

**Aus der Klinik für Anaesthesiologie
LMU Klinikum München**

Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler

Adultes und künstliches Myokardgewebe als neuartige *in-vitro* Modelle in der Herzforschung

Habilitationsschrift

zum Erwerb der Venia Legendi
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Dr. med. Dr. med. univ. Roland Heinrich Tomasi

Januar 2024

gewidmet an
Stephanie, Alexander und Luca

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1. Einführung zum Thema und Fragestellung	5
1.2. Die Herzinsuffizienz	6
1.2.1. Herzinsuffizienz mit reduzierter linksventrikulärer Pumpfunktion	7
1.2.2. Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Pumpfunktion	8
1.3. 3R-Modelle	9
1.3.1. in-vitro Modelle als Ersatz für in-vivo Modelle	9
1.3.2. Humanes Gewebe - aktueller Stand	10
1.3.3. Engineered heart tissues - aktueller Stand	11
1.4. Zielsetzung	14
2. Material und Methoden	16
2.1. Adultes Myokardgewebe	16
2.1.1. Gewebegewinnung humanes Myokard	16
2.1.2. Gewebegewinnung Myokard von der Maus	16
2.1.3. Präparation der kardialen Gewebeschnitte	17
2.1.4. Kulturbedingungen humaner kardialer Gewebeschnitte	18
2.1.5. Aufbau der Kulturkammern	19
2.1.6. Kulturbedingungen kardialer Gewebeschnitte von der Maus	20
2.1.7. Messungen im Organbad	22
2.1.8. Messung der Refraktärzeit	23
2.1.9. Messung der Zellviabilität	23
2.1.10. Histologie	23
2.1.11. Membranpotentialmessungen	24
2.1.12. Morphometrische Analyse der Myozyten	24
2.1.13. Quantitative Echtzeit-PCR	25

2.1.14. Transkriptomanalyse	26
2.2. Engineered Heart Tissues	27
2.2.1. Zellkultur und Differenzierung von humanen, induziert-pluripotenten Stammzellen	27
2.2.2. Kardiales Tissue Engineering	28
2.2.3. EHT Kulturkammern	28
2.2.4. Progressive Dehnung	29
2.2.5. Biomechanische und funktionelle Gewebecharakterisierung	29
2.2.6. Quantitative Morphologie	30
2.2.7. Zellmorphologie	30
2.2.8. RNA Sequenzierung und bioinformatische Analyse	31
2.3. Statistik	32
3. Ergebnisse	33
3.1. Humane kardiale Gewebeschnitte	33
3.1.1. Kardiale Biomechanik und elektrische Stimulation	33
3.1.2. Kühlung und Kulturdauer	35
3.1.3. Kontraktionskraftverlauf	37
3.1.4. Beeinflussung der Gewebestruktur und der Genexpression	38
3.1.5. Anwendungsversuch Arzneimittelsicherheit	41
3.2. Kardiale Gewebeschnitte von Mäuseherzen	44
3.2.1. Verschiedene Kulturbedingungen	44
3.2.2. Erste Anwendungsversuche im Organbad	45
3.2.3. Effekte der optogenetischen Stimulation	46
3.2.4. Beeinflussung der Kulturdauer durch Steigerung der Schüttelfrequenz und Zugabe von Antioxidantien	49
3.2.5. Herunterregulation von Strukturproteinen und Hypoxie	51
3.2.6. Elektrische Stimulation	51
3.3. Wachstum und Maturierung von künstlichem Myokard	53

3.3.1. Gewebebildung	53
3.3.2. Mechanische, elektrophysiologische und metabolische Eigenschaften der EHTs	55
3.3.3. Steigerung der Kontraktionskraft und Optimierung des elastischen Modulus	58
3.3.4. Erregungs-Kontraktionskoppelung in den EHTs	59
3.3.5. Dehnung induziert die Expression von adulten Genen	62
3.3.6. Dehnung steigert das Kardiomyozytenvolumen und erhöht die Myofibrillendichte und -anordnung	63
4. Diskussion	67
4.1. Adultes Myokardgewebe	67
4.2. Engineered Heart Tissues	77
5. Zusammenfassung	85
6. Literaturverzeichnis	87
7. Abbildungsverzeichnis	103
8. Danksagung	108

1. Einleitung

1.1. Einführung zum Thema und Fragestellung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind weltweit die häufigste Todesursache ¹. Die mit dieser Krankheit verbundenen gesundheitlichen Beeinträchtigungen führen zu hohen Gesundheitskosten und beeinträchtigen die Betroffenen und ihre Angehörigen erheblich, sowohl körperlich als auch psychisch. Aus diesem Grund ist die interdisziplinäre Entwicklung neuer diagnostischer, präventiver und kurativer Behandlungsstrategien von essentieller Bedeutung. Leider haben sich in den letzten Jahren einige potenzielle neue Wirkstoffe in der Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen als unwirksam erwiesen, da die Ergebnisse aus Nagetier-Modellen nicht auf größere Tiermodelle und den Menschen übertragbar waren ². Daher ist die Entwicklung neuer, idealerweise tierfreier Modelle zur klinischen Etablierung wirksamer diagnostischer und therapeutischer Verfahren dringend erforderlich. Diese Modelle müssen die humane Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen widerspiegeln und eine optimale Auswertung der Ergebnisse ermöglichen, was aufgrund der Komplexität von Herz-Kreislauf-Erkrankungen eine Herausforderung darstellt, da sie als Multiorganerkrankungen mit vielen Komorbiditäten verbunden sind.

Eine vollständige Vermeidung (Replacement) von Tierversuchen in der kardiovaskulären Forschung wird nicht möglich sein, aber es ist möglich, die Anzahl der eingesetzten Tiere zu reduzieren (Reduction) und ihr Leiden (Refinement) zu minimieren. Bereits 1959 wurde das Prinzip der 3R (Replacement, Reduction, Refinement) als Grundsatz der experimentellen wissenschaftlichen Arbeit veröffentlicht ³. Die Europäische Richtlinie 2010/63/EU hat das Prinzip gesetzlich anerkannt und es wurde in vielen Ländern in lokales Recht umgesetzt. Das 3R Prinzip ist heute die Grundlage für die bestehende Tierschutzpolitik.

Abb. 1 zeigt für die kardiovaskuläre Forschung entwickelte Modelle, die auf dem 3R Prinzip basieren. Dazu gehören unter anderem In-vitro-Modelle aus adultem

humanem Myokard oder künstlichem Myokardgewebe aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) als Alternativen.

Tools to Refine and Reduce	High-throughput analyses	Crispr/Cas9 and/or Talen	Ex vivo human tissue studies	Biobanking	Data and registries	Preclinical trials	Computational modeling	Sequential in vivo imaging
Human 			✓	✓	✓		✓	✓
Lab animal models 	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓
Companion animals 				✓	✓	✓	✓	✓
Drosophila, zebrafish 	✓	✓					✓	
hi-PSC/cell models 	✓	✓		✓	✓		✓	

Abb. 1 ⁴: Möglichkeiten zur Reduktion bzw. Ersatz von Tierversuchen

Um die Einsatzmöglichkeiten dieser in-vitro-Modelle im Rahmen der Arzneimittelforschung, Krankheitmodellierung und Therapiesimulation zu erhöhen und somit Tierversuche zu reduzieren oder zu ersetzen, sind neue strategische Ansätze erforderlich. Insbesondere bei der Herzinsuffizienz müssen die bisherigen Limitationen überwunden werden. Daher werden im Folgenden die relevanten Aspekte dieser Erkrankung näher beschrieben.

1.2. Die Herzinsuffizienz

Bei Patienten mit Herzinsuffizienz kann das Herz die peripheren Gewebe entsprechend ihrem metabolischen Bedarf nicht ausreichend mit Blut versorgen. Circa 38 Millionen Personen leiden weltweit unter dieser Erkrankung ⁵. Trotz optimierter Behandlungsstrategien und der Möglichkeit des Einsatzes von Herzunterstützungssystemen bei Herzversagen ⁶ bleibt die

Herzinsuffizienz die Hauptursache für Morbidität und Letalität (6-7% im ersten Jahr bei chronischem, mehr als 25% bei akutem Verlauf) in der Bevölkerung ⁷. Die Herzinsuffizienz kann u.a. in folgende drei Gruppen eingeteilt werden:

- Herzinsuffizienz mit reduzierter linksventrikulärer Pumpfunktion (HFrEF: heart failure with reduced ejection fraction), linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) < 40%
- Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Pumpfunktion (HFpEF: heart failure with preserved ejection fraction), LVEF > 50%
- Herzinsuffizienz mit leicht reduzierter Pumpfunktion, LVEF zwischen 40 und 50%

Mindestens die Hälfte aller Patienten leiden unter einer HFrEF ⁸.

1.2.1. Herzinsuffizienz mit reduzierter linksventrikulärer Pumpfunktion

Die häufigsten Ursachen einer HFrEF sind der Myokardinfarkt, die koronare Herzerkrankung mit allen ihren zugrundeliegenden Ursachen (arterielle Hypertonie, metabolisches Syndrom, usw.), Schädigungen durch kardiotoxische Arzneimittel, virale Myokarditiden, peripartale Kardiomyopathien und genetische Defekte ⁹⁻¹³. Pathophysiologisch kommt es zu einem Absterben von Kardiomyozyten mit einem parallel einhergehendem Remodeling der noch vitalen Kardiomyozyten sowie der Extrazellulärmatrix ⁴. Die Folge ist eine Fibrosierung mit Beeinträchtigung der viskoelastischen Eigenschaften des Herzmuskelgewebes ¹⁴ und eine linksventrikuläre Dilatation (exzentrischer Umbau). Diese strukturellen Veränderungen führen zu einer Einschränkung der Kontraktionskraft, einem erhöhten Sauerstoffbedarf und einer neurohumoralen Aktivierung ^{15,16}.

Auf molekularer Ebene konnten bisher folgende pathologischen Veränderungen gezeigt werden: Herunterregulation von β -Rezeptoren, Transition von kompensatorischer zu pathologischer Hypertrophie, Wechsel zu einem fötalen Genexpressionsprofil und Metabolismus, posttranslationale Proteinmodifikationen sowie Störungen der Kalzium-Transienten und der

Sarkomerstruktur⁴. Obwohl diese pathophysiologischen Veränderungen experimentell in Monokultur-Zellassays aus Kardiomyozyten, Fibroblasten oder Endothelzellen nachgebildet werden können, sind wegen der fehlenden 3-Dimensionalität (3D) weiterhin Kleintier- und Großtiermodelle für Proof-of-Concept-Studien und zur Evaluation systemischer Effekte eines Myokardinfarkts bzw. von neuen therapeutischen Interventionen notwendig, um die translationale Lücke zum Menschen zu schließen.

1.2.2. Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Pumpfunktion

Obwohl die Prävalenz der HFpEF kontinuierlich zunimmt, ist ihre Pathophysiologie noch unklar. Deshalb haben bestehende Therapien die Prognose der Betroffenen nur teilweise verbessern können¹⁷. Ein möglicher pathophysiologischer Ansatz ist, dass es sich bei der HFpEF um eine multisystemische entzündliche Stoffwechselerkrankung handelt¹⁸, die mit einer durch Adipositas und arteriellen Hypertonus induzierten Störung des Stickoxid (NO)-Gleichgewichts einhergeht^{18–20}. HFpEF tritt häufiger in den älteren Bevölkerungsschichten auf und ist mit verschiedenen Komorbiditäten wie arterieller Hypertonus, metabolischem Syndrom, koronarer Herzerkrankung, Schlafapnoe und Lungenerkrankungen assoziiert²¹. Daher unterscheiden sich die Symptome der Betroffenen deutlich und ein Phänomapping ist indiziert²², um den Effekt von Interventionen besser voraussagen zu können. Die gemeinsame Endstrecke der verschiedenen HFpEF-Phänotypen ist eine eingeschränkte linksventrikuläre Compliance mit Relaxationsstörung, die mit einer Erhöhung der linksventrikulären Füllungsdrücke, gestörter systemischer und pulmonaler Vasorelaxation und neurohumoraler Aktivierung einhergeht^{23–25}. Untersuchungen zur Pathophysiologie und zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien sind wegen der geringen Verfügbarkeit von geeigneten Tiermodellen nur eingeschränkt möglich^{26,27}. Ein geeignetes Tiermodell sollte folgende charakteristische Merkmale der HFpEF aufweisen: eine Ejektionsfraktion von mindestens 50%, diastolische Dysfunktion, eingeschränkte Belastbarkeit und Ausbildung eines Lungenödems²⁸. Abhängig

vom untersuchten Pathomechanismus sollte noch zusätzlich eine konzentrische Hypertrophie vorliegen. Neuere Diabetes- und Adipositas-Tiermodelle zeigen die typischen Merkmale einer HFpEF^{29–31}. Knockout-Tiermodelle sind nicht geeignet als alternative Modelle, da der komplexe Pathomechanismus dieser Erkrankung nicht nachgeahmt werden kann. Validierte in-vitro-Modelle stehen bisher nicht zur Verfügung³². Engineered heart tissues (EHTs) können von Nutzen sein, da humanes Herzgewebe und damit kardiale Gewebeschnitte von HFpEF-Patienten nicht verfügbar sind.

1.3. 3R-Modelle

1.3.1. in-vitro Modelle als Ersatz für in-vivo Modelle

Vor dem Einsatz von in-vivo Studien wären präklinische Untersuchungen an weniger invasiven in-vitro-Modellen sinnvoll. In-vitro-Modelle sind experimentelle Systeme, die im Labor unter kontrollierten Bedingungen entwickelt werden, um biologische Prozesse zu untersuchen. Ein ideales in-vitro Herzmodell sollte aus intakten, vielzelligen 3D-Geweben bestehen, die physiologische oder pathologische Mechanismen von adultem humanem Myokard bestmöglich modellieren und Therapien simulieren können³³. Derzeit werden in der Herzforschung vor allem zweidimensionale (2D)-in-vitro-Modelle wie Monokultur-Zellassays als Ersatz für in-vivo-Tiermodelle eingesetzt³⁴. Diese Modelle können zwar informativ sein^{35,36}, spiegeln jedoch die komplexen 3D-Bedingungen des adulten Myokards nicht wieder, da sie biologische und mechanische Zell-Zell-Kontakte sowie die Interaktion der Zellen mit der extrazellulären Matrix nicht nachahmen können³⁷. Außerdem können damit nur eine begrenzte Anzahl an umwelt- und genetisch bedingten Erkrankungen untersucht werden. Um speziesbezogene Unterschiede in den mechanischen und elektrischen Gewebeeigenschaften zu vermeiden, werden künstliche 3D-Gewebekonstrukte aus Zellen humanen Ursprungs als Alternative entwickelt^{38,39}. In diesen 3D-Modellen können sich Adhäsionskomplexe zwischen den Zellen, eine Zytoskelettstruktur sowie eine funktionelle Polarität des Gewebes

ausbilden, wodurch die Limitationen von 2D-Modellen reduziert werden können⁴⁰. Beispiele für solche 3D-Modelle sind 3D-Zellkultur-Sphäroide, in eine Gel-Matrix eingebettete Zellkulturen, "Organ auf einem Chip"-Modelle, Organoide und kardiales Tissue Engineering⁴¹⁻⁴⁵. Eine Limitation von 3D-Modellen aus Stammzellen humanen Ursprungs ist der unreife Phänotyp der differenzierten Kardiomyozyten. Verfeinerte Maturierungsprotokolle sowie angepasste biomechanische und elektrische Kulturbedingungen können die bestehenden Einschränkungen dieser Modelle reduzieren und sie für viele Forschungsanwendungen zugänglich machen. Alternative 3D-Modelle beinhalten die Kultivierung von Gewebestreifen aus humanem und tierischem Myokard⁴⁶, die jedoch bisher eine begrenzte Stabilität in der Kultur aufweisen sowie deutliche technische Limitationen aufzeigen.

1.3.2. Humanes Gewebe - aktueller Stand

Die Entwicklung von in-vitro-Modellen, die pathophysiologische Aspekte des adulten Myokards und von Blutgefäßen untersuchen können, erfordert eine standardisierte Gewebeentnahme und Lagerung. Die Sydney Heart Bank wurde 1989 als erste Datenbank von humanen Myokardpräparaten gegründet, die bei Herzkathetern und operativen Eingriffen gewonnen wurden. Viele funktionelle und genetische Studien wurden mit diesen Proben durchgeführt⁴⁷, was molekulare Profilerstellungen, Pathway-Analysen und die Identifizierung von möglichen Wirkstoffzielen ermöglichte⁴⁸.

Permeabilisierte kardiale Gewebeschnitte, Myofibrillen, Kardiomyozyten und glatte Muskelzellen dienen als in-vitro-Modelle für Studien zu Myofilamenten, Kalzium-Transienten, Adenosintriphosphat-Verbrauch, Stoffwechselfunktionen, Mitochondrienfunktion, Elektrophysiologie und Arzneimittelleffekte⁴⁹⁻⁵⁵. Diese Modelle haben eine hohe physiologische Relevanz und pharmakologische Vorhersagekraft aufgrund des humanen Phänotyps, jedoch ist die Kulturdauer begrenzt. Darüber hinaus sind Kardiomyozyten außerhalb ihrer Gewebestruktur aufwändig zu kultivieren, da

sie in Mono-Zellkulturen eine begrenzte Lebensdauer und ihre Fähigkeit zur Zellteilung postnatal verloren haben.

Kardiale Gewebeschnitte aus adultem Myokard hingegen können in-vitro bedeutend länger kultiviert werden ^{33,56,57}. Es handelt sich dabei um 3D-Gewebe mit einer Dicke von 200-400 µm. Die Gewebestruktur, Funktion und die biochemischen Eigenschaften bleiben unter biomimetischen Kulturbedingungen erhalten, wodurch funktionelle Parameter wie Kontraktionskraft, Leitungsgeschwindigkeiten, Kalzium-Transienten, Aktionspotentiale und Metabolismus ^{56,58} analysiert werden können. Strukturelle Analysen sowie Gen- und Proteomuntersuchungen sind ebenfalls möglich ^{59,60}. Neue technische Fortschritte haben das Interesse einiger Forschungsgruppen geweckt, in-vitro-Modelle mit kardialen Gewebeschnitte zu optimieren, um dadurch die Anzahl an Tierversuchen weiter zu reduzieren.

Isolierte Segmente von menschlichen Blutgefäßen (z.B. A. mammaria interna, Koronargefäße, Nierenarterien, Segmente von Aneurysmen) können Einblicke in die Pathophysiologie vaskulärer Erkrankungen geben ^{61,62}, indem Western Blot, RNA-Sequenzierungen und funktionelle Studien durchgeführt werden. Die A. mammaria interna eignet sich besonders für Untersuchungen der Gefäßregulation und des vaskulären oxidativen Stresses, da dieses Gefäß keine Arteriosklerose entwickelt und empfindlich gegenüber proarteriosklerotischen Schädigungsmechanismen und oxidativem Stress ⁶³ ist. Eine Kombination von Gefäßmodellen mit anderen humanen in-vitro-Modellen ist für translationale Fragestellungen denkbar.

1.3.3. Engineered heart tissues - aktueller Stand

Neben humanem Gewebe bieten auch EHTs aus hiPSC das Potential, als alternatives und komplementäres Forschungsmodell zu dienen, wenn die bisherigen strukturellen und funktionellen Einschränkungen überwunden werden können ^{64,65}. In verschiedenen Protokollen wurde versucht, adultes Myokardgewebe durch die Differenzierung von hiPSC zu Kardiomyozyten und deren Zusammensetzung zu einem 3D-Myokardgewebe zu reproduzieren ^{66,67}.

Jüngste Fortschritte bei den Differenzierungsprotokollen und der Nachahmung von organähnlichen Funktionen in-vitro werden diese Entwicklung weiter vorantreiben ⁶⁸.

Da hiPSC humanen Ursprung sind, erhöht sich die Translation von Ergebnissen im Vergleich zur Anwendung von Stammzellen von Tierspezies. Kulturen von differenzierten Zellen aus hiPSC sind im Allgemeinen stabiler und die Ergebnisse robuster im Vergleich zu Kulturen von frisch isolierten Zellen, Geweben oder Organen (z.B. Langendorff perfundiertes Herz). Stammzellen von Erkrankten ermöglichen zudem die Modellierung individueller Krankheitsmechanismen. Direkte pharmakologische und genetische Manipulationen (z.B. Gen-Editing) können in-vitro unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt werden, um Ursache-Wirkungs-Beziehungen zu simulieren und zu analysieren. Auch kardioprotektive und proliferative Therapien können näher untersucht werden. Durch Co-Kulturen verschiedener hiPSC-abgeleiteter Zelltypen können Zell-Zell-Interaktionen entschlüsselt und mittels Gewebezüchtung EHT-Plattformen entwickelt werden ⁴.

Ein Nachteil von EHTs besteht in der bisherigen Unreife der Kardiomyozyten ⁶⁹. hiPSC-Kardiomyozyten haben weniger ausgereifte Mitochondrien und sind stärker auf Glykolyse als auf Substratoxidation angewiesen ⁷⁰, was zu einem hohen Grundumsatz an Glukose und eingeschränkter Insulinaktivität führt ⁷¹. Darüber hinaus können während der Differenzierung und Langzeitkultur Karyotyp-Anomalien und epigenetische Veränderungen auftreten, die schwer zu kontrollieren sind ⁷². In-vitro-Assays können nur begrenzt krankheitsrelevante Gesamtorganfunktionen (z. B. Arrhythmien und diastolische Herzfunktion) sowie Zell-Zell-basierte Mechanismen (z. B. Einstrom von Entzündungs- und Immunzellen) erfassen. Weitere Limitationen sind die fehlende Vaskularisierung und Perfusion der Gewebe, der begrenzte Zeitrahmen für die Experimente sowie die fehlende Abbildung von kardiovaskulären Risikofaktoren, Komorbiditäten und Organ-Organ-

Interaktionen ⁴. Um den Einsatz von EHTs voranzubringen, werden folgende Strategien empfohlen:

Die Bildung von hiPSC-Kardiomyozyten sollte automatisiert und nach etablierten Qualitätsstandards erfolgen, um individuelle Unterschiede zu minimieren. Allerdings sind die hohen Kosten für die Anfangsinvestition und Wartung ein Hindernis für den breiten Einsatz von EHT-Plattformen.

Neuere Forschungsarbeiten konzentrieren sich auf den Einfluss von elektrischer, hydrodynamischer, metabolischer und mechanischer Stimulation, um einen adulten Phänotyp der Kardiomyozyten in den EHTs zu erreichen ^{65,73–75}. Eine Co-Kultur mit zu Fibroblasten, Endothelzellen, Neuronen und Immunzellen differenzierten hiPSC könnte eine weitere Verbesserung der Differenzierung ermöglichen ^{76,77}. Es ist jedoch noch unklar, inwieweit diese Zellen die natürlichen Funktionen in EHTs nachahmen können.

Parallele Messungen von Kontraktionskraft, Kalzium-Transienten und Aktionspotentialen mittels fluoreszierender Farbstoffe wie Fluo-4 oder genetisch kodierte Kalziumsensoren wie GCaMP6f116 ⁷⁸ sowie "scharfer" Elektrode ermöglichen eine phänotypische Charakterisierung der EHTs sowie Analysen in intakten Präparaten und reduzieren die Beeinflussung der Ergebnisse durch Zellisolierung ⁷⁹. Allerdings können bestimmte Fragestellungen nur mittels der Patch-Clamp-Methode bei isolierten Einzelzellen beantwortet werden. Setups, die eine Manipulation der Matrixsteifigkeit und der Nachlast ermöglichen, können Ischämie und Zellphänotypen in den EHTs hervorrufen, die unter basalen Bedingungen maskiert sind ^{80,81}. Bestimmte Komorbiditäten können beispielsweise durch hyperglykämische oder hypercholesterinämische Kulturmedien simuliert werden. Eine in-vitro Vaskularisierung kann zur Erforschung pathophysiologischer Aspekte von Thrombose und Ischämie dienen ⁸². "Organ-on-Chip" Ansätze, bei denen organähnliche Zellen in unterschiedlichen Kompartimenten kultiviert werden, die über das Kulturmedium miteinander verbunden sind, bieten die Möglichkeit, organähnliche Funktionen oder

komplexere Organ-Organ-Interaktionen wie die Wirkung von Arzneimitteln auf Kardiomyozyten in Anwesenheit von Leberzellen zu untersuchen ⁸³. Das Potenzial dieser neueren Versuchsmodelle muss jedoch gegen den technischen Aufwand und die eingeschränkte Organfunktion abgewogen werden. Aufgrund der fehlenden Nachbildung von Vaskularisierung, Erregungsleitung und spezifischer Organfunktionen ist ein Ersatz von Tierversuchen mit "Organ-on-Chip"-Modellen nur begrenzt möglich.

Die aktuellen Entwicklungsprozesse zeigen eine weitere Feinabstimmung der hiPSC-Differenzierung und Maturierung sowie der EHT-Bildung. Vielversprechend sind dabei die Bildung von 3D-Geweben oder Organoiden, die hiPSC-abgeleitete Endothelzellen, Fibroblasten und Kardiomyozyten enthalten ⁷⁶. Diese Gewebe werden durch ein Kapillarnetz perfundiert, um eine bessere Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff zu ermöglichen ⁸⁴. Außerdem werden sie in 3D-Drucker entwickelte Gerüste eingebettet, um die Steifigkeit von adultem Myokard zu simulieren ⁸⁵. Diese Technologien ermöglichen eine noch bessere Nachbildung des natürlichen Gewebes und könnten für die Entwicklung von Therapien für Herz-Kreislaufkrankungen von großer Bedeutung sein.

1.4. Zielsetzung

Die Kultivierung von kardialen Geweben erfolgt in Bioreaktoren. Bisher konnte die Vitalität und Funktion von Myokardgeweben in den entwickelten Bioreaktoren ⁸⁶⁻⁸⁸ nur für bis zu 6 Tagen aufrechterhalten werden, und trotz des hohen technischen Aufwands konnten nur wenige Gewebestreifen parallel kultiviert werden ^{89,90}. Daher ist das Hauptziel dieser Arbeit, die Kultivierung von kardialen Geweben zu verbessern und damit eine Grundlage für die Anwendung in der Arzneimittelsicherheit und der pathophysiologischen Forschung zu schaffen. Hierbei wurden folgende Zwischenziele verfolgt:

Weiterentwicklung eines biomimetischen Reaktors und der passenden Stimulations- und Registrierungseinheiten, um die Kulturbedingungen von humanem Myokard zu optimieren und eine Kultivierung von beliebig vielen Gewebestreifen parallel in einem Inkubator über mehrere Wochen zu ermöglichen.

Testung des optimierten Bioreaktors in Anwendungen zur Arzneimittelsicherheit und Beantwortung von pathophysiologischen Fragestellungen.

Anpassung der Kulturbedingungen im Bioreaktor, um die Struktur und Funktion von Gewebestreifen von Mäuseherzen in-vitro zu erhalten und somit auch tierisches Myokard in der Forschung einzusetzen.

Entwicklung eines neuen Herstellungsverfahrens von EHTs, das auf Gewebeverlängerung und Zellwachstum durch mechanische Stimulation basiert und die Gewebebildung von der Maturierung abkoppelt. Dadurch soll die postnatale Phase der Myokardentwicklung imitiert werden, die nicht durch Hyperplasie, sondern durch Hypertrophie gekennzeichnet ist und in der die Dehnungsbelastung der Kardiomyozyten eine entscheidende Rolle für das myokardiale Wachstum spielt.

2. Material und Methoden

2.1. Adultes Myokardgewebe

2.1.1. Gewebegewinnung humanes Myokard

Humanes Myokardgewebe wurde im Rahmen von Herztransplantationen oder bei Implantationen von Linksherzunterstützungssystemen (LVADs) gewonnen, die in den herzchirurgischen Kliniken des Herz- und Diabeteszentrum Bad Oeynhausen und des LMU Klinikums München stattfanden. Transmurale Gewebestücke mit einer Größe von 2 x 2 cm² wurden aus dem linken Ventrikel während der Transplantation ausgeschnitten oder bei der Implantation von LVADs ausgestanzt. In einigen Fällen wurde auch Myokardgewebe verarbeitet, das während einer Morrow-Myektomie (Korrektur einer subaortalen Obstruktion) reseziert wurde. Die Gewinnung der Gewebe wurde von der Ethikkommission der LMU genehmigt und die Studien wurden gemäß den ethischen Standards der Deklaration von Helsinki von 1964 und deren späteren Erweiterungen durchgeführt. Das Myokardgewebe wurde unmittelbar nach der Gewinnung in eine Pufferlösung bei 4°C (136 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0,33 mM NaH₂PO₄, 10 mM Glucose, 0,9 mM CaCl₂, 30 mM 2,3-Butadion-2-monoxim, 5 mM HEPES, pH 7,4) gelegt. Die Gewebe aus Bad Oeynhausen wurden per Kurier gekühlt verschickt und erst nach einer Verzögerung von bis zu 32 Stunden weiterverarbeitet.

2.1.2. Gewebegewinnung Myokard von der Maus

Die Versuche an Tieren wurden gemäß den Richtlinien der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Pflege und Verwendung von Versuchstieren durchgeführt und waren mit den gültigen Tierschutzgesetzen im Einklang. Die Experimente wurden vom Landesamt für Umwelt und Landwirtschaft genehmigt (Verfahrensnummer AZ 55.2-1-54-2532.3-67-13). Für die Versuche wurden Überschusstiere verwendet, die bei den Züchtungen angefallen sind. Transgene CD1 Mäuse (weiblich, 35-45 g) mit Channelrhodopsin-2 (Gen der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*) wurden für Experimente mit

optogenetischer Stimulation eingesetzt⁹¹. Die Mäuse wurden freundlicherweise vom Institut für Physiologie I der Universität Bonn zur Verfügung gestellt. Bei der optogenetischen Stimulation führt das blaue Licht der Wellenlänge 475 nm zur Öffnung der in die Membran der Kardiomyozyten eingebauten Channelrhodopsin-2-Kanäle und somit zum Einstrom von Ionen, wodurch es schließlich zur Kontraktion des Myokards kommt. Für die Experimente mit dieser Stimulationsart wurden den Mäusen vor der Tötung 50 µg/kg Buprenorphin und 500 IE/kg Heparin intraperitoneal injiziert. Die Tiere wurden unter tiefer Narkose mit 5 Vol% Isofluran getötet, indem das Herz schnell über eine mediane Sternotomie exzidiert wurde. Die entnommenen Herzen wurden in eine 4°C kalte Pufferlösung (136 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0,33 mM NaH₂PO₄, 10 mM Glucose, 0,9 mM CaCl₂, 30 mM 2,3-Butadion-2-monoxim, 5 mM HEPES, pH 7,4) gelegt. Nach ausreichender Kardioplegie wurden unter sterilen Bedingungen die Vorhöfe mit einer Schere abgetrennt.

