

Aus dem Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. K. Brockmeier

Optimierung, Standardisierung und Validierung der
Methodik der Präparation neonataler muriner myokardialer
Gewebeschnitte zur Durchführung elektrophysiologischer
Untersuchungen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Nathalie Rihab Jazmati
aus Rinteln

Promoviert am 22. April 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
2009

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Dr. Frank Pillekamp von mir selbst ausgeführt worden.

Ich möchte allen danken, die mir bei der Durchführung der Experimente und der Analysen behilflich waren!

Mein Dank gilt insbesondere Professor Dr. Brockmeier, der mir bei allen Fragen mit Rat und Tat zur Seite stand, Dr. Michael Reppel für seine Unterstützung und Geduld, Dr. Frank Pillekamp für die Einarbeitung und die Überlassung des Themas, Anna Kornblum und Teresa Lipke für die gemeinsame Zeit und Kajo Fritz für die orthographische Korrektur.

Für meine Eltern, den besten von allen,
und für meinen Freund, dem besten von allen

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	7
Abkürzungen	10
1 Einleitung.....	11
1.1 Gewebeschnitte – Historie und heute	15
1.2 Ziel der Arbeit	17
2 Methoden und Material.....	19
2.1 Methoden	19
2.1.1 Präparation der Gewebeschnitte	19
2.1.1.1 Präoxygenierung der Maus	20
2.1.1.2 Operation.....	20
2.1.1.3 Fixierung der Herzen zum Schneiden.....	21
2.1.1.4 Schneiden des Myokards.....	25
2.1.1.5 Gekühlte Aufbewahrung.....	26
2.1.1.6 Kalziumtoleration.....	27
2.1.1.7 Temperatureinführung und Inkubation.....	27
2.1.2 Biochemische Analyse der Gewebeschnitte.....	28
2.1.2.1 MTT -Test.....	28
2.1.2.2 ATP-Test	30
2.1.2.3 LDH-Test.....	33
2.1.2.4 Bio Rad Protein-Assay	35
2.1.2.5 Modified Lowry Protein-Assay.....	36
2.1.2.6 Umrechnung zwischen den Proteinassays	37
2.1.2.7 Trypanblau-Färbung.....	38
2.1.3 Elektrophysiologische Untersuchung.....	38
2.1.3.1 Mikro-Elektroden Arrays (MEAs) – Messung der Feldpotenziale	38
2.1.3.2 Bestimmung der Herzfrequenz	40
2.1.3.3 Feldpotenziale und Erregungsausbreitung	41
2.1.4 Histologie	42
2.1.4.1 Herstellung von Gefrierschnitten.....	42
2.1.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	42
2.1.5 Statistik.....	43
2.2 Material.....	44
2.2.1 Versuchstiere	44
2.2.2 Elektrolytlösungen und Medien.....	44
2.2.3 Zusätze/Veränderungen der Elektrolytlösung.....	45
2.2.3.1 2,3-Butanedionemoxim (BDM).....	45
2.2.3.2 Ethylen-glyco-tetra-acetat (EGTA).....	46

2.2.3.3	Kalzium.....	46
2.2.4	Materialliste (alphabetisch sortiert).....	47
3	Ergebnisse.....	51
3.1	ATP-Gehalt der Herzen <i>in vivo</i>	51
3.2	Verbesserung der Präparation der Herzgewebeschnitte.....	52
3.2.1	Experiment 1: Fixierung der Herzen auf der Arbeitsbühne.....	53
3.2.1.1	MTT-Assay.....	54
3.2.1.2	LDH-Assay.....	56
3.2.1.3	ATP-Assay.....	57
3.2.2	Experiment 2: Die Schnittdicke.....	59
3.2.3	Experiment 3: Die Operationstechnik.....	61
3.2.4	Experiment 4: Zugabe von 2,3-Butanedionmonoxime (BDM).....	62
3.2.5	Experiment 5: Kalziumgehalt.....	64
3.2.6	Experiment 6: EGTA.....	67
3.2.7	Experiment 7: Einfluss der Temperatur.....	68
3.2.8	Zusammenfassung der Präparationsexperimente.....	69
3.3	Charakterisierung der Gewebeschnitte.....	71
3.3.1	Histologie – HE-Färbung.....	71
3.3.2	Nekrose – Trypanblau-Färbungen.....	74
3.3.3	ATP-Messungen.....	78
3.3.4	MTT-Test.....	79
3.3.5	Autonome Kontraktion.....	80
3.3.6	Herzfrequenzanalyse.....	81
3.3.7	Feldpotenziale.....	83
3.3.8	Erregungsausbreitung.....	85
4	Diskussion.....	86
4.1	Diskussion der einzelnen Experimente zur Modifikation der Gewebeschnitte.....	86
4.1.1	ATP-Gehalt der Herzen <i>in vivo</i> und der Herzgewebeschnitte.....	87
4.1.2	Experiment 1: Fixierung der Herzen auf der Arbeitsbühne des Vibrotoms.....	88
4.1.3	Experiment 2: Schnittdicke.....	90
4.1.4	Experiment 3: Operationstechnik.....	92
4.1.5	Experiment 4: BDM.....	93
4.1.6	Experiment 5: Kalzium.....	95
4.1.7	Experiment 6: EGTA.....	97
4.1.8	Experiment 7: Temperatur.....	98
4.1.9	Zusammenfassung der Präparationsexperimente.....	99
4.2	Charakterisierung der Gewebeschnitte.....	100
4.2.1	Histologie.....	100

4.2.2	Trypanblau	102
4.2.3	ATP	103
4.2.4	MTT	104
4.2.5	Autonome Kontraktion	105
4.2.6	Herzfrequenz	106
4.2.7	Feldpotenziale.....	107
4.2.8	Erregungsausbreitung.....	109
4.3	Diskussion der verwendeten biochemischen, histologischen und elektrophysiologischen Untersuchungsmethoden	110
4.4	Generelle Diskussion des Modells der Herzgewebeschnitte	116
4.5	Diskussion zum Versuchstier neonatale Maus	120
4.6	Perspektiven und Ausblick	124
5	Zusammenfassung	126
6	Literaturverzeichnis	127
7	Vorabveröffentlichung.....	138
8	Lebenslauf	145

Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
BDM	2,3-Butanedionemonoxime
BSA	Bovine Serum Albumin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure
FG	Freiheitsgrade
LDH	Laktatdehydrogenase
MEA	Mikro-Elektroden Arrays
MTT	3,(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid
n	Fallzahl
NADH/H ⁺	reduzierte Form des Nicotinamidadenindinukleotid
NADH ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
OD	Optische Dichte
PARP	Poly-(ADP-Ribose-)Polymerase (Apoptose Markerenzym)
PFA	Paraformaldehyd
PN	postnatal
RT	Raumtemperatur
SEM	standard error of the mean= Standardabweichung von Mittelwerten
ww	wet weight (Nassgewicht)
ZP	Zeitpunkt

1 Einleitung

Die Physiologie und Pathophysiologie des Herzens war und ist aufgrund der hohen klinischen Relevanz in den letzten Jahren Mittelpunkt zahlreicher Diskussionen (Jahangiri et al. 2006; Lazzerini et al. 2006). Herzrhythmusstörungen sind klinischer Alltag und gefürchtete Komplikationen von Thoraxoperationen (Amar et al. 2006) und insbesondere von Eingriffen am Herzen wie zum Beispiel bei Herzkatheteruntersuchungen (Gorenek 2006) oder nach Korrektur einer Fallot'schen Tetralogie (Bouchardy et al. 2006; Karamlou et al. 2006) sowie beim Einsatz diverser Pharmaka (Morissette et al. 2005) und ischämiebedingten Myokardschäden (Akar and Akar 2006).

Der Pathomechanismus von Herzrhythmusstörungen beruht auf größtenteils noch ungeklärten strukturellen und/oder elektrophysiologischen Veränderungen des Myokards (Goette and Lendeckel 2006; Nattel et al. 2005). Um diese Veränderungen der Herzstruktur und insbesondere den Mechanismus der Entstehung von Arrhythmien besser verstehen zu können, braucht man ein geeignetes System, das eine detaillierte Untersuchung des komplexen Gewebeverbandes inklusive der Zell-Zell-Kontakte und dem umliegenden strukturellen Bindegewebe im Herzen auf einfache Weise ermöglicht.

In der elektrophysiologischen, kardiologischen Grundlagenforschung kommen zu diesen Zwecken vor allem *in vitro*-Methoden zur Anwendung (Partridge et al. 2005). Der Vorteil einer *in vitro*-Methode besteht dabei gegenüber *in vivo*-Methoden in der Isolation des Myokards von hormonellen und metabolischen Einflüssen des Körpers, welche herzspezifische Untersuchungen erschweren oder unmöglich machen. Allerdings wird bei der Entnahme von Herzen zur *in vitro*-Untersuchung die endogene Gewebepfusion unterbrochen. Eine Oxygenierung des Myokards erfolgt nunmehr ausschließlich *per diffusionem*. Arbeiten anderer Gruppen zeigen, dass die kritische Diffusionsstrecke für eine ausreichende Versorgung des Herzgewebes mit Sauerstoff maximal 300 µm betragen darf und diese nicht überschreiten sollte (Parrish et al. 1995). Anderenfalls droht eine hypoxische Zellschädigung insbesondere in den zentralen Regionen des Gewebes. Um eine suffiziente Versorgung mit

Sauerstoff für das Herzgewebe *in vitro* zu ermöglichen, bestehen derzeit zwei weit verbreitete Methoden:

Seit Mitte der 1970-er war und ist das isolierte, perfundierte Herz nach Langendorff für viele Untersuchungen Methode der Wahl (Langendorff O. 1895; Neely and Rovetto 1975; Sutherland and Hearse 2000). Dieser Aufbau erhält die physiologischen Zell-Zell-Kontakte und die Integrität der verschiedenen Zelltypen des Herzens. Allerdings ist es wegen der unzulänglichen Versorgung des Myokards nicht möglich, am perfundierten Herzen Messungen über einen längeren Zeitraum durchzuführen. Es kann zusammengefasst werden, dass ein Verlust der kontraktilen Funktion des linken Ventrikels von 5-10% pro Stunde zu erwarten ist (Sutherland and Hearse 2000), so dass Untersuchungen nur am Tag der Entnahme des Herzens durchgeführt werden können. Für diese Methode wird zudem eine hohe Anzahl von Tieren benötigt, da ein Herz je nach Versuchsaufbau nur einmalig untersucht werden kann. Elektrophysiologische Untersuchungen, die die Erregungsausbreitung betreffen, sind in der aufwendigen Apparatur an den Maus Herzen insbesondere wegen der geringen Größe kaum durchführbar. Menschliches Gewebe mit dieser Methode zu untersuchen, verbietet sich aufgrund ethischer Aspekte gänzlich.

Seit Mitte der 1980-er Jahre hat sich dann die Kultur von Einzelzellen als klassisches *in vitro*-Modell zur Untersuchung von Herzzellen etabliert (Morwinski 1986). Das ausdifferenzierte Herzgewebe wird dabei zum Beispiel mittels enzymatischer Lösung wie Kollagenase oder Trypsin (Feng et al. 1997; Hoppe and Beuckelmann 1998; Hullin et al. 2003) dissoziiert und anschließend zur Untersuchung kultiviert.

Eine weitere Möglichkeit solche Einzelzellen zu generieren, ist die Verwendung von embryonalen murinen oder auch humanen Stammzellen. Durch Zugabe von speziellen Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel DGF-b oder BMP (Behfar et al. 2002) kann man die Differenzierung der pluripotenten Stammzellen zu Herzzellen induzieren und diese anschließend für Untersuchungen und zu Therapie Zwecken kultivieren (Wei et al. 2005).

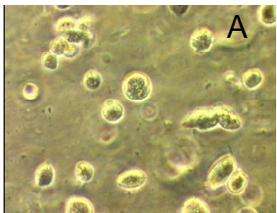
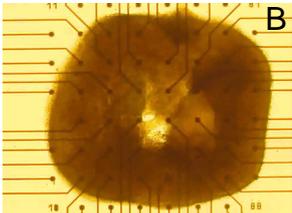
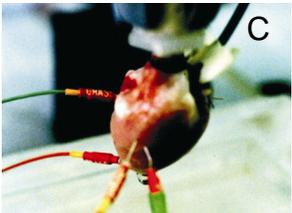
Im Vergleich zur Langendorff-Perfusion am ganzen Herzen ist die Zahl der benötigten Versuchstiere durch das Modell der Einzelzellen erheblich vermindert (Niwa et al. 1998). Durch die Etablierung der Kultur von Einzelzellen ist zudem auch humanes Gewebe zugänglich. Dies bietet die Möglichkeit genetische, pharmakologische, elektrophysiologische und metabolische Untersuchungen durchzuführen, die der humanen *in vivo*-Situation näher kommen als alle anderen verfügbaren *in vitro*-Modelle. Die Verwendung von humanen Stammzellen löst dabei seit der erstmaligen Veröffentlichung 1998 allerdings weltweit intensive ethische und soziale Debatten aus (Findikli et al. 2006). Die isolierten Zellen haben zudem den Nachteil, keinem physiologischen Gewebeverband mehr anzugehören. Zell-Zell-Kontakte bestehen nicht, es findet keine physiologische Interaktion statt. Dadurch ist die Untersuchung der Erregungsweiterleitung, die Untersuchung des Pathomechanismus von Arrhythmien sowie die Untersuchung der Rolle von Pharmaka und anderen Einflüssen (Ischämie) auf die Entstehung von Rhythmusstörungen nicht zufrieden stellend zu beurteilen. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse von einzelnen Zellen auf das ganze Herz ist eingeschränkt.

Diese Limitation in der Untersuchung von Herzgewebe fordert ein neues *in vitro*-Modell, mit dem sich kardiologische Fragestellungen auf einfache Weise, auch bezüglich der Zell-Zell-Interaktion und der Gewebestruktur untersuchen lassen.

Bereits 1995 postulierte Lin et al., dass die Modelle und Methoden zur elektrophysiologischen kardialen Untersuchung insbesondere am Modell der Maus weit hinter denen der molekularbiologischen Möglichkeiten liegen. Es wurde ein großer Bedarf an der Entwicklung und Charakterisierung geeigneter Modelle zur elektrophysiologischen Untersuchung von Herzgewebe festgestellt (Lin et al. 1995a). Dieser Bedarf besteht bis heute (Sutherland et al. 2003). Die hier vorgestellte Arbeit soll eine Möglichkeit vorstellen und etablieren, die diese Lücke füllt: vitale neonatale murine myokardiale Gewebeschnitte.

Vitale Schnitte des Herzgewebes in Kultur stellen ein praktikables *in vitro*-Modell dar, das die Vorteile von Einzelzellen und perfundiertem ganzen Herzen vereint: ein intakter dreidimensionaler Gewebeverband, der die *in vivo*-Situation

mit allen interzellulären Kontakten und Zelltypen widerspiegelt und durch eine ausreichend kurze Diffusionsstrecke von 300 µm über einen längeren Zeitraum in Kultur gehalten werden kann. Zudem ist die Anzahl der Versuchstiere reduziert und die benötigte Gewebemenge gering, da aus einem Herzen mehrere Schnitte zur Untersuchung erstellt werden könnten. Auch die Untersuchung von menschlichem Gewebe zum Beispiel aus anfallenden Biopsien bei Herzoperationen ist möglich.

Einzelzellen	Herzgewebeschnitte	Langendorff
		

Vorteile

Langzeituntersuchungen möglich	Untersuchungen über 48 Stunden möglich	physiologischer Zellverband
jede Art von Gewebe (auch humanes)	auch humanes Gewebe z.B. aus Biopsien	Organfunktion weitestgehend erhalten
etabliert und weit verbreitet	physiologischer Zellverband	
Anzahl der benötigten Tiere gering	Anzahl der benötigten Tiere gering	

Nachteile

keine zelluläre Interaktion	Modell bislang noch nicht etabliert	Untersuchungen nur in begrenztem Zeitrahmen
bei Stammzeleinsatz ethisch umstritten		nicht mit humanem Gewebe möglich
		Anzahl der benötigten Tiere hoch

Tabelle 1.1: Zusammenfassung der Vor- und Nachteile verschiedener Methoden zur Untersuchung kardialen Gewebes. A: isolierte Einzelzellen. B: Myokardschnitte. C: Langendorff-Perfusion.

1.1 Gewebeschnitte – Historie und heute

Der Gebrauch von Gewebeschnitten für *in vitro*-Untersuchungen wurde erstmalig in den 1920-er Jahren von Otto Warburg beschrieben. Warburg schnitt frisches Tumorgewebe in kleine Stücke und stellte anschließend direkt am noch vitalen Gewebe Untersuchungen an (Warburg 1923).

Seitdem wurden Gewebeschnitte von verschiedenen Organen hergestellt. Bei den meisten der Präparationen wurden die Schnitte zunächst einfach mit einem Skalpell freihändig gefertigt, also das Gewebe mit einem Messer in möglichst feine Scheiben geschnitten (Campbell and Hales 1971).

Der Vorteil, das Gewebe zu schneiden, bestand darin, dass die Versorgung der Zellen im Gewebeverband mit Sauerstoff und Glukose sowie der Austausch von Metaboliten ohne Blutkreislauf über die Diffusion gewährleistet werden konnte. Somit konnte das vom Kreislauf getrennte Gewebe bei ausreichend geringer Dicke auch für längere Untersuchungen im Zellverband am Leben gehalten werden. Doch das freihändige Erstellen von Schnitten mit dem Skalpell hatte einen erheblichen Nachteil: Mit dieser Methode waren die Gewebeschnitte uneinheitlich dick und die gewonnenen Daten somit oft nicht reproduzierbar. Dennoch wurden immer häufiger Schnitte von verschiedenen Organen (Gehirn, Niere, Leber, Lunge) und unterschiedlichen Spezies (Mensch, Primaten, Mäuse, Ratten) hergestellt, unter anderem, weil der Vorteil, die Zellen im intakten Gewebeverband mit normaler Zell-Zell-Interaktion untersuchen zu können, so immens war.

Der Durchbruch kam in den 1980-er Jahren mit der Entwicklung von Präzisions-Vibrotomen und Zellkultursystemen, die es ermöglichten, sehr dünne, reproduzierbare Schnitte herzustellen und in Kultur zu halten. Erstmals veröffentlicht wurde die Erstellung von diesen so genannten *precision-cut*-Gewebeschnitten 1980 an Lebergewebe (Krumdieck et al. 1980). Von diesem Zeitpunkt an entwickelte sich die Technik rasant: Der Zellschaden beim Schneiden wurde geringer, die Aufbewahrungszeiträume der Schnitte länger, die Ergebnisse exakter. Ein Jahrzehnt später konnten Leberschnitte bereits bis zu fünf Tagen zur Untersuchung in Kultur gehalten werden (Fisher et al. 1995).

Schnitte vom Herzen herzustellen ist wegen der Empfindlichkeit des Myokards gegenüber Hypoxie und mechanischen Noxen schwierig. Erstmals veröffentlicht wurde eine Studie mit Herzgewebeschnitten Mitte der 1980-er Jahre. Dabei untersuchte die Arbeitsgruppe um Neri und Cini-Neri die Effekte von Epirubicin und Anthracyclinderivaten auf das Myokard anhand von Herzgewebeschnitten (Neri and Cini-Neri 1986).

Eine orientierende histologische und biochemische Untersuchung der Herzgewebeschnitte erfolgte dann erstmals Anfang der 1990-er Jahre an Rattenherzen (Parrish et al. 1992). Eine funktionelle, elektrophysiologische Untersuchung des Gewebes fand dabei nicht statt.

Elektrophysiologische Untersuchungen wurden an Herzgewebeschnitten bislang erst zweimal durchgeführt. Kamiyama stellte 1986 mittels extrazellulären Ableitungen an Schnitten aus Kaninchenherzen Untersuchungen zur Grundlage von Tachykardien an (Kamiyama et al. 1986), während Burnashev nur vier Jahre später die Möglichkeit der intrazellulären Ableitung mittels Patch-Clamp-Versuchen an Schnitten aus neonatalen Rattenherzen veröffentlichte (Burnashev et al. 1990). Hierbei wurden aber weder die strukturelle, noch die biochemische Unversehrtheit der Schnitte dokumentiert. Extrazelluläre Ableitungen mittels Mikro-Elektroden Arrays (vgl. 2.1.3.1) an Myokardschnitten wie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt sind bislang nicht veröffentlicht. Anfang des neuen Jahrtausends wurden schließlich erstmals aus humanem Herzbiopsiematerial Gewebeschnitte hergestellt (Zhang et al. 2000). Hierbei wurden aus atrialen Myokardbiopsien mit Klängen handgefertigte, etwa einen halben Millimeter dicke Schnitte gefertigt und diese biochemisch (MTT-Test, LDH-Test) sowie histologisch (Elektronenmikroskopaufnahmen) untersucht. Das humane Modell atrialer Schnitte fand später insbesondere als Ischämiemodell Anklang (Bull et al. 2000; Ghosh et al. 2001; Schneider et al. 2003). Eine systematische Untersuchung der Faktoren, die die Präparation von Herzgewebeschnitten beeinflussen, bietet der derzeitige Literaturstand nicht.

1.2 Ziel der Arbeit

Bevor Herzmuskelschnitte routinemäßig in einem *in vitro*-Modell eingesetzt werden können, muss die Methodik zur Präparation etabliert und validiert sein. Die gewonnenen Ergebnisse müssen reproduzierbar sein. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Präparation von Herzgewebeschnitten am Modell der neonatalen Maus zu etablieren, zu standardisieren und die Gewebeschnitte abschließend zu charakterisieren.

Dazu wurde (i) in vorangegangenen bereits veröffentlichten Experimenten (Pillekamp et al. 2005) an murinem, embryonalem Gewebe ein Protokoll generiert, bei dem spontan schlagende, vitale Herzmuskelschnitte aus embryonalen Maus Herzen zur elektrophysiologischen *in vitro*-Untersuchung erstellt wurden. Dieses Protokoll soll (ii) in seinen einzelnen Parametern systematisch durch Variation der Arbeitsschritte kritisch untersucht und verbessert werden. Dazu wird an entscheidenden Stellen das Ausgangsprotokoll mit einer Alternativvariante verglichen. Kommt es durch die Variation zu einer signifikanten Verbesserung der Vitalität der Gewebeschnitte nach festgelegten Zeitpunkten, wird die Alternativmethode beibehalten. Zur Beurteilung der Vitalität wird der ATP-Test eingesetzt. In Tabelle 1.2 sind die Parameter welche einen Einfluss auf die Vitalität des Gewebes haben zusammenfassend dargestellt.

Die so optimal entwickelten Herzgewebeschnitte sollen dann (iii) charakterisiert werden. Dazu werden die Gewebeschnitte biochemisch (ATP-Test, MTT-Test), histologisch (Trypanblau-Färbung, H.E.-Färbung) und elektrophysiologisch (Schlagfrequenz, MEA) untersucht und an geeigneten Stellen mit dem Ausgangsmodell verglichen.

Parameter	mögliche Untersuchungskriterien
Operation	Perfusion, Operationsschritte
Schnittdicke	Austesten unterschiedlicher Schnittdicken
Fixierung beim Schneiden	Ankleben, Einbettung in Agarose, Sogfixierung
Temperatur	Präparation bei 4°C oder bei RT, Temperaturprotokoll
Oxygenierung	Sauerstoffzufuhr (100% O ₂ , carbogen, Raumluf (21% O ₂))
Elektrolytzusammensetzung	Zusätze wie EGTA, Kalzium, BDM u.a.
Inkubation	Wahl des Mediums und des Inkubationssystems
Vibrotom/Klinge	Stahl <i>versus</i> Keramik Klinge, unterschiedliche Vibrotome
Puffersystem	Bicarbonat, HEPES

Tabelle 1.2: Parameter, die einen Einfluss auf die Vitalität der Schnitte haben.

2 Methoden und Material

2.1 Methoden

2.1.1 Präparation der Gewebeschnitte

Das in einer Vorarbeit an embryonalen Mausherzen entwickelte Ausgangsprotokoll (Pillekamp et al. 2005) kann in acht große Arbeitsschritte eingeteilt werden (siehe Tabelle 2.1). Alle Arbeitsschritte und die dazu getesteten Alternativmethoden werden im Folgenden ausführlich beschrieben.

Arbeitsschritt	Zeit (min) +/- SEM
Präoxygenierung	5,58 +/- 1,16
↓	
Dekapitation	-
↓	
Operation	2,1 +/- 0,905
↓	
Fixierung der Herzen	5,63 +/- 1,495
↓	
Schneiden der Herzen	5,03 +/- 1,44
↓	
gekühlte Aufbewahrung	60
↓	
Kalziumtoleration	30
↓	
Inkubation	Bis zu 6 Tagen

Tabelle 2.1: Übersicht der Arbeitsschritte zur Präparation von neonatalen, murinen Gewebeschnitte. Die Zeitangaben sind ein Mittel aus 71 präparierten Herzen.

2.1.1.1 Präoxygenierung der Maus

Material:

- gasdichte Kammer, Werkstatt der Universität zu Köln
- medizinischer Sauerstoff, Linde

Durchführung:

Die 12 bis 48 Stunden alten Mäuse (vgl. Material 2.2.1) wurden kurz vor der Dekapitation für 5 Minuten 34 Sekunden +/- 1 Minute 10 Sekunden (n=71) in eine gasdichte, mit 100% Sauerstoff begaste Kammer gesetzt, um das Blut durch einen erhöhten O₂-Partialdruck vor der Dekapitation mit frei gelöstem Sauerstoff anzureichern.

2.1.1.2 Operation

Material:

- Operations-Besteck (siehe Materialliste)
- Zellkulturschalen (Ø 9,2 cm), VWR
- kalziumfreie Tyrode nach Yamashita et al. (vgl. Material 2.2.2)
- Mikroskop
- Sauerstoff, Linde

Standard-Durchführung:

Nach der Präoxygenierung wurden die Mäuse durch Dekapitation getötet. Die Operation wurde in Zellkulturschalen (Ø 9,2 cm), gefüllt mit 4°C kalter, kalziumfreier, mit 100% Sauerstoff präoxygenierter Tyrode unter dem Mikroskop durchgeführt.

Durch Schwenken der dekapitierten Maus in der Tyrode wurde zunächst versucht, das Blut bestmöglich auszuwaschen. Die Haut über dem Brustkorb wurde anschließend entfernt und der Brustkorb rechts und links des Sternums mit einer kleinen Schere eröffnet, um das Mediastinum freizulegen.

Um das Herz möglichst schonend aus dem Brustkorb zu entfernen, wurde der komplette Herz-Lungen-Komplex mit einer Pinzette entnommen. In einem frischen Tyrode-Bad wurde anschließend das Herz von Lungen- und

Bindegewebe befreit. Die komplette Operation dauerte im Schnitt 2 Minuten +/- 54 Sekunden.

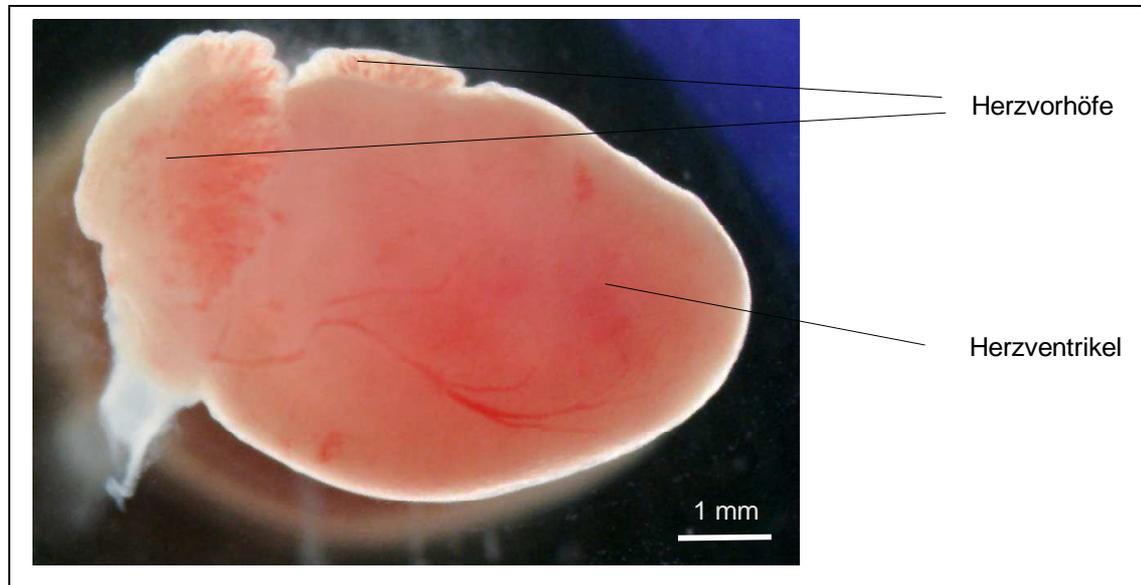


Abbildung 2.1: Das Herz einer 48 Stunden alten Maus direkt nach der Operation. Das Herz ist etwa 7 mm lang und hat einen Durchmesser von 4 mm. Die Vorhöfe sind an der Basis gut zu erkennen.

Variations-Durchführung: Entfernung der Vorhöfe durch Skalpellsschnitt oberhalb der Basis:

Durch einen sauberen Skalpellsschnitte auf Höhe der Herzbasis wurden die Atrien abgetrennt und die Ventrikel geöffnet. Anschließend wurde das Blut durch Umherschwenken in frischer Tyrode aus dem Herzen ausgewaschen.

2.1.1.3 Fixierung der Herzen zum Schneiden

Material:

- kleiner Metallzylinder (\varnothing 1,2 cm)
- Agarose Low Melt (4%), Roth
(0,5 g der Agarose wurden mit 12,5 ml der kalziumfreien Tyrode nach Yamashita (siehe Elektrolytlösungen) unter ständigem Rühren auf über 70°C erhitzt. Nach Abkühlung auf etwa 40°C wurde die Agarose in einem speziell angefertigtem Wasserbad unter kontinuierlichem Rühren bei einer Temperatur von 33°C aufbewahrt (Erstarrungstemperatur

32°C). Dadurch wurde das frühzeitige Erkalten und somit Erstarren der Agarose verhindert.

- Skalpell
- Wasserbad, Werkstatt der Universität zu Köln
- Sekundenkleber, „Blitz Kleber flüssig“ von Patex

Durchführung:

Das Herz wurde sofort nach der Operation in einen kleinen, Kälte gut leitenden Zylinder aus Metall gelegt und mit der auf 33°C abgekühlten, 4%-igen Low Melt Agarose übergossen (siehe Abbildung 2.2). Mit einer Pipettenspitze wurde das Herz in der noch flüssigen Agarose umherbewegt, um ein vollständiges Einbetten mit Agarose zu gewährleisten. Vor Erstarrung der Agarose wurde das Herz mit der Basis nach unten und mit der Herzspitze nach oben im Zylinder positioniert. Zum Erkalten der Agarose wurde der Zylinder auf Eis gelegt.

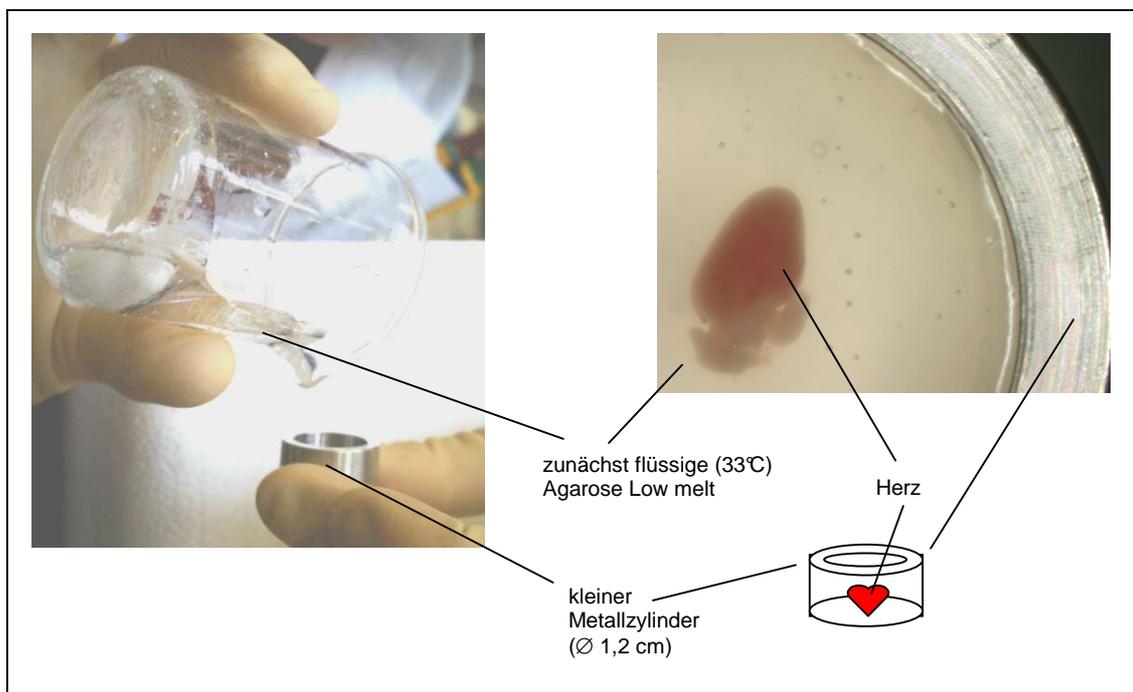


Abbildung 2.2: Einbetten des Herzens in Agarose. Zum Erstarren der Agarose wurde der Zylinder auf Eis gelegt.

Mit einem Skalpell wurde dann ein möglichst kleiner Block, der das eingegossene Herz beinhaltet, aus dem Agar herausgeschnitten und mit

Sekundenkleber auf der gekühlten Arbeitsfläche des Vibrotoms befestigt (siehe Abbildung 2.3).

Nach wenigen Sekunden war der Kleber trocken und die Arbeitsfläche konnte in die Schneidekammer des Vibrotoms, welches mit kalziumfreier, kalter (6°C-8°C) und mit Sauerstoff begaster Tyrode gefüllt war, eingesetzt werden. Gekühlt wurde die Elektrolytlösung mit vorher angefertigten Tyrode-Eiswürfeln. Die Fixierung der Herzen dauerte im Schnitt 5 Minuten 38 Sekunden +/- 1 Minute 30 Sekunden.

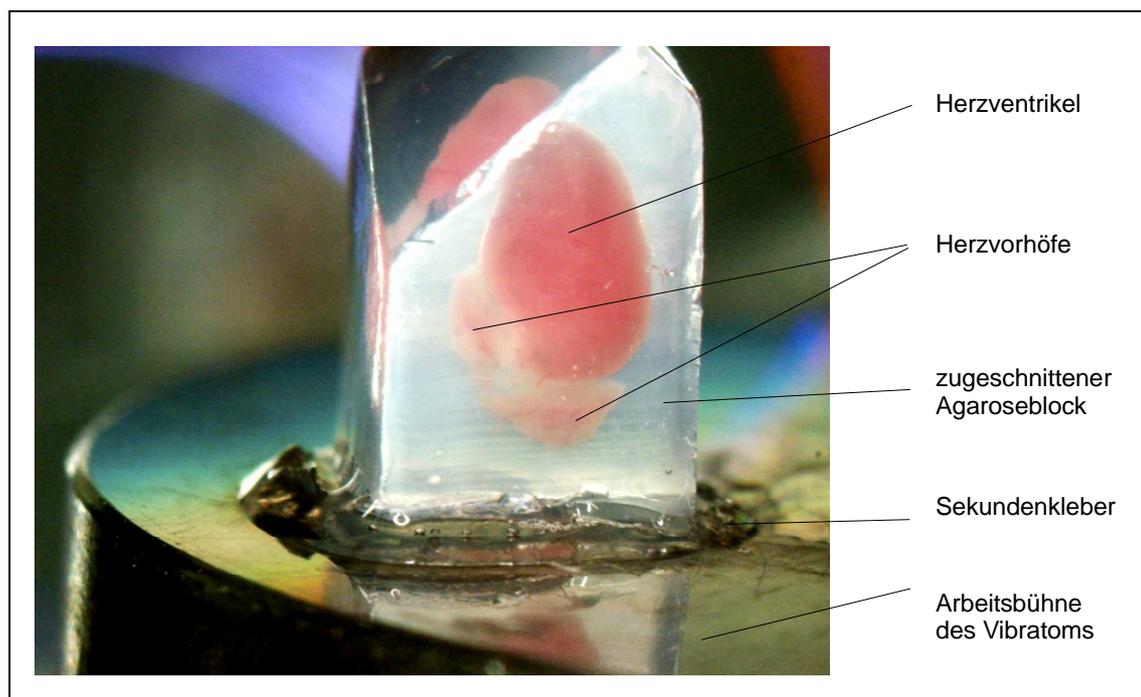


Abbildung 2.3: Das in Agar eingebettete Herz wurde im Block auf der Arbeitsfläche des Vibrotoms mit Sekundenkleber befestigt.

Variations-Durchführung: Ansaugen der Herzen an die Arbeitsfläche

Material:

- speziell angefertigte Ansaugvorrichtung (siehe Abbildung 2.4), Werkstatt der Universität zu Köln
- Agarose Low Melt (4%), Roth
(0,5 g der Agarose wurden mit 12,5 ml der kalziumfreien Tyrode nach Yamashita (siehe Elektrolytlösungen) unter ständigem Rühren auf über

70°C erhitzt. Aus der Agarose wurde eine Form gegossen, in dessen Mitte das Herz zum besseren Halt positioniert wurde.)

- Sekundenkleber („Blitz Kleber flüssig“ von Patex), um die Agaroseform an die Arbeitsfläche zu kleben
- Saugpumpe

Durchführung:

Die Arbeitsfläche wurde zunächst in das Schneidebecken eingelassen und die Saugpumpe angeschlossen. Damit das Gewebe beim Schneiden ein Widerlager hat und nicht vor der Klinge wegrutscht, wurde eine Form aus Agarose vorgefertigt und mit Patex auf die Ansaugvorrichtung aufgeklebt.

Das Herz wurde dann vorsichtig mit einer Pinzette gefasst und mit der Basis nach unten in die vorgefertigte Agaroseform auf der Arbeitsfläche gelegt. Die Saugpumpe wurde eingeschaltet. Durch den Sog wurde das Herz fest an die Arbeitsfläche herangezogen. Um das Wegsaugen des Herzens zu verhindern, wurde im Boden ein kleines Netz eingelassen (siehe Abbildung 2.4).

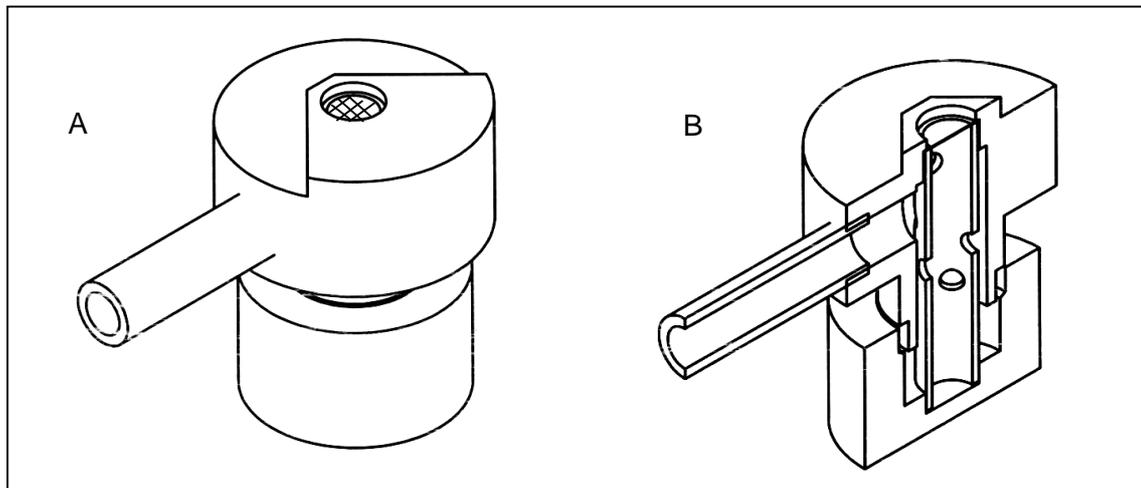


Abbildung 2.4: Ansaugvorrichtung (technische Zeichnung erstellt durch die Werkstatt der Universität zu Köln)

2.1.1.4 Schneiden des Myokards

Material:

- D.S.K.-Vibrotom (DTK-1000, DSK, Japan)
- Stahlklingen, Campden Instruments, Leicester, England
- Goldnetz (\varnothing der Maschen 10 μm)
- kalziumfreie Tyrode nach Yamashita et al. (siehe 2.2.2)
- Einwürfel aus kalziumfreier Tyrode nach Yamashita et al. (siehe 2.2.2)
- Spritzenkanülen von BD Microlance (\varnothing 0,9 mm, Länge 40 mm)
- Sauerstoff, Linde

Durchführung:

Geschnitten wurde mit dem D.S.K.-Vibrotom und einer Schnittdicke von 300 μm , wobei die benutzte Stahlklinge immer zu Beginn der Experimente und in jeder Versuchsgruppe gegen eine neue Klinge ausgetauscht wurde, um beim Schneiden der Herzen in den unterschiedlichen Experimentansätzen gleiche Bedingungen zu garantieren.

Die Elektrolytlösung im Schneidebecken wurde mit 100% Sauerstoff begast und mit Tyrode-Eiswürfeln gekühlt.

Die Schnittgeschwindigkeit wurde während des Schneidens reguliert und dabei zur Schonung des Gewebes möglichst gering gehalten (etwa 0,2 mm Vorschub pro Sekunde). Die Frequenz der horizontalen Klingenbewegung betrug 10 Hz. Geschnitten wurde parallel zur Basis, wobei die Herzspitze nach oben zeigte. Nach dem Schneiden löste sich die Agarose üblicherweise von selbst vom Gewebe. Falls nicht, wurde sie mit einer Pinzette vorsichtig abgezupft. Die Schnitte wurden dann mit einem kleinen Netz aufgefangen und gekühlt aufbewahrt (siehe 2.1.1.5). Der Schneidevorgang dauerte im Schnitt 5 Minuten +/- 1 Minute 26 Sekunden.

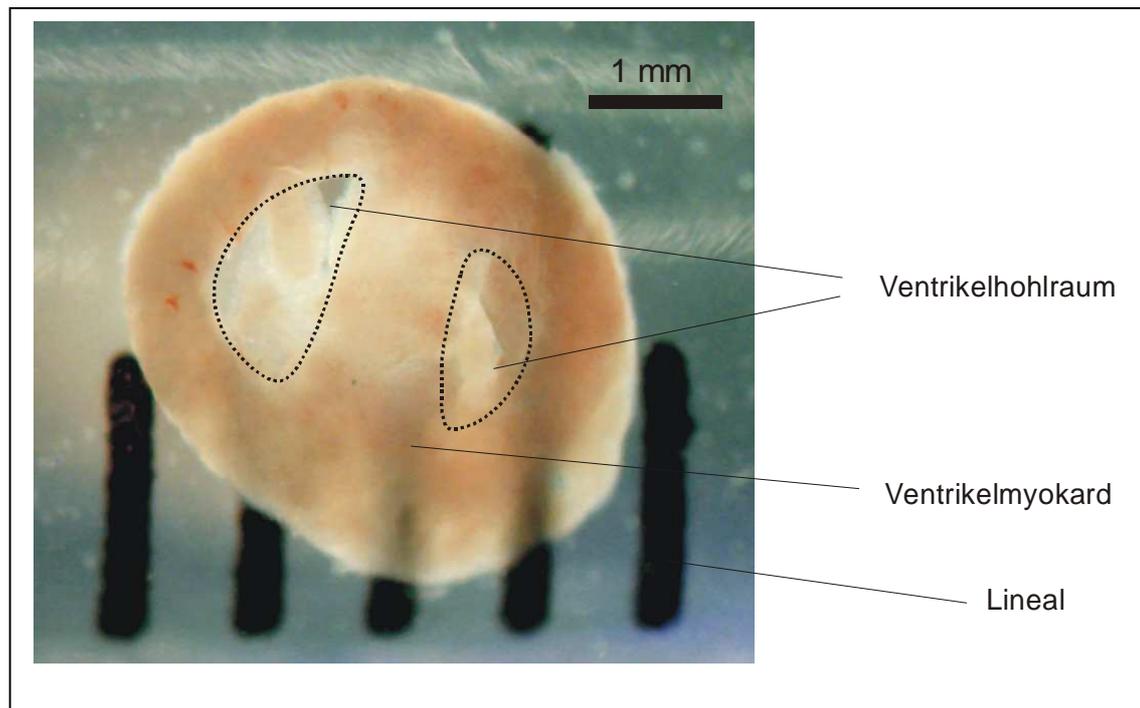


Abbildung 2.5: Muriner Herzgewebeschnitt auf einem Lineal (schwarze Streifen, Abstand 1 mm) fotografiert direkt nach dem Schneiden. Gut erkennbar: die beiden Kavitäten des Ventrikels (gestrichelte Linien).

