

Fachinformationen für Ärzte, Kliniken und Interessierte über Forschungsprojekte von *kinderherzen*

Kann Hypothermie die Inflammationsantwort geschädigter primärer Kardiomyozyten aufhalten?

Klinischer Hintergrund und aktueller Stand der Forschung

Ischämische Schädigungen des Herzmuskel im Kindesalter können primär durch Koronaranomalien oder sekundär beispielsweise nach kardiopulmonaler Reanimation mit Wiederherstellung eines Spontankreislaufes oder nach Überleben einer ECMO-Therapie entstehen. Die Ischämie/Reperfusionschädigung führt auf molekularer Ebene zu einer sterilen Inflammationsreaktion. Hierbei führt ein nekrotischer Zelltod zur Freisetzung von sogenannten damage associated molecular patterns (DAMPs), die an Pattern Recognition Rezeptoren (PRRs) binden und das Immunsystem aktivieren (1). Dadurch werden pro- und anti-inflammatorische Zytokine sezerniert, welche die myokardiale Dysfunktion verstärken können. Tierexperimentelle Studien konnten bereits belegen, dass Hypothermie das Infarktareal signifikant reduzieren kann (2-4). Daher diente das Projekt dazu, den Einfluss der Kühlung auf die sterile Inflammation primärer Kardiomyozyten zu untersuchen.

Die Effekte von akuter und chronischer Ischämie auf Mechanismen des kardialen Zelltodes

Zunächst wurde ein Zeit-Temperatur-Protokoll etabliert, hierfür wurden primäre Kardiomyozyten für zwei bis sechs Stunden einer simulierten Ischämie (OGD: oxygen-glucose-deprivation) und einer anschließenden Reperfusion ausgesetzt.

Die Zellen wurden für den Versuch in zwei Gruppen unterteilt: eine normotherme Versuchsgruppe wurde für die gesamte Versuchsdauer bei 37 °C inkubiert, während eine hypotherme Versuchsgruppe eine Stunde nach Versuchsbeginn auf 33,5 °C gekühlt wurde (Abbildung 1).

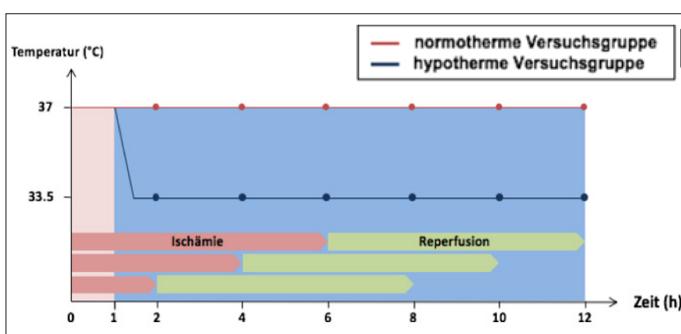


Abbildung 1:

Zeit-Temperatur-Protokoll zur Untersuchung der Zelltodmechanismen. Die primären Kardiomyozyten wurden einer 2- bis 6-stündigen simulierten Ischämie und anschließenden Reperfusion ausgesetzt. In der hypothermen Gruppe wurde während der simulierten Ischämie die InkubationsTemperatur auf 33,5 °C abgesenkt und für 6 Stunden aufrechterhalten.

Die simulierte Ischämie und Reperfusion verursacht in den primären Kardiomyozyten einen Zelluntergang. Der nekrotische Zelltod nahm mit zunehmender Schädigungszeit zu. Der Zelluntergang

der Kardiomyozyten konnte durch den Einsatz der therapeutischen Hypothermie nach sechs Stunden signifikant verminder werden (Abbildung 2A). Die Apoptose ist ein energiegebundener Prozess, der durch die Aktivierung des zentralen Enzyms Caspase 3 bestimmt werden kann. Eine zunehmende OGD-Schädigung und Zunahme des nekrotischen Zelltods bewirkte eine vermehrte Caspase 3 Aktivität. Durch die therapeutische Hypothermie bei 33,5 °C konnte die apoptotische Zelltod nach 2 h OGD + 6 h Reperfusion signifikant verminder werden (Abbildung 2B).

