch inaktiviert wird. Durch Phosphorylierung von Akt können tiefer geschaltete Ziele der Signalkaskade aktiviert oder inhibiert werden. [71, 78] Hervorzuheben ist hierbei die Phosphorylierung von Raf, wodurch es zu einer nachgeschalteten Aktivierung des antiapoptotischen ERK kommt [79]. Akt induziert die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) über die endotheliale NOS [80]. Und es bewirkt u. a. eine verminderte Caspasen-Aktivität sowie verminderte mitochondriale ROS-Bildung [79]. Es wurde gezeigt, dass Akt unter moderater Hypothermie vermehrt exprimiert wird. [81]

#### 1.5.4 Die Hämoxygenase-1

Die Hämoxygenase-1 (HO-1) wurde zuerst als Hitzeschockprotein 32 (Hsp32) beschrieben, da ihre vermehrte Expression bei Hyperthermie entdeckt wurde. Sie hat jedoch keine offensichtliche Aminosäure-Übereinstimmung mit anderen Hitzeschockproteinen und zeigt keine Funktion als Chaperonprotein. HO-1 kommt beim Menschen am endoplasmatischen Retikulum und möglicherweise auch in der Plasmamembran und im Nucleus vor. [82] Sie katalysiert den enzymatischen Abbau von Häm, wobei Kohlenstoffmonoxid (CO), Biliverdin und freies Eisen entstehen. Neben der grundlegend exprimierten Hämoxygenase-2, gibt es im Körper die schnell induzierbare HO-1, die antioxidativ, antiapoptiv und antiinflammatorisch wirkt [83]. Überwiegend wird HO-1 transkriptional mittels Aktivierung des HO-1-Gens und de novo Synthese aus mRNA gebildet. Ausgelöst wird dies durch verschiedenste Signale, wie beispielsweise Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), UVA-Strahlung, verschiedene Interleukine, Häm oder NO. Seine antiapoptotische Wirkung scheint vor allem durch CO vermittelt zu sein. Dieses moduliert verschiedene Signalwege, u. a. auch die MAPK/ERK-Signalkaskade. [82] Ning et al. zeigten an isolierten Hasenherzen, dass moderate Hypothermie zu einem signifikanten Anstieg der HO-1 führte [81].

#### 1.6 Unerwünschte Nebenwirkungen therapeutischer Hypothermie

Physiologisch kommt es unter Hypothermie zu einer Senkung der Herzfrequenz und in der Folge zu einer Reduktion der Herzauswurfleistung um 7 % pro 1 °C, wobei Schlagvolumen und mittlerer arterieller Druck unverändert bleiben. Durch externe Hautkühlung kommt es außerdem zu einem erhöhten systemischen Gefäßwiderstand. Zerebraler Blutfluss und intrakranieller Druck sinken, renaler Blutfluß und Diurese steigen. Die zerebrale metabolische Rate wird um 6 – 7 % pro 1 °C verlangsamt. Die Darmmotilität wird gehemmt. Der Blut-pH-Wert verändert sich um +0,016 Einheiten pro 1 °C Senkung. [84]

Unerwünschte Nebenwirkungen von TH umfassen Zittern, metabolische Störungen, Herzrhythmusstörungen, Bradykardien, Blutdruckanstieg und Blutungsrisiken. Das Risiko einer relevanten Arrhythmie erhöht sich jedoch erst bei Temperaturen unter 30 °C. Eine schnelle Induktion der TH kann das Risiko kurzfristiger Risiken senken.

Mögliche langfristige Nebenwirkungen sind Infektionen (Atemwegs- und Wundinfektionen) und Dekubitus. [85]

In Folge der Hypothermie kommt es durch vermehrte intrazelluläre Aufnahme zu Hypokaliämie, die nur vorsichtig behandelt werden sollte, da es in Folge der Wiedererwärmung zu einer Hyperkaliämie kommen kann. Es besteht unter Hypothermie ein erhöhtes Risiko für eine Koagulopathie. [19] Durch verminderte Insulin-Plasmaspiegel kann es zu Hyperglykämien kommen [86].

### 1.7 Ansätze pharmakologischer Therapien zur Kardioprotektion

Aktuelle Kühlmethoden wie beispielsweise die Anwendung von Kühldecken und -pads oder die Infusion gekühlter intravenöser Flüssigkeiten werden limitiert durch ihre Effektivität und unerwünschte Nebenwirkungen [87]. Eine pharmakologische Imitation physikalisch applizierter Hypothermie könnte in Wirkung und Nebenwirkungsprofil überlegen sein. Es wäre dabei die medikamentöse systemische Induktion von Hypothermie denkbar oder aber auch die gezielte Modulation intrazellulärer Signalwege, die während Ischämie und Reperfusion eine Rolle spielen. Im Folgenden soll auf zwei Pharmaka eingegangen werden, die bei der Kardioprotektion durch Hypothermie möglicherweise involviert sind: [D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>] Enkephalin (DADLE), ein Opioid und WIN-55,212-2 (WIN), aus der Gruppe der Cannabinoide.

#### 1.7.1 Das Opioid [D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>] Enkephalin

Es sind vier Untertypen von Opioidrezeptoren bekannt: Mu-, Delta-, Kappa- und Nociceptin-Rezeptor, die jeweils verschiedene Funktionen haben und in unterschiedlichen Gewebearten exprimiert werden [77]. DADLE ist das stabile Analogon des endogenen Opioids Enkephalin und bindet an den δ-Opioidrezeptor (DOR) [88]. DOR wird am humanen Myokard exprimiert [89]. Neben der Hypothermie ist ein weiterer kardioprotektiver Ansatz *in vitro* die ischämische Präkonditionierung, das heißt eine Anwendung kurzer Ischämie/Reperfusion vor Ischämie, die ebenfalls protektiv wirkt [90]. DADLE spielt sowohl im Rahmen der Kardioprotektion durch ischämische Präkonditionierung als auch bei der Hibernation von Säugetieren eine Rolle. Diese beiden Phänomene scheinen über einen gemeinsamen Signalweg

vermittelt zu werden. [91] In Studien zum Winterschlaf beim Eichhörnchen konnte der Zustand der Hibernation sowohl durch den *hibernation inducing trigger* (HIT) als auch DADLE ausgelöst werden. [88] Es konnte gezeigt werden, dass sich durch Gabe von HIT die Überlebenszeit von Organtransplantaten verlängerte [92]. In einer Studie mit isolierten Kaninchenherzen konnte bei einer Vorbehandlung zwei Stunden vor globaler Ischämie mit HIT oder DADLE jeweils das postischämische Outcome signifikant verbessert werden im Vergleich zur Standard-Kardioplegielösung [93]. Kevelaitis et al. konnten ebenfalls die kardioprotektiven Effekte ischämischer Präkonditionierung durch pharmakologische Präkonditionierung mit DADLE an isolierten Rattenherzen erzielen. Dieser Effekt scheint durch eine Öffnung des  $K_{ATP}$ -Kanals sowie durch die Proteinkinase C (PKC) vermittelt zu sein. [94] Ein Mechanismus der Protektion durch  $\delta$ -OR Stimulation könnte die Bildung von Stickstoffmonoxid durch die NOS sein, die die PKC entweder direkt oder über Sauerstoffradikale aktiviert. Die PKC scheint u. a. über den ERK-Pathway kardioprotektiv zu wirken. [77] Eine Stimulation durch DADLE hatte *in vitro* am humanen Myokardgewebe einen vergleichbaren kardioprotektiven Effekt wie ischämische Präkonditionierung [89].

#### 1.7.2 Das Cannabinoid WIN-55,212-2

Das Endocannabinoid-System spielt eine wichtige Rolle bei der Homöostase des Nerven- und Immunsystems, sowie metabolischer, digestiver und reproduktiver Funktionen. Dabei ist ihre Wirkung auf das Zentralnervensystem weitaus besser erforscht als auf das Herz-Kreislaufsystem. Endocannabinoide werden *in vivo* durch die Spaltung von Membranlipiden gebildet und wirken über die Bindung an spezifische Rezeptoren wobei bisher der Cannabinoid-1- (CB1) und -2-Rezeptor (CB2), der G-Protein-gekoppelte-Rezeptor55, Anandamide Rezeptor und Cannabidiol Rezeptor beschrieben wurden. [95] CB1 und CB2 sind membranständige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die extrazelluläre Signale in die Zelle vermitteln [74]. Es scheint am Myokard unter pathologischen Bedingungen eine Veränderung des Verhältnisses von CB1 und CB2 zu geben, wobei CB1 eine Gewebeschädigung zu fördern scheint und CB2 eine kardioprotektive Wirkung zeigt [95, 96]. WIN ist ein synthetischer Cannabinoid-Rezeptor-Agonist, der sowohl auf CB1 als auch CB2 wirkt. Im myokardialen I/R-Modell in der Maus wurde der protektive Effekt von WIN durch den

selektiven CB2-Antagonisten aufgehoben, aber nicht durch einen selektiven CB1-Antagonisten beeinflusst. [97] Durch Cannabinoide kann CB2-vermittelt Apoptose durch Reduktion von intrazellulärem Cyt c, Caspase 3 und Caspase 9 vermindert werden. Auch kann ein Abfall der  $\Delta\psi_m$  verhindert werden. Es ist möglich, dass die kardioprotektiven Eigenschaften des CB2 über eine mPTP-Inhibition vermittelt werden. Auch scheinen sowohl der ERK1/2-Pathway als auch der PI3K/Akt-Pathway eine Rolle bei der Kardioprotektion durch Cannabinoide eine Rolle zu spielen. [74] WIN kann über hypothalamische Thermoregulation eine systemische Hypothermie induzieren [98].

### 1.8 Hypothesen und Zielsetzung der Arbeit

TH wird aktuell zur Organprotektion bei außerklinischem HKS empfohlen [20]. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig erforscht.

Das Verständnis zellulärer Signalkaskaden unter Ischämie und TH ist die Basis für die Entwicklung potenter Pharmaka, die eine Aktivierung von zytoprotektiven Mechanismen ermöglichen und die in ihrer Anwendung und ihrem Nebenwirkungsprofil der TH überlegen sein könnten. Deshalb ist es das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluss von TH und pharmakologischer Intervention auf Kardiomyozyten während einer simulierten Ischämie mit Sauerstoff-Glukose-Entzug zu untersuchen.

Dazu wurde ein Modell *in vitro* mit entsprechendem Temperatur-Zeit-Protokoll entwickelt, das der Situation des außerklinischen HKS nachempfunden ist und eine intranschämische Kühlung beinhaltet. Mit Zellkulturmodellen können Störfaktoren vermieden werden, wie sie im Rahmen der klinischen Forschung am komplexen Patienten auftreten. Sie bieten eine gute Möglichkeit isolierte Teilbereiche mit Fokus auf das Wesentliche zu untersuchen und haben den Vorteil der Reproduzierbarkeit.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Ischämieschädigung und eine eventuelle Protektion durch TH geprüft. Auch wurden schädigende und schützende Faktoren im Rahmen der intrazellulären Signalwege erforscht. Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Anwendung zweier pharmakologischer Substanzen untersucht und mit TH verglichen.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

- Ist das HL1-Zellkulturmodell geeignet eine Schädigung durch simulierte Ischämie abzubilden?
- Ist TH kardioprotektiv im HL-1-Kultur-Modell?
- Kommt es dabei zu Veränderungen der Morphologie und Funktion der Zellen?
- Welche intrazellulären Signalkaskaden werden aktiviert?
- Kann ein potentieller kardioprotektiver Effekt pharmakologisch imitiert werden?
- Gibt es einen synergistischen Effekt bei der Kombination von TH und pharmakologischer Intervention?

## 2 Material

2.1 Geräte und Zubehör

<i>BEZEICHNUNG</i>	<i>HERSTELLER</i>
Chemilumineszenz Bildentwickler: ChemiDoc XRS™	Bio-Rad, München, Deutschland
Chromatography Paper, 3mm	Whatman, Maidstone, UK
CO <sub>2</sub> Inkubator mit O <sub>2</sub> -Regelung CB 60 (Hypoxiekammer)	Binder, Tuttlingen, Deutschland
CO <sub>2</sub> Inkubator, MCO-19AIC	Sanyo Electric Biomedical Co., Tokyo, Japan
Elektrophorese-/Blotting-Netzteil	Biometra, Göttingen Germany
Fluoreszenz-Mikroskop Kamera: AxioCam mRC	Zeiss/Axio, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenz-Mikroskop: Axio Imager M1	Zeiss/Axio, Göttingen, Deutschland
Gelkämme	Bio-Rad, München, Deutschland
Magnetrührer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mini Protean® 3 (Elektrophorese-Kammer)	Bio-Rad, München, Deutschland
Mini-Trans-Blot® (Blotting-Kammer)	Bio-Rad, München, Deutschland
Plattenfluorometer / -luminometer: Fluoroskan Ascent FL	Thermo Scientific Karlsruhe, Deutschland
Plattenphotometer: Multiskan Reader Ascent	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Präzisionswaage BP4100S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Reagenzglasschüttler: Vortex-2 Genie	Scientific Industries, Bohemia, NY USA
Schüttler Promax	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Sterile Werkbank: LaminAir	Heraeus Instruments, Berlin, Deutschland
Stromversorgungsgerät: Power Pac 300	Bio-Rad, München, Deutschland
Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
Tiefkühlschrank (-80 °C)	FRYKO, Esslingen, Deutschland
Wasserbad	P-D Ind.-Gesellschaft, Dresden,



	Deutschland
Zellkulturmikroskop	Motic, Wetzlar, Deutschland
Zellkulturmikroskop (Axiovert 40 CFL)	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Zellkulturmikroskop Kamera: uEye	IDS, Obersulm, Deutschland
Zentrifuge 1: Bio-Fuge primo	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge 2: Bio-Fuge fresco	Heraeus, Hanau, Deutschland

## 2.2 Chemikalien

<i>BEZEICHNUNG</i>	<i>HERSTELLER</i>
Acrylamid [30 %]	Roth, München, Deutschland
APS	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ascorbinsäure, Natriumsalz	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
$\beta$ -Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
CellTiter-Glo® Cell Viability Assay	Promega, Madison, USA
Chloroform	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
DADLE	Abcam, Cambridge, UK
Dako Fluorescent Mounting Medium	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
DAPI	Pierce, Rockford, USA
DMSO	Roth, München, Deutschland
Dura Super Signal West	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
EDTA [99 %]	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
ECL Western Blotting Substrat	Pierce, Rockford, USA
Ethanol [99 %]	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Guanidin Hydrochlorid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

## MATERIAL

Methanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Norepinephrin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 und 2	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Pierce Lane Marker Reducing Sample Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PMFS	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ponceau S 0,1 %, 5 % Essigsäure	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Probenpuffer, reduzierend	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Protein-Gewichtsmarker	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
PVDF Membranen Fluoro Trans®	PALL Life Sciences, Port Washington, USA
RNase-freies Aqua bidest	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Salzsäure	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
SDS	Roth, München, Deutschland
TEMED	Roth, München, Deutschland
Tris-Acetat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Triton X 100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau 0,5 %	Biochrom, Berlin, Deutschland
Trypsin-EDTA, 0,05 % Trypsin in 0,02% EDTA-Na	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Trypsin Inhibitor Type I-S, Soybean	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
TWEEN 20	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
WIN-55,212-2	Enzo Life Sciences, Farmingdale, USA

### 2.3 Zellkulturmaterialien

<i>BEZEICHNUNG</i>	<i>HERSTELLER</i>
96-Well Mikrotiter-Platten, transparent	Nunc, Langenselbold, Deutschland
96-Well Mikrotiter-Platten, weiß	Nunc, Langenselbold, Deutschland
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

MATERIAL

Claycomb Medium	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Cryovials, 2ml round bottom	Corning, Corning USA
Deckgläser (Ø 15 mm)	VWR, Radnor, USA
Destilliertes Wasser in Zellkulturqualität	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM) w 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> w 4,5 g/l D-Glucose w stable Glutamine	Biochrom, Berlin, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM) w 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> w/o D-Glucose w/o L-Glutamine	Biochrom, Berlin, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM) w 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> w 4,5 g/l D-Glucose w stable Glutamine w/o Phenol red	Biochrom, Berlin, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Fibronectin 1 mg/ml	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Gelatine from bovine skin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Gewebekulturflaschen 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
L-Glutamin 200 mM	Biochrom, Berlin, Deutschland
Menzelgläser, Super Frost	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland

## MATERIAL

Multipipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
Norepinephrin 10mM	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Phosphate Buffered Saline (PBS), Dulbecco	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin ( $10^4$ U/ml P und $10^4$ $\mu$ g/ml S)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Petrischalen 22 cm <sup>2</sup> , 55 cm <sup>2</sup>	TPP, Trasadingen, Schweiz
Petrischalen 22 cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Petrischalen 12,56 cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten, 5 – 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritzen Injekt® 20 ml	Braun, Melsungen, Deutschland
Sterilfilter Filtropur S0.2	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 % Trypsin in 0,02 % EDTA-Na)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Vakuumfilterflaschen 250 ml, 500 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkultur-Röhrchen 15 ml, 50 ml	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Zellschaber 39 cm, 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.4 Antikörper und Fluoreszenzmarker

<i>BEZEICHNUNG</i>	<i>HERSTELLER</i>
Akt Antikörper	Cell Signaling, Boston, USA
Alexa Fluor® 568 Phalloidin	Invitrogen, Eugene, USA
$\alpha$ -Tubulin (11H10) Kaninchen mAb	Cell Signaling, Boston, USA
Anti-Actin, N-terminaler Antikörper, Kaninchen	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
$\beta$ -Tubulin mit Alexa Fluor 647 konjugiert, (Kaninchen, monoklonal)	Cell Signaling, Boston, USA
$\beta$ -Actin, (Kaninchen, polyklonal)	Cell Signaling, Boston, USA
DAPI	PIERCE, Rockford, USA
Esel anti-Kaninchen IgG, (Esel, polyklonal)	Dianova, Hamburg, Deutschland
GAPDH (FL-335): sc-25778	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA
HO-1 (Hsp32), pAb	Assay Designs, Ann Arbor, USA
Loading Control Antibody Sampler Kit #5142	Cell Signaling, Boston, USA
M30 CytoDEATH™ Fluorescein	PEVIVA AB, Bromma, Schweden
Phospho-Akt (Ser 473) Antikörper	Cell Signaling, Boston, USA
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.144E) XP™ Kaninchen Antikörper	Cell Signaling, Boston, USA
P44/42 MAPK (Erk1/2) Antikörper	Cell Signaling, Boston, USA

2.5 Software

<i>BEZEICHNUNG</i>	<i>HERSTELLER</i>
ImageLab™-Software	Bio-Rad, München, Deutschland
Prism 9	Graphpad Software Inc., La Jolla, USA
Quantity One	Bio-Rad, München, Deutschland
uEye-Software	IDS, Obersulm, Deutschland

## 3 Methoden

### 3.1 Zellkultur

#### 3.1.1 HL-1 Kardiomyozyten

In der vorliegenden Arbeit wurden HL-1 Kardiomyozyten in Monokultur verwendet. Dabei handelt es sich um eine Zelllinie aus atrialen AT-1 Zellen der Maus, die durch Transfektion mit dem SV40 large T Antigen über den atrialen natriuretischen Faktor (ANF) Promoter immortalisiert wurde. AT-1 Zellen müssen stets neu aus subkutanen Tumoren syngener Mäuse präpariert werden. Mit dem Abkömmling HL-1 gelang die serielle Passagierung der Zelllinie, bei erhaltenem differenziertem kardialem Phänotyp und spontaner kontraktiler Aktivität. [99] In zahlreichen Studien wurden HL-1 Zellen eingesetzt, um kardiale Zellphysiologie und pathologische Mechanismen wie Hypoxie, Apoptose und I/R zu erforschen [100-102]. Es wurde gezeigt, dass HL-1 Zellen über eine ähnliche Zellausstattung wie adulte Kardiomyozyten verfügen. Auch wurde in vielen Studien bei simultanem Gebrauch primärer Kardiomyozyten übereinstimmende Ergebnisse erzielt. [103] Die Möglichkeit, Zellen aus gefrorenen Stocks zu verwenden, die anschließend in Kultur proliferieren und große Ähnlichkeit zu adulten Kardiomyozyten besitzen, machen die HL-1 Zellen zu einem hervorragenden Modell, um die Eigenschaften kardialer Zellen zu erforschen. Die Zellen wurden von der Claycomb-Arbeitsgruppe des Louisiana State University Science Center, New Orleans zur Verfügung gestellt.