Für die Experimente mit elektrischer Stimulation wurden männliche C57/BL6-Mäuse von Charles River (24-30 g) eingesetzt. Vor der Tötung der Mäuse wurden sie intraperitoneal mit einer Mischung aus 0,9 % NaCl, 10 % Ketaminhydrochlorid, 2 % Xylazin und 1 % Acepromazin injiziert (100 µl/10 g Körpergewicht). Die Tötung erfolgte ebenfalls durch rasche Exzision des Herzens über eine mediane Sternotomie.

2.1.3. Präparation der kardialen Gewebeschnitte

Nach der Entfernung von endokardialen Trabekelanteilen wurden die humanen Gewebestücke unter sterilen Bedingungen auf eine Größe von ca. 15 × 15 mm² zugeschnitten. Anschließend wurden die Gewebe in 37°C warmer 4 % Low-Melt-Agarose (gelöst in Pufferlösung bei 60 °C) eingebettet und auf eine gekühlte Schneideplatte eines Vibratoms (VT1200S, Leica Biosystems, Deutschland) aufgeklebt. In der gekühlten Pufferlösung wurden ausgehend vom Endokard die Gewebe mit einer Rasierklinge in tangentialer Ausrichtung in 300 µm dicke kardiale Gewebeschnitte geschnitten. Die Schwingungsamplitude betrug dabei 1,5 mm und die Vorschubgeschwindigkeit

0,07 mm/s^{46,56}. Nach dem Schneiden wurden die Gewebeschnitte vorsichtig von der Agarose befreit. In Faserrichtung wurden an den gegenüberliegenden Seiten kleine Kunststoffdreiecke aus 0,1 mm dickem Polyester (MGW5504, MGW Office Supplies, Deutschland) mit Histoacryl-Kleber (B. Braun Melsungen AG, Deutschland) angebracht, sodass ein ca 8 x 8 mm² großer Myokardanteil erhalten blieb. Die Gewebeschnitte wurden anschließend in Kulturkammern mit 2,4 ml vorgewärmten (37° C) Kulturmedium (Medium 199, Penicillin/Streptomycin, Insulin/Transferrin/Selenit und 50 µM 2-Mercaptoethanol) eingehängt. Die Gewebeschnitte wurden nach einer kurzen Äquilibrationszeit elektrisch stimuliert und die diastolische Vorlast auf 1 mN eingestellt. Die elektrische Stimulation erfolgte mithilfe einer steuerbaren Stromquelle mit bipolaren Impulsen (1 ms Ladestrom und 1 ms Entladestrom, getrennt durch ein Intervall von 1 ms) ohne Stromfluss zwischen den Impulsen. Nach 24 Stunden in der Kultur wurde die Vorlast der Gewebeschnitte nochmals auf 1 mN korrigiert.

Die Ventrikel der Mäuseherzen wurden nach der Entnahme in 37°C warme 4% Low-Melt-Agarose eingebettet und mit einem Vibratom transversal (Schwingungsamplitude 1 mm, Vorschubgeschwindigkeit 0,05 mm/s) in bis zu acht 300 µm dicke Gewebeschnitte geschnitten. Nach Entfernung der Agarose wurden an die Ventrikelvorder- und Hinterwände mit Histoacryl-Kleber kleine Kunststoffdreiecke aus 0,1 mm dickem Polyester (MGW5504, MGW Office Supplies, Deutschland) angeklebt, um die Gewebeschnitte für weitere Untersuchungen im Organbad und in den Kulturkammern einhängen zu können.

2.1.4. Kulturbedingungen humaner kardialer Gewebeschnitte

Die kardialen Gewebeschnitte wurden in einem Inkubator (37 °C, 5 % CO₂, 20 % O₂, 80 % Luftfeuchtigkeit) auf einem Messsystem mit acht Kulturkammern unter kontinuierlicher Kippbewegung (60 U/min, 15° Neigungswinkel Hi/Lo-Rocker, IBI Scientific, USA, bestückt mit bürstenlosem Motor BLH230KC-30, Orientalmotor, Deutschland) kultiviert. Die elektrische Stimulation erfolgte mit

bipolaren Impulsen mit einer Geschwindigkeit von 0,2 Hz und einer Stromstärke von 50 mA. Die unphysiologisch niedrige Frequenz wurde gewählt, um den Sauerstoffbedarf und den Bedarf an Nährstoffen so gering wie möglich zu halten. Das Kulturmedium wurde teilweise (1,6 ml von 2,4 ml) in Intervallen von 36 - 48 h gewechselt. Bei Langzeitbehandlungen wurden Medikamente in tausendfacher Endkonzentration entweder in DMSO oder in 0,9% NaCl gelöst und bei jedem Mediumwechsel hinzugefügt.

2.1.5. Aufbau der Kulturkammern

Die Kulturkammern für humane kardiale Gewebeschnitte bestanden aus CNC-gefrästen Schalen aus Polyoxymethylen oder Cyclo-Olefin-Copolymeren. Um eine elastische Aufhängung der kardialen Gewebeschnitte zu ermöglichen, wurden die Kulturkammern mit einem 0,25 mm dicken Stahldraht (1.4401, 18 mm lang) mit einem Magneten (NdFeB, 1 mm Länge, 0,5 mm Durchmesser, HKCM Engineering, Deutschland) an dessen freiem Ende und einem zweiten Stahldraht (1.441, 0,4 mm Durchmesser) mit einer Federkonstante von 75 mN/mm, der an einem Linearantrieb konnektiert wurde, ausgestattet. Abgedichtet wurden die Wanddurchtrittsstellen der Drähte mit Silikon. Die Auslenkungen des Magneten wurden mit einem 3D-Magnetfeldsensor (FXOS8700, NXP Semiconductors, USA) erfasst, der auf Sensorplatinen angebracht wurde, die mit den Kulturkammern verschraubt werden konnten. Der Magnetfeldsensor reagierte auf eine Verschiebung mit einer Empfindlichkeit von 7 T/m. Das Signal/Rausch Verhältnis ermöglichte die Detektion einer Muskelverkürzung mit einer räumlichen Auflösung von 0,5 μm . Die Stimulation der kardialen Gewebeschnitte erfolgte elektrisch über zwei 6 x 8 mm² große Graphitelektroden (CG1290, CGC Klein, Deutschland), die über Stahldrähte (Qualität 1.4401, 0,4 mm Durchmesser) mit den Sensorplatinen verbunden wurden und in den Kulturkammern im Abstand von 20 mm zum Gewebe platziert wurden. Die Steuerung der Sensorplatinen erfolgte über einen ARM Cortex M4 Microcontroller (Kinetis K22F, NXP Semiconductors, USA), der so programmiert wurde, dass er die Magnetfeldänderungen der 8

Kulturkammern über einen seriellen I²C-Port mit einer Abtastrate von 500/s registrierte und für jede Kammer einzeln Stimulationsimpulse über einen Multiplexer (ADG1407, Analog Devices Inc., USA) verteilte. Die elektrische Stimulation erfolgte durch eine steuerbare Stromquelle (LT1970, Linear Technology, USA). Der Microcontroller wurde mit einem PC verbunden, der als Registrier- und Stimulationseinheit diente. Die Datenregistrierung und Stimulation erfolgte über eine in der Arbeitsgruppe selbst geschriebene Software unter Einsatz der Funktionsbibliothek "Oscilloscope_DLL" (mit freundlicher Genehmigung von M. Bernstein, <https://www.oscilloscope-lib.de>). Aufgezeichnete Daten wurden in die Software „LabChart Reader“ (AD Instruments, Australien) importiert und analysiert.

2.1.6. Kulturbedingungen kardialer Gewebeschnitte von der Maus

Die kardialen Gewebeschnitte von der Maus wurden zunächst auf Filtermembranen (PICM0RG50, Millipore, USA) in Petrischalen kultiviert⁴⁶. Die Petrischalen wurden mit 1 ml Medium 199 mit Penicillin/Streptomycin und Insulin/Transferrin/Selenit befüllt, um eine ausreichende Nährstoffversorgung sicherzustellen. Die Petrischalen wurden in einem Inkubator bei denselben Bedingungen wie die humanen Gewebeschnitte inkubiert, wobei die Sauerstoffversorgung durch den direkten Kontakt der Gewebeschnitte mit der Luft gewährleistet wurde. Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium gewechselt und die Kulturzeit nach 48 Stunden beendet.

Da die Gewebeschnitte nicht an den Filtermembranen haften blieben, wurden sie isometrisch zwischen zwei 0,6 mm dicken Stahldrähten eingehängt. Anschließend wurden sie mit 3 ml Medium 199 bedeckt. Diese Bedingung ermöglichte die Anwendung einer diastolischen Vorlast. Um die Sauerstoffversorgung der Gewebe sicherzustellen, wurden die Petrischalen horizontal auf einem Orbitalschüttler (20 U/min, PSU-20, Grant Instruments, UK) im Inkubator geschüttelt. Das Kulturmedium wurde während der Kulturzeit nicht gewechselt, und die Kultur wurde nach 48 Stunden beendet.

Um eine effektive systolische Verkürzung zu ermöglichen, wurden die Gewebeschnitte in den Kulturkammern elastisch zwischen einem festen und einem elastischen Stahldraht (0,27 mm Wolframdraht) eingehängt. Anschließend wurden sie mit 3 ml Medium 199 mit oder ohne β -Mercaptoethanol (β -ME) bedeckt und die diastolische Vorlast auf 0,3 mN eingestellt. Die Kulturkammern wurden wie bei den humanen Gewebeschnitten auf einer Schüttelplatine aufgesteckt und in einem Inkubator bei 37 °C, 5% CO₂, 80% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Bei langsamen Schüttelbewegungen wurden die Kulturkammern horizontal auf einem Orbitalschüttler (20 U/min, PSU-20, Grant Instruments, UK) geschüttelt, bzw. bei schnellen Schüttelbewegungen auf einem Kippschüttler mit 12°-Neigung und einer Frequenz von 60/min (ST5 CAT, Zipperer-GmbH, Deutschland).

Für das Pacing der Gewebeschnitte wurden Licht emittierende Dioden (LEDs, CREE XP-EM2, LED-TECH.DE) zentral und im Abstand von 5 mm unter jede Kulturkammer auf der Grundplatte angebracht. Die LEDs hatten eine Emissionswellenlänge von 475 nm und wurden mit Impulsen von 3 ms Dauer und Strömen zwischen 0,1 und 1,2 Ampere betrieben. Die Reizschwelle wurde definiert als der Strom, der erforderlich war, um 50% der maximalen Kontraktionskraft in jedem Gewebeschnitt auszulösen. Die Schwellenwerte für erkennbare minimale und maximale Kontraktionen wurden durch Unterbrechung der Stimulation für 4 Minuten und anschließendem graduellen Anstieg des LED-Stroms alle 2 Minuten von 8,8 mA bis 1 A ermittelt. Während der Kultur wurde die Stromstärke pro Impuls auf 1 A eingestellt, was einem Lichtstrom von 80 Lumen entsprach. Die LED-Spezifikationen zeigten eine lineare Beziehung zwischen der Stromstärke und der Emissionsintensität. Die Stimulationen wurden mit Frequenzen von 0,1 Hz, 0,5 Hz und 2 Hz durchgeführt. Die Kultur wurde erneut nach 48 Stunden beendet.

Für die elektrisch stimulierten Gewebeschnitte wurden Kulturkammern verwendet mit einer Federkonstante des festen Stahldrahts von 14 mN/mm. Als Kulturmedium wurde ebenfalls Medium 199 mit Penicillin/Streptomycin,

Insulin/Transferrin/Selenit und 50 μM β -ME verwendet. Als diastolische Vorlast wurde ein Wert von 0,3 mN gewählt und innerhalb der ersten 24 Stunden alle 12 Stunden bei Bedarf angepasst. Das Pacing wurde mit bipolaren 50 mA-Impulsen bei einer Frequenz von 1 Hz durchgeführt. Es wurde erneut eine unphysiologisch niedrige Frequenz gewählt, um den Sauerstoff- und Nährstoffbedarf minimal zu halten.

2.1.7. Messungen im Organbad

Die maximale Kontraktionskraft von nicht kultivierten und kultivierten humanen kardialen Gewebeschnitten wurde unter isometrischen Bedingungen mit einer diastolischen Vorlast von 1 mN in einem Organbad gemessen. Als Perfusionslösung diente eine mit Sauerstoff angereicherte Krebs-Henseleit-Lösung bei einer Temperatur von 37 °C und einer Flussrate von 4 ml/min. Die Gewebe wurden elektrisch stimuliert (1 Hz, 3 ms Impulsbreite, 1,5-fache Reizschwelle) und die maximale Kontraktionskraft unter Isoprenalinstimulation (1 μM) bestimmt.

Auch die Gewebeschnitte von Mäuseherzen wurden im Organbad charakterisiert. Um die maximale Kontraktionskraft und die Gewebeelastizität zu bestimmen, wurden die Gewebeschnitte zunächst ohne Vorlast eingespannt und dann alle zwei Minuten schrittweise um 0,125 mm gedehnt. Die gemessenen Kräfte wurden zehn Sekunden vor der nächsten Dehnung abgespeichert. Das Experiment wurde beendet, sobald das Gewebe einriss.

Nach einer 30-minütigen Äquilibrationsphase ohne β -Stimulation wurden bei den Gewebeschnitten der Maus Anwendungsversuche mit Digitoxin durchgeführt. Dafür wurde die Perfusion gestoppt und Digitoxin in zwei verschiedenen Dosierungen (100 nM und 1 μM) oder das Lösungsmittel als Kontrollgruppe hinzugefügt.

Alle im Organbad gemessenen Kräfte wurden kontinuierlich mit WinEDR (John Dempster, Universität von Strathclyde, Glasgow) aufgezeichnet und mit LabChart 8 Reader (ADInstruments, Dunedin 9016, Neuseeland) ausgewertet.

2.1.8. Messung der Refraktärzeit

In den Kulturkammern wurde die Refraktärzeit automatisiert regelmäßig gemessen. Hierbei wurde nach einem regulären elektrischen Impuls in definierten Abständen ein weiterer Impuls verabreicht. Das Intervall zwischen den beiden Impulsen wurde schrittweise von 1000 ms auf 250 ms in Abständen von 30 Sekunden verkürzt. Sobald der zweite Impuls keine Kontraktion mehr auslösen konnte, wurde das Intervall als äquivalent zur Refraktärzeit angesehen. Dieser Vorgang wurde regelmäßig wiederholt, um die Refraktärzeit zuverlässig zu bestimmen.

2.1.9. Messung der Zellviabilität

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurden sowohl frische als auch kultivierte kardiale Gewebeschnitte für 20 Minuten bei 37°C in einem Inkubator mit 0,5 mg/ml Methylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) inkubiert. Das wasserlösliche Tetrazoliumsalz wird in Gegenwart von NADP zum wasserunlöslichen Formazan reduziert. Lebende Zellen färben sich durch die violette Farbe des Formazans positiv⁹². Anschließend wurde der MTT-positive Bereich der Gewebeschnitte mit der Hellfeldmikroskopie erfasst und mit ImageJ (U.S. National Institutes of Health, Bethesda; Maryland, USA) analysiert. Dabei wurde das Verhältnis zwischen der gefärbten Fläche und der Gesamtfläche der Gewebeschnitte berechnet, um die Zellviabilität zu quantifizieren.

2.1.10. Histologie

Hämatoxylin-Eosin-Färbungen wurden bei dünnen Paraffinschnitten der kardialen Gewebeschnitte durchgeführt. Für immunhistochemische Färbungen wurden die Gewebeschnitte mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 24 h fixiert und anschließend mit einem Sucrosegradienten von 4 %, 15 % und 30 % äquilibriert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte über Nacht bei 4°C mit 1 % Triton X-100 permeabilisiert und, um unspezifische Bindungen zu blockieren, mit 3 % BSA in PBS für 12 Stunden inkubiert. Die Gewebeschnitte wurden mit primären Antikörpern (Anti- α -Actinin, A7811, Anti-Connexin 43, C6219, Anti- α -smooth-muscle-Actin, A5228, Anti-Vimentin, AB92547, Anti-N-

Cadherin, #610921; 1:100 - Sigma-Aldrich, BD-Biosciences, Abcam) und sekundären Antikörpern (Anti-rabbit Alexa 488, A21441, Anti-mouse-Alexa 546, A11030; 1:100 - ThermoFisher) sowie 1 μ M TO-PRO-3 zur Kernfärbung (Anregung 633 nm, Emission 660 nm) gefärbt. Für die Waschschritte wurde Citratpuffer (150 mM NaCl, 15 mM Na₃-Citrat, pH 7.2), ergänzt mit 1 % BSA, 0,05 % Triton X-100 und 3 mM NaN₃ verwendet. Die Montage der Gewebeschnitte erfolgte in VectaMount AQ (Vector Laboratories). Die konfokale Mikroskopie wurde in der Bioimaging Core Facility des Biomedical Center der LMU München mit einem inversen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica SP8X WLL) durchgeführt.

2.1.11. Membranpotentialmessungen

Zur Messung des Membranpotentials der Kardiomyozyten in den kardialen Gewebeschnitten wurde die "scharfe Elektroden"-Technik angewendet. Dazu wurden GB100F-10-Kapillaren (Science Products) zu Elektroden gezogen und mit einer ionenselektiven Lösung aus 2 M KCl gefüllt, um einen Widerstand von 5–20 MOhm zu erreichen. Die Gewebeschnitte wurden in einem beheizten Organbad eingehängt und mit HEPES-gepufferter Earle-Salzlösung (pH 7,4, 4 ml/min, 37 °C) perfundiert. Die Elektrode wurde vorsichtig in das Gewebe eingeführt, bis ein stabiles Ruhepotential erreicht wurde. Die Stimulation erfolgte monopolar mit 1 ms Impulsen und der geringstmöglichen erforderlichen Intensität. Das gemessene Membranpotential wurde mit einem BA01X-Verstärker (npi electronic, Deutschland) verstärkt und mit einem PowerLab 4/20-System (AD-Instruments, Australien) aufgezeichnet.

2.1.12. Morphometrische Analyse der Myozyten

Frische und kultivierte humane kardiale Gewebeschnitte wurden in 4 % PFA fixiert und entweder direkt für die Bestimmung der Querschnittsfläche gefärbt oder nach Kryokonservierung zu 50 μ m dicken Schnitte präpariert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. α -Actinin wurde mit dem primären Antikörper Anti- α -Actinin (A7811, Sigma-Aldrich) und dem sekundären Antikörper Ziegen-Anti-Maus-AF488 (A21121, ThermoFisher) in einer

Konzentration von 1:200 in PBS mit 0,25% Triton X gefärbt. Die ECM und die Zellmembranen wurden mit 40 µg/ml Weizenkeim-Agglutinin (WGA), das an AF647 gebunden war (W32466, ThermoFisher), gefärbt. Zur Bestimmung der Querschnittsfläche wurden die Gewebeschnitte kompressionsfrei mit Fluoromount-G (#17984-25, Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA) eingedeckt⁹³. Die Kryoschnitte wurden auf einen Glasobjektträger mit Fluoromount-G eingedeckt und mit einem Deckglas bedeckt. Dreidimensionale Bildsequenzen wurden mit einem Zeiss LSM780 Konfokalmikroskop aufgenommen. Die Bildaufnahme erfolgte mit 1280 × 1280 Pixeln pro Ebene und etwa 200-300 Ebenen pro Bild. Die Voxelgröße betrug 0,1 × 0,1 × 0,2 µm, was zu Stapelgrößen von etwa 128 × 128 × 50 µm führte. Es wurden mindestens drei Bilder von jedem Kryoschnitt in zufällig ausgewählten Regionen aufgenommen.

Die Querschnittsflächen der Kardiomyozyten wurden durch Bildverarbeitung und Segmentierung bestimmt⁹³. Zur Berechnung des Anteils der ECM wurde das Volumen des segmentierten WGA-Signals herangezogen, das als Indikator für eine mögliche Fibrose diente⁹⁴. Zur Ermittlung der Sarkomerlänge wurde die Darstellung der Z-Linien mittels der α-Actinin-Färbung ausgewertet. Die mikroskopischen Bilder wurden mit einer Fourier-Transformation umgewandelt (ImageJ), und in dieser wurde das erste Maximum der Intensitätsverteilung in einem Bereich von 1/3 bis 1/µm identifiziert⁹⁵. Der Kehrwert dieses Maximums gab die Länge der räumlichen Struktur mit der überwiegenden Regelmäßigkeit wieder, welche der Sarkomerlänge entsprach. Um die Dichte der T-Tubuli zu quantifizieren, wurde der durchschnittliche intrazelluläre Abstand zur nächsten Membran nach einer schwellenbasierten Segmentierung des WGA-Signals berechnet⁹⁶.

2.1.13. Quantitative Echtzeit-PCR

Zur RNA-Extraktion wurde das RNAeasy Mini Kit (Qiagen) gemäß den Herstellerangabe verwendet. Die RNA-Konzentrationen wurden mit einem NanoDrop 2000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Für

die Erzeugung der cDNA-Proben wurden gleiche Mengen an RNA mit dem cDNA Synthesis Kit (Roche) gemäß den Herstellerangaben zu cDNA transkribiert. Alle qRT-PCR-Analysen wurden in Duplikaten auf einem LightCycler 1.5 Detection System (Roche) unter Verwendung des Power SYBR Green PCR Master Mix (Invitrogen) durchgeführt. Der speziell entworfene Primer wurden von Eurofin Genomics synthetisiert. Die Zyklusbedingungen umfassten eine Initialdenaturierung bei 95 °C für 5 Minuten, gefolgt von 45 Zyklen bei 95 °C für 10 Sekunden, 60 °C für 30 Sekunden und 72 °C für 15 Sekunden. β -Actin wurde in allen Experimenten als Referenzgen verwendet und die mRNA-Expression wurde auf die Gesamt-RNA bezogen. Die relative mRNA-Expression von Ziel- und Referenzgenen wurde unter Verwendung der Roche LightCycler Quantification Software berechnet.

2.1.14. Transkriptomanalyse

Die mRNA-Expression von kardialen Gewebeschnitten von drei Patienten wurde vor und nach 14 und 35 Tagen in der Kultur sequenziert. Hierfür wurde die RNA aus den gesamten Zelllysaten mit dem AllPrep RNA Kit (Qiagen) isoliert und die RNA-Integritätszahl (RIN) mit dem Agilent 2100 BioAnalyzer (RNA 6000 Nano Kit, Agilent) bestimmt. Zur Erstellung der RNA-Bibliothek wurde 1 μ g Poly(A)-RNA fragmentiert und mit dem Elute Prime Fragment Mix (Illumina) rücktranskribiert. Anschließend wurde Endreparatur, A-Schwanzbildung, Adapterligation und Bibliotheksanreicherung gemäß dem Low-Throughput-Protokoll des TruSeq-stranded-RNA-Proben-Vorbereitungsleitfadens (Illumina) durchgeführt. Die RNA-Bibliotheken wurden auf Qualität und Quantität mit dem Agilent 2100 BioAnalyzer und dem Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Life Technologies) überprüft und als 100 bp-Paar-End-Läufe auf einer Illumina HiSeq4000-Plattform sequenziert. Im Durchschnitt wurde eine 5,8 Gb große Sequenz pro Probe produziert. Die Split-Read-Ausrichtung gegen die menschliche Genom-Assembly hg19 (GRCh37) und UCSC KnownGene Annotation wurde mit dem STAR-Aligner (v2.4.2a) mit modifizierten Parameter-Einstellungen (--twopassMode = Basic) durchgeführt.

Zur Quantifizierung der Anzahl der Reads von annotierten Genen wurde der HTseq-count (v0.6.0) verwendet. Die Identifikation von differentiell exprimierten Genen erfolgte mit dem R Bioconductor-Paket DESeq2 (v1.10.1). Anschließend wurden Genontologien und Pfade mit den R Bioconductor-Paketen goseq (v1.22.0) und gage (v2.20.0) untersucht.

Um die kulturabhängige transkriptionelle Regulation einzelner Gene oder Genontologien zu untersuchen, wurden die Transkriptzahlen in kultivierten und nicht-kultivierten Gewebeproben desselben Patienten verglichen. Die Differenz dieser Werte wurde als Log₂-Wert ausgedrückt und der zeitliche Verlauf der Parameter wurde durch lineare Regression approximiert. Auf diese Weise konnten frühe transkriptionelle Reaktionen von langfristigen Veränderungen in der Gewebekultur unterschieden werden. Die Parameter der Regressionsanalyse ermöglichten eine Extrapolation der Expressionsniveaus zu Beginn der Kultivierung (Tag 0-Interzept) und des zeitlichen Trends während 35 Tagen Kultur (Steigung multipliziert mit 35).

2.2. Engineered Heart Tissues

2.2.1. Zellkultur und Differenzierung von humanen, induziert-pluripotenten Stammzellen

Für die Erzeugung von hiPSCs wurden Hautfibroblasten (ID MRIi004-A) eines gesunden Spenders nach Einholung der Zustimmung reprogrammiert ⁹⁷. Die hiPSCs wurden in matrixbeschichteten Petrischalen (Geltrex LDEV-Free, Gibco) unter Verwendung von Essential 8 Medium (Gibco) expandiert und täglich mit frischem Medium versorgt. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 85% mit EDTA (Versenesolution; Gibco) dissoziiert und aufgeteilt. Zur Differenzierung zu Kardiomyozyten wurde das von Chen et al. veröffentlichte Protokoll verwendet ⁹⁸. Die Differenzierung wurde bei einer Zellkonfluenz von etwa 85% durch Zugabe von Medium A für 24 Stunden und anschließend Medium B für 48 Stunden (PSC Cardiomyocyte Differentiation Kit; Gibco)

eingeleitet. Nach 72 Stunden wurde die Differenzierung für 12 Tage mit Cardiomyocyte Maintenance Medium (PSC Cardiomyocyte Differentiation Kit; Gibco) fortgesetzt. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt.

2.2.2. Kardiales Tissue Engineering

Zur Dissoziation wurden die hiPSCs für 8 Minuten mit TrypLE Select Enzym (Gibco) und anschließend für 7 Minuten mit Kollagenase II (1,5 mg/ml, Sigma-Aldrich) behandelt. Die Zellen wurden in EB6 Medium (Gibco) suspendiert und für 5 Minuten bei $390 \times g$ zentrifugiert. Der Zellpellet wurde anschließend in EB6 Medium mit 0,55 mg/ml bovinem Kollagen I (Gibco), 0,08 mg/ml Geltrex (LDEV-frei, Gibco) und 1 % RevitaCell Supplement resuspendiert (modifiziert nach ⁹⁹), wobei eine Zellkonzentration von $1,1 \times 10^5$ Zellen/ μ l angestrebt wurde. Daraufhin wurden 55 μ l der Zellmatrixmischung auf eine Filtermembran mit 30 mm Durchmesser (PICMORG50, Merck Millipore) pipettiert, um einen ovalen Gewebestreifen mit einem Durchmesser von etwa 8 mm und einer Dicke von 2 mm zu formen. Nach der Verfestigung der Gewebemischung bei 37 °C für 30 Minuten wurde die Filtermembran in eine Petrischale gelegt und der Boden mit 1 ml EB6 Medium bedeckt. Das Medium wurde alle zwei Tage für insgesamt fünf Tage gewechselt.

2.2.3. EHT Kulturkammern

Die Kulturkammern, die für die biomimetische Kultur von EHTs verwendet wurden, wurden aus spritzgegossenem Polystyrol (Proto Labs, Feldkirchen, Deutschland) hergestellt. Zur Erzeugung einer elastischen Compliance von 71 mm/N wurde ein 0,16 mm dicker Stahldraht als Feder eingesetzt (Edelstahl, Typ 1.4401). Haltepfosten in der Mitte der Stahldrähte wurden mit einem Polyethylenröhrchen (0,96 mm Außendurchmesser, Portex, Smiths Medical, Dublin, USA) bedeckt, das an seinem unteren Ende abgeflacht war, um eine stabile Unterstützung des Gewebes zu gewährleisten. Die EHTs wurden durch bipolare elektrische Impulse (2×1 ms Dauer, 50 mA, 1 Hz) stimuliert. Um eine Sauerstoffaufnahme im Inkubator zu ermöglichen, wurde die Schüttelplatte kontinuierlich mit einem Winkel von 12° und einer Geschwindigkeit von 60/min

geschüttelt. Mit dieser Technik erreichten wir Sauerstoffpartialdruckwerte im Medium zwischen 70-100 mmHg.

2.2.4. Progressive Dehnung

Nach der Filterkultur wurden die Gewebestreifen in die Kulturkammern, die mit 2,4 ml vorgewärmten (37 °C) EHT-Kulturmedium (modifiziert nach ⁴³) gefüllt waren, überführt. Für den Transfer wurden die Haltepfosten in Mittelstellung gebracht und das Zentrum der Gewebestreifen darüber aufgesteckt. Der Abstand der Haltepfosten wurde dann auf 3 mm eingestellt, sodass ein ringförmiges EHT entstand, das direkt elektrisch stimuliert (1 Hz und 50 mA Strom) wurde. Die EHTs wurden zufällig einer von vier Dehnungsbedingungen (S0 = 0 mm/Tag, S1 = 0,08 mm/Tag, S2 = 0,16 mm/Tag, S3 = 0,32 mm/Tag) zugewiesen und einmal täglich durch manuelle Drehung des Linearantriebs für 21 Tage aktiv gedehnt. Das Medium wurde teilweise (1,6 ml von 2,4 ml) jeden zweiten Tag unter Zugabe von 0,1 nmol/L 3,3',5-Triiod-L-thyronin (Sigma-Aldrich) ausgetauscht. Insgesamt wurden 20 unabhängige Experimente durchgeführt.

2.2.5. Biomechanische und funktionelle Gewebecharakterisierung

Die Gewebematurierung wurde durch kontinuierliche Aufzeichnung der Kontraktionskraft, der diastolischen Wandspannung und der Reizschwelle während der Kultur sowie durch eine Endpunktanalyse nach 21 Tagen charakterisiert. Hierbei wurden Kalzium-Transienten nach Beladung der EHTs mit Fluo-4 gemessen und die β -adrenerge Stimulationsfähigkeit durch Stimulation mit Isoproterenol getestet. Im Organbad wurden die maximale Kontraktionskraft und das Elastizitätsmodul bestimmt und diese Werte auf die Actinin-positive Querschnittsfläche bezogen, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Zur Messung des Membranpotentials der Kardiomyozyten wurde auch bei den EHTs die "scharfe Elektroden"-Technik angewendet. Die Expression von Genen, die für die Exzitation/Kontraktions-Kopplung, die Sarkomerstruktur oder einen adulten Phänotyp von Kardiomyozyten ⁴³ relevant sind, wurden mittels Standard-Echtzeit-PCR-Assays und RNA Sequenzierung

analysiert. Die Gewebestruktur wurde mittels Histologie und Immunfluoreszenz untersucht.