Variations-Durchführung: Schnittdicke 200 μ m

Es wurde mit den gleichen Einstellungen wie oben beschrieben eine Schnittdicke von 200 μ m ausgetestet.

2.1.1.5 Gekühlte Aufbewahrung

Material:

- sterile Glasbecher
- kalziumfreie Tyrode nach Yamashita et al.
- Sauerstoff, Linde
- Spritzenkanülen von BD Microlance (\varnothing 0,9 mm, Länge 40 mm)
- Tropfenzähler (Dosi-Flow 10, Leventon, SA)

Durchführung:

Nach dem Schneidevorgang wurden die Schnitte zunächst in einem sterilen Glasbecher gesammelt. Die Glasbecher enthielten gekühlte Tyrode, die zuvor

bereits für 5 Minuten mit 100% Sauerstoff begast wurde. Die Oxygenierung der Tyrode erfolgte vor und während der Aufbewahrung über Spritzenkanülen. Die Sauerstoffmenge war über Tropfenzähler reguliert und betrug 20 ml O₂ in der Stunde. Die Glasbehälter wurden auf Eis aufbewahrt, die Temperatur der Tyrode lag zwischen 1°C bis 4°C. Nach genau einer Stunde Aufbewahrung begann die Kalzium- und Temperaturtoleration (siehe unten).

2.1.1.6 Kalziumtoleration

Material:

- sterile Glasbecher
- kalziumhaltige Tyrode I nach Yamashita et al. (siehe 2.2.2)
- medizinischer Sauerstoff, Linde
- Spritzenkanülen von BD Microlance (Ø 0,9 mm, Länge 40 mm)
- Tropfenzähler (Dosi-Flow 10, Leventon, SA)

Durchführung:

Zur Kalziumtoleration wurden die Schnitte für weitere 30 Minuten in einem neuen Becherglas mit eisgekühlter Tyrode aufbewahrt. Die Tyrode wurde durchgängig mit 100% Sauerstoff oxygeniert und hatte einen Kalziumgehalt von 0,9 mmol.

2.1.1.7 Temperatureinführung und Inkubation

Material:

- Zellkulturschalen (Ø 5 cm), VWR
- 20% Iscove (siehe Medien), 4°C
- Inkubator (37°C, carbogen)

Durchführung:

Die Myokardschnitte wurden nach der Kalziumtoleration unter sterilen Bedingungen in kleine Zellkulturschalen mit je 3 ml kaltem (4°C) Medium (Iscove 20 %, 1.4 mmol Kalzium) überführt und in den Inkubator (37°C, carbogen) gelegt. Bis die Temperatur von 37°C erreicht war, verging etwa eine

halbe Stunde. Alle 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel mit auf 37°C warmem Medium (20 % Iscove) durchgeführt.

2.1.2 Biochemische Analyse der Gewebeschnitte

Alle drei in diesem Abschnitt vorgestellten biochemischen Untersuchungsmethoden wurden für die Fragestellungen im Rahmen dieser Arbeit etabliert, validiert und im Einzelnen auf ihre Reliabilität überprüft. Die Inkubationszeiten, Konzentrationen, Normierungsparameter sind in vielfachen Versuchsreihen ausgetestet und optimiert worden. Zusätzlich wurde ein Vergleich der einzelnen Assays durchgeführt, um die bestmögliche Anwendung im Bezug auf die Fragestellungen zu gewährleisten. Insbesondere die Etablierung des MTT-Test, welcher im hier dargestellten Protokoll neuartig und in der Literatur bislang so nicht vertreten ist, war Hauptaugenmerk der Voruntersuchungen zu den biochemischen Assays. Die einzelnen Ergebnisse sind in dieser Arbeit aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht im Detail dargestellt.

2.1.2.1 MTT -Test

Zur Bestimmung der Integrität der Mitochondrien wurde der MTT-Assay durchgeführt. Er basiert auf der enzymatischen Reduktion des löslichen, gelben Tetrazoliumsalzes MTT zum blauen Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen (Mosmann 1983). Die Aufnahme der ionischen Ausgangssubstanz MTT in die Zelle erfolgt durch Endozytose (Liu et al. 1997), die Bildung des Formazans in intakten Mitochondrien durch Öffnung des Tetrazoliumringes. Das so entstandene wasserunlösliche Formazan wird mit organischen Lösungsmitteln homogenisiert. Die Absorption des blauen Farbstoffes kann dann photometrisch bei 560 nm bestimmt werden.

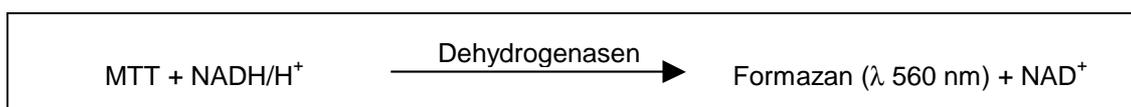


Abbildung 2.6: Prinzip der Formazanbildung aus MTT.

Chemikalien:

- 3 mmol MTT (1,24 mg MTT pro ml Wasser), Sigma
- Solubilisation-Lösung (10% Triton X-100 plus 0.1 HCL in Isopropanol), Sigma
- 0,1 M NaOH

Material:

- 1,5 ml Eppendorf-Hütchen
- Vortex
- Photometer
- 96-Loch-Mikrotiterplatten

Durchführung:

Wie in Abbildung 2.7 dargestellt, wurden je zwei Gewebeschnitte zunächst in 400 µl 37°C warmer, 3 mmol MTT-Lösung für 90 Minuten im Wasserbad unter kontinuierlichem Kreisen inkubiert (Ferrera et al. 1993). Die so behandelten Schnitte wurden danach mit einer feinen Pinzette sofort aus der MTT-Lösung genommen, kurz auf Zellstoff abgetrocknet und in 200 µl 0,1 molare NaOH-Lösung gegeben. Durch Vortexen, also schnelles maschinelles Schütteln, sowie Auf- und Abpipettieren wurde die Denaturierung der Proteine in der Lauge unterstützt.

Nachdem eine homogene Lösung entstanden war, wurden für die spätere Proteinbestimmung (siehe Kapitel 2.1.2.5) 100 µl des Homogenats in ein Eppendorf-Hütchen abpipettiert und mit 5 µl Proteinaseinhibitoren versetzt.

Weitere 100 µl des Homogenats wurden für die MTT-Bestimmung abgenommen und zunächst mit 100 µl der MTT-Solubilisation-Lösung versetzt, um die Formazankristalle schlussendlich in Lösung zu bringen (vgl. Abbildung 2.7). 80 µl der gelösten Kristalle wurden dann in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben und die Absorption im Photometer bei 560 nm gemessen. Die Werte wurden in OD pro mg Protein angegeben.

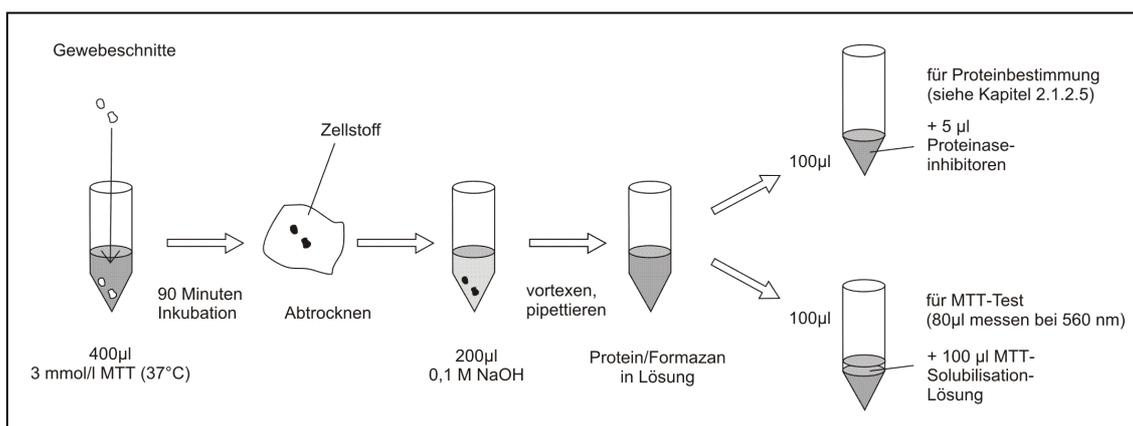


Abbildung 2.7: Ablauf der Arbeitsschritte zum MTT-Assay.

Normierungsparameter:

Um die MTT-Werte zu normieren, wurde der Proteingehalt der jeweiligen Schnitte bestimmt. Dazu wurden aus dem mit 5 µl Proteinaseinhibitor versetzten Homogenat 40 µl in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert und mit dem Modified Lowry Protein-Assay der Proteingehalt bestimmt (siehe 2.1.2.5). Andere in der Literatur übliche Referenzwerte wie zum Beispiel Trocken- oder Feuchtwicht der Schnitte erwiesen sich wegen der zu geringen Masse des Gewebes als ungenau (siehe Diskussion).

2.1.2.2 ATP-Test

Der ATP-Gehalt der Schnitte wurde mit dem ATP-Bioluminescence Assay Kit CLS II von Roche bestimmt. ATP ist der Hauptenergielieferant der Zellen und somit als Parameter für die Vitalität von hoher Relevanz. Zudem ist die Messung des ATP-Gehalts einfach und gut durchzuführen. Das Messprinzip beruht auf einer biochemischen Reaktion bei der in zwei Schritten Licht emittiert wird (siehe Abbildung 2.8). Das grüne Licht hat sein Emissionsmaximum bei 562 nm und kann mit einem Luminometer gemessen werden.

Nach der Michaelis-Gleichung gilt:

$$\text{Lichtintensität} = \frac{V_{\max} \times C_{\text{ATP}}}{K_m + C_{\text{ATP}}}$$

V_{\max} = maximale Umsatzgeschwindigkeit
 C_{ATP} = ATP-Konzentration
 K_m = Michaelis-Menten-Konstante

Bei sehr niedrigen ATP-Konzentrationen ($C_{\text{ATP}} \ll K_m$) vereinfacht sich die Formel wie folgt:

$$\text{Lichtintensität} = V_{\text{max}} \times C_{\text{ATP}}/K_m .$$

Daraus ergibt sich, dass die Menge an emittiertem Licht proportional zur ATP-Konzentration (C_{ATP}) ist.

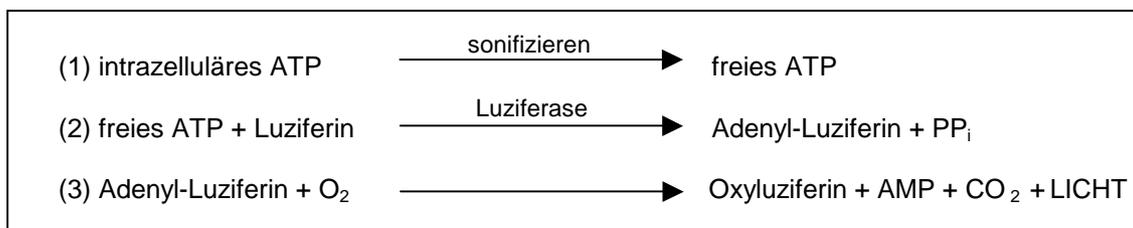


Abbildung 2.8: Testprinzip der Bestimmung des ATP-Gehalts. Die Lichtintensität ist direkt proportional zur ATP-Konzentration.

Chemikalien:

- Sonifikationslösung (Ethanol (70% v/v), 2 mM EDTA) (Ruben de Kanter 2002): Zunächst wurde 0,447 g EDTA in 150 ml destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert auf pH 10.9 mit 5 M NaOH eingestellt. Nach Auffüllen auf 163 ml mit destilliertem Wasser wurden 438 ml 96% Ethanol hinzugefügt.
- Verdünnungspuffer (100 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA) (Ruben de Kanter 2002): 6,0 g ($M=121,14$) Tris und 0,37 g EDTA wurden in 500 ml destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit 6 N HCl auf pH 7,6 eingestellt.
- Luziferase Reagenz (ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II, Roche)
- ATP-Standards von 10^{-6} bis 10^{-10} mol (ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II, Roche)

Material:

- Luminometer (SIRIUS Luminometer V2.2)
- 1 ml Eppendorf-Hütchen
- Cryo-Tubes
- flüssiger Stickstoff

Durchführung modifiziert nach Ruben de Kanter:

Ein Gewebeschnitt wurde in ein Cryo-Tube mit 300 µl Sonifikationslösung gelegt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Aufbewahrt wurden die Proben bis zur Messung bei -80°C. Kurz vor dem Messen wurden die Proben auf Eis mit dem Sonifikator homogenisiert.

Die Homogenate wurden im Verhältnis 1:10 mit der Tris-HCL-Lösung gemischt, um das Ethanol und das EDTA zu verdünnen sowie den pH-Wert zu normalisieren (50 µl Probe, 450 µl 0,1 M Puffer (pH=7,6)). Von dem verdünnten Homogenat wurden 50 µl in ein 1,5 ml-Eppendorf-Hütchen pipettiert und bis zur Messung bei 4°C auf Eis aufbewahrt. Die ATP-Standards wurden analog behandelt.

Gemessen wurde mit dem SIRIUS Luminometer V2.2. Die Arbeitsschritte wurden manuell durchgeführt, weswegen diese sekundengenau festgelegt waren. Zunächst wurden 50 µl des Luziferase-Reagenz zu der Probe pipettiert (0 Sekunden) und das Eppendorf-Hütchen in das geöffnete Schubfach des Luminometers gestellt (10 Sekunden). Nach genau 15 Sekunden wurde das Schubfach geschlossen und die Messung begann automatisch. Die am Gerät eingestellte Verzögerung betrug dabei 1 Sekunde, die Messzeit 10 Sekunden. Der ATP-Gehalt wurde anhand einer Standardkurve (10^{-6} mol ATP bis 10^{-10} mol ATP) ermittelt.

Normierungsparameter:

Um die ATP-Werte zu normieren, wurde aus den verwendeten Proben der Proteingehalt bestimmt. Dazu wurden zunächst 100 µl des unverdünnten Zell-Homogenats mit 395 µl PBS und 5 µl Proteinaseinhibitoren verdünnt, um den Ethanol- und EDTA-Gehalt herabzusetzen. In dieser Lösung konnte dann die Proteinmenge mit dem Protein-Assay von BIO-RAD bestimmt werden (siehe Kapitel 2.1.2.4)

Durchführung der Messung des ATP-Gehaltes ganzer Herzen:

Zur Messung des ATP-Gehalts ganzer Herzen wurden drei Herzen direkt nach der etwa einminütigen Operation in flüssigem Stickstoff für den ATP-Assay schockgefroren und der ATP-Gehalt wie oben beschrieben bestimmt. Um die

ATP-Konzentration der ganzen Herzen in den Bereich der Standardreihe herabzusetzen, wurde das sonifizierte Homogenat vor der Messung zweifach verdünnt. Der gemittelte Wert soll den ATP-Gehalt *in vivo* widerspiegeln.

2.1.2.3 LDH-Test

Die Laktatdehydrogenase ist ein zytosolisches Enzym, welches in allen kernhaltigen Zellen vorkommt. Bei gesunden lebenden Zellen ist es wegen seines hydrophilen Charakters nicht membrangängig. Es wird nicht aktiv sekretiert, so dass es bei intakten Zellen nicht im Extrazellulärraum zu finden ist.

Wird nun die Zellmembran beschädigt, was mit dem Zelltod einhergeht, gelangt das Enzym *per diffusionem* aus der Zelle hinaus ins umliegende Medium und kann hier nachgewiesen werden. Somit ist die LDH-Bestimmung ein Parameter für die Integrität der Zellmembran. Da die photometrische Bestimmung des LDH direkt nicht möglich ist, wird die Aktivität des Enzyms gemessen. Die Bestimmung der LDH-Aktivität erfolgt nach folgendem Prinzip:

In einem ersten Schritt wandelt die im Überstand enthaltene LDH zugegebenes Laktat in Pyruvat um, wobei äquivalent ein NAD^+ zu einem NADH/H^+ reduziert wird. Im zweiten Schritt überträgt ein Katalysator (Diaphorase) die Wasserstoffionen vom NADH/H^+ auf das Tetrazoliumsalz Iodotetrazoliumchlorid (INT), welches dadurch zu Formazan umgewandelt wird und bei 540 nm photometrisch bestimmt werden kann.

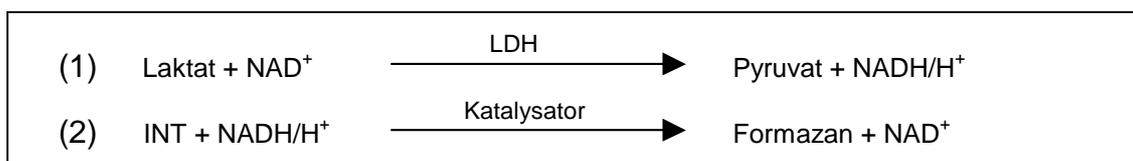


Abbildung 2.9: Testprinzip der Bestimmung der Laktatdehydrogenase-Aktivität. Da alle Reaktionen im Verhältnis 1:1 ablaufen, kann aus der Absorption des Formazans direkt die LDH-Konzentration bzw. Aktivität abgeleitet werden.

Chemikalien:

- Lösung A: Katalysator Diaphorase, NAD^+
- Lösung B: Färbelösung: Iodotetrazoliumchlorid (INT), Natriumlaktat

- Reaktionslösung: Für 100 Tests in der 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden 25 μ l Lösung A mit 11,25 ml Lösung B kurz vor der Benutzung zusammengegeben.
- 1 N HCL
- Triton-x-100
- LDH-Standard (0,2 U/ml bis 0,001 U/ml)

Material:

- Photometer Elisa-Reader μ -Quant
- 96-Loch-Mikrotiterplatten
- sterile Glasbecher (\varnothing 1,8 cm, Höhe von 4 cm)
- kalziumfreie Tyrode nach Yamashita et al.
- medizinischer Sauerstoff, Linde
- Spritzenkanülen von BD Microlance (\varnothing 0,9 mm, Länge 40 mm)
- Tropfenzähler (Dosi-Flow 10, Leventon, SA)

Durchführung:

Zur Darstellung der LDH-Freisetzung über die Zeit, musste ein geeigneter Versuchsaufbau mit ausreichend messbarer LDH-Konzentration im Überstand gewählt werden. Nach Vorversuchen wurde der folgende Aufbau gewählt:

Nach dem Schneidevorgang wurden die ersten fünf Schnitte eines Herzens zunächst in einem sterilen kleinen Glasbecher gesammelt. Die Glasbecher enthielten 2,5 ml gekühlte Tyrode, die zuvor bereits für 5 Minuten mit 100% Sauerstoff begast wurde. Die Oxygenierung der Tyrode erfolgte vor und während der Aufbewahrung über Spritzenkanülen. Die Sauerstoffmenge war über Tropfenzähler reguliert und betrug 20 ml O₂ in der Stunde. Aus dieser Tyrode erfolgten alle Abnahmen. Pro Untersuchungszeitpunkt wurden aus dem Glasbecher dreimal 100 μ l in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert. Die dadurch evozierte Volumenveränderung wurde am Ende in die Berechnung des LDH-Quotienten aufgenommen.

Zur Durchführung des LDH-Tests wurden je 100 μ l der Reaktionslösung in jedes Well der 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben und diese vor Licht geschützt

25 Minuten lang bei Raumtemperatur (21°C – 23°C) inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 1 molarer HCl pro Well gestoppt und die Absorption bei 540 nm mit dem Elisa-Reader µ-Quant gegen eine identisch hergestellte Leerprobe gemessen. Die LDH-Aktivität [U/ml] wurde anhand einer LDH-Standard-Eichkurve ($y = 0,0562x + 0,0078x^2$; $r^2 = 0,999$) ermittelt und mit dem Total-LDH als Referenzwert (siehe unten) ins Verhältnis gesetzt.

Referenzwert

Als Referenzwert wurde das Gesamt-LDH der Schnitte bestimmt. Dazu wurden die Schnitte am Ende des Experimentes 12 Stunden in 1 ml 1% Triton-x-100 inkubiert und das dadurch vollständig freigesetzte LDH im Überstand bestimmt und als 100% festgesetzt.

2.1.2.4 Bio Rad Protein-Assay

Zur Proteinbestimmung wurde der Bio-Rad Protein-Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, München), welcher auf der Methode von Bradford basiert, verwendet (Bradford 1976). Die Proteinbestimmung nach Bradford ist gekennzeichnet durch eine hohe Empfindlichkeit. Von Vorteil ist die geringe Interferenz mit anderen Substanzen, was eine stabile und valide Messung ermöglicht. Der Nachweis beruht auf der Bindung von Coomassie Brilliantblau an Proteine über spezifische hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen. Bei der Bindung wechselt das Absorptionsmaximum der Reaktionslösung von 465 nm (rot) nach 595 nm (blau) und kann photometrisch bestimmt werden (Reisner et al. 1975; Sedmak and Grossberg 1977).

Chemikalien:

- Reaktionslösung: Bio-Rad Reagenz (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- BSA-Proteinstandard (5µg/ml – 80 µg/ml)

Material:

- Photometer Elisa-Reader µ-Quant

- 96-Loch-Mikrotiterplatten

Durchführung:

Je 160 μl der Proben bzw. Standards wurden in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurden pro Well 40 μl unverdünnte Bio-Rad Reagenz hinzugeben und durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte bei 595 nm im Photometer gegen eine identisch hergestellte Leerprobe gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer mitgeführten BSA-Standard-Eichkurve (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ – 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$) berechnet.

2.1.2.5 Modified Lowry Protein-Assay

Zur Proteinbestimmung für die Normierung des MTT-Tests (vgl. 2.1.2.1) wurde der Modified Lowry Protein-Assay Kit von Pierce verwendet.

Die Proteinbestimmung nach Lowry wurde in diesem Ansatz gewählt, da die Absorbtion bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen wird und somit in Verbindung mit dem MTT-Test nicht durch das bereits in der Lösung befindliche Formazan (400 nm - 650 nm) beeinflusst wird (siehe Abbildung 2.10).

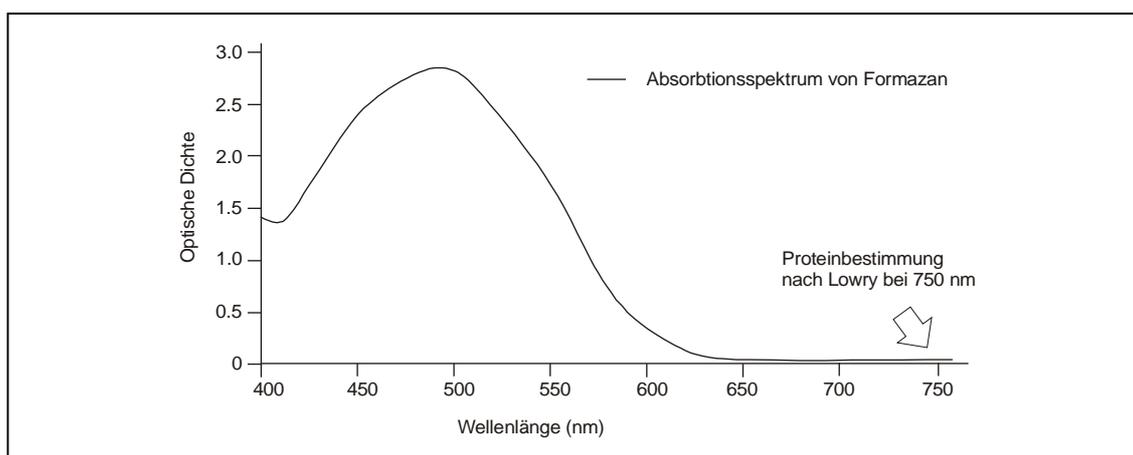


Abbildung 2.10: Absorbtionsspektrum von Formazan. Bei 750 nm keine messbare Absorbtion und somit keine Interaktion bei der Proteinbestimmung.

Das Prinzip dieser Proteinbestimmung beruht auf zwei Schritten: Die Reaktion des Stickstoffs aus der Peptidbindung mit zweiwertigem Kupfer in alkalischer

Lösung sowie anschließend die Reduktion von Heteropolysäuren (enthalten in dem Folinreagens) durch den Protein-Kupfer-Komplex (LOWRY et al. 1951). Die resultierende Blaufärbung kann anschließend bei 750 nm photometrisch bestimmt werden.

Chemikalien:

- Lösung A: Modified Lowry Reagenz (Pierce)
- Lösung B: 1 Teil Folin-Reagenz mit 1 Teil destilliertem Wasser
- BSA-Proteinstandard (1 µg/ml – 80 µg/ml)

Material:

- Photometer Elisa-Reader µ-Quant
- 96-Loch-Mikrotiterplatten

Durchführung:

Je 40 µl der zu messenden Protein-Lösung wurden in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert und bei konstanter Raumtemperatur im Bereich von 21°C bis 23°C zehn Minuten lang mit 200 µl der Lösung A inkubiert. Anschließend wurden 40 µl der Lösung B hinzugefügt und weitere 30 Minuten inkubiert. Nach genau 30 Minuten wurde die Platte bei 750 nm mit dem Elisa-Reader gegen eine identisch hergestellte Leerprobe gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer mitgeführten Albumin-Standard-Eichkurve ermittelt.

2.1.2.6 Umrechnung zwischen den Proteinassays

Ein Myokardschnitt hat (gemessen mit dem Bradford-Protein Assay) im Mittel ein Proteingehalt von 39 +/- 2 µg (n=15) und (gemessen im Lowry-Protein-Assay) 124 +/- 10 µg (n=15). Daraus ergibt sich, dass 1 µg Protein im Bradford-Assay 3,15 µg Protein im Lowry-Assay entspricht. Der besseren Vergleichbarkeit der Grafiken wegen wurde das Experiment 1 (vgl. Ergebnisse), bei dem die ATP-Messung noch mit dem Lowry-Assay kombiniert wurde auf die Proteinmenge im Bradford-Assay umgerechnet.

2.1.2.7 Trypanblau-Färbung

Zur Lokalisierung des Gewebes Schadens innerhalb der Schnitte wurde eine Trypanblau-Färbung durchgeführt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Trypanblau dringt ausschließlich durch *defekte* Zellmembranen in das Zytosol ein und färbt Zellkern und Zytosol tiefblau. Lebende Zellen werden hingegen nicht angefärbt. Anhand der Blaufärbung der Gewebeschnitte kann man somit Rückschlüsse auf die Vitalität ziehen.

Material:

- Trypanblau-Lösung 0,1%
- PBS
- Paraformaldehyd (PFA) 4% zur Fixierung

Durchführung:

Die Gewebeschnitte wurden für genau 10 Minuten bei Raumtemperatur in 1% Trypanblau-Lösung inkubiert. Anschließend wurde mehrfach mit PBS gespült und die Schnitte über Nacht in 4% PFA fixiert. Die Auswertung wurde in 30-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop durchgeführt.

2.1.3 **Elektrophysiologische Untersuchung**

2.1.3.1 *Mikro-Elektroden Arrays (MEAs) – Messung der Feldpotenziale*

In dieser Arbeit wurde das MEA-System benutzt, um die elektrische Aktivität der erstellten Gewebeschnitte zu dokumentieren. Hierzu gehört insbesondere die Auswertung der Schlagfrequenz, die Analyse der Feldpotenziale und die Messung der Erregungsausbreitung.

Aufbau des MEA-Setups:

Die extrazelluläre Messung von Feldpotenzialen wurde mit Hilfe von MEAs durchgeführt, die 60 in den Boden einer Kulturschale integrierte Elektroden enthalten. Die einzelnen Elektroden (vgl. Abbildung 2.11 D) haben einen Durchmesser von 30 μm und sind in Form eines Quadrats mit einem

horizontalen und vertikalen Abstand von 200 μm zwischen den Elektroden angeordnet (vgl. Abbildung 2.11 C). Als Erdung dient eine im Boden der MEAs integrierte Erdungselektrode. Nach Einlegen der MEAs in das Verstärker-System (vgl. Abbildung 2.11 A) wurden die Daten aller 60 Elektroden simultan mit Hilfe einer speziellen Software (MC-Rack) digital aufgezeichnet. Das MEA-System beinhaltet zudem eine Heizvorrichtung des Bodens, um die Temperatur innerhalb des MEAs auch während der Messung konstant zu halten.

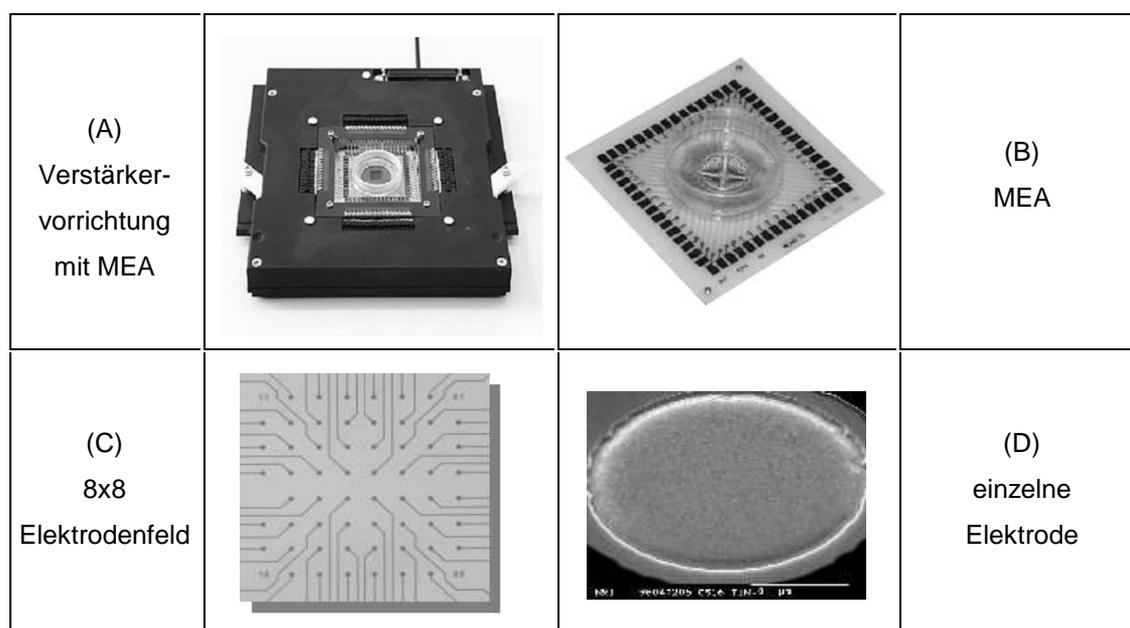


Abbildung 2.11: Aufbau der Mikro-Elektroden Arrays. Mit dieser Methode kann die elektrische Aktivität der Herzgewebeschnitte bestimmt werden (Bilder: Multi Channel Systems).

Material:

- MEAs (Multi Channel Systems, Reutlingen, Deutschland)
- Verstärker-System (Multi Channel Systems, Reutlingen, Deutschland)
- Heizvorrichtung (Multi Channel Systems, Reutlingen, Deutschland)
- MC-Rack-Software (Multi Channel Systems, Reutlingen, Deutschland)
- Medium (20% Iscove)

Durchführung:

Die MEAs wurden mit 300 μl 37°C warmen Medium gefüllt und die

Gewebeschnitte unter dem Mikroskop mittig auf den Elektroden platziert (Abbildung 2.13 A). Nach Einlegen des MEAs in den Verstärker wurde zunächst fünf Minuten gewartet, bevor die Messung mittels der Software MC-Rack mit einer Aufnahme-Frequenz von 2 kHz bei 37°C startete. Die Aufnahme der Feldpotenziale erfolgte für jeden untersuchten Gewebeschnitt über 5 Minuten (Abbildung 2.12). Die Daten wurden anschließend mit einer auf MATLAB basierenden Software analysiert und ausgewertet (Banach et al. 2003b, Egert et al. 2002).

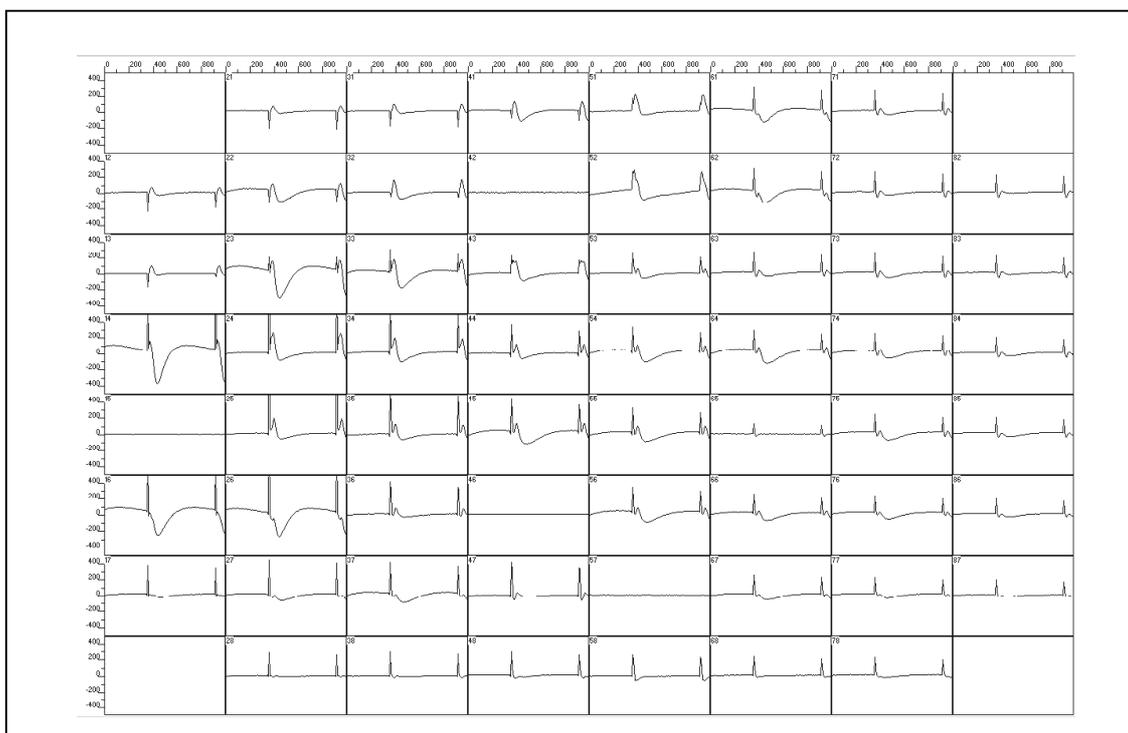


Abbildung 2.12: Beispielhafte Aufzeichnung der elektrischen Aktivität eines Herzgewebeschnittes auf einem MEA mit MC-Rack.

2.1.3.2 Bestimmung der Herzfrequenz

Zur Bestimmung der Herzfrequenz der Schnitte wurde eine MEA-Elektrode repräsentativ für den gesamten Schnitt ausgewählt. Mittels MATLAB konnte nach Programmierung der Einstellung eine sehr genaue Auswertung der Potenziale und deren Abstände über die Zeit durchgeführt werden.

Aus dem gemittelten Abstand der Feldpotenziale (ISI) lässt sich rechnerisch die Frequenz bestimmen ($1000/ISI \times 60$ Sekunden).

2.1.3.3 Feldpotenziale und Erregungsausbreitung

Die detaillierte Analyse der auf den MEAs platzierten Gewebeschnitten (Abbildung 2.13 A) basiert auf der Untersuchung der über den einzelnen Elektroden gemessenen Feldpotenziale (Abbildung 2.13 B) sowie der Verteilung der Erregung über dem gesamten Gewebeschnitt. Die Auswertung wurde mit der Software MATLAB durchgeführt. Aus den aufgezeichneten Daten können zur optischen Darstellung der elektrischen Erregung so genannte Konturplots erstellt werden (Abbildung 2.13 D), in denen die über den einzelnen Elektroden gemessenen Feldpotenziale farbige dargestellt sind. Der Vergleich einzelner Zeitpunkte im Verlauf kann Aufschlüsse über die Erregungsausbreitung geben (vgl. Ergebnisse).

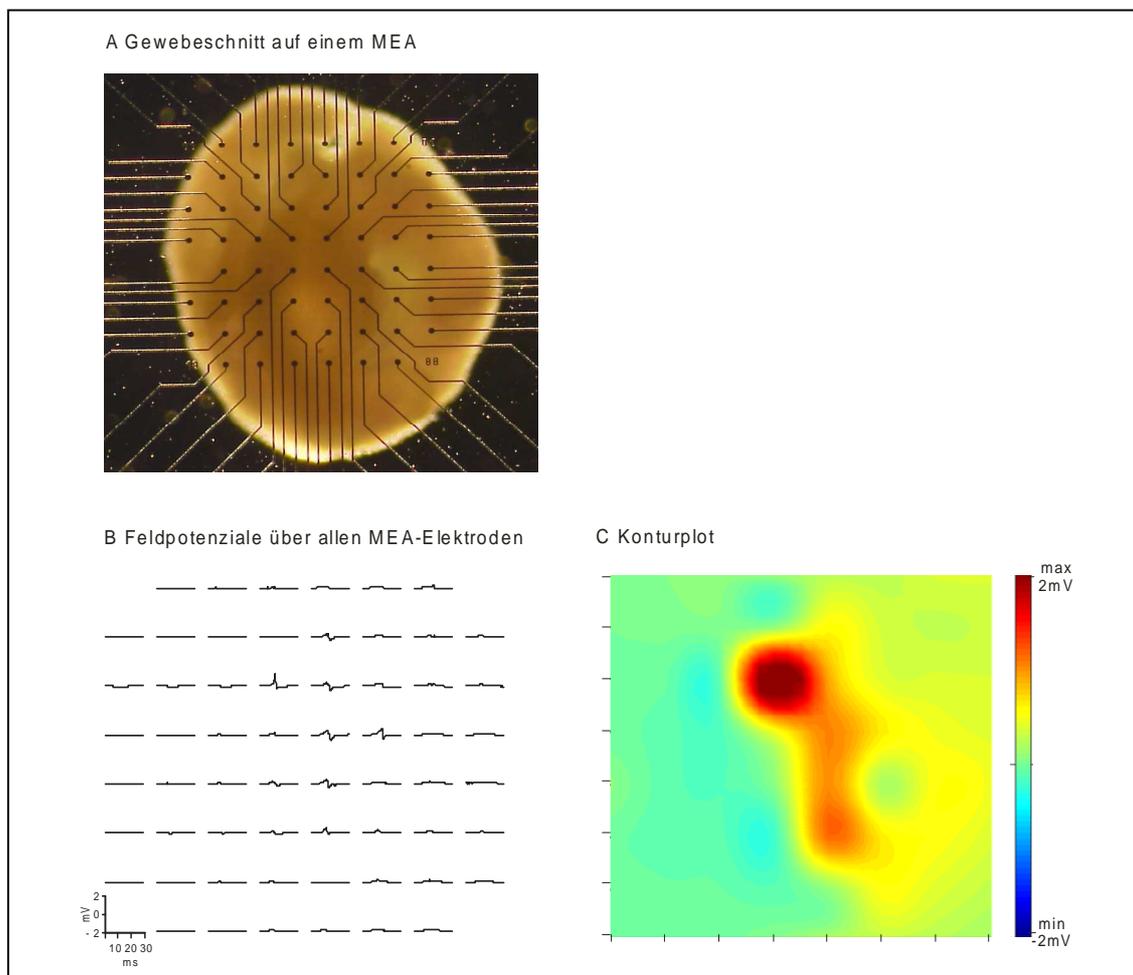


Abbildung 2.13: A Gewebeschnitt auf dem 8x8-Elektrodenfeld eines MEAs, B Übersicht der Potenziale über den 60 MEA-Elektroden, C Farbige Darstellung der Feldpotenzialamplituden als Konturplot .

2.1.4 Histologie

2.1.4.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Aus den Myokardgewebeschnitten wurden für histologische Färbungen 7 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt.

Material:

- Cryotom CM 3050S, Leica
- adhäsive, silanisierte Objektträger (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland)
- feiner Pferdehaarpinsel

Chemikalien:

- Saccharose 18% (Merk, Darmstadt, Deutschland)
- PFA 4%
- Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande)

Durchführung:

Die Gewebeschnitte wurden zunächst in 4% PFA für mehrere Stunden oder über Nacht fixiert. Zur Entwässerung wurde das Gewebe anschließend für 24 Stunden in 18% Saccharose-Lösung im Kühlschrank belassen. Das Einfrieren in „Tissue Tek“, ein speziell für Gefrierschnitte verwendetes Einbettungsmittel, erfolgte bei -80°C. Die gleiche Temperatur diente auch der Aufbewahrung der Gewebeschnitte bis zum Schneiden.

Die Gefrierschnitte wurden im Cryotom CM 3050S von Leica bei einer Blocktemperatur von -20°C angefertigt, wobei die Schnittdicke 7 µm betrug. Auf Adhäsions-Objektträger aufgezogen wurden die Gefrierschnitte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.1.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Als standardisierte Übersichtsfärbung wurde die Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach Mayer eingesetzt. Bei dieser Färbung werden die Kerne der Zellen durch

Anlagerung des blauen Hämalaun an die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren in tiefem Blau bis Violett gefärbt. Das Zytosol und die Zellmembranen werden durch Anlagerung des negativ geladenen Eosins an die positiv geladenen Proteine in einem zweiten Schritt rot gefärbt.

Material:

- Glasbehälter mit passenden Glasküvetten
- Deckgläßchen (20 x 55 mm)

Chemikalien:

- Hämalaun nach Mayer
- Eosinlösung (5%, versetzt mit wenigen Tropfen Essigsäure)
- Ethanol (70%, 96%, 100%)
- Xylol, Sigma
- Entellan, Sigma

Durchführung:

Zunächst wurden die Objektträger in eine mit der Hämalaun-Lösung gefüllte Glasküvette gestellt und diese für 7 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach kurzem Spülen mit deionisiertem Wasser wurde die Küvette für 15 Minuten zum „Bläuen“ (Einstellen des pH-Wertes auf $\text{pH} > 3$) unter fließendes Leitungswasser gestellt und am Schluss erneut in deionisiertem Wasser gespült.

In 5% Eosin-Lösung erfolgte für 2 Minuten ebenfalls in einer Küvette die Gegenfärbung der Schnitte. In einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) wurden diese anschließend entwässert, wobei sie in jedem Alkohol-Ansatz für eine Minute belassen wurden. Zum Schluss wurden die Schnitte für 5 Minuten in Xylol inkubiert und mit einem Tropfen Entellan eingedeckelt.

2.1.5 Statistik

Die Speicherung und Umrechnung der Rohdaten erfolgte jeweils in einer Excel-Tabelle (MS Office 2000, Microsoft Corporation, USA), die statistische Analyse

fand anhand der Software SPSS 11.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, USA) statt. Die Diagramme wurden mittels Sigma-Plot® 8.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, USA) erstellt, allgemeine Grafiken mit Corel Draw 11. Alle Daten wurden jeweils als Mittelwerte mit Standardabweichung in den Abbildungen dargestellt.

Für den Vergleich zweier Gruppen wurde zunächst die Varianzgleichheit mit dem Levene-Test untersucht. Anschließend wurden mittels T-Test für ungebundene Stichproben die Unterschiede im Mittelwert zum Niveau $\alpha=0,05$ getestet. Eine Signifikanz zu diesem Niveau ist in den Abbildungen mit einem Sternchen (*) versehen. Der p-Wert sowie die wichtigsten statistischen Größen werden zusätzlich in Tabellen angegeben.

2.2 Material

2.2.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelt es sich um 34 +/- 13 Stunden alte neonatale Mäuse des Wild-Typ Stammes H1MOF1 mit einem durchschnittlichen Gewicht von 2,21 +/- 0,04 g. Die Elterntiere wurden unter Standardbedingungen der Universität zu Köln bei 12-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus mit Zugang zu Wasser und Futter *ad libitum* dauerverpaart. Bis kurz vor den Experimenten wurde der Wurf bei den Eltern belassen. Alle Experimente wurden nach den Richtlinien der Universität zu Köln durchgeführt.

2.2.2 Elektrolytlösungen und Medien

Die Präparation der Gewebeschnitte wurde, wenn nicht anders angegeben, in der folgenden kalziumfreien Tyrode (Yamashita et al. 2004) durchgeführt.

Kalziumfreie Tyrode (mmol/l): NaCl 136; KCl 5,4; NaH₂PO₄ 0,33; MgCl₂ 1,0; D-Glucose 10; Hepes 5. Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH bei Raumtemperatur auf pH 7,4 eingestellt.

Wenn nicht anders angegeben war die Tyrode auf 4°C heruntergekühlt und mit 100% Sauerstoff begast.

Kalziumhaltige Tyrode I (mmol/l): NaCl 136; KCl 5,4; NaH₂PO₄ 0,33; CaCl 0,9; MgCl₂ 1,0; D-Glucose 10; Hepes 5. Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH bei Raumtemperatur auf pH 7,4 eingestellt.

