

Aus dem Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und
Toxikologie der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. M. Schwaninger

Etablierung und Charakterisierung von Langzeitkulturen humaner Herzschnitte

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Matthias Brandenburger
aus Essen
Lübeck 2011

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Dendorfer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. C. Kruse

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Juni 2011

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 17. Juni 2011

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	6
2	Einleitung	7
2.1	Epidemiologie von Herzerkrankungen	7
2.2	Arzneimittelentwicklung	9
2.2.1	Entwicklungsphasen	9
2.2.2	Kosten	10
2.2.3	Schwierigkeiten der präklinischen Arzneimitteltestung	11
2.3	Modellsysteme	13
2.3.1	In vitro Modellsysteme	13
2.3.2	In vivo Modellsysteme	13
2.3.3	Speziesunterschiede	14
2.3.4	Organotypische Gewebeschnitte	14
2.4	Zielsetzung	15
3	Material und Methoden	17
3.1	Material	17
3.1.1	Geräte	17
3.1.2	Verbrauchsmaterial	19
3.1.3	Chemikalien & Reagenzien	20
3.1.4	Antikörper	21
3.1.5	Lösungen	22
3.2	Methoden	24
3.2.1	Schneiden	24
3.2.2	Kultivierung	28
3.2.3	Färbungen	29
3.2.4	MTT-Test	33
3.2.5	PCR	34

3.2.6	Kraftmessung	35
3.2.7	Statistik	41
4	Ergebnisse	42
4.1	Präparation	42
4.1.1	Etablierung	42
4.2	Charakterisierung akuter Gewebeschnitte	45
4.2.1	Vergleich des Myokards verschiedener Spezies	45
4.2.2	Humane Herzschnitte aus Morrow-Myektomien	47
4.2.3	Humane Gewebeschnitte aus explantierten Herzen	53
4.3	Charakterisierung der Gewebeschnitte im Verlauf der Gewebeschnitt-Kultur	56
4.3.1	Optimierung der Kulturbedingung	56
4.3.2	Charakterisierung der Gewebekulturen aus Morrow-Myektomien .	60
4.3.3	Charakterisierung der Gewebekulturen aus explantierten Herzen .	71
4.4	Vergleich humaner Präparate	74
4.4.1	Kulturerfolg	74
4.4.2	Verfügbarkeit	75
5	Diskussion	76
5.1	Verfahren zur Präparation frischer Myokardschnitte	76
5.1.1	Stand der Technik	76
5.1.2	Mögliche Quellen für Myokardgewebe	77
5.1.3	Logistik	78
5.1.4	Schneidebedingungen	79
5.2	Charakterisierung akuter Myokardschnitte	82
5.2.1	Strukturerhalt/Schädigung	82
5.2.2	Messung der Kontraktilität	82
5.2.3	Modulation der Kontraktilität	84
5.3	Kultivierung von Gewebeschnitten	86
5.3.1	Stand der Technik/Innovation	86
5.3.2	Optimierung der Kulturbedingungen	86
5.3.3	Vitalität der Kardiomyozyten während der Kultur	88
5.3.4	Umdifferenzierung der Kardiomyozyten während der Kultur . . .	88
5.3.5	Verlauf der Kraftentwicklung	89
5.3.6	Differenzierung und Proliferation nicht-myozytärer Gewebe	91
5.3.7	Vergleich Morrow vs. Explantat	92

5.4 Perspektive	93
Abkürzungsverzeichnis	95
Literaturverzeichnis	97

1 Zusammenfassung

Myokardmodelle sind für die Grundlagenforschung und Arzneimittel-Entwicklung erforderlich und aufgrund von Speziesdifferenzen mit humanem Ursprung erwünscht. Bislang ist humanes Myokard wegen mangelnder Verfügbarkeit, Analysierbarkeit und Beeinflussbarkeit nur bedingt für diesen Einsatz geeignet. Organotypische humane Gewebeschnitte können diesen Anforderungen gerecht werden, da aus einer Probe mehrere Präparate erstellt und über mehrere Wochen kultiviert und untersucht werden können. Die Langzeitkultivierung myokardialer Gewebeschnitte aus adultem humanem Myokard ist bislang jedoch nicht gelungen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Durchführbarkeit von humanen adulten Myokardschnitten gezeigt. Die Charakterisierung frischer Myokardschnitte in der Kraftmessung zeigte eine Dehnungs- und Frequenzabhängigkeit der Inotropie. Zudem konnten die Herzschnitte mit Isoproterenol β -adrenerg stimuliert werden. Durch Optimierung verschiedener Kulturbedingungen (Medium, Substrat und Schnittdicke) konnte mit humanen Herzschnitten eine Kulturdauer von bis zu 28 Tagen erreicht werden. Die humanen Herzschnitte wurden im Kulturverlauf weiter charakterisiert. Mit Hilfe der Vitalitätsfärbung und einem MTT-Test konnte eine hohe Vitalität der kultivierten Schnitte nachgewiesen werden. Anhand von H&E gefärbten Paraffinschnitten und Immunfärbungen konnte ein Umbau des kultivierten Gewebes gezeigt werden. Die mRNA Expression vieler kardialer Strukturgene (ACTC, TTN, GJA1) zeigte bis auf die Myosin Leichtkette 2 keine signifikante Veränderung während der Kultur. In der Kraftmessung äußerte sich der strukturelle Umbau in einer verminderten Kontraktilität und einer erhöhten Elastizität des Gewebes. Dennoch zeigte das Gewebe, analog zu den frischen Herzschnitten eine signifikante Dehnungsabhängigkeit der Kontraktionskraft, einen negativen Verlauf der Kraft-Frequenz-Beziehung und eine β -adrenerge Stimulierbarkeit mit Isoproterenol. Durch Erweiterung der Technologie auf explantierte Herzen konnte die Verfügbarkeit von humanen Herzschnitten deutlich gesteigert werden.

Humane Herzschnitte sind ein neues multizelluläres Modellsystem für das adulte humane Herz. Im Vergleich zu bestehenden Modellen besitzen humane Herzschnitte eine höhere Verfügbarkeit und eignen sich für Beeinflussungen *in vitro*.

2 Einleitung

2.1 Epidemiologie von Herzerkrankungen

Erkrankungen des Herz-/Kreislaufsystems sind die häufigste Todesursache in den Industrienationen. Allein in Deutschland sterben laut Statistischem Bundesamt jährlich rund 800.000 Menschen an Herz-/Kreislaferkrankungen. Zu den häufigsten Herzerkrankungen zählen Herzinfarkt, Arrhythmien und Herzinsuffizienz.

Herzinfarkt Ein Herzinfarkt kann mehrere Ursachen haben. Meist liegt eine koronare Herzerkrankung als vaskuläre Ursache zugrunde. Durch Verengung der Herzkranzgefäße, hauptsächlich durch Arteriosklerose, kommt es zu einer Unterversorgung der Herzmuskulatur. Dadurch können Arrhythmien ausgelöst werden, die das gesamte Herz betreffen und im Extremfall zum Herzstillstand führen können. Meist wird das unterversorgte Gewebe irreversibel geschädigt, was sich morphologisch in einer fibrotischen Infarktnarbe widerspiegelt. Diese unterscheidet sich funktionell stark vom intakten Herzgewebe. So kann einerseits die Zellkopplung stark beeinträchtigt sein, was die Bildung von Arrhythmien begünstigt. Des weiteren ist die Herzleistung in diesem Areal stark vermindert, was sich in einer geringen Leistungsfähigkeit und einer Herzhypertrophie äußern kann. Die Folgen eines Herzinfarktes sind nicht heilbar. Es kann nur versucht werden, den Verlauf der Erkrankung zu mindern, was meist mit einer lebenslangen Abhängigkeit von Medikamenten verbunden ist. Trotz sorgfältiger experimenteller Testung können Herzmedikamente auf Grund ihrer Nebenwirkungen zu einer erhöhten Mortalität führen, was am Beispiel der Antiarrhythmika vielen Patienten das Leben gekostet haben könnte [Wyse et al., 1994, anonymous, 1992]. Eine genauere Charakterisierung und Sicherheitstestung aller Medikamente ist somit unabdingbar.

Arrhythmien Eine Störung des Herzrhythmus stellt eine lebensbedrohliche Erkrankung dar. Die Ursache kann einerseits erblich bedingt sein (z. B. long-QT-Syndrom) oder aber auch durch Blockade von Ionenkanälen auftreten [Jo et al., 2000, Choi et al., 2005, Lee et al., 2006]. Die Blockade des hERG(human-ether-a-gogo-related-geneproduct)-Kanals tritt sehr häufig als Nebenwirkung von Medikamenten auf, wodurch eine Testung der hERG-Blockade essentieller Bestandteil der Sicherheitspharmakologie neuer Medikamente ist. Neuartige elektrophysiologische Testsysteme, welche die *in vivo* Situation besser widerspiegeln, können zur Verbesserung des Sicherheitsprofils neuer Medikamente beitragen und das Risiko von gefährlichen kardialen Nebenwirkungen senken.

Herzinsuffizienz Eine Herzinsuffizienz liegt vor, wenn die Pumpleistung des Herzens nicht ausreicht um das vom Körper benötigte Herzzeitvolumen zu erreichen. Die Herzinsuffizienz kann aus mehreren Grunderkrankungen (z. B. Myokardinfarkt, Arrhythmien oder Myokarditis) des Herzens hervorgehen und kann in eine akute und eine chronische Herzinsuffizienz unterteilt werden. Im Fall einer chronischen Herzinsuffizienz kommt es zu einem Untergang der Kardiomyozyten mit einer damit verbundenen Fibrosierung des Herzmuskels. Da das Herz nicht in der Lage ist die geschädigten Areale zu regenerieren, muss es den Pumpverlust mit anderen Mechanismen (z.B. Hypertrophie) kompensieren. Dies führt zu einer fortschreitenden Verschlechterung der Pumpleistung. Eine schwere chronische Herzinsuffizienz kann bislang nur durch eine Herztransplantation hinreichend therapiert werden, weshalb seit mehreren Jahren versucht wird mit Hilfe von Stammzellen eine Alternativtherapie zu entwickeln. Die erhofften Erfolge stellten sich bislang jedoch noch nicht ein, da es einen großen Optimierungsbedarf bei der Wahl und Applikation geeigneter Stammzellen gibt [Mummery et al., 2010]. Bislang müssen diese Studien im Tierversuch durchgeführt werden. Ein multizelluläres humanes Herzpräparat würde die Möglichkeit eröffnen, *in vitro* nach geeigneten Bedingungen für eine Stammzelltherapie zu suchen.

2.2 Arzneimittelentwicklung

2.2.1 Entwicklungsphasen

Präklinische Studien

In präklinischen Studien soll die Wirksamkeit und Toxizität von Substanzen an einem Modellsystem untersucht werden. Als Modellsysteme können Zellen, isolierte Organe oder Versuchstiere eingesetzt werden. Je mehr das Modellsystem dem menschlichen Organismus gleicht, desto effizienter ist die Auswahl der Prüfsubstanzen für die klinische Prüfung. Aktuell gelangen lediglich 0,001% der getesteten Substanzen in die klinische Prüfung.

Klinische Prüfung

In Klinischen Studien sollen Verträglichkeit, Wirksamkeit und Dosierung der Prüfsubstanzen erstmals am Menschen getestet werden. Sie sind in 4 Phasen gegliedert.

Phase 1 Die Substanz wird an gesunden Probanden auf ihre Sicherheit und Verträglichkeit getestet. Zudem können Daten über die Pharmakodynamik und Pharmakokinetik erhoben werden. Eine Phase 1 Studie umfasst 20-80 Probanden und dauert mehrere Wochen.

Phase 2 Das Therapiekonzept wird überprüft, indem die Substanz erstmalig ausgewählten Patienten verabreicht wird. Zudem wird die Therapiedosis optimiert. Die Phase 2 Studien umfassen 50-200 Patienten und dauern mehrere Wochen bis Monate.

Phase 3 In der letzten Phase vor der Zulassung muss eine signifikante Wirkungsweise der Substanz nachgewiesen werden. Dazu wird die Substanz gegen eine Standard- oder Placebothherapie getestet. Phase 3 Studien umfassen 200-10.000 Patienten und können Monate bis Jahre dauern.

Phase 4 Ist eine Substanz zugelassen, wird sie allgemein angewandt und kann von jedem Arzt verordnet werden. Durch weitere klinische Studien und die Beobachtung in der Praxis wird die Substanz einer Langzeit Nutzen-Risiko Abwägung unterzogen. Zudem wird sie auf seltene Nebenwirkungen untersucht, die erst bei einem sehr großen Kollektiv erkennbar sind.

2.2.2 Kosten

Diese aufwendigen und langwierigen Testphasen tragen zu den hohen Entwicklungskosten von 800-1000 Millionen US\$ eines neuen Medikaments bei. Die eigenständige Entwicklung neuer Wirkstoffe ist deshalb großen Unternehmen vorbehalten.

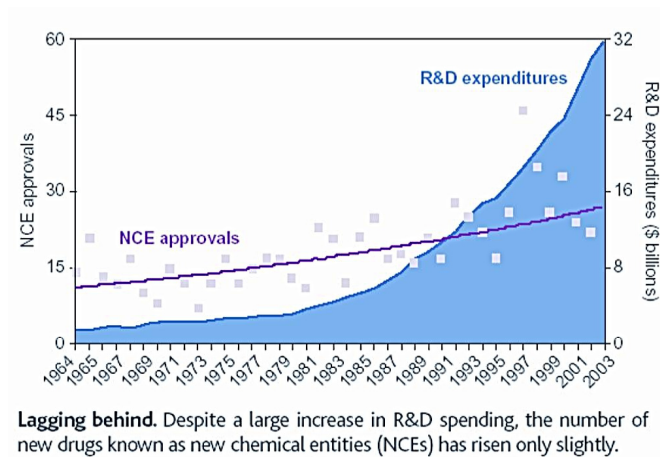


Abbildung 2.1: Effektivität der Wirkstoffentwicklung aus: *Science* (2004) 303, 1796-1799

Abbildung 2.1 zeigt die Diskrepanz zwischen Entwicklungskosten und Entwicklungserfolg neuer Wirkstoffe. Während sich die Anzahl der jährlich zugelassenen Wirkstoffe in den letzten 40 Jahren verdoppelt hat, sind die Entwicklungskosten auf das zehnfache gestiegen. Eine effizientere und kostengünstigere Medikamentenentwicklung ist dringend notwendig, um auch in Zukunft für Pharmafirmen finanzierbar zu bleiben.

Präklinische Studien verursachen einen nennenswerten Teil der Entwicklungskosten eines Wirkstoffs. Diese betragen nach DiMasi et al. circa 335 Millionen US\$ pro neu zugelassenem Medikament. Dennoch machen klinische Studien mit 467 Millionen US\$ einen noch größeren Teil der Kosten aus [DiMasi et al., 2003]. Während der klinischen Studien scheiden, allein durch den Übergang von Modellsystem zu Proband, 90% der Substanzen aus. Relevantere Modellsysteme könnten dabei helfen, unwirksame oder schädliche Substanzen früher zu erkennen, sodass Folgekosten in klinischen Studien vermieden werden können.

2.2.3 Schwierigkeiten der präklinischen Arzneimitteltestung

Wirksamkeit

Trotz zahlreicher präklinischer Tests lässt sich die Wirksamkeit eines Arzneistoffs nicht immer vorhersagen.

In der CAST-Studie (Cardiac Arrhythmia Suppression Trial) wurde gezeigt, dass der Einsatz von Klasse-I Antiarrhythmika bei Patienten mit Myokardinfarkt zu keiner Reduktion, sondern einer Erhöhung der Mortalität führte [Echt et al., 1991]. So führte eine Behandlung mit Encainid und Flecainid bei einem erneuten Herzinfarkt zu einem erhöhten Risiko eines plötzlichen Herztodes. Im Vergleich zur Placebo Behandlung war die Mortalität signifikant erhöht, was zu einem Abbruch der Studie führte.

Ein weiteres Beispiel stellt die DIG-Studie (Digitalis Investigation Group) dar. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit Digitalis bei Herzinsuffizienz zu keiner signifikanten Verbesserung der Mortalität führte. Lediglich die Zahl der Krankenhausaufenthalte konnte leicht reduziert werden [anonymous, 1997].

Die Beispiele zeigen, dass die Wirksamkeit von Arzneimitteln erst in großen klinischen Studien zum Vorschein kommt. Eine effektivere präklinische Arzneimitteltestung hat das Potential die Kosten für klinische Studien erheblich senken.

Sicherheit

Auch die Sicherheit von Arzneimitteln kann in präklinischen Tests nur unzureichend bestimmt werden, da es bei einigen Arzneimitteln nach Markteinführung zu erheblichen kardialen Nebenwirkungen gekommen ist.

Terfenadin ist ein Antihistaminikum, das zur Therapie von allergischen Reaktionen eingesetzt wird. Trotz seiner guten Verträglichkeit ist es in vielen Ländern nicht zugelassen, da es den hERG-Kanal blockiert und so durch QT-Verlängerung die Entstehung von Herzrhythmusstörungen bewirken kann [Roy et al., 1996]. Das Prokinetikum Cisaprid ist ein weiteres Beispiel für ein Medikament das aufgrund einer hERG-Kanal-Blockade vom Markt genommen wurde [Rampe et al., 1997].

Die oben genannten Beispiele beziehen sich auf eine Blockade des Ionenkanals hERG, deren Untersuchung heutzutage ein Standard in den präklinischen Sicherheitstests darstellt. Dabei wird die Blockade des hERG-Kanals an transfizierten *Xenopus* Oozyten untersucht. Im Gegensatz dazu werden die meisten Kanäle bei der Sicherheitstestung außer Acht gelassen, obwohl auch die Blockade anderer Kanäle Arrhythmien auslösen kann. Es wird vermutet, dass auch durch die Blockade des I(Ks) Kaliumkanals eine Ver-

längerung der QT-Zeit und eine damit einhergehende proarrhythmische Wirkung erzielt werden kann [Towart et al., 2009]. In den aktuellen präklinischen Sicherheitstest wird dieser Effekt aber nicht berücksichtigt.

Aktuelle Tests spiegeln nur einen Bruchteil der komplexen Elektrophysiologie des humanen Herzens wider. Die Entwicklung komplexerer Modellsysteme für das humane Herz könnte auch die präklinischen Sicherheitstestungen stark verbessern.

2.3 Modellsysteme

2.3.1 In vitro Modellsysteme

Das einfachste Modellsystem eines Organs sind dessen isolierte Zellen. In der kardiovaskulären Forschung kommen primär isolierte Zellen oder Zelllinien zum Einsatz. Zwar können primär isolierte Zellen leicht aus humanem Biopsiematerial gewonnen werden, dennoch kann das Ausgangsmaterial sehr heterogen sein, was die Vergleichbarkeit der einzelnen Versuche mindert. Zudem weisen isolierte Kardiomyozyten nur noch teilweise typische elektrophysiologische Eigenschaften auf, was durch den Isolationsprozess und einer Dedifferenzierung in Kultur zu erklären ist.

Zelllinien können hingegen über längere Zeit kultiviert werden. Zwar entsprechen diese immortalisierten Zellen noch weniger der Physiologie des Herzens als primäre Zellkulturen, aber sie lassen sich durch Selektion, Vorbehandlung oder genetische Modifikation den Untersuchungsbedürfnissen anpassen.

Ein Präparat mit Erhalt der organtypischen Funktion und Gewebezusammensetzung beruht auf isolierten Organen, die meistens durch *ex vivo*-Perfusion über kurze Zeit versorgt werden. Im Fall der kardiovaskulären Forschung können Muskelpräparate aus Trabekeln oder Papillarmuskeln des Herzens eingesetzt werden. Damit können Effekte eines Medikaments am gesamten isolierten Herzen betrachtet werden. Dieses Modell entspricht der Physiologie des Herzens zwar bei weitem besser als die zellbasierten Modelle, allerdings stehen nur Herzen von meist kleinen Versuchstieren zur Verfügung. Daher besteht das Problem der Übertragbarkeit der erhobenen Befunde auf den Menschen. Besonders elektrophysiologische Parameter unterscheiden sich stark zwischen den verschiedenen Spezies, was auf verschiedene Kanaluntereinheiten zurückzuführen ist. Die derzeit einzige Möglichkeit, die Speziesdiversität zu umgehen, besteht in der Verwendung von humanem Biopsiematerial. Im Gegensatz zu tierischen Geweben, ist dieses aber nur begrenzt verfügbar und kann eine weitaus höhere Heterogenität aufweisen. Zudem sind Langzeitkulturen mit isolierten Muskelpräparaten bislang nicht geglückt, sodass die Verwendung von adultem humanem Myokard bislang nur mit starken Einschränkungen möglich war.

2.3.2 In vivo Modellsysteme

Besonders für Arrhythmiestudien sind *in vivo* Testsysteme unerlässlich. Diese sind mit einem höheren Aufwand und höheren Kosten verbunden, weshalb sie den *in vitro* Versuchen nachgestellt sind. Analog zu den *in vitro* Testsystemen besteht aber auch hier

das Problem der Übertragbarkeit auf den Menschen. Bei großen Säugetieren wie Schweinen und Hunden sind diese Unterschiede am geringsten, weshalb sie als Goldstandard in der Entwicklung von Herzmedikamenten eingesetzt werden. [Guth, 2007]. An ihnen können Vitalparameter wie Blutdruck, Herzfrequenz und Elektrokardiogramme selbst über längere Zeit aufgenommen werden.

2.3.3 Speziesunterschiede

Aktuelle Modellsysteme des humanen Herzens basieren meist auf tierischem Myokard, weshalb Speziesunterschiede bei der Übertragung von Versuchsdaten auf den Menschen eine entscheidende Rolle spielen.

Ein entscheidendes Manko tierischer Modelle sind Unterschiede in der Expression kardialer Proteine. So ist es bekannt, dass murines Myokard im Gegensatz zum menschlichen Herzen nicht auf Blockade des hERG-Kanals reagiert, da der Kanal im murinen Herzen nicht exprimiert wird [Wang et al., 1996]. Auch andere Kanäle wie der Natrium-Calcium-Austauscher oder der inward rectifier unterscheiden sich in ihrer Aktivität stark zwischen den Spezies [Sham et al., 1995, Dhamoon et al., 2004].

Da sich Herzfrequenz und Blutdruck zwischen den verschiedenen Spezies stark unterscheiden, treten auch beim Vergleich von physiologischen Regulationsmechanismen starke Unterschiede auf. So unterscheidet sich die Kraft-Frequenz-Beziehung (engl. Force Frequency Relationship) stark zwischen verschiedenen Säugetierspezies. Für das humane Herz besagt die Kraft-Frequenz-Beziehung, dass eine Erhöhung der Stimulationsfrequenz zu einer Erhöhung des intrazellulären Calciums führt. Somit kann die Kontraktionskraft über die Herzfrequenz kurzfristig auf Belastungsänderungen angepasst werden (positive Kraft-Frequenz-Beziehung). Im Gegensatz zum humanen Herzen weisen Herzen aus Nagetieren eine negative Kraft-Frequenz-Beziehung auf [Endoh, 2004], was die Erforschung dieses Mechanismus an Versuchstieren einschränkt.

2.3.4 Organotypische Gewebeschnitte

Organotypische Gewebeschnitte (engl. organotypic slices oder precision-cut tissue slice) vereinen die Vorteile von Zellkulturen und komplexen Geweben (siehe Abb. 2.2).

Grundidee Die Schnitte sind meist wenige hundert Mikrometer dick und können aus dem Gewebe verschiedener Organe hergestellt werden. Durch die geringe Dicke wird die Diffusion von Nährstoffen und Sauerstoff ermöglicht, sodass das Gewebe nicht mehr

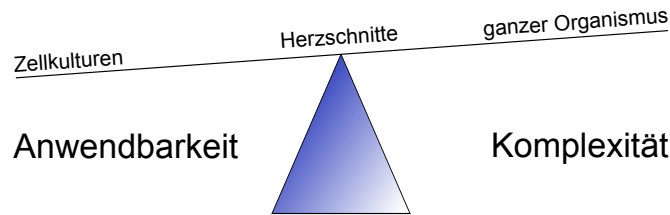


Abbildung 2.2: Balance zwischen Anwendbarkeit und Komplexität

durch den Blutkreislauf versorgt werden muss. Der entscheidende Vorteil besteht in der zur Zellkultur vergleichsweise hohen Komplexität. Im Gewebeschnitt befinden sich die Zellen in ihrer natürlichen Umgebung. Die zellulären Kontakte sind in Gewebeschnitten voll erhalten, wohingegen sie in der Zellkultur durch enzymatischen Verdau gelöst werden und nur teilweise wieder aufgebaut werden. Somit können Herzschnitte die Vorteile der Zellkultur und der isolierten Organe miteinander vereinen. Wird auf eine Kultivierung der Schnitte verzichtet, müssen die Gewebeschnitte innerhalb weniger Stunden verwendet werden. Diese Schnitte werden als akute Schnitte bezeichnet.

Mit der Technik, organotypische Schnitte eines Gewebes zu gewinnen, besteht grundsätzlich die Möglichkeit, Biopsiematerial besser zu verwerten. Aus einer Probe können meist mehrere Gewebeschnitte gewonnen werden, die jeweils für verschiedene Versuche benutzt werden können. Im Falle von Tierversuchen würde dies zur Reduzierung des Versuchstierbedarfs führen.

Die Möglichkeit humane Herzschnitte zu kultivieren würde zu einer erhöhten Verfügbarkeit des humanen Präparats beitragen, was besonders für die Routine-Nutzung von humanem Material von großer Bedeutung wäre. Zudem führt die Vereinheitlichung der Umgebungsbedingungen zu einer besseren Vergleichbarkeit der Präparate. So wäre es mit kultivierten Herzschnitten möglich, komplexe pathophysiologische Zustände, wie z.B. Hypertrophie, Ischämie oder Entzündung aber auch chronische Einflüsse, wie beispielsweise von genetischen Veränderungen oder Wirkstoffen *in vitro* nach zu stellen und zu untersuchen.

2.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Erprobung von geeigneten Myokardquellen, Präparationsbedingungen und Logistik für die Erzeugung vitaler Herzschnitte aus adultem humanem Biopsiematerial. Die entscheidende Weiterentwicklung dieser Technik sollte darin bestehen, die Schnitte in der Gewebekultur über einen längeren Zeitraum verfügbar zu halten.

Nach der Optimierung geeigneter Kulturbedingungen sollten die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Organkulturen charakterisiert und mit frischen Präparaten verglichen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage Typ MasterPro	Sartorius
Autoklav Typ 3870 ELV	Systec
Brückenverstärker (2 Kanal) Typ 301	Hugo Sachs Elektronik
cDNA-Synthesegerät TGradient-Cycler	Biometra
CO ₂ Inkubator Typ CB 210	Binder
externe Fluoreszenzlampe EL-6000	Leica
Elektronikrührer Combimag RCT	IKA
Filterwürfel I3, N2.1, POL, BF, A	Leica
Gel-Elektrophorese-System SUB-CELL	BioRad
Infusor	TSE-Systems
Konfokales Laser Scanning Mikroskop TCS SP5	Leica
Kraftaufnehmer Typ F30	Hugo Sachs Elektronik
Kryotom CM 3050	Leica
Kühlsystem „Minichiller“	Lauda
Mikrotom Typ VT1200S	Leica
Mikrowelle	Samsung
Narrow Pattern Forceps curved 12 cm	FST - Fine Science Tools
Narrow Pattern Forceps straight 12 cm	FST - Fine Science Tools
Organbad Mayflower	Hugo Sachs Elektronik
PCR-Gerät 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems

- Fortsetzung auf der nächsten Seite -

Gerät	Hersteller
Peristaltische Pumpe	Colora
pH-Meter Typ pMX 3000	WTW
Photometer Typ Fluostar Optima	BMG Labtech
Photometer Typ Smart Spec 3000	Bio-RAD
Pinzette, gerade, stumpf, 16 cm	Roth
Pipette Typ Finpette 1-10 µl	Thermo Labsystems
Pipette Typ Finpette 10-100 µl	Thermo Labsystems
Pipette Typ Reference 100-1000 µl	Eppendorf
Pipetus Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte
RNA-Extraktionsgerät ABI PRISM 6100	Applied Biosystems
Standard Surgical Scissor Curved Sharp/Sharp 16.5 cm	FST - Fine Science Tools
Sterilisator Typ 2712	Köttermann
Sterilwerkbank LaminAir Typ HBB 2448	Heraeus Instruments
Stimulator Typ T	Hugo Sachs Elektronik
Spektrophotometer Typ UVICON 932	Kontron Instruments
Wärmeschüttler Typ Thermomixer Comfort	Eppendorf
Wasserbad	ThermoHaake
Zentrifuge Typ C 412	Jouan

Ende der Tabelle

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Deckgläser, quadratisch 20 x 20 mm	Roth
Einmal-Kanülen, langer Schliff 70 mm	Roth
Einmal-Küvetten Typ K-Küvetten	Eppendorf
Falcon-Röhrchen Typ Cellstar Tubes 15,50 ml	Greiner Bio One
Filternetz für Schnittfänger (Nylon-Netz 160 µm)	Millipore
Kanülen 35 oder 70 mm	Carl Roth
Kulturfilter PET Typ PICMORG50	Millipore
Kulturfilter PC 0,4 µm Typ 140640	Nunc
Kulturfilter PC 3 µm Typ 140663	Nunc
Kulturfilter PC 8 µm Typ 140644	Nunc
Kulturfilter PET 0,4 µm Typ 353493	BD
Kulturfilter PET 1 µm Typ 353090	BD
Millipore Express PLUS (PES)-Membran, steril 250 ml	Roth
Objektträger	Menzel-Gläser
Organhaken	Hugo Sachs Elektronik
Pasteurpipetten, ohne Wattestopfen 230 mm	Roth
Petrischalen 35 mm oder 65 mm mit Nocken	Greiner Bio One
Pipettenspitzen 0,5-20 µl	Greiner Bio One
Pipettenspitzen 10-100 µl	Greiner Bio One
Pipettenspitzen 100-1000 µl	Greiner Bio One
Rasierklingen	Wilkinson Sword
Reaktionsgefäße (Eppis)	Sarstedt
Sekundenkleber SuperBond Gel	Kent
Serologische Pipette 5 ml, 10 ml oder 25 ml	Greiner Bio One
Sterilfilter Typ Express PLUS-Membran 250mL	Millipore
Zellkultur Multiwell Platten für Suspensionskulturen 6,24,96 Well	Greiner Bio One
Zellstoffpapier Typ Zupfbox POP-UP	Kimberley-Clark

Ende der Tabelle

3.1.3 Chemikalien & Reagenzien

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
Agarose Low Melt	Roth
Agarose RotiGarose	Roth
BAD Stabil	neoLab
Baysilone Paste mittelviskos	Bayer
2,3-Butanedion-Monoxim	Sigma
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck
Carbogen	Air Liquide
Carnitin	Sigma-Aldrich
cDNA-Synthese-Kit Typ Cloned AMV First Strand Synthesis	Invitrogen
Coomassie-Brillant-Blau G250	Sigma-Aldrich
Creatin	Sigma-Aldrich
D(+)-Glucose Monohydrat	Roth
Diethylether	Roth
Dimethylsulfoxid	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Fixable Far Red Live/Dead	Invitrogen
Gigasept AF	Schütte & Meyer
Glycerol	Sigma
HEPES analytical grade	Serva Electrophoresis
Isoproterenol	Sigma-Aldrich
ITS Liquid Media Supplement (100x)	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid	Merck
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Sigma Aldrich
Medium 199	Sigma-Aldrich
MTT	Sigma
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Merck

- Fortsetzung auf der nächsten Seite -

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
PCR-Kit SYBR green qPCR Supermix w. Rox	Invitrogen
Penicillin / Streptomycin (100x)	PAA
ortho-Phosphorsäure (80%ig)	Sigma-Aldrich
Propidiumiodid (100 mg)	Sigma-Aldrich
RBS 50	Roth
RNA-Isolations-Kit (RNA-Purification-Kit)	Applied Biosystems
Sauerstoff MedicAL	Air Liquide
SYTO9 5mM in DMSO	Invitrogen
Taurin	Sigma-Aldrich
Tissue-Tek O.C.T. Compound 4583	Gentaur
Tris	Sigma-Aldrich
TritonX100	Sigma-Aldrich

Ende der Tabelle

3.1.4 Antikörper

Antikörper	Hersteller
monoklonaler Antikörper (mouse) Cardiotin (R2G)	Abcam
monoklonaler Antikörper (rabbit) Vimentin (Sp20)	Abcam
Phalloidin Alexa Fluor 488	Invitrogen
Sekundärantikörper (goat anti rabbit) Alexa Fluor 555	Invitrogen
Sekundärantikörper (goat anti mouse) Alexa Fluor 633	Invitrogen

3.1.5 Lösungen

Schneidepuffer

Bestandteil	Konzentration (mM)
Natriumchlorid	136
Kaliumchlorid	5,4
Calciumchlorid	0,9
Magnesiumchlorid	1
Natriumhydrogenphosphat	0,33
D(+)-Glucose Monohydrat	10
2,3-Butanedion Monoxim	30
HEPES	5

Messpuffer

Bestandteil	Konzentration (mM)
Natriumchlorid	136
Kaliumchlorid	5,4
Calciumchlorid	1,8
Magnesiumchlorid	1
Natriumhydrogenphosphat	0,33
D(+)-Glucose Monohydrat	10
Natriumhydrogencarbonat	23

Tris-Buffered Saline (TBS)

Bestandteil	Konzentration (mM)
Tris	50
Natriumchlorid	150

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,6 eingestellt.