2.2.6. Quantitative Morphologie

Die EHTs wurden in den Kulturkammern unter Aufrechterhaltung der Dehnung mit 4 % PFA für eine Stunde fixiert. Für die immunhistochemischen Färbungen wurden die EHTs mit 30 % Saccharose äquilibriert und in 20 µm dicke Schnitte kryosektioniert. Die Permeabilisierung wurde mit 1 % Triton X-100 für 1 Stunde durchgeführt. Die EHTs wurden mit einem primären monoklonalen Anti- α -Actinin-Sarkomer-Antikörper (monoklonaler , 1:100, Sigma-Aldrich), passendem Sekundärantikörper (Ziegen-Anti-Maus-IgG (H+L) hochgradig quervernetzt, Alexa Fluor 546, 1:100, Invitrogen), fluoreszierendem WGA (WGA konjugiert mit CF633 bei 40 µg/mL, Biotium CF) und DAPI (Invitrogen) gefärbt. Die Mitochondrien wurden mit einem primären Antikörper gegen die Untereinheit der Cytochrom-c-Oxidase (Kaninchenpolyklonaler MT-CO2-Antikörper, 1:50, Invitrogen) und einem passenden Sekundärantikörper (Alexa Fluor 488 Anti-Kaninchen-IgG 1:500, Invitrogen A-21441) visualisiert. Die konfokale Mikroskopie wurde in der Bioimaging Core Facility des Biomedical Center der LMU München mit einem inversen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica SP8X WLL) durchgeführt. Die Sarkomerlänge wurde mit ImageJ und einem entsprechenden Plugin in der Längsachse gemessen (mindestens 5 Messungen aus 11 Präparaten). Der Querschnitt der Kardiomyozyten wurde in mindestens 50 Actinin-positiven Zellen je Präparat gemessen. Die Myofibrillenausrichtung wurde mit der Mikroskoptechnik der zweiten harmonischen Wellenlänge abgebildet ¹⁰⁰.

2.2.7. Zellmorphologie

Fixierte EHTs wurden mit Anti- α -Actinin, WGA-AF647-Konjugat (ThermoFisher) und DAPI gefärbt und auf einem Standard-Mikroskopträger mit Fluoromount eingebettet. Die konfokale Mikroskopie wurde mit einem Zeiss LSM780 Konfokalmikroskop mit einer 63x-Ölimmersionsoptik und einer Pixelgröße von 0,1 x 0,1 µm² durchgeführt. Zweidimensionale Scans über eine Fläche von 1-3

mm² mit einer Überlappung von 10 % wurden aufgenommen und mit der Zeiss ZEN Imaging Software automatisch zusammengesetzt. Die Bilder wurden rauschgefiltert und mit gemessenen Punktspreizfunktionen dekonvolviert^{93,100}. Um Myozytenkerne aus dem DAPI-Signal zu segmentieren, wurden histogrammbasierte Schwellenwerte und morphologische Closing-Operatoren verwendet. Die Kerne wurden als Marker (Startpunkte) für eine morphologische Wasserscheiden-Segmentierung mit der WGA-Intensität als Gradientenbild verwendet⁹³. Die resultierenden Segmente entsprachen den Umrissen der Zellen im Gewebe. Das α -Actinin-Signal wurde mit einem histogrammbasierten Schwellenwert (Modus + 1 SD) segmentiert^{93,95}. Um die Analyse auf Kardiomyozyten zu beschränken, deren Zentren sich innerhalb des optischen Schnittbildes befanden, wurden nur Segmente mit einem α -Actinin-Flächenanteil $\geq 0,07$ und einer Kerngröße $\geq 5 \mu\text{m}^2$ für die morphologische Analyse verwendet^{93,95}. Die morphologische Analyse wurde mit Matlab-Skripten (Version 2019a) durchgeführt und umfasste die Berechnung der Zellfläche, der Zelllänge und der Orientierung der Hauptachsen (Hauptkomponentenanalyse). Die Standardabweichung (Streuung) der Winkel zwischen der Hauptachse einer Zelle und den Hauptachsen ihrer Nachbarzellen erster und zweiter Ordnung wurde als Maß für die lokale Zellausrichtung verwendet.

2.2.8. RNA Sequenzierung und bioinformatische Analyse

Die RNA wurde gemäß den Herstellerangaben mit Trizol (Life Technologies) isoliert, und die Integrität wurde mit dem Agilent Bioanalyzer 2100 überprüft. Die Gesamt-RNA wurde mit dem SENSE Total RNA-Seq Library Prep Kit von Lexogen vorbereitet und auf einer Illumina HighSeq-2000-Plattform sequenziert (SR 50 bp; > 25 Mio. Reads pro Probe). Die Sequenzbilder wurden mit der Illumina-Software BaseCaller in BCL-Dateien umgewandelt und dann mit CASAVA (v1.8.2) in FASTQ-Dateien demultiplexiert. Die Gen- und Transkriptzählung wurde mit Salmon (v0.14.1) durchgeführt, und die Zähler wurden mit edgeR (v3.28.1) mittels TMM normiert. Die differentielle Expression

wurde mit limma (v3.42.2, Voom mit Qualitäts-Gewichten) ermittelt. Für die differentiell exprimierten Gene (adj. p-Wert < 0,1) wurde eine Gene Ontology (GO)-Analyse mit topGO (v2.38.1) durchgeführt.

2.3. Statistik

Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Ein- oder zweifaktorielle ANOVA wurden zur Überprüfung der Behandlungseffekte verwendet. Die Post-hoc-Analysen wurden mit dem Tukey Honest Significant Difference Test oder dem Dunnett Multiple Comparison Test durchgeführt. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem Fehlerlevel von $p < 0,05$ akzeptiert. Alle statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism 7 durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Humane kardiale Gewebeschnitte

3.1.1. Kardiale Biomechanik und elektrische Stimulation

Um humane kardiale Gewebeschnitte langfristig zu kultivieren, wurden spezielle biomimetische Kulturkammern (Abb. 2) entwickelt. Die Gewebeschnitte wurden mit den in Muskelfaserausrichtung angebrachten Kunststoffdreiecken so in die Kulturkammern eingehängt, dass sie sich durch die freie Neigung einer nicht gleichmäßigen Kraftverteilung anpassen konnten.

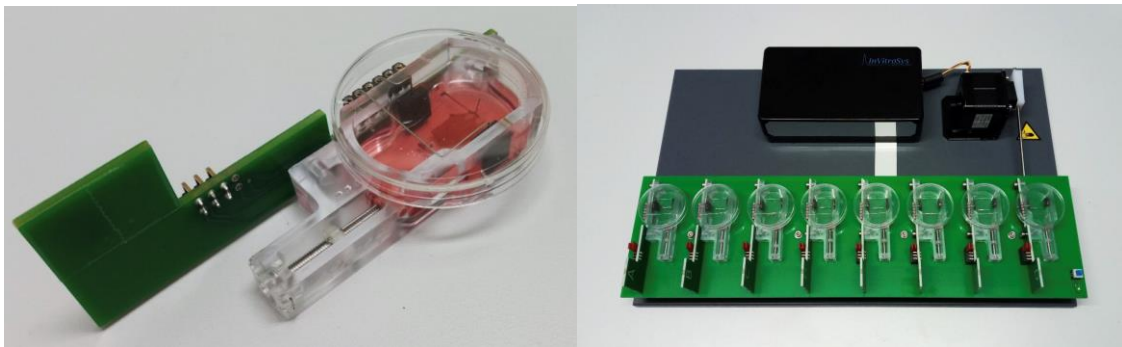


Abb. 2: Kulturkammern für humane kardiale Gewebeschnitte und Schüttelplatte mit Motor und elektronischer Steuerungseinheit.

Der Stahldraht mit der Federkonstante von 75 mN/mm ermöglichte ein lineares Verhältnis zwischen Gewebeverkürzung und Kontraktionskraft. Dadurch konnte bei einer Gewebeverkürzung von 6% während der Kontraktion eine normale systolische Wandspannung von 15 kN/m^2 ¹⁰¹ erzeugt werden. Die diastolische Vorlast wurde auf 1 mN eingestellt, was zu einer normalen mittleren diastolischen Wandspannung von $0,66 \text{ kN/m}^2$ führte¹⁰¹.

Elektrochemische Reaktionen während der elektrischen Stimulation wurden vermieden, indem bipolare Impulse mit stromfreien Intervallen zwischen Ladungs- und Entladungsstrom verwendet wurden. Dadurch konnten die Elektroden über mehrere Monate genutzt werden. Die Gewebestimulation wurde mit einer Frequenz von 0,2 Hz durchgeführt und im Durchschnitt mit einer

Stromstärke von 20-50 mA erreicht, was einer elektrischen Feldstärke von 0,15 bis 0,4 Volt/mm entspricht. In seltenen Fällen wurde die Stromstärke auf 75 mA und die Impulsdauer auf 3 ms erhöht.

Um die biomechanischen Eigenschaften der kultivierten Gewebeschnitte zu untersuchen, wurden diese nach einer Kulturdauer von 4 bis 16 Wochen hinsichtlich ihrer Kontraktionskraft und ihres Verhaltens bei mechanischer Dehnung mit nicht kultivierten Geweben verglichen. Dabei konnte die Kontraktionskraft durch Isoprenalin in beiden Gruppen um das 5,5-fache gesteigert werden (Abb. 3).

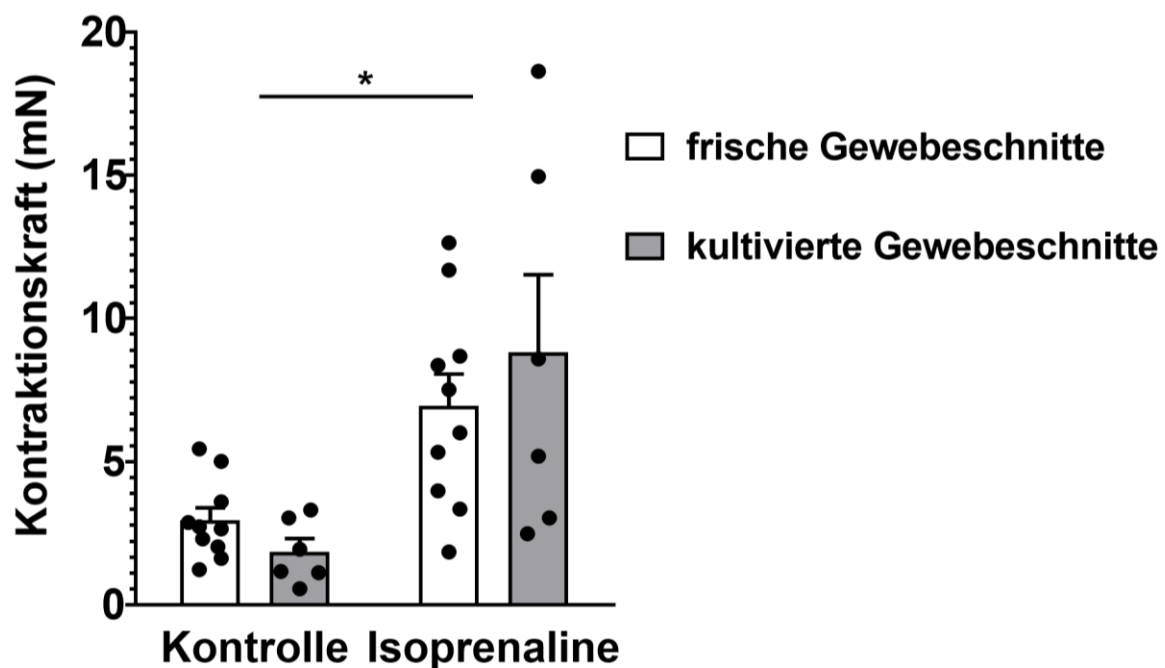


Abb. 3 (modifiziert nach ³³): Kontraktionskraft frischer und über 4-16 Wochen kultivierter Gewebeschnitte mit und ohne Isoprenalinstimulation (n=6-10, zweifaktorielle ANOVA, *p<0,05).

Im Bereich einer Dehnung der diastolischen Länge von 0-20 % reagierten die Gewebeschnitte beider Gruppen ähnlich auf die mechanische Belastung mit einer Zunahme der Kontraktionskraft. Allerdings zeigten kultivierte

Gewebeschnitte einen Abfall der Kontraktionskraft bei intensiverer Dehnung, was mit dem Auftreten von Arrhythmien und Tachykardie einherging (Abb. 4).

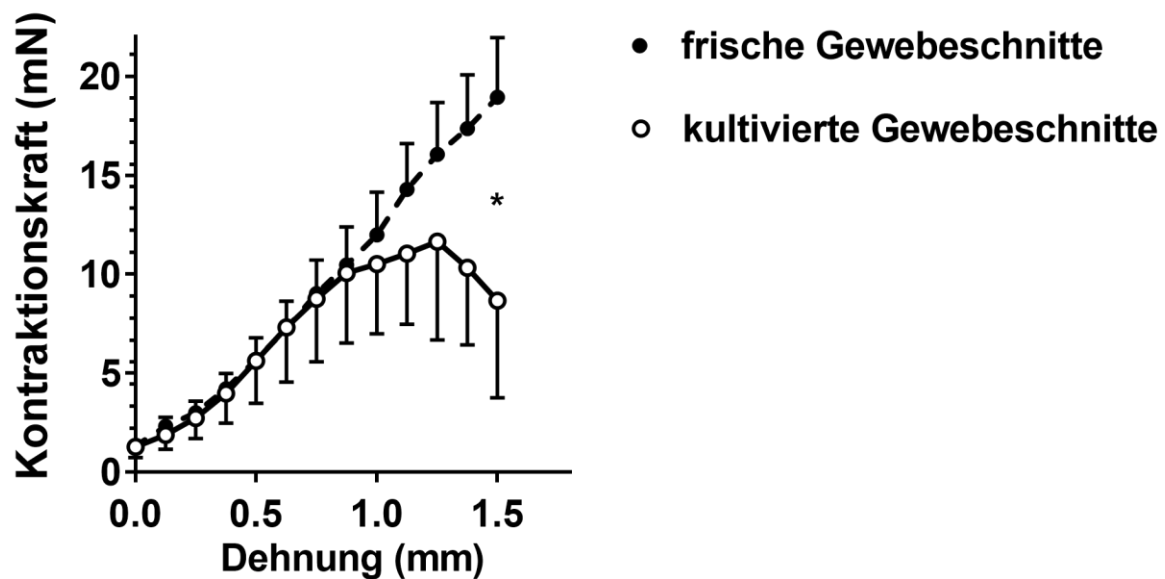


Abb. 4 (modifiziert nach ³³): Effekte der Dehnung auf die Kontraktionskraft (n=6-10, zweifaktorielle ANOVA, *p<0,05).

Die kultivierten kardialen Gewebeschnitte entwickelten eine etwas höhere diastolische Kraft als Antwort auf die Dehnung, aber dieser Unterschied war nicht statistisch signifikant. Bei Erhöhung der Herzfrequenz von 60 auf 180 Schläge/Minute zeigten sowohl kultivierte als auch nicht kultivierte Gewebeschnitte ähnliche negative Kraft-Frequenz-Abhängigkeiten. Allerdings wurde bei den kultivierten Gewebeschnitten eine Zunahme der Kontraktionskraft bei Bradykardie beobachtet. Möglicherweise ist dieser Effekt auf eine Anpassung der elektromechanischen Kopplung an die niedrige Stimulationsfrequenz zurückzuführen ³³.

3.1.2. Kühlung und Kulturdauer

Für die Charakterisierung der biomimetischen Kultur wurden Myokardpräparate von 18 Patienten verwendet. Aus jedem Präparat konnten bis zu 30 kardiale Gewebeschnitte gewonnen werden. Um die Verfügbarkeit von humanen

Präparaten zu erhöhen, wurden nicht nur Gewebe aus dem örtlichen LMU Klinikum, sondern auch aus Bad Oeynhausen verwendet. Die Präparate aus Bad Oeynhausen wurden auf Eis per Standard-Kurierdienst versendet und konnten deshalb erst nach bis zu 32 Stunden weiterverarbeitet werden. Eine Lagerung in gekühlter Pufferlösung bis zu 55 Stunden beeinträchtigte die maximale Kontraktionskraft der daraus gewonnenen Gewebeschnitte nicht, während eine längere Lagerung die Kontraktionskraft nahezu aufhob (Abb. 5).

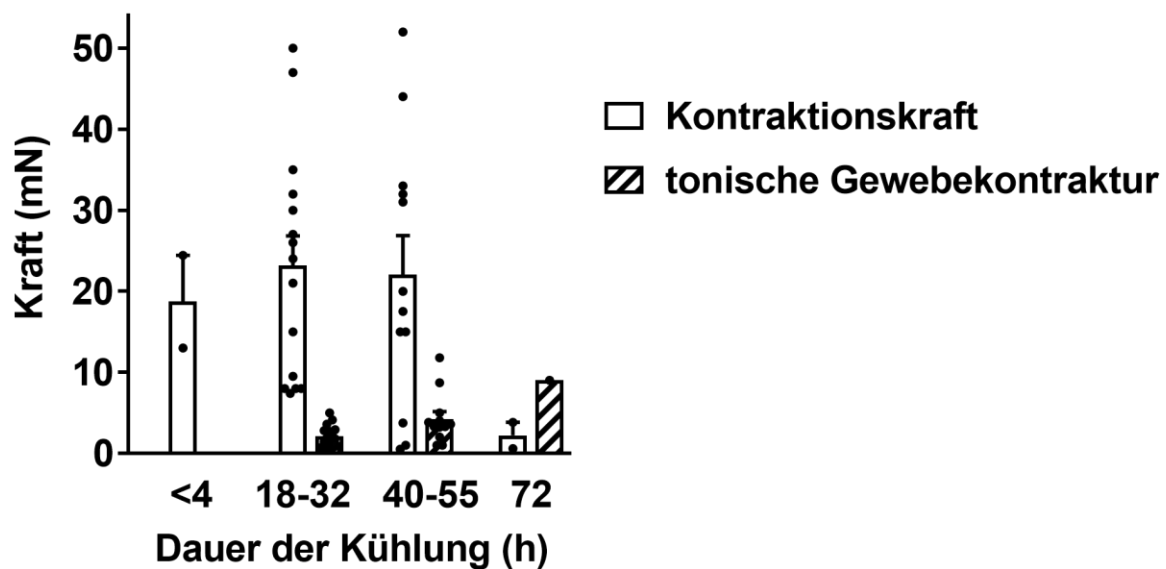


Abb. 5 (modifiziert nach ³³): Effekte der Kühlungsdauer auf die Kontraktionskraft und auf tonische Gewebekontraktionen (n=2-15).

Bei Präparaten, die länger als 32 Stunden gelagert wurden, traten zu Beginn der Kultur vermehrt tonische Gewebekontraktionen auf, was auf eine Gewebeschädigung hinweist (Abb. 5). Somit waren nur Myokardpräparate mit einer Lagerungszeit von weniger als 32 Stunden für die Kultur geeignet.

Wir beobachteten auch spontane Gewebekontraktionen bei kurz gelagerten Myokardpräparaten. Diese sistierten jedoch innerhalb einer Stunde während der Äquilibrationsphase. Gewebeschnitte, die in dieser Phase weniger als 30 % der durchschnittlichen Kontraktionskraft des jeweiligen Präparats aufwiesen,

wurden durch neue ersetzt. Etwa 10-20 % der Gewebeschnitte waren davon betroffen.

Die Kontraktionskraft der Gewebeschnitte wurde kontinuierlich für mehrere Monate registriert und überwacht. Die angestrebte Kulturdauer von vier Wochen wurde bei 12 von 18 Präparaten überschritten. Bei vier Präparaten zeigten die Gewebeschnitte innerhalb von zwei Wochen einen vorzeitigen Zelluntergang, was sich durch eine Abnahme der Kontraktionskraft, tonische Gewebekontraktionen und einen Anstieg der Reizschwelle zeigte. Diese Streifen wurden von der statistischen Auswertung ausgeschlossen. Obwohl den Präparaten unterschiedliche Erkrankungen zugrunde lagen, war die Kulturstabilität vor allem beeinträchtigt, wenn bei den Spendern eine Herzinsuffizienz mit ischämischer Ursache vorgelegen hatte³³.

3.1.3. Kontraktionskraftverlauf

Der typische Kontraktionskraftverlauf der kardialen Gewebeschnitte während der Kultur erreichte ein Minimum nach 6-24 Stunden, gefolgt von einer langsamen Erholung auf das Ausgangsniveau während der nächsten 3-4 Wochen (Abb. 6). Die Erholung konnte beschleunigt werden, wenn ab dem zweiten Tag eine kontinuierliche β -adrenerge Stimulation begonnen wurde (Abb. 6).

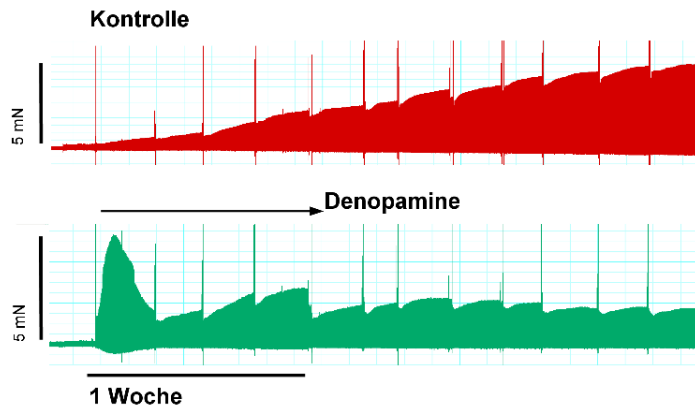


Abb. 6 (modifiziert nach ³³): Beispiele für Kontraktionskraftverlauf von einem nicht behandelten und einem mit 1 μ M Denopamin behandelten Gewebeschnitt.

Bei Pausieren der Schüttelbewegungen kam es innerhalb von 15 Minuten zu einer Abnahme der Kontraktionskraft und einer unvollständigen Erholung nach Verlängerung dieser Unterbrechung der Schüttelbewegungen. Diese Effekte bestätigten die Notwendigkeit der Schüttelbewegung für eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Gewebeschnitte. Das Pausieren der elektrischen Stimulation und damit das Sistieren der Kontraktionen der Gewebeschnitte beeinträchtigte die Erregung und Kraftentwicklung nach kurzen Intervallen nicht. Allerdings verhinderte eine Pausierung der elektrischen Stimulation für 30 Stunden die Stimulationsfähigkeit der Gewebe und unterdrückte die Erholung für mehrere Stunden.

3.1.4. Beeinflussung der Gewebestruktur und der Genexpression

Histologische Untersuchungen sowie mRNA-Sequenzierungen wurden an frischen kardialen Gewebeschnitten und zu verschiedenen Zeitpunkten während der Kultur durchgeführt. Sowohl frische als auch kultivierte Gewebeschnitte zeigten eine dichte Struktur von parallel ausgerichteten Myofibrillen mit erhaltener Querstreifung (α -Actinin) sowie eine deutliche Konzentrierung von Connexin 43 und N-Cadherin an den Glanzstreifen (Abb.

7), was auf intakte Zell-Zell-Kontakte über Adhäsionsverbindungen hinwies. Durch die Kultur kam es zu einer perinukleären Akkumulation von Lipofuszin und eosinophilem Material (HE-Färbung) sowie zu leichten Ausdünnungen und Unregelmäßigkeiten in der Myofibrillenstruktur. Die Färbung der Bindegewebsmarker Vimentin und α -Glattmuskel-Aktin (SMA) zeigte, dass keine Fibrose in den kultivierten kardialen Gewebeschnitte induziert wurde, jedoch zeigte sie auch eine leichte Zunahme von SMA-positiven Zellen. Eine Akkumulation von mesenchymalen Zellen, die entweder SMA oder Vimentin exprimierten, wurde nur an der Oberfläche der Gewebeschnitte beobachtet, was möglicherweise auf das Schneidetrauma zurückzuführen ist ³³.

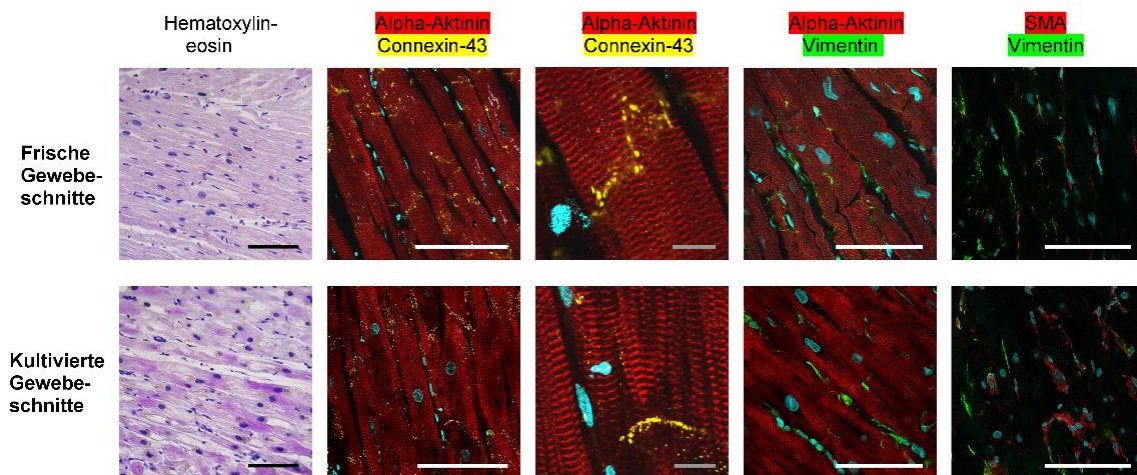


Abb. 7 (modifiziert nach ³³): Myokardstruktur nach Langzeitkultivierung. Vergleich von frischen (Reihe 1) mit kultivierten (Reihe 2) Gewebeschnitten. Färbung von kardiomyozytären Strukturproteinen (α -Actinin, Connexin 43) und Markern von Bindegewebe (Vimentin, α -Actin 2 - SMA).

Die Quantifizierung struktureller Merkmale der Kardiomyozyten ergab, dass Sarkomere (Abb. 8) und T-Tubuli in den kultivierten Geweben erhalten blieben und keine Myozyten-Hypertrophie oder -Atrophie vorlag.

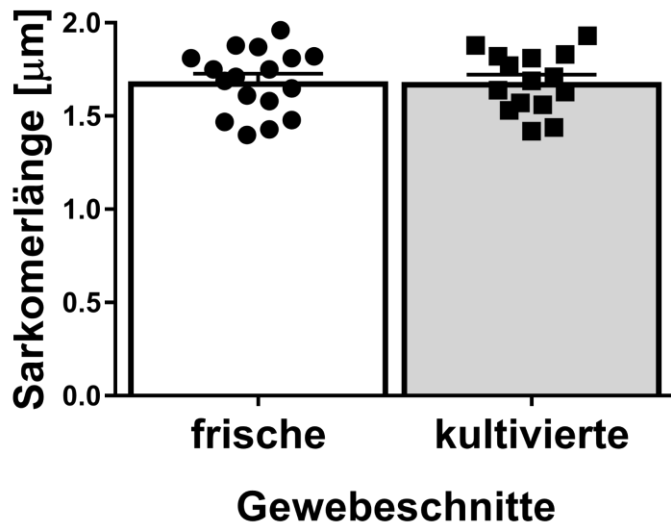


Abb. 8 (modifiziert nach ³³): Sarkomerlängen von 3 frischen und dazugehörigen kultivierten Gewebeschnitten. 3-6 Ausschnitte pro Gewebeschnitt wurden ausgewertet.

Die mRNA-Sequenzierung wurde an kardialen Gewebeschnitten von drei Patienten vor und nach 8, 14, 24 und 35 Tagen Kultur durchgeführt. Die Streifen, die an Tag 14 und 35 analysiert wurden, stammten vom selben Patienten. Die Analyse der hoch exprimierten Gene zeigte eine allgemeine Anpassung der Genexpression während der ersten 8 Kulturstage. Deutliche Veränderungen wurden bei Genen beobachtet, die an der Erregungs-Kontraktions-Kopplung, der extrazellulären Matrix und Adrenozeptor-Signalwegen beteiligt sind. Die anfänglichen Veränderungen normalisierten sich bei Genen, die für die Kontraktilität relevant sind. Tatsächlich waren einige dieser Gene (wie MYH7, TTN) nach vier Wochen sogar höher exprimiert und könnten so die Erholung der Kontraktionskraft während dieses Zeitraums erklären. Im Gegensatz dazu änderten sich die Induktion von extrazellulären Matrixgenen und die Unterdrückung von β -adrenergen Zielgenen während des gesamten Kulturzeitraums nicht. Bekannte Marker pathologischer Prozesse wie kontraktile Dysfunktion, Hypertrophie oder Hypoxie waren in den kultivierten kardialen Gewebeschnitten tendenziell niedriger exprimiert als im natürlichen

Myokard. Dieser Trend manifestierte sich entweder direkt zu Kulturbeginn oder während der Kultur. Wachstumsfaktoren wurden zum Teil stark hochreguliert und könnten daher an der Induktion von Matrixgenen oder an der Wiederherstellung der Erregungs-Kontraktions-Kopplung beteiligt sein. Die wirksamsten Veränderungen in der Genexpression nach der ersten Woche der Kultur wiesen auf eine aktive Rolle der Matrix-Integrin-Interaktion, neurotrophen Faktoren sowie einer Abschwächung von Entzündungen und des WNT-Signalwegs als weitere Mechanismen eines Remodelling in der Gewebekultur hin ³³.

3.1.5. Anwendungsversuch Arzneimittelsicherheit

Als erste Anwendung der Gewebekultur wurden bekannte proarrhythmogene Arzneimittelwirkungen mit hERG-Kanal Blockern an den kardialen Gewebeschnitten getestet. Die reduzierte Leitfähigkeit des K⁺-Kanals, der durch das Ether-a-gogo-ähnliche Gen kodiert wird (KCNH2, hERG-Kanal), beeinträchtigt die Repolarisation und verlängert das myokardiale Aktionspotential sowie die Refraktärzeit. Zur Messung der Refraktärzeit wurde während der Kultur ein regelmäßiger Stimulationsimpuls mit einem zweiten Reiz in abnehmenden Intervallen kombiniert. Das längste Intervall, mit dem noch zwei getrennte Kontraktionen ausgelöst werden konnten, wurde als tatsächliche Refraktärzeit betrachtet (Abb. 9).

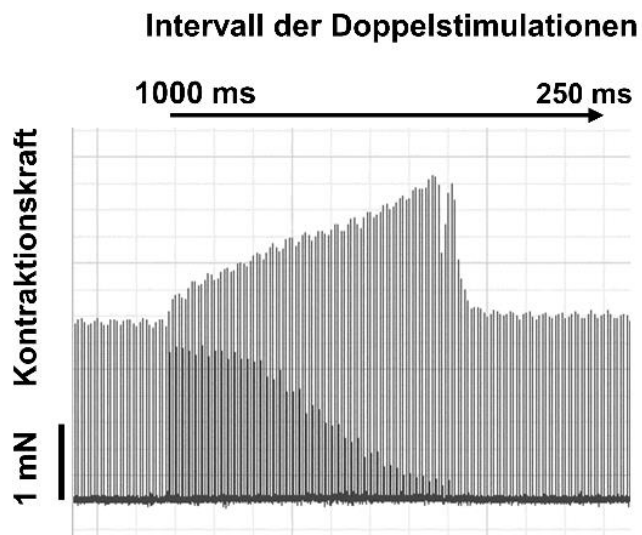


Abb. 9 (modifiziert nach ³³): Stimulationsprotokoll mit gepaarten Stimulationsimpulsen mit abnehmendem Zeitintervall. Der Verlust der zweiten Kontraktion ist mit der Refraktärzeit gleichzusetzen.