Diese Lösung wurde zur Kalziumtoleration (siehe Methodenteil) benutzt.

Kalziumhaltige Tyrode II (mmol/l): (NaCl 136; KCl 5,4; NaH₂PO₄ 0,33; CaCl 1,4; MgCl₂ 1,0; D-Glucose 10; Hepes 5. Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH bei Raumtemperatur auf pH 7,4 eingestellt.

Die Inkubation der Gewebeschnitte sowie die elektrophysiologischen Messungen auf den MEAs fanden allesamt in folgendem Medium statt.

20 % Iscove's-Medium:

77,9% Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), Gibco

20% heat inaktiviertes fetales Kälberserum

1% nichtessentielle Aminosäuren

1% Pen-Strep

0,1% β -Mercaptoethanol

2.2.3 Zusätze/Veränderungen der Elektrolytlösung

2.2.3.1 2,3-Butanedionemonoxim (BDM)

Material:

- 2,3-Butanedionemonoxime

Durchführung:

Der standardmäßig benutzten Elektrolytlösung (siehe 2.2.2) wurde 30 mmol BDM zugesetzt. Die Präparation der Gewebeschnitte wurde ansonsten ohne Veränderung bis zur Inkubation durchgeführt. Vor der Inkubation wurden die Gewebeschnitte (auch die Vergleichsgruppe) dreimal in 3 ml frischem Medium für drei Minuten ausgewaschen, um das BDM vollständig zu entfernen.

2.2.3.2 Ethylen-glyco-tetra-acetat (EGTA)

Material:

- Ethylen-glyco-tetra-acetat

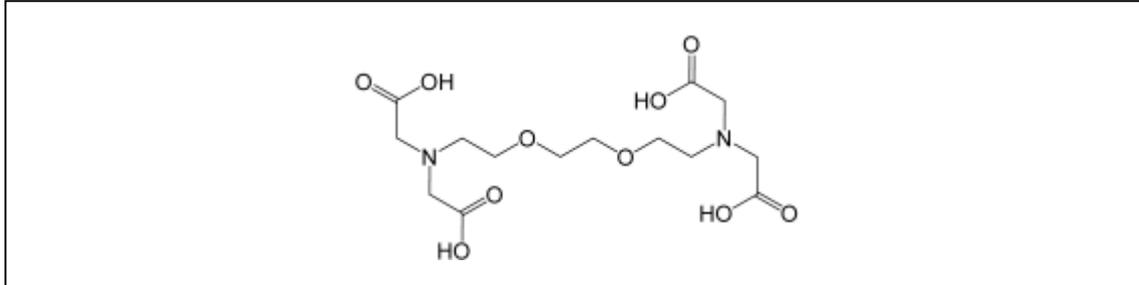


Abbildung 2.14: Strukturformel von EGTA. Neben den zwei freien Elektronenpaaren der Stickstoffe verfügt EGTA über vier Carboxylgruppen, mit denen es Kationen wie Kalzium binden kann.

Durchführung:

Der standardmäßig benutzten Elektrolytlösung (siehe 2.2.2) wurde 1 mmol EGTA zugesetzt. Die Präparation der Gewebeschnitte wurde ansonsten ohne Veränderung durchgeführt. Die Kalziumtoleration (Tyrode I) erfolgte dann ohne EGTA-Zusatz genau wie die Inkubation (20% Iscove).

2.2.3.3 Kalzium

Material:

- Kalziumchlorid

Durchführung:

Das Ausgangsprotokoll wurde verglichen mit einer Präparation in der oben beschriebenen Tyrode II (1,4 mmol Kalzium). Anstelle der Kalziumtoleration erfolgte für denselben Zeitraum eine Aufbewahrung in Tyrode II.

2.2.4 *Materialliste (alphabetisch sortiert)*

Labor- und Elektrogeräte

- Cryotom CM 3050S; Leica (Wetzlar, Deutschland)
- Elisa-Reader; μ -Quant
- gasdichte Kammer, Werkstatt der Universität zu Köln
- Magnetrührer IKAMAG[®]; Janke & Kunkel GmbH (Staufen, Deutschland)
- MC-Rack-Software; Multi Channel Systems (Reutlingen, Deutschland)
- MEA-Heizvorrichtung; Multi Channel System (Reutlingen, Deutschland)
- MEA-Verstärker-System; Multi Channel Systems (Reutlingen, Deutschland)
- Mikro-Elektroden Arrays; Multi Channel Systems (Reutlingen, Deutschland)
- Operations-Mikroskop WILDM8; Leica (Wetzlar, Deutschland)
- PH-Meter 766 Calimatic; Knick (Brandenburg, Deutschland)
- Präzisionswaage BP121S; Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
- Rollerpumpe minipuls 2; GILSON (Villiers le Bel, Frankreich)
- Saugpump-Vorrichtung zur Sogfixierung, Werkstatt der Universität zu Köln
- SIRIUS Luminometer V2.2; Zylus (Oak Ridge, Tennessee)
- Sonifikator, Bandelin Electronics (Berlin, Deutschland)
- Vibrotom D.S.K. Microslicer[®]; Dosaka (Japan)
- Vortex Genie 2; Scientific Industries (New York, USA)
- Wasserbad; Köttermann (Uetze-Haningen, Deutschland)
- Zentrifuge; Sigma (Steinheim, Deutschland)

Operations-Besteck

- anatomische Pinzetten gebogen; AESCULAP (Tuttlingen, Deutschland)
- anatomische Pinzetten klein; AESCULAP (Tuttlingen, Deutschland)
- chirurgische Pinzetten klein und groß; AESCULAP (Tuttlingen, Deutschland)

- chirurgische Schere klein und groß; AESCULAP (Tuttlingen, Deutschland)

Verbrauchsmaterialien

- 96-Loch-Mikrotiterplatten; Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
- Cryo-Tubes; Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
- Deckgläßchen (20 x 55 mm)
- deionisiertes Wasser
- Einmalhandschuhe Gentel Skin; Meditrade (Kiefersfelden, Deutschland)
- Einmalskalpelle (steril); Feather (Osaka, Japan)
- Eiswürfelform
- Eppendorf-Cups (1 ml); Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
- Eppendorf-Cups (1,5 ml); Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
- feiner Pferdehaarpinsel
- Glasbecher (\varnothing 1,8 cm, Höhe von 4 cm)
- Glasbehälter mit passenden Glasküvetten für HE-Färbung
- Goldnetz (\varnothing der Maschen 10 μ m); Werkstatt der Universität zu Köln
- kleiner Metallzylinder (\varnothing 1,2 cm); Werkstatt der Universität zu Köln
- medizinischer Sauerstoff; Linde (Unterschleißheim, Deutschland)
- Messbecher
- Objektträger adhäsiv, silanisiert; Marienfeld (Lauda-Königshofen, Deutschland)
- Spitzen für Eppendorfpipetten; Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
- Spritzenkanülen (\varnothing 0,9 mm , Länge 40 mm); Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
- Stahlklingen; Campden Instruments (Leicester, England)
- Tropfenzähler „Dosi-Flow 10“; Leventon (Barcelona, Spanien)
- Zellkulturschalen (\varnothing 5 cm); VWR (Darmstadt, Deutschland)
- Zellkulturschalen (\varnothing 9,2 cm); VWR (Darmstadt, Deutschland)

Chemikalien und Lösungsmittel

- Agarose Low Melt; Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
- Agarose Ultra Low Melt; Sea Prep® (Cambrex, Rockland, USA)
- Albumin Standard; Pierce (Rockford II, USA)
- ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II; Roche (Basel, Schweiz)
- ATP-Standard; Roche (Basel, Schweiz)
- Bio-Rad Reagenz; Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
- Butanedionemonoxim (BDM)
- CaCl₂; Sigma (Steinheim, Deutschland)
- DMSO; Sigma (Steinheim, Deutschland)
- EDTA; Sigma (Steinheim, Deutschland)
- EGTA; Sigma (Steinheim, Deutschland)
- Entellan; Sigma (Steinheim, Deutschland)
- Eosinlösung ; Sigma (Steinheim, Deutschland)
- Ethanol (70%, 96%, 100%)
- fetales Kälberserum; Gibco (Los Angeles, USA)
- flüssiger Stickstoff
- Glucose; Sigma (Steinheim, Deutschland)
- Hämalan nach Mayer
- HCL; Sigma (Steinheim, Deutschland)
- Hepes
- Iscove's Modified Dulbecco's Medium; Gibco (Los Angeles, USA)
- KCl; Merk (Darmstadt, Deutschland)
- LDH-Standard (0,2 U/ml bis 0,001 U/ml)
- Methanol
- MgCl₂; Sigma (Steinheim, Deutschland)
- MTT; Sigma (Steinheim, Deutschland)
- NaCl, NaH₂PO₄, NaOH (0,1 M); Sigma (Steinheim, Deutschland)
- nichtessentielle Aminosäuren; Sigma (Steinheim, Deutschland)
- Paraformaldehyd; Merk (Darmstadt, Deutschland)
- Pen-Strep

- Proteinaseinhibitoren; Sigma (Steinheim, Deutschland)
- Saccharose; Merk (Darmstadt, Deutschland)
- Sekundenkleber „Blitz Kleber flüssig“; Henkel KgaA (Düsseldorf Deutschland)
- Solubilisation Lösung; Sigma (Steinheim, Deutschland)
- Tissue-Tek O.C.T. Compound; Sakura Finetek (Zoeterwoude, Niederlande)
- Tris-HCl ; Merk (Darmstadt, Deutschland)
- Triton-X 100; Sigma (Steinheim, Deutschland)
- Trypanblau (0,4%), Sigma, Steinheim, Deutschland

3 Ergebnisse

3.1 ATP-Gehalt der Herzen *in vivo*

Um eine Vorstellung zu bekommen, welchen ATP-Gehalt das Myokard eines neonatalen Mausherzens *in vivo* hat, wurden drei ganze Herzen direkt nach der etwa einminütigen Operation in flüssigem Stickstoff schockgefroren und der ATP-Gehalt wie im Methodenteil beschrieben bestimmt. Zum direkten Vergleich wurde der ATP-Gehalt in Herzgewebeschnitten eine Stunde nach dem Schneiden bestimmt und mit den *in vivo*-Daten verglichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

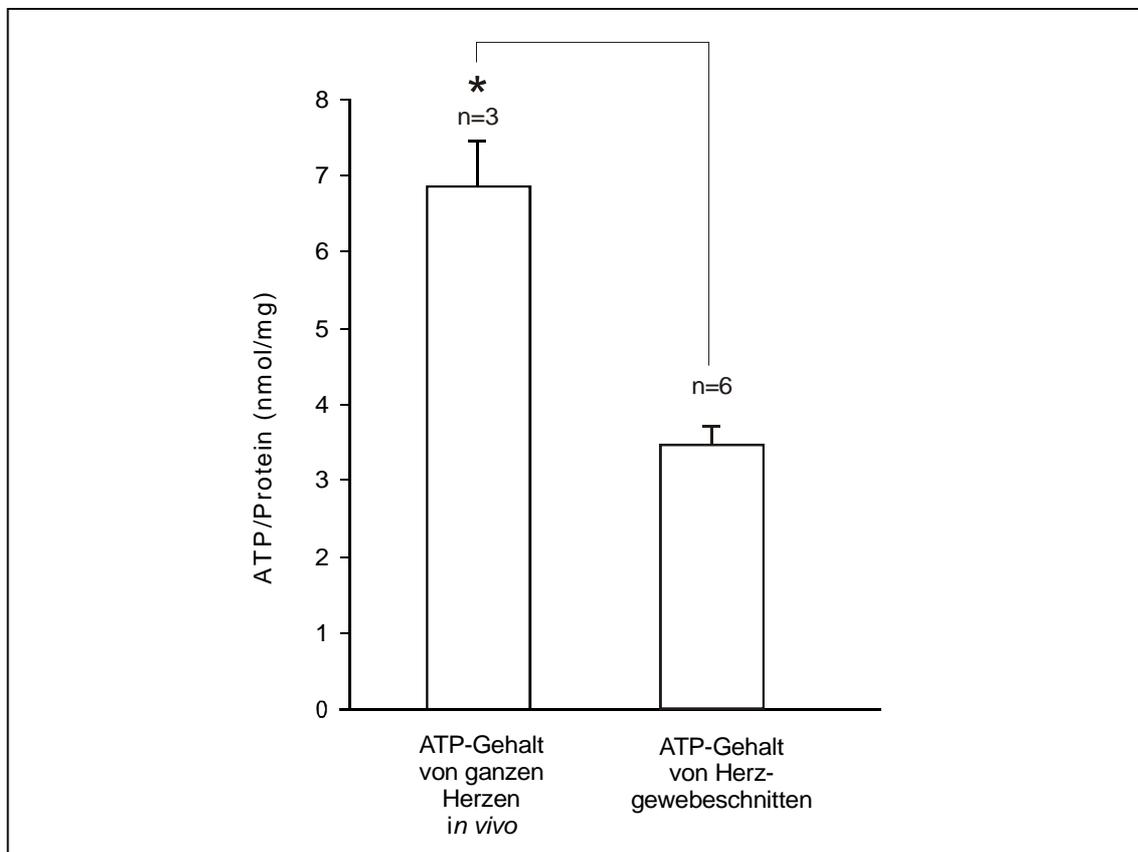


Abbildung 3.1: Der ATP-Gehalt von ganzen Herzen direkt nach der Operation im Vergleich zum ATP-Gehalt von Herzgewebeschnitten präpariert nach dem Ausgangsmodell. Die Balken repräsentieren den Mittelwert, die Fehlerbalken den SEM. Das Sternchen (*) zeigt signifikant höhere ATP-Werte zum Niveau $\alpha < 0,05$ an.

Der ATP-Gehalt der Herzgewebeschnitte ist im Vergleich zum ATP-Gehalt in den ganzen Herzen signifikant geringer (vgl. Tabelle 3.1).

Ziel der folgenden Experimente sollte es daher sein, die Präparation der Herzgewebeschnitte so zu verbessern, dass der ATP-Gehalt der Gewebeschnitte annähernd dem ermittelten ATP-Gehalt *in vivo* entspricht.

Gruppe	Allgemeine Statistik			T-Test		
	n	Mittelwert	SEM	T	FG	p-Wert
Ganze Herzen	3	6,9041	0,5876	-5,0433	7	0,0015
Herzgewebeschnitte	6	3,4722	0,2360			

Tabelle 3.1: ATP-Gehalt (nmol/mg) ganzer Herzen im Vergleich mit dem ATP-Gehalt von Herzgewebeschnitten eine Stunde nach dem Schneiden.

3.2 Verbesserung der Präparation der Herzgewebeschnitte

Um die Präparation der Herzgewebeschnitte zu untersuchen und zu verbessern wurden sieben Experimente geplant, in denen die kritischen Parameter (siehe oben) analysiert wurden. Die Vitalität der Gewebeschnitte wurde jeweils eine Stunde nach dem Schneiden und nach 24 Stunden im Inkubator mit dem ATP-Test untersucht.

Die erste Versuchsreihe (Experiment 1) unterscheidet sich von den darauf folgenden Experimenten; die hier beschriebene Fragestellung wurde mit drei biochemischen Endpunkten (MTT, ATP und LDH) untersucht, um die Assays untereinander auf Aussagekraft und Anwendungsmöglichkeiten zu testen. Sie diente somit zur Orientierung hinsichtlich der biochemischen Assays und deren Anwendung sowie zur Analyse der Präparation. Es wurde strikt darauf geachtet, dass die Parameter, die nicht im Fokus des jeweiligen Experiments standen, in den Gruppen konstant gehalten wurden. Zur besseren Übersicht sind im Folgenden alle untersuchten Parameter vorab in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Experiment	Parameter	Ausgangsmodell	Alternative
Experiment 1	Fixierung an der Arbeitsbühne	Agarose-Einbettung	Sogfixierung
Experiment 2	Schnittdicke	300 μm	200 μm
Experiment 3	Operation	Herz <i>in toto</i>	nur Ventrikel
ADDITIVA DER ELEKTROLYTLÖSUNG			
Experiment 4	BDM	ohne BDM	mit 30 mmol BDM
Experiment 5	Kalzium	ohne Kalzium	mit 1,4 mmol Kalzium
Experiment 6	EGTA	ohne EGTA	mit 1mmol EGTA
Experiment 7	Temperatur	4°C	Raumtemperatur (21°C)

Tabelle 3.2: Zusammenfassung der untersuchten Parameter. In den Experimenten 1 bis 3 wurden die wichtigsten Schritte der Präparation analysiert. Die Experimente 4 bis 7 untersuchen insbesondere Additiva der Elektrolytlösung.

3.2.1 Experiment 1: Fixierung der Herzen auf der Arbeitsbühne

Um den Einfluss der Fixierung der Herzen an der Arbeitsbühne zu untersuchen wurden zwei Möglichkeiten verglichen: die Einbettung der Herzen in Agarose (1) und die Sogfixierung (2) (vgl. Abbildung 3.2). Alle anderen Faktoren im Protokoll wurden, bei beiden Gruppen konstant gehalten (siehe Tabelle 3.3).

	Agarose-Einbettung (n=19) (Mittelwert+/-S.E.M)	Sog-Fixierung (n=12) (Mittelwert+/-S.E.M)
Außentemperatur (°C)	20,63+/-2,71	21,92+/-1,62
Alter der Maus (h)	30,32+/-10,86	34,00+/-12,36
Temperatur beim Schneiden (°C)	7,74+/-1,63	8,33+/- 1,09
Dauer der Präoxygenation (min)	6,95+/-1,08	7,58+/-2,28
Dauer der OP (min)	2,22+/-1,01	1,90+/-0,74
Fixierungszeit (min)	5,84+/-2,48	4,00+/-2,45
Zeit Schneidevorgang (min)	6,37+/-1,12	7,50+/-1,09
Zeit insgesamt (min)	13,05+/-2,82	14,50+/-2,68

Tabelle 3.3: Vergleich der Dauer der einzelnen Präparationsschritte in den untersuchten Gruppen. Die Unterschiede sind statistisch nicht relevant.

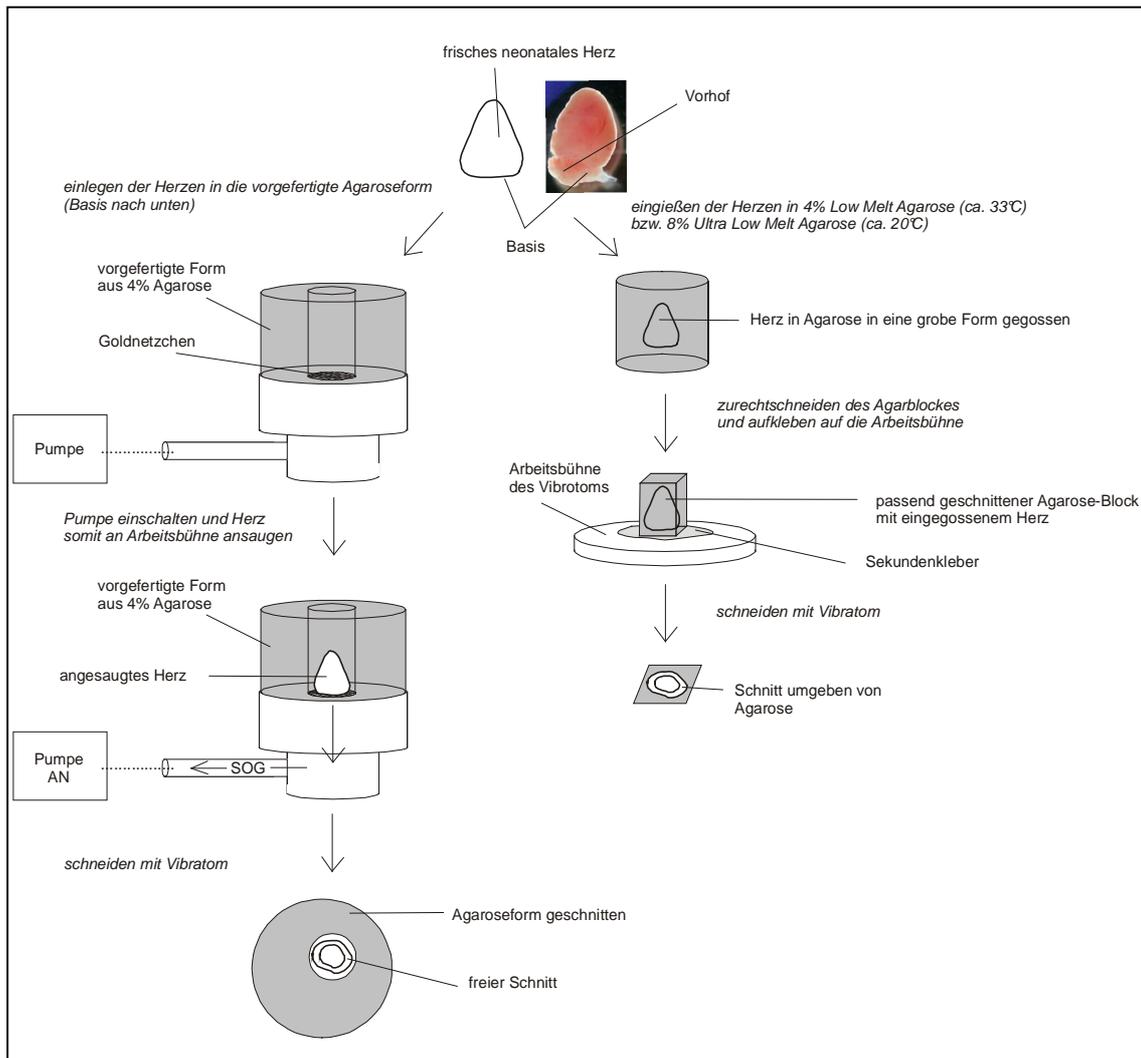


Abbildung 3.2: Darstellung der untersuchten Methoden zur Fixierung der Herzen auf der Arbeitsbühne des Vibrotoms.

3.2.1.1 MTT-Assay

Pro Gruppe wurden je drei unabhängige Experimente durchgeführt, bei denen zu den angegebenen Zeitpunkten (eine Stunde nach dem Schneiden (ZP1), eine Stunde nach Inkubation (ZP2) und 3 Stunden nach Inkubation (ZP3)) je zwei Schnitte untersucht wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3 dargestellt.

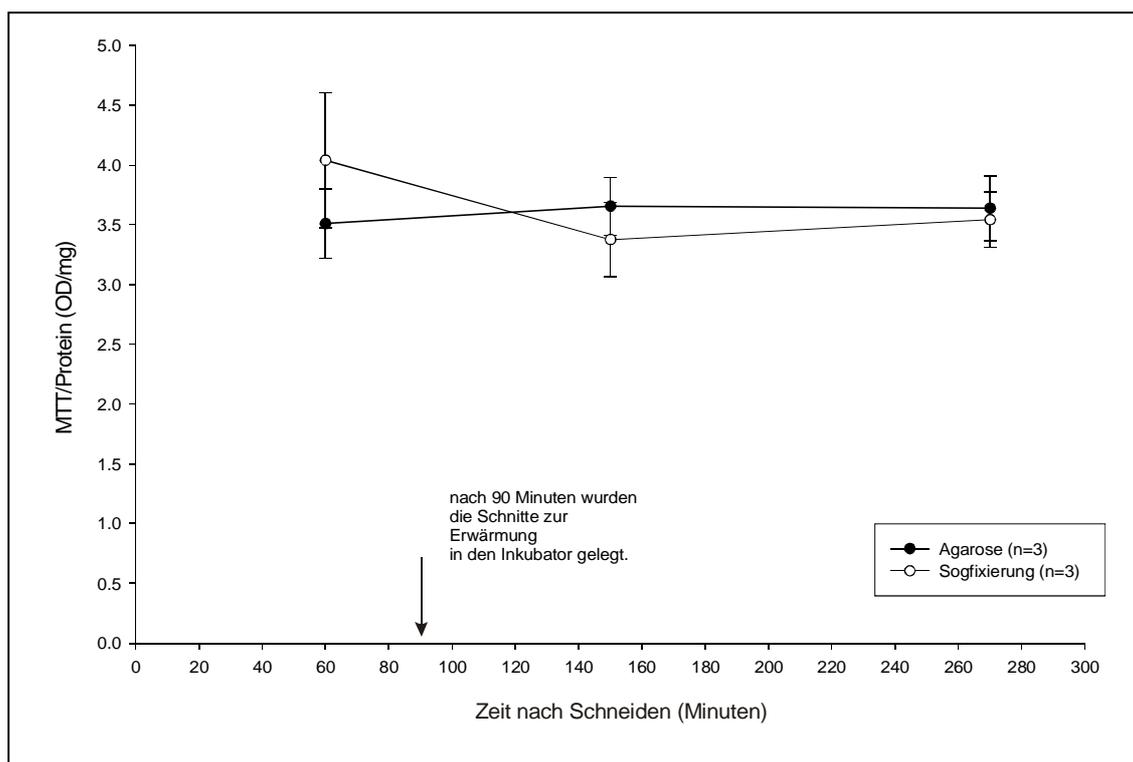


Abbildung 3.3: Im Vergleich die Fixierungsmethoden Agarose-Einbettung und Sogfixierung. Die Kreise repräsentieren den Mittelwert aus den Experimenten, die Balken den SEM.

Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Auch zwischen den untersuchten Zeitpunkten findet sich kein signifikanter Unterschied (vgl. Tabelle 3.4).

Gruppe	Allgemeine Statistik			T-Test		
	n	Mittelwert	SEM	T	FG	p-Wert
ZP1 Sogfixierung	3	4,0404	0,5637	0,8340	4	0,4512
ZP1 Agarose-Einbettung	3	3,5105	0,2931			
ZP2 Sogfixierung	3	3,3766	0,3118	-0,9570	4	0,3928
ZP2 Agarose-Einbettung	3	3,9891	0,5589			
ZP3 Sogfixierung	3	3,5425	0,2291	-0,2705	4	0,8002
ZP3 Agarose-Einbettung	3	3,6389	0,2732			
ZP1 vs. ZP2 Sogfixierung				1,0304	4	0,3611
Agarose-Einbettung				-0,7584	4	0,4904
ZP1 vs. ZP3 Sogfixierung				0,8183	4	0,4591
Agarose-Einbettung				-0,3205	4	0,7647
ZP2 vs. ZP3 Sogfixierung				-0,4286	4	0,6903
Agarose-Einbettung				0,5630	4	0,6035

Tabelle 3.4: Statistische Auswertung der Daten aus dem MTT-Test (OD/mg) im Experiment Sogfixierung vs. Agarose-Einbettung.

3.2.1.2 LDH-Assay

Um den Zelluntergang nach dem Schneidevorgang zu untersuchen wurden die Herzgewebeschnitte mit dem LDH-Test analysiert. In der Gruppe Agarose-Einbettung wurden neun Herzen, in der Gruppe Sogfixierung sechs Herzen an mindestens drei unterschiedlichen Tagen untersucht. Dabei wurde jeweils der LDH-Gehalt zu den Zeitpunkten 10 Minuten (ZP1), 30 Minuten (ZP2), 60 Minuten (ZP3) und 120 Minuten (ZP4) nach dem Schneiden aus der Elektrolytlösung bestimmt.

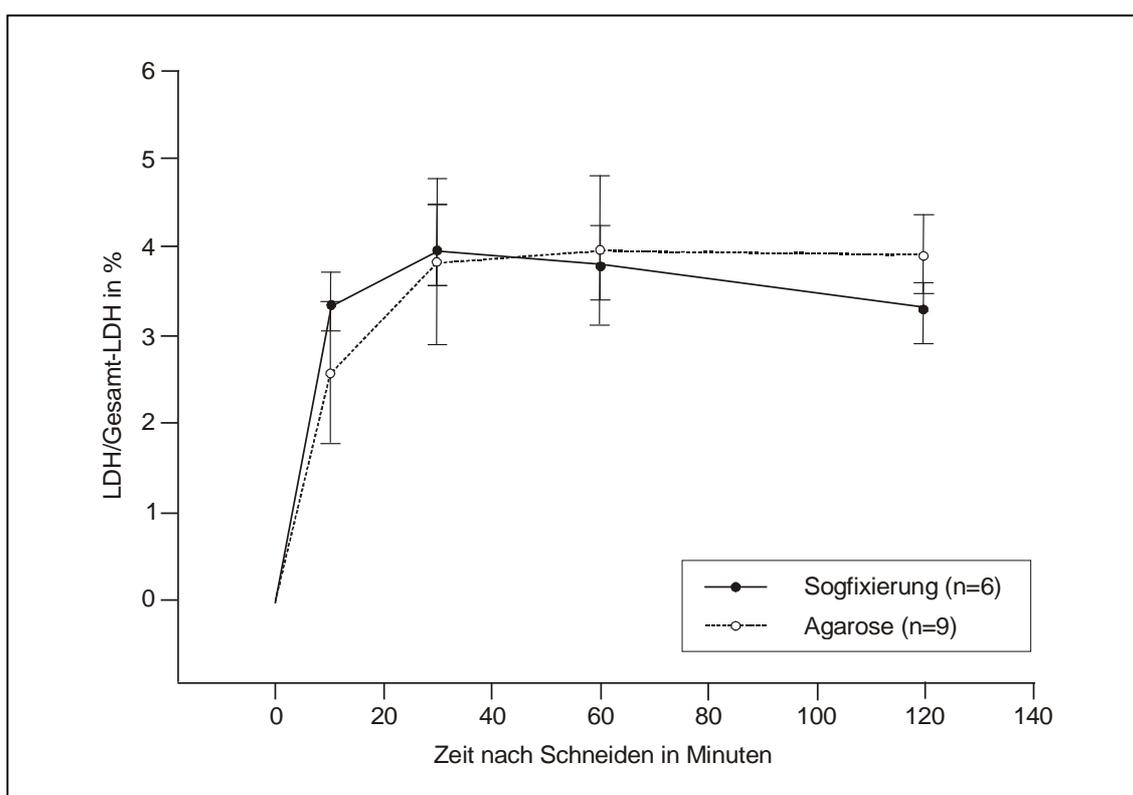


Abbildung 3.4: Im Vergleich die Fixierungsmethoden Einbettung in Agarose vs. Sogfixierung im LDH-Test. Die Kreise repräsentieren den Mittelwert, die Fehlerbalken den SEM.

Es konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (vgl. Tabelle 3.5). Die Unterschiede zwischen den Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe sind ebenfalls nicht signifikant.

Gruppe	Allgemeine Statistik			T-Test		
	n	Mittelwert	SEM	T	FG	p-Wert
ZP1 Sogfixierung	6	2,5833	0,8071	-1,007	13	0,3322
ZP1 Agarose-Einbettung	9	3,3578	0,3358			
ZP2 Sogfixierung	6	3,8367	0,9420	-0,1325	13	0,8966
ZP2 Agarose-Einbettung	9	3,9622	0,4620			
ZP3 Sogfixierung	6	3,9550	0,8680	0,1439	13	0,8878
ZP3 Agarose-Einbettung	9	3,8300	0,4202			
ZP4 Sogfixierung	6	3,9000	0,4527	1,0311	13	0,3213
ZP4 Agarose-Einbettung	9	3,3189	0,3479			

Tabelle 3.5: Statistische Auswertung des LDH-Tests (LDH/Gesamt-LDH in %). Sogfixierung vs. Agarose-Einbettung an vier unterschiedlichen Zeitpunkten.

3.2.1.3 ATP-Assay

Um die Vitalität der Herzgewebeschnitte über die Zeit zu analysieren, wurde der ATP-Assay eingesetzt. Pro Gruppe und Zeitpunkt (eine Stunde nach dem Schneiden (ZP1), eine Stunde nach Inkubation (ZP2) und drei Stunden nach Inkubation (ZP3)) wurden je sechs Schnitte aus mindestens drei unterschiedlichen Herzen auf ihren ATP-Gehalt untersucht. In Abbildung 3.5 sind die Daten dargestellt.

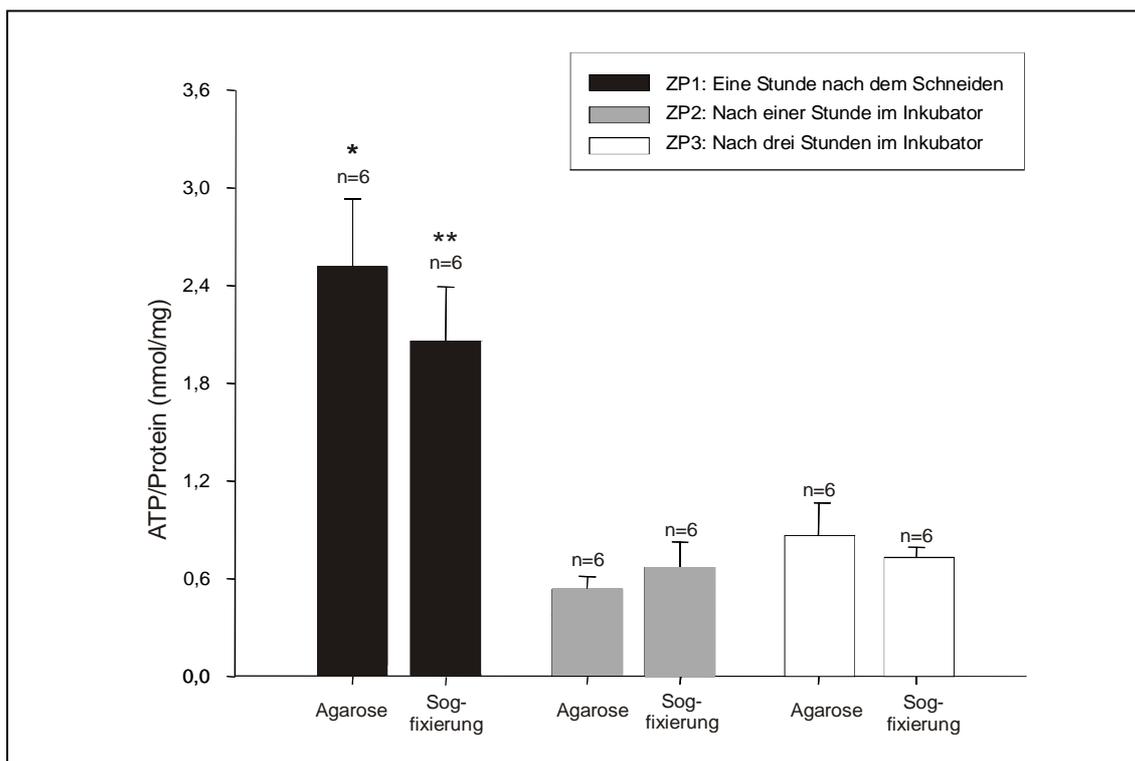


Abbildung 3.5: Im Vergleich die Fixierungsmethoden Einbettung in Agarose und die Sogfixierung im ATP-Test. Die Balken repräsentieren den Mittelwert, die Fehlerbalken den SEM. Das einfache Sternchen (*) markiert einen signifikanten Unterschied zwischen ZP1 im Vergleich mit ZP2 sowie mit ZP3 innerhalb der Gruppe Agarose-Einbettung. Das doppelte Sternchen (**) zeigt den signifikanten Unterschied zwischen ZP1 im Vergleich mit ZP2 sowie mit ZP3 innerhalb der Gruppe Sogfixierung.

Es besteht zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen Sogfixierung und Agarose-Einbettung. Zwischen ZP1 und den beiden Zeitpunkten ZP2 und ZP3 besteht in beiden Gruppen ein signifikanter Unterschied. ZP2 und ZP3 unterscheiden sich in beiden Gruppen hinsichtlich des ATP-Gehaltes nicht signifikant (vgl. Tabelle 3.6).

Gruppe	Allgemeine Statistik			T-Test		
	n	Mittelwert	SEM	T	FG	p-Wert
ZP1 Sogfixierung	6	1,9932	0,3335	-0,8508	10	0,4148
ZP1 Agarose-Einbettung	6	2,4491	0,4187			
ZP2 Sogfixierung	6	0,6086	0,1529	0,7972	10	0,4439
ZP2 Agarose-Einbettung	6	0,4729	0,0747			
ZP3 Sogfixierung	6	0,6652	0,0639	-0,6611	10	0,5235
ZP3 Agarose-Einbettung	6	0,80185	0,1965			
ZP1 vs. ZP2 Sogfixierung				3,7747	10	0,0036
Agarose-Einbettung				4,6462	10	0,0009
ZP1 vs. ZP3 Sogfixierung				3,9116	10	0,0029
Agarose-Einbettung				3,5613	10	0,0050
ZP2 vs. ZP3 Sogfixierung				-0,3414	10	0,7399
Agarose-Einbettung				-1,5644	10	0,1488

Tabelle 3.6: Statistische Auswertung des ATP-Tests (nmol/mg). Sogfixierung vs. Agarose-Einbettung an drei unterschiedlichen Zeitpunkten.

3.2.2 Experiment 2: Die Schnittdicke

Um den Einfluss der Schnittdicke auf die Vitalität der Myokardslices bestimmen zu können, wurde die Präparation in unterschiedlichen Dicken analysiert. Dabei wurde eine Schnittdicke von 300 µm mit einer Schnittdicke von 200 µm verglichen. Wie in Abbildung 3.6 dargestellt, besteht zu keinem der beiden Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen.

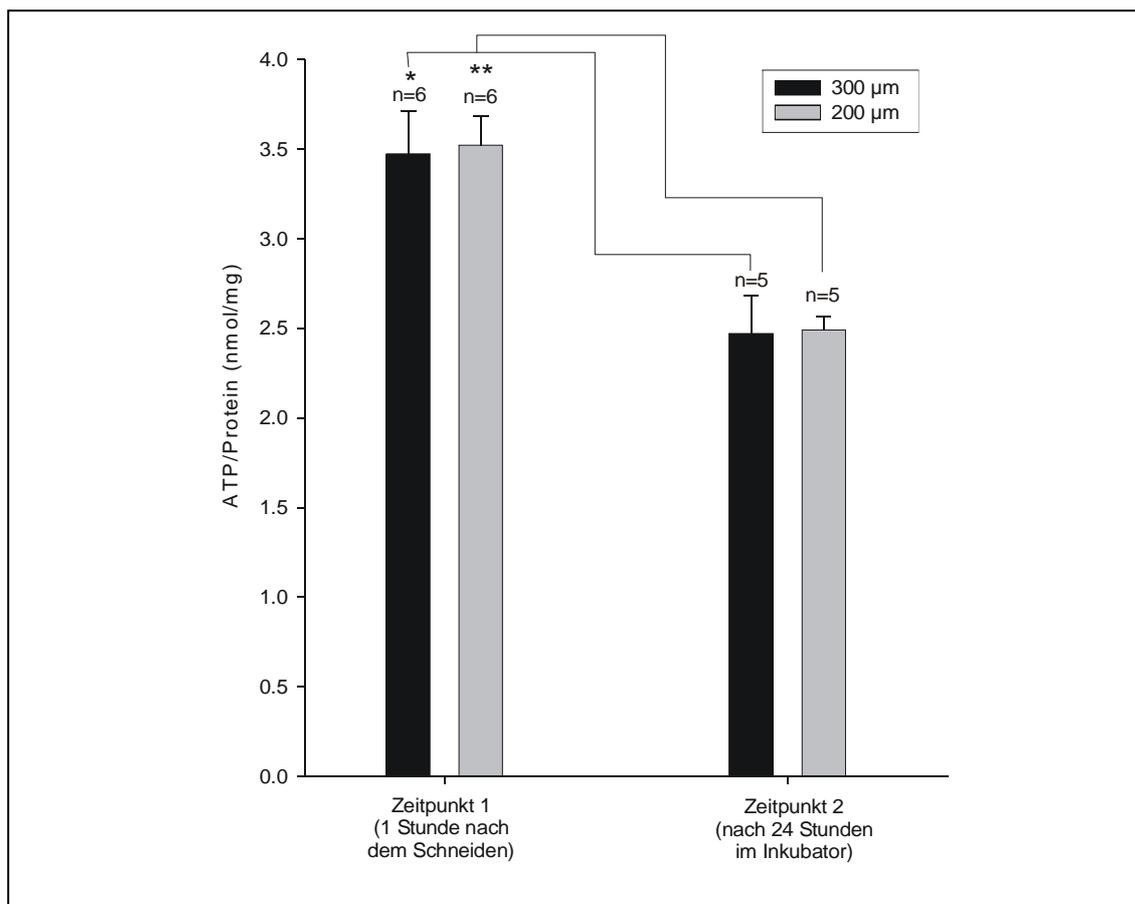


Abbildung 3.6: Vergleich Standardschnittdicke von 300 µm (Ausgangsprotokoll) mit einer Schnittdicke von 200 µm. Die Balken repräsentieren den Mittelwert, die Fehlerbalken den SEM. Das einfache Sternchen (*) markiert einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Zeitpunkten innerhalb der Gruppe 300 µm. Das doppelte Sternchen zeigt (**) den signifikanten Unterschied zwischen den beiden Zeitpunkten innerhalb der Gruppe 200 µm.

Zwischen den untersuchten Zeitpunkten besteht innerhalb beider Gruppen ein signifikanter Unterschied (vgl. Tabelle 3.7).

Gruppe	Allgemeine Statistik			T-Test		
	n	Mittelwert	SEM	T	FG	p-Wert
ZP1 300 µm	6	3,4722	0,2360	-0,1411	10	0,8905
ZP1 200 µm	6	3,5200	0,1619			
ZP2 300 µm	5	2,4691	0,2092	-0,06801	8	0,9474
ZP2 200µm	5	2,4876	0,0770			
ZP1 vs. ZP2 300 µm				2,6003	9	0,0096
ZP1 vs. ZP2 200 µm				4,5228	9	0,0014

Tabelle 3.7: Auswertung des ATP-Test (nmol/mg): 300 µm vs. 200µm Schnittdicke.

3.2.3 Experiment 3: Die Operationstechnik

Um den Einfluss der Operationstechnik bestimmen zu können, wurde diese variiert und mit dem ATP-Test analysiert. Verglichen wurde das Entfernen der Vorhöfe durch einen Schnitt unterhalb der Klappenebene mit der Standard-Operation (mit Vorhöfen). Die Dauer der Operation wurde nicht beeinflusst (vgl. Tabelle 3.8). Die Ergebnisse des sind in Abbildung 3.7 dargestellt.

	Operation ohne Vorhöfe (Mittelwert+/-S.E.M) n=12	Operation mit Vorhöfen (Mittelwert+/-S.E.M) n=45
Dauer der OP (min)	2min 13sek+/-60sek	1min 54 sek+/-44sek
Zeit insgesamt (min)	13min 3sek+/-2min 50sek	14min 30sek+/-2min 41sek

Tabelle 3.8: Dauer der Operation in den verglichenen Gruppen

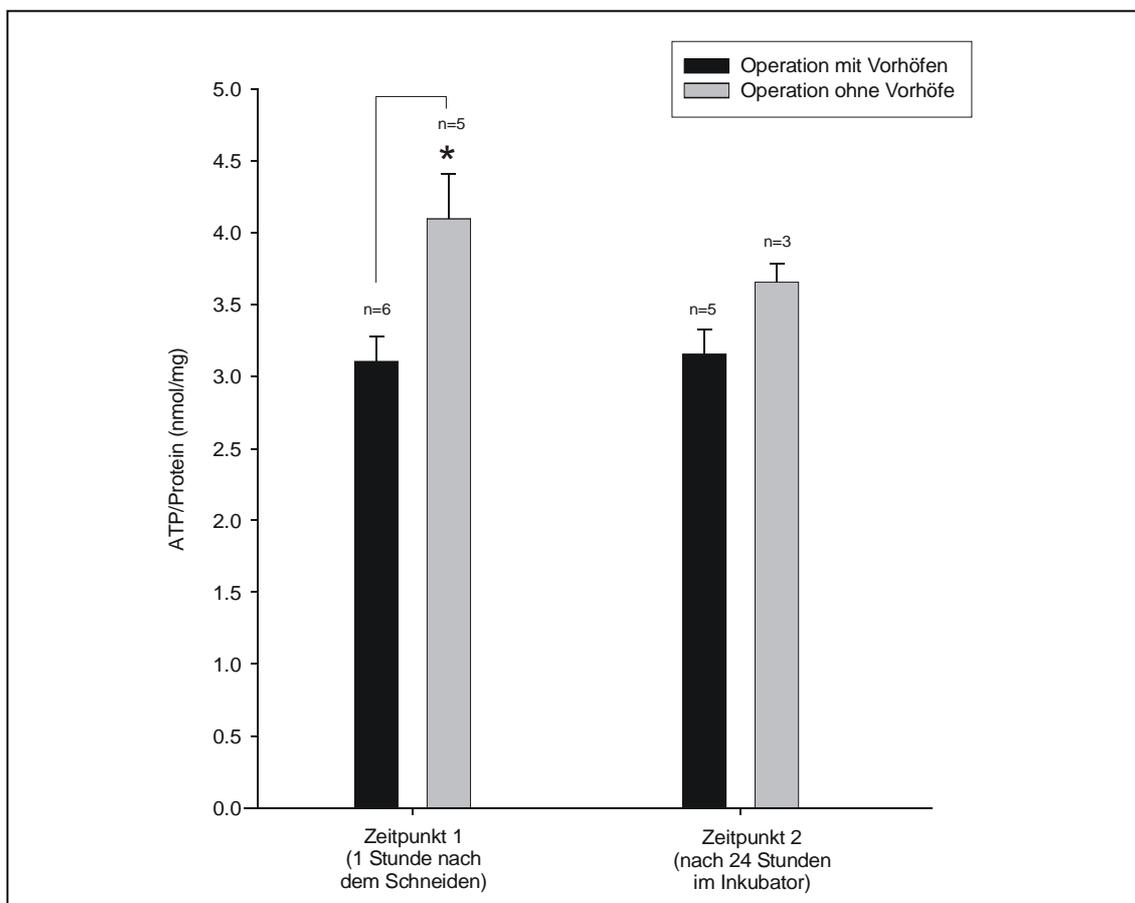


Abbildung 3.7: Vergleich von zwei verschiedenen Operationsmöglichkeiten. Die Balken repräsentieren den Mittelwert, die Fehlerbalken den SEM. Das Sternchen (*) markiert signifikant höhere ATP-Werte zum Niveau $\alpha < 0,05$.

