

Aus dem
Institut für Chirurgische Forschung im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Leiter: Prof. Dr. Daphne Merkus

**Untersuchung von Kontraktionskraftveränderungen humaner
Myokardslices in biomimetischer Langzeitkultur auf
Katecholaminabhängigkeit**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Elisabeth Maria Anna Reiser, geb. Vogel

aus
Gräfelfing

Jahr
2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Andreas Dendorfer
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Alexander Bartelt
PD Dr. Sebastian Clauß

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2024

Abstract

Research on cardiovascular diseases employs various myocardial models, implicating individual advantages and disadvantages. In the present work, a long-term culture for 300 μm thick myocardial slices from failing left ventricular human myocardium in a biomimetic culture model optimised for this purpose will be presented. During the culture period of 21 days, the contraction force of the slices was measured after electrical stimulation. A characteristic course of the contraction force was observed, with a decrease of approx. 95 % within the first 12 h in culture, followed by a subsequent increase during the next weeks of culture. In order to investigate the possible causes of these effects, the force measurements were complemented by the data acquisition of electromechanically relevant parameters of the myocardium (refractory period, electrical stimulation threshold, force-frequency-relationship, maximum frequency) and the determination of protein quantities and phosphorylation of various contractile and regulatory proteins using Western blots. The central question was whether the observed effects were triggered by the absence of catecholamine stimulation in the culture. To test this question, either the β_1 -agonist denopamine in two different doses or the β -blocker metoprolol were added to some specimens.

As a non-failing comparison group, myocardium from baboons that received a xenotransplantation with pig hearts was also examined in the same way.

The results of the investigations showed that a catecholamine deficiency with consecutive negative inotropy was present at the beginning of the culture, but was not solely responsible for the loss of strength of the human failing myocardium, as this could be attenuated but not prevented by adrenergic stimulation using denopamine. Based on a degradation of SERCA2a and phospholamban, a so-called “myocardial stunning” as an ischaemia-reperfusion reaction without functional damage to the myocardium appeared to play a greater causal role for the loss of strength. In the further course of culture, the myocardial slices recovered from this state with re-expression of the degraded proteins and the preparations treated with denopamine showed a positive inotropic effect and a shortening of the refractory period, as was to be expected.

For the non-failing baboon myocardial preparations, the effects in the course of the contraction force measurement were much faster and generally attenuated, before a slow decrease of the force occurred again. This demonstrated that the effects observed for human myocardium were not purely adaptive reactions to the culture. It was also shown that “myocardial stunning” was not present in the baboon preparations, so that a catecholamine deficiency seemed likely as the primary cause of the strength curve. The main reason for the differences in the baboon myocardium may have been the non-failing initial state of the baboon tissue.

Further interesting effects observed were a clear decrease in the phosphorylation of phospholamban at the amino acid Ser-16 for all preparations as well as the force-frequency-relationship of the myocardial slices becoming more and more positive, an effect accompanied by an increased phosphorylation at Thr-17 of phospholamban.

Research into the causes of these observations, as well as further investigations of the above-mentioned effects, e.g. by means of mRNA transcription data, open up opportunities for further studies, which would also be conceivable on a larger scale with the culture technique presented.

Abstract

In der Forschung an kardiovaskulären Erkrankungen wird mit verschiedenen Myokardmodellen gearbeitet, die vielfältige Vor- und Nachteile bieten. In der vorliegenden Arbeit soll eine Langzeitkultur für 300 µm dicke Myokardslices aus insuffizientem linksventrikulärem humanem Myokard in einem dafür optimierten biomimetischen Kulturmodell vorgestellt werden. Während der Kulturdauer von 21 Tagen erfolgten Messungen der Kontraktionskraft der Slices nach elektrischer Stimulation. Hierbei fiel ein charakteristischer Verlauf der Kontraktionskraft mit einem Abfall um ca. 95 % in den ersten 12 h in Kultur mit anschließend folgendem Wiederanstieg in den nächsten Wochen der Kultur auf. Um die möglichen Ursachen dieser Effekte zu untersuchen, wurden die Kraftmessungen um die Erhebung elektromechanisch relevanter Kenngrößen des Myokards (Refraktärzeit, elektrische Reizschwelle, Kraft-Frequenz-Abhängigkeit, Maximalfrequenz) und die Bestimmung von Proteinmengen und Phosphorylierungen verschiedener kontraktiler und regulatorischer Proteine mittels Western-Blots ergänzt. Dabei lag der Fokus auf der Fragestellung, ob die beobachteten Effekte durch das Fehlen einer Katecholaminstimulation in der Kultur ausgelöst wurden. Zur Überprüfung dieser Fragestellung wurden einigen Präparaten entweder der β_1 -Agonist Denopamin in zwei verschiedenen Dosierungen oder der β -Blocker Metoprolol zugesetzt.

Als nicht insuffiziente Vergleichsgruppe wurde zudem Myokard von Pavianen, die eine Xenotransplantation mit Schweineherzen erhielten, in gleicher Weise untersucht.

Die Resultate der Untersuchungen konnten zeigen, dass zu Beginn der Myokardkultur ein Katecholaminmangel mit konsekutiver negativer Inotropie vorlag, der jedoch für die humanen insuffizienten Myokardproben nicht alleinige Ursache des Kraftabfalls war, da dieser durch adrenerge Stimulation mittels Denopamin abzuschwächen, aber nicht zu verhindern war. Anhand eines Abbaus von SERCA2a und Phospholamban konnte als Kausalität des Kraftabfalls darüber hinaus ein sog. „myocardial stunning“ als Ischämie-Reperfusionreaktion ohne funktionelle Schädigung des Myokards vermutet werden. Im weiteren Kulturverlauf zeigte sich einerseits eine Erholung der Myokardslices von diesem Zustand mit Re-Expression der abgebauten Proteine, andererseits in den mit Denopamin behandelten Präparaten auch, wie zu erwarten war, eine positive Inotropie und Verkürzung der Refraktärzeit.

Für die nicht insuffizienten Pavian-Myokard-Präparate zeigten sich die Effekte im Verlauf der Kontraktionskraft-Messung mit einer wesentlich rascheren Kinetik und insgesamt abgemildert, bevor es im weiteren Verlauf wieder zu einem langsamen Absinken der Kraft kam. Hierdurch ließ sich nachweisen, dass es sich bei den für humanes Myokard beobachteten Effekten eher nicht um reine Anpassungsreaktionen an die Kultur gehandelt hatte. Zudem ließ sich zeigen, dass ein „myocardial stunning“ in den Pavianpräparaten nicht vorlag, sodass ein Katecholaminmangel als primäre Ursache des Kraftverlaufs wahrscheinlich schien. Die Ursache für die Unterschiede im Pavianmyokard dürfte primär im nicht insuffizienten Ausgangszustand des Gewebes gelegen haben.

Im Rahmen der Untersuchungen fielen als weitere interessante Effekte auch eine deutliche Abnahme der Phospholamban-Phosphorylierung an der Aminosäure Ser-16 für alle Präparate sowie eine zunehmende Positivierung der Kraft-Frequenz-Abhängigkeit der Myokardpräparate auf, die mit einer vermehrten Phosphorylierung an Thr-17 des Phospholambans einherging.

Die Erforschung der Ursachen dieser Beobachtungen bietet ebenso wie die weiterführenden Untersuchungen obengenannter Effekte z.B. mittels mRNA-Transkriptionsdaten Anlass zu weiteren Studien, die mit der vorgestellten Kulturtechnik auch in größeren Dimensionen denkbar wären.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|--|----|
| 1. | Einleitung und Hintergrund..... | 1 |
| 1.1 | Hinführung..... | 1 |
| 1.2 | Myokardmodelle..... | 2 |
| 1.2.1 | <i>In-vivo</i> -Tiermodelle..... | 2 |
| 1.2.2 | Multizelluläre Gewebe-Modelle aus Myokard..... | 4 |
| 1.2.3 | Modelle unter Verwendung von Kardiomyozyten..... | 5 |
| 1.2.4 | Modelle mit aus Stammzellen gewonnenen Kardiomyozyten..... | 6 |
| 1.2.5 | Kardiale Slice-Modelle..... | 7 |
| 1.3 | Physiologische und pathophysiologische Hintergründe..... | 8 |
| 2. | Zielsetzung..... | 14 |
| 2.1 | Fragestellung..... | 15 |
| 3. | Technik und Methoden..... | 16 |
| 3.1 | Myokardkultur..... | 16 |
| 3.1.1 | Herkunft der Myokardproben..... | 16 |
| 3.1.2 | Transport und Lagerung des Gewebes..... | 17 |
| 3.1.3 | Präparation der Myokard-Slices..... | 17 |
| 3.1.4 | Kulturtechnik..... | 20 |
| 3.1.5 | Möglichkeiten zur Variation der Kulturbedingungen..... | 24 |
| 3.1.6 | Verwendete Kulturbedingungen..... | 25 |
| 3.1.7 | Datenerhebung..... | 25 |
| 3.1.8 | Analyse der Daten..... | 29 |
| 3.2 | Analyse der Proben nach Kulturende..... | 33 |
| 3.2.1 | Western-Blot..... | 33 |
| 3.3 | Statistische Methoden..... | 34 |
| 4. | Ergebnisse der Untersuchung von insuffizientem humanem Myokard..... | 36 |
| 4.1 | Probenstatistik..... | 36 |
| 4.2 | Beobachtete Veränderungen der Kontraktionskraft..... | 36 |
| 4.2.1 | Verlauf der Kontraktionskraft ohne pharmakologische Beeinflussung..... | 36 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.2.2 | Einflüsse der eingesetzten Pharmaka auf die Kontraktionskraft | 37 |
| 4.3 | Entwicklung der funktionellen Messgrößen..... | 40 |
| 4.3.1 | Refraktärzeit | 40 |
| 4.3.2 | Reizschwelle | 41 |
| 4.3.3 | Maximalfrequenz und Kraft-Frequenz-Abhängigkeit..... | 43 |
| 4.4 | Ergebnisse der Western-Blot-Analyse | 45 |
| 4.4.1 | Proteinmenge der SERCA2a | 45 |
| 4.4.2 | Proteinmenge des Phospholambans (PLN) | 46 |
| 4.4.3 | Phosphorylierung an der Aminosäure Ser-16 des PLNs | 48 |
| 4.4.4 | Phosphorylierung an der Aminosäure Thr-17 des PLNs..... | 49 |
| 4.4.5 | Phosphorylierung an der Aminosäure Ser-10 des PLNs | 49 |
| 5. | Ergebnisse der Untersuchung des nicht-insuffizienten Pavianmyokards..... | 50 |
| 5.1 | Statistik der Pavianproben..... | 50 |
| 5.2 | Veränderungen der Kontraktionskraft im Pavianmyokard | 50 |
| 5.3 | Entwicklung der funktionellen Messgrößen im Pavianmyokard..... | 52 |
| 5.3.1 | Refraktärzeit | 52 |
| 5.3.2 | Reizschwelle | 53 |
| 5.3.3 | Kraft-Frequenz-Abhängigkeit | 54 |
| 5.4 | Western-Blot-Analysen | 56 |
| 5.4.1 | SERCA2a-Proteinmenge..... | 57 |
| 5.4.2 | PLN-Proteinmenge | 57 |
| 5.4.3 | Ser-16-Phosphorylierung des PLNs | 58 |
| 5.4.4 | Thr-17-Phosphorylierung des PLNs | 59 |
| 5.4.5 | Ser-10-Phosphorylierung des PLNs | 60 |
| 6. | Diskussion..... | 62 |
| 6.1 | Eignung von Myokard und Kulturbedingungen..... | 62 |
| 6.1.1 | Eignung des Myokards | 62 |
| 6.1.2 | Zellverband | 63 |
| 6.1.3 | Sauerstoffversorgung | 63 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 6.1.4 | pH-Wert..... | 64 |
| 6.1.5 | Medikamentenzusätze..... | 64 |
| 6.1.6 | Aufhängung und Kontraktion..... | 64 |
| 6.1.7 | Kulturmedium und Energieversorgung..... | 65 |
| 6.1.8 | Elektrische Stimulation..... | 66 |
| 6.2 | Bedeutung der Ergebnisse der insuffizienten humanen Myokardproben..... | 67 |
| 6.2.1 | Interpretation des Verlaufs der Kontraktionskraft..... | 67 |
| 6.2.2 | Interpretation der Veränderungen funktioneller Parameter | 70 |
| 6.2.3 | Interpretation der Proteindaten zur Regulation des intrazellulären Ca ²⁺ -Transports | 74 |
| 6.2.4 | Fazit: Interpretation der Ergebnisse für insuffizientes humanes Myokard | 79 |
| 6.3 | Bedeutung der Ergebnisse der Primatenmyokardproben..... | 81 |
| 6.3.1 | Vergleichende Interpretation der Veränderungen der Kontraktionskraft | 81 |
| 6.3.2 | Vergleichende Interpretation der Ergebnisse funktioneller Parameter..... | 82 |
| 6.3.3 | Vergleichende Interpretation der Proteindaten zum intrazellulären Ca ²⁺ -Transport..... | 84 |
| 6.3.4 | Fazit: Interpretation der Ergebnisse für nicht-insuffizientes Pavianmyokard | 87 |
| 7. | Zusammenfassung und Ausblick..... | 89 |
| 8. | Literaturverzeichnis | 93 |
| 9. | Danksagung | 104 |
| 10. | Lebenslauf..... | 105 |
| 11. | Publikationsliste | 106 |
| 12. | Eidesstattliche Erklärung..... | 107 |
| 13. | Übereinstimmungserklärung | 108 |

1. Einleitung und Hintergrund

1.1 Hinführung

In der Antike sah man das Herz als Sitz der Seele und als Zentrum jeder Gefühls- und Sinneswahrnehmung an. Schon Aristoteles (384 v. Chr. - 322 v. Chr.) schrieb in seinem Werk „Περὶ δὲ νεότητος καὶ γήρως καὶ περὶ ζωῆς καὶ θανάτου“ (Von Jugend und Alter, von Leben und Tod) Folgendes:

„ὥστ' ἀνάγκη καὶ τῆς αἰσθητικῆς καὶ τῆς θρεπτικῆς ψυχῆς ἐν τῇ καρδίᾳ τὴν ἀρχὴν εἶναι τοῖς ἐνάιμοις· τὰ γὰρ τῶν ἄλλων μορίων ἔργα περὶ τὴν τροφήν τοῦ ταύτης ἔργου χάριν ἐστί· δεῖ μὲν γὰρ τὸ κύριον πρὸς τὸ οὐ ἔνεκα διατελεῖν, ἀλλ' οὐκ ἐν τοῖς τούτου ἔνεκα, οἷον ἰατρὸς πρὸς τὴν ὑγίειαν. ἀλλὰ μὴν τό γε κύριον τῶν αἰσθήσεων ἐν ταύτῃ τοῖς ἐνάιμοις πᾶσιν· ἐν τούτῳ γὰρ ἀναγκαῖον εἶναι τὸ πάντων τῶν αἰσθητηρίων κοινὸν αἰσθητήριον.“

„So muß denn sowohl das Prinzip der sensitiven wie das der vegetativen Seele bei den Bluttieren im Herzen sein. Denn die auf die Ernährung bezüglichen Verrichtungen der anderen Teile sind um seiner Verrichtung willen da. Denn das Herrschende und der maßgebende Faktor muß das Weswegen, den Endzweck, verfolgen, nicht was des Zweckes wegen ist, so wie der Arzt mit seinem Verfahren die Gesundheit als Zweck verfolgt. Nun haben ja aber alle Bluttiere das herrschende Prinzip der Sinne in ihm, dem Herzen, Denn dort muß das allen Sensorien gemeinsame Sensorium sein.“

Aristoteles, 335 v. Chr.; zitiert aus [1], v. 469a

[2], v. 469a

Das Herz war also schon vor mehr als 2300 Jahren als zentrales und unverzichtbares Organ im Körper erkannt worden. In den vergangenen Jahrhunderten entstanden zwar viele neue Erkenntnisse über dessen tatsächliche Funktion, auch heute kann jedoch natürlich kein Zweifel an der Relevanz dieses Organs für den Körper bestehen.

Erkrankungen des Herzens oder, allgemeiner gefasst, des Herz-Kreislauf-Systems sind daher auch in unserer Zeit Faktoren, die schnell eine massive Einschränkung der Lebensqualität der Betroffenen zur Folge haben können. Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind jedoch keine Seltenheit, sie stellen im Gegenteil sogar global weiterhin die häufigste Todesursache [3] dar, auch wenn in den letzten Jahren ein Trend hin zu einer fortschreitenden Diversifizierung der häufigsten Todesursachen in Industrienationen zu erkennen war [4,5].

Dies verdeutlicht die Notwendigkeit der Fortführung intensiver Forschung zu Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wie sie sich in den letzten Jahrzehnten etabliert hat.

Wichtige Zielsetzungen dieser Forschung sind einerseits die physiologische und pathophysiologische Grundlagenforschung zur Gewinnung neuer Erkenntnisse über die im gesunden und erkrankten Herzen herrschenden Zustände, andererseits aber auch die Entwicklung neuer medikamentöser und nicht-medikamentöser Therapieoptionen für kardiale Erkrankungen sowie auch die Toxizitätstestung verschiedener Medikamente gegen andere Erkrankungen hinsichtlich kardialer Toxizität.

1.2 Myokardmodelle

Eine maßgebliche Fragestellung ist, mithilfe welchen Modells man Vorgänge am humanen Herzen am zielführendsten erforschen kann, da *In-vivo*-Studien am Menschen bei einem lebenswichtigen Organ natürlich aus ethischen Gründen auf die Erprobung von zuvor gut auf anderen Wegen überprüften Verfahren beschränkt sein müssen.

Theoretische computergestützte Simulationen von kardialen Prozessen sind für verschiedene Fragestellungen bereits entwickelt worden, beschränken sich bisher jedoch meist auf einzelne Bereiche wie z.B. die Elektrophysiologie [6], auch wenn es bereits Ansätze zur Integration verschiedener Modelle im Sinne einer patientenspezifischen Analyse der diagnostischen Parameter zur Generierung einer individuellen Therapieempfehlung gibt [7].

Eine wesentlich bedeutendere Rolle spielen jedoch vielfältige *In-vivo*- und *In-vitro*-Modelle für die kardielle Forschung, über die im Folgenden ein Überblick inklusive einiger Vor- und Nachteile der Methoden gegeben werden soll.

Zur Einordnung der verschiedenen Modelle soll dabei insbesondere auf folgende Punkte eingegangen werden (zum Folgenden vgl. [8]): Ein wichtiges Kriterium bei Myokardmodellen ist die pathophysiologische Relevanz der daraus zu gewinnenden Erkenntnisse im Hinblick auf die Übertragbarkeit von *In-vitro*-Ergebnissen auf den *In-vivo*-Zustand. Besonders bei Experimenten mit Herzen oder Kardiomyozyten anderer Spezies ist ein weiteres Kriterium die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf menschliches Gewebe. Zudem soll die Möglichkeit zu Hoch-Durchsatz-Experimenten betrachtet werden, die den Vorteil der Beobachtung vieler verschiedener Bedingungen über einen längeren Zeitraum mit sich bringen. Ebenfalls wichtig zur Einordnung von Myokardmodellen sind die Möglichkeiten der Beeinflussung verschiedener Parameter und der Analysetechniken. Dabei sollten bei der Veränderung eines Einflussfaktors idealerweise möglichst wenig Nebeneffekte auftreten, um die Wirkung der Veränderung leicht erkennen und Kausalitäten feststellen zu können.

1.2.1 *In-vivo*-Tiermodelle

Ein klassischer und lang bewährter Ansatz in der Herzforschung ist die Verwendung verschiedener Tiermodelle. Solche Modelle bieten den Vorteil, dass das hochkomplexe Zusammenspiel verschiedener Einflussfaktoren auf das Herz *in vivo* in einem Organismus nachvollzogen und untersucht werden kann. Gerade im Hinblick auf die Untersuchung der Pathogenese kardialer Erkrankungen können hier viele Erkenntnisse gewonnen werden. So handelt es sich beispielsweise bei der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie oder Atrophie um Prozesse, bei denen multiple Faktoren wie neurohumorale Einflüsse, der Volumenstatus des Organismus oder auch genetische Prädisposition eine Rolle spielen, wodurch eine enorme kardiale Plastizität in Wachstumsprozessen entsteht [9]. Derartig komplexe Prozesse mit vielen Einflussfaktoren sind natürlich *in vitro* schwer zu simulieren und können daher primär in Tiermodellen beobachtet werden. Neben der Integration der Komplexität eines ganzen Organismus bieten Tiermodelle des Weiteren Möglichkeiten wie Langzeitstudien über die komplette Lebensspanne eines Tieres, über mehrere Generationen hinweg oder auch die Anwendung verschiedenster gentechnischer Verfahren zur Hervorbringung gewisser Geno- und Phänotypen (vgl. auch [10]). Auch Auswirkungen kardialer Erkrankungen auf andere Organsysteme wie die Nieren lassen sich im Tiermodell erforschen,

hier gibt es zum Beispiel Modelle an Hunden oder Ratten [11]. Zudem lassen sich bei Tierversuchen Operationen und Verfahren erproben, die aus ethischen Gründen beim Menschen nicht zu Forschungszwecken durchgeführt werden könnten, wie heterotope Herztransplantationen zur Verminderung der kardialen Beanspruchung [12–14]. Aufgrund dieser Vorteile haben sich Modelle verschiedenster kardialer Erkrankungen für viele Tierarten etabliert: es gibt beispielsweise für die Herzinsuffizienz Modelle für einzelne pathogenetisch relevante Ursachen wie die Aortenstenose (Hund, Katze, Schwein, Schaf, Maus) oder kardiale Ischämie (Nagetiere, Hund, Schaf, Schwein) [15]. Bei all diesen Modellen ist nach Abschluss der klinischen Untersuchungen der Versuchstiere auch eine gezielte Tötung und die Durchführung weitergehender Versuche auf z.B. zellulärer Ebene möglich [12–14,16].

Trotz all dieser Faktoren ergeben sich jedoch auch viele Schwierigkeiten und offene Fragen bei der Verwendung von Tiermodellen für kardiale Erkrankungen: So ist aus ethischer Sicht zu hinterfragen, welche Tiere in welchem Ausmaß für Tierversuche verwendet werden sollen und dürfen, gerade wenn die Versuchsdurchführung die gezielte Verursachung von potentiell beeinträchtigenden oder schmerzhaften Erkrankungen oder die gezielte Tötung der Versuchstiere beinhaltet. Die Vielfältigkeit der Einflussfaktoren in einem vollständigen Organismus erschwert zudem die Interpretation der Ergebnisse aus Tiermodellen [10], sodass einzelne Effekte von Modulationen übersehen oder unterschätzt werden können. Ein weiteres Problem bei diesen Modellen ergibt sich aus dem Zeit- und Kostenaufwand [10,17], der für ihre Entwicklung und Validierung nötig ist – bei der Verwendung von größeren Tieren wie Schafen oder Schweinen ergeben sich hier viele Kosten im Rahmen eines Projekts und aufgrund der relativ langen Tragezeit und Generationsdauer auch lange Planungszeiträume. Ein entscheidender Nachteil von Tierversuchen liegt jedoch in der oft mangelnden Übertragbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen und seine Erkrankungen – hierbei handelt es sich auch um eine häufige Ursache für das Scheitern potentiell neuer therapeutischer Substanzen bei der Medikamentenentwicklung, da sich die im präklinischen Tierversuch vermuteten Wirkmechanismen in Studien an humanen Probanden nicht reproduzieren lassen [17]. Hierfür gibt es verschiedenste Ursachen: so sind viele kardiale Erkrankungen das Ergebnis einer multifaktoriellen und über viele Jahre fortschreitenden Pathogenese, die im Tiermodell nicht immer adäquat abgebildet werden kann [17]. Auch entsprechen die Symptome und Krankheitsverläufe, die sich z.B. bei transgenen Tieren entwickeln, nicht immer den human bekannten Krankheitsbildern [17]. Zudem ist bekannt, dass verschiedene Organismen auf verschiedene Stimuli im Sinne einer Veränderung äußerer Bedingungen oder der Verabreichung toxischer Substanzen unterschiedlich reagieren [18–20], was eine Interpretation und Translation der aus Tierversuchen gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen weiter erschwert. Daneben bewegen sich auch physiologische Kenngrößen, wie beispielsweise die Herzfrequenz [21,22], für verschiedene Tierarten in ganz anderen Größenordnungen wie die für Menschen bekannten Referenzbereiche, und auch wichtige Regulationsprozesse wie das Verhalten der kardialen Kontraktionskraft bei unterschiedlichen Stimulationsfrequenzen unterscheiden sich [18,23], was eine Interpretation weiter erschwert. Somit kann für die Verwendung von Tiermodellen für Untersuchungen kardialer Prozesse festgestellt werden, dass es sich für einige Fragestellungen um eine gute Modell-Auswahl handeln kann, sich jedoch im Hinblick auf die Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen gravierende Probleme ergeben können.

1.2.2 Multizelluläre Gewebe-Modelle aus Myokard

Eine weitere schon lang etablierte Technik in der Herzforschung ist die Verwendung isoliert perfundiert schlagender Herzen als sogenannte Langendorff-Herzen [24–28]. Der originalen Beschreibung von Oskar Langendorff von 1895 folgend [25], wird dazu das Herz eines narkotisierten Säugetiers entnommen und die Koronarien werden mittels eines speziellen Aufbaus mit fibrinfreiem Vollblut über die kanülierte Aorta retrograd perfundiert. Die nach distal abgebundene Aorta wird über die Kanüle mit dem Perfusat gefüllt, sodass die Aortenklappe durch den Druck der eingebrachten Flüssigkeit geschlossen bleibt und das Perfusat in die Koronarien gelangt. Dabei werden die Atrien und Ventrikel im Originalaufbau nicht durchblutet. Derartige Versuchsaufbauten gibt es heute in vielfältigen Variationen für die verschiedensten Tierarten, wie zum Beispiel für sehr kleine Säugetierherzen z.B. von Mäusen [26] oder auch von großen Säugetieren [28], aber auch für humane Präparate gibt es inzwischen geeignete Modelle [29–31]. Auch Versionen des Verfahrens, bei denen eine Ventrikeldurchblutung erfolgt, wurden inzwischen entwickelt [32,33]. Der auf der Hand liegende Vorteil dieser Versuche liegt in der Betrachtung des gesamten Organs, jedoch *in vitro* und damit frei von z.B. neurohumoralen Einflüssen [27]. Die mechanische Funktion des Herzens ist dabei je nach Versuchsaufbau mehr oder weniger erhalten (je nach Vorhandensein einer Kammerfüllung) [25,27], das Herz kontrahiert ohne weitere elektrische Stimulation durch den Wegfall neurohumoraler Einflussfaktoren und die fehlende Perfusion des Sinusknotens jedoch langsamer als *in vivo* [24]. Eine externe elektrische Stimulation mit direkter Ableitung eines EKGs von der Herzoberfläche ist in einem solchen Aufbau natürlich möglich [27]. Die Schwierigkeiten und Nachteile dieser Herzmodelle liegen dabei vor allem in den teuren und hochkomplexen Versuchsaufbauten [8] sowie der Tatsache, dass pro Experiment nur ein ganzes Herz verwendet werden kann – die Durchführung von Versuchsreihen, z.B. zur Testung neuer pharmakologischer Substanzen, im Hoch-Durchsatz-Bereich ist damit kaum möglich und mit humanem Gewebe aufgrund der limitierten Verfügbarkeit nicht zu realisieren. Zudem ist die Versuchsdauer von Langendorff-Präparationen extrem beschränkt, für humane Herzen liegt sie bei etwa 4-5 h Perfusionsdauer [30]. Des Weiteren ist das Ergebnis, das nach der aufwendigen und zeitkritischen Präparation [27] erreicht wird, in den meisten Fällen keines, das dem *In-vivo*-Zustand in funktionellen Belangen entsprechen könnte – in den klassischen Präparationen bleiben die Herzhöhlen während des Versuches leer und erfüllen nicht ihre biologische Funktion [27]. Die Langendorff-Modelle mit erhaltener ventrikulärer Perfusion [32,33] sind jedoch in ihrem Aufbau noch wesentlich komplexer und teurer in der Durchführung und bleiben daher speziellen Fragestellungen vorbehalten [27].

Betrachtungen kardialer Eigenschaften in einem kleineren Maßstab ermöglichen *In-vitro*-Modelle, die verschiedene Myokardstücke verwenden: Etabliert sind hier Modelle mit ventrikulären sog. „Wedges“ [8], also keilförmigen Myokardstücken, die über ein vor Ort belassenes Gefäß künstlich perfundiert werden. Die Verwendung kardialer „Wedges“ erfolgt bisher beinahe ausschließlich für elektrophysiologische Studien [34–37], da dieses Modell den Vorteil bietet, alle Schichten der Ventrikelwand, also Endokard, Myokard und Epikard im Gewebeverbund betrachten zu können [36,37]. Als nachteilig erweisen sich bei dieser Technik der geringe Durchsatz [8,36], die relativ begrenzte mögliche Beobachtungsdauer von ca. 7 h [34] sowie die Erfolgsquote von ca. 50 % [36] bis ca. 80 % [35].

Des Weiteren gibt es die Möglichkeit, mit isolierten Papillarmuskeln oder Trabekelmuskeln aus den Ventrikeln Untersuchungen durchzuführen: hierfür werden dünne und kurze (meist ca. 3 mm lange

[38]) Präparate aus diesen Strukturen gewonnen und in speziellen Setups fixiert, die eine Dehnung [38,39] und elektrische Stimulation [38,40] des Gewebes ermöglichen. Auf diese Weise wird eine gezielte Modulation mechanischer [38,41] und elektrischer Bedingungen für den Versuchsaufbau möglich. Unter diesen Bedingungen ist auch eine längerfristige Kultur der Myokardpräparate, auch für humanes Myokard, für viele Stunden bis einige Tage [42] möglich. Eine Perfusion des Gewebes ist dabei nicht erforderlich, die Versuchsaufbauten sehen eine Versorgung über ein einfaches Kulturmedium vor [38,39], das regelmäßig alle ca. 7-11 h ausgetauscht werden muss [38]. Die Sauerstoffversorgung erfolgt durch eine Präoxygenierung des Kulturmediums und Diffusion ins Gewebe. Sofern die Gewebedicke unter 400 μm beträgt, ist dies meist gut möglich [43,44], bei dickeren Präparaten kann es hier jedoch zu Ischämie kommen [8,38]. Diese Modelle ermöglichen eine einfache Zugabe verschiedenster Substanzen, beispielsweise zu testender pharmakologischer Agenzien [45], aber auch von z.B. Adenoviren für Gentransfers [38]. Auch weitere Untersuchungen, wie z.B. eine parallele Messung der Kontraktionskraft und der Ca^{2+} -Konzentrationsveränderungen sind in solchen Setups möglich [40]. Als vorteilhaft ist des Weiteren zu erwähnen, dass trotz des kleinen Maßstabs der Trabekelpräparate im Gegensatz zur Untersuchung einzelner Kardiomyozyten (siehe unten) alle im Herzen vorkommenden Zelltypen in den Präparaten enthalten sind, also beispielsweise auch Fibroblasten [42], was dem physiologischen Zustand natürlich näher kommt. Als Nachteile der Trabekel- bzw. Papillarmuskelmethode sind zu erwähnen, dass auch hier nur ein sehr beschränkter Durchsatz möglich ist (pro Setup ein Datenset pro Woche [38]), wobei die Erfolgsquote ebenfalls bei ca. 80 % liegt [38], und nur sehr endokardnahes Gewebe verwendet werden kann [44]. Meist wird zudem eher rechtsventrikuläres Gewebe verwendet, das nicht notwendigerweise auf den linken Ventrikel übertragbare Ergebnisse liefert [38,39]. Bei einer Kultivierung sind zudem meist zusätzliche Substanzzugaben nötig, um eine bakterielle Kontamination zu verhindern [38].

1.2.3 Modelle unter Verwendung von Kardiomyozyten

Grundlegende kardiomyozytäre Eigenschaften können sehr gut an einzelnen Kardiomyozyten erforscht werden, hier sind vielfältigste Untersuchungen auf einfache Art und Weise möglich [8]. Vorteile solcher Experimente liegen vor allem in den hohen Kontrollmöglichkeiten für verschiedene Parameter auf direkte und indirekte Art und Weise. So ist es beispielsweise möglich, die Länge eines einzelnen Kardiomyozyten zu verändern und die dadurch entwickelte Kontraktionskraft zu messen [46], oder auch die Effekte einer Kultivierung von Kardiomyozyten in verschiedenen extrazellulären Milieus und deren Effekt zu untersuchen [16]. Dabei können die Kardiomyozyten isoliert von Einflüssen der extrazellulären Matrix oder unter gezielter Veränderung derselben untersucht werden. Neben mechanischen Bedingungen sind aber auch Veränderungen z.B. des chemischen Milieus, in dem sich die Zellen befinden, durch Zugabe von Substanzen einfach möglich [8,47]. Zudem ist es von Vorteil, dass aus einem auch verhältnismäßig kleinen Myokardstück (humanen oder tierischen Ursprungs) natürlich sehr viele einzelne Kardiomyozyten extrahiert werden können, was Probleme der Verfügbarkeit und des Durchsatzes minimiert und teilweise auch eine automatisierte Untersuchung hoher Probenzahlen ermöglicht [8]. Allerdings eignen sich solche Modelle primär für kurzzeitige Experimente [8,10,46], auch wenn es einzelne Langzeitversuche mit Kardiomyozyten durchaus gibt [48]. Zudem erschwert die Arbeit in einem solch kleinen Maßstab auf Einzelzellebene sowohl den Aufbau von Versuchsanordnungen als auch die Auswertung von Ergebnissen, da sich beispielsweise registrierte Kontraktionskräfte im Bereich weniger

μ N bewegen [46]. Der größte Nachteil an Experimenten mit einzelnen Kardiomyozyten liegt jedoch darin, dass die experimentellen Bedingungen sehr weit von einem physiologischen Zustand des Myokards entfernt sind. Dies kommt einerseits durch die zur Gewinnung von Einzelzellen notwendige Enzym-Verdauung der extrazellulären Matrix zustande, die auch teilweise Zellschäden verursachen kann [8,49–51], andererseits durch die Veränderungen der Kardiomyozyten durch Kultivierung. Hierdurch können grundlegende sowohl kontraktile als auch elektrische Eigenschaften der Zellen verändert werden [49,52]. Durch die somit unphysiologischen Bedingungen im Mikro- und Makro-Umfeld der Kardiomyozyten [9,53] kommt es oft zu einer Dedifferenzierung der Kardiomyozyten während der Kultur [48].

1.2.4 Modelle mit aus Stammzellen gewonnenen Kardiomyozyten

Auf zellulärer Ebene (und inzwischen auch in etwas größerem Maßstab) sind jedoch auch Experimente mit aus Stammzellen (meist aus Körperzellen durch Reprogrammierung gewonnen induzierten pluripotenten Stammzellen) entwickelten Kardiomyozyten und daraus zusammengesetzten Gewebekonstrukten, sog. engineered heart tissue (EHT), möglich. Solche Ansätze bieten wie auch die Forschung anhand von Kardiomyozyten Vorteile wie die einfache Modulierbarkeit verschiedenster Parameter und die leichte Veränderbarkeit einer extrazellulären Matrix, falls vorhanden, anhand biologischer oder synthetischer Materialien [10]. Auch Experimente mit hohem Durchsatz sind mit dieser Technik möglich, z.B. zur Testung neuer Therapeutika [54]. Darüber hinaus ergeben sich aus diesem Ansatz aber noch weitere Vorteile: So ist die Manipulation verschiedenster Gene in einem solchen Modell problemlos möglich [10,55], was auch die Entwicklung verschiedenster Modellsysteme genetisch (mit-)bedingter, kardialer Erkrankungen ermöglicht [56]. Zudem sind aufgrund der Möglichkeit, induzierte pluripotente Stammzellen aus humanen, z.B. von Patientinnen und Patienten stammenden, Haut- oder Blutzellen gewinnen zu können, sehr präzise Untersuchungen im Sinne einer personalisierten Medizin möglich [8,57,58]. An Zellen mit dem Genom von Patientinnen/Patienten, die z.B. ein neues Medikament erhalten sollen, können beispielsweise direkt Verträglichkeitstestungen durchgeführt werden. Als Idealbild ergibt sich dabei die patientenspezifische Entwicklung voll-funktionsfähigen Myokards aus Stammzellen [10] zur Verwendung zu therapeutischen Zwecken, z.B. als Zelltherapie-Ansatz gegen Narbengewebe nach Infarkten [59,60]. Hierfür sind natürlich komplexe Konstrukte aus Kardiomyozyten nötig – solche 3D-Konstrukte sind auch zunehmend Ziel von Forschungsvorhaben und bieten bereits vielversprechende Möglichkeiten [55,61,62]. Dabei gelingt inzwischen auch die Schaffung selbst-organisierender Systeme, also die eigenständige Organisation multizellulärer Konstrukte *in vitro*, z.B. sog. Cardioide [63]. Dabei handelt es sich um „Organoide“, die wie auch sog. Heart-on-a-chip-Systeme aus verschiedenen Zelltypen bestehen, um den physiologischen Bedingungen des Herzens und der Herzentwicklung möglichst nahe zu kommen [56,62,64]. Jedoch ergeben sich auch für diese Forschungsansätze einige Nachteile: So ist die Vergleichbarkeit solcher Konstrukte aus Stammzellen untereinander und mit dem physiologischen Zustand oft noch unklar und es kann sich eine hohe Beeinflussung durch artifizielle Effekte ergeben [10]. Da es bisher wenig Standardprotokolle für die Entwicklung von kardiomyozytären 3D-Konstrukten aus aus Stammzellen gewonnenen Zellen gibt [64], muss die Vergleichbarkeit mit bisherigen Experimenten und dem gewünschten (patho-)physiologischen Ergebnis also bei Entwicklung eines Modells stets untersucht werden [45]. Zudem ergeben sich bei solchen Ansätzen oft Probleme wie die hohe Komplexität der nötigen Prozeduren [55] oder die komplizierte Beeinflussung

der sich entwickelnden Kardiomyozyten z.B. in Richtung eines atrialen oder ventrikulären Phänotyps [10], auch wenn es hier schon vielversprechende Ansätze gibt [59]. Die Kulturdauer fertiger Konstrukte liegt bei diesen Methoden meist im Bereich von Tagen [10]. Die größte Schwierigkeit liegt bisher aber im mangelnden Reife- und Differenzierungsgrad der entwickelten Kardiomyozyten – so zeigen die aus Stammzellen gewonnenen Kardiomyozyten oft hinsichtlich Form, elektrischer Eigenschaften, Metabolismus und vieler anderer Parameter ein von humanen adulten Kardiomyozyten deutlich abweichendes Verhalten [10,58,65,66], die entwickelte Kontraktionskraft ist ebenfalls deutlich geringer als die adulter Kardiomyozyten [58].

1.2.5 Kardiale Slice-Modelle

Eine schon lang in der Untersuchung verschiedener Gewebe [67–70] bewährte Technik ist das Erstellen von vitalen, dünnen tangentialen Schnitten, sog. „Slices“, aus Gewebeblöcken [51,71]. Dieses Verfahren wurde auch schon früh für Myokardgewebe angewendet [69,70], findet aber erst in letzter Zeit vermehrt Verbreitung und Beachtung in der Myokardforschung. An derartigen Slices, die meist nur einige Zelllagen in der Dicke umfassen, aber mehrere mm lang und breit sind [53], können sowohl Kurzzeiteperimente [44,72] als auch langfristige Untersuchungen durchgeführt werden. Hierbei gibt es verschiedenste experimentelle Aufbauten, die von der Kultivierung von Myokard-Slices auf einer einfachen semipermeablen Filtermembran [73] bis hin zu komplexen Konstruktionen [74–77] reichen. Auch für dieses Modell ergeben sich einige nachteilige Faktoren und Umstände, die hier zunächst beleuchtet werden sollen, bevor auf die vielfältigen Vorteile dieser Technik eingegangen wird.

So ergeben sich Schwierigkeiten bei der Forschung mit Myokard-Slices zum einen aus dem Fehlen verschiedener Einflüsse, denen Myokard *in vivo* ausgesetzt ist, wie z.B. hormoneller, (anti-) inflammatorischer oder neuronaler Stimuli [8]. Auch Faktoren wie das Fehlen von Gewebepfusion [8] oder die oft verwendete elektrische Feldstimulation zur Kontraktionserzeugung [8,74,77] entsprechen nicht den physiologischen Bedingungen. Zudem scheinen sich bei Kultivierung von myokardialen Slices auch die Proteinbiosynthese [53,74] und der Metabolismus [78] aufgrund des veränderten Nährstoffangebots in einer Kultur zu verändern. Dies sind jedoch Faktoren, die in jeder Kultur eines Gewebes grundsätzlich auftreten können. Auch mechanisch entsprechen die verwendeten experimentellen Bedingungen für Myokardslices meist nicht dem *In-vivo*-Zustand, da eine Dehnung und Belastung des Gewebes praktisch nur in 2D-Richtung erfolgen kann [8], während *in vivo* eine dreidimensionale Belastung vorliegt. So wird für die Untersuchung von Myokardslices meist mit einer isometrischen, isotonischen oder auxotonen Kontraktion des Gewebes gearbeitet, während *in vivo* bei einer Herzkontraktion eine Abfolge verschiedener Kontraktionsarten zu beobachten ist [8]. All diese Faktoren können in Kardiomyozyten potentiell zu Veränderungen und auch ungünstigen Remodeling- (Umbau-) Vorgängen führen [8,48,49,52]. Ein weiterer Einflussfaktor, der bei der Arbeit mit myokardialen Slices zu beachten ist, ist die Verschiedenheit des Myokards von der epikardial bis zur endokardial gelegenen Seite, die bei Versuchen berücksichtigt werden sollte [79].

Neben diesen bei der Versuchsplanung zu beachtenden Faktoren ergeben sich aus der Myokardforschung an Slices jedoch viele Vorteile: Es handelt sich um ein experimentelles Modell, bei dem Struktur und Aufbau des Gewebes mitsamt der Extrazellulärmatrix erhalten bleiben, da ja ähnlich wie bei den erwähnten Techniken für ganze Herzen oder größere Herzstücke keine Enzymverdauung wie für die

Verwendung einzelner Zellen notwendig ist [8,80]. Es können jedoch aus verhältnismäßig kleinen Myokardproben durch die Schnitt-Technologie bis zu 30 einzelne Slices gewonnen werden [51], was im Gegensatz zu einigen der zuvor beschriebenen Techniken einen deutlich höheren Durchsatz bedeutet und die Möglichkeit für größer angelegte Parallel-Studien zum Vergleich z.B. verschiedener Kulturbedingungen eröffnet. Es handelt sich zudem um ein gut validiertes Modell und der entscheidende Schritt des Schneidens des Myokards ist automatisiert mittels sogenannter Vibratome möglich [8,73,81], wodurch die Technik gut erlernbar und anhand von Protokollen standardisierbar ist [8,51,71]. Derartige Slices können für vielfältige Experimente kürzerer oder auch längerer Dauer verwendet werden, es existieren verschiedene Ansätze, in denen mannigfaltige Einflüsse auf das Gewebe sehr differenziert gesteuert [8] und die Auswirkungen kontinuierlich überwacht werden können [74]: so können mechanische Veränderungen durchgeführt werden, ohne dafür wie in Einzelzellexperimenten ein Mikroskop zu benötigen, aber auch elektrische Einflüsse und Interaktionen zwischen beiden sind gut zu untersuchen [8,82]. Dabei zeigen die eigentlich dreidimensionalen Slices aufgrund ihrer geringen Dicke oft ein Verhalten, das als „pseudo-zweidimensional“ beschrieben wird, was gerade für elektromechanische Versuche von Vorteil sein kann [8,81,83]. Aufgrund der guten Möglichkeiten zu Modulation und Überwachung eignet sich dieses Modell auch sehr gut für toxikologische Studien [69,70], sogar auch für funktionell und erst über längere Expositionszeiten toxische Substanzen [74]. Ein großer Vorteil der Forschung an Slices ist, dass anders als bei Verwendung ganzer Herzen oder größerer Myokardstücke keine Perfusion zur Sauerstoffversorgung des Gewebes nötig ist [78], da die geringe Dicke der Slices eine ausreichende Versorgung über Diffusion ermöglicht [8,51]. Des Weiteren können für die Slicing-Technologie verschiedene Gewebeproben genutzt werden. So kann neben der natürlich auch vorhandenen Möglichkeit der Verwendung von Myokard verschiedener Versuchstiere mit humanem Gewebe sowohl aus Transplantationen als auch aus vielen anderen Herzoperationen, z.B. der Implantation eines linksventrikulären Unterstützungssystems (LVAD) [44], gearbeitet werden [8,51,74]. Dabei ergibt sich automatisch die Situation, dass am Zielgewebe z.B. für die Entwicklung neuartiger Therapieformen geforscht werden kann, da bei all diesen Varianten humanes insuffizientes Myokard Verwendung findet [8]. Auch neuartigere Varianten und Veränderungsmöglichkeiten sind bei der Verwendung myokardialer Slices möglich, beispielsweise ein Gentransfer verschiedener Gene mittels viraler Vektoren. Im weiteren Kulturverlauf kann dann beobachtet werden, welche Auswirkungen sich daraus auf die elektrischen und mechanischen Eigenschaften des Myokards ergeben [75,80]. Ein großes Feld ergibt sich auch aus der Möglichkeit der Cokultur von anderen Zelltypen wie embryonalen Stammzellen oder Fibroblasten auf der Basis von Myokard-Slices zur Untersuchung z.B. der Interaktionen der verschiedenen Zellen [81,84,85]. Dies ist besonders interessant, da ja inzwischen bekannt ist, wie viele nicht-myokardiale Zelltypen einen relevanten Einfluss auf die myokardiale Funktion ausüben [86].

1.3 Physiologische und pathophysiologische Hintergründe

Für das Verständnis von Untersuchungen verschiedener Effekte in einer solchen Myokard-Slice-Kultur soll nun ein Überblick über die hierfür relevanten zell- und gewebephysiologischen sowie pathophysiologischen Zusammenhänge im Myokard gegeben werden.

Das Ventrikelmyokard adulter humaner Herzen besteht aus zylindrisch geformten Kardiomyozyten mit einer Länge von ca. 100 μm und einem Durchmesser von ca. 15 μm [87(Kap. 10.2.1)], die aneinandergereiht lange Herzmuskelfasern bilden. Die einzelnen Zellen sind dabei durch sog. Glanzstreifen, an

denen Haft- und Kommunikationskontakte („gap junctions“) ausgebildet sind [87(Kap. 10.2.1)], verbunden. Somit besteht eine elektrische Verbindung der Zellen, was eine rasche Fortleitung von Aktionspotentialen über lange Strecken ermöglicht (vgl. [87(Kap. 10.2.1)]). In den einzelnen Zellen befinden sich als wichtiges mechanisches Element Myofilamente, die in sog. Sarkomeren als sich wiederholender Organisationseinheit angeordnet sind und Myofibrillen bilden [87(Kap. 10)]. Um die Myofibrillen befindet sich ein Netz aus sog. terminalen Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) [88(S. 169)], das einen großen intrazellulären Ca^{2+} -Speicher in den Kardiomyozyten darstellt. In kurzen regelmäßigen Abschnitten liegen parallel zu den terminalen Zisternen zusätzlich Einstülpungen der Plasmamembran, die als t-Tubuli bezeichnet werden und eine wichtige Funktion in der elektromechanischen Kopplung der Herzmuskelzellen spielen [87(Kap. 10),89].

Elektrische Aktionspotentiale entstehen im Herzen im Sinusknoten und werden über das spezialisierte Reizleitungssystem zum Arbeitsmyokard weitergeleitet, wo dann eine schnelle Ausbreitung über die gap junctions erfolgt (vgl. [88(S. 201)]). Durch einen Kationeneinstrom kommt es dann an der Zellmembran des Kardiomyozyten zu einer Depolarisation, die von einer partiellen Repolarisation durch einen Kationenausstrom gefolgt wird (vgl. [88(S. 194 f.),89]). Parallel kommt es durch die Depolarisation zu einer Aktivierung spannungsabhängiger L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle im Sarkolemm (der Zellmembran) an der Zelloberfläche und in den t-Tubuli [90]. Hierdurch kommt es zu einer Aktivierung der sog. Ryanodin-Rezeptoren (RyR2) in der Membran des SR, wodurch ein Ca^{2+} -Ausstrom aus dem SR in das Zytosol erfolgt – dieser Vorgang ist als Ca^{2+} -induzierte- Ca^{2+} -Freisetzung bekannt (vgl. [88(S. 199),89]). Durch den Ca^{2+} -Einstrom kommt es elektrisch zur sogenannten Plateauphase des Herzaktionspotentials: das eingeströmte Ca^{2+} bindet an Troponin-C-Proteine, sodass durch Tropomyosin-Vermittlung eine Bindung zwischen den Myofilamenten ausgeprägt wird, die zu einer Kontraktion der Muskelzelle unter ATP-Verbrauch führt (vgl. [88(S. 172),89]). Durch negative Feedback-Mechanismen und eine zunehmende Ca^{2+} -Depletion des SR kommt der Ca^{2+} -Einstrom im weiteren Verlauf zum Erliegen [90] und die Repolarisation schreitet fort. Im Anschluss erfolgt der Ca^{2+} -Rücktransport durch verschiedene Kanäle: zu ca. 30 % durch den Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher nach extrazellulär, zu ca. 70 % durch die sog. SERCA (sarko-endoplasmatische-Retikulum- Ca^{2+} -ATPase) ins SR, zu geringen Prozentanteilen über eine Ca^{2+} -ATPase im Sarkolemm nach extrazellulär und durch mitochondriale Transporter in die Mitochondrien [90]. Durch den sinkenden intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel kommt es zur Relaxation des kontraktile Apparats und durch die Repolarisation durch K^+ -Ausstrom stellt sich das Ruhepotential wieder ein [88(S. 195)]. Bei diesem Vorgang der kardialen elektromechanischen Kopplung spielen also Ca^{2+} und der Ca^{2+} -Transport eine entscheidende Rolle, die Ca^{2+} -Menge ist dabei auch ein entscheidender Faktor für die Stärke der Kontraktion [89].

Auf diese grundlegenden Abläufe der Kontraktion der Kardiomyozyten und des ganzen Herzens wirkt eine Vielzahl unterschiedlichster Regulationsmechanismen, um eine optimale Anpassung an die jeweiligen Gegebenheiten in verschiedenen Situationen zu ermöglichen. Hier soll der Fokus auf die Mechanismen gelegt werden, die sich für den weiteren Verlauf dieser Arbeit als relevant erwiesen. Ein sehr wichtiger Einflussfaktor ist dabei physiologisch die Wirkung des vegetativen Nervensystems. Während im Herz großteils nur die Atrien direkt parasympathisch innerviert sind, wodurch eine Beeinflussung der Herzfrequenz ermöglicht wird [91], besteht im Ventrikelmuskel eine relevante direkte Einwirkung

des sympathischen Nervensystems, die über Katecholaminspiegel vermittelt wird. Dies geschieht mittels Bindung der endogenen Katecholamine an entsprechende Rezeptoren im Myokard – ein zentraler Mechanismus im Myokard ist die Bindung von Adrenalin an β_1 -Rezeptoren. Dies führt zur Aktivierung eines stimulierenden G-Proteins [92], wodurch die Adenylylcyclase-Aktivität ansteigt [93,94] und der cAMP-Spiegel im Cytosol erhöht wird [90], der über die Aktivierung von Proteinkinasen verschiedene Wege der intrazellulären Signaltransduktion aktiviert oder deaktiviert. In Summe kommt es durch die adrenerge Wirkung zu einer positiven Chronotropie (gesteigerten Herzfrequenz), Inotropie (gesteigerten Kontraktionskraft), Lusitropie (beschleunigten Relaxation), Bathmotropie (gesenkten elektrischen Reizschwelle) und Dromotropie (beschleunigten elektrischen Erregungsleitung) im Myokard [93,95]. Viele dieser Effekte werden durch die cAMP-abhängige Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) vermittelt, die multiple Zielproteine phosphoryliert und dadurch in ihrer Aktivität beeinflusst. Auf diese Weise wird die Öffnungswahrscheinlichkeit von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen erhöht, wodurch es zu einem vermehrten Ca^{2+} -Einstrom in die Kardiomyozyten kommt (vgl. [88(S. 170),93]). Da auch der Ca^{2+} -Strom aus dem SR ins Zytosol über RyR2 gesteigert wird [90,93], kommt es durch diese Faktoren zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und in Folge dessen unter anderem auch zu einer vermehrten Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Kinase II (CaMKII). Ebenfalls durch die PKA, aber auch durch die CaMKII, wird Phospholamban (PLN) jeweils an verschiedenen Aminosäuren phosphoryliert (Ser-16 für PKA, Thr-17 für CaMKII), ein auf die SERCA inhibitorisch wirkendes Protein, dessen SERCA-Inhibition durch die Phosphorylierung aufgehoben wird, wodurch es zu einer vermehrten Ca^{2+} -Wiederaufnahme ins SR und damit zu einer positiven Lusitropie kommt [90,93]. Auch Troponin I wird durch die PKA phosphoryliert, hierdurch kommt es zu einer beschleunigten Abdiffusion von Ca^{2+} vom Troponin-C-Tropomyosin-Komplex und dadurch ebenfalls zu einer positiven Lusitropie (vgl. [88(S.171 und S. 183),90]). Weitere PKA-Targets sind z.B. auch das Myosin-bindende Protein C, der langsame K^+ -Kanal KCNQ1 oder die Myosin-Leichtketten-Kinase [88(S. 162),90,93], auch kommt es zu einem vermehrten Einbau von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen in die t-Tubuli [93,96]. Des Weiteren werden durch die vermehrte PKA-Aktivität andere inhibitorisch wirkende Mechanismen reduziert, so wird die Aktivität der Proteinphosphatase 1 (PP1), die PLN und CaMKII dephosphoryliert und damit die Wirkung von PKA antagonisieren würde, über die Aktivierung ihres Inhibitor-Proteins Inhibitor 1 (I-1) gehemmt [97,98].

Eine wichtige Rolle in der Regulation kardialer Funktionen auf zellulärer Ebene kommt der Regulation der intra- und extrazellulären Ionenkonzentrationen und dadurch der Ionenströme zu, da das Aktionspotential stark von diesen abhängig ist. Aufgrund ihrer Funktionen für Depolarisation, Repolarisation und der Aufrechterhaltung des Ruhepotentials haben natürlich Veränderung der Na^+ - und K^+ -Konzentrationen einen großen Einfluss (vgl. [88 (S. 194 ff.),90]), eine zentrale Rolle spielt im Kardiomyozyten jedoch das Ca^{2+} -Gleichgewicht. Die Ca^{2+} -Konzentration beeinflusst dabei die Funktion von Ionenkanälen, die elementar an der Kontraktion beteiligt sind, z.B. des Na^+ - Ca^{2+} -Austauschers, der Ca^{2+} -ATPase, der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle oder des RyR2 [90]. Die Ca^{2+} -Konzentrationen im SR, das als Speicher für die folgenden Kontraktionen dient, und im Zytosol beeinflussen zudem die Kontraktionsstärke. Des Weiteren aktiviert eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration auch Proteinkinasen wie die CaMKII [99], wodurch es zu einer Phosphorylierung und damit Inhibition des SERCA-Inhibitors PLN kommt. Auch ein Feedback-Mechanismus, der der Wirkung von PKA entgegenwirkt, wird aktiviert, indem es zu einer Aktivitätssteigerung der Proteinphosphatasen 2A und 2B kommt, wodurch I-1 und PP1 dephosphoryliert werden [98].