Bei den kultivierten Gewebeschnitten wurde eine Refraktärzeit von 425 ± 24 ms gemessen. Durch Zugabe des hERG-Blockers Dofetilid (100 nM) stieg die Refraktärzeit direkt um bis zu 160 ± 18 ms ($n = 6$, $EC_{50} = 3$ nM). Im Gegensatz dazu führte die Anwendung von Pentamidin (1 μ M) erst nach zwei Wochen zu einer Verlängerung der Refraktärzeit (Abb. 10). Da die Verlängerung der Refraktärzeit mit Pentamidin ausgeprägter war als mit Dofetilid, scheint Pentamidin auch andere Kanäle zu hemmen, die für die Repolarisation verantwortlich sind ³³.

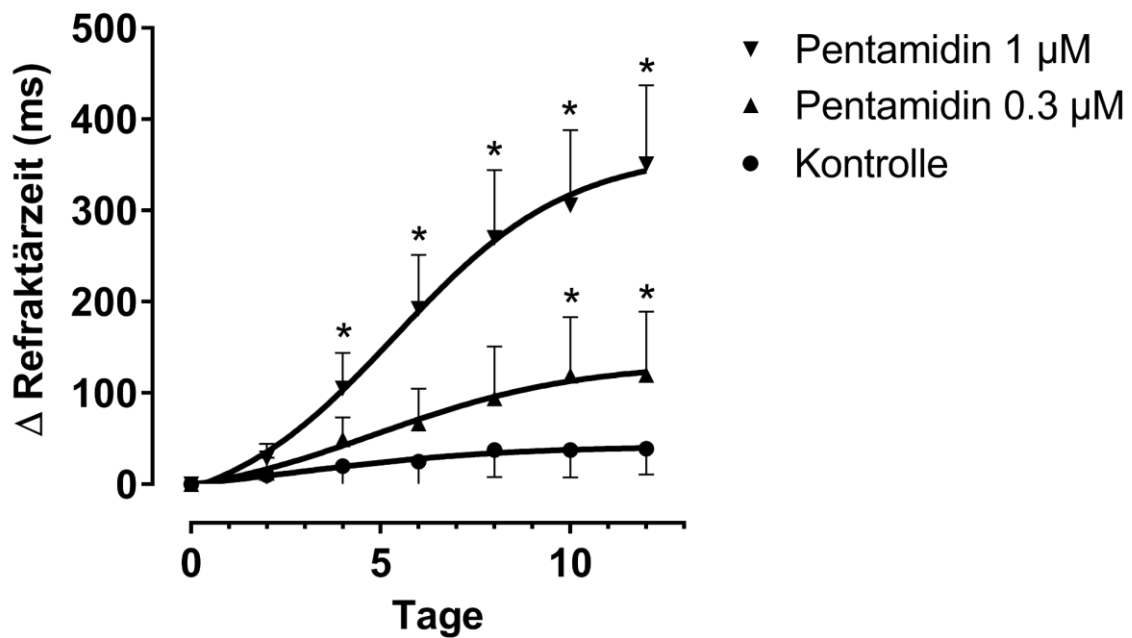


Abb. 10 (modifiziert nach ³³): Effekte von Pentamidin auf die Refraktärzeit (n=5, zweifaktorielle ANOVA, *p<0.05 vs. Ausgangsrefraktärzeit).

Aktionspotentialmessungen bestätigten die Beeinflussung der Refraktärzeit und zeigten eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer (APD₉₀) durch Pentamidin (Abb. 11).

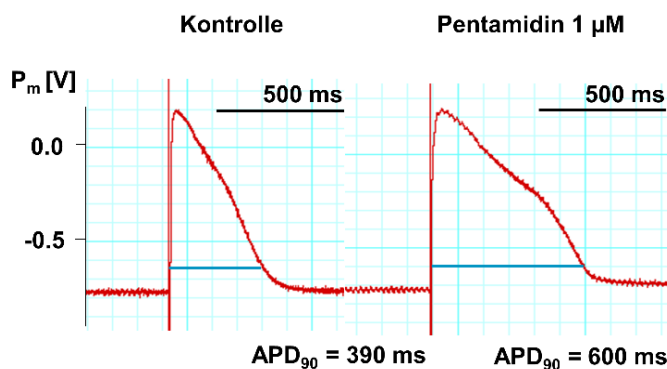


Abb. 11 (modifiziert nach ³³): Aktionspotentialmessung zeigt eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer (APD₉₀) nach der Gabe von Pentamidin 1 μM für 1 Woche).

3.2. Kardiale Gewebeschnitte von Mäuseherzen

3.2.1. Verschiedene Kulturbedingungen

Zur Kultivierung von kardialen Gewebeschnitten von Mäuseherzen wurden zunächst Filtermembranen ohne Stimulationsmöglichkeit und ohne Vorlast verwendet, was zu einer geringeren Zellviabilität und einem signifikanten Funktionsverlust des Gewebes führte (Abb.12). Um die Gewebeintegrität zu erhöhen, wurden die Gewebeschnitte isometrisch zwischen zwei festen Stahldrähten aufgehängt und optogenetisch stimuliert (Abb.12). Diese Veränderung führte zu einer signifikanten Verbesserung der Zellviabilität und einer deutlichen Steigerung der maximalen Kontraktionskraft im Organbad (Abb. 13).

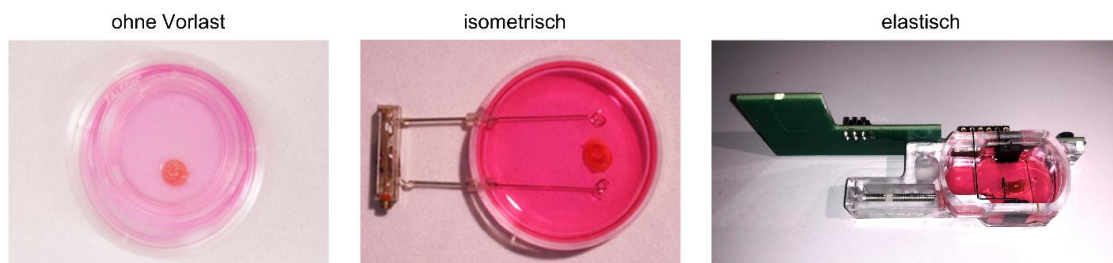


Abb. 12 (modifiziert nach ¹⁰²): Drei verschiedene Kulturbedingungen für die kardialen Gewebeschnitte von Mäuseherzen.

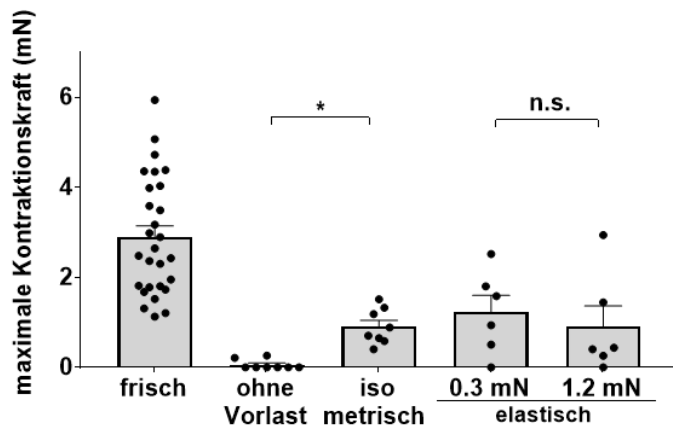


Abb. 13 (modifiziert nach ¹⁰²): Im Organbad gemessene maximale Kontraktionskraft frischer Gewebe, von Geweben auf Filtermembranen und von Geweben mit isometrischer oder elastischer (diastolischer Vorlast von 0.3 mN oder 1.2 mN) Aufhängung nach 48 h Kulturdauer (n = 6-28, t-Test, *p <0.05, n.s. nicht signifikant).

Um die optimale Vorlast der Gewebe unter elastischen Kontraktionsbedingungen zu bestimmen, wurden die Gewebeschnitte zwischen einem beweglichen und einem elastischen (Federkonstante von 4 N/m) Stahldraht eingehängt, ähnlich wie bei den humanen Gewebeschnitten. Dabei nahm die maximale Kontraktionskraft bei einer diastolischen Vorlast von 0,3 mN und 1,2 mN um 50 % bzw. 70 % im Vergleich zu den nicht kultivierten Gewebeschnitten ab (Abb. 13). Der Funktionsverlust der Gewebe war somit deutlich geringer im Vergleich zu den bisherigen Kulturbedingungen. Die Zellviabilität konnte aufrechterhalten werden. Unterschiede in der Gewebeelastizität zwischen den verschiedenen Bedingungen wurden nicht festgestellt ¹⁰².

3.2.2. Erste Anwendungsversuche im Organbad

Die ersten funktionellen Untersuchungen mit den kardialen Gewebeschnitten von Mäuseherzen wurden im Organbad durchgeführt. Dabei wurden frische Gewebeschnitte mit Digitoxin (100 nM und 1 µM) behandelt und mit einer

Kontrollgruppe verglichen. Es wurde eine signifikante Zunahme der Kontraktionskraft bei den behandelten Gewebeschnitten festgestellt (Abb. 14), wobei nur eine geringfügige zusätzliche Wirkung der höheren Digitoxinkonzentration im Vergleich zur niedrigeren Konzentration festgestellt wurde. Bei der Behandlung mit Isoproterenol wurden keine Unterschiede zwischen kultivierten und nicht kultivierten Gewebeschnitten festgestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass Medikamentenexperimente mit Gewebeschnitten von Mäuseherzen möglich sind.

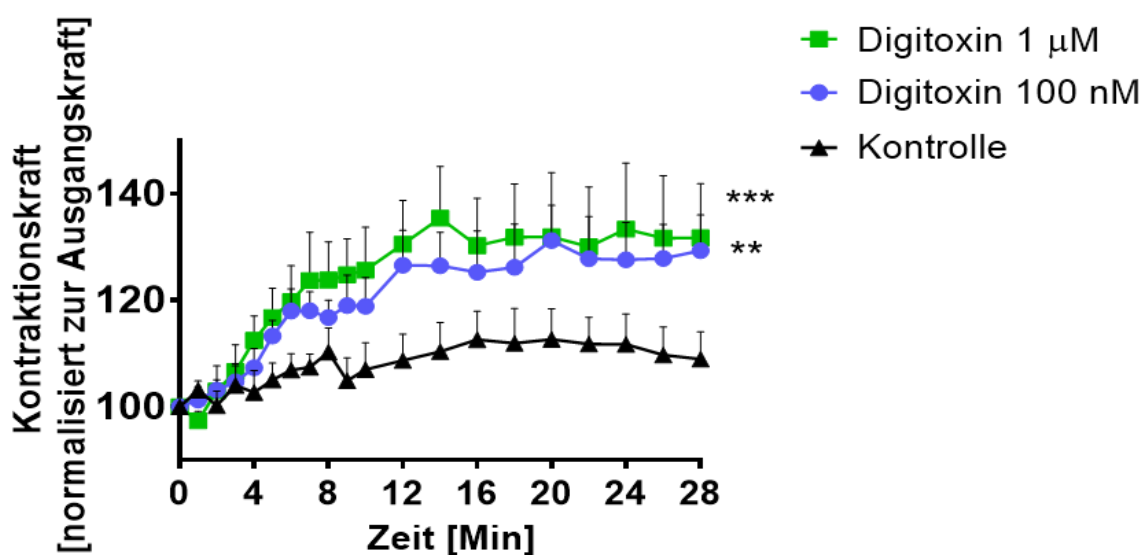


Abb. 14 (modifiziert nach ¹⁰²): Positiver inotroper Effekt von Digitoxin in den behandelten kardialen Gewebeschnitten von Mäuseherzen (n = 6, einfaktorische ANOVA, ***p < 0.001, **p < 0.01).

3.2.3. Effekte der optogenetischen Stimulation

Unter optogenetischer Stimulation wurde während der Kultur eine signifikante Abnahme der Kontraktionskraft der kardialen Gewebeschnitte beobachtet. Gleichzeitig traten gehäuft Gewebekontraktionen auf mit einer signifikanten Erhöhung der Reizschwelle. Zur Vergleichsmessung wurden nicht stimulierte Gewebeschnitte zu Beginn und am Ende der Kultur für eine Stunde stimuliert.

In allen Bedingungen nahm die Kontraktionskraft deutlich ab (Abb. 15), jedoch war der Rückgang bei den mit 2 Hz stimulierten kardialen Gewebeschnitten im Vergleich zu den nicht stimulierten Gewebeschnitten stärker ausgeprägt.

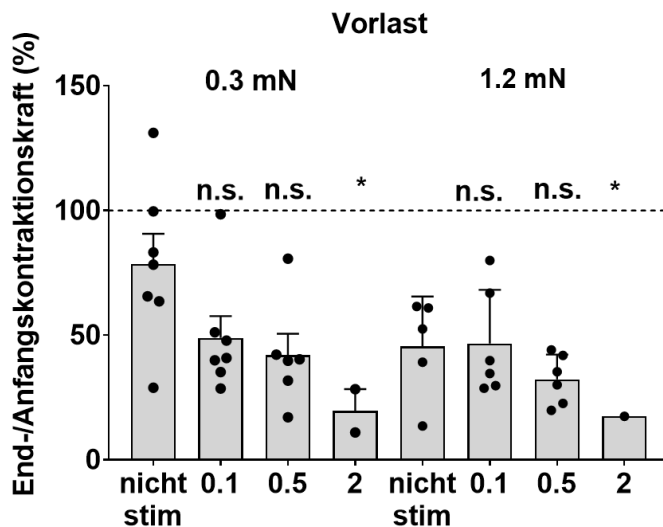


Abb. 15 (modifiziert nach ¹⁰²): Verhältnis der im Organbad gemessenen maximalen Kontraktionskraft vor und nach 48 h Kulturdauer bei Gewebeschnitten mit unterschiedlicher Stimulationsfrequenz und unterschiedlicher diastolischer Vorlast (n = 6-28, t-Test, *p < 0.05, n.s. nicht signifikant).

Die Reizschwelle stieg von 8,8 mA zu Beginn der Kultur auf 300 mA zum Ende der Kultur in den stimulierten Gewebeschnitten an. Gewebeschnitte mit einer diastolischen Vorlast von 0,3 mN entwickelten unter der Stimulation mit 2 Hz vermehrt tonische Gewebekontraktionen im Vergleich zu den Gewebeschnitten mit einer Vorlast von 1,2 mN (Abb. 16) ¹⁰².

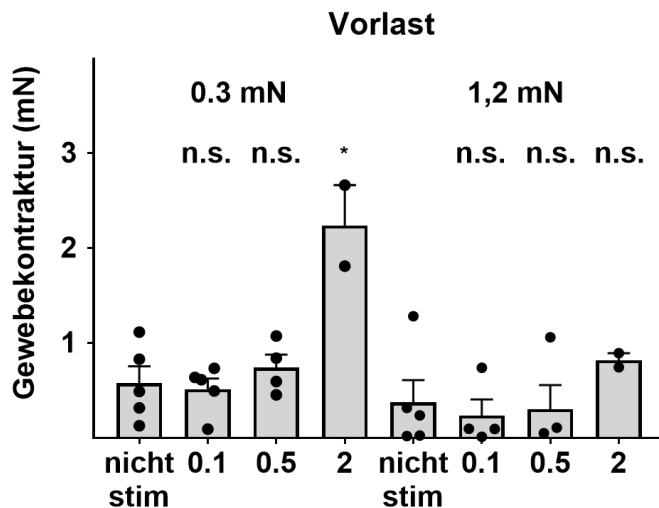


Abb. 16 (modifiziert nach ¹⁰²): Gewebekontraktionen nach 48 h Kulturdauer bei Gewebeschnitten mit unterschiedlicher Stimulationsfrequenz und unterschiedlicher diastolischer Vorlast (n = 6-28, t-Test, *p <0.05, n.s. nicht signifikant).

Die Ergebnisse deuteten auf eine irreversible Schädigung der Gewebeschnitte unter optogenetischer Stimulation hin. Um die Ursache für die Schädigung zu finden, wurden mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie die Anordnung der Myofibrillen, die Sarkomerlänge und die Connexin 43 Verteilung näher untersucht. Die Ausrichtung der Sarkomere und die Sarkomerlänge waren zwischen nicht kultivierten Gewebeschnitten ($1,69 \mu\text{m} \pm 0,06$) und Gewebeschnitten mit einer diastolischen Vorlast von 0,3 mN ($1,61 \mu\text{m} \pm 0,09$) vergleichbar, während die Sarkomerlänge in den Gewebeschnitten mit einer diastolischen Vorlast von 1,2 mN länger war ($1,92 \mu\text{m} \pm 0,10$) ¹⁰².

Connexin 43 ist der Hauptbestandteil von Gap Junctions bei adultem Myokardgewebe und spielt eine wesentliche Rolle bei der synchronisierten Kontraktion des Herzens ^{103,104}. In allen Gewebeschnitten war Connexin 43 auf

die Glanzstreifen konzentriert, was bedeutet, dass während der Kultur keine Umverteilung von Connexin 43 stattgefunden hat (Abb. 17).

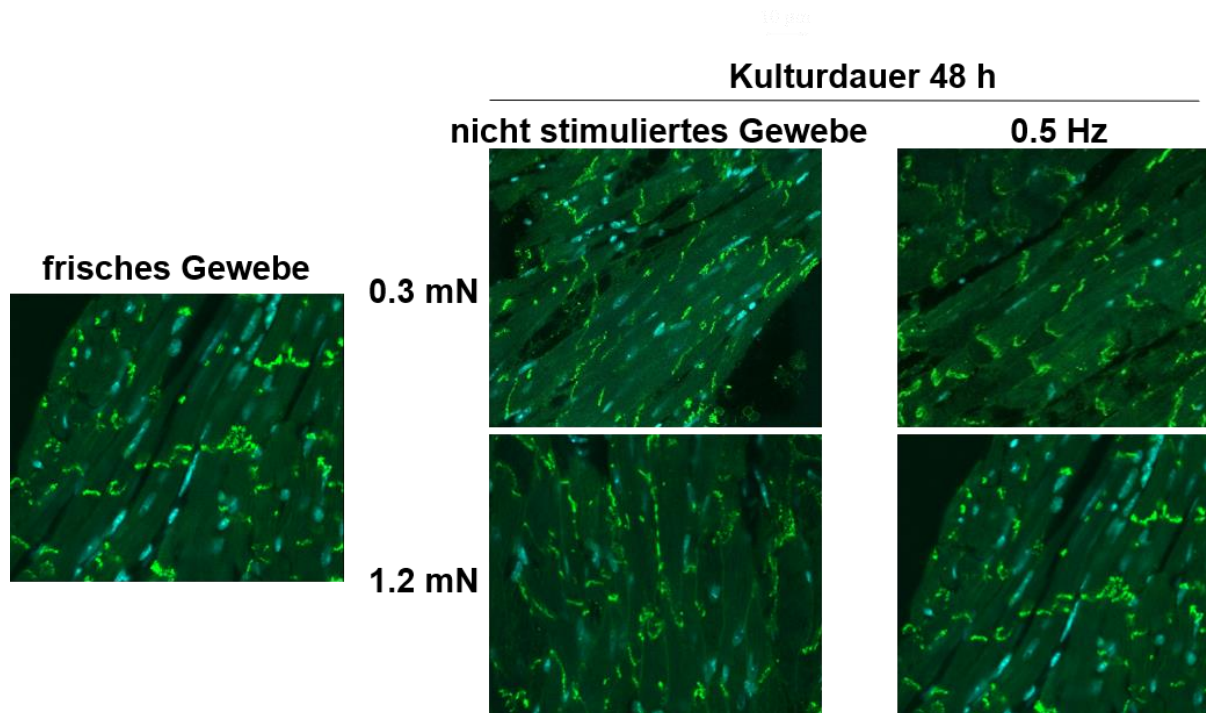


Abb. 17 (modifiziert nach ¹⁰²): Verteilung von Connexin 43 in frischen sowie für 48 h kultivierten Gewebeschnitten. Die Gewebeschnitte sind mit Connexin 43 Antikörper (hellgrün) und mit Topro 3 für die Zellkerne (blau) gefärbt.

3.2.4. Beeinflussung der Kulturdauer durch Steigerung der Schüttelfrequenz und Zugabe von Antioxidantien

Um den oxidativen Stress der kardialen Gewebeschnitte zu reduzieren, wurde β -Mercaptoethanol (β -ME, 50 μ M) als Antioxidant dem Kulturmedium zugefügt. Die Kontraktionskraft war nach 48 Stunden signifikant höher im Vergleich zur Kontrollgruppe (138 % \pm 17,71 % vs. 83 % \pm 6,4 %), was auf eine protektive Wirkung von β -ME hindeutet. Aus diesem Grund wurde es in allen folgenden Experimenten ins Kulturmedium pipettiert ¹⁰².

Um die Sauerstoffversorgung der Gewebeschnitte zu verbessern, wurden die Auswirkungen von langsamen und schnellen Schüttelbewegungen auf die Kontraktionskraft untersucht. Eine schnelle transversale Schüttelbewegung bei den nicht stimulierten kardialen Gewebeschnitten führte nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Kontraktionskraft (Abb. 18), jedoch wurden weniger Gewebekontraktionen beobachtet (Abb. 18). Bei den optogenetisch stimulierten Gewebeschnitten hingegen führte die Kombination von schnellen Schüttelbewegungen mit β -ME im Kulturmedium zu einer signifikant höheren Kontraktionskraft (Abb. 18) und einer signifikanten Verringerung von tonischen Gewebekontraktionen (Abb. 18). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Zugabe von β -ME und die Verwendung schneller Schüttelbewegungen die funktionellen Eigenschaften der Gewebeschnitte besser erhalten und oxidativer Stress reduziert werden kann ¹⁰².

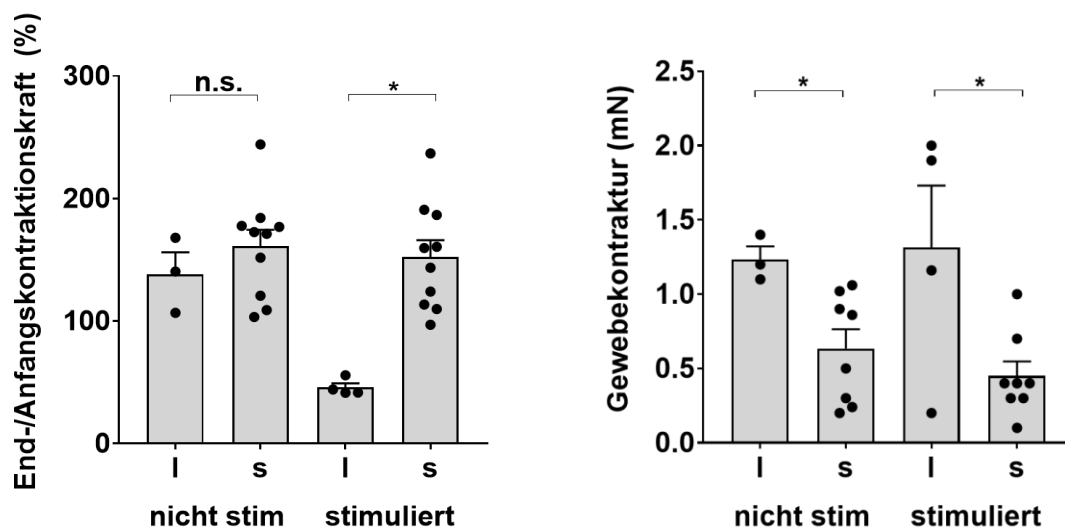


Abb.18 (modifiziert nach ¹⁰²): Verhältnis der Kontraktionskraft sowie Stärke der tonischen Gewebekontraktur in langsam (l) und schnell (s) geschüttelten stimulierten und nicht stimulierten Gewebeschnitten (n=3-10, t-Test, *p<0,05, n.s. nicht signifikant).

3.2.5. Herunterregulation von Strukturproteinen und Hypoxie

Mithilfe der quantitativen RT-PCR analysierten wir die möglichen Ursachen der funktionellen Beeinträchtigungen der kardialen Gewebeschnitte. Wir untersuchten die mRNA-Expression der kardialen Myosin-Leichtkette-2 (MLC-2V), Titin (Isoformen N2A und N2B), Connexin 43 (GJA1) und Glukosetransporter 1 (Glut1). Der Vergleich von kultiviertem mit nicht kultiviertem Gewebe zeigte eine verminderte Expression von MLC-2V und N2B, während die Expression von Glut1 signifikant erhöht war. Das Expressionsniveau der Gene war höher, wenn sie auf die Gesamtmenge der extrahierten mRNA bezogen wurden, was auf eine Hochregulation der β -Actin-Expression während der Kultur hinweist. Kein Einfluss der Gewebekultur konnte auf die N2A- und GJA1-mRNA-Expression festgestellt werden. Schnelle Schüttelbewegungen führten im Vergleich zu langsamen Schüttelbewegungen zu einer signifikanten Reduktion der Glut1-Expression. Die Ergebnisse bestätigten den strukturellen Schaden der kardialen Gewebeschnitte in den ersten Versuchen aufgrund von Hypoxie, der durch schnelle Schüttelbewegungen behoben werden konnte ¹⁰².

3.2.6. Elektrische Stimulation

Da in den ersten Versuchen die Funktion und Struktur der kardialen Gewebeschnitte nur teilweise für 48 Stunden erhalten blieben und die optogenetische Stimulation keine Vorteile bot, haben wir uns entschieden, die Effekte der elektrischen Stimulation zu untersuchen. Die Gewebeschnitte wurden unter elastischen Bedingungen mit einer diastolischen Vorlast von 0,3 mN kultiviert und unmittelbar nach dem Transfer in die Kulturkammern elektrisch stimuliert. Wie bei den humanen Gewebeschnitten verwendeten wir bipolare 50 mA Impulse mit 1 ms Lade- und Entladedauer, die durch ein 1 ms

stromfreies Intervall getrennt waren. Die Gewebeschnitte von Mäusen wurden in Medium 199 kultiviert, das Penicillin/Streptomycin, Insulin/Transferrin/Selenit und β -ME (50 μ M) enthielt. Die diastolische Vorlast wurde nach einer Stunde in der Kultur erneut angepasst. Unter diesen Bedingungen blieb die Kontraktionskraft der Gewebeschnitte bis zu 7 Tagen erhalten (Abb. 19). Um Gewebekontraktionen durch eine allmähliche Anpassung an die Kultur zu reduzieren, wurde während der ersten Stunde eine Mischung aus 1 ml Pufferlösung und 1,4 ml Kulturmedium appliziert. Wir haben jedoch keinen zusätzlichen Nutzen dieser vermeintlich schützenden Intervention festgestellt, sondern sogar eine schwächere Kontraktionskraft beobachtet ¹⁰².

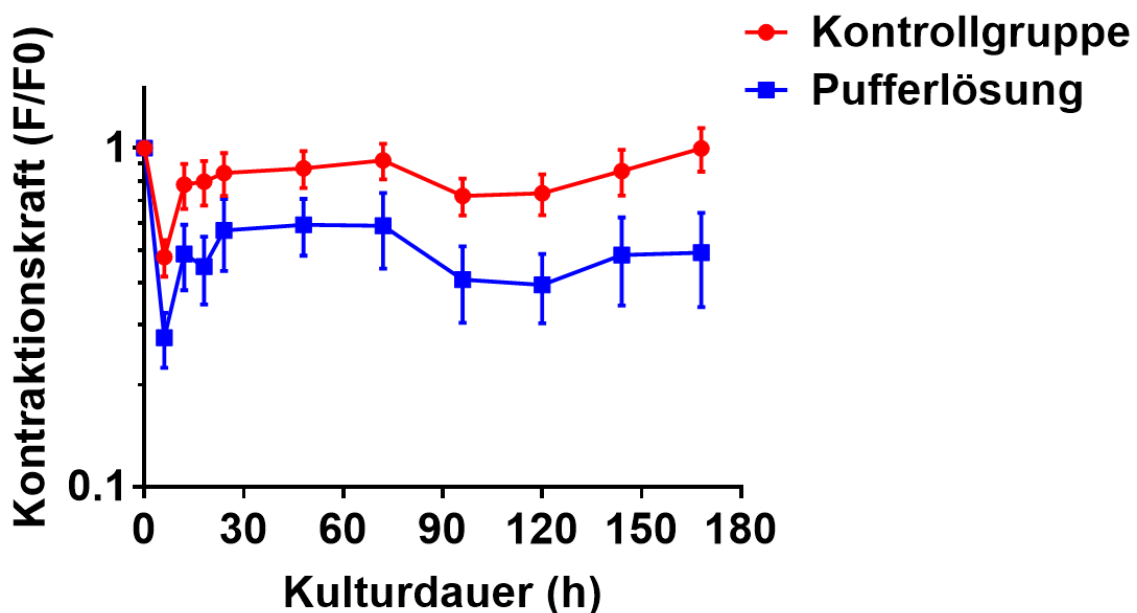


Abb. 19 (modifiziert nach ¹⁰²): Kontraktionskraft und Kulturdauer der Gewebeschnitte von der Maus unter elektrischer Stimulation mit (n=23 Gewebeschnitte aus 5 unabhängigen Präparationen) und ohne Pufferlösung (n=9 Gewebeschnitte aus 2 unabhängigen Präparationen).

3.3. Wachstum und Maturierung von künstlichem Myokard

3.3.1. Gewebekonstruktion

Stammzellen wurden bis zu 80 %iger Konfluenz kultiviert und dann entsprechend dem Protokoll zur Differenzierung in Kardiomyozyten behandelt. Es bildete sich ein Monolayer-Netzwerk von Zellen, das am 8. Tag der Differenzierung erstmals spontane Kontraktionen zeigte. Die Zellpopulation bestand zu 69 ± 1 % aus doppelt-positiven Zellen für kardiales Troponin T (cTNT) und α -Actinin und wurde daher als hiPSC-Kardiomyozyten identifiziert (Abb. 20).