#### 3.1.2 Zellpflege

Um ein Anwachsen des Zellrasens zu gewährleisten, wurden die Böden aller Zellbehälter stets mindestens eine Stunde vor dem Ausplattieren mit  $0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Fibronectin in 0,02%-iger Gelatine behandelt. Nach zügigem Auftauen im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  und Waschen der Kryokultur wurden die Zellen in beschichtete Kulturflaschen überführt und mit Zellkulturmedium versorgt. Nach vier Stunden wurde das Medium gewechselt, um Reste des DMSO-haltigen Kryomediums zu entfernen. In der Erhaltungskultur wurden die Zellen bei 21 %  $\text{O}_2$  und 5 %  $\text{CO}_2$  bei  $37^\circ\text{C}$  kultiviert. Das Nährmedium (Claycomb-Medium, CM) ist auf der Basis von Dulbeccos's modified Eagles' medium (DMEM) entwickelt worden und setzt sich folgendermaßen zusammen:

**Tabelle 2** Zusammensetzung des Nährmediums für HL-1-Kardiomyozyten [103]

Inhaltsstoff	Konzentration
Gesamtprotein	261 mg/l
Rinderalbumin	48,85 mg/l
Nichtessentielle Aminosäuren	0,1 mM
Fetuin	165 mg/l
Transferrin	31,8 mg/l
Retinsäure	300 µg/l
Humaninsulin (rekombinant)	15 µg/l
Long R3IGF-1 (rekombinant)	0,1 µg/l
Long EGF (rekombinant)	0,1 µg/l
Cholsterol	1,96 mg/l
Linolsäure	0,78 mg/l
$\gamma$ -Oleyl- $\beta$ -pal- $\alpha$ -Phosphatidylcholin	1,96 mg/l
Ascorbinsäure	0,3 mM
Noradrenalin	100 µM
L-Glutamin	2 mM
Penicillin-Streptomycin	100 U/ml - 100 µg/ml
Fetales Rinderserum (FBS)	10 %

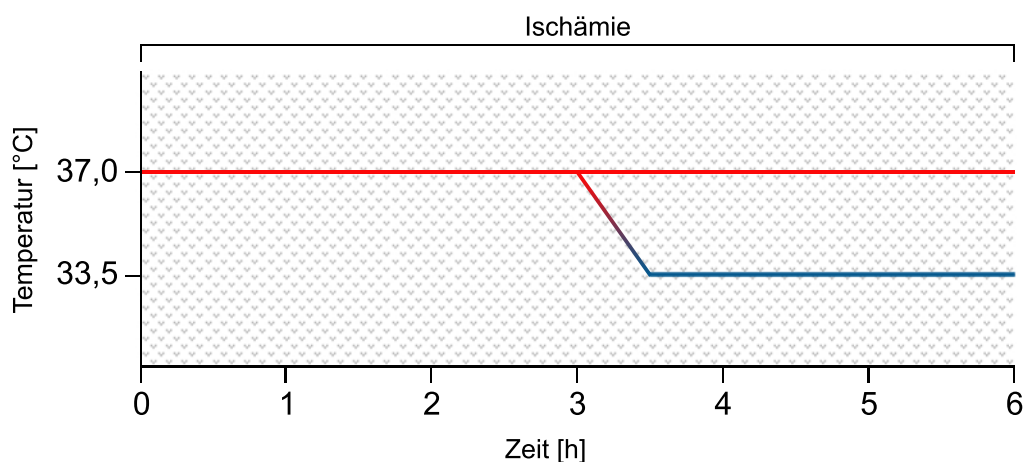
Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Die Zellkultur wurde bei voller Konfluenz im Verhältnis 1:2 bis 1:5 passagiert. Die Zellen wurden vor Passage und Versuchsbeginn mikroskopisch auf Konfluenz, Morphologie, mögliche Kontamination und Kontraktionen untersucht. Dabei waren zuerst vereinzelt schlagende Zellen, dann Zellhaufen zu beobachten, die sich bei Kontakt zweier schlagender Zellgruppen synchronisierten. Die Versuche wurden mit Zellen der 49. bis 67. Zellpassage durchgeführt. Die Claycomb-Arbeitsgruppe beschreibt eine Kontraktilität der Zellen bis Passage 240 [99].



### 3.2 In-vitro-Modell kardialer Ischämie nach außerklinischem Herzstillstand

Das Temperatur-Zeit-Protokoll (Abb. 1) orientierte sich an der Situation des OHCA und der damit einhergehenden kardialen Ischämie. In unserem Modell wurde die Mangelversorgung der Kardiomyozyten dargestellt durch Reduktion des Sauerstoffgehaltes der Umgebungsluft auf 0,2 % in einem entsprechenden Inkubator sowie durch Verwenden eines Mangelmediums, das weder Glukose noch Serum enthielt. Für die Versuche wurde DMEM als Grundlage mit verschiedenen Zusätzen verwendet. HL-1-Zellen können bis zu 72 Stunden mit DMEM ohne weitere Zusätze versorgt werden ohne den Verlust eines differenzierten Phänotyps [103]. Die Kühlung wurde drei Stunden nach Experimentstart begonnen, in Anlehnung an die Situation bei einem außerklinischen HKS mit früher, d. h. intranschämischer, Kühlung. Die Zieltemperatur von 33,5 °C wurde im Inkubator nach einer halben Stunde Kühlung erreicht und dann für weitere 2,5 Stunden gehalten.

Die Zellen wurden jeweils 48 Stunden vor Experimentbeginn ausplattiert. Einen Tag vor dem Experiment wurden die Medien angesetzt und bei entsprechendem Sauerstoffgehalt vorinkubiert. Dabei wurde eine adäquate Temperatur des Mediums sichergestellt. Für die Versuche wurde kein Noradrenalin zugesetzt, da es darunter in Kardiomyozyten zu einem erhöhten ATP-Verbrauchs kommt [104]. Außerdem wirken  $\beta$ -Mimetika u. a. direkt auf die intrazellulären Signalkaskaden der PI3K, AMPK, mTOR sowie ERK1/2, was die Ergebnisse beeinflussen könnte [105].



**Abbildung 1** Zeit-Temperatur-Protokoll: Anwendung von moderater Hypothermie während simulierter Ischämie. Ischämie wurde in einer Hypoxiekammer (0,2 % O<sub>2</sub>) in glukose- und serumfreiem Medium für sechs Stunden simuliert. Nach drei Stunden erfolgte die Einleitung von Hypothermie, die über weitere drei Stunden bei simulierter Ischämie fortgeführt wurde.

**Tabelle 3** Versuchsgruppen

	Unbehandelte Normoxiegruppe	Hypotherme Normoxiegruppe	Unbehandelte Ischämiegruppe	Hypotherme Ischämiegruppe
O <sub>2</sub>	21 %	21 %	0,2 %	0,2 %
T	37 °C	33,5 °C	37 °C	33,5 °C
Medium (auf Basis von DMEM)	Nährmedium: 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin 2 mM L-Glutamin 10 % FBS 4,5 g/l Glucose	Nährmedium: 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin 2 mM L-Glutamin 10 % FBS 4,5 g/l Glucose	Mangelmedium: 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin 2 mM L-Glutamin	Mangelmedium: 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin 2 mM L-Glutamin

### 3.3 Zellzählung mit Trypanblau-Färbung

Über die Messung der Zellzahl kann eine Aussage über das Zellüberleben getroffen werden. Um die nicht mehr intakten Zellen von den vitalen Zellen zu unterscheiden, wird die Trypanblau-Färbung benutzt. Bei Trypanblau handelt es sich um ein 960 Da großes Molekül. Es kann lediglich nicht-intakte Zellmembranen passieren und in der Folge an intrazelluläre Proteine binden. Diese Zellen stellen sich unter dem Lichtmikroskop tiefblau dar. Intakte Zellen nehmen keinen Farbstoff auf und erscheinen unter dem Mikroskop hell. [106]

Auf einer Zellkulturschale ( $\varnothing$  40 mm) wurden  $4 \times 10^5$  HL-1-Kardiomyozyten ausplattiert. Nach einer Anwachsphase von 48 Stunden wurde der Versuch laut Protokoll durchgeführt. Zu Beginn und nach sechs Stunden wurden die Zellen in den einzelnen Gruppen gezählt. Dazu wurden die Zellen mikroskopiert und auf Kontamination überprüft, der Überstand wurde entfernt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen, anschließend mit Trypsin inkubiert und vorsichtig abgelöst. Die Zellsuspension wurde mit Trypanblau gefärbt. Anschließend wurden in einer Neubauer-Zählkammer die vitalen Zellen quantifiziert. Die Werte wurden nach Normalisierung zum Start bei 37 °C und 21 % O<sub>2</sub> (= 100 %) dargestellt und statistisch ausgewertet.

### 3.4 Nachweis der Zellschädigung mittels LDH-Assay

Während mit der Zellzählung eine erste Aussage über den Zustand der adhären Zellen gemacht wurde, bildete die Messung der Laktatdehydrogenase (LDH) einen

Verlust der Membranintegrität sowohl der adhärennten als auch der gelösten Zellen im Medium ab.

LDH ist ein Enzym des Zytosols, das eine Rolle im Glukosestoffwechsel spielt. Wenn sich die Plasmamembran im Rahmen des Zelluntergangs auflöst, wird dieses Protein freigesetzt und kann im Überstand quantifiziert werden. Dazu wurde das „Cytotoxicity Detection Kit“ der Firma Roche verwendet, das einen Katalysator (Diaphorase/NAD<sup>+</sup>) und Tetrazoliumsalz beinhaltet. Die Messung beruht auf dem kolorimetrischen Nachweis der LDH. Bei der durch die LDH katalysierten Umwandlung von Laktat zu Pyruvat entstehen Protonen, die in einer zweiten Reaktion das in dem Testreagenz enthaltene Tetrazolium reduzieren. Das dabei entstehende Formazan lässt sich im Plattenphotometer quantifizieren. [107]

In der Vorbereitung wurden 48 Stunden vor Experimentbeginn  $8 \times 10^5$  HL-1 Zellen in Petrischalen (55 cm<sup>2</sup>) ausgesät. Zu Beginn des Experimentes wurden die Zellen im jeweiligen Medium gewaschen und je nach Versuchsgruppe mit 200 µl Mangel- oder Kontrollmedium versehen. Die Zellkulturplatten wurden entsprechend auf die vier verschiedenen Inkubatoren aufgeteilt.

Zur Analyse des LDH-Gehaltes wurde der Überstand in Eppendorfgefäße überführt. Diese wurden vier Minuten bei 3000/min zentrifugiert um eventuelle Zellreste abzutrennen. Pro Vertiefung einer 96-Well-Platte wurden 100 µl Überstand und 100 µl Entwicklerlösung pipettiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtabschirmung wurde die Reaktion mit 50 µl 1 M HCl pro Well gestoppt. Bei 492 nm wurde die Extinktion im Plattenphotometer gemessen. Je Messzeitpunkt wurden drei Wells gemessen und ein Mittelwert daraus gebildet.

Um die Hintergrundaktivität herauszurechnen, wurden die Extinktionen der beiden verschiedenen Versuchsmedien wie oben beschrieben parallel bestimmt und von den gemessenen Werten abgezogen. Die Werte wurden nach Normalisierung zum Start bei 37 °C und 21 % O<sub>2</sub> (=1) dargestellt und statistisch ausgewertet.

### 3.5 Aussage über die Zellfunktion mittels ATP-Messung

Um den intrazellulären ATP-Gehalt zu messen, wurde das „Cell Titer-Glo® Luminescent Cell Viability Assay“ der Firma Promega verwendet. Die Messung beruht auf der Luziferase-Reaktion [108]. Hierbei wird Luziferin + ATP + O<sub>2</sub> zu Oxyluziferin +

AMP + PPi + CO<sub>2</sub> + Licht umgewandelt. Diese Reaktion kann also nur in Gegenwart von ATP ablaufen und lässt damit einen direkten Rückschluss auf die Anzahl metabolisch aktiver Zellen zu.

Für den Versuch wurden 48 Stunden vor Experimentbeginn weiße 96-Well-Platten beschichtet und Triplets à 20.000 Zellen pro Well in 200 µl CM ausgesät. Zu Beginn des Experimentes wurden die Zellen gewaschen und je nach Versuchsgruppe mit 100 µl Mangel- oder Kontrollmedium versehen. Die Zellkulturplatten wurden auf die vier verschiedenen Inkubatoren aufgeteilt und durchliefen den Versuch gemäß Protokoll. Nach jeder vollen Stunde wurden Messwerte erhoben. Nach sechs Stunden wurde das Experiment beendet, ein Waschen der Zellen war nicht nötig. Aufgrund der unterschiedlichen Temperaturen der einzelnen Versuchsgruppen, wurden die Proben 30 Minuten der Raumtemperatur angepasst. In dieser Zeit wurde die ATP-Standardkurve erstellt (in den Konzentrationen 625 nM, 1250 nM, 2500 nM, 5000 nM, 10000 nM, 20000 nM, 40000 nM) und auf die entsprechenden Zellkulturplatten pipettiert. Um das Reagenz herzustellen wurden gemäß der Anleitung von Promega 10 ml Buffer in die Glasflasche mit CellTiter-Glo®-Substrat überführt und homogen gemischt. 100 µl Reagenz wurde pro Well pipettiert und die Platten wurden 2 Minuten gerüttelt, um eine Lyse der Zellen anzuregen. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, um ein stabiles Signal zu gewährleisten. Die Zellkulturplatten wurden bei 0,5 Sekunden Integrationszeit im Luminometer ausgelesen. Mit Hilfe der ATP-Standardkurve wurde die ATP-Konzentration berechnet, zum Start normalisiert dargestellt und statistisch ausgewertet.

### 3.6 Fluoreszenzmikroskopie zur Detektion früher Apoptose

Der monoklonale Antikörper M30 CytoDEATH detektiert das Neo-Epitop M30, das durch Caspasen-abhängige Spaltung des zellulären Strukturproteins Zytokeratin-18 entsteht. Bereits frühapoptotische Zellen können so detektiert werden und lassen sich von gesunden sowie nekrotischen Zellen unterscheiden. [109] Der M30-Antikörper ist mit einem grün fluoreszierenden Farbstoff konjugiert. Zur besseren Darstellung der Zellen wurde das Strukturprotein F-Aktin mit Fluoreszenz-markiertem Phalloidin rot angefärbt. Die Zellkerne wurden mit dem blau fluoreszierenden Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) markiert.

Es wurden 48 Stunden vor Experimentbeginn 75000 Zellen pro Well in 500 µl CM-Medium auf gecoateten Deckgläschen in einer 24-Wellplatte ausplattiert. Nach einem Mediumwechsel wurde der Versuch entsprechend Zeit-Temperatur-Protokoll (s. o.) durchgeführt. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 4 % Paraformaldehyd in PBS 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und anschließend 3x mit PBS gewaschen. Es folgte die Permeabilisierung mit 0,1 % Triton X-100 in PBS für 5 Minuten und anschließend 3-maliges Waschen mit PBS. Die Zellen wurden dann mit 1 % BSA für 30 Minuten behandelt um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, und dann mit M30 CytoDEATH Fluorescein (1:200) in PBS + 1 % BSA 45 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte wieder 3-maliges Waschen mit PBS und Markierung mit F-Actin Alexa Fluor 568 (1:40) in PBS + 1 % BSA für 30 Minuten im Dunkeln. Nach 3-maligem Waschen mit PBS erfolgte die Gegenfärbung mit DAPI (1:1000) in PBS für 10 min. Die Zellen wurden erneut 3-malig mit PBS gewaschen, auf Objektträger überführt und mit Mounting Solution eingedeckt. Nach Trocknung wurden die Zellen lichtgeschützt gelagert bis zur mikroskopischen Fotodokumentation. Zum Waschen wurden je 500 µl pro Well, zum Fixieren, Permeabilisieren und Blockieren je 200 µl pro Well und von den Antikörpern je 150 µl pro Well verwendet.

### 3.7 Untersuchung intrazellulärer Proteine mittels Western-Blot-Technik

#### 3.7.1 Proteingewinnung und Aufreinigung

Es wurden 48 Stunden vor Experimentbeginn  $8 \times 10^5$  Zellen in Petrischalen à 55cm<sup>2</sup> ausgesät. Die Versuche wurden entsprechend Protokoll durchgeführt. Es wurden Proteinanalysen zu Beginn und dann nach 4, 5 und 6 Stunden vorgenommen. Dazu wurden die Petrischalen zum entsprechenden Zeitpunkt auf Eis gestellt und mit 4°C kaltem PBS behandelt. Durch die sofortige Kühlung kommt der Zellstoffwechsel zum Erliegen. Die Zellen wurden vorsichtig mit einem Zellschaber entfernt und in ein 15 ml Falcon überführt. Die Petrischale wurde anschließend noch einmal mit PBS gewaschen und abgeschabt und die Flüssigkeit in das Falcon überführt. Das Falcon wurde 5 min bei 4000 U/min zentrifugiert um ein sichtbares Zellpellet zu erhalten. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und 5 min bei 10.000 U/min bei 4 °C zentrifugiert. Der

Überstand wurde vorsichtig abpipetiert und das Pellet in 100 µl Lysispuffer mit Inhibitoren resuspendiert. Der Lysis-Puffer (1ml) für die Proteingewinnung setzte sich dabei folgendermaßen zusammen:

29 mM Tris (pH 7,5)

150 mM NaCl

1 mM EDTA

1 mM EGTA

1 % Triton X-100 in PBS

+ Inhibitoren:

10 µl PMFS (inhibiert Proteasen)

10 µl P-PIC 2 (inhibiert Tyrosin-Phosphatase)

10 µl P-PIC 3 (inhibiert Serin- und Threonin-Phosphatasen).

Die Proteinproben wurden anschließend 15 min auf Eis gekühlt, zweimal geschüttelt und bei -80 °C gelagert.

### 3.7.2 Bestimmung der Proteinmenge mittels BCA-Protein-Assay

Die Proben wurden 1:10 mit bidestilliertem Wasser verdünnt. Pro Probe wurden zweimal je 20 µl in eine 96-Well-Platte pipettiert. Es wurde durch Verdünnung eine Standardreihe hergestellt (62,5 µg/l, 125 µg/l, 250 µg/l, 500 µg/l, 1000 µg/l), die neben bidestilliertem Wasser als Leerwert ebenfalls jeweils doppelt à 20 µl in die Vertiefungen pipettiert wurde. Die BCA-Reagenz wurde nach Herstelleranleitung im Verhältnis 50 Teile Reagenz I + 1 Teil Reagenz II angesetzt. Mit einem Multi Stepper wurden jedem Well 200 µl hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37 °C wurde die Extinktion der Proben im Plattenphotometer bei 570 nm gemessen.

### 3.7.3 Proteintrennung mittels SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die Natrium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen. Sie beruht auf der unterschiedlich schnellen Wanderung von negativ geladenen Proteinen in Abhängigkeit des Molekulargewichtes in einem elektrischen Feld. Dabei müssen die Eigenladungen der Proteine überlagert werden, die Proteine müssen in ihrer primären Struktur als Polypeptidketten vorliegen. Das wird durch Kochen der Proteine, sowie durch Spaltung der Disulfidbrücken durch

Dithiothreitol (DTT) erreicht. Das anionische SDS entfaltet die Proteine schließlich in ihre lineare Primärstruktur und bewirkt die negative Ladung der Proteine, um eine Wanderung in Richtung Anode zu gewährleisten. [110]

In Vorbereitung zum Gießen der Acrylamid-Gele wurden Glasplatten in einen Gießstand eingespannt. Die entstandene Kammer wurde mit Aqua bidest auf Dichtigkeit geprüft und anschließend mit Filterpapier getrocknet. Die Bestandteile von Sammelgel und Trenngel wurden pipettiert. Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) wurden direkt vor Gießen der jeweiligen Schicht hinzugefügt, da sie zur Polymerisation führen.

**Tabelle 4** Zusammensetzung der Gele

<b>Sammelgel 5%</b>	<b>Trenngel 15%</b>
Sammelgelpuffer TRIS/HCL 0,5 M pH = 6,8	Trenngelpuffer TRIS/ HCL 1,5 M pH = 8,8
SDS-Lösung 10 %	SDS-Lösung 10 %
APS-Lösung 10 %	APS-Lösung 10 %
Acrylamid	Acrylamid
TEMED	TEMED
H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O

Das Sammelgel wurde vorsichtig mit einer Spritze mit Aqua bidest überschichtet und benötigte etwa 30 – 45 Minuten zur Auspolymerisation. Anschließend wurde das Aqua bidest abgegossen und mit Filterpapier nachgetrocknet. Dann wurde das Sammelgel in die Kammer gegossen und zur Bildung von Ladungstaschen wurde ein der Anzahl der zu messenden Proben entsprechender Gelkamm auf das noch flüssige Gel blasenfrei gesteckt. Nach 1 – 5 Minuten wurde der Kamm entfernt und die Taschen gespült. Anschließend wurden die Gele in die Elektrophoresekammer eingebaut und mit Elektrophoresepuffer (250 mM Glycin, 25 mM TRIS Base, 0,1 % SDS) aufgefüllt. Vor der Ladung der Gele wurden Proben mit SDS-haltigem Probenpuffer versetzt und die Proteine wurden bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert. Es wurde jeweils die gleiche Proteinmenge geladen. Die Flüssigkeit in den Eppendorfgefäßen wurden zum besseren Pipettieren kurz anzentrifugiert und auf Eis gelagert.

Die Proben wurden vorsichtig in die Taschen des vorbereiteten Gels pipettiert. Als Referenz für die molekulare Größe der einzelnen Proteine lief der Molekulargewichtsmaker *Page Ruler Prestained Protein Ladder* mit. Zu Beginn wurde eine Spannung von 60 mV für etwa 20 min angelegt bis die Proteine sich im 5%igen Sammelgel kurz vor dem Übergang zum Trenngel sammelten. Im 15%igen Trenngel wurden die Proteine dann bei 110 mV separiert.

#### 3.7.4 Transfer mittels Tankblotting-Methode

Die Blottingeinheit wurde folgendermaßen zusammengebaut: ein Filterpad, Filterpapier, das Gel mit den darin aufgetrennten Proteinen, die Polyvinylidendifluorid-Membran, Filterpapier, ein Filterpad. Mögliche Luftblasen wurden vorsichtig herausgedrückt und die Einheit mit Blottingpuffer (192 mM Glycin, 25 mM TRIS Base, 20 % Methanol) befüllt. Über Nacht fand der Transfer der Proteine entlang einer angelegten Stromspannung von 30 V bei 4 °C auf die Membran statt. Zur Überprüfung einer erfolgreichen Übertragung wurden die Proteinbanden auf der Membran mit Ponceau S (0,1 % + 5 % Essigsäure) angefärbt.

#### 3.7.5 Immundetektion spezifischer Proteine

Zur Vorbereitung wurden die Membranen mit den transferierten Proteinen eine Stunde mit 5 % Magermilchpulver in TBST (20 mM TRIS, 140 mM NaCl, 0,05 % Tween20) blockiert um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern. Der gewünschte Antikörper wurde in TBST in entsprechender Verdünnung angesetzt und über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Membranen für > 5 Minuten in TBST gewaschen. Anschließend wurde der Peroxidase konjugierte Sekundärantikörper gegen Kaninchen in der Verdünnung 1:20.000 in TBST eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde drei Mal mit TBST für > 5 Minuten gewaschen. Die Membran wurde eine Minute bei Raumtemperatur mit der Reaktionsmischung behandelt, die Peroxid und die Chemilumineszenzsubstanz Luminol enthielt. Diese beiden Substrate reagierten daraufhin mittels der am Sekundär-Antikörper gebundenen Peroxidase unter Lichtemission. Nach einer Minute erfolgte die Aufnahme des Lumineszenzsignals mittels CCD-Kamera (Chemidoc™ System) und Import in die Quantity One™-



Software. Die Intensität des Lumineszenz-Signals der Banden wurde mittels ImageLab, Version 4.1, BioRad ausgewertet. Sie ist proportional zur Proteinexpression. Die Werte wurden in eine Excel-Tabelle übertragen und gegen die Kontrollgruppe normalisiert. Zur Entfernung der Primär- und Sekundär-Antikörper wurde die Membran mit Stripping-Puffer (6 M Guanidin Hydrochlorid; 0,3 % Triton X-100; 20 mM TRIS/HCl pH 7,5; 0,1 M  $\beta$ -Mercaptoethanol) behandelt. Um eine homogene Beladung der Geltaschen zu überprüfen und gegebenenfalls rechnerisch auszugleichen wurde  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle detektiert.