Die Präparation der Herzen ohne Vorhöfe zeigt mit einem ATP-Gehalt von 4,09 +/- 0,31 nmol ATP/mg Protein besonders zum ZP1 (eine Stunde nach dem Schneiden) einen signifikanten Vorteil gegenüber der zweiten Gruppe, in denen die Vorhöfe belassen wurden (3,11 +/- 0,17 nmol ATP/mg Protein). Nach 24 Stunden im Inkubator (ZP2) ist der Effekt zwar noch zu erkennen, statistisch aber nicht mehr signifikant (vgl. Tabelle 3.9).

Gruppe	Allgemeine Statistik			T-Test		
	n	Mittelwert	SEM	T	FG	p-Wert
ZP1 OP mit Vorhöfen	6	3,1066	0,1728	-2,4076	9	0,0394
ZP1 OP ohne Vorhöfe	5	4,0997	0,3121			
ZP2 OP mit Vorhöfen	5	3,1567	0,1709	-1,6135	6	0,1578
ZP2 OP ohne Vorhöfe	3	3,6570	0,1310			
ZP1 vs. ZP2 OP mit Vorhöfen				-0,1700	9	0,8688
ZP1 vs. ZP2 OP ohne Vorhöfe				0,8396	6	0,4333

Tabelle 3.9: Statistische Auswertung der Daten des ATP-Tests (nmol/mg): Operation mit Entfernung der Vorhöfe vs. Operation ohne Entfernung der Vorhöfe.

Aufgrund dieser Ergebnisse wird die Entfernung der Vorhöfe mit in das Protokoll zur optimalen Präparation von Herzgewebeschnitten einbezogen.

3.2.4 Experiment 4: Zugabe von 2,3-Butanedionmonoxime (BDM)

Verglichen wurde der Zusatz von 30 mmol BDM zur standardmäßig benutzten Elektrolytlösung im Vergleich zur Lösung ohne BDM. Die Präparation der Gewebeschnitte wurde ansonsten ohne Veränderung bis zur Inkubation durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.8 dargestellt.

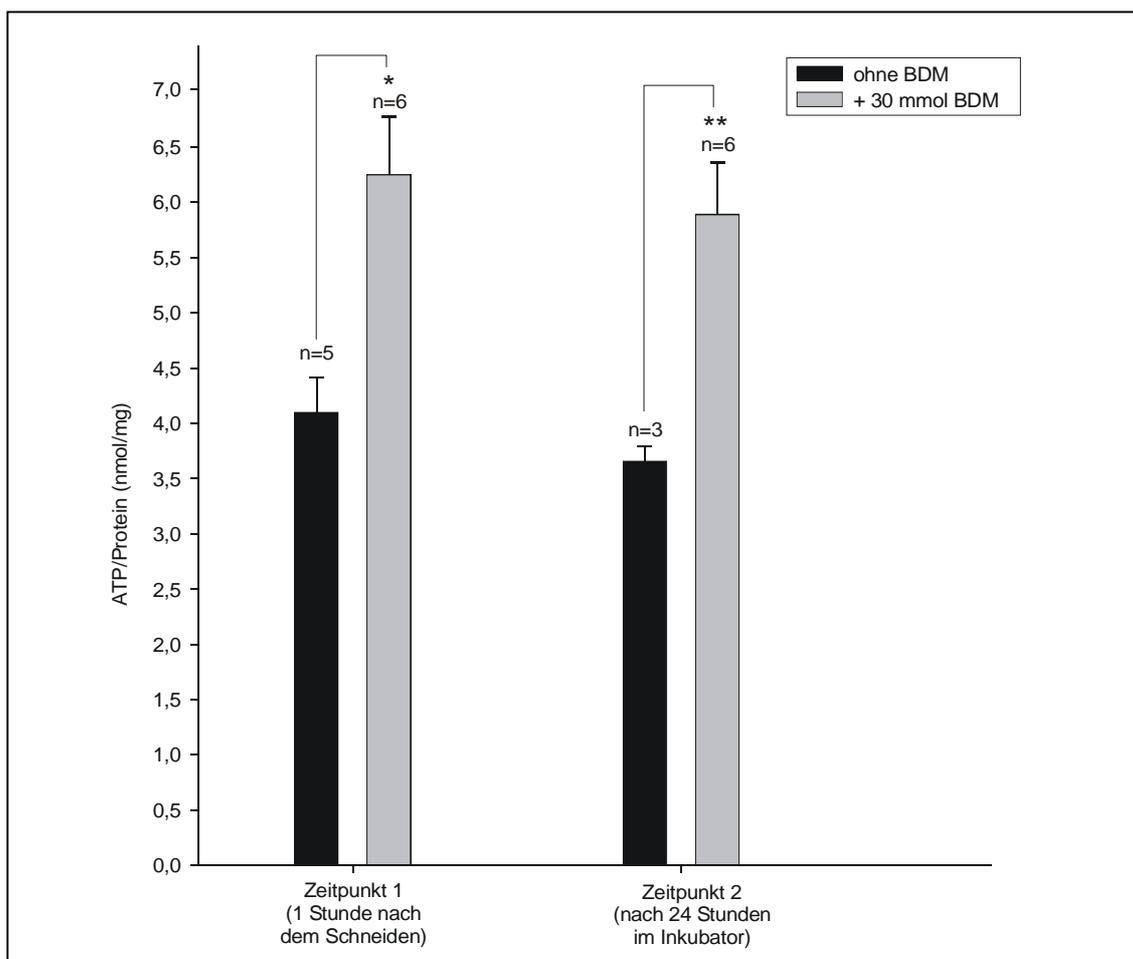


Abbildung 3.8: Untersuchung der Zugabe von 30 mmol BDM zur Elektrolytlösung. Die Balken repräsentieren den Mittelwert, die Fehlerbalken den SEM. Das einfache Sternchen markiert (*) signifikant höhere ATP-Werte zwischen den beiden Gruppen zum Zeitpunkt 1. Das doppelte Sternchen zeigt (**) signifikant höhere ATP-Werte zwischen den beiden Gruppen zum Zeitpunkt 2.

Die Zugabe von BDM ergab sowohl zu ZP1 wie auch zu ZP2 einen signifikanten Anstieg der ATP-Konzentration (vgl. Tabelle 3.10).

Gruppe	Allgemeine Statistik			T-Test		
	n	Mittelwert	SEM	T	FG	p-Wert
ZP1 ohne BDM	5	4,0997	0,3822	2,8921	9	0,0178
ZP1 mit BDM	6	6,3070	0,5204			
ZP2 ohne BDM	3	3,6570	0,1852	2,6093	7	0,0349
ZP2 mit BDM	6	5,8329	0,4763			
ZP1 vs. ZP2 ohne BDM				0,8396	6	0,4333
ZP1 vs. ZP2 mit BDM				0,5679	10	0,5826

Tabelle 3.10: ATP-Test (nmol/mg) mit Zugabe von 30 mmol BDM vs. ohne Zugabe von BDM.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle folgenden Experimente mit Zugabe von 30 mmol BDM zur Elektrolytlösung durchgeführt.

Die Zugabe des BDM hat den ATP-Wert der Herzgewebeschnitte in der Form steigern können, dass der Unterschied zu den *in vivo*-Herzen nicht mehr signifikant ist (vgl. Tabelle 3.11).

Gruppe	Allgemeine Statistik			T-Test		
	n	Mittelwert	SEM	T	FG	p-Wert
Ganze Herzen	3	6,9041	0,5876	0,5671	7	0,5884
Herzgewebeschnitte (mit BDM) direkt nach dem Schneiden	6	6,3070	0,5204			
Ganze Herzen	3	6,9041	0,5876	1,0839	7	0,3143
Herzgewebeschnitte (mit BDM) nach 24 Stunden im Inkubator	6	5,8329	0,4763			

Tabelle 3.11: ATP-Gehalt (nmol/mg) ganzer Herzen im Vergleich mit dem ATP-Gehalt von Herzgewebeschnitten eine Stunde nach dem Schneiden und nach 24 Stunden im Inkubator.

Da nach 24 Stunden im Inkubator trotzdem ein Abfall der ATP-Werte beobachtet werden konnte, wurden auch im Hinblick auf die Praktikabilität der Präparation weitere im Folgenden beschriebene Parameter getestet.

3.2.5 Experiment 5: Kalziumgehalt

Dem Schneiden in kalziumfreier Lösung mit anschließender Kalziumtoleration wurde eine kontinuierliche Präparation in 1,4 mmol kalziumhaltiger Lösung gegenübergestellt. Um einen temporären Effekt auf die Ergebnisse auszuschließen, wurden die in kalziumhaltiger Lösung präparierten Schnitte während der Kalziumtoleration der Vergleichsgruppe für 30 Minuten in gekühlter kalziumhaltiger Lösung belassen. Neben der Untersuchung des ATP-Gehalts (siehe Abbildung 3.9) wurde zusätzlich die LDH-Freisetzung 10 Minuten (ZP1), 30 Minuten (ZP2), 60 Minuten (ZP3) und 90 Minuten (ZP4) nach dem Schneiden gemessen (siehe Abbildung 3.9).

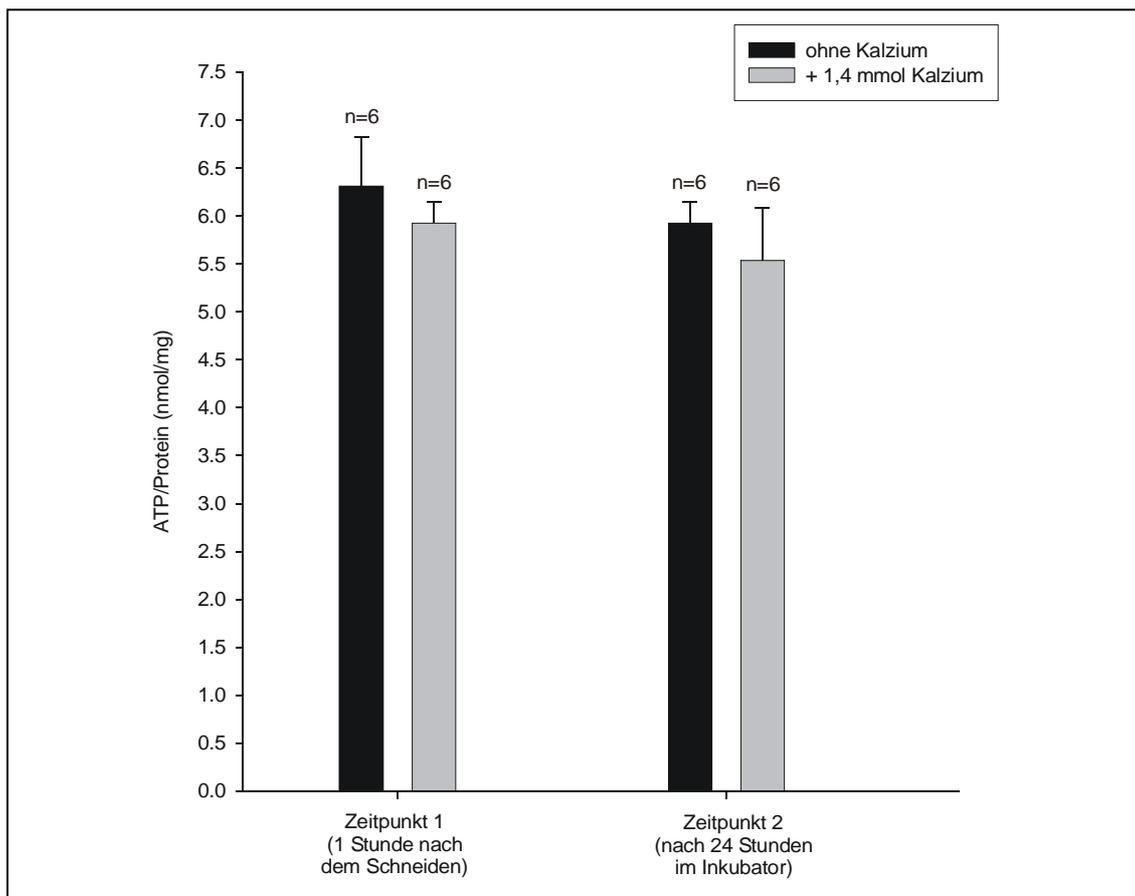


Abbildung 3.9: Untersuchung der Zugabe von 1,4 mmol Kalzium zur Elektrolytlösung. Die Balken repräsentieren den Mittelwert, die Fehlerbalken den SEM.

Gruppe	Allgemeine Statistik			T-Test		
	n	Mittelwert	SEM	T	FG	p-Wert
ZP1 ohne Kalzium	6	6,3070	0,5204	0,5723	10	0,5798
ZP1 mit Kalzium	6	5,9231	0,2252			
ZP2 ohne Kalzium	6	5,8329	0,4763	0,3481	10	0,7350
ZP2 mit Kalzium	6	5,5349	0,5447			
ZP1 vs. ZP2 ohne Kalzium				0,5679	10	0,5826
ZP1 vs. ZP2 ohne Kalzium				0,5565	10	0,5901

Tabelle 3.12: Statistische Auswertung der Daten aus dem ATP-Test (nmol/mg): kalziumhaltige vs. kalziumfreie Präparation

Da der Kalziumgehalt der Elektrolytlösung ausschließlich während der Präparation zur Unterdrückung der spontanen Kontraktion, also bis zur

Inkubation eine Rolle spielt, wurde eben dieser Zeitraum mittels des LDH-Tests noch einmal genauer untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.10 dargestellt.

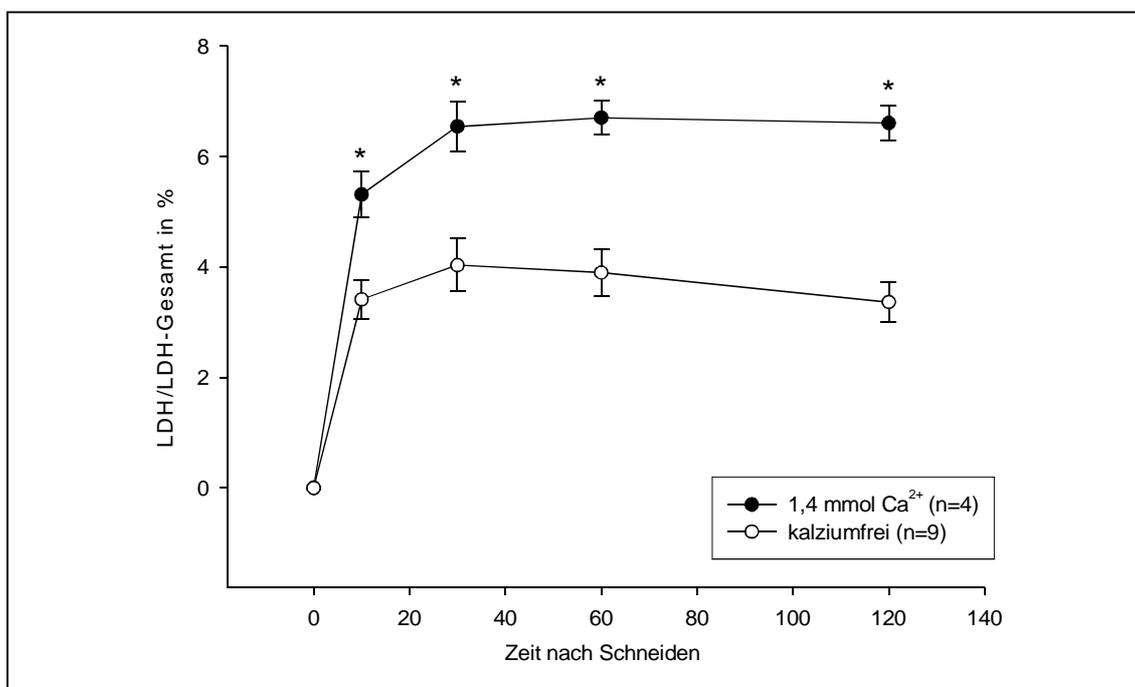


Abbildung 3.10: Im Vergleich die Präparation in kalziumhaltiger und kalziumfreier Elektrolytlösung im LDH-Test. Die Kreise repräsentieren den Mittelwert, die Fehlerbalken den SEM. Das Sternchen (*) markiert eine signifikante Erhöhung der LDH-Freisetzung innerhalb der Gruppen zu den angegebenen Zeitpunkten.

Bei der Analyse zeigte sich zu allen Zeitpunkten eine signifikante Erhöhung der LDH-Freisetzung in der Gruppe kalziumhaltige Präparation (vgl. Tabelle 3.13).

Gruppe	Allgemeine Statistik			T-Test		
	n	Mittelwert	SEM	T	FG	p-Wert
ZP1 ohne Kalzium	9	3,4122	0,3506	-3,1667	11	0,0089
ZP1 mit Kalzium	4	5,3125	0,4201			
ZP2 ohne Kalzium	9	4,0333	0,4819	-3,1657	11	0,0089
ZP2 mit Kalzium	4	6,5425	0,4487			
ZP3 ohne Kalzium	9	3,8967	0,4362	-4,0208	11	0,0020
ZP3 mit Kalzium	4	6,7025	0,3071			
ZP4 ohne Kalzium	9	3,3667	0,3568	-5,5496	11	0,0002
ZP4 mit Kalzium	4	6,6050	0,3168			

Tabelle 3.13: 1,4 mmol Ca²⁺ vs. kalziumfrei im LDH-Test (LDH/Gesamt-LDH in %).

3.2.6 Experiment 6: EGTA

Verglichen wurde eine Präparation in kalziumfreier Lösung mit einer Präparation in kalziumfreier Lösung unter Zugabe von 1 mmol EGTA. Die Daten sind in Abbildung 3.11 dargestellt.

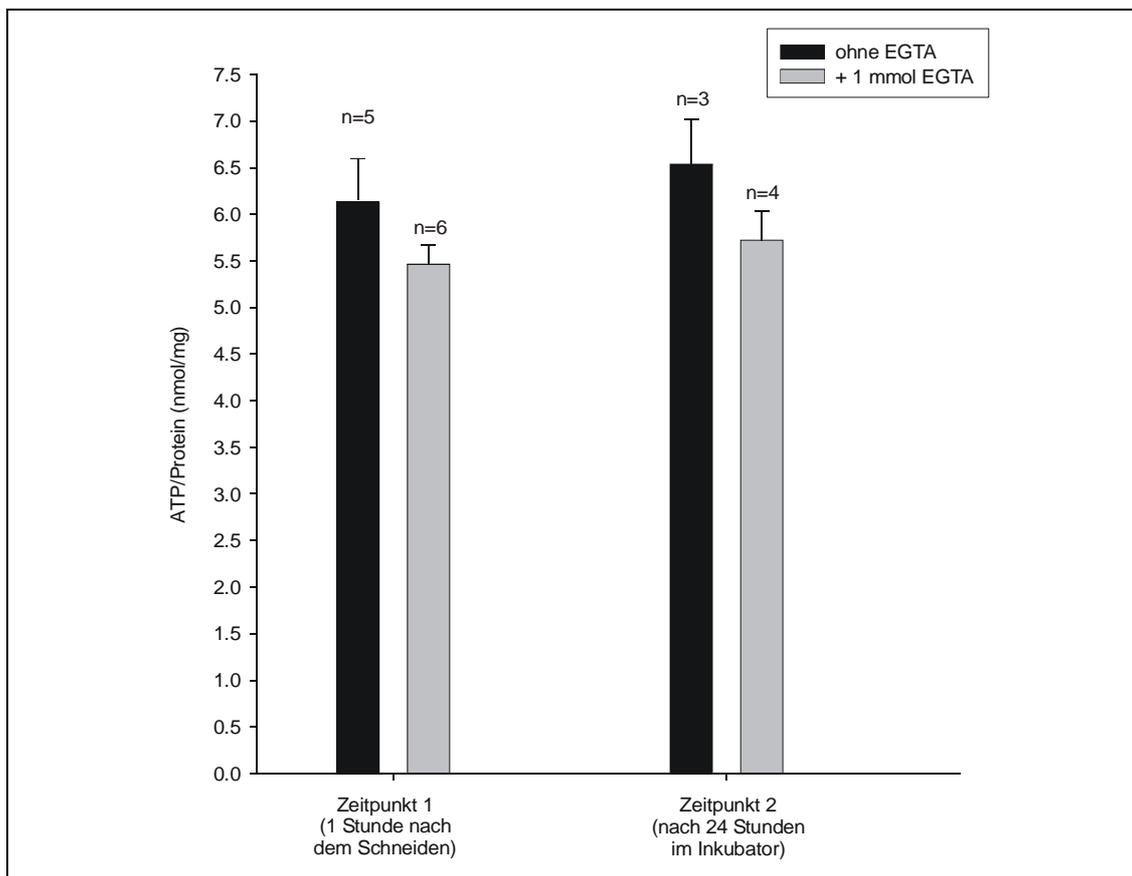


Abbildung 3.11: Untersuchung der Zugabe von 1 mmol EGTA zur kalziumfreien Elektrolytlösung. Die Balken repräsentieren den Mittelwert, die Fehlerbalken den SEM.

Zwischen den Gruppen und zwischen den untersuchten Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe besteht kein signifikanter Unterschied (vgl. Tabelle 3.14).

Gruppe	Allgemeine Statistik			T-Test		
	n	Mittelwert	SEM	T	FG	p-Wert
ZP1 ohne EGTA	5	6,1797	0,4085	1,3640	9	0,2057
ZP1 mit EGTA	6	5,4646	0,2036			
ZP2 ohne EGTA	3	6,6232	0,5449	1,3575	5	0,2327
ZP2 mit EGTA	4	5,7209	0,3167			
ZP1 vs. ZP2 ohne EGTA				-0,5710	6	0,5887
ZP1 vs. ZP2 mit EGTA				-0,5802	8	0,5777

Tabelle 3.14: ATP-Test (nmol/mg) mit Zugabe von 1 mmol EGTA vs. ohne Zugabe von EGTA.

3.2.7 Experiment 7: Einfluss der Temperatur

Um den Einfluss der Temperatur zu testen wurden die Präparation der Herzwebeschnitte unter gekühlten Bedingungen bei etwa 0°C - 4°C mit der Präparation der Gewebeschnitte bei Raumtemperatur verglichen (Abb. 3.12).

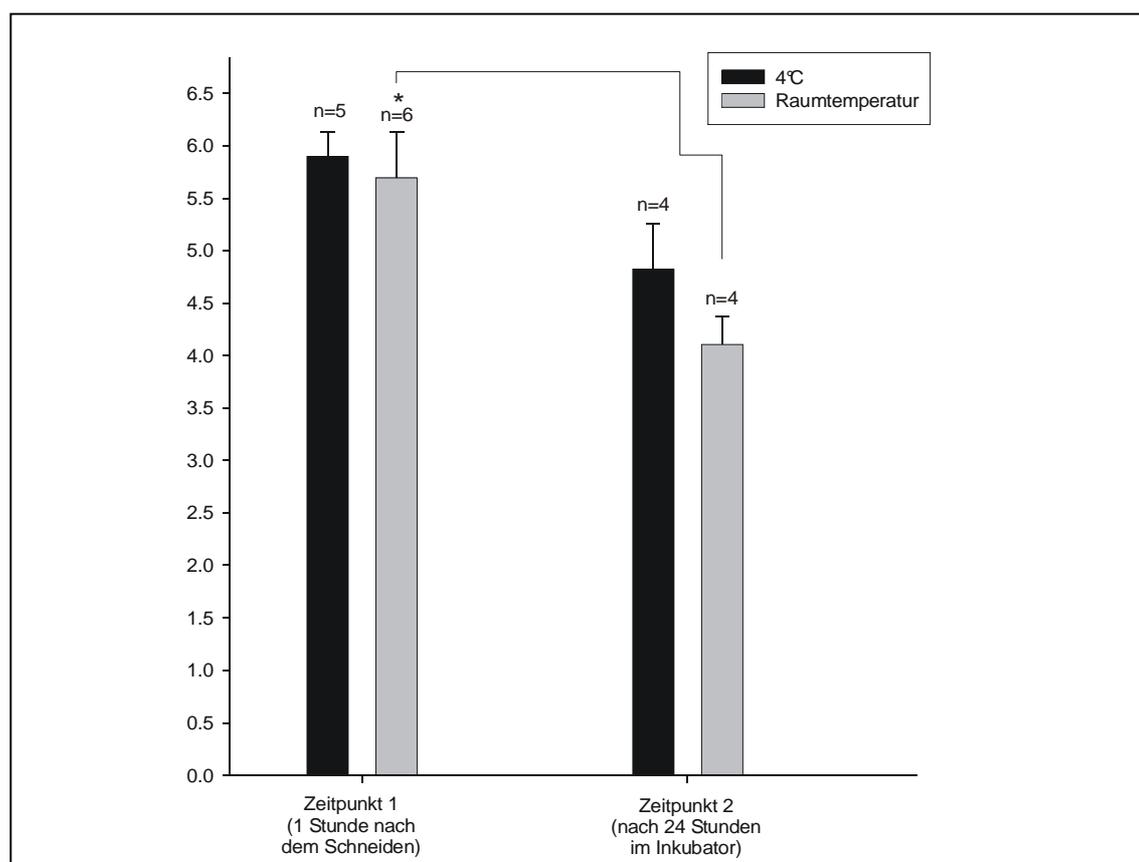


Abbildung 3.12: 4°C vs. Raumtemperatur bei der Präparation. Die Balken repräsentieren den Mittelwert, die Fehlerbalken den SEM. Das Sternchen (*) markiert einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Zeitpunkten innerhalb der Gruppe Raumtemperatur.

Die Präparation bei Raumtemperatur zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Präparation bei 4°C. Zwischen den untersuchten Zeitpunkten besteht innerhalb der Gruppe RT ein signifikanter Abfall des ATP-Gehalts (Tabelle 3.15).

Gruppe	Allgemeine Statistik			T-Test		
	n	Mittelwert	SEM	T	FG	p-Wert
ZP1 Präparation bei 4°C	5	5,8992	0,2337	0,3881	9	0,7070
ZP1 Präparation bei RT (20°C)	6	5,6933	0,4404			
ZP2 Präparation bei 4°C	4	4,8250	0,4326	1,4198	6	0,2055
ZP2 Präparation bei RT (20°C)	4	4,1053	0,2644			
ZP1 vs. ZP2 Präparation bei 4°C				2,3190	7	0,0535
ZP1 vs. ZP2 Präparation bei RT				2,6967	8	0,0272

Tabelle 3.15: Auswertung des ATP-Tests (nmol/mg): Präparation bei 4°C vs. Präparation bei Raumtemperatur.

3.2.8 Zusammenfassung der Präparationsexperimente

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Experimente zur Verbesserung der Präparation wegen der besseren Übersicht in einer Grafik zusammengefasst. Es ist ersichtlich, dass neben dem Operationsverfahren die Zugabe von 30 mmol BDM zur Präparationslösung von entscheidender Bedeutung ist. Man erreicht mit diesen Neuerungen einen ATP-Gehalt der Gewebeschnitte, der den gemessenen *in-vivo*-Werten entspricht. Die in Abbildung 3.13 gezeigten Daten sind Mittelwerte aus allen gemessenen Gewebeschnitten, die zu den unter der Grafik stehenden Bedingungen angefertigt wurden. Diese sind nicht deckungsgleich mit den Ergebnissen der einzelnen für sich alleine stehenden Experimente, da auch die Daten einfließen, welche in anderen in dieser Dissertation nicht dargestellten Experimenten erhoben wurden. Selbstverständlich wurde großen Wert darauf gelegt, dass die Experimentbedingungen gleich waren. Bei der statistischen Auswertung des Gesamtdatensatzes konnten dadurch die Tendenzen der Einzelexperimente (siehe oben) durch eine statistische Signifikanz bestätigt werden (vgl. Tabelle 3.15).

Insbesondere der ATP-Abfall bei Präparation unter Raumtemperatur und der ATP-Abfall bei Präparation in kalziumhaltiger Lösung sind hier statistisch signifikant.

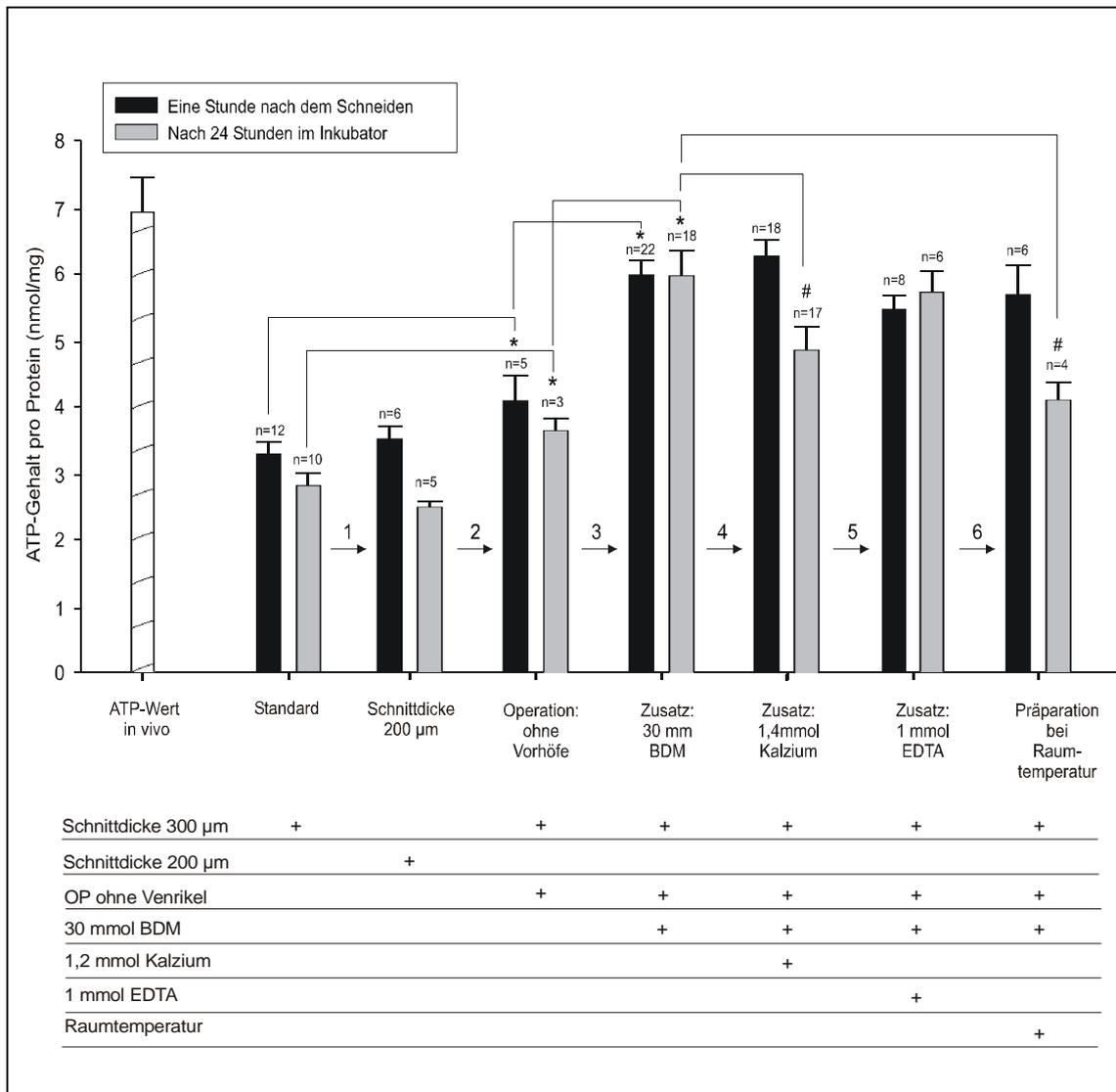


Abbildung 3.13: Zusammenfassung aller Experimente zur Verbesserung der Präparation.

Gruppe	Allgemeine Statistik			T-Test		
	n	Mittelwert	SEM	T	FG	p-Wert
ZP1 Standard	12	3,2894	0,1740	-0,8173	16	0,4258
ZP1 200µm	6	3,5200	0,1916			
ZP2 Standard	10	2,8129	0,1935	1,1365	13	0,2763
ZP2 200µm	5	2,4876	0,0943			
ZP1 Standard	12	3,2894	0,1740	-2,2418	15	0,0405
ZP1 OP ohne Vorhöfe	5	4,0997	0,3822			
ZP2 Standard	5	2,8129	0,1935	-2,2487	11	0,0460
ZP2 OP ohne Vorhöfe	3	3,6570	0,1852			
ZP1 OP ohne Vorhöfe	5	4,0997	0,3822	3,7518	25	0,0009
ZP1 Zusatz 30 mmol BDM	22	5,9914	0,2230			
ZP2 OP ohne Vorhöfe	3	4,0997	0,3822	-2,4179	19	0,0258
ZP2 Zusatz 30 mmol BDM	18	5,9767	0,3825			
ZP1 Zusatz 30 mmol BDM	22	5,9914	0,2230	-0,9178	38	0,3645
ZP1 Zusatz 1,4 mmol Kalzium	18	6,2945	0,2430			
ZP2 Zusatz 30 mmol BDM	18	5,9767	0,3825	2,1005	33	0,0434
ZP2 Zusatz 1,4 mmol Kalzium	17	4,8771	0,3551			
ZP1 Zusatz 30 mmol BDM	22	5,9914	0,2230	1,2689	27	0,2153
ZP1 Zusatz 1 mmol EGTA	8	5,4646	0,2036			
ZP2 Zusatz 30 mmol BDM	18	5,9767	0,3825	0,3390	21	0,7380
ZP2 Zusatz 1 mmol EGTA	6	5,7209	0,3167			
ZP1 Zusatz 30 mmol BDM (4°C)	22	5,9914	0,2230	0,6150	26	0,5439
ZP1 Raumtemperatur	6	5,6933	0,4404			
ZP2 Zusatz 30 mmol BDM (4°C)	18	5,9767	0,3825	2,2421	20	0,0365
ZP2 Raumtemperatur	4	4,1053	0,2644			

Tabelle 3.16: Zusammenfassung aller Experimente mittels des ATP-Tests (nmol/mg) zur Verbesserung der Präparation.

3.3 Charakterisierung der Gewebeschnitte

In einer zweiten Untersuchungsreihe wurden die mit dem modifizierten Modell erstellten Gewebeschnitte histologisch, biochemisch und elektrophysiologisch charakterisiert und an geeigneten Stellen der Vorteil gegenüber dem Ausgangsmodell herausgearbeitet.

3.3.1 Histologie – HE-Färbung

Zur histologischen Charakterisierung der Gewebeschnitte wurden nach 24 Stunden im Inkubator 7 µm dicke Gefrierschnitte der Herzgewebeschnitte

angefertigt und diese mittels HE-Färbung wie im Methodenteil beschrieben angefärbt.

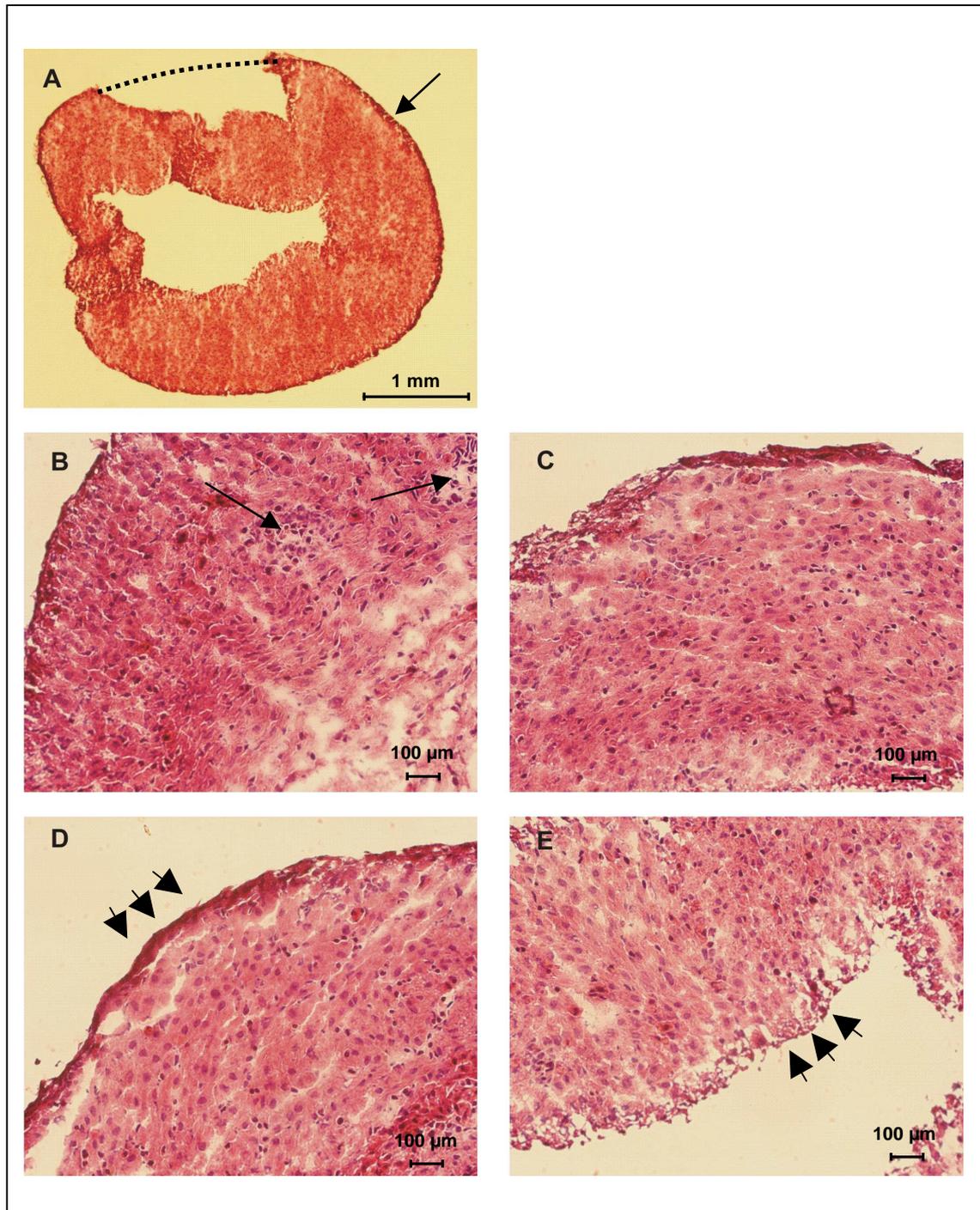


Abbildung 3.14: HE-Färbungen in 7 µm dicken Gefrierschnitten der Myokardslices. Die Schnitte zeigten zuvor über 24 Stunden im Inkubator eine autonome Aktivität. A: Übersicht eines gefärbten Gefrierschnitts. B - E: Teilansichten des Gewebeschnitts (nähere Erläuterung im Text).

Es wurden insgesamt sechs Herzgewebeschnitte aufbereitet und untersucht. Die Hauptcharakteristika sind repräsentativ an einem Schnitt in Abbildung 3.14 A bis D dargestellt.

Dabei zeigt A zur Orientierung ein Übersichtsbild. Die Wand des rechten Ventrikels (gestrichelte Linie) ist während der HE-Färbung zerstört worden und deswegen nicht komplett. Das Epikard stellt sich als intakte Schicht auf der Außenseite der Herzwand dar (A, Pfeil). Abbildung 3.14 B zeigt einen Wandausschnitt des linken Ventrikels mit der typischen Längs- und Querschichtung (vgl. Diskussion). Zusätzlich sind Gefäße angeschnitten (B, Pfeile). In Abbildung 3.14 C ist ein Teil des strukturell gut erhaltenen Epikards der linksventrikulären Herzwand dargestellt. D zeigt ebenfalls einen Ausschnitt des linken Ventrikels. Das Epikard erscheint durchgängig und intakt (D, Pfeilköpfe), während sich in E das Endokard des linken Ventrikels mit strukturellen Veränderungen präsentiert (E, Pfeilköpfe).

3.3.2 Nekrose – Trypanblau-Färbungen

Durch die einzelnen Präparationsschritte zur Erstellung der Gewebeschnitte wird das Myokard einer Belastung ausgesetzt, die im ATP-Test zu einem messbaren Zelluntergang führt. Um besser einschätzen zu können, wo dieser Schaden lokalisiert ist, wurde der Zelluntergang mittels Trypanblau-Färbung sichtbar gemacht. Dazu wurden in zwei Gruppen (im Vergleich das Ausgangsmodell mit dem modifizierten Modell) sechs Schnitte aus drei unterschiedlichen Herzen an zwei verschiedenen Zeitpunkten (eine Stunde nach dem Schneiden und nach 48 Stunden im Inkubator) mit Trypanblau wie im Methodenteil beschrieben gefärbt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.15 dargestellt.

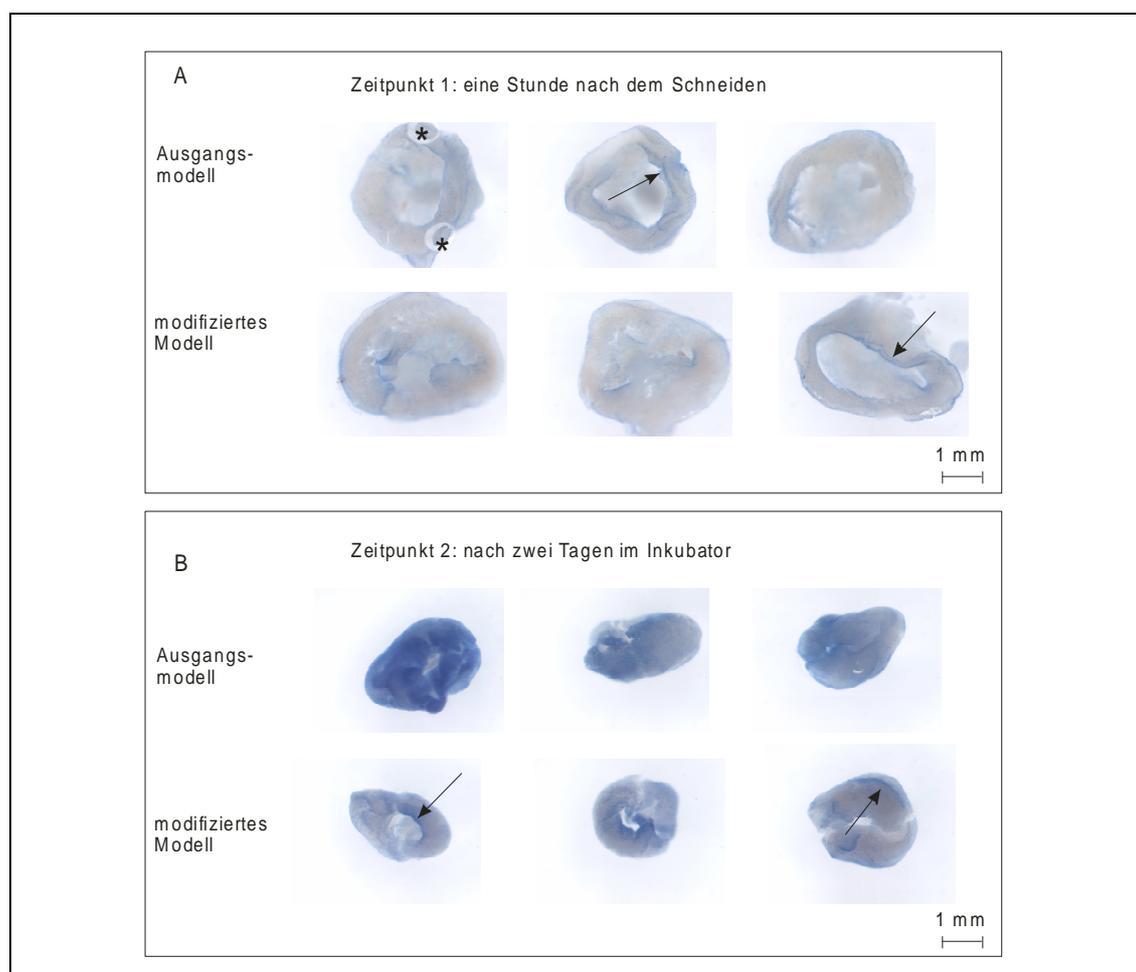


Abbildung 3.15: Trypanblau-Färbungen von Gewebeschnitten in 30-facher Vergrößerung unter dem Lupenmikroskop. Der Stern (*) markiert Luftblasen. Erläuterung siehe Text.