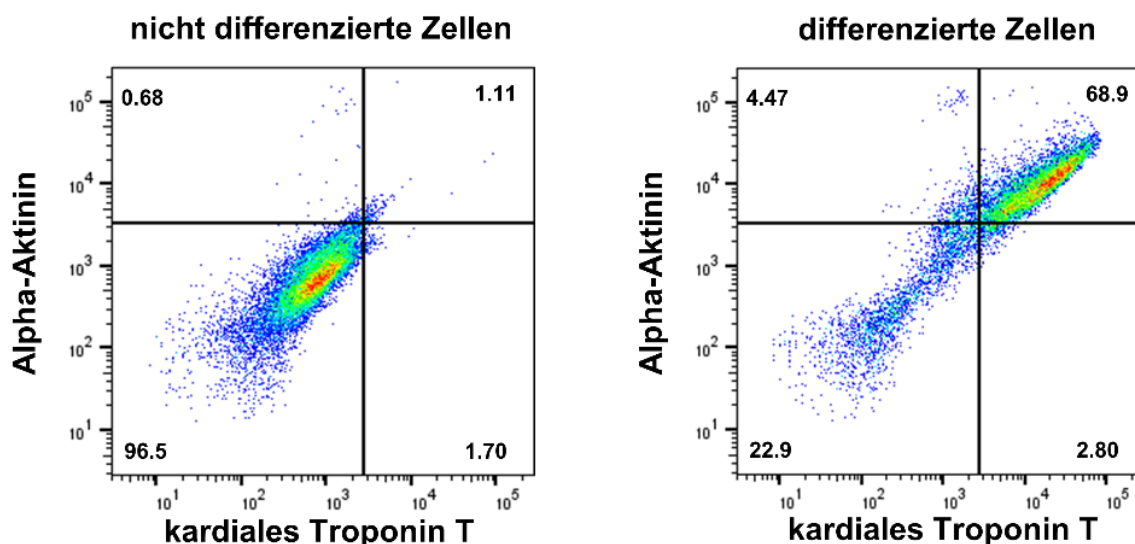


Abb. 20 (modifiziert nach ¹⁰⁵): Beispiele der Durchflusszytometrie von nicht differenzierten und differenzierten hiPSC vor der Bildung von künstlichem Myokard. Die Zellsuspension wurde für kardiales Troponin T und α -Actinin gefärbt.

Für die EHT-Bildung wurden die adhärennten Zellen dissoziiert, mit einer kollagenbasierten Matrix gemischt und auf eine Filtermembran aufgebracht. Diese Technik fördert Zell-Zell-Kontakte durch das zügige Entfernen von überschüssigem Medium. Es bildete sich ein flaches kardiales Mikrogewebe, das innerhalb von 24 Stunden spontan synchron zu kontrahieren begann. In

den nächsten fünf Tagen kondensierte das Gewebe von 8 mm Durchmesser auf 5 mm (Abb. 21), um ausreichende mechanische Stabilität für den Transfer in die Kulturkammern und das anschließende biomimetische Training zu erreichen ¹⁰⁵.

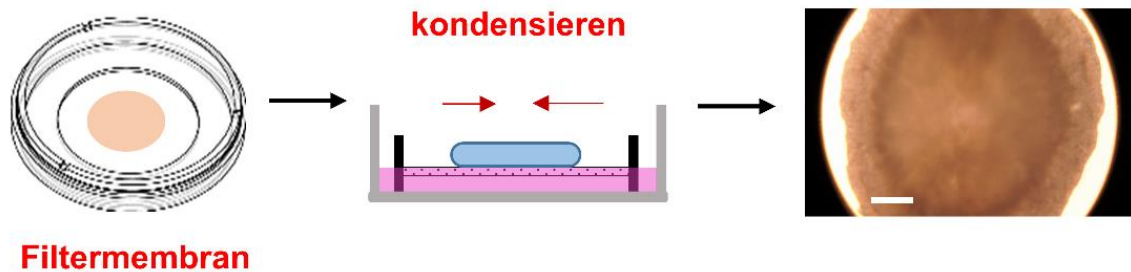


Abb. 21 (modifiziert nach ¹⁰⁵): Schematische Darstellung eines EHT auf der Filtermembran sowie Foto eines primären diskoiden EHTs (Maßstab: 0.5 mm).

Die mechanische Fixierung an den Stahldrahtpfosten der Kulturkammern wurde durch Durchstechen in der Mitte jedes Gewebes und Erweiterung des Abstands der Haltepfosten auf 3 mm erreicht. Dadurch bildeten sich ringförmige EHTs, die sofort zu kontrahieren begannen, was darauf hinwies, dass mechanische Schäden auf die Punktionsstelle begrenzt waren. Während des dreiwöchigen progressiven Dehnens passten sich die Kardiomyozyten dem Kraftverlauf zwischen den Haltepfosten entsprechend an, wodurch sich die EHTs verlängerten. Die Abmessungen der EHTs wurden hauptsächlich durch die Dehnung bestimmt (Abb. 22). Bei geringer Dehnung (Gruppen S0-S2) traten keine Risse in den EHTs auf, aber während der intensivsten Dehnung (S3) rissen spontan 7 von 20 EHTs. In einigen Fällen verschmolzen die beiden Seiten der Ringstruktur, was jedoch die EHTs nicht beeinträchtigte und nicht durch die Intensität der Dehnung beeinflusst wurde ¹⁰⁵.

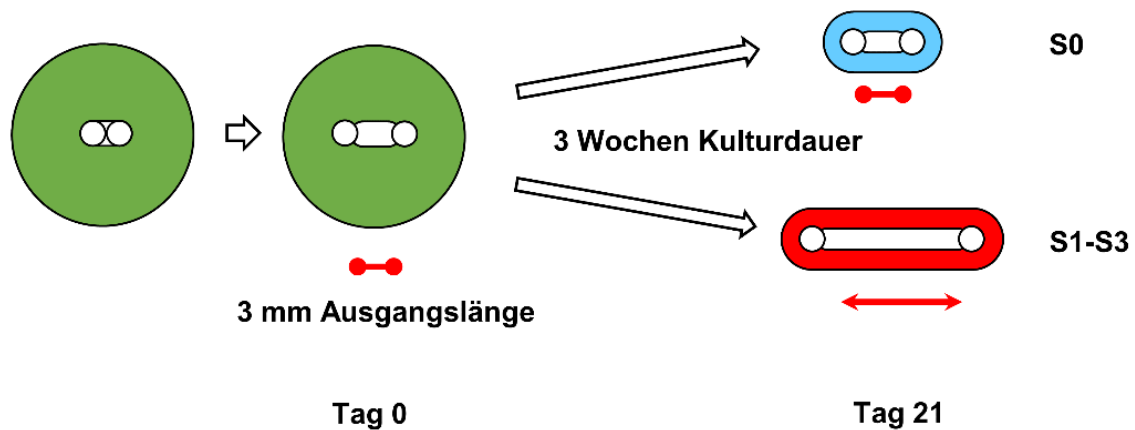


Abb. 22 (modifiziert nach ¹⁰⁵): Schematische Darstellung der progressiven Dehnung.

3.3.2. Mechanische, elektrophysiologische und metabolische Eigenschaften der EHTs

Während der dreiwöchigen progressiven Dehnung wurden die Kontraktionen jedes EHTs kontinuierlich aufgezeichnet und analysiert. Die statisch gedehnten EHTs (S0) zeigten eine Zunahme der Kontraktionskraft während der Kulturdauer und entwickelten eine diastolische Kraft, die nach etwa 12 Tagen ein konstantes Niveau erreichte (Abb. 23). Bei den progressiv gedehnten EHTs führte jeder Dehnungsschritt zu einem direkten Anstieg der Kontraktionsamplitude. Obwohl die Kontraktionsamplitude nach der Dehnung wieder zurückging, hielt die Zunahme teilweise für 24 Stunden an und summierte sich über die dreiwöchige progressive Dehnung auf. Nur die intensivste Dehnung (S3) führte zur Bildung einer diastolischen Vorlast (S0=0,3 mN SD=0,24 mN; S3=0,71 mN SD=0,86 mN, $p < 0,001$) ¹⁰⁵.

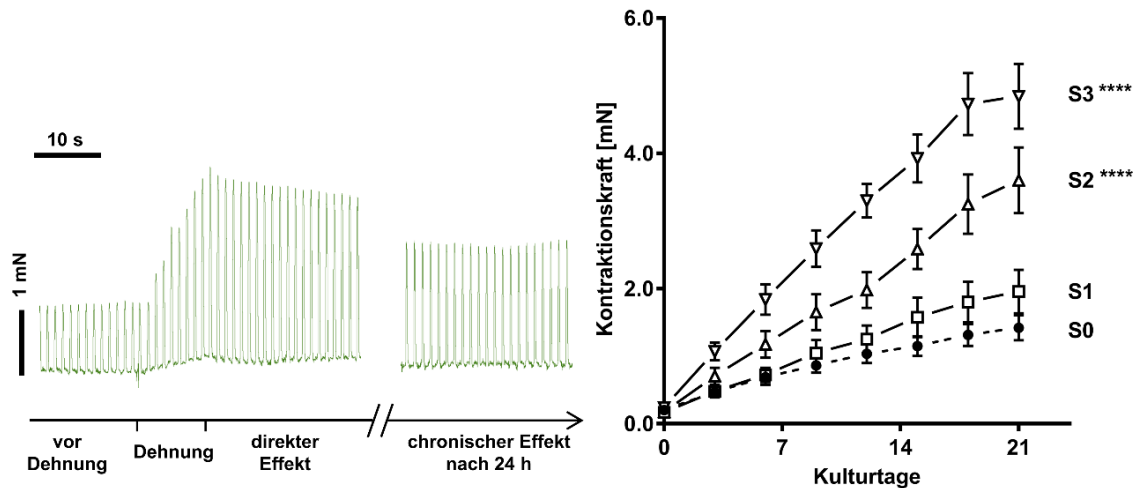


Abb. 23 (modifiziert nach ¹⁰⁵): Beispiel einer Echtzeit-Aufnahme von einer Dehnung (jede Zacke entspricht einer Kontraktion) und Kontraktionskraftverlauf aller Dehnungsbedingungen (n = 10, zweifaktorielle ANOVA, Tukey's multiple comparison test vs. statischer Dehnung, ****p < 0,0001).

In den ersten Kulturtagen zeigten die EHTs schnelle spontane elektrische Aktivitäten, die die externe Stimulation beeinflussten. Die Spontanaktivität nahm innerhalb einer Woche ab, so dass eine konsistente 1:1-Stimulation mit 1 Hz möglich war. Die EHTs entwickelten im weiteren Verlauf eine Alles-oder-Nichts-Reaktion auf elektrische Stimulation mit einer zunehmenden Reduktion der Reizschwelle, was ein weiterer Indikator für die elektrische Maturierung war (Abb. 24). Es gab jedoch keinen Zusammenhang zwischen der Intensität der Dehnung und der elektrischen Maturierung ¹⁰⁵.

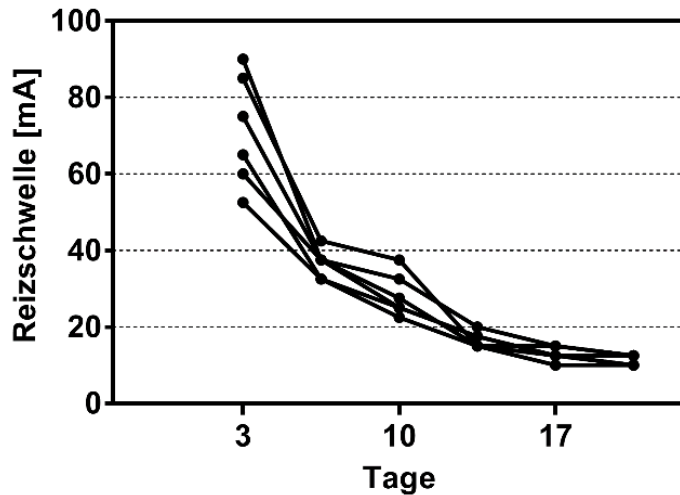


Abb. 24 (modifiziert nach ¹⁰⁵): Reizschwellenverlauf der EHTs während der Kulturdauer (n=6 aus den Gruppen S0-S3).

Der O₂-Verbrauch der Gewebe wurde durch eine Abschwächung der Kontraktionskraft während einer 2-minütigen Unterbrechung der Schüttelbewegungen abgeschätzt. Dabei zeigte sich, dass die relative Reduktion der Kontraktionskraft bei den statisch gedehnten EHTs (S0) am niedrigsten war ($77,6 \pm 2,5$ % Restkraft) und mit der Intensität der Dehnung korrelierte (S3, $64 \pm 2,4$ % Restkraft). Diese Beziehung zeigt eine parallele Zunahme der Kontraktionskraft mit der O₂-Aufnahme bei den progressiv gedehnten Geweben. Für eine gesteigerte O₂-Aufnahme in den gedehnten EHTs spricht auch die höhere Dichte und das stärkere lineare Netzwerk von Mitochondrien (Abb. 25) ¹⁰⁵.

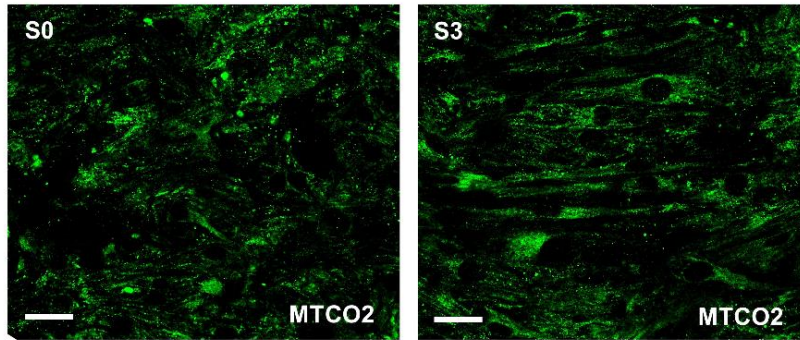


Abb. 25 (modifiziert nach ¹⁰⁵): Immunfluoreszenz Aufnahmen von EHTs S0 und S3 mit Färbung einer Untereinheit der Zytochrom C Oxidase in Mitochondrien (MTCO2, Grün, Maßstab 25 μ m).

3.3.3. Steigerung der Kontraktionskraft und Optimierung des elastischen Modulus

Nach einer 21-tägigen progressiven Dehnung wurden die EHTs in ein Organbad transferiert und dort unter isometrischen Bedingungen gedehnt sowie verschiedenen Stimulationsfrequenzen ausgesetzt. Die Gewebe tolerierten eine Elongation von bis zu 1,8-facher unbelasteter Länge und entwickelten dementsprechend stärkere diastolische und systolische Kräfte. Sowohl die Kontraktionskraft bei akuter Dehnung als auch die Kontraktionsamplitude bei optimaler Vorspannung nahmen mit der Intensität der Dehnung zu. EHTs, die am intensivsten gedehnt wurden, entwickelten nicht nur eine 5,1-fach höhere Kontraktionskraft, sondern auch einen 2,6-fach höheren elastischen Modulus (Kraft/Dehnung) im Vergleich zu den statisch gedehnten Geweben (Abb. 26). Besonders bedeutsam ist, dass das biomimetische Training mit intensivster Dehnung (S3) EHTs erzeugte, die ein maximales Verhältnis von systolischer zu diastolischer Wandspannung von $9,47 \pm 0,84$ aufwiesen (Abb. 26) - ähnlich den biomechanischen Eigenschaften von adultem humanem Myokard ^{105,106}.

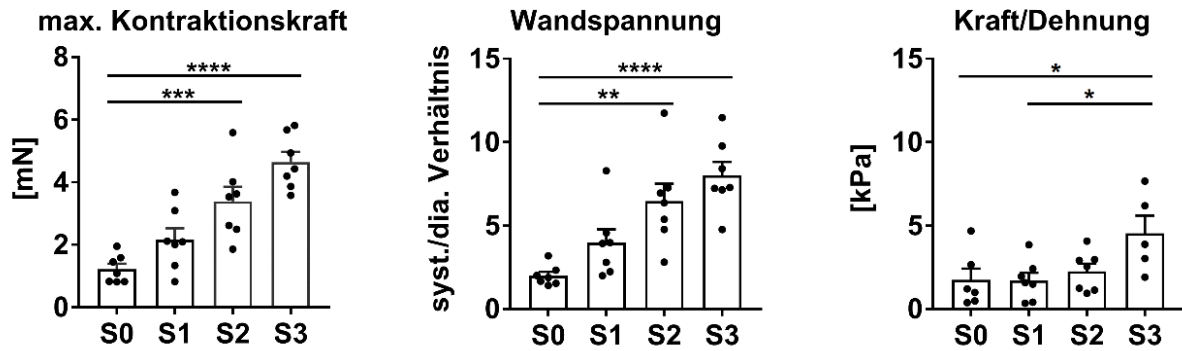


Abb. 26 (modifiziert nach ¹⁰⁵): Maximale Kontraktionskraft, Wandspannung, elastischer Modulus nach 21 Tagen Kulturdauer im Organbad bestimmt (n=7, zweifaktorielle ANOVA, Tukey's multiple comparison test vs. statischer Dehnung, *p<0,05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001).

3.3.4. Erregungs-Kontraktionskoppelung in den EHTs

Die Kraft-Frequenz-Abhängigkeit (FFR) ist ein bedeutender Parameter der elektromechanischen Kopplung von Kardiomyozyten, der durch das Membranpotential, den Ca²⁺-Zyklus und den Maturierungsgrad der Ultrastruktur beeinflusst wird. Statisch gedehnte EHTs zeigten eine Abnahme der Kontraktionskraft bei höheren Stimulationsfrequenzen (negative FFR). Im Gegensatz dazu führte die progressive Dehnung, insbesondere bei S2 und S3, zu einer Steigerung der Kontraktionskraft um das 1,25-fach bei hohen Stimulationsfrequenzen (positive FFR), wobei das Optimum bei 3 bzw. 4 Hz lag (Abb. 27) ¹⁰⁵.

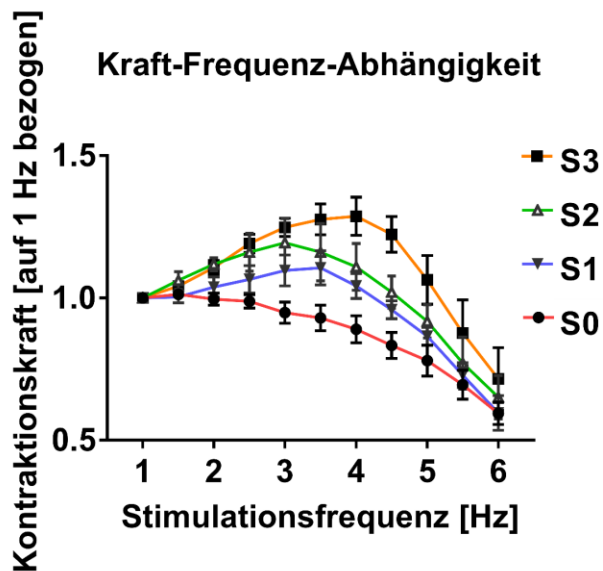


Abb. 27 (modifiziert nach ¹⁰⁵): Kraft-Frequenz-Abhängigkeit der EHTs nach 21 Tagen Kulturdauer (n=7).

Um den Einfluss der progressiven Dehnung auf diese funktionalen Marker zu untersuchen, wurden Kalzium-Transienten in mit Fluo-4 beladenen EHTs am Ende der Kultivierungszeit gemessen. Intensiv gedehnte EHTs wiesen höhere systolische Ca^{2+} -Amplituden und einen beschleunigten Ca^{2+} -Zyklus auf, mit einer kürzeren Ca^{2+} -Transientendauer und einer kürzeren Zeitkonstante (τ) des Ca^{2+} -Abfalls (Abb. 28). Zusätzlich wurden Aktionspotentialmessungen durchgeführt. Im Vergleich zu statisch gedehnten Geweben (S0) zeigten die am intensivsten gedehnten EHTs (S3) ein negativeres Ruhemembranpotential ($-72,4 \pm 3,4$ mV vs. $-52,5 \pm 5,3$ mV), höhere Aktionspotentialamplituden ($99,7 \pm 7,9$ mV vs. $68,3 \pm 5,6$ mV) und höhere Anstiegsgeschwindigkeiten ($13,47 \pm 3,2$ V/s vs. $7,79 \pm 0,5$ V/s, n = 6) ¹⁰⁵.

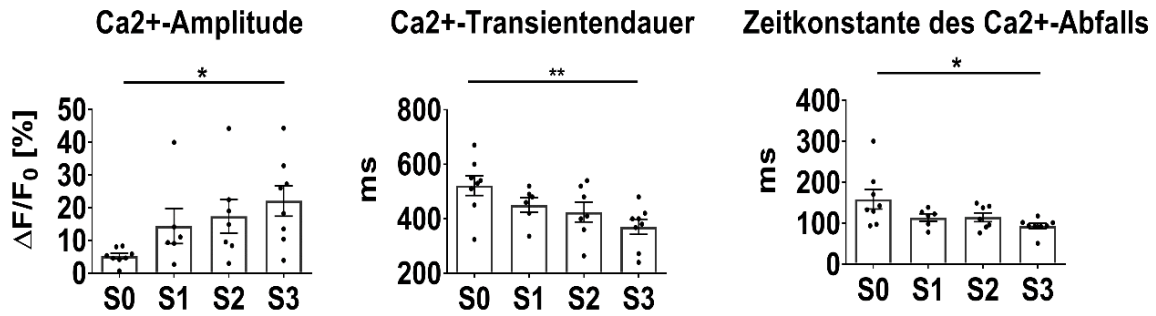


Abb. 28 (modifiziert nach ¹⁰⁵): Ca²⁺-Amplituden und Parameter des Ca²⁺-Zyklus in statisch und progressiv gedehnten EHTs (S0, n=8; S1, n=6; S2, n=7; S3, n=8; einfaktorielle ANOVA, Dunnett's multiple comparison test, *p<0,05, **p<0,01).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die progressive Dehnung die positiven inotropen und lusitropen Effekte von Isoproterenol verstärkten, die sich in einer Erhöhung der Kontraktionskraft, einer höheren Relaxationsgeschwindigkeit und einer kürzeren Kontraktionsdauer (Abb. 29) äußerten und weitere Merkmale der phänotypischen Maturierung darstellen ^{65,107}.

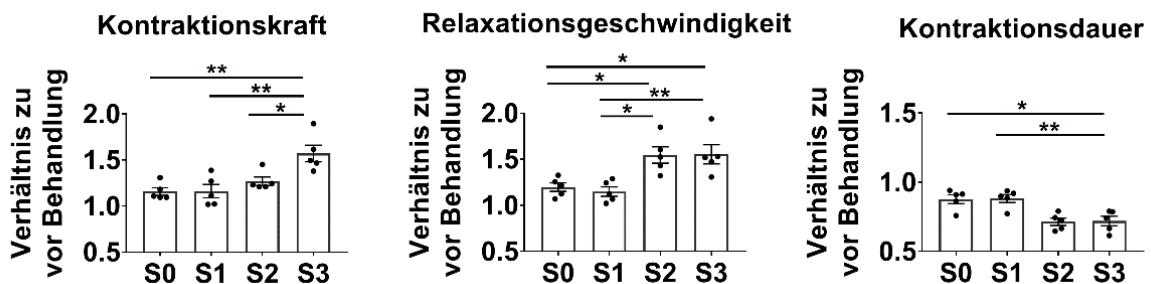


Abb. 29 (modifiziert nach ¹⁰⁵): Effekte der Stimulation mit Isoprenalin (1 μmol/L, n=5, einfaktorielle ANOVA, Tukey's multiple comparison test, *p<0.05, **p<0.01).

3.3.5. Dehnung induziert die Expression von adulten Genen

Wir haben den Einfluss von progressiver Dehnung auf die Differenzierung von hiPSC-Kardiomyozyten untersucht, indem wir die mRNA-Expression ausgewählter Marker-Gene analysiert haben. Während der kardialen Organogenese steigt die Expression der β -Isoform von Myosin (MHC) ¹⁰⁸, die hauptsächlich im Ventrikel exprimiert wird, an, während die Expression der α -MHC-Isoform, die hauptsächlich im fötalen Stadium exprimiert wird, abfällt ¹⁰⁹. In mittel- und intensiv gedehnten EHTs stieg das mRNA-Verhältnis von β -MHC zu α -MHC im Vergleich zu statisch gedehnten EHTs um bis zu 4,6-fach an ($p = 0,001$, $n = 6-13$) ¹⁰⁵. Gleichzeitig wurde eine reduzierte mRNA-Expression des stressaktiven Gens von Brain Natriuretic Peptide (NPPB, $p = 0,008$, $n = 6-13$) beobachtet ¹¹⁰. Aufgrund des begrenzten Einflusses der progressiven Dehnung auf die für die PCR-Analyse ausgewählten Gene führten wir eine RNA-Sequenzierung durch. Eine Auswahl von Genen, die spezifisch in adulten Kardiomyozyten im Vergleich zu embryonalen Kardiomyozyten exprimiert werden ⁴³, wurde verwendet, um die Maturierung von progressiv gedehnten EHTs zu bewerten. Die durchschnittliche Transkripthäufigkeit dieser Gene war in den am intensivsten gedehnten EHTs (S3) im Vergleich zu statisch gedehnten EHTs (S0) um das 2,1-fache höher, was auf eine Steigerung der Kardiomyozyten-Maturierung hinweist (Abb 30). Einzelne Gene wurden genauer analysiert, um individuelle Maturierungsprozesse aufzuzeigen. Die RNA-Sequenzierung zeigte eine deutliche Induktion von Genen, die in Zusammenhang mit der Erregung/Kontraktions-Kopplung und oxidativen Phosphorylierung stehen. Die Induktion der β -Oxidation (PPAR α) und die Unterdrückung der anaeroben Glykolyse (LDH) könnten einen metabolischen Wechsel in den progressiv gedehnten EHTs darstellen. Auch waren spezifische Marker von Nicht-Myozyten-Zelltypen wie Fibroblasten und Endothelzellen von der Dehnung betroffen, was auf die Bedeutung von Zellinteraktionen hinweist, die noch weiter untersucht werden müssen ¹⁰⁵.

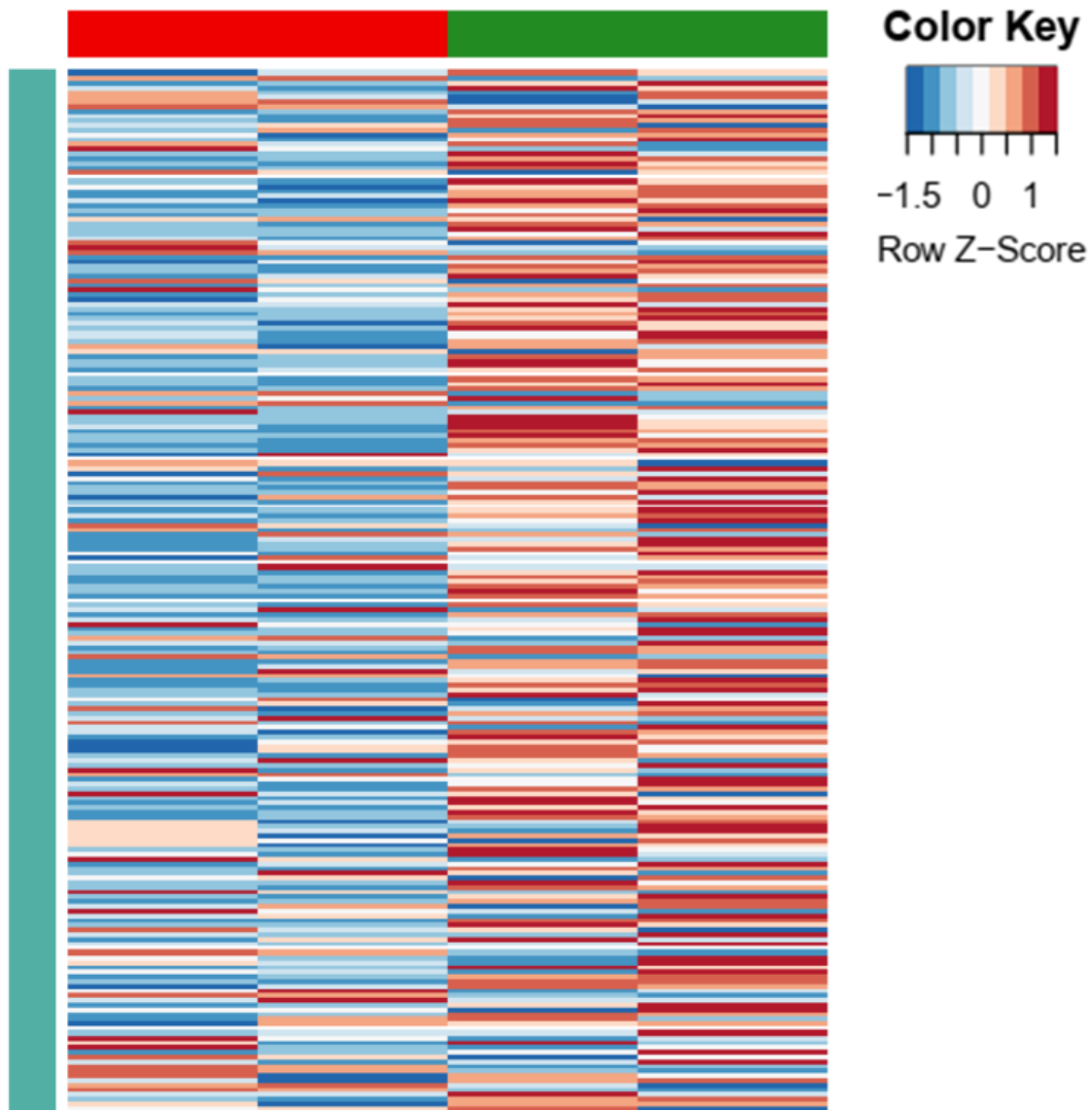


Abb. 30 (modifiziert nach ¹⁰⁵): Heatmap einer Auswahl von 218 Genen aus der RNA Sequenzierung, welche spezifisch sind für adulte Kardiomyozytein (Rot: statisch gedehnte EHTs S0, Grün: am stärksten gedehnte EHTs S3).

3.3.6. Dehnung steigert das Kardiomyozytenvolumen und erhöht die Myofibrillendichte und -anordnung

Die progressive Dehnung führte zu einer Zunahme der Gewebelänge, welche mit der Länge der Kardiomyozyten korrelierte (Abb.31). Nach Gewebedissoziation konnte in der Durchflusszytometrie die zelluläre

Volumenzunahme der progressiv gedehnten Kardiomyozyten bestätigt werden ($S_0 = 5,11 \times 10^4 \pm \text{SD } 0,5 \times 10^4$ vs. $S_3 = 7,03 \times 10^4 \pm \text{SD } 0,79 \times 10^4$)¹⁰⁵.

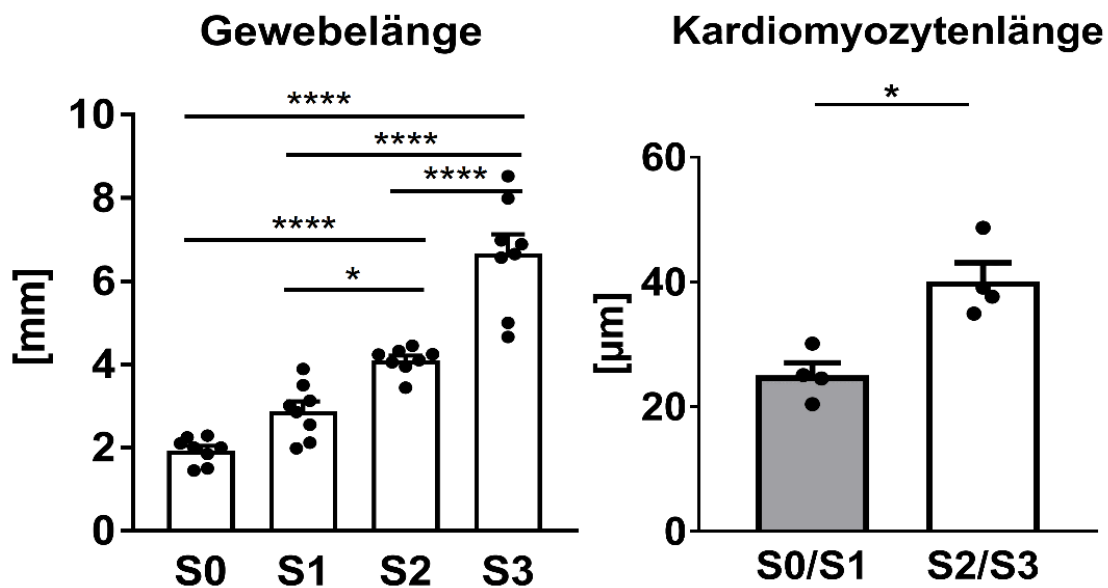


Abb. 31 (modifiziert nach¹⁰⁵): Entspannte Länge von EHTs nach drei Wochen in der Kultur (n=8, einfaktorielle ANOVA, Tukey's multiple comparison test ****p<0,0001, *p<0,05) und entsprechende Kardiomyozytenlänge (Mittelwerte n=4, Mann-Whitney Test *p<0,05).