Weitere Einflussfaktoren, die die kardiale Funktion neben dem vegetativen Nervensystem und den Ionenkonzentrationen relevant beeinflussen, sind beispielsweise jedoch auch Azidose, da hierdurch Einflüsse auf die Ca^{2+} -Konzentration und die Aktivität von Phosphatasen bestehen [99,100], posttranslationale Modifikationen der an der Kontraktion beteiligten Proteine [101], Wirkungen anderer Hormone, wie z.B. der Schilddrüsenhormone [101], Einflüsse durch vorangegangene Ischämie-Reperfusionsschädigungen [97,98,102] aber auch mechanische Faktoren. Hier sind vor allem zwei Mechanismen zu erwähnen: Deren erster ist der sog. Frank-Starling-Mechanismus, der eine Steigerung der Kontraktionskraft der Kardiomyozyten und damit der kardialen Pumpfunktion durch eine Steigerung der Vordehnung der Zellen bis zu einem Optimum beschreibt. Als ursächlich wird eine verbesserte Überlappung der Myofilamente bei einer gewissen Dehnung sowie eine Ca^{2+} Sensitivierung des Myosins bei Dehnung angesehen [88(S. 182)], auch weitere Mechanismen werden jedoch diskutiert [103]. Der zweite relevante Mechanismus ist der sog. Bowditch-Effekt, der auch als Treppe-Effekt oder positive Force-Frequency-Relationship bekannt ist. Dieser beschreibt die Tatsache, dass eine Steigerung der Herzfrequenz ebenfalls bis zu einem gewissen Optimum zu einer gesteigerten Kontraktionskraft führt. Der dabei zugrundeliegende Effekt ist eine Steigerung der sog. Ca^{2+} -Transienten, also der Ca^{2+} -Ströme, bei steigender Herzfrequenz, da es insgesamt pro Zeiteinheit durch die gesteigerte Frequenz zu einem erhöhten Ca^{2+} -Einstrom ins Zytosol kommt [104], wodurch die Kontraktionskraft ansteigt. Zudem kommt es auch zu einer Beschleunigung der Abläufe der Kontraktion und Relaxation hierdurch und zu einer angepassten Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente [104,105].

Bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz treten in vielen dieser Regulationsmechanismen Veränderungen auf. „Bei der Herzinsuffizienz ist das Herz nicht mehr in der Lage, den Organismus mit ausreichend Blut und Sauerstoff zu versorgen, um einen stabilen Stoffwechsel unter Ruhe- oder Belastungsbedingungen zu gewährleisten.“ [106]. Die Ursachen der Herzinsuffizienz sind dabei vielfältig, da die Herzinsuffizienz die gemeinsame Endstrecke fortgeschrittener kardialer Pathologien darstellt [107]. Die wichtigsten Mechanismen bestehen dabei in anhaltender Druckbelastung des Herzens, myokardialer Ischämie oder Infarzierung, Volumenüberladung oder genetisch bedingter oder erworbener Kardiomyopathien [107,108]. Es existieren verschiedenste Einteilungen der Herzinsuffizienz, so kann nach der zugrundeliegenden Erkrankung, zwischen Rechts- und Linksherzinsuffizienz oder akuter und chronischer Herzinsuffizienz unterschieden werden. Die früher gebräuchlichste Einteilung [108] nach systolischer Insuffizienz, also einer Unfähigkeit des Ventrikels zur adäquaten Kontraktion gegen Volumenbelastung, und diastolischer Insuffizienz, also einer beeinträchtigten Füllung der Ventrikel, ist inzwischen ersetzt worden durch die Unterscheidung nach Herzinsuffizienz mit erhaltener (HFpEF) und Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF) sowie einer dazwischenliegenden Herzinsuffizienz mit mittlerer Ejektionsfraktion (HFmrEF) [109]. Die Charakteristiken der beiden Haupt-Varianten stellt Tabelle 1 gegenüber.

Eine wichtige Rolle in der pathophysiologischen Entwicklung der Herzinsuffizienz spielen Kompensationsmechanismen nach dem Eintreten einer Schädigung oder einer Veränderung des initial bestehenden Gleichgewichts verschiedener Faktoren. Zwei dieser Kompensationsmechanismen sind die vermehrte Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und eine Sympathikusaktivierung mit erhöhten Katecholaminspiegeln [108,109]. Während diese Mechanismen z.B. durch eine Steigerung der Kontraktionskraft durch die oben beschriebenen Katecholaminwirkungen kurzzeitig die Auswirkungen

| | HFrEF | HFpEF |
|---|--|--|
| Ejektionsfraktion | < 40 % | > 50 % |
| Ursachen | Volumenüberladung, Verlust an Kardiomyozyten, vermehrte Fibrose | Drucküberlastung, Beeinträchtigung der ventrikulären Füllung und Relaxation, vermehrte Steifheit des Gewebes, erhöhter ventrikulärer Füllungsdruck |
| Zugrundeliegende Herzerkrankungen (Auswahl) | Koronare Herzerkrankung, arterielle Hypertonie, Klappenvitien, Arrhythmie, Inflammation, idiopathische Kardiomyopathie, toxische Kardiomyopathie | Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Klappenvitien, hypertrophe Kardiomyopathie, restriktive Kardiomyopathie, Pericarditis constrictiva, Amyloidose |
| Pathologisches Bild | Fibrose, Dilatation | konzentrische Hypertrophie |

Tabelle 1 Einteilung der Herzinsuffizienz, modifiziert nach [109]

von Schädigungen und Veränderungen kompensieren können, kommt es bei ihrer langfristigen Aktivierung zu einer neurohumoralen Dysregulation.

So führt die catecholaminabhängige Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zwar zu einer gesteigerten Kontraktionskraft, jedoch durch diese auch zu einem erhöhten O_2 -Verbrauch des Gewebes, zu einer verringerten kardialen Reserve für Belastungssituationen und durch die veränderten Ionenkonzentrationen zu einem erhöhten Arrhythmierisiko [91,109]. Weitere Auswirkungen chronisch erhöhter Katecholaminstimulation sind auch eine funktionelle Desensitivierung gegenüber adrenerger Stimulation durch Entkopplung der β -Rezeptoren von den G-Proteinen, die der Wirkungsvermittlung intrazellulär dienen, und eine Verschiebung des Verhältnisses von β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren zugunsten letzterer, was zu einer Veränderung der intrazellulären Phosphorylierungsmuster und damit beispielsweise der Ca^{2+} -Sensitivität und der Aktivität verschiedener Ionenkanäle führen kann [91,108]. Des Weiteren kommt es auch zu einer Umverteilung der regionalen Durchblutung, zu Veränderungen der Genexpression und zur Entwicklung von Hypertrophie [108,109]. Katecholamine sind zudem in höheren Konzentrationen myotoxisch, sodass es auch zu Zelltod kommen kann [91,108,109]. Infolge der physiologischen Kompensationsmechanismen entsteht durch Langzeiteinwirkung oder überschießende Kompensation schlussendlich eine Gewebeschädigung. Dies ist nicht nur aufgrund von Katecholaminwirkungen der Fall, sondern auch aufgrund von mechanischen Veränderungen, die im Laufe der Entwicklung einer Herzinsuffizienz auftreten. Aufgrund von Umbauprozessen entwickelt sich vermehrt Fibrose, wodurch sich die Gewebebeschaffenheit und -elastizität verändert. Teilweise entsteht auch Hypertrophie, unter anderem durch die vermehrte RAAS-Aktivierung, die initial eine Kraftsteigerung und vermehrte Effektivität bewirken soll, im Verlauf jedoch die Sauerstoff- und Energieversorgung des Gewebes weiter erschwert und dadurch zu einer progredienten Gewebeschädigung beiträgt [108]. Im weiteren Verlauf der Pathogenese kommt es vermehrt zu Apoptose und Nekrose von Kardiomyozyten und Fibroblasten sowie auch zu Schädigung des Endothels und der Extrazellulärmatrix, wodurch es zu einer myozytären Disorganisation und zu Dilatation des Gewebes kommen kann [109]. Zudem sind auch wichtige intrazelluläre Prozesse zunehmend verändert: dies betrifft einerseits die Proteinexpres-

sion und -modifikation, sodass z.B. die Expression von SERCA sinkt, ebenso wie die Menge an phosphoryliertem (inaktivem) PLN, während beispielsweise vermehrt proinflammatorische Zytokine exprimiert werden [108–110]. Andererseits kommt es durch die reduzierte Versorgung mit O₂ und energiereichen Substraten durch die erschwerte Durchblutungssituation auch zu einer Dysbalance im intrazellulären ATP-Transfer und zu mitochondrialen Veränderungen, die myozytäre Dysfunktionen, z.B. durch verminderte Aktivität von ATPasen wie der SERCA, zur Folge haben und langfristig Apoptose begünstigen [109]. Zudem entsteht durch diese Prozesse ein vermehrter oxidativer Stress für die Kardiomyozyten, z.B. durch reaktive O₂-Spezies (ROS), und damit kommt es zu weiteren Zellschädigungen [91,109]. Durch all diese Faktoren kommt es somit zu grundlegenden Beeinträchtigungen der myozytären Funktion hinsichtlich Energieversorgung, mechanischen Prozessen, einer Ionen-Dysbalance und elektrischen Veränderungen, sodass die elektromechanische Kopplung und die Kontraktionsmechanismen beeinträchtigt sind [108]. Zu erwähnen sind hier besonders die Veränderungen in der Ca²⁺-Homöostase, da es zu einem Anstieg des intrazellulären Ca²⁺ kommt [109], was durch die vermehrte SR-Ca²⁺-Beladung unter anderem auch die Entstehung plötzlicher Ca²⁺-Ströme (sog. Sparks) aus dem SR begünstigt, wodurch das Arrhythmierisiko ansteigt [108,111]. Somit sind grundlegende elektrische Eigenschaften des Myokards bei Insuffizienz beeinträchtigt, das Ruhepotential ist depolarisierter als im physiologischen Zustand, die Aktionspotential-Dauer ist verlängert, wodurch die Relaxation verlängert ist, und die elektrische Verbindung der Myozyten durch die gap junctions ist durch verminderte Expression und vermehrten Zelltod beeinträchtigt [109,110]. Durch diese Faktoren steigt das Arrhythmierisiko im insuffizienten Herzen weiter an. Die Auswirkungen dieser Veränderungen sind auch bei den oben beschriebenen Effekten zur Kraftsteigerung im Herzen in bestimmten Situationen sichtbar, z.B. in Form einer Beeinträchtigung des Frank-Starling-Mechanismus, sodass erst bei stärkerer Dehnung noch ein geringer Kraftanstieg möglich ist [108,109], und des Bowditch-Effekts, sodass eine Kraftsteigerung bei Frequenzsteigerung nur noch sehr gering oder gar nicht mehr erfolgt [109]. Ursächlich für diese dann teilweise sogar negative Kraft-Frequenz-Abhängigkeit bei Herzinsuffizienz ist einerseits die verminderte Expression wichtiger Proteine wie der SERCA, andererseits die Veränderung funktioneller Regulationsmechanismen wie des Phosphorylierungsgrads des PLNs und wiederum andererseits auch die Veränderung von strukturellen Prozessen wie ein Umbau der t-Tubuli-Struktur [112,113]. Natürlich haben die Veränderungen und Umbauprozesse im Herzen auch auf größerer Ebene vielfältige Auswirkungen, z.B. auf die Druck-Volumen-Beziehungen im gesamten Organismus oder die gegenseitige Beeinflussung von Herz- und Nierenfunktion [108,109] – Ausführungen zu diesen Themen sind jedoch für diese Arbeit nicht von unmittelbarer Relevanz.

In den letzten Jahren wurden weitere potentiell reversible und damit therapeutisch interessante Schädigungsmechanismen des Myokards beschrieben, die *in vivo*, aber auch bei Schneideprozessen von Myokard zur Kultivierung auftreten können: das sog. myokardiale „stunning“ und „hibernating“. „Hibernating myocardium“ bezeichnet dabei die Anpassung des Myokards an eine bestehende oder wiederholte Minderperfusion, die bei einer Verbesserung der Perfusion reversibel ist [114,115]. Unter „stunning myocardium“ versteht man eine temporäre post-ischämische kardiomechanische Dysfunktion nach kurzer Ischämie ohne histologisch nachweisbaren irreversiblen Gewebeschaden, bei der ein voll oder teilweise reversibles Ungleichgewicht kontraktiler Funktionen besteht [114]. Die zugrundeliegenden Pathologien des „stunnings“ sind dabei vielfältig und umfassen sowohl eine Gewebeischämie bei koronarer Herzerkrankung als auch Situationen eines relativen O₂-Mangels [116], also einem erhöhten

O₂-Bedarf ohne entsprechende Steigerung des Angebots, z.B. bei andauernder Katecholaminstimulation bei Stress (klinisch bekannt als Tako-Tsubo-Kardiomyopathie) oder entzündlichen Erkrankungen [114], mit anschließender Reperfusion bzw. Rückgang des O₂-Bedarfs. Denkbar ist ein solcher Mechanismus jedoch auch durch eine Ischämie im Rahmen eines Schneidens und Kultivierens von Myokard. Nach einem einmaligen Ischämieereignis mit voller Reperfusion kann es bis zu 24 h nach dem Ereignis zu „stunning“ kommen [116], nach teilweise irreversibler Ischämie oder einer längeren Episode, z.B. mehreren Stunden, einer nur teilweisen Ischämie dauert das „stunning“ mehrere Tage bis Wochen [115,116], bevor die Erholung von der Schädigung erfolgt. Die Mechanismen, die bei „myocardial stunning“ als transientser Schädigung durch Ischämie und Reperfusion auftreten, sind dabei vor allem ein Anstieg reaktiver O₂-Spezies (ROS) mit daraus resultierendem oxidativem Stress und oxidativen Modifikationen myofibrillärer Proteine, eine Ca²⁺-Überladung der Myozyten mit daraus resultierendem vermindertem Ansprechen der Myofilamente auf Ca²⁺ und einer Aktivierung z.B. der CaMKII, eine elektromechanische Entkopplung und eine Dysfunktion des SR [114,115]. Auch eine Aktivierung von Proteasen wie Calpain durch Ca²⁺-Überladung mit anschließender Proteolyse myofibrillärer Proteine wie z.B. Troponin I wird als Mechanismus diskutiert [115]. Zudem konnte auch eine Beeinträchtigung der koronaren Autoregulation der Gefäßweite sowie der Reaktion auf Stimulation durch den Sympathikus nachgewiesen werden: so erholt sich das Ansprechen auf Katecholaminstimulation erst ca. 24 h nach einer stattgehabten Ischämie [115]. Ein Schlüsselfaktor bei „myocardial stunning“ und der Erholung davon scheint die Phosphorylierung von PLN zu sein, das während einer Ischämie de- und nach einer Reperfusion rephosphoryliert wird [114]. So konnte nachgewiesen werden, dass eine Phosphorylierung von PLN durch CaMKII an der Aminosäure Threonin an Position 17 des Proteins, z.B. durch Ca²⁺-Überladung, sich als protektiv im Rahmen einer Erholung von einer Ischämie erwies [117]. Eine Beteiligung von Mechanismen des programmierten Zelltods, der Apoptose, wird dabei diskutiert, da sich die Zelle durch Ischämie und Reperfusion in einem empfindlichen Gleichgewicht zwischen Überleben und Apoptose befindet [114]. Interpretiert wird „myocardial stunning“ im Allgemeinen als Ausdruck einer reversiblen Schädigung, nicht als protektiver Mechanismus [115]. Eine solche Schädigung könnte potentiell therapeutisch zugänglich sein, da z.B. eine Therapie mit Katecholaminen oder positiv inotropen Agentien denkbar wäre, wobei nach aktuellem Stand der Literatur keine negativen Langzeitfolgen zu erwarten wären [114,115].

2. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollen Myokard-Slices von humanem insuffizientem Myokard mithilfe einer biomimetischen Langzeitkultur, die viele Einfluss-, Kontroll- und Messmöglichkeiten bietet, untersucht und mit nicht insuffizienten Slices von Pavian-Myokard verglichen werden. Über die gesamte Kulturdauer von 21 Tagen erfolgen dabei Messungen der Kontraktionskraft und anderer Kenngrößen myokardialen Gewebes. Dabei sollen die Ursachen eines Effekts untersucht werden, der sich in vorangegangenen Versuchen für humanes insuffizientes Myokard gezeigt hatte: Während unmittelbar zu Kulturbeginn eine starke Kontraktilität der Kardiomyozyten beobachtet werden konnte, kam es in den folgenden Stunden zu einem deutlichen Kraftabfall, bis nach ca. 24 h fast keine Kontraktionen mehr messbar waren, bevor dann ein Wiederanstieg der Kontraktionskraft über die nächsten Wochen zu erkennen war.

Eine mögliche Erklärung für diese Effekte könnte eine Anpassung des Myokards an die elektromechanischen Bedingungen in der Kultur sein, dies ist für Kraftabfall und Kraftanstieg gleichermaßen denkbar. Der Kraftabfall könnte jedoch auch durch das Fehlen von Hormonen wie z.B. Katecholaminen, Energiequellen oder anderen Substanzen ausgelöst werden, der Wiederanstieg der Kraft könnte dabei eine Anpassung an das Fehlen derselben bzw. eine Kompensation des Mangels über z.B. die Umstellung von Stoffwechselwegen repräsentieren. Auch eine initiale Inflammationsreaktion mit Rückgang im Kulturverlauf oder eine Art „Schutzreaktion“ des Gewebes zu Kulturbeginn mit anschließendem Rückgang wären denkbar. Die unmittelbar zu Kulturbeginn gemessene Kontraktionskraft könnte jedoch auch durch verschiedene Einflussfaktoren verfälscht sein, sodass die kaum messbare Kontraktionskraft nach einigen Stunden den insuffizienten Zustand des Myokards widerspiegelt, während es im Kulturverlauf zu einer Erholung vom insuffizienten Zustand im Sinne einer reversen Pathogenese kommen könnte. Dies würde einem „reverse remodeling“, also einer Rückabwicklung der Veränderungen durch die Herzinsuffizienz und damit einer erfolgreichen Herzinsuffizienz-Therapie *in vitro* entsprechen. Eine weitere Erklärung für diese Beobachtung könnte jedoch auch die Entwicklung des oben bereits näher erläuterten „myocardial stunning“ als Post-Ischämie-Reperfusion-Reaktion zu Kulturbeginn mit anschließendem Rückgang im weiteren Verlauf bei Reversibilität des „stunnings“ sein.

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit soll der Fokus auf der Annahme liegen, dass das insuffiziente Myokard durch die pathophysiologischen Prozesse und einen zusätzlichen therapeutischen Einsatz von Katecholaminen *in vivo* hohen Katecholaminspiegeln ausgesetzt war, sodass der Wegfall der Katecholaminstimulation im Rahmen der Kultivierung einen Kraftabfall auslöste. Für den Kraftanstieg im Kulturverlauf kommen dabei primär zwei Optionen in Betracht: ein Rückgang der unter anderem (siehe oben) durch Katecholaminstimulation mitbedingten Kaskade der Pathogenese der Herzinsuffizienz oder der Anstieg des intrinsisch vorhandenen beta-adrenergen Spontantonus der Rezeptoren [118–121] als Ursache des Kraftanstiegs.

Zur Überprüfung dieser Thesen werden dabei in dieser Arbeit Versuche unter Zusatz der adrenerg wirkenden Substanz Denopamin durchgeführt, um einen eventuellen Katecholaminmangel auszugleichen.

2.1 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit soll zeigen, welche Effekte die Kraftkinetik des humanen insuffizienten Myokards in biomimetischer Langzeit-Kultur begleiten, und anhand von Substitution einer β -adrenergen Substanz (Denopamin) die Frage beantworten, ob die Veränderungen mit einem Wegfall der Katecholaminstimulation in kausalem Zusammenhang stehen. Als Vergleichsmodell sollen dabei die Ergebnisse einer Kultivierung von nicht insuffizientem Pavian-Myokard unter den gleichen Bedingungen dienen.

Somit soll untersucht werden, welche Mechanismen für die beobachtete Ab- und Zunahme der Kontraktionskraft im Verlauf der Langzeitkultur humanen insuffizienten Myokards verantwortlich sind.

3. Technik und Methoden

3.1 Myokardkultur

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Kulturtechnik für humanes Myokardgewebe basiert auf den bereits publizierten Ergebnissen der AG Dendorfer am Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin [71,74] und soll hier zunächst inklusive einiger Weiterentwicklungen dargestellt werden.

3.1.1 Herkunft der Myokardproben

3.1.1.1 *Humane Proben*

Das in dieser Arbeit verwendete humane Myokard wurde im Rahmen von Kooperationen durch zwei große deutsche Transplantationszentren, der Klinik für Thorax- und Kardiovaskularchirurgie des Herz- und Diabeteszentrums Nordrhein-Westfalen in Bad Oeynhausen und der Klinik für Herzchirurgie des Klinikums der Universität München, gewonnen.

Die hier untersuchten humanen Herzgewebeproben stammten mit einer Ausnahme aus dem linken Ventrikel von im Rahmen von Transplantationen explantierten Herzen der Transplantatempfänger. Vertreten war auch ein Präparat, das im Rahmen einer Myoektomie nach Morrow entnommen wurde. Somit handelte es sich bei jedem der Gewebe um insuffizientes Myokard. Es konnte jedoch aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit humaner Herzproben bei der Auswahl der Proben nicht nach Ursache der Kardiomyopathie der jeweiligen Patientinnen/Patienten selektiert werden, sodass Gewebe von Patientinnen/Patienten untersucht wurde, bei denen verschiedene Ätiologien der Herzinsuffizienz vorgelegen hatten (vgl. Kapitel 4.1). Alle Patientinnen/Patienten, deren Gewebe im Rahmen dieser Studie verwendet wurde, hatten zuvor schriftlich ihr Einverständnis zur Verwendung ihres Myokards zu wissenschaftlichen Zwecken erklärt.

Die Entnahme eines linksventrikulären Myokardabschnitts wurde dabei unter sterilen Bedingungen direkt von den zuständigen Chirurgen (im Klinikum der Universität München) oder der kooperierenden AG Prof. Milting (im Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen, Erich-und-Hanna-Klessmann-Institut) durchgeführt. Direkt anschließend wurde die so gewonnene Probe wie unten beschrieben gelagert und transportiert.

Dieses Vorgehen wurde von der Ethikkommission des Klinikums der Universität München genehmigt (Projektnummer 063-12 vom 04.07.2012) und im Einklang mit der Deklaration von Helsinki bzw. deren späteren Revisionen durchgeführt.

3.1.1.2 *Primatenmyokard als nicht insuffizientes Vergleichsmodell*

Das verwendete Primatenmyokard stammte aus den explantierten Herzen von Pavianen, deren Herztransplantation Teil eines Xenotransplantationsprojekts (AG Kardiale Xenotransplantation, TRR 127, DFG) war. Diese Operationen wurden von der Arbeitsgruppe von PD Dr. Abicht im Walter-Brendel-Zentrum München durchgeführt, die Gewebeentnahme für das vorliegende Projekt erfolgte durch den jeweils explantierenden Chirurgen.

3.1.2 Transport und Lagerung des Gewebes

Im unmittelbaren Anschluss an die Probengewinnung wurden die Myokardproben in ca. 70 ml 4 °C kalte Transportlösung gegeben. Diese Pufferlösung (eine modifizierte Tyrode-Lösung) enthielt 136 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0,33 mM NaH₂PO₄, 10 mM Glukose, 0,9 mM CaCl₂, 30 mM 2,3-Diacetylmonoxim sowie 5 mM HEPES und wurde konstant bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 stabilisiert [74]. In dieser Pufferlösung wurde das Myokard bis zur weiteren Verwendung gelagert. Wie Fischer et al. [74] zeigen, ist eine Lagerung auf diese Art und Weise bei 4 °C bis zu 36 h nach Entnahme des Gewebes möglich. Dies ermöglichte den Transport auf Eis per Standard-Übernacht-Kurier vom Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen nach München in das Walter-Brendel-Zentrum. Die Proben aus dem Klinikum der Universität München und der Xenotransplantationsgruppe des Walter-Brendel-Zentrums wurden bis zur Verarbeitung in einem Kühlschrank bei 4 °C gelagert und dann persönlich abgeholt.

3.1.3 Präparation der Myokard-Slices

Die Herzgewebeproben wurden wie bei Fischer et al. [74], Hamers et al. [71] und Brandenburger et al. [73] beschrieben präpariert.

Diese gesamte Präparation der Myokard-Slices wurde unter sterilen Bedingungen in der oben beschriebenen 4 °C-kalten Pufferlösung durchgeführt.

Zunächst wurde vom vorliegenden Herzgewebe soweit möglich mit Pinzette und Schere die gesamte endokardiale Trabekelschicht abgetragen und epikardial gelegenes Fett entfernt, sodass das reine Myokard wie in Abbildung 1 (a) gezeigt übrigblieb.

Anschließend wurde das Gewebestück mittels vierer Kanülen auf ein kleines Stück Gummi fixiert (Abbildung 1 (b)) und mit einer Rasierklinge ein Gewebeblock mit einer Grundfläche von ca. 8x8 mm aus der Probe herausgeschnitten (Abbildung 1 (c), (d)). Dabei wurden die Ränder des ursprünglichen Stückes gemieden, um durch den chirurgischen Schneideprozess möglicherweise geschädigte Myokardabschnitte nicht zu verwenden. Ein solcher Myokard-Quader wurde nun in vierprozentige in oben beschriebener Pufferlösung gelöste schnell schmelzende Agarose eingebettet und diese durch Abkühlung zum Aushärten gebracht, sodass bei Verwendung von zwei Myokardstücken das in Abbildung 1 (e) gezeigte Ergebnis entstand.

Dieser Myokard-Agarose-Quader wurde nun mittels Histoacryl® -Gewebekleber (B.Braun) mit der epikardialen Seite auf den Schneideteller eines Schneidegeräts (Vibratom VT1200S von Leica Biosystems) geklebt (vgl. Abbildung 2 (a)). Meist konnten zwei Gewebelöcke des gleichen Herzens parallel fixiert werden. Der Teller wurde nun mit den darauf befindlichen Agarose-Blöcken in das 4 °C kalte Schneidebad des Vibratoms transferiert, das mit oben beschriebener Pufferlösung gefüllt war. Die Temperatur wurde durch eine kontinuierliche Kühlung des Schneidebads mithilfe einer dauerhaften Wandperfusion des Beckens mit 4 °C kaltem Wasser konstant gehalten.

So konnte das Myokard tangential von endo- nach epikardial fortschreitend geschnitten werden (Abbildung 2 (b)). Die Schichtdicke betrug jeweils 300 µm, die Vorschubgeschwindigkeit der in das Gerät eingespannten Rasierklinge (Gillette® Silver Blue™) betrug 0,07 mm/s. Die so entstandenen

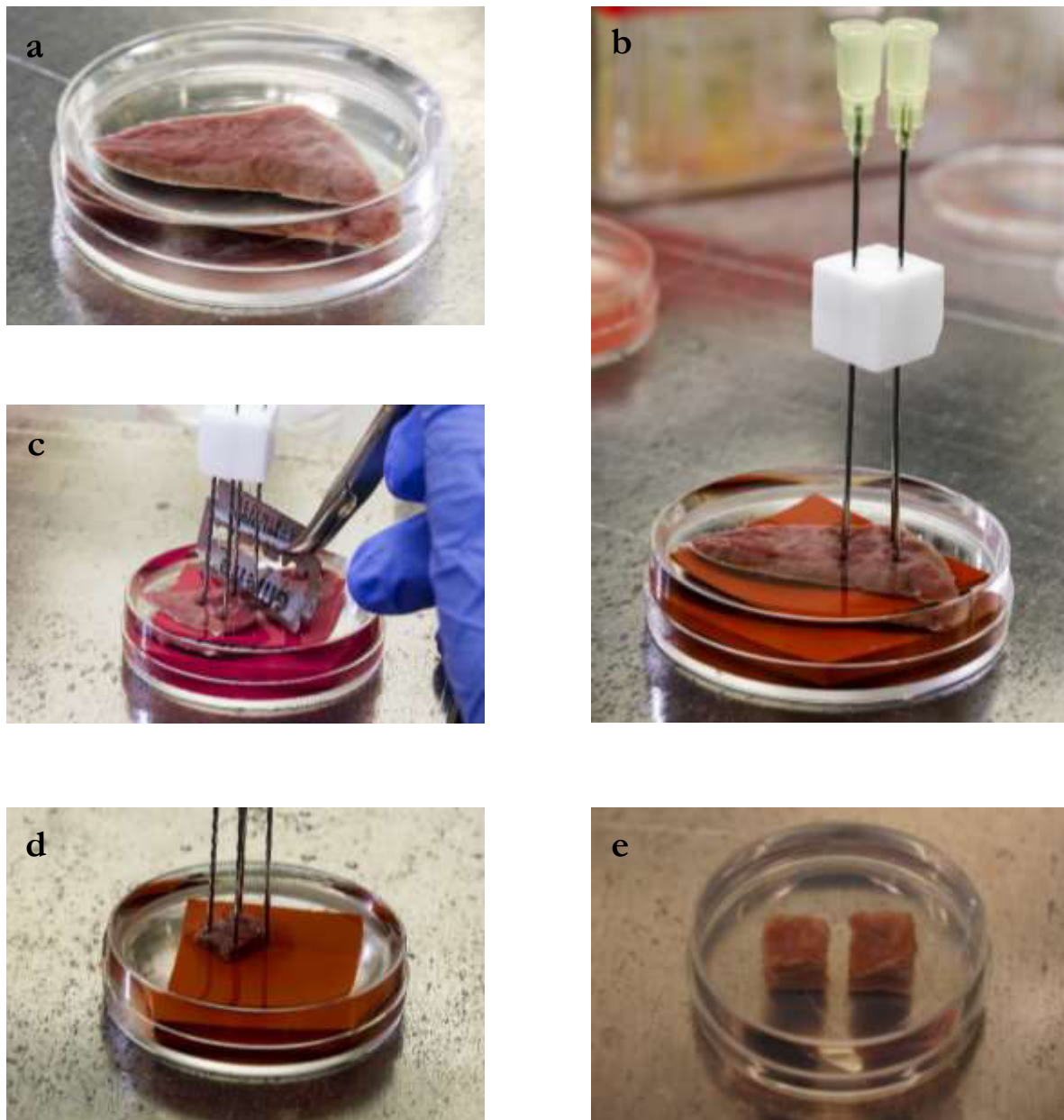


Abbildung 1 Präparation des Myokards: Frisches Myokard (a) wird mithilfe mehrerer Kanülen in definiertem Abstand auf ein Gummistück fixiert (b) und mithilfe einer Rasierklinge zugeschnitten (c). Der entstehende Myokardblock (d) wird in Agarose eingebettet (e), meist zusammen mit einem zweiten. Abbildungen modifiziert nach Fischer et al. [74], aufgenommen von Prof. A. Dendorfer

Myokard-Slices konnten, wie in der Abbildung erkennbar, zunächst in der Agarose-Einbettung in der gekühlten Schneidewanne belassen werden.

Zur Vorbereitung zur Kultivierung der Gewebeschnitte wurden diese außerhalb der Lösung auf dem Deckel einer Standard-Plastik-Kulturschale aus der Agarose gelöst (Abbildung 2 (c), (d)), wobei darauf geachtet wurde, das Gewebe möglichst wenig zu berühren oder zu strapazieren. Anschließend konnte solch ein Schnitt mittels einer kleinen Menge Histoacryl® an kleine sterilisierte Plastikdreiecke (aus der Kopierfolie MGW5504 von MGW Bürobedarf) mit vorgebohrten Löchern angeklebt werden (siehe Abbildung 2 (e)).

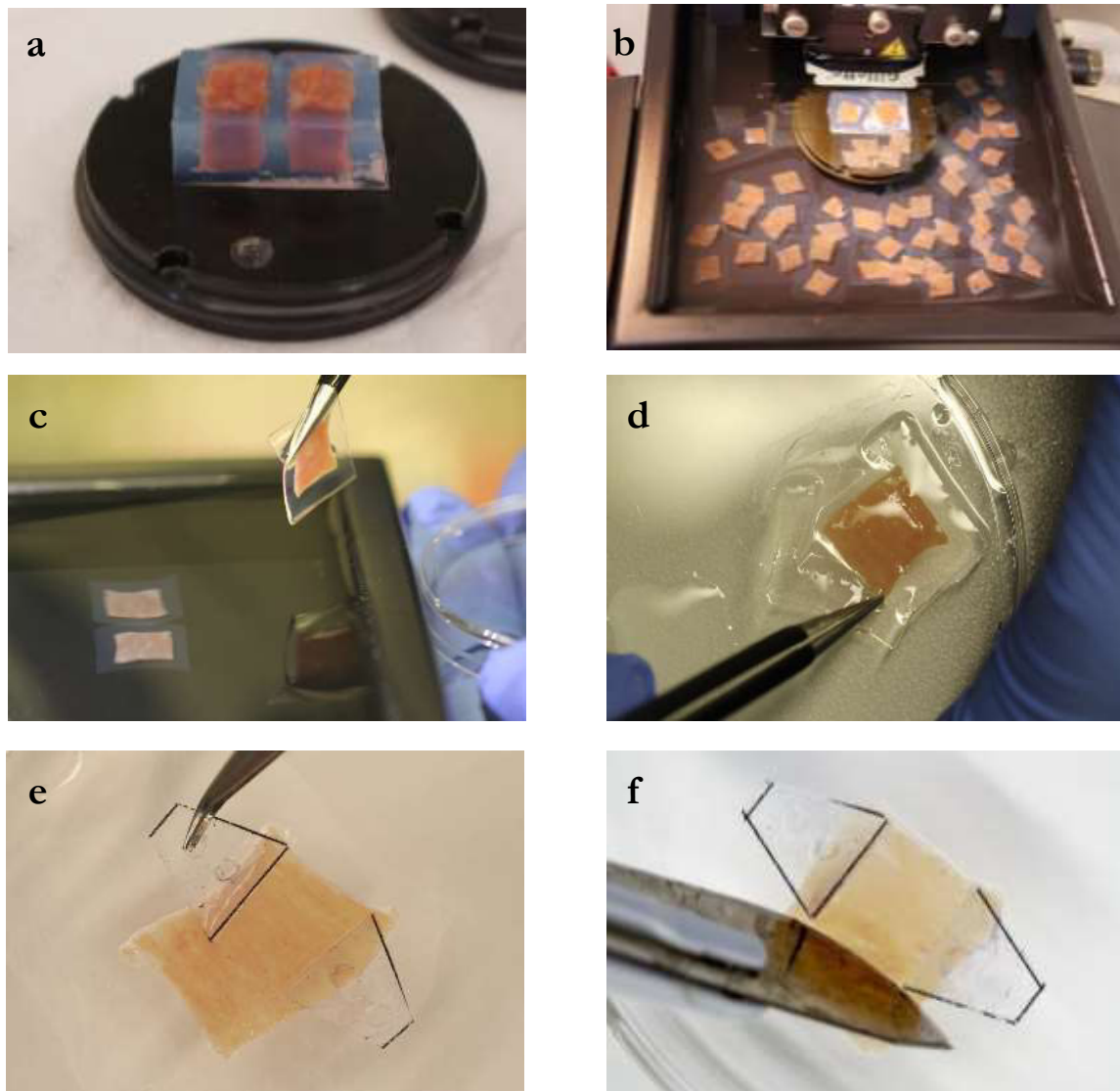


Abbildung 2 Schneiden des Gewebes und Vorbereitung zur Kultivierung: Die in Agarose eingebetteten Myokardquader werden mit Histoacryl® auf einen Schneideteller geklebt (a) und mithilfe eines Vibratoms in 300 µm dicke Slices geschnitten (b). Die Schnitte werden aus dem Schneidebad genommen (c) und von der Agarose befreit (d). Anschließend werden kleine Plastikdreiecke an das Gewebe geklebt (e) und überschüssiges Gewebe entfernt (f). Abbildungen modifiziert nach Fischer et al. [74], aufgenommen von Prof. A. Dendorfer

Dies erfolgte so, dass die Faserrichtung des Myokards möglichst parallel genau zwischen den beiden Dreiecken verlief, überstehendes Gewebe wurde mit einem Skalpell entfernt (Abbildung 2 (f)). Das Konstrukt wurde dann zurück in das Schneidebad gegeben. Dies ermöglichte die Lagerung der fertig präparierten Slices über wenige Stunden, sodass der Kulturbeginn für alle Präparate gleichzeitig erfolgen konnte.

Die so entstandenen, an die Dreiecke montierten Myokard-Schnitte konnten nun, wie Abbildung 3 zeigt, in die unten beschriebenen Kulturkammern transferiert werden.

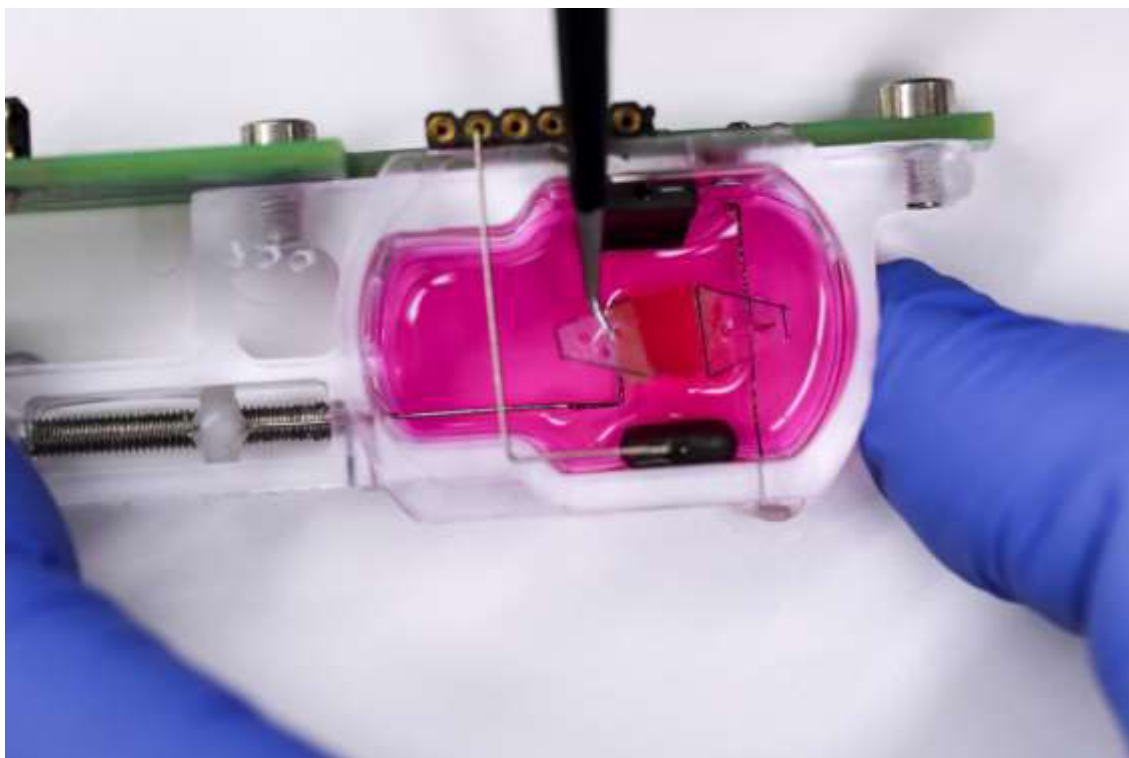


Abbildung 3 Einhängen eines Slices in die Kulturkammer, Bild aufgenommen von Prof. A. Dendorfer

3.1.4 Kulturtechnik

3.1.4.1 *Aufbau der Kulturkammern*

Die hier verwendeten Kulturkammern (vgl. zum Folgenden Abbildung 5) wurden aus Polystyrol spritzgegossen und waren wie folgt aufgebaut: Zur Aufhängung des Gewebe-Konstrukts (Abbildung 5 (3)) dienten auf der einen Seite ein dünner Federdraht (Federkonstante 75 N/m) (Abbildung 5 (1)), an dessen einem Ende ein kleiner Magnet festgeklebt war, und auf der anderen Seite ein Stahldraht (Abbildung 5 (4)), der über einen mit Silikon abgedichteten Kanal mit einer Schraubvorrichtung verbunden war. Über diese Schraube konnte der Stahldraht in seiner Länge reguliert werden und damit die Vorspannung des aufgehängten Präparats eingestellt werden. An den Seiten neben der Myokardprobe befanden sich kleine Graphitelektroden (Abbildung 5 (2)), die an Drähten befestigt waren, die aus der Kammer geleitet und an einer Platine befestigt werden konnten. Als Deckel wurden die Deckel von 25 mm-Kulturschalen verwendet. An die Kunststoffkammer wurde eine Platine (Abbildung 5 (5)) angeschraubt, die zur elektrischen Verbindung der Elektrodendrähte mit der Grundplatte diente. Die Platine enthielt auch einen Magnetsensor, der außerhalb der Kammer direkt gegenüber dem Magneten des Federdrahts zu liegen kam. Somit wurde die Messung der Auslenkung des Magneten über den Sensor und die Weiterleitung des Signals ermöglicht.

3.1.4.2 *Aufbau der Setup-Platten*

Als Grundlage einer Kultursetup-Platte diente eine Leiterplatte, die Anschlussmöglichkeiten für acht Kulturkammern bereithielt. Diese konnten über einfache Steckverbindungen mit der Platte verbunden werden (vgl. zum Folgenden Abbildung 4).

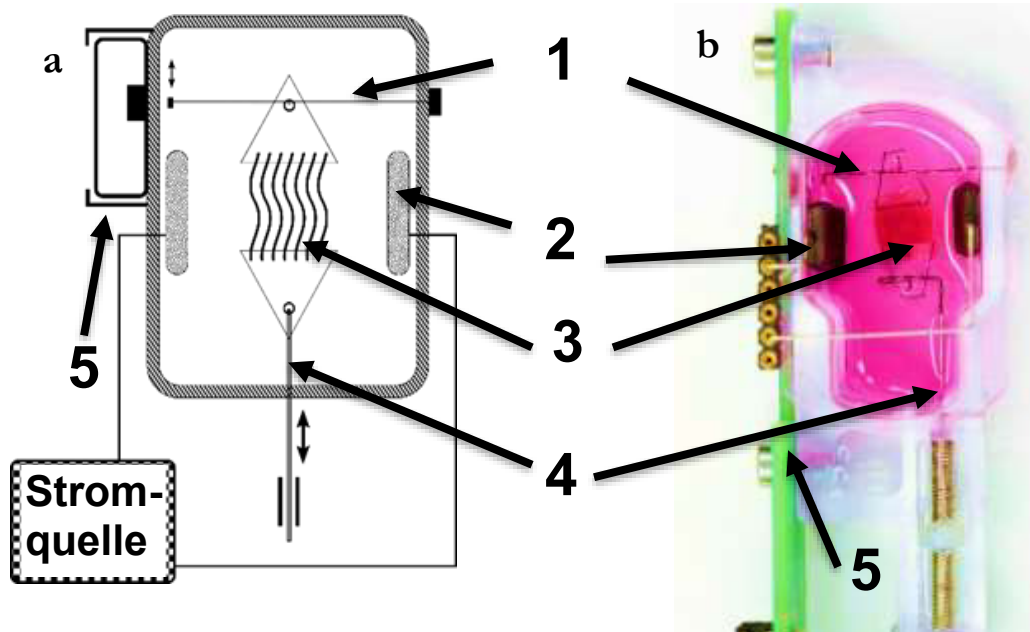


Abbildung 5 Aufbau der Kulturkammern in Schema (a) und Photo (b): Zwischen einem Federdraht mit Magnet am freien Ende (1) und einem starren längenregulierbaren Draht (4) wird der Slice mithilfe der Plastikdreiecke eingehängt (3). Die elektrische Stimulation erfolgt ausgehend von der Stromquelle über zwei Graphitelektroden (2) auf beiden Seiten des Gewebes, die an einer Platine (5) befestigt werden. Die Kammer ist mit Kulturmedium gefüllt. Abbildungen modifiziert nach Fischer et al. [74]

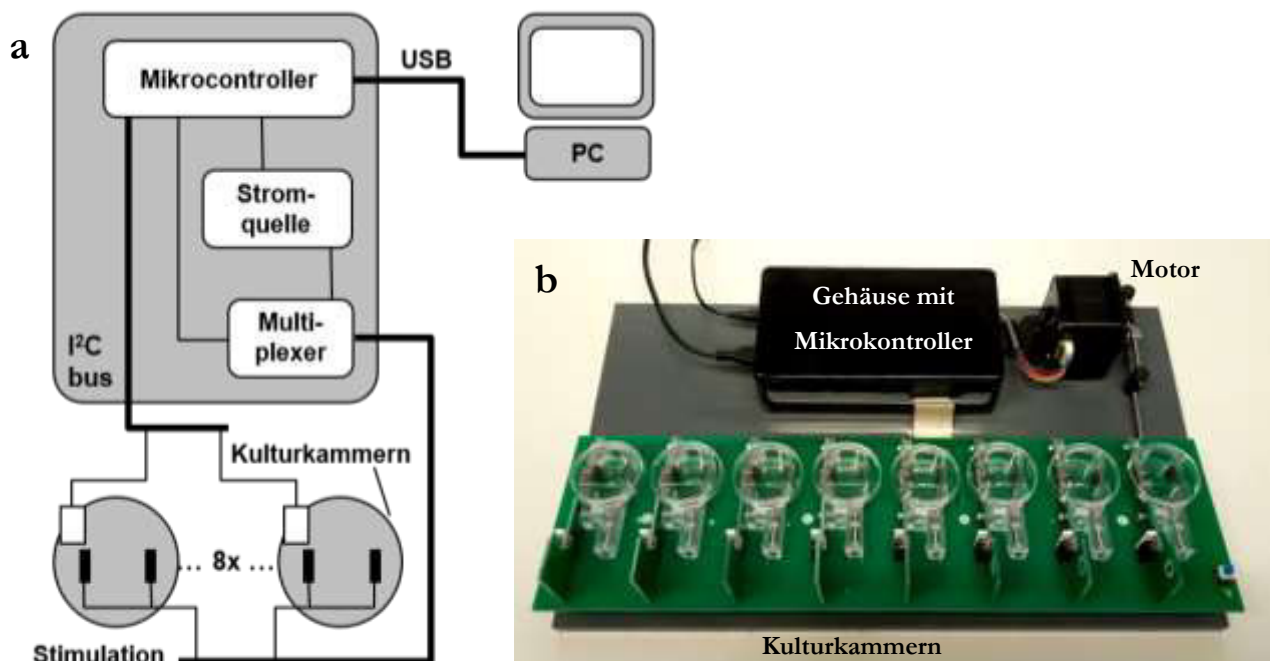


Abbildung 4 Aufbau des Kultur-Setups als Schema (a) und Photo (b): Die Kulturkammern werden auf eine Leiterplatte gesteckt und mit dieser elektrisch verbunden. Von dieser Platte aus führen Verbindungen über einen Mikrocontroller zu einem PC außerhalb des Brutschrankes und von diesem PC ebenfalls über den Mikrocontroller zu einer Stromquelle. Von dieser Stromquelle aus werden mithilfe eines Multiplexers die elektrischen Stimulationssimpulse für die Kammern abgegeben. Zudem befindet sich auf der Grundplatte ein Motor, der es mithilfe einer Stangenverbindung ermöglicht, die Leiterplatte mit den Kulturkammern alternierend zu kippen. Abbildung (a) modifiziert nach Fischer et al. [74]

Eine solche Platte wurde auf eine Konstruktion montiert, die es ermöglichte, die Platte kontinuierlich longitudinal zu kippen (Frequenz 1 Hz), um durch die Bewegung des Kulturmediums eine verbesserte Oxygenierung in den Kammern zu erreichen. Dieser Aufbau konnte nun in einen Zellkultur-Inkubator (Temperatur 37 °C, CO₂-Konzentration 5 %, O₂-Konzentration 20 %, Luftfeuchtigkeit 80 %) überführt werden.

Zur Registrierung der Signale aus den Kammern und zur kontrollierten elektrischen Stimulation der Präparate wurde auf der Basisplatte ein Mikrokontroller befestigt, von dem aus ein USB-Kabel aus dem Brutschrank herausgeleitet und mit einem externen Laptop verbunden werden konnte. Das Kabel zur Stromversorgung des Setups wurde mit diesem gemeinsam in den Schrank geleitet.

3.1.4.3 Die MyoDish-Software

Die in der AG Dendorfer des Walter-Brendel-Zentrums entworfene und programmierte MyoDish-Software ermöglichte eine kontinuierliche Messung der Kontraktionen der einzelnen Myokardschnitte und eine elektrische Stimulation derselben. Die Benutzeroberfläche bestand aus einer Kontrolleinheit (Abbildung 6 (a)) und drei Oszilloskop-Anzeige-Fenstern (Abbildung 6 (b)), in denen die Signale der Magnetsensoren graphisch dargestellt werden konnten. Über die Kontrolleinheit konnten sowohl eine komplette Speicherung der Rohdaten im .raw-Dateiformat als auch die Steuerung der elektrischen Stimulation der einzelnen Kulturkammern erfolgen. Dabei konnten einzelne Stimulationsparameter wie Frequenz oder Stromstärke und elektrische Pulsdauer eines bipolaren elektrischen Impulses variiert werden. Zudem war es möglich, ganze Stimulationsabläufe in Form einer in Excel erstellten .csv-Datei zur Variation dieser Parameter zu verwenden.

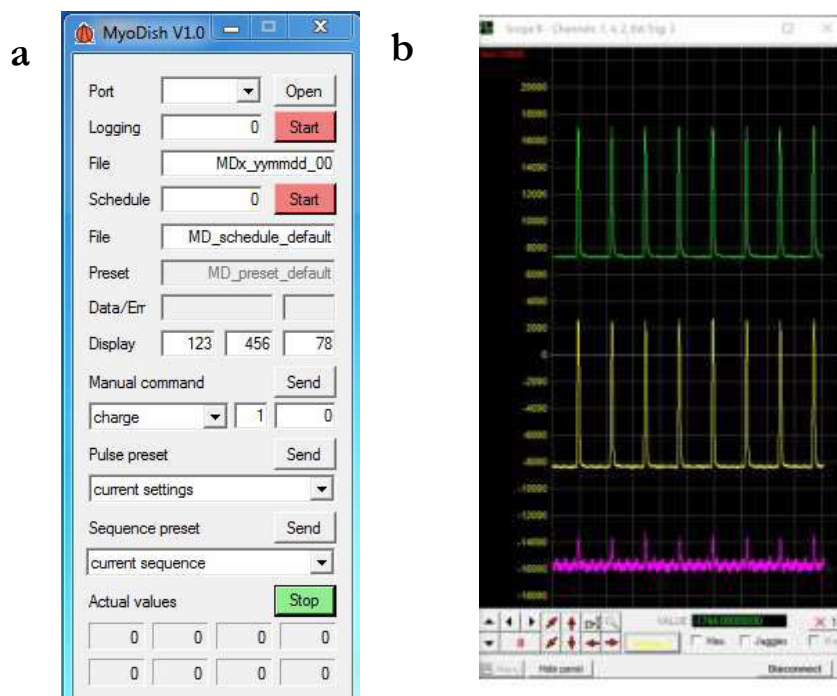


Abbildung 6 Das MyoDish-Programm: Bedienoberfläche (a) und eines der drei Oszilloskop-Fenster (Ausschnitt) (b). Die Bilder wurden von Prof. A. Dendorfer zur Verfügung gestellt.

3.1.4.4 *Beginn einer Myokardkultur*

Vor jeder neuen Myokardkultur wurden die Kulturkammern in 100 % Isopropanol gereinigt und die Graphitelektroden und Plastikdreiecke autoklaviert. Das Kulturmedium M199 wurde mit Insulin, Transferrin, Selen (ITS-G Supplement, Gibco®, Verdünnung 1:100 direkt in Kulturmedium), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) (Penicillin-Streptomycin, Sigma-Aldrich®) versetzt und bei 4 °C gelagert. Kurz vor dem Einsatz wurde β-Mercaptoethanol (50 µM, PanReac AppliChem) als Antioxidans zugesetzt und das Medium auf 37 °C erwärmt.

Nach der Reinigung der Kammern wurden diese zum beschriebenen Aufbau zusammengesetzt und mit je 2,4 ml Kulturmedium befüllt. So wurden sie in den Inkubator auf die oben vorgestellten Leiterplatten gestellt, um weiter vorgewärmt zu werden und mithilfe der CO₂-Konzentration im Brutschrank einen pH-Wert von 7,4 zu erreichen.

Nach der Präparation der Gewebekonstrukte wurden diese in die Kulturkammern überführt und dort ohne Vorspannung eingehängt. Nach dem Transfer der Kammer in den Brutschrank auf das Setup konnte die Vorspannung der Präparate auf jeweils 1 mN eingestellt werden. Es wurde sofort mit der elektrischen Stimulation des Gewebes mit 0,5 Hz begonnen. Jeder Stimulationsimpuls bestand aus zwei Einzelimpulsen (je 1 ms, 50 mA) mit gegensätzlicher Polarität, die durch eine Pause von 1 ms Dauer getrennt wurden. War dies nicht für eine gleichmäßige Stimulation ausreichend, wurde eine Stromstärke von 75 mA und ein Pulsablauf von 3 ms – 1 ms – 3 ms gewählt.

Auf diese Weise wurden alle Schnitte in die Kammern eingehängt und vorgespannt, anschließend folgte eine Adaptationsphase von 30-60 min Dauer, um die Gewebestücke an die neuen Bedingungen zu gewöhnen. Da in dieser Phase eine unterschiedlich starke tonische Hyperkontraktion zu beobachten war, wurden anschließend die Konstrukte wieder vollständig entspannt und erneut auf die definierte Vorspannung von 1 mN eingestellt.

3.1.4.5 *Aufrechterhaltung der Kultur*

Nach Überführung der Gewebeschnitte in die Kulturkammern konnte eine solche Kultur bis zu 4 Monate aufrecht erhalten werden [74]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Kulturdauer auf 21 (in einigen Fällen 22) Tage beschränkt. Dies geschah einerseits aus Kapazitätsgründen, andererseits hatte sich in vorhergehenden Untersuchungen gezeigt, dass ungefähr in diesem Zeitraum ein stabiler Zustand erreicht worden war.