Tris-EDTA Lösung

Bestandteil	Konzentration (mM)
Tris	10
EDTA	1

Zudem wurde 0,05% Tween 20 hinzugefügt und der pH auf 9,0 eingestellt.

ITS-Medium

Für das ITS-Medium wurde Medium 199 mit 1% Penicillin/Streptomycin benutzt und mit folgenden sterilfiltrierten Zusätzen versehen.

Zusätze	Konzentration
Insulin	10 mg/l
Transferrin	5,5 mg/l
Selen	5 µg/l

CCT-Medium

Für das CCT-Medium wurde Medium 199 mit 1% Penicillin/Streptomycin benutzt und mit folgenden sterilfiltrierten Zusätzen versehen.

Zusätze	Konzentration (mM)
Creatin	5
Carnitin	2
Taurin	5

3.2 Methoden

3.2.1 Schneiden

Einleitung

Die Etablierung geeigneter Schneidebedingungen war der erste Schritt für die Erstellung vitaler Herzschnitte. Bei der Etablierung einer geeigneten Schneidetechnik wurde auf Vorarbeiten von Pillekamp et al. zurückgegriffen. Diese wurde dann mit der Zeit optimiert. Die Optimierung der Schneidebedingungen erfolgte an murinen Herzen und wird im Ergebnisteil beschrieben. Der folgende Teil beschreibt hingegen die endgültige Schneidetechnik, mit der die humanen Herzschnitte erstellt wurden.

Gewinnung von tierischem Myokardgewebe

Für die Etablierung der Technologie wurden zunächst Herzen aus Versuchstieren eingesetzt. Die Experimente wurden vom Landesamt für Umwelt und Landwirtschaft genehmigt und erfolgten in Übereinstimmung mit den gültigen Tierschutzgesetzen. Im Laufe des Projektes wurde dann hauptsächlich auf humanes Myokard umgestellt.

Maus In dieser Studie wurden weibliche, 22g schwere Mäuse des NMRI-Stamms genutzt. Die Mäuse wurden mit Diethylether tief narkotisiert und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Danach wurde der Brustkorb schnellstmöglich geöffnet und das Herz entnommen. Das noch schlagende Herz wurde innerhalb von 5 min mit Schneidepuffer auf 4°C gekühlt und unter die Sterilwerkbank gebracht. Vor dem Einbetten wurden die Vorhöfe abgetrennt, und das restliche Blut durch Spülen entfernt. Danach konnte das Präparat in einer Petrischale mit vorgewärmter Low Melting Agarose eingebettet werden. Mit Hilfe einer Pinzette wurde das Herz mit der Herzspitze nach oben ausgerichtet und vorsichtig komprimiert um Luftblasen aus dem Ventrikel zu entfernen.

Ratte Für die Studie wurden männliche SD-Ratten mit 350g Gewicht eingesetzt. Die Herzentnahme erfolgte bei der Ratte analog zu der Entnahme muriner Herzen. Da Ratten mit diesem Gewicht nicht sicher durch zervikale Dislokation getötet werden können, erfolgte die Tötung der Ratten durch Dekapitation. Rattenherzen sind zu groß, um vollständig in einer Petrischale mit Agarose eingebettet zu werden. Deshalb mussten beim Rattenherzen Vorhöfe und Herzspitze entfernt werden, bevor es gespült und eingebettet wurde. Das restliche Vorgehen verlief analog zur Maus.

Schwein und Ziege Myokard von größeren Säugetieren konnte nur im Rahmen von anderen Tierversuchen oder aus dem Schlachthaus gewonnen werden. Die Ziegen stammten aus Studien der Klinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, in denen die *in vivo* Differenzierung von Stammzellen im Herzen untersucht wurde. Nach der Tötung des Tieres wurden Herzstückchen von 1cm³ Größe aus dem Myokard heraus geschnitten und in Schneidepuffer schnellstmöglich in das Labor gebracht. Die Proben wurden anschließend mit der endokardialen Seite nach unten in Low Melting Agarose eingebettet und weiter verarbeitet.

Gewinnung von humanem Myokardgewebe

Humanes Myokard wird bei verschiedenen Herzoperationen exzidiert. Die Patienten wurden vor dem Eingriff aufgeklärt und haben einer Verwendung des Gewebes für die Forschung zugestimmt. Gewebeproben aus der Resektion einer subvalvulären Gewebehypertrophie (Morrow-Gewebe) oder einer Ablation von auricula atrii (Vorhofohren) stammten aus der Herzchirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Lübeck. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck genehmigt. Das Herzgewebe aus explantierten Herzen stammte aus dem Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf. Die Verwendung des Herzgewebes wurde durch das örtliche Ethikkomitee gebilligt.

Morrow-Gewebe Bei Vorliegen einer subvalvularen Hypertrophie, die beim operativen Ersatz der Aortenklappe erkannt wird, muss hypertrophes Gewebe durch eine Morrow-Myektomie entfernt werden. Das Herzgewebe wurde schnellstmöglich von der OP-Schleuse abgeholt und ins Labor gebracht. Dort wurde erkennbares Fett und Bindegewebe abgetrennt und das Herz mit der endokardialen Seite nach unten in einer Petrischale mit Low Melting Agarose eingebettet.

Vorhofohren Ein gängiges Verfahren zur Einbindung der venösen Kanüle einer Herz-Lungen-Maschine sieht einen Zugang durch das entfernte rechte Herzohr vor. Das dabei abgetrennte Vorhofstück wird normalerweise verworfen und stand für unsere Untersuchungen zur Verfügung. Analog zum Morrow Gewebe wurde das Herzohr schnellstmöglich in das Labor gebracht. Vor dem Einbetten wurde das Vorhofohr aufgeschnitten und das Myokard bestmöglich von Fett und Bindegewebe befreit. Anschließend wurden Vorhofwand oder Trabekel mit der Innenseite nach oben in eine Petrischale gelegt und in Low Melting Agarose eingebettet.

Explantierte Herzen Die verwendeten Proben aus explantierten Herzen stammten aus dem Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf. Aus dem erkrankten explantierten Herzen wurden transmurale Stückchen von 1 cm³ Größe entfernt, die besonders wenig Schädigungen (z.B. Infarktnarben) aufwiesen. Da die Transplantationen üblicherweise nachts stattfinden, wurden die Proben zwischen 6 und 30 Stunden in 4°C kaltem Schneidepuffer gelagert, bis sie im Labor analog zu den Morrow-Proben weiter verarbeitet werden konnten.

Einbetten

Da die Myokardproben vor dem Schneiden in Low Melting Agarose eingebettet wurden, musste diese zuvor rechtzeitig im Wasserbad (95°C) geschmolzen und anschließend auf 37°C abgekühlt werden. Gleichzeitig wurde das Kühlaggregat angeschaltet, damit die Probenwanne rechtzeitig auf 4°C gekühlt war.

Nachdem das Gewebe in die flüssige Agarose gelegt wurde, erfolgte eine Ausrichtung des Gewebes mit Hilfe einer sterilen Pinzette. Zur Beschleunigung des Aushärtungsprozesses wurde die Petrischale auf Eis gestellt. Die Ausrichtung des Präparats wurde bis zur vollständigen Aushärtung mit Hilfe der Pinzette korrigiert. Anschließend konnte das Gewebe im Agaroseblock aus der Petrischale getrennt und mit Sekundenkleber auf den Probenteller geklebt werden. Dabei wurde möglichst wenig Sekundenkleber verwendet, damit die Verbindung innerhalb kurzer Zeit auf Eis aushärten konnte. Anschließend wurde der Probenteller in die vorbegebaste Probenwanne des Vibratoms platziert.

Schneiden

Das Schneiden erfolgte mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Vibratoms (Leica VT 1200S), welches aus Sterilitätsgründen in einer Sterilwerkbank untergebracht wurde (siehe Abb.3.1). An dem Vibratom lassen sich Schneideparameter wie Schnittgeschwindigkeit, Schnittdicke und der Klingenhub einstellen. Zudem verfügt das Gerät über einen schwingenden Klingenhalter, in den verschiedenartige Klingen (wie z.B. Stahl, Keramik, Saphir) eingespannt werden können. Mit Hilfe einer elektronischen Justiereinrichtung (Vibrocheck) kann die Klinge genau parallel zur Schwingungslinie ausgerichtet werden, wodurch das Gewebe während des Schneidens weniger stark geschädigt wird. Unter dem Klingenhalter befindet sich eine kühlbare Probenwanne in der das zu schneidende Präparat auf einem Probenteller befestigt wird.

Da aus Gründen der Hygiene und der Abnutzung bei jedem Präparat eine neue Stahlklinge benutzt wurde, musste diese vor dem Einspannen mit Ethanol von fetthaltigen

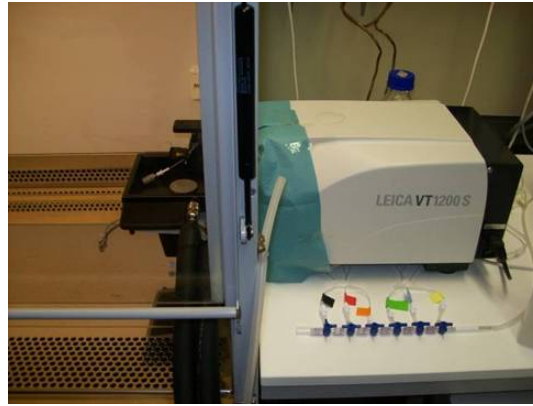


Abbildung 3.1: Leica VT1200S

Produktionsrückständen gereinigt werden. Danach wurde die Klinge in das Vibratom eingespannt und mit Hilfe des Vibrochecks in der Z-Achse justiert. Anschließend konnten die Probenwanne sowie ein 50 ml Reaktionsgefäß mit Schneidepuffer gefüllt und mit reinem Sauerstoff begast werden.

Vor dem Schneiden wurden Proben aus der Ventrikelvorderwand von großen Säugetieren und von Patienten mit dem Probenteller so gedreht, dass das Gewebe in Faserrichtung geschnitten wurde. Anschließend wurden die Schnittgrenzen in das Gerät einprogrammiert. Dann konnte mit dem Schneiden begonnen werden. Während des Anschneidens näherte man sich vorsichtig in 300µm Schritten dem Myokard. Sobald Myokard geschnitten wurde, verlangsamte man die Schnittgeschwindigkeit auf 0,07 mm/s. Der erste Schnitt wurde verworfen, da er eine undefinierte Dicke besitzt. Alle folgenden Schnitte wurden nach dem Schneiden mit Hilfe eines Filternetzes in das vorbereitete 50 ml Reaktionsgefäß mit vorbegastem Schneidepuffer gegeben. Nach Beenden des Schneidens ruhten die Schnitte 30 min bei 4°C bis zur weiteren Verwendung.

3.2.2 Kultivierung

Mit der Etablierung geeigneter Kulturbedingungen für die Langzeitkultivierung humaner Herzschnitte sollte die Verfügbarkeit von humanen Schnitten gesteigert werden. Im folgenden Teil wird die im Verlauf der Untersuchungen etablierte Standardkulturmethode für Herzschnitte aus Säugetierherzen beschrieben. Die durchgeführten Schritte zur Optimierung dieser Kulturbedingungen werden hingegen im Ergebnisteil thematisiert.

Vorbereitungen

Zunächst wurden 6-Well-Zellkulturplatten für die Kultivierung vorbereitet. Dafür wurde für jeden zu kultivierenden Schnitt eine Schale mit 1 ml Medium befüllt und für mindestens 15 Minuten in den Brutschrank gestellt. Die Vorinkubation des Mediums diente der Äquilibration von Temperatur und pH-Wert.

Durchführung

Zunächst wurden die einzelnen Schnitte mit Hilfe eines Filternetzes vorsichtig aus dem Schneidepuffer geholt. Um eine optimale Adhäsion der Schnitte an den Kulturfilter zu gewährleisten, musste der oberflächige Flüssigkeitsfilm von den Schnitten entfernt werden. Dazu wurde der auf dem Filternetz befindliche Schnitt kurz auf ein Zellstoffpapier (Typ Kimberly Clark) gelegt, welches den überschüssigen Puffer rasch aufsaugte. Anschließend konnte der Schnitt mit Hilfe des Filternetzes auf einen trockenen Kulturfilter gedrückt werden. Dabei saugte sich der Schnitt an dem trockenen Filter fest. Der Filter wurde danach vorsichtig in eine vorbereitete Kammer einer 6-Well-Platte transferiert. Dazu wurde der Filter schräg in die Kulturkammer eingebracht und danach langsam abgesenkt. Dieses Vorgehen verhinderte die Entstehung von Luftblasen unter dem Filter. Nach Befüllung aller Schalen wurde die Kulturplatte in den Brutschrank gestellt.

Medienwechsel

Der Medienwechsel wurde auf Grund des hohen Energiebedarfs der Schnitte täglich durchgeführt. Dazu wurden neue 6-Well-Platten mit Medium vorbereitet und ebenfalls für 15 min in den Brutschrank gegeben. Die kultivierten Schnitte wurden zusammen mit ihren Kulturfiltern mit einer sterilen Pinzette in die neue Kulturplatte überführt. Auch hier wurde auf die Vermeidung von Luftblasen geachtet.

3.2.3 Färbungen

Vitalitätsfärbung

Die Vitalitätsfärbung diente der Evaluation der Gewebeschädigung nach dem Schneiden und während der Kultur. Die Färbung musste für ein komplexes Gewebe, wie es die Herzschnitte darstellen, erst etabliert werden.

Farbstoffe

Die Vitalitätsfärbung ist eine Dreifachfärbung (siehe Abb.3.2).

Propidiumiodid wurde 1969 von Hudson et al. erstmals als dsDNA bindendes Molekül auf Basis von Ethidiumbromid beschrieben [Hudson et al., 1969]. Es besitzt ein Molekulargewicht von 668,4 g/mol, ist nicht membrangängig und kann nur in Zellen mit geschädigter Plasmamembran eindringen, wo es durch Bindung an der DNA einen fluoreszierenden Komplex bildet.

Far Red bindet an extra- sowie intrazelluläre Amidgruppen und emittiert absorbiertes Licht im tiefroten Bereich bei 670 nm. Es ist ebenfalls nicht membrangängig und kann nur in Zellen mit geschädigter Plasmamembran eindringen. Tote Zellen werden komplett gefärbt, bei lebenden nur die Plasmamembran. Durch die Färbung extrazellulärer Proteine an intaktem Gewebe kann die Eindringtiefe des Farbstoffs in die myokardialen Schnittpräparate abgeschätzt werden.

Syto9 ist membrangängig und bindet DNA im Zellkern lebender und toter Zellen und bildet dadurch auch einen fluoreszierenden Komplex. In dieser Versuchsreihe diente es lediglich als Gegenfärbung zu Propidiumiodid.

Tote Zellen, deren Membranintegrität geschädigt ist, werden durch Propidiumiodid und Far Red angefärbt. Dadurch, dass Far Red auch an extrazelluläre Plasmamembranproteine bindet, kann die Diffusionstiefe anhand der Plasmamembranfärbung erkannt werden. Die Zellkernfärbung mit Propidiumiodid oder Syto9 soll eine quantitative Auswertung der Vitalität ermöglichen.

Vorbereitungen

Vor der Färbung mussten alle Schnitte gewaschen werden. Das Verfahren ist zwischen akuten und kultivierten Herzschnitten unterschiedlich.

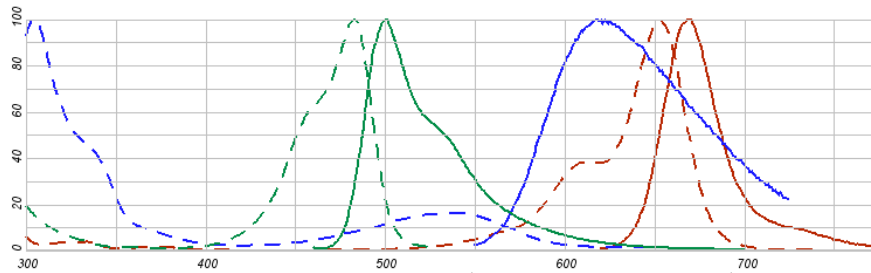


Abbildung 3.2: **Excitations- und Emissionsspektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe** gestrichelt: Excitation; konstant: Emission; grün: Syto9; blau: Propidiumiodid; rot: Fixable Far Red *Quelle: probes.invitrogen.com*

Akute Schnitte Akute Schnitte konnten erst für die Färbung genutzt werden, nachdem die Substanz 2,3-Butanedion-Monoxim (BDM) mit Färbepuffer aus dem Schnitt gewaschen war. Da BDM, das nach dem Schneiden in den Schnitten enthalten ist, strukturell einer Aminosäure ähnelt, würde es mit Far Red reagieren und das Färbeergebnis verfälschen. Daher wurden akute Schnitte 30 min bei 4°C in 1 ml Schneidepuffer ohne BDM gewaschen, bevor sie gefärbt werden konnten.

Kultivierte Schnitte Bei kultivierten Schnitten tritt das Problem noch stärker auf, weil das Medium lösliche Aminosäuren und Peptide enthält, die sich schlechter auswaschen lassen. Im Gegensatz zu akuten Schnitten wurden kultivierte Schnitte für 30 min bei 37°C in Messpuffer gewaschen, weil ein 30 minütiger Waschschriff bei 4°C zu einer zusätzlichen Schädigung des Gewebes führen könnte.

Durchführung

Zunächst wurde 1 ml der Färbelösung (0,5 μM Propidiumiodid und Far Red (Verd. 1:1000) in Schneidepuffer ohne BDM) in eine Kammer einer 24-Well-Platte pipettiert. Für jeden zu färbenden Schnitt wurde eine Kammer vorbereitet. Anschließend wurde jeder Schnitt mit einem Filternetz in eine vorbereitete Kammer überführt. Dann wurde die 24-Well-Platte für 30 min in einem Eisbehälter auf einen Schüttler platziert. Nach der Färbung wurde der Schnitt zweimal für 5 min in Schneidepuffer ohne BDM gewaschen, um die ungebundenen Farbstoffe zu entfernen.

Kryoschnitte Die angefertigten Gewebeschnitte sind mit 300 μm zu dick, um den Querschnitt unter einem Durchlichtmikroskop beurteilen zu können. Nach der Färbung wurden deshalb 16 μm dicke Kryoschnitte angefertigt. Vor dem Schneiden wurde das

Kryotom auf -18°C abgekühlt. Dabei wurde darauf geachtet, dass das gesamte Zubehör (Schnittstrecker, Pinzette, Klinge, etc.) zu Versuchsbeginn ebenfalls auf -18°C vorgekühlt war.

Die Probe wurde mit 4°C kaltem TissueTek Kryomedium auf einem Probenhalter eingebettet und in das vorgekühlte Kryotom platziert. Die Art der Analyse entschied über die Orientierung der Probe in dem Kryomedium. Für eine Schnittkantenanalyse wurde die Probe senkrecht zu ihrer Oberfläche geschnitten, für eine Gesamtübersicht hingegen parallel. Die Schnitte wurden mit Hilfe eines Schnittstreckers aufgefangen und anschließend auf ein langes Deckglas überführt. Das Deckglas besaß Raumtemperatur, sodass der Schnitt dort haften blieb. Um Artefakte durch Verdunstung zu vermeiden, wurde der Schnitt schnellstmöglich mit Eindecklösung (Glycerin mit $5\mu\text{M}$ Syto9) bedeckt und mit einem kleinen Deckgläschen eingedeckelt. Nachdem die Probe in einer dunklen Kammer ausgehärtet war, konnte sie unter dem Mikroskop betrachtet werden.

Mikroskopie Übersichtsaufnahmen wurden mit einem normalen Durchlichtmikroskop und einer Fluoreszenzlampe aufgenommen. Die Bandbreite der Fluoreszenzanregung wurde mit einem Filter auf 450-490 nm eingestellt. Auf den Übersichtsbildern erscheinen somit nur Propidiumiodid und Syto9.

Detailaufnahmen wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop angefertigt. Die Excitations- und Emissionswellenlängen wurden wie folgt eingestellt.

Farbstoff	Excitation (nm)	Aufnahme (nm)
Syto9	458	500-540
Propidiumiodid	543	550-600
Far Red	633	660-680

Die Aufnahmen der konfokalen Fluoreszenzbilder erfolgten sequentiell. Somit traten keine Überschneidungen von Excitations- und Emissionsbereichen der verschiedenen Farbstoffe auf. Vor der Aufnahme wurde die Anregungsintensität für jeden Laser so eingestellt, dass es nicht zum Übersteuern kam. Die $16\mu\text{m}$ dicken Gewebeschnitte wurden in 10 Ebenen unterteilt. Von jeder Ebene wurden drei Aufnahmen gemacht, welche als Mittelwerte ein rauscharmes Bild ergaben. Schließlich wurden alle Ebenen des Schnitts übereinander gelegt, um das Gesamtbild zu erhalten.

Immunfärbungen

Vorbereitungen Mit Immunfärbungen wurden gewebespezifische Proteine nachgewiesen. Sie dienten der weiteren Charakterisierung des Gewebes. Für die Immunfärbungen wurden Paraffinschnitte aus Formalin-fixierten humanen Herzschnitten verwendet, die freundlicherweise im Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck hergestellt wurden. Vor der Färbung wurden die Paraffinschnitte zunächst entparaffiniert, indem sie für 30 min in einem Tris-EDTA-Puffer gekocht wurden. Nach dem Abkühlen wurden die Schnitte in TBS mit 0,025% Triton X-100 gewaschen und anschließend für 30 min in 300 µl TBS mit 0,1% BSA in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur blockiert. Danach wurde der Schnitt mit dem gewünschten Primärantikörper in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Antikörperkonzentration, sowie die Inkubationsdauer wurden in Vorversuchen individuell ermittelt und variieren zwischen den verschiedenen Antikörpern (siehe Tabelle 3.1). Die Antikörper wurden in TBS mit 1% BSA verdünnt. Anschließend wurde der Schnitt dreimal gewaschen, bevor der passende Sekundärantikörper in einer abgedunkelten feuchten Kammer inkubiert wurde.

	Primärantikörper		Sekundärantikörper	
	<i>Verdünnung</i>	<i>Inkubation (min)</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Inkubation(min)</i>
Phalloidin	1:40	60	bereits	konjugiert
Cardiotin	1:100	60	1:1000	60
Vimentin	1:100	60	1:1000	60

Tabelle 3.1: Verdünnung von Primär- und Sekundärantikörpern. Die Verdünnung erfolgte in TBS mit 1% BSA.

Nach der Färbung wurde der überschüssige Sekundärantikörper von der Probe gewaschen und diese mit Eindeckmedium eingedeckelt. Nach ausreichender Trocknung wurde die Probe unter einem konfokalen Laserscanning Mikroskop untersucht.

3.2.4 MTT-Test

Die Optimierung der Kultur- und Schneidebedingungen erforderte die Etablierung eines sensitiven und quantitativen Vitalitätstests. Der MTT-Test wurde bereits erfolgreich für die Vitalitätsmessung an Leberschnitten eingesetzt [Olinga et al., 1997] und wurde für die Anwendung an Herzschnitten angepasst. Dabei wird das wasserlösliche Tetrazoliumsalz in Anwesenheit von NADP(H) in wasserunlösliches Formazan reduziert. Das Formazan ist violett und farblich deutlich vom gelben Tetrazoliumsalz zu unterscheiden.

Vorbereitungen Das Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromid (MTT) wurde in einer zehnfach konzentrierten Stammlösung (5 mg/ml in Messpuffer) angesetzt, welche vor jedem Versuch 1:10 mit Messpuffer verdünnt wurde. Dazu wurden 5 mg/ml MTT in Messpuffer gelöst und anschließend sterilfiltriert. Sterilität ist bei der Haltbarkeit des MTT Reagenzes besonders wichtig, da es auch von Bakterien in das Formazan umgesetzt werden kann. Die Stammlösung wurde verworfen, sobald sie violetten Niederschlag aufwies.

Vor jeder Färbung wurde eine 24-Well-Platte mit MTT-Färbelösung und Messpuffer angesetzt. Für jeden zu färbenden Schnitt wurde eine Schale mit 1 ml MTT-Färbelösung, sowie zwei Schalen mit jeweils 1 ml Messpuffer vorbereitet. Die Färbepalette wurde anschließend für mindestens 15 min in den Brutschrank gestellt, um Temperatur und pH-Wert einzustellen. Zudem wurde der Wärmeschüttler auf 37°C vorgewärmt.

Färbung Für die Färbung wurden die Schnitte mit einer Pinzette in jeweils eine Schale mit Messpuffer überführt und für 15 min im Brutschrank inkubiert. Nach Wiederholung dieses Waschschrittes wurde der Schnitt in eine Schale mit MTT-Färbelösung gegeben. Nach 30 min wurde der gefärbte Schnitt in ein vorgewärmtes mit Messpuffer gefülltes Eppendorf Gefäß gegeben und für 5 min in den Wärmeschüttler platziert. Nachdem das überschüssige MTT-Reagenz ausgewaschen war, wurde der Schnitt in ein Eppendorf Gefäß mit 1 ml DMSO gegeben und ebenfalls im Wärmeschüttler inkubiert. Nach 30 min war das unlösliche Formazan aus dem Schnitt in das DMSO übergetreten, sodass die Extinktion der DMSO-Lösung anschließend bei 555 nm im Photometer gemessen werden konnte.

Proteinbestimmung

Die Herzschnitte weisen Variationen in der Größe auf und wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf die Proteinmenge normiert. Dazu wurden die Herzschnitte nach Ex-

traktion des Formazans bei -20°C eingefroren und gelagert. Vor der Proteinbestimmung wurden die Proben für 30 min in 0,5 M NaOH bei 95°C homogenisiert. Anschließend konnte die Proteinbestimmung nach dem Protokoll von Bradford [Bradford, 1976] erfolgen. Die Messwerte wurden an einem Plattenphotometer erhoben und mit einer BSA-Konzentrationsreihe geeicht.

3.2.5 PCR

RNA Extraktion und cDNA Synthese

Die Proben für die PCR-Analyse wurden am Tag der Präparation und den verschiedenen Kulturzeitpunkten genommen und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Danach wurde das Gewebe mit einem Teflon Mörser zerkleinert und durch Zugabe von Proteinase K homogenisiert. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe einer Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt und mit Hilfe der ABI PRISM 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems) extrahiert. Dann wurde die RNA Konzentration mit Hilfe einer photometrischen Messung bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Dieser Wert diente zur späteren Normierung der Expressionswerte. Die cDNA Synthese wurde mit dem Cloned AMV First Strand Synthesis Kit (Invitrogen) durchgeführt. Dabei erstellt das virale Enzym AMV Reverse Transkriptase aus der mRNA eine doppelsträngige cDNA, welche bis zur weiteren Benutzung bei -20°C gelagert wurde.