Die Actinin-Gesamtquerschnittsfläche sowie ihr Anteil an der Gewebe-Querschnittsfläche wurde durch die Dehnung nicht beeinflusst (38-48% in allen Gruppen, n = 2-6, n. s.). Dementsprechend ergab die Berechnung des mittleren Kardiomyozytenvolumen (mittlere Länge multipliziert mit mittlerer Querschnittsfläche) eine Verdoppelung in den progressiv gedehnten Geweben (S0/S1: 3050 µm³; S2/S3: 6270 µm³). Dies entspricht einer ähnlichen Zunahme der muskulären Masse der EHTs (Gewelbelänge multipliziert mit mittlerer Querschnittsfläche, S0: 1,3 mm³, S3: 2,7 mm³)¹⁰⁵. Die progressive Dehnung verbesserte auch die Achsenausrichtung der Kardiomyozyten, insbesondere in Richtung der Kraftentwicklung und parallel zu den benachbarten Kardiomyozyten. Es kam zu einer Verlängerung der Sarkomerlänge von $1,87 \pm$

0,1 μm (S0) auf nahezu physiologische Werte (S3: $2,19 \pm 0,1 \mu\text{m}$). Diese Eigenschaften trugen möglicherweise zur physiologischen Kraft-Längen-Abhängigkeit der gedehnten EHTs bei, die dem physiologischen Frank-Starling-Mechanismus gut entspricht. Die ultrastrukturelle Untersuchung der α -Actinin-positiven Areale mittels konfokaler Mikroskopie und Second Harmonic Imaging Mikroskopie zeigte, dass die Kardiomyozyten in den progressiv gedehnten Geweben (S1-S3) dicht gepackte und linear angeordnete Myofibrillen mit deutlicher Querstreifung aufwiesen, während in den statisch gedehnten Geweben (S0) die Kardiomyozyten weniger und ungeordnete Myofibrillen aufwiesen (Abb.32). Bei starker Vergrößerung zeigte sich eine größere Fläche an α -Actinin-positiven Myofibrillen in den Querschnitten der Kardiomyozyten und eine Kompaktierung der Kardiomyozyten in progressiv gedehnten EHTs im Vergleich zu statisch gedehnten EHTs. Die Zunahme der Myofibrillendichte und -struktur zusammen mit einer engen mechanischen Kopplung der Zellen können ursächlich für die durch progressive Dehnung verursachte Zunahme der Kontraktionskraft sein ¹⁰⁵.

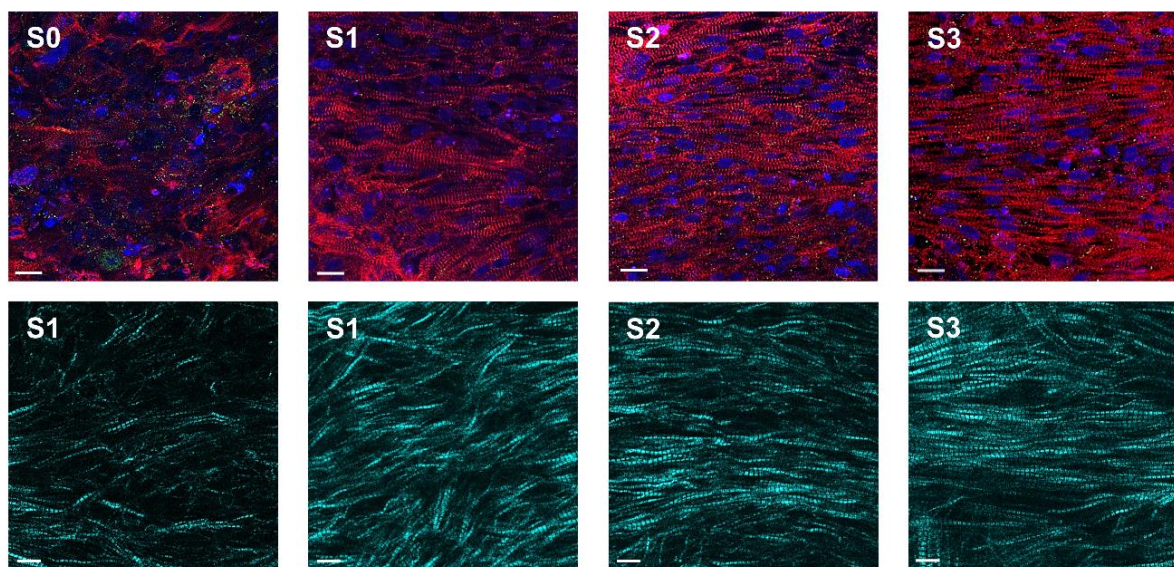


Abb. 32 (modifiziert nach ¹⁰⁵): Reihe 1: Immunfluoreszenzfärbungen von längsgeschnittenen EHTs nach drei Wochen statischer und progressiver Dehnung (α -Actinin (Rot), Connexin 43 (Grün) and DNA (Blau), Maßstab: 10 μm) und Reihe 2: Mikroskopische Aufnahmen mit der

Frequenzverdoppelungstechnik zur Darstellung der Ausrichtung und Dichte von Myofibrillen und Sarkomeren (Maßstab: 10 μm).

4. Diskussion

4.1. Adultes Myokardgewebe

Adultes kardiales Gewebe unterliegt einem schnellen Zelluntergang, wenn es außerhalb des Körpers kultiviert wird ^{46,111}. Bisher war es nur möglich, die Kontraktionskraft von humanen trabekulären Muskelfasern für 6 Tage in einem aufwändig gebauten Inkubator aufrechtzuerhalten ⁸⁹. Die in-vivo Umgebung, insbesondere die konstante elektromechanische Stimulation, ist entscheidend für die Regulation der kardialen Struktur und Funktion ⁵⁶. In den in dieser Arbeit vorgestellten Studien konnte gezeigt werden, dass die Optimierung der Kulturbedingungen von kardialen Gewebeschnitten einen Schritt in Richtung eines stabilen in-vitro-Modells des adulten humanen und tierischen Myokards darstellt. Dabei resultiert die Optimierung aus der Berücksichtigung mehrerer technischer Aspekte, die eine Annäherung an die normale Physiologie ermöglichen, wie elastische und nicht isometrische Kontraktionen, eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Gewebes bei einem Sauerstoffpartialdruck von 21 %, die Vermeidung elektrochemischer Reaktionen durch spezielle biphasische Stimulation und die mechanische Dehnung. Die Ernährungsbedürfnisse der kardialen Gewebeschnitte scheinen durch serumfreies Medium, das Glucose als einzige Energiequelle enthält, erfüllt zu sein. Während einige Studien vor allem die mechanische Dehnung als entscheidenden Faktor für eine stabile Gewebekultur hervorheben ¹¹², da identisch präparierte und kultivierte Gewebeschnitte ohne diastolische Vorlast schnell ihre Funktion einstellen ^{46,111}, konnten andere Studien keine Erhaltung der Kontraktionskraft allein durch Dehnung zeigen ^{90,111}. Die mechanische Dehnung spielt auch eine entscheidende Rolle im kardialen Remodeling-Prozess. Bei einer zu starken Dehnung, wie sie bei der Aortenklappenstenose auftritt, kommt es zu einer Gewebehypertrophie ^{113,114}, die sich durch Behebung der zugrundeliegenden Ursache wieder zurückbilden kann ¹¹⁵. Fehlt die Dehnung hingegen, kann es zur Myokardatrophie führen ¹¹⁶. Um die Funktion der Gewebeschnitte in der Kultur zu erhalten und eine myokardiale

Differenzierungsrückbildung zu verhindern, muss eine mechanische Dehnung im spezifischen Bereich von 1,8-2,2 μm Sarkomerlänge angewendet werden ⁵⁶. Die Sarkomerlänge konnte in der Kultur bisher nicht direkt bestimmt werden. Sie wurde erst nach Fixierung der Gewebeschnitte in den Kulturkammern während der Diastole und nach entsprechender Färbung gemessen. Dabei wurde eine durchschnittliche Sarkomerlänge von 1,8 μm festgestellt. Eine mögliche Alternative zur indirekten Bestimmung der biomechanischen Eigenschaften des Myokardgewebes besteht in der Berechnung des Verhältnisses von passiver und aktiver Kraftentwicklung. Bei gesunden Menschen liegt das Verhältnis von diastolischer zu systolischer Kraft bei 11 %, während es bei Patienten mit Volumenüberlastung bei 23 % liegt ¹⁰¹. Dieses Verhältnis tritt bei 85-90 % der Myozytenlänge während maximaler Kraftentwicklung auf, was einer Sarkomerlänge von 1,85-2,0 μm in gesunden und kranken humanen trabekulären Fasern entspricht ¹¹⁷. Im in-vitro Modell wurde deshalb eine diastolische Vorlast von 1 mN gewählt, was 83 % der für maximale Kontraktionskraft erforderlichen Myozytenlänge entsprach. Das Verhältnis von diastolischer zu systolischer Kraft nahm während der 4-wöchigen Kultur von anfänglichen 23 % auf 14 % ab. Die Möglichkeit, Gewebeschnitte in-vitro in einem funktionsfähigen Zustand zu erhalten, bietet ein signifikant verbessertes und dringend benötigtes Modell für die kardiovaskuläre Forschung. Die spezifischen Vorteile eines solchen Modells umfassen die lang anhaltende Erhaltung des adulten kardialen Phänotyps, die intakte kardiale Multizellularität und Gewebearchitektur, die kontinuierliche Überwachung der Vitalität sowie die Möglichkeit, das Modell für Arzneimittelsicherheitsprüfungen und die Untersuchung kardialer pathophysiologischer Prozesse einzusetzen. Ebenso können langfristige Interventionen, genetische Manipulationen und die Untersuchung chronischer Behandlungseffekte durchgeführt werden ¹¹⁸.

Die Verfügbarkeit von menschlichem Gewebe ist in Deutschland hauptsächlich von durchgeführten Herztransplantationen abhängig, die wiederum von der Organspendebereitschaft beeinflusst werden ¹¹⁹. Neue Quellen für

Herzmuskelgewebe sind die septale Myektomie oder die Implantation von linksventrikulären Assist-Devices. Die Möglichkeit, Proben mit Standard-Kurierdiensten zu versenden, hat die Anzahl an Gewebeproben entscheidend erhöht. Die hohe Lagerungstoleranz der Gewebeproben ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass bisherige in-vitro Modelle nicht von der Wiederherstellung der Perfusion abhängig sind. Dies ist eine Limitation der Modelle, da Flussuntersuchungen am Endothel und im Myokard nicht durchgeführt werden können. Ein Vorteil ist, dass durch den automatisierten Verarbeitungsprozess viele Gewebeschnitte aus einer Probe gewonnen werden, was sowohl zeitliche als auch quantitative Vorteile für die Forschung am humanen Myokard bietet. Einschränkend ist dabei, dass die Schnitte von endokardial bis epikardial transmural erzeugt werden. Dies sollte berücksichtigt werden, da Unterschiede der Myokardeigenschaften in den Schichten der Ventrikelwand beschrieben wurden ¹²⁰⁻¹²², was zu einer erhöhten Variabilität der Ergebnisse führen kann. Eine Randomisierung der Gewebeschnitte könnte diese Variabilität deutlich reduzieren. Eine weitere Einschränkung im Schneidprozess kann die interstitielle Fibrose sein, die durch die Erkrankungen bedingt ist ¹¹⁸. Stark fibrotische Bereiche können den Schnittprozess beeinträchtigen und zu ungleichmäßigen kardialen Gewebeschnitten führen. Durch Anpassungen der Vibratom-Parameter kann dieser Einschränkung oft entgegengewirkt werden.

Die auffälligste Veränderung der myokardialen Funktion in dem vorgestellten in-vitro-Modell war eine innerhalb von wenigen Stunden fast vollständige Aufhebung der Kontraktionskraft, gefolgt von einer allmählichen Erholung während der ersten Wochen in der Kultur. Eine mögliche Ursache hierfür könnte der Mangel an hormonellen Einflüssen wie Katecholaminen sein. Die Herunterregulierung von Genen der Exzitations-Kontraktions-Kopplung und des Adrenozeptor-Signalwegs könnte ein weiterer Hinweis dafür sein. Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Katecholaminen die Erholung der Kontraktionskraft signifikant beschleunigen konnte. Der Nutzen einer Substitution mit Katecholaminen wird derzeit in einer laufenden Studie genauer

untersucht und kann noch nicht abschließend geklärt werden. Die Transkriptomanalyse zeigte nach längerer Kulturdauer eine leichte Hochregulierung von Sarkomerproteinen und Proteinen, die am Kalziumhaushalt beteiligt sind. Die Veränderungen im Kalziumhaushalt könnten durch die Kulturbedingungen verursacht worden sein, aber sie könnten auch auf eine Rückbildung der pathologischen Veränderungen bei Herzinsuffizienz im Sinn eines reversen Remodelings zurückzuführen sein. Auf eine solche Normalisierung könnte auch die Herunterregulierung der Expression von Markergenen für Herzinsuffizienz, Hypertrophie und Hypoxie hindeuten. Die Induktion der Expression von Wachstumsfaktoren und Matrixproteinen wie Kollagenen und Fibronectin während der Kultur korrelierte nicht mit einer Zunahme der Fibrosierung oder mit einem Remodeling der Myozyten in der Histologie. In der Histologie zeigte sich keine Atrophie der Kardiomyozyten und die T-Tubuli waren intakt. Frühere Studien hatten eine Abnahme der T-Tubuli innerhalb von 48-96 Stunden Kulturdauer beobachtet ¹²³. In einer Folgestudie von Abu-Khousa et al. ¹²⁴ wurde der Einfluss des Remodelings von T-Tubuli auf die FFR und die Relaxationszeit bei chronischer Herzinsuffizienz untersucht. Eine reduzierte kardiale Reserve ist ein charakteristisches Merkmal der chronischen Herzinsuffizienz und führt insbesondere unter Bedingungen von erhöhter Belastung, wie z. B. bei körperlicher Aktivität, zu einer Verschlechterung der Symptome. Während im gesunden Myokard die FFR dazu beiträgt, die Anpassung des Herzzeitvolumens an erhöhte Anforderungen zu ermöglichen, sind die intrinsischen kardialen Mechanismen im insuffizienten Myokard abgeschwächt oder sogar umgekehrt ^{125,126}. Darüber hinaus kann eine beeinträchtigte kardiale Relaxation zu einer verminderten diastolischen Füllung beitragen. Die Untersuchungen wurden an Gewebeschnitten von 13 linksventrikulären Gewebepreparaten von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz mit dem hier vorgestellten in-vitro-Modell durchgeführt. Zur Quantifizierung der FFR wurde das Verhältnis der Kontraktionskraft bei 2 bzw. 1 Hz im Vergleich zu 0,5 Hz berechnet und zur Quantifizierung des Remodelings der T-Tubuli wurde der intrazelluläre Abstand der T-Tubuli (ΔTT)

histologisch gemessen. Zusätzlich wurden die Proteinspiegel der Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA2), des Natrium-Calcium-Austauschers (NCX1) und von Phospholamban (PLB) mittels Immunoblot quantifiziert. Die Auswertungen zeigten eine negative Korrelation von $\Delta T T$ und FFR, was bedeutet, dass Geweben mit einem ausgeprägten T-Tubuli Verlust eine deutlich negativere FFR und reduzierte Wandspannung bei hohen Stimulationsfrequenzen aufwiesen. Die gemessene 90 % Kontraktionsdauer korrelierte positiv mit $\Delta T T$ und invers mit dem Verhältnis SERCA2 zu PLB. Dadurch konnte die Bedeutung nicht nur der SERCA2-Aktivität, sondern auch der T-Tubuli für die Kontraktionskinetik des Myokards bestätigt werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass der $\Delta T T$ signifikant mit der Relaxationszeit korrelierte, insbesondere bei niedriger NCX1-Expression. Ein Verlust von T-Tubuli in den untersuchten Geweben führte somit zu einer Negativierung der FFR und zu einer Verlängerung der Kontraktionsdauer, die vor allem auf einer Verlängerung der Relaxationszeit beruhte. Die Verlängerung der Relaxationszeit war dabei nicht nur von den T-Tubuli, sondern auch von der NCX1-Expression abhängig.

Neben pathophysiologischen Untersuchungen wurden auch Effekte im Rahmen der Arzneimittelsicherheit in den kardialen Gewebeschnitten untersucht. Die Arzneimittelentwicklung beginnt mit präklinischen Tests, gefolgt von Experimenten an großen Tieren und endet mit klinischen Phase-0-IV-Studien. Der Einsatz von Gewebeschnitten in Kombination mit bestehenden Tests kann die präklinische Arzneimittelsicherheitsprüfung ergänzen. Der Einsatz von humanem Gewebe ist von Vorteil, da es elektrophysiologische Unterschiede zwischen den Spezies gibt ¹²⁷, die zuverlässige Versuche im Rahmen der Arzneimittelsicherheit an kleinen Säugetieren gemäß S7B European Medicine Agency verhindern. Zudem ermöglicht die Inkubation neuer Wirkstoffe mit humanem Myokard eine zeitliche Analyse ihrer Auswirkungen auf das kardiale Gewebe, um Nebenwirkungen frühzeitig zu erkennen und positive Effekte weiterzuentwickeln. Hierfür sind stabile experimentelle Bedingungen notwendig, die im Myokardmodell nach einer Kulturdauer von 2-3 Wochen

erreicht werden. Um die Validität des Modells für diese Prüfungen zu bestätigen, wurde die Interferenz von Arzneimitteln mit der Repolarisation von Kardiomyozyten untersucht, die das Long-QT-Syndrom (LQTS) und assoziierte Arrhythmien hervorrufen können¹²⁸. Die Interaktionsmechanismen können vielfältig sein und verschiedene Ionenkanäle beeinflussen, wodurch eine Bewertung neue und integrative Ansätze erfordert¹²⁹. Das Antiprotozoenmedikament Pentamidin hat ein sehr hohes proarrhythmisches Risiko, das durch die Interferenz mit der Proteinreifung, dem Membrantransport und der mRNA-Expression des Kv11.1-Kanals (Ether-a-go-go-Related Gene, hERG-Kanal) verursacht wird^{130,131}. Aufgrund der indirekten und verzögerten Wirkmechanismen entgeht die Beeinflussung des hERG-Kanals der Erkennung durch Protein-Interaktions-Assays und akuten elektrophysiologischen Tests. Im Gegensatz dazu spiegelte die tägliche Bestimmung der Refraktärzeit in den Gewebeschnitten die Aktionspotentialdauer im humanen Gewebe wieder und zeigte die akkumulierende Wirkung von Pentamidin über 2 Wochen ohne analytischen Aufwand oder Intervention. Die ausgeprägten Effekte von Pentamidin nach chronischer Exposition auf die Refraktärzeit deuteten auf eine Interferenz mit Repolarisationsmechanismen hin, die nicht mit dem hERG-Kanal zusammenhängen. Pentamidin sowie die direkte hERG-Blockade führten auch zu einer signifikanten Verlängerung der Aktionspotentialdauer. Obwohl die zugrunde liegenden Mechanismen noch geklärt werden müssen, würden solche Beobachtungen strengere Risikobewertungen vorschreiben, insbesondere hinsichtlich der Wechselwirkungen mit anderen hERG-blockierenden Medikamenten oder einer genetischen LQTS-Prädisposition. Bei Pentamidin könnten solche Vorsichtsmaßnahmen klinisch relevant sein, da die Empfindlichkeit von Standard-Assays der hERG-Beeinflussung (5,1-11,3 μM ^{130,131}) das Risiko von Arrhythmien bei mittleren therapeutischen Plasmakonzentrationen (0,1-0,5 μM ¹³²) zu unterschätzen scheint.

Die Optimierung der Kulturbedingungen von kardialen Gewebeschnitten der Maus ermöglicht eine realistische Nachbildung der Gewebestruktur und kontinuierliche elektrische Stimulation für bis zu 7 Tage. Auch bei den

Mäuseherzen zeigte sich, dass die mechanische Belastung während der Kultur entscheidend für die Kontraktionskraft des Gewebes ist. Eine ausreichende mechanische Belastung führt zu einer Steigerung der Sarkomerlänge und unterstützt die normale diastolische Füllung und systolische Kontraktion der Kardiomyozyten. Im Gegensatz zum humanen Myokardgewebe wurde bei den kardialen Gewebeschnitten der Maus eine diastolische Vorlast von 0,3 mN eingestellt. Dabei wurde eine Sarkomerlänge von 1,6 μm in frischen Gewebeschnitten gemessen. Dieser Wert entspricht nicht der zu erwartenden Sarkomerlänge von 2,0 μm . Allerdings wurden die Sarkomerlängen in nicht gedehnten, frischen Gewebeschnitten gemessen, die mit PFA fixiert wurden und typischerweise während der Fixierung zur Schrumpfung neigen. Eine Erhöhung der diastolischen Vorlast auf 1,2 mN führte zwar zu einer Zunahme der Sarkomerlänge auf 1,9 μm , jedoch nicht zu einer Zunahme der Kontraktionskraft. Eine veränderte Kalziumsensitivität des Mäusemyokards könnte dafür verantwortlich sein ¹³³. Durch die Berechnung der Wandspannung konnte eine diastolische Vorlast von 0,3 mN als optimale Bedingung identifiziert werden. Unter der Annahme, dass das Herz der Maus eine Wanddicke von 1,5 mm und einen Radius von 2 mm aufweist ¹³⁴, kann die Querschnittsfläche der kardialen Gewebeschnitte berechnet werden: $2 \times 1,5 \times 0,3 = 0,9 \text{ mm}^2$. Daraus ergibt sich eine diastolische Wandspannung von $0,3/0,9 = 0,39 \text{ mN/mm}^2$ bei einer diastolischen Vorlast von 0,3 mN. Diese Wandspannung entspricht der physiologischen Wandspannung von $0,33 \text{ mN/mm}^2$ ($2 \times 0,65/1,5/2$ anhand des Laplaceschen Gesetzes für Hohlkörper ¹³⁵), die durch einen transmuralen Druck von $0,65 \text{ mN/mm}^2$ erzeugt wird ¹³⁶. Da es zudem keine Unterschiede in der Genexpression der Titin Isoformen zwischen der diastolischen Vorlast von 0,3 mN und 1,2 mN gab, wurden alle weiteren Versuche mit einer Vorlast von 0,3 mN durchgeführt.

Die mechanische Gewebecharakterisierung der kardialen Gewebeschnitte von der Maus wurde im Organbad unter 1000 nM Isoproterenol durchgeführt, um in den Versuchen die maximale Kontraktionskraft zu erreichen. Die maximale Kontraktionskraft war in den kultivierten Geweben im Vergleich zu den frischen

Gewebe deutlich reduziert. Diese Ergebnisse zusammen mit der verringerten Genexpression von Myosin-Leichtketten 2 (MLC2) deuten darauf hin, dass während der Kultur ein Umbau des Gewebes stattfand. Ähnliche Effekte wurden auch in den humanen Gewebeschnitten beobachtet ⁴⁶. Im Gegensatz dazu fanden wir keine Veränderungen in der Gewebeelastizität der Gewebeschnitte, obwohl die mRNA-Expression der Titin Isoformen (N2A, N2B) in den kultivierten Schnitten reduziert war. Die Gewebeelastizität des Myokards wird vor allem vom Sarkomerprotein Titin und von Kollagen in der extrazellulären Matrix bestimmt ¹³⁷. Die Menge an Kollagen wurde in dieser Studie nicht gemessen.

Ein weiterer Schritt in der Optimierung der Kulturbedingungen war die kontinuierliche Stimulation der kardialen Gewebeschnitte der Maus. Zunächst wurde die optische Stimulation der elektrischen vorgezogen, da die letztere nicht zu elektrochemischen Reaktionen mit Bildung von Sauerstoffradikalen und H⁺ aufgrund der Oxidation von Cl⁻ und H₂O führt ^{138,139}. Unter optischer Stimulation nahm die Kontraktionskraft der Gewebeschnitte innerhalb der ersten 48 Stunden kontinuierlich ab, während die Reizschwelle parallel dazu kontinuierlich anstieg. Im Vergleich dazu zeigten nicht stimulierte Gewebeschnitte nach 48 Stunden eine deutlich höhere Kontraktionskraft. Eine mögliche Ursache dafür könnte die Verteilung und mRNA-Expression von Connexin 43 sein, die sich jedoch zwischen den stimulierten und nicht stimulierten Gewebeschnitten nicht unterschieden. Die Induktion der Glukosetransporter 1 (Glut1)-Expression lieferte klare Hinweise auf Hypoxie, was darauf hindeuten könnte, dass die Hemmung der Gap-Junction-Leitfähigkeit durch Dephosphorylierung ¹⁴⁰ ein möglicher Mechanismus der Entkopplung ist. Zudem könnte die Phototoxizität des Anregungslichts für den Unterschied in der Kontraktionskraft verantwortlich sein, da die optische Stimulation auf die oberste Schicht des stark lichtabsorbierenden Gewebes beschränkt ist und das Phänomen der Desensibilisierung hervorrufen könnte. Um den Sauerstoffverbrauch der Gewebeschnitte zu minimieren, wurden diese mit subphysiologischen Frequenzen zwischen 0,1 Hz und 2 Hz stimuliert und nicht mit der physiologischen Frequenz von bis zu 10 Hz ¹⁴¹. Obwohl gezeigt

wurde, dass eine Schnittdicke von 300 μm eine ausreichende Sauerstoffdiffusion in den zentralen Teil der Schnitte ermöglicht ¹⁴², konnten wir nicht ausschließen, dass die optische Stimulation einen höheren Sauerstoffbedarf verursacht und somit eine Ischämie in den zentralen Anteilen der Gewebeschnitte entsteht, was die funktionelle Integrität beeinträchtigen könnte. Im Einklang mit dem Verlust der Kontraktionskraft nahm das Expressionsniveau von MLC-2 stark ab. Zur Optimierung der Sauerstoffverteilung im Medium wurde die Schüttelbewegung der Kulturkammern deutlich erhöht. Durch das schnellere Kippen der Kulturkammern zeigten die stimulierten Gewebeschnitte eine signifikant bessere funktionelle Integrität, während die Kontraktionskraft der nicht stimulierten Schnitte unverändert blieb. Entsprechend war die Glut1-Expression in den schneller geschüttelten Gewebeschnitten im Vergleich zu den langsamer geschüttelten geringer ausgeprägt, wodurch die Myokardhypoxie in letzterer Gruppe bestätigt wurde ¹⁴³. Die Hypoxie führte nicht nur zu einem Verlust der Kontraktibilität, sondern auch zu diastolischer Kontraktur. Eine diastolische Hyperkontraktur führt zu einer irreversiblen Zellverkürzung ¹⁴⁴. Dies ist auf eine Kalziumüberladung in den Kardiomyozyten zurückzuführen ^{145,146}, die bei Hypoxie, Ischämie, Hypertrophie, oxidativem Stress und Herzinsuffizienz auftreten kann ^{147,148}.

Neben der Hypoxie kann auch oxidativer Stress durch Sauerstoffradikalbildung zu einer Zellschädigung führen. Glutathion kann hier schützende Effekte haben ¹⁴⁹. Die Zugabe von β -Mercaptoethanol (β -ME) zum Kulturmedium führte zu einer Induktion der Glutathionsynthese in Rinderembryonen ¹⁵⁰. Tatsächlich blieb die Kontraktionskraft stabiler, wenn β -ME dem Kulturmedium hinzugefügt wurde. Hingegen zeigte β -ME keinen Effekt auf die diastolische Kontraktur.

Aufgrund der schlechten Ergebnisse unter optischer Stimulation wurde unter Berücksichtigung aller Optimierungen stattdessen die elektrische Stimulation der kardialen Gewebeschnitte getestet. Ein Vorteil der elektrischen Stimulation besteht darin, dass sie universell auf alle erregbaren Gewebe angewendet

werden kann und nicht von transgenen Modifikationen abhängig ist. Zusätzlich wurde bei den elektrisch stimulierten Gewebeschnitten als weitere Optimierungsmaßnahme das Anästhesieverfahren der Mäuse geändert. Anstelle von Isofluran wurden die Mäuse intraperitoneal mit Ketamin und Xylazin anästhesiert, da diese Kombination die stärkste kardiale Depression in der Echokardiographie bei gesunden Mäusen zeigte ¹⁵¹. Mit diesen Maßnahmen erreichten wir stabile Kulturbedingungen von bis zu 7 Tagen, über die die Kontraktionskraft auf dem Niveau von frischen Gewebeschnitten erhalten wurde. Eine weitere Optimierungsmaßnahme war die schrittweise Anpassung der Gewebeschnitte an die Kultur, indem die Pufferlösung innerhalb der ersten Stunde dem Medium zugegeben wurde. Diese Intervention zeigte keine Vorteile, sondern eher eine geringere Kontraktionskraft im Vergleich zu den Gewebeschnitten, die die Intervention nicht erhalten hatten. In den ersten Validierungstests (Arzneimittelbehandlungen von frischen Gewebeschnitten mit Digitoxin und von frischen sowie kultivierten Gewebeschnitten mit Isoproterenol) zeigten sich stabile Kontraktionsreaktionen ohne relevante Unterschiede zwischen frischen und kultivierten Gewebeschnitten. Weitere Validierungen sind notwendig, um die Einsatzmöglichkeiten des in-vitro-Modells mit kardialen Gewebeschnitten von der Maus zu bestätigen.

Eine Limitation der in-vitro Kultur von kardialen Gewebeschnitten besteht darin, dass die Kraftvektoren bei der Kontraktion in einer 2D-Ebene parallel zur Faserrichtung ausgerichtet sind und nicht wie im in-situ Myokard ständigen 3D Druck- und Volumenänderungen ausgesetzt sind. Um diese Limitation in gewissem Maße zu reduzieren, könnten geometrische Modelle entwickelt werden, die die Spannung und Dehnung in Druck- und Volumenänderungen umwandeln. Dadurch wäre eine noch realitätsnähere Simulation der physiologischen Bedingungen möglich.