Das Kulturmedium wurde alle zwei Tage gewechselt, dabei wurden jedoch nur 2/3 des Volumens, also 1,6 ml, ausgetauscht. Vorversuche [74] hatten gezeigt, dass dies eine ausreichende Nährstoffversorgung des Gewebes sicherstellen konnte, ohne das Myokard zu hohem Stress durch ein neues Milieu aussetzen. Dazu wurde M199, das bereits mit Insulin, Transferrin, Selen, Penicillin, Streptomycin und Mercaptoethanol in den oben genannten Dosierungen versetzt worden war, auf 37 °C angewärmt und jeweils 1,6 ml des Volumens in den Kammern ausgetauscht. Anschließend wurden, soweit erforderlich, wieder die gewünschten Substanzen je nach Kulturbedingungen zugesetzt, um die Konzentration dieser konstant zu halten.

An den Kulturtagen 1 (also dem Tag nach Beginn der Kultur), 3, 5 und 7 wurden die Präparate zudem auf die zuvor eingestellte Vorspannung nachjustiert, falls sich eine Entspannung des Gewebes zeigte.

3.1.4.6 *Ende der Kulturperiode*

Für weiterführende Untersuchungen an Myokard im initialen Kulturzustand nach 24 h wurden erste Proben der zu untersuchenden Bedingungen nach diesem Zeitraum entnommen. Dafür wurde das Gewebe zunächst noch einmal auf die ursprünglich eingestellte Vorspannung justiert, anschließend aus dem Brutschrank entnommen und vollständig entspannt, um die Entnahme zu ermöglichen. Nach Abtrennen der Plasticaufhängungen wurden die Schnitte unverzüglich bei -80 °C eingefroren und damit für die weiteren Analysen konserviert. Mit der gleichen Vorgehensweise wurden zum Kulturrende auch die länger kultivierten Myokardproben behandelt, das Nachjustieren auf die ursprüngliche Vorspannung entfiel hierbei jedoch.

3.1.4.7 *Umgang mit auftretenden Problemen*

Im Laufe der vorliegenden Arbeit bestanden zum einen technische Schwierigkeiten, die durch Software- oder Hardware-Überarbeitungen zu beheben waren, zum anderen typische Herausforderungen der Zell- und Gewebekultur: Konnte einer Besiedlung durch Bakterien durch steriles Arbeiten und dem Zusatz von Penicillin/Streptomycin zum Kulturmedium entgegengewirkt werden, so war dies bei Pilzen nicht der Fall. Da auf einen generellen Zusatz von Antimykotika verzichtet wurde und einzelne Bestandteile der Kulturkammern (beispielsweise der Magnet am Ende des flexiblen Drahtes) in den verwendeten Versionen nicht autoklavierbar waren, kam es in einigen Präparaten zu einer Pilzbesiedlung. Bei erkennbarem Pilzbefall wurden die entsprechenden Präparate verworfen und die Kultur nicht betroffener Slices der gleichen Präparation unter Zusatz von Amphotericin B (0,25 µg/ml, Antibiotic Antimycotic Solution, Sigma-Aldrich®, Verdünnung 1:100, Einsatz anstatt des Penicillin-Streptomycin-Supplements) fortgesetzt. So behandelte Proben wurden, sofern ein sichtbarer Pilzbefall ausblieb, in der Auswertung berücksichtigt.

3.1.5 Möglichkeiten zur Variation der Kulturbedingungen

3.1.5.1 *Variation mittels Substanzzugabe*

Um verschiedene Kulturbedingungen zu schaffen, wurden den Kulturkammern verschiedene unten beschriebene Substanzen zugesetzt. Diese wurden (wenn nicht anderes angegeben) mit dem Lösungsmittel DMSO auf eine Konzentration von 10 mM gelöst und als Stammlösung bei -80 °C gelagert, anschließend in PBS (phosphatgepufferte physiologische Salzlösung) auf die 1000-fache Konzentration der gewünschten vorverdünnt und dem Medium dann in einer 1:1000-Verdünnung zugesetzt. Die Endkonzentration von DMSO lag dadurch bei 0,1 %. Die Lagerung der Vorverdünnungen erfolgte bei -20 °C, diese wurden jeweils vor Verwendung aufgetaut und erwärmt. Der Zusatz der Substanzen erfolgte zu Beginn der Kultur nach 60-90 min Kulturdauer oder nach 20 h Kulturdauer bei den spät beginnenden Behandlungen. Zudem wurde nach jedem Mediumwechsel 2/3 der ursprünglichen Menge ergänzt, um die gewünschte Konzentration der Substanz aufrecht zu erhalten.

3.1.6 Verwendete Kulturbedingungen

3.1.6.1 Kontrollgruppen

Vor Beginn der Kultur wurden je ein Gewebestück und einige Gewebeschnitte kryokonserviert. Kontrollpräparate wurden immer in möglichst großer Zahl mitkultiviert, sodass auch bei jedem geplanten Entnahmezeitpunkt für behandelte Proben ein Kontroll-Gewebestück mit entnommen werden konnte. Für diese Proben wurden keine zusätzlichen Substanzen zugesetzt.

3.1.6.2 β_1 -Stimulation

Zur β_1 -adrenergen Stimulation des Myokards wurde die in einigen Ländern, z.B. Japan [122], auch klinisch eingesetzte Substanz Denopamin (CAS 71771-90-9, Sigma-Aldrich®) verwendet. Denopamin ist ein sehr selektiver β_1 -Agonist mit wenig Wirkung auf β_2 - und β_3 -Rezeptoren [123], zeigt im Vergleich zu Isoproterenol jedoch nur einen Partialagonismus [124].

Eingesetzt wurden folgende Endkonzentrationen: 1000 nM; 100 nM.

In einer Gruppe wurden diese Bedingungen direkt 60-90 min nach Kulturbeginn gestartet, in einer weiteren erst nach ungefähr 20 h Kulturdauer sowie der ersten Nachjustierung der Vorspannung.

Als Negativkontrolle wurde eine mit einem β -Blocker (Metoprolol 100 nM; Sigma-Aldrich®) inkubierte Kammer mitgeführt, wobei hier Lösung und Verdünnung der Substanz in M199 erfolgt war.

3.1.7 Datenerhebung

3.1.7.1 Kontinuierliche Kraftmessung

Über die oben beschriebene Konstruktion der Kulturkammern konnte eine kontinuierliche elektrische Stimulation des eingespannten Myokards und eine ebenso kontinuierliche Messung der Auslenkung des Magneten und damit der erzeugten Kraft erfolgen. Dies geschah mit einer Messfrequenz von 500 Datenpunkten pro Sekunde. Die so aufgezeichneten Kraftabläufe konnten einerseits simultan an einem Bildschirm visualisiert und andererseits als .raw-Datei abgespeichert werden. Aus den Kurven der Magnetauslenkung konnte durch Messung der Amplitude einfach die Kontraktionskraft abgelesen werden. Nach entsprechender Eichung der Kulturkammern konnten die Messwerte für die Kontraktionskraft in mN abgelesen werden. Somit war es möglich, über mehrere Tage und Wochen eine fortlaufende Darstellung der Kontraktionskraft der Myokardproben zu erhalten. Auf diese Weise konnten sowohl die langfristige Kraftentwicklung über diesen Zeitraum als auch kurzfristige Effekte nach beispielsweise Mediumwechseln oder sogar einzelne Kontraktionen des Gewebes beurteilt werden. Kurzfristige Pausen in der Registrierung kamen durch das Beenden einer Datei und Start einer neuen oder in einzelnen Fällen durch technische Defekte zustande.

3.1.7.2 Stimulationsprotokolle

Der Einbau eines Mikrocontrollers ermöglichte nicht nur die gezielte fortlaufende Stimulation der Präparate mit den gewünschten Stimulationsimpulsparametern und Frequenz, sondern auch die Programmierung einzelner Impulse oder Frequenzabläufe. Über die Verwendung von .csv-Dateien konnten auch längere und deutlich komplexere Abläufe von Stimulationsimpulsen programmiert werden. Diese

programmierten Änderungsabläufe der Stimulation sollen im Folgenden als Stimulationsprotokoll bezeichnet werden. Das hier verwendete Protokoll enthält die Messung vierer wichtiger Parameter zur Charakterisierung der Myokardfunktion:

- (1) Die Refraktärzeit, also die Zeit, in der nach einer erfolgten Kontraktion keine erneute Kontraktion der Myozyten auslösbar war
- (2) Die Reizschwelle, also die elektrische Stromstärke, die nötig war, um eine Kontraktion auszulösen
- (3) Die sog. Kraft-Frequenz-Abhängigkeit (auch Force-Frequency-Relationship genannt, kurz FFR), also eine Messung der Kontraktionskraft bei verschiedenen Simulationsfrequenzen
- (4) Die maximal mögliche Frequenz, bei der eine 1:1-Umsetzung von einer Kontraktion pro Stimulationsimpuls erfolgen konnte

Um eine engmaschige Erhebung dieser Parameter zu erreichen und gleichzeitig das Gewebe nicht zu hohen Belastungen durch zu häufiges Durchlaufen dieses Ablaufs auszusetzen, wurde dieses Protokoll alle 24 h durchgeführt. Dabei wurde vor jedem Mediumwechsel (also ca. alle 48 h) manuell ein Programm gestartet, das das Stimulationsprotokoll sofort und erneut exakt 24 h später startete. Der unten beschriebene Ablauf des Protokolls beanspruchte jeweils eine Dauer von ca. 37 min.

Aus technischen Gründen wurden diese Stimulationsprotokolle mit einer Grundfrequenz von 0,2 Hz durchgeführt. Um Effekte des Frequenzwechsels auszuschließen, wurde zu Beginn jedes Stimulationsprotokolls eine dreiminütige Gewöhnungsphase mit 0,2 Hz einprogrammiert. Abbildung 7 zeigt als Übersicht den Ablauf eines solchen Protokolls.

3.1.7.2.1 Refraktärzeit

Unter der Refraktärzeit wird die Zeit verstanden, in der ein Kardiomyozyt nach erfolgter Stimulation und Kontraktion durch Blockade der Ionenkanäle absolut unerregbar ist (absolute Refraktärzeit) oder nur durch stark überschwellige Stimulation erregbar ist (relative Refraktärzeit). Um diese Zeit messen zu können, wurden im hier verwendeten Versuchsaufbau bei gleichbleibenden elektrischen Pulseigenschaften zwei Impulse kurz nacheinander abgegeben, zu Beginn mit einem Abstand von 1 s. Die grundsätzliche Frequenz blieb dabei stabil bei 0,2 Hz (vergleiche Abbildung 8). Nach je 30 s wurde nun der Abstand zwischen erstem und zweitem Impuls jeweils verringert, bis nach 12,5 min ein Abstand von 0,2 s erreicht war (siehe Abbildung 7 und Tabelle 2).

3.1.7.2.2 Reizschwelle

Nach der Messung der Refraktärzeit wurde die elektrische Reizschwelle des Gewebes bestimmt. Dazu wurde bei sonst gleichbleibenden Bedingungen die Stromstärke auf 0 mA gesetzt, 30 s später dann auf 10 mA. Anschließend wurde die Stromstärke alle 30 s um 2,5 mA gesteigert, bis nach ca. 14 min ein Wert von 80 mA erreicht war (siehe Abbildung 7 und Tabelle 3).

3.1.7.2.3 Kraft-Frequenz-Abhängigkeit und Maximalfrequenz

Zur Bestimmung der Kraft-Frequenz-Abhängigkeit und der Maximalfrequenz war eine Steigerung der Stimulationsfrequenz nötig. Alle anderen Parameter wurden konstant belassen. Die Steigerung erfolgte dabei nach dem in Tabelle 4 gezeigten Schema. Für die höheren Frequenzen wurden dabei kürzere

Zeitintervalle gewählt, um das Gewebe nicht zu überlasten. Nach Ende dieses Abschnitts des Protokolls wurden die Stimulationsparameter auf die vor Protokollstart verwendeten Ausgangswerte zurückgesetzt.

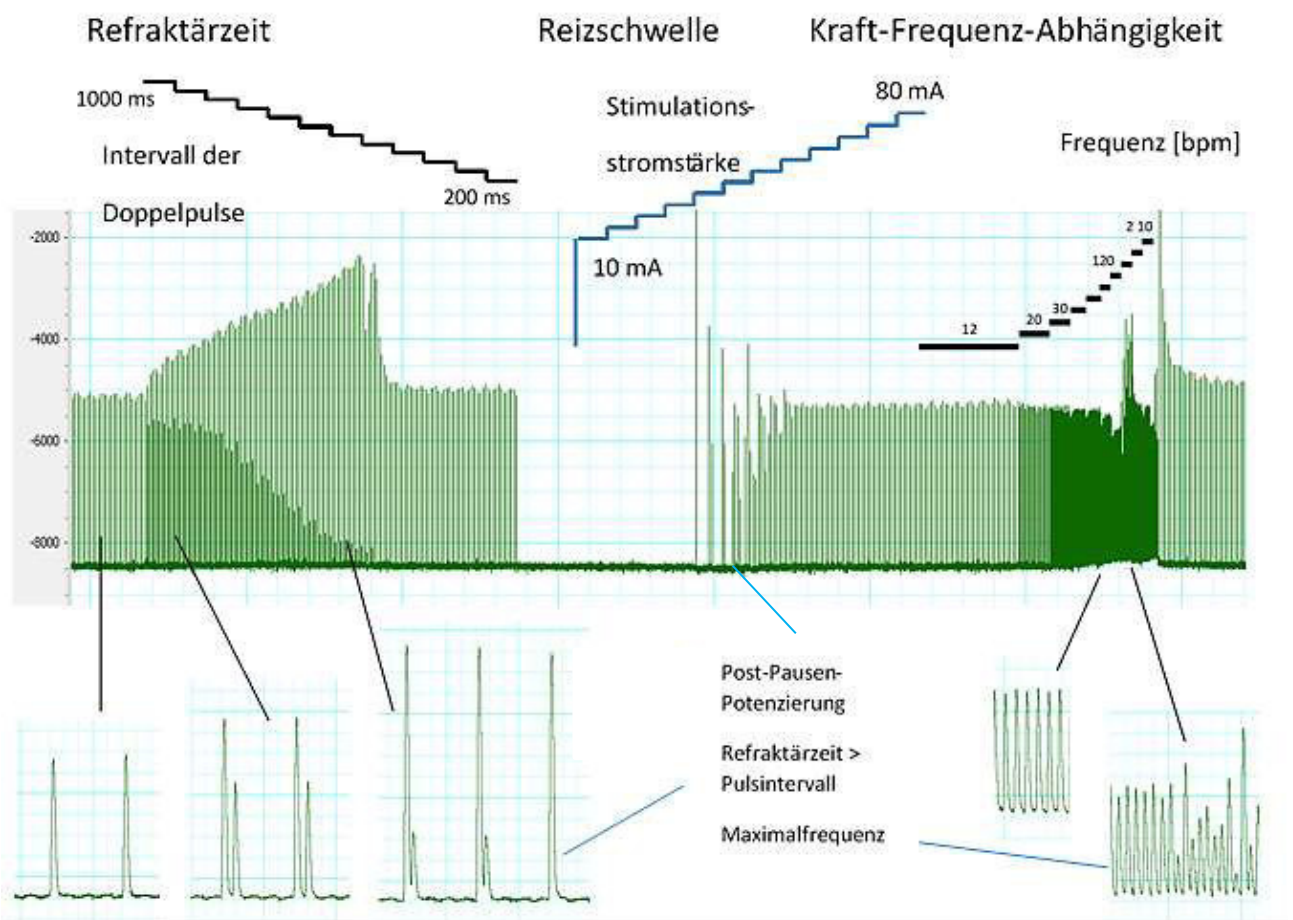


Abbildung 7 Veranschaulichung des Ablaufs eines Stimulationsprotokolls: Darstellung des zeitlichen Ablaufs eines Stimulationsprotokolls anhand einer beispielhaften Kontraktionskraftdarstellung eines Myokardschnitts. Als erstes wird mithilfe von immer näher zusammenrückenden Doppelpulsen die Refraktärzeit bestimmt, anschließend mittels schrittweiser Steigerung der Stromstärke nach einer kurzen Phase ohne Stimulation die elektrische Reizschwelle. Zuletzt folgt die Messung der Kraft-Frequenz-Abhängigkeit und der Maximalfrequenz durch stufenweise Steigerung der Stimulationsfrequenz. Abbildung zur Verfügung gestellt von Prof. A. Dendorfer, leicht modifiziert.

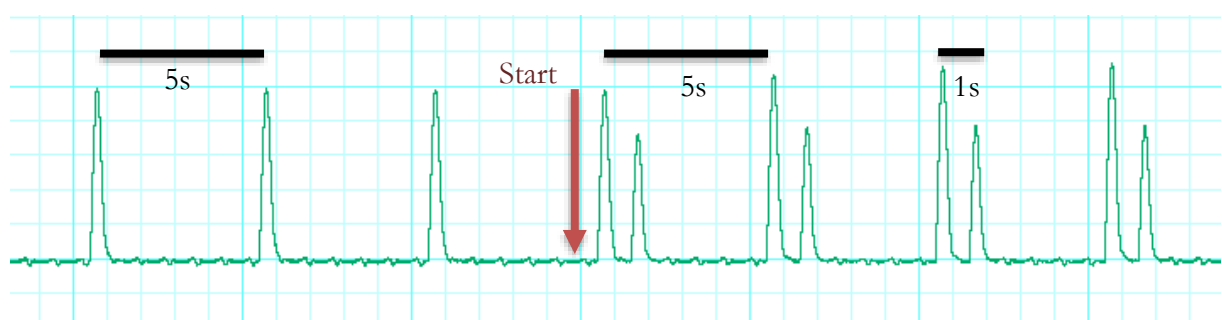


Abbildung 8 Start der Refraktärzeitbestimmung: Nach einer Eingewöhnungsphase bei 0,2 Hz beginnen die Doppelpulse mit einem Abstand von je 1 s bei gleichbleibender Grundfrequenz von 0,2 Hz. Im Verlauf wird der Abstand zwischen den Doppelpulsen immer geringer, bis der zweite Impuls nicht mehr zu einer Kontraktion führt, also der Abstand die Refraktärzeit unterschreitet.

| Refraktärzeit | |
|------------------------------------|-----------------|
| Zeit seit Protokollbeginn (min) | Abstand (ms) |
| 3:00 | 1000 |
| 3:30 | 900 |
| 4:00 | 850 |
| 4:30 | 800 |
| 5:00 | 750 |
| 5:30 | 700 |
| 6:00 | 675 |
| 6:30 | 650 |
| 7:00 | 625 |
| 7:30 | 600 |
| 8:00 | 575 |
| 8:30 | 550 |
| 9:00 | 525 |
| 9:30 | 500 |
| 10:00 | 475 |
| 10:30 | 450 |
| 11:00 | 425 |
| 11:30 | 400 |
| 12:00 | 375 |
| 12:30 | 350 |
| 13:00 | 325 |
| 13:30 | 300 |
| 14:00 | 275 |
| 14:30 | 250 |
| 15:00 | 225 |
| 15:30 | 200 |

Tabelle 2 Stufen der Abstände zwischen den Doppelimpulsen der Refraktärzeitbestimmung im Zeitablauf des Stimulationsprotokolls

| Reizschwelle | |
|------------------------------------|--------------------|
| Zeit seit Protokollbeginn (min) | Reizstärke (mA) |
| 16:30 | 0,0 |
| 17:00 | 10,0 |
| 17:30 | 12,5 |
| 18:00 | 15,0 |
| 18:30 | 17,5 |
| 19:00 | 20,0 |
| 19:30 | 22,5 |
| 20:00 | 25,0 |
| 20:30 | 27,5 |
| 21:00 | 30,0 |
| 21:30 | 32,5 |
| 22:00 | 35,0 |
| 22:30 | 37,5 |
| 23:00 | 40,0 |
| 23:30 | 42,5 |
| 24:00 | 45,0 |
| 24:30 | 47,5 |
| 25:00 | 50,0 |
| 25:30 | 52,5 |
| 26:00 | 55,0 |
| 26:30 | 57,5 |
| 27:00 | 60,0 |
| 27:30 | 62,5 |
| 28:00 | 65,0 |
| 28:30 | 67,5 |
| 29:00 | 70,0 |
| 29:30 | 72,5 |
| 30:00 | 75,0 |
| 30:30 | 77,5 |
| 31:00 | 80,0 |

Tabelle 3 Stufen der Anhebung der Reizstärke im Zeitablauf des Stimulationsprotokolls

| Kraft-Frequenz-Abhängigkeit | | | |
|------------------------------------|------------------------|---------------|-----|
| Schritt | Dauer des Schritts (s) | Frequenz (Hz) | bpm |
| 1 | 60 | 0,20 | 12 |
| 2 | 60 | 0,33 | 20 |
| 3 | 40 | 0,50 | 30 |
| 4 | 30 | 0,75 | 45 |
| 5 | 30 | 1,00 | 60 |
| 6 | 20 | 1,33 | 80 |
| 7 | 20 | 1,67 | 100 |
| 8 | 20 | 2,00 | 120 |
| 9 | 20 | 2,50 | 150 |
| 10 | 15 | 3,00 | 180 |
| 11 | 15 | 3,50 | 210 |

Tabelle 4 Schritte der Anhebung der Stimulationsfrequenz in Hz und bpm (beats per minute, also Schläge pro Minute)

3.1.8 Analyse der Daten

3.1.8.1 Probenselektion

Eine erste Probenselektion erfolgte im Rahmen der Gewebepräparation: es konnte aus Kapazitätsgründen nicht jedes verfügbare Gewebe präpariert werden und es wurden aus vielen angefertigten Myokard-slices die makroskopisch homogenen mit dem größten Anteil an reinem Myokard (also mit wenig Fibrose oder Gefäßanschnitten) ausgewählt. Zudem wurden in die Auswertung nur die Daten von Proben einbezogen, die bis zum Ende der angestrebten 21-tägigen Kulturdauer auf jeden Stimulationsimpuls hin messbare Kontraktionen ($\geq 0,1$ mN) zeigten.

Im Rahmen der Auswertung der Proben wurde eine Selektion anhand der vorhandenen Behandlungsbedingungen nötig, da nicht zu jeder Patientenprobe Daten zu allen geplanten Kulturbedingungen vorhanden waren. Dabei wurden Myokardproben ausgeschlossen, zu denen nur Daten von behandelten Präparaten ohne unbehandelten Schnitt als Vergleich vorlagen.

Diese Kriterien galten für die Auswertung des Kraftverlaufs und der Parameter aus den Stimulationsprotokollen, wobei für letztere darauf geachtet wurde, dass für die Proben auch die Daten der Kontraktionskraft Berücksichtigung gefunden hatten.

3.1.8.2 Visualisierung der Daten

Zur Betrachtung und Auswertung der Daten wurden die erzeugten .raw-Dateien mittels einer in der AG Dendorfer am Walter-Brendel-Zentrum entwickelten Software (MakeADIBin) in .bin-Dateien umgewandelt, wobei eine Komprimierung der Daten um den Faktor fünf (durch Medianbildung über je fünf Messwerte) erfolgte. Dabei war es möglich, auch mehrere ursprüngliche Dateien aneinanderzufügen und damit einen längeren Zeitverlauf fortlaufend darzustellen. Die so erzeugten Dateien konnten

mit der Open-Source-Version des Programms LabChart®Reader von ADInstruments angezeigt und ausgewertet werden.

3.1.8.3 Auswertung des Kraftverlaufs

Einerseits konnte der Kraftverlauf der Myokardschnitte über einen längeren Zeitraum direkt im LabChart®-Reader-Programm visualisiert werden (Abbildung 9), andererseits wurde die entwickelte Kontraktionskraft zu definierten Zeitpunkten nochmals manuell mithilfe des Programms vermessen und quantifiziert. Dies erfolgte wie in Abbildung 10 gezeigt. Als Zeitschema wurde dabei das in Tabelle 5 gezeigte verwendet. Dabei wurden in Zeiträumen, in denen sich in Vorversuchen große Änderungen der Kontraktionskraft gezeigt hatten, die Messzeitpunkte enger gewählt. Um zu vermeiden, dass durch die Vermessung einzelner Kontraktionen Verzerrungen oder Verfälschungen entstanden, wurde pro Messung jeweils der Mittelwert über eine stabile Phase von ca. 40 Minuten gebildet. Soweit möglich, wurde der Messzeitpunkt dabei vor und nicht nach einem Mediumwechsel gewählt, um Einflüsse durch die damit einhergehende Milieuveränderung und Gewebebelastung auszuschließen.

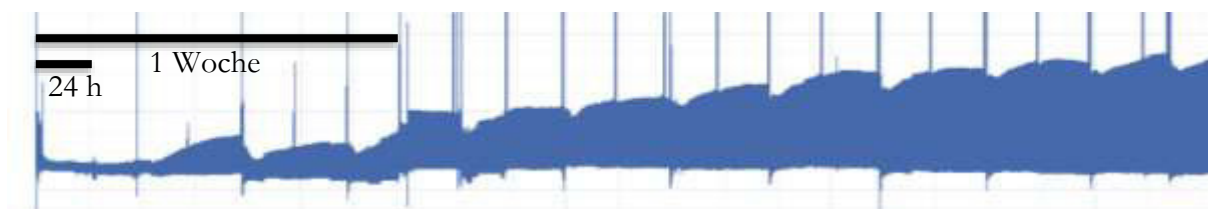


Abbildung 9 Beispielhafte Darstellung des Kraftverlaufs eines Myokardschnitts über einen Zeitraum von drei Wochen. Die erkennbaren hohen Peaks entstehen durch die Entnahme einer Kulturkammer zum Mediumwechsel.

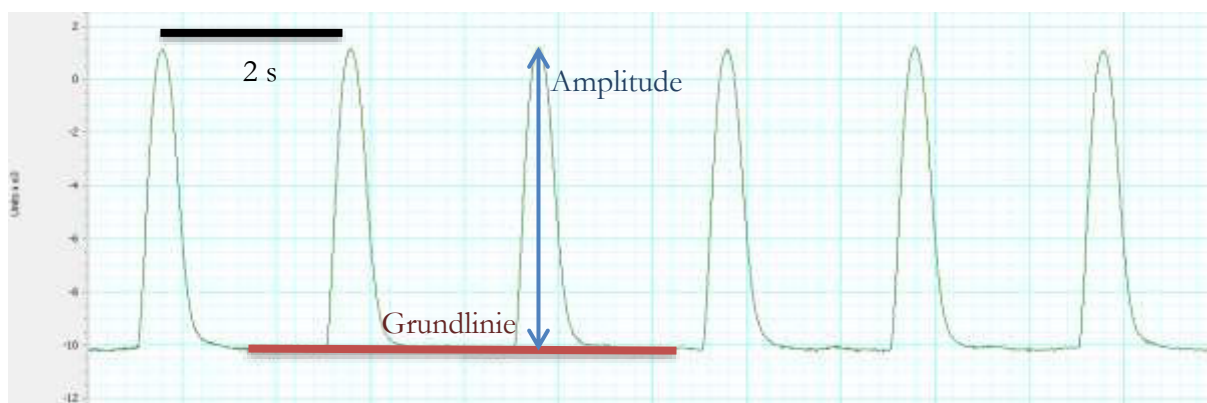


Abbildung 10 Veranschaulichung des Ausmessens der Kontraktionskraft: Angezeigt wurden als Ordinate im LabChart®Reader-Programm zunächst Units, die μN entsprachen und in der weiteren Datenanalyse in mN umgerechnet wurden

| Kraftmessung | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|---|---|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Zeitpunkt | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| Zeit seit Kulturbeginn (h) | 0 | 6 | 12 | 18 | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 | 144 | 168 | 216 | 264 | 312 | 360 | 408 | 456 | 504 |

Tabelle 5 Zeitpunkte, zu denen die Kontraktionskraft in der Aufzeichnung mithilfe des Programms LabChart®Reader vermessen wurde.

3.1.8.4 Auswertung der Stimulationsprotokolle

3.1.8.4.1 Refraktärzeit

Zur Bestimmung der Refraktärzeit wurden immer näher zusammenrückende Doppelimpulse verwendet. Um nun den Wert der Refraktärzeit zu ermitteln, wurde der Zeitpunkt in der Datenregistrierung gesucht, an dem der doppelte Stimulationsimpuls keine doppelte Kontraktion des Gewebes mehr auslösen konnte. Anhand des Zeitablaufs aus Tabelle 2 konnte der entsprechende Abstand zwischen den zwei Impulsen abgelesen werden, der ungefähr der Refraktärzeit des Gewebes entsprach. Dabei wurde eine im Vergleich zum Ruhezustand verbreiterte Kontraktion mit „Schulter“ (ein Beispiel zeigt Abbildung 11) als noch nicht refraktär gewertet, eine einzige Doppelkontraktion zu Beginn eines neuen Abstandes jedoch gerade noch als refraktär akzeptiert. Diese Messung wurde bei jedem regulären Stimulationsprotokoll (alle 24 h) durchgeführt.



Abbildung 11 Auswertung der Refraktärzeitbestimmung: Während die links gezeigte Doppelstimulation noch zur Ausbildung einer „Schulter“ in der Kontraktion führt (Refraktärzeit noch nicht erreicht), ist dies beim nächstkleineren Abstand der beiden Impulse (rechts gezeigt) nicht mehr der Fall, der zweite Impuls fällt vor Ende der Refraktärzeit ein und löst keine Kontraktion mehr aus. Die tatsächliche Refraktärzeit liegt zwischen den beiden gezeigten Abstandsstufen und kann auf diese Weise gut abgeschätzt werden.

3.1.8.4.2 Reizschwelle

Die Reizschwelle konnte aus der Registrierung des Stimulationsprotokolls abgelesen werden, indem der Zeitpunkt bestimmt wurde, an dem die neu eingestellte Stromstärke zu regelmäßigen Kontraktionen

führte. Anschließend konnte anhand des Zeitablaufs aus Tabelle 3 die entsprechende Stromstärke abgelesen werden. In Fällen, in denen der Wiederbeginn der regelmäßigen Kontraktionen nicht gleich mit voller Kontraktionskraft erfolgte (wie Abbildung 12 zeigt), wurde vermerkt, dass kein „Alles-oder-Nichts-Prinzip“ vorlag. Dennoch wurde hier der erste Beginn regelmäßiger Kontraktionen als Überschreiten der Reizschwelle gewertet. Auch diese Messung wurde alle 24 h durchgeführt.

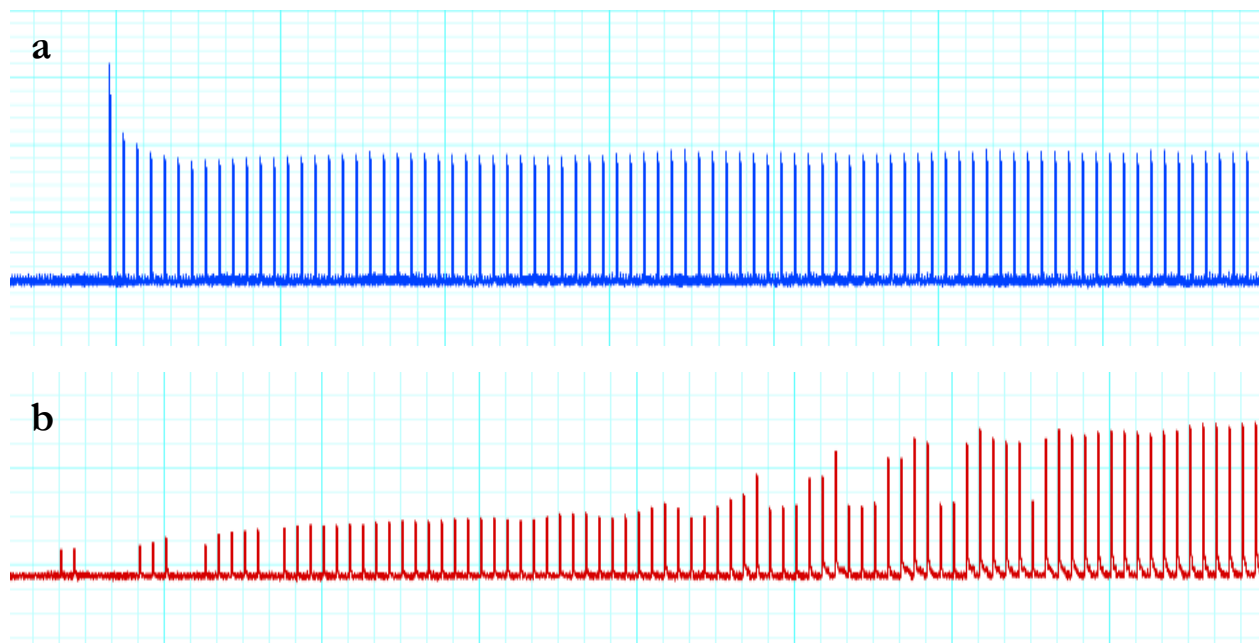


Abbildung 12 Auswertung der Reizschwellentestung: Während im oben gezeigten Beispiel (a) die Kontraktionen von Beginn an mit voller Kraft erfolgen (die erste starke Kontraktion ist als „Post-Pausen-Potenzierung“ durch Ca^{2+} -Akkumulation während der Pause zu werten, vgl. [132]) erfolgt beim unten abgebildeten Beispiel (b) ein kontinuierlicher Anstieg der Kraft mit dem ansteigen der Stimulationsstärke. Somit liegt in (a) ein „Alles-oder-nichts-Prinzip“ vor, nicht jedoch in (b).

3.1.8.4.3 Kraft-Frequenz-Abhängigkeit und Maximalfrequenz

Die Kraft-Frequenz-Abhängigkeit wurde bestimmt, indem bei jeder der oben genannten Frequenzen Grundlinie und Amplitude über sieben Kontraktionen gemittelt bestimmt wurden. Es wurden jeweils die letzten sieben Kontraktionen vor einem Frequenzwechsel verwendet, da hier der stabilste Zustand vorlag. Ausgewertet wurden dabei alle Frequenzen, bei denen in mindestens 75 % des entsprechenden Zeitraums eine 1:1-Umsetzung der Stimulationsimpulse in Kontraktionen stattfand. Somit wurde die Maximalfrequenz definiert als die letzte Frequenz, bei der in weniger als 25 % der Zeit keine entsprechende Umsetzung gegeben war. In einigen Fällen lag die Maximalfrequenz jedoch höher als die maximal getestete Frequenz, somit wurde in diesen Fällen die tatsächliche Maximalfrequenz nicht bestimmt. Durchgeführt wurde auch diese Erhebung täglich, ausgewertet wurde dabei ein solches Protokoll jedoch nur alle vier Tage, aus Gründen der Übersichtlichkeit sollen in der vorliegenden Arbeit exemplarisch drei Zeitpunkte betrachtet werden: Woche 1 (Tag 3-6), Woche 2 (Tag 12-15), Woche 3 (Tag 19-22). Es wurden Zeitspannen und nicht festgelegte Zeitpunkte gewählt, da aufgrund technischer Schwierigkeiten bei den hohen Stimulationsfrequenzen nicht in allen Versuchsreihen an einem festgelegten Tag ein verwertbares Protokoll existierte.

3.2 Analyse der Proben nach Kulturende

3.2.1 Western-Blot

Zur Untersuchung verschiedener Proteinmengen wurden einige der bei -80 °C konservierten Myokard-schnitte für eine Western-Blot-Analyse vorbereitet. Hierfür war eine Homogenisierung bzw. ein Gewebeaufschluss nötig. Dies geschah mithilfe von Homogenization-Tubes (Lysis Tubes P, Difficult samples, innuSPEED, Analytik Jena; die Hälfte der Kugeln wurde zuvor entfernt). In diese Tubes wurden jeweils 200 µl Pierce® RIPA Puffer (Thermo Scientific™) sowie 2 µl Halt™ Protease- und Phosphatase-Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific™) zusammen mit der Hälfte eines angetauten Myokardlices gegeben. In einem Schlagschüttler (SpeedMill PLUS von Analytik Jena) erfolgte dann zweimal für je eine Minute (mit einer Minute Pause dazwischen) der Gewebeaufschluss. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 4 °C mit 12000 rpm zentrifugiert.

Aus dem Überstand wurde die Proteinmenge mittels eines BCA Protein Assay Kits (Pierce™ BCA Protein Assay Kit von Thermo Scientific™) bestimmt. Mit einer definierten Proteinmenge (5 µg für PLN-, Serca2a-, p-Thr-17-, p-Ser-10-Blot, 15 µg für p-Ser-16-Blot) wurde eine Gelelektrophorese zur Auftrennung der Proteine nach Größe und Ladung durchgeführt. Dies erfolgte auf nUView Tris-Glycin NG21-816 Gradientengelen mit einem Gradienten zwischen 8 % und 16 % Acrylamid. Die Laufzeit betrug dabei 68 min bei 25 mA.

Mithilfe eines Semi-Dry-Blot-Verfahrens erfolgte der Proteintransfer auf eine Nitrocellulose-Membran, es wurde ein 10 %-Methanol enthaltender Transferpuffer verwendet. Die Dauer hierfür betrug 100 min bei 54 mA. Zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurden die Membranen in Odyssey® Blocking Buffer (1:2 mit Waschpuffer verdünnt) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem fünfminütigem Waschen wurden die Blots vor der Antikörperinkubation dann geteilt.

Nach Inkubation mit den Primärantikörpern in den angegebenen Verdünnungen (siehe Tabelle 6) bei 4 °C über Nacht folgten erneut drei Waschschritte für je 5 min.

| Antikörper gegen | Spezies | Firma | Verdünnung |
|----------------------------|-----------|----------------|--------------------|
| Actin | Kaninchen | Sigma Aldrich® | 1:1000 in 3 % BSA |
| Phospholamban (PLN) gesamt | Maus | Badrilla | 1:5000 in 3 % BSA |
| Serca2a | Kaninchen | Badrilla | 1:20000 in 3 % BSA |
| p-Ser-10 des PLNs | Kaninchen | Badrilla | 1:1000 in 3% BSA |
| p-Ser-16 des PLNs | Kaninchen | Badrilla | 1:500 in 3 % BSA |
| p-Thr-17 des PLNs | Kaninchen | Badrilla | 1:5000 in 3 % BSA |

Tabelle 6 Verwendete Primärantikörper

Danach konnte die Inkubation mit den in Tabelle 7 aufgeführten Sekundärantikörpern für eine Stunde bei Raumtemperatur angeschlossen werden.

| Antikörper | Verdünnung |
|--------------------|------------------------|
| Anti-mouse 680RD | 1:10000 in Waschpuffer |
| Anti-rabbit 800 CW | 1:10000 in Waschpuffer |
| Anti-rabbit 680RD | 1:10000 in Waschpuffer |

Tabelle 7 Verwendete Sekundärantikörper

Nach viermaligem Waschen für je 5 min wurden die Signale mithilfe des Odyssey® Imaging Systems (Near infrared western blot detection) detektiert.

3.3 Statistische Methoden

Zur Analyse der Ergebnisse mit statistischen Methoden wurde zur gleichmäßigen Gewichtung der Myokardproben bei Vorhandensein von zwei oder mehr Gewebeschnitten der gleichen Kulturbedingung vom gleichen Patienten der arithmetische Mittelwert der Messwerte gebildet und dieser als Wert in den Analysen gleichberechtigt zu den nur in einfacher Messung vorliegenden Daten verwendet. Kam es in solchen Fällen von Mehrfachbestimmungen zu technischen Ausfällen in einem der entsprechenden Präparate, wurde nur der Mittelwert der verbleibenden Proben verwendet.

Zudem wurden nur Ergebnisse zu Stimulationsprotokollparametern und Western Blots inkludiert, die von Präparaten stammten, deren Daten auch in der Kraftverlaufsauswertung repräsentiert waren.

Im Falle der Western Blots erfolgte die zusätzliche Einschränkung, dass nur Präparate einbezogen wurden, bei denen das Gewebe der unkultivierten Vergleichsbedingung auf demselben Blot untersucht worden war wie die Proben aus kultiviertem und behandeltem Myokard. So konnten Einflüsse durch verschiedene Blots minimiert werden.

Die Angabe der Ergebnisse erfolgt jeweils unter Angabe der Präparatezahl n als Angabe des arithmetischen Mittels der Gruppe \pm SEM (Standardfehler), in den Grafiken ist ebenfalls der SEM abgebildet.

Zur Signifikanztestung bezüglich Behandlungseffekten im Zeitverlauf wurde für den Kraftverlauf ein zweidimensionaler ANOVA eingesetzt (Behandlungsgruppen, Zeit), wobei alle behandelten Proben jeweils mit der Kontrollgruppe verglichen wurden. Die verschiedenen Zeitpunkte desselben Präparats wurden dabei als gepaart betrachtet. Verglichen wurden die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$, es erfolgte eine Korrektur für multiple Vergleiche mit dem Dunnett-Test, ebenso wurden die p -Werte für multiple Vergleiche adjustiert.

Für die Untersuchung von Behandlungseffekten auf die Stimulationsprotokollparameter wurden multiple t -Tests für die verschiedenen Zeitpunkte (oder Frequenzen im Falle der FFR) für den Vergleich einer Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe verwendet. Auch hier wurden jeweils die Mittelwerte verglichen. Der Vergleich wurde als ungepaarter Test durchgeführt, es wurde keine konsistente Standardabweichung angenommen und der p -Wert lag bei $< 0,05$. Die Korrektur für multiple Vergleiche erfolgte dabei mit dem Holm-Sidak-Test.

Zur Untersuchung der Veränderung der FFR im Laufe der Kulturdauer wurden die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten mit einem zweidimensionalen ANOVA verglichen

(Zeitpunkte, Frequenzen), wobei die Ergebnisse als ungepaart betrachtet wurden und das Signifikanzniveau bei $p < 0,05$ lag. Die Ergebnisse für Woche 2 bzw. 3 in Kultur wurden mit denen der ersten Kulturwoche verglichen. Eine Korrektur für multiple Vergleiche erfolgte auch hier mit dem Dunnett-Test, ebenso wurden die p-Werte adjustiert.

Im Falle der Western-Blot-Ergebnisse wurden alle Werte auf den Actin-Gehalt der jeweiligen Gewebeprobe normiert, um einen Einfluss durch unterschiedliche Proteinmengen zu eliminieren. Zudem wurde immer der Bezug zum frischen unkultivierten Gewebe aus dem jeweiligen Herz hergestellt. Für die Gruppe von Präparaten, die über 21 Tage eine Behandlung erhalten hatten, wurden die Präparate zusammengefasst, die die gleiche Dosis Denopamin direkt nach Kulturbeginn oder erst nach einem Tag Kultur erhalten hatten, da davon auszugehen war, dass dieser Unterschied im Startzeitpunkt nach 20 bis 21 weiteren Tagen in Kultur nicht mehr relevant war. Auch hier wurden dabei die Werte von multiplen Bestimmungen der gleichen Behandlung aus Geweben des gleichen Individuums wie oben beschrieben gemittelt und als ein Wert einbezogen. Zum Einsatz kam dann ein eindimensionaler ANOVA der ungepaarten Mittelwerte der verschiedenen Gruppen. Dabei wurden jeweils folgende Gruppen untersucht:

- Wert des einen Tag lang kultivierten Gewebes vs. Wert des 21 Tage lang kultivierten Gewebes der jeweils gleichen Behandlungsbedingung
- Wert des einen Tag lang kultivierten Gewebes vs. Wert des unkultivierten Gewebes
- Wert jeder behandelten Gruppe vs. Wert der Kontrollgruppe jeweils am ersten und 21. Tag in Kultur

Eine Korrektur für multiple Vergleiche erfolgte in diesem Fall mithilfe des Sidak-Tests, ebenso wurden die p-Werte auch hier adjustiert.

Für die Kennzeichnung, auf welchem Niveau die dargestellten Ergebnisse eine Signifikanz ergeben hatten, wurde folgende Kennzeichnung verwendet:

* $p < 0,033$, ** $p < 0,002$, *** $p < 0,0001$

Das Vorgehen für die Patienten- und Primatenproben war identisch.

4. Ergebnisse der Untersuchung von insuffizientem humanem Myokard

4.1 Probenstatistik

Zunächst soll ein Überblick über die Herkunft der in dieser Studie untersuchten Myokardpräparate gegeben werden.

Von insgesamt 26 im Rahmen der vorliegenden Untersuchung kultivierten Proben erfüllten 14 die Einschlusskriterien und wurden in die Auswertung einbezogen. Daraus ergibt sich eine Einschlussquote von 54 %. Die im Folgenden gemachten Angaben beziehen sich nur auf die in die Auswertung einbezogenen Proben.

9 (64 %) der eingeschlossenen Myokardproben stammten aus der Klinik für Herzchirurgie des Klinikums der Universität München, die restlichen 5 (36 %) aus dem Herz- und Diabeteszentrum Bad Oeynhausen. 10 (71 %) der Gewebeproben stammte von männlichen Patienten, 4 (29 %) von Patientinnen. 13 der Präparate stammten aus Gewebe von Herztransplantationen, wovon es sich bei einer der Operationen bereits um eine Retransplantation gehandelt hatte, das kultivierte Gewebe stammte in diesem Fall somit von einem ehemaligen Spenderherz. Ein weiteres Präparat wurde aus Gewebe gewonnen, das aus einer Myektomie nach Morrow stammte. Die jeweilige Ätiologie der Herzinsuffizienz der Patientinnen/Patienten wurde ebenfalls erhoben (Tabelle 8).

| Ätiologie der Herzinsuffizienz | Anzahl der Myokardproben |
|---|--------------------------|
| Dilatative Kardiomyopathie | 5 |
| Ischämische Kardiomyopathie | 3 |
| Restriktive Kardiomyopathie | 1 |
| Kardiomyopathie in Folge von Myokarditis | 3 |
| Hypertroph-obstruktive Kardiomyopathie | 1 |
| Hypertroph-nicht-obstruktive Kardiomyopathie | 1 |
| Kardiomyopathie infolge Ventrikelseptumdefekt | 1 |

Tabelle 8 Ätiologie der Herzinsuffizienz der Patientinnen/Patienten, von denen die Myokardproben dieser Studie stammten. Ein Patient litt unter einer dilatativen Kardiomyopathie infolge einer Myokarditis und ist daher in beiden Kategorien berücksichtigt.

4.2 Beobachtete Veränderungen der Kontraktionskraft

4.2.1 Verlauf der Kontraktionskraft ohne pharmakologische Beeinflussung

Bei der Betrachtung des Verlaufs der Kontraktionskraft der 14 Proben der Kontrollgruppe (ohne Zusatz von pharmakologisch wirksamen Substanzen im Kulturmedium) zeigte sich eine gleichförmige Abfolge von Veränderungen in den gleichen Zeiträumen. Dabei konnten verschiedene Prozesse unterschieden werden: Zum einen zeigten sich kurzfristige Veränderungen mit einer Dauer im Minutenbereich, beispielsweise durch eine Abkühlung oder eine Veränderung des CO₂-Gehalts, z.B. bei Öffnen der Brutschranktür oder Herausnehmen einer Kulturkammer. Die Rückkehr zum Zustand vor Eintre-

ten dieser Veränderung war innerhalb weniger Minuten nach Normalisierung der Bedingungen zu erkennen. Zum anderen ließen sich jedoch auch mittelfristige Veränderungen der Kontraktionskraft beobachten: so war nach einem Mediumwechsel ein rascher Kraftabfall zu beobachten, der innerhalb weniger Stunden jedoch voll reversibel war.

In dieser Arbeit soll der Fokus auf den langfristigen Veränderungen der gemessenen Parameter liegen, die mit einer Kinetik im Bereich mehrerer Stunden bis Tage zu beobachten waren.

Abbildung 13 zeigt den durchschnittlichen Verlauf der Kontraktionskraft der Kontrollgruppe. Dabei lässt sich erkennen, dass über die Kulturdauer von 21 Tagen deutliche Veränderungen stattfanden: Zu Beginn der Kulturperiode konnte eine durchschnittliche Kontraktionskraft von $6,2 \text{ mN}$ ($\pm 1,1 \text{ mN}$) gemessen werden. Innerhalb weniger Stunden sank diese jedoch massiv ab und erreichte nach ca. 12 h ein Minimum von durchschnittlich $0,3 \text{ mN}$ ($\pm 0,04 \text{ mN}$). Dies entspricht einem Abfall auf ca. 5 % des Ausgangswerts.

Im weiteren Verlauf war anschließend, beginnend ungefähr nach 24 h Kulturdauer, ein kontinuierlicher langsamer Wiederanstieg des Kraftniveaus zu erkennen, zum Ende der Kultur wurden dann durchschnittlich $3,4 \text{ mN}$ ($\pm 0,9 \text{ mN}$) erreicht. Eine Erholung vom Minimalzustand war in allen betrachteten Proben zu sehen.

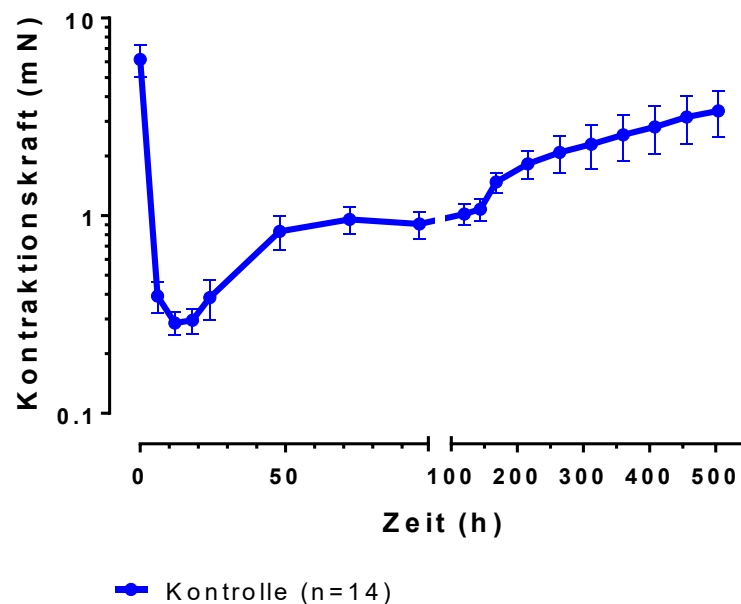


Abbildung 13 Kraftverlauf der unbehandelten Kontrollproben über die Kulturdauer von 21 Tagen (entsprechend 504 h)

4.2.2 Einflüsse der eingesetzten Pharmaka auf die Kontraktionskraft

Bei Betrachtung der verschiedenen Arten von Veränderungen des Kraftverlaufs fiel bei Vergleich der behandelten Proben mit der Kontrollgruppe auf, dass die kurz- und mittelfristigen Abläufe als Reaktion auf äußere Einflüsse (Öffnen der Tür, Mediumwechsel) sich nicht von den unbehandelten Proben unterscheiden, während im langfristigen Verlauf über drei Wochen zum Teil deutliche Unterschiede feststellbar waren.

Die Ergebnisse der mit Denopamin ab Kulturbeginn behandelten Proben zeigt Abbildung 14 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei der niedrigeren Dosierung (100 nM, n=6), ist kein signifikanter Unterschied im Verlauf zur Kontrollgruppe feststellbar. Obwohl diese Gruppe insgesamt zu Beginn eine signifikant stärkere Kontraktionskraft als die Kontrollen zeigte (durchschnittlich 10,1 mN \pm 3,1 mN), fiel diese im gleichen Zeitraum wie in der Kontrollgruppe auf einen ähnlichen Wert (0,3 mN \pm 0,08 mN) ab. Der Wiederanstieg der Kraft fiel durchschnittlich in dieser Gruppe schwächer aus, der Endwert lag bei durchschnittlich 2,3 mN (\pm 0,6 mN). Durch die Behandlung mit der hohen Dosierung des Medikaments (1000 nM) kam es zu deutlichen Veränderungen: Zu Kulturbeginn lag die Kontraktionskraft in dieser Gruppe (n=4) in einem leicht höheren Bereich als in der Kontrollgruppe (7,8 mN \pm 1,6 mN). Der Kraftabfall erfolgte langsamer (Erreichen des Minimums bei 18 h) und deutlich abgeschwächt: der Minimalwert dieser Gruppe lag bei durchschnittlich 2,5 mN (\pm 0,9 mN), was einem Abfall auf 36 % entspricht. Im weiteren Verlauf stieg die Kontraktionskraft dieser Proben ebenfalls deutlich an und liegt im Bereich von 48 h bis 456 h (19 Tage) signifikant über dem Kraftniveau der unbehandelten Kontrollen. Mit Erreichen des Kulturrendes nach 21 Tagen liegt die Kontraktionskraft der Denopamin-1000 nM-Gruppe mit durchschnittlich 6,2 mN (\pm 2,4 mN) weiterhin tendenziell über dem Niveau der Kontrollen, jedoch nicht mehr signifikant.

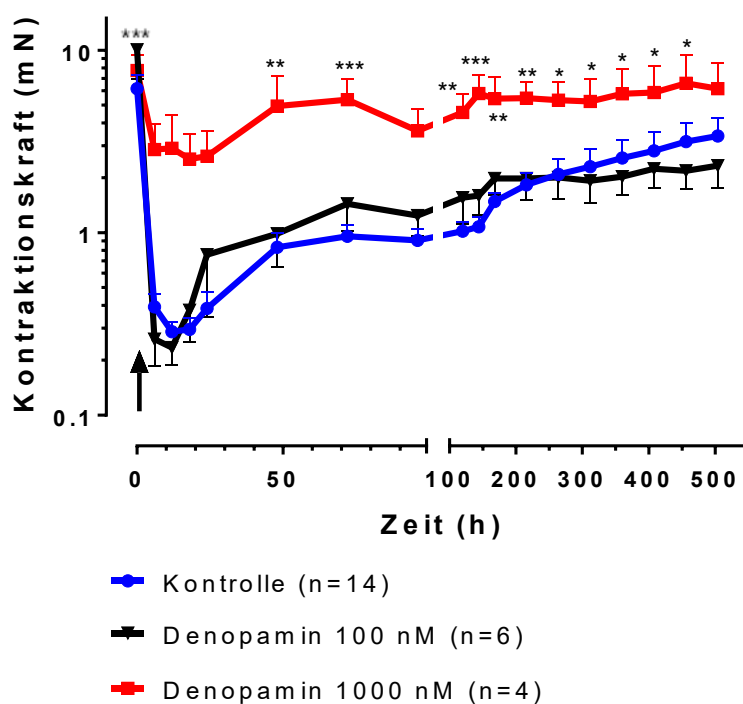


Abbildung 14 Kraftverlauf der mit Denopamin behandelten Proben beider Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe (blau); der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zugabe von Denopamin; die Denopamin-100 nM-Gruppe unterschied sich zum Zeitpunkt 0 h signifikant von der Kontrollgruppe; die Signifikanzangaben beziehen sich auf den Vergleich zur Kontrollgruppe

Für die nach ca. 20 h erstmals mit Denopamin behandelten Myokardproben wurden ebenfalls Versuche mit niedriger (100 nM, n=9) und mit hoher (1000 nM, n=8) Dosierung der Substanz durchgeführt. Beide zeigten in der Zeit vor Beginn der Behandlung den gleichen Verlauf wie die Kontrollgruppe, da

ja in diesem Zeitbereich noch keine adrenergen Substanzen zugesetzt worden waren. Für die Denopamin-100 nM-spät-Gruppe ergeben sich ein Startwert von 6,2 mN ($\pm 1,7$ mN) und ein Minimum von 0,3 mN ($\pm 0,07$ mN). Nach Behandlungsbeginn kam es zu einem stärkeren und schnelleren Anstieg der Kontraktionskraft als ohne Behandlung, das Maximum der Kontraktionskraft wurde nach 72 h mit durchschnittlich 2,6 mN ($\pm 0,5$ mN) beobachtet. Anschließend war ein Verbleiben der Kraft auf ungefähr diesem Niveau zu beobachten, der Endwert lag nach 21 Tagen bei 1,8 mN ($\pm 0,3$ mN). Sehr ähnliche Ergebnisse ergaben sich auch für die Gruppe, die zum späten Zeitpunkt die hohe Dosis der Substanz erhielt: Bei einem niedrigeren Startwert von 4,8 mN ($\pm 1,3$ mN) lag das Kraftminimum im gleichen Bereich wie bei den anderen Gruppen (nach 12 h bei 0,3 mN $\pm 0,09$ mN). Schon wenige Stunden nach Beginn der Behandlung zeigte sich hier ein deutlicher Kraftanstieg, nach 48 h Gesamtkulturdauer wurde ein im Vergleich zur Kontrolle signifikant höheres Maximum (3,9 mN $\pm 0,9$ mN) erreicht. Anschließend war für diese Behandlungsbedingung ein erneuter leichter Krafteinbruch in den nächsten zwei Kulturtagen zu beobachten, bevor sich die Kontraktionskraft dann am Kulturrende auf 2,3 mN ($\pm 0,7$ mN) stabilisierte (siehe auch Abbildung 15).