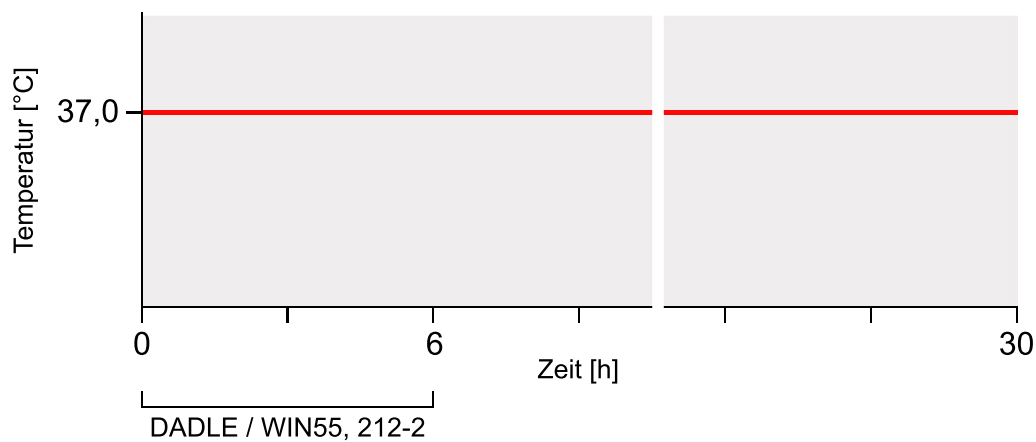
**Tabelle 5** Verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Molekulargewicht
Akt	1:1000	60 kDa
Phospho-Akt	1:1000	60 kDa
Erk 1/2	1:1000	42, 44 kDa
Phospho-Erk 1/2	1:2000	44, 42 kDa
HO-1 (Hsp32)	1:500	32 kDa
$\beta$ -Actin	1:15000	45 kDa

### 3.8 Applikation von DADLE und WIN55,212-2

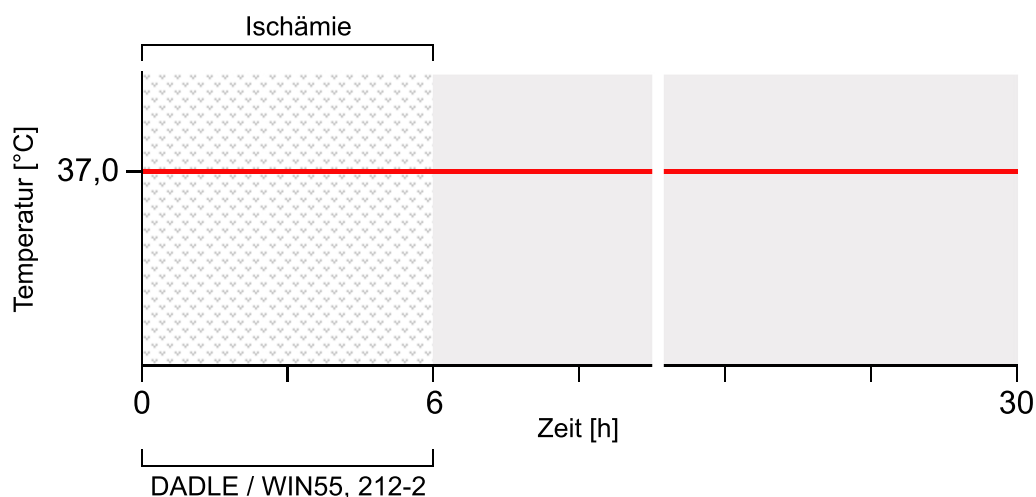
Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Wirkung der pharmakologischen Substanzen DADLE und WIN mit den Ergebnissen aus dem ersten Teil verglichen werden. Dazu wurde die Zellschädigung mittels LDH-Assay im Überstand untersucht. Die Methode des LDH-Essays ist in Kapitel 3.4 beschrieben. Die Prüfung der Pharmaka wurde in 96-Well-Platten durchgeführt. Jeweils 48 Stunden vor Versuchsbeginn wurden Triplets mit je  $2 \times 10^4$  Zellen pro Well in 200  $\mu$ l CM ausplattiert.

Zuerst wurden unterschiedliche Konzentrationen beider Arzneistoffe auf ihre Zytotoxizität untersucht (Abb. 2). Dazu wurde eine dezimale Verdünnungsreihe (1 nM – 100  $\mu$ M) in Nährmedium auf DMEM-Basis erstellt. Die Zellen wurden darin sechs Stunden inkubiert, dann erfolgte ein Mediumwechsel gegen CM ohne Noradrenalin und ohne DADLE/WIN. Zur Nachbeobachtung wurde ein 30h-Wert erhoben.



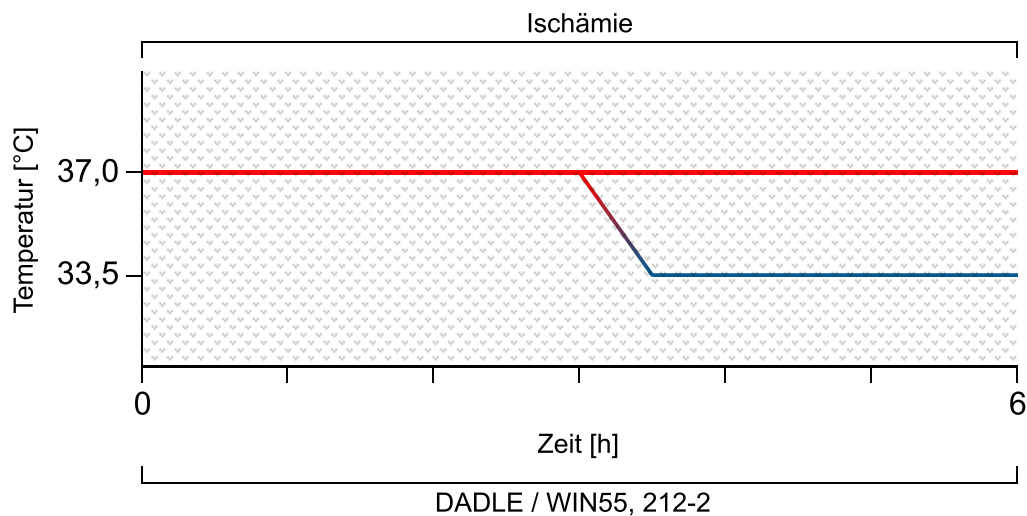
**Abbildung 2** Zeit-Temperatur-Protokoll 2 Zytotoxizität. Die Anwendung von DADLE oder WIN erfolgte über eine Dauer von sechs Stunden unter physiologischen Zellbedingungen (21 % O<sub>2</sub>, glukose- und serumhaltiges Nährmedium). Die Zellen wurden 24 Stunden nachbeobachtet.

Danach wurde ein Versuch zur Dosisfindung (Abb. 3) durchgeführt, wobei die Zellen für sechs Stunden die simulierte Ischämie durchliefen und dabei die Arzneistoffe in verschiedenen Verdünnungen (1 nM – 100 µM) erhielten. Auch hier wurde die Beobachtung auf 30 Stunden ausgeweitet.



**Abbildung 3** Zeit-Temperatur-Protokoll Dosisfindung. Die Anwendung von DADLE oder WIN erfolgte über eine Dauer von sechs Stunden während Ischämie, die in einer Hypoxiekammer (0,2 % O<sub>2</sub>) in glukose- und serumfreiem Medium simuliert wurde. Die Zellen wurden 24 Stunden nachbeobachtet.

Anschließend wurden drei Wirkstoffkonzentrationen ausgewählt und am Ischämiemodell sowohl ohne als auch in Kombination mit Kühlung geprüft (Abb. 4). Die Kühlung wurde wie im ursprünglichen Zeit-Temperatur-Protokoll (Abb. 1, s. Kap. 3.2) nach drei Stunden begonnen und das Experiment nach sechs Stunden beendet.



**Abbildung 4** Zeit-Temperatur-Protokoll Pharmaka und Hypothermie. Ischämie wurde in einer Hypoxiekammer (0,2 % O<sub>2</sub>) in glukose- und serumfreiem Medium für sechs Stunden simuliert. Nach drei Stunden erfolgte die Einleitung von moderater Hypothermie, die über weitere drei Stunden bei simulierter Ischämie fortgeführt wurde. Die Anwendung von DADLE oder WIN erfolgte über eine Dauer von sechs Stunden.

### 3.9 Darstellung und Statistische Auswertung

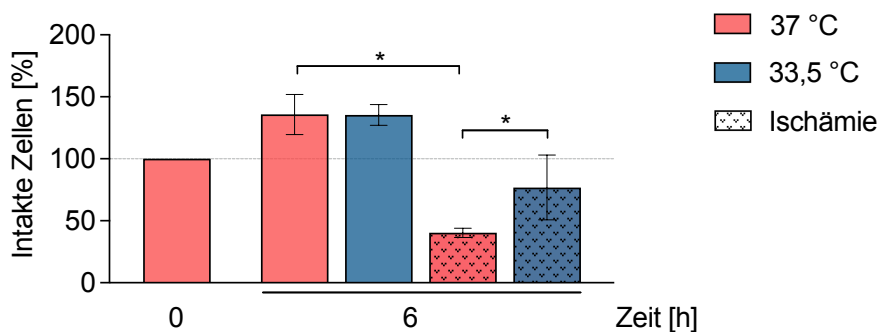
Die Ergebnisse sind als Mittelwerte (M) mit der Standardabweichung (SD) dargestellt. P-Werte < 0,05 wurden als signifikant betrachtet und mit einem Stern (\*) markiert. Die statistische Auswertung basierte auf mindestens vier Stichproben aus unterschiedlichen Zellpassagen und/oder unterschiedlichen Zellstocks. Zur Analyse der nicht-gepaarten Stichproben wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet, da keine Normalverteilung angenommen wurde.

Für die Erstellung der Graphen und die statistische Analyse wurde die GraphPad Prism Software, Version 9.0, verwendet.

## 4 Ergebnisse

#### 4.1 Einfluss der Hypothermie auf das Zellüberleben

Die Experimente wurden mit einer Zählung der intakten, adhärenen Zellen in den Proben begonnen. In Abbildung 5 ist die zum Start normierte Zellzahl dargestellt. Dazu wurde die Anzahl an lebenden Zellen in der unbehandelten Probe zu Versuchsbeginn 100 % gesetzt. Nach sechs Stunden Inkubationszeit zeigte sich ein Anstieg des Lebendzellanteils in den beiden Normoxie-Gruppen. Die normotherme Gruppe unterschied sich dabei nicht signifikant von der hypothermen Gruppe ( $p = 0,8413$ ). Zwischen der Normoxie- und Ischämiegruppe zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,0079$ ) von 96 Prozentpunkten in der Zahl an intakten Zellen bei 37 °C. Durch die Anwendung einer intranschämischen Kühlung auf 33,5 °C, zeigten die Kardiomyozyten eine höhere Überlebensrate, gemessen an lebenden Zellen, verglichen zur normothermen Ischämie ( $p = 0,0238$ ).



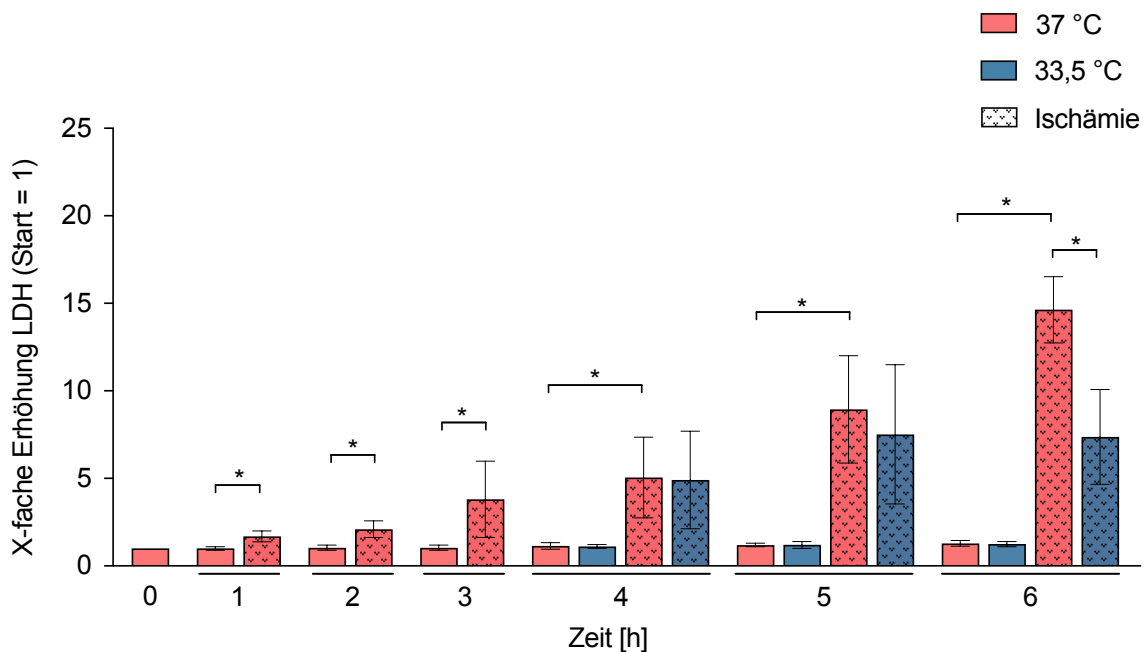
**Abbildung 5** Einfluss simulierter Ischämie und Kühlung auf das Zellüberleben.

Versuchsstart (0 h) = 100 %; Unbehandelte Normoxiegruppe = 135,8 %; gekühlte Normoxiegruppe = 135,4 %; ungekühlte Ischämiegruppe = 40,3 %; gekühlte Ischämiegruppe = 76,9 %. Die Normoxie-Gruppen wurden bei 21 % O<sub>2</sub> in glukose- und serumhaltigem Nährmedium inkubiert. Ischämie wurde in einer Hypoxiekammer (0,2 % O<sub>2</sub>) in glukose- und serumfreiem Mangelmedium für sechs Stunden simuliert. Nach drei Stunden erfolgte die Einleitung von moderater Hypothermie, die über weitere drei Stunden fortgeführt wurde. Die Versuche wurden fünfmal durchgeführt. n = 5; M +/- SD; statistische Analyse mit Mann-Whitney-U-Test; \* =  $p < 0,05$

#### 4.2 Einfluss der Hypothermie auf die Zellschädigung

Der Austritt von intrazellulärer Laktatdehydrogenase durch nicht mehr intakte Zellwände lässt sich im Zellüberstand messen und zeigt das Ausmaß der Zellschädigung. In Abbildung 6 ist die LDH-Ausschüttung in den verschiedenen Versuchsgruppen über sechs Stunden als relative Erhöhung normalisiert zum Versuchsstart dargestellt.

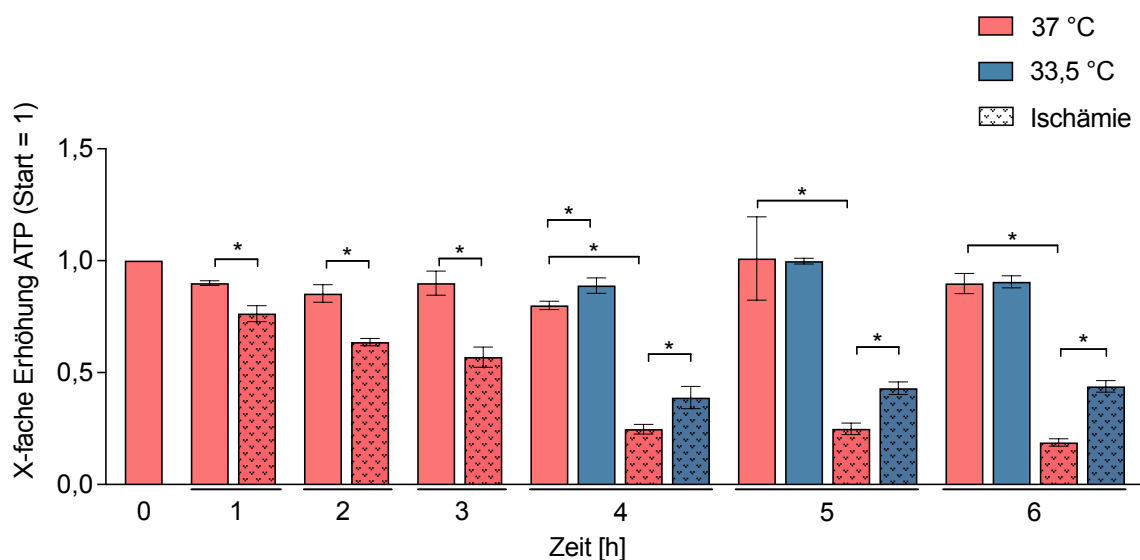
Die simulierte Ischämie führte zu einer zeitabhängigen Freisetzung von LDH ( $p < 0,0001$ ). Die Senkung der Temperatur um  $3,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  hatte nach drei Stunden intranschämischer Anwendung eine Halbierung des LDH-Übertrittes in den Überstand bei den Kardiomyozyten zur Folge ( $p = 0,0013$ ).



**Abbildung 6** Einfluss simulierter Ischämie und Kühlung auf die LDH-Freisetzung. Die Normoxie-Gruppen wurden bei 21 % O<sub>2</sub> in glukose- und serumhaltigem Nährmedium inkubiert. Ischämie wurde in einer Hypoxiekammer (0,2 % O<sub>2</sub>) in glukose- und serumfreiem Mangelmedium für sechs Stunden simuliert. Nach drei Stunden erfolgte die Einleitung von moderater Hypothermie, die über weitere drei Stunden fortgeführt wurde. Die Versuche wurden mindestens sechsmal durchgeführt. n = 6; M +/- SD; statistische Analyse mit Mann-Whitney-U-Test; \* = p < 0,05

### 4.3 Einfluss der Hypothermie auf den ATP-Gehalt

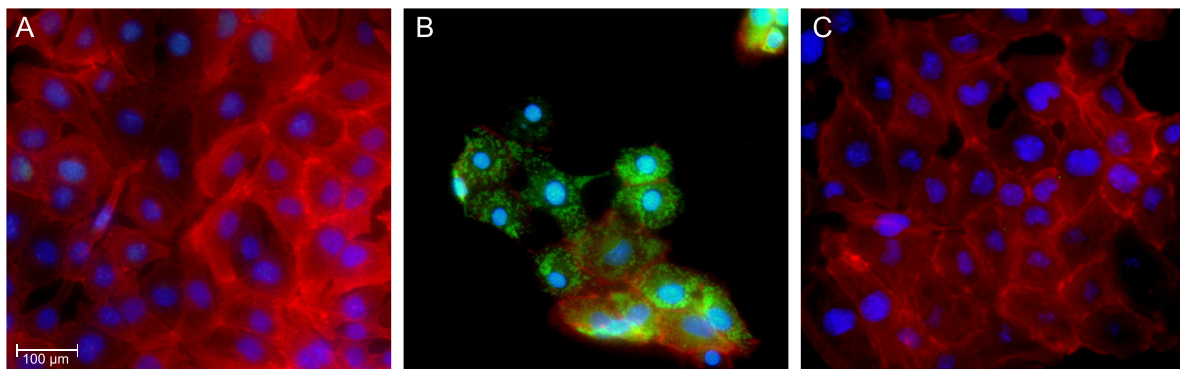
Abbildung 7 zeigt den zum Start normalisierten intrazellulären ATP-Gehalt gemessen über sechs Stunden. Bereits nach einer Stunde ließ sich die Ischämieschädigung durch einen signifikant reduzierten intrazellulären ATP-Spiegel im Vergleich zur Normoxiegruppe nachweisen ( $p = 0,0286$ ). Diese Beobachtung wurde auch für alle weiteren Messzeitpunkt gemacht. Nach einer Stunde Kühlung war die schädigende Wirkung der Ischämie auf die Zellen signifikant reduziert ( $p = 0,0286$ ). Beim Vergleich der Normoxiegruppen zeigte sich für den 4-h-Messzeitpunkt, dass eine einstündige Hypothermie zu einem signifikant höheren intrazellulärem ATP-Gehalt führt ( $p = 0,0286$ ). Dies zeigte sich jedoch nicht nach zwei und drei Stunden Kühlung ( $p = >0,9999$  und  $0,8857$ ).



**Abbildung 7** Einfluss simulierter Ischämie und Kühlung den intrazellulären ATP-Gehalt. Die Normoxie-Gruppen wurden bei 21 % O<sub>2</sub> in glukose- und serumhaltigem Nährmedium inkubiert. Ischämie wurde in einer Hypoxiekammer (0,2 % O<sub>2</sub>) in glukose- und serumfreiem Mangelmedium für sechs Stunden simuliert. Nach drei Stunden erfolgte die Einleitung von moderater Hypothermie, die über weitere drei Stunden fortgeführt wurde. Die Versuche wurden viermal durchgeführt. n = 4; M +/- SD; statistische Analyse mit Mann-Whitney-U-Test; \* = p < 0,05

#### 4.4 Einfluss der Hypothermie auf Apoptose

Mit der vorliegenden Fluoreszenzfärbung mit dem M30 CytoDEATH-Kit konnte eine Aussage über das Vorliegen früher Apoptose getroffen werden. Nach intraischämischer Kühlung ließen sich deutlich weniger M30-positive Zellen nachweisen als in der ungekühlten Ischämiegruppe. In den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 8) wird darüber hinaus deutlich, dass die Kühlung zu einem Erhalt der ovalen Zellform mit abgrenzbarem Zellkern führt. Auch zeigte sich ein höherer Anteil adhärenter Zellen und die Zellkontakte zwischen den Kardiomyozyten blieben überwiegend erhalten.



**Abbildung 8** Fluoreszenzfärbungen: Einfluss simulierter Ischämie und Kühlung auf Apoptose. A) Kontrolle B) Unbehandelte Ischämiegruppe C) Gekühlte Ischämiegruppe. 400-fache Vergrößerung. Die Kontrolle wurde in glukose- und serumhaltigem Nährmedium bei 37 °C und 21 % O<sub>2</sub> für sechs Stunden inkubiert. Eine normotherme und eine hypotherme Ischämiegruppe wurden sechs Stunden in glukose- und serumfreiem Mangelmedium bei 0,2 % O<sub>2</sub> inkubiert. Die Kühlung wurde nach drei Stunden begonnen und über weitere drei Stunden fortgeführt. Die Zellen wurden direkt im Anschluss an den Versuch fixiert. Grün = Apoptose (M30), rot = Zytosol (F-Actin), blau = Nuklei (DAPI).