Für Forscher, welche an den Auswirkungen des Flusses auf das Endothel oder Myokard interessiert sind, ist dieses in-vitro-Modell nicht geeignet, da die Gewebeschnitte nicht perfundiert werden, sondern die Sauerstoff- und

Stoffwechselfversorgung über Diffusion erfolgt. Darüber hinaus sind Gewebeschnitte ein isoliertes System, das frei von hormonellen, neuronalen und entzündlichen Einflüssen und den damit verbundenen Mechanismen ist. Aus diesem Grund muss darauf geachtet werden, dass die Interpretation der Ergebnisse im Kontext einer in vitro-Präparation bleibt. Auch die Bildgebung zeigt Limitationen, da die Lichtstreuung durch dickes Myokard eine Herausforderung darstellt und die Gewebedurchdringung auf wenige Dutzend Mikrometer Tiefe beschränkt ist. Spezifische Darstellungstechniken wie FASTClear ermöglichen eine komplette Gewebedurchdringung durch die Mikroskopie ¹⁵².

Zusammenfassend haben in den letzten Jahren in-vitro-Modelle von kardialen Gewebeschnitten durch ihre Optimierungen an Bedeutung in der Forschung gewonnen. In der Grundlagenforschung ermöglichen Gewebeschnitte eine Überbrückung der Lücke zwischen Zell- und in-vivo-Forschung, bei translationalen Fragestellung durch die lange Kultivierung neue Möglichkeiten zur Erforschung des Remodelings und zum Einsatz für pharmakologische Tests. Zudem lassen sich Gewebeschnitte mittlerweile leicht herstellen und weisen einige Vorteile im Vergleich mit bestehenden Modellen auf, um die kardiale Forschung zu verändern.

4.2. Engineered Heart Tissues

Das Herz ist ein hochkomplexes muskuläres System, das ständig Blut durch den Kreislauf pumpt. In den Bemühungen, die Myokardstruktur zu simulieren, wurden verschiedene Arten von humanen EHTs entwickelt. Verschiedene Technologien zur Zelldifferenzierung und Gewebekonstruktion wurden veröffentlicht, mit dem Ziel, solide dreidimensionale Gewebe zu produzieren. Obwohl einige funktionale Merkmale des Herzens in diesen Geweben repräsentiert werden, besteht eine wichtige Limitation im unreifen Phänotyp der Kardiomyozyten. Um die Differenzierung der Kardiomyozyten zu einem mehr adulten Phänotyp zu verbessern, spielt die in-vitro-Simulation wichtiger Faktoren, die die kardiale

Organogenese beeinflussen, eine entscheidende Rolle. Ähnlich wie bei den kardialen Gewebeschnitten sind hierbei die biomechanischen Bedingungen entscheidend ¹⁵³. Daher wurden die EHTs in der vorliegenden Studie in einem leicht modifizierten in-vitro-Modell kultiviert, das auch für Gewebeschnitte verwendet wurde ³³. Neben biomimetischen Bedingungen wie definierter Compliance und elektrischer Stimulation wurden die EHTs auch einer progressiven Dehnung unterzogen, um das Wachstum der Kardiomyozyten zu fördern. Dies ist von Bedeutung, da die Hypertrophie ein entscheidender zellulärer Prozess für die 30- bis 40-fache Zunahme des Volumens der Kardiomyozyten in der postnatalen Phase ist. Nach der Geburt verlieren die Kardiomyozyten schnell die Fähigkeit zur Zellteilung ^{154,155}. Diese Phase repräsentiert eine adaptive Reaktion des Herzens, die mit einer Erhöhung der Größe und Leistung einhergeht und sich von dem pathologischen hypertrophen Remodeling durch übermäßige Belastung unterscheidet ¹⁵⁶. Sowohl statische als auch zyklische Dehnungsprotokolle haben bereits gezeigt, dass mechanische Belastung eine entscheidende Rolle bei der terminalen Differenzierung von aus Stammzellen gewonnenen Kardiomyozyten spielt ¹⁵⁷⁻¹⁶³. Es ist wichtig festzuhalten, dass die biologischen Effekte der zyklischen Dehnung grundlegend von denen der progressiven Dehnung abweichen. Bei der zyklischen Dehnung entsteht eine passive Dehnung in den Geweben, ohne dass ihre Dimensionen vergrößert werden, da die endgültigen EHTs eine feste Größe haben. Im Gegensatz dazu führte die progressive Dehnung zu einer 5,1-fachen Steigerung der Kontraktionskraft, einer Verdopplung der Gewebelänge und einer Normalisierung der Sarkomerlänge. Zusätzlich wurde eine maximale tägliche Dehnung identifiziert, bei der die diastolische Vorlast die Werte der statischen Gewebe nicht überschritt und somit vollständig durch longitudinales Wachstum kompensiert wurde ($S_2 = 0,16 \text{ mm/Tag}$). Dieses Modell ebnet somit den Weg für die Erzeugung größerer Myokardgewebe, da die Gewebebildung leicht skalierbar ist. Insbesondere die Bildung von Geweben mit regenerativer Kapazität aus Kardiomyozyten-Vorläuferzellen kann dadurch gesteigert werden.

Neben der neuen Technik der progressiven Dehnung wurden auch kürzlich veröffentlichte Optimierungsmaßnahmen für die Kultur von EHTs eingesetzt, wie z. B. elektrische Stimulation^{65,74,86} und die Verwendung eines optimierten Nährmediums⁴³. Die kontinuierliche elektrische Stimulation der EHTs wurde unter Verwendung einer normalen Herzfrequenz (1 Hz) durchgeführt. Dabei zeigte sich eine Verlangsamung der Spontanaktivität, regelmäßige 1:1-Stimulation mit 1 Hz und ein kontinuierlicher Rückgang der Reizschwelle als Indikatoren für die Differenzierung der Kardiomyozyten zu einem ausgereiften Phänotyp. Um die Effekte der progressiven Dehnung besser identifizieren zu können, wurde bewusst auf die Verwendung eines spezifischen elektrischen Stimulationsprotokolls verzichtet⁶⁵. Für die Kultur wurde ein serumfreies EHT-Erhaltungsmedium⁴³ mit wachstumssteigernden hormonellen Zusätzen^{164,165} verwendet. Die Sauerstoffversorgung erfolgte durch Diffusion ohne zusätzliche Sauerstoffzufuhr, ähnlich wie bei den kardialen Gewebeschnitten, indem die Kulturkammern kontinuierlich geschüttelt wurden. Echtzeit-Kontraktionskraftmessungen zeigten, dass der Sauerstoffbedarf von stark kontrahierenden EHTs durch eine stationäre Inkubation nicht ausreichend gedeckt wurde und unter Dehnung noch ausgeprägter war. Dies spiegelte sich auch in einer höheren Dichte und einem stärker linearen Netzwerk von Mitochondrien in den gedehnten EHTs wieder. Die Induktion des Kardiomyozytenwachstums zusammen mit den erwähnten Optimierungsmaßnahmen könnte möglicherweise zu physiologischeren Werten funktioneller Merkmale und biomechanischer Eigenschaften in den gedehnten EHTs geführt haben. Hinsichtlich struktureller Merkmale zeigten die gedehnten und statischen EHTs keine Unterschiede in der Ausbildung von T-Tubuli oder der Anordnung von Connexinen an den Glanzstreifen. Möglicherweise lassen sich diese Beobachtungen durch das gewählte Differenzierungsprotokoll, unspezifische Wechselwirkungen mit der ECM und den nicht-myozytären Gewebeanteilen sowie das Fehlen verschiedener Hormone erklären.

Sowohl bei den gedehnt wie auch statisch kultivierten EHTs kam es während der Kultur zu einer signifikanten Zunahme der Kontraktionskraft. Besonders bemerkenswert war, dass die Kontraktionskraft der gedehnten EHTs (11,3 mN/mm²) die systolischen Kräfte anderer in der Literatur beschriebener Gewebe deutlich übertraf (< 5 mN/mm²)^{43,65,74,97}, mit einer Ausnahme (23 mN/mm²)⁷⁵. Die progressiv gedehnten EHTs erreichten sogar beinahe die Kontraktionskraft des adulten humanen Myokards (15,1 mN/mm²)^{75,101}. Diese Steigerung der Kontraktionskraft basierte auf mehrere Faktoren, einschließlich der Zunahme der Kardiomyozytengröße und der Myofibrillendichte, einer verbesserten linearen Ausrichtung der Kardiomyozyten im Gewebe sowie einer gesteigerten elektrischen Leitfähigkeit und gesteigertem Kalziumzyklus. Besonders die Kardiomyozytengröße, ein Indikator für die Zelldifferenzierung¹⁶⁶, und die Sarkomerlänge (2,2 µm, identisch mit adultem humanem Myokard)¹⁶⁶ korrelierten deutlich mit der durch die Dehnung induzierten Zunahme der Kontraktionskraft. Die Analysen mittels Morphometrie und Durchflusszytometrie bestätigten, dass die Gewebeverlängerung nicht durch reversible elastische Dehnung verursacht wurde, sondern durch ein longitudinales zelluläres Wachstum bedingt war. Obwohl die Zellgröße adulter humaner Kardiomyozyten innerhalb von drei Wochen nicht erreicht wurde, führte die Zunahme der Gewebelänge zu einer signifikanten Steigerung der diastolischen Wandspannung bei niedriger und mittlerer Dehnung (S1, S2). Unter diesen Bedingungen entsprach die progressive Dehnung direkt dem zellulären Wachstum. Bei der stärksten Dehnung hingegen erhöhte sich die diastolische Wandspannung messbar und erzeugte so einen zusätzlichen Wachstumsreiz. Stabilisierte sich die diastolische Wandspannung nicht, kam es gelegentlich zu Rissen in den EHTs während weiterer Dehnung. Die stärkste Dehnung überstieg somit die maximale Wachstumsrate der Kardiomyozyten. Zusätzlich zur Steigerung der Kontraktionskraft führte die progressive Dehnung auch zu einer Anpassung der passiven Steifigkeit der EHTs. Das Elastizitätsmodul bei stärkster Dehnung (4,5 kPa) entsprach den physiologischen Werten des adulten humanen Myokards (5-7 kPa)¹⁶⁷. Dies ist ein besonderes Kennzeichen

der vorgestellten Kulturtechnik, da alternative Methoden häufig einen Überschuss an Matrixkomponenten einsetzen, um die Bildung des künstlichen Herzgewebes zu stabilisieren. Es resultieren daraus EHTs mit deutlich höherer Steifigkeit. Dies entspricht nicht den physiologischen Verhältnissen, bei denen die ECM nur zu einem geringen Teil (1,5 kPa) zum Elastizitätsmodul des Gesamtgewebes beiträgt^{168,169}. Bei der sich daraus ergebenden Bindung an eine zu steife Matrix bilden sich Stressfasern im Zytoskelett und fokale Adhäsionsstellen der Kardiomyozyten mit der Matrix, wodurch die Entwicklung der interzellulären Kraftübertragung signifikant beeinträchtigt werden kann^{169,170}. Um mögliche pathophysiologische Auswirkungen einer übermäßigen Matrix zu vermeiden, wurden in diesem Modell nur geringe Mengen an Matrixbestandteilen bei der EHT-Bildung eingesetzt. Dadurch entwickelte sich in den EHTs ein Verhältnis von endsystolischer zu enddiastolischer Wandspannung von 9 unter elastischen Bedingungen in den Kulturkammern und von 9,5 bei optimaler diastolischer Vorlast unter isometrischen Bedingungen im Organbad. Dieses Verhältnis entspricht dem Verhältnis im adulten humanen Myokard ($10,2 \pm 1,7$)¹⁰⁶. Es zeigt, dass EHTs ähnliche Fähigkeiten haben, externe Dehnung in Änderungen der Sarkomerlänge umzusetzen.

Als Indikator für die Differenzierung der Kardiomyozyten zu einem ausgereiften Phänotyp wurde in den gedehnten EHTs eine Verschiebung in der Expression von α -MHC zu β -MHC beobachtet. Während andere für die rt-PCR-Analyse ausgewählte Gene nur wenige zusätzliche Hinweise lieferten, zeigte die Auswertung der Genexpression aus der RNA-Sequenzierung eine deutliche Hochregulierung einer vorab ausgewählten Gruppe von Genen in den gedehnten EHTs, die spezifisch für reife Kardiomyozyten sind. Zudem wurden Abhängigkeiten von der Dehnung in Signalwegen der Erregung/Kontraktionskopplung, des Stoffwechsels und bei nicht-myozytären Zelltypen identifiziert. Überraschenderweise beobachteten wir eine Herunterregulierung der Expression von natriuretischem Peptid (BNP) unter allen Dehnungsbedingungen, was im Gegensatz zur mechanosensitiven Induktion

der BNP-Expression bei Herzinsuffizienz und EHTs steht, die unter isometrischen oder geringen Compliance-Bedingungen kultiviert werden^{114,160,171}. Im Gegensatz zu diesen biomechanischen Bedingungen kontrahieren die iPSC-Kardiomyozyten in den Kulturkammern unter elastischen Bedingungen, wodurch anscheinend eine pathologische Gewebeüberlastung trotz progressiver Dehnung verhindert werden kann. Dies wird das Fehlen (S1, S2) bzw. die geringe Zunahme (S3) der diastolischen Vorlast bei den verschiedenen Dehnungsbedingungen bestätigen. Es kann vermutet werden, dass eher die systolische als die diastolische Wandspannung der dominante Reiz für die Freisetzung von BNP sein könnte, was entsprechende Beobachtungen in anderen Studien bestätigen^{172,173}. Mit diesem EHT-Modell könnte daher u.a. die noch unbekannte Mechanotransduktion von natriuretischen Peptiden näher untersucht werden.

Für die Bildung der EHTs wurde in dieser Studie ein Kardiomyozyten-Differenzierungskit verwendet, um die Differenzierung einer generischen iPSC-Linie zu induzieren, wodurch eine Reinheit von 69 % an Kardiomyozyten erreicht wurde (α -Actinin und cTnT-doppelt positive Zellen). Die gesamte Zellpopulation wurde ohne weitere Aufreinigung in einem Kollagen/Laminin-Hydrogel suspendiert und auf einer Filteroberfläche zusammengesetzt. Dadurch sollte die Verfestigung des Gewebes beschleunigt und die Schrumpfung der Konstrukte minimiert werden. Dieser Ansatz unterscheidet sich deutlich von den bisher veröffentlichten Ansätzen, die eine Matrix-Strukturstütze für die EHTs verwenden und nicht von der Beeinflussung der Matrixkomponenten durch mesenchymale Zellen abhängig sind. Dadurch konnten EHTs mit hoher Zelldichte gebildet werden, was enge Zellkontakte förderte, eine schnelle Wiederaufnahme elektrischer Aktivität ermöglichte und einen frühen Beginn der progressiven Dehnung erlaubte. Eine Einschränkung der Studie liegt darin, dass nur eine hiPSC-Linie zu einem festen Differenzierungszeitpunkt getestet wurde, um die Auswirkungen der progressiven Dehnung zu bewerten. Da die Differenzierungsergebnisse mit anderen hiPSC-Linien ähnlich waren¹⁵⁸, stellen die Ergebnisse dieser Studie

allgemeine Reaktionen dar, welche sicherlich übertragbar sind. Weitere Einschränkungen sind, dass die stärkste Dehnung zu Rissen in den EHTs führte und innerhalb der 3 Wochen das Volumen der Kardiomyozyten nicht auf physiologische Werte gesteigert werden konnte. Möglicherweise führen fehlende hormonelle Stimulation und Ernährungsdefizite zu Wachstumseinschränkungen. Auch die fehlende Gefäßversorgung der EHTs kann die Gewebegröße und die Kulturdauer einschränken und durch Hypoxie eine Apoptose einleiten. Aus diesem Grund sollten die fortschrittlichsten Protokolle für die Bildung von EHTs mit der progressiven Dehnung kombiniert werden. Maßnahmen in diesen Protokollen sind die Zugabe von Fibroblasten, hormonelle Stimulation, verlängerte Kulturdauer und elektrische Stimulationsprotokolle.

Diese Studie präsentiert einen neuen Ansatz zur Induktion der Differenzierung von Kardiomyozyten und dem Wachstum von EHTs durch progressive Dehnung, wodurch die postnatalen Herzentwicklung simuliert wird. Innerhalb von nur drei Wochen zeigten die EHTs ein Zellwachstum, eine Steigerung der Myofibrillendichte und -anordnung sowie der Kontraktionskraft und wiesen Merkmale einer ausgereiften Erregungs-Kontraktions-Kopplung auf. Diese Konstrukte können dazu beitragen, Untersuchungen zur Biomechanik der Herzentwicklung zu erleichtern und die Erzeugung therapeutisch relevanter Gewebekonstrukte zu fördern. Durch die Kombination verschiedener wachstumsfördernder Techniken können EHTs aus humanen iPSCs ein relevanteres in-vitro-Modell darstellen als Tierversuche. Sie ermöglichen Experimente, die in herkömmlichen 2D-Systemen mit hiPSC-Kardiomyozyten unmöglich wären. 2D-Kulturen eignen sich zur Untersuchung von Vitalität und Zellmorphologie, und auch die Erregungsausbreitung kann durch fluorometrische Verfahren oder multi-Elektrodenarrays gut erfasst werden. In EHTs ist dagegen eine 3D-Struktur aufgebaut, welche die zusätzliche Messung von Elastizität und Kontraktionskräften ermöglicht. Dadurch können funktionelle Messungen, wie z.B. die Analyse des Frank-Starling Mechanismus, oder die direkte Erfassung des Aktionspotentials durch scharfe, intrazelluläre Elektroden

durchgeführt werden. Einsatzmöglichkeiten sind die Modellierung von Krankheiten, Arzneimitteltestungen, die in-vivo-Regeneration von Myokardgewebe ¹⁷⁴ und die Bildung einer zellbasierten kardialen Pumpe ¹⁷⁵. Darüber hinaus ermöglichen technische Fortschritte die Erzeugung von atrialen, ventrikulären und bipolaren EHTs ^{64,176,177} sowie von Organoiden ^{178,179}, wodurch eine Modellierung von herzkammerspezifischen Erkrankungen möglich wird. Mit weiteren Entwicklungen und Fortschritten in der Herstellung und Anwendung von EHTs besteht das Potenzial, die Herzforschung und die klinische Praxis in der kardiovaskulären Medizin weiter voranzutreiben.

5. Zusammenfassung

Die interdisziplinäre Erforschung der Ursachen und neuer Behandlungsstrategien von Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist von essentieller Bedeutung. Vor dem Einsatz von sehr aufwendigen und beim Einsatz von Tiermodellen nur teilweise vergleichbaren in-vivo Studien wären präklinische Untersuchungen an weniger invasiven humanen in-vitro Modellen sinnvoll. Aktuelle Modelle zeigen aber deutliche Limitationen. Die Reduktion dieser Limitationen kann den Einsatz für viele Forschungsanwendungen erhöhen und dadurch Tiermodelle relevant reduzieren. Aus diesem Grund haben wir einen Bioreaktor entwickelt, mit dem es möglich ist, Gewebeschnitte aus intaktem adultem humanem Myokard zu kultivieren und funktionell zu überwachen. Dabei konnten wir erstmals die Struktur und die Funktion der Gewebe für mehr als 4 Monate aufrechterhalten. Dadurch sind Langzeitinterventionen, genetische Manipulationen und die Überwachung chronischer Behandlungseffekte am adulten Myokard möglich. Mit dem Modell wurden bereits proarrhythmogene Arzneimittelwirkungen sowie Untersuchungen pathophysiologischer Aspekte der Herzinsuffizienz durchgeführt. Dieses Herzmodell hat somit das Potential, Forschung am humanen Myokard zu fördern, indem Versuche an vielen Gewebeschnitten desselben Präparates in einem Standard-CO₂-Inkubator über mehrere Wochen durchgeführt werden können. Dadurch wird die Sensitivität von Studien erhöht und der Einsatz von Tierversuchen relevant reduziert.

Da die Kultur bisher abhängig ist von der Verfügbarkeit von Gewebeproben und viele Myokarderkrankungen in genetisch manipulierten Mäusen simuliert werden können, haben wir die Kulturbedingungen im Bioreaktor so angepasst, dass eine Kultivierung von Gewebeschnitten der Maus bis zu einer Woche möglich wurde. Auch damit könnte der Einsatz von Tiermodellen reduziert werden, da mehrere Gewebeschnitte aus einem Herzen gewonnen und kultiviert werden können. Erste pharmakologische Versuche am

Mäusemyokard zeigten reproduzierbare Ergebnisse, längere Interventionen während der Kultur wurden aber bisher noch nicht durchgeführt.

Der Bioreaktor wurde zudem auch verwendet um künstliches Herzmuskelgewebe zu kultivieren. Dabei wurde das Ziel verfolgt, durch eine in-vitro Simulation der kardialen Organogenese die Differenzierung von hiPSC zu einem mehr adulten Phänotyp zu fördern. Um die postnatale Hypertrophie besser zu simulieren, wurden die EHTs in unseren BMCCs neben bereits publizierten Promotoren der Maturierung, wie elektrische Stimulation und optimiertes Kulturmedium, einer progressiven Dehnung mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten unterzogen. So konnten wir mit dem von uns präsentierten neuen Ansatz humane EHTs mit ausgeprägten Eigenschaften des adulten Myokards erzeugen, die sowohl Aufschluss über die Biomechanik der Herzentwicklung geben als auch einen Weg für die Erzeugung von therapeutisch relevanten Gewebekonstrukten aufzeigen. Durch die primäre Zusammensetzung der Gewebe auf Kulturfiltern konnte eine Verfestigung beschleunigt, eine Schrumpfung minimiert und die Verwendung eines vorgefertigten Matrixkonstruktes mit geringer Compliance vermieden werden. Auf diese Weise konnten wir EHTs mit einer hohen Zelldichte bilden, die enge Zell-Zell Kontakte, eine schnelle Wiederaufnahme der rhythmischen Aktivität und einen frühzeitigen Beginn des Dehnungsprotokolls ermöglichten. Dieses Modell ebnet somit den Weg für die Bildung von größeren Myokardgeweben, da die Bildung der EHTs beliebig hochskaliert und auch für regenerative Gewebe mit Progenitorzellen eingesetzt werden kann. Eine längere Kulturdauer mit progressiver Dehnung sollte mit den bisher fortschrittlichsten EHT-Protokollen (elektrische Konditionierung, Fibroblasten-Supplementierung, hormonelle Stimulation) kombiniert werden, um das volle Maturierungspotential von hiPSC ausschöpfen zu können.

6. Literaturverzeichnis

1. Virani, S. S. et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 141, e139–e596 (2020).
2. Rajamohan, D. et al. Current status of drug screening and disease modelling in human pluripotent stem cells. *Bioessays* 35, 281–298 (2013).
3. Russell, W. M. S. & Burch, R. L. The Principles of Humane Experimental Technique. *Medical Journal of Australia* 10.5694/j.1326-5377.1960.tb73127.x (1960).
4. van der Velden, J. et al. Animal models and animal-free innovations for cardiovascular research: current status and routes to be explored. Consensus document of the ESC working group on myocardial function and the ESC Working Group on Cellular Biology of the Heart. *Cardiovasc Res* 118, 3016-3051 (2022).
5. Roth, G. A. et al. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol* 70, 1–25 (2017).
6. Birks, E. J. Molecular changes after left ventricular assist device support for heart failure. *Circ Res* 113, 777–791 (2013).
7. Crespo-Leiro, M. G. et al. European Society of Cardiology Heart Failure Long-Term Registry (ESC-HF-LT): 1-year follow-up outcomes and differences across regions. *Eur J Heart Fail* 18, 613–625 (2016).
8. McMurray, J. J. V. Clinical practice. Systolic heart failure. *N Engl J Med* 362, 228–238 (2010).
9. Lloyd-Jones, D. M. et al. Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Circulation* 106, 3068–3072 (2002).
10. Tocchetti, C. G. et al. Cardiac dysfunction in cancer patients: beyond direct cardiomyocyte damage of anticancer drugs: novel cardio-oncology insights from the joint 2019 meeting of the ESC Working Groups of

- Myocardial Function and Cellular Biology of the Heart. *Cardiovasc Res* 116, 1820–1834 (2020).
11. Sagar, S. et al. Myocarditis. *Lancet* 379, 738–747 (2012).
 12. Davis, M. B. et al. Peripartum Cardiomyopathy: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol* 75, 207–221 (2020).
 13. Rosenbaum, A. N. et al. Genetics of dilated cardiomyopathy: practical implications for heart failure management. *Nat Rev Cardiol* 17, 286–297 (2020).
 14. Katz, A. M. & Rolett, E. L. Heart failure: when form fails to follow function. *Eur Heart J* 37, 449–454 (2016).
 15. Metra, M. & Teerlink, J. R. Heart failure. *Lancet* 390, 1981–1995 (2017).
 16. Bloom, M. W. et al. Heart failure with reduced ejection fraction. *Nat Rev Dis Primers* 3, 17058 (2017).
 17. Benjamin, E. J. et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 135, e146–e603 (2017).
 18. Paulus, W. J. & Tschope, C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol* 62, 263–271 (2013).
 19. Franssen, C. et al. Myocardial Microvascular Inflammatory Endothelial Activation in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *JACC Heart Fail* 4, 312–324 (2016).
 20. Eisenberg, T. et al. Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine. *Nat Med* 22, 1428–1438 (2016).
 21. Shah, S. J. et al. Phenotype-Specific Treatment of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Multiorgan Roadmap. *Circulation* 134, 73–90 (2016).
 22. Pieske, B. et al. How to diagnose heart failure with preserved ejection fraction: the HFA-PEFF diagnostic algorithm: a consensus recommendation from the Heart Failure Association (HFA) of the

- European Society of Cardiology (ESC). *Eur J Heart Fail* 22, 391–412 (2020).
23. Argulian, E. et al. Teasing Apart Heart Failure With Preserved Ejection Fraction Phenotypes With Echocardiographic Imaging: Potential Approach to Research and Clinical Practice. *Circ Res* 122, 23–25 (2018).
 24. Senni, M. et al. New strategies for heart failure with preserved ejection fraction: the importance of targeted therapies for heart failure phenotypes. *Eur Heart J* 35, 2797–2815 (2014).
 25. Udelson, J. E. Heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation* 124, e540–3 (2011).
 26. Conceição, G. et al. Animal models of heart failure with preserved ejection fraction. *Neth Heart J* 24, 275–286 (2016).
 27. Mishra, S. & Kass, D. A. Cellular and molecular pathobiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Rev Cardiol* 18, 400–423 (2021).
 28. Valero-Muñoz, M. et al. Murine Models of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: a ‘Fishing Expedition’. *JACC Basic Transl Sci* 2, 770–789 (2017).
 29. Mori, J. et al. Angiotensin 1-7 ameliorates diabetic cardiomyopathy and diastolic dysfunction in db/db mice by reducing lipotoxicity and inflammation. *Circ Heart Fail* 7, 327–339 (2014).
 30. van Bilsen, M. et al. Hypertension is a conditional factor for the development of cardiac hypertrophy in type 2 diabetic mice. *PLoS One* 9, e85078 (2014).
 31. Murase, T. et al. Cardiac remodeling and diastolic dysfunction in DahlS.Z-Lepr(fa)/Lepr(fa) rats: a new animal model of metabolic syndrome. *Hypertens Res* 35, 186–193 (2012).
 32. Kriegel, A. J. et al. Molecular Approaches in HFpEF: MicroRNAs and iPSC-Derived Cardiomyocytes. *J Cardiovasc Transl Res* 10, 295–304 (2017).
 33. Fischer, C. et al. Long-term functional and structural preservation of

- precision-cut human myocardium under continuous electromechanical stimulation in vitro. *Nat Commun* 10, 117 (2019).
34. Veldhuizen, J. et al. Three-dimensional microengineered models of human cardiac diseases. *J Biol Eng* 13, 29 (2019).
 35. Singhvi, R. et al. Engineering cell shape and function. *Science* 264, 696–698 (1994).
 36. Chen, C. S. et al. Geometric control of cell life and death. *Science* 276, 1425–1428 (1997).
 37. Shao, Y. et al. On human pluripotent stem cell control: The rise of 3D bioengineering and mechanobiology. *Biomaterials* 52, 26–43 (2015).
 38. Liu, W. et al. MR tagging demonstrates quantitative differences in regional ventricular wall motion in mice, rats, and men. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H2515–21 (2006).
 39. Salama, G. & Bett, G. C. L. Sex differences in the mechanisms underlying long QT syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 307, H640–8 (2014).
 40. Mathur, A. et al. In vitro cardiac tissue models: Current status and future prospects. *Adv Drug Deliv Rev* 96, 203–213 (2016).
 41. Sidorov, V. Y. et al. I-Wire Heart-on-a-Chip I: Three-dimensional cardiac tissue constructs for physiology and pharmacology. *Acta Biomater* 48, 68–78 (2017).
 42. Wang, G. et al. Modeling the mitochondrial cardiomyopathy of Barth syndrome with induced pluripotent stem cell and heart-on-chip technologies. *Nat Med* 20, 616–623 (2014).
 43. Tiburcy, M. et al. Defined Engineered Human Myocardium With Advanced Maturation for Applications in Heart Failure Modeling and Repair. *Circulation* 135, 1832–1847 (2017).
 44. Annabi, N. et al. Highly Elastic Micropatterned Hydrogel for Engineering Functional Cardiac Tissue. *Adv Funct Mater* 23, 10.1002/adfm.201300570 (2013).
 45. Alford, P. W. et al. Biohybrid thin films for measuring contractility in engineered cardiovascular muscle. *Biomaterials* 31, 3613–3621 (2010).