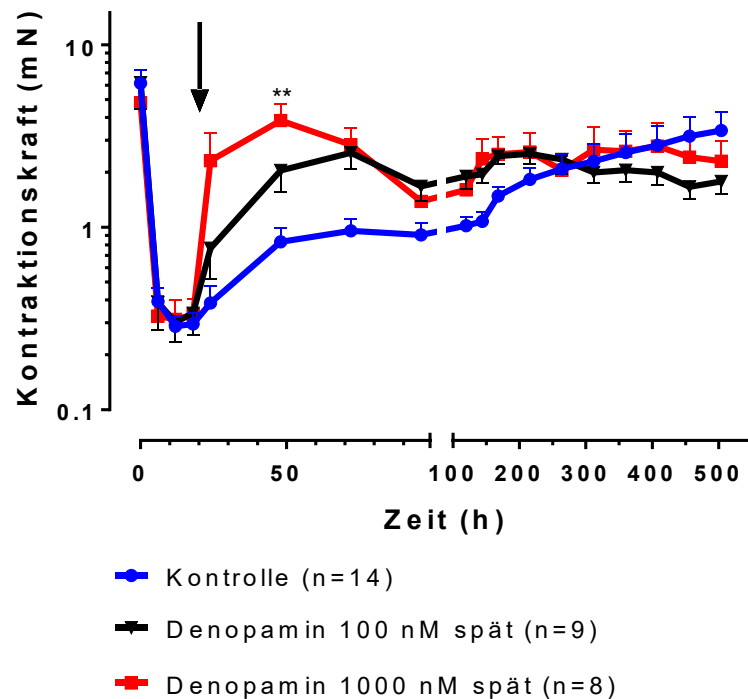


Abbildung 15 Kraftverlauf der erst nach 20 h mit Denopamin beider Dosierungen behandelten Proben im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (blau); der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zugabe von Denopamin; die Signifikanzangabe bezieht sich auf den Vergleich zur Kontrollgruppe

Als gegenteilige Behandlung zur Denopamin-Gabe wurden einige Präparate auch mit dem β -Blocker Metoprolol, für den eine invers agonistische Funktion nachgewiesen ist [118–121], in der Dosis 100 nM behandelt (vgl. Abbildung 16). Lag der Startwert mit 8,3 mN ($\pm 2,4$ mN) noch höher, zeigte sich das Minimum mit 0,2 mN ($\pm 0,04$ mN) nach 6 h im Vergleich zur Kontrolle früher, aber in ähnlichem

Kraftbereich. Der Kraftanstieg begann in dieser Gruppe schneller, endete aber bei einem zur Kontrollgruppe vergleichbaren Endwert ($2,5 \text{ mN} \pm 0,7 \text{ mN}$). Im Verlauf zeigten sich für diese Gruppe keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollproben.

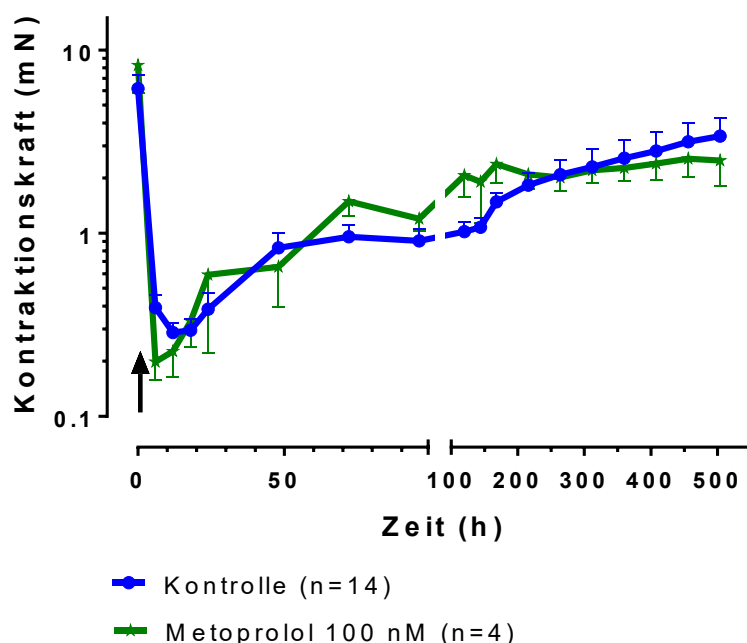


Abbildung 16 Kraftverlauf der Myokardslices unter β -Blockade mit Metoprolol im Vergleich zur Kontrollgruppe; der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zugabe von Metoprolol

4.3 Entwicklung der funktionellen Messgrößen

4.3.1 Refraktärzeit

Die Kontrollproben zeigten eine über den Kulturverlauf von 21 Tagen stabile Refraktärzeit, die zwischen Mittelwerten von minimal 318 ms (± 14 ms) bis maximal 375 ms (± 16 ms) und damit in einem relativ engen Korridor schwankte (Abbildung 17 (a)).

Bei Betrachtung der Refraktärzeiten der von Kulturbeginn an mit Denopamin behandelten Proben fiel im Durchschnitt eine zu Beginn tendenziell längere Refraktärzeit auf, die im Verlauf mit zunehmender Dauer der Behandlung kürzer wurde. Dabei konnte eine leichte Dosisabhängigkeit dieses Effekts festgestellt werden: Mit Denopamin in der Dosis 100 nM sank der Mittelwert dieses Parameters bis auf 283 ms (± 14 ms), um gegen Ende der Kulturzeit wieder auf 325 ms (± 17 ms) anzusteigen, während bei der Dosis von 1000 nM ein Abfall bis auf durchschnittlich 254 ms (± 29 ms) zu beobachten war, bevor es auch hier zu einem Anstieg auf 300 ms (± 33 ms) kam (Abbildung 17 (b)).

Wurde die Behandlung mit der catecholaminähnlichen Substanz erst nach 20 h begonnen, konnte ein Abfall des Parameters auf kürzere Zeiten in den behandelten Gruppen (Dosis 100 nM bis 284 ms (± 12 ms), Dosis 1000 nM bis 246 ms (± 11 ms) beobachtet werden, gegen Ende der Kulturperiode kam es auch in dieser Gruppe zu einem leichten Anstieg der Refraktärzeit (Abbildung 17 (c)). Im Unterschied zur früher beginnenden Behandlung zeigt sich hier im Bereich 12-15 Tage mit der hohen

Dosierung des Medikaments ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe. Denopamin 1000 nM reduzierte somit in diesem Zeitraum signifikant die Refraktärzeit der Proben.

Auch für die mit Metoprolol behandelten Myokardpräparate wurde die Refraktärzeit täglich erhoben. Diese Behandlung führte jedoch zu keiner feststellbaren Änderung im Vergleich zu den Werten ohne Behandlung, lediglich die Schwankungen waren ein wenig stärker, was auf die geringere Probenanzahl zurückzuführen sein dürfte (Abbildung 17 (d)).

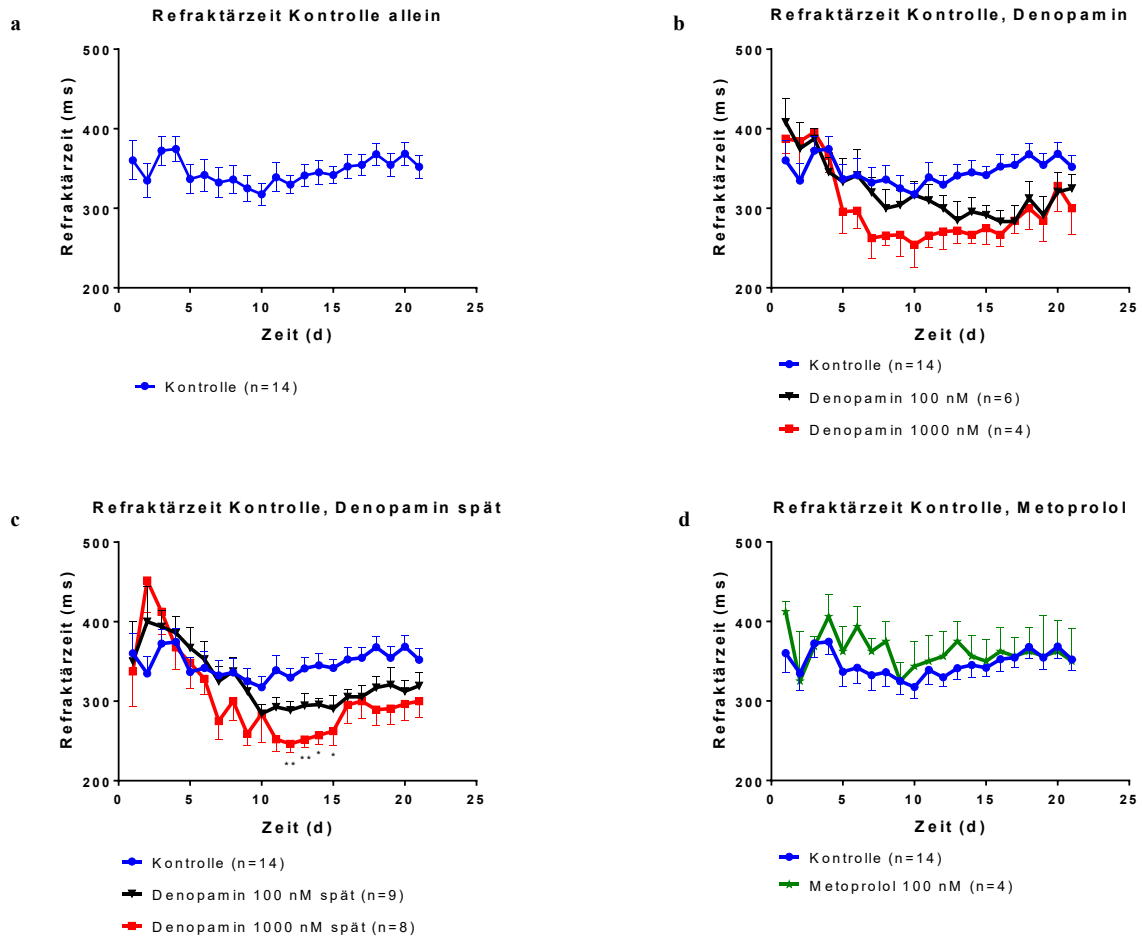


Abbildung 17 Refraktärzeit der Myokardproben im Zeitverlauf unter verschiedenen Behandlungsbedingungen: (a) zeigt die Ergebnisse der Kontrollgruppe allein, (b) die Ergebnisse der von Beginn an mit Denopamin behandelten, (c) die Ergebnisse der erst nach 20 h mit Denopamin behandelten und (d) die Ergebnisse der mit Metoprolol behandelten Präparate im Vergleich zur Kontrollgruppe

4.3.2 Reizschwelle

Als nächstes soll die Reizschwelle der Kontrollpräparate im Kulturverlauf betrachtet werden (Abbildung 18 (a)): die Reizschwelle lag hier zu Kulturbeginn bei durchschnittlich 14 mA (± 1 mA), stieg dann über die nächsten 21 Tage leicht an und lag am Ende bei im Mittel 20 mA (± 2 mA).

Die ab Kulturbeginn mit Denopamin behandelten Proben zeigten im Verlauf der elektrischen Reizschwelle keinen signifikanten Unterschied zu den unbehandelten Proben (Abbildung 18 (b)), die mit der höheren Dosierung behandelte Gruppe liegt in der Zeitspanne von Tag 7 bis Tag 12 in ihrem

Niveau unterhalb dessen der Kontrollen. Auch zeigen sich in den behandelten Gruppen etwas stärkere Schwankungen, was auf die geringere Anzahl der betrachteten Proben zurückzuführen sein dürfte.

In den erst spät mit dem β -Agonisten in Kontakt gekommenen Proben (Abbildung 18 (c)) lässt sich ein ähnliches Ergebnis erkennen. Die mit 100 nM Denopamin behandelten Präparate zeigen einen den Kontrollen sehr ähnlichen Verlauf, die höhere Dosis führt hier scheinbar zu viel stärkeren Schwankungen (bis zu einem Maximum von 35 mA (± 5 mA)), was auf einige wenige Myokardslices zurückzuführen ist, deren Reizschwenniveau stärker anstieg als das der übrigen. Zudem ist hier zu erwähnen, dass aus technischen Gründen in einigen Proben lediglich alle zwei Tage die Durchführung eines Stimulationsprotokolls möglich war, was in Zusammenhang mit obengenannten Abweichungen einiger weniger Proben zu einem scheinbar stark undulierenden Verlauf der Messergebnisse führt.

Unter Behandlung mit der antagonistischen und invers agonistischen Substanz Metoprolol lag die gemessene Reizschwelle stabil leicht unter dem Niveau der Kontrollproben und zeigte keine größeren Entwicklungen und Veränderungen im betrachteten Zeitraum (Abbildung 18 (d)).

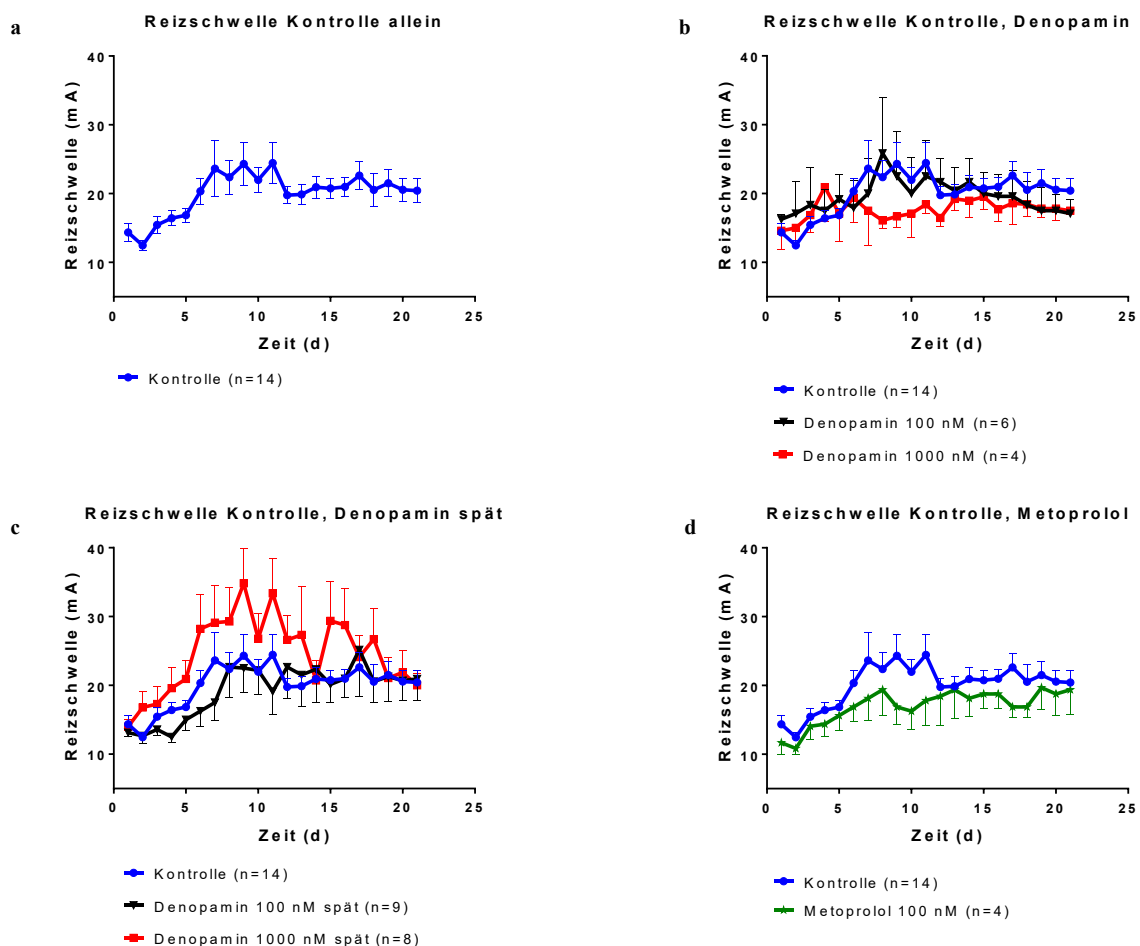


Abbildung 18 Elektrische Reizschwelle der Proben unter verschiedenen Kulturbedingungen im Zeitverlauf: (a) zeigt die Ergebnisse der Kontrollgruppe allein, (b) die Ergebnisse der von Beginn an mit Denopamin behandelten, (c) die Ergebnisse der erst nach 20 h mit Denopamin behandelten und (d) die Ergebnisse der mit Metoprolol behandelten Präparate im Vergleich zur Kontrollgruppe

4.3.3 Maximalfrequenz und Kraft-Frequenz-Abhängigkeit

Die Maximalfrequenz des untersuchten Myokards ändert sich im Zeitverlauf nur sehr wenig und auch die verschiedenen Kulturbedingungen haben keinen signifikanten Einfluss auf diesen Parameter (Abbildung 19). Die maximale Stimulationsfrequenz, die noch zu einer adäquaten 1:1-Umsetzung in Kontraktionen führte, lag dabei in allen Gruppen im Bereich von ungefähr 3 Hz.

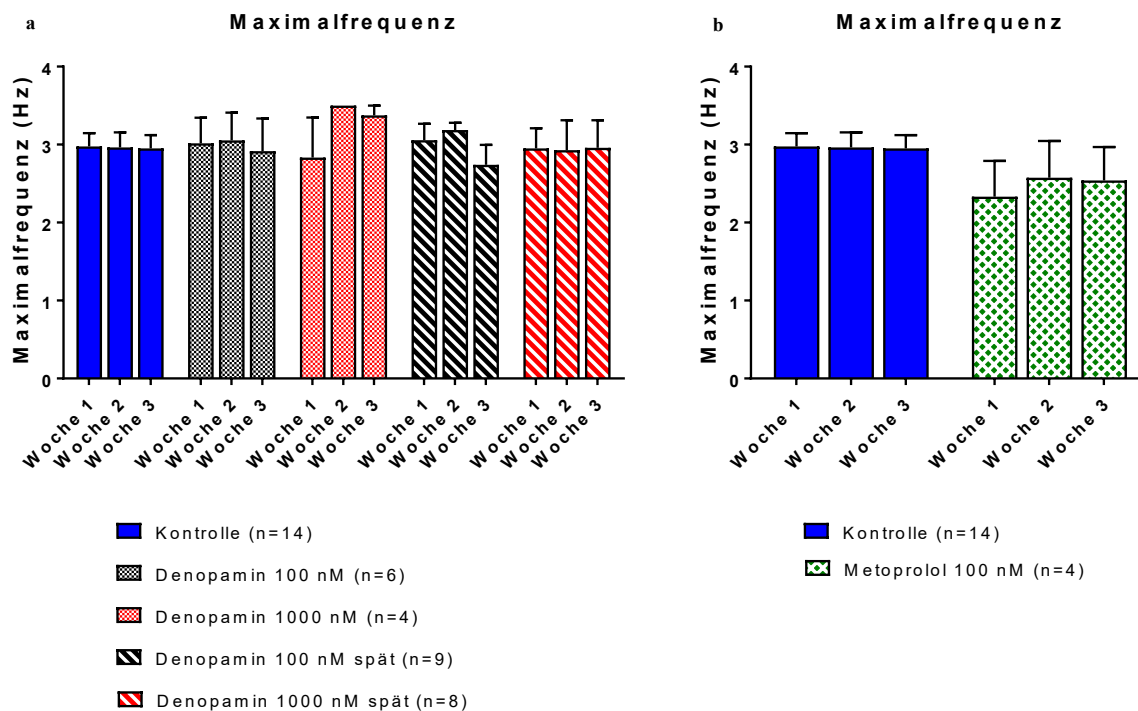


Abbildung 19 Maximalfrequenzen der verschiedenen Behandlungsgruppen (Denopamin verschiedener Dosierungen und Startzeitpunkte links, Metoprolol rechts) für jeweils drei Zeitpunkte (1., 2., 3. Woche in Kultur) im Vergleich zu unbehandelten Slices (blau)

Zur Entwicklung der Kraft-Frequenz-Abhängigkeit zu den drei oben genannten Zeitpunkten (Woche 1, 2, 3 in Kultur) ist als wichtige Vorbemerkung zu erwähnen, dass die Abweichungen der Messwerte mit ansteigender Stimulationsfrequenz deutlich und zum Teil stark anzusteigen scheinen – dies liegt darin begründet, dass die Kraft-Messwerte von Proben, deren individuelle Maximalfrequenz bereits überschritten worden war, für die Messwerte der darüberhinausgehenden Frequenzen wegfielen. Somit ist bei einer Stimulationsfrequenz von z.B. 3,5 Hz die Anzahl n der untersuchten Proben zum Teil geringer als sie am Anfang bei 0,2 Hz noch gewesen war, was einzelne gewebe- und patientenabhängige Unterschiede viel stärker hervorhebt. Die in der Legende angegebene Anzahl n bezeichnet dabei immer die gesamte Gruppengröße zu Beginn der jeweiligen Protokolle.

Im Vergleich der verschiedenen Behandlungsgruppen mit der Kontrollgruppe ergaben sich hier für alle Zeitpunkte keine signifikanten Unterschiede, während für die jeweiligen Gruppen hingegen ein deutlicher Zeiteffekt im Verlauf feststellbar war (vgl. zum Überblick Abbildung 20).

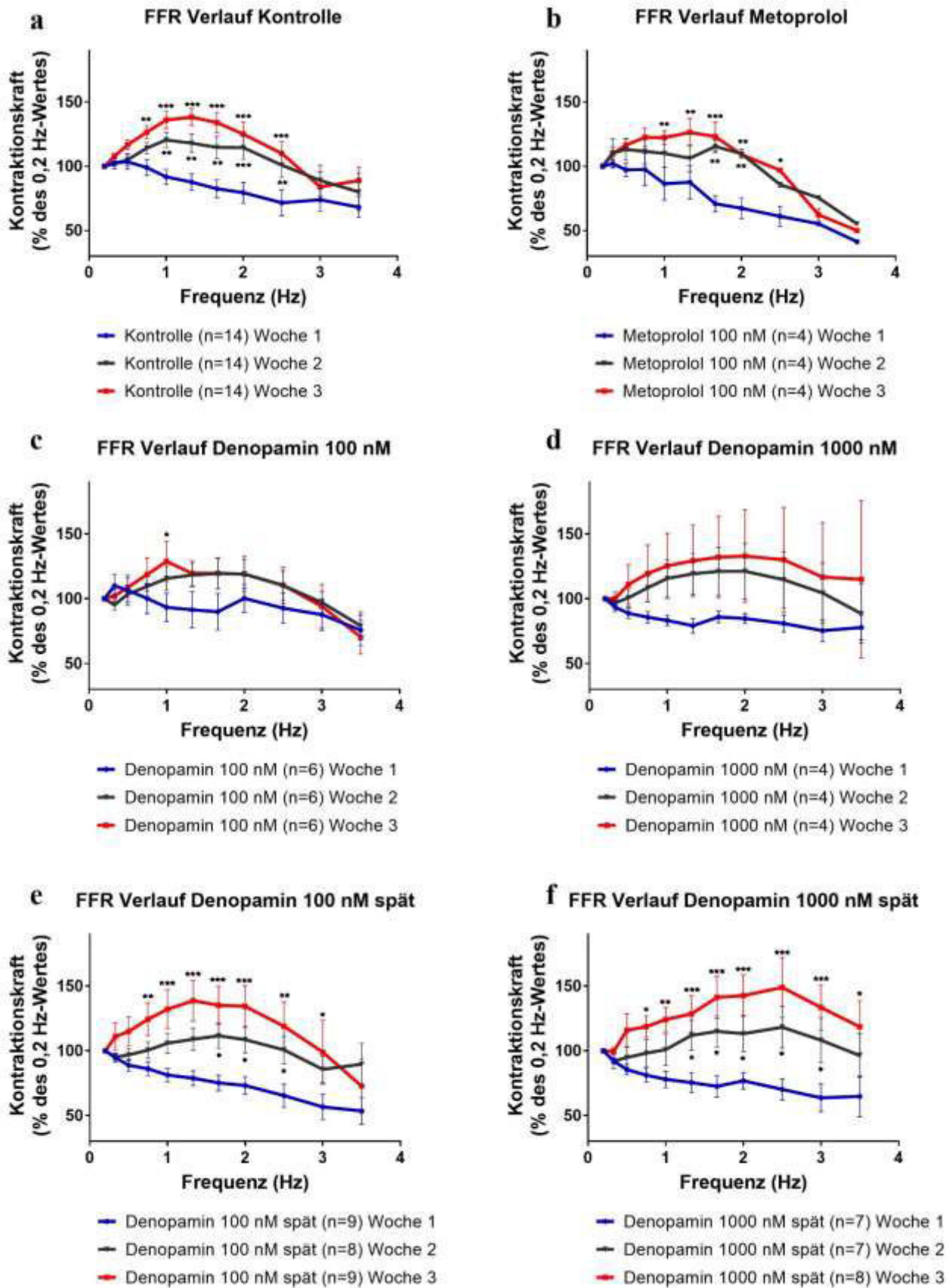


Abbildung 20 Vergleich der Kraft-Frequenz-Abhängigkeit (FFR) zu verschiedenen Zeitpunkten im Kulturverlauf für die unterschiedlich behandelten Myokardslices. Die Signifikanzangaben beziehen sich auf den Vergleich zum jeweiligen Verlauf in Woche 1.

In der ersten Kulturwoche (jeweils blau dargestellt) wird in den Präparaten die höchste prozentuale Kraft noch zu Beginn des Ablaufs bei niedrigen Frequenzen (< 1 Hz) erreicht, bei Erhöhung der Stimulationsfrequenz kommt es zu einem stetigen Kraftabfall.

Eine Veränderung in diesem Verhalten bei verschiedenen Frequenzen wird schon in Kulturwoche 2 erkennbar (jeweils schwarz dargestellt). Es zeigt sich eine Verschiebung der Frequenz, bei der das Kraftmaximum erreicht wird: Ist dies zu Beginn der Kultur noch bei sehr niedrigen Frequenzen zu verorten, liegt es in der zweiten Woche nun schon deutlich in einem Bereich der physiologischen Herzfrequenz bei 1-2 Hz und erreicht $121 (\pm 6)$ % des Wertes bei 0,2 Hz. Bei höheren Frequenzen kommt es dann wieder zu einem Kraftabfall. Dies ist für alle Gruppen sehr ähnlich, lediglich bei Behandlung mit Denopamin in der hohen Dosierung erst ab 20 h Kulturdauer wird dieses Maximum bei einer noch höheren Frequenz (2,5 Hz) erreicht.

Dieser Effekt verstärkt sich in der dritten Woche in Kultur (jeweils in rot dargestellt) noch einmal, wobei die Frequenz, bei der ein Kraftmaximum erreicht wird, dabei im Vergleich zu Woche 2 gleichbleibt. Allerdings liegt dieses Maximum deutlich über dem in der zweiten Woche erreichten (für die Kontrollgruppe liegt dieses nun bei $138 (\pm 7)$ % des Ausgangswertes), sodass eine annähernd parabelförmige Kurve entsteht. Auch dieses Verhalten lässt sich in nahezu allen Behandlungsgruppen zu diesem Zeitpunkt finden, lediglich die erst spät mit Denopamin der Dosis 1000 nM behandelten Proben zeigen wie schon in der zweiten Kulturwoche ein Maximum bei einer höheren Frequenz (2,5 Hz) als die übrigen Gruppen und erreichen dabei auch ein höheres Kraftniveau.

Ab der zweiten Woche in Kultur kommt es also in der Kontrollgruppe, der Metoprolol-Gruppe und den beiden Denopamin-spät-Gruppen zu einer signifikanten Veränderung der FFR von einem negativen Verlauf hin zu einer Positivierung, der Effekt zeigt sich in der dritten Woche verstärkt, lediglich für die niedrigsten und höchsten getesteten Frequenzen bestehen keine derart großen Unterschiede zum Verhalten zu Kulturbeginn. Für die Denopamin-früh-Gruppen ließen sich bei teilweise größeren Schwankungen mit einer Ausnahme keine signifikanten Unterschiede feststellen, die erkennbare Tendenz war jedoch die gleiche wie für die anderen Gruppen.

4.4 Ergebnisse der Western-Blot-Analyse

4.4.1 Proteinmenge der SERCA2a

Bei der Betrachtung der Proteinmenge der SERCA2a (Abbildung 21), sollen zunächst die Unterschiede zwischen den zu verschiedenen Zeitpunkten aus der Kultur entnommenen Myokardproben betrachtet werden: Vergleicht man die Proteinmenge im unkultivierten Gewebe mit den Werten nach einem Tag Kulturdauer, fällt ein deutlicher Abfall derselben auf $26 (\pm 6)$ % bis $43 (\pm 6)$ % des Ausgangswertes in allen Behandlungsgruppen auf. Für die Kontrollgruppe ist dieser Abfall statistisch signifikant. Im weiteren Verlauf beim Vergleich der Werte vom ersten Tag mit den Werten der jeweiligen Behandlungsgruppe 20 Tage später, ist ein deutlicher Wiederanstieg, der zum Teil auch etwas über das Ausgangsniveau hinausgeht ($95 (\pm 28)$ % bis $141 (\pm 27)$ %) festzustellen, der für die Kontrollgruppe und die mit der hohen Dosis Denopamin behandelten Myokardslices als statistisch signifikant zu beurteilen ist. So-

mit ist ein deutlicher Einfluss der Kulturdauer auf diesen Parameter feststellbar, der Vergleich der verschiedenen Behandlungsgruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten gegeneinander lässt im Gegensatz dazu keine signifikanten Unterschiede erkennen.

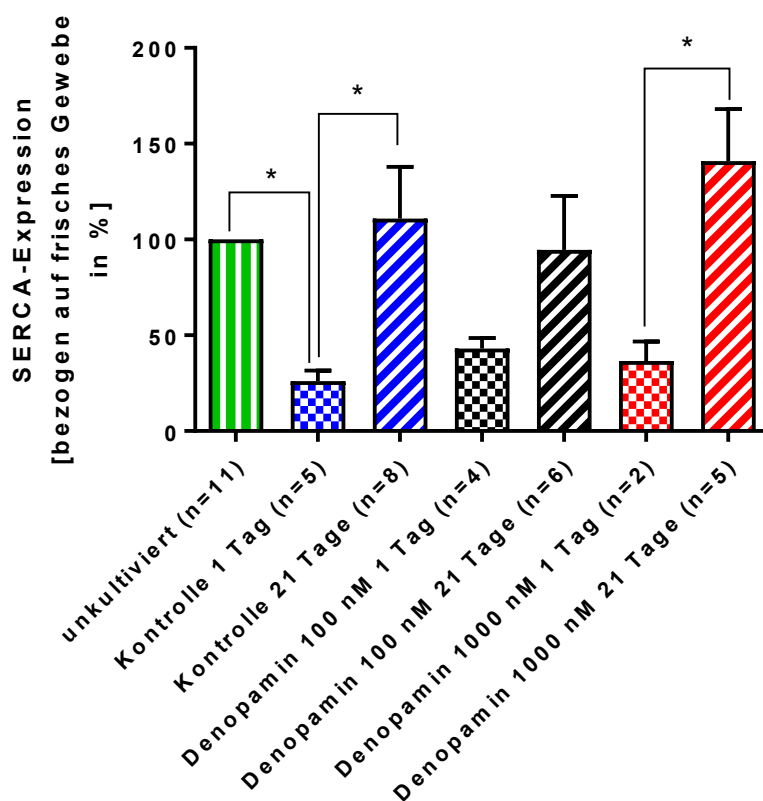


Abbildung 21 Proteinmenge der SERCA2a zu verschiedenen Kulturzeitpunkten und nach Zusatz von Denopamin während der Kultur

4.4.2 Proteinmenge des Phospholambans (PLN)

Als nächstes soll die Proteinmenge des Phospholambans (PLN) im Gesamten sowie die Mengen der Monomer- und Pentamer-Form desselben im Zeitverlauf und nach den verschiedenen Behandlungen dargestellt werden (Abbildung 22). Die Gesamtmenge an PLN (Abbildung 22 (a)) zeigt wie die Proteinmenge der SERCA eine deutlich sinkende Tendenz vom unkultivierten Zustand zu dem nach einem Tag in Kultur, es zeigt sich ein Abfall auf $27 (\pm 7) \%$ bis $68 (\pm 17) \%$ des Ausgangswertes. Auch hier kommt es dann im Verlauf der nächsten 20 Kulturstage zu einem Wiederanstieg auf $110 (\pm 40) \%$ bis $178 (\pm 56) \%$, der in der Kontrollgruppe als signifikant zu beurteilen ist. Zwischen den verschiedenen pharmakologisch behandelten Gewebeproben ist zu beiden Zeitpunkten (1 Tag und 21 Tage) kein signifikanter Unterschied erkennbar.

Betrachtet man die Proteinmenge des als Monomer vorliegenden Phospholambans (Abbildung 22 (b)) allein, ist im Zeitverlauf keine derart klare Tendenz zum Abfall dieses Werts zu erkennen (nach 1 Tag Kultur $52 (\pm 28) \%$ bis $123 (\pm 10) \%$ des Ausgangswertes), während eine deutliche Zunahme im Bereich der nächsten 20 Kulturstage durchaus zu beobachten ist. Am Ende der dreiwöchigen Kultur liegt der

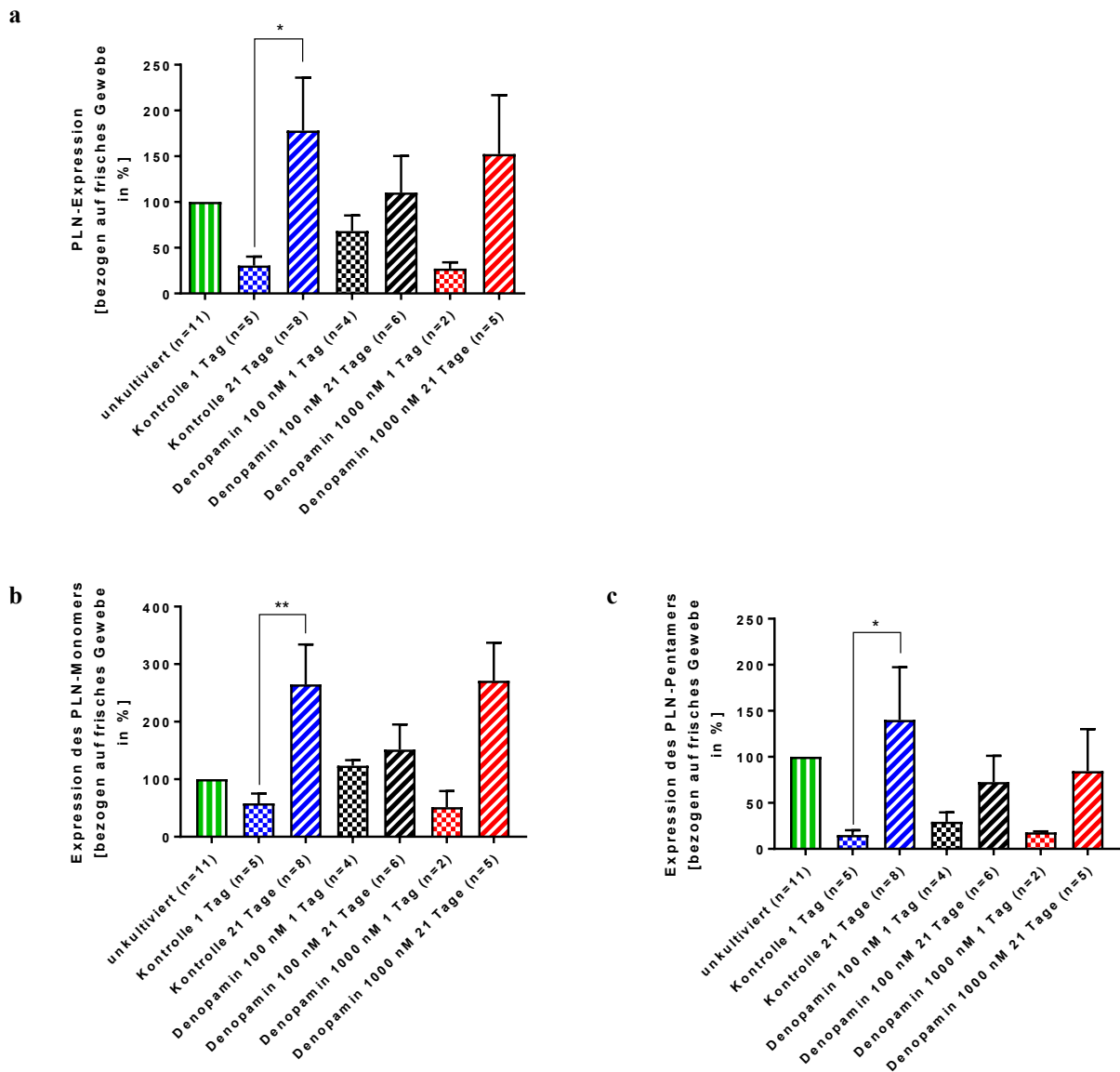


Abbildung 22 Proteinmenge an Phospholamban (PLN) gesamt (a), sowie der Monomer-Form (b) und der Pentamer-Form (c) zu verschiedenen Zeitpunkten und nach unterschiedlicher Behandlung

Wert auf $152 (\pm 44) \%$ bis $271 (\pm 66) \%$ des Werts vom jeweiligen unkultivierten Gewebe. Dies entspricht für die Kontrolle einem signifikanten Anstieg im Vergleich zwischen erstem und 21. Kulturtag. Beim Vergleich der Behandlungsgruppen ist lediglich festzustellen, dass die Veränderungen in der Gruppe mit der niedrigen Dosis des Denopamins weniger stark ausgeprägt scheinen, ein signifikanter Unterschied zu den einzelnen Zeitpunkten lässt sich aber im Hinblick auf die pharmakologische Beeinflussung nicht erkennen.

Die Proteinmenge des als Pentamer-Form vorliegenden PLNs (Abbildung 22 (c)) zeigt im Vergleich dazu einen wesentlich stärkeren Abfall innerhalb des ersten Kulturtages für alle Gruppen (auf $15 (\pm 5) \%$ bis $29 (\pm 10) \%$), bevor es auch hier bis zum Kulturrende zu einem deutlichen Wiederanstieg auf $73 (\pm 29) \%$ bis $140 (\pm 57) \%$ kommt, der für die Kontrollgruppe als signifikant zu beurteilen ist.

Ein Unterschied in diesem Verhalten für die verschiedenen behandelten Proben ist dabei nicht klar zu erkennen.

Somit ist bei gemeinsamer Betrachtung obengenannter Veränderungen für das Protein PLN zu beobachten, dass innerhalb des ersten Kulturtages eine deutliche Abnahme der Proteinmenge stattfindet, wobei vor allem die als Pentamer vorliegenden Einheiten abnehmen. Im weiteren Kulturverlauf kommt es dann zu einem Wiederanstieg dieses Proteins, wobei in dieser Entwicklung sowohl die PLN-Monomere als auch die Pentamere zunehmen, die Monomere jedoch stärker. Diese Beobachtung unterscheidet sich dabei nicht für die mit Denopamin stimulierten und die unbehandelten Myokardproben.

4.4.3 Phosphorylierung an der Aminosäure Ser-16 des PLNs

Betrachtet man nun den Anteil des PLN-Monomers, das an der Aminosäure Serin 16 phosphoryliert ist, zu den verschiedenen Zeitpunkten und unter den verschiedenen Kulturbedingungen (Abbildung 23 (a)), ist die größte Veränderung zwischen dem unkultivierten Zustand und dem nach einem Tag Kultur festzustellen: es kommt hier zu einem signifikanten Abfall der Phosphorylierung des Monomers innerhalb eines Tags. Der übrigbleibende phosphorylierte Anteil unterscheidet sich dabei zwischen den Behandlungsgruppen: Während in der Kontrollgruppe lediglich $0,8 (\pm 0,5) \%$ der Ausgangsphosphorylierung zu messen sind, liegt dieser Wert für die Behandlung mit 100 nM Denopamin bei $2 (\pm 2) \%$ und bei 1000 nM bei $20 (\pm 20) \%$. Im weiteren Kulturverlauf ergeben sich dann keine deutlichen Änderungen mehr, der Phosphorylierungsstatus verbleibt auf dem niedrigen erreichten Niveau, wobei einzig bei der Hochdosis-Denopamin-Gruppe die Tendenz einer weiteren Abnahme besteht.

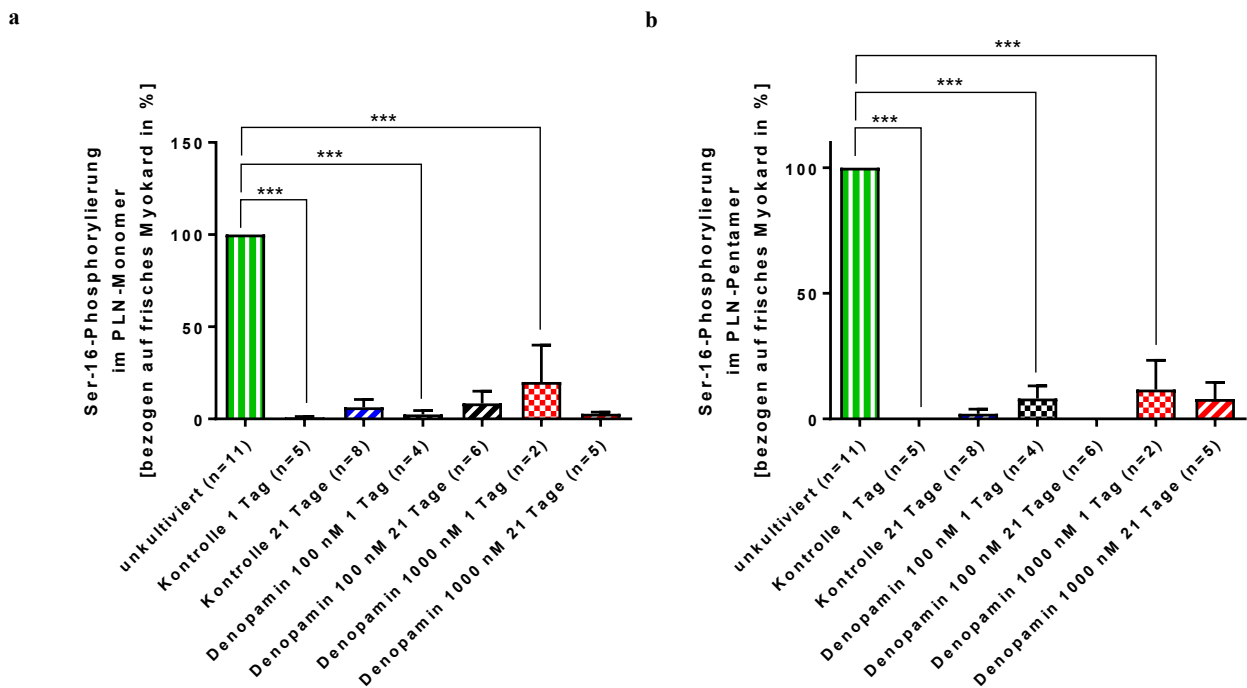


Abbildung 23 Anteil des an Ser-16 phosphorylierten Mono- (a) und Pentamers (b) des PLNs im Vergleich zum unkultivierten Gewebe

Ein ähnliches Ergebnis ergibt sich bei der Messung des entsprechend phosphorylierten Anteils des PLN-Pentamers (Abbildung 23 (b)): Auch hier ist in allen Kulturgruppen ein höchst signifikanter Rückgang der Phosphorylierung innerhalb des ersten Kulturtages zu verzeichnen, wobei, während für die Kontrollgruppe kein Wert mehr messbar ist, für die behandelten Gruppen noch 8 (± 5) % (Denopamin 100 nM) bzw. 12 (± 12) % (Denopamin 1000 nM) des Ausgangswertes festzustellen sind. Im weiteren Verlauf kommt es dann zu keinen deutlichen weiteren Veränderungen mehr.

4.4.4 Phosphorylierung an der Aminosäure Thr-17 des PLNs

Untersucht man auf gleiche Weise die an Threonin 17 phosphorylierten Anteile des PLN-Monomers und -Pentamers (Abbildung 24), ist festzustellen, dass hier keine so massiven Änderungen des Phosphorylierungsniveaus erfolgen.

Es zeigt sich jedoch für den an dieser Stelle phosphorylierten Anteil des Monomers eine klare Tendenz einer Reduktion innerhalb des ersten Kulturtages auf 74 (± 50) % des Ausgangswertes für die Kontrollgruppe, 63 (± 28) % für die Denopamin 100 nM-Gruppe und 11 (± 11) % für die Denopamin-1000 nM-Gruppe. Anschließend kommt es zu einem starken Anstieg in allen Gruppen auf 187 (± 78) % bis 315 (± 113) % des Ausgangswertes.

Für den Phosphorylierungsstatus des Pentamers lässt sich allerdings keine derart klare Tendenz erkennen, lediglich ein Anstieg zwischen dem ersten und letzten Kulturtag scheint in allen Gruppen in unterschiedlichem Ausmaß vorzuliegen.

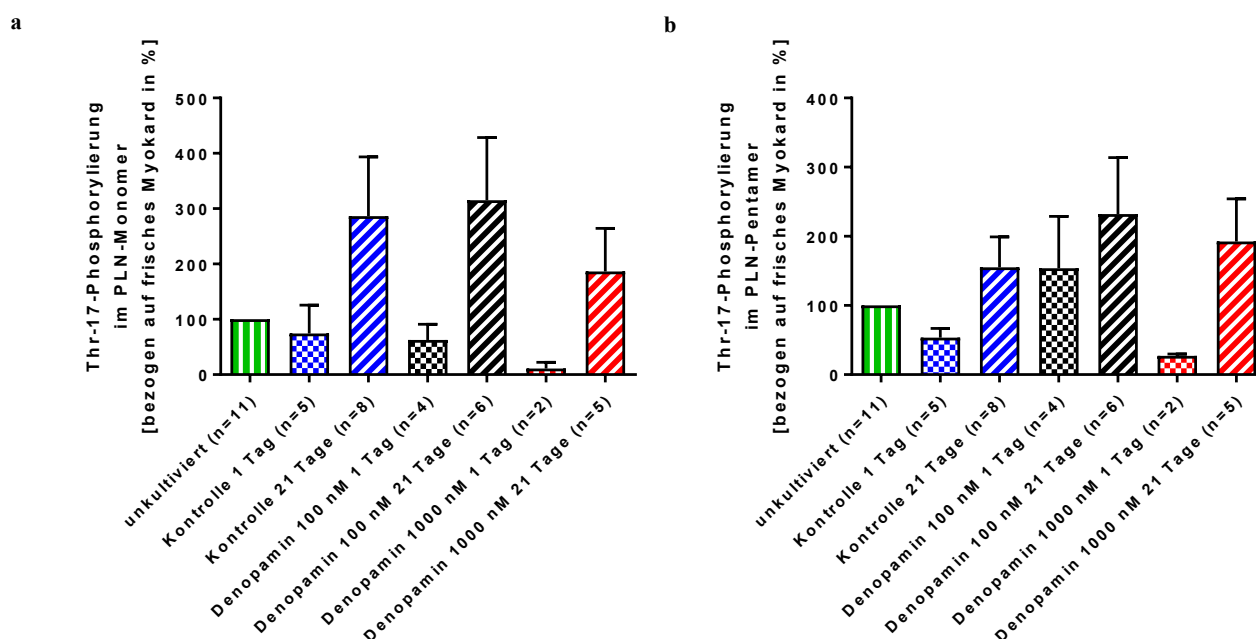


Abbildung 24 Anteil des an Thr-17 phosphorylierten Mono- (a) und Pentamers (b) des PLNs im Vergleich zum unkultivierten Gewebe

4.4.5 Phosphorylierung an der Aminosäure Ser-10 des PLNs

Ebenso soll nun der Anteil der PLN-Monomere und -Pentamere betrachtet werden, der an der Aminosäure Serin 10 phosphoryliert war: Hier zeigen sich keinerlei signifikante Änderungen im Vergleich

der verschiedenen Zeitpunkte und auch Kulturgruppen. Dies trifft sowohl für die Monomere als auch für die Pentamere zu (Abbildung 25).

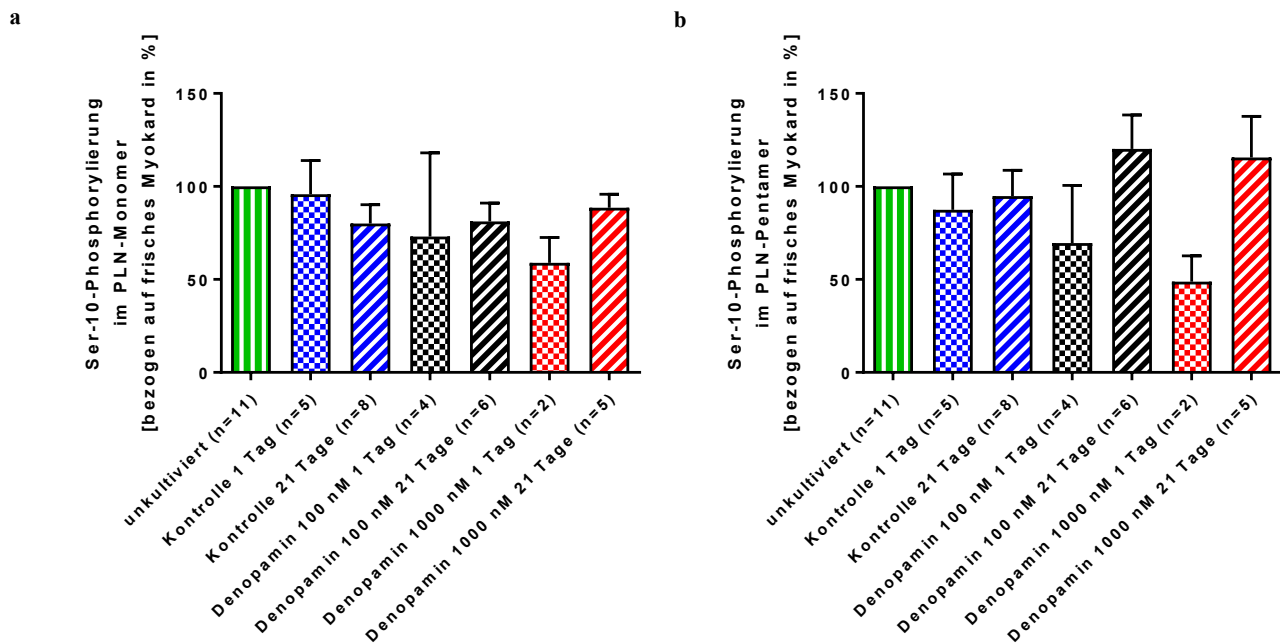


Abbildung 25 Anteil des an Ser-10 phosphorylierten Mono- (a) und Pentamers (b) des PLNs im Vergleich zum unkultivierten Gewebe

5. Ergebnisse der Untersuchung des nicht-insuffizienten Pavianmyokards

5.1 Statistik der Pavianproben

In diese Betrachtung miteinbezogen wurden anhand der Ein- und Ausschlusskriterien drei von fünf kultivierten Myokardproben, die Einschlussquote lag mit 60 % also etwas höher als für die humanen Präparate. Alle der Präparate stammten von bis zur Operation gesunden Pavianen, die im Rahmen einer Xenotransplantationsstudie ein Schweineherz implantiert bekamen. Für die Untersuchung der Proben erfolgte die Erhebung der gleichen Parameter wie für die humanen Präparate.

5.2 Veränderungen der Kontraktionskraft im Pavianmyokard

Als Erstes soll auch hier in gleicher Weise wie für die humanen Myokardslices eine Untersuchung des Kraftverlaufs in Kultur als zentralem Parameter erfolgen. Grundsätzlich sind dabei ebenfalls Veränderungen in verschiedenen Zeitbereichen zu beobachten: kurz- und mittelfristige Veränderungen im Bereich von Minuten (z.B. nach dem Öffnen der Tür) oder wenigen Stunden (nach den Mediumwechseln) waren hier in ähnlicher Form wie für die humanen Proben zu beobachten und sollen auch von den Primatenproben in dieser Arbeit nicht näher untersucht werden. Der Fokus liegt auch hier auf den langfristigen Veränderungen im Verlauf mehrerer Tage. Abbildung 26 zeigt diese Kraftverläufe der Pavianproben unter den gleichen pharmakologischen Behandlungen wie für die humanen Proben: Für

unbehandelte Pavian-Myokardslices (Abbildung 26 (a)) ist zu Kulturbeginn eine durchschnittliche Kontraktionskraft von 3,2 mN ($\pm 0,4$ mN) messbar, die innerhalb der ersten 6 h auf ein Minimum von 1,1 mN ($\pm 0,05$ mN) abfällt (Reduktion auf ca. 34 % des Anfangswerts). Innerhalb der nächsten Stunden kommt es zu einem starken Wiederanstieg auf das Startniveau der Kraft, das Maximum ist dabei mit 3,3 mN ($\pm 0,4$ mN) nach 48 h Kulturdauer erreicht. Es folgt eine stabile Phase auf diesem Niveau, bevor es ab ungefähr 216 h (9 Tagen), zu einem langsamen Absinken auf einen Endwert von 0,8 mN ($\pm 0,2$ mN) (ca. 24 % des Anfangswertes) kommt.