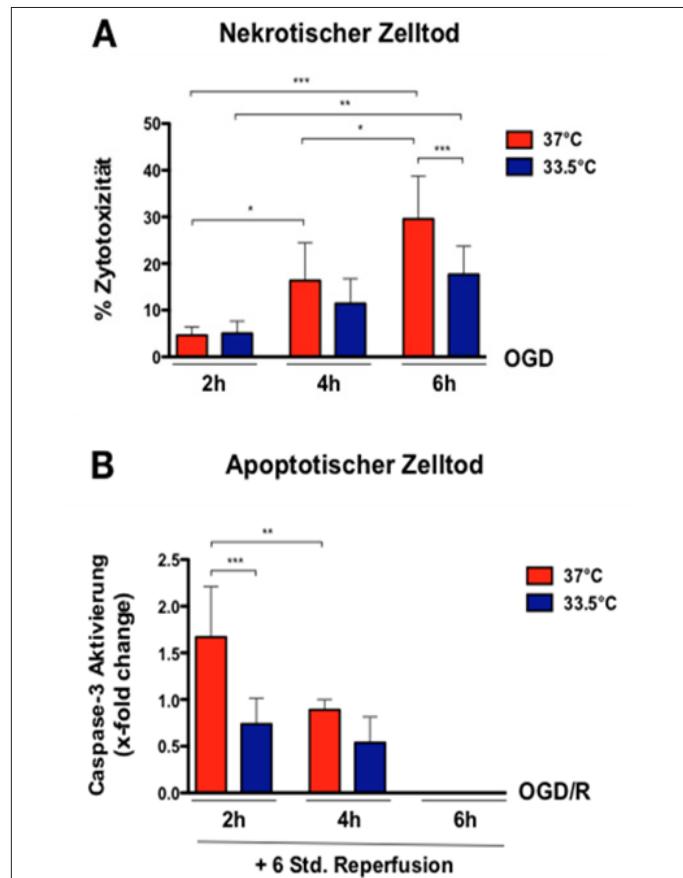


Abbildung 2:
(A) LDH Zytotoxizität-Analyse von Nekrose und (B) Western Blot-Analyse von Apoptose induzierenden Proteinen

Effekte von moderater therapeutischer Hypothermie auf die durch den kardialen Zelltod induzierte Inflammationsreaktion

Im nächsten Schritt untersuchten wir den Einfluss der Hypothermie auf die Freisetzung von DAMPs als Mediatoren der sterilen Inflammation. Dabei analysierten wir neben der Freisetzung von High Mobility Group Box 1 (HMGB1), Heat Shock Protein 70 (Hsp70) auch das Cold Shock Binding Protein (CIRBP). CIRPB wurde als neuer und möglicherweise zentraler Mediator der sterilen Inflammation beschrieben (6). In den OGD-schädigten Kardiomyozyten sahen wir interessanterweise für alle drei DAMPs ein

ähnliches Muster, das mit den Nekrose-Daten korreliert. Somit stieg die Konzentration der DAMPS mit steigender Schädigungszeit und die Kühlung auf 33,5 °C konnte eine zum Teil reduzierte Ausschüttung (Abbildung 3) bewirken.

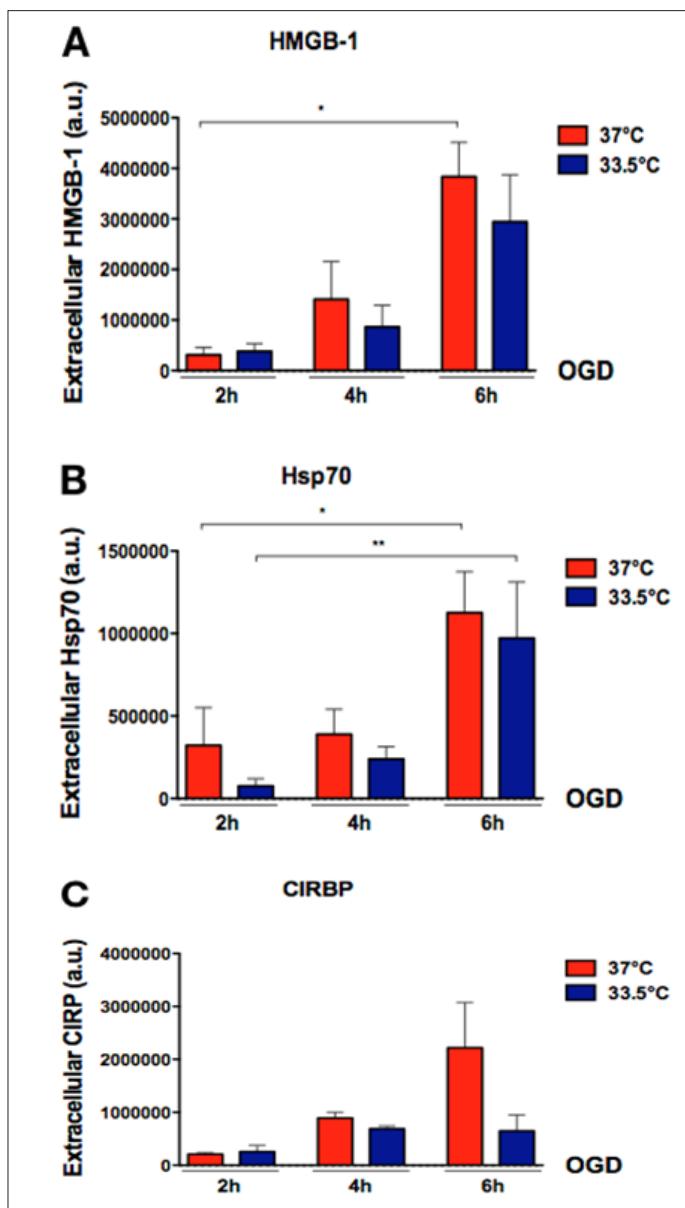


Abbildung 3:
Western Blot-Analyse von DAMPs Proteinen im Medium von OGD-geschädigten Kardiomyozyten: (A) HMGB1, (B) HSP70 und (C) CIRBP