Real-Time quantitative PCR

Die Erstellung geeigneter Primer erfolgte mit Hilfe der Primer Express Software (Applied Biosystems), indem die publizierte cDNA Sequenz des Gens auf einen optimalen Bereich der Primerbindung untersucht wurde. Anschließend wurde die Spezifität der Primer auf das zu untersuchende Gen mit Hilfe einer BLAST Suche getestet. Die verwendeten 5'-sowie 3'-Oligonukleotide sind in Tabelle 3.2 aufgelistet. Vor der Real Time PCR wurde die Primer-Konzentration optimiert. Dazu wurden die Synthese-Produkte aus Versuchen mit verschiedenen Primer-Konzentrationen mit Hilfe eines Ethidium-Bromid Gels untersucht.

Die quantitative Real Time PCR erfolgte mit dem Platinum SYBR green qPCR supermix with rox kit und wurde an dem 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Messwerte wurden auf den anfangs ermittelten RNA Gehalt der Probe korrigiert und auf die mittlere Expression aller akuten Schnitte normiert.

Genname	5' -3' Primer	3' -5' Primer
ACTC1	CTTTGCCCCATGCCATCAT	TTCACGTTTCAGCAGTGGTGAC
MYL2	GAGGAAACCATTCTCAACGCA	TTGGAAAACCTCTCCGCCT
GJA1	GCTGGTTACTGGCGACAGAAA	TGCCCCATTTCGATTTTGTTT
TTN	CCATCAAGCAAGCCAGTCACA	TGTGAGATGAAGGCTGGAGCA
VIM	AGCTAACCAACGACAAAGCCC	TGCCAGAGACGCATTGTCAA
DDR2	CAATAACCGCTCCTCATCACC	TTTTCGTATCAGCCTGGATGG

Tabelle 3.2: Liste der verwendeten Primer

3.2.6 Kraftmessung

Aufbau

Die Kraftmessungen wurden in einem kommerziell erhältlichen Organbad (Hugo Sachs Elektronik) durchgeführt (siehe Abb.3.3). Das Organbad bietet die Möglichkeit, Muskelbiopsien unter kontrollierten Bedingungen zu messen. Über ein Wasserbad wurde der Wärmetauscher des Organbads auf 37°C erwärmt. Mit einer Rollerpumpe gelangte der vorbegaste Puffer über den Wärmetauscher in die Kraftkammer, wo er hinter dem Organhaken wieder abgesaugt wurde. Die Proben wurden in Organhaken eingehängt. Ein Organhaken blieb während des Experiments fest eingestellt, der andere konnte über eine Mikrometerschraube verschoben werden. Dadurch konnten während eines Experiments verschiedene Vorspannungen eingestellt werden.

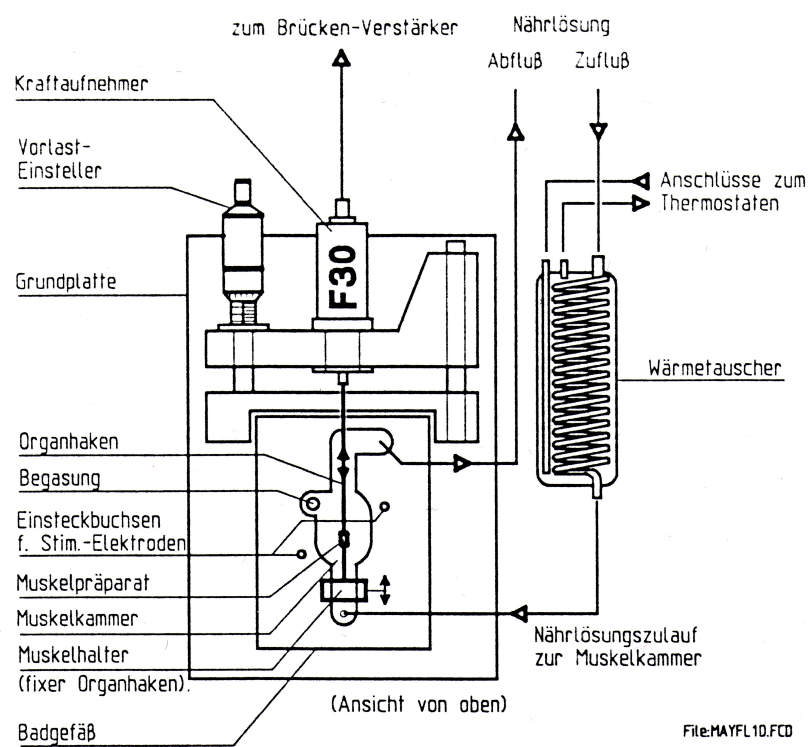


Abbildung 3.3: Organbad Mayflower (Hugo Sachs Elektronik)

Software

Aufnahme Die Auswertung der gemessenen Daten sollte mit der Software „Chart für Windows“ (AD Instruments) erfolgen. Um eine vollständige Kompatibilität der Messdaten mit der Auswertungssoftware zu gewährleisten, wurde ein eigenes Programm in der graphischen Programmiersprache „LabView“ (National Instruments) geschrieben (siehe Abb. 3.4). Die Software speicherte die gemessenen Daten in einer Textdatei. Unterschiedliche Kanäle wurden dabei in einzelne Spalten gespeichert. Während des Experiments war es zudem möglich, kleinste Ausschläge zu erkennen, da die Anzeige der Messwerte automatisch skaliert wurde.

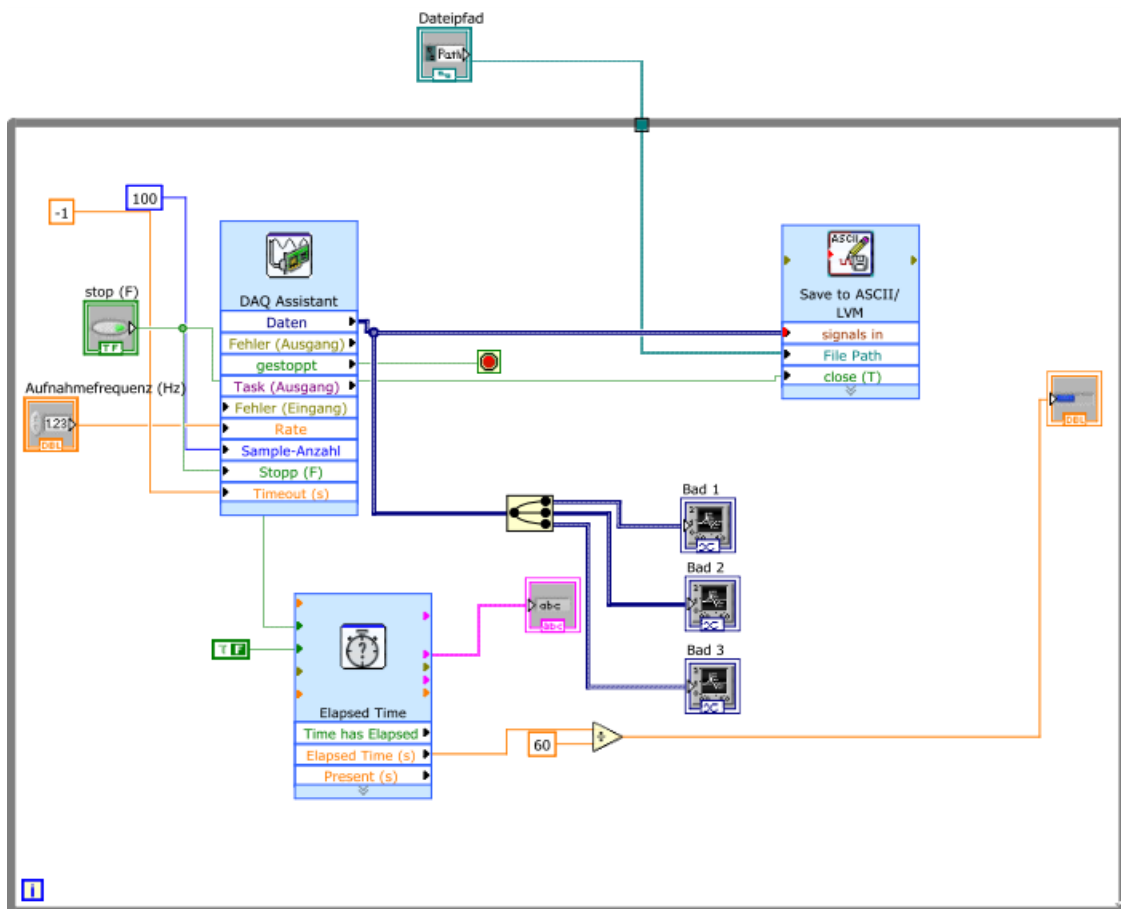


Abbildung 3.4: Blockdiagramm des Programms zur Datenaufnahme

Stimulation Die Stimulation erfolgte mit analogen Pulsgeneratoren (Stimulator T, HSE), die über Eingänge triggerbar waren. Für die Durchführung von Kraft-Frequenz-Experimenten war es notwendig, eine durchgehende Stimulation zu gewährleisten. Undefinierte Pausen in der Stimulationsfolge konnten das Versuchsergebnis verfälschen (siehe Post-Pausen-Potenzierung), sodass eine manuelle Einstellung der Frequenz am Stimulator nicht geeignet war. Um dies zu vermeiden, wurde ein LabView Programm erstellt, das einerseits eine lückenlose Stimulation gewährleistete und andererseits Frequenzfolgen mit einstellbaren Intervallen erzeugen konnte (siehe Abb.3.5).

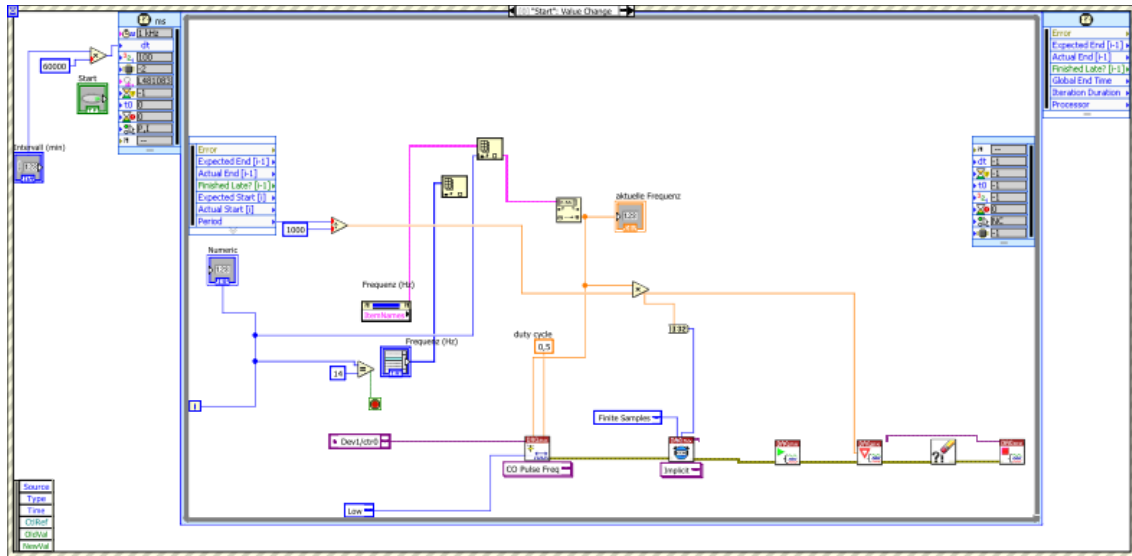


Abbildung 3.5: Blockdiagramm des Programms zur Stimulation

Vorbereitung

Vor Beginn der Experimente mussten die Kraftaufnehmer kalibriert werden. Dazu wurden die Organbäder senkrecht aufgestellt und nacheinander mit einem 220 mg schweren Gewicht kalibriert. Traten dabei Abweichungen über 0,1 mN auf, wurde der korrekte Wert über den Verstärker eingestellt. Dadurch, dass die gesamte Prozedur vom Aufnahmeprogramm registriert wird, konnten Abweichungen auch im Nachhinein nachvollzogen werden. Nach der Kalibrierung wurde der Messpuffer mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast und das Wasserbad zur Erwärmung der Wärmetauscher eingeschaltet. Nach einer halben Stunde wurde mit der Perfusion begonnen. Dazu wurde die Pumpe auf 4 ml/min eingestellt und die Messkammer durchspült. Nach circa 5 min konnte mit dem Einspannen des ersten Präparats begonnen werden. Die Perfusion wurde mit 4 ml/min von Carbogen-begastem Perfusionspuffer während des gesamten Experiments fortgesetzt.

Einspannen

Für die Befestigung der Herzschnitte in der Kraftkammer, wurden die Schnitte mechanisch mit dem Kraftaufnehmer verbunden. Dazu wurden dreieckige Gefäßhalter mit Sekundenkleber auf die Schnitte geklebt. Für eine optimale Verbindung wurde mit möglichst wenig Sekundenkleber gearbeitet. Zudem war der Gewebeschnitt beim Ankleben mit möglichst wenig Flüssigkeit bedeckt. Nachdem der Bügel auf den Schnitt geklebt war, wurde das Präparat schnellstmöglich mit vorgewärmtem und vorbegastem Messpuffer bedeckt. Dies führte zur sofortigen Aushärtung des Sekundenklebers, sodass das Präparat anschließend in das Organbad gespannt werden konnte. Dazu wurde ein Bügel in den stationären Haken eingespannt, wobei der andere Haken auf den Boden der Messkammer gelegt wurde. Anschließend wurde die Aufnahme gestartet und der zweite Bügel in den Kraftaufnehmer gehängt. Dabei wurde der Kraftaufnehmer so justiert, dass keine Lücke zu dem Organhaken entstand. Anschließend konnte mit der Stimulation begonnen werden.

Stimulation

Die Stimulationsparameter sind abhängig von der Spezies aus der die Gewebeschnitte gewonnen wurden.

Parameter	Maus	Ratte	Ziege	Schwein	Mensch
Frequenz (Hz)	4		1		
Breite (ms)	2				
Amplitude (mA)	200				

Tabelle 3.3: Stimulationsparameter

Vor Beginn des eigentlichen Experiments wurden die Gewebeschnitte vorstimuliert, um einen stabilen Ausgangspunkt zu erreichen. Bei akuten Gewebeschnitten wurde 10 min bis zum Beginn des Experiments vorstimuliert. Bei kultivierten Schnitten wurde die Zeit auf 30 min verlängert.

Vorspannungsabhängigkeit

Für die Untersuchung der Vorspannungsabhängigkeit der Kontraktilität wurden die Schnitte durch Drehen der Mikrometerschraube am Organbad alle 5 min um 0,5 mm gedehnt. Das Experiment wurde beendet, sobald eine Dehnung zu einer Abnahme der Kontraktilität führte.

Kraft-Frequenz-Beziehung

Zur Bestimmung der Kraft-Frequenz-Beziehung (engl. Force-Frequency-Relationship) wurde die Kontraktilität bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen gemessen. Das Stimulationsprotokoll war abhängig von der zu untersuchenden Spezies (siehe Tabelle 3.4) und wurde nach Erreichen und Stabilisierung der maximalen Kontraktionskraft gestartet. Für die graphische Darstellung der Kraft-Frequenz-Beziehung wurden die Kontraktionskräfte innerhalb der letzten zehn Sekunden der verschiedenen Stimulationsfrequenzen (siehe # in Abb. 4.5) mit der vorhergehenden Kontraktilität bei 1 Hz normiert (siehe * in Abb. 4.5). Die Auswertung der diastolischen und systolischen Kräfte erfolgte analog zu den Kontraktionskräften. Die Normierung erfolgte in beiden Fällen aber auf die systolische Kraft bei 1 Hz.

Zeit (min)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Mensch (Hz)	1	0,25	1	0,5	1	2	1	2,5	1	3	1
Maus (Hz)	4	1	4	2	4	3	4	5	4	6	4

Tabelle 3.4: Stimulationsprotokolle

β -Adrenorezeptor-Stimulation

Die hormonelle Stimulierbarkeit von Herzgewebe über β_1 -Adrenozeptoren ist ein wichtiger physiologischer Parameter. In dieser Studie wurden die Herzschnitte mit Isoproterenol stimuliert um eine β -adrenerge Stimulierbarkeit zu untersuchen. Dazu wurde nach Erreichen und Stabilisierung der optimalen Kontraktilität das Organbad mit schrittweise zunehmenden Isoproterenol Konzentrationen perfundiert (siehe Tabelle 3.5).

Zeitpunkt (min)	0	3	6	9	12	15	18	21
Konzentration (M)	10^{-9}	3×10^{-9}	10^{-8}	3×10^{-8}	10^{-7}	3×10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}

Tabelle 3.5: Protokoll der Isoproterenol Stimulation

Auswertung

Die Messdaten wurden zur Auswertung in das Programm Chart 5.5.6 geladen und die Kontraktionen mit Hilfe der Peak-Analysis-Erweiterung untersucht. Dafür wurden die zu untersuchenden Bereiche markiert und gemittelt. Die Darstellung der Messdaten erfolgte mit Hilfe der Programme Prism (GraphPad) und Igor (WaveMetrics).

3.2.7 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software Prism (GraphPad). Für den Vergleich von zwei Gruppen wurde der t-Test verwendet. P-Werte unter 0,05 wurden als signifikant bezeichnet. Der Vergleich von mehr als zwei Gruppen erfolgte mit einem One-way ANOVA, wobei die einzelnen Gruppen untereinander mit dem Bonferroni Post-Hoc-Test untersucht wurden. Auch hier galt ein P-Wert unter 0,05 als signifikant.

Bei der grafischen Darstellung der Versuchsdaten wurden Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt. Die jeweilige Anzahl unabhängiger Versuche ist in der Legende aufgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Präparation

Bei der Etablierung von geeigneten Schneidebedingungen konnte auf Erfahrungen von anderen Gruppen an murinen Herzen zurück gegriffen werden [Pillekamp et al., 2005]. Für humane Proben konnte durch Optimierung der Schneideparameter die Vitalität der gewonnenen Schnitte signifikant gesteigert werden.

4.1.1 Etablierung

Die Optimierung zahlreicher Parameter erforderte eine Vielzahl von Versuchen, die an murinen Herzschnitten durchgeführt wurden, da zu dem Zeitpunkt noch kein humanes Material zur Verfügung stand. Als wesentliche Parameter der Schneidebedingungen wurden die Schnittdicke sowie der Calciumgehalt im Schneidepuffer variiert und auf Kraftentwicklung und MTT-Umsatz optimiert. Hingegen konnte durch eine Erhöhung der Vorschubgeschwindigkeit oder den Einsatz von Keramik- oder Saphirklingen keine Verbesserung in der Far Red-Färbung erzielt werden.

Calciumentzug Die meisten Arbeiten beschreiben einen initialen Calciumentzug während der Präparation als essentiell. Dadurch soll die Hyperkontraktion geschädigter Kardiomyozyten und somit auch die Schädigung benachbarter Zellen verhindert werden. Nach der Präparation ist dann eine sorgfältige Recalcifizierung notwendig, wodurch die Calciumkonzentration im Kardiomyozyten wieder normalisiert wird.

Während der Etablierungsphase der Schneidemethode stellte sich dieses Vorgehen aber als zu unzuverlässig heraus, da die erstellten Schnitte eine hohe Heterogenität aufwiesen. Viele Schnitte hyperkontrahierten, sodass sie entweder gar nicht oder nur mit begrenzter Vitalität in Organbadversuchen eingesetzt werden konnten. Durch Verzicht auf den initialen Calciumentzug und der Verwendung einer reduzierten Calciumkonzentration konnte dieses Problem gelöst werden (siehe Abb. 4.1). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen einer 0 mM (nominal) und 0,9 mM Calciumkonzentration im Schnei-

depuffer beobachtet werden. Aus theoretischen Gründen wurde die Verwendung von Calcium im Schneidepuffer für die Erstellung der Gewebeschnitte bevorzugt.

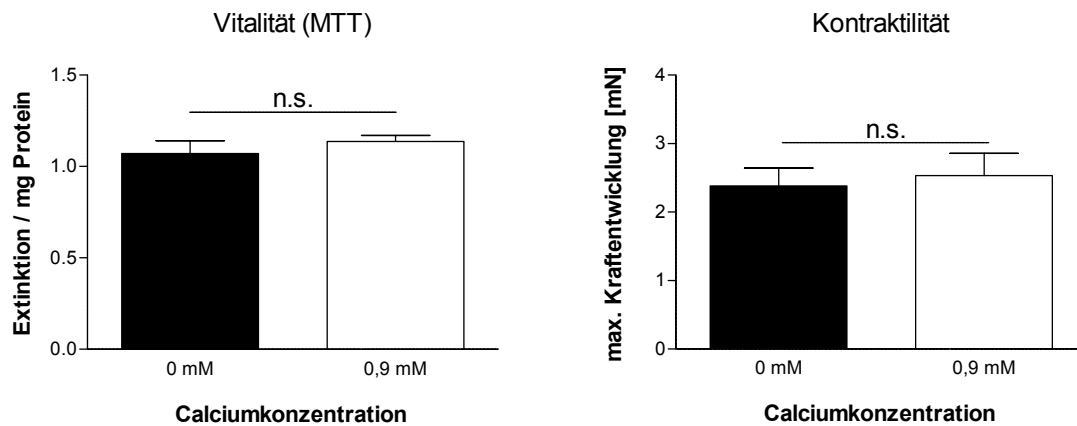


Abbildung 4.1: Einfluss verschiedener Calciumkonzentrationen im Schneidepuffer auf die Vitalität im MTT-Test ($n=18$) und der maximalen Kraftentwicklung ($n=6$) von murinen Herzschnitten. Die beiden Bedingungen unterschieden sich weder im MTT-Test ($p=0,3932$) noch in der Kontraktilität ($p=0,7246$) signifikant. n.s.: $p>0,05$; Fehlerbalken: Standardfehler

Schnittdicke Auch die Schnittdicke ist ein wichtiger Parameter, der ausschlaggebend für die Vitalität der gewonnenen Herzschnitte ist. Einerseits darf der Schnitt nicht zu dick sein, da ansonsten die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff über Diffusion ungenügend ist. Andererseits darf der Gewebeschnitt auch nicht zu dünn sein, weil sonst die Gewebeschädigung während des Schneidens größer ist. Aus Vorarbeiten von Pillekamp et al. war bekannt, dass eine Schnittdicke von 300 μm für die Erstellung von vitalen Herzschnitten aus der Maus geeignet ist.

Es wurde getestet, ob eine Reduktion der Schnittdicke auf 200 μm zu einer Verbesserung der Vitalität und Funktionalität der murinen Herzschnitte führt. Dabei wurde deutlich, dass eine Reduktion der Schnittdicke mit einer verminderten Vitalität und Funktionalität verbunden ist (siehe Abb. 4.2). Somit sind MTT-Werte sowie die Kontraktilität bei 200 μm deutlich geringer als bei 300 μm dicken Schnitten. Da die Heterogenität der 200 μm Schnitte größer war als bei der Kontrolle, wurde die Schnittdicke in allen folgenden Versuchen auf 300 μm gesetzt.

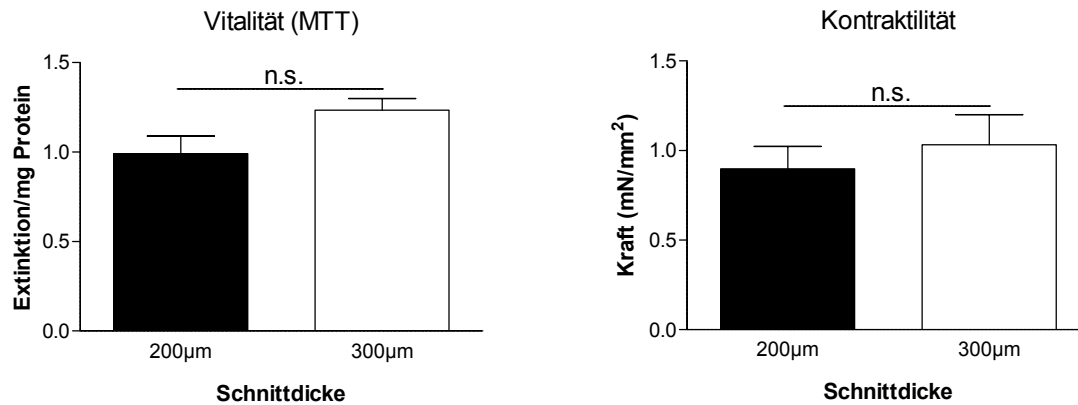


Abbildung 4.2: Einfluss verschiedener Schnittdicken auf die Vitalität im MTT-Test (n=9) und der maximalen Kraftentwicklung (n=9) von akuten murinen Herzschnitten. Die beiden Bedingungen unterschieden sich weder im MTT-Test ($p=0,0580$) noch in der Kontraktilität ($p=0,5401$) signifikant. n.s.: $p>0,05$; Fehlerbalken: Standardfehler

4.2 Charakterisierung akuter Gewebeschnitte

4.2.1 Vergleich des Myokards verschiedener Spezies

Maus

Murine Herzschnitte konnten für die Etablierung und Optimierung der Schneideparameter, der Kraftmessung, der Vitalitätstests, sowie der initialen Kulturbedingungen verwendet werden. Dennoch zeigten sich bei der Verwendung von murinen Herzschnitten einige Nachteile. So reagierten murine Herzschnitte sehr sensitiv auf mechanische Beanspruchung. Unachtsamkeiten bei der Präparation führten zur irreversiblen Schädigung durch Hyperkontraktionen und Funktionsverlust des Gewebes. Diese Eigenschaften stellten sich für die Perfektionierung der Schneidebedingungen bei humanem Material aber als hilfreich heraus. Ein Problem kam bei der weiteren Optimierung der Kulturbedingungen zutage. Innerhalb des ersten Kulturtages verloren murine Schnitte stark an Kontraktionskraft, was mit einem leichten Vitalitätsverlust einherging. Da die akuten Kräfte bereits vergleichsweise gering waren, konnte nach einem Kulturtage keine Kontraktilität mehr gemessen werden. Zudem ist die Ausbeute mit circa 10 Schnitten pro Mäuseherz sehr gering. Auf Grund dieser Problematik, wurden zusätzlich Gewebeschnitte aus anderen Säugetierherzen angefertigt.

Ratte

Im Vergleich zur Maus brachte die Etablierung von myokardialen Rattenschnitten einige Vorteile. So war die absolute Kontraktionskraft bis zu dreimal stärker, sodass Rattenschnitte auch in Kulturexperimenten eingesetzt werden konnten. Ein weiterer Vorteil lag in der Größe des Rattenherzens. Um das Rattenherz zum Schneiden einbetten zu können, wurde die ungleichmäßige Ober- und Unterseite des Herzens entfernt. Dies ermöglichte die Generierung von durchschnittlich 20 Schnitten mit geringer Heterogenität.

Schwein & Ziege

Zusätzlich wurde versucht, myokardiale Schnitte aus der Ziege sowie dem Schwein herzustellen. Dies sollte insbesondere bei einer schlechten Versorgungslage mit humanem Material als Alternative dienen. Leider eigneten sich die Spezies nicht für den Routineeinsatz. So konnten von einem Versuchstier zwar viele Schnitte erstellt werden, es war dafür aber wesentlich schwieriger, geeignete Versuchstiere zu finden. Schweine aus dem Schlachthof eigneten sich für die Gewinnung von vitalem Herzgewebe nicht. Die Tiere

wurden nach der Tötung in heißes Wasser getaucht, was zu einer Abtötung des Herzwes führte. Da es sich dabei um eine hygienische Maßnahme handelt, konnte von diesem Verfahren bei der Schlachtung nicht abgewichen werden, sodass Schweine aus der Lebensmittelproduktion nicht für Versuche zur Verfügung standen. Als Alternative konnte Myokard von Ziegen aus Versuchen der Klinik für Herzchirurgie (UK-SH, Campus Lübeck) eingesetzt werden. Die Schnitte wiesen aber im Vergleich zu den Herzschnitten aus Nagetieren eine geringere Vitalität auf. Den Tieren wurden mehrere Wochen vor der Tötung Stammzellen in das Myokard gespritzt um deren Differenzierung *in vivo* zu untersuchen. Deshalb mussten diese Areale nach Tötung des Tieres entfernt werden, bevor Myokardproben für die Erstellung von Herzschnitten bereit gestellt werden konnten. Vermutlich führte diese zeitliche Verzögerung zur irreversiblen Schädigung des Gewebes.

Eigenschaft	Maus	Ratte	Ziege
Physiologische Herzfrequenz (Hz)	≈ 10	4-7	$\approx 1,5$
Kontraktionskraft (mN)	2	4	3
Zahl der Schnitte	12	20	150
Haltbarkeit in Kultur (d)	< 1	4	< 4
Verfügbarkeit	hoch	hoch	gering

Tabelle 4.1: Vergleich von Herzschnitten aus verschiedenen Säugetierspezies. Die Haltbarkeit in Kultur wurde mit Hilfe der Kraftmessung bestimmt. Schnitte mit einer Kraft über 0,2 mN wurden als vital definiert.

4.2.2 Humane Herzschnitte aus Morrow-Myektomien

Morphologie

Herzmuskelpräparate aus der Morrow-Myektomie wiesen eine ähnliche Morphologie und Größe auf. Die Stückchen wiesen einen Querschnitt von 1 cm² auf und waren meistens dicker als 3 mm (siehe Abb. 4.3 A), sodass man im Normalfall mit mindestens 10 Herzschnitten pro Präparation rechnen konnte. In Einzelfällen wurden auch größere oder kleinere Stückchen entfernt.

Die Orientierung der Stückchen konnte durch das Endokard vorgenommen werden. Die Innenseite des Herzmuskels ließ sich schlecht schneiden und führte oft zu ungleichen Schnittdicken, weshalb die Präparate mit der Endokardseite nach unten eingebettet wurden. Durch ein sauberes Abtrennen überstehender endokardialer Ränder, sowie ein gerades Einbetten, konnte die Erstellung homogener Schnitte mit intakten Kardiomyozyten gewährleistet werden (siehe Abb. 4.3 B,C).