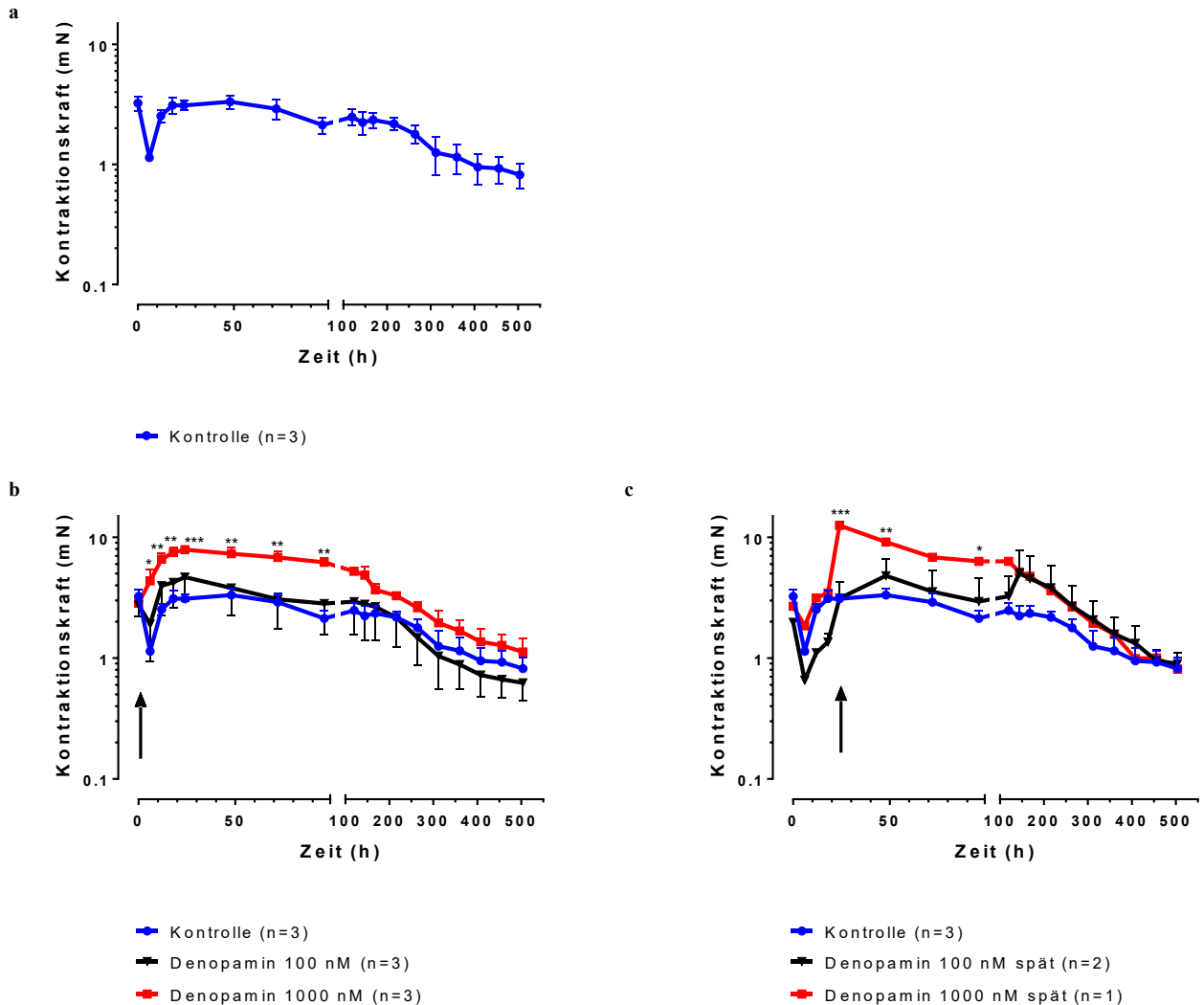


Abbildung 26 Kraftverlauf der Pavian-Myokardslices unter verschiedenen Behandlungsbedingungen: (a) zeigt die Ergebnisse der Kontrollgruppe allein, (b) die Ergebnisse der ab Kulturbeginn, (c) die der ab 20 h in Kultur mit Denopamin behandelten Präparate; die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Zugabe von Denopamin; die Signifikanzangaben beziehen sich auf den Vergleich zur Kontrollgruppe

Setzt man den Kulturkammern direkt nach Kulturbeginn die Substanz Denopamin in Konzentrationen von 100 nM und 1000 nM zu (Abbildung 26 (b)), liegt bei Zusatz der niedrigeren Menge der Substanz die Kontraktionskraft mit einem Wert von durchschnittlich 2,8 mN ($\pm 0,5$ mN) zu Beginn zwar unterhalb dessen der Kontrolle, mit einem Minimum von 2,0 mN ($\pm 1,0$ mN) und damit ca. 71 % des Anfangswerts nach 6 h in Kultur jedoch ist erkennbar, dass die verbleibende Kraft doppelt so groß ist wie ohne Behandlung. Bei dem anschließenden Wiederanstieg wird mit 4,7 mN ($\pm 1,7$ mN) nach 24 h

Kulturdauer ein höheres Niveau erreicht als zu Beginn, das langsame Abfallen nach einer Plateauphase ist stärker ausgeprägt als in der Kontrollgruppe, der Endwert liegt bei durchschnittlich 0,6 mN ($\pm 0,2$ mN) nach 21 Tagen. Dabei ist erkennbar, dass das Absinken der Kraft nach Erreichen des Maximums kontinuierlich erfolgt.

Stärker ausgeprägt sind die Unterschiede bei der höheren Konzentration des Denopamins bei Sofort-einsatz (Abbildung 26 (b)). Der Anfangswert der Kontraktionskraft liegt mit 2,9 mN ($\pm 0,4$ mN) im Durchschnitt in einem den anderen Gruppen vergleichbaren Bereich, es zeigt sich jedoch im Unterschied zu diesen kein Abfallen auf ein Minimum in den ersten Stunden, sondern ein direkter starker Anstieg der Kraft auf ein Maximum von 7,9 mN ($\pm 0,6$ mN) und damit ca. 272 % des Anfangswerts nach 24 h. Anschließend findet sich auch hier ein kontinuierliches Absinken der Kraft über die restliche Kulturdauer, bis ein Endwert von 1,1 mN ($\pm 0,3$ mN) erreicht wird. Damit liegt ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe durch diese Behandlung im Bereich 6 h bis 96 h in Kultur vor.

Bei den nach 20 h Kulturdauer erstmalig mit der niedrigen Dosierung behandelten Proben (Abbildung 26 (c)), deren Startwert mit durchschnittlich 2,0 mN ($\pm 0,01$ mN) unter dem der Kontrollgruppe liegt, zeigen sich wie dort ein Minimum von 0,7 mN ($\pm 0,0$ mN) (ca. 35 % des Ausgangswertes) nach 6 h sowie ein Wiederanstieg auf zunächst 1,4 mN ($\pm 0,2$ mN) vor Behandlungsbeginn (nach 18 h Kultur). Unter Behandlung kommt es nach einer Plateauphase dann zu einem Anstieg bis auf 5,0 mN ($\pm 2,8$ mN) nach 144 h (6 Tagen) in Kultur. Anschließend fällt die Kontraktionskraft dann langsam auf einen Wert von 0,9 mN ($\pm 0,2$ mN), der dem der Kontrollgruppe sehr vergleichbar ist, ab.

Die spät mit der höheren Dosierung Denopamin behandelte Gruppe beinhaltet lediglich ein Präparat. Für dieses ist ein Startwert von 2,7 mN und ein Minimum von 1,9 mN (ca. 70 % des Anfangswertes) nach 6 h zu erheben, bevor es auch hier zu einem Anstieg bis auf 3,5 mN nach 18 h Kulturdauer kommt. Somit liegt für dieses Präparat der Anfangswert zwar unterhalb dessen der Kontrollgruppe, der Kraftabfall fällt jedoch auch vor Behandlungsbeginn deutlich schwächer aus als dort, bevor nach 18 h ein nur noch leicht höherer Wert als das Kontrollniveau, das zu diesem Zeitpunkt bei 3,1 mN liegt, erreicht wird. Kurz nach Behandlungsbeginn kommt es dann zu einem sehr starken Anstieg auf maximal 12,5 mN. In zwei Phasen, zwischen denen ein Plateau liegt, kommt es dann über die nächsten Tage auch hier zu einem Abfall der Kontraktionskraft auf lediglich 0,8 mN zu Kulturende. Somit liegt für dieses Präparat ein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe im Zeitraum 24 h bis 96 h mit einer Ausnahme beim 72 h-Wert vor.

5.3 Entwicklung der funktionellen Messgrößen im Pavianmyokard

5.3.1 Refraktärzeit

Die Refraktärzeit der nicht pharmakologisch beeinflussten Pavian-Proben (Abbildung 27 (a)) schwankt in den ersten Kulturtagen in einem den humanen Proben grundsätzlich vergleichbaren Bereich zwischen 292 ms (± 0 ms bei $n=1$) und 414 ms (± 73 ms), ab ungefähr dem 12. Kulturtag kommt es dann zu einem allmählichen Absinken bis auf 254 ms (± 4 ms) gegen Kulturende.

Bei Einsatz von Denopamin beider Dosierungen gleich zu Kulturbeginn (Abbildung 27 (b)) zeigt sich, mit lediglich stärkeren Schwankungen, ein Verhalten, das dem der Kontrollgruppe sehr ähnlich ist.

Bei späterem Beginn dieser Behandlung (Abbildung 27 (c)) zeigt sich für die niedrige Dosierung ebenfalls ein den Kontrollen ähnliches Verhalten. Die mit der hohen Dosierung behandelte Probe zeigt generell eine etwas niedrigere Refraktärzeit, die über die Kulturdauer stabil bleibt.

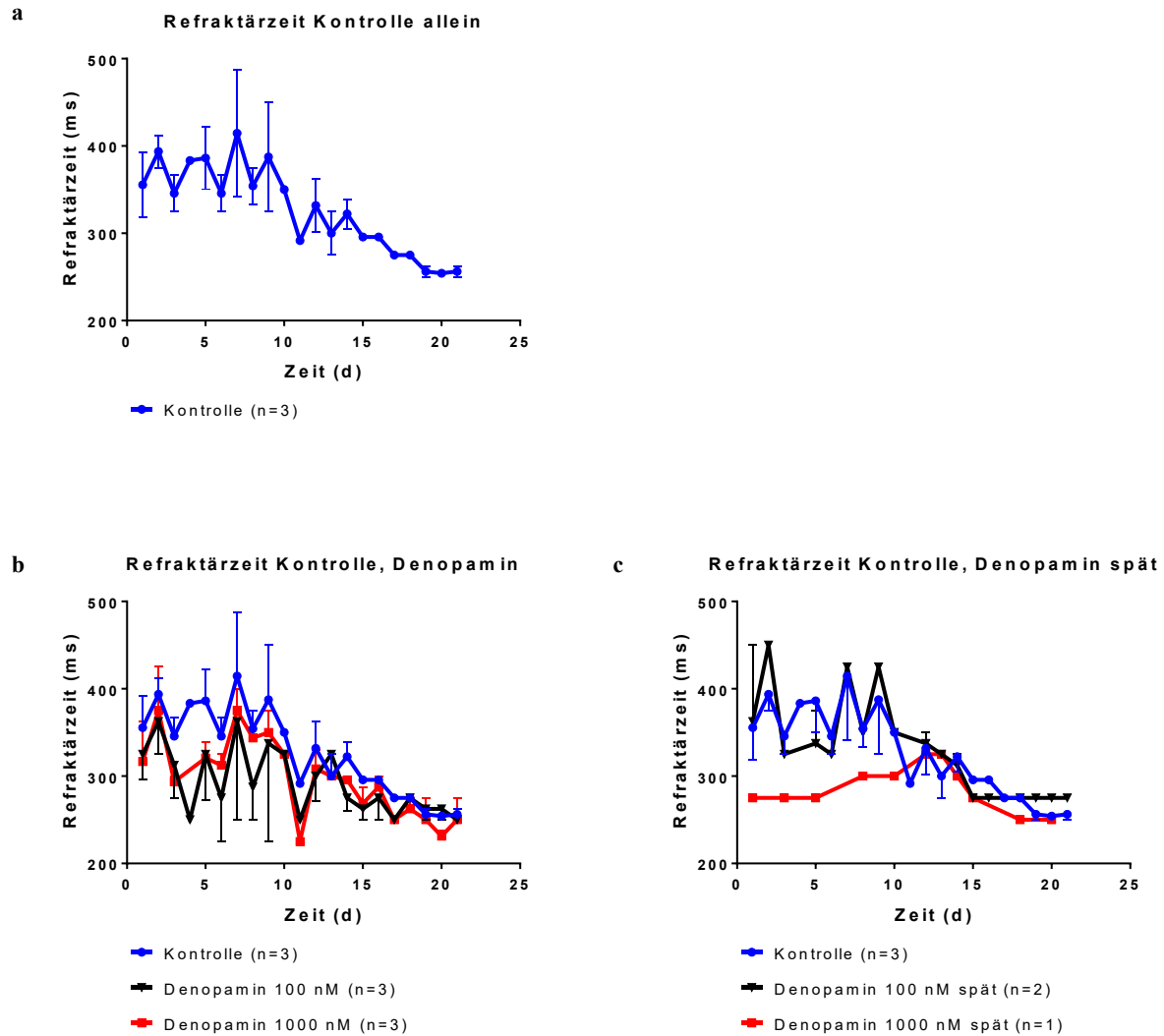


Abbildung 27 Refraktärzeit der Pavian-Proben im Zeitverlauf unter den verschiedenen Kulturbedingungen: (a) zeigt die Ergebnisse der Kontrollgruppe allein, (b) die Ergebnisse der von Beginn an mit Denopamin behandelten und (c) die Ergebnisse der erst nach 20 h mit Denopamin behandelten Präparate im Vergleich zur Kontrollgruppe

5.3.2 Reizschwelle

Ebenso soll auch die elektrisch nötige Reizschwelle zum Auslösen gleichmäßiger Kontraktionen für diese Proben dargestellt werden (Abbildung 28).

Es ist hier zu erkennen, dass die initial 14 mA (± 2 mA) für die Kontrollgruppe betragende Reizschwelle unter sehr starken Schwankungen tendenziell generell leicht ansteigt – für genauere Erläuterungen zu den Schwankungen siehe Abschnitt 6.3.2.

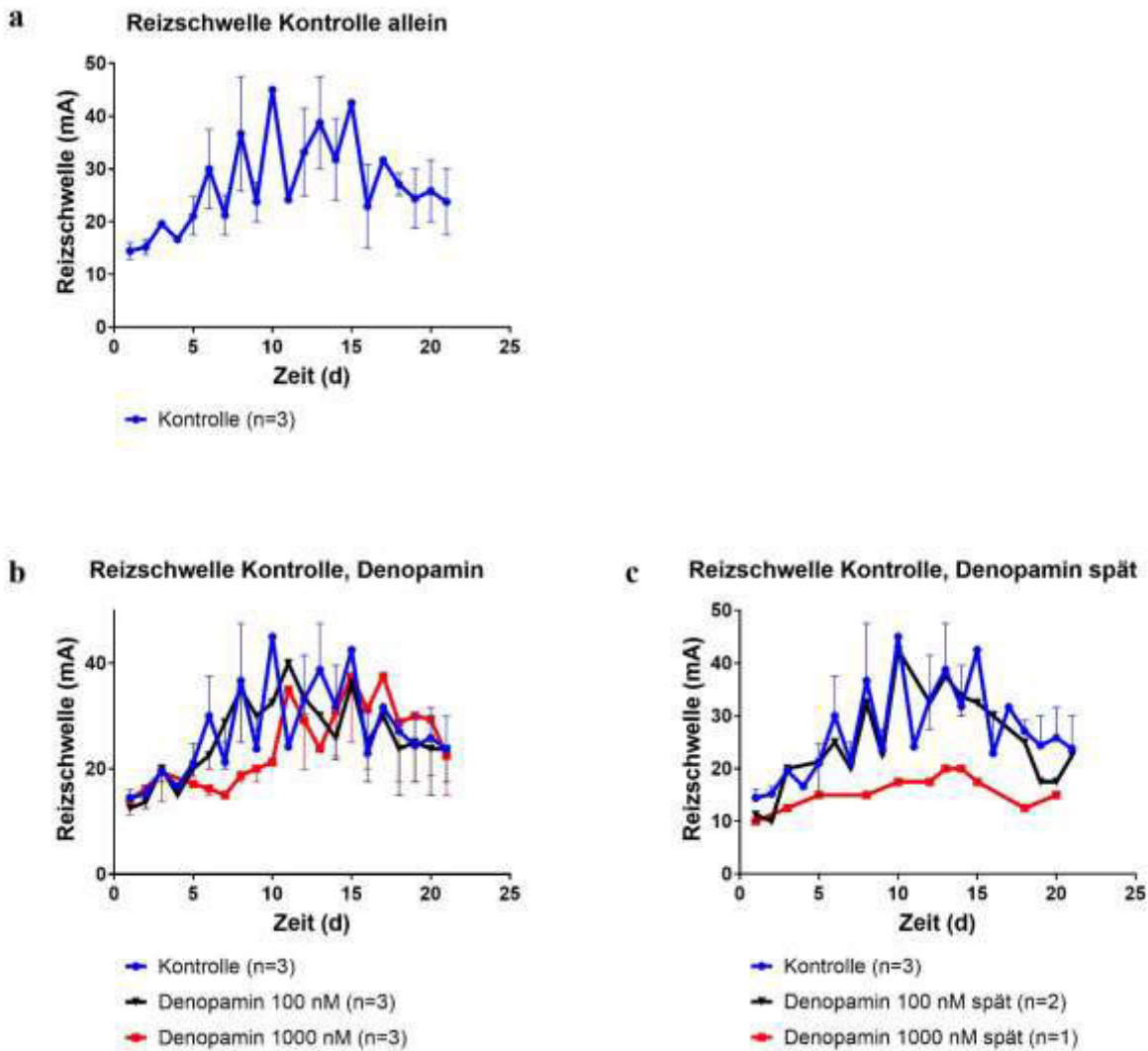


Abbildung 28 Elektrische Reizschwelle der Pavian-Proben im Zeitverlauf unter den verschiedenen Bedingungen: (a) zeigt die Ergebnisse der Kontrollgruppe allein, (b) die Ergebnisse der von Beginn an mit Denopamin behandelten und (c) die Ergebnisse der erst nach 20 h mit Denopamin behandelten Präparate im Vergleich zur Kontrollgruppe

Für die von Tag 0 an mit Denopamin behandelten Slices zeigt sich in der niedrigen Dosis das gleiche Verhalten wie ohne diese Behandlung, für die höhere Dosis liegt der Wert der elektrischen Reizschwelle im Bereich 5-10 Kulturtage noch unter dem der anderen beiden Gruppen, bevor auch hier ein Anstieg zu verzeichnen ist.

Ähnlich verhält es sich bei den spät pharmakologisch beeinflussten Präparaten: Die niedrige Dosierungsgruppe zeigt keine nennenswerten Unterschiede zum Zustand ohne die Behandlung. Die mit 1000 nM Denopamin versetzte Probe liegt mit ihrem Messwert hier über die gesamte Kulturdauer hinweg unter dem Niveau der Kontrollen.

5.3.3 Kraft-Frequenz-Abhängigkeit

Auch für die Pavian-Myokardslices wurde das Verhalten der Kontraktionskraft bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen in drei Kultur-Zeitabschnitten untersucht (vgl. Abbildung 29).

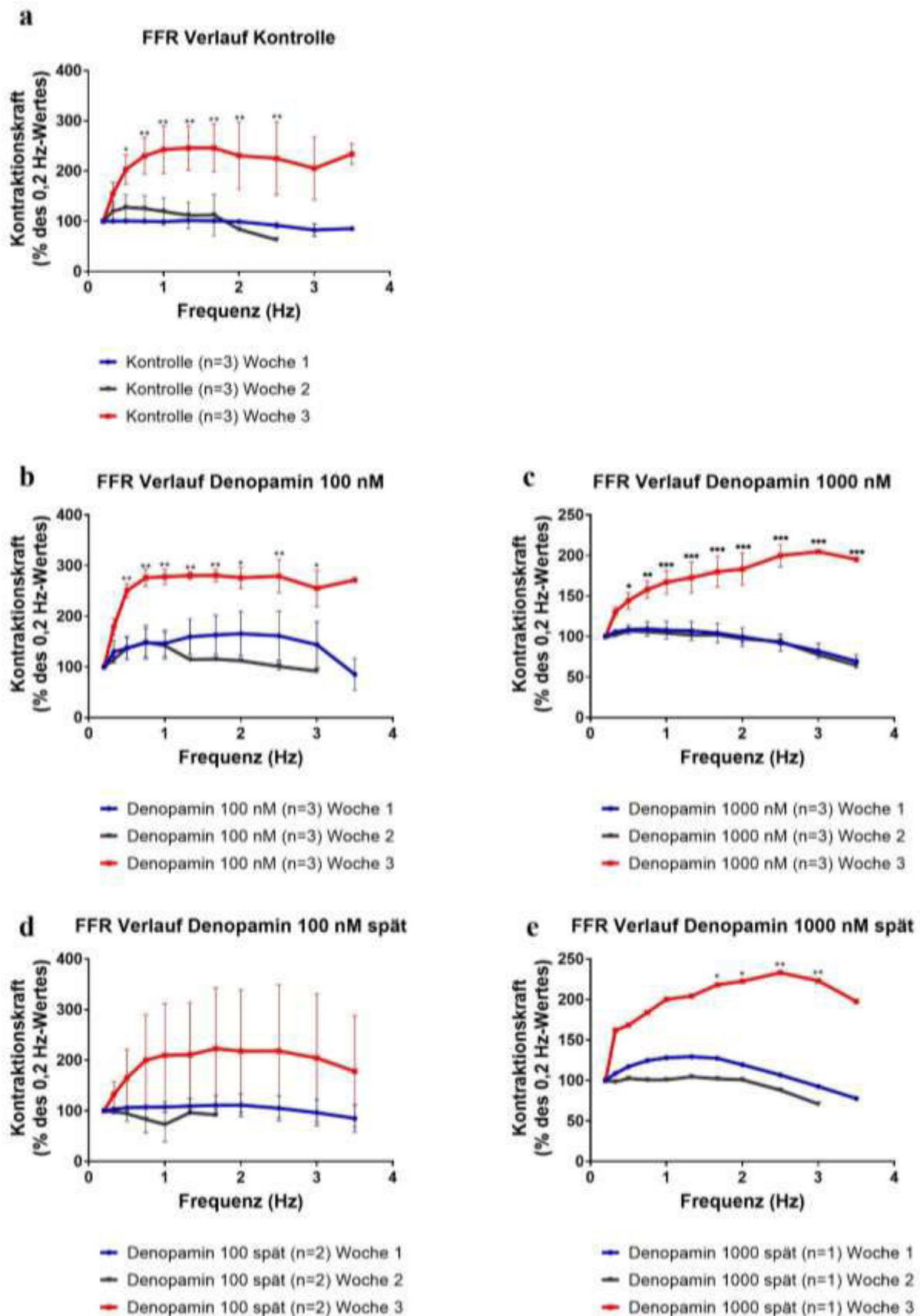


Abbildung 29 Veränderungen der FFR des Pavian-Myokards im Zeitverlauf unter verschiedenen Behandlungen: (a) zeigt die Ergebnisse der unbehandelten, (b) die der mit Denopamin 100 nM und (c) die der mit Denopamin 1000 nM behandelten Präparate; (d) und (e) zeigen die Ergebnisse für die erst nach 20 h mit Denopamin behandelten Präparate. Die Signifikanztestungen beziehen sich auf den Vergleich zum jeweiligen Verlauf in Woche 1

In der ersten Kulturwoche (jeweils blau dargestellt) bewirkt eine Steigerung der Frequenz für die Kontrollgruppe nur unwesentliche Veränderungen der Kontraktionskraft. Im Vergleich dazu lässt sich bei initialem Einsatz von Denopamin der Dosis 100 nM eine deutliche Kraftsteigerung bei einem Frequenzoptimum von 2 Hz erkennen, bevor es bei höheren Frequenzen wieder zu einem Absinken kommt, wohingegen die 10-fach stärker behandelte Gruppe das gleiche Verhalten wie die unbehandelten Proben zeigt. Für die erst im Verlauf mit der Substanz versetzten Slices lässt sich ebenfalls ein der Kontrollgruppe ähnliches Verhalten erkennen, lediglich die 1000 nM-Dosis scheint hier zu einer leichten Kraftsteigerung im Bereich 1,33 Hz zu führen.

In der zweiten Kulturwoche (jeweils schwarz dargestellt), ist für die Kontrollgruppe ausgehend vom 0,2 Hz-Wert ein leichter Kraftanstieg bei 0,5 Hz zu erkennen, bevor es zu einem Abfallen der Kontraktionskraft bei steigender Stimulationsfrequenz kommt. Die Präparate, die Denopamin 100 nM von Tag 0 an erhielten, zeigen hier bei niedrigen Frequenzen einen ausgeprägteren Kraftanstieg als die Kontrollproben bevor es auch hier wieder zu einem Abfall bei höheren Frequenzen kommt. Die ab Kulturbeginn behandelte 1000 nM-Gruppe zeigt hingegen für alle Frequenzen eine nahezu konstante Kraft. Eine erst nach 20 h in Kultur beginnende pharmakologische Intervention bewirkt für beide Dosierungen ein Kraftniveau unterhalb dessen der unbehandelten Slices mit einer näherungsweise konstanten Kontraktionskraft für die untersuchten Frequenzen.

In der letzten Kulturwoche (jeweils in rot dargestellt) verstärkt sich in der Kontrollgruppe der in der Vorwoche beginnende Effekt, die Kontraktionskraft steigt nun deutlich bis auf 246 (\pm 44) % des 0,2 Hz-Ausgangswertes bei 1,33 Hz und 1,67 Hz, ein Niveau das bis zu 3,5 Hz als höchster untersuchter Frequenz gehalten werden kann. In der Denopamin-100 nM-früh-Gruppe zeigt sich dieser Effekt verstärkt, die Kontraktionskraft bleibt ebenfalls bei einem Vielfachen des Ausgangswerts stabil, während die höherdosiert behandelten Präparate lediglich einen kontinuierlichen Kraftanstieg bei sehr hohen Frequenzen zeigen. Die erst einen Tag später mit der Substanz versetzten Proben schließlich lassen das gleiche Kraftverhalten wie die Kontrollproben erkennen.

Betrachtet man hier wie für das humane Myokard die jeweiligen Veränderungen im Zeitverlauf, fällt auf, dass es auch hier zu einer deutlichen Positivierung der anfänglich eher flachen FFR-Kurve kommt, diese Entwicklung aber erst in der dritten Kulturwoche signifikant (für die Kontrollen und die frühe Denopamin-Behandlung) zu erkennen ist. Für die spät beginnende Denopaminbehandlung zeigten sich bei $n=2$ für die niedrige Dosis bei gleicher Tendenz große Schwankungen, für die hohe Dosis existierte lediglich ein Präparat, das ebenfalls eine signifikante Positivierung in Woche 3 zeigte.

5.4 Western-Blot-Analysen

Auch für die Pavian-Myokardproben wurden die gleichen Western Blots zur Untersuchung der Proteinmengen und des Phosphorylierungsstatus durchgeführt wie für das humane Herzgewebe. Eine Zusammenfassung der jeweils mit Denopamin direkt von Beginn an und erst im Verlauf behandelten Präparate zu einer Denopamin-Dosis-Gruppe erfolgte dabei analog zum Vorgehen bei den humanen Proben (vgl. Abschnitt 3.3).

5.4.1 SERCA2a-Proteinmenge

Im Vergleich der Proteinmenge der SERCA2a für die verschiedenen Gruppen und Zeitpunkte (Abbildung 30) ist zu erkennen, dass keine signifikanten Unterschiede sowohl zwischen den einzelnen Zeitpunkten als auch zwischen den verschiedenen Behandlungen festzustellen sind. Es ist auch keine klare Tendenz einer Veränderung in eine bestimmte Richtung oder in einer bestimmten Gruppe zu

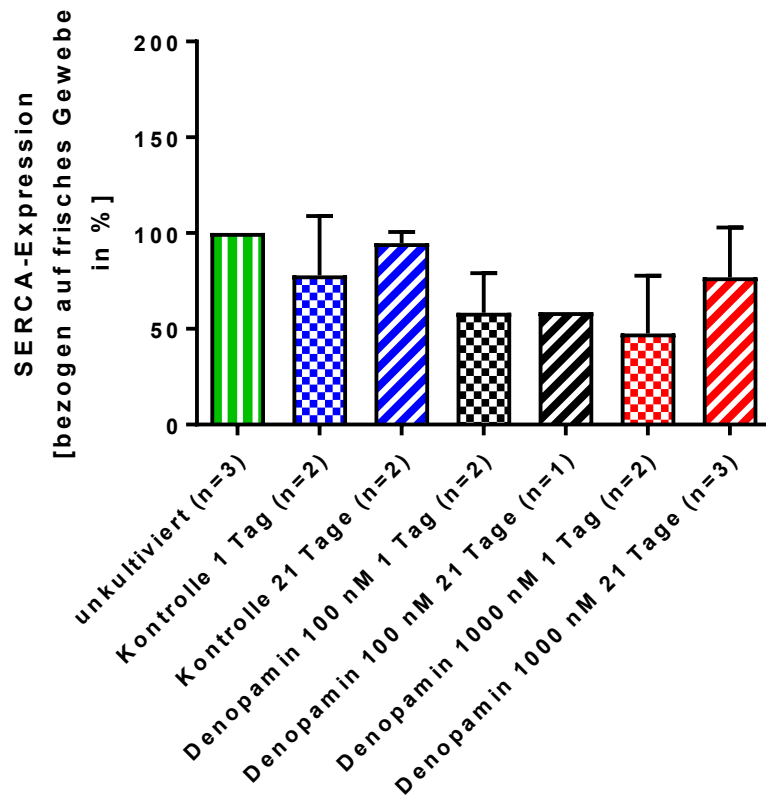


Abbildung 30 Proteinmenge der SERCA im Pavian-Myokard unter verschiedenen Kulturbedingungen und zu verschiedenen Zeitpunkten

erkennen.

5.4.2 PLN-Proteinmenge

Ein ähnliches Ergebnis wie für die SERCA-Proteinmenge findet sich im Primatenmyokard auch für die Phospholamban (PLN)-Gesamtmenge (Abbildung 31), es sind keine signifikanten Änderungen im Zeitverlauf festzustellen. Eine leichte Tendenz zeigt sich lediglich im Behandlungsgruppen-Vergleich, hier scheint die Kontrollgruppe für die komplette Kulturzeit stabil bei dem Wert von frischem Myokard zu bleiben, während die Denopamin-behandelten Präparate schon ab dem ersten Kulturtag nur noch ca. die Hälfte dieses Wertes erreichen.

Auch für die Menge des PLN-Monomers (Abbildung 31 (b)) ist kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Bedingungen und Zeitpunkten erkennbar, auffällig ist jedoch, dass die Kontrollgruppe im Langzeitverlauf (Wert nach 21 Tagen Kultur) doppelt so viel PLN-Monomere aufweist wie noch zu Beginn nach einem Tag Kultur oder im frischen Myokard.

Für die Pentamer-Form des Phospholambans (Abbildung 31 (c)) lässt sich lediglich eine leichte Tendenz erkennen, dass die mit Denopamin behandelten Gruppen zu beiden Zeitpunkten einen etwas niedrigeren Wert aufweisen als die Kontrollgruppe, sonst ergeben sich keine klaren oder signifikanten Unterschiede.

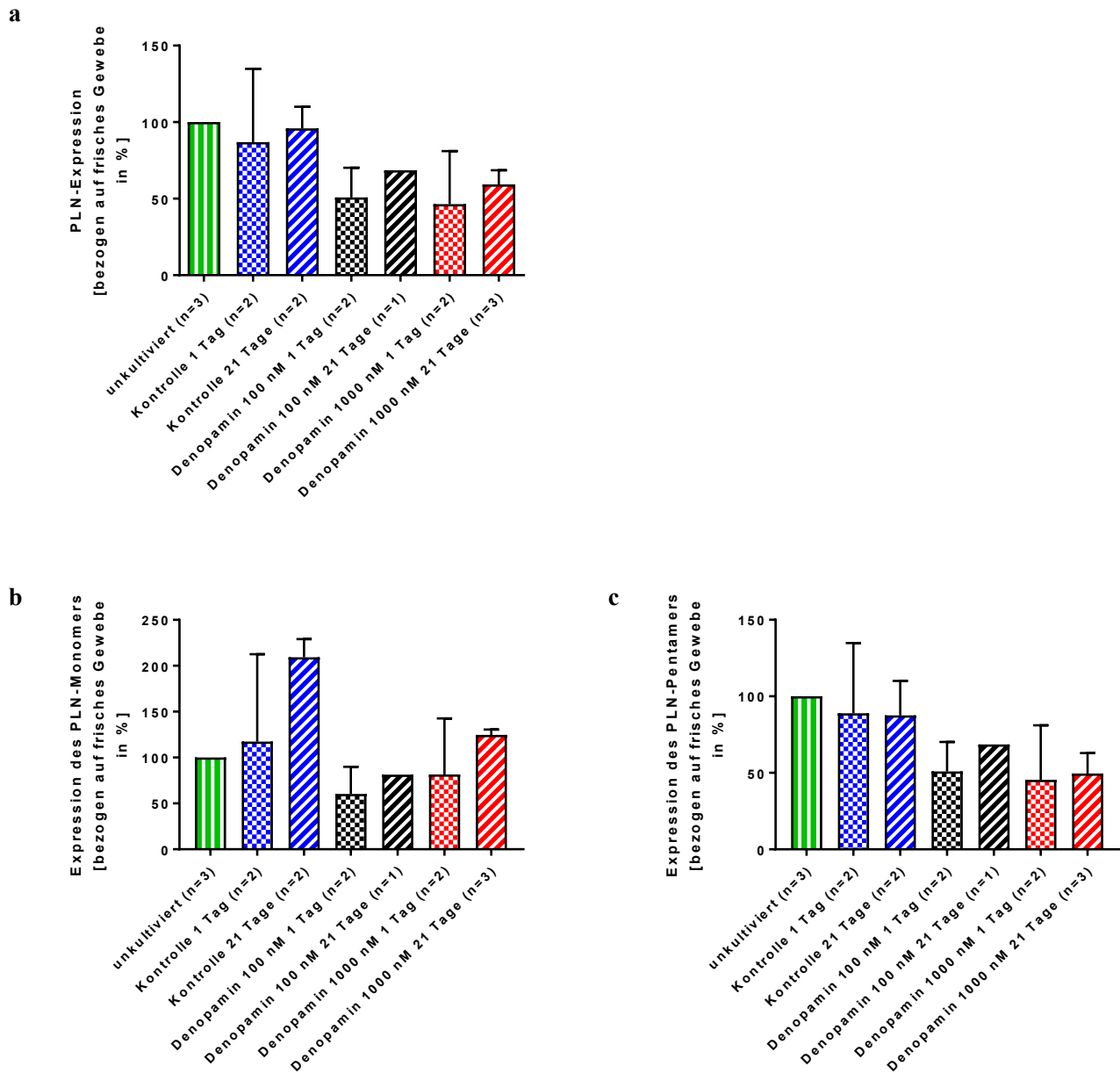


Abbildung 31 Proteinmenge des PLNs im Pavian-Myokard unter verschiedenen Kulturbedingungen und zu verschiedenen Zeitpunkten; (a) zeigt die Gesamtmenge, (b) die Menge des PLN-Monomers und (c) die Menge des Pentamers

5.4.3 Ser-16-Phosphorylierung des PLNs

Untersucht man auf gleiche Weise den Phosphorylierungsstatus des PLN-Monomers an der Aminosäure Ser-16 (Abbildung 32 (a)) zeigt sich ein signifikanter Abfall dieser Phosphorylierung in allen Gruppen innerhalb eines Tages Kulturdauer ohne Unterschied zwischen den behandelten und unbehandelten Präparaten. Im Vergleich dieses ersten Kulturtages mit dem Status nach 21 Tagen ist keine deutliche

Veränderung mehr wahrzunehmen, es kommt also auch nicht zu einem Wiederanstieg der Phosphorylierung an dieser Position im Zeitverlauf.

Auf ähnliche Weise fällt auch die Ser-16-Phosphorylierung des entsprechenden PLN-Pentamers innerhalb eines Tages Kulturdauer signifikant stark ab (vgl. Abbildung 32 (b)), jedoch für die mit Denopamin 1000 nM behandelte Gruppe lediglich auf 21 (± 1) % des Initialwertes, in den anderen Gruppen stärker. Im weiteren Verlauf kommt es zu einem nahezu vollständigen Verschwinden dieser Phosphorylierung im Pentamer. Auch in der Hochdosis-Denopamin-Gruppe kommt es zu einem weiteren signifikanten Abfall. Im Vergleich der verschiedenen Kulturgruppen im Hinblick auf Behandlungseffekte ist damit ein signifikanter Unterschied im Vergleich des 1-Tages-Wertes von Kontrollen und Denopamin 1000 nM-Präparaten zu beobachten - die behandelte Gruppe lässt einen doppelt so hohen Phosphorylierungsstatus im Pentamer zu diesem Zeitpunkt erkennen.

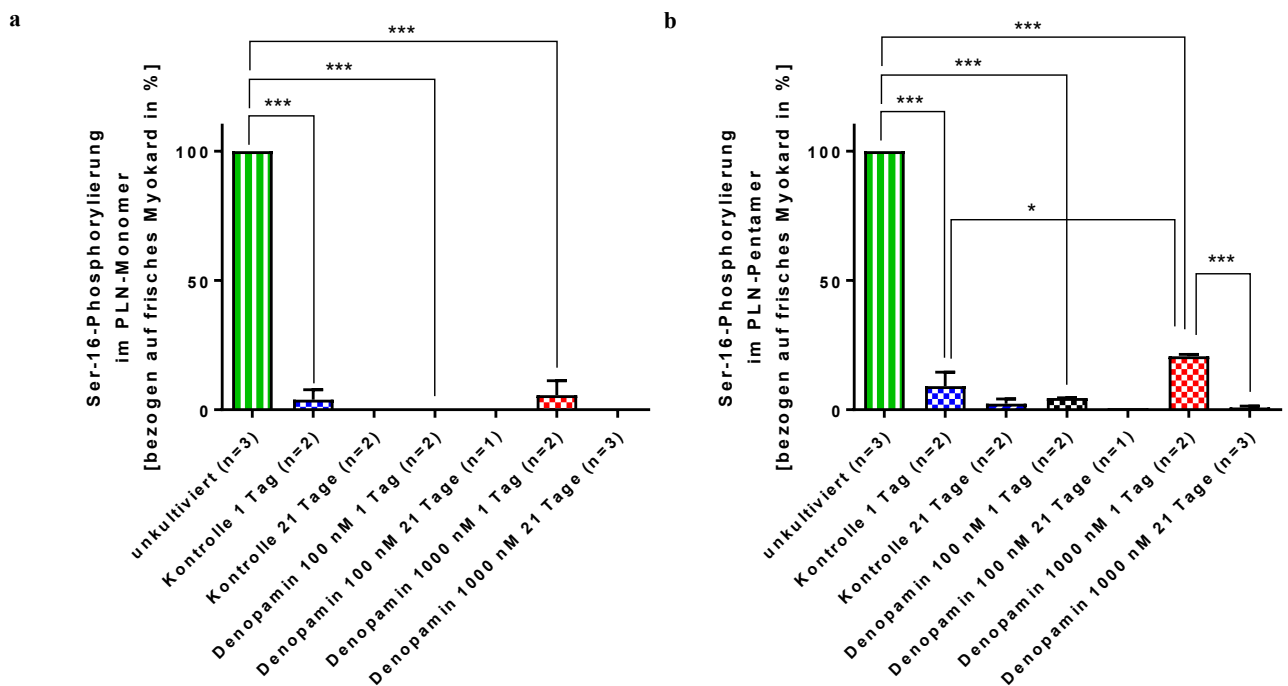


Abbildung 32 Ser-16-Phosphorylierung im PLN-Monomer (a) und -Pentamer (b) des Pavian-Myokards

5.4.4 Thr-17-Phosphorylierung des PLNs

Bei der Betrachtung der Phosphorylierung des Phospholambans an der Aminosäure Thr-17 ergeben sich folgende Erkenntnisse (vgl. Abbildung 33):

Für die Monomer-Form ist eine Tendenz eines Abfalls innerhalb eines Tages Kulturdauer zu erkennen, im weiteren Verlauf wird der initiale Wert jedoch dann wieder erreicht und sogar teilweise überschritten. Dieser grundsätzliche Verlauf ist dabei in allen Gruppen zu beobachten, in der Ausprägung jedoch ergeben sich Unterschiede: In der Kontrollgruppe kommt es zu einem Abfall auf 30 (± 30) %, nach 21 Tagen werden dann jedoch 151 (± 89) % des Initialwertes vor Kultur erreicht. In der mit niedrig dosiertem Denopamin behandelten Gruppe liegen diese Werte bei 5 (± 5) % und 238 % (n=1), in der mit höher dosiertem Denopamin behandelten bei 68 (± 68) % und 87 (± 41) %. Somit sind bei starken

Schwankungen der niedrigen Dosis die stärksten und der hohen Dosis die geringsten Veränderungen im Zeitverlauf zuzuordnen.

In den PLN-Pentameren ist grundsätzlich ein ähnliches Ergebnis zu erheben, hier ist ebenfalls ein starkes Absinken der Thr-17-Phosphorylierung innerhalb des ersten Kulturtages und ein Anstieg innerhalb der nächsten 20 Tage zu erkennen, die Ausprägung dieses Verhaltens ist jedoch nicht so stark wie für die Monomer-Form. Eine Tendenz im Sinne von Behandlungseffekten lässt sich daher hier nicht klar erkennen.

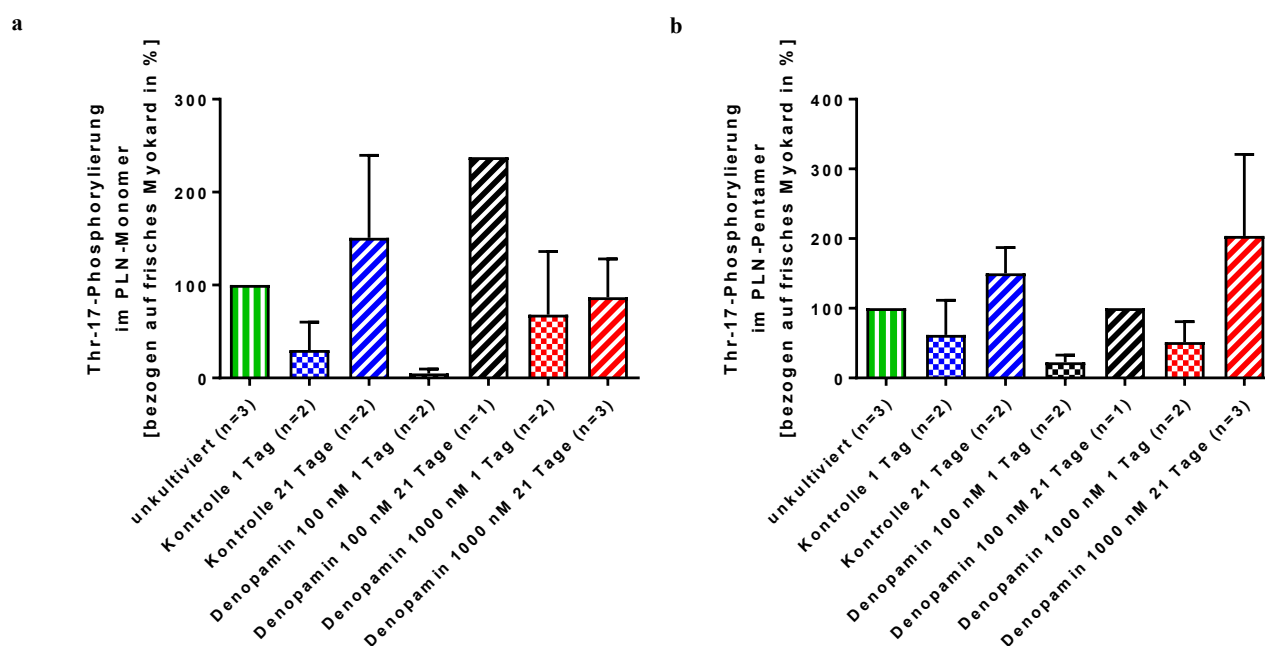


Abbildung 33 Thr-17-Phosphorylierung im PLN-Monomer (a) und Pentamer (b) des Pavian-Myokards

5.4.5 Ser-10-Phosphorylierung des PLNs

Der Phosphorylierungsstatus des Phospholambans an der Aminosäure Ser-10 wiederum zeigt für die Monomer-Form (Abbildung 34 (a)) nahezu keine Änderung im Kulturverlauf oder zwischen den verschiedenen pharmakologisch behandelten Gruppen.

Betrachtet man die Ser-10-Phosphorylierung der Pentamer-Form (Abbildung 34 (b)), fällt für die Kontrollgruppe und die mit 100 nM Denopamin behandelte Gruppe ein leichtes Abfallen der Phosphorylierung auf, während für die mit 1000 nM der Substanz behandelte Gruppe ein leichter Anstieg zu verzeichnen ist. Im weiteren Verlauf erreicht der Wert für die Kontrollen wieder sein Initialniveau, in den behandelten Präparaten kommt es eher zu einem Absinken. Ein signifikanter Unterschied besteht dabei zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen lediglich bei den Werten vom ersten Kulturtag: hier ist die mit der hohen Dosis Denopamin behandelte Gruppe mit 109 (± 19) % des Initialwerts deutlich stärker phosphoryliert als die Kontrollgruppe mit 67 (± 4) %.

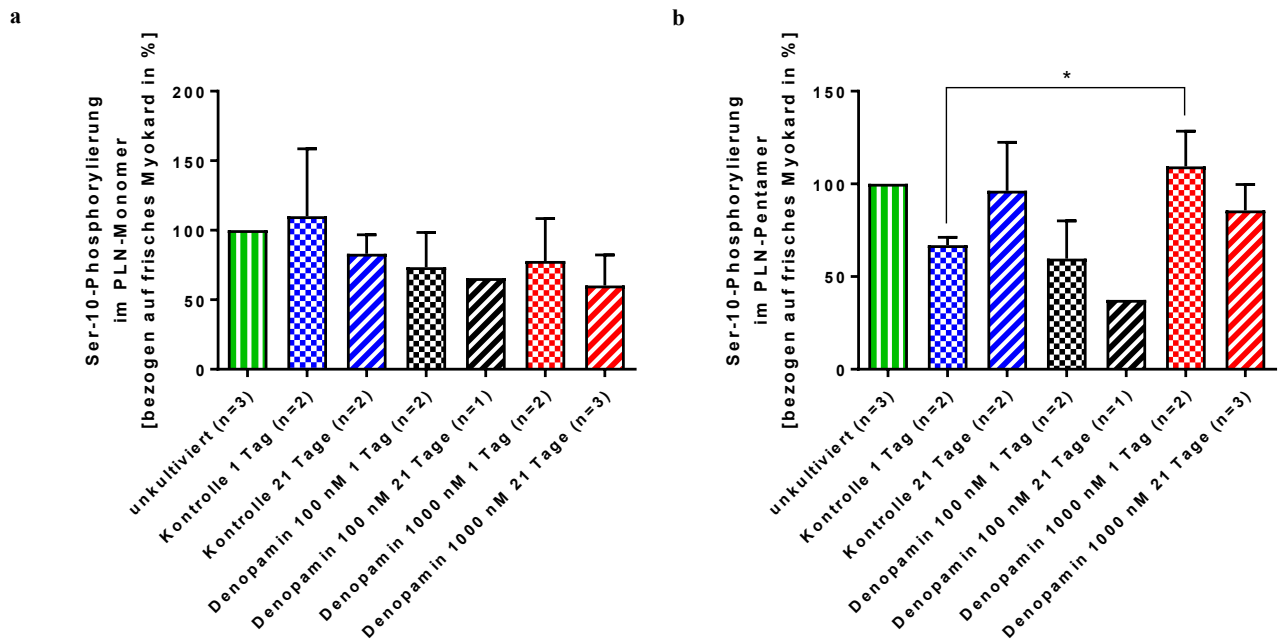


Abbildung 34 Ser-10-Phosphorylierung im PLN-Monomer (a) und -Pentamer (b) des Pavian-Myokards

6. Diskussion

6.1 Eignung von Myokard und Kulturbedingungen

6.1.1 Eignung des Myokards

Die 14 Myokardproben dieser Arbeit unterschieden sich in vielerlei Hinsicht (vgl. Kapitel 4.1): Es handelte sich um Proben, die von terminal herzinsuffizienten Patientinnen/Patienten unterschiedlicher Krankheitsätiologie entnommen wurden. Die Vormedikation der Patientinnen/Patienten unterschied sich, da sich die medikamentösen Therapieansätze bei Herzinsuffizienz unterscheiden und keine Berücksichtigung von Nebendiagnosen erfolgte. Eine genauere Selektion der Patientinnen/Patienten war aufgrund der Knappheit an humanem Herzgewebe nicht durchführbar, da die Zahl der in Deutschland durchgeführten Herztransplantationen zwar in den letzten 15 Jahren stabil bei ca. 300-400 pro Jahr liegt, im europaweiten Vergleich damit aber unterdurchschnittlich ist [125–127]. Eine Gruppierung der Proben nach Alter, Geschlecht, Herzinsuffizienzätiologie oder Ähnlichem wäre daher nur in einem multizentrischen Setting, gegebenenfalls auch ländergrenzenübergreifend, denkbar.

Aufgrund der geringen Gewebeverfügbarkeit mit resultierend geringer Probenanzahl eignen sich die vorgestellten Ergebnisse durch interindividuelle Unterschiede des Gewebes nur bedingt für statistische Signifikanztestungen, sodass hier neben den statistisch relevanten Unterschieden auch klare Tendenzen einzelner Behandlungs- oder Zeiteffekte Betrachtung finden.

Eine Beschränkung bei der Gewebeauswahl auf ein Merkmal zur Vergleichbarkeit war möglich: es wurde ausschließlich linksventrikuläres Myokard verwendet, einerseits aufgrund der größeren Dicke des Myokards im linken Ventrikel (15 mm im linken vs. 5 mm im rechten Ventrikel (vgl. [128(S. 277)])), andererseits, da sich die elektrischen und mechanischen Bedingungen und auch die Ionenströme zwischen linkem und rechtem Ventrikel bzw. den Atrien doch sehr unterscheiden (vgl. [87(Kap. 10.2),88(Kap. 5)]).

Grundsätzlich ist trotz aller patientenspezifischen Unterschiede im Myokard aufgrund der anfangs angeführten Hintergründe zur Pathophysiologie der Herzinsuffizienz darauf hinzuweisen, dass es sich bei der terminalen Herzinsuffizienz um die Endstrecke vieler Pathologien handelt [107], sodass sich Veränderungen im Gewebe und auch Therapieansätze bei terminaler Insuffizienz weniger unterscheiden als bei beginnender.

Generell ist feststellbar, dass sich das verfügbare terminal insuffiziente Gewebe für einige Studien insofern gut eignet, dass hier im Modell untersucht werden kann, wie und ob beispielsweise neue Pharmaka tatsächlich die erwünschte Wirkung am erkrankten Gewebe zu erzielen vermögen. Dabei ist davon auszugehen, dass in einer Transportzeit von maximal 36 h unter den eingesetzten Bedingungen keine relevanten Veränderungen am verwendeten Gewebe auftreten [74], das Gewebe zu Kulturbeginn also repräsentativ den Zustand im Patienten/in der Patientin zum Entnahmezeitpunkt widerspiegelt.

Auch wenn es sich beim insuffizienten Myokardgewebe um das Zielgewebe für entsprechende pharmakologische Studien handelt, wäre es für die Etablierung der Methode für solche Zwecke natürlich interessant, zu wissen, wie sich gesundes, nicht insuffizientes Myokard unter den gleichen Bedingungen

verhalten würde. Derartige Studien konnten noch in den 1990er-Jahren auch in Deutschland mit humanem Gewebe aus Spenderherzen, die sich nicht für die Verwendung im Rahmen einer Transplantation eignen, durchgeführt werden [113,129–133]. Dies ist heute in Deutschland aufgrund gesetzlicher Bestimmungen nicht mehr möglich.

Als eigene Vergleichsgruppe mit gesundem Myokard konnte daher lediglich auf Primatenmyokard zurückgegriffen werden – da eine Xenotransplantationsstudie im gleichen Institut durchgeführt wurde, war dieses Gewebe leicht verfügbar.

6.1.2 Zellverband

Die Gewebezusammensetzung aus verschiedenen Zelltypen, beispielsweise Kardiomyozyten, Fibroblasten, Gefäßendothel, blieb in der vorliegenden Studie bei Verwendung von intaktem, vitalem humanem Herzgewebe erhalten und bildet so die pathologischen Veränderungen der Herzinsuffizienz ab.

Abweichungen vom intakten Gewebe finden sich präparationsbedingt in den Schneidezonen des Gewebes aufgrund von Verletzungen der Grenzschicht. Es entstehen Zellschäden mit elektrophysiologischen Veränderungen (z.B. durch Ionenverlust über geschädigte Zellen). Diese Schädigungen dürften bei der hier verwendeten Schneidetechnik durch das tangentielle Schneiden der Myokardblöcke von subendokardial nach subepikardial, wie für einen sehr ähnlichen Slicing-Prozess bereits beschrieben ([8,51]), im niedrigen Prozentbereich liegen und sich auf die oberste und unterste Kardiomyozyten-Schicht jedes Slices beschränken, sodass die restlichen Zellschichten intakt blieben.

Im Vergleich zu anderen humanen Myokardmodellen wie Studien an Kardiomyozyten aus induzierten pluripotenten Stammzellen [45,57,134] oder Streifen aus Trabekelmyokard [38,40,129,133,135], kann im verwendeten Modell somit in größeren Dimensionen humanes Myokard betrachtet werden. Im Gegensatz zu Ansätzen mit aus Stammzellen hervorgegangenen Myozyten [55,58,60] besteht zudem der Vorteil, dass es sich um voll ausgereifte Zellen handelt. Im Vergleich zu Myokardmodellen größeren Maßstabs, wie Langendorff-Modellen oder kardialen Wedge-Präparationen [31,37], kann zwar keine vollständige Abbildung des *In-vivo*-Zellverbands gewährleistet werden, dafür können mittels Slice-Kultur im vorliegenden Modell viele gut vergleichbare Proben aus demselben Herz gewonnen werden und über einen langen Zeitraum kultiviert werden.

6.1.3 Sauerstoffversorgung

Die Obergrenze der Diffusionsstrecke für Sauerstoff in ein Gewebe, bei der noch eine suffiziente O₂-Versorgung gewährleistet wird, beträgt 200 µm [136], somit ist bei der in den Versuchen für diese Arbeit verwendeten Gewebedicke von 300 µm eine ausreichende Sauerstoffversorgung gegeben, da die Diffusion ins Gewebe ja von der Ober- und Unterseite der Slices aus erfolgen kann.

Wichtigste Voraussetzung für eine optimale Sicherstellung einer gleichmäßigen Sauerstoffkonzentration im Kulturmedium war neben einer ausreichenden O₂-Konzentration im Inkubator die gleichmäßige Kippbewegung der Kulturkammern. Bei Stoppen dieser Bewegung kam es innerhalb weniger Minuten zu einem deutlichen Absinken der Kontraktionskraft der Myozyten [74], nach Wiederbeginn aber auch wieder zu einer raschen Erholung auf das vorhergehende Niveau.