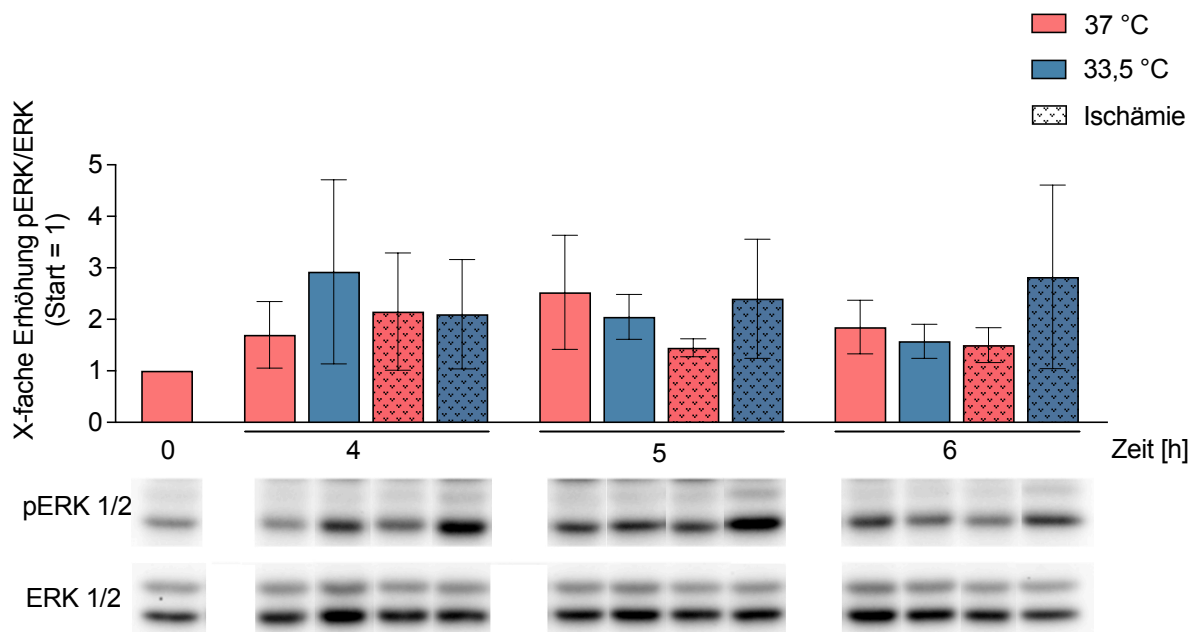
#### 4.5 Untersuchung antiapoptotischer intrazellulärer Proteine

Nachdem eine intraischämische Apoptoseaktivierung mittels Fluoreszenz-Mikroskopie festgestellt wurde, untersuchten wir die mögliche Involvierung dreier potentiell antiapoptotischer Proteine. Ziel war es intrazelluläre Signalkaskaden zu identifizieren, die durch Hypothermie aktiviert werden.



4.5.1 Einfluss der Hypothermie auf die ERK-Aktivierung

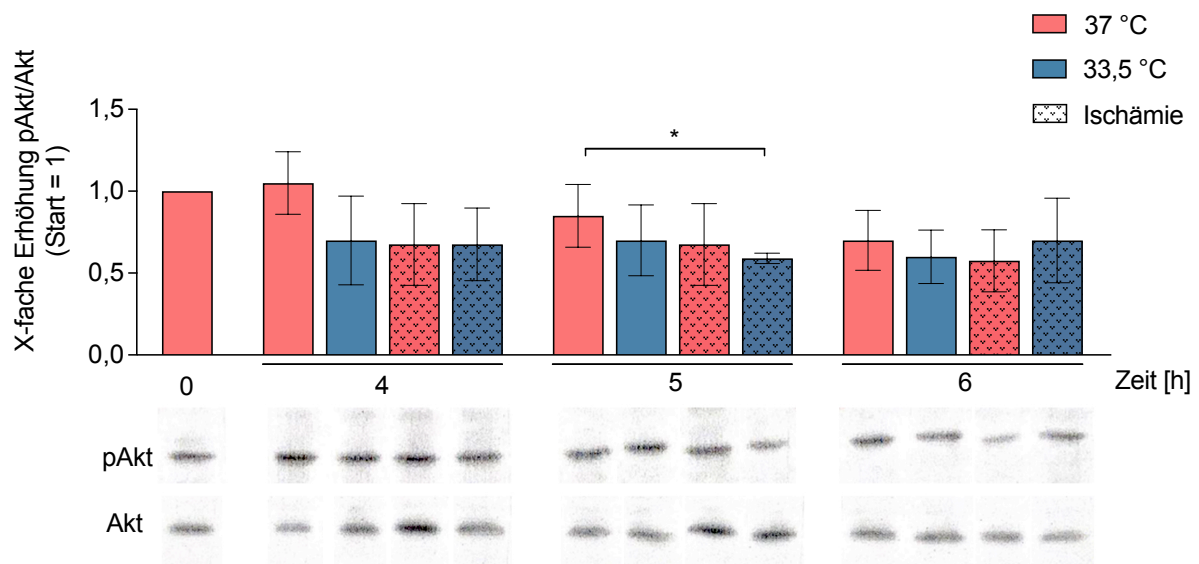
In Abbildung 9 ist das Verhältnis von aktivierten, d.h. phosphoryliertem, ERK zu ERK normalisiert zum Start mit den korrespondierenden Western Blot Banden dargestellt. Bei der statistischen Auswertung gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen und Zeitpunkten. Es zeigt sich jedoch bei Betrachtung der pERK 1/2 Western Blot Banden in allen gekühlten Ischämiegruppen eine stärkere Ausprägung der Bande.



**Abbildung 9** Relative Erhöhung der pERK/ERK Ratio mit korrespondierenden Western Blot Banden. Die Normoxie-Gruppen wurden bei 21 % O<sub>2</sub> in glukose- und serumhaltigem Nährmedium inkubiert. Ischämie wurde in einer Hypoxiekammer (0,2 % O<sub>2</sub>) in glukose- und serumfreiem Mangelmedium für sechs Stunden simuliert. Nach drei Stunden erfolgte die Einleitung von moderater Hypothermie, die über weitere drei Stunden fortgeführt wurde. Die Versuche wurden viermal durchgeführt. n = 4; M +/- SD; statistische Analyse mit Mann-Whitney-U-Test.

#### 4.5.2 Einfluss der Hypothermie auf die Aktivierung von Akt

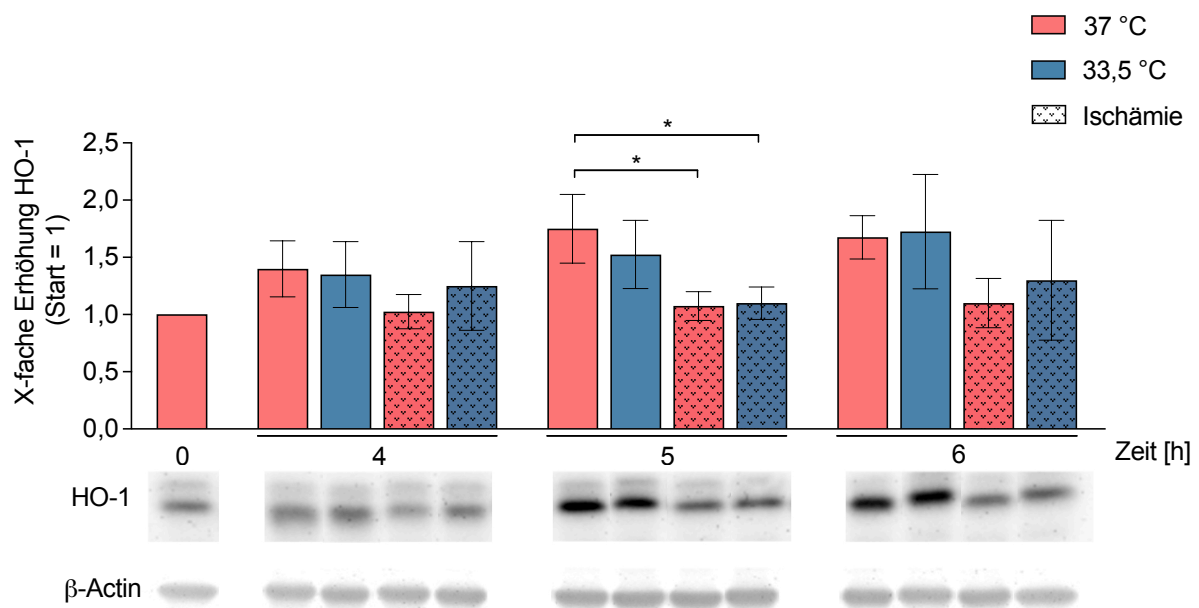
In Abbildung 10 ist die pAkt/Akt Ratio normalisiert zum Start dargestellt. Es zeigte sich eine verminderte Aktivierung von Akt in der gekühlten Ischämiegruppe im Vergleich zur ungekühlten Normoxiegruppe für den 5h-Messzeitpunkt ( $p = 0,294$ ). Bei einer relativ kleinen Stichprobe von 4 n gab es in der gekühlten Ischämiegruppe zum 5h-Zeitpunkt eine sehr geringe Standardabweichung der einzelnen Werte.



**Abbildung 10** Relative Erhöhung der pAkt/Akt Ratio mit korrespondierenden Western Blot Banden. Die Normoxie-Gruppen wurden bei 21 % O<sub>2</sub> in glukose- und serumhaltigem Nährmedium inkubiert. Ischämie wurde in einer Hypoxiekammer (0,2 % O<sub>2</sub>) in glukose- und serumfreiem Mangelmedium für sechs Stunden simuliert. Nach drei Stunden erfolgte die Einleitung von moderater Hypothermie, die über weitere drei Stunden fortgeführt wurde. Die Versuche wurden viermal durchgeführt. n = 4; M +/- SD; statistische Analyse mit Mann-Whitney-U-Test. \* =  $p < 0,05$

#### 4.5.3 Einfluss der Hypothermie auf die Expressierung der HO-1

In Abbildung 11 ist die relative Erhöhung der HO-1 mit den korrespondierenden Western Blot Banden dargestellt. Bereits beim Betrachten der Banden zeigte sich in den Ischämiegruppen eine geringere Expressierung der HO-1. In der statistischen Auswertung war nach fünf Stunden der Unterschied zwischen der normoxen Kontrolle zur gekühlten als auch zur ungekühlten Ischämiegruppe signifikant ( $p = 0,286$ ). Sowohl nach vier Stunden als auch nach sechs Stunden lässt sich ein gleicher Trend in der Abbildung erkennen.



**Abbildung 11** Relative Erhöhung der HO-1 mit korrespondierenden Western Blot Banden. Die Normoxie-Gruppen wurden bei 21 % O<sub>2</sub> in glukose- und serumhaltigem Nährmedium inkubiert. Ischämie wurde in einer Hypoxiekammer (0,2 % O<sub>2</sub>) in glukose- und serumfreiem Mangelmedium für sechs Stunden simuliert. Nach drei Stunden erfolgte die Einleitung von moderater Hypothermie, die über weitere drei Stunden fortgeführt wurde. Die Ladungskontrolle erfolgte mit β-Actin. Die Versuche wurden viermal durchgeführt. n = 4; M +/- SD; statistische Analyse mit Mann-Whitney-U-Test. \* = p < 0,05

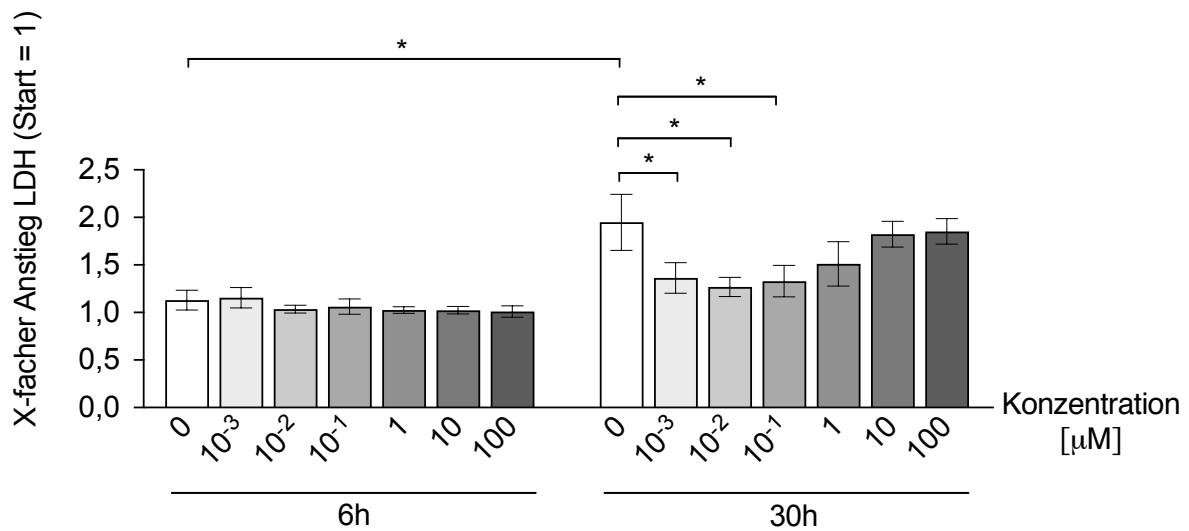
## 4.6 Pharmakologischer Therapieansatz mit DADLE und WIN55,212-2

### 4.6.1 Zytotoxizitätsprüfung

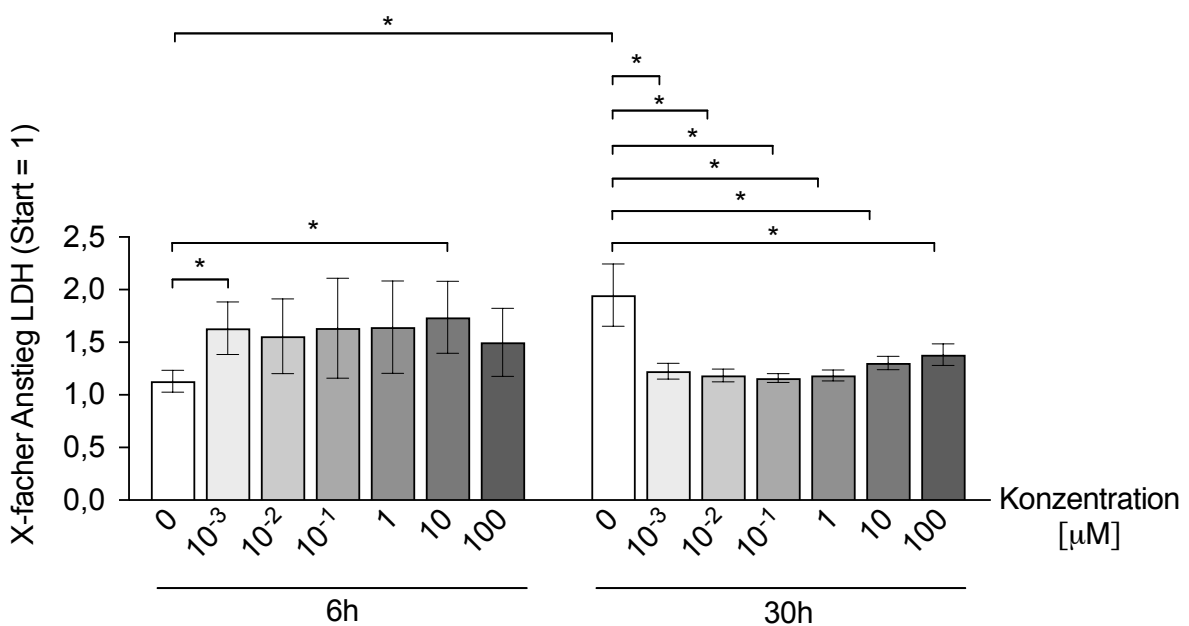
Entsprechend Versuchsprotokoll (s. S. 37, Abb. 2) wurde die Zytotoxizität des jeweiligen Pharmakons in einer dezimalen Konzentrationsreihe mittels LDH-Assay untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 normalisiert zum Versuchsstart dargestellt. Nach sechs Stunden zeigte sich für die Behandlung mit DADLE kein signifikanter Unterschied in der LDH-Ausschüttung im Vergleich zur Kontrolle, keine der gewählten Konzentrationen wirkte zytotoxisch. Nach dreißig Stunden zeigte sich eine Zellschädigung der Kontrolle, die bei DADLE-Konzentrationen von 1 – 100 nM signifikant reduziert werden konnte. DADLE-Konzentrationen von 1 – 100 µM zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle für diesen Messzeitpunkt.

Für WIN zeigte sich nach sechs Stunden Inkubation eine Schädigung bei 1 nM und 10 µM. Nach 30 Stunden konnte eine Zellschädigung der Kontrolle festgestellt werden. In den Zellen, die die sechsstündige Behandlung mit WIN erhalten hatten, konnte für alle sechs Konzentrationen eine signifikante Reduktion der LDH-Ausschüttung gemessen werden.

A) DADLE



B) WIN55,212-2



**Abbildung 12** Dezimale Konzentrationsreihen zur Bestimmung der Zytotoxizität von A) DADLE und B) WIN55,212-2. Die Kontrolle wurde in wirkstofffreiem, glukose- und serumhaltigem Nährmedium bei 21 % O<sub>2</sub> inkubiert. Die Zytotoxizität der Pharmaka wurde durch sechsstündige Inkubation in wirkstoff-, glukose- und serumhaltigem Nährmedium bei 21 % O<sub>2</sub> geprüft und weitere 24 Stunden mit wirkstofffreiem CM nachbeobachtet. Die Versuche wurden zweimal mit insgesamt vier verschiedenen Zellpassagen durchgeführt. n = 4; M +/- SD; statistische Analyse mit Mann-Whitney-U-Test. \* = p < 0,05

#### 4.6.2 Dosisfindung

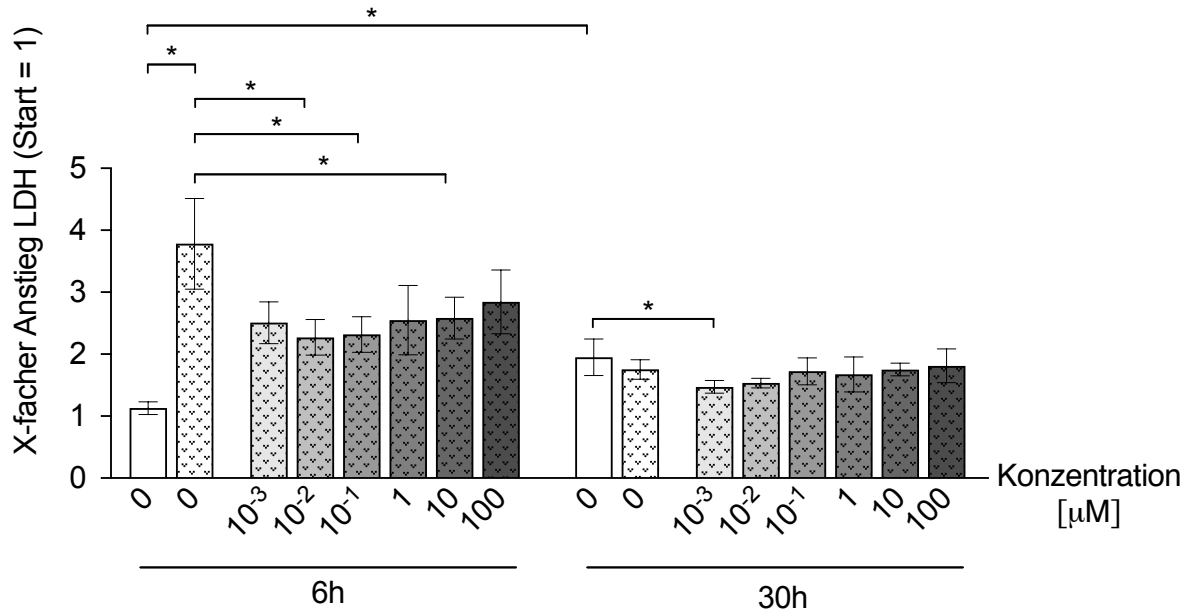
Zur Bestimmung der optimalen Dosis der Pharmaka wurde die Testung einer dezimalen Konzentrationsreihe unter simulierter Ischämie an den Zellen durchgeführt (s. S. 37, Abb. 3) und der Übertritt von LDH in den Zellüberstand gemessen. In Abbildung 13 wurden die Ergebnisse normalisiert zum Versuchsstart dargestellt.

Nach sechs Stunden zeigte sich in der unbehandelten Ischämiegruppe eine signifikant höhere LDH-Ausschüttung im Vergleich zur Kontrolle. Nach dreißig Stunden war die Schädigung nicht mehr ersichtlich, die unbehandelte Ischämiegruppe unterschied sich in der statistischen Analyse nicht von der Kontrolle.