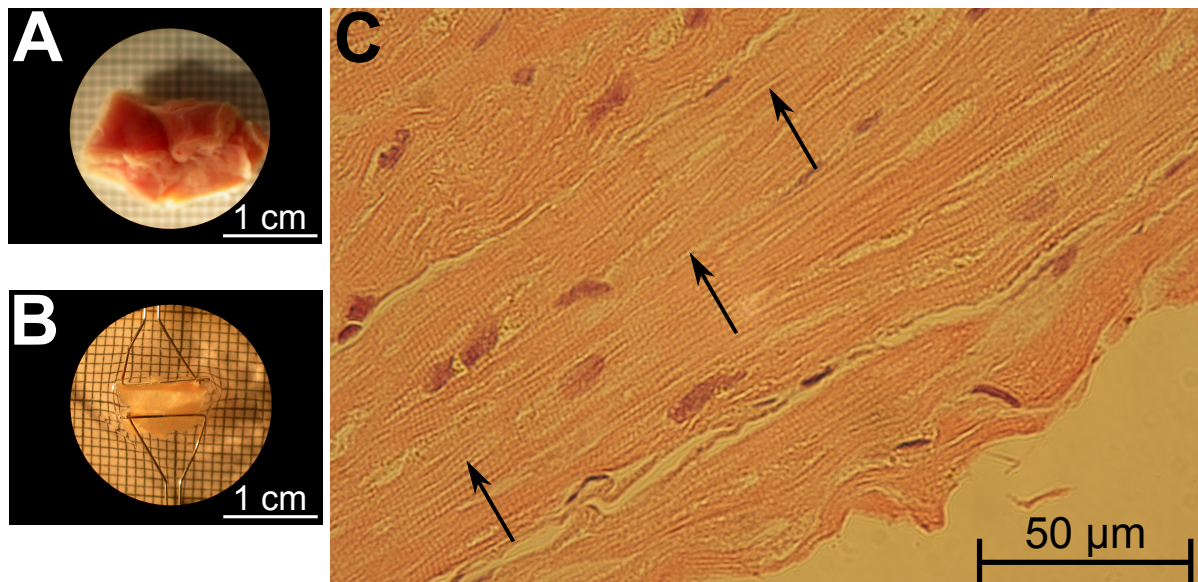


Abbildung 4.3: Gewebemorphologie der Morrow-Proben (A) Typisches Morrow-Präparat mit endokardialer Seite unten (B) Typischer Gewebeschnitt aus einem Morrow-Präparat mit angeklebten Bügeln für die Organbadmessung (C) Im Paraffin-Dünnschnitt eines Hämalaun/Eosin gefärbten akuten Herzschnitts sind die quergestreiften Kardiomyozyten klar zu erkennen (↖).

Kontraktilität

Die Schnitte zeigten makroskopisch keine Anzeichen einer irreversiblen maximalen Kontraktur, sodass sie erfolgreich in Organbadversuchen eingesetzt werden konnten.

Vorspannungsabhängigkeit der Inotropie Die Kontraktilität der humanen Proben lag durchschnittlich bei 10 mN, wobei eine klare Vorspannungsabhängigkeit der Inotropie zu beobachten war (Abb.4.4A). Wurde die Vorspannung in mehreren Schritten erhöht, stieg auch die Kontraktilität stetig an, bis sie einen maximalen Wert erreichte (Abb.4.4B). Dehnte man das Gewebe darüber hinaus, kam es zu Zerreißen und somit auch zum Kontraktionsverlust. Die optimale Vorspannung betrug für die humanen Herzschnitte 10 mN/mm². Um diese Kraft mit den physiologischen Bedingungen im Herzmuskel zu vergleichen, wurde der intraventrikuläre Druck errechnet, der in der Herzwand eine entsprechende Spannung hervorruft. Nach dem LaPlace-Gesetz für Hohlkörper lässt sich eine enddiastolische Wandspannung in mmHg errechnen:

Das Herz kann annähernd durch das LaPlace-Gesetz für Hohlkörper beschrieben werden:

$$\text{Wandspannung } S = \frac{P \times r}{2 \times \omega} \Rightarrow P = \frac{S \times 2 \times \omega}{r} \quad (4.1)$$

Folgende Parameter können für das humane Herz gewählt werden:

$$\text{Wanddicke } \omega = 1,2 \text{ cm} \quad (4.2)$$

$$\text{Radius des linken Ventrikels } r = 7,5 \text{ cm} \quad (4.3)$$

Die Dehnungsspannung des Myokardschnittes (S) kann aus der gemessenen diastolischen Kraft errechnet werden:

$$\text{es gilt: } 1 \text{ mmHg} \approx 133,322 \frac{\text{N}}{\text{m}^2} \quad (4.4)$$

$$\Rightarrow S = 10 \frac{\text{mN}}{\text{mm}^2} = 10000 \frac{\text{N}}{\text{m}^2} \approx 75 \text{ mmHg} \quad (4.5)$$

Diese Spannung des Myokardschnittes wird mit der Wandspannung des Ventrikels gleichgesetzt:

$$P = \frac{75 \text{ mmHg} \times 2 \times 1,2 \text{ cm}}{7,5 \text{ cm}} = 24 \text{ mmHg} \quad (4.6)$$

Folglich entspricht die für die maximale Krafterwicklung eines Myokardschnittes erforderliche Dehnungsspannung einer enddiastolischen Wandspannung von circa 24 mmHg.

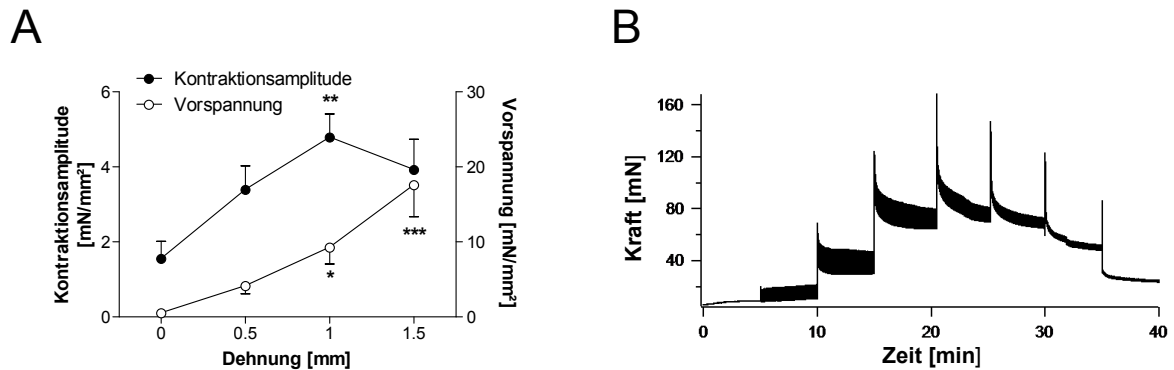


Abbildung 4.4: Durch Dehnung des Gewebeschnittes in Schritten von 0,5 mm konnte die Vorspannungsabhängigkeit der Inotropie bestimmt werden. (A) Dehnung führte zu einer signifikanten Steigerung der Kontraktionskraft. Bei einer Dehnung über 1 mm kam es zu einer Reduktion der Kontraktionskraft (n=9). (B) Originalaufnahme eines repräsentativen Vorspannungsexperimentes. ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$, im One-way ANOVA mit Bonferroni Post-Hoc-Test gegen 0 mm Dehnung getestet, Fehlerbalken: Standardfehler

Frequenzabhängigkeit der Inotropie Die humanen Herzschnitte reagierten auf eine Variation der Stimulationsfrequenz. In einer repräsentativen Originalaufzeichnung eines Experimentes ist zu erkennen, dass beim Übergang auf eine höhere Stimulationsfrequenz eine Änderung der Kontraktionskraft in zwei Phasen erfolgte. Kurzfristig kam es zu einer Steigerung der systolischen Kraftentwicklung, die sich innerhalb weniger Sekunden auf eine niedrigere Plateauphase stabilisierte. (siehe * in Abb. 4.5 A). Die diastolische Kraft stieg bei höheren Stimulationsfrequenzen stark an, sodass bei höheren Stimulationsfrequenzen niedrigere Kontraktionsamplituden gemessen wurden. Um den Effekt der Stimulationsfrequenz auf die Kontraktionsamplitude zu untersuchen, wurde die Differenz der systolischen und diastolischen Kontraktionskraft in der Plateauphase (siehe # in Abb. 4.5 A) errechnet und auf die vorhergehende 1 Hz Stimulation (siehe * in Abb. 4.5 A) normiert.

Die meisten der untersuchten Proben zeigten eine Reduktion der Kontraktionskraft bei höheren Stimulationsfrequenzen (siehe Abb. 4.5 B). Der Verlauf der Kraft-Frequenz-Abhängigkeit (engl. FFR Force-Frequency-Relationship) war signifikant negativ (One-way ANOVA: $p < 0,001$). Bei einer maximalen Stimulation mit 3 Hz betrug die Kontraktilität nur noch 60% im Vergleich zum Kontrollwert bei 1 Hz. In dieser Versuchsreihe wurde nur eine Probe mit einer positiven Kraft-Frequenz-Abhängigkeit gemessen.

Dieser Effekt konnte für alle Proben mit negativer Kraft-Frequenz-Abhängigkeit weiter charakterisiert werden, indem systolische und diastolische Kraft getrennt untersucht wurden (siehe Abb. 4.5 C). Dabei stellte sich heraus, dass die diastolische Kraft von der Stimulationsfrequenz abhängig ist (One-way ANOVA: $p = 0,0564$) und bei höheren Frequenzen ansteigt. Bei der systolischen Kraft ist dieser Effekt weniger stark ausgeprägt, was die rückläufige Entwicklung der Kontraktionsamplitude bei höheren Frequenzen erklärt.

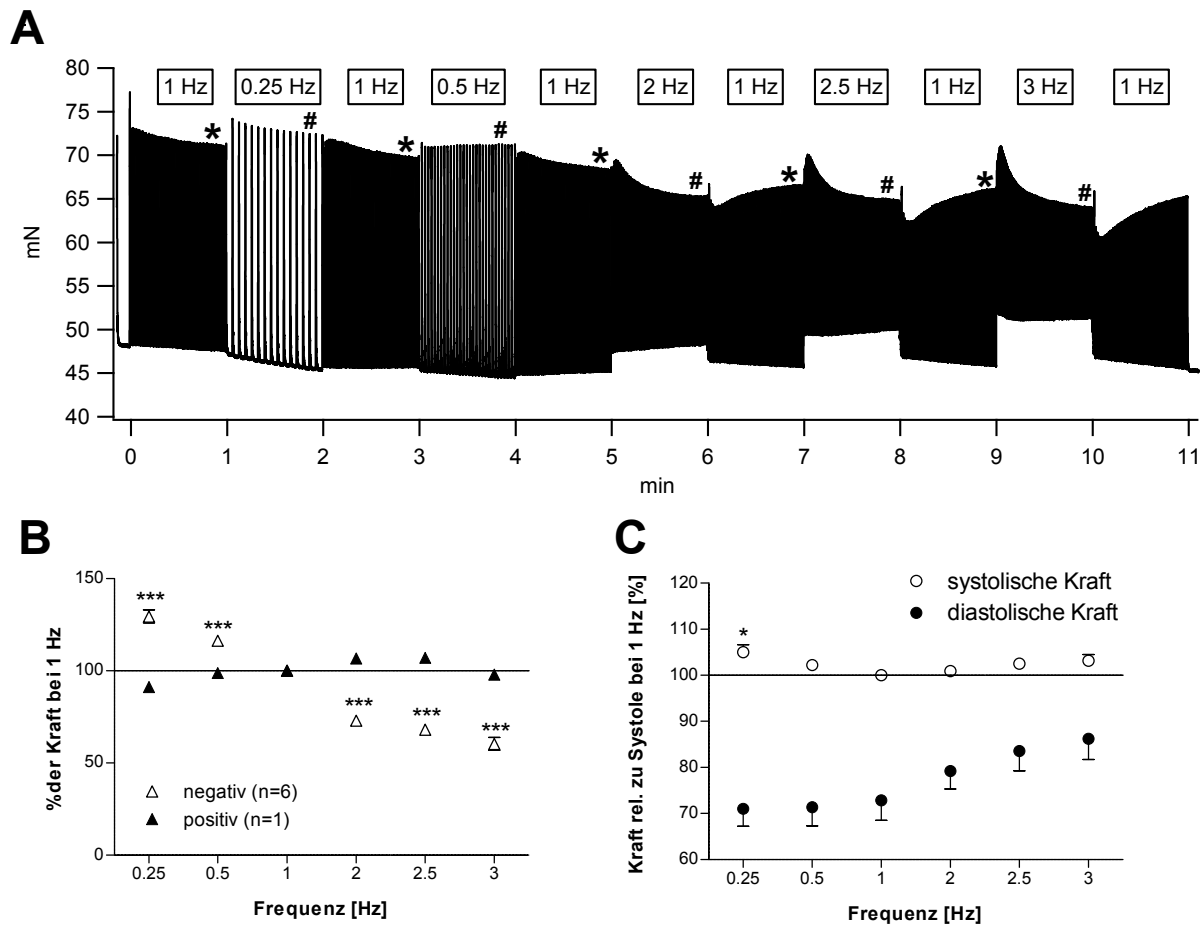


Abbildung 4.5: Frequenzabhängigkeit der Inotropie akuter Herzschnitte. (A) Repräsentatives Kraft-Frequenz-Experiment: Die Herzschnitte reagierten kurzfristig mit einer Erhöhung der systolischen Kraft auf eine Erhöhung der Stimulationsfrequenz (#), wobei die diastolische Kraft bei höheren Frequenzen anstieg. (B) Die Kontraktionsamplitude als Differenz der systolischen und diastolischen Kraft reagierte daher mit einer Reduktion auf eine Erhöhung der Stimulationsfrequenz (negativer Verlauf), wohingegen eine Probe einen positiven Verlauf zeigte. (C) Um die negative Kraft-Frequenz-Abhängigkeit zu charakterisieren wurden systolische und diastolische Kraftentwicklung getrennt untersucht. Bei Stimulationsfrequenzen über 1 Hz stieg die diastolische Kraft (Vorspannung) stärker an als die systolische Kraft, was die Verringerung der Kontraktionsamplitude bei hohen Stimulationsfrequenzen erklärt. ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$, Bonferroni Post-Hoc-Test gegen 1 Hz Stimulationsfrequenz, Fehlerbalken: Standardfehler

β -adrenerge Stimulation Akute Herzschnitte aus Morrow-Myektomien reagierten deutlich auf eine β -adrenerge Stimulation mit Isoproterenol. Eine akkumulative Erhöhung der Isoproterenol-Konzentration führte zu einer steigenden Kontraktilität, die einem sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Verlauf mit einem durchschnittlichen EC_{50} -Wert von 179 ± 62 nM folgte (siehe Abb. 4.6). Die maximale Stimulation wurde bei circa 1 μ M Isoproterenol erreicht.

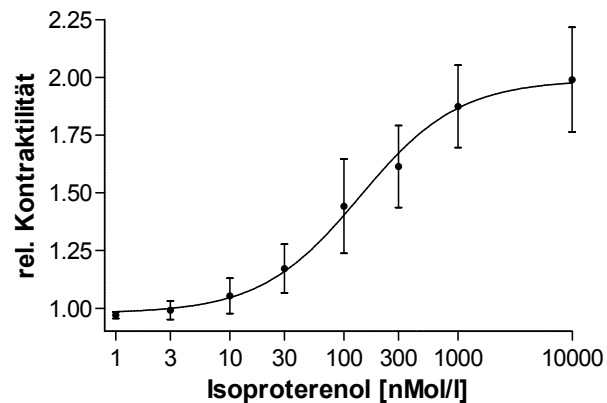


Abbildung 4.6: Dosis-Wirkungs-Kurve einer Isoproterenol Stimulation. Eine Erhöhung der Isoproterenol-Konzentration führte zu einer Erhöhung der Kontraktionskraft. $EC_{50} = 179 \pm 62$ nM, Kurve entspricht einer sigmoidalen Dosis/Wirkungsabhängigkeit mit der Steigung 1,012, Fehlerbalken: Standardfehler (n=3)

4.2.3 Humane Gewebeschnitte aus explantierten Herzen

Stückchen aus der Ventrikelwand explantierter Herzen konnten auch für die Herstellung vitaler Herzschnitte benutzt werden. Für die Etablierung geeigneter Schneidebedingungen wurde auf die Erfahrungen mit den Stückchen aus der Morrow-Myektomie zurück gegriffen.

Morphologie

Die Präparation und Logistik erforderten einen Optimierungsprozess. Die lange Lagerungszeit während des Transports von Hamburg nach Lübeck erforderte eine optimale Kardioprotektion. Um eine schnelle und vollständige Kühlung des Gewebes zu gewährleisten wurde nicht das gesamte Herz, sondern transmurale Stückchen von 1 cm³ Größe verschickt. Dies hatte auch den Vorteil, dass die Ähnlichkeit zu den Morrow-Proben den Einstieg in die Etablierung des Schneidens erleichterte.

Morphologisch unterschieden sich die Proben aus den explantierten Herzen nur leicht von den Morrow-Präparaten. Da aber patientenspezifisch unterschiedliche Grunderkrankungen vorlagen und die Herzen unterschiedlich starke Schädigungen aufwiesen, war die Qualität der Stückchen heterogener als bei den Morrow-Präparaten. So wies eine Probe sogar nekrotisches Myokard mit starker Bindegewebsdurchsetzung und Infarktnarben auf. Aus dieser Probe konnten keine funktionalen Schnitte erstellt werden. Mit der Verwendung von möglichst intaktem Myokard konnte dieses Problem vermieden werden, sodass aus allen weiteren Proben vitale Herzschnitte hergestellt werden konnten.

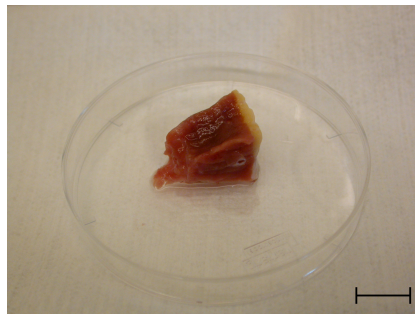


Abbildung 4.7: Präparat aus einem explantierten Herzen. Die epikardiale Seite befindet sich rechts. Balken: 1 cm

Kontraktilität

Auch aus explantierten Herzen konnten funktionale Herzschnitte gewonnen werden, die in Kraftmessungen eingesetzt wurden.

Vorspannungsabhängigkeit der Inotropie Bei Herzschnitten aus explantierten Herzen konnte die Inotropie auch durch Dehnung gesteigert werden. So führte eine Dehnung über mehrere Millimeter zu einer konstanten Erhöhung der Vorspannung (siehe Abb. 4.8). Auch die Kontraktilität wurde durch Dehnung gesteigert. Ab 1 mm relativer Dehnung im Vergleich zur relaxierten Ausgangslänge konnte die Kontraktionskraft aber nicht weiter gesteigert werden.

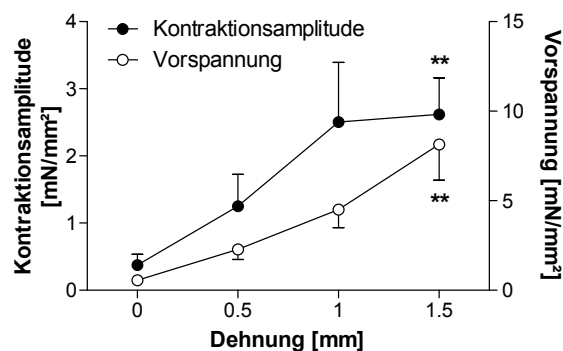


Abbildung 4.8: Vorspannungsabhängigkeit der Inotropie von akuten Schnitten aus explantierten Herzen (A) Durch Dehnung können Vorspannung und Kontraktionskraft signifikant gesteigert werden. **: $p < 0,01$, im One-way ANOVA mit Bonferroni Post-Hoc-Test gegen 0 mm Dehnung getestet, Fehlerbalken: Standardfehler ($n=6$)

Frequenzabhängigkeit der Inotropie Die Frequenzabhängigkeit der Inotropie war bei allen gemessenen Schnitten negativ. So führte eine Erhöhung der Stimulationsfrequenz zu einer Verringerung der Kontraktionsamplitude.

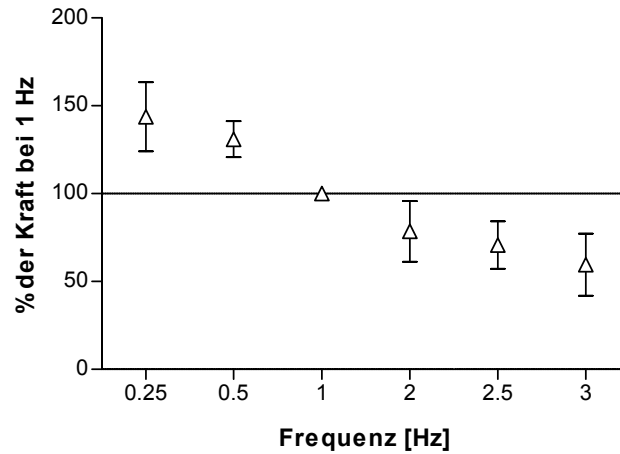


Abbildung 4.9: Frequenzabhängigkeit der Inotropie von akuten Schnitten aus explantierten Herzen: Alle Proben reagierten mit einer Reduktion der Kontraktionsamplitude auf eine Erhöhung der Stimulationsfrequenz (negativer Verlauf). Analyse mit One-way ANOVA ergab keine signifikante Abhängigkeit zwischen Kontraktilität und Stimulationsfrequenz, Fehlerbalken: Standardfehler (n=3)

4.3 Charakterisierung der Gewebeschnitte im Verlauf der Gewebeschnitt-Kultur

4.3.1 Optimierung der Kulturbedingung

Die Etablierung geeigneter Kulturparameter wurde analog zu der Etablierung der Schneideparameter an murinen Herzschnitten durchgeführt. Murine Herzschnitte boten den Vorteil, dass sie frühzeitig etabliert waren und in großen Mengen hergestellt werden konnten. Die Kultur wurde durch Variation des Kulturmediums, des Kultursubstrats und der Schnittdicke optimiert. Dabei führte die Optimierung des Kulturmediums zu einer signifikanten Verbesserung der Vitalität.

Kulturmedium Als eines der wichtigsten Bestandteile der Kulturetablierung war die Auswahl eines geeigneten Kulturmediums notwendig. Für Kardiomyozytenkulturen werden in der Literatur verschiedene Medien beschrieben. Meist werden weit verbreitete Basalmedien wie das Medium 199 oder DMEM verwendet. Bei den Zusätzen gibt es aber entscheidende Unterschiede. So wird bei einigen Formulierungen fötales Kälberserum (FCS) hinzugesetzt um eine bessere Kultivierbarkeit der Kardiomyozyten zu erreichen [Claycomb et al., 1984]. Dies kann aber gerade bei multizellulären Kulturen wie den Herzschnitten zum Problem werden, da undefinierte, im FCS enthaltene Wachstumsfaktoren zu einer verstärkten Zellproliferation beitragen können. Ähnliches wurde von der Aminosäure L-Glutamin berichtet. Proliferationsstarke Zellen, wie zum Beispiel Fibroblasten, könnten bei Verwendung dieser Zusätze die proliferationsschwachen Kardiomyozyten überwachsen. Aufgrund dieser Überlegungen wurde bewusst auf den Einsatz von FCS und L-Glutamin in den Kulturmedien verzichtet.

Im Gegensatz dazu gibt es aber auch Substanzkombinationen, die als förderlich für die Langzeitkultivierung von Kardiomyozyten beschrieben sind. Zu ihnen zählen die Kombinationen aus Insulin, Transferrin, Selen (ITS) [Viero et al., 2008] und aus Creatin, Carnitin, Taurin (CCT) [Volz et al., 1991]. Die Eignung der beiden Zusätze wurde in einer Versuchsreihe gegen das Basalmedium verglichen. Als Basalmedium wurde für die gesamte Versuchsreihe Medium 199 mit Penicillin und Streptomycin gewählt. Bereits nach einem Kulturtag waren deutliche Unterschiede zu erkennen. Kulturen, die mit ITS kultiviert wurden, zeigten eine vergleichbare Vitalität zum Standard, wobei die Kulturen mit CCT-Zusatz eine deutlich niedrigere Vitalität aufwiesen (Abb. 4.10). Nach zwei Kulturtagen waren die Unterschiede am deutlichsten. Der Zusatz von ITS brachte die

vitalsten Kulturen hervor, wobei CCT und die Kontrolle einen deutlichen Vitalitätsabfall zu verzeichnen hatten.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde bei der Kultivierung von humanen Herzschnitten Medium 199 mit Penicillin/Streptomycin und ITS eingesetzt.

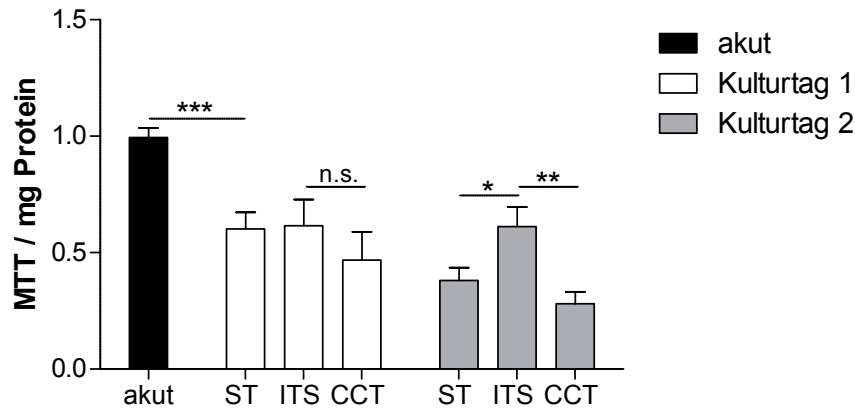


Abbildung 4.10: Vergleich des Effektes verschiedener Zellkulturzusätze auf die Vitalität muriner Herzschnitte nach einem und zwei Tagen Kultur. Nach einem Tag Kultur ist im Vergleich zum Akutwert unter allen Bedingungen ein signifikanter Abfall in der Vitalität zu erkennen. Nach zwei Tagen Kultur zeigte der Zusatz von ITS einen signifikanten Vorteil gegenüber den anderen Bedingungen. ST: Medium 199 + Penicillin/Streptomycin, ITS: ST + Insulin (10 mg/l) + Transferrin (5,5 mg/l) + Selen (5 µg/l), CCT: ST + Creatin (5 mM) + Carnitin (2 mM) + Taurin (5 mM), ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,05$, n.s.: $p > 0,05$ t-Test, (n=8-42) Fehlerbalken: Standardfehler

Kultursubstrat Zwei Möglichkeiten der Schnittlagerung wurden erprobt. Zum einen konnten die Schnitte frei schwimmend (submerged) in die Kulturschalen gelegt werden, zum anderen auf einem Untergrund fixiert werden. Wichtig bei der Auswahl der Lagerung war die Versorgung mit Sauerstoff. Eine schwimmende Lagerung der Schnitte erfordert den Einsatz eines Schüttlers, um durch die Bewegung den Gastransport innerhalb des Mediums zu erleichtern. Bei einer fixierten Lagerung boten sich anfangs Filtereinsätze an, welche eine Lagerung der Schnitte auf der Grenzfläche von Kulturmedium und Atmosphäre ermöglichten. Bei den Filtereinsätzen wurde zunächst auf PTFE Filter mit 0,4 µm Porengröße zurückgegriffen, mit denen Habeler et al. [Habeler et al., 2009] die

Kultur von fötalen humanen Herzschnitten über mehrere Wochen beschreibt.

Bei einem Vergleich beider Lagerungen stellte sich schnell heraus, dass die Herzschnitte die Adhäsion an ein Substrat benötigen, um die Form beizubehalten. Frei schwimmende Schnitte zeigten bereits nach einem Kulturtag durch eine unebene Morphologie deutliche Zeichen von Hyperkontraktur und eigneten sich somit nicht für weitere Versuche. Im Vergleich dazu erzeugte die Kultur auf dem Filter glatte Schnitte, welche auch in funktionale Messungen eingesetzt werden konnten.

In weiteren Tests wurde der Effekt verschiedener Filtermaterialien und Porengrößen auf die Vitalität muriner Herzschnitte ermittelt. Dafür wurden die Herzschnitte für zwei Tage auf den verschiedenen Filtern kultiviert und anschließend mit dem MTT-Test auf Vitalität getestet. Es zeigte sich, dass es bei allen Kulturfiltren nach einem Tag Kultur zu einem starken Abfall in der Vitalität kam. Zwischen den verschiedenen Filtermaterialien und Porengrößen zeigte sich im Vergleich zum Standardfilter (PTFE, 0,4 μm) aber kein signifikanter Unterschied (siehe Abb. 4.11).