Die Trypanblau-Färbung leistet keine quantitative Aussage über den Unterschied zwischen den beiden getesteten Modellen, wohl aber eine tendenziell qualitative Aussage. Zusätzlich ist eine Beurteilung der Lokalisation des Schadens gut möglich.

Direkt nach dem Schneiden fällt in der ein scharf lokalisierter Schaden insbesondere in den Randbereichen des Gewebeschnitts auf (vgl. Abbildung 3.15 A, Pfeile). Unterschiede zwischen den untersuchten Modellen sind in der Übersicht kaum auszumachen. Um hier eventuelle Differenzen besser darzustellen, wurden im Folgenden aus der Übersicht von jedem Zeitpunkt und jeder Gruppe ein repräsentativer Schnitt in zwei Schritten digital vergrößert (zunächst auf ein 90-faches der Originalschnittgröße, dann auf ein 215-faches) und vergleichend gegenübergestellt (Abbildung 3.16 und 3.17).

Bei Färbungen der Schnitte nach 24 Stunden im Inkubator fallen in der Übersicht zwei Aspekte auf:

1. Der Durchmesser aller untersuchten Schnitte ist nach der Inkubation auffällig geringer als in gekühlter Elektrolytlösung (vgl. Abbildung 3.15 A und B). Die deutliche Größenminderung lässt sich insbesondere durch die Kontraktion des Muskels erklären. Nach dem Übergang des in Hypothermie und Kardioplegie entspannten Myokards (direkt nach dem Schneiden; Abb. 3.15 A) in ein kontraktiles, aktives Herzgewebe (bei 37°C Inkubation; Abb. 3.15 B) zu erklären.
2. Die Schnitte, die nach dem Ausgangsmodell präpariert wurden, sind insgesamt auch im Inneren der Myokardwand stärker angefärbt als in der Vergleichsgruppe, in der der Schaden weiterhin insbesondere auf den Rand bzw. auf die Schnittflächen (vgl. Abb. 3.15, Pfeile) begrenzt zu sein scheint.

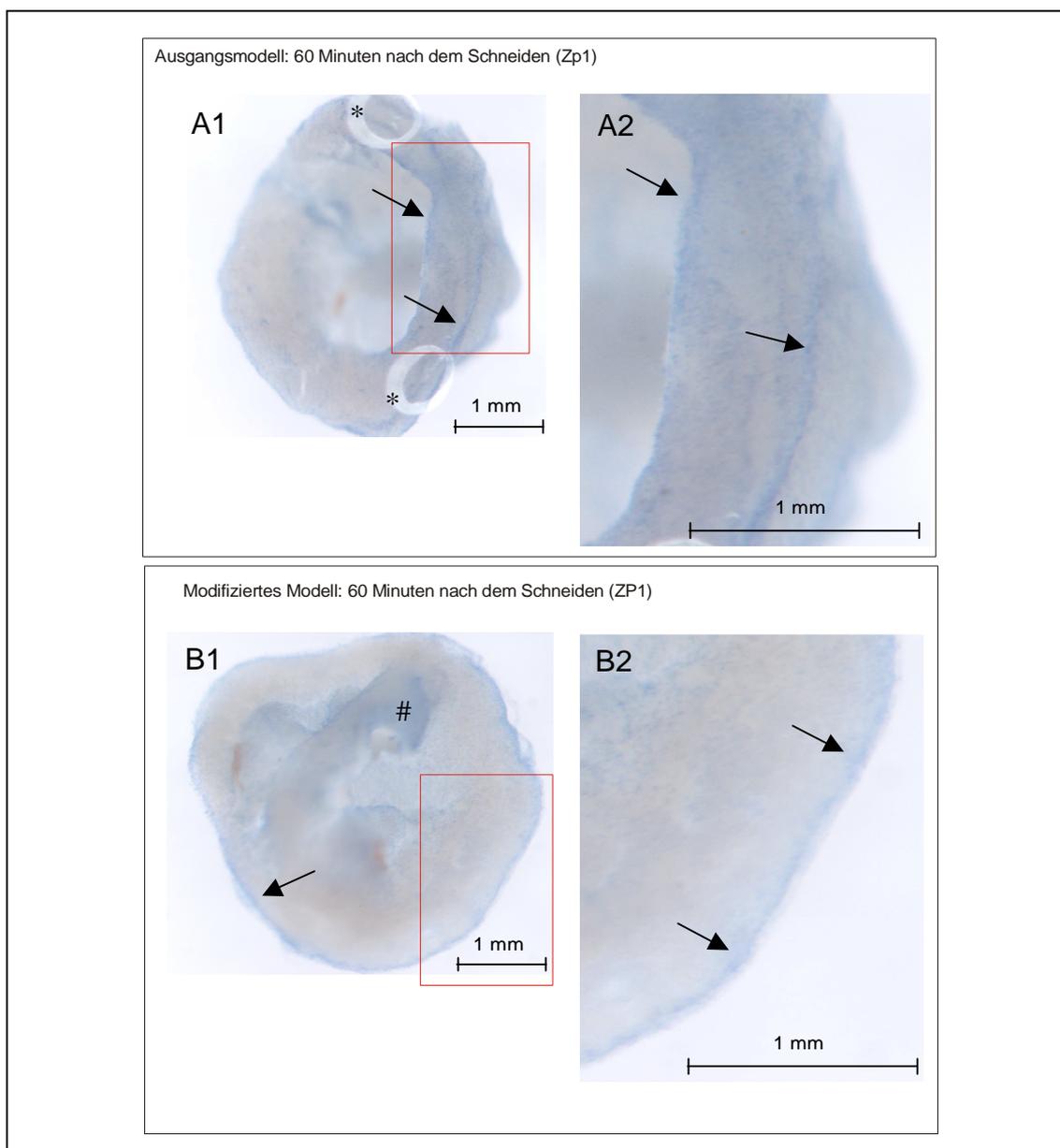


Abbildung 3.16: Zur besseren Darstellung wurde pro Gruppe je ein repräsentativer Schnitt ausgesucht und digital vergrößert (A1, B1: 90-fach; A2, B2: 215-fach). Hier dargestellt, je ein Schnitt aus jeder Gruppe zum Zeitpunkt 1 (60 Minuten nach dem Schneiden). Der Stern (*) markiert Luftblasen; Die Raute (#) markiert Myokardüberlagerungen.

In der Vergrößerung lässt sich die Anreicherung von Trypanblau in den Randzonen besser nachvollziehen (Pfeile). Die mit einem Stern (*) gekennzeichneten weißen Ringe sind durch Luftreflexe hervorgerufene Artefakte. Die blauen Zonen innerhalb des Gewebeschnittes (#) sind Stellen, an denen sich Myokard überlagert hat, weswegen eine ebenfalls artifizielle verstärkte Färbung hervorgerufen wird. Insgesamt wirken die Bilder von

Gewebeschnitten des Ausgangsmodells (vgl. Abbildung 3.16 A) subjektiv dunkler angefärbt als die der Vergleichsgruppe.

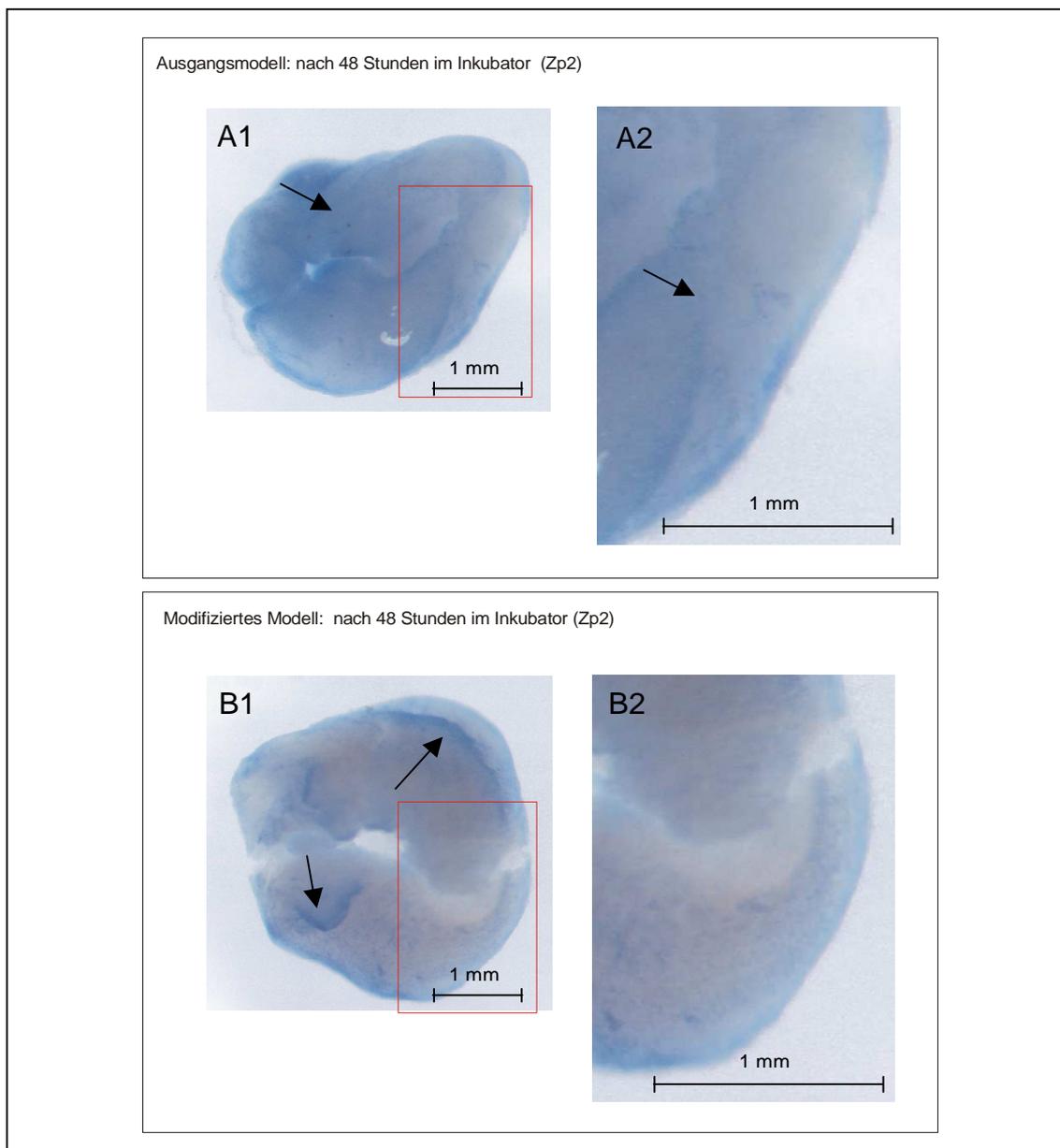


Abbildung 3.17: Zur besseren Darstellung wurde pro Gruppe je ein Bild der Färbung ausgesucht und digital (A1, B1: 90-fach; A2, B2: 215-fach) vergrößert. Hier dargestellt, je ein Schnitt aus jeder Gruppe zum Zeitpunkt 2 (zwei Tage nach dem Schneiden).

Eine Anreicherung des blauen Farbstoffes ist zum Zeitpunkt 2 insbesondere bei den Gewebeschnitten, die nach dem Ausgangsmodell präpariert wurden, auch innerhalb der Herzwand zu erkennen (Abbildung 3.17 A, Pfeile).

Die Schnitte wirken insgesamt subjektiv stärker gefärbt als zum Zeitpunkt 1. Bei den Färbungen der Schnitte des modifizierten Modells fällt zum Zeitpunkt 2, wie

auch direkt nach dem Schneiden, insbesondere die lokalisierte Anreicherung des Farbstoffs an den Schnitträndern auf (Abbildung 3.17 B, Pfeile). Der Durchmesser der Schnitte beider Gruppen ist im Vergleich zum ersten Zeitpunkt (Abbildung 3.16) nach Ausmessungen um das 1,5-fache gesunken. Dies lässt sich durch die nach Inkubation einsetzende Kontraktion des Gewebes erklären.

3.3.3 ATP-Messungen

Die Optimierung der Präparation durch die vorangegangenen Arbeitsschritte wurde mit dem ATP-Test verifiziert. Durch einen Vergleich des modifizierten Modells mit dem Ausgangsmodell konnte gezeigt werden, dass die Gewebeschnitte jetzt einen signifikant höheren ATP-Gehalt aufweisen. An je drei Schnitten aus drei unterschiedlichen Herzen pro Gruppe wurde nach 24 Stunden im Inkubator und nach 48 Stunden im Inkubator der ATP-Gehalt der Herzgewebeschnitte in den untersuchten Modellen bestimmt und verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.18 dargestellt.

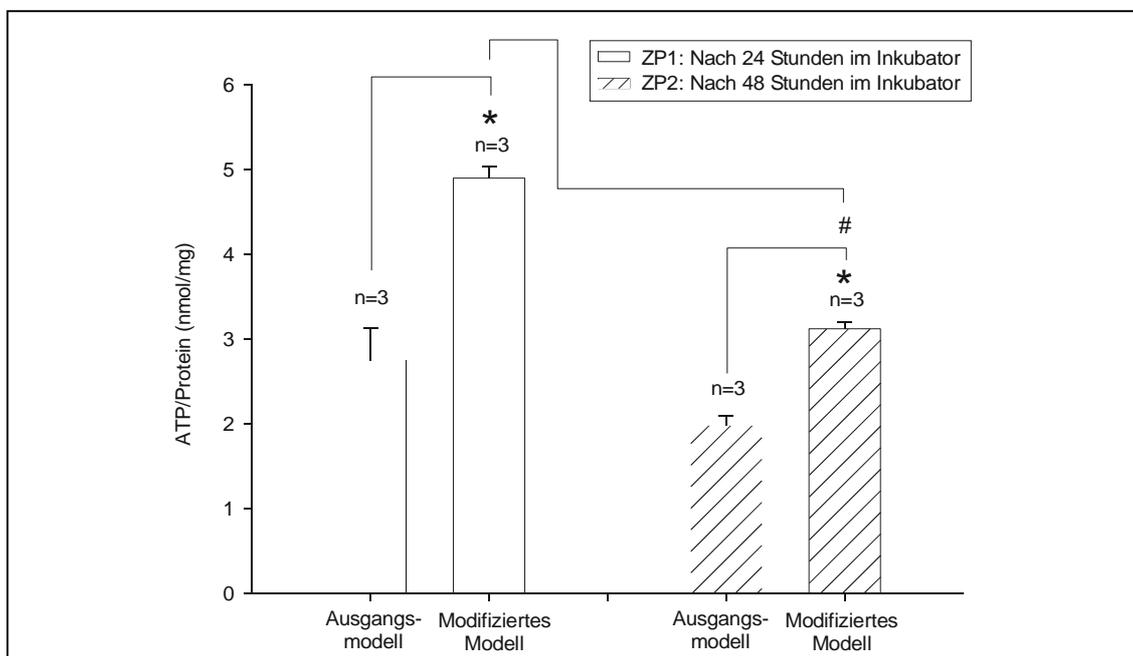


Abbildung 3.18: Der ATP-Gehalt der Myokardschnitte wurde nach 24 und nach 48 Stunden im Inkubator gemessen. Die Balken geben den Mittelwert an, die Fehlerbalken den SEM. Der Stern (*) markiert signifikant höhere ATP-Werte im modifizierten Modell zu beiden Zeitpunkten. Die Raute (#) zeigt einen signifikanten ATP-Abfall zwischen den untersuchten Zeitpunkten.

Das modifizierte Modell zeigt im ATP-Test zu beiden Zeitpunkten einen signifikant höheren ATP-Gehalt. Zwischen den untersuchten Zeitpunkten besteht im modifizierten Modell ein signifikanter Abfall des ATP-Gehaltes von Zeitpunkt 1 zu Zeitpunkt 2 (vgl. Tabelle 3.16).

Gruppe	Allgemeine Statistik			T-Test		
	n	Mittelwert	SEM	T	FG	p-Wert
ZP1 Ausgangsmodell	3	2,7458	0,3844	-5,3056	4	0,0061
ZP1 Modifiziertes Modell	3	4,8992	0,1303			
ZP2 Ausgangsmodell	3	1,9792	0,1150	-8,2210	4	0,0012
ZP2 Modifiziertes Modell	3	3,1199	0,0777			
ZP1 vs. ZP2 Ausgangsmodell				1,9109	4	0,1286
ZP1 vs. ZP2 Modifiziertes Modell				11,7247	4	0,0003

Tabelle 3.17: Vergleich des Ausgangsmodells mit dem modifizierten Modell im ATP-Test (nmol/mg).

3.3.4 MTT-Test

Um die Integrität der Mitochondrien zu testen, wurde der MTT-Test angewendet. 4 x je 2 Schnitte wurden nach dem Ausgangsmodell und 6 x je 2 Schnitte nach dem modifizierten Modell aus drei verschiedenen Herzen präpariert und nach 48 Stunden im Inkubator mit dem MTT-Test gemessen.

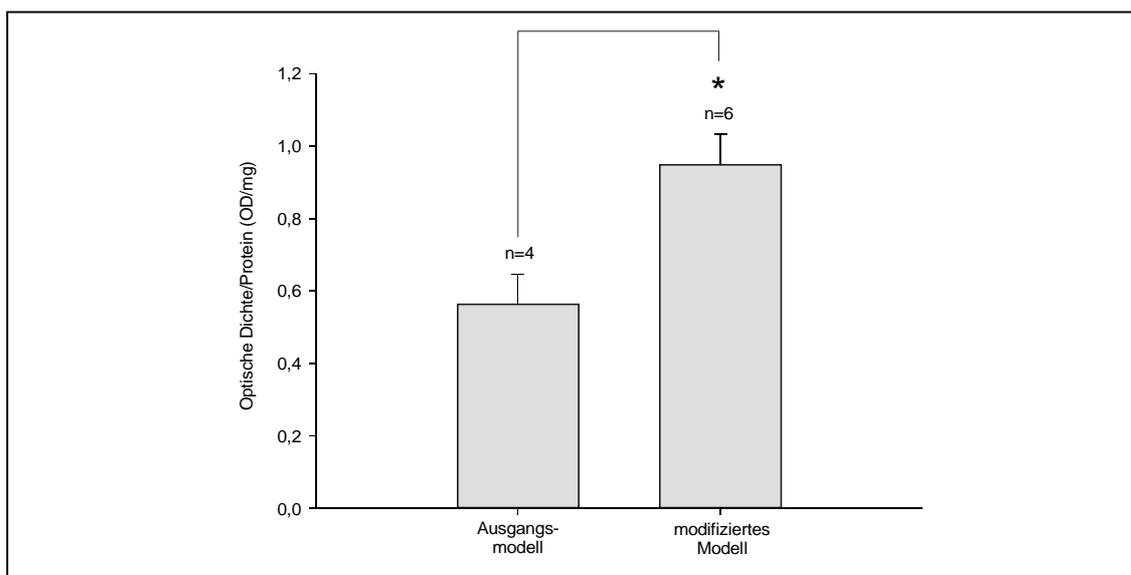


Abbildung 3.19: MTT-Test. Die Balken geben den Mittelwert an, die Fehlerbalken den SEM. Der Stern (*) markiert signifikant höhere MTT-Werte im modifizierten Modell.

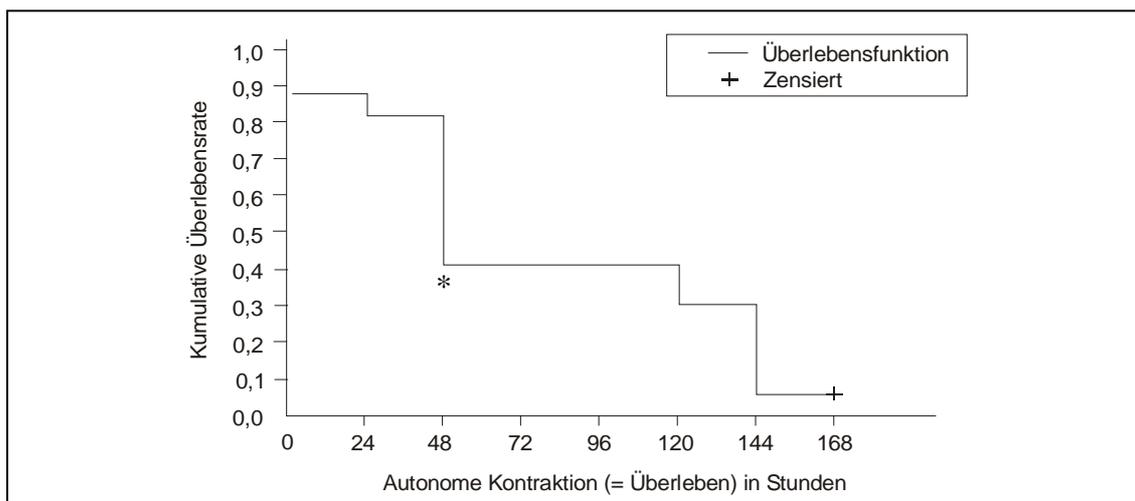
Das modifizierte Modell zeigt hinsichtlich des Umsatzes von MTT einen signifikanten Vorteil (vgl. Tabelle 3.17).

Gruppe	Allgemeine Statistik			T-Test		
	n	Mittelwert	SEM	T	FG	p-Wert
Ausgangsmodell	4	0,5631	0,0824	-3,2022	4	0,0328
Modifiziertes Modell	6	0,9474	0,0872			

Tabelle 3.18: Vergleich des Ausgangsmodells mit dem modifizierten Modell im MTT-Test (OD/mg).

3.3.5 Autonome Kontraktion

Es konnte beobachtet werden, dass die mit dem modifizierten Modell erstellten Herzgewebeschnitte nach etwa 90 Minuten im Inkubator selbständig und regelmäßig zu kontrahieren begannen. Diese Beobachtung wurde als funktioneller Vitalitätsparameter angesehen (vgl. Diskussion). Als aktiv und somit vital wurden die Schnitte gewertet, wenn eine ubiquitäre Kontraktion zu beobachten war. Vereinzelt Kontraktionen in kleinen Bereichen der Gewebeschnitte wurden nicht als autonome Aktivität im oben stehenden Sinne gewertet. Von 17 hinsichtlich dieser Fragestellung untersuchten Gewebeschnitte, die nach dem modifizierten Modell erstellt wurden, zeigten 15 eine autonome Aktivität über einen Zeitraum von mindestens 24 Stunden (88,24%). Nach zwei Tagen im Inkubator schlugen 7 der 17 Gewebeschnitte (50%) spontan. Fünf der Gewebeschnitte zeigten auch am fünften Tag nach der Operation noch eine regelmäßige autonome Kontraktion. Die Daten sind im Folgenden in einer Überlebensfunktion nach Kaplan-Meier dargestellt.



Zeit im Inkubator	Autonom schlagende Schnitte (Prozent (Anzahl)) (n=17)
90 Minuten	88,24% (15 Schnitte)
24 Stunden	82,35% (14 Schnitte)
2 Tage	41,18% (7 Schnitte)
5 Tage	29,41% (5 Schnitte)
6 Tage	5,88% (1 Schnitte)

Abbildung/Tabelle 3.19: Analyse der autonomen Kontraktion über die Zeit. Abbildung: Überlebensfunktion nach Kaplan-Meier. Stärkster Abfall zwischen dem ersten und zweiten Tag nach der Operation (*). Zensiert bedeutet, dass bei diesen Gewebeschnitten am Ende des Beobachtungszeitraums (6 Tage) das abgebildete Ereignis (Aussetzen der autonomen Kontraktion) nicht eingetreten ist. Die Tabelle entschlüsselt die Daten detailliert.

3.3.6 Herzfrequenzanalyse

Untersucht man die elektrische Aktivität der kontrahierenden Schnitte auf MEAs, können über den Elektroden Feldpotenziale wie im Methodenteil beschrieben gemessen und ausgewertet werden. Analysiert wurde die Schlagfrequenz an je 7 Schnitten pro Gruppe (Ausgangsmodell vs. modifiziertes Modell), um eine Aussage über die Herzfrequenz treffen zu können. Mittels des Softwareprogramms MATLAB[®] wurden in fünfminütigen Aufzeichnungen der Feldpotenziale die Abstände zwischen den Potenzialen (inter spike interval = ISI) über einen Zeitraum von 30 Sekunden bestimmt und computergestützt gemittelt. Aus dem gemittelten Abstand der Aktionspotenziale lässt sich dann die Frequenz errechnen ($1000 / \text{ISI (ms)} \times 60 \text{ Sek.}$). In der

unten stehenden Grafik sind neben der Frequenz zusätzlich Ausschnitte der Originalaufnahmen dargestellt (Abbildung 3.20 A).

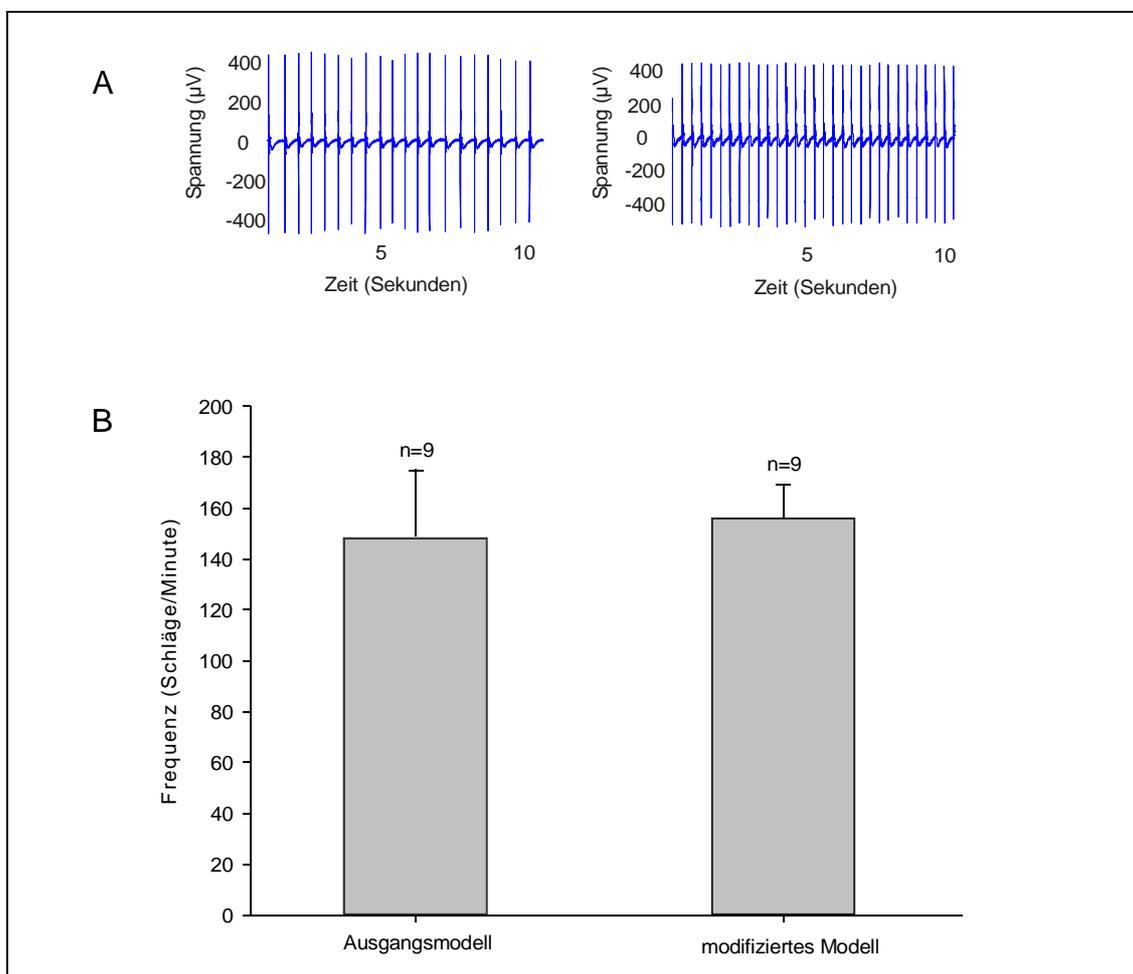


Abbildung 3.20: Untersucht wurde die Frequenz an je 7 Schnitten aus drei unterschiedlichen Herzen. Die Balken geben den Mittelwert an, die Fehlerbalken den SEM.

Die gemessene Frequenz der autonomen Kontraktionen weist insbesondere bei Präparation nach dem Ausgangsmodell eine sehr hohe Streuung auf. Unterschiede zwischen den beiden Modellen lassen sich nicht ausmachen (vgl. Tabelle 3.20).

Gruppe	Allgemeine Statistik			T-Test		
	n	Mittelwert	SEM	T	FG	p-Wert
Ausgangsmodell	9	148,2203	25,0982	-0,3149	16	0,7568
Modifiziertes Modell	9	157,1211	12,9930			

Tabelle 3.20: Frequenz der Herzgewebeschnitte (Schläge/Minute).

3.3.7 Feldpotenziale

Untersucht wurden 9 Gewebeschnitte hinsichtlich des Auftretens, der Form und der Verteilung der Feldpotenziale über den Elektroden der MEAs. Dabei konnten folgende Charakteristika beobachtet werden:

1. Es konnten über allen Schnitten FPs jeweils über allen 60 Elektroden abgeleitet werden (vergleiche beispielhaft Abbildung 3.21 A/B).
2. Alle Herzen zeigten Kontraktionen bzw. Erregungen in konstanten Abständen (ISI), welche innerhalb des Messzeitraums nur marginal schwankten (vergleiche beispielhaft Abbildung 3.21 C/D).
3. Die mittlere Frequenz wies im Vergleich der Schnitte untereinander allerdings eine große Streuung auf (vgl. Ergebnisse, Herzfrequenz).
4. Die Form der Feldpotenziale war innerhalb der Messung über einer Elektrode eines Schnitts stets gleich (Abbildung 3.21 D).
5. Im Vergleich der Schnitte zeigten sich aber Unterschiede im Aufbau des Feldpotenzials. Allen gemeinsam war dennoch stets eine positive (FPmax) und eine negative (FPmin) Welle.
6. FPmin und FPmax zeigten innerhalb einer Messung stets einheitliche Amplituden (Abbildung 3.21 F).
7. Es wurde beobachtet, dass FPmin im Durchschnitt der untersuchten Schnitte eine weitaus höhere Amplitude als FPmax aufwies ($p=0,00058$) (vgl. Abbildung 3.21 F und Tabelle 3.21).

Feldpotenzial-Amplitude

FPmin	-675 mV +/- 126 mV (n=9)
FPmax	115 mV +/- 34 mV (n=9)

Tabelle 3.21: Vergleich der Amplitude von FPmin und FPmax. Der Unterschied ist zum Niveau $\alpha=0,05$ signifikant ($p=0,00058$).

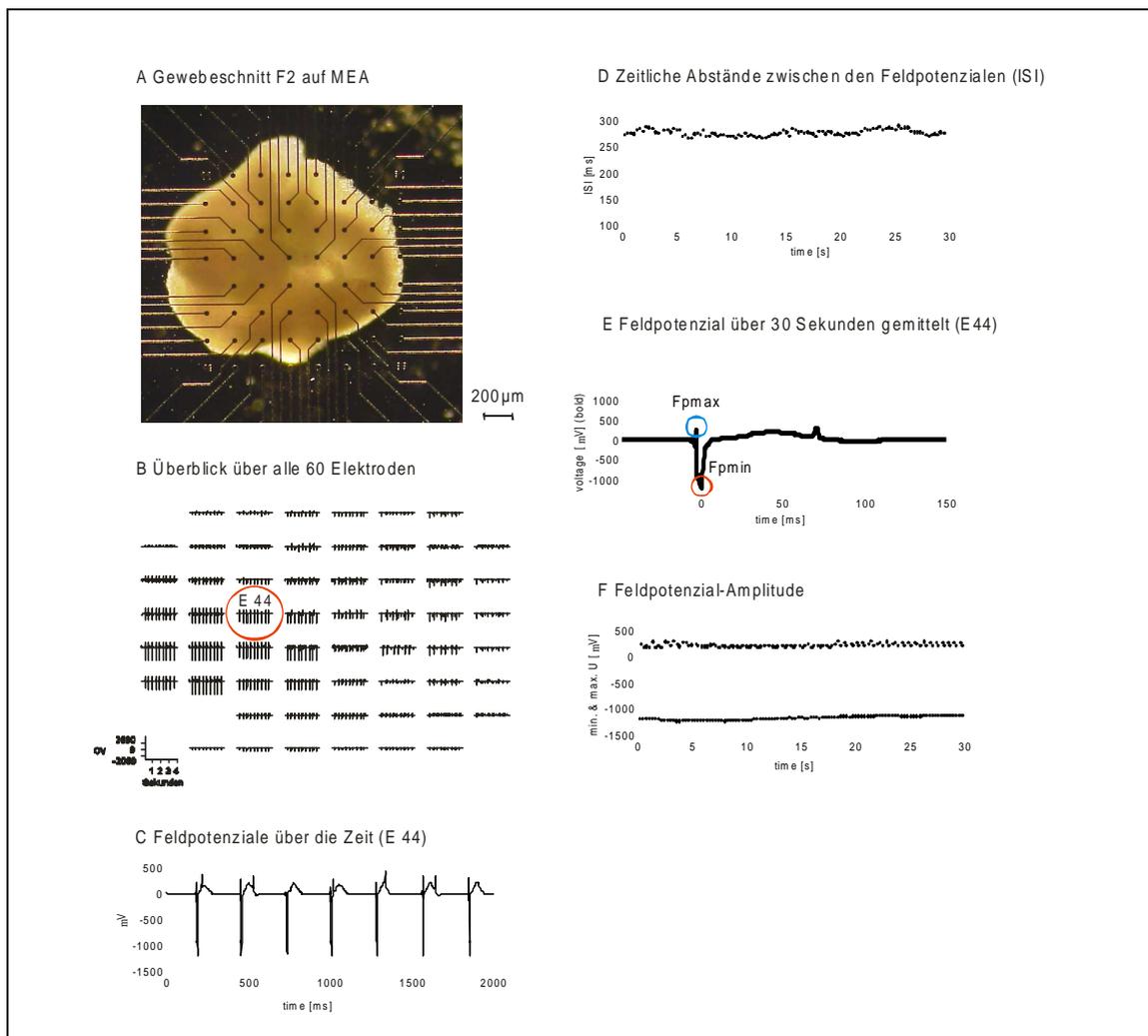


Abbildung 3.21: Beispielhafte Auswertung der elektrophysiologischen MEA-Messung eines Herzgewebeschnitts (Erläuterung siehe Text).

3.3.8 Erregungsausbreitung

In einer weiteren Versuchsreihe wurde untersucht, ob in den erstellten Schnitten bei autonomer Kontraktion eine geordnete Erregungsausbreitung bestimmt werden kann. Dazu wurden im Abstand von 6 ms die FPs über den Elektroden gemessen und grafisch als Konturplot (siehe Methoden) abgebildet. Dabei konnte über allen analysierten Schnitten beobachtet werden, dass sich die Erregung über den gesamten Herzgewebeschnitt ausbreitet. Bei jeder Kontraktion eines Gewebeschnitts lief die Erregungsausbreitung gleich ab. In Abbildung 3.22 wurde beispielhaft an einem Herzgewebeschnitt die Erregungsausbreitung mit Erregungszentrum (*) in einzelnen Sequenzen dargestellt. Dies war in allen neun untersuchten Herzgewebeschnitten zu beobachten.

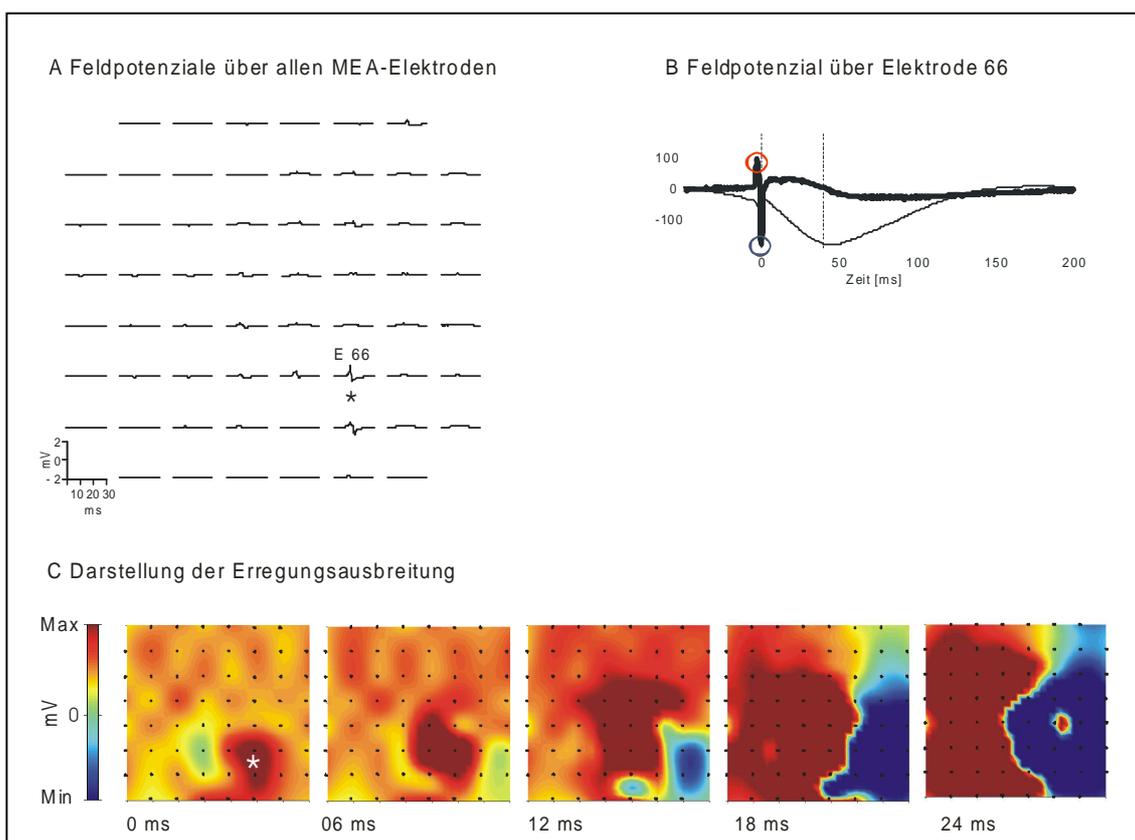


Abbildung 3.22: Erregungsausbreitung mit Erregungszentrum (durch den Stern (*) markiert) im unteren rechten Quadranten. A: Darstellung der einzelnen Feldpotenziale über den MEA-Elektroden. B: Feldpotenzial über der Elektrode 66. C: Darstellung der Erregungsausbreitung. Aufnahmen der Konturplots im Abstand von 6 ms.

4 Diskussion

Der Mangel an bestehenden Methoden zur Untersuchung myokardialen Gewebes *in vitro* (Lin et al. 1995), die große Relevanz kardiologischer Fragestellungen vor allem in Bezug auf Arrhythmien sowie der Anspruch auf unkomplizierte, wirtschaftlich und ethisch vertretbare Forschung im kardiologischen Bereich fordern die Entwicklung eines effizienten Modells zur Untersuchung von Herzgewebe.

In der vorliegenden Arbeit wurde (i) erstmals eine Methode entwickelt, bei der spontan schlagende, vitale Herzmuskelschnitte aus neonatalen Maus Herzen zur elektrophysiologischen Untersuchung *in vitro* über 48 Stunden generiert wurden. Diese Methode wurde (ii) in ihren Arbeitsschritten systematisch durch Variation der einzelnen Parameter hinsichtlich der vitalen Aufbereitung des Gewebes signifikant verbessert. Die so entwickelten vitalen Herzgewebeschnitte wurden (iii) in ihren histologischen, biochemischen und elektrophysiologischen Eigenschaften charakterisiert und damit ein reproduzierbares, valides Modell von strukturell und funktionell intakten Myokardschnitten zur Untersuchung von Herzgewebe über einen Zeitraum von zwei Tagen geschaffen.

4.1 Diskussion der einzelnen Experimente zur Modifikation der Gewebeschnitte

Herauszufinden, welche Parameter kritisch für das Gelingen der Präparation vitaler Herzgewebeschnitte sind, war einer der zentralen Punkte dieser Arbeit. Dazu wurden zunächst Überlegungen angestellt, durch welche Präparationsschritte eine Vitalitätsminderung hervorgerufen worden sein könnte. Anschließend wurden als relevant eingestufte Faktoren im Einzelnen untersucht.

Ausschlaggebend für die Auswahl der genauer zu untersuchenden Faktoren, die wegen des zeitlichen Rahmens notwendig erschien, waren neben Vorversuchen, eigene Überlegungen sowie in anderen Arbeiten angestellte Untersuchungen an Herzgewebe, die einen Einfluss auf die Schnittvitalität vermuten ließen.

4.1.1 ATP-Gehalt der Herzen in vivo und der Herzgewebeschnitte

Um die in dieser Arbeit gemessenen ATP-Werte der ganzen Herzen (6,9 +/- 0,59 nmol/mg Protein) und der Herzgewebeschnitte (6,0 +/- 0,2 nmol/mg Protein) einzuordnen und zu diskutieren, wurde in der Literatur nach vergleichbaren Untersuchungen mit dem *outcome* ATP-Test gesucht. Limitiert wurde dies insbesondere durch den Normierungsparameter Protein. Nur wenige Arbeitsgruppen normierten das Herzgewebe bislang auf das Totalprotein. Die meisten hingegen nutzten das Nassgewicht der Gewebestücke oder Gewebeschnitte (vergleiche Diskussion 4.3). Um dennoch einen Vergleich zu ermöglichen, wurde ein durchschnittliches Nassgewicht der in dieser Arbeit erstellten Herzgewebeschnitte ermittelt, welches bei 0,8 +/- 0,06 mg (n=12) liegt. Ein durchschnittlicher Schnitt hat ein Totalprotein von ca. 40 µg Protein (39 +/- 2 µg (n=41)). Umgerechnet bedeutet dies, dass 1 mg Nassgewicht 32 µg Protein entspricht.

ATP-Untersuchungen an Herzgewebeschnitten wurden in der Vergangenheit erst ein Mal durchgeführt. Hierbei wurde der ATP-Gehalt im Gewebe von adulten Ratten ebenfalls mit einem Bioluminescence-ATP-Assay bestimmt (Parrish et al. 1992). Direkt nach dem Schneiden konnte ein ATP-Wert von 0,1 nmol/g ww, was umgerechnet 0,0032 nmol/mg Protein entspricht, gemessen werden. Dieser Wert ist um ein Vielfaches kleiner als der in dieser Arbeit gemessene Wert (6,0 +/- 0,2 nmol/mg). Möglicherweise spielen die unterschiedlichen Protokolle, Arbeitsweisen und die Umrechnung der Daten eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der beschriebenen Differenz. Ein weiterer Grund hierfür könnte auch eine niedrigere Vitalität der Gewebeschnitte sein. Da ein *in vivo*-Vergleichswert in der vorgestellten Arbeit von Parrish aber nicht ermittelt worden ist, kann keine Aussage bezüglich der relativen Vitalität gemacht werden.

Ein *in vivo*-Vergleichswert wurde von der Arbeitsgruppe um Ruiz-Lozano am Herzen embryonaler Mäuse (ED 14) unter Verwendung des ATP-Bioluminescence-Assays bestimmt und wie in der vorliegenden Arbeit auf das Gesamt-Protein normiert. Der Wert lag bei 35 nmol ATP/mg Protein (Ruiz-Lozano et al. 1998). Diese Messung lag etwa 6-fach über dem in dieser Arbeit

bestimmten Wert. Ein Grund dafür könnte das unterschiedliche Gewebe sein. Embryonales Herzgewebe ist relativ gesehen reicher an Herzmuskelzellen und somit an ATP als neonatales Gewebe (Leu et al. 2001).

Bei Operationen am menschlichen Herzen wurde der ATP-Gehalt direkt nach der Entnahme der Biopsie mit dem Bioluminescence-Assay bestimmt und ebenfalls mit dem Gesamt-Protein normiert. Hierbei fanden sich Werte von 5,3 +/- 0,3 nmol ATP/mg Protein (Corbucci et al. 2004). Dies entspricht annähernd den in dieser Arbeit erhobenen Daten.