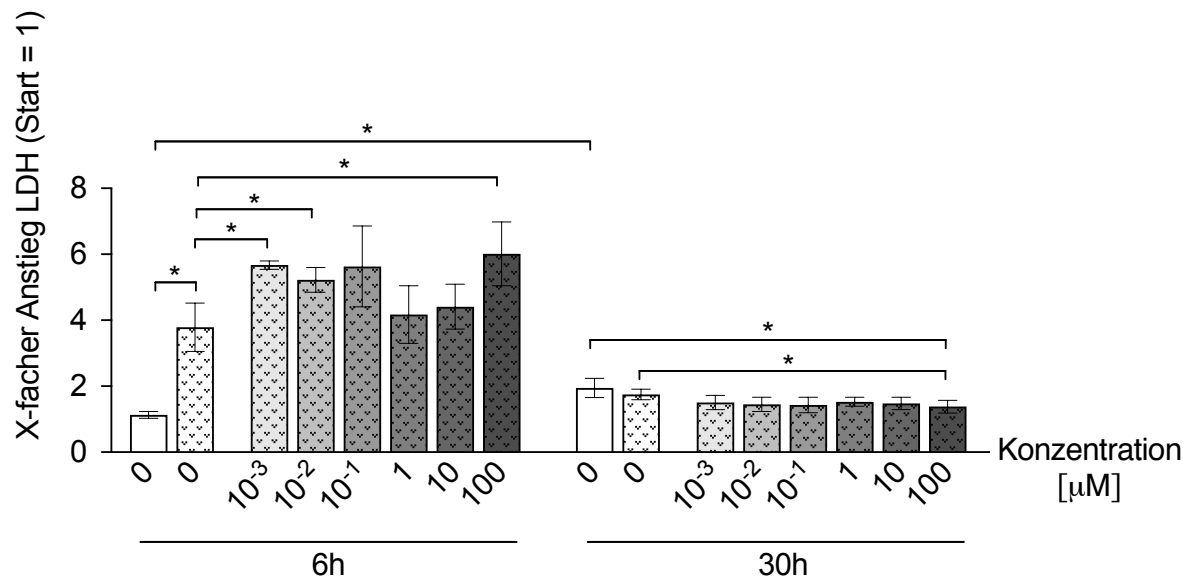
DADLE bewirkte nach sechs Stunden in den Konzentrationen 10 nM, 100 nM und 10 µM eine signifikant geringere LDH-Ausschüttung im Vergleich zur unbehandelten Ischämiegruppe. Alle mit DADLE behandelten Ischämiegruppen wiesen dabei eine signifikant höhere Schädigung auf als die Kontrolle. Der besseren Übersicht halber ist dies in der Abbildung nicht markiert. Nach weiteren 24 Stunden führte die Behandlung mit 1 nM DADLE zu einer geringeren LDH-Ausschüttung verglichen mit der Kontrolle. Die intraischämische Inkubation mit 1 nM, 10 nM und 100 nM WIN bewirkte eine höhere LDH-Ausschüttung als in der unbehandelten Ischämiegruppe. Nach dreißig Stunden wurde für die Dosierung 100 nM signifikant weniger LDH im Überstand gemessen verglichen mit der unbehandelten Ischämie und der Kontrolle.

A) DADLE

☒ Ischämie



B) WIN55,212-2



**Abbildung 13** Versuchsreihen zur Wirkung verschiedener Konzentrationen von A) DADLE und B) WIN55,212-2 während simulierter Ischämie. Die Kontrolle wurde in wirkstofffreiem, glukose- und serumhaltigem Nährmedium bei Normoxie (21 % O<sub>2</sub>) inkubiert. Die intraischämische Wirkung der Pharmaka wurde in einer Hypoxiekammer (0,2 % O<sub>2</sub>) in wirkstoffhaltigem, glukose- und serumfreiem Mangelmedium für sechs Stunden geprüft und weitere 24 Stunden mit wirkstofffreiem CM bei Normoxie nachbeobachtet. Die Versuche wurden zweimal mit insgesamt vier verschiedenen Zellpassagen durchgeführt. n = 4; M +/- SD; statistische Analyse mit Mann-Whitney-U-Test. \* = p < 0,05

#### 4.6.3 Pharmakologische Therapie und Hypothermie

Anhand der Toxizitäts- und Dosisfindungsversuche wurden die Konzentration, mit denen weitergearbeitet wurde, für DADLE auf 1 – 100nM und für WIN auf 100nM – 10µM eingegrenzt. Es wurde der Versuch laut Protokoll durchgeführt (s. S. 38, Abb. 4). Da die Ischämieschädigung in den Vorversuchen zur Dosisfindung nach 30 Stunden nicht mehr sichtbar war, reduzierten wir die Beobachtung auf 6 Stunden.

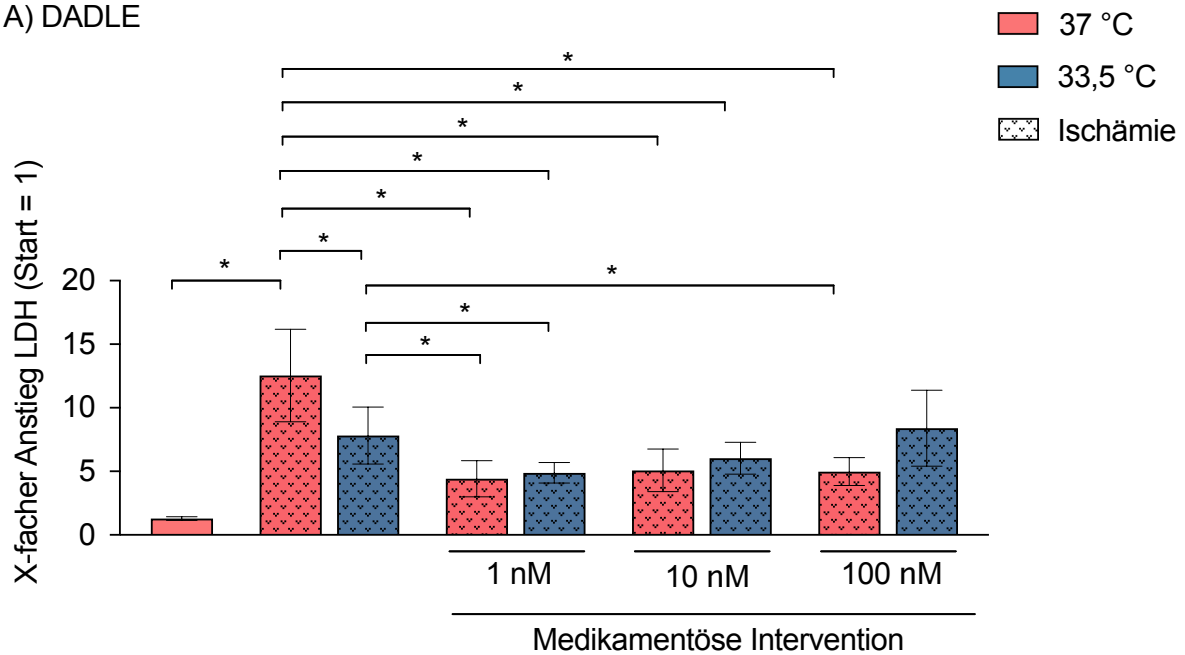
In Abbildung 14 ist der relative Anstieg der LDH-Freisetzung normalisiert zum Versuchsstart dargestellt. Dabei bestätigen sich die Beobachtungen aus dem ersten Teil der Arbeit: Es wurde eine signifikant höhere LDH-Freisetzung in der unbehandelten Ischämiegruppe und eine signifikante Reduktion der LDH-Freisetzung durch die intranschämische Kühlung gemessen.

Mit der Opioid-Behandlung ließ sich der LDH-Übertritt in den Überstand teilweise noch weiter senken. Mit Ausnahme der mit 100 nM DADLE behandelten und zusätzlich gekühlten Gruppe ergab die statistische Analyse für alle anderen Konzentrationen eine signifikant geringere LDH-Ausschüttung im Vergleich zur ungekühlten Ischämiegruppe. Bei drei der mit DADLE behandelten Gruppen fand sich darüber hinaus eine signifikant niedrigere LDH-Ausschüttung im Vergleich zur unbehandelten, hypothermen Ischämiegruppe.

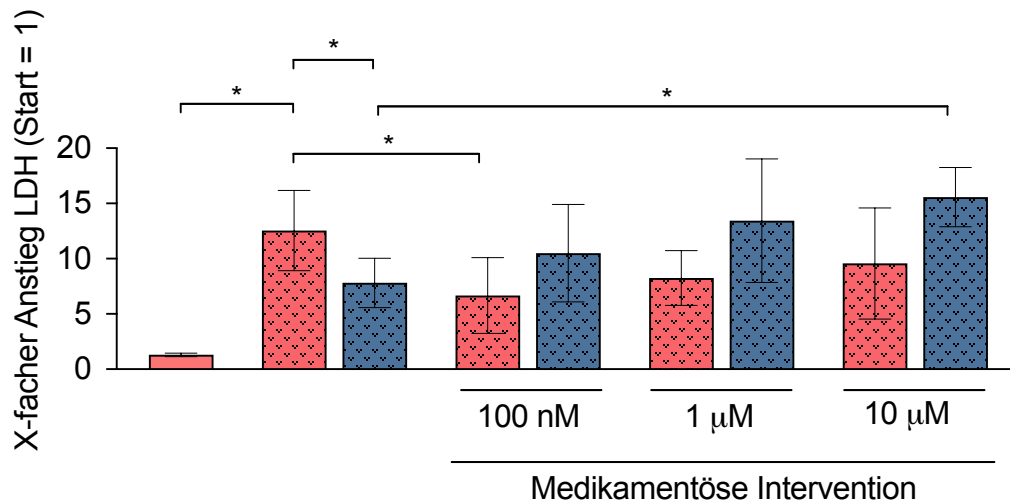
Das Cannabinoid WIN war in der Konzentration 100 nM vergleichbar in der Reduktion der LDH-Freisetzung wie intranschämische Hypothermie. WIN in Kombination mit Kühlung hatte keinen senkenden Effekt auf die gemessene LDH. Eine Kombination aus Hypothermie und Behandlung mit 10 µM WIN führte sogar zu einer signifikant höheren LDH-Konzentration im Medium verglichen mit der unbehandelten, hypothermen Ischämiegruppe.



A) DADLE



B) WIN55,212-2



**Abbildung 14** Wirkung verschiedener Konzentrationen von A) DADLE und B) WIN55,212-2 während simulierter Ischämie und Kühlung. Die Kontrolle wurde in wirkstofffreiem, glukose- und serumhaltigem Nährmedium bei Normoxie (21 % O<sub>2</sub>) und 37 °C inkubiert. Die intraschämische Wirkung der Pharmaka wurde mit sechsständiger Inkubation bei simulierter Ischämie geprüft. Ischämie wurde dabei in einer Hypoxiekammer (0,2 % O<sub>2</sub>) in glukose- und serumfreiem Mangelmedium für sechs Stunden simuliert. Nach drei Stunden erfolgte die Einleitung von moderater Hypothermie, die über weitere drei Stunden fortgeführt wurde. Die Versuche wurden mindestens zweimal mit mindestens vier verschiedenen Zellpassagen durchgeführt. n = 4; M +/- SD; statistische Analyse mit Mann-Whitney-U-Test. \* = p < 0,05

## 5 Diskussion

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, ist TH zur Organprotektion Gegenstand zahlreicher Studien. TH wird in den aktuellen Leitlinien bei HKS mit dem Ziel insbesondere der Neuroprotektion empfohlen (s. Kapitel 1.4.1).

Es gilt nach wie vor den potentiellen kardioprotektiven Effekt der TH besser zu verstehen, um eine Übertragung von laborexperimentellen Ergebnissen in den klinischen Alltag zu ermöglichen und die identifizierten protektiven Signalwege pharmakologisch nutzbar zu machen. Der Fokus dieser Forschungsarbeit liegt auf der Ischämiephase. Zwar hat die Reperfusionsschädigung auch einen Anteil an der Gesamtschädigung durch I/R [13]. Jedoch erscheint es plausibel, dass wenn man den ersten Ischämieschaden reduzieren kann, auch nachfolgende Schädigungsmechanismen gemildert werden. Das übergeordnete Ziel ist es, die Morbidität und Mortalität des außerklinischen HKS zu reduzieren.

### 5.1. Überprüfung des Modells

Im Rahmen der Untersuchung zugrundeliegender Protektionsmechanismen therapeutischer Hypothermie wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Zellkulturmodell mit HL-1-Kardiomyozyten in Monokultur entwickelt. Dabei wurde die Mangelversorgung der Kardiomyozyten dargestellt durch Reduktion des Sauerstoffgehaltes im Inkubator auf 0,2 % und durch Verwenden eines Mangelmediums, das weder Glukose noch Serum enthielt. [111] Um das Schädigungs-Modell zu überprüfen, wurde zuerst der Einfluss der simulierten Ischämie auf die Zahl der intakten HL-1-Zellen untersucht. Nach sechs Stunden zeigte sich unter Ischämie eine reduzierte Zellzahl, gleich den Ergebnissen von Åström-Olsson et al. (2012). In der zitierten Studie wurde die Ischämie in einem HL1-Zellkulturmodell mit einem höherem Luftsauerstoffgehalt von 1 % und einem Mangelmedium mit HCl-Zusatz simuliert. [112] Demnach konnte erfolgreich eine Ischämie im Zellmodell nachgeahmt, und ein deutlich messbarer Effekt nach sechs Stunden beobachtet werden.

Um weitere Erkenntnisse zu gewinnen, beinhalteten sich anschließende Arbeiten eine Messung früherer Zeitpunkte in der simulierten Ischämie. Dazu wurden die ins Zellmedium freigesetzte LDH und der intrazelluläre ATP-Gehalt untersucht. Es zeigte sich in unseren Versuchen eine signifikante Zell- und Mitochondrienschädigung durch die simulierte Ischämie bereits eine Stunde nach Inkubationsstart, die mit jeder

weiteren Stunde zunahm. Dadurch konnten die publizierten Daten unserer Arbeitsgruppe reproduziert werden [111]. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch zu frühen intraischämischen Zeitpunkten eine Schädigung der Zellmembran und Mitochondrien auftritt. Eine Schädigung auf mitochondrialer Ebene wurde auch von Brady et al. (2006) in Form von Fragmentierung der Mitochondrien bei HL-1 Zellen nach 2-stündiger simulierter Ischämie nachgewiesen [113].

Insgesamt konnte mit der Messung der Zellzahl, der extrazellulären LDH und dem intrazellulären ATP-Gehalt nachgewiesen werden, dass wir mit dem Modell in der Lage sind, eine Ischämie-Schädigung abzubilden.

## 5.2. Kardioprotektion durch Hypothermie

### 5.2.1 Einfluss der Hypothermie auf Zellvitalität, Zellüberleben und metabolische Aktivität

Bei der Auswertung zeigten die ungekühlte und die gekühlte Normoxiegruppe vergleichbare Ergebnisse bei Zellzahl und LDH-Messung. Diese Beobachtung war wichtig, um die Wirkung einer intraischämischen Kühlung besser beurteilen zu können. Bei der Messung der ATP führte die Kühlung in der Normoxiegruppe jedoch teilweise zu einem höheren intrazellulären ATP-Gehalt. Demnach bestätigt sich hier, dass Hypothermie zu einer Präservierung der Energiespeicher führt [70].

Bereits die Sichtung der Petrischalen ließ die Vermutung zu, dass die intraischämische Kühlung die Zellzahl erhält. Mittels Zellzählung ließ sich dies quantifizieren. Die Kühlung hatte einen positiven Effekt auf Zellüberleben und -metabolismus, was sich mit den Beobachtungen von Tong et al. (2015) deckt [111]. So konnten wir übereinstimmend zeigen, dass Hypothermie zu einem reduzierten extrazellulären LDH-Spiegel bei höherem intrazellulärem ATP-Gehalt führt.

### 5.2.2 Einfluß der Hypothermie auf intraischämische Apoptose

Nachfolgend wurde untersucht, ob Apoptosevorgänge intraischämisch stattfinden. Es ist bekannt, dass apoptotische Signalkaskaden maßgeblich am Zelluntergang bei Ischämie-Reperfusion beteiligt sind [114]. Es ist aber unklar, ob Apoptose während der Ischämie und/oder Reperfusion auftritt [115].

Die Apoptose ist ein ATP-abhängiger Prozess [73]. In der Arbeit von Eguchi et al. wurde beschrieben, wie sich bestimmte apoptotische Signalkaskaden durch reduzierte ATP blockieren lassen [116]. Im Gegensatz dazu, korrelierte in unseren Versuchen der verminderte intrazelluläre ATP-Gehalt der unbehandelten Ischämiegruppe nicht mit reduzierter Apoptose.

Mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie konnten wir beobachten, dass intraintrischämische Hypothermie zu einer Reduktion des Caspase-Spaltproduktes CK18 führte. Dies weist darauf hin, dass durch die Kühlung pro-apoptotische Signalkaskaden geblockt werden. Diese Ergebnisse bestätigen Resultate von Shao et al., die auf eine verringerte Apoptose durch verminderte Aktivität der Caspase-3 durch eine Kühlung der Kardiomyozyten auf 25 °C weisen [117]. Auch Shuja et al. zeigten im Ratten-Tiermodell eine Reduktion von Apoptose unter Hypothermie bei hämorrhagischem Schock [118].

### 5.2.3 Durch Hypothermie induzierte antiapoptotische Signalwege

Nachdem wir nachgewiesen hatten, dass Apoptose beim Zelluntergang durch Ischämie eine Rolle spielt und durch Hypothermie reduziert werden kann, sollten die zugrundeliegenden Signalwege weiter untersucht werden. Dazu wurden die potentiell antiapoptotischen Proteine ERK, Akt und HO-1 gemessen.

Beharier et al. zeigten 2012 an HL-1-Kardiomyozyten, dass ischämiebedingtes Zellsterben durch Phosphorylierung von ERK reduziert wird. Die Anwendung eines MEK-Inhibitors hob diesen Effekt auf. [119] In der vorliegenden Arbeit ergab die statistische Auswertung der Banden keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen und Zeitpunkten. Eine kleine Stichprobengröße und relativ große Standardabweichung könnten dabei eine Rolle gespielt haben. Es zeigte sich bei Betrachtung der pERK-Western-Blot-Banden in allen gekühlten Ischämiegruppen eine stärkere Ausprägung der Bande, die auf eine vermehrte Expression hinweisen könnte. In publizierten Studien wurde ebenfalls gezeigt, dass die Kardioprotektion milder Hypothermie durch ERK vermittelt wird [120, 121]. Die Messung der ERK erfolgte in den genannten Studien in der Reperfusionphase. Es ist denkbar, dass Hypothermie bereits während der Ischämiephase eine Aktivierung des MAPK/ERK-Signalweges auslöst, die dann auch in der frühen Reperfusionphase

nachweisbar ist bzw. mit einem weiteren Anstieg von aktiviertem ERK einhergeht. Yang et al. postulierte nach einer Untersuchung an isolierten Rattenherzen, dass der kardioprotektive Effekt von Hypothermie (35 °C) während 30-minütiger Ischämie durch ERK vermittelt wird, nicht jedoch durch Akt [120].

In unserer Arbeit konnten wir in der HL-1-Monokultur ebenfalls keine intranschämische Aktivierung von Akt unter Ischämie und/oder Kühlung feststellen. Bei der statistischen Auswertung zeigte sich sogar eine reduzierte Aktivierung von Akt in der gekühlten Ischämiegruppe für den 5h-Messzeitpunkt. Shao et al. konnte dagegen in einem Modell mit primären Mauskardiomyozyten einen Anstieg von p-Akt durch intranschämische Hypothermie (32°C) mittels Western-Blot-Analyse messen. Die protektiven Eigenschaften der Hypothermie konnten durch Inhibition von Akt blockiert werden. [122] Akt ist ein Downstream-Effektormolekül von PI3K in der gleichnamigen Signalkaskade [78]. In der Studie von Mochizuki et al. wurde an isolierten Rattenherzen der Einfluss einer 30-minütigen globalen Ischämie und Kühlung untersucht. Sie konnten zwar zeigen, dass hypotherme Kardioprotektion durch eine Hochregulation von PI3K vermittelt wurde, jedoch wurde diese erst in der Reperusionsphase gemessen. [123] So lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass durch Hypothermie der PI3K/Akt-Pathway während der Ischämie nicht induziert wird. Möglicherweise findet dies erst in der Reperusionsphase statt.

Weiter wurde untersucht, ob die HO-1 im Rahmen der Kardioprotektion durch Hypothermie beteiligt ist. In einer Studie von Ning et al. an isolierten Rattenherzen mit kardioplegem Herzstillstand über 120 Minuten zeigte sich bei prä- und intranschämischer Kühlung auf 30 °C ein supprimierter Metabolismus, aber gleichzeitig eine erhöhte Expression von HO-1 und Akt. Die Kühlung bei 34 °C mit Beginn der Kardioplegie zeigte diesen Effekt nicht. [81] Die Expression könnte also abhängig von der Tiefe der Hypothermie sein. In unserer Arbeit mit HL-1-Zellen zeigte sich keine vermehrte HO-1-Exprimierung unter Kühlung auf 33,5 °C. In den Blots war jedoch eine verminderte Exprimierung der HO-1 unter simulierter Ischämie unabhängig von der Temperatur erkennbar. Nach fünf Stunden unterschieden sich dabei die beiden Ischämiegruppen jeweils von der Kontrolle statistisch signifikant. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, konnte Kacimi et al. in primären Rattenkardiomyozyten messen, dass Hypoxie die HO-1 induzierte [124].

Insgesamt konnte mit der Untersuchung der drei potentiell antiapoptotischen Proteine eine mögliche Aktivierung von ERK durch intraischämische Hypothermie gezeigt werden.

### 5.3 Pharmakologische Intervention und Hypothermie

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnten wir *in vitro* zeigen, dass intraischämische Hypothermie einen kardioprotektiven Effekt hatte. Am Patienten hingegen erweist sich die physikalisch applizierte Kühlung als eingeschränkt effektiv und geht mit unerwünschten Nebenwirkungen einher [33, 87]. Eine medikamentöse Behandlung könnte in Bezug auf den zytoprotektiven Effekt und das Nebenwirkungsprofil überlegen sein. Daher sollten im zweiten Teil der Arbeit Pharmaka aus der Gruppe der Opiode (DADLE) und der Cannabinoide (WIN) in unserem Ischämiemodell auf ihre Wirkung geprüft werden. Dabei sollte geklärt werden, ob sich die durch TH vermittelte Kardioprotektion medikamentös imitieren lässt. Außerdem wurde die Kombination von Kühlung und pharmakologischer Behandlung untersucht.

#### 5.3.1 DADLE

Wie bereits in Kap. 1.7.1 erläutert wurde, ist DADLE das stabile Analogon des endogenen Opioids Enkephalin und bindet an den  $\delta$ -Opioidrezeptor (DOR) [88]. DOR wird in HL-1 Zellen sowie am humanen Myokard exprimiert [89, 125]. In mehreren Studien konnte ein kardioprotektiver Effekt der Behandlung mit DADLE am Myokard festgestellt werden [126-128].

Seymour et al. zeigte, dass die Präkonditionierung mit DADLE vor Ischämie an HL-1 Zellen zu einer signifikant verminderten LDH-Ausschüttung führte. Dabei wurde mit 10  $\mu$ M für zehn Minuten inkubiert und fünf Minuten vor Ischämie gewaschen. [129] In unseren Versuchen wurde in Anlehnung daran eine dezimale Verdünnungsreihe von 1 nM bis 100  $\mu$ M auf Zytotoxizität und Wirkung während simulierter Ischämie getestet. Wir entschieden uns gegen eine Präkonditionierung, da die Behandlung mit den Daten zur intraischämischen Kühlung aus dem ersten Teil der Arbeit verglichen werden sollten. Aus technischen Gründen ließ sich jedoch während der Ischämie kein Mediumwechsel oder Hinzufügen des Pharmakons nach drei Stunden (in Anlehnung

an das Kühlungsprotokoll) realisieren, sodass wir die Inkubation über die gesamte Zeit der Ischämie wählten.