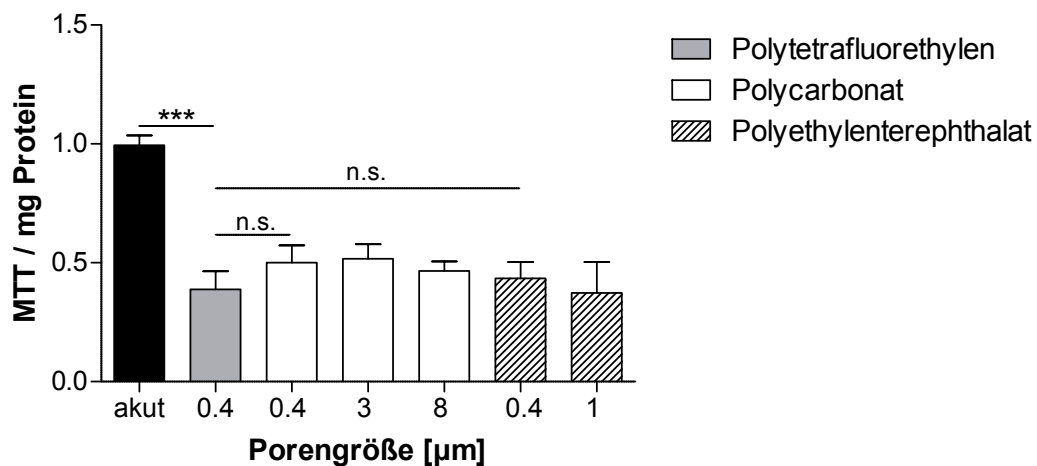


Abbildung 4.11: Auswirkungen von Material und Porengröße verschiedener Kulturfiltren auf die Vitalität von murinen Herzschnitten nach zwei Tagen Kultur mit Medium 199 + Penicillin/Streptomycin. Nach einem Kulturtag ist ein signifikanter Abfall in der Vitalität zu verzeichnen. Im Vergleich zum Standard (PTFE, 0,4 μm) zeigen weder das Material noch die Porengröße einen signifikanten Effekt auf die Vitalität der Herzschnitte. ***: $p < 0,001$, n.s.: $p > 0,05$ t-Test, ($n=6-42$) Fehlerbalken: Standardfehler

Schnittdicke Um die Auswirkung der Schnittdicke auf den Kulturerfolg zu testen, wurden 200 μm und 300 μm dicke Schnitte über 2 Tage mit Medium199 + Penicillin/Streptomycin auf Standardfiltern (PTFE 0,4 μm) kultiviert und anschließend mit dem MTT-Test ausgewertet. Nach zwei Tagen Kultur wiesen die 200 μm Schnitte eine signifikant geringere Vitalität auf als die 300 μm dicken Schnitte (siehe Abb. 4.12). Deshalb wurde die Schnittdicke für die folgenden Versuche auf 300 μm gesetzt.

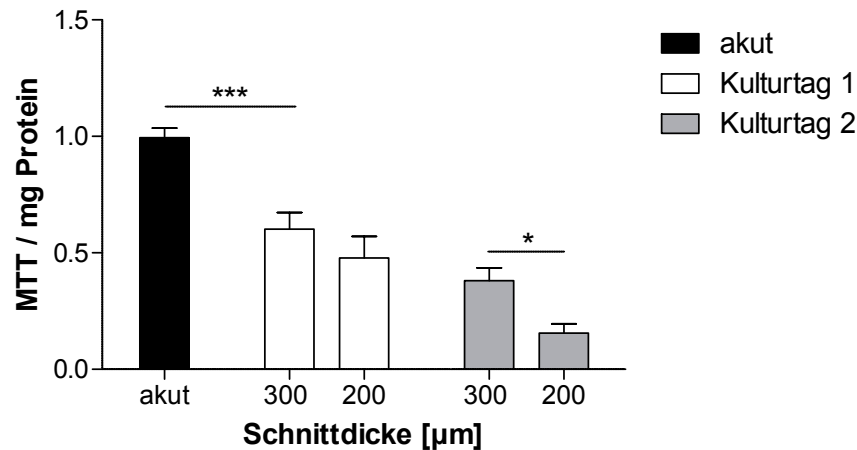


Abbildung 4.12: Auswirkungen der Schnittdicke auf die Vitalität von murinen Herzschnitten nach einem und zwei Tagen Kultur mit Medium 199 + Penicillin/Streptomycin. Nach zwei Kulturtagen sind die 200 μm Schnitte signifikant schlechter als die 300 μm Schnitte. ***: $p < 0,001$, *: $p < 0,05$, n.s.: $p > 0,05$ t-Test, $n = 6-42$, Fehlerbalken: Standardfehler

4.3.2 Charakterisierung der Gewebekulturen aus Morrow-Myektomien

Morphologie

Histologie Anhand von mit Hämalaun und Eosin gefärbten Paraffinschnitten konnte die Degeneration des kontraktilen Apparates während der Kultur nachvollzogen werden. Akute Gewebeschnitte wiesen eine vollständige Querstreifung auf, wohingegen selbst bei den besten Präparationen (n=3) die Schnitte nach 28 Tagen Kultur nur in 10% des gesamten Areals eine Querstreifung aufwiesen (siehe Abb. 4.13). Die meisten Zellen verloren während der Kultur hingegen die längliche Struktur.

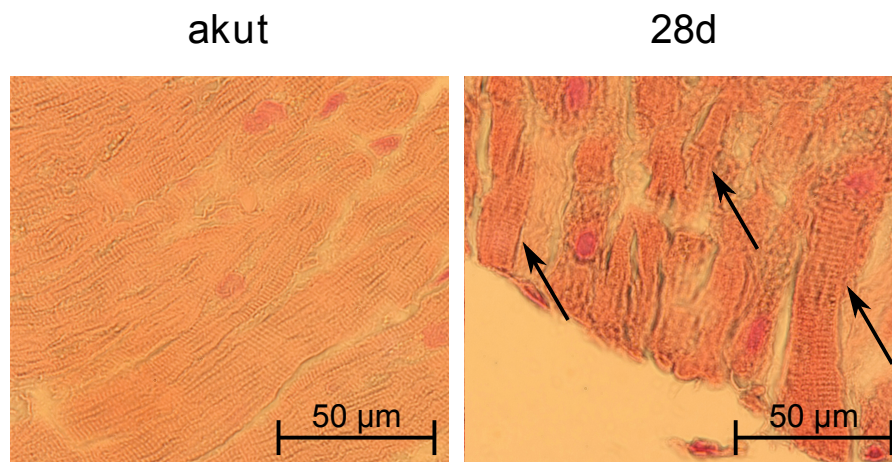


Abbildung 4.13: Hämalaun/Eosin gefärbter Paraffinschnitt eines akuten bzw. eines für 28 Tage kultivierten Myokardpräparats. Nach 28 Tagen Kultur sind nur noch vereinzelt Kardiomyozyten mit Querstreifung (↖) zu erkennen.

Vitalitätsfärbung Akute Schnitte waren an den Schnittträndern stark mit Far Red und Propidiumiodid gefärbt, wohingegen im Zentrum des Schnittes nur vereinzelt geschädigte Areale vorzufinden waren (siehe Abb. 4.14). Bei hoher Verstärkung des Far Red Signals wurden die gefärbten Plasmamembranproteine in der Mitte des Schnitts sichtbar, was als Diffusionskontrolle für den Farbstoff diente. Im Gegensatz zu den akuten Schnitten wiesen kultivierte Schnitte keine geschädigten Schnitttränder auf. Im Zentrum des Schnittes befanden sich nur wenige geschädigte Areale. Anhand der Syto9 Gegenfärbung war zu erkennen, dass der Großteil des Schnittes vital war.

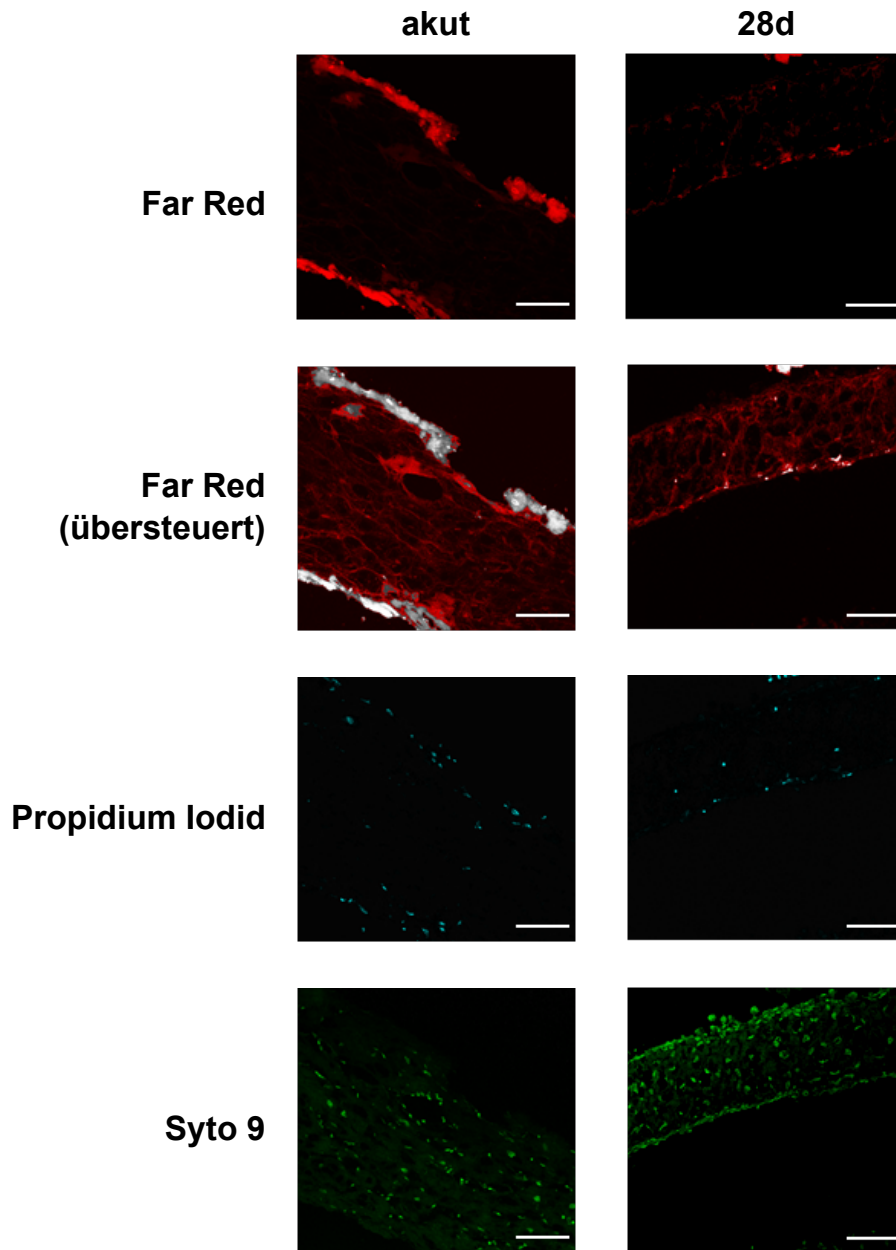


Abbildung 4.14: Vitalitätsfärbung im Querschnitt eines akuten und eines 28 Tage alten humanen Herzschnittes. Far Red und Propidiumiodid dringen in geschädigte Zellen ein und färben diese an. In der Übersteuerung der Far Red Färbung kann man gefärbte Plasmamembranproteine erkennen, was als Diffusionskontrolle dient. Mit Syto9 können Zellkerne gefärbt werden die nicht mit Propidiumiodid gefärbt sind. Im akuten Herzschnitt sind die geschädigten Schnitttränder deutlich zu erkennen. Nach 28 Tagen Kultur sind die geschädigten Schnitttränder verschwunden und der Schnitt weist eine hohe Vitalität auf. Balken: 100 µm

Verlauf der zellulären Differenzierung Ein bekanntes Problem bei der Kultur von humanen Primärzellen ist eine Verdrängung durch proliferationsstarke Fibroblasten, welche bei der Gewinnung von parenchymatösen Primärzellen (z.B. Kardiomyozyten) mit in die Kulturen gelangen. Bei den Herzschnitten wurde versucht, dieses Problem mit Hilfe eines geeigneten Mediums zu umgehen, mit dem Ziel, das Verhältnis zwischen Fibroblasten und Kardiomyozyten während der Kultur konstant zu halten.

Anhand der Vimentinfärbung zeigte sich, dass die Zahl der Fibroblasten nach 28 Tagen Kultur zwar gestiegen war, diese aber eher am Rand des Schnittes vorzufinden waren. Im Zentrum des Schnittes war das Verhältnis vergleichbar mit den akuten Schnitten. Die Aktinfärbung stellte den strukturellen Umbau des Gewebes ähnlich dar, wie die H&E-Färbung. Bei akuten Schnitten konnten Glanzstreifen erkannt werden (siehe Abb. 4.15), was nach 28 Tagen Kultur auf Grund des Umbaus nicht mehr möglich war. Trotzdem konnte das Strukturprotein Cardiotin, welches im Myokard parallel zum kontraktilem Apparat orientiert ist [Schaart et al., 1993] und bei der Dedifferenzierung von Kardiomyozyten vermindert exprimiert wird [Ausma et al., 1995, Driesen et al., 2009], auch noch nach 28 Tagen Kultur nachgewiesen werden.

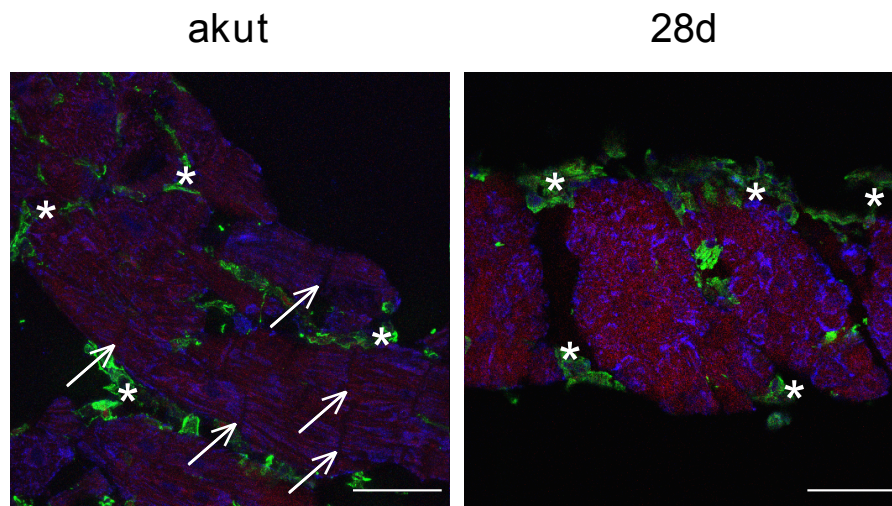


Abbildung 4.15: Immunhistologischer Vergleich zwischen einem akuten und einem 28 Tage alten humanem Herzschnitt. Im akuten Herzschnitt verläuft das Cardiotin (blau) parallel zum Aktin (rot). Glanzstreifen sind im akuten Schnitt deutlich zu erkennen (↗). Die Vimentinfärbung (grün) zeigt, dass sich die Fibroblasten zwischen den Kardiomyozyten befinden (*). Nach 28 Tagen Kultur ist die Anordnung des Aktins und Cardiotins diffus und es sind keine Glanzstreifen zu erkennen. Die Fibroblasten befinden sich hauptsächlich am Rand des Gewebeschnittes (*). Balken: 100 µm

Biochemischer Vitalitätstest Ein Vergleich der MTT-Werte zwischen akuten und kultivierten Schnitten zeigte keine signifikante Änderung des MTT-Umsatzes nach 28 Tagen Kultur (siehe Abb.4.16), sodass auch anhand der MTT-Daten von einer hohen Vitalität der kultivierten Herzschnitte ausgegangen werden kann.

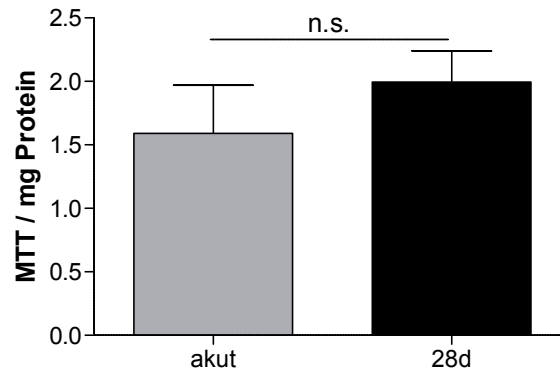


Abbildung 4.16: Vergleich des MTT Umsatzes zwischen akuten und für 28 Tage kultivierten humanen Herzschnitten. Im MTT-Test zeigten die kultivierten Herzschnitte eine durchschnittlich höhere Vitalität als die akuten Schnitte. Dieser Effekt war aber nicht signifikant. n.s.: $p > 0,05$ ($n=9-14$)

Kontraktilität

Die Kontraktilität ist ein wichtiger Parameter, der Aufschluss über die Vitalität und Funktionalität des Herzgewebes gibt. Um die Kulturmethode zu charakterisieren, wurden einzelne Schnitte während der Kulturphase entnommen und im Organbad gemessen.

Kraft-Dehnungs-Beziehung Die humanen Herzschnitte verloren innerhalb des ersten Tages stark an Kontraktilität. Im Durchschnitt konnte nach einem Kulturtage nur noch 10% der akuten Kontraktionskraft gemessen werden (Abb. 4.17 A). Während der ersten Kulturwoche blieb die Kontraktilität dann aber relativ stabil, wobei sie anschließend weiter absank, bis nach 21 Tagen ein Basalwert von 0,2 mN erreicht wurde. Der Verlust der Kontraktilität spiegelte sich auch in der Vorspannungsabhängigkeit der Inotropie wieder. So führte eine Dehnung von kultivierten Schnitten zu keiner messbaren Erhöhung der Vorspannung (Abb. 4.17 B,C). Vermutlich ist der Beitrag der elastischen Komponente zur Kraftentwicklung so gering, dass sie in diesem Versuchsaufbau nicht gemessen werden kann. Dennoch reagierten die kultivierten Schnitte auf eine Dehnung mit einer Steigerung der Kontraktionskraft.

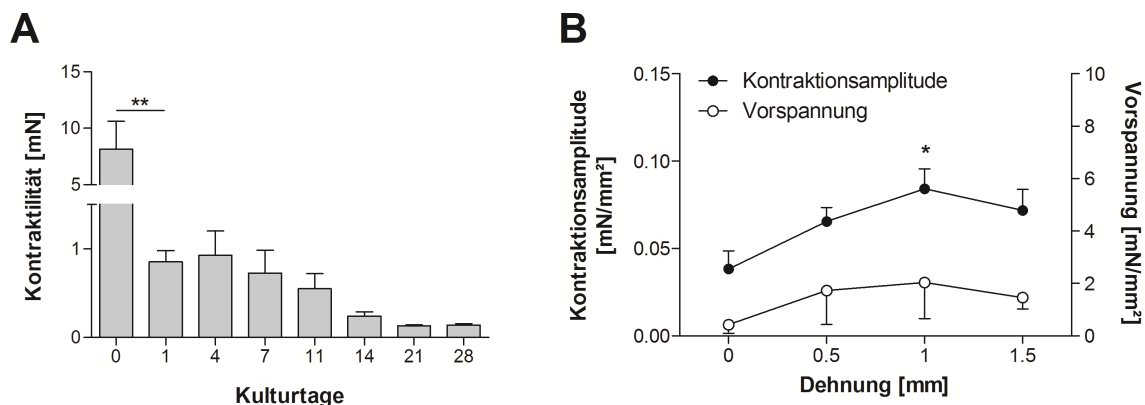


Abbildung 4.17: Kraftentwicklung humaner Herzschnitte während der Kultur (A) Nach einem Tag Kultur fällt die Kontraktionskraft auf circa 10% des Akutwertes. Nach vier Tagen Kultur sinkt die Kontraktilität weiter, bis nach 21 Tagen ein Basalwert von 0,2 mN erreicht wird. (B) Dehnung führte bei kultivierten Schnitten zu einer signifikanten Steigerung der Kontraktilität, nicht aber der Vorspannung. **: $p < 0,01$ *: $p < 0,05$ mit t-Test (A) oder One-way ANOVA mit Bonferroni Post-Hoc-Test gegen 0 mm Dehnung (B), ($n=3-8$), Fehlerbalken: Standardfehler

Kraft-Frequenz-Beziehung Analog zu den akuten Schnitten, zeigte die Kraft-Frequenz-Beziehung bei kultivierten Herzschnitten aus Morrow-Myektomien einen negativen Verlauf. Zwar steigt die Kontraktilität beim Übergang von 0,25 auf 0,5 Hz an, wechselt aber bei höheren Frequenzen in eine negative Form. Ähnlich wie bei den akuten Herzschnitten wird bei Stimulationsfrequenzen ab 2,5 Hz ein Plateau erreicht.

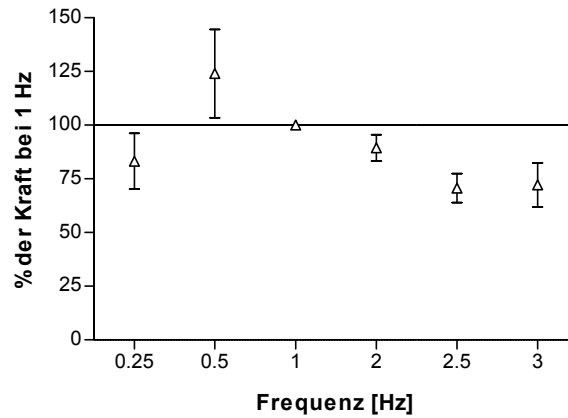


Abbildung 4.18: Kraft-Frequenz-Abhängigkeit bei kultivierten Schnitten. Obwohl zwischen 0,25 und 0,5 Hz ein Anstieg der Kontraktionskraft zu verzeichnen war, zeigte sich auch bei den kultivierten Schnitten ein negativer Verlauf der Frequenzabhängigkeit bei höheren Frequenzen. ANOVA, $p > 0,05$, ($n=4$)

Kraftentwicklung bei β -adrenerger Stimulation

Die Reaktivität auf β -adrenerge Substanzen ist ein wichtiger Parameter für die Funktionalität von Herzgewebe. Für die Charakterisierung wurde die Reaktivität auf Isoproterenol bei verschiedenen Konzentrationen getestet.

Kulturverlauf Während der Kulturphase traten Schwankungen in der Reaktivität auf eine β -adrenerge Stimulation auf. Am ersten Kulturtag war eine Verdreifachung der Reaktivität auf eine Isoproterenol Stimulation zu verzeichnen. In den darauf folgenden Kulturtagen sank die Reaktivität leicht ab, war aber immer noch doppelt so stark im Vergleich zu akuten Schnitten. Ab der zweiten Kulturwoche hat sich die Reaktion auf eine Isoproterenol-Stimulation wieder auf den Akutwert normalisiert und blieb für die restliche Kulturperiode konstant.

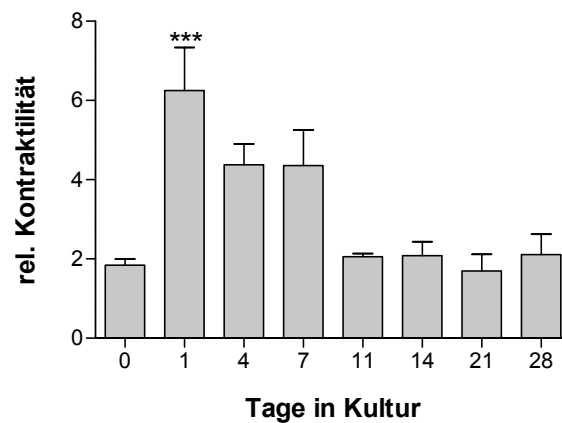


Abbildung 4.19: Verlauf der Reaktivität auf 1 μ M Isoproterenol in der Kultur. Nach einem Tag Kultur ist ein signifikanter Anstieg in der Reaktivität auf 1 μ M Isoproterenol zu erkennen. Nach 11 Tagen Kultur erreicht die Reaktivität wieder das Niveau eines akuten Schnittes. ***: $p < 0,001$, One-way ANOVA mit Bonferroni Post-Hoc-Test gegen rel. Kontraktilität an Tag 0, ($n=3-6$)

Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit Die unterschiedliche Reaktivität zeigte sich auch in den gemessenen Dosis-Wirkungs-Kurven. So unterschied sich der Maximaleffekt (E_{max}) einer Isoproterenol Stimulation zwischen akuten ($E_{max}=1.9\pm0,2$) und kultivierten Schnitten ($E_{max}=6,1\pm1,5$ bzw. $5,3\pm1,2$) zwar deutlich (Abb. 4.20 A,B), dennoch blieben die EC_{50} -Werte unverändert (Abb. 4.20 C). Nach sieben Tagen Kultur konnten keine Dosis-Wirkungskurven gemessen werden, da die Kontraktilität der Herzschnitte hierfür zu gering war.

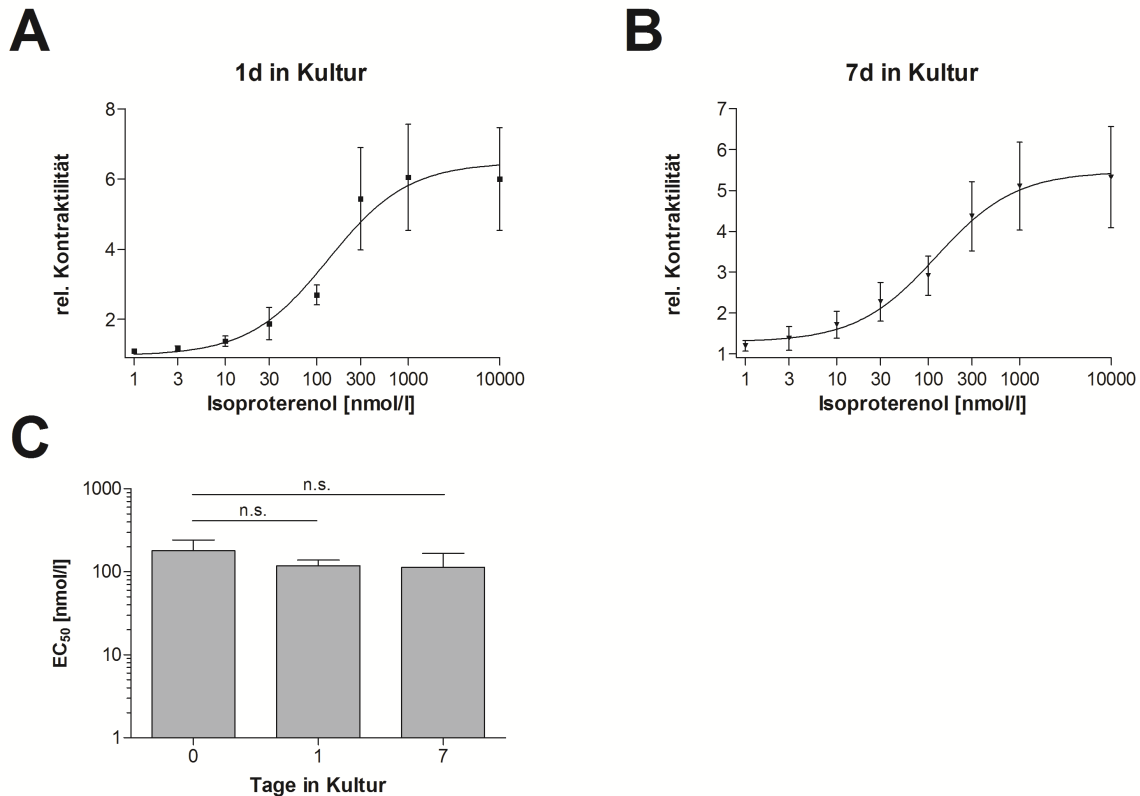


Abbildung 4.20: Dosis-Wirkungs-Kurven der Isoproterenol Stimulation von kultivierten Schnitten. (A,B) Eine kumulative Stimulation führte sowohl nach 1 wie auch nach 7 Tagen Kultur zu einer deutlichen Zunahme der Kontraktilität. (C) Es traten keine signifikanten Änderungen der EC_{50} -Werte während der Kultur auf. t-Test: n.s.: $p>0,05$ ($n=3$)

Genexpression

Die Genexpression auf mRNA Ebene liefert wichtige Erkenntnisse über die zelluläre Differenzierung der kultivierten Schnitte. Als funktional bedeutsame Gene wurden kardiomyozytäre Strukturgene wie das kardiale Myosin, Aktin, Titin und Connexin 43 [Kabaeva et al., 2002, Jiang et al., 2010, Linke et al., 1997, Betsuyaku et al., 2002], sowie Fibroblasten-Marker wie das Vimentin und der Discoidin Domain Receptor 2 (DDR2) untersucht.

Strukturelle Gene

Myosin Light Chain 2 Die Expression der Myosin Leichtkette 2 sank innerhalb des ersten Kulturtages auf circa 30%. Im weiteren Kulturverlauf verringerte sich diese dann noch weiter, bis nach einer Woche ein basaler Wert von ungefähr 20% des Ausgangswertes erreicht war. Dieser Wert blieb dann für die restliche Kulturdauer erhalten. Die mittlere Kopienzahl bei den akuten Schnitten betrug 215459531.

Kardiales Aktin Auch die Expression des Aktins sank innerhalb des ersten Kulturtages auf circa 30%. Im Laufe der Kultur normalisierte sich die Genexpression wieder, sodass ab der zweiten Woche wieder das Expressionsniveau von akuten Schnitten erreicht wurde. Die mittlere Kopienzahl bei den akuten Schnitten betrug 74305861.

Titin Das Strukturprotein Titin wurde bei kultivierten Schnitten durchschnittlich etwas schwächer exprimiert als bei den akuten Kontrollen. Dennoch blieb die Expression während der gesamten Kulturperiode auf einem konstanten Niveau. Die mittlere Kopienzahl bei den akuten Schnitten betrug 24016160.

Connexin 43 Auch das Connexin 43 wurde während der gesamten Kulturdauer konstant exprimiert. Dabei wich es aber im Vergleich zu den anderen Genen am geringsten von den akuten Schnitten ab. Die mittlere Kopienzahl bei den akuten Schnitten betrug 1106843.

RNA-Gehalt Der RNA-Gehalt der Proben zeigte über den gesamten Kulturverlauf keine signifikante Veränderung, was für eine hohe Vitalität der kultivierten Schnitte spricht.