Wie aus diesen drei Beispielen ersichtlich, scheint es wenig sinnvoll zu versuchen, die ermittelten Daten auf andere Arbeiten zu übertragen. Es muss zusammenfassend gesagt werden, dass ein Vergleich der gemessenen ATP-Werte mit anderen Arbeiten kritisch ist und durch die unterschiedliche Protokollführung der einzelnen Arbeitsgruppen sicher stark beeinflusst wird. Die in dieser Arbeit ermittelten ATP-Werte sowie der gemessene *in vivo*-Wert dienen somit in erster Linie zur Einschätzung der Vitalität der Gewebeschnitte untereinander und müssen im Verhältnis zu dem bestimmten Maximalwert gesehen werden.

4.1.2 Experiment 1: Fixierung der Herzen auf der Arbeitsbühne des Vibrotoms

Grundlage des hier entwickelten Modells war es, von den entnommenen Herzen dünne Gewebeschnitte zu erstellen. Geschnitten wurde das Gewebe mit einem Vibrotom. Ein solches stellt die Grundlage für ein einfaches, kostengünstiges und leicht nachzuvollziehendes System dar.

Das Vibrotom sieht vor, dass das zu schneidende Gewebe auf der Arbeitsbühne befestigt wird. Hierzu stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung.

Das Gewebestück kann mit herkömmlichem Flüssigkleber direkt auf die Arbeitsbühne aufgeklebt werden. Diese Methodik (Burnashev et al. 1990) erschien für das hier erarbeitete Modell wegen der geringen Größe der Herzen (etwa 5 mm²) nicht geeignet. Die toxischen Inhaltsstoffe des Klebers, die das Herz nahezu gänzlich durchsetzten sowie eine hohe Restmobilität des Herzen

gegenüber der Klinge, machten in Vorversuchen einen sauberen Schneidevorgang nahezu unmöglich.

Eine Technik, bei der das Gewebe vor dem Schneiden vollständig in *Agarose eingebettet* wird, wurde ursprünglich für die Präparation von Lungenschnitten entwickelt (Fisher et al. 1994). Dies erschien auch für die Aufbereitung des Herzgewebes vielversprechend. Durch das Eindringen der Agarose in die Ventrikel wird das Herz zusätzlich von innen gestützt und so ein Zusammenfallen des Gewebes verhindert, ohne dass toxische Einflüsse die Vitalität des Gewebes beeinflussen.

Der positive Effekt durch die Füllung des Hohlorgans mit Agarose wurde unter anderem zum Schneiden von Dickdarmgewebe untersucht und verifiziert (Parrish et al. 1992; Ruben de Kanter 2002). Zusätzlich verleiht die erkaltete Agarose dem ganzen System eine Stabilität, die es ermöglicht, selbst weiches und anspruchsvolles Gewebe wie Lunge oder eben Herz stabil zu schneiden (Price et al. 1995a; Price et al. 1995b; Stefaniak et al. 1992). Die Penetration von Sauerstoff, Elektrolyten und Metaboliten sollte während der Einbettung in Agarose durch Diffusion gesichert sein, ist aber nicht direkt quantifizierbar. Eine Diffusionsbarriere durch die das Herz umgebende Agarose kann ohne Untersuchung also nicht ausgeschlossen werden. Deswegen wurde im Institut für Physiologie der Universität zu Köln speziell für diese Fragestellung eine Ansaugvorrichtung zur Sogfixierung (vgl. Methoden 2.1.1.3) entwickelt. Diese ersetzt das Einbetten in Agarose und ermöglicht während des kompletten Schneidevorgangs einen direkten Kontakt des Gewebes mit der versorgenden Elektrolytlösung. Nachteil dieser Methode ist der zum Fixieren benötigte Sog, der einen mechanischen Reiz auf das Herzgewebe ausübt und unter Umständen zu Gewebeschäden führen kann. Im Vergleich der beiden Fixiermodelle konnte in allen drei Untersuchungsendpunkten (LDH, MTT und ATP) allerdings kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Gegenüber der Agarose-Einbettung hat die Sogfixierung den pragmatischen Nachteil, dass es in einzelnen Fällen zu einer Dislokation der Herzen auf der Arbeitbühne gekommen ist. Zudem ist die zur Sogfixierung genutzte Apparatur auf vorgefertigte Gewebegrößen ausgelegt, was ausschließlich das Schneiden

passgenauer Herzstücke ermöglicht. Da es sich zudem bei der Einbettung in Agarose um ein gut etabliertes System handelt, wurde entschieden, die fragliche Diffusionsminderung über eine mittlere Fixierungszeit von 6 +/- 2 Minuten zu tolerieren. Die Charakteristika der verschiedenen Ansätze sind in der folgenden Tabelle gegenübergestellt.

Agarose-Einbettung	Sog-Fixierung
die Einbettung in Agarose ist nicht auf die aufwendige Ansaugvorrichtung angewiesen und kann somit flexibler auch für Gewebestücke unterschiedlicher Größen (humane Herzbiopsien, adulte Mäuse) angewendet werden	vorgefertigte Formen ermöglichen ausschließlich das Schneiden passgenauer Herzen
das Füllen der Cavitäten mit Agarose bietet von innen zusätzlichen Widerstand beim Schneiden	beim Schneiden in der Agarose-Form kommt es gelegentlich zum Verrutschen des Herzens, was zu uneinheitlichen Schnittdicken führen kann
fragliche Diffusionsminderung durch Agarose-Einbettung	der zum Fixieren benötigte Sog übt einen mechanischen Reiz auf das Herzgewebe aus, der unter Umständen zu Gewebeschäden führen kann
etabliertes System (Lungengewebe)	neues System

Tabelle 4.1 : Zusammenfassung der Charakteristika von Agarose-Einbettung und Sogfixierung

4.1.3 Experiment 2: Schnittdicke

Die Versorgung der innersten Zellreihen des Gewebeschnitts durch Diffusion von außen ist ein kritischer Parameter. Zwar wurde veröffentlicht, dass die optimale Dicke für Herzgewebeschnitte zwischen 250 und 350 µm liegen sollte (Parrish et al. 1995), in hier durchgeführten Voruntersuchungen mittels Apoptose-Immunostaining (Bilder nicht im Einzelnen dargestellt) zeigte sich aber, dass nach 48 Stunden Inkubation in den inneren Zelllagen apoptotische Zellen zu finden sind. Dies führte zu der Überlegung, ob eine weitere Verringerung der Gewebedicke eventuell eine bessere Versorgung der

Innenschichten und somit insgesamt einen Vitalitätsvorteil ermöglichen könnte. Im durchgeführten Experiment (Experiment 2) konnte dies nicht bestätigt werden. Im Gegenteil zeigte sich eher eine Verschlechterung des ATP-Levels in den dünneren Gewebeschnitten. Eine mögliche Erklärung mag in der Anordnung und Verteilung der neonatalen Kardiomyozyten liegen.

Die Kardiomyozyten der neonatalen Maus am ersten Tag nach der Geburt sind charakterisiert durch ein spindelförmiges Aussehen. Die Länge der ventrikulären Zellen beträgt am ersten Tag postnatal $46 \pm 13 \mu\text{m}$, die Breite $13 \mu\text{m} \pm 2 \mu\text{m}$ und die Höhe $5 \pm 1 \mu\text{m}$ (Leu et al. 2001). Diese Daten ermöglichen eine Vorstellung der Zellschichtzahl in einem Gewebeschnitt und lassen vermuten, dass im Falle einer vertikalen Zellausrichtung bei einer Gewebeschnittdicke von $300 \mu\text{m}$ etwa sechs Zelllagen übereinander intakt sein können. Es kann weiter davon ausgegangen werden, dass sowohl vertikal, wie auch horizontal verlaufende Schichten im Gewebeschnitt vertreten sind, da im neonatalen Herzen die Herzwand bereits einen typischen Aufbau besitzt (McLean and Prothero 1991). Durch den Schneidevorgang werden die Zellen der obersten Schichten verletzt, was mit dem Zelltod einhergeht. Verringert man nun die Dicke der Gewebeschnitte von $300 \mu\text{m}$ auf $200 \mu\text{m}$ sind insgesamt weniger Zelllagen zu erwarten. Beim Schneiden geht aber wegen der gleichen Oberfläche dieselbe Anzahl von Zellen unter, so dass anteilmäßig in einem $200\text{-}\mu\text{m}$ -Schnitt mehr Zellen untergehen als in einem $300\text{-}\mu\text{m}$ -Schnitt. Deswegen wäre eher ein geringerer Anteil von ATP pro Protein zu erwarten. In dieser Arbeit wurde kein Unterschied zwischen den beiden Schnittdicken ermittelt, was zu der Überlegung führt, dass sich die positiven und negativen Aspekte des dünneren Schneidens nivellieren. Da die Präparation von $300 \mu\text{m}$ dicken Schnitten in der Praxis einfacher durchführbar war und die Gewebeschnitte durch ihre Dicke stabiler und somit weniger leicht zerstörbar sind, wurde die Präparation mit einer Dicke von $300 \mu\text{m}$ beibehalten.

4.1.4 Experiment 3: Operationstechnik

Die Operation von Mäusen zur Freilegung des Herzens wird in der Literatur unterschiedlich behandelt. Dabei finden sich drei Herangehensweisen, die hier im Einzelnen diskutiert werden sollen.

Die weitverbreitetste Methode zur Operation und Präparation des Herzens ist, den Brustkorb des Tieres nach Dekapitation zu eröffnen und das Herz nach grober Durchtrennung des Gefäßstiels *en bloc* herauszunehmen und ohne weitere Aufarbeitung zu schneiden (Bull et al. 2000; Kamiyama et al. 1986). Das Entfernen der Herzen dauert hierbei nicht länger als 1 bis 2 Minuten und ist in jedem Labor schnell und einfach durchzuführen. Nachteil dieser Methode ist aber, dass die im Herzen verbleibenden Blutbestandteile durch Metabolite und Elektrolytausschüttung das umliegende Myokard schädigen können. In Bildern der Herzen nach oben beschriebener Entnahme ist deutlich eine Blutstase in den Koronarien zu sehen (vgl. Abbildung 2.1). Zwar entleeren sich die Ventrikel und Koronarien während des Schneidevorgangs, so dass eine dauerhafte Beeinflussung des Myokards nicht anzunehmen ist, eine frühe Schädigung durch die Blutbestandteile kann aber nicht ausgeschlossen werden.

Die aufwendigste und sicherlich im Hinblick auf Vermeidung der oben beschriebenen Problematik optimale Lösung ist es, die Maus unter Anästhesie zu operieren, das Herz im Brustkorb zu kanülieren, zu heparinisieren und vor dem Schneiden mittels einer Langendorff-Perfusion zu spülen, wie es Yamashita an erwachsenen Ratten durchgeführt hat (Yamashita et al. 2004). Zusätzlicher Vorteil dabei ist neben der kompletten Spülung der Blutbestandteile aus dem Herzen eine nahezu durchgängige Perfusion des Herzens bis Sekunden vor dem Schneidevorgang.

Diese Methode ließ sich nicht auf das hier entwickelte Modell übertragen. In Vorversuchen an den erheblich kleineren neonatalen Mäusen (2 g Körpergewicht im Vergleich zu 50 g bei Ratten) zeigte sich schnell, dass eine saubere Kanülierung der großen Gefäße des Herzens selbst mit kleinsten Kanülen und Schläuchen nicht durchzuführen ist. Die Kanülierungsversuche wurden durch Einspritzen von blauem Farbstoff geprüft. Es konnte dabei immer

ein Farbstoffaustritt durch Perforationsstellen des Myokards oder der Gefäße beobachtet werden. Um eine solche Operation in der gegebenen Größenordnung durchzuführen, sind aufwendigere mikrochirurgische Techniken zwingend. Der Kompromiss aus einfacher Handhabung und Spülung des Herzens fand sich wie folgt: Durch einen knappen Skalpellschnitt gerade unterhalb der Klappenebene direkt nach Entfernung des Herzens aus dem Brustkorb (etwa 1 Minute nach Perfusionsstopp), kann das Blut aus den eröffneten Ventrikeln laufen und durch leichte Bewegung in der Tyrode fast vollständig ausgewaschen werden. Hier ist zwar eine komplette Waschung der Koronarien nicht gesichert, eine Entlastung hingegen durch das sichtbar austretende Blut aber anzunehmen (Walsh et al. 2004). In Experiment 3 konnte anhand der erhobenen Daten bestätigt werden, dass der Schnitt unterhalb der Klappenebene einen signifikanten Vorteil für die Vitalität der Herzgewebeschnitte darstellt. Die ATP-Werte der so erstellten Schnitte sind signifikant höher als die der Vergleichsgruppe. Dies ist eine zwar simple, aber doch sehr effektive Modifikation, die für die weitere Präparation übernommen wurde. Die Zeit der Operation hat sich durch diese Modifikation nicht signifikant verändert (vgl. Tabelle 4.2). Zusammenfassend müssen somit toxische oder mechanische (z.B.: Druck) Komponenten des im Herzen verbliebenen Blutes als kritischer Faktor für die Präparation angenommen werden.

	Operation ohne Vorhöfe (Mittelwert+/-S.E.M) n=12	Operation mit Vorhöfen (Mittelwert+/-S.E.M) n=45
Dauer der OP (min)	2min 13sek+/-60sek	1min 54 sek+/-44sek
Zeit insgesamt (min)	13min 3sek+/-2min 50sek	14min 30sek+/-2min 41sek

Tabelle 4.2 : Operationsdauer

4.1.5 Experiment 4: BDM

In vielen Veröffentlichungen wurde die Wirkung von BDM zur besseren Konservierung von Herzen untersucht. Dabei wurde häufig ein kardioprotektiver Effekt festgestellt (Mulieri et al. 1989). Es wurde beobachtet, dass BDM

dosisabhängig die Kontraktionskraft des Myokards reversibel herabsetzt (Marijic et al. 1991; Perreault et al. 1992; Schwinger et al. 1994; Vahl et al. 1995). Die vollständige Hemmung der Kraftentwicklung im Myokard tritt ab einer Dosis von 30 mmol/l ein (Ikenouchi et al. 1994; Perreault et al. 1992; Vahl et al. 1995) und wurde in dieser Konzentration bereits zur Vitalitätsverbesserung bei der Präparation von Herz-Muskel-Streifen erfolgreich eingesetzt (von Lewinski et al. 2004). Man nimmt an, dass vor allem die Inhibition der Kontraktion durch BDM dafür verantwortlich ist (Li et al. 1985; Mulieri et al. 1989). Es werden drei Hauptmechanismen des BDM beschrieben: Zum einen vermutet man eine reduzierte Kalziumsensibilität der Myofilamente sowie eine verringerte Menge an Kalziumionen insgesamt durch direkte Bindung an BDM. Außerdem wird eine Inhibition der Brückenbildung zwischen Aktin- und Myosinfilamenten beschrieben (Perreault et al. 1992).

BDM soll zudem direkt den Energiegehalt der Zellen beeinflussen. Es hemmt zum einen die Aktomyosin-ATPase-Aktivität, die durch Spaltung von ATP zu einer Abnahme des ATP-Gehalts führt. Zum anderen hemmt es die mitochondriale oxydative Phosphorylierung, die zu einem ATP-Aufbau führt (Hebisch et al. 1993). Beide Effekte finden in ähnlichem Ausmaß gleichzeitig statt, so dass nicht mit einem Einfluss auf den ATP-Gehalt der Zelle und somit nicht mit einer Verfälschung der Ergebnisse im ATP-Test zu rechnen ist. Insgesamt besitzt BDM also einen protektiven Effekt, der bei der Manipulation kardialen Gewebes beispielsweise durch mechanische Belastung eine übermäßige Schädigung der Zellen verhindert (Mulieri et al. 1989; Perreault et al. 1992).

Aus diesen Gründen wurde auch in dieser Arbeit 30 mmol BDM in der Elektrolytlösung getestet. Die Ergebnisse (Experiment 4) decken sich mit den Untersuchungen der oben vorgestellten Arbeiten. Auch in dem vorliegenden Ansatz schlägt sich eine Zugabe von 30 mmol BDM zur Präparationslösung in einer deutlichen Verbesserung der Vitalität des Myokards nach der Präparation im ATP-Gehalt nieder (vgl. Ergebnisse). Sowohl eine Stunde nach der Präparation, als auch nach 24 Stunden im Inkubator ist der ATP-Gehalt signifikant erhöht.

Durch ein geringes Molekulargewicht von 101,1 M und einen lipophilen Charakter, ist ein schneller Wirkungseintritt von BDM sowie ein schneller Wirkungsverlust durch Auswaschen garantiert (Stringham et al. 1992). Somit ist bei weiteren Untersuchungen der Herzgewebeschnitte nach intensiver Auswaschung und Inkubation nicht mit Interferenzen durch den vormaligen BDM-Kontakt zu rechnen. Dies wurde hier durch Untersuchungen der Gewebeschnitte im Verlauf der Experimente ebenfalls bestätigt. Die vormals mit BDM behandelten, nicht mehr kontraktile Schnitte zeigten nach Auswaschung im Inkubator bei 37° C wieder eine regelmäßige, spontane Kontraktion, was mit einer erfolgreichen Auswaschung der Substanz korreliert.

4.1.6 Experiment 5: Kalzium

Kalzium in der Lösung zur gekühlten Aufbewahrung bzw. Perfusion von Herzgewebe ist ein in der Literatur viel diskutiertes Thema. Kalzium spielt insbesondere bei der Entwicklung der Kontraktion des Myokards eine entscheidende Rolle. Die Präparation in *kalziumfreier* Elektrolytlösung hat den Vorteil, dass eine Kontraktion des Myokards vollständig unterdrückt werden kann. Dies ist beim Schneiden der Herzen von großem Vorteil, so dass die Präparation der Herzgewebeschnitte in dieser Arbeit zunächst in kalziumfreier Lösung durchgeführt wurde. Bei Kontakt des Myokards mit kalziumfreier Lösung wird durch ein entstehendes Diffusionsgefälle das Kalzium aus dem Extrazellulärraum und somit aus den Zellen gespült. Dies kann zu einer Schwächung der Zell-Zell-Kontakte führen. Durch anschließende Perfusion mit kalziumhaltiger Lösung, wie es auch in dieser Arbeit bei der Kalziumtoleration durchgeführt wurde (vgl. Methoden 2.1.1.6), kann durch den plötzlich erhöhten Kalziumeinstrom in die Zellen eine Kontraktur ausgelöst werden, die zu einer kompletten Lösung der Zell-Zell-Kontakte und einer Zerstörung der sarkolemmalen Membranen führt. Anschließende ultrastrukturelle Schäden wie Formierung von Kontraktionsbändern und Austritt von Myoglobin könnten dabei ebenfalls entstehen (Altschuld et al. 1991; Hearse et al. 1978). Zimmermann und Hulsman berichteten Mitte der 1960-er Jahre erstmals von der Entstehung dieser Schädigung und nannten dies Kalziumparadox (Zimmerman

and Hulsman 1966). Wahrscheinlich aus diesem Grund präparierten andere Arbeitsgruppen Herzgewebeschnitte eher in kalziumhaltiger Lösung (Yamashita et al. 2004; Zhang et al. 2000). Burnashev postuliert, dass ein Kalziumgehalt von 1 mmol optimal zur Präparation von Herzgewebeschnitten sei (Burnashev et al. 1990). Ob in der hier durchgeführten Präparation das Kalziumparadox wirklich auftritt und das Gewebe schädigt, ist fraglich, da die Entstehung des Kalziumparadoxes temperaturabhängig ist und durch Perfusion mit gekühlten Lösungen verhindert werden kann (Hearse et al. 1978; Holland, Jr. and Olson 1975; Ruigrok et al. 1983). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (Experiment 5) sprechen nicht für eine Schädigung des Gewebes durch den oben beschriebenen Pathomechanismus.

Im Vergleich war zwischen einer Präparation in konstant 1,4 mmol kalziumhaltiger Lösung und der Präparation in kalziumfreier Lösung mit anschließender Kalziumtoleration im Verlauf der untersuchten 24 Stunden im ATP-Test kein signifikanter Unterschied festzustellen. Tendenziell sprachen die Daten eher für eine Präparation in kalziumfreier Lösung. Schaut man sich die Daten aus den kumulierten Experimenten an (vgl. Abbildung 3.13), kann man von einem signifikanten Abfall des ATP-Gehalts bei Präparation in kalziumhaltiger Lösung sprechen. Auch in zusätzlichen Untersuchungen hinsichtlich der LDH-Freisetzung der Gewebeschnitte, die im Rahmen dieser Fragestellung zur Absicherung der Ergebnisse im ATP-Test durchgeführt wurden, war zu jedem untersuchten Zeitpunkt eine signifikant erhöhte LDH im Überstand der in kalziumhaltiger Lösung präparierten Schnitte zu erkennen. Deswegen kann davon ausgegangen werden, dass in diesem Modell der Kalziumgehalt in der Lösung möglichst niedrig gehalten werden sollte. Ob ein mittlerer Kalziumgehalt oder andere Abstufungen der Kalzium-Konzentration einen positiven Effekt auf das Myokard haben, wurde wegen der guten Ergebnisse bei kalziumfreier Präparation nicht weiter untersucht. In der Literatur werden geringe Kalziumkonzentrationen zwischen 0,1 mmol und 1,4 mmol zur Präparation von Herzgewebe eingesetzt. So präparierte Lewinski Muskelstreifen in Elektrolytlösung mit einem Kalziumgehalt von 0,2 mmol (von Lewinski et al. 2004).

Für die Kalziumtoleration und auch für die Kalziumkonzentration des Inkubationsmediums ist in dieser Arbeit eine Endkonzentration von 1,4 mmol festgesetzt worden. Dies entspricht dem physiologischen Wert des freien Kalziums im Blut von neonatalen Mäusen (1.41±/− 0.07 mmol) (Zheng et al. 2004).

4.1.7 Experiment 6: EGTA

EGTA ist ein Komplexbildner. Es bildet besonders stabile Komplexe mit Kationen, die eine mindestens zweifach positive Ladungszahl aufweisen. Dies trifft insbesondere auf Kalziumionen zu. Durch Zugabe von EGTA zu einer Lösung werden alle Kalziumionen gebunden und stehen dem Gewebe nicht mehr zur Verfügung. Auch die Kalziumionen, die bei Präparation in kalziumfreier Lösung aus den Zellen in den Extrazellulärraum diffundieren, werden sofort gebunden. Da Kalzium eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Muskelkontraktionen besitzt (siehe oben), ist durch die Komplexbildung mittels EGTA eine solche zusätzlich unterdrückbar. Dies könnte einen negativen Einfluss auf die Präparation durch das Kalziumparadox (siehe oben) ausüben, jedoch auch einen potenziell kardioprotektiven Effekt haben (Mugelli et al. 1995). So konnte in perfundierten Langendorff-Herzen an Ratten gezeigt werden, dass eine Konzentration von 1 mmol EGTA in der Perfusionslösung das Herzgewebe positiv beeinflusst (Busselen 1991). In der vorliegenden Arbeit konnte der positive Effekt von EGTA bei der Präparation der Herzmuskelschnitte nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse (Experiment 6) sprechen nicht für eine Verbesserung der Vitalität. Es konnte tendenziell eher eine Erniedrigung des ATP-Wertes festgestellt werden, so dass von einer Zugabe von EGTA zur Elektrolytlösung abgesehen wurde. Der fehlende positive Einfluss des EGTA ist am ehesten darin begründet, dass in anderen Arbeiten der protektive Effekt vor allem darauf beruht, das Kalziumparadox zu unterdrücken (Busselen 1991). Da hier – wie oben beschrieben – aber kein Mechanismus im Sinne eines Kalziumparadoxes vorliegt oder zu erwarten ist, ist auch kein Effekt durch EGTA-Zugabe zu erwarten. Der tendenzielle Abfall des ATP-Gehalts könnte auf einer direkten toxischen Schädigung durch EGTA

beruhen. Auch der veränderte Einfluss von anderen zweifach positiv geladenen Ionen wie zum Beispiel Magnesium, die ebenfalls durch EGTA gebunden werden, ist ein Erklärungsansatz für den gemessenen Abfall des ATP.

4.1.8 Experiment 7: Temperatur

In früheren Arbeiten zum Thema Herzgewebeschnitte wird davon berichtet, dass die Kühlung der Herzen nach Entnahme aus dem Brustkorb auf ein Niveau um den Gefrierpunkt ein wichtiger und kritischer Faktor für das Überleben der Herzzellen sei (Burnashev et al. 1990). Der Stoffwechsel und die Zellmetabolisation werden durch extreme Hypothermie (4°C) auf ein niedriges Niveau heruntergefahren. Die kalte Lösung, in der die Herzen aufbewahrt werden, bewirkt hierdurch eine Kardioplegie, die die Kontraktion hemmt und so das Herz vor Schäden vor und während des Schneidevorgangs schützt. Zudem verhindert die Hypothermie das Auftreten des Kalziumparadox effektiv (Hearse et al. 1978; Holland, Jr. and Olson 1975; Ruigrok et al. 1983). Es hat sich in Arbeiten an Leber- und Nierengewebeschnitten gezeigt, dass sich die Aufbewahrung des Gewebes auf Eis positiver auf die Vitalität auswirkt, als die Aufbewahrung bei 4°C im Kühlschrank (Eschwege et al. 1996).

Nach der gekühlten Präparation sollen die Herzgewebeschnitte aber unter physiologischen Bedingungen - also bei 37°C - untersucht werden. Deswegen ist eine Wiedererwärmung der Schnitte vonnöten. In dieser Phase, in der sich physiologischer Stoffwechsel und Kontraktion wiedereinstellen, ist das Gewebe besonders vulnerabel. Um möglichst schonend vorzugehen, werden die frischen Gewebeschnitte in zunächst *kaltem Medium* in den Inkubator gelegt und dort langsam wiedererwärmt. Die Erwärmung von etwa 4°C auf 37°C im Inkubator dauert bei einem Volumen von 3 ml etwa 30 Minuten. Um die vulnerable Phase zu verkürzen und aus pragmatischen Gründen (weniger Aufwand durch ständige Kühlung während aller Arbeitsschritte) gibt es Arbeitsgruppen, die die komplette Präparation bei Raumtemperatur durchgeführt haben (Walsh et al. 2004). Viele Arbeitsgruppen führten die Arbeitsschritte bis nach dem Schneiden in gekühlten Lösungen durch und lagerten die Schnitte dann direkt bei Raumtemperatur oder 37°C (Burnashev et

al. 1990; Zhang et al. 2000). Wegen der Fülle an möglichen Temperaturprotokollen wurde in der vorliegenden Arbeit im Wesentlichen untersucht, ob eine komplette Präparation bei Raumtemperatur, bei der die Temperaturwiedereinführung weniger steil verläuft (17°C Temperaturdifferenz im Vergleich zu 35°C), einen positiven Effekt auf die Gewebektivität besitzt. Dies konnte nicht bestätigt werden. Es ließ sich im Gegenteil ein Abfall der ATP-Konzentration insbesondere nach 24 Stunden im Inkubator beobachten (vgl. Experiment 7). Der protektive Effekt durch die Hypothermie ist bei Raumtemperatur geringer. Ohne den Zusatz von BDM haben die Herzen bei Raumtemperatur noch Kontraktionen gezeigt, während dies in gekühlter Lösung nicht mehr zu beobachten war. Trotz der Präparation unter BDM, das die Kontraktion weitestgehend unterdrückt, läuft der normale Stoffwechsel der Zellen weiter. Dies macht das Gewebe möglicherweise vulnerabel und weniger resistent gegen Schädigung bei der Präparation.

4.1.9 Zusammenfassung der Präparationsexperimente

Insgesamt kann resümiert werden, dass mittels der durchgeführten Untersuchungen eine deutliche Verbesserung der Präparation von Herzgewebeschnitten erreicht wurde. Dabei waren insbesondere zwei Faktoren entscheidend:

1. Die Operation der Herzen (Schnittführung unterhalb der Klappenebene)
2. Die Zugabe von BDM zur Präparationslösung (30 mmol)

Es konnte gezeigt werden, dass die nach der verbesserten Präparation hergestellten Schnitte direkt nach dem Schneiden einen ATP-Gehalt nahe des gemessenen *in vivo*-Gehaltes aufweisen (91% des *in vivo*-Wertes) und auch nach 24 Stunden im Inkubator noch 84% des *in vivo*-ATP-Gehalts zu messen waren. Dies ist verglichen mit dem Ausgangsprotokoll, bei dem direkt nach dem Schneiden nur 50% des ATP-Gehalts gemessen wurde (nach 24 Stunden noch 36%) eine deutliche Verbesserung.

	Ausgangsmodell (% des Gesamt-ATP)	Modifiziertes Modell (% des Gesamt-ATP)
Zeitpunkt 1 (1 h nach dem Schneiden)	50 +/- 3	91 +/- 8
Zeitpunkt 2 (nach 24 h im Inkubator)	36 +/- 3	84 +/- 7

Tabelle 4.3: Prozent des ATP-Gehalts der Herzgewebeschnitte im Verhältnis zum ermittelten *in vivo*-ATP-Wert.

Der zweite Teil der Arbeit sollte die Herzgewebeschnitte in ihren biochemischen, histologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften charakterisieren.

4.2 Charakterisierung der Gewebeschnitte

4.2.1 Histologie

Die Histologie der Gewebeschnitte wurde untersucht, nachdem die Herzschnitte 24 Stunden bei 37°C in Medium inkubiert wurden. Dies entspricht dem ersten Tag nach der Präparation und somit dem Zeitpunkt, an dem weiterführende Experimente an den Gewebeschnitten durchgeführt werden sollen. Hier war insbesondere zu klären, ob die Gewebestruktur des Herzens erhalten geblieben ist oder ob ein struktureller Schaden vorliegt. In der neonatalen Maus ist die Ausrichtung der Myozyten in typischer Form angeordnet. So kann man eine „Sandwich-Form“ im Sinne von einer inneren Schicht mit zirkulär angeordneten Zellen und zwei umgebenden Schichten mit zur Herzachse parallel verlaufenden Zellen unterscheiden (McLean and Prothero 1991).

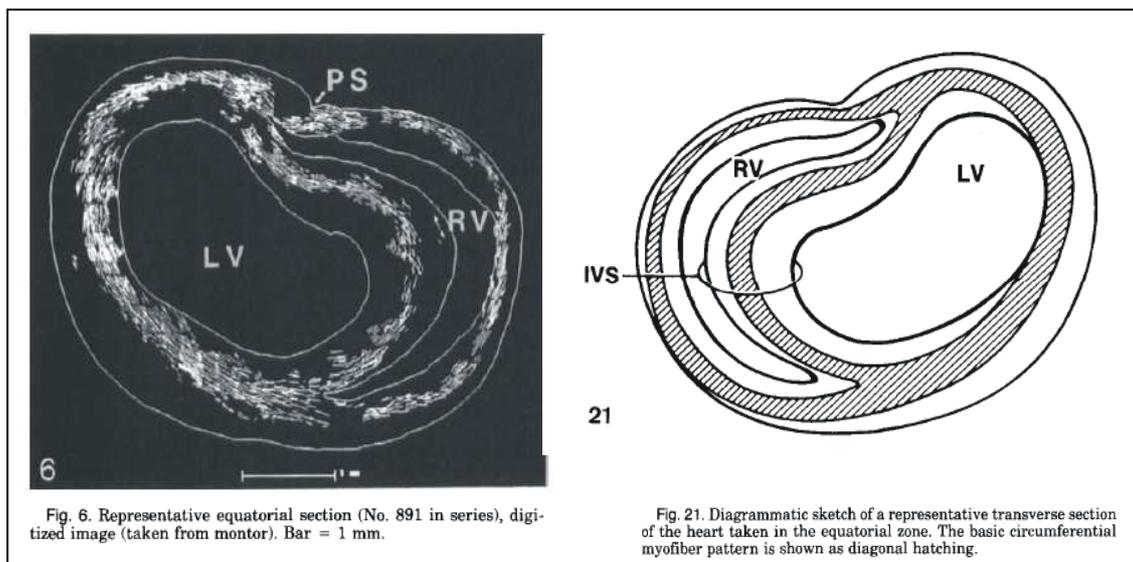


Abbildung 4.1: Anordnung der Myozyten in neonatalen Mäuseherzen (McLean and Prothero 1991).

Eine solche Schichtung ist auch bei den in dieser Arbeit hergestellten Gewebeschnitten zu beobachten, was auf einen generellen Erhalt der Struktur des Myokards hinweist (vgl. Abbildung 3.14 B). Die Gefäße des neonatalen Herzens beginnen insbesondere nach der Geburt stark zu proliferieren (Hew and Keller 2003). Die Größe der Myozyten verändert sich in den ersten Tagen hingegen kaum, während sich das Gewicht des Herzens stark erhöht. Dies deutet auf Proliferation anderer beispielsweise vaskulärer Zellen hin (Leu et al. 2001). Auch in den in dieser Arbeit untersuchten Gewebeschnitten sind in der HE-Färbung Hinweise auf proliferierende Gefäße zu entdecken, was physiologisch erscheint und ebenfalls für die strukturelle Unversehrtheit der Präparate spricht (vgl. Abbildung 3.14 B). Das Epithel in den Gewebeschnitten erscheint größtenteils intakt und nicht verändert (vgl. Abbildung 3.14 D).

Einzig das Endothel zeigt in den hier erstellten Färbungen strukturelle Auffälligkeiten. Es erscheint blasig, aufgetrieben und insgesamt uneinheitlich (vgl. Abbildung 3.14 E). Neben der generellen Fragilität und Empfindlichkeit des Endothels muss bedacht werden, dass die Versorgung der inneren Schichten des Myokards nach Perfusionsstopp bei Hypoxie am schlechtesten ist (Prinzip der „letzten Wiese“). Ähnliche Beobachtungen konnten in Vorversuchen mittels Apoptose-Färbungen gemacht werden. Hier zeigte sich an murinen

embryonalen Herzschnitten ein positives Immunostaining mit Caspase-3 und PARP als Apoptose-Marker in den innersten und äußersten Zelllagen der Gewebeschnitte (Pillekamp et al. 2005). Es ist somit zu vermuten, dass eine Hypoxie eventuell in Verbindung mit mechanischer Belastung durch die Klinge beim Schneidevorgang zu den beobachteten strukturellen Veränderungen an der Innenauskleidung der Ventrikel geführt hat. Um diesen Faktor möglichst gering zu halten, wurde während des Schneidens auf eine sehr niedrige Vorschiebegeschwindigkeit der Klinge und eine rasche Präparation nach Perfusionsstopp geachtet.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Struktur der Herzgewebeschnitte weitestgehend gut erhalten und physiologisch intakt erscheint, was eine wichtige Voraussetzung für die Aussagekraft späterer Untersuchung an den Präparaten ist.

4.2.2 Trypanblau

Trypanblau dringt bei Kontakt mit Gewebe ausschließlich durch defekte Zellmembranen in das Zytoplasma ein und färbt Zellkern und Zytoplasma tiefblau. Lebende Zellen werden hingegen nicht angefärbt. Anhand der Anreicherung des blauen Farbstoffs in den Zellen kann man somit Rückschlüsse auf die Vitalität ziehen. Wenn Zellen nach der Farbstoffzugabe mikroskopisch bläulich angefärbt erscheinen, spricht dies für eine Schädigung bzw. einen Zelltod durch besondere Belastung von Außen oder durch Apoptose bzw. Nekrose. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen (vgl. 3.3.2) zeigen insbesondere eine Anreicherung des Farbstoffs und somit einen Zelltod in den ein bis zwei innersten und äußersten Zelllagen der Herzgewebeschnitte. Dies deckt sich mit den Beobachtungen, die an embryonalen Herzgewebeschnitten hervorgehen (Pillekamp et al. 2005). Auch hier zeigte sich bei ansonsten intaktem Gewebe ein Zelltod in den äußersten zwei bis drei Zelllagen.

Eine denkbare Ursache des Zelltods wäre neben der bereits oben diskutierten mechanischen Belastung (vgl. 4.2.1) durch die ein- bzw. austretende Klinge beim Schneidevorgang, eine Affektion des Gewebes

durch die Einbettung in Agarose. Das Einbetten der auf 4°C gekühlten Herzen in etwa 32°C warme Agarose könnte eine derartige thermische Belastung für die in Kontakt tretenden Zellen sein, dass diese zerstört werden oder auf den thermischen Reiz hin Apoptose einleiten. Versuche mit Agarose, welche bereits bei 18°C erstarrt („ultra low melt agarose“), zeigten in durchgeführten LDH-Tests gegen die Erwartung direkt nach dem Schneiden aber eher einen erhöhten Zelluntergang (Ergebnisse nicht im Einzelnen dargestellt), so dass die thermische Belastung allein nicht der entscheidende Faktor für den lokal begrenzten Zelluntergang zu sein scheint.

Gegen einen Schaden durch ausschließlich mechanische Belastung spricht die in der HE-Färbung beobachtete Unversehrtheit der Zellen in den äußeren Lagen (vergleiche Abbildung 3.14: keine Zerreißen der Zellmembranen, keine Zerstörung des Gewebeverbands), so dass von einer Kombination der mechanischen, thermischen und eventuell hypoxischen Belastung ausgegangen werden kann. Diese macht sich insbesondere an den sensiblen Endothelzellen aber auch an den exponierten äußeren Zellschichten bemerkbar, so dass die Anfärbung der Zellen mit Trypanblau in diesem Bereich auf die besondere anatomische Exposition zurückgeführt werden kann.

4.2.3 ATP

Der ATP-Gehalt der Schnitte wurde in der gesamten Arbeit als Maßstab für die Vitalität verwendet. In einem abschließenden Experiment wurden die ATP-Werte der Schnitte nochmals gemessen, wobei das Ausgangsprotokoll mit dem modifizierten Protokoll an zwei Zeitpunkten (24h und 48h nach der Inkubation) verglichen wurde. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass die durchgeführten Versuche hinsichtlich der Präparationsverbesserung einen signifikant positiven Effekt erzielen konnten.

Daneben fiel jedoch auf, dass in den zweiten 24 Stunden der Inkubation die ATP-Konzentration in den Gewebeschnitten unabhängig vom Protokoll noch einmal signifikant abgesunken war (vergleiche 3.3.3). In dieser Zeitspanne könnte insbesondere die Inkubation wie auch die fehlende humorale stimulation des Gewebes entscheidend für Vitalität der Herzgewebeschnitte gewesen sein.

Eine genaue Untersuchung dieser Faktoren ist in Zukunft deshalb ein wichtiger Ansatzpunkt, die Vitalität der Schnitte auch über den in dieser Arbeit untersuchten Zeitraum auf einem hohen Niveau zu halten.

Bei der Herstellung von Leber- und Lungengewebeschnitten etwa wurde die kontinuierliche Bewegung des Mediums während der Inkubation als kritischer Parameter beschrieben. Ein dauerhafter Fluss des Inkubationsmediums sollte neben der optimalen Verteilung von Sauerstoff, CO₂ und anderen Metaboliten eine von allen Seiten des Schnitts optimale Versorgung gewährleisten. Es wurde beobachtet, dass zudem eine hohe Schüttelgeschwindigkeit einen besseren O₂-Austausch mit der Atmosphäre ermöglicht als eine niedrige (O'Neil et al. 1977).

Um generell eine Bewegung des Mediums und der Gewebeschnitte zu ermöglichen, gibt es neben dem speziell entwickelten Inkubationssystem DOC (Dynamic Organ Culture) (Smith et al. 1985) die Möglichkeit, die Gewebeschnitte in 12-Well-oder 6-Well-Platten im Schüttelinkubator aufzubewahren (Dogterom 1993; Hashemi et al. 1999; Toutain et al. 1998). Auch eine Bewegung durch sprudelnde Begasung hervorzurufen ist denkbar (Ruegg et al. 1987).

Weitere kritische Faktoren für eine optimale Inkubation sind zudem beispielsweise die Zusammensetzung der Inkubationsluft, das verwendete Medium, der optimale Ph-Wert oder die Abstände des Mediumwechsels. Für Gewebe wie Lunge, Leber und Niere sind diese Parameter in der Literatur bereits vielfach getestet und verglichen (Review: de Kanter 2002). Für Herzgewebeschnitte hingegen wurde zur optimalen Inkubation noch kein Protokoll erarbeitet, so dass hier eine systematische Untersuchung noch ansteht und auch das Potenzial hat, die Vitalität der Herzgewebeschnitte für einen längeren Zeitraum konstant zu halten.

4.2.4 MTT

Der MTT-Assay ist ein seit 1983 (Mosmann 1983) weit verbreitetes Verfahren zur Messung des Anteils lebender Zellen in Zellverbänden. Er beruht auf der Reduktion des Tetrazoliumsalzes MTT durch verschiedene intrazelluläre

Enzyme. Dies geschieht unter Bildung eines wasserunlöslichen Formazan-Farbstoffs, der photometrisch quantifiziert werden kann. Die optische Dichte korreliert nach Abzug des Leerwerts direkt mit der Zahl metabolisch aktiver Zellen.

Ein physiologischer Parameter ist die optische Dichte indes nicht, so dass keine funktionelle Aussage getroffen werden kann. Will man die in dieser Arbeit gemessenen MTT-Werte in die Literatur einordnen und mit anderen Arbeiten vergleichen, stößt man auf ein generelles Problem dieses Tests: Die gemessene optische Dichte ist direkt abhängig von der Verdünnung, den Zusätzen in der Lösung und den Inkubationszeiten. Die Arbeitsschritte, Inkubationszeiten und Mengen müssen in den zu vergleichenden Experimenten deshalb identisch sein, um eine sinnvolle vergleichende Aussage treffen zu können. Da in dieser Arbeit zur Untersuchung von Herzgewebeschnitten der MTT-Test auf neuartige Weise erstmals mit dem Gesamtprotein als Normierungsparameter etabliert und durchgeführt wurde, ist kein Vergleich mit anderen Arbeiten möglich. Einzig die Veränderung der Werte innerhalb dieser Arbeit kann bewertet und zu einer Aussage genutzt werden. Dabei lässt sich im Vergleich zwischen dem Ausgangsmodell und dem modifizierten Modell ein signifikant höheres MTT-Level im modifizierten Modell nachweisen, was die These einer Verbesserung der Präparation durch die Veränderung der Arbeitsschritte stützt.

4.2.5 Autonome Kontraktion

Die Tatsache, dass die in dieser Arbeit erstellten neonatalen Herzgewebeschnitte spontan beginnen rhythmisch zu schlagen, ist ein bisher in der Literatur nicht veröffentlichter funktionell sehr interessanter Parameter. Spontanes Schlagen kann bei isolierten adulten Kardiomyozyten ein Zeichen für Zellschaden sein und wird als Ausdruck von einem unphysiologischen Kalziumoverload diskutiert (Fisher et al. 1995; Hillebrenner et al. 2003). Für embryonale und neonatale Herzzellen hingegen ist spontane Kontraktion ein typisches Zeichen für Vitalität (Fleischmann et al. 2004), weswegen der spontane Rhythmus auch hier in diesem Sinne gewertet wurde.

Beobachtet man die autonome Kontraktion der Herzgewebeschnitte über die Zeit, fällt auf, dass insbesondere nach 48 Stunden etwa die Hälfte aller untersuchten Schnitte aufhört spontan zu schlagen. Aus dieser Beobachtung lässt sich zunächst ableiten, dass anstehende Untersuchungen an den Gewebeschnitten innerhalb der ersten 48 Stunden durchgeführt werden sollten. Der hier beobachtete Abfall im Bereich der zweiten 24 Stunden ist vergleichbar mit den Ergebnissen des ATP-Tests (vgl. 4.3.3) und wirft auch hier die Frage nach den Inkubationsbedingungen auf.

4.2.6 Herzfrequenz

Verglichen mit EKG-Ableitungen von neonatalen Mäusen *in vivo*, erscheint die hier gemessene Frequenz der Gewebeschnitte zu gering. Die *in vivo* gemessene Herzfrequenz mittels EKG an nicht sedierten neonatalen Mäusen liegt mit 423 Schlägen/Minute (Wang et al. 2000) deutlich höher als die in dieser Arbeit gemessene mittlere Frequenz von etwa 160 Schlägen/Minute. Auch eine Untersuchung der Herzfrequenz von neonatalen Mäusen *in vivo* mittels MRI ergab mit 372 +/- 54 Schlägen/Minute einen deutlich höheren Wert (Wiesmann et al. 2000). Die niedrigere Schlagfrequenz der Gewebeschnitte ist im Wesentlichen auf die fehlende nervale und humorale Stimulation des Gewebes zurückzuführen. Zusätzlich könnten die Unterschiede auf geringe Schwankungen in der Temperatur zurückgeführt werden. So zeigten insbesondere junge Tiere eine enorme Empfindlichkeit gegenüber Temperaturunterschieden. Mäuse, die *in vivo* bei Raumtemperatur mittels EKG gemessen wurden, wiesen nur eine Herzfrequenz von 208 Schlägen/Minute auf, weswegen bei den oben beschriebenen EKG-Untersuchungen spezielle Inkubatoren benutzt wurden, die eine Körpertemperatur von 36,5 +/- 0,5°C garantierten (Wang et al. 2000).