46. Brandenburger, M. et al. Organotypic slice culture from human adult ventricular myocardium. *Cardiovasc Res* 93, 50–59 (2012).
47. Dos Remedios, C. G. et al. The Sydney Heart Bank: improving translational research while eliminating or reducing the use of animal models of human heart disease. *Biophys Rev* 9, 431–441 (2017).
48. Verdonschot, J. A. J. et al. Distinct Cardiac Transcriptomic Clustering in Titin and Lamin A/C-Associated Dilated Cardiomyopathy Patients. *Circulation* 142, 1230–1232 (2020).
49. Borbély, A. et al. Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation* 111, 774–781 (2005).
50. Coppini, R. et al. Late sodium current inhibition reverses electromechanical dysfunction in human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 127, 575–584 (2013).
51. Chen, C. Y. et al. Suppression of detyrosinated microtubules improves cardiomyocyte function in human heart failure. *Nat Med* 24, 1225–1233 (2018).
52. Piroddi, N. et al. The homozygous K280N troponin T mutation alters cross-bridge kinetics and energetics in human HCM. *J Gen Physiol* 151, 18–29 (2019).
53. Nijenkamp, L. L. A. M. et al. Sex-specific cardiac remodeling in early and advanced stages of hypertrophic cardiomyopathy. *PLoS One* 15, e0232427 (2020).
54. Bogunovic, N. et al. Patient-Specific 3-Dimensional Model of Smooth Muscle Cell and Extracellular Matrix Dysfunction for the Study of Aortic Aneurysms. *J Endovasc Ther* 28, 604–613 (2021).
55. Meekel, J. P. et al. A multilayer micromechanical elastic modulus measuring method in ex vivo human aneurysmal abdominal aortas. *Acta Biomater* 96, 345–353 (2019).
56. Watson, S. A. et al. Preparation of viable adult ventricular myocardial slices from large and small mammals. *Nat Protoc* 12, 2623–2639 (2017).
57. Pitoulis, F. G. et al. Myocardial slices come to age: an intermediate

- complexity in vitro cardiac model for translational research. *Cardiovasc Res* 116, 1275–1287 (2020).
58. Wang, K. et al. Cardiac tissue slices: preparation, handling, and successful optical mapping. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 308, H1112–25 (2015).
 59. Thomas, R. C. et al. A Myocardial Slice Culture Model Reveals Alpha-1A-Adrenergic Receptor Signaling in the Human Heart. *JACC Basic Transl Sci* 1, 155–167 (2016).
 60. Watson, S. A. et al. A practical guide for investigating cardiac physiology using living myocardial slices. *Basic Res Cardiol* 115, 61 (2020).
 61. Guzik, T. J. et al. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 105, 1656–1662 (2002).
 62. Guzik, T. J. et al. Coronary artery superoxide production and nox isoform expression in human coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 333–339 (2006).
 63. Guzik, T. J. et al. UltraRapid communications : vascular superoxide production by NAD(P)H Oxidase Association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res* 86, 1008 (2000).
 64. Zhao, Y. et al. A Platform for Generation of Chamber-Specific Cardiac Tissues and Disease Modeling. *Cell* 176, 913–927.e18 (2019).
 65. Ronaldson-Bouchard, K. et al. Advanced maturation of human cardiac tissue grown from pluripotent stem cells. *Nature* 556, 239–243 (2018).
 66. Le, M. N. T. & Hasegawa, K. Expansion Culture of Human Pluripotent Stem Cells and Production of Cardiomyocytes. *Bioengineering (Basel)* 6, (2019).
 67. Breckwoldt, K. et al. Differentiation of cardiomyocytes and generation of human engineered heart tissue. *Nat Protoc* 12, 1177–1197 (2017).
 68. Buikema, J. W. et al. Wnt Activation and Reduced Cell-Cell Contact Synergistically Induce Massive Expansion of Functional Human iPSC-Derived Cardiomyocytes. *Cell Stem Cell* 27, 50–63.e5 (2020).

69. Cai, W. et al. An Unbiased Proteomics Method to Assess the Maturation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Circ Res* 125, 936–953 (2019).
70. Madonna, R. et al. Glucose Metabolism, Hyperosmotic Stress, and Reprogramming of Somatic Cells. *Mol Biotechnol* 55, 169–178 (2013).
71. Bowman, P. R. T et al. GLUT4 expression and glucose transport in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *PLoS One* 14, e0217885 (2019).
72. Rohani, L. et al. Concise Review: Molecular Cytogenetics and Quality Control: Clinical Guardians for Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Transl Med* 7, 867–875 (2018).
73. Ruan, J.-L. et al. Mechanical Stress Conditioning and Electrical Stimulation Promote Contractility and Force Maturation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Human Cardiac Tissue. *Circulation* 134, 1557–1567 (2016).
74. Radisic, M. et al. Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 18129–18134 (2004).
75. Shadrin, I. Y. et al. Cardiopatch platform enables maturation and scale-up of human pluripotent stem cell-derived engineered heart tissues. *Nat Commun* 8, 1825 (2017).
76. Giacomelli, E. et al. Human-iPSC-Derived Cardiac Stromal Cells Enhance Maturation in 3D Cardiac Microtissues and Reveal Non-cardiomyocyte Contributions to Heart Disease. *Cell Stem Cell* 26, 862–879.e11 (2020).
77. Olmer, R. et al. Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Functional Endothelial Cells in Scalable Suspension Culture. *Stem Cell Reports* 10, 1657–1672 (2018).
78. Saleem, U. et al. Force and Calcium Transients Analysis in Human Engineered Heart Tissues Reveals Positive Force-Frequency Relation at Physiological Frequency. *Stem Cell Reports* 14, 312–324 (2020).
79. Park, S.-J. et al. Insights Into the Pathogenesis of Catecholaminergic

- Polymorphic Ventricular Tachycardia From Engineered Human Heart Tissue. *Circulation* 140, 390–404 (2019).
80. Corbin, E. A. et al. Tunable and Reversible Substrate Stiffness Reveals a Dynamic Mechanosensitivity of Cardiomyocytes. *ACS Appl Mater Interfaces* 12, 20603–20614 (2019).
 81. Ma, Z. et al. Contractile deficits in engineered cardiac microtissues as a result of MYBPC3 deficiency and mechanical overload. *Nat Biomed Eng* 2, 955–967 (2018).
 82. Zhang, Y. S. et al. Bioprinted thrombosis-on-a-chip. *Lab Chip* 16, 4097–4105 (2016).
 83. van den Berg, A. et al. Personalised organs-on-chips: functional testing for precision medicine. *Lab Chip* 19, 198–205 (2019).
 84. Lai, B. F. L. et al. A well plate-based multiplexed platform for incorporation of organoids into an organ-on-a-chip system with a perfusable vasculature. *Nat Protoc* 16, 2158–2189 (2021).
 85. Castilho, M. et al. Melt Electrowriting Allows Tailored Microstructural and Mechanical Design of Scaffolds to Advance Functional Human Myocardial Tissue Formation. *Advanced Functional Materials* 28, 1803151 (2018).
 86. Hirt, M. N. et al. Functional improvement and maturation of rat and human engineered heart tissue by chronic electrical stimulation. *J Mol Cell Cardiol* 74, 151–161 (2014).
 87. Korolj, A. et al. Biophysical stimulation for in vitro engineering of functional cardiac tissues. *Clin Sci (Lond)* 131, 1393–1404 (2017).
 88. Stoppel, W. L. et al. Electrical and mechanical stimulation of cardiac cells and tissue constructs. *Adv Drug Deliv Rev* 96, 135–155 (2016).
 89. Janssen, P. M. et al. Preservation of contractile characteristics of human myocardium in multi-day cell culture. *J Mol Cell Cardiol* 31, 1419–1427 (1999).
 90. Qiao, Y. et al. Multiparametric slice culture platform for the investigation of human cardiac tissue physiology. *Prog Biophys Mol Biol* 144, 139–150

- (2019).
91. Bruegmann, T. et al. Optogenetic control of heart muscle in vitro and in vivo. *Nat Methods* 7, 897–900 (2010).
 92. Olinga, P. et al. Comparison of five incubation systems for rat liver slices using functional and viability parameters. *J Pharmacol Toxicol Methods* 38, 59–69 (1997).
 93. Seidel, T. et al. Analyzing Remodeling of Cardiac Tissue: A Comprehensive Approach Based on Confocal Microscopy and 3D Reconstructions. *Ann Biomed Eng* 44, 1436–1448 (2016).
 94. Emde, B. et al. Wheat germ agglutinin staining as a suitable method for detection and quantification of fibrosis in cardiac tissue after myocardial infarction. *Eur J Histochem* 58, 2448 (2014).
 95. Seidel, T. et al. Remodeling of the transverse tubular system after myocardial infarction in rabbit correlates with local fibrosis: A potential role of biomechanics. *Prog Biophys Mol Biol* 130, 302–314 (2017).
 96. Seidel, T. et al. Sheet-Like Remodeling of the Transverse Tubular System in Human Heart Failure Impairs Excitation-Contraction Coupling and Functional Recovery by Mechanical Unloading. *Circulation* 135, 1632–1645 (2017).
 97. Moretti, A. et al. Pluripotent stem cell models of human heart disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 3, a014027 (2013).
 98. Chen, G. et al. Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat Methods* 8, 424–429 (2011).
 99. Cashman, T. J. et al. Construction of Defined Human Engineered Cardiac Tissues to Study Mechanisms of Cardiac Cell Therapy. *J Vis Exp* 1, e53447 (2016).
 100. Dietzel, S. et al. Label-free determination of hemodynamic parameters in the microcirculation with third harmonic generation microscopy. *PLoS One* 9, e99615 (2014).
 101. Grossman, W., et al. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 56, 56–64 (1975).

102. Cao-Ehlker, X. et al. Optimized Conditions for the Long-Term Maintenance of Precision-Cut Murine Myocardium in Biomimetic Tissue Culture. *Bioengineering (Basel)* 10, 171 (2023).
103. Kelly, J. J. et al. Mechanisms linking connexin mutations to human diseases. *Cell Tissue Res* 360, 701–721 (2015).
104. Leybaert, L. et al. Connexins in Cardiovascular and Neurovascular Health and Disease: Pharmacological Implications. *Pharmacol Rev* 69, 396–478 (2017).
105. Lu, K. et al. Progressive stretch enhances growth and maturation of 3D stem-cell-derived myocardium. *Theranostics* 11, 6138–6153 (2021).
106. Hood, W. P.. Wall stress in the normal and hypertrophied human left ventricle. *Am J Cardiol* 22, 550-558 (1968).
107. Huebsch, N. et al. Miniaturized iPS-Cell-Derived Cardiac Muscles for Physiologically Relevant Drug Response Analyses. *Sci Rep* 6, 24726 (2016).
108. Taegtmeyer, H. et al. Return to the fetal gene program: a suggested metabolic link to gene expression in the heart. *Ann N Y Acad Sci* 1188, 191–198 (2010).
109. Xu, X. Q. et al. Global expression profile of highly enriched cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 27, 2163–2174 (2009).
110. Liang, F. & Gardner, D. G. Mechanical strain activates BNP gene transcription through a p38/NF- κ B–dependent mechanism. *J Clin Invest* 104, 1603–1612 (1999).
111. Perbellini, F. et al. Investigation of cardiac fibroblasts using myocardial slices. *Cardiovasc Res* 114, 77–89 (2018).
112. Watson, S. A. et al. Biomimetic electromechanical stimulation to maintain adult myocardial slices in vitro. *Nat Commun* 10, 2168 (2019).
113. Hill, J. A. & Olson, E. N. Cardiac plasticity. *N Engl J Med* 358, 1370–1380 (2008).
114. Leonard, A. et al. Afterload promotes maturation of human induced

- pluripotent stem cell derived cardiomyocytes in engineered heart tissues. *J Mol Cell Cardiol* 118, 147–158 (2018).
115. Treibel, T. A. et al. Reverse Myocardial Remodeling Following Valve Replacement in Patients With Aortic Stenosis. *J Am Coll Cardiol* 71, 860–871 (2018).
116. Ibrahim, M. et al. Prolonged mechanical unloading affects cardiomyocyte excitation-contraction coupling, transverse-tubule structure, and the cell surface. *FASEB J* 24, 3321–3329 (2010).
117. Vahl, C. F. et al. Myocardial length-force relationship in end stage dilated cardiomyopathy and normal human myocardium: analysis of intact and skinned left ventricular trabeculae obtained during 11 heart transplantations. *Basic Res Cardiol* 92, 261–270 (1997).
118. Perbellini, F. & Thum, T. Living myocardial slices: a novel multicellular model for cardiac translational research. *Eur Heart J* 41, 2405–2408 (2020).
119. Fuchs, M. et al. Does the Heart Transplant Have a Future? *Eur J Cardiothorac Surg* 55, i38-i48 (2019).
120. Cazorla, O. et al. Transmural stretch-dependent regulation of contractile properties in rat heart and its alteration after myocardial infarction. *FASEB J*. 19, 88–90 (2005).
121. van der Velden, J. et al. Transmural heterogeneity of myofilament function and sarcomeric protein phosphorylation in remodeled myocardium of pigs with a recent myocardial infarction. *Front Physiol* 2, 83 (2011).
122. Haynes, P. et al. Transmural heterogeneity of cellular level power output is reduced in human heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 72, 1–8 (2014).
123. Banyasz, T. et al. Transformation of adult rat cardiac myocytes in primary culture. *Exp Physiol* 93, 370–382 (2008).
124. Abu-Khousa, M. et al. The Degree of t-System Remodeling Predicts Negative Force-Frequency Relationship and Prolonged Relaxation Time in Failing Human Myocardium. *Front Physiol* 11, 182 (2020).

125. Mulieri, L. A. et al. Altered myocardial force-frequency relation in human heart failure. *Circulation* 85, 1743–1750 (1992).
126. Schwinger, R. H. et al. The failing human heart is unable to use the Frank-Starling mechanism. *Circ Res* 74, 959–969 (1994).
127. O'Hara, T. & Rudy, Y. Quantitative comparison of cardiac ventricular myocyte electrophysiology and response to drugs in human and nonhuman species. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302, H1023–30 (2012).
128. Zhang, K.-P. et al. Translational toxicology and rescue strategies of the hERG channel dysfunction: biochemical and molecular mechanistic aspects. *Acta Pharmacol Sin* 35, 1473–1484 (2014).
129. Gintant, G. et al. Evolution of strategies to improve preclinical cardiac safety testing. *Nat Rev Drug Discov* 15, 457–471 (2016).
130. Kuryshv, Y. A. et al. Pentamidine-induced long QT syndrome and block of hERG trafficking. *J Pharmacol Exp Ther* 312, 316–323 (2005).
131. Huang, X.-P. et al. Identification of human Ether-à-go-go related gene modulators by three screening platforms in an academic drug-discovery setting. *Assay Drug Dev Technol* 8, 727–742 (2010).
132. Lidman, C. et al. Plasma pentamidine concentrations vary between individuals with *Pneumocystis carinii* pneumonia and the drug is actively secreted by the kidney. *J Antimicrob Chemother* 33, 803–810 (1994).
133. Fuchs, F. & Martyn, D. A. Length-dependent Ca(2+) activation in cardiac muscle: some remaining questions. *J Muscle Res Cell Motil* 26, 199–212 (2005).
134. Pacher, P. et al. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat Protoc* 3, 1422–1434 (2008).
135. Casha, A. R. et al. Physiological rules for the heart, lungs and other pressure-based organs. *J Thorac Dis* 9, 3793–3801 (2017).
136. Saito, S. et al. Mapping of left ventricle wall thickness in mice using 11.7-T magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging* 36, 128–134

- (2017).
137. Linke, W. A., et al. Passive and active tension in single cardiac myofibrils. *Biophys J* 67, 782–792 (1994).
 138. Berendson, J. & Simonsson, D. Electrochemical aspects of treatment of tissue with direct current. *Eur J Surg Suppl* 574, 111–115 (1994).
 139. Merrill, D. R. et al. Electrical stimulation of excitable tissue: design of efficacious and safe protocols. *J Neurosci Methods* 141, 171–198 (2005).
 140. Beardslee, M. A. et al. Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia. *Circ Res* 87, 656–662 (2000).
 141. Doevendans, P. A., et al. Cardiovascular phenotyping in mice. *Cardiovasc Res* 39, 34–49 (1998).
 142. Raman, S. et al. Effect of muscle dimensions on trabecular contractile performance under physiological conditions. *Pflugers Arch* 451, 625–630 (2006).
 143. Shao, D. & Tian, R. Glucose Transporters in Cardiac Metabolism and Hypertrophy. *Compr Physiol* 6, 331–351 (2015).
 144. Schäfer, C. et al. Role of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovasc Res* 51, 241–250 (2001).
 145. Woodcock, E. A. & Matkovich, S. J. Cardiomyocytes structure, function and associated pathologies. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 1746–1751 (2005).
 146. Ruiz-Meana, M. et al. Role of sarcoplasmic reticulum in mitochondrial permeability transition and cardiomyocyte death during reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H1281–9 (2009).
 147. Bers, D. M. et al. Intracellular Na⁺ regulation in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 57, 897–912 (2003).
 148. Siegmund, B. et al. Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture. *Circulation* 96, 4372–4379 (1997).

149. Lafleur, M. V., et al. The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against singlet oxygen. *Free Radic Res* 21, 9–17 (1994).
150. Takahashi, M. et al. Effect of thiol compounds on in vitro development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biol Reprod* 49, 228–232 (1993).
151. Roth, D. M. et al. Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282, H2134–40 (2002).
152. Perbellini, F. et al. Free-of-Acrylamide SDS-based Tissue Clearing (FASTClear) for three dimensional visualization of myocardial tissue. *Sci Rep* 7, 5188 (2017).
153. Kroll, K. et al. Electro-mechanical conditioning of human iPSC-derived cardiomyocytes for translational research. *Prog Biophys Mol Biol* 130, 212–222 (2017).
154. Li, F. et al. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *J Mol Cell Cardiol* 28, 1737–1746 (1996).
155. Oparil, S. et al. Myocardial cell hypertrophy or hyperplasia. *Hypertension* 6, III38–43 (1984).
156. Gibb, A. A. & Hill, B. G. Metabolic Coordination of Physiological and Pathological Cardiac Remodeling. *Circ Res* 123, 107–128 (2018).
157. Karbassi, E. et al. Cardiomyocyte maturation: advances in knowledge and implications for regenerative medicine. *Nat Rev Cardiol* 17, 341–359 (2020).
158. Guo, Y. & Pu, W. T. Cardiomyocyte Maturation: New Phase in Development. *Circ Res* 126, 1086–1106 (2020).
159. Besser, R. R. et al. Engineered Microenvironments for Maturation of Stem Cell Derived Cardiac Myocytes. *Theranostics* 8, 124–140 (2018).
160. Hirt, M. N. et al. Increased afterload induces pathological cardiac hypertrophy: a new in vitro model. *Basic Res Cardiol* 107, 307 (2012).
161. Abilez, O. J. et al. Passive Stretch Induces Structural and Functional

- Maturation of Engineered Heart Muscle as Predicted by Computational Modeling. *Stem Cells* 36, 265–277 (2018).
162. Mihic, A. et al. The effect of cyclic stretch on maturation and 3D tissue formation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Biomaterials* 35, 2798–2808 (2014).
163. Ruan, J.-L. et al. Mechanical Stress Promotes Maturation of Human Myocardium From Pluripotent Stem Cell-Derived Progenitors. *Stem Cells* 33, 2148–2157 (2015).
164. Parikh, S. S. et al. Thyroid and Glucocorticoid Hormones Promote Functional T-Tubule Development in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Circ Res* 121, 1323–1330 (2017).
165. Huang, C. Y. et al. Enhancement of human iPSC-derived cardiomyocyte maturation by chemical conditioning in a 3D environment. *J Mol Cell Cardiol* 138, 1–11 (2020).
166. Lundy, S. D. et al. Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 22, 1991–2002 (2013).
167. Ghista, D. N. *Cardiology Science and Technology*. CRC Press (2016).
168. Momtahan, N. et al. Automation of Pressure Control Improves Whole Porcine Heart Decellularization. *Tissue Eng Part C Methods* 21, 1148–1161 (2015).
169. McCain, M. L. et al. Matrix elasticity regulates the optimal cardiac myocyte shape for contractility. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 306, H1525–39 (2014).
170. McCain, M. L. et al. Cooperative coupling of cell-matrix and cell-cell adhesions in cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 9881–9886 (2012).
171. Magga, J. et al. Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms in cardiac overload-induced increase of B-type natriuretic peptide gene expression. *Circ Res* 81, 694–702 (1997).
172. Guterl, K. A. et al. Isometric contraction induces rapid myocyte

- remodeling in cultured rat right ventricular papillary muscles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293, H3707–12 (2007).
173. Maeder, M. T., et al. Hemodynamic determinants of myocardial B-type natriuretic peptide release: relative contributions of systolic and diastolic wall stress. *Hypertension* 56, 682–689 (2010).
174. Poch, C. M. et al. Migratory and anti-fibrotic programmes define the regenerative potential of human cardiac progenitors. *Nat Cell Biol* 24, 659–671 (2022).
175. Tsuruyama, S. et al. Pulsatile tubular cardiac tissues fabricated by wrapping human iPS cells-derived cardiomyocyte sheets. *Regen Ther* 11, 297–305 (2019).
176. Lemme, M. et al. Atrial-like Engineered Heart Tissue: An In Vitro Model of the Human Atrium. *Stem Cell Reports* 11, 1378–1390 (2018).
177. Li, R. A. et al. Bioengineering an electro-mechanically functional miniature ventricular heart chamber from human pluripotent stem cells. *Biomaterials* 163, 116–127 (2018).
178. Hofbauer, P. et al. Cardioids reveal self-organizing principles of human cardiogenesis. *Cell* 184, 3299–3317.e22 (2021).
179. Lewis-Israeli, Y. R. et al. Self-assembling human heart organoids for the modeling of cardiac development and congenital heart disease. *Nat Commun* 12, 5142 (2021).

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 ⁴ : Möglichkeiten zur Reduktion bzw. Ersatz von Tierversuchen.....	6
Abbildung 2: Kulturkammern für humane kardiale Gewebeschnitte und Schüttelplatine mit Motor und elektronischer Steuerungseinheit.....	33
Abbildung 3 (modifiziert nach ³³): Kontraktionskraft frischer und über 4-16 Wochen kultivierter Gewebeschnitte mit und ohne Isoprenalinstimulation (n=6-10, zweifaktorielle ANOVA, *p<0,05).....	34
Abbildung 4 (modifiziert nach ³³): Effekte der Dehnung auf die Kontraktionskraft (n=6-10, zweifaktorielle ANOVA, *p<0,05).....	35
Abbildung 5 (modifiziert nach ³³): Effekte der Kühlungsdauer auf die Kontraktionskraft und auf tonische Gewebekontraktionen (n=2-15).....	36
Abbildung 6 (modifiziert nach ³³): Beispiele für Kontraktionskraftverlauf von einem nicht behandelten und einem mit 1 µM Denopamin behandelten Gewebeschnitt.....	38
Abbildung 7 (modifiziert nach ³³): Myokardstruktur nach Langzeitkultivierung. Vergleich von frischen (Reihe 1) mit kultivierten (Reihe 2) Gewebeschnitten. Färbung von kardiomyozytären Strukturproteinen (α-Actinin, Connexin 43) und Markern von Bindegewebe (Vimentin, α-Actin 2 - SMA).....	39
Abbildung 8 (modifiziert nach ³³): Sarkomerlängen von 3 frischen und dazugehörigen kultivierten Gewebeschnitten. 3-6 Ausschnitte pro Gewebeschnitt wurden ausgewertet.....	40

Abbildung 9 (modifiziert nach ³³): Stimulationsprotokoll mit gepaarten Stimulationsimpulsen mit abnehmendem Zeitintervall. Der Verlust der zweiten Kontraktion ist mit der Refraktärzeit gleichzusetzen.....	42
Abbildung 10 (modifiziert nach ³³): Effekte von Pentamidin auf die Refraktärzeit (n=5, zweifaktorielle ANOVA, *p<0.05 vs. Ausgangsrefraktärzeit).....	43
Abbildung 11 (modifiziert nach ³³): Aktionspotentialmessung zeigt eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer (APD90) nach der Gabe von Pentamidin 1 µM für 1 Woche).....	43
Abbildung 12 (modifiziert nach ¹⁰²): Drei verschiedene Kulturbedingungen für die kardialen Gewebeschnitte von Mäuseherzen.....	44
Abbildung 13 (modifiziert nach ¹⁰²): Im Organbad gemessene maximale Kontraktionskraft frischer Gewebe, von Geweben auf Filtermembranen und von Geweben mit isometrischer oder elastischer (diastolischer Vorlast von 0.3 mN oder 1.2 mN) Aufhängung nach 48 h Kulturdauer (n = 6-28, t-Test, *p <0.05, n.s. nicht signifikant).....	45
Abbildung 14 (modifiziert nach ¹⁰²): Positiver inotroper Effekt von Digitoxin in den behandelten kardialen Gewebeschnitten von Mäuseherzen (n = 6, einfaktorielle ANOVA, ***p <0.001, **p <0.01).....	46
Abbildung 15 (modifiziert nach ¹⁰²): Verhältnis der im Organbad gemessenen maximalen Kontraktionskraft vor und nach 48 h Kulturdauer bei Gewebeschnitten mit unterschiedlicher Stimulationsfrequenz und	

unterschiedlicher diastolischer Vorlast (n = 6-28, t-Test, *p <0.05, n.s. nicht signifikant).....	47
Abbildung 16 (modifiziert nach ¹⁰²): Gewebekontraktionen nach 48 h Kulturdauer bei Gewebeschnitten mit unterschiedlicher Stimulationsfrequenz und unterschiedlicher diastolischer Vorlast (n = 6-28, t-Test, *p <0.05, n.s. nicht signifikant).....	48
Abbildung 17 (modifiziert nach ¹⁰²): Verteilung von Connexin 43 in frischen sowie für 48 h kultivierten Gewebeschnitten. Die Gewebeschnitte sind mit Connexin 43 Antikörper (hellgrün) und mit Topro 3 für die Zellkerne (blau) gefärbt.....	49
Abbildung 18 (modifiziert nach ¹⁰²): Verhältnis der Kontraktionskraft sowie Stärke der tonischen Gewebekontraktur in langsam (l) und schnell (s) geschüttelten stimulierten und nicht stimulierten Gewebeschnitten (n=3-10, t-Test, *p<0,05, n.s. nicht signifikant).....	50
Abbildung 19 (modifiziert nach ¹⁰²): Kontraktionskraft und Kulturdauer der Gewebeschnitte von der Maus unter elektrischer Stimulation mit (n=23 Gewebeschnitte aus 5 unabhängigen Präparationen) und ohne Pufferlösung (n=9 Gewebeschnitte aus 2 unabhängigen Präparationen).....	52
Abbildung 20 (modifiziert nach ¹⁰⁵): Beispiele der Durchflusszytometrie von nicht differenzierten und differenzierten hiPSC vor der Bildung von künstlichem Myokard. Die Zellsuspension wurde für kardiales Troponin T und α-Actinin gefärbt.....	53

Abbildung 21 (modifiziert nach ¹⁰⁵): Schematische Darstellung eines EHT auf der Filtermembran sowie Foto eines primären diskoiden EHTs (Maßstab: 0.5 mm).....	54
Abbildung 22 (modifiziert nach ¹⁰⁵): Schematische Darstellung der progressiven Dehnung.....	55
Abbildung 23 (modifiziert nach ¹⁰⁵): Beispiel einer Echtzeit-Aufnahme von einer Dehnung (jede Zacke entspricht einer Kontraktion) und Kontraktionskraftverlauf aller Dehnungsbedingungen (n = 10, zweifaktorielle ANOVA, Tukey's multiple comparison test vs. statischer Dehnung, ****p < 0,0001).....	56
Abbildung 24 (modifiziert nach ¹⁰⁵): Reizschwellenverlauf der EHTs während der Kulturdauer (n=6 aus den Gruppen S0-S3).....	57
Abbildung 25 (modifiziert nach ¹⁰⁵): Immunfluoreszenz Aufnahmen von EHTs S0 und S3 mit Färbung einer Untereinheit der Zytochrom C Oxidase in Mitochondrien (MTCO2, Grün, Maßstab 25 µm).....	58
Abbildung 26 (modifiziert nach ¹⁰⁵): Maximale Kontraktionskraft, Wandspannung, elastischer Modulus nach 21 Tagen Kulturdauer im Organbad bestimmt (n=7, zweifaktorielle ANOVA, Tukey's multiple comparison test vs. statischer Dehnung, *p<0,05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001).....	59
Abbildung 27 (modifiziert nach ¹⁰⁵): Kraft-Frequenz-Abhängigkeit der EHTs nach 21 Tagen Kulturdauer (n=7).....	60

Abbildung 28 (modifiziert nach ¹⁰⁵): Ca²⁺-Amplituden und Parameter des Ca²⁺-Zyklus in statisch und progressiv gedehnten EHTs (S0, n=8; S1, n=6; S2, n=7; S3, n=8; einfaktorielle ANOVA, Dunnett's multiple comparison test, *p<0,05, **p<0,01).....61

Abbildung 29 (modifiziert nach ¹⁰⁵): Effekte der Stimulation mit Isoprenalin (1 µmol/L, n=5, einfaktorielle ANOVA, Tukey's multiple comparison test, *p<0.05, **p<0.01).....61

Abbildung 30 (modifiziert nach ¹⁰⁵): Heatmap einer Auswahl von 218 Genen aus der RNA Sequenzierung, welche spezifisch sind für adulte Kardiomyozytein (Rot: statisch gedehnte EHTs S0, Grün: am stärksten gedehnte EHTs S3).....63

Abbildung 31 (modifiziert nach ¹⁰⁵): Entspannte Länge von EHTs nach drei Wochen in der Kultur (n=8, einfaktorielle ANOVA, Tukey's multiple comparison test ****p<0,0001, *p<0,05) und entsprechende Kardiomyozytenlänge (Mittelwerte n=4, Mann-Whitney Test *p<0,05).....64

Abbildung 32 (modifiziert nach ¹⁰⁵): Reihe 1: Immunofluoreszenzfärbungen von längsgeschnittenen EHTs nach drei Wochen statischer und progressiver Dehnung (α-Actinin (Rot), Connexin 43 (Grün) and DNA (Blau), Maßstab: 10 µm) und Reihe 2: Mikroskopische Aufnahmen mit der Frequenzverdoppelungstechnik zur Darstellung der Ausrichtung und Dichte von Myofibrillen und Sarkomeren (Maßstab: 10 µm).....65

8. Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei **Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Zwißler**, dem Direktor der Klinik für Anaesthesiologie am LMU Klinikum, herzlich bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, mein Habilitationsvorhaben in seiner Klinik durchzuführen. Ebenso möchte ich mich für das Vertrauen, das mir im Rahmen meiner klinischen Tätigkeiten entgegengebracht wurde, bedanken.

Ein besonderer Dank gilt **Herrn Prof. Dr. med. Andreas Dendorfer**, meinem Arbeitsgruppenleiter am Walter-Brendel-Zentrum München, für seine unermüdliche Unterstützung bei meiner wissenschaftlichen Tätigkeit. Seine Begeisterung und seine wertvollen Anregungen, Hilfestellungen und Ideen haben mich jederzeit begleitet.

Weiterhin möchte ich mich bei **Frau Prof. Dr. Dr. med. Simone Kreth**, der Leiterin des Forschungslabors II - ‚Molekulare Medizin‘ in der Klinik für Anaesthesiologie, herzlich bedanken. Ihre maßgebliche Unterstützung bei meiner Bewerbung für das Metiphs-Stipendium am LMU Klinikum legte den Grundstein für mein Habilitationsvorhaben. Auch heute noch schätze ich ihre Anregungen und Ideen zu verschiedenen Projekten sehr.

Ein herzlicher Dank geht auch an **Frau Prof. Dr. med. Vera von Dossow**, **Herrn Prof. Dr. med. Ludwig Christian Hinske**, **Herrn Dr. Dr. med. Max Hübner**, **Herrn Privatdozent Dr. med. Jan Abicht** und **Herrn Privatdozent Dr. Dr. med. Patrick Scheiermann**. Sie alle haben mich bei verschiedenen wissenschaftlichen Projekten tatkräftig unterstützt. Ich schätze die fortwährende gute Zusammenarbeit sehr.

Der größte Dank gilt meiner **Ehefrau Dr. Stephanie Tomasi** für ihre Liebe, ihren Rückhalt und ihre geduldige Unterstützung.