In anderen Myokardmodellen wird die Sauerstoffversorgung bei Verwendung großer Myokardstücke oder ganzer Herzen mittels Perfusion mit oxygenierter, teilweise erythrozytenreicher Lösung gewährleistet [31,37], während bei Verwendung von Zellkulturen die Kultivierung in einem Inkubator mit ausreichender O₂-Konzentration genügt [45,52]. In anderen Slice-Modellen [77] wird eine kontinuierliche Begasung des Kulturmediums eingesetzt, ähnlich ist dies auch für Trabekelkulturmodelle mit zusätzlicher Mediumagitation durch Rühren beschrieben. Die in dieser Arbeit verwendete Methode kombiniert die technisch einfache Verwendung eines Inkubators mit entsprechender O₂-Konzentration mit einer Mediumagitation durch sanftes Kippen des Kulturaufbaus. Die Simulation eines O₂-Mangels für Ischämie-Modelle wäre durch Verminderung der O₂-Konzentration im Inkubator oder Anhalten der Kippbewegung möglich.

6.1.4 pH-Wert

Die Regulation des pH-Werts erfolgte über den konstanten CO₂-Gehalt der verwendeten Brutschränke. Im Kulturmedium befand sich ein pH-Indikatorfarbstoff (Phenolrot), sodass anhand der Mediumfarbe eine Aussage über den herrschenden pH-Wert im Medium getroffen werden konnte. Im Laufe einer Kulturperiode von zwei Tagen ohne Mediumwechsel zeigte sich dabei meist eine leichte Verfärbung des Medium-Indikators im Sinne einer leichten Azidisierung aufgrund von Stoffwechselprodukten.

In ähnlicher Form wie in dem hier verwendeten Modell erfolgt auch für andere Myokardkulturmodelle die Regulation des Gewebe-pH-Werts über das CO₂-Puffersystem und über die verwendete Gaskonzentrationen in der Perfusionslösung, der Begasung oder den Inkubatoren [31,37,45,52,77].

6.1.5 Medikamentenzusätze

Beim Zusatz der verwendeten medikamentösen Substanzen (Denopamin und Metoprolol) wurde darauf Wert gelegt, möglichst geringe Konzentrationen von Lösungsmitteln mit in die Kulturkammern einzubringen. Im Fall von Metoprolol gelang dies aufgrund der guten Wasserlöslichkeit der Substanz gut, hier konnte der Ansatz der benötigten Verdünnung nach Lösung der pulverförmigen Ausgangssubstanz in PBS (phosphatgepufferter Salzlösung) im Kulturmedium erfolgen. Im Falle des verwendeten Denopamins war dies aufgrund der geringen Hydrophilie der Substanz nicht möglich. Daher wurde die Stammlösung in DMSO angesetzt, die weiteren Verdünnungen erfolgten dann in PBS. Es ergab sich aus diesem Vorgehen eine maximale Endkonzentration von 1 ‰ DMSO in den Kulturkammern. Eine derartige (oder höhere) Konzentration von DMSO ist in vielen Experimenten üblich [34,44,55,137], teilweise wird DMSO sogar *in vivo* [138] angewendet. Laut einer Untersuchung [139] hat DMSO bis zu einer Konzentration von 3 ‰ keinen Einfluss auf Kardiomyozyten. Somit wurde in den Kontrollpräparaten auf den Zusatz von DMSO verzichtet.

Bei den verwendeten Medikamentenzusätzen lag der Fokus darauf, auch *in vivo* angewendete Präparate zu wählen. Denopamin wurde aufgrund der hohen Selektivität für β_1 -Rezeptoren und langanhaltenden Effekts trotz seltenen klinischen Einsatzes gegenüber anderen β -Agonisten vorgezogen [123,124].

6.1.6 Aufhängung und Kontraktion

Durch die verwendete flexible Aufhängung der Myokardschnitte an einem Federdraht auf der einen Seite und einem stabilen Draht auf der anderen Seite konnte eine den physiologischen Bedingungen

nahekommende auxotone Kontraktion erreicht werden. Im Gegensatz zu den in anderen Modellen [45,60,66] häufig verwendeten isometrischen oder isotonischen Kontraktionsformen, bei denen sich entweder nur die Spannung im Kardiomyozyten ohne Längenänderung (isometrisch) oder nur die Länge des Kardiomyozyten bei gleichbleibender Spannung (isotonisch) ändern kann, war in diesem Modell also eine gleichzeitige Änderung von Länge und Spannung des Gewebes möglich. Anhand des stabilen Drahts konnte die Vorspannung des Gewebes in Form einer Dehnung auf eine bestimmte Länge eingestellt werden. Durch die Federhärte des verwendeten Federdrahts hingegen konnte der Widerstand für das Gewebe bei der Kontraktion definiert werden. Um möglichst physiologische Bedingungen zu erreichen, wurden beide Parameter auf die im normalen, gesunden humanem Myokard vorliegenden Werte [74,140] adjustiert: die Federhärte des Federdrahts betrug 75 mN/mm, um eine physiologische Wandspannung des linken Ventrikels von 15 kN/m² bei ca. 6 % Verkürzung eines üblichen Myokard-Slices simulieren zu können. Die Vorspannung durch Dehnung des Gewebes wurde parallel dazu auf 1 mN eingestellt, um eine Wandspannung von ca. 0,66 kN/m² zu erreichen.

Experimente zur tatsächlichen Größe und Dehnung der einzelnen Myozyten, z.B. im Hinblick auf die tatsächliche Sarkomerlänge, sind mit dieser Kulturtechnik somit möglich [112].

Vergleicht man die hier verwendete Technik mit anderen Ansätzen in der Myokardforschung, sind Experimente an derartigen mechanischen Parametern des Myokards in Tiermodellen oder Modellen mit großen Gewebestücken nur sehr eingeschränkt möglich. Für einzelne Kardiomyozyten existieren Versuchsaufbauten für mechanische Veränderungen und Messungen [46], diese sind aufgrund des notwendigen Maßstabs bei Einzelzellexperimenten jedoch komplex in der Handhabung und könnten nur mithilfe von Mikroskopen eingesetzt werden. Für adulte oder aus Stammzellen gewonnene Kardiomyozyten existieren Modelle, die für Zellverbände oder mehrere auf einer Matrix angesiedelte Zellen mechanische Beeinflussungen oder Messungen erlauben [60,141]. Für Trabekelmuskel-Kultur existieren ähnliche Aufbauten wie für Modelle mit kardialen Slices [38,42] in einem angepassten Maßstab. Für kardiale Slices wurden auch durch andere Arbeitsgruppen bereits Dehnungsaufbauten entwickelt (vgl. z.B. [77]), jedoch ohne kontinuierliche Kraftmessung während der Veränderungen der Dehnung.

6.1.7 Kulturmedium und Energieversorgung

Bei der verwendeten Zusammensetzung des Kulturmediums wurde auf eine bewährte Formulierung für Zellkulturen zurückgegriffen [73,77,80]. Medium M199 wurde Insulin, Selen und Transferrin, Penicillin, Streptomycin und in einigen Versuchsreihen Amphotericin zugesetzt. Ein Unterschied zum physiologischen Milieu von Kardiomyozyten ergab sich aus der Abwesenheit jeder Hormonstimulation außer Insulin im Basis-Medium. Physiologisch haben Hormonkonzentrationen Einfluss auf die Myokardfunktion, abgesehen von Katecholaminen beispielsweise auch Triiodthyronin (T₃) [142], Glukokortikoide [143] und Sexualhormone [144–146].

Die Energieversorgung erfolgt durch Glukose, deren Aufnahme in die Zellen durch Insulinzusatz verstärkt wird. Im Unterschied dazu wird die Energieversorgung des Herzens physiologisch zu 50-70 % über die β -Oxidation von Fettsäuren gewährleistet [147], zu geringeren Anteilen dienen auch Glykolyse und Verwertung von Ketonkörpern und Aminosäuren als Energiequellen [88(S. 191),148,149]. Insuffizientes Herzgewebe, wie es in der vorliegenden Studie verwendet wurde, nützt zu größeren Anteilen Ketonkörper als Energiequelle [150].

Im Hinblick auf die Schichtdicke von 300 μm der verwendeten Gewebeschnitte zeigte sich kein Hinweis auf einen Mangel an Energielieferanten (vgl. [74]).

Für Myokardmodelle größerer Maßstäbe sind bezüglich der verwendeten Kulturmedien verschiedene Ansätze, z.B. Perfusion mit Donor-Erythrozyten und weiteren Zusätzen [31], einem Gemisch aus Salzlösung mit Vollblut [29,30] oder Tyrode's Solution, einer Salzlösung, mit Zusatz von Glukose und Insulin [37] bekannt. In Zellkulturmodellen, Trabekelmodellen oder Slice-Kulturen wird meist wie hier Medium M199 mit verschiedenen Zusätzen verwendet, wobei auch Ansätze mit Serum [49], Aminosäuren [38] oder weiteren Zusätzen wie auch Wachstumsfaktoren [75] zum Einsatz kommen. Hinsichtlich der Energieversorgung stellt die Umstellung auf Glukose-Metabolismus eine häufige Basis für Myokardmodelle kleineren Maßstabs dar [38,52,77].

Da der Fokus dieser Arbeit auf der Auswirkung von Katecholaminstimulation der Gewebeschnitte im Modell liegt, wurden für diese Studie Ansätze mit anderen Mediumzusätzen oder alternativen Energiequellen außer Acht gelassen und es wurde mit der bisher bewährten Mediumzusammensetzung gearbeitet. Weitere speziell auf die Effekte einer Mediumveränderung des Grundmediums durch Hormonzusatz oder andere Energielieferanten ausgerichtete Studien sind aber möglich.

6.1.8 Elektrische Stimulation

Physiologisch erfolgt die elektrische Erregung der Kardiomyozyten gerichtet ausgehend von den Strukturen des Reizleitungssystems und unidirektional aufgrund der langen Refraktärzeit der Kardiomyozyten. Im Gegensatz dazu erfolgt die elektrische Stimulation des Myokards im hier verwendeten Kulturmodell über eine elektrische Feldstimulation ausgehend von zwei seitlich zum Myokard angebrachten Elektroden, sodass eine Seite der Kardiomyozyten de- und die gegenüberliegende hyperpolarisiert wird. Eine Weiterleitung der entstehenden Aktionspotentiale im Gewebe über gap junctions ist wahrscheinlich, eine unidirektionale Impulsweiterleitung ist aufgrund Impulsform und -richtung eher nicht möglich. Die Verwendung zweier Impulsanteile mit entgegengesetzter Polarität ist nötig, um potentiell schädliche elektrochemische Prozesse durch das Überwiegen des Anteils einer Polarität zu vermeiden (vgl. [141]).

Andere Myokardmodelle setzen verschiedene elektrische Stimulationstechniken ein, dies reicht von externer Stimulation des Sinusknotens bei Langendorff-Herzen [30] über elektrische Feldstimulation für Myokardmodelle kleinerer Maßstäbe [55,60,141] bis hin zu optischer Stimulation oder optogenetischen Ansätzen [141]. In anderen Slice-Modellen kommt meist eine ungerichtete Stimulation mittels Einzelelektrode in einem mediumgefüllten Raum zum Einsatz [75,77].

Die basal verwendete Stimulationsfrequenz von 30 bpm ist im Vergleich zur humanen Ruhefrequenz von 60-80 bpm niedrig. Die Entscheidung für den Einsatz dieser Frequenz erfolgte zur Sicherstellung der Energie- und Sauerstoffversorgung und im Einklang mit anderen Myokardmodellen [38,75,77] und stellt im Vergleich zu vorherigen Anwendungen der hier vorgestellten Technik mit 12 bpm [74] eine physiologischere Frequenz dar. Studien zur weiteren Steigerung der Stimulationsfrequenzen sind im vorliegenden Modell aber grundsätzlich zukünftig einfach möglich.

6.2 Bedeutung der Ergebnisse der insuffizienten humanen Myokardproben

In Zusammenschau der Ergebnisse der humanen Myokardproben wird nun den zu Beginn formulierten Fragen auf den Grund gegangen und untersucht, welche Aussagen die Ergebnisse über den Zeitverlauf der Kontraktionskraft und dessen Ursachen zulassen. Dabei werden die Ergebnisse dahingehend betrachtet, ob ein Fehlen von Katecholaminstimulation für die beobachteten Effekte des kultivierten Myokards ursächlich ist, oder ob andere Mechanismen dafür verantwortlich sind.

6.2.1 Interpretation des Verlaufs der Kontraktionskraft

Die Kontraktionskraft von Kardiomyozyten ist eine wichtige Messgröße, die in einem Messaufbau wie dem hier verwendeten einfach und kontinuierlich longitudinal überwacht werden kann. Ihre klinische Relevanz ergibt sich aus dem klinisch messbaren Parameter der Ejektionsfraktion, der auch für die Stadieneinteilung der Herzinsuffizienz relevant ist.

Den Betrachtungen ist voranzustellen, dass sich aufgrund der Verwendung ausgewählter Zeitpunkte zur Kraftmessung für die einzelnen Versuchsreihen unterschiedliche Abstände dieser Zeitpunkte zu markanten Ereignissen des Kulturverlaufs wie Mediumwechseln, die wie beschrieben meist von mittelfristigen leichten Veränderungen der Kontraktionskraft gefolgt waren, ergaben. Es wurde dabei für den Auswertungszeitpunkt möglichst ein Zeitpunkt vor einem Mediumwechsel gewählt, dies war aus organisatorischen Gründen nicht für alle Präparate möglich. Damit unterscheiden sich auch die zeitlichen Abstände zwischen Messungen und den Substanzzugaben für die Versuchsreihen in Einzelfällen. Daher liegt für die erst im späteren Kulturverlauf mit Denopamin versetzten Proben der Behandlungsbeginn nicht immer genau bei 20 h nach Kulturbeginn und der 24 h-Messwert für die Kontraktionskraft befindet sich für diese Proben meist nach, in Einzelfällen aber auch vor Beginn der Denopaminbehandlung. Daher war bei diesem Messpunkt eine höhere Fehlerquote als bei den übrigen Präparaten zu beobachten, weshalb in der Auswertung des Denopamineffekts der Fokus nicht auf Effekte im Minutenbereich gelegt werden soll.

Mit einer großen Konstanz ließ sich in den unbehandelten humanen Myokardproben der schon in den Vorversuchen aufgefallene Effekt eines raschen initialen Kraftabfalls mit anschließendem langsamem Wiederanstieg beobachten. Kausal in Betracht für diesen Verlauf kommen primär die bereits genannten Möglichkeiten: So kann es sich generell bei dem gesamten Verlauf um eine reine Anpassung an die Kulturbedingungen handeln, wobei zu erwarten wäre, dass alle kultivierten Myokardlices dieses Verhalten zeigen. Für den Kraftabfall kommen aber kausal auch ein Fehlen wichtiger Substanzen z.B. Hormonen oder Energielieferanten, eine inflammatorische Reaktion des Gewebes sowie eine Schädigung der Kardiomyozyten durch den Kultivierungsprozess im Sinne eines Ischämie-Reperfusionsschadens in Betracht, der dem bekannten Modell des „stunning myocardium“ [114,115,151] entsprechen könnte. Auch eine Art „Schutzreaktion“ des Gewebes im Sinne einer Reduktion der Kontraktionskraft zugunsten gewisser nötiger Anpassungsprozesse ist grundsätzlich denkbar. Da es sich beim verwendeten Gewebe um insuffizientes Myokard handelte, kommt aber auch die These in Frage, dass möglicherweise der nach einigen Stunden erreichte Zustand geringer Kontraktionskraft die tatsächliche Kraftentwicklung, die dem Myokard zuletzt im Gesamtverband des insuffizienten Patientenherzen möglich war, widerspiegelt, während die deutlich stärkeren Schläge der ersten Kulturzeit auf Verfälschung durch den

Kulturbeginn zurückgehen. Für den Wiederanstieg der Kontraktionskraft kommen anhand dieser Überlegungen ebenfalls verschiedene Möglichkeiten in Betracht: so kann es sich um eine Anpassung des Gewebes an einen bestehenden Mangelzustand für bestimmte Substanzen im Sinne beispielsweise veränderter Abbauwege oder verstärkter Produktion mancher Stoffe handeln. Alternativ kommt natürlich auch die Erholung von einem eventuell initial erlittenen Schaden oder einer Inflammationsreaktion sowie die Reversibilität einer Schutzreaktion in Frage. Ebenfalls möglich ist aber auch eine Art „Reverse Remodeling“ [152], also einer Art Gegenprozess zu den Abläufen, die *in vivo* auf Gewebeebene zu einer Herzinsuffizienz beitragen bzw. beigetragen hatten. In diesem Fall käme es durch die Kultivierung des Myokards zu einer Erholung von der bei den Patientinnen/Patienten vorliegenden Herzinsuffizienz und einer Veränderung von einem pathologischen zu einem funktionell physiologischeren Zustand.

Da *in vivo* die hormonelle Stimulation durch Katecholamine einen entscheidenden Einflussfaktor für die Regulation der kardialen Kontraktionskraft darstellt, diese in Kultur aber vollständig fehlt, entstand die Hypothese, dass der Katecholaminmangel für den Effekt ursächlich sein könnte. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde einigen Proben der β -Agonist Denopamin zugesetzt. Da sich eine grundsätzliche Wirkung von Denopamin unter anderem im Sinne einer Kraftsteigerung in Vorversuchen schon hatte zeigen lassen, galt es, zu überprüfen, ob es sich um additive Effekte, also um eine katecholaminähnliche Wirkung parallel zu den anderen Effekten im Kraftverlauf, oder eine tatsächlich kausal ansetzende Wirkung, also ein Aufheben des in den unbehandelten Kontrollen beobachteten Effekts, handelte. Um Dosiseffekte zu berücksichtigen, wurden zwei Dosierungen gewählt. Der Zusatz erfolgte zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (kurz nach Kulturbeginn und 20 h später), da die Möglichkeit denkbar war, dass im insuffizienten Grundzustand des Myokards zu Beginn eine Desensitivierung gegenüber Katecholaminstimulation aus dem *In-vivo*-Zustand vorgelegen hatte. Zur Resensitivierung gegenüber einer entsprechenden Stimulation wurde also in der Denopamin-spät-Gruppe eine 20-stündige Katecholaminpause vorgesehen und die Behandlung erst im Anschluss begonnen. Somit sollte in der Denopamin-früh-Gruppe mit Behandlungsbeginn zu Kulturbeginn überprüft werden, ob sich der Kraftabfall der Proben durch die Intervention aufheben und sich der Kraftanstieg beschleunigen ließ, während in der Denopamin-spät-Gruppe der Fokus auf der Frage lag, ob der Kraftanstieg in potentiell Katecholamin-resensitivierten Proben gleich oder schneller ablaufen würde. Zudem sollte mithilfe dieser Gruppe überprüft werden, ob im Vergleich zur Denopamin-früh-Gruppe die gleichen oder geringere Effekte zu erzielen waren, um zu überprüfen, ob eine Denopaminstimulation während der Kraftverlustphase Auswirkungen hatte, die sich mit später beginnender Stimulation nicht mehr bewirken ließen.

In den Präparaten der Denopamin-früh-Gruppe zeigte sich nur für die höhere Dosierung (1000 nM) ein Effekt, dies steht im Einklang mit der vermuteten initialen Desensitivierung des Gewebes für Katecholaminstimulation. Für die Phase des Kraftabfalls zeigt sich hier eine klare Tendenz einer Abschwächung des Kraftabfalls, sodass das Kraftminimum bei deutlich höheren Werten liegt und etwas verzögert wird. Für die folgende Phase zeigt sich ein weiterer Kraftanstieg mit anschließend stabiler Kraft. Dies unterstützt die These, dass ein Katecholaminmangel ursächlich für den Verlauf in den unbehandelten Präparaten ist, da die Behandlung den Effekt des Kraftabfalls deutlich reduziert. Der Dosisunterschied lässt vermuten, dass ein voller Effekt der Verhinderung jeglichen Kraftabfalls mit einer noch höheren Denopamin-Dosis möglich wäre. Das in der stabilen Phase erreichte Kraftniveau liegt in einem

ähnlichen Bereich wie das der Kontrollproben gegen Ende der Kultur. Daraus ergibt sich die Überlegung, dass sich der Kraftanstieg der unbehandelten Proben auf einen Anstieg des auch bei völliger Abwesenheit von Katecholaminstimulation vorhandenen Spontanonus der β -Rezeptoren, wie er auch für β_1 -Rezeptoren bekannt ist [118–121], zurückführen lassen könnte. Dieser würde dabei am Ende der Kulturdauer eine ähnlich starke Wirkung zeigen wie eine Stimulation mit Denopamin der Dosierung 1000 nM.

Für die Denopamin-spät-Gruppe der Präparate ergab sich ein ähnliches Kraftminimum wie für die Kontrollen, da die Behandlung erst nach Erreichen des Minimums begonnen wurde. Die erkennbare Tendenz eines stärkeren Kraftanstiegs nach Behandlungsbeginn mit der 100 nM-Dosierung des Denopamins mit anschließend ähnlichem Verlauf wie für die frühe Denopamin-1000 nM-Gruppe unterstützt die These eines initial katecholamindesensitiven Zustands der Myozyten. Dieser scheint in Form einer Resensitivierung bei längerer Abwesenheit des Stimulus in den ersten Stunden in Kultur wieder aufgehoben zu werden, da die Kardiomyozyten in diesem Zustand wieder auf eine geringe β -Stimulation zu reagieren scheinen. Dieser Effekt nach der späten Denopamin-Gabe war in den mit der hohen Dosierung behandelten Präparaten verstärkt nachzuweisen, hier kam es zu einem stärkeren Kraftanstieg kurz nach Beginn der Behandlung und einem höheren Kraftmaximum, die Stabilisierung der Kontraktionskraft in den folgenden Tagen erfolgte jedoch auf ein ähnliches Niveau wie bei den Präparaten, die die niedrigere Dosierung erhalten hatten. Interessant ist hier somit, ob gegen Ende der Kultur nach 21 Tagen tatsächlich noch eine β -adrenerge Wirkung des Denopamins vorlag und beide Dosierungen lediglich gleich stark wirkten, oder ob zu diesem Zeitpunkt keine Denopamin-verursachten Effekte auf die Kontraktionskraft mehr zu beobachten waren und daher alle Gruppen eine ähnliche Kraft zeigten. Diese Frage lässt sich jedoch rein anhand der beobachteten Kontraktionskraft nicht beantworten, und bedarf daher der Betrachtung der weiteren Messgrößen.

Zuvor fällt jedoch in der Denopamin-spät-Gruppe ein weiterer interessanter Effekt auf: es kommt in beiden Dosierungs-Gruppen zu einem leichten und später reversiblen Kraftabfall zum Messzeitpunkt 96 h. Ungefähr zu diesem Zeitpunkt erfolgte meist der zweite Mediumwechsel nach Kulturbeginn und damit die Applikation der dritten Denopamin-Dosis für die Präparate. Dieser Kraftabfall könnte durch eine erneute Desensitivierung der Myokardslices für Katecholaminstimulation zustande kommen, die Wirkung des Denopamins könnte daher zu diesem Zeitpunkt nachgelassen haben oder gar aufgehoben sein – dann wäre der folgende Kraftverlauf mit einer leichten Erholung und der anschließenden stabilen Phase womöglich im Rahmen eines ähnlichen Prozesses zu sehen, wie der Kraftanstieg bei den unbehandelten Proben. Alternativ käme theoretisch auch eine mögliche Schädigung durch eine womöglich zu hohe Denopamindosis in Frage, gegen diese These spricht jedoch deutlich, dass der Effekt auch bei der niedrigen Dosis der Substanz auftrat und auch bei späteren Gaben nicht erneut zu beobachten war. Etwas wahrscheinlicher ist daher ein Effekt durch eine Entfernung z.B. möglicherweise entstandener Stoffwechselprodukte mit einem eventuell protektiven Effekt für die Kontraktionskraft im Rahmen des ersten oder zweiten Mediumwechsels oder eine durch die Denopamin-Behandlung hervorgerufene geringere Toleranz des Gewebes gegen den „Stress“ des Mediumwechsels im Sinne einer reduzierten Anpassungsfähigkeit an die leichte Veränderung des Kulturmediums. Gerade der erstgenannte Effekt einer Entfernung protektiver Substanzen müsste aber gleichermaßen in den Kontrollpräparaten zu beobachten sein, was nicht der Fall war. Möglich ist aber auch ein Verfälschungs-Effekt der Ergebnisse

zu diesem Zeitpunkt eben durch den erfolgten zweiten Mediumwechsel: da es im Rahmen mittelfristiger Veränderungen nach Mediumwechseln meist zu einem vorübergehenden Kraftabfall kam, ist es möglich, dass in einigen Präparaten der Erhebungszeitpunkt trotz des Versuchs der Vermeidung solcher Effekte der Messzeitpunkt des 96 h-Kraftwertes nach dem zweiten Mediumwechsel und nicht davor lag. In diesem Fall würde es sich um einen Denopamin-unabhängigen Effekt handeln und der vorübergehende Kraftabfall wäre durch den Mediumwechsel bedingt. In den Behandlungsgruppen würde ein derartiger Effekt in ungünstigen Fällen aufgrund der geringen Präparatezahlen womöglich stärker ins Gewicht fallen als in der Kontrollgruppe, in der durch die statistische Mittelung von mehr Proben ein derartiges Problem geringer ausfiel.

6.2.2 Interpretation der Veränderungen funktioneller Parameter

6.2.2.1 Refraktärzeit

Die Refraktärzeit auf zellulärer Ebene entspricht in etwa der *in vivo* im EKG erhobenen QT-Zeit. Die Referenzbereiche liegen für diesen Parameter bei < 450 ms für Männer und < 460 ms für Frauen [153(S. 110)]. Die klinische Relevanz dieses Messwertes liegt unter anderem in der Abschätzung eines Arrhythmierisikos durch beispielsweise vorzeitige Erregungen, da bei einer verkürzten Refraktärzeit z.B. erneut elektrische Erregungen des Kardiomyozyten möglich sind, da die Zelle nicht mehr refraktär ist [154]. In der hier verwendeten biomimetischen Kulturtechnik wurden schon in der Vergangenheit mit Erfolg Versuche über Veränderungen der Refraktärzeit durchgeführt, es hatte sich eine gute Eignung der Technik für die Untersuchung dieses Parameters ergeben [74].

In den unbehandelten Gewebeschnitten konnte in Kultur für die Refraktärzeit eine sehr stabile Situation beobachtet werden, von Beginn an lag die Refraktärzeit dieser Proben zudem im Referenzbereich der QT-Zeit für beide Geschlechter. Das spricht für eine gut erhaltene elektrische Funktionsfähigkeit des untersuchten Myokards, denn im Falle einer deutlichen Veränderung des elektrischen Systems im Kardiomyozyten, zum Beispiel durch eine Dedifferenzierung oder eine Anpassung an unphysiologische Stimulationsbedingungen, wären Abweichungen und Veränderungen zu erwarten gewesen. Solche Veränderungen treten *in vivo* beispielsweise bei der Entwicklung eines „remodelings“ bei Entstehung einer Herzinsuffizienz auf [110,111], es kommt zu einer Verlängerung des Aktionspotentials und der Relaxation [111,155] und damit auch der Refraktärzeit. Somit spricht die stabile Refraktärzeit gegen eine Schädigung des Myokards.

Der Effekt von Katecholaminen *in vivo* auf die Refraktärzeit besteht in einer Verkürzung derselben [154,156], um bei Sympathikus-Aktivierung eine höhere Herzfrequenz zu ermöglichen (durch die kürzere Refraktärzeit kann der nächste elektrische Impuls schneller verarbeitet werden). Somit wäre als Effekt eines Katecholaminmangels, wie er als Ursache des initialen Kraftabfalls vermutet wurde, zunächst mit einer Verlängerung der Refraktärzeit zu rechnen gewesen. Im Falle der Entwicklung eines Anstiegs des adrenergen Spontanonus der unbehandelten Kardiomyozyten wäre im Laufe der Kultur also eine Verkürzung das erwartete Ergebnis gewesen. Keine dieser beiden Entwicklungen kann jedoch tatsächlich beobachtet werden, ein Indiz also, das gegen diese Theorien spricht.

Durch die Zugabe von Denopamin in die Kulturkammern ist durch die β -Rezeptor-Stimulation ebenfalls mit einer Verkürzung der Refraktärzeit zu rechnen. Ein derartiger Effekt lässt sich auch tatsächlich

in der Denopamin-früh-Gruppe beobachten – es ist eine fortschreitende Tendenz zur Verkürzung der Refraktärzeit erkennbar, bei der höheren Dosis in stärkerem Maße.

Bei der später beginnenden Behandlung mit Denopamin lässt sich eine ähnliche Entwicklung beobachten, vor allem die höhere Dosierung des Medikaments bewirkt eine signifikante Verkürzung der Refraktärzeit gegenüber den Kontrollproben. Interessant ist hier, dass es bei den mit 1000 nM Denopamin ab Tag 1 behandelten Proben zu einem relativ starken vorübergehenden Anstieg des Parameters am zweiten Kulturtag kommt. Dies könnte ein Zeichen für die Entwicklung sogenannter Nachdepolarisationen der Präparate in diesem Zeitraum sein, hierbei handelt es sich um ein Phänomen, das ein deutliches Arrhythmierisiko darstellt und bei der Applikation von Katecholaminen beobachtet werden kann [157]. Durch eine solche Nachdepolarisation kommt es zur Entwicklung einer zusätzlichen Depolarisation gegen Ende der Repolarisierungsphase eines Kardiomyozyten und dadurch zu einer verlängerten Refraktärzeit für die nächste externe elektrische Stimulation. Um dies zu überprüfen, wären gezielte Auswertungen der Aktionspotentiale nötig, was eine Möglichkeit für weitere Studien darstellt.

Somit kann in Zusammenschau der Ergebnisse der Refraktärzeitmessungen der humanen Proben ein Effekt der Denopamin-Gaben beobachtet werden, der jedoch eher wie ein additiver Effekt wirkt, da in den Kontrollpräparaten keine Veränderungen zu erkennen waren, die die These eines initialen Katecholaminmangels, oder eines sich im Verlauf verstärkenden adrenergen Spontanonus unterstützen würden. Der erkennbare Denopamineffekt tritt erst langsam und im Verlauf mehrerer Tage ein, wodurch der Schluss nahe liegt, dass womöglich strukturelle Anpassungen, z.B. der Proteinmengen von Ionenkanälen, an die adrenerge Stimulation zu Grunde liegen könnten – *in vivo* tritt eine Verkürzung der Refraktärzeit über PKA- und CaMKII-Aktivierung bei Sympathikusaktivierung innerhalb kürzester Zeit auf, um möglichst rasch eine Anpassung an die veränderte Situation zu ermöglichen. So ist bereits nach 5 Minuten einer Infusion mit dem adrenerg wirkenden Isoprenalin eine deutliche Verkürzung der Refraktärzeit *in vivo* zu beobachten [158].

6.2.2.2 Elektrische Reizschwelle

Die elektrische Reizschwelle des Myokards ist ein wichtiges Maß für die elektrische Integrität des Gewebes, da eine koordinierte und gleichzeitige Kontraktion aller Myozyten im Gewebeschnitt ermöglicht wird durch die Verbindung der einzelnen Zellen über gap junctions – es entsteht ein sog. funktionelles Synzytium [87(S. 61),159]. Kommt es beispielsweise durch vermehrte Apoptose von Kardiomyozyten, wie sie bei einer Schädigung durch die Kultivierungsvorgänge grundsätzlich denkbar wäre, zu einer elektrischen Isolation von Kardiomyozyten, ist es möglich, dass im Slice verschiedene voneinander entkoppelte Areale mit unterschiedlichen elektrischen Reizschwellen entstehen. Auf gleiche Weise käme es zu einer elektrischen Entkopplung der Areale bei Entwicklung einer starken Fibrose durch die im Gewebe enthaltenen Fibroblasten. Eine derartige elektrische Entkopplung durch Fibrose spielt *in vivo* beispielsweise eine relevante Rolle bei der Entwicklung von Arrhythmien nach kardialen Infarkten [160,161]. Somit kann bei einer stabilen elektrischen Reizschwelle ohne Entkopplung einzelner Areale von einem elektrisch stabilen Gewebezustand und geringer Entwicklung von Apoptose oder Fibrose ausgegangen werden. Wie bereits in Abschnitt 3.1.8.4.2 beschrieben, wurde daher darauf geachtet, ob bei Wiedereinsetzen der Kontraktionen bei der Bestimmung der Reizschwelle ein „Alles-oder nichts-Prinzip“ vorlag, also ob die Kontraktionen gleich ab Erreichen der Reizschwelle mit voller Kontrak-

tionskraft erfolgten. Bei einer elektrischen Entkopplung würde sich stattdessen eine Art treppenförmiger Anstieg der Kontraktionskraft bei steigender Stimulationsstärke zeigen. Ein derartiges Phänomen war bei einigen Präparaten im Laufe der Kulturdauer zu beobachten und wurde zunächst erfasst, da dies aber in der Regel auch mit einem generellen Anstieg der elektrischen Reizschwelle einherging, wurden diese Daten nicht weiter ausgewertet, sondern der Fokus im Sinne der Übersichtlichkeit auf den Absolutwert der elektrischen Reizschwelle gelegt.

Zu Beginn der Kulturdauer zeigte sich in den Kontrollpräparaten eine stabil niedrige Reizschwelle, dann folgte ein leichter Anstieg, bevor der Parameter dann für den weiteren Kulturverlauf stabil blieb. Dies lässt sich interpretieren als ein guter Erhalt der elektrischen Mechanismen der Kardiomyozyten und eine geringe elektrische Entkopplung durch z.B. Apoptose und Fibrose. Der leichte Anstieg innerhalb der ersten Kulturwoche könnte ein Indiz für eine vulnerable Phase des kultivierten Myokards sein, in der Apoptose oder Fibrose vorkommen können, die dann aber nach kurzer Zeit nicht weiter fortschreiten. Alternativ könnte es sich bei diesem Anstieg auch um eine Anpassung an die veränderten Stimulationsbedingungen im Vergleich zum *In-vivo*-Zustand handeln, die durch strukturelle Umbauten langsam über mehrere Tage fortschreitet.

Adrenerge Stimulation durch einen vermehrt vorhandenen adrenergen Spontanonus der Kardiomyozyten oder eine Stimulation mit Denopamin würde erwartbar eine positive Bathmotropie bewirken [95], also ein Absinken der elektrischen Reizschwelle.

In der Denopamin-früh-Gruppe ist für die niedrige Dosierung kein Effekt der Behandlung zu erkennen, dies parallelisiert die fehlende Wirkung auf die Kontraktionskraft in derselben Gruppe. Für die höhere Dosierung zeigt sich ein Ausbleiben des in den Kontrollproben beobachteten Anstiegs der Reizschwelle innerhalb der ersten Kulturwoche, dies kann einerseits für eine typisch adrenerge positiv bathmotrope Wirkung sprechen, könnte aber auch auf ein Ausbleiben des Prozesses, der für den Anstieg in der Kontrollgruppe verantwortlich ist, hindeuten.

Eine etwas andere Aussage lässt sich jedoch für die Denopamin-spät-Gruppe treffen, auch hier hat die niedrigere Dosierung keinen Effekt, allerdings im Gegensatz zu einem sichtbaren leichten Effekt bei der Messung der Kontraktionskraft, während die höhere Dosierung hier einen dem erwarteten Effekt entgegengesetzten hervorbringt: die elektrische Reizschwelle steigt vor allem in einigen Präparaten relativ stark an. Als ursächlich hierfür kämen beispielsweise die Möglichkeit einer Schädigung im Sinne z.B. von Apoptose durch eine adrenerge Überstimulation (vgl. [162]) oder die ständigen Anpassungsvorgänge durch eine Re- und anschließende erneute Desensitivierung in Frage. Parallel zu dieser potentiellen elektrischen Entkopplung zeigt sich zu einem ähnlichen Zeitpunkt der Kultur auch in der Kraftentwicklung ein Einbruch der Kontraktionskraft dieser Gruppe. In Zusammenschau der Befunde entsteht hier also der Verdacht, dass es in diesem Zeitfenster zu stärkeren, potentiell ungünstigen, Veränderungen in den auf diese Weise behandelten Myokardschnitten kam.

6.2.2.3 *Maximalfrequenz*

Auch bei der maximal möglichen Stimulationsfrequenz, die noch die Umsetzung der Stimulationsimpulse 1:1 in eine kardiomyozytäre Kontraktion erlaubt, handelt es sich um einen Parameter mit klinischer Relevanz. Bei Stimulationsfrequenzen, die diese Maximalfrequenz überschreiten, kommt es zum

Auftreten von unkontrollierten Kontraktionen, vergleichbar mit Arrhythmien, oder zu einer reduzierten Umsetzung von Impulsen in Kontraktionen (z.B. 2:1 oder 3:1). Dies kommt dadurch zustande, dass nach einer Kontraktion der nächste oder die nächsten beiden Stimulationsimpulse noch in die Refraktärzeit des Gewebes fallen und somit keine Kontraktion auslösen können.

Die physiologischen Referenzwerte für die maximale Herzfrequenz bei Belastung werden abhängig von verschiedenen Faktoren wie Lebensalter oder Geschlecht mittels Formeln errechnet und liegen durchschnittlich bei Werten um 110-150 Schlägen pro Minute *in vivo* [163,164].

Bei Betrachtung dieser Maximalfrequenz für die untersuchten Gruppen für verschiedene Zeitpunkte zeigte sich hier kein relevanter Unterschied für die verschiedenen Behandlungsbedingungen *in vitro*, der Wert liegt durchgehend bei durchschnittlich 3 Hz, also 180 Kontraktionen pro Minute. Dies lässt einerseits positive Rückschlüsse auf die Sauerstoff- und Energieversorgung des Gewebes zu, da diese Voraussetzungen damit nicht limitierend (bzw. nicht limitierender als *in vivo* physiologisch) für die Umsetzung höherer Stimulationsfrequenzen in Kontraktionen sind, da ein ähnliches Spektrum möglich ist wie *in vivo*. Zudem spricht diese Beobachtung auch für den Erhalt der elektromechanischen Strukturen der untersuchten Kardiomyozyten, da auch hohe Kontraktionsfrequenzen gegen Ende der Kultur noch genauso gut umgesetzt werden können wie zu Beginn der Kultur, ohne ein erhöhtes Arrhythmierisiko zu bewirken. Andererseits spricht der fehlende Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen gegen eine starke adrenerge Wirkung des eingesetzten Denopamins, da bei Katecholaminstimulation der Effekt einer verkürzten Refraktärzeit höhere Maximalfrequenzen ermöglichen würde. Ein derartiger positiver Effekt konnte hier zwar auf Einzelkontraktions-Ebene bei der Messung der Refraktärzeit durchaus gezeigt werden (vgl. 6.2.2.1), dieser scheint sich aber bei der Bestimmung der Maximalfrequenz nicht zu bestätigen oder nicht stark genug für einen deutlichen Unterschied zu sein.

6.2.2.4 Kraft-Frequenz-Abhängigkeit

In gesundem humanem Myokard kann eine sogenannte positive Kraft-Frequenz-Abhängigkeit beobachtet werden, die erstmals von Henry Bowditch 1871 beobachtet werden konnte [165]: bei steigenden Herzfrequenzen steigt bis zu einem gewissen Optimum die entwickelte Kontraktionskraft kontinuierlich an [18,133,166]. Dies stellt einen wichtigen Effekt für die kardiale Reserve bei Säugetieren dar, in Stresssituationen kann auf diesem Weg dem Kreislauf ein größeres Herzminutenvolumen zur Verfügung gestellt werden, da Frequenz und Kontraktionskraft pro Schlag ansteigen. Andere Tierarten generieren ihre kardiale Reserve oft durch alternative Mechanismen, z.B. einer ausschließlichen maximalen Frequenzsteigerung bei unveränderter Kraft [18]. Beim Menschen liegt die Frequenz, die eine optimale kardiale Kraftentwicklung ermöglicht, im gesunden Zustand bei ca. 2,5 Hz bis 3 Hz [132,133,166]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass sich diese Relation von Kraft und Frequenz im Rahmen der Entwicklung einer Herzinsuffizienz verändert und bei insuffizientem Myokard stark abgeflacht oder sogar ins Gegenteil verkehrt auftritt – bei steigenden Stimulationsfrequenzen kommt es also zu einer gleichbleibenden oder absinkenden Kontraktionskraft [112,129,130,132,166,167].

In der ersten Kulturwoche war ein Force-Frequency-Relationship- (FFR-) Verlauf zu beobachten, wie er als typisch für insuffizientes humanes Myokard beschrieben wurde [129,133,166]: die maximale Kontraktionskraft wurde bei den minimalen Stimulationsfrequenzen erreicht, Frequenzsteigerungen führten

zu einer Abschwächung der Kraft. Dies passt sehr gut zur vorangegangenen Pathologie des verwendeten humanen Myokards, da es sich ja durchgehend um terminal insuffizientes Gewebe handelte.

Im Verlauf der folgenden Kulturwochen war eine deutliche Veränderung dieses Verhaltens zu erkennen: die initial negative FFR entwickelte sich hin zu einer deutlichen positiven FFR, also dem Ablauf, den gesundes humanes Myokard physiologisch zeigt. Die stärkste Kontraktionskraft wurde mit einer Frequenz zwischen 1 Hz und 2,5 Hz bei einer etwas niedrigeren Frequenz als für nicht insuffizientes Myokard beschrieben erreicht. Diese Entwicklung ist sehr interessant und bietet Anlass für verschiedenste Überlegungen: Die Positivierung spricht deutlich gegen eine Erhaltung des insuffizienten Ausgangszustands des Myokards und auch gegen eine Dedifferenzierung des Gewebes. Auch ein Fehlen dringend benötigter Substanzen im Kulturmedium oder Gewebe erscheint angesichts dieser Entwicklung unwahrscheinlich. Ursächlich für die Entwicklung dieses Parameters von pathophysiologischen Bereichen in einen physiologischen Bereich könnte natürlich eine Anpassung an verschiedene Bedingungen der Kultivierung wie die veränderte Energieversorgung oder die im Vergleich zum *In-vivo*-Zustand reduzierte Stimulationsfrequenz sein. Eine Anpassung an niedrigere Frequenzen würde auch erklären, warum die maximale Kontraktionskraft bei niedrigeren Frequenzen als physiologisch zutreffend entwickelt wurde. Zudem kommt aber als für die Veränderung im Zeitverlauf ursächlich auch ein Katecholamineffekt im Sinne eines Anstiegs des intrinsischen adrenergen Spontanonus in Frage, allerdings finden sich in der Literatur widersprüchliche Angaben über die Möglichkeit einer Normalisierung der negativen FFR durch adrenerge Stimulation [130,137]. Des Weiteren wäre aber auch ein Vorgang als Ursache dieser Veränderung denkbar, der im Allgemeinen als „reverse remodeling“ bezeichnet wird, in dessen Rahmen also die pathophysiologischen Effekte der Umbauvorgänge bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz funktionell antagonisiert werden könnten. Neue Erkenntnisse unterscheiden dabei ein „reverse remodeling“ von einer Gesundung vom insuffizienten Zustand, da bei einem „reverse remodeling“ die molekularen Veränderungen nicht in den physiologischen Ausgangszustand zurückzukehren scheinen [152]. Eine Aussage, ob ein derartiger Vorgang im Sinne eines „reverse remodeling“ oder sogar einer Gesundung des Gewebes tatsächlich vorliegt, dürfte nur anhand der Auswertung von mRNA- und Proteinexpressionsdaten möglich sein, die Positivierung der FFR als Veränderung eines zentralen und komplexen Vorgangs der Herzerregung bietet hier jedoch schon ein zentrales Indiz für eine funktionelle Veränderung.

Die adrenerge Stimulation mit Denopamin bewirkte bei der Untersuchung der FFR im Zeitverlauf keinen erkennbaren Effekt. Daraus lässt sich lediglich ableiten, dass die Substanz eine potentielle Erholung des Gewebes, wie sie anhand des Kraftanstiegs und der Positivierung der FFR zu vermuten ist, im Hinblick auf die FFR nicht beschleunigt, aber auch nicht durch fortgesetzte adrenerge Stimulation des eine hohe adrenerge Stimulation gewöhnten Gewebes den insuffizienten Zustand des Myokards weiter zu erhalten scheint.

6.2.3 Interpretation der Proteindaten zur Regulation des intrazellulären Ca^{2+} -Transports

Zur genaueren Betrachtung der oben aufgestellten Thesen auf Proteinebene wurden die Proteinmengen und der Phosphorylierungsstatus ausgewählter wichtiger Proteine der Regulation kontraktile Vorgänge untersucht.

Eine zentrale Funktion im kardialen Kontraktionszyklus nimmt das Enzym SERCA ein. Die im Herz vorherrschende Isoform dieses Transporters ist SERCA2a [97], deren Proteinmenge hier für die Myokardschnitte aus den zuvor beschriebenen Versuchen bestimmt wurde. Die primäre Funktion dieses Transporters ist die Wiederaufnahme von Ca^{2+} in das SR des Kardiomyozyten nach erfolgter Kontraktion [168,169]. Dies ermöglicht die Relaxation der Zelle und für die nächste Kontraktion erneut eine Ausschüttung einer für die Aktivierung des kontraktile Apparats ausreichenden Ca^{2+} -Menge [168,169]. Durch diese Vorgänge ergibt sich ein enger Zusammenhang zwischen Menge und Aktivierungsstatus der SERCA und der entwickelten Kontraktionskraft der Kardiomyozyten [113]. Anhand dieses Zusammenhangs werden bereits erste Studien zu einer möglichen Gentherapie zur Überexpression von SERCA2a zur Verbesserung der kontraktile Funktion von Myokard durchgeführt [169–171].

Die erhobenen Daten zur SERCA2a-Proteinmenge der untersuchten Myokardproben zeigen einen gut mit diesen Erkenntnissen vereinbaren Effekt: Parallel zum beobachteten Kraftabfall der Myokardslices lässt sich hier auch im Vergleich der SERCA2a-Menge des unkultivierten Gewebes und der nach einem Kulturtag entnommenen Präparate ein starker Einbruch um 74 % (für die Kontrollproben) innerhalb dieses einen Tages erkennen. Interessant ist hierbei, dass die physiologische Halbwertszeit der SERCA bei 4,9 Tagen liegt [101], somit kommt als Mechanismus für diesen starken Abfall neben einer massiven Apoptose von Kardiomyozyten vor allem ein induzierter Abbau dieses Proteins in diesem Zeitraum in Frage. Eine massive Apoptose von mehr Zellen als den an der Schnittfläche unmittelbar betroffenen Zelllagen erscheint angesichts der oben gezeigten guten Erhaltung der elektrischen Kenngrößen des Myokards unwahrscheinlich, zudem müsste in diesem Fall die Gesamtproteinmenge im Gewebe gleichermaßen abnehmen. Da die Messergebnisse für die SERCA2a-Menge jedoch auf den Aktin-Gehalt des jeweiligen Präparats normiert wurden, ist ein solcher Effekt nahezu auszuschließen. Somit kommt primär ein induzierter Abbau der SERCA2a, beispielsweise durch Proteasen wie Calpain oder Matrix-Metalloproteinase 2 [114,172,173], für diese Beobachtung in Frage. Derartige Prozesse sind Teil einer Entwicklung von sogenanntem „stunned myocardium“, also Myokard, das histologisch keine nachweisbare Schädigung aufweist, jedoch trotz normaler Perfusion eine reversibel eingeschränkte Kontraktionsfähigkeit aufweist [114]. Diese Entwicklung kann vielfältiger Ursache sein [114], der wichtigste Mechanismus ist jedoch die Ausbildung dieses Phänomens nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden [114,174]. Auch der zeitliche Verlauf passt gut zu dieser Überlegung, da sich „stunned myocardium“ innerhalb weniger Stunden nach Eintritt des Ischämie-Reperfusionsschadens entwickelt [114]. Passend zu der These, dass es sich somit bei dem beobachteten Kraftabfall um „stunned myocardium“ handelt, einem voll reversiblen Zustand also, steigen sowohl Kontraktionskraft als auch SERCA2a-Gehalt im weiteren Kulturverlauf wieder an. Daher dürfte davon auszugehen sein, dass die Proteinsynthese von SERCA2a zwischen Tag 1 und Tag 21 der Myokardkultur gegenüber einem stabilen Zustand deutlich verstärkt sein dürfte, was sich in zukünftigen Experimenten mithilfe von mRNA-Expressionsdaten überprüfen ließe.

Die adrenerge Stimulation mittels Denopamin zeigte bezüglich der Proteinmenge der SERCA2a keinen Effekt, dies korreliert gut mit der beschriebenen Wirkung adrenerger Stimuli auf die kontraktile Vorgänge primär über die Modifikation regulatorischer Wege durch beispielsweise Phosphorylierung [92,175].

Neben der absoluten Proteinmenge der SERCA2a spielen für den Kontraktionszyklus eines Kardiomyozyten vielfältige Regulationsmechanismen für deren Aktivität eine große Rolle [97,168]. Das wichtigste dafür relevante Protein ist Phospholamban (PLN), das bei Bindung an SERCA2a deren Aktivität reduziert und dessen Aktivität wiederum durch Phosphorylierung reguliert wird [18,97,168,176–178]. Die Gesamtmenge des PLNs zeigt in der vorliegenden Studie einen Effekt, der sich parallel zu dem der Menge an SERCA2a verhält – es kommt zunächst zu einem massiven Abfall, dann zu Kulturende zu einer Wiederrückbildung. Da SERCA2a und PLN einen Komplex in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums bilden [179] und beide Proteine durch Proteasen wie Calpain abgebaut werden können [114], liegt die Vermutung nahe, dass beide Proteine als Komplex abgebaut werden und sich daher initial gleichsinnig verändern. Dabei lässt sich vermuten, dass die Abnahme des PLN-Gehalts aus dem Grund eines gleichbleibenden Mengenverhältnisses keinen funktionellen Effekt auf die SERCA2a bewirkt – bei einer isolierten PLN-Abnahme wäre eine Funktionszunahme der SERCA2a zu erwarten. Anhand der Daten der vorliegenden Mengen von PLN-Monomeren und -Pentameren lässt sich feststellen, dass es vor allem zu einem Verlust an Pentameren zu kommen scheint, während ein Anstieg zu Kulturende besonders stark bei den Monomeren ausgeprägt zu sein scheint. Somit läge die Vermutung nahe, dass vor allem Pentamere als Komplex mit SERCA2a abgebaut werden, dann aber im Rahmen der Proteinsynthese Monomere nachgebildet werden, die dann zu Pentameren werden könnten. Über die spezifische Funktion der Monomere und Pentamere des PLNs existieren viele Vermutungen, aktuell werden meist die Monomere als aktive, inhibitorische Form des PLNs beschrieben, die Pentamere sollen als Reserve und regulatorische Variante zum Aufrechterhalten eines Phosphorylierungsgleichgewichts dienen [97,179,180]. Folgt man dieser These, werden also primär die regulatorischen und Reserve-Moleküle des PLNs abgebaut, nachgebildet werden dann primär die inhibitorisch aktiven Monomere. Sollte dies der Fall sein, dürfte die verschobene Relation der Monomere und Pentamere den Effekt eines initialen Kraftabfalls der Myokardpräparate noch weiter verstärken, da vor allem die inhibitorisch wirksamen Einheiten übrigbleiben und die SERCA2a inhibieren könnten. Beim Wiederanstieg der Kraft würden dann auch in höherem Maße inhibitorisch wirksame Monomere nachgebildet, ein Teil der Kraftzunahme könnte dann dem Übergang der Monomere in inaktive Pentamere zuzuschreiben sein.

Bei einer adrenergen Stimulation wäre, da diese primär über eine Phosphorylierung wirken soll, zunächst kein Effekt auf diese Vorgänge zu erwarten. Jedoch gibt es in der Literatur die These, dass der Trigger für die Bildung von PLN-Pentameren aus Monomeren eine Phosphorylierung der Monomere sei [97]. Neuere Erkenntnisse widersprechen dieser Vermutung jedoch, da die höhere Rate an phosphoryliert vorliegenden Pentameren als Phosphorylierungspuffer zu verstehen sei und nicht in kausalem Zusammenhang mit der Bildung eines Pentamers stehe [179]. Somit wäre bei Zutreffen ersterer Vermutung eine Veränderung im Verhältnis der Monomere und Pentamere durch adrenerge Stimulation zu erwarten, bei letzterer Hypothese jedoch nicht. In der Analyse der hier untersuchten Myokardproben zeigt sich kein klarer Effekt im Vergleich zu den Kontrollen, die Menge des als Monomer vorliegenden PLN scheint sich tendenziell nicht von den Werten der Kontrollgruppe zu unterscheiden, lediglich für die mit 100 nM Denopamin behandelten Präparate fehlt der Abfall der PLN-Monomere am ersten Kulturtag – hier liegt ein kontinuierlicher Anstieg zwischen unkultiviertem und 21 Tage lang kultiviertem Gewebe vor. Dieser Effekt lässt sich aber keiner der beiden oben vorgestellten Thesen gut zuordnen, die Bedeutung bleibt daher fraglich. Die zeitliche Entwicklung des PLN-Pentamer-Gehalts der

Gewebeschnitte zeigt ebenfalls keine Unterschiede zur Kontrollgruppe. Somit sind die erkennbaren Auswirkungen einer Denopaminstimulation auf die Proteinmenge der verschiedenen PLN-Formen eher gering – dies spricht für die These, dass die Pentamere nicht durch den Trigger der Phosphorylierung aus Monomeren gebildet werden, sondern eine eigene regulatorische Wirkung erfüllen. Alternativ wäre natürlich denkbar, dass die Denopaminstimulation trotz erkennbaren Effekten auf Ebene der in den Stimulationsprotokollen erhobenen Parameter und der Kontraktionskraft keine auf Proteinebene messbaren Effekte bewirkt.

Zur Überprüfung eines molekularen Effekts adrenerger Stimulation, der unter anderem über eine Phosphorylierung des PLNs an der Aminosäure Serin an Position 16 (Ser-16) zustande kommen soll [18,97,168,175–178], folgt nun die Diskussion der Ergebnisse der an Ser-16 phosphorylierten PLN-Mengen der verschiedenen Gruppen.

Für die unbehandelten Präparate war hier für den an Ser-16 phosphorylierten Anteil sowohl der Monomere als auch der Pentamere ein massiver Abfall gegenüber dem unkultivierten Zustand festzustellen, auch zu Kulturrende kam es zu keiner Veränderung mehr. Dies entspricht den erwarteten Ergebnissen der Auswirkungen eines Katecholaminmangels in diesen Proben. Diese Entwicklung eines starken Rückgangs der Phosphorylierung geht mit einer Aktivierung des Phospholambans einher, da mehr Proteine in der unphosphorylierten, aktiv inhibierenden Form vorliegen. Physiologisch liegt hier ein gewisses Gleichgewicht zwischen Proteinkinasen (hier z.B. PKA) und Phosphatasen (für PLN z.B. Proteinphosphatase 1, PP-1 [97]) vor. Bei Rückgang der PKA-Aktivität durch Katecholaminmangel erklärt sich der Kraftabfall zu Kulturbeginn zusätzlich zur Reduktion der SERCA-Proteinmenge durch SERCA2a-Inhibition durch vermehrte PLN-Aktivierung. Trotz anhaltend niedriger PLN-Ser-16-Phosphorylierung kommt es jedoch in weiterer Kultur in der Kontraktionskraft zu einem Wiederanstieg, diese Beobachtung widerlegt die initiale Hypothese eines Anstiegs des adrenergen Spontantonus als Ursache dieses Kraftanstiegs. Für diese Entwicklung dürften also andere Mechanismen verantwortlich sein.