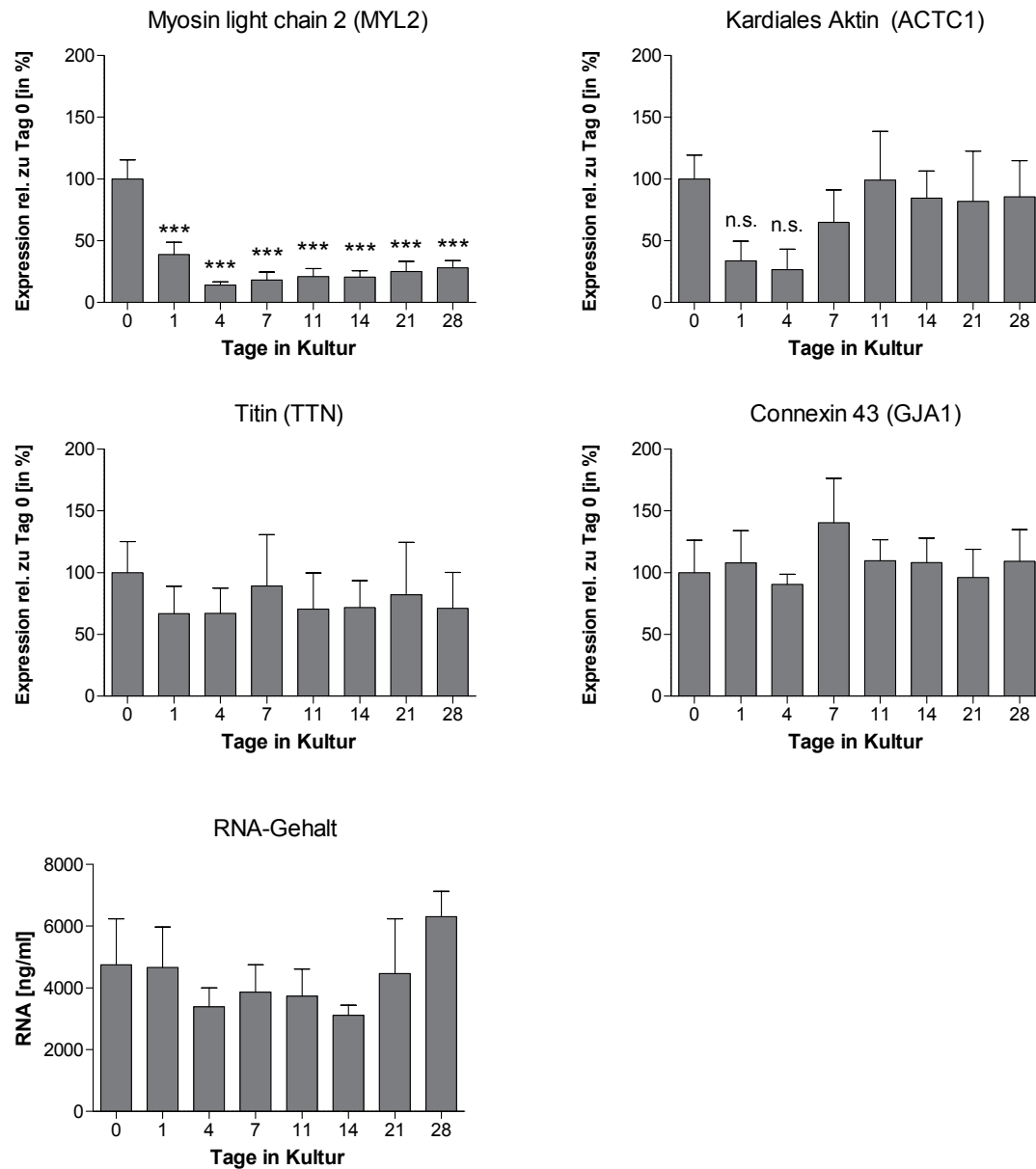


Abbildung 4.21: Verlauf des mRNA-Gehaltes von wichtigen kardialen Strukturgenen. Die Expression der Myosin Leichtkette 2 sank innerhalb des ersten Kulturtages signifikant und blieb für die restliche Kultur auf einem niedrigen Niveau. Auch die Expression des kardialen Aktins sank innerhalb des ersten Kulturtages, erreichte während der Kultur aber wieder das Niveau der akuten Schnitte. Die Expression von Titin und Connexin 43 sowie der RNA-Gehalt veränderten sich nicht signifikant in der Kultur. ***: $p < 0,001$, n.s.: $p > 0,05$, One-way ANOVA mit Bonferroni Post-Hoc-Test gegen Tag 0 getestet ($n=6-8$)

Fibroblasten-Marker

Vimentin Einer der bekanntesten Fibroblasten-Marker ist das Vimentin, welches als Intermediärfilament im Herzen von nicht kardiomyozytären Zellen exprimiert wird [Speiser et al., 1992]. Während der Kultur wurde es immer stärker exprimiert. Innerhalb der zweiten und dritten Woche wurde ein Plateau erreicht, wobei nach vier Wochen die höchste Expression zu verzeichnen war. Die mittlere Kopienzahl bei den akuten Schnitten betrug 3870211.

DDR2 Der Discoidin Domain Receptor 2 (DDR2) ist ein alternativer Fibroblastenmarker, der spezifisch für kardiale Fibroblasten ist [Goldsmith et al., 2004]. Die Expression des DDR2 stieg in den ersten beiden Kulturwochen auf das Dreifache an. Während der verbleibenden Kulturdauer war aber keine deutliche Steigerung zu verzeichnen. Die mittlere Kopienzahl bei den akuten Schnitten betrug 225673.

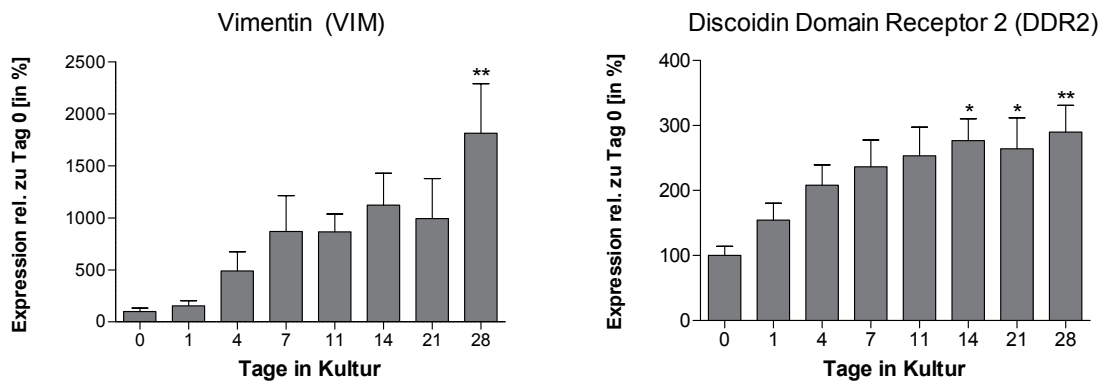


Abbildung 4.22: Verlauf des mRNA-Gehaltes von wichtigen Fibroblastengenen. Die Expression von Vimentin und DDR2 stieg während der Kultur signifikant an, wobei sich die Werte nach zwei Wochen Kultur stabilisierten. **: $p < 0,005$, *: $p < 0,05$, One-way ANOVA mit Bonferroni Post-Hoc-Test gegen Tag 0 getestet ($n=6-8$)

4.3.3 Charakterisierung der Gewebekulturen aus explantierten Herzen

Explantierte Herzen stellen eine attraktive Alternative als Gewebequelle im Vergleich zu überschüssigem Gewebe aus Herzoperationen (z.B. der Morrow-Myektomie) dar. Der Nachteil der geringen Verfügbarkeit explantierter Herzen wird durch die hohe Ausbeute an Herzschnitten ausgeglichen. Mit einer erfolgreichen Kulturmethode können so auch Phasen geringer Verfügbarkeit überwunden werden.

Vitalität

Zur Überprüfung der Vitalität wurden an verschiedenen Kulturtagen Proben im MTT-Test gemessen. Im Verlauf zeigte sich keine signifikante Änderung der Vitalität.

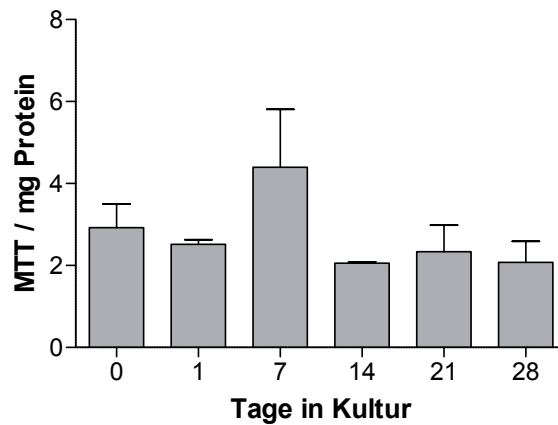


Abbildung 4.23: Verlauf der Vitalität von Herzschnitten aus explantierten Herzen gemessen mit dem MTT-Test. Die Vitalität bleibt während der gesamten Kulturzeit erhalten und weist zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Änderung zum Akutwert auf. One-Way ANOVA, (n=2-3)

Kontraktilität

Auch bei explantierten Schnitten war ein Abfall der Kontraktionskraft während der Kultur zu beobachten. Nach einem Tag betrug die durchschnittliche Kontraktilität nur noch circa 15% im Vergleich zu den akuten Schnitten. Im Gegensatz zu den ventrikulären Schnitten aus der Morrow-Myektomie fiel die Kontraktilität bei den explantierten Schnitten in der ersten Woche kontinuierlich ab. Danach blieb die Kontraktilität für den Rest der Kulturphase konstant.

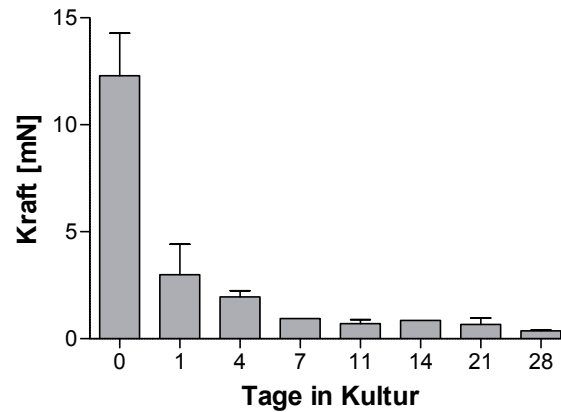


Abbildung 4.24: Verlauf der Kontraktilität. Nach einem Tag Kultur fällt die Kontraktionsamplitude auf circa 15% des Akutwertes. Diese Kraft fällt im Verlauf der Kultur kontinuierlich ab, bis nach einer Woche Kultur ein stabiles Niveau erreicht wird das für die restliche Kulturzeit gehalten wird. (n=2-9)

β -adrenerge Stimulation

Auch bei Herzschnitten aus explantierten Herzen wurde die Reaktion auf eine β -adrenerge Stimulation mit Isoproterenol getestet. Im Vergleich zu den Morrow-Präparaten trat eine verstärkte Reaktivität erst nach vier Kulturtagen auf. Zudem reagierten die Schnitte nach 11 Tagen Kultur kaum auf eine Isoproterenol-Stimulation.

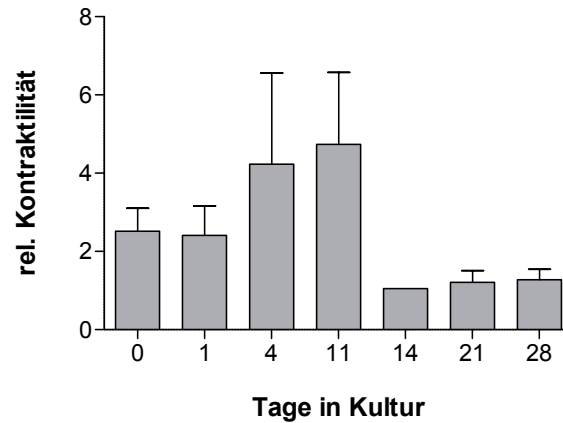


Abbildung 4.25: Verlauf der Isoproterenol Stimulation. Nach einem Tag Kultur zeigten Schnitte aus explantierten Herzen eine verstärkte Reaktivität auf 1 μ M Isoproterenol. Nach 11 Tagen Kultur sank die Isoproterenol Reaktivität unter das Niveau der akuten Schnitte. (n=2-4)

4.4 Vergleich humaner Präparate

4.4.1 Kulturerfolg

Der Kulturerfolg bedingt maßgeblich die Eignung eines Präparates für die routinemäßige Erstellung und Nutzung humaner Herzschnitte. So konnten Schnitte aus explantierten Herzen, wie auch aus Morrow-Myektomien für bis zu vier Wochen in Kultur gehalten werden. Dabei zeigen Schnitte aus explantierten Herzen eine geringere Überlebensrate (Kriterium: Kraft $> 0,2$ mN) als Schnitte aus der Morrow-Myektomie.

Herzschnitte aus dem Vorhofrohr waren nicht für die Langzeitkultivierung geeignet. Zudem war die Präparation von akuten Vorhofschnitten, im Vergleich zu den ventrikulären Schnitten, weniger erfolgreich.

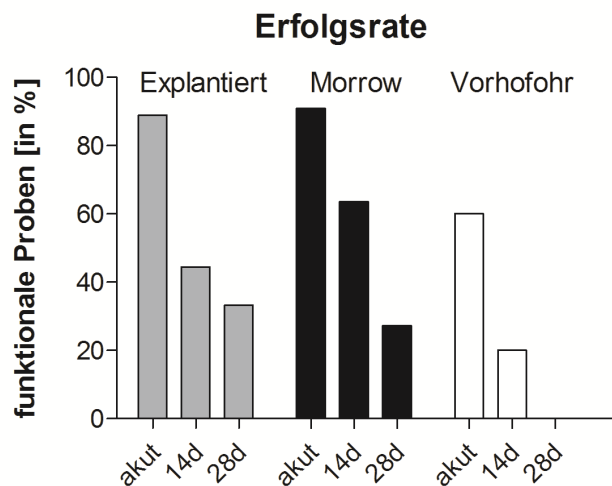


Abbildung 4.26: Vergleich des Kulturerfolgs von Schnitten aus verschiedenen humanen Präparaten anhand der Funktionalität in der Kraftmessung (Kriterium: Kraft $> 0,2$ mN). Aus explantierten Herzen und Morrow Myektomien konnte in den meisten Präparationen Schnitte in einer Akutmessung eingesetzt werden. In der Kultur verhielten sich diese Präparate auch sehr ähnlich. Explantierte Herzen konnten aber weniger erfolgreich über 14 Tage in Kultur gehalten werden. Schnitte aus dem Vorhofrohr konnten zu circa 60% in akuten Messungen eingesetzt werden. In der Kultur zeigten die Schnitte aber eine wesentlich geringere Kraftentwicklung als die anderen Präparate. Gesamtanzahl verwendeter Proben: Explantiert: $n=9$, Morrow: $n=11$, Vorhofrohr: $n=5$

4.4.2 Verfügbarkeit

Anhand der erhobenen Daten kann ein Vergleich zwischen den verschiedenen Quellen humanen Myokards angestellt werden (Tab. 4.2). Die Eignung der Proben für die Generierung von Herzschnitten hing stark von der Verfügbarkeit des Gewebes ab. Bei der Planung der Studie konnte von einer guten Verfügbarkeit von Vorhofohren ausgegangen werden. Da diese Operationstechnik mittlerweile nicht mehr so oft angewandt wird, standen während der Studie nur wenige Präparate zur Verfügung. Ein weiteres Problem war die geringe Ausbeute. Da das Herzohr nur wenig Muskel enthält, konnten pro Präparation nur circa 5 Schnitte gewonnen werden. Zusammen mit der erschwerten Präparation trug dies dazu bei, dass andere Quellen für humanes Myokard genutzt wurden.

Im Vergleich zu den Vorhofohren war die Verfügbarkeit der Stückchen aus der Morrow-Myektomie höher. So konnten in regelmäßigen Abständen ventrikuläre Herzschnitte erstellt werden (Tab. 4.2). Im Vergleich zu den Vorhofohren können ungefähr doppelt so viele Schnitte aus einem Morrow Stück gewonnen werden. Die Tatsache, dass sich die Schnitte auch über mehrere Wochen in Kultur halten ließen, führte zu einer starken Verbesserung der Verfügbarkeit.

Die Verfügbarkeit von humanem Gewebe konnte mit der Etablierung von ventrikulären Schnitten aus dem explantierten Herzen noch weiter gesteigert werden, obwohl eine Herztransplantation viel seltener als eine Morrow-Myektomie ist. Dies lag an der hohen Ausbeute aus explantierten Herzen. Aus einem Herzen konnten gleich mehrere Stückchen gewonnen werden, wovon jeweils 20 Schnitte gewonnen werden konnten.

Quelle	Herzohr	Morrow-Myektomie	explantiertes Herz
Gewebe	Vorhof	Ventrikel	Ventrikel
Verfügbarkeit	gering	mäßig	gering
Anzahl der Schnitte	<10	12	>20
Kontraktionskraft (mN)	2	10	10
Haltbarkeit in Kultur (d)	<14	28	28

Tabelle 4.2: Vergleich verschiedener humaner Gewebequellen

5 Diskussion

5.1 Verfahren zur Präparation frischer Myokardschnitte

5.1.1 Stand der Technik

Organotypische Gewebeschnitte wurden erstmals 1976 von Viktorov et al. aus neuronalem Gewebe hergestellt [Viktorov & Khaspekov, 1976]. Fünf Jahre später publizierte Gähwiler erste Kultivierungen organotypischer Schnitte [Gähwiler, 1981]. Seitdem wurden organotypische neuronale Gewebeschnittkulturen stetig weiterentwickelt und haben sich als nützliches Modellsystem für verschiedene Gehirnregionen erwiesen [Cho et al., 2007]. Die Methode trug zu einem besseren Verständnis der Entwicklung und Pathophysiologie des Gehirns bei.

Die Technik konnte auch auf andere Organe wie Leber [Hart et al., 1983], Niere [Ruegg et al., 1987] und Lunge [Stefaniak et al., 1988] übertragen werden. Die Herstellung akuter myokardialer Gewebeschnitte ist lange Zeit jedoch nicht gelungen. Erste myokardiale Gewebeschnitte eigneten zunächst nur für Toxizitätstests [Neri et al., 1984, Cini-Neri & Neri, 1986]. Die erstellten Gewebeschnitte konnten für 24 Stunden in Kultur gehalten werden und wurden mit histologischen und biochemischen Methoden charakterisiert [Parrish et al., 1995]. Kürzlich ist es aufgrund verbesserter Präparationsbedingungen jedoch gelungen, akute Gewebeschnitte aus neonatalen Mäuseherzen herzustellen [Pillekamp et al., 2005] und mit Hilfe von Kraftmessungen zu charakterisieren [Pillekamp et al., 2007]. Durch Zugabe von Isoproterenol, Carbachol und Nifedipin wurde die Kontraktilität pharmakologisch beeinflusst. Im Folgenden konnten die Herzschnitte für *in vitro* Studien der Stammzelldifferenzierung genutzt werden [Pillekamp et al., 2009]. In einer weiteren Studie wurde die Herzschnitttechnik auf adulte Meerschweinchenherzen übertragen, wobei auch die Generierung von adulten humanen Herzschnitten aus dem Vorhof beschrieben wurde [Bussek et al., 2009]. Habeler et al. ist es erstmals gelungen humane fötale Herzschnitte für einen längeren Zeitraum zu kultivieren [Habeler et al., 2009]. Die bislang längste Kulturzeit von adultem multizellulärem

Myokardpräparaten konnte mit Trabekeln über einen Zeitraum von mehreren Tagen erzielt werden [Janssen et al., 1998]. Die Herstellung organotypischer Langzeitkulturen aus adultem humanem Myokard war bislang jedoch noch nicht erfolgreich.

5.1.2 Mögliche Quellen für Myokardgewebe

Herzschnitte aus Versuchstieren waren in der Anfangsphase, sowie in Phasen geringer Verfügbarkeit humaner Proben wichtige Präparate. Die Erstellung von Herzschnitten aus Mäusen und Ratten war standardisiert durchführbar, wohingegen die Übertragung der Methodik auf größere Versuchstiere wie Ziegen und Schweine nicht möglich war. Die wahrscheinlichste Erklärung für diesen Unterschied ist die unterschiedliche Vorbehandlung des Myokards. Kleine Nagetiere wurden ausschließlich für die Entnahme des Herzens getötet. Dadurch konnte auch die Anästhesie und Tötungsmethode angepasst werden. So stellte sich bei Ratten zum Beispiel eine Isofluranbetäubung mit anschließender Dekapitation als optimal heraus. Eine Variation des Protokolls konnte die Vitalität der gewonnenen Schnitte stark beeinträchtigen. Volatile Anästhetika können durch Präkonditionierung zu einer Kardioprotektion führen [Zaugg et al., 2002]. Vermutlich reichte die kurze Inkubationszeit von wenigen Minuten nicht aus, um kardioprotektive Wirkungen zu erzielen, sodass präletaler Stress sowie eine postletale Gewebehypoxie zu einer Schädigung des Gewebes führen konnten. Bei Präparaten aus Großtierversuchen, wie zum Beispiel aus der Ziege oder dem Schwein, konnte kein Einfluss auf die Anästhesie oder Tötung der Tiere genommen werden. Die Tiere wurden für andere Studien genutzt, wobei die Bereitstellung von Herzproben eine untergeordnete Rolle spielte. Vermutlich führten die Vorbehandlungen und eine postletale Gewebeischämie zu einer Schädigung des Myokards, was die Erstellung vitaler Gewebeschnitte erschwerte.

Im Vergleich zum Myokard aus den Großtieren war die Erstellung von humanen Herzschnitten erfolgreicher. Vermutlich führte die längere Einwirkzeit volatiler Anästhetika zu einer Präkonditionierung des Gewebes. In dieser Studie konnten ventrikuläre Herzproben aus der Morrow-Myektomie und aus explantierten Herzen oder atriale Proben aus dem Vorhofohr für die Erstellung von Herzschnitten verwendet werden. Damit wurden die häufigsten humanen Herzpräparate getestet, die regelmäßig bei Herzoperationen entfernt werden. Die Erstellung von humanen Herzschnitten aus explantierten Herzen erscheint besonders vorteilhaft, da aus einem Präparat hunderte Schnitte generiert werden können, die mit Hilfe der Kultur für einen langen Zeitraum zur Verfügung stehen und dabei funktional bleiben. Die Benutzung explantierter Herzen ist ethisch unbedenklich, da das Gewebe immer nach einer Herztransplantation anfällt und danach nicht

weiter verwendet wird. In unseren Versuchen konnten wir zeigen, dass die Präparate gut versendbar sind, sodass die Erstellung der Schnitte unabhängig vom Ort der Herztransplantation ist.

In dieser Studie wurde menschliches Myokard nur verwendet, wenn es aufgrund einer Vorerkrankung, wie Hypertrophie oder Herzinsuffizienz entfernt werden musste. Es ist anzunehmen, dass humane Herzschnitte aus gesunden Herzen ähnlich gut geschnitten und kultiviert werden können wie erkrankte. Eine mögliche Quelle für gesundes adultes Myokard wären Spenderherzen, bei denen kein geeigneter Empfänger gefunden werden kann. Diese Präparate stehen der Forschung aber nicht zur Verfügung, da jeder erdenkliche Einfluss auf die therapeutischen Maßnahmen vermieden werden muss.

5.1.3 Logistik

Die Verwendung von humanen Präparaten aus Herzoperationen forderte eine optimale Logistik, um mögliche Schäden durch Lagerung und Transport am Gewebe zu vermeiden. Es stellte sich heraus, dass humane Herzproben von circa 1 cm³ Größe auch nach bis zu 30 Stunden Lagerung in 4°C kaltem Schneidepuffer zu vitalen Herzschnitten verarbeitet werden konnten. Diese Beobachtung steht nicht in Einklang mit dem aktuellen Stand der Herztransplantationstechnik, nach dem Spenderherzen maximal 4 Stunden unter kalter Kardioplegie transportiert werden können [Jeevanandam, 2010]. Dabei korreliert die Transportzeit mit der post-operativen Lebenserwartung des Empfängers [Goldsmith et al., 2009]. Im Gegensatz zu Myokardproben wird die Lagerungszeit von Spenderherzen nicht nur durch ein Überleben der Cardiomyozyten begrenzt, sondern setzt einen Funktionserhalt des gesamten Organs voraus. So kann eine Schädigung der Gefäße post-operativ zu einer erhöhten Antigenpräsentation an den Endothelzellen führen, was zur Abstoßung des Organs führen kann [Wilhelm et al., 1998, Häyry et al., 1999, Tilney, 1999]. Dieses Problem tritt bei dem Transport von Myokardproben für die Schnittherstellung nicht auf, was eine längere Lagerungszeit ermöglicht. Ein weiterer entscheidender Unterschied zwischen der Lagerung der von uns verwendeten humanen Herzpräparate und Spenderherzen ist die Zusammensetzung der kardioplegischen Lösung. Im Gegensatz zu gängigen kardioplegischen Lösungen, die bei Herztransplantationen eingesetzt werden, enthält der Schneidepuffer, in dem unsere Proben gelagert wurden, die Substanz 2,3-Butanedion-Monoxim (BDM). Es ist bekannt, dass die Verwendung von BDM in kardioplegischen Lösungen zu einer deutlichen Verlängerung der Lagerungszeit führt. So konnten Trabekel aus Schweineherzen für bis zu 42 Stunden in BDM-haltiger Lösung (4°C) gelagert und anschließend in Kontraktionsmessungen ein-

gesetzt werden [Vahl et al., 1995]. Dieser Effekt wird mit einem niedrigeren Energieverbrauch des Myokards unter BDM Einfluss begründet (siehe Kapitel 5.1.4). Eine weitere Erklärung für die lange Lagerfähigkeit des Myokards könnte in einer durch Kälte erzeugten Präkonditionierung des Gewebes liegen. Es wurde bereits gezeigt, dass Myokard nach kalter Kardioplegie resistenter gegenüber Ischämie ist [Cleveland et al., 1997]. Die durch Hypothermie erzeugte Kardioprotektion kann auf verschiedene intrazelluläre Ereignisse zurückgeführt werden. Zum einen wird der Energieverbrauch unter Hypothermie gesenkt und eine Übersäuerung durch Laktat vermieden, was sich in der Reperusionsphase positiv auf das Überleben des Myokards auswirkt. So wird der Glukose- und ATP-Verbrauch sowie die Laktatproduktion durch eine Absenkung der Temperatur signifikant gesenkt [Ichihara et al., 1981, Jones et al., 1982]. Zusätzlich führt eine Hypothermie zu einem Schutz vor dem Calcium-Paradox in Folge einer Calciumüberladung. Bei niedrigen Temperaturen sinkt die Fluidität der Plasmamembran und deren Leitfähigkeit für Ionen [McMurchie et al., 1973, Holland & Olson, 1975]. Zudem sinkt die Aktivität des Natrium-Calcium-Austauschers, sodass es während kalter Ischämie zu einem Erhalt der intrazellulären Ionenkonzentrationen kommt.

Insgesamt ist die Lagerfähigkeit auf einen verminderten Energieverbrauch, eine Vermeidung von Übersäuerung, sowie einem Erhalt der intrazellulären Ionenkonzentrationen zurück zu führen. Dies konnte durch eine kalte Lagerung in BDM-haltiger Lösung erreicht werden. Da die verwendeten Myokardproben aufgrund ihrer geringen Größe und Komplexität weniger starke Anforderungen an die kardioplegischen Bedingungen stellten, konnten sie längeren Lagerungszeiten ausgesetzt werden als Spenderherzen für eine Herztransplantation. Aufgrund dieser Erkenntnisse wird der Transport humaner Myokardproben über große Distanzen möglich. Dies ermöglicht eine Verwendung der humanen Herzschnitttechnologie unabhängig von der örtlichen Verfügbarkeit humaner Myokardproben.

5.1.4 Schneidebedingungen

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung geeigneter Kulturbedingungen für die Langzeitkultivierung von humanen Herzschnitten. Um dieses Ziel zu erreichen, mussten zunächst geeignete Parameter für die Generierung von humanen Herzschnitten gefunden werden. Dazu konnte auf Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen zurückgegriffen werden. Die Studie von Pillekamp et al. lieferte zu Anfang der Untersuchungen die Methodik zur Generierung vitaler neonataler muriner Herzschnitte [Pillekamp et al., 2007]. Für die zuverlässige Erzeugung adulter Herzschnitte wurden zahlreiche Bedingungen des Schneidens

schrittweise und systematisch optimiert.

Bei der Erstellung der ersten Herzschnitte kam es oft zu Hyperkontraktionen auf Grund des nominalen Calciumentzugs während der Präparation. Dieses Phänomen ist in der Literatur als Calcium-Paradoxon bekannt und stellt ein wesentliches Problem bei der Präparation isolierter Kardiomyozyten dar [Powell & Twist, 1976]. So führt ein Calciumentzug bei den Kardiomyozyten zu einer unspezifischen Erhöhung der Membranleitfähigkeit, was während einer Recalcifizierung zu einem erhöhten Calciumeinstrom führt, sodass der Calciumentzug paradoxerweise indirekt eine Hyperkontraktion bewirkt [Altschuld et al., 1991]. Eine schonende Recalcifizierung konnte das Ergebnis zwar verbessern, dennoch war die Heterogenität für ein Routineverfahren immer noch zu hoch. Da die Kontraktionshemmung während der Präparation nicht allein durch den Calciumentzug, sondern auch durch Zusatz von 2,3-Butanedion-Monoxim (BDM) erreicht wurde, konnte dem Schneidepuffer 0,9 mM Calcium zugesetzt werden, ohne dass es zu einer Schädigung des Gewebes kam. BDM verursacht konzentrationsabhängig vielseitige Effekte [Gwathmey et al., 1991]. So kann BDM in Konzentrationen über 2 mM die Calciumempfindlichkeit der Myofibrillen senken [Fryer et al., 1988] und hat ab Konzentrationen über 5 mM Einfluss auf die intrazelluläre Calciumkonzentration [Blanchard et al., 1990]. Ab einer BDM-Konzentration von 7,5 mM kann die Kontraktilität fast vollständig (98%) blockiert werden, wobei BDM-Konzentrationen ab 20 mM elektrophysiologische Veränderungen hervorrufen [Hui & Maylie, 1991]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass BDM in Konzentrationen über 15 mM die Transkription vieler Ionenkanäle, Ionenaustauscher, Ca^{2+} -bindender Proteine und Proteine des Zytoskeletts hochreguliert [Borlak & Zwadlo, 2004]. Bei niedrigen Temperaturen kann mit BDM aber ein kardioprotektiver Effekt erzielt werden [Hebisch et al., 1993]. Dies ermöglichte die Vermeidung eines initialen Calciumentzuges, sodass vitale murine Herzschnitte mit höherer Reproduzierbarkeit hergestellt werden konnten. Vermutlich führte die geringe Calciumkonzentration zu einer besseren Resistenz gegenüber Hyperkontraktionen bei der Recalcifizierung, weil der Calciumeinstrom bei der Recalcifizierung weniger stark ausgeprägt war als nach einem Calciumentzug.