Nach sechs Stunden zeigte keine der Konzentrationen eine toxische Wirkung. Nach 30 Stunden zeigte sich in der Kontrollgruppe eine Zellschädigung in Form eines vermehrten LDH-Übertrittes in das Zellmedium. Die Zellen befanden sich sechs Stunden in DMEM statt des idealen Claycombmediums. Es wurde anschließend gewechselt und für 24 weitere Stunden noradrenalinfreies Claycombmedium verwendet. Es ist beschrieben, dass HL-1 Zellen bis zu 72 Stunden mit DMEM ohne weitere Zusätze versorgt werden können ohne den Verlust eines differenzierten Phänotyps [103]. Daher lässt sich der LDH-Anstieg nach 30 Stunden durch die Wahl des Mediums nicht erklären. Möglicherweise hatte die Schädigung ihre Ursache darin, dass die Zellen zu diesem Zeitpunkt die volle Konfluenz überschritten hatten und keine optimalen räumlichen Bedingungen mehr vorfanden. DADLE wirkte im Bereich 1 nM – 100 nM dieser Schädigung offenbar entgegen. Obwohl das Medium, das DADLE enthielt, nach sechs Stunden gegen ein wirkstofffreies Zellkulturmedium getauscht wurde, scheint es in der Nachbeobachtungsphase zu einer verzögerten zytoprotektiven Wirkung gekommen zu sein.

Im Versuch zur Dosisfindung zeigten sich nach sechs Stunden simulierter Ischämie die Dosierungen 10 nM, 100 nM sowie 10 µM und nach 30 Stunden 1 nM als vorteilhaft. So wurde in Zusammenschau mit den Ergebnissen aus dem Toxizitätsversuch für die weitere Testung die Dosierung auf 1 – 100 nM eingegrenzt. Hierbei wurde das Pharmakon allein und in Kombination mit Kühlung getestet. Mit Ausnahme der mit 100 nM DADLE behandelten und zusätzlich gekühlten Gruppe erwies sich die pharmakologische Intervention unabhängig der Temperatur protektiv. So konnten wir *in vitro* zeigen, dass DADLE eine potentielle Behandlungsoption bei I/R-Pathologien sein könnte. Die Behandlung mit dem Pharmakon scheint sogar effektiver zu sein als die Kühlung. Es konnte kein synergistischer Effekt durch DADLE und zusätzliche Hypothermie-Anwendung nachgewiesen werden.

### 5.3.2 WIN55,212-2

Die Wirkung des synthetischen Cannabinoid-Rezeptor-Agonist WIN bei Ischämie wurde bisher vor allem in *in situ* Tiermodellen untersucht [97, 130]. Xiao et al. zeigte



2020 an der Ratte, dass die Induktion von Hypothermie mit 1 mg/kg/h WIN nach VF und anschließender Wiederbelebung in ihrem kardioprotektivem Effekt einer physikalischen Kühlung überlegen war [130]. In der Studie von Di Filippo et al. von 2004 führte die Präkonditionierung mit 3,5 mg/kg WIN vermittelt zu einer Reduktion der Infarktgröße in einem Infarktmodell an der Maus *in situ* [97].

In unserer Arbeit wurde zuerst die Zytotoxizität von WIN geprüft. Wie bereits in Kapitel 5.3.1 beschrieben, waren die Zellen in der Kontrollgruppe nach 30 Stunden signifikant stärker geschädigt als nach sechs Stunden.

Nach der Behandlung mit WIN konnte in den Überständen nach 30 Stunden für alle Konzentrationen eine signifikant geringere LDH-Ausschüttung beobachtet werden im Vergleich zur Kontrolle. Es wäre möglich, dass WIN hier eine verzögerte protektive Wirkung zeigt, obwohl der Wirkstoff nicht mehr im Medium präsent war. Andererseits könnte es auch die Folge einer Schädigung durch das Pharmakon in den ersten sechs Stunden sein. Im Bereich von sechs Stunden gab in allen Konzentrationen tendenziell eine höhere Zytotoxizität von WIN, die für 1 nM und 10 µM auch das Signifikanzniveau erreichte. Es wäre es denkbar, dass ein Teil der Zellpopulation durch die Behandlung mit WIN geschädigt wurde, die Adhärenz verlor und nach sechs Stunden bei Mediumwechsel abgewaschen wurde. Dadurch kam es dann möglicherweise zu einer Verminderung der Zellzahl in den pharmakologisch behandelten Gruppen, was sich auf die Höhe der LDH-Ausschüttung in den folgenden 24 Stunden ausgewirkt haben könnte.

In den Versuchen zur Dosisfindung zeigte die intraischämische Anwendung von WIN nach sechs Stunden in keiner Dosierung einen protektiven Effekt. Die Dosisstärken 1 nM, 10 nM und 100 nM bewirkten sogar eine größere Schädigung als Ischämie ohne Pharmakon. Hier decken sich die Ergebnisse des Versuches nicht mit denen aus dem Versuch zur pharmakologischen Intervention plus Hypothermie. Wenn man die Ergebnisse der beiden Versuche (Abb. 13 und 14) betrachtet, fällt auf, dass die unbehandelten Ischämiegruppen in unterschiedlichem Maße geschädigt wurden, obwohl jeweils die gleiche Methode sowie Darstellung gewählt wurde. Im Nachgang ließ sich die Ursache dafür nicht eruieren. Die Zellen waren korrekt versorgt und passagiert worden und zeigten keinen Hinweis auf eine Kontamination in der Mikroskopie auf. Die Versuche wurden exakt nach Protokoll durchgeführt. Nach 30

Stunden zeigte sich für 100 nM WIN eine signifikant niedrigere LDH-Ausschüttung. Damit wiederholt sich hier ein möglicher verzögerter Effekt im Sinne der Ergebnisse des Toxizitätsversuches. Für 100 nM WIN in Kombination mit Ischämie zeigte sich nach sechs Stunden eine stärkere Schädigung als bei bloßer Ischämie. Daher liegt die Vermutung nahe, dass der verminderte LDH-Spiegel im Medium nach 30 Stunden durch einen vorherigen Zelluntergang erklärbar sein könnte.

Im letzten Schritt der pharmakologischen Versuche wurde die Dosierung von WIN auf 100 nM – 10 µM eingegrenzt. Hier zeigte sich ein gleichrangiger, protektiver Effekt für Hypothermie ohne Pharmakon sowie für 100nM. Interessanterweise hob die Behandlung mit 100nM WIN bei gleichzeitiger Hypothermie diesen Effekt auf. In Kombination mit Kühlung hatte WIN also keinen protektiven oder synergistischen Effekt. Eine Kombination aus Hypothermie und Behandlung mit 10 µM WIN führte sogar zu einer stärkeren Schädigung als bei der unbehandelten, hypothermen Ischämiegruppe. Es wäre denkbar, dass die kardioprotektiven Wirkungen von WIN und von Hypothermie durch unterschiedliche Signalwege vermittelt werden, die in der Kombination miteinander interferieren.

#### 5.4 Limitationen des Modells

Bei der Literaturrecherche wird deutlich, wie verschieden die einzelnen I/R-Modelle sind: immortalisierte Zelllinien, primäre Kardiomyozyten, isolierte Herzen oder *in situ* Tiermodelle verschiedener Spezies. Vielversprechende Effekte im Zell- oder Tiermodell lassen sich jedoch nicht immer auf den Menschen übertragen. WIN beispielsweise wirkt sowohl auf CB1 als auch CB2, wobei die Kardioprotektion vor allem durch CB2 vermittelt wird [97]. Eine Aktivierung des CB1-Rezeptors geht jedoch mit einem Blutdruckabfall, Tachykardie, erhöhtem Puls und Myokardinfarkt einher [131], was erhebliche Komplikationen mit sich bringen könnte.

Das Herz setzt sich aus einem komplexen, sich gegenseitig beeinflussenden System verschiedener Zelltypen zusammen. Kardiomyozyten machen dabei nur 25 – 35 % des Myokards aus. Nicht-Kardiomyozyten sind beispielsweise Endothelzellen, Fibroblasten, Telozyten, glatte Muskelzellen, Perizyten, Adipozyten, Leukozyten, Mastzellen, Makrophagen und andere immunologisch aktive Zellen. [132] Ein

Zellmodell aus Kardiomyozyten in Monokultur kann damit auch nur einen Einblick in die Stoffwechselfvorgänge eines isolierten Zelltyps geben.

Bei den HL-1-Zellen handelt es sich um immortalisierte Tumorzellen aus Mäusen. Zwar sind diese Zellen adulten Kardiomyozyten in ihrer Zellausstattung sehr ähnlich und verfügen sogar über die Fähigkeit im Zellverbund synchron zu kontrahieren, dennoch gibt es Unterschiede, die die Ergebnisse in Ihrer Übertragbarkeit limitieren. HL-1-Zellen haben eine höhere Ischämietoleranz verglichen mit Kardiomyozyten *in vivo*, da sie als Tumorzellen an reduzierte Versorgungsbedingungen angepasst sind. Im Versuchsgefäß ordnen sie sich als einlagige Zellschicht an. So müssen sie nicht gegen Widerstand kontrahieren. Es ist davon auszugehen, dass sie daher einen verminderten Nährstoffbedarf haben.

Auch unterscheidet sich der Energiestoffwechsel der HL-1-Zellen von humanen Kardiomyozyten, bei denen ATP überwiegend aus freien Fettsäuren gewonnen wird [6]. Die Phosphorylierung geschieht beim Menschen überwiegend durch die Kreatinkinase unter aeroben Bedingungen. Bei HL-1-Zellen spielt die Kreatinkinase kaum eine Rolle, hier findet die ATP-Gewinnung durch Glykolyse statt, wobei vor allem die Hexokinase die oxidative Phosphorylierung übernimmt. [133, 134]

Während der Ischämie kommt es zu einem pH-Wert-Abfall. Das für die Versuche verwendete Zellmedium DMEM enthält jedoch Natriumhydrogencarbonat als Puffer. Somit wird möglicherweise auch die intraischämische Laktatazidose gepuffert. In der Arbeit von Andersen et al. führte bei HL-1-Zellen die Absenkung des pH-Wertes von 7,4 auf 6,0 zu einer reduzierten Caspase-3-Aktivierung. Möglicherweise werden durch ein saures pH-Milieu Apoptosevorgänge vermindert. Das Absenken des pH-Wertes auf 6,0 führte in der genannten Publikation jedoch nicht zu einer Reduktion von nekrotischem Zellschaden. [135]

In dieser Forschungsarbeit wurde lediglich die Schädigung während der Ischämie betrachtet. Reperfusion und Wiedererwärmung spielen in der klinischen Situation ebenso eine entscheidende Rolle. Wenn das Myokard während der Ischämie geschützt wird, ist aber davon auszugehen, dass auch der Reperfusionsschaden reduziert ist. Pathophysiologische Vorgänge während der Wiedererwärmung können eventuell durch eine langsame Wiedererwärmung und eine anschließende Verhinderung von Fieber reduziert werden.

### 5.5 Überlegungen zu Tiefe und Anwendungszeitpunkt der Hypothermie

Welche Patientengruppen von milder oder moderater Hypothermie oder kontrollierter Normothermie profitiert, ist Gegenstand der aktuellen Diskussion in der Wissenschaft. Bei der Anwendung von TH nach akutem Myokardinfarkt scheint es eine Korrelation zwischen Zieltemperatur und Infarktgröße zu geben. Chien et al. zeigten beispielsweise in einem Modell mit Kaninchenherzen, dass in einem Bereich von 35 – 42 °C je 1 °C Temperaturreduktion zu einer Verringerung um 10 % der Infarktgröße führte. [58]

Die Nebenwirkungen von TH nehmen mit Absinken der Körperkerntemperatur zu und beinhalten Zittern, metabolische Störungen, Herzrhythmusstörungen, Bradykardien, Blutdruckanstieg und Blutungsrisiken [85]. Bei Temperaturen unter 30 °C besteht die Gefahr der ventrikulären Fibrillation. Spontane ventrikuläre Fibrillation wird in den meisten Säugetieren bei Körperkerntemperatur < 28 °C induziert. [84] Polderman et al. beschrieben aber auch, dass beispielsweise Zittern leichter bei Temperaturen von 32 – 33 °C zu kontrollieren sei als bei 36 °C. Im TTM-Trial waren so durchschnittlich mehr Medikamente bei 36 °C nötig, um Zittern zu kontrollieren. [136] Bei der Wahl der optimalen Zieltemperatur gilt es folglich die protektiven Eigenschaften der Hypothermie mit den unerwünschten Nebenwirkungen abzuwägen.

Es erscheint logisch den Zeitpunkt der Initiierung des TH/TTM möglichst früh zu wählen, um von den protektiven Eigenschaften wie reduziertem Stoffwechsel und Energieverbrauch, sowie Hochregulierung antiapoptotischer Proteine zu profitieren. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass intraischämische Hypothermie kardioprotektiv wirkt. Für eine Kühlung mit Beginn der Reperfusion zeigte sich kein protektiver Effekt. [111, 137] Auch Shao et al. konstatierten, dass TH vor Reperfusion einen protektiven Effekt hat, während eine spätere Aktivierung weniger protektiv wirkt [122]. Der Zeitpunkt der Kühlung scheint also von großer Bedeutung zu sein. An Patienten mit außerklinischem HKS zeigten die Studien von Bernard et al. jedoch keine Überlegenheit einer frühen Kühlung [138, 139]. Bei der außerklinischen Anwendung ist es möglicherweise schwieriger eine exakte Zieltemperatur einzustellen und zu halten. Auch scheint ein streng normothermes TTM ähnlich anspruchsvoll wie ein hypothermes TTM zu sein [136]. Hier bedarf es weiterer Verbesserung der

Kühlungsmethoden, um ein schnelles Erreichen der Zieltemperatur und ein stabiles TTM zu gewährleisten.

### 5.6 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von intranschämischer, moderater TH sowie zweier Pharmaka auf die Schädigung durch eine simulierte Ischämie an immortalisierten Mausekardiomyozyten untersucht.

Im ersten Teil der Arbeit konnten wir zeigen, dass TH zu einer Reduktion des Zellschadens und zu einer Verbesserung der mitochondrialen Aktivität führt. Es konnte zudem weniger Apoptose in den gekühlten Zellen festgestellt werden, wobei möglicherweise die Aktivierung von ERK mitverantwortlich ist. TH ist also eine vielversprechende Therapie, um das Myokard bei außerklinischem HKS zu schützen. Eine frühe Kühlung vor Reperfusion scheint dabei besonders vorteilhaft für Gewebeerhalt und kardiale Funktion zu sein.

Im zweiten Teil konnte gezeigt werden, dass das Opioid DADLE und das Cannabinoid WIN einen ähnlich positiven Effekt auf das Zellüberleben haben wie TH. Bei der Kombination von WIN mit TH wurde jedoch die Aufhebung der schützenden Wirkung beobachtet. Insgesamt zeigte sich hierbei ein interessanter Ansatz wie man Hypothermie zukünftig durch Pharmaka ersetzen könnte, mit dem Ziel, die Morbidität und Mortalität von I/R-Pathologien, wie dem außerklinischen HKS, zu senken.

Die Übertragung vom Labor ans Patientenbett ist jedoch nur limitiert möglich und es bedarf weiterer Forschung.

Um die genauen Wirkmechanismen der Kardioprotektion durch DADLE und WIN zu erforschen, sollten zugrundeliegende pro- und antiapoptotische Signalkaskaden auf Proteinebene und Genexpression mittels Western Blot sowie Kernisolierung und Real-Time PCR untersucht werden. Zuerst wäre dabei eine Untersuchung der Aktivierung von ERK durch DADLE oder WIN in unserem Schädigungsmodell eine logische Fortführung der vorliegenden Forschungsarbeit.

Maslov et al. teilen protektive Signale im Rahmen der ischämischen Präkonditionierung in Trigger, die protektive Zellkaskaden anstoßen, und Mediatoren, die ihre Schutzfunktion während der Reperfusion entfalten, ein. Sie gehen davon aus, dass Trigger vor Ischämie angewendet werden müssen, während Mediatoren lediglich

kurz vor Reperfusion eingesetzt werden müssen, um eine protektive Wirkung zu erzielen. [74] In unserem laborexperimentellen Setting wurde DADLE über die gesamte Zeit der Ischämie angewandt und zeigte eine protektive Wirkung, die dem Effekt der Hypothermie entsprach. Es wäre von Bedeutung in zukünftigen Studien zu untersuchen, ob es bei einem späteren Einsatz - analog zum klinischen Setting bei einem außerklinischen HKS - ebenfalls eine kardioprotektive Wirkung gibt.

Darüber hinaus wäre ein nächster Schritt, die gewonnenen Erkenntnisse aus Versuchen mit der HL-1-Monokultur an primären Kardiomyozyten oder am isolierten Langendorff-Herz auf ihre Übertragbarkeit zu prüfen.

## Bibliographie

1. Perkins, G.D., A.J. Handley, R.W. Koster, M. Castren, M.A. Smyth, T. Olasveengen, K.G. Monsieurs, V. Raffay, J.T. Grasner, V. Wenzel, G. Ristagno, J. Soar, s. Adult basic life, and C. automated external defibrillation section, *European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2015: Section 2. Adult basic life support and automated external defibrillation*. Resuscitation, 2015. **95**: p. 81-99.
2. Sasson, C., M.A. Rogers, J. Dahl, and A.L. Kellermann, *Predictors of survival from out-of-hospital cardiac arrest: a systematic review and meta-analysis*. Circ Cardiovasc Qual Outcomes, 2010. **3**(1): p. 63-81.
3. Frohlich, G.M., R.M. Lyon, C. Sasson, T. Crake, M. Whitbread, A. Indermuehle, A. Timmis, and P. Meier, *Out-of-hospital cardiac arrest -optimal management*. Curr Cardiol Rev, 2013. **9**(4): p. 316-24.
4. Soar, J., C.W. Callaway, M. Aibiki, B.W. Bottiger, S.C. Brooks, C.D. Deakin, M.W. Donnino, S. Drajer, W. Kloeck, P.T. Morley, L.J. Morrison, R.W. Neumar, T.C. Nicholson, J.P. Nolan, K. Okada, B.J. O'Neil, E.F. Paiva, M.J. Parr, T.L. Wang, J. Witt, and C. Advanced Life Support Chapter, *Part 4: Advanced life support: 2015 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science with Treatment Recommendations*. Resuscitation, 2015. **95**: p. e71-120.
5. Efendijev, I., D. Folger, R. Raj, M. Reinikainen, P.T. Pekkarinen, E. Litonius, and M.B. Skrifvars, *Outcomes and healthcare-associated costs one year after intensive care-treated cardiac arrest*. Resuscitation, 2018. **131**: p. 128-134.
6. Giordano, F.J., *Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 500-8.
7. Taha, M. and G.D. Lopaschuk, *Alterations in energy metabolism in cardiomyopathies*. Ann Med, 2007. **39**(8): p. 594-607.
8. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 92-100.
9. Murphy, E. and C. Steenbergen, *Ion transport and energetics during cell death and protection*. Physiology (Bethesda), 2008. **23**: p. 115-23.
10. Perricone, A.J. and R.S. Vander Heide, *Novel therapeutic strategies for ischemic heart disease*. Pharmacol Res, 2014. **89**: p. 36-45.
11. Tissier, R., M. Chenoune, S. Pons, R. Zini, L. Darbera, F. Lidouren, B. Ghaleh, A. Berdeaux, and D. Morin, *Mild hypothermia reduces per-ischemic reactive oxygen species production and preserves mitochondrial respiratory complexes*. Resuscitation, 2013. **84**(2): p. 249-55.
12. Nolan, J.P., R.W. Neumar, C. Adrie, M. Aibiki, R.A. Berg, B.W. Bottiger, C. Callaway, R.S. Clark, R.G. Geocadin, E.C. Jauch, K.B. Kern, I. Laurent, W.T. Longstreth, R.M. Merchant, P. Morley, L.J. Morrison, V. Nadkarni, M.A. Peberdy, E.P. Rivers, A. Rodriguez-Nunez, F.W. Sellke, C. Spaulding, K. Sunde, and T.V. Hoek, *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): p. 350-79.
13. Soar, J. and J.P. Nolan, *Mild hypothermia for post cardiac arrest syndrome*. BMJ, 2007. **335**(7618): p. 459-60.
  14. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. N Engl J Med, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
  15. Kloner, R.A. and R.B. Jennings, *Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1*. Circulation, 2001. **104**(24): p. 2981-9.
  16. Zhou, T., C.C. Chuang, and L. Zuo, *Molecular Characterization of Reactive Oxygen Species in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 864946.
  17. Sanada, S., I. Komuro, and M. Kitakaze, *Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(5): p. H1723-41.
  18. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion*. J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**(4): p. 339-41.
  19. Polderman, K.H., *Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia*. Crit Care Med, 2009. **37**(7 Suppl): p. S186-202.
  20. Nolan, J.P., C. Sandroni, B.W. Bottiger, A. Cariou, T. Cronberg, H. Friberg, C. Genbrugge, K. Haywood, G. Lilja, V.R.M. Moulart, N. Nikolaou, T. Mariero Olasveengen, M.B. Skrifvars, F. Taccone, and J. Soar, *European Resuscitation Council and European Society of Intensive Care Medicine Guidelines 2021: Post-resuscitation care*. Resuscitation, 2021. **161**: p. 220-269.
  21. Meyer, J.S. and J. Hunter, *Effects of hypothermia on local blood flow and metabolism during cerebral ischemia and hypoxia*. J Neurosurg, 1957. **14**(2): p. 210-27.
  22. Marchand, P. and J.C. Allan, *An experimental study of the effect of hypothermia on the heart and brain*. S Afr J Med Sci, 1956. **21**(3-4): p. 127-41.
  23. Rosomoff, H.L. and D.A. Holaday, *Cerebral blood flow and cerebral oxygen consumption during hypothermia*. Am J Physiol, 1954. **179**(1): p. 85-8.
  24. Williams, G.R., Jr. and F.C. Spencer, *The clinical use of hypothermia following cardiac arrest*. Ann Surg, 1958. **148**(3): p. 462-8.
  25. Benson, D.W., G.R. Williams, Jr., F.C. Spencer, and A.J. Yates, *The use of hypothermia after cardiac arrest*. Anesth Analg, 1959. **38**: p. 423-8.
  26. Thauer, R. and W. Brendel, Prog Surg, 1962. **2**: p. 73-271.
  27. Gilbert, M., R. Busund, A. Skagseth, P.A. Nilsen, and J.P. Solbo, *Resuscitation from accidental hypothermia of 13.7 degrees C with circulatory arrest*. Lancet, 2000. **355**(9201): p. 375-6.
  28. Hypothermia after Cardiac Arrest Study, G., *Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest*. N Engl J Med, 2002. **346**(8): p. 549-56.