Da es sich bei der Phosphorylierung an PLN-Ser-16 um einen zentralen Effekt einer β_1 -adrenergen Stimulation handelt, sind bei Denopamin-Stimulation hier entsprechende Auswirkungen zu erwarten. Für die an Kulturtag 1 untersuchten Denopamin-behandelten Präparate lässt sich eine stärkere Ser-16-Phosphorylierung im Vergleich mit den Kontrollen lediglich als Tendenz vermuten, erklärt also eine stärkere Kontraktionskraft dieser Präparate nicht. Bei Betrachtung der Daten vom letzten Kulturtag zeigt sich ein weiterer Rückgang dieses Effekts, eine adrenerg bedingte PLN-Phosphorylierung liegt hier nicht mehr vor. Aus diesen Ergebnissen ergibt sich ein lediglich schwacher Denopamin-Effekt am ersten Kulturtag, der nach weiteren 20 Tagen nicht mehr nachweisbar ist. Der schwach nachweisbare Effekt am ersten Tag könnte für einen Teil der in diesen Gruppen stärkeren Kontraktionskraft verantwortlich sein, die im Verlauf nicht mehr nachweisbare Phosphorylierung spricht für eine Desensitivierung des Gewebes gegenüber diesem Stimulus. Daraus lässt sich ableiten, dass lediglich ein geringer Teil des Kraftabfalls auf den Katecholaminmangel zurückzuführen ist, der in Kombination mit der Entwicklung eines „stunned myocardium“-Zustands auftrat. Für „stunned myocardium“ ist eine erhaltene Wirkung positiv inotrop wirkender Substanzen auch in der Literatur beschrieben [114].

Die Tatsache, dass die adrenerge Stimulation den Abfall der Ser-16-Phosphorylierung nicht stärker verhindern kann, könnte jedoch auch dadurch hervorgerufen oder verstärkt werden, dass das Gewebe *in vivo* deutlich höhere (therapeutische) Katecholaminstimulation gewöhnt gewesen sein könnte und die hier verwendeten Dosen somit zu gering waren. Zudem ist ein katecholaminunabhängiger Mechanismus als Ursache für diesen Effekt denkbar, da ein Überwiegen einer Dephosphorylierung des PLNs auch durch andere Gründe zustande kommen könnte, da diese auch beispielsweise durch Proteinkinase C, Azidose, Ca^{2+} -Gehalt des Kardiomyozyten oder Heat-shock-protein-20 (Hsp-20) verstärkt wird [97,100].

Neben der Phosphorylierung des PLNs an Ser-16 findet die Regulation dieses Proteins auch über eine Phosphorylierung an der Aminosäure Threonin an Position 17 (Thr-17) durch die Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) statt [97,98,102,178]. Während hier in der Literatur zunächst eine von der Ser-16-Phosphorylierung unabhängige Phosphorylierung beschrieben worden war [181], wurde später festgestellt, dass Thr-17 konsekutiv erst nach einer Ser-16-Phosphorylierung phosphoryliert werden konnte [182]. In letzter Zeit konnten jedoch zusätzliche von einer Ser-16-Phosphorylierung unabhängige Mechanismen festgestellt werden: so wird davon ausgegangen, dass für die CaMKII-abhängige Phosphorylierung von Thr-17 ein erhöhter intrazellulärer Ca^{2+} -Spiegel und eine Inhibition der PP-1, die PLN auch an Thr-17 dephosphoryliert, notwendig sind – beide Mechanismen können dabei auch durch einen erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegel z.B. bei adrenerger Stimulation hervorgerufen werden [98].

Für die hier untersuchten unbehandelten Myokardpräparate zeigt sich kaum ein Rückgang der Thr-17-Phosphorylierung innerhalb des ersten Kulturtages. Am 21. Kulturtag zeigt sich ein starker Anstieg, der das Ausgangsniveau des unkultivierten Myokards übertrifft. Der initiale minimale Rückgang für Thr-17 steht im Gegensatz zum starken Rückgang der Ser-16-Phosphorylierung, was in Zusammenschau mit dem Anstieg der Thr-17-Phosphorylierung zu Kulturrende ohne Veränderung der Ser-16-Phosphorylierung für das Vorliegen von unabhängigen Mechanismen der Aktivierung der CaMKII spricht. Hierfür sind verschiedene Möglichkeiten beschrieben worden, beispielsweise eine intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung, eine PP-1-Inhibition durch vielfältige Regulationsmechanismen oder eine Azidose [98–100]. Eine Funktion der Thr-17-Phosphorylierung wurde auch für protektive Vorgänge nach einem Ischämie-Reperfusion-Vorgang im Rahmen eines „myocardial stunning“, wie es sich hier anhand der SERCA-Daten vermuten ließ, beschrieben [117]. Jedoch sind diese Zusammenhänge nur für die ersten Minuten des „stunnings“ beschrieben, was wiederum der These widerspricht, dass 24 h nach Kulturbeginn noch eine relevante Auswirkung erkennbar ist. Des Weiteren wurde auch ein Zusammenhang der Thr-17-PLN-Phosphorylierung mit der sogenannten „frequency dependent acceleration of relaxation“ (FDAR) beschrieben [102], einem Vorgang der beschleunigten Relaxation von Kardiomyozyten bei erhöhter Stimulationsfrequenz, der essentieller Bestandteil der Vorgänge der Regulierung der Kraft-Frequenz-Abhängigkeit ist [104,105]. Diese Daten korrelieren gut mit der im Laufe der Kultur immer stärker ausgeprägten positiven Kraft-Frequenz-Abhängigkeit der untersuchten Präparate, es liegt jedoch auch die Vermutung nahe, dass die Entnahme der Slices am 21. Kulturtag unmittelbar nach der Durchführung eines FFR-Assessments im Rahmen des Stimulationsprotokolls aufgrund dieser Zusammenhänge die Thr-17-Phosphorylierungs-Ergebnisse beeinflusst haben könnte. Hierzu ist noch anzumerken, dass

eine Thr-17-Phosphorylierung für die erfolgreiche FDAR-Regulation nicht als erforderlich gilt, sodass die Relevanz fraglich scheint [183,184].

Für eine adrenerge Stimulation wurde ein dosisabhängiger Effekt auf das Zusammenspiel zwischen Ser-16- und Thr-17-Phosphorylierung beschrieben [185], wobei die Ursachen dieser Dosisabhängigkeit vermutlich in der Wirkung der adrenerg aktivierten PKA auf die die CaMKII dephosphorylierende PP-1 liegen [98,185]. Die hier erhobenen Daten für die Thr-17-Phosphorylierung der Denopamin-behandelten Präparate zeigen für die PLN-Monomere tendenziell einen stärkeren Rückgang innerhalb des ersten Kulturtags, dann einen ähnlichen Anstieg wie die Kontrollgruppe, für die Pentamer-Form einen reinen Anstieg an Tag 1 und Tag 21 in der Denopamin-100 nM-Gruppe, ansonsten einen der Kontrollgruppe ähnlichen Effekt. Passend zur Vermutung, dass die hier eingesetzten Denopamin-Dosen womöglich zu gering für eine starke Ser-16-Phosphorylierung waren, kommt es in den behandelten Gruppen also vor allem für die Monomere zu einem stärkeren Rückgang der Thr-17-Phosphorylierung – bei zu geringen Dosen könnte also die Aktivierung der PP-1 überwiegen, die dann Thr-17 dephosphorylieren würde. Denkbar sind jedoch auch hier, vor allem für den Anstieg der Thr-17-Phosphorylierung im Kulturverlauf ohne damit einhergehende Ser-16-Phosphorylierung, katecholaminunabhängige Effekte, wie sie für die Kontrollgruppe beschrieben wurden.

Phospholamban weist noch eine dritte Phosphorylierungsdomäne für Proteinkinase C auf, die Aminosäure Serin an Position 10, hier wurde jedoch bisher ein reiner *In-vitro*-Effekt auf subzellulärer Ebene ohne *In-vivo*-Korrelation beschrieben [186]. In Einklang mit diesen Beobachtungen war für die hier untersuchten Proben kein Unterschied in der Ser-10-Phosphorylierung zwischen den verschiedenen Zeitpunkten oder Behandlungsbedingungen erkennbar, die biomimetischen Bedingungen dieser Kulturmethode scheinen also eher den *In-vivo*-Zustand als den subzellulären *In-vitro*-Zustand widerzuspiegeln.

6.2.4 Fazit: Interpretation der Ergebnisse für insuffizientes humanes Myokard

Betrachtet man diese vielfältigen Überlegungen und Ergebnisse nun zusammengefasst im Hinblick auf die zu Beginn formulierten Möglichkeiten für das beobachtete Phänomen der Kontraktionskraft, ergibt sich für die Kausalität des Kraftabfalls eine Kombination aus Katecholaminmangel und „myocardial stunning“: im Minimum der Kontraktionskraft zeigt sich bei Denopamin-Zugabe eine deutliche Tendenz einer adrenergen Wirkung in Richtung Aufhebung des Minimums, auf molekularer Ebene zeigt sich jedoch nur ein schwacher Effekt des zugegebenen Denopamins. Damit korrelierend lässt sich auch der Kraftabfall in den behandelten Proben nicht vollständig verhindern. Da sich funktionell wie molekular jedoch Indizien für einen dosisabhängigen Effekt ergaben, bleibt natürlich die Möglichkeit offen, dass die eingesetzte Dosis für eine vollständige Kompensation des Katecholaminmangels zu gering war. Dagegen spricht jedoch, dass relevante Veränderungen auf Proteinebene, nämlich der nachweisbare deutliche Abbau von SERCA2a und PLN in allen Gruppen behandlungsunabhängig auftraten. Diese Veränderungen dürften einen großen Anteil an der Kraftreduktion haben und werden durch die adrenerge Stimulation nicht beeinflusst. Diese Effekte stehen in Einklang mit Betrachtungen zum „myocardial stunning“ im Sinne eines deutlichen Rückgangs der Kontraktionskraft durch veränderte Ca^{2+} -Ströme ohne irreversible Schädigung nach einem Ischämie-Reperfusionsvorgang [114]. Dieser

Verdacht wird erhärtet anhand der Daten zu elektrischer Reizschwelle und Refraktärzeit der Proben, die eine weitestgehende elektrische Stabilität der Präparate vermuten lassen.

Für den weiteren Kulturverlauf zeigte sich in einigen der untersuchten Parameter ein nachweisbarer Effekt für Denopamin in der erwarteten Weise: eine positive Inotropie und Verkürzung der Refraktärzeit sind nachweisbar, die positive Bathmotropie ist eher fraglich, da dieser Effekt nur teilweise beobachtet werden konnte. Diese Effekte ließen sich primär im mittleren Zeitbereich des Kulturverlaufs nachweisen, für den keine Western-Blot-Daten vorlagen. Nach Kulturrende, wobei hier einige der genannten Beobachtungen nur noch einen geringen Unterschied zur Kontrollgruppe aufwiesen, war auf Proteinebene kein Effekt einer adrenergen Stimulation auf die Ser-16-Phosphorylierung des PLNs mehr nachweisbar. Zur genaueren Untersuchung der molekularen Effekte adrenerger Stimulation im mittleren Zeitbereich der Kultur müssten in Zukunft Versuchsreihen mit Western-Blot-Analysen zu weiteren Zeitpunkten durchgeführt werden.

Der vermutete Anstieg eines adrenergen Spontantonus als Ursache der Kraftzunahme der unbehandelten Kontrollproben erscheint anhand der Untersuchungsergebnisse als unwahrscheinlich. In den erhobenen Kenngrößen zeigte sich kein Hinweis auf einen derartigen Vorgang, während für eine externe adrenerge Stimulation Effekte nachweisbar waren. Auch die Western-Blot-Daten lassen einen relevanten derartigen Spontantonus nicht vermuten. Untermauert wird die Ablehnung dieser These durch die weitestgehend fehlenden Auswirkungen einer Metoprolol-Gabe, die daher hier auch nicht einzeln diskutiert werden sollen, auf die Messkurven – im Falle eines Spontantonus wäre ja eine Unterdrückung dieses Tonus durch den inversen Agonismus am β_1 -Rezeptor zu erwarten.

Während zu Kulturbeginn also eine Kombination aus „myocardial stunning“ und Katecholaminmangel einen Einbruch der Kontraktionskraft verursachen, zeigt sich die anschließende langsame Erholung als Reversibilität des „stunnings“ ohne Verstärkung eines adrenergen Spontantonus. Denopamin wirkt im „stunned myocardium“, wenn auch molekular mit nur geringem Effekt auf die Ser-16-Phosphorylierung des PLNs.

Sehr interessant ist in der Erholungsphase des Myokards die Veränderung der Kraft-Frequenz-Abhängigkeit von einer typischen Charakteristik insuffizienten Myokards zu Beginn hin zu einer typischen Charakteristik nicht insuffizienten Myokards gegen Ende der Kultur. Es scheint also im Rahmen der Erholung des Gewebes vom „stunning“ auch zu einer weiteren Entwicklung zu kommen, die eine Art „reverse remodeling“ im Sinne einer Veränderung des Zustands hin zu einem weniger pathologischen vermuten lässt. Dazu korrelierend zeigt sich ein Anstieg der Thr-17-Phosphorylierung des PLNs, wie er für frequenzabhängige Prozesse bereits in der Literatur beschrieben wurde. Die Fragestellung, auf welche konkreten Veränderungen im Rahmen der Kultur diese Effekte jedoch zurückzuführen sind, bietet Anlass für weitere Untersuchungen.

Zur Überprüfung, in wieweit sich die gezeigten Effekte bei Verwendung nicht insuffizienten Myokards verhielten, soll nun beleuchtet werden, wie sich Myokard gesunder Paviane in der gleichen Kultur verhielt und welche Parallelen und Unterschiede sich hierbei zum humanen Myokard ergeben. Anhand deutlicher Unterschiede zu den bisher betrachteten Proben kann auch gezeigt werden, dass nicht generell kultiviertes Myokard als Anpassungsreaktion derartige Effekte zeigt.

6.3 Bedeutung der Ergebnisse der Primatenmyokardproben

6.3.1 Vergleichende Interpretation der Veränderungen der Kontraktionskraft

Im Verlauf der Kontraktionskraft zeigte sich für die ohne Substanzzugabe kultivierten Pavian-Myokardschnitte mit einem weniger stark ausgeprägter Kraftabfall nur im 6 h-Messwert, der schon weitere 6 h später wieder ausgeglichen war, eine deutlich andere Kinetik als für das menschliche Myokard.

Der erste Unterschied zum Verhalten des humanen Myokards lag dabei in der Stärke der Kraftabnahme auf ca. 34 % Restkontraktionskraft vs. ca. 5 % bei humanem Myokard. Im Hinblick auf die oben vermuteten Veränderungen des menschlichen Gewebes im Sinne einer Entwicklung eines „stunning myocardium“ durch ein Ischämie-Reperfusion-Ereignis als Ursache des Kraftabfalls wäre als Ursache für die andere Kinetik des Pavian-Gewebes zu vermuten, dass nicht vorgeschädigtes Gewebe sich deutlich widerstandsfähiger gegenüber solchen Ereignissen und potentiellen Schädigungen zeigt und daher diese Entwicklung hier nicht so ausgeprägt war. Zudem lässt sich vermuten, dass das Pavian-Myokard tendenziell einer kürzeren warmen Ischämie-Zeit zwischen Herzexplantation und Gewebeentnahme der Myokardprobe und Kühlung dieser ausgesetzt war als humanes Myokard, da im Unterschied zum Vorgehen bei einer menschlichen Herztransplantation hier ein eigenes Team zur raschen Prozessierung des entnommenen Herzens im OP bereitstand. Eine positiv inotrope Wirkung der Denopaminstimulation ließ sich auch für die Pavian-Präparate erkennen. Dabei ließ sich wie in den humanen Präparaten eine Dosisabhängigkeit feststellen, der Kraftanstieg nach Denopaminstimulation war für die hohe Dosis stärker ausgeprägt als für die niedrige, für die ab Kulturbeginn mit der hohen Dosis behandelte Gruppe war sogar kein Kraftminimum mehr nachweisbar. Dabei war hier eine über das Ausgleichen des Kraftminimums hinausgehende Steigerung der Kontraktionskraft zu erkennen, eine Beobachtung, die für eine teilweise einen Ausgleich des möglichen Mangels übersteigende additive adrenerge Wirkung spricht.

Der zweite Unterschied zeigte sich in der Kinetik der folgenden Kraftzunahme, die im Pavian-Myokard wesentlich rascher ablief als im humanen Myokard. Hier ist natürlich einerseits zu berücksichtigen, dass der Kraftabfall auch schwächer ausgeprägt war und daher eine geringere Differenz bis zum Erreichen der Ausgangskraft zu überbrücken war, andererseits ist auch zu vermuten, dass gesundes Myokard mehr Regenerationsmöglichkeiten für eine erlittene Beeinträchtigung aufweist. Zudem besteht die Möglichkeit, dass die verwendeten Kulturbedingungen für nicht vorgeschädigtes Myokard eine weniger starke Anpassungsreaktion erforderten, sodass sich die veränderte Kinetik daraus ergeben hätte können.

Der dritte erkennbare Unterschied im Kraftverlauf der Primatenproben war ein kontinuierlicher Kraftabfall für alle Gruppen ab ungefähr dem 9. Kulturtag bis zum Kulturende, der so bei humanen Proben nicht beobachtet werden konnte. Eine adrenerge Stimulation veränderte dabei nichts an dieser erfolgenden Kraftreduktion in der zweiten Kulturhälfte. Zu den Ursachen dieses Effekts gibt es mehrere Hypothesen: Zum einen könnte ein initialer „Schutzmechanismus“ fehlen, womöglich ist die Entwicklung eines „stunnings“ und die darauffolgenden Umbauprozesse relevant für eine anschließende langfristige Erhaltung einer stabilen Kontraktionskraft. Zum anderen könnte das nicht insuffiziente Pavianmyokard langfristig anfälliger für bestimmte Veränderungen durch die Kultivierung sein, auch die

primäre Anpassung der Kulturbedingungen an die Erfordernisse humaner Proben, wie z.B. Vorspannung des Gewebes oder Stimulationsfrequenz, könnte hierbei eine Rolle gespielt haben. Zudem könnten die für das humane Myokard vermuteten Umbauvorgänge im Sinne eines „reverse remodeling“ für ein gesundes Myokard eher schädliche Auswirkungen (im Sinne eines „remodeling“) haben.

Aus diesen Betrachtungen lässt sich schließen, dass Denopamin auch für Pavian-Kardiomyozyten eine positiv inotrope Wirkung aufweist, eine Kausalität bezüglich eines Katecholaminmangels als Ursache des initialen Kraftabfalls lässt sich daraus noch nicht ableiten, hier müssen die Daten der Proteinexpression mit einbezogen werden. Der im humanen Myokard vermutete Effekt des „stunnings“ scheint für Pavianmyokard hingegen anhand der Kontraktionskraftdaten nicht vorzuliegen.

6.3.2 Vergleichende Interpretation der Ergebnisse funktioneller Parameter

Für die Einbeziehung der Daten aus den Stimulationsprotokollen der Pavian-Myokardslices ist zunächst auf die deutlich größeren Schwankungen und Abweichungen zwischen den einzelnen Präparaten und den Zeitpunkten hinzuweisen. Diese kamen dadurch zustande, dass zum einen die Zahl der verfügbaren Präparate in jeder Gruppe deutlich geringer war und dadurch Schwankungen einzelner Proben deutlich stärker in der Gesamtheit ins Gewicht fielen. Zum anderen war die Durchführung der Stimulationsprotokolle aufgrund technischer Schwierigkeiten für einige Präparate nur jeden zweiten Tag möglich und dies für die verschiedenen Myokardproben im Wechsel, sodass die sichtbaren deutlichen Unterschiede von Tag zu Tag eher auf dieses technische Problem und damit auf stärkere interindividuelle Unterschiede der einzelnen Gewebeschnitte zurückzuführen waren.

Für die Refraktärzeit der Pavian-Proben zeigte sich ohne Denopamin-Stimulation zunächst eine Undulation um einen den humanen Präparaten ähnlichen Mittelwert, der etwa in dem für gesunde Paviane bekannten Bereich lag. In der Literatur finden sich hier für gesunde Paviane Werte um eine QT-Zeit von ca. 200 ms (vgl. [187]) bis zu einer Aktionspotentialdauer von ca. 420 ms für subendokardiales Myokard (vgl. [188]). Ab ungefähr dem zwölften Kulturtag war dann jedoch ein recht einheitlicher Rückgang dieses Messwerts auf geringere Werte zu beobachten, der ungefähr parallel zu dem im selben Zeitraum auffälligen Kraftabfall erfolgte. Diese Entwicklung ist ein Indiz für elektrische Veränderungen im Gewebe im Kulturverlauf, die auf diese Art in humanen Gewebeproben nicht beobachtet werden konnten. Dieses Phänomen könnte für einen verstärkten adrenergen Spontanonus der unbehandelten Proben sprechen, allerdings stellt sich die Frage, warum dies erst abrupt ab diesem Zeitpunkt erfolgen sollte und nicht von einer positiven, sondern einer negativen Inotropie begleitet sein sollte. Auch denkbar wären Anpassungsvorgänge an die durch die Kultivierung veränderten Stimulationsbedingungen oder eine Entstehung dieses Effekts im Rahmen von Umbauvorgängen im Sinne einer Art „remodeling“.

Eine Behandlung der Myokardschnitte mit Denopamin zeigte hier im Unterschied zu der beobachteten leichten Verkürzung der Refraktärzeit im humanen Gewebe eher keine derartige Auswirkung. Die gemessene Refraktärzeit der behandelten Proben lag zwar in einigen Untergruppen tendenziell leicht unter den Werten der Kontrollen, aber außer für das einzige mit Denopamin 1000 nM nach 20 h versetzte Präparat, das deutlich unterhalb der Werte der anderen Gruppen anzusiedeln war, lässt sich keine klare Aussage treffen. Dieser weitestgehend fehlende Effekt lässt sich womöglich auf eine Verschleierung

eines Effekts durch die starken Schwankungen oder einen spezieabhängigen Wirkungsunterschied erklären. Eine zu geringe Denopamin-Dosis kommt als Ursache eher nicht in Frage, da sich in der Kontraktionskraft eine deutliche positiv inotrope Wirkung erkennen hatte lassen. Interessanterweise wurde der Abfall der Refraktärzeiten in der zweiten Kulturhälfte ebenso wenig durch Denopamingabe verändert wie der parallel dazu erfolgende Kraftabfall. Dies spricht für einen katecholaminunabhängigen Mechanismus als Ursache dieses Phänomens und somit gegen die These, in der Kontrollgruppe könnte ein Anstieg des adrenergen Spontanonus ursächlich dafür sein. In Frage kämen hier also eher Umbauvorgänge oder elektrische Veränderungen.

Abgesehen von den oben beschriebenen starken Schwankungen im Messverlauf zeigte sich für die Erhebung der elektrischen Reizschwelle der unbehandelten Pavianherzproben ein ähnlicher Ablauf wie für die humanen Präparate, auch die Absolutwerte lagen dabei in ähnlichen Bereichen. Im Hinblick auf die durch diesen Parameter erfassten elektrischen Veränderungen scheinen sich also die ablaufenden Mechanismen zwischen den beiden Teilen der Studie nicht zu unterscheiden, Speziesunterschiede oder Unterschiede zwischen insuffizientem und nicht insuffizientem Myokard scheinen hier nicht zum Tragen zu kommen. Dies stellt ein Indiz für eine generelle kulturbedingte Anpassungsreaktion für beide Myokardarten dar, deren Ursachen weiterer Abklärung bedürfen.

Während die Behandlung der Pavian-Myokardproben mit Denopamin der niedrigen Dosierung (100 nM) weder bei frühem noch spätem Behandlungsbeginn eine Veränderung der Reizschwelle gegenüber den Kontrollproben erkennen ließ, zeigte sich für die ab Kulturbeginn mit 1000 nM Denopamin versetzten Präparate ein sehr ähnlicher Effekt wie für die humanen Proben der gleichen Gruppe. Zwischen Tag 5 und Tag 10 in Kultur lag die elektrische Reizschwelle dieser Gruppe deutlich unter der der Kontrollgruppe, dies könnte wie bei den humanen Proben ein Hinweis auf eine positiv bathmotrope Wirkung sein, wie sie bei adrenerger Stimulation zu erwarten wäre. Anschließend kam es in den Primatenproben jedoch zu einem starken Anstieg der elektrischen Reizschwelle auf das Niveau der Kontrollen, wofür potentiell ungünstige elektrische Veränderungen ursächlich sein könnten.

Für die Kraft-Frequenz-Abhängigkeit (FFR) des unbehandelten Pavian-Myokards zeigt sich schon zu Kulturbeginn ein Unterschied zum Verhalten des humanen Myokards: wie für nicht insuffizientes Gewebe zu erwarten [129,133,166], zeigte sich keine Abnahme der Kontraktionskraft bei Steigerung der Stimulationsfrequenz. Es zeigte sich jedoch auch keine stark positive FFR, sondern eine weitestgehend gleichbleibende Kraft bei allen Stimulationsfrequenzen – dies könnte ein Indiz für eine Anpassung des Gewebes an die für Primatenmyokard relativ geringe Grundstimulationsfrequenz sein, denn die physiologische Herzfrequenz eines Pavians liegt bei ca. 120 Schlägen pro Minute, also 2 Hz [21], diese Frequenzen werden auch unter den Bedingungen einer Xenotransplantation erreicht [189]. Im Kulturverlauf zeigt sich auch für das Pavianmyokard eine starke Veränderung der FFR hin zu einem massiven Kraftanstieg bei steigender Stimulationsfrequenz in der dritten Kulturwoche. Die größte Kontraktionskraft wird dabei bei etwas höheren Frequenzen erreicht als im humanen Gewebe, allerdings kommt es bei weiterer Steigerung der Frequenz nicht zu einem erneuten Abfall der Kraft, sondern zu einer Plateauphase. Dies könnte mit der Gewöhnung des Pavianmyokards an physiologisch *in vivo* höhere Herzfrequenzen zu begründen sein. Aus dieser Beobachtung lässt sich ableiten, dass die Verschiebung der FFR im Sinne einer Positivierung auch für die humanen Präparate eher ein Anpassungseffekt an Kul-

turbedingungen zu sein scheint, da er für beide Spezies unabhängig von einer vor der Myokardpräparation vorliegenden Herzinsuffizienz auftritt. Alternativ käme die Verstärkung eines adrenergen Spontanonus als ursächlich in Frage, dies erscheint aufgrund der bereits beschriebenen Gründe jedoch als eher unwahrscheinlich.

Berücksichtigt man die in der zweiten Kulturhälfte stark zurückgehende Kontraktionskraft der Pavian-Myokardslices, ist ersichtlich, dass im Unterschied zum humanen Myokard, für das die Positivierung der FFR von einem Kraftanstieg begleitet wird, hier eine Positivierung der FFR bei sinkender Kraft unter stabilen Kulturbedingungen einhergeht. Dies lässt eine stärkere Schädigung des Pavian-Myokards im Sinne einer Apoptose oder Nekrose unwahrscheinlich erscheinen. Wahrscheinlicher liegt eine funktionelle Hemmung bzw. Einschränkung der Kraftentwicklung des Primatenmyokards im Rahmen der Kultur vor, z.B. durch die für einen Pavian unphysiologisch niedrige basale Stimulationsfrequenz, so dass aber für eine Kraftentwicklung bei höheren Frequenzen eine größere kardiale Reserve verfügbar ist. Um diese Thesen zu überprüfen, bedarf es weiterer gezielter Untersuchungen.

Denopamin bewirkt, wie auch in den Ergebnissen des humanen Myokards ersichtlich, keinen relevanten Effekt auf die Entwicklung der Kraft-Frequenz-Abhängigkeit und deren Veränderungen im Laufe der Kulturzeit. Da sich durch Denopamin-Stimulation keine negative FFR für die Primatenproben ergab, ist davon auszugehen, dass eine langfristige Denopaminstimulation keine *in vitro* entstehende Herzinsuffizienz für diese Proben auslöst. Relevant ist damit vor allem, dass der Effekt einer FFR-Positivierung im Verlauf der Kultur sich auch für alle Pavian-Proben zeigen ließ, und dieser damit tendenziell als kulturbedingte Anpassungsreaktion zu entlarven ist.

6.3.3 Vergleichende Interpretation der Proteindaten zum intrazellulären Ca^{2+} -Transport

Für die Proteinmenge der SERCA2a zeigte sich für alle Gruppen unabhängig von einer Substanzzugabe eine wesentliche Abweichung gegenüber den Daten der humanen Proben: es war sowohl am ersten als auch letzten Kulturtag eine konstante Proteinmenge dieses Proteins nachweisbar, die für humane Präparate beobachtete deutliche Reduktion an Tag 1 und der Wiederanstieg an Tag 21 fehlten dabei. Dies korreliert gut mit dem nur leichten und schnell reversiblen Kraftabfall dieser Präparate, wobei ein eventuell für den Krafteinbruch verantwortlicher SERCA2a-Abbau aufgrund der gewählten Zeitpunkte womöglich verschleiert worden sein könnte, da das Kraftminimum bei ca. 6 h in Kultur erreicht war, während die SERCA2a-Daten von ca. 24 h nach Kulturbeginn stammten. Tendenziell ist aber aufgrund der raschen Kinetik am ehesten von einem SERCA2a-Proteinmengen-unabhängigen Effekt (z.B. Katecholaminmangel) für den Krafteinbruch der Pavian-Myokardslices auszugehen. Weiterhin lässt sich aus den SERCA2a-Daten der Primatenproben ableiten, dass ein genereller Anstieg des SERCA2a-Levels nicht als reine Kulturanpassung aufzutreten scheint, da er für die lang kultivierten Präparate nicht festzustellen ist. Somit scheint es sich bei dem parallel zum Kraftverlauf der humanen Proben auftretenden auf Proteinebene nachweisbaren Effekt um einen spezifischen Effekt für insuffizientes oder auch allgemein für humanes Myokard zu handeln, wobei hier die Vermutung eines „myocardial stunnings“, das bei insuffizientem Myokard auftritt, während es bei nicht vorgeschädigtem Gewebe ausbleibt, gut zu den beobachteten Phänomenen passt.

Der nur für die Primaten-Präparate auftretende langsame Kraftabfall in der zweiten Kulturhälfte wird interessanterweise nicht von einer signifikanten SERCA2a-Reduktion begleitet, hier scheinen also andere Gründe, womöglich eine veränderte Regulation der kontraktiven Mechanismen, vorzuliegen.

Für eines der wichtigsten regulatorischen Proteine der SERCA2a, PLN, ließ sich wie für die humanen Proben auch für die Pavian-Proben ein größtenteils parallel zu den SERCA2a-Daten verlaufendes Verhalten feststellen. Für die Gesamtmenge des PLNs zeigte sich für die Pavian-Kontrollproben eine konstante Proteinmenge für alle Messzeitpunkte. Dies korreliert gut mit der für die humanen Präparate vermuteten These, dass SERCA2a und PLN als Komplex vorliegen (wie auch bereits in der Literatur beschrieben [179]) und auch als solcher abgebaut werden oder vorhanden bleiben. Für die Pentamer-Form des PLNs ergibt sich für die Kontrollgruppe keine Veränderung, während bei der Monomer-Form ein Anstieg an Kulturtag 21 festzustellen ist, bei dem es sich um eine Anpassung an Kulturbedingungen handeln könnte.

Sowohl die PLN-Gesamtmenge als auch die Monomer- und Pentamer-Daten zeigen für eine Denopaminbehandlung keinen Unterschied im Zeitverlauf, wie das für die humanen Präparate parallel zu den dortigen Kontrollen festzustellen gewesen war. Generell liegen die Proteinmengen des PLNs in allen Erhebungen jedoch eher unterhalb des Niveaus der Kontrollen, dies könnte einerseits ein individueller Effekt der einzelnen Präparate dieser (kleinen) Gruppen sein, andererseits kommt auch ein Behandlungseffekt im Sinne von durch die Denopamin-Zugabe angeregte Umbau- oder Abbau-Prozesse in Frage. Da sich diese Unterschiede schon am ersten Kulturtag zeigten, wäre hierbei aber von einer rasch einsetzenden und dann sehr konstanten Veränderung in den behandelten Gruppen auszugehen, dies erscheint anhand der Daten der Stimulationsprotokollparameter, die Veränderungen im elektrischen System des Myokards auch erfassen hätten müssen, allerdings unwahrscheinlich – hier ist kein für alle Denopamingruppen massiv von den Kontrollen unterschiedlicher, dann aber konstanter Verlauf für einen der Parameter erkennbar. Daher erscheint es plausibler, dass sich die Präparate der verschiedenen Gruppen in den individuellen Ausgangswerten unterschieden hatten, dann aber ein ebenso konstantes Verhalten zeigten wie die Kontrollpräparate. Da ein starker Anstieg der Monomer-Form des PLNs, wie er für die Kontrollgruppe an Tag 21 zu vermerken war, für die behandelten Gruppen ausblieb, ist eher nicht davon auszugehen, dass dies eine grundsätzlichen Anpassung an die Kulturbedingungen darstellte.

Aufgrund der weitgehend unveränderten Proteinmengen der SERCA2a und des PLNs für das Pavian-Myokard ist interessant, wie sich die regulatorisch relevante Phosphorylierung des PLNs für die verschiedenen Gruppen und Phosphorylierungsstellen verhielt.

Ähnlich wie für die humanen Präparate kam es auch für die Kontrollproben des Pavianmyokards zu einem fast vollständigen Rückgang der Phosphorylierung an Ser-16 des PLNs zwischen Kulturbeginn und Tag 1, der auch bis Tag 21 keine relevante Veränderung mehr zeigte und für Monomere und Pentamere gleichermaßen vorlag. Dies ließe sich mit dem vollständigen Wegfall der adrenergen Stimulation erklären. Bei zunächst weitestgehend gleichbleibender SERCA2a- und PLN-Proteinmenge wäre durch den Wegfall der PLN-Inhibition durch Wegfall der Ser-16-Phosphorylierung mit einer negativ inotropen Wirkung auf die Kontraktionskraft zu rechnen. Ein derartiger Effekt kann anhand des Kraftabfalls in den ersten Stunden vermutet werden, zum Messzeitpunkt der Proteinveränderungen nach 24 h Kulturdauer war jedoch kein Kraftverlust mehr erkennbar. Daher ist davon auszugehen, dass der Effekt

entweder zu gering war, um zu diesem Zeitpunkt sichtbare Auswirkungen auf den Kraftverlauf hervorzurufen, oder aber durch andere, rasch nach Kulturbeginn einsetzende kraftsteigernde Mechanismen überdeckt worden war.

Eine adrenerge Stimulation zeigte als einzigen Effekt für die mit der hohen Denopamindosis versetzten Präparate eine signifikante Wirkung auf die Ser-16-Phosphorylierung der PLN-Pentamere im Vergleich zu den Kontrollen an Tag 1, nicht mehr jedoch an Tag 21 der Kultur. Dieses Phänomen ist erklärbar durch die oben erwähnte regulatorische Funktion der PLN-Pentamere [179], wobei die Pentamere die Phosphorylierung der Monomere regulieren und dabei zunächst selbst deutlich mehr phosphoryliert werden als die Monomere. Somit wird die schnell in der Kontraktionskraft erkennbare Auswirkung von Denopamin der hohen Dosis auch auf Proteinebene sichtbar, gegen Ende der Kultur lag, wie auch in der Kontraktionskraft, kein Unterschied zur Kontrollgruppe mehr vor. Die These, dass zur genauen Überprüfung der Denopamin-Wirkung auf PLN-Phosphorylierungsebene mehr Western-Blots zu weiteren Zeitpunkten der Kultur nötig wären, wird dadurch untermauert. Nur anhand der Daten weiterer Zeitpunkte kann eine Aussage getroffen werden, wie lang eine adrenerge Stimulation durch Denopamin erkennbare Effekte zeigt.

Im Unterschied zu den humanen Proben ist für die Pavian-Proben ein stärkerer und auch signifikanter Effekt des Denopamins der hohen Dosierung auf die Ser-16-Phosphorylierung nachweisbar, wahrscheinlich, da das menschliche insuffiziente Gewebe aufgrund vorangegangener *In-vivo*-Katecholamin-gabe bereits gegenüber einer β -adrenergen Stimulation desensitiviert war. Bei langfristiger adrenerger Stimulation des Pavian-Myokards könnte es ebenfalls zu einer derartigen Desensitivierung gekommen sein, was die fehlende Denopamin-Wirkung zu Kulturrende auf Kraft- und Proteinebene erklären würde. Da sich trotz einer adrenergen Stimulation mit nachweisbarem molekularem Effekt der Rückgang der Ser-16-Phosphorylierung nicht verhindern ließ, erscheinen als Ursache für den Großteil des Phosphorylierungsrückgangs der humanen und Primaten-Proben gleichermaßen katecholaminunabhängige Mechanismen wahrscheinlicher. Die schon erwähnten Einflussfaktoren auf die PP-1, wie Azidose, Hsp-20 oder Proteinkinase C kommen dabei als ursächlich in Frage. Dies ließe sich anhand weiterführender Untersuchungen dieser Faktoren überprüfen.

Für die Thr-17-Phosphorylierung des PLNs im Pavian-Myokard ließ sich die gleiche Tendenz eines behandlungsunabhängigen Rückgangs der Phosphorylierung der Mono- und Pentamere innerhalb des ersten Tages mit anschließendem Anstieg beobachten wie für das menschliche Gewebe. Die fehlenden Auswirkungen einer adrenergen Stimulation auf diese Veränderungen sind dabei weitere Indizien, dass, wie auch für die humanen Präparate vermutet, ein katecholaminunabhängiger Mechanismus für diese Phosphorylierung im Rahmen der vorliegenden Kulturmethode verantwortlich war. Im Zusammenhang mit der auch für die Primatenproben deutlich positiveren FFR und den schon oben erwähnten Hinweisen in der Literatur, dass die Thr-17-Phosphorylierung in einer engen Verbindung mit frequenzabhängigen Prozessen stehen soll, ergibt sich also der Verdacht, dass ein diesbezüglicher Effekt hier zu beobachten war. Da sich dieser Effekt für insuffizientes wie für nicht insuffizientes Myokard gleichermaßen zeigte, besteht allerdings die Vermutung, dass es sich hier um eine Auswirkung gewisser Kulturbedingungen oder der Entnahme der Präparate direkt nach einem FFR-Stimulationsprotokoll handelte.

Die Phosphorylierung an Ser-10 des PLNs zeigte für die Kontrollproben keinen Unterschied, für die mit 1000 nM Denopamin versetzten Proben zeigte sich für den ersten Kulturtag hier eine signifikant stärkere Phosphorylierung an dieser Stelle für die PLN-Pentamere, während alle anderen Gruppen wie die Kontrollgruppe keine Unterschiede erkennen ließen. Aufgrund der in der Literatur festgestellten fehlenden *In-vivo*-Relevanz dieser PLN-Phosphorylierung [186], bleiben Gründe und Auswirkungen dieses Unterschieds jedoch unklar und fraglich.

6.3.4 Fazit: Interpretation der Ergebnisse für nicht-insuffizientes Pavianmyokard

Vergleicht man nun zusammengenommen die Überlegungen und Ergebnisse der Primatenproben mit den beobachteten Effekten des humanen Myokards, lassen sich einige Schlussfolgerungen ziehen. So zeigt sich für die Kontraktionskraft der Pavian-Proben ein deutlich abweichender Verlauf im Vergleich zu den humanen Proben. Die Kraftreduktion zu Beginn erfolgt schneller, schwächer und kürzer, der Wiederanstieg im Anschluss ebenfalls schneller. In Zusammenschau mit den Western-Blot-Daten des Pavian-Myokards, die keine Reduktion der SERCA2a und des PLNs zeigen, erscheint ein „myocardial stunning“, wie es für die humanen Proben als Effekt wahrscheinlich scheint, hier nicht vorzuliegen.

Eine Denopaminzugabe bewirkte für die Primatenproben wie auch für die humanen Proben eine positiv inotrope Wirkung, die den Kraftabfall auszugleichen vermochte. Auf Proteinebene war als Wirkung von Denopamin lediglich eine stärkere PLN-Ser-16-Phosphorylierung der PLN-Pentamere am ersten Kulturtag bei Stimulation mit 1000 nM Denopamin erkennbar. Aus diesen Beobachtungen lässt sich die These ableiten, dass der schwache Kraftabfall der Primatenproben durch Katecholaminmangel bedingt war, die adrenergen Effekte bei Denopaminzugabe dabei jedoch auch in größerem Ausmaß über PLN-Phosphorylierungs-unabhängige Mechanismen zustande kamen. Für eine genauere Überprüfung der denopaminabhängigen Phosphorylierungsprozesse wären daher Western-Blots zu weiteren Zeitpunkten der Kultur sowie im Hinblick auf weitere Phosphorylierungsziele bei adrenerger Stimulation nötig. Untersucht werden könnten ebenso weitere molekulare Ziele einer adrenergen Stimulation auch hinsichtlich der Proteinmengen von z.B. Ionenkanälen.

Festzustellen ist des Weiteren, dass eine deutliche Ser-16-Dephosphorylierung des PLNs am ersten Kulturtag auch für die Primaten-Präparate durch adrenerge Stimulation nicht zu verhindern war, somit sind hier katecholaminunabhängige Ursachen zu vermuten. Möglich wäre beispielsweise, dass durch bestimmte Einflüsse in der Kultur ein Ungleichgewicht zwischen Phosphorylierung mittels Kinasen und Dephosphorylierung mittels Phosphatasen entstanden war, sodass die Phosphatase-Aktivität überwog. Diese These könnte beispielsweise durch die Zugabe von Phosphatase-Inhibitoren zum Kulturmedium weiter überprüft werden. Die Mechanismen der raschen Erholung der Kontraktionskraft auf das Ausgangsniveau für die Pavianproben trotz PLN-Dephosphorylierung bleiben bisher unklar.

Generell lässt sich anhand der Unterschiede im Vergleich der Daten von humanem und Primaten-Myokard erkennen, dass es sich weder bei dem beschriebenen Effekt eines initialen Abfallens der Kontraktionskraft mit anschließendem Wiederanstieg noch bei den für SERCA2a und PLN untersuchten Proteinmengenveränderungen um eine reine Auswirkung von Anpassungen an die Kultur handelt, da die beiden Gruppen deutliche Unterschiede erkennen ließen. Diese Unterschiede können dabei speziesspezifisch sein oder aber dadurch bedingt sein, dass es sich beim humanen Gewebe um insuffizientes Myokard handelte, während das Pavian-Myokard nicht insuffizient war. Anhand der Effekte adrenerger

Stimulation lässt sich konstatieren, dass entsprechend zu den Primaten-Daten auch für das humane Myokard nur ein untergeordneter Teil des Kraftabfalls durch Katecholaminmangel bedingt war, die darüber hinausgehende Kraftreduktion damit einem „myocardial stunning“ zuzuschreiben ist.

Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen ist zu vermuten, dass es sich bei dem Effekt eines leichten Anstiegs der elektrischen Reizschwelle im Kulturverlauf um eine Kulturanpassungsreaktion handelt, da sich dieser Ablauf in gleicher Weise für Myokard beider Spezies erkennen ließ.

Als Ursache der Positivierung der FFR wurde für die humanen Präparate ein „reverse remodeling“ mit Umbauprozessen hin zu einem weniger pathologischen Zustand als einem insuffizienten Gewebe in Betracht gezogen. Ein derartiges Phänomen einer FFR-Positivierung ist jedoch auch für die Präparate des Pavian-Myokards zu beobachten und wurde ebenfalls durch Thr-17-Hyperphosphorylierung des PLNs begleitet. Dadurch ist dieser Effekt zwar tatsächlich als Indiz für das Vorliegen von Umbauprozessen und funktionellen Veränderungen zu werten, allerdings dürfte kausal eher eine Anpassung an Kulturbedingungen vorliegen als ein Rückgang des initial pathologischen Zustands des humanen Myokards. Da zudem keine Beeinflussung der Thr-17-Phosphorylierung durch einen Zusatz von Denopamin erfolgte, kommen hier also primär katecholaminunabhängige Mechanismen dieser Phosphorylierung in Frage. Anhand der parallelen Entwicklung der Myokardproben der verschiedenen Spezies lässt sich des Weiteren auch schlussfolgern, dass für die Positivierung der FFR keine Erholung vom Zustand eines „myocardial stunning“ nötig ist. Dabei scheint es, wie auch am leichten Anstieg der Reizschwelle zu erkennen, zu einer Veränderung der elektrischen Abläufe im Myokard zu kommen, die von funktionellen Anpassungen begleitet werden. Die genauere Untersuchung dieses Phänomens könnte Gegenstand weiterer Studien sein.

Anders als für das menschliche Myokard zeigte sich für Affen-Myokard als weiterer Effekt behandlungsunabhängig eine deutlich ausgeprägte langsame Kraftreduktion in der zweiten Kulturhälfte, die von einem Absinken der Refraktärzeit begleitet wurde. Abbauprozesse erscheinen als Ursache der Kraftreduktion unwahrscheinlich, da funktionell eine deutliche Kraftsteigerung möglich war. Dies spricht in Zusammenschau mit der sinkenden Refraktärzeit für eine katecholaminunabhängige Veränderung der regulatorischen Prozesse, die für die humanen Myozyten nicht zu beobachten ist, wobei die Möglichkeit in Frage kommt, dass das initial vermutlich vorliegende „myocardial stunning“ und die anschließende Erholung davon das Myokard vor derartigen Veränderungen der Kontraktionsregulation im Sinne eines protektiven Effekts bewahren.

Diese Überlegungen und ihre Ergebnisse zeigen, dass anhand des Vergleichs der Ergebnisse von insuffizientem humanem Myokard und nicht insuffizientem Pavian-Myokard eine wesentlich genauere Einordnung der beobachteten Phänomene in das Feld von Speziesunterschieden, Kulturanpassungsreaktionen und pathophysiologischen Prozessen möglich wird.

7. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an einem biomimetischen Langzeitkulturmodell myokardialer Slices durchgeführt. Dabei handelte es sich um eine der ersten Anwendungen dieses Modells für humanes Myokard. Es konnte somit gezeigt werden, dass eine stabile Langzeitkultur humanen Herzgewebes unter Anwendung der hier beschriebenen MyoDish-Kulturtechnik möglich ist und vielfältige Versuchsansätze erlaubt. Dies wird durch die Modifizierbarkeit und wichtiger Kenngrößen und Einflussfaktoren in diesem Modell begünstigt. So können mechanische Faktoren wie die Vorspannung des Gewebes oder der Widerstand gegen den eine Kontraktion erfolgt ebenso modifiziert werden wie elektrische Einflüsse durch Anpassung der Stimulationsfrequenz oder der Stromstärke oder auch metabolisch-chemische Einflüsse wie die zur Verfügung stehenden Energiequellen des Gewebes oder der pH-Wert. Die Veränderung dieser Parameter ist dabei für jeden Myokardschnitt aufgrund des Designs des Kultursetups individuell gezielt möglich. Die Kulturtechnik kann daher auch für Gewebe verschiedener Spezies oder verschiedener Pathologien optimiert werden. Zudem ermöglicht die verwendete Kulturtechnik über die gesamte Kulturdauer eine engmaschige Überwachung jeder einzelnen Kontraktion der kultivierten Slices und damit eine Betrachtung von Effekten verschiedener Kinetiken als Reaktion auf verschiedene Einflussfaktoren. Kombinieren lässt sich die Kultivierung von Myokard und Überwachung der Kontraktionskraft dabei mit der Durchführung von Analytik am eingesetzten Gewebe nach Beendigung der Kultur.

Untersucht wurde in der hier vorliegenden Arbeit ein Effekt, der sich im Zeitverlauf mehrerer Tage für humanes Myokard gezeigt hatte. Als mögliche Ursachen des beobachteten Effekts einer initialen Reduktion der Kontraktionskraft mit anschließendem Anstieg derselben waren mehrere Faktoren vermutet worden. Anhand der durchgeführten Untersuchungen an insuffizientem humanem und nicht insuffizientem Primaten-Myokard soll nun der Versuch unternommen werden, die zu Beginn gestellte Frage zu beantworten, ob die Veränderungen der Kontraktionskraft der Myokard-Slices in Kultur mit dem Fehlen einer Katecholaminstimulation in kausalem Zusammenhang stehen oder ob andere Faktoren als wahrscheinlichere Ursachen für diese Kinetik angenommen werden sollten.

Da sich der untersuchte Effekt für Pavian-Myokard nur in wesentlich geringerem Ausmaß und mit einer rascheren Kinetik als für humanes Myokard nachweisen ließ, handelte es sich bei den Beobachtungen für humanes Myokard nicht um eine systematische Anpassungsreaktion an Kulturbedingungen.

Anhand des Vergleichs mit dem Primatenmyokard und der Ergebnisse der Proteinanalysen ließ sich zeigen, dass der Kraftabfall der humanen Proben auf eine Kombination aus „myocardial stunning“ als Ischämie-Reperfusion-Reaktion und Katecholaminmangel zurückzuführen ist.

Sowohl für humanes Myokard als auch für Pavian-Myokard konnte bei der Betrachtung verschiedener Kenngrößen wie der Kontraktionskraft eine Wirkung der eingesetzten Denopaminstimulation beobachtet werden, hinsichtlich der PLN-Phosphorylierung zeigte sich jedoch im Kraftminimum nur ein geringer und zu Ende der Kultur kein relevanter Unterschied zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen. Somit dürften die funktionell nachweisbaren Effekte durch adrenerge Stimulation großteils auf andere Mechanismen zurückzuführen sein. Die Entwicklung eines adrenergen Spontantonus

konnte weder anhand der Ergebnisse der Kontraktionskraft-Beobachtungen noch der Phosphorylierungs-Untersuchungen nachgewiesen werden und erscheint somit nicht als relevant für den beobachteten Kraftanstieg im humanen Myokard.

Anhand der Ergebnisse aus den Bestimmungen der Proteinmengen für die kardiale Kontraktion relevanter Proteine ließ sich jedoch eine Hypothese aufstellen, welche Ursache den Großteil des Kraftverfalls der humanen Proben verursachte: die festgestellte deutliche Reduktion der Proteinmengen von SERCA2a und PLN korreliert gut mit dem Kraftabfall und lässt in Zusammenschau mit den grundsätzlich gut erhaltenen elektrischen Eigenschaften des Myokards die Entwicklung eines „myocardial stunning“ bei Kultivierung humanen Myokards mit anschließender Erholung von dieser Entwicklung wahrscheinlich erscheinen. Für das untersuchte Pavian-Myokard zeigte sich dieser Effekt deutlich schwächer. Hierfür dürfte neben möglichen Unterschieden in den Ischämiezeiten aufgrund der Entnahmebedingungen des Gewebes ursächlich sein, dass es sich bei dem verwendeten humanen Gewebe um terminal insuffizientes und damit vorgeschädigtes Myokard handelte, während das Pavian-Gewebe von gesunden Versuchstieren aus einem Xenotransplantationsprojekt stammte.

Bei den durchgeführten Experimenten konnten zudem über die Fragestellung hinaus auch noch weitere Effekte festgestellt werden, die sich jedoch eher als durch die mit der Kultivierung einhergehenden Anpassungen bedingt entlarven ließen: so war ein leichter Anstieg der elektrischen Reizschwelle im Kulturverlauf festzustellen, was mit einer zumindest teilweisen elektromechanischen Entkopplung im Gewebe in Zusammenhang stehen kann, und es zeigte sich eine starke Reduktion der Phosphorylierung von PLN an der Aminosäure Ser-16, was ein Ungleichgewicht von Kinasen und Phosphatasen wahrscheinlich erscheinen lässt. Zudem war eine deutliche Veränderung des Verhaltens der Kontraktionskraft bei kurzfristiger Steigerung der Stimulationsfrequenz zu beobachten: es zeigte sich ein stärker werdender Anstieg der Kraft bei Frequenzsteigerung im Verlauf der Kultur, der von einer Hyperphosphorylierung der Aminosäure Thr-17 des PLNs begleitet wurde. Ein Zusammenhang dieser Faktoren wird in der Literatur kontrovers diskutiert, welche Faktoren hier ursächlich für diese Entwicklung sind, ist bisher jedoch noch unklar.

Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente bieten vielfältige Ansatzpunkte für künftige weitere Untersuchungen: Im Hinblick auf den hier untersuchten Effekt eines Kraftabfalls und Kraftanstiegs im Verlauf der Kultur sollte der Fokus künftig vor allem auf der Durchführung von mRNA-Sequenzierungen an zu verschiedenen Zeitpunkten aus der Kultur entnommenen Gewebes unter verschiedenen Kulturbedingungen liegen. Idealerweise könnte dabei ein sog. Transkriptom des kultivierten Myokards zu verschiedenen Zeitpunkten erstellt werden, wodurch die Analyse sämtlicher im Laufe der Kultur eintretender Veränderungen der Proteinexpression ermöglicht würde. Dies würde beispielsweise Aussagen über die stattfindenden Veränderungen im Stoffwechsel der Kardiomyozyten durch die veränderten Bedingungen oder auch über weitere Auswirkungen des Wegfalls der Hormonstimulation im Gewebe, z.B. des Katecholaminmangels, erlauben. Hiermit könnten weitere Indizien für die Bestätigung der oben genannten Thesen gesammelt werden, dass ein Katecholaminmangel nicht allein ursächlich für den stattfindenden Kraftabfall ist, während ein „myocardial stunning“ eine größere Rolle zu spielen scheint. Hinsichtlich dieser Thesen sollten zudem die hier bereits vorgestellten Untersuchungen der aus den Transkriptionsveränderungen resultierenden Proteinmengen und Phosphorylierungszuständen mittels Western-Blot-Verfahren zu noch weiteren Kulturzeitpunkten und hinsichtlich

weiterer Proteine durchgeführt werden, da sich anhand der erhobenen funktionellen Daten der Stimulationsprotokolle Veränderungen auch im Bereich zwischen den hier untersuchten Zeitpunkten erkennen ließen, die weiterer Erforschung bedürfen.