Schlussfolgerung

In dieser Studie konnten wir erstmals den Verlauf des Zelluntergangs primärer Kardiomyozyten durch ischämische Schädigung beschreiben. Während der Zelluntergang bei akuter Ischämie

apoptotisch verläuft, kommt es durch eine anhaltende und somit chronische Ischämie zu einem nekrotischen Zelltod. Der Einsatz therapeutischer Hypothermie reduzierte den Zelluntergang sowohl bei akuter, wie auch chronischer Ischämie erfolgreich. In dem vorliegenden Forschungsprojekt konnten wir zeigen, dass Kardiomyozyten durch die Ausschüttung von DAMPs als Vermittler einer initialen Inflammation agieren. Als erste Arbeitsgruppe konnten wir primäre Kardiomyozyten als Quelle der CIRBP-Freisetzung beschreiben. Durch die fröhe Kühlung konnte eine tendenzielle verringerte Ausschüttung der DAMPs beobachtet werden.

Literatur:

- [1] Lee SM, et al. The role of Toll-like receptor 4 (TLR4) in cardiac ischaemic-reperfusion injury, cardioprotection and preconditioning. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2016;43(9):864-71.
- [2] Abendschein DR, et al. Protection of ischemic myocardium by whole-body hypothermia after coronary artery occlusion in dogs. Am Heart J. 1978;96(6):772-80.
- [3] Schwartz LM, et al. Epicardial temperature is a major predictor of myocardial infarct size in dogs. J Mol Cell Cardiol. 1997;29(6):1577-83.
- [4] Miki T, et al. Mild hypothermia reduces infarct size in the beating rabbit heart: a practical intervention for acute myocardial infarction? Basic Res Cardiol. 1998;93(5):372-83.
- [5] Hale SL, et al. Mild hypothermia as a cardioprotective approach for acute myocardial infarction: laboratory to clinical application. J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2011;16(2):131-9.
- [6] Qiang X, Yang WL, Wu R, et al. Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) triggers inflammatory responses in hemorrhagic shock and sepsis. Nat Med 2013;19(11):1489-95.

Durchführende Stelle:

Abteilung für Angeborene Herzfehler / Kinderkardiologie,
Deutsches Herzzentrum Berlin

Projektleitung: Prof. Dr. med. Katharina Schmitt

Klinikleiter: Prof. Dr. med. Felix Berger

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden im Rahmen des European Resuscitation Councils im Jahr 2018 in Bologna als Vortrag mit dem Titel "Targeted Temperature Management protects murine primary cardiomyocytes from Ischaemia/Reperfusion-induced injury and prevents the onset of sterile inflammation by attenuating the release of DAMPs" vorgestellt.

Des Weiteren wurde im Rahmen der Studie die Publikation „The Effects of Targeted Temperature Management on Oxygen-Glucose Deprivation/Reperfusion-Induced Injury and DAMP release in Murine Primary Cardiomyocytes“ bei Mediators of Inflammation in 2020 veröffentlicht.

kinderherzen forscht und fördert Forschungsvorhaben im Bereich der Kinderherzmedizin – mit Schwerpunkt Kinderkardiologie und Kinderherzchirurgie – und stellt im „**kinderherzen** Research Report“ Kliniken und Ärzten die Inhalte aktuell laufender sowie Ergebnisse abgeschlossener Projekte vor. Antragstellungen zu Forschungsvorhaben sind jeweils zum 31.03. und 30.09. eines Jahres einzureichen.

Impressum: V.i.S.d.P.: Jörg Gattenlöwner, Geschäftsführer **kinderherzen** **Text:** Prof. Dr. Katharina Schmitt **Mitglieder des Wissenschaftlichen Beirats:**

Prof. Dr. Thomas Paul (Sprecher), Prof. Dr. Philipp Beerbaum, Prof. Dr. Felix Berger, Prof. Dr. Oliver Dewald, Prof. em. Dr. John Hess, Prof. Dr. Dr. Christian Schlensak, Prof. Dr. Brigitte Stiller

Spendenkonto: Bank für Sozialwirtschaft

IBAN: DE47 3702 0500 0008 1242 00 | BIC: BFSWDE33XXX

kinderherzen Fördergemeinschaft Deutsche Kinderherzzentren e.V.

Elsa-Brändström-Straße 21 · 53225 Bonn

Tel.: +49 (0) 228 | 42 28 0-0 · Fax: +49 (0) 228 | 35 57 22

Ansprechpartnerin: Tanja Schmitz · tanja.schmitz@kinderherzen.de

www.kinderherzen.de