29. Bernard, S.A., T.W. Gray, M.D. Buist, B.M. Jones, W. Silvester, G. Gutteridge, and K. Smith, *Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia*. N Engl J Med, 2002. **346**(8): p. 557-63.
30. International Liaison Committee on, R., *2005 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science with Treatment Recommendations. Part 8: Interdisciplinary topics*. Resuscitation, 2005. **67**(2-3): p. 305-14.
31. Nielsen, N., J. Wetterslev, T. Cronberg, D. Erlinge, Y. Gasche, C. Hassager, J. Horn, J. Hovdenes, J. Kjaergaard, M. Kuiper, T. Pellis, P. Stammet, M. Wanscher, M.P. Wise, A. Aneman, N. Al-Subaie, S. Boesgaard, J. Bro-Jeppesen, I. Brunetti, J.F. Bugge, C.D. Hingston, N.P. Juffermans, M. Koopmans, L. Kober, J. Langorgen, G. Lilja, J.E. Moller, M. Rundgren, C. Rylander, O. Smid, C. Werer, P. Winkel, H. Friberg, and T.T.M.T. Investigators, *Targeted temperature management at 33 degrees C versus 36 degrees C after cardiac arrest*. N Engl J Med, 2013. **369**(23): p. 2197-206.
32. Lascarrou, J.B., H. Merdji, A. Le Gouge, G. Colin, G. Grillet, P. Girardie, E. Coupez, P.F. Dequin, A. Cariou, T. Boulain, N. Brule, J.P. Frat, P. Asfar, N. Pichon, M. Landais, G. Plantefeve, J.P. Quenot, J.C. Chakarian, M. Sirodot, S. Legriel, J. Letheulle, D. Thevenin, A. Desachy, A. Delahaye, V. Botoc, S. Vimeux, F. Martino, B. Giraudeau, J. Reignier, and C.-T. Group, *Targeted Temperature Management for Cardiac Arrest with Nonshockable Rhythm*. N Engl J Med, 2019. **381**(24): p. 2327-2337.
33. Dankiewicz, J., T. Cronberg, G. Lilja, J.C. Jakobsen, H. Levin, S. Ullen, C. Rylander, M.P. Wise, M. Oddo, A. Cariou, J. Belohlavek, J. Hovdenes, M. Saxena, H. Kirkegaard, P.J. Young, P. Pelosi, C. Storm, F.S. Taccone, M. Joannidis, C. Callaway, G.M. Eastwood, M.P.G. Morgan, P. Nordberg, D. Erlinge, A.D. Nichol, M.S. Chew, J. Hollenberg, M. Thomas, J. Bewley, K. Sweet, A.M. Grejs, S. Christensen, M. Haenggi, A. Levis, A. Lundin, J. During, S. Schmidbauer, T.R. Keeble, G.V. Karamasis, C. Schrag, E. Faessler, O. Smid, M. Otahal, M. Maggiorini, P.D. Wendel Garcia, P. Jaubert, J.M. Cole, M. Solar, O. Borgquist, C. Leithner, S. Abed-Maillard, L. Navarra, M. Annborn, J. Uden, I. Brunetti, A. Awad, P. McGuigan, R. Bjorkholt Olsen, T. Cassina, P. Vignon, H. Langeland, T. Lange, H. Friberg, N. Nielsen, and T.T.M.T. Investigators, *Hypothermia versus Normothermia after Out-of-Hospital Cardiac Arrest*. N Engl J Med, 2021. **384**(24): p. 2283-2294.
34. Moler, F.W., F.S. Silverstein, R. Holubkov, B.S. Slomine, J.R. Christensen, V.M. Nadkarni, K.L. Meert, A.E. Clark, B. Browning, V.L. Pemberton, K. Page, S. Shankaran, J.S. Hutchison, C.J. Newth, K.S. Bennett, J.T. Berger, A. Topjian, J.A. Pineda, J.D. Koch, C.L. Schleien, H.J. Dalton, G. Ofori-Amanfo, D.M. Goodman, E.L. Fink, P. McQuillen, J.J. Zimmerman, N.J. Thomas, E.W. van der Jagt, M.B. Porter, M.T. Meyer, R. Harrison, N. Pham, A.J. Schwarz, J.E. Nowak, J. Alten, D.S. Wheeler, U.S. Bhalala, K. Lidsky, E. Lloyd, M. Mathur, S. Shah, T. Wu, A.A. Theodorou, R.C. Sanders, Jr., J.M. Dean, and T.T. Investigators, *Therapeutic hypothermia after out-of-hospital cardiac arrest in children*. N Engl J Med, 2015. **372**(20): p. 1898-908.
35. Moler, F.W., F.S. Silverstein, R. Holubkov, B.S. Slomine, J.R. Christensen, V.M. Nadkarni, K.L. Meert, B. Browning, V.L. Pemberton, K. Page, M.R. Gildea, B.R. Scholefield, S. Shankaran, J.S. Hutchison, J.T. Berger, G. Ofori-

- Amanfo, C.J. Newth, A. Topjian, K.S. Bennett, J.D. Koch, N. Pham, N.K. Chanani, J.A. Pineda, R. Harrison, H.J. Dalton, J. Alten, C.L. Schleien, D.M. Goodman, J.J. Zimmerman, U.S. Bhalala, A.J. Schwarz, M.B. Porter, S. Shah, E.L. Fink, P. McQuillen, T. Wu, S. Skellett, N.J. Thomas, J.E. Nowak, P.B. Baines, J. Pappachan, M. Mathur, E. Lloyd, E.W. van der Jagt, E.L. Dobyms, M.T. Meyer, R.C. Sanders, Jr., A.E. Clark, J.M. Dean, and T.T. Investigators, *Therapeutic Hypothermia after In-Hospital Cardiac Arrest in Children*. *N Engl J Med*, 2017. **376**(4): p. 318-329.
36. Lin, J.J., C.Y. Lin, S.H. Hsia, H.S. Wang, M.C. Chiang, K.L. Lin, and C.N.S.G. i, *72-h therapeutic hypothermia improves neurological outcomes in paediatric asphyxial out-of-hospital cardiac arrest-An exploratory investigation*. *Resuscitation*, 2018. **133**: p. 180-186.
37. Buick, J.E., C. Wallner, R. Aickin, P.A. Meaney, A. de Caen, I. Maconochie, M.B. Skrifvars, M. Welsford, and F. International Liaison Committee on Resuscitation Pediatric Life Support Task, *Paediatric targeted temperature management post cardiac arrest: A systematic review and meta-analysis*. *Resuscitation*, 2019. **139**: p. 65-75.
38. Maconochie, I.K., R. Aickin, M.F. Hazinski, D.L. Atkins, R. Bingham, T.B. Couto, A.M. Guerguerian, V.M. Nadkarni, K.C. Ng, G.A. Nuthall, G.Y.K. Ong, A.G. Reis, S.M. Schexnayder, B.R. Scholefield, J.A. Tijssen, J.P. Nolan, P.T. Morley, P. Van de Voorde, A.L. Zaritsky, A.R. de Caen, and C. Pediatric Life Support, *Pediatric Life Support: 2020 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science With Treatment Recommendations*. *Resuscitation*, 2020. **156**: p. A120-A155.
39. Madar, J., C.C. Roehr, S. Ainsworth, H. Ersdal, C. Morley, M. Rudiger, C. Skare, T. Szczapa, A. Te Pas, D. Trevisanuto, B. Urlesberger, D. Wilkinson, and J.P. Wyllie, *European Resuscitation Council Guidelines 2021: Newborn resuscitation and support of transition of infants at birth*. *Resuscitation*, 2021. **161**: p. 291-326.
40. Shankaran, S., A.R. Laptook, R.A. Ehrenkranz, J.E. Tyson, S.A. McDonald, E.F. Donovan, A.A. Fanaroff, W.K. Poole, L.L. Wright, R.D. Higgins, N.N. Finer, W.A. Carlo, S. Duara, W. Oh, C.M. Cotten, D.K. Stevenson, B.J. Stoll, J.A. Lemons, R. Guillet, A.H. Jobe, H. National Institute of Child, and N. Human Development Neonatal Research, *Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(15): p. 1574-84.
41. Azzopardi, D.V., B. Strohm, A.D. Edwards, L. Dyet, H.L. Halliday, E. Juszczak, O. Kapellou, M. Levene, N. Marlow, E. Porter, M. Thoresen, A. Whitelaw, P. Brocklehurst, and T.S. Group, *Moderate hypothermia to treat perinatal asphyxial encephalopathy*. *N Engl J Med*, 2009. **361**(14): p. 1349-58.
42. Azzopardi, D., B. Strohm, N. Marlow, P. Brocklehurst, A. Deierl, O. Eddama, J. Goodwin, H.L. Halliday, E. Juszczak, O. Kapellou, M. Levene, L. Linsell, O. Omar, M. Thoresen, N. Tusor, A. Whitelaw, A.D. Edwards, and T.S. Group, *Effects of hypothermia for perinatal asphyxia on childhood outcomes*. *N Engl J Med*, 2014. **371**(2): p. 140-9.
43. Jacobs, S.E., M. Berg, R. Hunt, W.O. Tarnow-Mordi, T.E. Inder, and P.G. Davis, *Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013(1): p. CD003311.

44. Kariholu, U., P. Montaldo, T. Markati, P.J. Lally, R. Pryce, J. Teiserskas, N. Liow, V. Oliveira, A. Soe, S. Shankaran, and S. Thayyil, *Therapeutic hypothermia for mild neonatal encephalopathy: a systematic review and meta-analysis*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2020. **105**(2): p. 225-228.
45. van der Worp, H.B., E.S. Sena, G.A. Donnan, D.W. Howells, and M.R. Macleod, *Hypothermia in animal models of acute ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis*. Brain, 2007. **130**(Pt 12): p. 3063-74.
46. Wu, T.C. and J.C. Grotta, *Hypothermia for acute ischaemic stroke*. Lancet Neurol, 2013. **12**(3): p. 275-84.
47. Geurts, M., J. Petersson, M. Brizzi, S. Olsson-Hau, G.J. Luijckx, A. Algra, D.W. Dippel, L.J. Kappelle, and H.B. van der Worp, *COOLIST (Cooling for Ischemic Stroke Trial): A Multicenter, Open, Randomized, Phase II, Clinical Trial*. Stroke, 2017. **48**(1): p. 219-221.
48. Lyden, P., T. Hemmen, J. Grotta, K. Rapp, K. Ernstrom, T. Rzesiewicz, S. Parker, M. Concha, S. Hussain, S. Agarwal, B. Meyer, J. Jurf, I. Altafullah, R. Raman, and Collaborators, *Results of the ICTuS 2 Trial (Intravascular Cooling in the Treatment of Stroke 2)*. Stroke, 2016. **47**(12): p. 2888-2895.
49. Powers, W.J., A.A. Rabinstein, T. Ackerson, O.M. Adeoye, N.C. Bambakidis, K. Becker, J. Biller, M. Brown, B.M. Demaerschalk, B. Hoh, E.C. Jauch, C.S. Kidwell, T.M. Leslie-Mazwi, B. Ovbiagele, P.A. Scott, K.N. Sheth, A.M. Southerland, D.V. Summers, D.L. Tirschwell, and C. American Heart Association Stroke, *2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association*. Stroke, 2018. **49**(3): p. e46-e110.
50. Carney, N., A.M. Totten, C. O'Reilly, J.S. Ullman, G.W. Hawryluk, M.J. Bell, S.L. Bratton, R. Chesnut, O.A. Harris, N. Kissoon, A.M. Rubiano, L. Shutter, R.C. Tasker, M.S. Vavilala, J. Wilberger, D.W. Wright, and J. Ghajar, *Guidelines for the Management of Severe Traumatic Brain Injury, Fourth Edition*. Neurosurgery, 2017. **80**(1): p. 6-15.
51. Shaefi, S., A.M. Mittel, J.A. Hyam, M.D. Boone, C.C. Chen, and E.M. Kasper, *Hypothermia for severe traumatic brain injury in adults: Recent lessons from randomized controlled trials*. Surg Neurol Int, 2016. **7**: p. 103.
52. Mourvillier, B., F. Tubach, D. van de Beek, D. Garot, N. Pichon, H. Georges, L.M. Lefevre, P.E. Bollaert, T. Boulain, D. Luis, A. Cariou, P. Girardie, R. Chelha, B. Megarbane, A. Delahaye, L. Chalumeau-Lemoine, S. Legriél, P. Beuret, F. Brivet, C. Bruel, F. Camou, D. Chatellier, P. Chillet, B. Clair, J.M. Constantin, A. Duguet, R. Galliot, F. Bayle, H. Hyvernats, K. Ouchenir, G. Plantefeve, J.P. Quenot, J. Richecoeur, C. Schwebel, M. Sirodot, M. Esposito-Farese, Y. Le Tulzo, and M. Wolff, *Induced hypothermia in severe bacterial meningitis: a randomized clinical trial*. JAMA, 2013. **310**(20): p. 2174-83.
53. Legriél, S., V. Lemiale, M. Schenck, J. Chelly, V. Laurent, F. Daviaud, M. Srairi, A. Hamdi, G. Geri, T. Rossignol, J. Hilly-Ginoux, J. Boisrame-Helms, B. Louart, I. Malissin, N. Mongardon, B. Planquette, M. Thirion, S. Merceron, E. Canet, F. Pico, Y.R. Tran-Dinh, J.P. Bedos, E. Azoulay, M. Resche-Rigon, A. Cariou, and H.S. Group, *Hypothermia for Neuroprotection in Convulsive Status Epilepticus*. N Engl J Med, 2016. **375**(25): p. 2457-2467.

54. Skulec, R., T. Kovarnik, G. Dostalova, J. Kolar, and A. Linhart, *Induction of mild hypothermia in cardiac arrest survivors presenting with cardiogenic shock syndrome*. Acta Anaesthesiol Scand, 2008. **52**(2): p. 188-94.
55. Cariou, A., J.F. Payen, K. Asehnoune, G. Audibert, A. Botte, O. Brissaud, G. Debaty, S. Deltour, N. Deye, N. Engrand, G. Francony, S. Legriel, B. Levy, P. Meyer, J.C. Orban, S. Renolleau, B. Vigue, L. De Saint Blanquat, C. Mathien, L. Velly, F. Societe de Reanimation de Langue, t.G.F.d.R.e.U.P.t.S.F. the Societe Francaise d'Anesthesie et de Reanimation In conjunction with the Association de Neuro Anesthesie Reanimation de Langue Francaise, and N.-V. the Societe Francaise, *Targeted temperature management in the ICU: guidelines from a French expert panel*. Ann Intensive Care, 2017. **7**(1): p. 70.
56. Fan, Y., A.M. Zhang, Y.B. Xiao, Y.G. Weng, and R. Hetzer, *Warm versus cold cardioplegia for heart surgery: a meta-analysis*. Eur J Cardiothorac Surg, 2010. **37**(4): p. 912-9.
57. Haendchen, R.V., E. Corday, S. Meerbaum, M. Povzhitkov, J. Rit, and M.C. Fishbein, *Prevention of ischemic injury and early reperfusion derangements by hypothermic retroperfusion*. J Am Coll Cardiol, 1983. **1**(4): p. 1067-80.
58. Chien, G.L., R.A. Wolff, R.F. Davis, and D.M. van Winkle, *"Normothermic range" temperature affects myocardial infarct size*. Cardiovasc Res, 1994. **28**(7): p. 1014-7.
59. Duncker, D.J., C.L. Klassen, Y. Ishibashi, S.H. Herrlinger, T.J. Pavek, and R.J. Bache, *Effect of temperature on myocardial infarction in swine*. Am J Physiol, 1996. **270**(4 Pt 2): p. H1189-99.
60. Tissier, R., N. Couvreur, B. Ghaleh, P. Bruneval, F. Lidouren, D. Morin, R. Zini, A. Bize, M. Chenoune, M.F. Belair, C. Mandet, M. Douheret, J.L. Dubois-Rande, J.C. Parker, M.V. Cohen, J.M. Downey, and A. Berdeaux, *Rapid cooling preserves the ischaemic myocardium against mitochondrial damage and left ventricular dysfunction*. Cardiovasc Res, 2009. **83**(2): p. 345-53.
61. Dixon, S.R., R.J. Whitbourn, M.W. Dae, E. Grube, W. Sherman, G.L. Schaer, J.S. Jenkins, D.S. Baim, R.J. Gibbons, R.E. Kuntz, J.J. Popma, T.T. Nguyen, and W.W. O'Neill, *Induction of mild systemic hypothermia with endovascular cooling during primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2002. **40**(11): p. 1928-34.
62. O'Neill, W.W. and S.R. Dixon, *The year in interventional cardiology*. J Am Coll Cardiol, 2004. **43**(5): p. 875-90.
63. O'Neill, W.W., S.R. Dixon, and C.L. Grines, *The year in interventional cardiology*. J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(7): p. 1117-34.
64. Gotberg, M., G.K. Olivecrona, S. Koul, M. Carlsson, H. Engblom, M. Ugander, J. van der Pals, L. Algotsson, H. Arheden, and D. Erlinge, *A pilot study of rapid cooling by cold saline and endovascular cooling before reperfusion in patients with ST-elevation myocardial infarction*. Circ Cardiovasc Interv, 2010. **3**(5): p. 400-7.
65. Erlinge, D., M. Gotberg, I. Lang, M. Holzer, M. Noc, P. Clemmensen, U. Jensen, B. Metzler, S. James, H.E. Botker, E. Omerovic, H. Engblom, M. Carlsson, H. Arheden, O. Ostlund, L. Wallentin, J. Harnek, and G.K. Olivecrona, *Rapid endovascular catheter core cooling combined with cold saline as an adjunct to percutaneous coronary intervention for the treatment of acute myocardial infarction. The CHILL-MI trial: a randomized controlled study*

- of the use of central venous catheter core cooling combined with cold saline as an adjunct to percutaneous coronary intervention for the treatment of acute myocardial infarction.* J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(18): p. 1857-65.
66. Polderman, K.H., M. Noc, A. Beishuizen, H. Biermann, A.R. Girbes, G.W. Tully, D. Seidman, P.A. Albertsson, M. Holmberg, F. Sterz, and M. Holzer, *Ultrarapid Induction of Hypothermia Using Continuous Automated Peritoneal Lavage With Ice-Cold Fluids: Final Results of the Cooling for Cardiac Arrest or Acute ST-Elevation Myocardial Infarction Trial.* Crit Care Med, 2015. **43**(10): p. 2191-201.
  67. Nichol, G., W. Strickland, D. Shavelle, A. Maehara, O. Ben-Yehuda, P. Genereux, O. Dressler, R. Parvataneni, M. Nichols, J. McPherson, G. Barbeau, A. Laddu, J.A. Elrod, G.W. Tully, R. Ivanhoe, G.W. Stone, and V. Investigators, *Prospective, multicenter, randomized, controlled pilot trial of peritoneal hypothermia in patients with ST-segment- elevation myocardial infarction.* Circ Cardiovasc Interv, 2015. **8**(3): p. e001965.
  68. Noc, M., D. Erlinge, A.N. Neskovic, S. Kafedzic, B. Merkely, E. Zima, M. Fister, M. Petrovic, M. Cankovic, G. Veress, P. Laanmets, T. Pern, V. Vukcevic, V. Dedovic, B. Sredniawa, A. Swiatkowski, T.R. Keeble, J.R. Davies, A.M. Warenits, G. Olivecrona, J.Z. Peruga, M. Ciszewski, I. Horvath, I. Edes, G.G. Nagy, D. Aradi, and M. Holzer, *COOL AMI EU pilot trial: a multicentre, prospective, randomised controlled trial to assess cooling as an adjunctive therapy to percutaneous intervention in patients with acute myocardial infarction.* EuroIntervention, 2017. **13**(5): p. e531-e539.
  69. Noc, M., P. Laanmets, A.N. Neskovic, M. Petrovic, B. Stanetic, D. Aradi, R.G. Kiss, I. Ungi, B. Merkely, M. Hudec, P. Blasko, I. Horvath, J.R. Davies, V. Vukcevic, M. Holzer, B. Metzler, A. Witkowski, A. Erglis, M. Fister, G. Nagy, J. Bulum, I. Edes, J.Z. Peruga, B. Sredniawa, D. Erlinge, and T.R. Keeble, *A multicentre, prospective, randomised controlled trial to assess the safety and effectiveness of cooling as an adjunctive therapy to percutaneous intervention in patients with acute myocardial infarction: the COOL AMI EU Pivotal Trial.* EuroIntervention, 2021. **17**(6): p. 466-473.
  70. Kang, I.S., I. Fumiaki, and W.B. Pyun, *Therapeutic Hypothermia for Cardioprotection in Acute Myocardial Infarction.* Yonsei Med J, 2016. **57**(2): p. 291-7.
  71. Xia, P., Y. Liu, and Z. Cheng, *Signaling Pathways in Cardiac Myocyte Apoptosis.* Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 9583268.
  72. Vaux, D.L., G. Haeccker, and A. Strasser, *An evolutionary perspective on apoptosis.* Cell, 1994. **76**(5): p. 777-9.
  73. Thompson, C.B., *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.* Science, 1995. **267**(5203): p. 1456-62.
  74. Maslov, L.N., I. Khaliulin, Y. Zhang, A.V. Krylatov, N.V. Naryzhnaya, R. Mechoulam, L. De Petrocellis, and J.M. Downey, *Prospects for Creation of Cardioprotective Drugs Based on Cannabinoid Receptor Agonists.* J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2016. **21**(3): p. 262-72.
  75. Danno, S., H. Nishiyama, H. Higashitsuji, H. Yokoi, J.H. Xue, K. Itoh, T. Matsuda, and J. Fujita, *Increased transcript level of RBM3, a member of the glycine-rich RNA-binding protein family, in human cells in response to cold stress.* Biochem Biophys Res Commun, 1997. **236**(3): p. 804-7.