Allgemein kann für zukünftige Experimente mit humanem oder nicht-humanem Myokard in der hier vorgestellten Kulturtechnik an einer Feinjustierung der Kulturbedingungen für das jeweilige Gewebe gearbeitet werden, was die Kulturtechnik grundsätzlich hinsichtlich sehr vieler Faktoren leicht ermöglicht. Beispielsweise sollte die eingesetzte Stimulationsfrequenz dem jeweiligen physiologischen Bereich des Gewebes weiter angenähert werden, für humanes Myokard wäre also eine Anhebung auf 1 Hz vorzuschlagen, für Pavianmyokard auf 2 Hz. Auch Experimente mit dem Einsatz verschiedener Energiequellen für die Kardiomyozyten sind sicher aussichtsreich, so könnte mit dem Zusatz verschiedener Lipide zusätzlich zu oder anstelle von Glukose als Energiequelle gearbeitet werden. Weiterführende Versuche könnten zudem eine Modifikation der Gewebedehnung beinhalten, entweder, um möglichst physiologische Bedingungen für das jeweilige Gewebe (z.B. Pavianmyokard oder murines Myokard) zu erreichen oder aber um verschiedene pathophysiologische Bedingungen zu simulieren. Auch weiterführende elektrophysiologische Untersuchungen sind denkbar und interessant, so könnte mit einer Modifikation der hier eingesetzten Stimulationsprotokolle beispielsweise eine Analyse der sog. Post-Pausen-Potenzierungen im Myokard erfolgen, wodurch weitere Aussagen über den Ca^{2+} -Haushalt der Kardiomyozyten möglich würden. Auch die Analyse von im Gewebe ablaufenden Inflammationsprozessen böte Ansatzpunkte für weitere Experimente.

Darüber hinausgehend kann jedoch mit der MyoDish-Kulturtechnik auch in größeren Maßstäben gedacht werden, eine Ausweitung auf multizentrische Studien ist gerade aufgrund der limitierten Gewebeförbarkeit in Deutschland ein naheliegender Schritt. Aufgrund der Möglichkeit, humanes Gewebe bis zu 36 h zu transportieren, sind sogar Transporte von entnommenem humanem Myokard per Lufttransport grundsätzlich weltweit denkbar. Dies würde eine deutliche Erweiterung der Möglichkeiten zu mannigfaltigen Untersuchungen bedeuten und potenziell auch die Kultivierung von in Deutschland nicht verfügbarem nicht insuffizientem humanem Myokard erlauben.

Derartige Studien in größeren Maßstäben würden vielfältige Einsatzmöglichkeiten für die hier vorgestellte Kulturtechnik bieten, deren Eignung für verschiedene Forschungsbereiche bereits gezeigt werden konnte: so existieren bereits Ansätze für die Entwicklung von aus Stammzellen gewonnenen Kardiomyozyten mithilfe einer leicht abgewandelten Technik [190,191], auch Experimente mit murinem Myokard [192] wurden durchgeführt. Des Weiteren eignet sich eine derartige biomimetische Kultivierung von Myokard jedoch auch für vielfältige Experimente mit z.B. viraler Transduktion, Versuchen mit dem Einsatz von miRNA [193] oder auch zur Untersuchung von Auswirkungen viraler Infektionen, z.B. des Sars-CoV2-Virus [194] auf Kardiomyozyten. Auch eine Kokultur mit z.B. aus Stammzellen gewonnenen kardialen Progenitorzellen ist möglich [195] und erlaubt beispielsweise Experimente zur Migration solcher Zellen in ein *in vitro* erzeugtes Narbengewebe.

Es bieten sich somit vielfältige Einsatzmöglichkeiten für die hier vorgestellte und im Rahmen dieser Arbeit für die Kultivierung humanen Myokards weiter optimierte biomimetische Kulturtechnik, die gerade durch die zahlreichen Modifikationsmöglichkeiten einen wichtigen Platz unter den vielfältigen Myokardmodellen einnimmt und viele Vorteile anderer experimenteller Ansätze in sich vereinen kann.

Weiterführende Optimierungen sind, wie auch die vorliegende Arbeit zeigen konnte, sowohl hinsichtlich der Bedingungen der Gewebeentnahme als auch verschiedener Kulturbedingungen möglich und erlauben dann den Einsatz dieser Technik in vielen Bereichen der Myokardforschung, die aufgrund der Häufigkeit kardiovaskulärer Erkrankungen auch in Zukunft ein wichtiges Forschungsgebiet darstellen wird.

8. Literaturverzeichnis

1. Aristotle, Ross WD (Ed.). Aristotle: Parva Naturalia [Internet]. Oxford University Press; 1955 [zitiert 15. Januar 2023]. Verfügbar unter: <http://www.oxfordscholarlyeditions.com/view/10.1093/actrade/9780198141082.book.1/actrade-9780198141082-book-1>
2. Aristoteles, Rolfes E. Aristoteles [microform] Kleine naturwissenschaftliche schriften (Parva naturalia) [Internet]. Leipzig, Meiner; 1924 [zitiert 14. September 2022]. 99 S. Verfügbar unter: <http://archive.org/details/aristotelesklein00aris>
3. Cardiovascular diseases (CVDs) [Internet]. 2023 [zitiert 21. Mai 2023]. Verfügbar unter: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
4. Bergeron-Boucher MP, Aburto JM, van Raalte A. Diversification in causes of death in low-mortality countries: emerging patterns and implications. *BMJ Glob Health*. 21. Juli 2020;5(7):e002414.
5. MPIDR - Sterblichkeit in Industrieländern: Todesursachen werden vielfältiger [Internet]. Max Planck Institute for Demographic Research. 2022 [zitiert 14. September 2022]. Verfügbar unter: https://www.demogr.mpg.de/de/news_events_6123/news_pressemitteilungen_4630/presse/sterblichkeit_in_industrielaendern_todesursachen_werden_vielfaeltiger_8104
6. Mayourian J, Sobie EA, Costa KD. An Introduction to Computational Modeling of Cardiac Electrophysiology and Arrhythmogenicity. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2018;1816:17–35.
7. Niederer SA, Lumens J, Trayanova NA. Computational models in cardiology. *Nat Rev Cardiol*. Februar 2019;16(2):100–11.
8. Pitoulis FG, Watson SA, Perbellini F, Terracciano CM. Myocardial slices come to age: an intermediate complexity in vitro cardiac model for translational research. *Cardiovasc Res*. 1. Juni 2020;116(7):1275–87.
9. Hill JA, Olson EN. Cardiac Plasticity. *N Engl J Med*. 27. März 2008;358(13):1370–80.
10. Vunjak Novakovic G, Eschenhagen T, Mummery C. Myocardial Tissue Engineering: In Vitro Models. *Cold Spring Harb Perspect Med*. März 2014;4(3):a014076.
11. Cops J, Haesen S, De Moor B, Mullens W, Hansen D. Current animal models for the study of congestion in heart failure: an overview. *Heart Fail Rev*. 2019;24(3):387–97.
12. Ibrahim M, Kukadia P, Siedlecka U, Cartledge JE, Navaratnarajah M, Tokar S, Van Doorn C, Tsang VT, Gorelik J, Yacoub MH, Terracciano CM. Cardiomyocyte Ca²⁺ handling and structure is regulated by degree and duration of mechanical load variation. *J Cell Mol Med*. Dezember 2012;16(12):2910–8.
13. Ibrahim M, Al Masri A, Navaratnarajah M, Siedlecka U, Soppa GK, Moshkov A, Al-Saud SA, Gorelik J, Yacoub MH, Terracciano CMN. Prolonged mechanical unloading affects cardiomyocyte excitation-contraction coupling, transverse-tubule structure, and the cell surface. *FASEB J*. September 2010;24(9):3321–9.
14. Wright PT, Sanchez-Alonso JL, Lucarelli C, Alvarez-Laviada A, Poulet CE, Bello SO, Faggian G, Terracciano CM, Gorelik J. Partial Mechanical Unloading of the Heart Disrupts L-Type Calcium Channel and Beta-Adrenoceptor Signaling Microdomains. *Front Physiol*. 19. September 2018;9:1302.
15. Houser SR, Margulies KB, Murphy AM, Spinale FG, Francis GS, Prabhu SD, Rockman HA, Kass DA, Molkentin JD, Sussman MA, Koch WJ. Animal Models of Heart Failure. *Circ Res*. 22. Juni 2012;111(1):131–50.
16. van Deel ED, Najafi A, Fontoura D, Valent E, Goebel M, Kardux K, Falcão-Pires I, van der Velden J. In vitro model to study the effects of matrix stiffening on Ca²⁺ handling and myofilament function in isolated adult rat cardiomyocytes. *J Physiol*. 15. Juli 2017;595(14):4597–610.
17. Perry CJ, Lawrence AJ. Hurdles in Basic Science Translation. *Front Pharmacol*. 18. Juli 2017;8:478.
18. Cerra MC, Imbrogno S. Phospholamban and cardiac function: a comparative perspective in vertebrates. *Acta Physiol*. Mai 2012;205(1):9–25.

19. Sauter C, Wolfensberger C. INTERFERON IN HUMAN SERUM AFTER INJECTION OF ENDOTOXIN. *The Lancet*. Oktober 1980;316(8199):852–3.
20. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, Richards DR, McDonald-Smith GP, Gao H, Hennessy L, Finnerty CC, López CM, Honari S, Moore EE, Minei JP, Cuschieri J, Bankey PE, Johnson JL, Sperry J, Nathens AB, Billiar TR, West MA, Jeschke MG, Klein MB, Gamelli RL, Gibran NS, Brownstein BH, Miller-Graziano C, Calvano SE, Mason PH, Cobb JP, Rahme LG, Lowry SF, Maier RV, Moldawer LL, Herndon DN, Davis RW, Xiao W, Tompkins RG, Abouhamze A, Balis UGJ, Camp DG, De AK, Harbrecht BG, Hayden DL, Kaushal A, O’Keefe GE, Kotz KT, Qian W, Schoenfeld DA, Shapiro MB, Silver GM, Smith RD, Storey JD, Tibshirani R, Toner M, Wilhelmy J, Wispelwey B, Wong WH. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26. Februar 2013;110(9):3507–12.
21. Garner MG, Phippard AF, Fletcher PJ, Maclean JM, Duggin GG, Horvath JS, Tiller DJ. Effect of angiotensin II on baroreceptor reflex control of heart rate in conscious baboons. *Hypertension*. 1. Dezember 1987;10(6):628–34.
22. Levine HJ. Rest heart rate and life expectancy. *J Am Coll Cardiol*. Oktober 1997;30(4):1104–6.
23. Endoh M. Force–frequency relationship in intact mammalian ventricular myocardium: physiological and pathophysiological relevance. *Eur J Pharmacol*. 1. Oktober 2004;500(1):73–86.
24. Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 1. Juni 2011;50(6):940–50.
25. Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Arch Für Gesamte Physiol Menschen Tiere*. 1. August 1895;61(6):291–332.
26. Motayagheni N. Modified Langendorff technique for mouse heart cannulation: Improved heart quality and decreased risk of ischemia. *MethodsX*. 14. November 2017;4:508–12.
27. Olejnickova V, Novakova M, Provaznik I. Isolated heart models: cardiovascular system studies and technological advances. *Med Biol Eng Comput*. 1. Juli 2015;53(7):669–78.
28. Schechter MA, Southerland KW, Feger BJ, Linder D, Ali AA, Njoroge L, Milano CA, Bowles DE. An Isolated Working Heart System for Large Animal Models. *J Vis Exp JoVE*. 11. Juni 2014;(88):51671.
29. Bear LR, Cluitmans M, Abell E, Rogier J, Labrousse L, Cheng LK, LeGrice I, Lever N, Sands GB, Smaill B, Haïssaguerre M, Bernus O, Coronel R, Dubois R. Electrocardiographic Imaging of Repolarization Abnormalities. *J Am Heart Assoc*. 4. Mai 2021;10(9):e020153.
30. de Baker JMT, Coronel R, Tasseront S, Wilde AAM, Opthof T, Janse MJ, van Capelle FJL, Becker AE, Jambroes G. Ventricular tachyrdia in the infarcted, Langendorff-perfused human heart: Role of the arrangement of surviving cardiac fibers. *J Am Coll Cardiol*. 1. Juni 1990;15(7):1594–607.
31. Kadipasaoglu KA, Bennink GW, Conger JL, Birovljev S, Sartori M, Clubb FJ, Noda H, Ferguson JJ, Frazier OH. An ex vivo model for the reperfusion of explanted human hearts. *Tex Heart Inst J*. 1993;20(1):33–9.
32. Chinchoy E, Soule CL, Houlton AJ, Gallagher WJ, Hjelle MA, Laske TG, Morissette J, Iaizzo PA. Isolated four-chamber working swine heart model. *Ann Thorac Surg*. 1. November 2000;70(5):1607–14.
33. Neely, Liebermeister H, Battersby E, Morgan H. Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart. *Am J Physiol-Leg Content*. April 1967;212(4):804–14.
34. Chen X, Cordes JS, Bradley JA, Sun Z, Zhou J. Use of arterially perfused rabbit ventricular wedge in predicting arrhythmogenic potentials of drugs. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1. November 2006;54(3):261–72.
35. Di Diego JM, Sicouri S, Myles RC, Burton FL, Smith GL, Antzelevitch C. Optical and Electrical Recordings from Isolated Coronary-Perfused Ventricular Wedge Preparations. *J Mol Cell Cardiol*. Januar 2013;54:53–64.
36. Lawrence CL, Pollard CE, Hammond TG, Valentin JP. Nonclinical proarrhythmia models: Predicting Torsades de Pointes. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1. Juli 2005;52(1):46–59.
37. Yan GX, Antzelevitch C. Cellular Basis for the Electrocardiographic J Wave. *Circulation*. 15. Januar 1996;93(2):372–9.

38. Janssen PML, Lehnart SE, Prestle J, Lynker JC, Salfeld P, Just H, Hasenfuss G. The trabecula culture system: a novel technique to study contractile parameters over a multiday time period. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. Mai 1998;274(5):H1481–8.
39. Guterl KA, Haggart CR, Janssen PM, Holmes JW. Isometric contraction induces rapid myocyte remodeling in cultured rat right ventricular papillary muscles. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. Dezember 2007;293(6):H3707–12.
40. Pieske B, Kretschmann B, Meyer M, Holubarsch C, Weirich J, Posival H, Minami K, Just H, Hasenfuss G. Alterations in Intracellular Calcium Handling Associated With the Inverse Force-Frequency Relation in Human Dilated Cardiomyopathy. *Circulation*. September 1995;92(5):1169–78.
41. De Tombe PP, Little WC. Inotropic effects of ejection are myocardial properties. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. März 1994;266(3):H1202–13.
42. Janssen PML, Lehnart SE, Prestle J, Hasenfuss G. Preservation of Contractile Characteristics of Human Myocardium in Multi-day Cell Culture. *J Mol Cell Cardiol*. 1. August 1999;31(8):1419–27.
43. Barclay CJ. Modelling diffusive O₂ supply to isolated preparations of mammalian skeletal and cardiac muscle. *J Muscle Res Cell Motil*. 1. November 2005;26(4):225–35.
44. Camelliti P, Al-Saud SA, Smolenski RT, Al-Ayoubi S, Bussek A, Wettwer E, Banner NR, Bowles CT, Yacoub MH, Terracciano CM. Adult human heart slices are a multicellular system suitable for electrophysiological and pharmacological studies. *J Mol Cell Cardiol*. September 2011;51(3):390–8.
45. Mannhardt I, Eder A, Dumotier B, Prondzynski M, Krämer E, Traebert M, Söhren KD, Flenner F, Stathopoulou K, Lemoine MD, Carrier L, Christ T, Eschenhagen T, Hansen A. Blinded Contractility Analysis in hiPSC-Cardiomyocytes in Engineered Heart Tissue Format: Comparison With Human Atrial Trabeculae. *Toxicol Sci*. Juli 2017;158(1):164–75.
46. Helmes M, Najafi A, Palmer BM, Breel E, Rijnveld N, Iannuzzi D, van der Velden J. Mimicking the cardiac cycle in intact cardiomyocytes using diastolic and systolic force clamps; measuring power output. *Cardiovasc Res*. 1. Juli 2016;111(1):66–73.
47. Ferrara N, O’Gara P, Wynne DG, Brown LA, del Monte F, Poole-Wilson PA, Harding SE. Decreased contractile responses to isoproterenol in isolated cardiac myocytes from aging guinea-pigs. *J Mol Cell Cardiol*. Mai 1995;27(5):1141–50.
48. Zhang Y, Li TS, Lee ST, Wawrowsky KA, Cheng K, Galang G, Malliaras K, Abraham MR, Wang C, Marbán E. Dedifferentiation and Proliferation of Mammalian Cardiomyocytes. *PLoS ONE*. 3. September 2010;5(9):e12559.
49. Mitcheson JS, Hancox JC, Levi AJ. Cultured adult cardiac myocytes: Future applications, culture methods, morphological and electrophysiological properties. *Cardiovasc Res*. 1. August 1998;39(2):280–300.
50. Watson SA, Terracciano CM, Perbellini F. Myocardial Slices: an Intermediate Complexity Platform for Translational Cardiovascular Research. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2019;33(2):239–44.
51. Watson SA, Scigliano M, Bardi I, Ascione R, Terracciano CM, Perbellini F. Preparation of viable adult ventricular myocardial slices from large and small mammals. *Nat Protoc*. Dezember 2017;12(12):2623–39.
52. Louch WE, Sheehan KA, Wolska BM. Methods in Cardiomyocyte Isolation, Culture, and Gene Transfer. *J Mol Cell Cardiol*. September 2011;51(3):288–98.
53. Schneider-Warme F, Johnston CM, Kohl P. Organotypic myocardial slices as model system to study heterocellular interactions. *Cardiovasc Res*. 1. Januar 2018;114(1):3–6.
54. Hansen A, Eder A, Bönstrup M, Flato M, Mewe M, Schaaf S, Aksehrioglu B, Schwörer A, Uebeler J, Eschenhagen T. Development of a Drug Screening Platform Based on Engineered Heart Tissue. *Circ Res*. 9. Juli 2010;107(1):35–44.
55. Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, Scholz H, Wattchow J, Weil J, Zimmermann W, Dohmen HH, Schäfer H, Bishopric N, Wakatsuki T, Elson EL. Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *FASEB J*. 1997;11(8):683–94.

56. Stein JM, Mummery CL, Bellin M. Engineered models of the human heart: Directions and challenges. *Stem Cell Rep.* 18. Dezember 2020;16(9):2049–57.
57. Matsa E, Burridge PW, Wu JC. Human Stem Cells for Modeling Heart Disease and for Drug Discovery. *Sci Transl Med.* 4. Juni 2014;6(239):239ps6.
58. Tzatzalos E, Abilez OJ, Shukla P, Wu JC. Engineered heart tissues and induced pluripotent stem cells: macro- and microstructures for disease modeling, drug screening, and translational studies. *Adv Drug Deliv Rev.* 15. Januar 2016;96:234–44.
59. Protze SI, Lee JH, Keller GM. Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiovascular Cells: From Developmental Biology to Therapeutic Applications. *Cell Stem Cell.* 5. September 2019;25(3):311–27.
60. Zimmermann WH, Schneiderbanger K, Schubert P, Didié M, Münzel F, Heubach J f., Kostin S, Neuhuber W l., Eschenhagen T. Tissue Engineering of a Differentiated Cardiac Muscle Construct. *Circ Res.* 8. Februar 2002;90(2):223–30.
61. Kawaguchi N, Hatta K, Nakanishi T. 3D-Culture System for Heart Regeneration and Cardiac Medicine. *BioMed Res Int.* 2013;2013:895967.
62. Zuppinger C. 3D culture for cardiac cells. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 1. Juli 2016;1863(7, Part B):1873–81.
63. Hofbauer P, Jahnel SM, Mendjan S. *In vitro* models of the human heart. *Development.* 15. August 2021;148(16):dev199672.
64. Inbody SC, Sinquefield BE, Lewis JP, Horton RE. Biomimetic microsystems for cardiovascular studies. *Am J Physiol-Cell Physiol.* Mai 2021;320(5):C850–72.
65. Dhahri W, Romagnuolo R, Laflamme MA. Training heart tissue to mature. *Nat Biomed Eng.* Juni 2018;2(6):351–2.
66. Guth BD, Engwall M, Eldridge S, Foley CM, Guo L, Gintant G, Koerner J, Parish ST, Pierson JB, Ribeiro AJS, Zabka T, Chaudhary KW, Kanda Y, Berridge B. Considerations for an In Vitro, Cell-Based Testing Platform for Detection of Adverse Drug-Induced Inotropic Effects in Early Drug Development. Part 1: General Considerations for Development of Novel Testing Platforms. *Front Pharmacol.* 9. August 2019;10:884.
67. Daviaud N, Garbayo E, Schiller PC, Perez-Pinzon M, Montero-Menei CN. Organotypic cultures as tools for optimizing central nervous system cell therapies. *Exp Neurol.* 1. Oktober 2013;248:429–40.
68. Leclerc E, Baudoin R, Corlu A, Griscom L, Luc Duval J, Legallais C. Selective control of liver and kidney cells migration during organotypic cocultures inside fibronectin-coated rectangular silicone microchannels. *Biomaterials.* 1. April 2007;28(10):1820–9.
69. Neri B, Cini-Neri G, D'Alterio M. Effect of anthracyclines and mitoxantrone on oxygen uptake and ATP intracellular concentration in rat heart slices. *Biochem Biophys Res Commun.* 28. Dezember 1984;125(3):954–60.
70. Parrish AR, Shipp NG, Spall RD, Dorr RT, Krumdieck CL, Gandolfi AJ, Brendel K. Organ Culture of Rat Myocardial Slices: An Alternative in Vitro Tool in Organ-Specific Toxicology. *Toxicol Methods.* 1. Januar 1992;2(2):101–11.
71. Hamers J, Sen P, Merkus D, Seidel T, Lu K, Dendorfer A. Preparation of Human Myocardial Tissue for Long-Term Cultivation. *J Vis Exp JoVE.* 2. Juni 2022;(184).
72. Wen Q, Gandhi K, Capel RA, Hao G, O'Shea C, Neagu G, Pearcey S, Pavlovic D, Terrar DA, Wu J, Faggian G, Camelliti P, Lei M. Transverse cardiac slicing and optical imaging for analysis of transmural gradients in membrane potential and Ca²⁺ transients in murine heart. *J Physiol.* 1. September 2018;596(17):3951–65.
73. Brandenburger M, Wenzel J, Bogdan R, Richardt D, Nguemo F, Reppel M, Hescheler J, Terlau H, Dendorfer A. Organotypic slice culture from human adult ventricular myocardium. *Cardiovasc Res.* 1. Januar 2012;93(1):50–9.
74. Fischer C, Milting H, Fein E, Reiser E, Lu K, Seidel T, Schinner C, Schwarzmayr T, Schramm R, Tomasi R, Husse B, Cao-Ehlker X, Pohl U, Dendorfer A. Long-term functional and structural preservation of precision-cut human myocardium under continuous electromechanical stimulation in vitro. *Nat Commun.* 10. Januar 2019;10(1):117.

75. Ou Q, Jacobson Z, Abouleisa RRE, Tang XL, Hindi SM, Kumar A, Ivey KN, Giridharan G, El-Baz A, Brittan K, Rood B, Lin YH, Watson SA, Perbellini F, McKinsey TA, Hill BG, Jones SP, Terracciano CM, Bolli R, Mohamed TMA. Physiological Biomimetic Culture System for Pig and Human Heart Slices. *Circ Res.* 30. 2019;125(6):628–42.
76. Qiao Y, Dong Q, Li B, Obaid S, Miccile C, Yin RT, Talapatra T, Lin Z, Li S, Li Z, Efimov IR. Multiparametric slice culture platform for the investigation of human cardiac tissue physiology. *Prog Biophys Mol Biol.* Juli 2019;144:139–50.
77. Watson SA, Duff J, Bardi I, Zabielska M, Atanur SS, Jabbour RJ, Simon A, Tomas A, Smolenski RT, Harding SE, Perbellini F, Terracciano CM. Biomimetic electromechanical stimulation to maintain adult myocardial slices in vitro. *Nat Commun.* 15. Mai 2019;10:2168.
78. Meki MH, Miller JM, Mohamed TMA. Heart Slices to Model Cardiac Physiology. *Front Pharmacol.* 4. Februar 2021;12:617922.
79. Haynes P, Nava KE, Lawson BA, Chung CS, Mitov MI, Campbell SG, Stromberg AJ, Sadayappan S, Bonnell MR, Hoopes CW, Campbell KS. Transmural heterogeneity of cellular level power output is reduced in human heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* Juli 2014;72:1–8.
80. Kang C, Qiao Y, Li G, Baeckle K, Camelliti P, Rentschler S, Efimov IR. Human Organotypic Cultured Cardiac Slices: New Platform For High Throughput Preclinical Human Trials. *Sci Rep.* 30. Juni 2016;6:28798.
81. de Boer TP, Camelliti P, Ravens U, Kohl P. Myocardial tissue slices: organotypic pseudo-2D models for cardiac research & development. *Future Cardiol.* September 2009;5(5):425–30.
82. Wang K, Terrar D, Gavaghan DJ, Mu-u-min R, Kohl P, Bollensdorff C. Living cardiac tissue slices: An organotypic pseudo two-dimensional model for cardiac biophysics research. *Prog Biophys Mol Biol.* 1. August 2014;115(2):314–27.
83. Garny A, Noble D, Kohl P. Dimensionality in cardiac modelling. *Prog Biophys Mol Biol.* 1. Januar 2005;87(1):47–66.
84. Hannes T, Halbach M, Nazzari R, Frenzel L, Saric T, Khalil M, Hescheler J, Brockmeier K, Pillekamp F. Biological pacemakers: characterization in an in vitro coculture model. *J Electrocardiol.* 1. November 2008;41(6):562–6.
85. Perbellini F, Watson SA, Scigliano M, Alayoubi S, Tkach S, Bardi I, Quafe N, Kane C, Dufton NP, Simon A, Sikkil MB, Faggian G, Randi AM, Gorelik J, Harding SE, Terracciano CM. Investigation of cardiac fibroblasts using myocardial slices. *Cardiovasc Res.* 1. Januar 2018;114(1):77–89.
86. Perbellini F, Watson SA, Bardi I, Terracciano CM. Heterocellularity and Cellular Cross-Talk in the Cardiovascular System. *Front Cardiovasc Med.* 1. November 2018;5:143.
87. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. 6., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2019. Online-Ressource (752 Seiten).
88. Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S, Klinke R, Gay R, Rothenburger A, Herausgeber. Physiologie. 9., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag; 2019. 1028 S.
89. Eisner DA, Caldwell JL, Kistamas K, Trafford AW. Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circ Res.* 7. Juli 2017;121(2):181–95.
90. Bers DM. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature.* Januar 2002;415(6868):198–205.
91. Lymperopoulos A, Rengo G, Koch WJ. The Adrenergic Nervous System in Heart Failure: Pathophysiology and Therapy. *Circ Res* [Internet]. 30. August 2013 [zitiert 11. Februar 2021];113(6). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3843360/>
92. Yang J, Liu Y, Fan X, Li Z, Cheng Y. A pathway and network review on beta-adrenoceptor signaling and beta blockers in cardiac remodeling. *Heart Fail Rev.* 1. November 2014;19(6):799–814.
93. Papa A, Kushner J, Marx SO. Adrenergic Regulation of Calcium Channels in the Heart. *Annu Rev Physiol.* 10. Februar 2022;84:285–306.
94. Sutherland EW. Studies on the Mechanism of Hormone Action. *Science.* 4. August 1972;177(4047):401–8.
95. Schümann HJ. What role do α - and β -adrenoceptors play in the regulation of the heart? *Eur Heart J.* 1. Januar 1983;4(suppl_A):55–60.

96. del Villar SG, Voelker TL, Westhoff M, Reddy GR, Spooner HC, Navedo MF, Dickson EJ, Dixon RE. β -Adrenergic control of sarcolemmal CaV1.2 abundance by small GTPase Rab proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16. Februar 2021;118(7):e2017937118.
97. Kranias EG, Hajjar RJ. Modulation of Cardiac Contractility by the Phospholamban/SERCA2a Regulatome. *Circ Res*. 8. Juni 2012;110(12):1646–60.
98. Mattiazzi A, Mundiña-Weilenmann C, Guoxiang C, Vittone L, Kranias E. Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. *Cardiovasc Res*. 1. Dezember 2005;68(3):366–75.
99. Vittone L, Mundiña-Weilenmann C, Mattiazzi A. Phospholamban phosphorylation by CaMKII under pathophysiological conditions. *Front Biosci J Virtual Libr*. 1. Mai 2008;13:5988–6005.
100. Vittone L, Mundiña-Weilenmann C, Said M, Mattiazzi A. Mechanisms Involved in the Acidosis Enhancement of the Isoproterenol-induced Phosphorylation of Phospholamban in the Intact Heart. *J Biol Chem*. 17. April 1998;273(16):9804–11.
101. Stammers AN, Susser SE, Hamm NC, Hlynsky MW, Kimber DE, Kehler DS, Duhamel TA. The regulation of sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPases (SERCA). *Can J Physiol Pharmacol*. Oktober 2015;93(10):843–54.
102. Zhao W, Uehara Y, Chu G, Song Q, Qian J, Young K, Kranias EG. Threonine-17 phosphorylation of phospholamban: a key determinant of frequency-dependent increase of cardiac contractility. *J Mol Cell Cardiol*. 1. August 2004;37(2):607–12.
103. de Tombe PP, Mateja RD, Kittipong-Tachampa, Mou YA, Farman GP, Irving TC. Myofilament Length Dependent Activation. *J Mol Cell Cardiol*. Mai 2010;48(5):851–8.
104. Janssen PML, Periasamy M. Determinants of Frequency Dependent Contraction and Relaxation of Mammalian Myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. November 2007;43(5):523–31.
105. Janssen PML. Myocardial contraction-relaxation coupling. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 17. September 2010;299(6):H1741–9.
106. Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische Herzinsuffizienz – Langfassung, 3. Auflage. Version 3 [Internet]. 2019 [zitiert 21. Mai 2023]. Verfügbar unter: <https://www.leitlinien.de/themen/herzinsuffizienz>
107. Hilfiker-Kleiner D, Landmesser U, Drexler H. Molecular Mechanisms in Heart Failure: Focus on Cardiac Hypertrophy, Inflammation, Angiogenesis, and Apoptosis. *J Am Coll Cardiol*. 7. November 2006;48(9, Supplement):A56–66.
108. Piano MR, Bondmass M, Schwertz DW. The molecular and cellular pathophysiology of heart failure. *Heart Lung*. Januar 1998;27(1):3–19.
109. Schwinger RHG. Pathophysiology of heart failure. *Cardiovasc Diagn Ther*. Februar 2021;11(1):263–76.
110. Wang Y, Hill JA. Electrophysiological Remodeling in Heart Failure. 2011;31.
111. Hegyi B, Bossuyt J, Griffiths LG, Shimkunas R, Coulibaly Z, Jian Z, Grimsrud KN, Sondergaard CS, Ginsburg KS, Chiamvimonvat N, Belardinelli L, Varró A, Papp JG, Pollesello P, Levijoki J, Izu LT, Boyd WD, Bányász T, Bers DM, Chen-Izu Y. Complex electrophysiological remodeling in postinfarction ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci*. 27. März 2018;115(13):E3036–44.
112. Abu-Khousa M, Fiegle DJ, Sommer ST, Minabari G, Milting H, Heim C, Weyand M, Tomasi R, Dendorfer A, Volk T, Seidel T. The Degree of t-System Remodeling Predicts Negative Force-Frequency Relationship and Prolonged Relaxation Time in Failing Human Myocardium. *Front Physiol*. 2020;11:182.
113. Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Just H, Drexler H. Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res*. September 1994;75(3):434–42.
114. Guaricci AI, Bulzis G, Pontone G, Scicchitano P, Carbonara R, Rabbat M, De Santis D, Ciccone MM. Current interpretation of myocardial stunning. *Trends Cardiovasc Med*. Mai 2018;28(4):263–71.

115. Heusch G. Myocardial stunning and hibernation revisited. *Nat Rev Cardiol.* Juli 2021;18(7):522–36.
116. Bolli R, Marbán E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev.* April 1999;79(2):609–34.
117. Said M, Vittone L, Mundiña-Weilenmann C, Ferrero P, Kranias EG, Mattiazzi A. Role of dual-site phospholamban phosphorylation in the stunned heart: insights from phospholamban site-specific mutants. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol.* 1. September 2003;285(3):H1198–205.
118. Engelhardt S, Grimmer Y, Fan GH, Lohse MJ. Constitutive Activity of the Human β 1-Adrenergic Receptor in β 1-Receptor Transgenic Mice. *Mol Pharmacol.* 1. Oktober 2001;60(4):712–7.
119. Maack C, Tyroller S, Schnabel P, Cremers B, Dabew E, Südkamp M, Böhm M. Characterization of β 1-selectivity, adrenoceptor-Gs-protein interaction and inverse agonism of nebivolol in human myocardium. *Br J Pharmacol.* April 2001;132(8):1817–26.
120. Maack C, Cremers B, Flesch M, Höper A, Südkamp M, Böhm M. Different intrinsic activities of bucindolol, carvedilol and metoprolol in human failing myocardium. *Br J Pharmacol.* Juli 2000;130(5):1131–9.
121. Taira CA, Monczor F, Höcht C. Measurement of Inverse Agonism in β -Adrenoceptors. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 2010 [zitiert 2. Juni 2023]. S. 37–60. Verfügbar unter: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123812964000038>
122. Ishide T. Denopamine, a Selective 1-Receptor Agonist and a New Coronary Vasodilator. *Curr Med Res Opin* [Internet]. 26. August 2008 [zitiert 21. August 2023]; Verfügbar unter: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1185/030079902125001119>
123. Baker JG. The selectivity of β -adrenoceptor agonists at human β 1-, β 2- and β 3-adrenoceptors. *Br J Pharmacol.* 2010;160(5):1048–61.
124. Suzuki T, Nantel F, Bonin H, Valiquette M, Bouvier M. Cellular characterization of the pharmacological selectivity and tachyphylactic properties of denopamine for the human beta adrenergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1. November 1993;267(2):785–90.
125. Eurotransplant - Statistics [Internet]. 2022 [zitiert 10. Juli 2022]. Verfügbar unter: https://statistics.eurotransplant.org/index.php?search_type=&search_organ=heart&search_region=All+ET&search_period=by+year&search_characteristic=&search_text=
126. Grafiken 2014 Herz.pdf [Internet]. 2022 [zitiert 10. Juli 2022]. Verfügbar unter: <https://dso.de/BerichteTransplantationszentren/Grafiken%202014%20Herz.pdf>
127. Grafiken D 2020 Herz.pdf [Internet]. 2022 [zitiert 10. Juli 2022]. Verfügbar unter: <https://dso.de/BerichteTransplantationszentren/Grafiken%20D%202020%20Herz.pdf>
128. Waschke J. Anatomie. 2. Auflage. München, Deutschland: Urban-&-Fischer-Verlag (München); 2019. 1 Online-Ressource. (Sobotta).
129. Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Pieske B, Meyer M, Drexler H, Just H. Calcium cycling proteins and force-frequency relationship in heart failure. *Basic Res Cardiol.* 1. Januar 1996;91(1):17–22.
130. Maier LS, Schwan C, Schillinger W, Minami K, Schütt U, Pieske B. Gingerol, isoproterenol and ouabain normalize impaired post-rest behavior but not force–frequency relation in failing human myocardium. *Cardiovasc Res.* 1. März 2000;45(4):913–24.
131. Pieske B, Maier LS, Schmidt-Schweda S. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} load in human heart failure. *Basic Res Cardiol.* 1. Mai 2002;97(1):163–71.
132. Pieske B, Sütterlin M, Schmidt-Schweda S, Minami K, Meyer M, Olschewski M, Holubarsch C, Just H, Hasenfuss G. Diminished post-rest potentiation of contractile force in human dilated cardiomyopathy. Functional evidence for alterations in intracellular Ca^{2+} handling. *J Clin Invest.* 1. August 1996;98(3):764–76.
133. Pieske Burkert, Maier Lars S., Bers Donald M., Hasenfuss Gerd. Ca^{2+} Handling and Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Content in Isolated Failing and Nonfailing Human Myocardium. *Circ Res.* 9. Juli 1999;85(1):38–46.
134. Mordwinkin NM, Burridge PW, Wu JC. A Review of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes for High-Throughput Drug Discovery, Cardiotoxicity Screening and Publication Standards. *J Cardiovasc Transl Res.* Februar 2013;6(1):22–30.

135. Mulieri LA, Hasenfuss G, Ittleman F, Blanchard EM, Alpert NR. Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime. *Circ Res*. November 1989;65(5):1441–9.
136. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. September 2000;407(6801):249–57.
137. Bavendiek U, Brixius K, Münch G, Zobel C, Müller-Ehmsen J, Schwinger RHG. Effect of inotropic interventions on the force-frequency relation in the human heart. *Basic Res Cardiol*. 1. Oktober 1998;93(1):s076–85.
138. Jacob SW, de la Torre JC. Pharmacology of dimethyl sulfoxide in cardiac and CNS damage. *Pharmacol Rep PR*. April 2009;61(2):225–35.
139. Hyun SW, Kim BR, Hyun SA, Seo JW. The assessment of electrophysiological activity in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes exposed to dimethyl sulfoxide and ethanol by manual patch clamp and multi-electrode array system. *J Pharmacol Toxicol Methods*. September 2017;87:93–8.
140. Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest*. Juli 1975;56(1):56–64.
141. Simmons CS, Petzold BC, Pruitt BL. Microsystems for biomimetic stimulation of cardiac cells. *Lab Chip*. 14. August 2012;12(18):3235–48.
142. Klein I, Ojamaa K. Thyroid Hormone and the Cardiovascular System. *N Engl J Med*. 15. Februar 2001;344(7):501–9.
143. Oakley RH, Cidlowski JA. Glucocorticoid Signaling in the Heart: A Cardiomyocyte Perspective. *J Steroid Biochem Mol Biol*. September 2015;153:27–34.
144. Bianchi V, Mezzani A. Androgens and cardiac diseases. *Monaldi Arch Chest Dis [Internet]*. 30. Dezember 2013 [zitiert 11. Juli 2022];80(4). Verfügbar unter: <https://monaldi-archives.org/index.php/macd/article/view/18>
145. Knowlton AA, Lee AR. Estrogen and the Cardiovascular System. *Pharmacol Ther*. Juli 2012;135(1):54–70.
146. van der Heyden MAG, Vos MA. Sex hormones and jumping heart beats. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2019;30(6):950–1.
147. Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CDL, Jaswal JS, Stanley WC. Myocardial Fatty Acid Metabolism in Health and Disease. *Physiol Rev*. Januar 2010;90(1):207–58.
148. Abdul Kadir A, Clarke K, Evans RD. Cardiac ketone body metabolism. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 1. Juni 2020;1866(6):165739.
149. Bing RJ, Siegel A, Ungar I, Gilbert M. Metabolism of the human heart: II. Studies on fat, ketone and amino acid metabolism. *Am J Med*. 1. April 1954;16(4):504–15.
150. Aubert G, Martin OJ, Horton JL, Lai L, Vega RB, Leone TC, Koves T, Gardell SJ, Krüger M, Hoppel CL, Lewandowski ED, Crawford PA, Muoio DM, Kelly DP. The Failing Heart Relies on Ketone Bodies as a Fuel. *Circulation*. 23. Februar 2016;133(8):698–705.
151. Chiariello M, Perrone-Filardi P, Ambrosio G. Hibernating and stunned myocardium. *Cardioscience*. Juni 1993;4(2):63–8.
152. Kim GH, Uriel N, Burkhoff D. Reverse remodelling and myocardial recovery in heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 1. Februar 2018;15(2):83–97.
153. Kühn P. EKG lesen - verstehen - beherrschen. 1st ed. Wien: facultas; 2016. Online-Ressource (260 Seiten).
154. Poláková E, Illaste A, Niggli E, Sobie EA. Maximal acceleration of Ca²⁺ release refractoriness by β -adrenergic stimulation requires dual activation of kinases PKA and CaMKII in mouse ventricular myocytes. *J Physiol*. 15. März 2015;593(Pt 6):1495–507.
155. Akar FG, Rosenbaum DS. Transmural Electrophysiological Heterogeneities Underlying Arrhythmogenesis in Heart Failure. *Circ Res*. 3. Oktober 2003;93(7):638–45.
156. Hoang JD, Yamakawa K, Rajendran P, Chan CA, Yagishita D, Nakamura K, Lux RL, Vaseghi M. Pro-arrhythmic Effects of Sympathetic Activation Are Mitigated by Vagal Nerve Stimulation in Infarcted Hearts. *JACC Clin Electrophysiol*. April 2022;8(4):513–25.

157. Levy MN, Wiseman MN. Electrophysiologic Mechanisms for Ventricular Arrhythmias in Left Ventricular Dysfunction: Electrolytes, Catecholamines and Drugs. *J Clin Pharmacol.* 1991;31(11):1053–60.
158. Toda I, Kawahara T, Murakawa Y, Nozaki A, Kawakubo K, Inoue H, Sugimoto T. Electrophysiological study of young patients with exercise related paroxysms of palpitation: role of atropine and isoprenaline for initiation of supraventricular tachycardia. *Heart.* 1. März 1989;61(3):268–73.
159. Dhein S, Salameh A. Remodeling of Cardiac Gap Junctional Cell–Cell Coupling. *Cells.* 14. September 2021;10(9):2422.
160. de Jong S, van Veen TAB, van Rijen HVM, de Bakker JMT. Fibrosis and Cardiac Arrhythmias. *J Cardiovasc Pharmacol.* Juni 2011;57(6):630–8.
161. Verheule S, Schotten U. Electrophysiological Consequences of Cardiac Fibrosis. *Cells.* 18. November 2021;10(11):3220.
162. Branco AF, Moreira AC, Cunha-Oliveira T, Couto R, Sardao VA, Rizvanov AA, Oliveira AP and PJ. β -Adrenergic Over-Stimulation and Cardio-Myocyte Apoptosis: Two Receptors, One Organelle, Two Fates? [Internet]. *Current Drug Targets.* 2014 [zitiert 2. Januar 2018]. Verfügbar unter: <http://www.eurekaselect.com.emedien.uni-muenchen.de/124321/article>
163. Ahmed HM, Al-Mallah MH, Keteyian SJ, Brawner CA, Ehrman JK, Zhao D, Guallar E, Blaha MJ, Michos ED. Sex-Specific Maximum Predicted Heart Rate and Its Prognosis for Mortality and Myocardial Infarction. *Med Sci Sports Exerc.* August 2017;49(8):1704.
164. Helleryd E, Rawshani A, Rawshani A, Hjærtstam N, Myredal A, Skoglund K. Association between exercise load, resting heart rate, and maximum heart rate and risk of future ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI). *Open Heart.* 17. Juli 2023;10(2):e002307.
165. Bowditch, Henry P. Über die Eigenthümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens zeigen. *Archiv für Physiologie.* 1871;139–76.
166. Mulieri, L A, Hasenfuss G, Leavitt B, Allen P D, Alpert N R. Altered myocardial force-frequency relation in human heart failure. *Circulation.* 1. Mai 1992;85(5):1743–50.
167. Kass DA. Force-frequency relation in patients with left ventricular hypertrophy and failure. *Basic Res Cardiol.* 1. Oktober 1998;93(1):s108–16.
168. Periasamy M, Bhupathy P, Babu GJ. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. *Cardiovasc Res.* 15. Januar 2008;77(2):265–73.
169. Zhihao L, Jingyu N, Lan L, Michael S, Rui G, Xiyun B, Xiaozhi L, Guanwei F. SERCA2a: a key protein in the Ca^{2+} cycle of the heart failure. *Heart Fail Rev.* 1. Mai 2020;25(3):523–35.
170. Kawase Y, Ly HQ, Prunier F, Lebeche D, Shi Y, Jin H, Hadri L, Yoneyama R, Hoshino K, Takewa Y, Sakata S, Peluso R, Zsebo K, Gwathmey JK, Tardif JC, Tanguay JF, Hajjar RJ. Reversal of cardiac dysfunction after long-term expression of SERCA2a by gene transfer in a pre-clinical model of heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 18. März 2008;51(11):1112–9.
171. Samuel TJ, Rosenberry RP, Lee S, Pan Z. Correcting Calcium Dysregulation in Chronic Heart Failure Using SERCA2a Gene Therapy. *Int J Mol Sci.* 5. April 2018;19(4):E1086.
172. Roczkowsky A, Chan BYH, Lee TYT, Mahmud Z, Hartley B, Julien O, Armanious G, Young HS, Schulz R. Myocardial MMP-2 contributes to SERCA2a proteolysis during cardiac ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 1. April 2020;116(5):1021–31.
173. Singh RB, Chohan PK, Dhalla NS, Netticadan T. The sarcoplasmic reticulum proteins are targets for calpain action in the ischemic–reperfused heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1. Juli 2004;37(1):101–10.
174. Ambrosio G, Betocchi S, Pace L, Losi MA, Perrone-Filardi P, Soricelli A, Piscione F, Taube J, Squame F, Salvatore M, Weiss JL, Chiariello M. Prolonged impairment of regional contractile function after resolution of exercise-induced angina. Evidence of myocardial stunning in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 15. November 1996;94(10):2455–64.
175. Sasaki Y, Yabana H, Nagao T, Takeyama S. Effect of denopamine on the phosphorylation of cardiac muscle proteins in the perfused guinea-pig heart. *Biochem Pharmacol.* Februar 1988;37(4):679–86.
176. Colyer J. Phosphorylation States of Phospholamban. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;853(1):79–91.

177. Lindemann JP, Watanabe AM. Phosphorylation of phospholamban in intact myocardium. Role of Ca²⁺-calmodulin-dependent mechanisms. *J Biol Chem.* 4. Oktober 1985;260(7):4516–25.
178. Wegener AD, Simmerman HK, Lindemann JP, Jones LR. Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation. *J Biol Chem.* 7. Mai 1989;264(19):11468–74.
179. Wittmann T, Lohse MJ, Schmitt JP. Phospholamban pentamers attenuate PKA-dependent phosphorylation of monomers. *J Mol Cell Cardiol.* 1. März 2015;80:90–7.
180. Bompotis GC, Deftereos S, Angelidis C, Choidis E, Panagopoulou V, Kaoukis A, Vassilikos VP, Cleman MW, Giannopoulos G. Altered Calcium Handling in Reperfusion Injury. *Med Chem.* 2016;12(2):114–30.
181. Bilezikjian LM, Kranias EG, Potter JD, Schwartz A. Studies on phosphorylation of canine cardiac sarcoplasmic reticulum by calmodulin-dependent protein kinase. *Circ Res.* Dezember 1981;49(6):1356–62.
182. Luo W, Chu G, Sato Y, Zhou Z, Kadambi VJ, Kranias EG. Transgenic approaches to define the functional role of dual site phospholamban phosphorylation. *J Biol Chem.* 20. Februar 1998;273(8):4734–9.
183. DeSantiago J, Maier LS, Bers DM. Frequency-dependent Acceleration of Relaxation in the Heart Depends on CaMKII, but not Phospholamban. *J Mol Cell Cardiol.* 1. August 2002;34(8):975–84.
184. Valverde CA, Mundiña-Weilenmann C, Said M, Ferrero P, Vittone L, Salas M, Palomeque J, Petroff MV, Mattiazzi A. Frequency-dependent acceleration of relaxation in mammalian heart: a property not relying on phospholamban and SERCA2a phosphorylation. *J Physiol.* 1. Februar 2005;562(Pt 3):801–13.
185. Said M, Mundiña-Weilenmann C, Vittone L, Mattiazzi A. The relative relevance of phosphorylation of the Thr(17) residue of phospholamban is different at different levels of beta-adrenergic stimulation. *Pflugers Arch.* September 2002;444(6):801–9.
186. Edes I, Kranias EG. Phospholamban and troponin I are substrates for protein kinase C in vitro but not in intact beating guinea pig hearts. *Circ Res.* August 1990;67(2):394–400.
187. Szabó CÁ, Akopian M, González DA, de la Garza MA, Carless MA. Cardiac Biomarkers Associated with Epilepsy in a Captive Baboon Pedigree. *Epilepsia.* November 2019;60(11):e110–4.
188. Dangman KH, Michler RE. Transmembrane action Potentials and intracellular potassium activity of baboon cardiac tissues. 1988;
189. Mayr T, Bauer A, Reichart B, Guethoff S, Schoenmann U, Längin M, Panelli A, Kind A, Brenner P, Abicht JM. Hemodynamic and perioperative management in two different preclinical pig-to-baboon cardiac xenotransplantation models. *Xenotransplantation.* 2017;24(3):e12295.
190. Lu K. Maturation of human induced pluripotent stem cell based myocardium by biomechanical stimulation of three-dimensional tissue cultures [Dissertation]. LMU München: Medizinische Fakultät; 2023.
191. Lu K, Seidel T, Cao-Ehlker X, Dorn T, Batcha AMN, Schneider CM, Semmler M, Volk T, Moretti A, Dendorfer A, Tomasi R. Progressive stretch enhances growth and maturation of 3D stem-cell-derived myocardium. *Theranostics.* 15. April 2021;11(13):6138–53.
192. Cao-Ehlker X, Fischer C, Lu K, Bruegmann T, Sasse P, Dendorfer A, Tomasi R. Optimized Conditions for the Long-Term Maintenance of Precision-Cut Murine Myocardium in Biometric Tissue Culture. *Bioengineering.* 28. Januar 2023;10(2):171.
193. Esfandyari D, Idrissou BMG, Hennis K, Avramopoulos P, Dueck A, El-Battrawy I, Grüter L, Meier MA, Näger AC, Ramanujam D, Dorn T, Meitinger T, Hagl C, Milting H, Borggrefe M, Fenske S, Biel M, Dendorfer A, Sassi Y, Moretti A, Engelhardt S. MicroRNA-365 regulates human cardiac action potential duration. *Nat Commun.* 11. Januar 2022;13:220.
194. Bojkova D, Wagner JUG, Shumliakivska M, Aslan GS, Saleem U, Hansen A, Luxán G, Günther S, Pham MD, Krishnan J, Harter PN, Ermel UH, Frangakis AS, Zeiher AM, Klingel K, Cinatl J, Dendorfer A, Eschenhagen T, Tschöpe C, Ciesek S, Dimmeler S. SARS-CoV-2 infects and induces cytotoxic effects in human cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 1. Dezember 2020;116(14):2207–15.

-
195. Poch CM, Foo KS, De Angelis MT, Jennbacken K, Santamaria G, Bähr A, Wang QD, Reiter F, Hornaschewitz N, Zawada D, Bozoglu T, My I, Meier A, Dorn T, Hege S, Lehtinen ML, Tsoi YL, Hovdal D, Hyllner J, Schwarz S, Sudhop S, Jurisch V, Sini M, Fellows MD, Cummings M, Clarke J, Baptista R, Eroglu E, Wolf E, Klymiuk N, Lu K, Tomasi R, Dendorfer A, Gaspari M, Parrotta E, Cuda G, Krane M, Sinnecker D, Hoppmann P, Kupatt C, Fritsche-Danielson R, Moretti A, Chien KR, Laugwitz KL. Migratory and anti-fibrotic programmes define the regenerative potential of human cardiac progenitors. *Nat Cell Biol.* 2022;24(5):659–71.

9. Danksagung

Besonders herzlich danken möchte ich im Rahmen dieser Arbeit meinem Doktorvater, Prof. Andreas Dendorfer, der mir nicht nur das Projekt und eine Teilnahme am spannenden Prozess der Weiterentwicklung eines biomimetischen Gewebekulturmodells ermöglichte, sondern mir auch jederzeit in allen Belangen des Promotionsprojekts mit Rat und Tat zur Seite stand. Danke für die spannenden Diskussionen, wertvollen Anregungen und vor allem für die Weitergabe der eigenen Begeisterung für das Thema und die Möglichkeiten der Myokardkultur. Die Labor-Zeit, die ich sehr genossen habe und an die ich immer gerne zurückdenke, war dadurch in vielerlei Hinsicht eine persönliche und fachliche Bereicherung für mich.

Ein großes Dankeschön geht auch an Dr. Roland Tomasi für die tatkräftige Unterstützung bei den Experimenten und organisatorischen Fragen, die Mitbetreuung und Mitkorrektur dieser Arbeit und vor allem die immer konstruktive Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und die immer gute Stimmung im Labor.

Des Weiteren möchte ich auch Mai Ping Wu und Dora Kiesel danken, vor allem für ihre intensive Unterstützung bei Gewebeaufschluss und Western-Blots.

Danke auch an Mathias Semisch für die Beratung und Unterstützung in München und Bad Oeynhausen.

Vielen Dank auch an alle anderen Mitglieder der AG Dendorfer und am Walter-Brendel-Zentrum, die mich herzlich aufgenommen und unterstützt haben.

Danken möchte ich auch den Teams der Herzchirurgie der LMU Klinik und in Bad Oeynhausen sowie der AG Milting am Erich und Hanna-Klessmann-Institut für die Gewebeentnahmen des humanen Gewebes sowie dem Xenotransplantationsteam an der LMU für die Pavianmyokardproben, die gute Zusammenarbeit und die Hilfsbereitschaft.

Mein tiefster Dank geht auch an alle Patientinnen und Patienten, die sich entschlossen, ihr entnommenes Gewebe der Wissenschaft zur Verfügung zu stellen und damit Fortschritte in der Myokardforschung und neuen Therapieansätzen zu unterstützen und zu ermöglichen.

Ganz besonderen Dank möchte ich auch meinem Mann Daniel aussprechen für die unschätzbar wertvolle selbstlose Unterstützung und Hilfsbereitschaft, die Motivation, die vielen Stunden der Diskussion über für ihn fachfremde Themen und vor allem die unendliche Liebe.

Dank gebührt auch meiner Mutter Veronika Vogel für die immerwährende Unterstützung zu jeder Tages- und Nachtzeit, ihre Geduld und die fachlichen Diskussionen. Vielen Dank auch an meinen Vater, meine Schwester und meine Schwiegermutter für ihre Hilfe, Ratschläge und Ermutigungen.

Zum Schluss möchte ich auch meiner besten Freundin Amina Sanchin danken für ihr offenes Ohr, ihre Unterstützung in fachlicher Diskussion und ihre Anregungen.

10. Lebenslauf

11. Publikationsliste

Vogel E, Tomasi R, Dendorfer A. Dose-dependent effects of long-term b-adrenergic stimulation on cultured failing myocardium. Poster auf dem 14th Munich Heart Alliance Meeting; 2018 Juli 19; Starnberg.

Fischer C, Milting H, Fein E, Reiser E, Lu K, Seidel T, u. a. Long-term functional and structural preservation of precision-cut human myocardium under continuous electromechanical stimulation *in vitro*. Nat Commun. 10. Januar 2019;10(1):117.

12. Eidesstattliche Erklärung



Eidesstattliche Versicherung

Reiser, Elisabeth Maria Anna

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Untersuchung von Kontraktionskraftveränderungen humaner Myokardslices in biomimetischer Langzeitkultur auf Katecholaminabhängigkeit

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 16.11.2024

Ort, Datum

Elisabeth Reiser

Unterschrift: Elisabeth Maria Anna Reiser

Eidesstattliche Versicherung

Stand: 31.05.2024

13. Übereinstimmungserklärung



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro



Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung

Ihr Name: Elisabeth Maria Anna Reiser

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel

**Untersuchung von Kontraktionskraftveränderungen humaner Myokardslices in biomimetischer
Langzeitkultur auf Katecholaminabhängigkeit**

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

München, 22.11.2024

Ort, Datum

Elisabeth Reiser

Unterschrift Elisabeth Maria Anna Reiser