Ein weiterer, für die Vitalität der gewonnenen Schnitte maßgeblicher Parameter, ist die Schnittdicke. Eine große Schnittdicke erschwert die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen in der Mitte des Schnittes. Die Schnitte würden in Langzeitversuchen eine verminderte Vitalität und Funktionalität aufweisen. In der Literatur wird von Schnittdicken zwischen 200 μm und 1 mm berichtet [Pillekamp et al., 2005, Drouin et al., 1995, Ghosh et al., 2001, Kohzuki et al., 2001], wobei eine Schnittdicke zwischen 200 μm und

300 μm als optimal für eine ausreichende Sauerstoffversorgung kardialer Gewebeschnitte erachtet wird [Parrish et al., 1995]. Auf Grund dieser publizierten Erfahrungen wurde die Vitalität von 200 μm und 300 μm dicken Herzschnitten verglichen. Die Benutzung einer geringen Schnittdicke hätte nicht nur zu einer verbesserten Versorgung des Gewebes, sondern auch zu einer erhöhten Ausbeute geführt. Im Vergleich waren die 200 μm Schnitte aber weniger vital und deutlich heterogener als die 300 μm Schnitte. Besonders die Heterogenität der Schnitte stellte sich als Problem für die Standardisierung heraus. Vermutlich werden dünnere Schnitte beim Schneiden stärker beansprucht als dickere.

Im Gegensatz zum Myokard von Schwein oder Ziege konnte humanes Myokard zu vitalen Schnitten verarbeitet werden. Vermutlich stellte die optimale Versorgung während des Eingriffs den entscheidenden Unterschied zu den Großtierversuchen dar. Auch im Vergleich zu Myokardschnitten von Nagetieren waren humane Schnitte robuster und einfacher zu handhaben. Diese Beobachtung könnte der unterschiedlichen Dimensionierung und Stoffwechselrate des Gewebes zugrunde liegen. Es ist denkbar, dass Zellen mit hoher Stoffwechselrate schneller irreversibel geschädigt werden als Zellen mit langsamem Stoffwechsel. Dies zeigte sich bereits bei einem Speziesvergleich der zeitabhängigen Ischämieschädigung. So wurde in der Ratte bereits nach 41 min Ischämie eine halbmaximale Schädigung beobachtet, wofür beim Menschen 288 min Ischämie benötigt wurden [Hedström et al., 2009].

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Beschaffenheit der geschnittenen Proben. Beim Schneiden von vollständigen Nagetierherzen wurde das Gewebe aufgrund des Ventrikellumens stärker von der Klinge mitbewegt als bei humanen Myokardproben. Diese Robustheit der humanen Präparate erleichterte die Übertragung der Methodik auf das humane Material.

5.2 Charakterisierung akuter Myokardschnitte

5.2.1 Strukturert/halt/Schädigung

Die Herzschnitte werden durch den Schneidevorgang unvermeidlich geschädigt, da nicht alle Kardiomyozyten in der Schnittebene liegen und deshalb im Randbereich angeschnitten werden. Dies wurde in der Vitalitätsfärbung anhand der starken Färbung mit Propidiumiodid und Far Red gezeigt. Das Prinzip der Vitalitätsfärbung beruht auf einer erhöhten Permeabilität der Plasmamembran geschädigter Zellen, sodass die Farbstoffe in geschädigte Zellen diffundieren können. Die Färbung ist abhängig von der Anwesenheit des Farbstoffes im Gewebe, sodass es wichtig war, dessen gleichmäßige Verteilung zu kontrollieren. Da durch Far Red auch extrazelluläre Proteine nachgewiesen werden können, färbte es die Plasmamembran intakter Zellen an, was als Diffusionskontrolle für den Farbstoff diente. So konnten auch Zellschäden im Zentrum der Myokardschnitte detektiert werden. In der Vitalitätsfärbung wiesen die Zellen im Zentrum des Gewebeschnittes eine gute Integrität der Plasmamembran auf, da nur vereinzelte Zellen permeabel für Far Red und Propidiumiodid waren. Auch in den histologischen Aufnahmen wiesen akute humane Herzschnitte einen guten Strukturert/halt mit intakter Z-Streifung auf. Der Strukturert/halt lag wahrscheinlich an der Verwendung von Calcium und BDM im Schneidepuffer und lieferte einen ersten Hinweis für die Vitalität der erstellten Schnitte. Über die Funktionalität der Kardiomyozyten lieferte die Histologie keine Aussage, sodass eine funktionelle Charakterisierung in der Kraftmessung erforderlich war.

5.2.2 Messung der Kontraktilität

Die Kontraktilität der Herzschnitte konnte in Kraftmessungen ermittelt werden. Dabei wurden kommerziell erhältliche Organbäder verwendet, in denen weitgehend physiologische Bedingungen eingestellt werden konnten. Die Temperatur wurde während der Experimente bei 37°C gehalten. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Temperatur einen großen Einfluss auf die Kontraktilität hat [Raman et al., 2006]. So wird beispielsweise die Kraft-Frequenzabhängigkeit bei Hypothermie umgekehrt [Lewis et al., 2002]. Durch eine ständige Carbogenbegasung (95% O₂ / 5% CO₂) wurde eine Sauerstoffsättigung im Puffer, sowie ein physiologischer pH-Wert von 7,4 erreicht. Andere Parameter entsprachen nicht ganz der Physiologie des Herzens. So wurden die Herzschnitte während des Experiments mit Feldelektroden stimuliert. Dies ermöglichte zwar die synchrone Stimulation aller Kardiomyozyten im Präparat, entspricht aber nicht der *in vivo* Si-

tuation. Dort breitet sich der Stimulationsreiz über das Synzytium von Zelle zu Zelle aus, was *in vitro* mit einer Punktstimulation simuliert werden könnte. Ein weiterer unphysiologischer Parameter betrifft die Aufhängung des Präparats. Um die Vorspannung einzustellen und die Kraft messen zu können, wird der Muskel isometrisch zwischen die Organhaken eingespannt. Dies entspricht nicht der Situation *in vivo*, da die Länge des Herzmuskels während der Kontraktion variiert und die Kontraktion somit auxotonisch verläuft. Außerdem entspricht die relative Dehnung des Gewebeschnittes nicht der Sarkomerlänge der Kardiomyozyten, weil die Zellen im Gewebeschnitt nicht gleichmäßig genug gedehnt werden. So werden einige Kardiomyozyten bereits überlastet, während andere Kardiomyozyten optimal vorgespannt sind. Diese methodischen Einschränkungen müssen bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden. Es ist aber bekannt, dass zwischen einer isometrischen und einer auxotonischen Kontraktion keine signifikanten Unterschiede in der Ausprägung der Kraft-Frequenz Beziehung bei physiologischer Calciumkonzentration auftreten [Redel et al., 2002].

Ventrikuläre Gewebeschnitte entwickelten durchschnittliche Kontraktionskräfte von circa $4,78 \pm 0,62 \text{ mN/mm}^2$. Dieser Wert ist vergleichbar mit Kontraktionskräften aus isolierten Trabekeln von ischämischen Herzen ($6,4 \pm 0,9 \text{ mN/mm}^2$ - $7,6 \pm 2,2 \text{ mN/mm}^2$), liegt aber deutlich unter der Kontraktilität von Trabekeln aus gesunden Herzen ($15,0 \pm 1,8 \text{ mN/mm}^2$ - $26,4 \pm 3,5 \text{ mN/mm}^2$) [Hasenfuss et al., 1994]. Bei einem Vergleich von Kontraktionskräften zwischen Herzschnitten und anderen Muskelpräparaten aus humanen Herzen muss jedoch die Anordnung der Muskelfasern betrachtet werden. Im Fall von Trabekeln oder Papillarmuskeln verlaufen alle Muskelfasern in eine Richtung, sodass eine optimale Kraftentwicklung zu erwarten ist. Bei den humanen Herzschnitten können die Muskelfasern in unterschiedliche Richtungen verlaufen, was die maximale Kontraktilität der Herzschnitte mindert.

Die Kontraktilität der Herzschnitte konnte durch Steigerung der Vorspannung erhöht werden. Dies simuliert den wichtigen physiologischen Frank-Starling Mechanismus, der im Herzen für eine Anpassung der Kontraktionskraft an das Füllungsvolumen der Kammern verantwortlich ist. Bei einer erhöhten Füllung des Ventrikels steigt auch dessen Wandspannung an, was dann eine stärkere Kontraktion hervorbringt. In Vorspannungsexperimenten wurde eine optimale Vorspannung von circa 10 mN/mm^2 ermittelt. In der Literatur werden für Messungen an humanen Papillarmuskeln optimale Vorspannungen von circa 45 mN/mm^2 beschrieben [Sonnenblick et al., 1965]. Auch dieser Unterschied kann mit einer ungleichmäßigen Verteilung der Muskelfasern in humanen Herzschnitten erklärt werden. Rechnet man hingegen die experimentell erhobene optimale Vorspan-

nung von 10 mN/mm^2 in einen Druck um, so erhält man mit 24 mmHg einen Wert, der nahe am physiologischen enddiastolischen ventrikulären Füllungsdruck des menschlichen Herzens von 10 mmHg liegt.

5.2.3 Modulation der Kontraktilität

Eine weitere wichtige Eigenschaft ist die Kraft-Frequenz-Beziehung (engl. Force Frequency Relationship (FFR)). Im gesunden adulten Herzen führt eine Erhöhung der Herzfrequenz zu einer erhöhten Kontraktilität (positive FFR). In dieser Studie konnte nur an einer Probe eine positive Kraft-Frequenz-Beziehung nachgewiesen werden. Alle anderen wiesen eine negative FFR auf. Ein Vergleich zwischen diastolischer und systolischer Kraft hat gezeigt, dass der negative Verlauf der FFR an einer verminderten Relaxationsfähigkeit bei hohen Frequenzen lag. Dies kann mehrere Ursachen haben. Es ist bekannt, dass die Kraft-Frequenz-Beziehung bei hypertrophem, sowie insuffizientem Myokard negativ ist [Gwathmey et al., 1987, Mulieri et al., 1992]. Zudem ist beschrieben, dass insuffizientes Myokard einen geringen myofibrilären Proteingehalt [Pagani et al., 1988], eine verminderte Expression der sarkoplasmatischen Retikulum-Calcium-ATPase (SERCA) [Hwang et al., 2002], sowie eine reduzierte Bildung von zyklischem AMP aufweist [Feldman et al., 1987]. Da es sich bei den verwendeten Proben um hypertrophes Gewebe aus der Morrow-Myektomie oder insuffizientes Gewebe aus explantierten Herzen handelte, könnte die Herkunft und Vorerkrankung des Gewebes eine Erklärung für die Beobachtung sein. Davon abzugrenzen wäre ein auftretender Energiemangel während der Stimulation [Schouten & ter Keurs, 1986]. Als Folge kann die SERCA bei hohen Stimulationsfrequenzen das Calcium nicht schnell genug aus dem Zytosol in das sarkoplasmatische Retikulum zurückpumpen, was zu einer verminderten Kontraktionskraft führt. Aufgrund der vielfältigen pathologischen Veränderungen in insuffizientem Myokard kann dieser Effekt nicht von einer verminderten Bildung des zyklischen AMPs oder einer verminderten SERCA-Expression unterschieden werden. Die Tatsache, dass eines der Präparate eine positive FFR aufwies, deutet darauf hin, dass die Energieversorgung unter den experimentellen Bedingungen grundsätzlich ausreichen kann und spricht gegen einen Energiemangel während der Stimulation.

Mit Isoproterenol konnten die Herzschnitte über β_1 -Adrenozeptoren stimuliert werden. Eine maximale Stimulation wurde mit $1 \mu\text{M}$ Isoproterenol erreicht, was eine Verdoppelung der Kontraktionskraft bewirkte. Im gesunden humanen Herzen führt eine maximale Stimulation mit Isoproterenol zu einer Versechsfachung der Kontraktionskraft

[Schwinger et al., 1993]. Insuffizientes humanes Myokard weist eine verminderte Expression von β -Adrenozeptoren auf [Böhm et al., 1988], sodass eine maximale Stimulation mit Isoproterenol zu einer Verdopplung der Kontraktionskraft führte [Schwinger et al., 1993, Hasenfuss et al., 1996].

5.3 Kultivierung von Gewebeschnitten

5.3.1 Stand der Technik/Innovation

Ein großer Vorteil der kardialen Gewebeschnitte im Vergleich zu anderen Präparaten besteht in der Möglichkeit der Langzeitkultur. Bislang konnten funktionale Daten von adulten multizellulären humanen Proben lediglich an Trabekelmuskulatur oder perfundierten Herzstückchen (Wedges) durchgeführt werden. Diese können nicht für längere Zeit in Kultur gehalten werden, da die Versorgung mit Nährstoffen unzureichend ist. Aus ersten Kulturversuchen mit kardialen Gewebeschnitten ist bekannt, dass Myokardschnitte aus der Ratte mit einer Dicke von 350 μm bis 400 μm für 24 Stunden in Kultur gehalten werden können [A. R. Parrish & Brendel, 1992]. Diese Dicke darf nicht überschritten werden, da sonst die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff eingeschränkt ist, was zu einer verminderten Kontraktilität führt. So beträgt die kritische Diffusionsgrenze für Sauerstoff im adulten Hundeherzen 370 μm [J. R. Blinks & Koch-Weser, 1963]. Für Nagetiere liegt die kritische Diffusionsgrenze für Sauerstoff mit 150 μm sogar noch deutlich niedriger [Schouten & ter Keurs, 1986, Raman et al., 2006]. Vermutlich liegt dieser Unterschied an den unterschiedlichen physiologischen Herzfrequenzen der verschiedenen Spezies. Auch fötale humane Herzschnitte scheinen eine deutlich höhere Sauerstoffdiffusionsgrenze zu besitzen, da 1 mm dicke Schnitte über zwei Monate kultiviert werden konnten [Habeler et al., 2009]. Auch im Embryo wird das Herz primär durch Diffusion versorgt. Das Gefäßsystem bildet sich erst während der Entwicklung aus und spielt zunächst eine untergeordnete Rolle [Burggren, 2004]. Diese Eigenschaft des embryonalen Herzens zeigt sich auch in dessen hoher Hypoxietoleranz [Patterson & Zhang, 2010]. Im Gegensatz zu adultem Myokard, dessen Nährstoffversorgung primär auf einer Versorgung durch Blutgefäße basiert, sollte embryonales Myokard daher besser für eine Kultur auf Filtern geeignet sein. Dies stellt eine Erklärung für die lange Kultivierbarkeit embryonaler Herzschnitte dar.

5.3.2 Optimierung der Kulturbedingungen

Um das Ziel einer Langzeitkultur von adulten humanen Herzschnitten zu erreichen, wurden zunächst Kulturversuche mit adulten murinen Herzschnitten unternommen. Im Vergleich zu den anderen Spezies boten Mäuseschnitte zwar eine hohe Verfügbarkeit, aber bereits nach einem Kulturtag konnte keine Kontraktilität mehr im Organbad gemessen werden. Dies kann durch die geringe Anfangskontraktilität, sowie dem schnelleren Stoff-

wechsel der murinen Herzschnitte erklärt werden. Auf Grund des hohen physiologischen Pulses von circa 10 Hz reagiert das Präparat vermutlich schneller und sensitiver auf suboptimale Schneide- und Kulturbedingungen als humane Schnitte. Diese Eigenschaft der murinen Schnitte konnte man sich bei der Optimierung der Schneide- und Kulturbedingungen mit Hilfe des MTT-Tests zu Nutze machen.

Eines der wichtigsten Parameter für die Etablierung von humanen Herzschnittkulturen stellte das Kulturmedium dar. Für die Kultur von Kardiomyozyten ist eine Vielzahl von Medien beschrieben [Mitcheson et al., 1998, Viero et al., 2008]. Auf den Zusatz von Serum wurde bewusst verzichtet, da aus mehreren Studien bekannt ist, dass bereits geringe Mengen Serum (2%) zu einer Dedifferenzierung der Kardiomyozyten führen können [Bird et al., 2003, Viero et al., 2008]. In dieser Studie zeigte der Zusatz von Insulin, Transferrin und Selen große Vorteile in der Langzeitkultivierung adulter humaner Herzschnitte. Besonders in Hinblick auf eine optimale Nährstoffversorgung und der Vermeidung von oxidativem Stress erscheint diese Kombination der Zusätze sinnvoll. Insulin ist für die Glukoseaufnahme der Kardiomyozyten essentiell. Es ist bekannt, dass der kardiale Energiemetabolismus zu circa 30% vom Glukosestoffwechsel abhängig ist [Stanley et al., 2005] und dass der Anteil an der Gesamtenergieversorgung unter Ischämie steigt [Tuunanen et al., 2008]. Selen ist ein wichtiges Spurenelement, welches im Körper für die Bildung von Selenocystein benötigt wird. Selenocystein wird wiederum für die Bildung der Glutathionperoxidase benötigt, welche die Integrität der Plasmamembran bei oxidativem Stress gewährleistet [Tinggi, 2008]. Studien haben gezeigt, dass Selen Ischämie und Reperfusionsschäden im Herzgewebe vermindern kann [Venardos et al., 2005, Lymbury et al., 2006]. Eisen ist ein wichtiger Bestandteil des aktiven Zentrums vieler Enzyme, die essentiell für den Stoffwechsel der Zellen sind. So findet man es zum Beispiel in Enzymen der Atmungskette. In Peroxisomen ist Eisen im aktiven Zentrum des Enzyms Katalase enthalten, wo es das zellschädigende Wasserstoffperoxid abbaut. Freies Eisen ist hingegen schädlich für die Zelle, da es über die Fenton-Reaktion die Bildung von zytotoxischen Sauerstoffradikalen katalysiert. Transferrin bindet freies Eisen, sodass die Bildung von schädlichen Sauerstoffradikalen unterbunden wird. In dem *in vitro* Modell der humanen Herzschnitte können diese Faktoren zum Überleben des Myokards beitragen. Der Schneideprozess stellt eine unvermeidbare Schädigung dar, wodurch die Zellen des Synzytiums auf kompensatorische Mechanismen angewiesen sind.

5.3.3 Vitalität der Kardiomyozyten während der Kultur

Einen der wichtigsten Parameter der humanen Herzschnitte stellt die Vitalität des Präparats dar. Da in akuten Herzschnitten die tote Zellschicht deutlich zu erkennen war, stellte sich die Frage, inwieweit sich diese Schädigung auf das restliche Synzytium während der Kultur auswirkt. Die Beobachtung, dass nach 28 Tagen Kultur keine toten Randbereiche mehr zu erkennen waren, lässt vermuten, dass die Zellen im Laufe der Kulturzeit durch Autolyse oder Fibroblasten abgebaut wurden und die Schnitttränder im Zuge eines Vernarbungsprozesses mit Fibroblasten bewachsen wurden.

Mit Hilfe des MTT-Tests, der hauptsächlich auf dem NADP(H) Gehalt der Zellen beruht [Berridge & Tan, 1993], konnte diese Beobachtung quantitativ bestätigt werden. So blieb die Vitalität der Schnitte an den verschiedenen Kulturzeitpunkten auf einem hohen Niveau. Auch nach 28 Tagen Kultur konnte kein signifikanter Unterschied in der MTT-Umsetzung im Vergleich zu akuten Schnitten erkannt werden.

Einen weiteren Hinweis auf die Vitalität der kultivierten Schnitte lieferte der Verlauf des gesamten RNA-Gehaltes von kultivierten Herzschnitten. Im Falle eines Absterbens des Präparats wäre der RNA-Gehalt der Proben gesunken. Stattdessen bleibt die Vitalität der Gewebeschnitte über den gesamten Kulturzeitraum erhalten. Da die sich die Vitalität auf alle Zellen des Präparates bezieht, ist eine Differenzierung zwischen den einzelnen Zelltypen erforderlich. Auf diese Weise lässt sich auch eine Umdifferenzierung der Kardiomyozyten während der Kultur charakterisieren.

5.3.4 Umdifferenzierung der Kardiomyozyten während der Kultur

Die Umdifferenzierung der Kardiomyozyten während der Kultur konnte anhand der mRNA-Expression wichtiger kardiomyozytärer Strukturgene untersucht werden, die bedeutsam für die Funktionalität der Kardiomyozyten sind. Zu ihnen zählen die Myosinleichtkette 2 [Kabaeva et al., 2002], das kardiale Aktin [Jiang et al., 2010], das Titin [Linke et al., 1997] und das Connexin 43 [Betsuyaku et al., 2002]. Die Expression der Myosinleichtkette 2 sowie des kardialen Aktins sank innerhalb der ersten Kulturtage stark. Dies wäre entweder durch eine Umdifferenzierung oder einen Verlust von Kardiomyozyten zu erklären.

Durch die Analyse weiterer kardialer Gene konnte ein nennenswerter Verlust von Kardiomyozyten während der Kultur ausgeschlossen werden. Einen Hinweis darauf gab die Expression des kardialen Aktins, welches nach 4 Tagen Kultur wieder auf das Expressionsniveau akuter Schnitte stieg. Die Expression des Myosins blieb während der gesamten

Kulturdauer hingegen sehr niedrig und stieg nur leicht wieder an. Vermutlich wurde die Expression des Myosins stärker durch die Inaktivität beeinflusst als die des Aktins. Weitere wichtige kardiomyozytäre Strukturgene wie das Titin oder das Connexin 43 blieben während der gesamten Kulturdauer auf einem hohen Niveau, was für einen guten Erhalt der Kardiomyozyten während der Kultur spricht. Vermutlich führt die Inaktivität der Kardiomyozyten zu einem Umbau des kontraktilen Apparates und nicht zu einem Absterben von Kardiomyozyten.

Diese Vermutung konnte durch eine Immunfärbung struktureller kardiomyozytärer Proteine bestätigt werden. So konnte in einer Aktin- und Cardiotin- Färbung von akuten Schnitten Glanzstreifen deutlich erkannt werden. Cardiotin bildet 300 kDa große Proteinkomplexe, die entlang der Muskelfasern orientiert sind. Die Funktion ist noch nicht vollständig geklärt, es konnte aber gezeigt werden, dass Cardiotin mit der mitochondrialen Membran assoziiert ist und bei einer Dedifferenzierung des Myokards vermindert exprimiert wird [Driesen et al., 2009]. Vermutlich besitzt Cardiotin eine entscheidende Funktion im Energiehaushalt der Kardiomyozyten. Nach 28 Tagen Kultur konnten Aktin und Cardiotin im Zuge einer strukturellen Reorganisation der Muskelfasern nicht mehr in einer filamentösen, sondern einer diffusen Anordnung nachgewiesen werden, was für ruhendes Myokard typisch ist [Ausma et al., 1995] und zu den Beobachtungen aus den H&E-Färbungen passt.

Einen weiteren Hinweis für ein Überleben der Kardiomyozyten liefert der Erhalt von elektrophysiologischen Parametern der Gewebeschnitte während der gesamten Kulturdauer [Wenzel et al., 2010]. Trotz des Umbaus konnten kultivierte Schnitte in Kontraktionsmessungen eingesetzt und charakterisiert werden.

5.3.5 Verlauf der Kraftentwicklung

Als einer der wichtigsten funktionalen Parameter wurde die Kontraktilität der kultivierten Gewebeschnitte gemessen. Während der Kultur fiel die Kontraktilität stark ab. Dieser Prozess lief in zwei Phasen ab. In der ersten Phase war bereits am ersten Kulturtag ein Kraftverlust von circa 90% zu verzeichnen. Innerhalb der ersten vier Kulturtage blieb diese Kraft erhalten und sank anschließend während der zweiten Phase weiter, bis nach circa zwei Wochen die minimale Kraft erreicht wurde. Die primäre Phase beginnt wahrscheinlich unmittelbar nach der Explantation aus dem Patienten und beruht wahrscheinlich auf einer Anpassung an die mechanische und elektrische Inaktivität, was zu einer verminderten Expression des kardialen Myosins führt. Der Muskel wird während der Lagerung weder hormonell noch elektrisch stimuliert, wodurch Umbauprozesse im

Muskel hervorgerufen werden [Berger et al., 1994, Schlüter et al., 1995]. Es ist anzunehmen, dass in der Kultur nur Zellen überleben und zur Funktion des Präparats beitragen können, die in der Lage sind, sich dem zweidimensionalen Kultursystem anzupassen. Da sich die funktionale Belastung sowie die Versorgung in der Kultur stark von der *in vivo* Situation unterscheiden, werden nur Zellen mit optimaler Adhäsion und Ausrichtung ihre ursprüngliche Struktur behalten. Die funktionale Charakterisierung mit Hilfe der Kraftmessung hat zudem gezeigt, dass die Schnitte zwar an Kontraktionskraft verlieren, andere myokardiale Eigenschaften aber beibehalten. So bleibt die Dehnungsabhängigkeit der Kontraktionskraft während der Kultur vollständig erhalten, obwohl der Verlust der Gewebeelastizität zu einer verminderten Vorspannung und Kraft führt. Dieser Parameter unterscheidet sich stark zwischen akuten und kultivierten Schnitten und repräsentiert die strukturelle Umdifferenzierung, die das gesamte Präparat betrifft. Da die Dehnungsabhängigkeit der Kontraktilität nur von funktionalen kontrahierenden Zellen beeinflusst wird, kann von einem Erhalt der physiologischen Eigenschaften der verbleibenden Kardiomyozyten ausgegangen werden. Ob die restliche Kontraktilität von differenzierten oder umgebauten Kardiomyozyten ausgeht, kann nicht eindeutig gesagt werden. Da nach 28 Tagen Kultur Kardiomyozyten mit deutlicher Z-Streifung zu erkennen waren, ist anzunehmen, dass zumindest ein Teil der Kardiomyozyten in einem differenzierten Zustand bleibt.

Auch anhand der β -adrenergen Stimulation mit Isoproterenol konnte ein Umbauprozess erkannt werden. Akute Herzschnitte reagierten mit einer Verdopplung der Kontraktionskraft auf eine maximale Stimulation. Innerhalb der ersten Kulturtage war eine Vervier- bis Verachtfachung der Kontraktionskraft auf Isoproterenolstimulation zu verzeichnen. Aus Transplantationsstudien ist bekannt, dass transplantierte Herzen aufgrund der Denervierung eine verstärkte β -Adrenorezeptordichte aufweisen und deshalb stärker auf Isoproterenol reagieren [Yusuf et al., 1987]. Da die EC_{50} -Werte der akkumulativen Dosiswirkungskurven unverändert blieben, kann von einem vollständigen Erhalt der Rezeptorbindungsaffinität ausgegangen werden. Somit findet in der Umbauphase der ersten Kulturtage ein Anpassungsprozess statt, in der das Myokard auf ein Fehlen der physiologischen β -adrenergen Stimulation mit einer Hochregulation der Rezeptoren reagiert. Die Beobachtung, dass sich auch die Isoproterenol-Stimulation nach der ersten Kulturphase normalisiert, spricht für einen Abschluss der Umbauvorgänge nach der ersten Kulturwoche.

Einen weiteren Parameter stellt die Frequenzabhängigkeit der Inotropie dar. Analog zu akuten Schnitten besaßen kultivierte Schnitte eine negative Kraft-Frequenz-Beziehung.

Dies war erstaunlich, da neue Befunde eine Erholung struktureller und kontraktile Eigenschaften von zugentlastetem dilatiertem Myokard beschrieben [Burkhoff et al., 2000]. In der Kultur humaner Herzschnitte hätte sich dies mit einer positiven Kraft-Frequenz Beziehung äußern können. Vermutlich wichen die Kulturparameter aber zu stark von der *in vivo* Situation ab, sodass diese Effekte nicht *in vitro* nachgestellt werden konnten.

5.3.6 Differenzierung und Proliferation nicht-myozytärer Gewebe

In Hinblick auf den Strukturhalt eines multizellulären Gewebes war die Expression von nicht kardiomyozytären Zellen von großem Interesse. Besonders Fibroblasten besitzen eine hohe Proliferationsrate und können andere Primärzellen in Kokulturen überleben. Um das Verhalten der kardialen Fibroblasten in den Herzschnittkulturen zu charakterisieren wurde die Expression der Fibroblastenmarker Vimentin und DDR2 im Verlauf der Kultur untersucht. Vimentin ist ein Typ3 Intermediärfilament der Desmine und wird in Fibroblasten stark exprimiert [Laurila et al., 1982]. Auf Grund seines hohen Vorkommens im Zytoplasma von Fibroblasten eignet es sich als Fibroblastenmarker. Ein weiterer geeigneter Marker ist der Discoidin Domänen Rezeptor 2 (DDR2), der zur Gruppe der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren gehört. Der Rezeptor wird ebenfalls stark in Fibroblasten exprimiert und wird als alternativer Fibroblastenmarker beschrieben [Olaso et al., 2002, Baudino et al., 2006]. Die Expressionsanalyse der beiden verschiedenen Fibroblastenmarker zeigte eine starke Proliferation der Fibroblasten während des Umbauprozesses. Nach einer Woche erreichte die Expression beider Marker eine Plateauphase. Dies spricht ebenfalls für einen Abschluss des Umbauprozesses nach einer Woche Kultur. Da sich die Frage stellte, inwieweit die Fibroblastenproliferation die Integrität des Gewebes beeinträchtigt, wurden Immunfärbungen von Aktin, Vimentin und Cardiotin angefertigt. Dort zeigte sich, dass die Fibroblastenproliferation vor allem am Rand des Gewebeschnitts stattfand. Dies könnte als eine Vernarbung der geschädigten Schnitttränder interpretiert werden, was einer natürlichen Reaktion des Gewebes entsprechen würde. Dabei kann nicht unterschieden werden, ob die Zunahme der Fibroblastenanzahl durch Proliferation randständiger Fibroblasten oder Migration von Fibroblasten aus dem Zentrum hervorgerufen wurde. Es ist aber möglich, dass durch die Schädigung der Randbereiche Cytokine aus Fibroblasten oder noch vorhandenen Entzündungszellen freigesetzt wurden, die eine Migration von Fibroblasten hervorgerufen haben [Baudino et al., 2006, Mitchell et al., 2007]. In der Literatur wird besonders der Fibroblastenmarker DDR2 mit einer Migration durch die extrazelluläre Matrix assoziiert [Olaso et al., 2002].