76. Wang, X., J.L. Martindale, Y. Liu, and N.J. Holbrook, *The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival*. Biochem J, 1998. **333 ( Pt 2)**: p. 291-300.
77. Dragasis, S., E. Bassiakou, N. Iacovidou, L. Papadimitriou, P. Andreas Steen, A. Gulati, and T. Xanthos, *The role of opioid receptor agonists in ischemic preconditioning*. Eur J Pharmacol, 2013. **720(1-3)**: p. 401-8.
78. Kunstle, G., J. Laine, G. Pierron, S. Kagami Si, H. Nakajima, F. Hoh, C. Roumestand, M.H. Stern, and M. Noguchi, *Identification of Akt association and oligomerization domains of the Akt kinase coactivator TCL1*. Mol Cell Biol, 2002. **22(5)**: p. 1513-25.
79. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129(7)**: p. 1261-74.
80. Gao, F., E. Gao, T.L. Yue, E.H. Ohlstein, B.L. Lopez, T.A. Christopher, and X.L. Ma, *Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation*. Circulation, 2002. **105(12)**: p. 1497-502.
81. Ning, X.H., E.Y. Chi, N.E. Buroker, S.H. Chen, C.S. Xu, Y.T. Tien, O.M. Hyyti, M. Ge, and M.A. Portman, *Moderate hypothermia (30 degrees C) maintains myocardial integrity and modifies response of cell survival proteins after reperfusion*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293(4)**: p. H2119-28.
82. Ryter, S.W., J. Alam, and A.M. Choi, *Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications*. Physiol Rev, 2006. **86(2)**: p. 583-650.
83. Shan, H., T. Li, L. Zhang, R. Yang, Y. Li, M. Zhang, Y. Dong, Y. Zhou, C. Xu, B. Yang, H. Liang, X. Gao, and H. Shan, *Heme oxygenase-1 prevents heart against myocardial infarction by attenuating ischemic injury-induced cardiomyocytes senescence*. EBioMedicine, 2019. **39**: p. 59-68.
84. Tissier, R., M. Chenoune, B. Ghaleh, M.V. Cohen, J.M. Downey, and A. Berdeaux, *The small chill: mild hypothermia for cardioprotection?* Cardiovasc Res, 2010. **88(3)**: p. 406-14.
85. Polderman, K.H. and I. Herold, *Therapeutic hypothermia and controlled normothermia in the intensive care unit: practical considerations, side effects, and cooling methods*. Crit Care Med, 2009. **37(3)**: p. 1101-20.
86. Lehot, J.J., H. Piriz, J. Villard, R. Cohen, and J. Guidollet, *Glucose homeostasis. Comparison between hypothermic and normothermic cardiopulmonary bypass*. Chest, 1992. **102(1)**: p. 106-11.
87. Lampe, J.W. and L.B. Becker, *Rapid cooling for saving lives: a bioengineering opportunity*. Expert Rev Med Devices, 2007. **4(4)**: p. 441-6.
88. Oeltgen, P.R., S.P. Nilekani, P.A. Nuchols, W.A. Spurrier, and T.P. Su, *Further studies on opioids and hibernation: delta opioid receptor ligand selectively induced hibernation in summer-active ground squirrels*. Life Sci, 1988. **43(19)**: p. 1565-74.
89. Bell, S.P., M.N. Sack, A. Patel, L.H. Opie, and D.M. Yellon, *Delta opioid receptor stimulation mimics ischemic preconditioning in human heart muscle*. J Am Coll Cardiol, 2000. **36(7)**: p. 2296-302.
90. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. Circulation, 1986. **74(5)**: p. 1124-36.

91. Karck, M., S. Tanaka, S.F. Bolling, A. Simon, T.P. Su, P.R. Oeltgen, and A. Haverich, *Myocardial protection by ischemic preconditioning and delta-opioid receptor activation in the isolated working rat heart*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2001. **122**(5): p. 986-92.
92. Chien, S., P.R. Oeltgen, J.N. Diana, X. Shi, S.P. Nilekani, and R. Salley, *Two-day preservation of major organs with autoperfusion multiorgan preparation and hibernation induction trigger. A preliminary report*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1991. **102**(2): p. 224-34.
93. Bolling, S.F., N.L. Tramontini, K.S. Kilgore, T.P. Su, P.R. Oeltgen, and H.H. Harlow, *Use of "natural" hibernation induction triggers for myocardial protection*. Ann Thorac Surg, 1997. **64**(3): p. 623-7.
94. Kevelaitis, E., J. Peynet, C. Mouas, J.M. Launay, and P. Menasche, *Opening of potassium channels: the common cardioprotective link between preconditioning and natural hibernation?* Circulation, 1999. **99**(23): p. 3079-85.
95. Montecucco, F. and V. Di Marzo, *At the heart of the matter: the endocannabinoid system in cardiovascular function and dysfunction*. Trends Pharmacol Sci, 2012. **33**(6): p. 331-40.
96. Weis, F., A. Beiras-Fernandez, R. Sodian, I. Kaczmarek, B. Reichart, A. Beiras, G. Schelling, and S. Kreth, *Substantially altered expression pattern of cannabinoid receptor 2 and activated endocannabinoid system in patients with severe heart failure*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **48**(6): p. 1187-93.
97. Di Filippo, C., F. Rossi, S. Rossi, and M. D'Amico, *Cannabinoid CB2 receptor activation reduces mouse myocardial ischemia-reperfusion injury: involvement of cytokine/chemokines and PMN*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(3): p. 453-9.
98. Bonfils, P.K., J. Reith, H. Hasseldam, and F.F. Johansen, *Estimation of the hypothermic component in neuroprotection provided by cannabinoids following cerebral ischemia*. Neurochem Int, 2006. **49**(5): p. 508-18.
99. Claycomb, W.C., N.A. Lanson, Jr., B.S. Stallworth, D.B. Egeland, J.B. Delcarpio, A. Bahinski, and N.J. Izzo, 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): p. 2979-84.
100. Carlson, D.L., E. Lightfoot, Jr., D.D. Bryant, S.B. Haudek, D. Maass, J. Horton, and B.P. Giroir, *Burn plasma mediates cardiac myocyte apoptosis via endotoxin*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(5): p. H1907-14.
101. McPherson, B.C. and Z. Yao, *Signal transduction of opioid-induced cardioprotection in ischemia-reperfusion*. Anesthesiology, 2001. **94**(6): p. 1082-8.
102. Nguyen, S.V. and W.C. Claycomb, *Hypoxia regulates the expression of the adrenomedullin and HIF-1 genes in cultured HL-1 cardiomyocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **265**(2): p. 382-6.
103. White, S.M., P.E. Constantin, and W.C. Claycomb, *Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(3): p. H823-9.
104. Barbiero, S., A. Aimo, V. Castiglione, A. Giannoni, G. Vergaro, C. Passino, and M. Emdin, *Healthy hearts at hectic pace: From daily life stress to abnormal cardiomyocyte function and arrhythmias*. Eur J Prev Cardiol, 2018. **25**(13): p. 1419-1430.

105. Ciccarelli, M., G. Santulli, V. Pascale, B. Trimarco, and G. Iaccarino, *Adrenergic receptors and metabolism: role in development of cardiovascular disease*. *Front Physiol*, 2013. **4**: p. 265.
106. Chan, L.L., D. Kuksin, D.J. Lavery, S. Saldi, and J. Qiu, *Morphological observation and analysis using automated image cytometry for the comparison of trypan blue and fluorescence-based viability detection method*. *Cytotechnology*, 2015. **67**(3): p. 461-73.
107. Decker, T. and M.L. Lohmann-Matthes, *A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity*. *J Immunol Methods*, 1988. **115**(1): p. 61-9.
108. Posimo, J.M., A.S. Unnithan, A.M. Gleixner, H.J. Choi, Y. Jiang, S.H. Pulugulla, and R.K. Leak, *Viability assays for cells in culture*. *J Vis Exp*, 2014(83): p. e50645.
109. Leers, M.P., W. Kolgen, V. Bjorklund, T. Bergman, G. Tribbick, B. Persson, P. Bjorklund, F.C. Ramaekers, B. Bjorklund, M. Nap, H. Jornvall, and B. Schutte, *Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis*. *J Pathol*, 1999. **187**(5): p. 567-72.
110. Nowakowski, A.B., W.J. Wobig, and D.H. Petering, *Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions*. *Metallomics*, 2014. **6**(5): p. 1068-78.
111. Tong, G., C. Walker, C. Buhner, F. Berger, O. Miera, and K.R. Schmitt, *Moderate hypothermia initiated during oxygen-glucose deprivation preserves HL-1 cardiomyocytes*. *Cryobiology*, 2015. **70**(2): p. 101-8.
112. Astrom-Olsson, K., L. Li, C.S. Olofsson, J. Boren, H. Ohlin, and L. Grip, *Impact of hypoxia, simulated ischemia and reperfusion in HL-1 cells on the expression of FKBP12/FKBP12.6 and intracellular calcium dynamics*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. **422**(4): p. 732-8.
113. Brady, N.R., A. Hamacher-Brady, and R.A. Gottlieb, *Proapoptotic BCL-2 family members and mitochondrial dysfunction during ischemia/reperfusion injury, a study employing cardiac HL-1 cells and GFP biosensors*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1757**(5-6): p. 667-78.
114. Shan, D., R.B. Marchase, and J.C. Chatham, *Overexpression of TRPC3 increases apoptosis but not necrosis in response to ischemia-reperfusion in adult mouse cardiomyocytes*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008. **294**(3): p. C833-41.
115. Zhao, Z.Q. and J. Vinten-Johansen, *Myocardial apoptosis and ischemic preconditioning*. *Cardiovasc Res*, 2002. **55**(3): p. 438-55.
116. Eguchi, Y., S. Shimizu, and Y. Tsujimoto, *Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis*. *Cancer Res*, 1997. **57**(10): p. 1835-40.
117. Shao, Z.H., W.T. Chang, K.C. Chan, K.R. Wojcik, C.W. Hsu, C.Q. Li, J. Li, T. Anderson, Y. Qin, L.B. Becker, K.J. Hamann, and T.L. Vanden Hoek, *Hypothermia-induced cardioprotection using extended ischemia and early reperfusion cooling*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. **292**(4): p. H1995-2003.



118. Shuja, F., M. Tabbara, Y. Li, B. Liu, M.U. Butt, G.C. Velmahos, M. DeMoya, and H.B. Alam, *Profound hypothermia decreases cardiac apoptosis through Akt survival pathway*. J Am Coll Surg, 2009. **209**(1): p. 89-99.
119. Beharier, O., S. Dror, S. Levy, J. Kahn, M. Mor, S. Etzion, D. Gitler, A. Katz, A.J. Muslin, A. Moran, and Y. Etzion, *ZnT-1 protects HL-1 cells from simulated ischemia-reperfusion through activation of Ras-ERK signaling*. J Mol Med (Berl), 2012. **90**(2): p. 127-38.
120. Yang, X., Y. Liu, X.M. Yang, F. Hu, L. Cui, M.R. Swingle, R.E. Honkanen, P. Soltani, R. Tissier, M.V. Cohen, and J.M. Downey, *Cardioprotection by mild hypothermia during ischemia involves preservation of ERK activity*. Basic Res Cardiol, 2011. **106**(3): p. 421-30.
121. Alakoski, T., J. Ulvila, R. Yrjola, L. Vainio, J. Magga, Z. Szabo, J.D. Licht, and R. Kerkela, *Inhibition of cardiomyocyte Sprouty1 protects from cardiac ischemia-reperfusion injury*. Basic Res Cardiol, 2019. **114**(2): p. 7.
122. Shao, Z.H., W.W. Sharp, K.R. Wojcik, C.Q. Li, M. Han, W.T. Chang, S. Ramachandran, J. Li, K.J. Hamann, and T.L. Vanden Hoek, *Therapeutic hypothermia cardioprotection via Akt- and nitric oxide-mediated attenuation of mitochondrial oxidants*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **298**(6): p. H2164-73.
123. Mochizuki, T., S. Yu, T. Katoh, K. Aoki, and S. Sato, *Cardioprotective effect of therapeutic hypothermia at 34 degrees C against ischaemia/reperfusion injury mediated by PI3K and nitric oxide in a rat isolated heart model*. Resuscitation, 2012. **83**(2): p. 238-42.
124. Kacimi, R., J. Chentoufi, N. Honbo, C.S. Long, and J.S. Karliner, *Hypoxia differentially regulates stress proteins in cultured cardiomyocytes: role of the p38 stress-activated kinase signaling cascade, and relation to cytoprotection*. Cardiovasc Res, 2000. **46**(1): p. 139-50.
125. Neilan, C.L., E. Kenyon, M.A. Kovach, K. Bowden, W.C. Claycomb, J.R. Traynor, and S.F. Bolling, *An immortalized myocyte cell line, HL-1, expresses a functional delta -opioid receptor*. J Mol Cell Cardiol, 2000. **32**(12): p. 2187-93.
126. Tsuchida, A., T. Miura, M. Tanno, Y. Nozawa, H. Kita, and K. Shimamoto, *Time window for the contribution of the delta-opioid receptor to cardioprotection by ischemic preconditioning in the rat heart*. Cardiovasc Drugs Ther, 1998. **12**(4): p. 365-73.
127. Huh, J., G.J. Gross, H. Nagase, and B.T. Liang, *Protection of cardiac myocytes via delta(1)-opioid receptors, protein kinase C, and mitochondrial K(ATP) channels*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(1): p. H377-83.
128. Watson, M.J., J.D. Holt, S.J. O'Neill, K. Wei, W. Pendergast, G.J. Gross, P.J. Gengo, and K.J. Chang, *ARD-353 [4-((2R,5S)-4-(R)-(4-diethylcarbamoylphenyl)(3-hydroxyphenyl)methyl)-2,5-dimethyl piperazin-1-ylmethyl]benzoic acid], a novel nonpeptide delta receptor agonist, reduces myocardial infarct size without central effects*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **316**(1): p. 423-30.
129. Seymour, E.M., S.Y. Wu, M.A. Kovach, M.A. Romano, J.R. Traynor, W.C. Claycomb, and S.F. Bolling, *HL-1 myocytes exhibit PKC and K(ATP) channel-dependent delta opioid preconditioning*. J Surg Res, 2003. **114**(2): p. 187-94.

130. Xiao, Y., D. Contaifer, W. Huang, J. Yang, Z. Hu, Q. Guo, J. Bradley, M.A. Peberdy, J.P. Ornato, D.S. Wijesinghe, and W. Tang, *Cannabinoid Receptor Agonist WIN55, 212-2 Adjusts Lipid Metabolism in a Rat Model of Cardiac Arrest*. *Ther Hypothermia Temp Manag*, 2020. **10**(4): p. 192-203.
131. Eid, B.G., *Cannabinoids for Treating Cardiovascular Disorders: Putting Together a Complex Puzzle*. *J Microsc Ultrastruct*, 2018. **6**(4): p. 171-176.
132. Pinto, A.R., A. Ilinykh, M.J. Ivey, J.T. Kuwabara, M.L. D'Antoni, R. Debuque, A. Chandran, L. Wang, K. Arora, N.A. Rosenthal, and M.D. Tallquist, *Revisiting Cardiac Cellular Composition*. *Circ Res*, 2016. **118**(3): p. 400-9.
133. Monge, C., N. Beraud, K. Tepp, S. Pelloux, S. Chahboun, T. Kaambre, L. Kadaja, M. Roosimaa, A. Piirsoo, Y. Tourneur, A.V. Kuznetsov, V. Saks, and E. Seppet, *Comparative analysis of the bioenergetics of adult cardiomyocytes and nonbeating HL-1 cells: respiratory chain activities, glycolytic enzyme profiles, and metabolic fluxes*. *Can J Physiol Pharmacol*, 2009. **87**(4): p. 318-26.
134. Eimre, M., K. Paju, S. Pelloux, N. Beraud, M. Roosimaa, L. Kadaja, M. Gruno, N. Peet, E. Orlova, R. Remmelkoor, A. Piirsoo, V. Saks, and E. Seppet, *Distinct organization of energy metabolism in HL-1 cardiac cell line and cardiomyocytes*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1777**(6): p. 514-24.
135. Andersen, A.D., K.A. Poulsen, I.H. Lambert, and S.F. Pedersen, *HL-1 mouse cardiomyocyte injury and death after simulated ischemia and reperfusion: roles of pH, Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2, and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009. **296**(5): p. C1227-42.
136. Polderman, K.H. and J. Varon, *How low should we go? Hypothermia or strict normothermia after cardiac arrest?* *Circulation*, 2015. **131**(7): p. 669-75.
137. Krech, J., G. Tong, S. Wowro, C. Walker, L.M. Rosenthal, F. Berger, and K.R.L. Schmitt, *Moderate therapeutic hypothermia induces multimodal protective effects in oxygen-glucose deprivation/reperfusion injured cardiomyocytes*. *Mitochondrion*, 2017. **35**: p. 1-10.
138. Bernard, S.A., K. Smith, P. Cameron, K. Masci, D.M. Taylor, D.J. Cooper, A.M. Kelly, W. Silvester, and I. Rapid Infusion of Cold Hartmanns, *Induction of therapeutic hypothermia by paramedics after resuscitation from out-of-hospital ventricular fibrillation cardiac arrest: a randomized controlled trial*. *Circulation*, 2010. **122**(7): p. 737-42.
139. Bernard, S.A., K. Smith, J. Finn, C. Hein, H. Grantham, J.E. Bray, C. Deasy, M. Stephenson, T.A. Williams, L.D. Straney, D. Brink, R. Larsen, C. Cotton, and P. Cameron, *Induction of Therapeutic Hypothermia During Out-of-Hospital Cardiac Arrest Using a Rapid Infusion of Cold Saline: The RINSE Trial (Rapid Infusion of Cold Normal Saline)*. *Circulation*, 2016. **134**(11): p. 797-805.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Vivienne Gourdon (geb. Fabig), versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Kardioprotektion durch Therapeutische Hypothermie und pharmakologische Intervention während simulierter Ischämie: Eine Zellkulturstudie mit kontraktile HL-1 Kardiomyozyten selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/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.

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

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

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

## Publikationsliste

### **Vortrag mit Abstractveröffentlichung**

Cardioprotective effect of early therapeutic hypothermia during ischemia in an in vitro cardiomyocyte model, V. Fabig, C. Drescher, A. Krauss, G. Tong, C. Walker, B. Schmitt, K. Schmitt, Resuscitation 84, S6, Oktober 2013

### **Posterpräsentation mit Abstractveröffentlichung**

Automatische vs. visuelle Auswertung der Polygraphie zur Diagnostik der Schlafapnoe, V. Fabig, G. Wewer, S. Knorre, C. Garcia, A. Blau, M. Glos, H. Woehrle, I. Fietze, T. Penzel, Somnologie, Suppl. 1, S85, November 2016

Cardioprotective Effect of Early Moderate Hypothermia during Ischemia, V. Fabig, C. Drescher, A. Krauss, K. Schmitt, The Thoracic and Cardiovascular Surgeon 61, S2, Oktober 2013

### **Nebenautorenschaften bei Postern und Vorträgen mit Abstractveröffentlichungen**

Pilot study for a new diagnostic supply process for patients with sleep related breathing disorders, K. Lederer, S. Zimmermann, M. Haustein, V. Gourdon, B. Weller, M. Glos, M. Maass, I. Fietze, T. Penzel, European Respiratory Journal 2018

Pilotstudie zum optimierten Versorgungsprozess bei Patienten mit schlafbezogenen Atmungsstörungen, K. Lederer, S. Zimmermann, M. Haustein, V. Gourdon, B. Weller, M. Maaß, M. Glos, I. Fietze, T. Penzel, Somnologie September 2018

Entwicklung eines ambulanten EEG- basierten Einkanal-Schlafmesssystems  
M. Glos, S. Riazzy, T. Wendler, K. Lederer, V. Fabig, M. Maaß T. Penzel, Somnologie  
Oktober 2017

Schlaferkennung - Polysomnographie oder Smartphone? T. Penzel, V. Fabig, C. Garcia, M. Glos, M. Platzeck, M. Renelt, C. Schöbel, B. Weller, I. Fietze, Somnologie, Suppl. 1, S35, November 2016

Bestimmung des Herz-Kreislauf-Risikos bei Patienten mit einer chronischen Insomnie mittels autonomer Statusindikatoren aus der Photoplethysmographie, M. Glos, S. Potzka, N. Laharnar, S. Zimmermann, D. Sommermeyer, V. Fabig, I. Fietze, T. Penzel, Somnologie, Suppl. 1, S28, November 2016

Verlauf der Körperkerntemperatur in der Nacht in Abhängigkeit von der Matratzenoberfläche, J. Hein, L. Aßmus, V. Fabig, K. Kräuchi, M. Glos, I. Fietze, T. Penzel, Somnologie, Suppl. 1, S54, November 2016

Auswirkung der Schlafstätte auf den Schlaf, L. Aßmus, J. Hein, V. Fabig, K. Kräuchi, I. Fietze, T. Penzel, Somnologie, Suppl. 1, S88, November 2016

Neuroprotective properties of mild therapeutic hypothermia in a co-culture model following a hypoxic ischemic event, M. Feldmann, V. Fabig, G. Tong, A. Krauss, S. Wollersheim, B. Schmitt, K. Schmitt, Resuscitation 84, S77, Oktober 2013

## Danksagung

Besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Katharina Schmitt für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die engagierte Betreuung. Auch Ph.D. Giang Tong gilt für die Hilfe bei der Projektplanung, die Einführung in die Methoden und Diskussion der Daten mein Dank. Daneben möchte ich Dr. med. Cornelia Drescher und Dr. med. Christopher Walker für ihren fachlichen Rat während der Laborarbeit danken. Dank gilt auch Dr. med. Jana Krech, Dr. med. Meghna Jha und Dr. rer. nat. Ulrike Schimpf für das Lesen und hilfreiche Anmerkungen zur fertigen Dissertation. Und was hätte ich ohne Nora Ebermann und Dr. med. Maria Feldmann im Labor gemacht? Ich bin euch sehr verbunden für eure Unterstützung und gute Laune. Darüber hinaus danke ich Prof. Dr. med. Christoph Bühner, PD Dr. rer. nat. Stefanie Endesfelder und Ruth Herrmann für die Bereitstellung der Hypoxiekammer und die gute Zusammenarbeit.