Im Rahmen der MEA-Messung kann es trotz einer integrierten Wärmeplatte durchaus zu marginalen Abkühlungen des Mediums kommen, die dadurch zu einer Erniedrigung der Herzfrequenz geführt haben könnten. Auch konnte insbesondere nach langer Inkubation (über 48 Stunden nach dem Schneiden) beobachtet werden, dass die Schnitte direkt nach Entnahme aus dem Inkubator

noch spontan kontrahierten, im MEA nur wenige Sekunden später aber bereits keine autonome Kontraktion mehr zeigten. Es scheint somit enorm wichtig bei der elektrophysiologischen Untersuchung der Gewebeschnitte, eine konstante Temperatur zu gewährleisten.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die eher niedrige Frequenz der Herzgewebeschnitte im Vergleich zum *in vivo*-Modell ist die Zellzusammensetzung des untersuchten Gewebeverbandes. Wobei hier insbesondere der Anteil bzw. die Art der Erregungsweiterleitungszellen, die in den jeweiligen Schnitten vertreten sind, entscheidend sein könnte.

Höhenunterschiede der Gewebeschnitte implizieren unterschiedliche Anteile des Erregungsleitungssystems. Da die Präparation der Schnitte ausschließlich aus Gewebe unterhalb der Herzbasis durchgeführt wird, sind weder Anteile des schnellen Sinusknotens, noch des AV-Knotens in den Schnitten vertreten. Das Erregungsweiterleitungssystem in der Entwicklung der Maus beginnt in der Embryonalphase um den 13 Tag (ED13) (Viragh and Challice 1983). Neben dem Sinus- und AV-Knoten sind dann auch die tieferen Anteile des Erregungsleitungssystems wie His-Bündel und Purkinje-Fasern ausgebildet (Arguello et al. 1988). Diese sind bei Gewebeschnitten aus unterschiedlichen Höhen in unterschiedlichen Anteilen vertreten und könnten somit die Schlagfrequenz beeinflussen bzw. bestimmen. Dies ist auch ein möglicher Erklärungsansatz für die große Heterogenität der gemessenen Schlagfrequenzen (min. 107 Schläge/Minute bis max. 218 Schläge/Minute).

4.2.7 Feldpotenziale

Zur Charakterisierung der Herzgewebeschnitte wurde die elektrische Aktivität der Gewebeschnitte mittels MEA-Ableitungen gemessen. Das Ergebnis war eindeutig. In 100 Prozent der untersuchten Schnitte nach dem modifizierten Modell konnten Feldpotenziale über allen MEA-Elektroden abgeleitet werden. Ohne intakte Herzmuskelzellen wäre eine elektrische Aktivität nicht zu erwarten. Die gemessenen Feldpotenziale sind zwar keine direkte Messung der transmembranären Potenziale, korrelieren aber mit diesen. Es wird davon ausgegangen, dass die gemessenen Feldpotenziale überwiegend die

elektrische Aktivität der in unmittelbarer Nähe liegenden Zellen wiedergibt. So stehen die Amplitude und die Form der FPs in direkter Abhängigkeit zu der ersten Ableitung des Aktionspotenzials der umliegenden Zellen (Egert et al. 2002a; Halbach et al. 2003). Seit Halbach einzelne Parameter der FPs (Anstiegssteilheit, FP-Dauer) mit dem Aufbau von monophasischen Aktionspotenzialen korrelieren konnte, ist die Grundlage geschaffen, Feldpotenziale zu interpretieren (Halbach et al. 2003). Somit sind Veränderungen der Zellerregung durch Medikamente, Traumen oder Zellimplantationen nun auch anhand von MEA-Ableitungen objektivierbar. Bislang wurde diese Methode ausschließlich an Zellmonolayern (Halbach et al. 2003), an embryoid bodies aus embryonalen Stammzellen (Reppel et al. 2007) und an ganzen embryonalen Herzen bzw. embryonalen Atrien und Ventrikeln (Lu et al. 2004), die auf dem Elektrodenfeld platziert wurden, durchgeführt. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich auch neonatale Herzwebeschnitte dafür eignen. Die Auswertung der Feldpotenziale mit dem Ergebnis eines FPmax und eines stets höheren FPmin deckt sich mit den Untersuchungen von Halbach. Dieser zeigt in seiner Arbeit, dass FPmin mit dem maximalen Geschwindigkeitsanstieg (Na-Kanal abhängig) des Aktionspotenzials korreliert (Halbach et al. 2003).

Trotz der unterschiedlichen Frequenzen zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Modell erscheint die Morphologie der Ableitungen also vergleichbar. Wie aus einer Gegenüberstellung einer MEA-Ableitung über einer Elektrode mit einem EKG einer gleich alten neonatalen Maus ersichtlich, kann zudem ein QRS-Komplex, ein QT-Intervall sowie eine P-Welle ähnlicher Morphologie abgegrenzt werden.

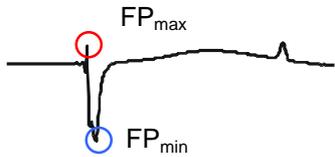
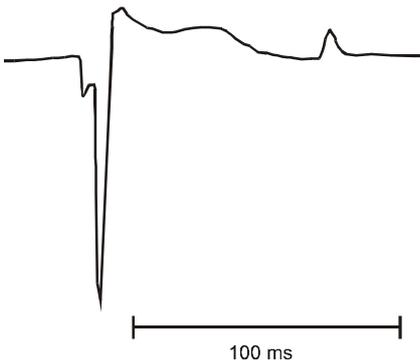
	R-R-Intervall	Aufzeichnung
MEA-Ableitung <i>in vitro</i> an Herzgewebeschnitten von neonatalen Mäusen	403 +/- 33 ms	
EKG <i>in vivo</i> an neonatalen Mäusen (Wang et al. 2000a)	120 +/- 3 ms	

Tabelle 4.4: Vergleich von MEA-Aufzeichnungen mit EKG-Ableitungen an lebenden neonatalen Mäusen (Tag 1).

Genauere Untersuchungen an Herzgewebeschnitten hinsichtlich der Feldpotenziale stehen in Zukunft an und sind für das Verständnis und Analyse der erhobenen Daten wichtig.

4.2.8 Erregungsausbreitung

Aktuell werden zur Untersuchung der fundamentalen Mechanismen bei der Erregungsleitung und bei der Entstehung von Arrhythmien insbesondere myokardiale Zellmonolayer verwendet. Hier werden neben der extrazellulären Ableitung (Kong et al. 2005) auch spannungsabhängige Färbungen durchgeführt (Tung and Zhang 2006), um die Erregung zu visualisieren und physiologische wie pathologische Prozesse besser zu verstehen. Diese Verfahren sind durch die langwierige Präparation von Zellmonolayern zeitintensiv und durch zusätzlich notwendige Färbungen aufwändig (Salama and Choi 2007; Tung and Cysyk 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Darstellung der Erregungsausbreitung und Lokalisation eines Erregungszentrums auf MEAs mittels MATLAB an den entwickelten Herzgewebeschnitten problemlos durchgeführt werden kann (vgl. Ergebnisse).

Im Gegensatz zu Zellmonolayern haben die Gewebeschnitte den großen Vorteil, die physiologische Gewebezusammensetzung 100-prozentig zu repräsentieren. Die Zell-Zell-Kontakte sind *in vivo* gewachsen und nicht *in vitro* künstlich erstellt. Zudem ist die verwendete MEA-Technologie als Grundlage eines Arrhythmie-modells wegen der computerunterstützten Aufzeichnung der Erregung über 60 Elektroden optimal.

Im intakten Herzgewebe lassen sich so Einflüsse auf die Erregungsausbreitung gut untersuchen. Die Analyse der Erregungsleitung nach gezielter Herzmuskelschädigungen wie zum Beispiel durch Operationen oder Hypoxie ist denkbar. Zudem dient das Modell als Ausgangspunkt, um auch menschliches Gewebe aus Biopsiematerial zu schneiden und elektrophysiologisch zu untersuchen.

4.3 Diskussion der verwendeten biochemischen, histologischen und elektrophysiologischen Untersuchungsmethoden

Bei der Aufbereitung von Herzgewebe zur Erstellung von vitalen Schnitten kann an mehreren Punkten eine kritische Belastung des Gewebes durch mechanische Noxen oder eine Mangelversorgung entstehen. Um den Effekt eines Arbeitsschrittes auf das Gewebe beurteilen und quantifizieren zu können ist es nötig, die Vitalität der Schnitte zu bestimmen. Eine Vitalitätsmessung versetzt den Untersucher in die Lage (i), die Gewebebeschaffenheit *in vitro* mit der gesunden *in vivo*-Situation zu vergleichen und so den allgemeinen Schaden abschätzen zu können. Zudem kann man (ii) die Qualität des Arbeitsschrittes zur Aufbereitung des Gewebes beurteilen und (iii) die Integrität des Zellverbandes während der Inkubation im Zeitverlauf abschätzen (Bach P.H. et al. 1996).

Hierbei werden neben allgemeinen Tests zur Zellvitalität oft auch organspezifische Marker untersucht. Die Auswahl der für die hier bearbeiteten

Fragestellungen geeigneten Tests hängt von unterschiedlichen Kriterien ab. Generell gilt aber: Je mehr Endpunkte untersucht werden, desto mehr Vertrauen darf in die generierten Ergebnisse gelegt werden. Unentbehrlich bei jeder Untersuchung sind zusätzliche Negativ- und Positivkontrollen, die in den Experimenten der vorliegenden Arbeit zur Qualitätssicherung generell mitgeführt wurden.

Da die Verbesserung der Methode zur Erstellung von Gewebeschnitten auf dem Screening möglichst vieler Einflussfaktoren basieren sollte, wurde nur ein möglichst aussagekräftigen biochemischen Vitalitätsassay ausgewählt, der zur orientierenden Beurteilung der Gewebevitalität benutzt werden sollte. Bei der anschließenden Charakterisierung der Gewebeschnitte wurden dann verschiedene Endpunkte zur Überprüfung der These, ein stabiles, strukturell und funktionell intaktes System zur Untersuchung von myokardialem Gewebe entwickelt zu haben, eingesetzt.

Biochemische Assays

Essentiell zur biochemischen Untersuchung des Gewebes ist es, die Stärken und Schwächen der Assays zu kennen und optimal zu nutzen. Zu diesem Zweck wurden drei in der Literatur weit verbreitete Assays zur Untersuchung von Herzgewebe im Rahmen dieser Arbeit etabliert und werden hinsichtlich ihrer Vor- und Nachteile im Folgenden diskutiert:

Für die angestellten Vergleichsuntersuchungen der einzelnen Parameter zur Verbesserung des Modells stellte sich der ATP-Test als sinnvollster Assay heraus. Dies ist (i) begründet in seiner einfachen Anwendung. Zu jedem Zeitpunkt der Präparation war eine Messung des ATP-Gehaltes direkt aus den Gewebeschnitten und unabhängig von der benutzten Inkubationslösung oder dem jeweiligen Arbeitsschritt möglich. Hier zeigte insbesondere der LDH-Test, welcher aus dem Überstand der Schnitte bestimmt wurde, deutliche Nachteile. Um eine Messung durchzuführen, ist ein genau definierter Überstand aus dem die Probenentnahme erfolgt, vonnöten. Dies erschwert den Experimentaufbau erheblich. Ebenfalls Probleme bereitete das Volumen des Überstands. Um eine messbare LDH-Konzentration zu erhalten, musste das Volumen in dem die

Gewebeschnitte aufbewahrt wurden mit 2 ml Elektrolytlösungen für 5 Schnitte sehr gering gehalten werden und eine Volumenänderung bei Zugabe/Abnahme der Schnitte oder durch Verdampfen der Flüssigkeit und durch die Begasung verhindert werden. Eine LDH-Messung während der Inkubationsphase war wegen einer Interaktion des LDH-Assays mit dem im Medium vorhandenen Indikator Phenolrot und wegen der häufigen Medienwechsel nicht mit der nötigen Genauigkeit möglich. Somit entfiel die Möglichkeit von Verlaufs-Untersuchungen der Vitalität durch den LDH-Test während der Inkubation.

Der MTT-Test ist ähnlich wie der ATP-Test zu jedem Zeitpunkt der Präparation/Inkubation unabhängig vom Überstand direkt an den Schnitten durchführbar. Er ist praktikabel, schnell durchführbar und liefert gut reproduzierbare Ergebnisse. Dies allerdings erst zu späteren Zeitpunkten, da ein fortgeschrittener Gewebeschaden unter Mitbeteiligung der Mitochondrien Voraussetzung für die Messbarkeit von Vitalitätseinbußen des Gewebes ist. Kurzzeitige Effekte, die im LDH- und im ATP-Test gut detektiert werden konnten, konnten im MTT-Test nicht nachgewiesen werden. Diese Beobachtung wurde bereits früher beschrieben und darauf zurückgeführt, dass neben den Dehydrogenasen aus den Mitochondrien zu einem gewissen Anteil auch extramitochondriale Dehydrogenasen noch MTT umwandeln können, was bei geringen Gewebeschäden zu ungenauen Ergebnissen führt (Page et al. 1988; Sieuwerts et al. 1995; Fisher et al. 1995; Mosmann 1983). Deswegen wurde der MTT-Test nicht zum Screening, sondern nur zur Charakterisierung der Schnitte nach ein bzw. zwei Tagen Inkubation eingesetzt.

Die Messung des ATP-Gehalt stellt (ii) einen physiologischen Parameter dar, der die Möglichkeit bietet, die *in vitro* untersuchten Schnitte mit einem ermittelten *in vivo*-Wert zu vergleichen. Dies ist weder beim LDH-Test noch beim MTT-Test möglich, da beide nur in unphysiologischen Situationen auftreten. Die im Verlauf dieser Arbeit gemachten Beobachtungen hinsichtlich der drei Assays decken sich mit den Feststellungen anderer Arbeitsgruppen. Es lässt sich zur Detektion von geringgradigen Schäden des Herzwebes *in vitro* eine absteigende Reihenfolge von ATP-Assay über LDH-Test bis hin zum MTT-Assay dokumentieren (Mueller et al. 2004; Petty et al. 1995).

Auch deswegen wurde entschieden, in der vorliegenden Arbeit für alle Untersuchungen zur Verbesserung des Protokolls den ATP-Assay zu verwenden. Ein wichtiger Aspekt bei der Messung des ATP-Gehalts in den Schnitten ist, die endogenen ATP-asen ab dem Beginn der Messung komplett zu inhibieren. Dies wurde durch Schockgefrieren der Schnitte zum Untersuchungszeitpunkt in flüssigem Stickstoff gewährleistet. Nach dem Auftauen zur endgültigen Messung wurden alle folgenden Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Dies führt ebenfalls zu einer Inhibition der ATP-asen und zu einer Inhibition des Verbrauchs von ATP.

Eine kurze Zusammenfassung der Vorteile des ATP-Assays als Screening-Methode ist in Tabelle 4.5 beschrieben.

Vorteile des ATP-Assays im Hinblick auf die durchzuführenden Untersuchungen

- die Gewebeschnitte können zu allen Zeitpunkten unabhängig vom Inkubationszeitpunkt untersucht werden.
- der ATP-Assay ist ein stabiler, zuverlässig Test mit für die Vitalität relevantem, physiologischem Hintergrund.
- im Gegensatz zum MTT und LDH-Test ist die Lagerung der Proben für eine Untersuchung zu späteren Zeitpunkten ohne Weiteres möglich und gewährleistet somit eine bessere Zeiteinteilung bei der Experimentplanung
- der ATP-Assay hat in Voruntersuchungen eine hohe Sensibilität im Hinblick auf geringgradigen Zellschaden gezeigt. Hier erwies sich insbesondere der MTT-Assay zu den selben Zeitpunkten als ungenau.
- auch in der Literatur wird der ATP-Assay für ähnliche Untersuchungen im Vergleich zu anderen biochemischen Assays als stabilster und sensibelster Test diskutiert.

Tabelle 4.5: Vorteile des ATP-Assays**Interpretation der Assays – Normierung der Schnitte**

Um eine Interpretation, eine Skalierung und auch einen Vergleich der Ergebnisse erzielen zu können, müssen die Messparameter der Assays normiert werden. Eine Möglichkeit dazu ist, das Nassgewicht der Schnitte zu bestimmen. Dies ist nach der Einbettung in Agarose aber sehr ungenau. Neben

Agaroseresten verändert auch das am Gewebe hängende Wasser stark das Gewicht. Bei einem Endgewicht von etwa 1 mg sind 0,5 mg Wasser nicht zu tolerieren.

Die Bestimmung des Trockengewichts ist stark von der Technik abhängig und führt zu einem sehr geringen Endgewicht, das nur äußerst ungenau zu bestimmen ist. Beide Methoden wurden hier ausgetestet und aus oben angegebenen Gründen verworfen. Ein wesentlich genauerer Parameter ist die Bestimmung des totalen Proteingehalts des Gewebes, der nach Homogenisierung der Schnitte bestimmt werden kann. Um möglichst genaue Aussagen machen zu können, wurde in dieser Arbeit die Proteinbestimmung zur Normierung der Schnitte gewählt.

Für die Normierung des LDH-Test, wurde nicht der Proteingehalt der Schnitte bestimmt, sondern der Anteil in % des gesamten LDH. Dieser ist einfacher zu ermitteln und erfordert nicht die Anwendung eines weiteren Testverfahrens. Um das Gesamt-LDH zu ermitteln, muss der Gewebeschnitt vollständig zerstört werden. Dies wurde von anderen Arbeitsgruppen unter anderem mit Triton-x-100 durchgeführt. Wie lange die Herzwebeschnitte in Triton-x-100 inkubiert werden müssen, und ob die Wirkung vergleichbar mit mechanischer Zellerstörung (Sonifikator) ist, wurde ausgetestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.2 dargestellt.

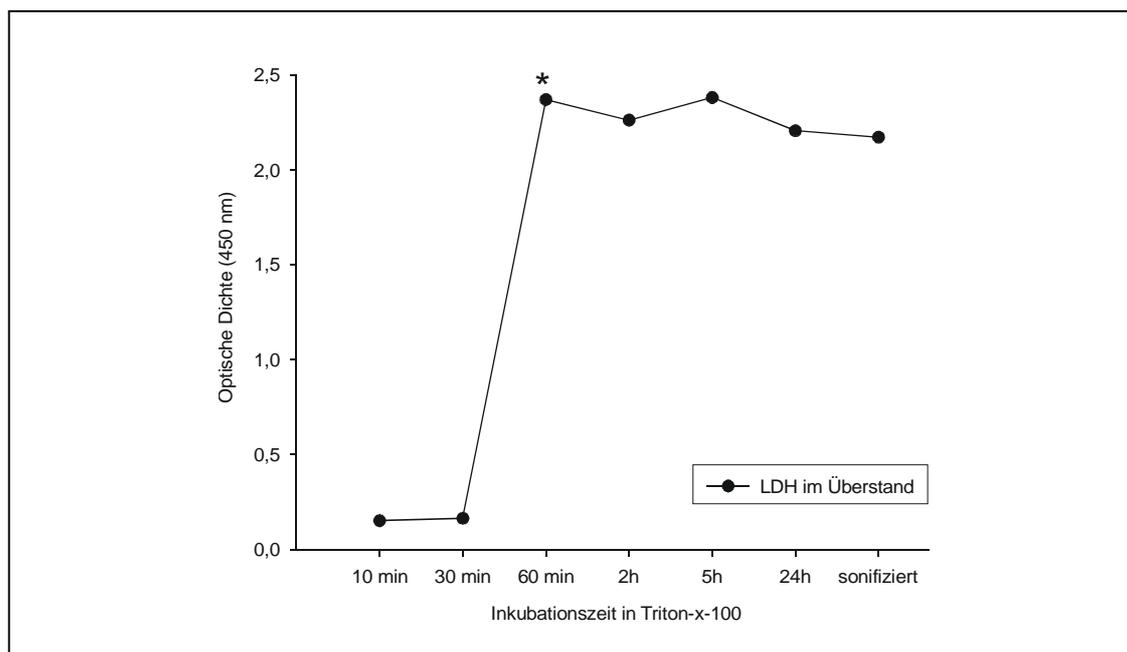


Abbildung 4.2: Triton-x-100-Inkubation der Herzgewebeschnitte über die Zeit. Nach 60 Minuten ist eine der mechanischen Zerstörung gleichgesetzte vollständige Freisetzung der LDH (markiert durch einen Stern) erfolgt.

Funktionelle Untersuchungen

Um die Güte der Gewebeschnitte als *in vitro*-Modell zu testen und diese zu charakterisieren, sind insbesondere funktionelle Parameter von Bedeutung. Zur Untersuchung elektrophysiologischer Parameter wie die Frequenz der Kontraktion, die Feldpotenziale und die Erregungsausbreitung wurde das neuartige MEA-System gewählt, das eine unkomplizierte Messung eben dieser Faktoren ermöglicht. Die Schnitte müssen hierzu nicht, wie im Rahmen der Patch-Clamp-Methode zu Einzelzellen verdaut werden (Hamill et al. 1981), sondern können *in toto* untersucht werden.

Es konnte inzwischen gezeigt werden, dass die abgeleiteten Feldpotenziale der ersten Ableitung monophasischer Aktionspotenziale entsprechen (Halbach et al. 2003). MEAs ermöglichen die simultane Ableitung von extrazellulären Feldpotenzialen eines zusammenhängenden Gewebes. Es konnte inzwischen gezeigt werden, dass die abgeleiteten Feldpotenziale in guter Näherung der ersten Ableitung monophasischer Aktionspotenziale entsprechen (Halbach et al. 2003). Durch die Vielzahl der Elektroden (8 x 8 Elektroden) kann auch die

Erregungsausbreitung erfasst werden (Igelmund et al. 1999). Auf den MEAs selbst können Zellen über Tage inkubiert und kultiviert werden (Banach et al. 2003). Darüber hinaus wurde für transgene Mausmodelle gezeigt, dass Feldpotenzialableitungen mittels MEAs auch an Herzen *in toto* durchgeführt werden können und somit ein ideales Modell zur Messung grundlegender, elektrophysiologischer Parameter kardialen Gewebes im Verband mit hoher räumlicher Diskriminierung darstellen. Somit besteht die Möglichkeit, Überleitungszeiten, Reizleitungsgeschwindigkeiten und Erregungsausbreitung sowie Frequenz und Rhythmus innerhalb eines intakten kardialen Zellverbandes über einen längeren Zeitraum zu untersuchen.

MEA-Messungen an kardialen Gewebeschnitten sind bislang, im Gegensatz zu der steigenden Anzahl an MEA-Messungen muriner und humaner Stammzellen (Banach et al. 2003; Kehat et al. 2002) oder Zellmonolayern (Halbach et al. 2003), nur vereinzelt durchgeführt worden und beschränken sich hauptsächlich auf die Analyse der Herzfrequenz (Pillekamp et al. 2005).

Histologie/Färbungen

Die **histologische Aufarbeitung** mittels HE-gefärbten Kryoschnitten wurde nach einem gängigen Protokoll (siehe Methodenteil) durchgeführt. Bei der histologischen Auswertung wurde insbesondere auf die Integrität des Zellverbandes im Übersichtsbild sowie auf die Anordnung der Zellen Wert gelegt. Zusätzliche Informationen über die Lokalisation des Gewebeschadens konnten über die Trypanblau-Färbung, welche zur ergänzenden Charakterisierung an verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt wurde, gewonnen werden.

4.4 Generelle Diskussion des Modells der Herzgewebeschnitte

Was sind die Vor- und Nachteile der Herzgewebeschnitte?

Die Präparation von Herzgewebeschnitten insbesondere von kleinen Tieren und Biopsien ist eine hoch reproduzierbare Methode, welche schnell und bei relativ niedrigem Kostenaufwand mit hohem Output durchgeführt werden kann.

Diese Methode erlaubt ein breites Spektrum an biochemischen, morphologischen, pharmakologischen und elektrophysiologischen Untersuchungen. Durch die Isolation des Herzgewebes finden Experimente unabhängig von beeinflussenden Effekten anderer Organe statt. Dies kann als experimenteller Vorteil, aber auch als Nachteil gesehen werden. Durch die Denervation und Entfernung aller peripheren hormonellen Einflüsse kann es zu nur schwer berechenbaren Kompensationsmechanismen innerhalb des Herzgewebes kommen. Dadurch, dass es sich um eine *in vitro*-Methode handelt, muss zudem berücksichtigt werden, dass der Untersuchungszeitraum limitiert ist (siehe unten). Durch den Schneidevorgang werden sicherlich trotz einer schonenden Präparation Schäden gesetzt, die bei der Interpretation von Experimenten nicht unberücksichtigt bleiben dürfen.

Welche Gewebefunktionen können gemessen werden?

Wie bereits beschrieben, ist mit dem Modell der Herzgewebeschnitte ein breites Spektrum von Untersuchungen möglich. So wurden neben metabolischen und pharmakologischen Studien (Kohzuki et al. 2001; Neri and Cini-Neri 1986; Parrish et al. 1992) bereits Untersuchungen zum Sauerstoffverbrauch des Herzens (Yamashita et al. 2004) sowie zur myokardialen Ischämie (Sutherland and Hearse 2000; Zhang et al. 2000) und Herztransplantationsbedingungen (Bull et al. 2000) durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus insbesondere auf die bisher wenig ausgeschöpften elektrophysiologischen Möglichkeiten von Herzgewebeschnitten gelegt. Mittels extrazellulärer Ableitungen lassen sich Herzfrequenz und Erregungsausbreitung sowie die Lokalisation der Erregung optimal begutachten. Auch sind intrazelluläre Ableitungen in dem dreidimensionalen Gewebeschnitt sowie spannungsabhängige Färbungen denkbar. Morphologisch interessant ist insbesondere die Möglichkeit, Veränderungen der Zell-Zell-Kontakte auf unterschiedliche Reize zu untersuchen. Die spontan kontrahierenden Gewebeschnitte können für funktionelle Testungen in eine Kraftmessung eingespannt und unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden (Pillekamp et al. 2007).

Was ist der maximale Zeitraum, in dem man Herzgewebeschnitte untersuchen kann?

Die wahrscheinlich am häufigsten gestellte Frage bezüglich der Herzgewebeschnitte betrifft die Zeitspanne, in der Untersuchungen angestellt werden können. Sicher ist, dass von dem Moment der *ex vivo*-Präparation an, die Funktionalität des Herzgewebes abnimmt. Insgesamt kann festgehalten werden, dass die Herzgewebeschnitte mindestens 24 Stunden unter nur geringem Verlust des ATP-Gehaltes (etwa 10%) für Untersuchungen zur Verfügung stehen und auch nach 48 Stunden durchaus funktionell und strukturell erhalten sein können. In Einzelfällen konnten Schnitte bis zu 5 Tage elektrophysiologisch untersucht werden.

Wie erwähnt ist das Potenzial diese Zeitspanne auszubauen, durchaus vorhanden. Dabei spielen insbesondere die Charakterisierung und Optimierung der Inkubationsbedingungen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurden, eine große Rolle.

Sollten Ausschlusskriterien zur Untersuchung von Herzgewebeschnitten aufgestellt werden?

Es ist sinnvoll, eine gewisse Qualitätssicherung durch Aufstellung von Ausschlusskriterien zu gewährleisten, da nicht jeder Schnitt dem anderen gleicht. Allerdings gestaltet es sich schwierig, die Güte eines Gewebeschnitts zu bestimmen, ohne dem Gewebe dabei Schaden zuzufügen. Denkbar wäre aber je nach Versuchsaufbau, ein Minimum an Schlagfrequenz oder Kraftentwicklung vorauszusetzen. Auch eine bestimmte Morphologie der extrazellulären Aktionspotenziale oder der Erregungsausbreitung könnte für solche Gütekriterien genutzt werden.

Was sind die häufigsten Fehler, die zu einer schlechten Präparation der Herzgewebeschnitten und somit zu deren Unbrauchbarkeit für weiterführende Experimente führen?

Fehler während der Präparation können dazu führen, dass Gewebeschnitte oder das ganze Herz für die weitere Untersuchung nicht mehr einsetzbar sind.

Ein Herausbrechen des Herzens aus dem Agaroseblock während des Schneidevorgangs und der Verlust der Herzgewebeschnitte im Auffangbecken des Vibrotoms (durch die Klängenbewegung kann der Gewebeschnitt unauffindbar hinter die Klinge gespült werden) sind dabei relativ gesehen die beiden häufigsten Gründe. Auch eine unsaubere Operation oder eine zu schnelle Vorschiebegeschwindigkeit beim Schneiden können ein Grund für den unwiderruflichen Verlust von Gewebe sein.

Nach der Präparationsphase ist die Kontamination der Herzgewebeschnitte im Inkubator ein weiterer Grund einen Schnitt nicht mehr untersuchen zu können. Neben Bakterien, die weitestgehend durch Zugabe von Antibiotika zum Medium in Ihrer Proliferation gehemmt werden können, spielen dabei insbesondere Pilze eine Rolle. Bei sauberer Präparation ist dies allerdings nur in einem kleinen Teil der Präparate und auch erst zu späteren Zeitpunkten zu erwarten. Dennoch ist die Kontamination ein Faktor, der insbesondere bei Langzeituntersuchungen berücksichtigt werden muss.

Speziell bei MEA-Untersuchungen ist die Aufnahme der Potenziale stark davon abhängig, dass der Gewebeschnitt der Oberfläche des MEAs gut aufsitzt. Andernfalls kann der Schnitt beim Transport vom Inkubator zum Messplatz oder bei Zugabe/Abnahme von Medium über den Elektroden verrutschen und ist dann nicht mehr messbar. Um dieses so genannte Attachment zu verbessern, können die MEAs vor Auflage des Gewebeschnittes mit speziellen adhäsiven Verbindungen wie Gelatine, Fibronectin, Laminin oder Polyethylenaminen beschichtet werden.

Wie sollten die Herzgewebeschnitte zwischen den einzelnen Schritten transportiert werden?

Um einen Schaden des Gewebes nach dem Schneidevorgang zu verhindern, ist beim Transport der Herzgewebeschnitte insbesondere bei Wechsel zwischen einzelnen Aufbewahrungsgefäßen (gekühlte Lagerung in Elektrolytlösung, Zellkulturschale, MEA) darauf zu achten, keine mechanische Belastung - wie zum Beispiel durch einen Pinzettengriff - auf das Gewebe auszuüben. Es können kleine Netzchen benutzt werden, mit denen man die

Gewebeschnitte aus der Lösung hebt. Dies ist wenig traumatisch, kann aber dazu führen, dass bei Überführung zwischen zwei Gefäßen die Gewebeschnitte direkt der Luft ausgesetzt sind. Besser und auch einfacher zu handhaben ist eine großlumige Glaspipette (Innendurchmesser 0,9 cm), mit der die Schnitte langsam angesaugt und im Glasrohr zum Zielgefäß transportiert werden können. Dies ist ebenfalls wenig traumatisch und ermöglicht unter ständigem Kontakt mit dem umgebenden Medium den Austausch zwischen zwei Gefäßen. Wird der Schnitt allerdings von einem Medium in eine andere Flüssigkeit übertragen, wobei diese nicht miteinander vermischt werden sollen, ist das Netzchen nach einer kurzen Spülung vorzuziehen.

4.5 Diskussion zum Versuchstier neonatale Maus

Da die meisten elektrophysiologischen wie auch pharmakologischen Untersuchungen am menschlichen Herzen *in vivo* nicht möglich sind, und für *in vitro*-Untersuchungen nur bedingt zugänglich sind, galt es alternativ eine Spezies zu untersuchen, die dem humanen Gewebe möglichst nahe kommt und aus ethischen und praktischen Gründen akzeptabel erscheint. Warum das neonatale Mausmodell gewählt worden ist, wird im Folgenden diskutiert.

Warum ist murines Myokard das Gewebe der Wahl?

Vergleicht man das genetische Erbgut von Maus und Mensch, so konnten Mural et al. anhand des Chromosoms 16 zeigen, dass über 93 % der Gene des Menschen auch in der Maus exprimiert werden (Mural et al. 2002). Affen gleichen der menschlichen Rasse hingegen zu 98,7 % (Enard et al. 2002). Trotzdem ist das Mausmodell in den letzten Jahren vor allem aufgrund der einzig bei diesen Tieren gut etablierten und weit verbreiteten Möglichkeit genetische Manipulationen durchzuführen, immer populärer geworden. Kardiale Gene können hinzugefügt, inaktiviert/entfernt oder verändert und anschließend die Effekte quantitativ bestimmt werden (Izumo and Shioi 1998). So wurden zum Beispiel humane Ionenkanäle im murinen Myokard exprimiert und dann in den transgenen Mäusen untersucht (Chiello et al. 2003). Die steigende Wichtigkeit des transgenen Mausmodells insbesondere zur

Untersuchung der kardialen Elektrophysiologie sowie generell zur Untersuchung der Herzentwicklung wurde in den letzten Jahren häufig beschrieben (Bogue 2003; Nerbonne 2004). Zudem sind Mäuse im Gegensatz zu höheren Säugetieren wie Affen, Hunden oder Hasen einfacher zu halten sowie schnell und in größerer Zahl kostengünstig zu züchten. Auch wenn Untersuchungen an murinem Gewebe die Versuche am menschlichen Myokard nicht ersetzen können, eignet sich die Maus zur Entwicklung eines neuen Modells aus genannten Gründen sehr gut.

Warum neonatale Mäuse?

Bei der Expression von Ionenkanälen und somit in den elektrophysiologischen Eigenschaften sind während der Entwicklung im murinen Herzen starke Veränderungen zu beobachten (Wang et al. 1996). Auch deswegen stellt das Alter der Maus, die zur Etablierung eines Modells benutzt wird, ein wichtiges Kriterium dar. Die Übereinstimmung der Ionenkanäle und Aktionspotenzialformen sollte zwischen Mausmodell und Mensch möglichst groß sein. Vergleicht man die adulte Maus mit dem Menschen, so kann man im Bereich der Kalium-Kanäle die größten Unterschiede in der Expression feststellen (Abbildung 4.3).

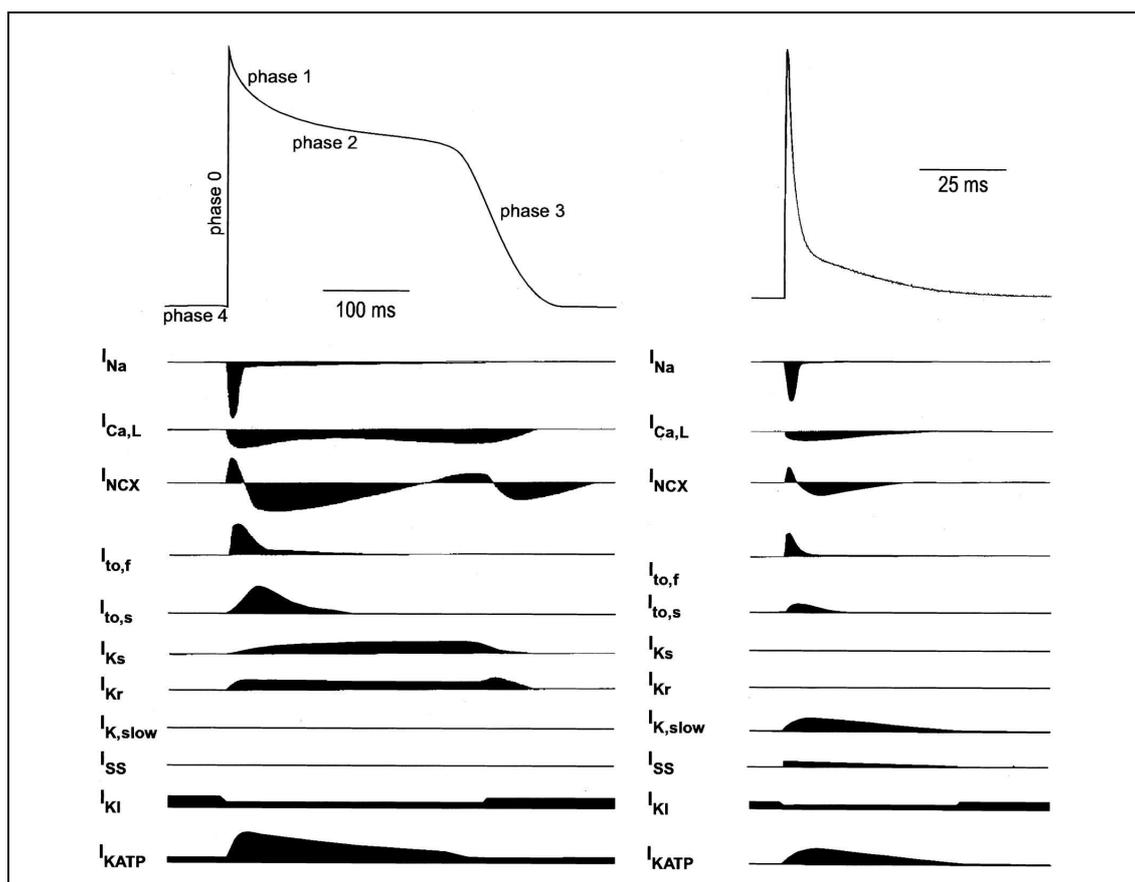


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der Aktionspotenziale und Ionenkanäle in der erwachsenen menschlichen und in der erwachsenen murinen ventrikulären Herzzelle (Nerbonne 2004).

Beim Menschen sind so genannte „verzögerte Gleichrichter“ oder Delayed Rectifier-Ionenströme (I_{Ks} und I_{Kr} vgl. Abbildung 4.3) für die Phase 3 im Aktionspotenzial, also die Repolarisation, verantwortlich (Li et al 1996). Diese können in der Form nicht in der adulten Maus gefunden werden (Li Wang, 1996). Hingegen konnte gezeigt werden, dass sowohl I_{Ks} wie auch I_{Kr} in Kardiomyozyten der neonatalen Maus (Tag 1) vorhanden sind (Wang et al. 1996). Die spannungsabhängigen Natrium-Kanäle sind bei Maus und Mensch für die schnelle anfängliche Depolarisation im Aktionspotenzial zuständig (Phase 0). Stellt man hier Vergleiche an, so findet man bei adulten Mäusen Ionenkanäle, die den TTX-resistenten Na^+ -Kanälen des Menschen ähnlich sind. Diese gleichen den humanen Kanälen in Ihrer Nukleotidsequenz zu über 89 % und werden wie die humanen im SCN5A-Gen codiert (Zimmer et al. 2002).

Auch in der neonatalen sowie embryonalen Maus sind solche Natrium-Kanäle vorhanden (Davies et al. 1996).

Im Vergleich der Aktionspotentiale zwischen den einzelnen Entwicklungsstadien der Maus und dem Menschen (Abbildung 4.4) fällt ein deutlicher Unterschied in der Aktionspotenzialdauer zwischen adulter Maus und adultem Menschen auf. Dieser Unterschied ist bei den embryonalen Mäusen und auch bei neonatalen Mäusen am ersten Tag nach der Geburt (PN 1) geringer.

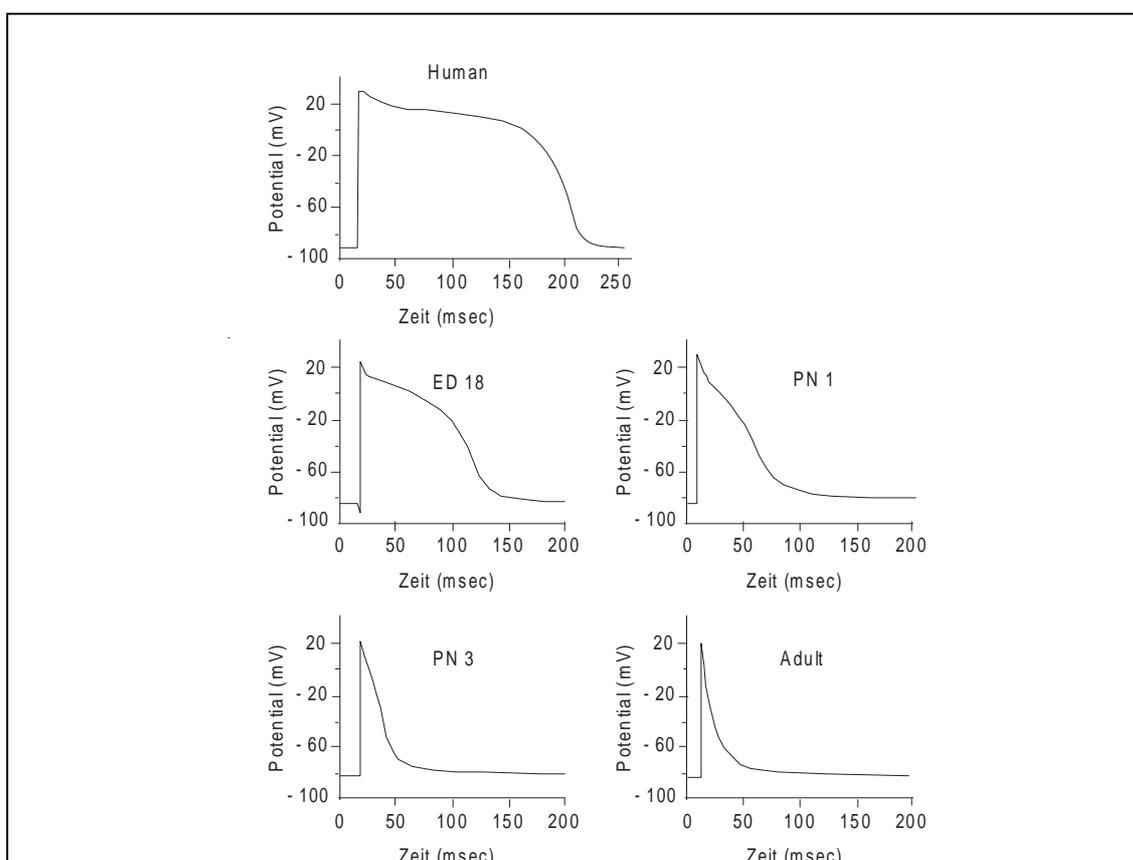


Abbildung 4.4: Aktionspotenziale abgeleitet aus Kardiomyozyten von 18 Tage alten murinen Embryonen (ED18), neonatalen murinen Herzzellen am ersten und dritten Tag (PN1 und PN3) sowie von Herzzellen adulter Mäuse im Vergleich zum adulten humanen Aktionspotenzial (Leu et al. 2001; Nerbonne 2004; Wang et al. 1996).

Neben der Verteilung der Ionenkanäle haben neonatale Mäuse insbesondere aus pragmatischen Gründen Vorteile gegenüber anderen Entwicklungsstufen. Im Vergleich zum embryonalen Modell besticht das neonatale durch eine bessere Handhabbarkeit. Denn nach Elokation der Halswirbelsäule beim

Muttertier im embryonalen Modell (Pillekamp et al. 2005) werden auch die Feten schon nach wenigen Minuten hypoxisch. Das erschwert die Experimentstandardisierung, da der zuerst präparierte Embryo weniger lange einer potenziell schädigenden Hypoxie ausgesetzt ist als der letzte Embryo. Demgegenüber sind neonatale Mäuse, die nacheinander untersucht und präpariert werden können, besser zu analysieren. Adulte Mäuse benötigen in ihrer Haltung wesentlich mehr Platz. Zudem muss die Maus bis sie ausgewachsen ist über Wochen gehalten werden, was mit Mehrkosten und Mehraufwand verbunden ist.

Es kann zusammengefasst werden, dass das neonatale Mausmodell zur Untersuchung von kardialen Gewebe sowohl aus pragmatischer wie auch aus wissenschaftlicher Sicht sehr geeignet erscheint.

4.6 Perspektiven und Ausblick

Die Erstellung von Herzgewebeschnitten ist eine einfache und kostengünstige Methode, um intaktes zum Beispiel auch humanes Gewebe mit geringer Ischämiezeit für *in vitro*-Versuche zugänglich zu machen. Durch das Schneiden wird eine Möglichkeit geboten, aussagekräftige Untersuchungen an dem nur in begrenztem Rahmen zur Verfügung stehenden humanen Gewebe auch in großer Anzahl durchzuführen. Aus einer kleinen Biopsie, wie sie beispielsweise bei Herzoperationen an der Herz-Lungenmaschine anfällt, könnten eine große Zahl Gewebeschnitte angefertigt und auf vielfältige Art und Weise untersucht werden.

Ein weiterer interessanter und wichtiger Punkt wird zudem in Zukunft der Versuch sein, das geschnittene Herzgewebe für spätere Untersuchungen aufzubewahren. Dies insbesondere, wenn es sich um nur begrenzt zur Verfügung stehendes humanes Gewebe handelt. Die Idee, Gewebeschnitte aufzubereiten und bis zur weiteren Untersuchung einzufrieren, ist nicht neu (Kryopreservation). Dies ermöglicht neben einer größeren Probenanzahl und Probenvariation auch ein besseres Zeitmanagement. Insbesondere für Lebergewebeschnitte wurden seit Anfang der 1990-er Jahre Methoden zur Kryopreservation auch menschlichen Gewebes untersucht (de Graaf et al.