5.3.7 Vergleich Morrow vs. Explantat

Um die Verfügbarkeit von humanem Material zu verbessern wurde die Möglichkeit getestet, Herzschnitte aus explantierten Herzen zu gewinnen. Es zeigte sich, dass Proben aus explantierten Herzen ebenso für die Generierung von vitalen Herzschnitten geeignet waren wie Morrow-Gewebe. Dabei wiesen die Schnitte keine deutlichen Unterschiede in den physiologischen Eigenschaften auf. So besaßen auch Schnitte aus explantierten Herzen eine negative Kraft-Frequenz Beziehung sowie eine Vorspannungsabhängigkeit der Inotropie. In einem Vergleich mit Kontraktionsmessungen aus isolierten Trabekeln zeigten auch explantierte Herzschnitte eine Ähnlichkeit zu Trabekeln aus insuffizientem Myokard. Der Kulturerfolg war ähnlich hoch wie bei Herzschnitten aus Morrow-Gewebe. Dies war erstaunlich, da Stückchen aus explantierten Herzen aufgrund des längeren Transports mindestens 12h in kaltem Schneidepuffer gelagert wurden, bevor sie verwendet werden konnten. Vermutlich konnte der Schneidepuffer das Gewebe bei der geringen Größe von 1 cm³ schnell kühlen und aufgrund der langen Lagerung vollständig durchdringen, sodass eine optimale Kardioplegie erreicht wurde.

5.4 Perspektive

Da es zwischen den verschiedenen Spezies große elektrophysiologische Unterschiede gibt, sind humane Herzschnitte eine gute Ergänzung zu bestehenden Modellsystemen. Im Vergleich zu anderen Modellsystemen des humanen Herzens bieten humane Herzschnitte den entscheidenden Vorteil einer hohen experimentellen Verfügbarkeit bei gleichzeitiger Verwendung eines multizellulären humanen Gewebes. Aus einem explantierten Herzen könnten je nach Ausstattung des Labors Hunderte von Herzschnitten gewonnen werden. Durch die Möglichkeit der Kultur kann die experimentelle Verfügbarkeit sogar noch weiter gesteigert werden. Andere adulte humane Präparate wie z.B. Papillarmuskel oder Trabekel sind weniger verfügbar, weil sie weder in großen Mengen gewonnen noch so lange in Kultur gehalten werden können. Die Etablierung von adulten humanen Langzeitkulturen bietet viele neue Möglichkeiten für die Erforschung kardiovaskulärer Erkrankungen. So wären humane Herzschnitte für die Stammzellbiologie sehr interessant. Besonders die Möglichkeit der Kultur, würde die Perspektive eröffnen, das Einwachsen von verschiedenen Stammzelltypen in humanes Myokard funktional zu untersuchen und verschiedene Bedingungen *in vitro* zu vergleichen. Dabei wären Parameter wie das Einwachsen, Differenzieren und die Zellkopplung besonders relevant. Dies könnte Ansätze für die Stammzelltherapie der Herzinsuffizienz liefern, da klinische Studien bislang keine wegweisenden Erfolge liefern konnten [Mummery et al., 2010].

Des weiteren bietet das Modellsystem humaner Herzschnittkulturen einige weitere interessante Ansatzpunkte für Projekte, die anfangs nicht als Hauptentwicklungsziel verfolgt wurden. So stellen humane Herzschnittkulturen ein Modell für chronisch entlastetes Myokard dar, was anhand der Cardiotinfärbung auch experimentell gezeigt werden konnte. In aktuellen Studien werden Patienten mit Herzinsuffizienz zur Unterstützung der Herzleistung vermehrt unterstützende Pumpen implantiert. Dabei soll das Herz entlastet und eine Regeneration der Herzleistung erreicht werden. Die Mechanismen der kardialen Entlastung sind komplex und können bislang nur am Tiermodell erforscht werden [Schwoerer et al., 2008]. Der Einsatz von humanen Herzschnittkulturen könnte für ein besseres Verständnis der ablaufenden Prozesse bei kardialer Entlastung beitragen.

Ein weiterer Ansatz wäre die Untersuchung von Vernarbungsprozessen in humanem Myokard. Die Schädigung des Myokards an den Schnittkanten tritt bei den Herzschnitten zwangsläufig auf. Die dabei beobachtete Narbenbildung könnte man sich zunutze machen, um die Fibrosierung von Herzgewebe zu untersuchen. Dies könnte zum besseren Verständnis pathologischer Vorgänge nach Ischämie/Reperfusions-Schäden oder Virus-

infektionen führen.

Da die Kultur auf Filtern eine Cokultivierung der Herzschnitte mit anderen Zelltypen ermöglicht, könnte man zudem komplexere Modellsysteme entwickeln. So wäre es zum Beispiel denkbar, den Einfluss von Entzündungszellen in der Cokultur zu untersuchen. Dies könnte zum besseren Verständnis inflammatorischer Prozesse bei der Fibrosierung oder der Integration von Stammzellen beitragen.

Für einige Fragestellungen wird man auch weiterhin auf Herzschnitte aus Versuchstieren zurückgreifen. So birgt die Erstellung von Herzschnitten aus transgenen Mäusen ein enormes Potential, die Auswirkungen einer experimentellen Gendeletion funktional auf multizellulärer Ebene zu untersuchen.

Um in Zukunft besser mit Herzschnitten arbeiten zu können sind weitere Optimierungen der Schneide- und Kulturbedingungen notwendig. So könnte die Vitalität der Schnitte durch den Einsatz anderer Filter womöglich verbessert werden. Zudem könnte getestet werden, ob die Inaktivitätsatrophie mit Hilfe einer geeigneten elektrischen Stimulation während der Kultur vermindert werden kann. Auch eine verbesserte Schneidetechnik mit geringerer Gewebeschädigung könnte die Vitalität der Gewebeschnitte stark steigern. Besonders das Schwingen der Klinge überträgt sich während des Schneidens auf die Herzschnitte und kann unwiderrufliche Schäden hervorrufen, die erst während funktionaler Messungen oder in der Kultur sichtbar werden. Es ist bekannt, dass Fibroblasten und Kardiomyozyten mechanosensitive Ionenkanäle besitzen, deren Aktivität durch Dehnung beeinflusst werden kann [Kamkin et al., 2010]. Eine mechanische Belastung wie sie während des Schneidens auftritt, könnte zur Öffnung dieser Kanäle und somit zur Depolarisation der Kardiomyozyten führen. Der Einsatz einer sich drehenden Klinge könnte die mechanische Belastung reduzieren und womöglich zu einer höheren Vitalität der Gewebeschnitte führen. Dies würde vielleicht auch die Generierung von dünneren Gewebeschnitten ermöglichen.

Mit der Etablierung von humanen Herzschnitt-Kulturen konnte ein neues Modellsystem entwickelt werden, welches einerseits elektrophysiologische Langzeitstudien an multizellulärem Gewebe ermöglicht. Gleichzeitig wird die Verfügbarkeit und Vergleichbarkeit von humanem Material erhöht. In Zukunft wird sich zeigen, für welche der vielfältigen Anwendungen humane Herzschnitte Verwendung finden werden.

Abkürzungsverzeichnis

BDM	2,3-Butanedion-Monoxim
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperaziny)-ethansulfonsäure
BSA	Bovine serum albumin
CCT	Creatin Carnitin Taurin
DNA	Deoxyribonucleic acid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
Em.	Emission
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
Ex.	Excitation
FR	Far Red
FFR	Force Frequency Relationship
°C	Grad Celsius
g	Gramm
Hz	Hertz
hERG	human-ether-a-gogo-related-gene product
H&E	Hämalaun/Eosin
ITS	Insulin Transferrin Selen
l	Liter
F_{max}	maximale Kraftentwicklung
MTT	Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromid
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mN	Millinewton
min	Minuten
nm	Nanometer

NMRI		Naval Medical Research Institute
n.s.		nicht signifikant
pH		potentium hydrogenii
PI		Propidiumiodid
RT		Raumtemperatur
RNA		Ribonucleic acid
SERCA		sarkoplasmatische Retikulum ATPase
SR		sarkoplasmatisches Retikulum
siRNA		small inhibitory RNA
SD		Sprague Dawley
SEM		Standardfehler
d		Tag
TBS		Tris Buffered Saline
Tris		tris(hydroxymethyl)aminomethane

Literaturverzeichnis

- [A. R. Parrish & Brendel, 1992] A. R. Parrish, N. G. Shipp, R. D. S. R. T. D. C. L. K. A. J. G. & Brendel, K. (1992). *Toxicology Methods* 2, 101–111.
- [Altschuld et al., 1991] Altschuld, R. A., Ganote, C. E., Nayler, W. G. & Piper, H. M. (1991). *J Mol Cell Cardiol* 23, 765–767.
- [anonymous, 1992] anonymous (1992). *N Engl J Med* 327, 227–233.
- [anonymous, 1997] anonymous (1997). *N Engl J Med* 336, 525–533.
- [Ausma et al., 1995] Ausma, J., Schaart, G., Thoné, F., Shivalkar, B., Flameng, W., Depré, C., Vanoverschelde, J.-L., Ramaekers, F. & Borgers, M. (1995). *Cardiovascular Pathology* 4, 29 – 37.
- [Baudino et al., 2006] Baudino, T. A., Carver, W., Giles, W. & Borg, T. K. (2006). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H1015–H1026.
- [Berger et al., 1994] Berger, H. J., Prasad, S. K., Davidoff, A. J., Pimental, D., Ellingsen, O., Marsh, J. D., Smith, T. W. & Kelly, R. A. (1994). *Am J Physiol* 266, H341–H349.
- [Berridge & Tan, 1993] Berridge, M. V. & Tan, A. S. (1993). *Arch Biochem Biophys* 303, 474–482.
- [Betsuyaku et al., 2002] Betsuyaku, T., Kovacs, A., Saffitz, J. E. & Yamada, K. A. (2002). *J Mol Cell Cardiol* 34, 175–184.
- [Böhm et al., 1988] Böhm, M., Diet, F., Feiler, G., Kemkes, B., Kreuzer, E., Weinhold, C. & Erdmann, E. (1988). *J Cardiovasc Pharmacol* 12, 726–732.
- [Bird et al., 2003] Bird, S. D., Doevendans, P. A., van Rooijen, M. A., de la Riviere, A. B., Hassink, R. J., Passier, R. & Mummery, C. L. (2003). *Cardiovasc Res* 58, 423–434.

- [Blanchard et al., 1990] Blanchard, E. M., Smith, G. L., Allen, D. G. & Alpert, N. R. (1990). *Pflugers Arch* 416, 219–221.
- [Borlak & Zwadlo, 2004] Borlak, J. & Zwadlo, C. (2004). *Mol Pharmacol* 66, 708–717.
- [Bradford, 1976] Bradford, M. M. (1976). *Anal Biochem* 72, 248–254.
- [Burggren, 2004] Burggren, W. W. (2004). *Physiol Biochem Zool* 77, 333–345.
- [Burkhoff et al., 2000] Burkhoff, D., Holmes, J. W., Madigan, J., Barbone, A. & Oz, M. C. (2000). *Prog Cardiovasc Dis* 43, 19–26.
- [Bussek et al., 2009] Bussek, A., Wettwer, E., Christ, T., Lohmann, H., Camelliti, P. & Ravens, U. (2009). *Cell Physiol Biochem* 24, 527–536.
- [Cho et al., 2007] Cho, S., Wood, A. & Bowlby, M. R. (2007). *Curr Neuropharmacol* 5, 19–33.
- [Choi et al., 2005] Choi, S.-Y., Koh, Y.-S. & Jo, S.-H. (2005). *J Pharmacol Exp Ther* 313, 888–895.
- [Cini-Neri & Neri, 1986] Cini-Neri, G. & Neri, B. (1986). *Anticancer Res* 6, 195–197.
- [Claycomb et al., 1984] Claycomb, W. C., Burns, A. H. & Shepherd, R. E. (1984). *FEBS Lett* 169, 261–266.
- [Cleveland et al., 1997] Cleveland, J. C., Meldrum, D. R., Rowland, R. T., Banerjee, A. & Harken, A. H. (1997). *Ann Thorac Surg* 63, 147–152.
- [Dhamoon et al., 2004] Dhamoon, A. S., Pandit, S. V., Sarmast, F., Parisian, K. R., Guha, P., Li, Y., Bagwe, S., Taffet, S. M. & Anumonwo, J. M. B. (2004). *Circ Res* 94, 1332–1339.
- [DiMasi et al., 2003] DiMasi, J. A., Hansen, R. W. & Grabowski, H. G. (2003). *J Health Econ* 22, 151–185.
- [Driesen et al., 2009] Driesen, R. B., Verheyen, F. K., Schaart, G., de Mazière, A., Viebahn, C., Prinzen, F. W., Lenders, M.-H., Debie, W., Totzeck, A., Borgers, M. & Ramaekers, F. C. S. (2009). *Cardiovasc Pathol* 18, 19–27.
- [Drouin et al., 1995] Drouin, E., Charpentier, F., Gauthier, C., Laurent, K. & Marec, H. L. (1995). *J Am Coll Cardiol* 26, 185–192.

- [Echt et al., 1991] Echt, D. S., Liebson, P. R., Mitchell, L. B., Peters, R. W., Obias-Manno, D., Barker, A. H., Arensberg, D., Baker, A., Friedman, L. & Greene, H. L. (1991). *N Engl J Med* 324, 781–788.
- [Endoh, 2004] Endoh, M. (2004). *Eur J Pharmacol* 500, 73–86.
- [Feldman et al., 1987] Feldman, M. D., Copelas, L., Gwathmey, J. K., Phillips, P., Warren, S. E., Schoen, F. J., Grossman, W. & Morgan, J. P. (1987). *Circulation* 75, 331–339.
- [Fryer et al., 1988] Fryer, M. W., Neering, I. R. & Stephenson, D. G. (1988). *J Physiol* 407, 53–75.
- [Ghosh et al., 2001] Ghosh, S., Standen, N. B. & Galinianes, M. (2001). *J Am Coll Cardiol* 37, 711–718.
- [Gähwiler, 1981] Gähwiler, B. H. (1981). *J Neurosci Methods* 4, 329–342.
- [Goldsmith et al., 2004] Goldsmith, E. C., Hoffman, A., Morales, M. O., Potts, J. D., Price, R. L., McFadden, A., Rice, M. & Borg, T. K. (2004). *Dev Dyn* 230, 787–794.
- [Goldsmith et al., 2009] Goldsmith, K. A., Demiris, N., Gooi, J. H., Sharples, L. D., Jenkins, D. P., Dhital, K. K. & Tsui, S. S. L. (2009). *Transplantation* 87, 243–248.
- [Guth, 2007] Guth, B. D. (2007). *Toxicol Sci* 97, 4–20.
- [Gwathmey et al., 1987] Gwathmey, J. K., Copelas, L., MacKinnon, R., Schoen, F. J., Feldman, M. D., Grossman, W. & Morgan, J. P. (1987). *Circ Res* 61, 70–76.
- [Gwathmey et al., 1991] Gwathmey, J. K., Hajjar, R. J. & Solaro, R. J. (1991). *Circ Res* 69, 1280–1292.
- [Habeler et al., 2009] Habeler, W., Pouillot, S., Plancheron, A., Pucéat, M., Peschanski, M. & Monville, C. (2009). *Cardiovasc Res* 81, 253–259.
- [Hart et al., 1983] Hart, A., Mattheyse, F. J. & Balinsky, J. B. (1983). *In Vitro* 19, 841–852.
- [Hasenfuss et al., 1996] Hasenfuss, G., Mulieri, L. A., Allen, P. D., Just, H. & Alpert, N. R. (1996). *Circulation* 94, 3155–3160.

- [Hasenfuss et al., 1994] Hasenfuss, G., Reinecke, H., Studer, R., Meyer, M., Pieske, B., Holtz, J., Holubarsch, C., Posival, H., Just, H. & Drexler, H. (1994). *Circ Res* 75, 434–442.
- [Hebisch et al., 1993] Hebisch, S., Bischoff, E. & Soboll, S. (1993). *Basic Res Cardiol* 88, 566–575.
- [Hedström et al., 2009] Hedström, E., Engblom, H., Frogner, F., Aström-Olsson, K., Ohlin, H., Jovinge, S. & Arheden, H. (2009). *J Cardiovasc Magn Reson* 11, 38.
- [Holland & Olson, 1975] Holland, C. E. & Olson, R. E. (1975). *J Mol Cell Cardiol* 7, 917–928.
- [Hudson et al., 1969] Hudson, B., Upholt, W. B., Devanny, J. & Vinograd, J. (1969). *Proc Natl Acad Sci U S A* 62, 813–820.
- [Hui & Maylie, 1991] Hui, C. S. & Maylie, J. (1991). *J Physiol* 442, 527–549.
- [Hwang et al., 2002] Hwang, J.-J., Allen, P. D., Tseng, G. C., Lam, C.-W., Fananapazir, L., Dzau, V. J. & Liew, C.-C. (2002). *Physiol Genomics* 10, 31–44.
- [Häyry et al., 1999] Häyry, P., Aavik, E. & Savolainen, H. (1999). *Transplant Proc* 31, 5S–8S.
- [Ichihara et al., 1981] Ichihara, K., Robishaw, J. D., Vary, T. C. & Neely, J. R. (1981). *Acta Med Scand Suppl* 651, 13–18.
- [J. R. Blinks & Koch-Weser, 1963] J. R. Blinks, J. R. & Koch-Weser, J. (1963). *Pharmacol Rev* 15, 531–599.
- [Janssen et al., 1998] Janssen, P. M., Lehnart, S. E., Prestle, J., Lynker, J. C., Salfeld, P., Just, H. & Hasenfuss, G. (1998). *Am J Physiol* 274, H1481–H1488.
- [Jeevanandam, 2010] Jeevanandam, V. (2010). *World J Surg* 34, 628–631.
- [Jiang et al., 2010] Jiang, H.-K., Qiu, G.-R., Li-Ling, J., Xin, N. & Sun, K.-L. (2010). *Circ J* 74, 2410–2418.
- [Jo et al., 2000] Jo, S. H., Youm, J. B., Lee, C. O., Earm, Y. E. & Ho, W. K. (2000). *Br J Pharmacol* 129, 1474–1480.

- [Jones et al., 1982] Jones, R. N., Reimer, K. A., Hill, M. L. & Jennings, R. B. (1982). *J Mol Cell Cardiol* 14 Suppl 3, 123–130.
- [Kabaeva et al., 2002] Kabaeva, Z. T., Perrot, A., Wolter, B., Dietz, R., Cardim, N., Correia, J. M., Schulte, H. D., Aldashev, A. A., Mirrakhimov, M. M. & Osterziel, K. J. (2002). *Eur J Hum Genet* 10, 741–748.
- [Kamkin et al., 2010] Kamkin, A., Kirischuk, S. & Kiseleva, I. (2010). *Acta Physiol (Oxf)* 199, 277–292.
- [Kohzuki et al., 2001] Kohzuki, H., Misawa, H., Sakata, S., Ohga, Y. & Takaki, M. (2001). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281, H566–H572.
- [Laurila et al., 1982] Laurila, P., Virtanen, I., Lehto, V. P., Vartio, T. & Stenman, S. (1982). *J Cell Biol* 94, 308–315.
- [Lee et al., 2006] Lee, S.-Y., Kim, Y.-J., Kim, K.-T., Choe, H. & Jo, S.-H. (2006). *Br J Pharmacol* 148, 499–509.
- [Lewis et al., 2002] Lewis, M. E., Al-Khalidi, A.-H., Townend, J. N., Coote, J. & Bonser, R. S. (2002). *J Am Coll Cardiol* 39, 102–108.
- [Linke et al., 1997] Linke, W. A., Ivemeyer, M., Labeit, S., Hinssen, H., Rüegg, J. C. & Gautel, M. (1997). *Biophys J* 73, 905–919.
- [Lymbury et al., 2006] Lymbury, R., Venardos, K. & Perkins, A. V. (2006). *Biol Trace Elem Res* 114, 197–206.
- [McMurchie et al., 1973] McMurchie, E. J., Raison, J. K. & Cairncross, K. D. (1973). *Comp Biochem Physiol B* 44, 1017–1026.
- [Mitchell et al., 2007] Mitchell, M. D., Laird, R. E., Brown, R. D. & Long, C. S. (2007). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, H1139–H1147.
- [Mitcheson et al., 1998] Mitcheson, J. S., Hancox, J. C. & Levi, A. J. (1998). *Cardiovasc Res* 39, 280–300. Isolation von Cardiomyozyten CCT Medium.
- [Mulieri et al., 1992] Mulieri, L. A., Hasenfuss, G., Leavitt, B., Allen, P. D. & Alpert, N. R. (1992). *Circulation* 85, 1743–1750.
- [Mummery et al., 2010] Mummery, C. L., Davis, R. P. & Krieger, J. E. (2010). *Sci Transl Med* 2, 27ps17.

- [Neri et al., 1984] Neri, B., Cini-Neri, G. & D’Alterio, M. (1984). *Biochem Biophys Res Commun* 125, 954–960.
- [Olaso et al., 2002] Olaso, E., Labrador, J.-P., Wang, L., Ikeda, K., Eng, F. J., Klein, R., Lovett, D. H., Lin, H. C. & Friedman, S. L. (2002). *J Biol Chem* 277, 3606–3613.
- [Olinga et al., 1997] Olinga, P., Groen, K., Hof, I. H., Kanter, R. D., Koster, H. J., Leeman, W. R., Rutten, A. A., Twillert, K. V. & Groothuis, G. M. (1997). *J Pharmacol Toxicol Methods* 38, 59–69.
- [Pagani et al., 1988] Pagani, E. D., Alousi, A. A., Grant, A. M., Older, T. M., Dziuban, S. W. & Allen, P. D. (1988). *Circ Res* 63, 380–385.
- [Parrish et al., 1995] Parrish, A. R., Gandolfi, A. J. & Brendel, K. (1995). *Life Sci* 57, 1887–1901.
- [Patterson & Zhang, 2010] Patterson, A. J. & Zhang, L. (2010). *Curr Mol Med* 10, 653–666.
- [Pillekamp et al., 2009] Pillekamp, F., Halbach, M., Reppel, M., Pfannkuche, K., Nazzal, R., Nguemo, F., Matzkies, M., Rubenchyk, O., Hannes, T., Khalil, M., Bloch, W., Sreeram, N., Brockmeier, K. & Hescheler, J. (2009). *Cell Physiol Biochem* 23, 65–74.
- [Pillekamp et al., 2007] Pillekamp, F., Halbach, M., Reppel, M., Rubenchyk, O., Pfannkuche, K., Xi, J.-Y., Bloch, W., Sreeram, N., Brockmeier, K. & Hescheler, J. (2007). *Cell Physiol Biochem* 20, 837–846.
- [Pillekamp et al., 2005] Pillekamp, F., Reppel, M., Dinkelacker, V., Duan, Y., Jazmati, N., Bloch, W., Brockmeier, K., Hescheler, J., Fleischmann, B. K. & Koehling, R. (2005). *Cell Physiol Biochem* 16, 127–132.
- [Powell & Twist, 1976] Powell, T. & Twist, V. W. (1976). *Biochem Biophys Res Commun* 72, 327–333.
- [Raman et al., 2006] Raman, S., Kelley, M. A. & Janssen, P. M. L. (2006). *Pflugers Arch* 451, 625–630.
- [Rampe et al., 1997] Rampe, D., Roy, M. L., Dennis, A. & Brown, A. M. (1997). *FEBS Lett* 417, 28–32.

- [Redel et al., 2002] Redel, A., Baumgartner, W., Golenhofen, K., Drenckhahn, D. & Golenhofen, N. (2002). *Pflugers Arch* 445, 297–304.
- [Roy et al., 1996] Roy, M., Dumaine, R. & Brown, A. M. (1996). *Circulation* 94, 817–823.
- [Ruegg et al., 1987] Ruegg, C. E., Gandolfi, A. J., Nagle, R. B., Krumdieck, C. L. & Brendel, K. (1987). *J Pharmacol Methods* 17, 111–123.
- [Schaart et al., 1993] Schaart, G., van der Ven, P. F. & Ramaekers, F. C. (1993). *Eur J Cell Biol* 62, 34–48.
- [Schlüter et al., 1995] Schlüter, K. D., Millar, B. C., McDermott, B. J. & Piper, H. M. (1995). *Am J Physiol* 269, C1347–C1355.
- [Schouten & ter Keurs, 1986] Schouten, V. J. & ter Keurs, H. E. (1986). *Pflugers Arch* 407, 14–17.
- [Schwinger et al., 1993] Schwinger, R. H., Böhm, M., Schulz, C., Schmidt, U., Schmidt, U., Schmid, B., Dienemann, H., Reichart, B. & Erdmann, E. (1993). *J Pharmacol Exp Ther* 265, 346–357.
- [Schwoerer et al., 2008] Schwoerer, A. P., Melnychenko, I., Goltz, D., Hedinger, N., Broichhausen, I., El-Armouche, A., Eschenhagen, T., Volk, T. & Ehmke, H. (2008). *J Mol Cell Cardiol* 45, 633–641.
- [Sham et al., 1995] Sham, J. S., Hatem, S. N. & Morad, M. (1995). *J Physiol* 488 (Pt 3), 623–631.
- [Sonnenblick et al., 1965] Sonnenblick, E. H., Braunwald, E. & Morrow, A. G. (1965). *J Clin Invest* 44, 966–977.
- [Speiser et al., 1992] Speiser, B., Weihrauch, D., Riess, C. F. & Schaper, J. (1992). *Cardioscience* 3, 41–49.
- [Stanley et al., 2005] Stanley, W. C., Recchia, F. A. & Lopaschuk, G. D. (2005). *Physiol Rev* 85, 1093–1129.
- [Stefaniak et al., 1988] Stefaniak, M. S., Gandolfi, A. J. & Brendel, K. (1988). *Proc West Pharmacol Soc* 31, 149–151.

- [Tilney, 1999] Tilney, N. L. (1999). *Transplant Proc* 31, 41S–44S.
- [Tinggi, 2008] Tinggi, U. (2008). *Environ Health Prev Med* 13, 102–108.
- [Towart et al., 2009] Towart, R., Linders, J. T. M., Hermans, A. N., Rohrbacher, J., van der Linde, H. J., Ercken, M., Cik, M., Roevens, P., Teisman, A. & Gallacher, D. J. (2009). *J Pharmacol Toxicol Methods* 60, 1–10.
- [Tuunanen et al., 2008] Tuunanen, H., Ukkonen, H. & Knuuti, J. (2008). *Curr Cardiol Rep* 10, 142–148.
- [Vahl et al., 1995] Vahl, C. F., Bonz, A., Hagl, C., Timek, T., Herold, U., Fuchs, H., Kochsiek, N. & Hagl, S. (1995). *Thorac Cardiovasc Surg* 43, 185–193.
- [Venardos et al., 2005] Venardos, K., Ashton, K., Headrick, J. & Perkins, A. (2005). *Mol Cell Biochem* 270, 131–138.
- [Viero et al., 2008] Viero, C., Kraushaar, U., Ruppenthal, S., Kaestner, L. & Lipp, P. (2008). *Cell Calcium* 43, 59–71.
- [Viktorov & Khaspekov, 1976] Viktorov, I. V. & Khaspekov, L. G. (1976). *Neirofiziologiia* 8, 384–390.
- [Volz et al., 1991] Volz, A., Piper, H. M., Siegmund, B. & Schwartz, P. (1991). *J Mol Cell Cardiol* 23, 161–173.
- [Wang et al., 1996] Wang, L., Feng, Z. P., Kondo, C. S., Sheldon, R. S. & Duff, H. J. (1996). *Circ Res* 79, 79–85.
- [Wenzel et al., 2010] Wenzel, J., Brandenburger, M., Bogdan, R., Richardt, D., Reppel, M., Hescheler, J., Dendorfer, A. & Terlau, H. (2010). *Cardiovasc Res* 87, 106.
- [Wilhelm et al., 1998] Wilhelm, M. J., Kusaka, M., Pratschke, J. & Tilney, N. L. (1998). *Transplant Proc* 30, 2402–2406.
- [Wyse et al., 1994] Wyse, D. G., Morganroth, J., Ledingham, R., Denes, P., Hallstrom, A., Mitchell, L. B., Epstein, A. E., Woosley, R. L. & Capone, R. (1994). *J Am Coll Cardiol* 23, 1130–1140.
- [Yusuf et al., 1987] Yusuf, S., Theodoropoulos, S., Mathias, C. J., Dhalla, N., Wittes, J., Mitchell, A. & Yacoub, M. (1987). *Circulation* 75, 696–704.

- [Zaugg et al., 2002] Zaugg, M., Lucchinetti, E., Spahn, D. R., Pasch, T., Garcia, C. & Schaub, M. C. (2002). *Anesthesiology* 97, 15–23.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Dendorfer, der mich beim Planen der Versuche und Zusammenfassen der Ergebnisse mit wertvollen Ratschlägen unterstützt hat.

Herrn Prof. Dr. Terlau und Herrn Prof. Dr. Dendorfer möchte ich für die Vergabe des Themas, sowie der Möglichkeit an dem interessanten BMBF-Projekt teilzunehmen, herzlich danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dominiak für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Jan Wenzel danke ich für viele interessante Diskussionen und die gute Zusammenarbeit.

Frau Beate Lembrich danke ich für die exzellente technische Unterstützung, sowie für viele nützliche Ratschläge und Anregungen.

Frau Gudrun Vierke danke ich für die Erhebung der mRNA Expressionsdaten.

Frau Ines Stölting und Herrn Klaus Tempel danke ich für die Unterstützung beim Umgang mit den Versuchstieren.

Dem gesamten Institut für Pharmakologie danke ich für ein produktives Arbeitsklima.

Meiner Freundin Steffi danke ich für viel Verständnis und Unterstützung.

Meinen Eltern und Großeltern möchte ich für die Unterstützung während des Studiums herzlich danken.