2000; de Kanter et al. 1998; Fisher et al. 1991; Martignoni et al. 2004). Einfrieren von Gewebe unter -130°C stoppt die biologische Aktivität komplett, so dass theoretisch eine unendlich lange Aufbewahrung möglich ist (Mazur 1970). Limitierend für den Einsatz insbesondere bei Gewebeschnitten von empfindlichem Gewebe ist der Schaden, der durch den Prozess entsteht. Intrazelluläre Eiskristalle zerstören die Zellmembran. Um dies zu verhindern, werden Substanzen wie DMSO dem Medium zugesetzt und die Geschwindigkeit des Einfrierprozesses niedrig gehalten (Glockner et al. 1998). Die so hergestellten und wieder aufgetauten Leberschnitte erreichen heutzutage mittlerweile nahezu vollständig ihre metabolische Funktion, die sie vor dem Einfrieren aufwiesen (Martignoni et al. 2004). Erfolgreiche Versuche an Herzgewebeschnitten zur Kryopreservation wurden indes noch nicht durchgeführt. Die Langzeitaufbewahrung von Herzgewebe im Sinne einer Kryopreservation zu entwickeln und zu etablieren ist somit ein wichtiger Schritt, der an dem hier vorgestelltem Modell zur Präparation von Herzgewebeschnitten etabliert werden könnte. Humanes Herzgewebe oder Herzgewebe von großen Tieren könnte dann noch optimaler ausgenutzt und seltenes, exponiertes oder krankes Herzgewebe in einer Datenbank gesammelt und vergleichend untersucht werden.

Auch die aktuell in den Medien und in der Literatur vieldiskutierte Transplantation von Herzmuskelzellen in *in vivo*-Herzen kann an dem hier etablierten Modell getestet werden. Eine Veränderung der Erregungsausbreitung, der Feldpotenziale oder der Kontraktilität durch implantierte Zellen könnten anhand der Herzgewebeschnitte analysiert werden.

5 Zusammenfassung

Bereits 1995 postulierte Lin, dass die Methoden zur elektrophysiologischen kardialen Untersuchung an Mäusen weit hinter denen der molekularbiologischen Möglichkeiten liegen (Lin et al. 1995). Der Bedarf an der Entwicklung geeigneter Modelle zur elektrophysiologischen Untersuchung von Herzgewebe besteht bis heute (Fabritz et al. 2007).

Die hier vorgestellte Arbeit stellt ein neues Modell vor, dass diesem Anspruch auf einfache Weise gerecht wird.

- Es wurde dazu (i) erstmals eine Methode entwickelt, spontan schlagende vitale Herzmuskelschnitte aus neonatalen Mausherzen zur elektrophysiologischen Untersuchung auf MEAs herzustellen.
- Diese Methode wurde (ii) in ihren Arbeitsschritten systematisch durch Variation einzelner Parameter analysiert und signifikant optimiert.
- Die so entwickelten Herzgewebeschnitte wurden (iii) in ihren histologischen (HE-Färbung, Trypanblau-Färbung), biochemischen (ATP-Test, MTT-Test, LDH-Test) und elektrophysiologischen Eigenschaften (MEA-Messungen) charakterisiert.

Dadurch konnte ein reproduzierbares Modell von strukturell und funktionell intakten murinen Myokardschnitten geschaffen werden. Der Vorteil zu anderen kardiologischen *in vivo*-Modellen ist ein intakter dreidimensionaler Gewebeverband, der die *in vivo*-Situation mit allen Zellen und interzellulären Kontakten widerspiegelt und über einen Zeitraum von mindestens 48 Stunden in Kultur gehalten werden kann.

Anhand dieses Modells können nun insbesondere pharmakologische Screenings, aber auch Analysen hinsichtlich der elektrophysiologischen Auswirkung von Eingriffen am Herzen wie Zelltransplantationen, Operationen, Hypoxie oder Elektrolytverschiebungen durchgeführt werden.

Eine wichtige Perspektive für die Zukunft ist die Verwendung von humanen Gewebeschnitten. Das hier entwickelte Protokoll bildet die Grundlage, um beispielsweise Stanzpräparate, die bei Herzoperationen anfallen, aufzuarbeiten und zu analysieren.

6 Literaturverzeichnis

1. Akar, J.G. and F.G. Akar. 2006. "Mapping arrhythmias in the failing heart: from Langendorff to patient." *J. Electrocardiol.* 39:S19-S23.
2. Altschuld, R.A., C.E. Ganote, W.G. Nayler, and H.M. Piper. 1991. "What constitutes the calcium paradox?" *J. Mol. Cell Cardiol.* 23:765-767.
3. Amar, D., A. Goenka, H. Zhang, B. Park, and H.T. Thaler. 2006. "Leukocytosis and increased risk of atrial fibrillation after general thoracic surgery." *Ann. Thorac. Surg.* 82:1057-1061.
4. Arguello, C., J. Alanis, and B. Valenzuela. 1988. "The early development of the atrioventricular node and bundle of His in the embryonic chick heart. An electrophysiological and morphological study." *Development.* 102:623-637.
5. Bach P.H., Alison E.M. Vickers, Robyn Fisher, Andreas Baumann, Eva Brittebo, David J. Carlisle, Henk J. Koster, Brian G. Lake, Florence Salmon, Thomas W. Sawyer, and Greg Skibinski. 1996. "The Use of Tissue Slices for Pharmacotoxicological Studies." *ATLA.* 24:893-923.
8. Banach, K., M.D. Halbach, P. Hu, J. Hescheler, and U. Egert. 2003. "Development of electrical activity in cardiac myocyte aggregates derived from mouse embryonic stem cells." *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol.* 284:H2114-H2123.
9. Behfar, A., L.V. Zingman, D.M. Hodgson, J.M. Rauzier, G.C. Kane, A. Terzic, and M. Puceat. 2002. "Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart." *FASEB J.* 16:1558-1566.
10. Bogue, C.W. 2003. "Genetic Models in Applied Physiology. Functional genomics in the mouse: powerful techniques for unraveling the basis of human development and disease." *J. Appl. Physiol.* 94:2502-2509.
11. Bouchardy, J., C. Huber, E.J. Meijboom, L.K. von Segesser, and N. Sekarski. 2006. "[Tetralogy of Fallot: after the successful surgical correction...]." *Rev. Med. Suisse.* 2:1376-1379.
12. Bradford, M.M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.* 72:248-54.:248-254.
13. Bull, D.A., B.B. Reid, R.C. Connors, A. Albanil, J.C. Stringham, and S.V. Karwande. 2000. "Improved biochemical preservation of heart slices during cold storage." *Int. J. Surg. Investig.* 2:117-123.
14. Burnashev, N.A., F.A. Edwards, and A.N. Verkhatsky. 1990. "Patch-clamp recordings on rat cardiac muscle slices." *Pflugers Arch.* 417:123-125.

15. Busselen,P. 1991. "Polyamines and the calcium paradox in rat hearts." *J.Mol.Cell Cardiol.* 23:237-247.
 16. Campbell,A.K. and C.N.Hales. 1971. "Maintenance of viable cells in an organ culture of mature rat liver." *Exp.Cell Res.* 68:33-42.
 17. Chiello,T.C., C.Cabo, J.Coromilas, J.Kurokawa, R.S.Kass, and A.L.Wit. 2003. "Electrophysiological consequences of human IKs channel expression in adult murine heart." *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* 284:H168-H175.
 18. Corbucci,G.G., C.Perrino, G.Donato, A.Ricchi, B.Lettieri, G.Troncone, C.Indolfi, M.Chiariello, and E.V.Avvedimento. 2004. "Transient and reversible deoxyribonucleic acid damage in human left ventricle under controlled ischemia and reperfusion." *J.Am.Coll.Cardiol.* 43:1992-1999.
 19. Davies,M.P., R.H.An, P.Doevendans, S.Kubalak, K.R.Chien, and R.S.Kass. 1996. "Developmental changes in ionic channel activity in the embryonic murine heart." *Circ.Res.* 78:15-25.
 20. de Graaf,I.A., d.van, V, J.H.Brits, and H.J.Koster. 2000. "Increased post-thaw viability and phase I and II biotransformation activity in cryopreserved rat liver slices after improvement of a fast-freezing method." *Drug Metab Dispos.* 28:1100-1106.
 21. de Kanter,R. Human and rat organ slices: a tool to study drug metabolism and toxicity. 2002. Groningen University Institute for Drug Exploration (GUIDE).
- Ref Type: Thesis/Dissertation
22. de Kanter,R., P.Olinga, I.Hof, M.de Jager, W.A.Verwillegen, M.J.Slooff, H.J.Koster, D.K.Meijer, and G.M.Groothuis. 1998. "A rapid and simple method for cryopreservation of human liver slices." *Xenobiotica.* 28:225-234.
 23. Dogterom,P. 1993. "Development of a simple incubation system for metabolism studies with precision-cut liver slices." *Drug Metab Dispos.* 21:699-704.
 24. Egert,U., D.Heck, and A.Aertsen. 2002a. "Two-dimensional monitoring of spiking networks in acute brain slices." *Exp.Brain Res.* 142:268-274.
 25. Egert,U., T.Knott, C.Schwarz, M.Nawrot, A.Brandt, S.Rotter, and M.Diesmann. 2002b. "MEA-Tools: an open source toolbox for the analysis of multi-electrode data with MATLAB." *J.Neurosci.Methods.* 117:33-42.
 26. Enard,W., P.Khaitovich, J.Klose, S.Zollner, F.Heissig, P.Giavalisco, K.Nieselt-Struwe, E.Muchmore, A.Varki, R.Ravid, G.M.Doxiadis, R.E.Bontrop, and S.Paabo. 2002. "Intra- and interspecific variation in primate gene expression patterns." *Science.* 296:340-343.
 27. Eschwege,P., Y.Godfrin, M.Conti, J.Quillard, D.Douguet, and G.Benoit. 1996. "Subzero nonfrozen storage of rat kidneys and livers: computer-assisted organ perfusion-storage equipment." *Transplant.Proc.* 28:2900-2902.

28. Fabritz,L., G.Breithardt, and P.Kirchhof. 2007. "Preclinical testing of drug-induced proarrhythmia: value of transgenic models." *Cardiovasc.Hematol.Agents Med.Chem.* 5:289-294.
29. Feng,J., B.Wible, G.R.Li, Z.Wang, and S.Nattel. 1997. "Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K⁺ current in cultured adult human atrial myocytes." *Circ.Res.* 80:572-579.
30. Ferrera,R., A.Larese, F.Berthod, J.Guidollet, C.Rodriguez, G.Dureau, and A.Dittmar. 1993. "Quantitative reduction of MTT by hearts biopsies in vitro is an index of viability." *J.Mol.Cell Cardiol.* 25:1091-1099.
31. Findikli,N., N.Z.Candan, and S.Kahraman. 2006. "Human embryonic stem cell culture: current limitations and novel strategies." *Reprod.Biomed.Online.* 13:581-590.
32. Fisher,R., C.W.Putnam, L.J.Koep, I.G.Sipes, A.J.Gandolfi, and K.Brendel. 1991. "Cryopreservation of pig and human liver slices." *Cryobiology.* 28:131-142.
33. Fisher,R.L., R.P.Shaughnessy, P.M.Jenkins, M.L.Austin, G.L.Roth, A.J.Gandolfi, and K.Brendel. 1995. "Dynamic organ culture is superior to multiwell plate culture for maintaining precision-cut tissue slices: optimization of tissue slice culture." *Toxicology Methods.* 5:99-113.
34. Fisher,R.L., M.S.Smith, S.J.Hasal, K.S.Hasal, A.J.Gandolfi, and K.Brendel. 1994. "The use of human lung slices in toxicology." *Hum.Exp.Toxicol.* 13:466-471.
35. Fleischmann,B.K., Y.Duan, Y.Fan, T.Schoneberg, A.Ehlich, N.Lenka, S.Viatchenko-Karpinski, L.Pott, J.Hescheler, and B.Fakler. 2004. "Differential subunit composition of the G protein-activated inward-rectifier potassium channel during cardiac development." *J.Clin.Invest.* 114:994-1001.
36. Ghosh,S., N.B.Standen, and M.Galinianes. 2001. "Failure to precondition pathological human myocardium." *J.Am.Coll.Cardiol.* 37:711-718.
37. Glockner,R., P.Steinmetzer, C.Drobner, and D.Muller. 1998. "Application of cryopreserved precision-cut liver slices in pharmacotoxicology--principles, literature data and own investigations with special reference to CYP1A1-mRNA induction." *Exp.Toxicol.Pathol.* 50:440-449.
38. Goette,A. and U.Lendeckel. 2006. "[Morphological remodeling in atrial fibrillation]." *Herz.* 31:101-107.
39. Gorenek,B. 2006. "Tachyarrhythmias in percutaneous coronary interventions." *J.Electrocardiol.* 39:412-415.

40. Halbach, M., U. Egert, J. Hescheler, and K. Banach. 2003. "Estimation of action potential changes from field potential recordings in multicellular mouse cardiac myocyte cultures." *Cell Physiol Biochem*. 13:271-284.
43. Hamill, O.P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F.J. Sigworth. 1981. "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." *Pflugers Arch*. 391:85-100.
44. Hashemi, E., M. Dobrota, C. Till, and C. Ioannides. 1999. "Structural and functional integrity of precision-cut liver slices in xenobiotic metabolism: a comparison of the dynamic organ and multiwell plate culture procedures." *Xenobiotica*. 29:11-25.
45. Hearse, D.J., S.M. Humphrey, and G.R. Bullock. 1978. "The oxygen paradox and the calcium paradox: two facets of the same problem?" *J. Mol. Cell Cardiol*. 10:641-668.
46. Hebisch, S., E. Bischoff, and S. Soboll. 1993. "Influence of 2,3-butanedione monoxime on heart energy metabolism." *Basic Res. Cardiol*. 88:566-575.
47. Hew, K.W. and K.A. Keller. 2003. "Postnatal anatomical and functional development of the heart: a species comparison." *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol*. 68:309-320.
48. Hillebrenner, M.G., J.C. Eason, C.A. Campbell, and N.A. Trayanova. 2003. "Postshock arrhythmogenesis in a slice of the canine heart." *J. Cardiovasc. Electrophysiol*. 14:S249-S256.
49. Holland, C.E., Jr. and R.E. Olson. 1975. "Prevention by hypothermia of paradoxical calcium necrosis in cardiac muscle." *J. Mol. Cell Cardiol*. 7:917-928.
50. Hoppe, U.C. and D.J. Beuckelmann. 1998. "Characterization of the hyperpolarization-activated inward current in isolated human atrial myocytes." *Cardiovasc. Res*. 38:788-801.
51. Hullin, R., I.F. Khan, S. Wirtz, P. Mohacsi, G. Varadi, A. Schwartz, and S. Herzig. 2003. "Cardiac L-type calcium channel beta-subunits expressed in human heart have differential effects on single channel characteristics." *J. Biol. Chem*. 278:21623-21630.
52. Igelmund, P., Fleischmann B.K., I.R. Fischer, J. Soest, O. Gryshchenko, M.M. Bohm-Pinger, H. Sauer, Liu Q., and Hescheler J. 1999. "Action potential propagation failures in long-term recordings from embryonic stem-cell derived cardiomyocytes in tissue culture." *Pflugers Arch*. 437:669-679.
53. Ikenouchi, H., L. Zhao, and W.H. Barry. 1994. "Effect of 2,3-butanedione monoxime on myocyte resting force during prolonged metabolic inhibition." *Am. J. Physiol*. 267:H419-H430.

54. Izumo,S. and T.Shioi. 1998. "Cardiac transgenic and gene-targeted mice as models of cardiac hypertrophy and failure: a problem of (new) riches." *J.Card Fail.* 4:263-270.
55. Jahangiri,M., G.Weir, K.Mandal, I.Savelieva, and J.Camm. 2006. "Current strategies in the management of atrial fibrillation." *Ann.Thorac.Surg.* 82:357-364.
56. Kamiyama,A., K.Eguchi, and R.Shibayama. 1986. "Circus movement tachycardia induced by a single premature stimulus on the ventricular sheet--evaluation of the leading circle hypothesis in the canine ventricular muscle." *Jpn.Circ.J.* 50:65-73.
57. Karamlou,T., B.W.McCrindle, and W.G.Williams. 2006. "Surgery insight: late complications following repair of tetralogy of Fallot and related surgical strategies for management." *Nat.Clin.Pract.Cardiovasc.Med.* 3:611-622.
58. Kehat,I., A.Gepstein, A.Spira, J.Itskovitz-Eldor, and L.Gepstein. 2002. "High-resolution electrophysiological assessment of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: a novel in vitro model for the study of conduction." *Circ.Res.* 91:659-661.
59. Kohzuki,H., H.Misawa, S.Sakata, Y.Ohga, and M.Takaki. 2001. "Sustained high O₂ use for Ca²⁺ handling in rat ventricular slices under decreased free shortening after ryanodine." *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* 281:H566-H572.
60. Kong,C.R., N.Bursac, and L.Tung. 2005. "Mechanoelectrical excitation by fluid jets in monolayers of cultured cardiac myocytes." *J.Appl.Physiol.* 98:2328-2336.
61. Krumdieck,C.L., J.E.dos Santos, and K.J.Ho. 1980. "A new instrument for the rapid preparation of tissue slices." *Anal.Biochem.* 104:118-123.
62. Langendorff O. 1895. "Untersuchungen am ueberlebenden Säugetierherzen." *Pfluegers Arch für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere.* 61:291-332.
63. Lazzerini,P.E., P.L.Capecci, F.Guideri, M.Acampa, M.Galeazzi, and P.F.Laghi. 2006. "Connective tissue diseases and cardiac rhythm disorders: an overview." *Autoimmun.Rev.* 5:306-313.
64. Leu,M., E.Ehler, and J.C.Perriard. 2001. "Characterisation of postnatal growth of the murine heart." *Anat.Embryol.(Berl).* 204:217-224.
65. Li,T., N.Sperelakis, R.E.Teneick, and R.J.Solaro. 1985. "Effects of diacetyl monoxime on cardiac excitation-contraction coupling." *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 232:688-695.
66. Lin,M.C., H.A.Rockman, and K.R.Chien. 1995. "Heart and lung disease in engineered mice." *Nat.Med.* 1:749-751.

69. Liu, Y., D.A. Peterson, H. Kimura, and D. Schubert. 1997. "Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction." *J. Neurochem.* 69:581-593.
70. LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, and R.J. RANDALL. 1951. "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
71. Lu, Z.J., A. Pereverzev, H.L. Liu, M. Weiergraber, M. Henry, A. Krieger, N. Smyth, J. Hescheler, and T. Schneider. 2004. "Arrhythmia in isolated prenatal hearts after ablation of the Cav2.3 (alpha1E) subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels." *Cell Physiol Biochem.* 14:11-22.
72. Marijic, J., N. Buljubasic, D.F. Stowe, L.A. Turner, J.P. Kampine, and Z.J. Bosnjak. 1991. "Opposing effects of diacetyl monoxime on contractility and calcium transients in isolated myocardium." *Am. J. Physiol.* 260:H1153-H1159.
73. Martignoni, M., M. Monshouwer, R. de Kanter, D. Pezzetta, A. Moscone, and P. Grossi. 2004. "Phase I and phase II metabolic activities are retained in liver slices from mouse, rat, dog, monkey and human after cryopreservation." *Toxicol. In Vitro.* 18:121-128.
75. Mazur, P. 1970. "Cryobiology: the freezing of biological systems." *Science.* 168:939-949.
76. McLean, M. and J. Prothero. 1991. "Myofiber orientation in the weanling mouse heart." *Am. J. Anat.* 192:425-441.
77. Morissette, P., R. Hreiche, and J. Turgeon. 2005. "Drug-induced long QT syndrome and torsade de pointes." *Can. J. Cardiol.* 21:857-864.
78. Morwinski, R. 1986. "The cultured myocardial cells as a model in cardiac research." *Biomed. Biochim. Acta.* 45:S237-S240.
79. Mosmann, T. 1983. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J. Immunol. Methods.* 65:55-63.
80. Mueller, H., M.U. Kassack, and M. Wiese. 2004. "Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines." *J. Biomol. Screen.* 9:506-515.
81. Mugelli, A., E. Cerbai, M. Barbieri, and Q. Li. 1995. "Cellular electrophysiological aspects of myocardial protection." *Pharmacol. Res.* 31:243-249.
82. Mulieri, L.A., G. Hasenfuss, F. Ittleman, E.M. Blanchard, and N.R. Alpert. 1989. "Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3-butanedione monoxime." *Circ. Res.* 65:1441-1449.
83. Mural, R.J., M.D. Adams, E.W. Myers, H.O. Smith, G.L. Miklos, R. Wides, A. Halpern, P.W. Li, G.G. Sutton, J. Nadeau, S.L. Salzberg, R.A. Holt, C.D. Kodira, F. Lu, L. Chen, Z. Deng, C.C. Evangelista, W. Gan,

- T.J.Heiman, J.Li, Z.Li, G.V.Merkulov, N.V.Milshina, A.K.Naik, R.Qi, B.C.Shue, A.Wang, J.Wang, X.Wang, X.Yan, J.Ye, S.Yooseph, Q.Zhao, L.Zheng, S.C.Zhu, K.Biddick, R.Bolanos, A.L.Delcher, I.M.Dew, D.Fasulo, M.J.Flanigan, D.H.Huson, S.A.Kravitz, J.R.Miller, C.M.Mobarry, K.Reinert, K.A.Remington, Q.Zhang, X.H.Zheng, D.R.Nusskern, Z.Lai, Y.Lei, W.Zhong, A.Yao, P.Guan, R.R.Ji, Z.Gu, Z.Y.Wang, F.Zhong, C.Xiao, C.C.Chiang, M.Yandell, J.R.Wortman, P.G.Amanatides, S.L.Hladun, E.C.Pratts, J.E.Johnson, K.L.Dodson, K.J.Woodford, C.A.Evans, B.Gropman, D.B.Rusch, E.Venter, M.Wang, T.J.Smith, J.T.Houck, D.E.Tompkins, C.Haynes, D.Jacob, S.H.Chin, D.R.Allen, C.E.Dahlke, R.Sanders, K.Li, X.Liu, A.A.Levitsky, W.H.Majoros, Q.Chen, A.C.Xia, J.R.Lopez, M.T.Donnely, M.H.Newman, A.Glodek, C.L.Kraft, M.Nodell, F.Ali, H.J.An, D.Baldwin-Pitts, K.Y.Beeson, S.Cai, M.Carnes, A.Carver, P.M.Caulk, A.Center, Y.H.Chen, M.L.Cheng, M.D.Coyne, M.Crowder, S.Danaher, L.B.Davenport, R.Desilets, S.M.Dietz, L.Doup, P.Dullaghan, S.Ferriera, C.R.Fosler, H.C.Gire, A.Gluecksmann, J.D.Gocayne, J.Gray, B.Hart, J.Haynes, J.Hoover, T.Howland, C.Ibegwam, M.Jalali, D.Johns, L.Kline, D.S.Ma, S.MacCawley, A.Magoon, F.Mann, D.May, T.C.McIntosh, S.Mehta, L.Moy, M.C.Moy, B.J.Murphy, S.D.Murphy, K.A.Nelson, Z.Nuri, K.A.Parker, A.C.Prudhomme, V.N.Puri, H.Qureshi, J.C.Raley, M.S.Reardon, M.A.Regier, Y.H.Rogers, D.L.Romblad, J.Schutz, J.L.Scott, R.Scott, C.D.Sitter, M.Smallwood, A.C.Sprague, E.Stewart, R.V.Strong, E.Suh, K.Sylvester, R.Thomas, N.N.Tint, C.Tsonis, G.Wang, G.Wang, M.S.Williams, S.M.Williams, S.M.Windsor, K.Wolfe, M.M.Wu, J.Zaveri, K.Chaturvedi, A.E.Gabrielian, Z.Ke, J.Sun, G.Subramanian, J.C.Venter, C.M.Pfannkoch, M.Barnstead, and L.D.Stephenson. 2002. "A comparison of whole-genome shotgun-derived mouse chromosome 16 and the human genome." *Science*. 296:1661-1671.
84. Nattel,S., A.Shiroshita-Takeshita, S.Cardin, and P.Pelletier. 2005. "Mechanisms of atrial remodeling and clinical relevance." *Curr.Opin.Cardiol*. 20:21-25.
85. Neely,J.R. and M.J.Rovetto. 1975. "Techniques for perfusing isolated rat hearts." *Methods Enzymol*. 39:43-60.
86. Nerbonne,J.M. 2004. "Studying cardiac arrhythmias in the mouse--a reasonable model for probing mechanisms?" *Trends Cardiovasc.Med*. 14:83-93.
87. Neri,B. and G.Cini-Neri. 1986. "Inhibition of endogenous respiration in rat heart slices as a measure of mitoxantrone cardiac toxicity." *Oncology*. 43:264-267.
88. Niwa,H., T.Burdon, I.Chambers, and A.Smith. 1998. "Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3." *Genes Dev*. 12:2048-2060.
89. O'Neil,J.J., R.L.Sanford, S.Wasserman, and D.F.Tierney. 1977. "Metabolism in rat lung tissue slices: technical factors." *J.Appl.Physiol*. 43:902-906.

90. Page, M., N. Bejaoui, B. Cinq-Mars, and P. Lemieux. 1988. "Optimization of the tetrazolium-based colorimetric assay for the measurement of cell number and cytotoxicity." *Int. J. Immunopharmacol.* 10:785-793.
91. Parrish, A.R., A.J. Gandolfi, and K. Brendel. 1995. "Precision-cut tissue slices: applications in pharmacology and toxicology." *Life Sci.* 57:1887-1901.
92. Parrish, A.R., Shipp N.G., Spall R.D., Dorr R.T., Krumdieck C.L., A.J. Gandolfi, and K. Brendel. 1992. "Organ culture of rat myocardial slices: an alternative in vitro tool in organ-specific toxicology." *Toxicology Methods.* 2:101-111.
93. Partridge, C.R., C.D. Johnson, and K.S. Ramos. 2005. "In vitro models to evaluate acute and chronic injury to the heart and vascular systems." *Toxicol. In Vitro.* 19:631-644.
94. Perreault, C.L., L.A. Mulieri, N.R. Alpert, B.J. Ransil, P.D. Allen, and J.P. Morgan. 1992. "Cellular basis of negative inotropic effect of 2,3-butanedione monoxime in human myocardium." *Am. J. Physiol.* 263:H503-H510.
95. Petty, R.D., L.A. Sutherland, E.M. Hunter, and I.A. Cree. 1995. "Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number." *J. Biolumin. Chemilumin.* 10:29-34.
96. Pillekamp, F., M. Halbach, M. Reppel, O. Rubenchyk, K. Pfannkuche, J.Y. Xi, W. Bloch, N. Sreeram, K. Brockmeier, and J. Hescheler. 2007. "Neonatal murine heart slices. A robust model to study ventricular isometric contractions." *Cell Physiol Biochem.* 20:837-846.
98. Pillekamp, F., M. Reppel, V. Dinkelacker, Y. Duan, N. Jazmati, W. Bloch, K. Brockmeier, J. Hescheler, B.K. Fleischmann, and R. Koehling. 2005. "Establishment and characterization of a mouse embryonic heart slice preparation." *Cell Physiol Biochem.* 16:127-132.
99. Price, R.J., A.B. Renwick, J.A. Beamand, F. Esclangon, P.T. Wield, D.G. Walters, and B.G. Lake. 1995a. "Comparison of the metabolism of 7-ethoxycoumarin and coumarin in precision-cut rat liver and lung slices." *Food Chem. Toxicol.* 33:233-237.
100. Price, R.J., A.B. Renwick, P.T. Wield, J.A. Beamand, and B.G. Lake. 1995b. "Toxicity of 3-methylindole, 1-nitronaphthalene and paraquat in precision-cut rat lung slices." *Arch. Toxicol.* 69:405-409.
101. Reisner, A.H., P. Nemes, and C. Bucholtz. 1975. "The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels." *Anal. Biochem.* 64:509-516.
102. Reppel, M., P. Igelmund, U. Egert, F. Juchelka, J. Hescheler, and I. Drobinskaya. 2007. "Effect of cardioactive drugs on action potential generation and propagation in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes." *Cell Physiol Biochem.* 19:213-224.

104. Ruegg,C.E., A.J.Gandolfi, R.B.Nagle, C.L.Krumdieck, and K.Brendel. 1987. "Preparation of positional renal slices for study of cell-specific toxicity." *J.Pharmacol.Methods*. 17:111-123.
105. Ruigrok,T.J., D.de Moes, and C.Borst. 1983. "Bretschneider's histidine-buffered cardioplegic solution and the calcium paradox." *J.Thorac.Cardiovasc.Surg*. 86:412-417.
106. Ruiz-Lozano,P., S.M.Smith, G.Perkins, S.W.Kubalak, G.R.Boss, H.M.Sucov, R.M.Evans, and K.R.Chien. 1998. "Energy deprivation and a deficiency in downstream metabolic target genes during the onset of embryonic heart failure in RXRalpha-/- embryos." *Development*. 125:533-544.
107. Salama,G. and B.R.Choi. 2007. "Imaging ventricular fibrillation." *J.Electrocardiol*. 40:S56-S61.
108. Schneider,A., N.Ad, U.Izhar, I.Khaliulin, J.B.Borman, and H.Schwalb. 2003. "Protection of myocardium by cyclosporin A and insulin: in vitro simulated ischemia study in human myocardium." *Ann.Thorac.Surg*. 76:1240-1245.
109. Schwinger,R.H., M.Bohm, A.Koch, I.Morano, J.C.Ruegg, and E.Erdmann. 1994. "Inotropic effect of the cardioprotective agent 2,3-butanedione monoxime in failing and nonfailing human myocardium." *J.Pharmacol.Exp.Ther*. 269:778-786.
110. Sedmak,J.J. and S.E.Grossberg. 1977. "A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250." *Anal.Biochem*. 79:544-552.
111. Sieuwerts,A.M., J.G.Klijn, H.A.Peters, and J.A.Foekens. 1995. "The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival." *Eur.J.Clin.Chem.Clin.Biochem*. 33:813-823.
112. Smith,P.F., A.J.Gandolfi, C.L.Krumdieck, C.W.Putnam, C.F.Zukoski, III, W.M.Davis, and K.Brendel. 1985. "Dynamic organ culture of precision liver slices for in vitro toxicology." *Life Sci*. 36:1367-1375.
113. Stefaniak,M.S., C.L.Krumdieck, A.J.Gandolfi, and K.Brendel. 1992. "Biochemical and histological characterisation of agar-filled precision cut lung slices in dynamic organ culture as an *in vitro* tool." *In Vitro Toxicology*. 5:7-19.
114. Stringham,J.C., K.L.Paulsen, J.H.Southard, B.L.Fields, and F.O.Belzer. 1992. "Improved myocardial ischemic tolerance by contractile inhibition with 2,3-butanedione monoxime." *Ann.Thorac.Surg*. 54:852-859.
115. Sutherland,F.J. and D.J.Hearse. 2000. "The isolated blood and perfusion fluid perfused heart." *Pharmacol.Res*. 41:613-627.

116. Sutherland,F.J., M.J.Shattock, K.E.Baker, and D.J.Hearse. 2003. "Mouse isolated perfused heart: characteristics and cautions." *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* 30:867-878.
117. Toutain,H.J., V.Moronvalle-Halley, J.P.Sarsat, C.Chelin, D.Hoet, and D.Leroy. 1998. "Morphological and functional integrity of precision-cut rat liver slices in rotating organ culture and multiwell plate culture: effects of oxygen tension." *Cell Biol.Toxicol.* 14:175-190.
118. Tung,L. and J.Cysyk. 2007. "Imaging fibrillation/defibrillation in a dish." *J.Electrocardiol.* 40:S62-S65.
119. Tung,L. and Y.Zhang. 2006. "Optical imaging of arrhythmias in tissue culture." *J.Electrocardiol.* 39:S2-S6.
120. Vahl,C.F., A.Bonz, C.Hagl, T.Timek, U.Herold, H.Fuchs, N.Kochsiek, and S.Hagl. 1995. "'Cardioplegia on the contractile apparatus level": evaluation of a new concept for myocardial preservation in perfused pig hearts." *Thorac.Cardiovasc.Surg.* 43:185-193.
121. Viragh,S. and C.E.Chalice. 1983. "The development of the early atrioventricular conduction system in the embryonic heart." *Can.J.Physiol Pharmacol.* 61:775-792.
123. von Lewinski,D., B.Stumme, F.Fialka, C.Luers, and B.Pieske. 2004. "Functional relevance of the stretch-dependent slow force response in failing human myocardium." *Circ.Res.* 94:1392-1398.
124. Walsh,E.K., H.Huang, Z.Wang, J.Williams, R.de Crom, R.van Haperen, C.I.Thompson, D.J.Lefter, and T.H.Hintze. 2004. "Control of myocardial oxygen consumption in transgenic mice overexpressing vascular eNOS." *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* 287:H2115-H2121.
125. Wang,L., Z.P.Feng, C.S.Kondo, R.S.Sheldon, and H.J.Duff. 1996. "Developmental changes in the delayed rectifier K⁺ channels in mouse heart." *Circ.Res.* 79:79-85.
126. Wang,L., S.Swirp, and H.Duff. 2000. "Age-dependent response of the electrocardiogram to K(+) channel blockers in mice." *Am.J.Physiol Cell Physiol.* 278:C73-C80.
129. Warburg,O. 1923. "Versuche an überlebendem Karzinomgewebe." *Biochemische Zeitung.* 142:317-333.
130. Wei,H., O.Juhasz, J.Li, Y.S.Tarasova, and K.R.Boheler. 2005. "Embryonic stem cells and cardiomyocyte differentiation: phenotypic and molecular analyses." *J.Cell Mol.Med.* 9:804-817.
131. Wiesmann,F., J.Ruff, K.H.Hiller, E.Rommel, A.Haase, and S.Neubauer. 2000. "Developmental changes of cardiac function and mass assessed with MRI in neonatal, juvenile, and adult mice." *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* 278:H652-H657.

132. Yamashita,D., H.Kohzuki, Y.Kitagawa, T.Nakashima, A.Kikuta, and M.Takaki. 2004. "O₂ consumption of mechanically unloaded contractions of mouse left ventricular myocardial slices." *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* 287:H54-H62.
133. Zhang,J.G., S.Ghosh, C.D.Ockleford, and M.Galinanes. 2000. "Characterization of an in vitro model for the study of the short and prolonged effects of myocardial ischaemia and reperfusion in man." *Clin.Sci.(Lond)*. 99:443-453.
134. Zheng,W., Y.Xie, G.Li, J.Kong, J.Q.Feng, and Y.C.Li. 2004. "Critical role of calbindin-D28k in calcium homeostasis revealed by mice lacking both vitamin D receptor and calbindin-D28k." *J.Biol.Chem.* 279:52406-52413.
135. Zimmer,T., C.Bollensdorff, V.Haufe, E.Birch-Hirschfeld, and K.Benndorf. 2002. "Mouse heart Na⁺ channels: primary structure and function of two isoforms and alternatively spliced variants." *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* 282:H1007-H1017.
136. Zimmerman,A.N. and W.C.Hulsmann. 1966. "Paradoxical influence of calcium ions on the permeability of the cell membranes of the isolated rat heart." *Nature.* 211:646-647.

7 Vorabveröffentlichung

Pillekamp, F., M. Reppel, V. Dinkelacker, Y. Duan, N. Jazmati, W. Bloch, K. Brockmeier, J. Hescheler, B. K. Fleischmann, and R. Koehling. 2005. "Establishment and characterization of a mouse embryonic heart slice preparation." *Cell Physiol Biochem.* 16:127-132.

Original Paper

Cellular Physiology
and Biochemistry

Cell Physiol Biochem 2005;16:127-132

Accepted: April 18, 2005

Establishment and Characterization of a Mouse
Embryonic Heart Slice Preparation

Frank Pillekamp, M.D.^{1,2,a}, Michael Reppel, M.D.^{2,a}, Vera Dinkelacker, M.D.^{3,4}, Yaqi Duan², Nathalie Jazmati², Wilhelm Bloch, M.D.⁵, Konrad Brockmeier, M.D.¹, Juergen Hescheler, M.D.², Bernd K. Fleischmann, M.D.³ and Ruediger Koehling, M.D.⁴

¹Pediatric Cardiology and ²Institute of Neurophysiology, University of Cologne, ³Institute of Physiology I and ⁴Department of Epileptology, University of Bonn, ⁵Department of Molecular and Cellular Sport Medicine, German Sport University, Cologne, ^aauthors contributed equally to the manuscript

Key Words

Myocytes, cardiac/*physiology • Action potentials • Electrophysiology/*methods • Electrophysiology/*embryology • Heart/*physiology • Animal models

preserved. Conclusion: Functionally intact heart slices can be generated from murine embryos.

Copyright © 2005 S. Karger AG, Basel

Abstract

Background: In contrast to isolated cells, the anatomic and functional integrity of tissue slices remains preserved. Aim of the study was to establish the slice technique in embryonic mouse hearts in order to perform physiological and pharmacological investigations of wild-type mice and genetically engineered mouse models of heart disease. Methods: Ventricular slices (thickness: 300 µm) were cut from agar-embedded embryonic mouse hearts (ED 16.5-18.5) with a vibratome. Histology, immunostaining with markers for apoptosis induction, intracellular recordings with sharp electrodes and field potential recordings using microelectrode arrays were performed to assess viability. Results: Slices exhibited normal histology without prominent signs of apoptosis for at least 24 hours. Intracellular recordings revealed the typical electrophysiological fingerprint of ventricular cardiomyocytes. Field potential recordings proved that adrenergic and muscarinic signaling was

Introduction

The advent of the brain slice preparation led to a dramatic improvement of the understanding of cerebral activity because it has enabled studies of cellular function in the context of an intact tissue [1]. This is particularly important for structures like the brain and the heart in which intercellular cross-talk is critical for complex organ function. Furthermore, aggressive dissociation methods required to prepare isolated cells, often have adverse effects on the function of ion channels and receptors. Thus, we sought to establish an intact heart slice preparation so that we might better understand mechanisms of cardiac physiology in the future. To date, relatively little progress has been made in establishing a viable heart slice preparation [2, 3] and in recording physiological activity of cardiac slices [4]. This is in part due to the fact that the heart contains a significant amount

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2005 S. Karger AG, Basel
1015-8987/05/0163-0127\$22.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/journals/net

Bernd K. Fleischmann, M.D.
Institute of Physiology I, Live & Brain Center, University of Bonn
Sigmund-Freud-Str. 25, D-53105 Bonn (Germany)
Tel. +49-228-6885-200, Fax +49-228-6885-201
E-Mail bernd.fleischmann@uni-bonn.de

of extracellular matrix and is expected to exhibit hypercontraction in response to even small increases in extracellular K^+ , which leaks out of damaged cells. Burnashev et al. [4] reported the first patch-clamp recordings using neonatal rat heart slices. Although they provided no information on the structural integrity or viability of the tissue, they did report that a significant number of cells had depolarized resting potentials. Consequently, for many years electrophysiological studies of cardiac function have relied primarily on preparations of isolated cardiomyocytes. Because of the increasing importance of transgenic and gene-targeted mice being developed to study cardiac electrophysiology [5] we developed this model in murine heart tissue.

Materials and Methods

Harvesting of tissue and preparation of slices

Experiments were carried out according to the guidelines of the local animal welfare committee. Mice were superovulated, time-mated and tissue harvested between days 16.5-18.5 post coitum [6]. Isolated hearts and slices were kept in ice-cold (4°C) Ca^{2+} -free Tyrode's solution (see [3] for composition), continuously gassed with pure oxygen; CaCl_2 was added as indicated. All substances were purchased from Sigma Chemical Co. unless otherwise stated. 4% low-melting agarose (Roth, Karlsruhe, Germany) dissolved at 70°C and maintained liquid at 34°C was poured over the hearts, rapidly chilled and was allowed to solidify on ice. Agarose-embedded hearts were fixed onto a specimen holder using cyanoacrylate glue (Pattex, Henkel, Germany). Ventricles were sectioned into 300- μm -thick slices along the short axis with a microtome (Leica VT1000S, Leica Microsystems, Germany) using steel blades (Campden Instruments, Leicester, England).

Histology

For histological and immunohistochemical examination, 7 μm thick cryosections were prepared from the slices. Immunohistochemistry was performed as described [7] using rabbit anti-active-Caspase-3 antibody (1:500, Pharmingen, San Diego, Ca, USA) and rabbit anti-poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) p85 fragment antibody (1:250, Promega, Madison, WI, USA) as primary antibodies.

Action potential (AP) and field potential (FP) recordings

AP recordings were performed with sharp glass micropipettes and FP recordings with blunt glass micropipettes in an interface-type chamber superfused with Tyrode's solution (Ca^{2+} 0.9 mM; 32°C) (see also [8]). Whole-cell current clamp recordings of isolated ventricular cardiomyocytes were obtained as reported [9] using external Tyrode's solution containing Na^+ 140 mM and Ca^{2+} 3.6 mM.

Microelectrode arrays

For microelectrode array (MEA) recordings, slices were transferred to ice-cold Tyrode's solution (0.9 mM Ca^{2+}) bubbled with 100% oxygen for 30 minutes, plated on planar MEAs (Multi Channel Systems, Reutlingen, Germany) using cooled Iscove's medium containing 20% heat inactivated fetal calf serum (Gibco Inc., Germany) and equilibrated with 5% CO_2 at 37°C [10]. One hour before electrical recordings were obtained, Iscove's medium was replaced with Tyrode's solution (Ca^{2+} 1.8 mM). Spontaneous or electrically stimulated field potentials were recorded using a MEA60 system and analyzed off-line [10]. A bipolar external electrode (diameter: 40 μm) applying a square pulse (5-10 V; 5 ms) was used for stimulation. The timing of maximal negative intrinsic deflection (dV/dt_{min}) of the recordings was calculated and averaged for each electrode to generate color-coded activation maps [11].

Statistics

All data are presented as means \pm standard deviations (SDs). Heart rate analysis was performed using paired t-tests with Bonferroni adjustment for multiple comparisons. One-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-test analysis were used for comparison of AP characteristics after equal variances were determined by the Levene procedure. Statistics were calculated using SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). P values <0.05 were considered significant.

Results

Histology

Hematoxylin and Eosin (H & E) (Fig. 1A) and trypan blue staining (Fig. 1B) was performed to evaluate the structure of cardiac tissue slices. This analysis demonstrated that the histological structure was well-preserved, although some disruption of tissue integrity with trypan blue positive cardiomyocytes was observed in two to three of the most superficial cell layers (approx. 40 μm). We assessed the degree of apoptosis in these cells by staining for active-Caspase-3 (Fig. 1C) and/or PARP p85 fragment (Fig. 1D). This analysis revealed that active-Caspase-3 and PARP p85 fragment staining localized to trypan blue positive areas. Thus, the cells throughout the cardiac slice except for those in the surface layers were viable and intact for the first 24 hours after preparation (Fig. 1 C, D).

AP and FP recordings

Intracellular AP and FP recordings were obtained primarily from slices without spontaneous beating; however, qualitatively useful recordings were also acquired from contracting slices. Intracellular recording

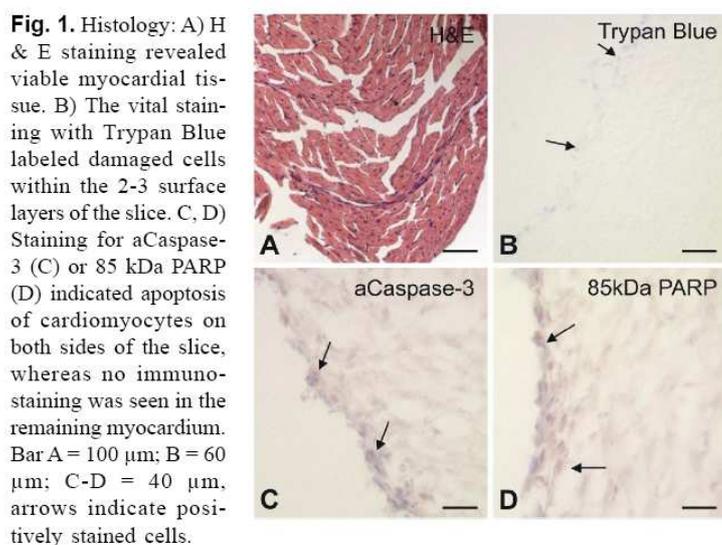


Fig. 1. Histology: A) H & E staining revealed viable myocardial tissue. B) The vital staining with Trypan Blue labeled damaged cells within the 2-3 surface layers of the slice. C, D) Staining for aCaspase-3 (C) or 85 kDa PARP (D) indicated apoptosis of cardiomyocytes on both sides of the slice, whereas no immunostaining was seen in the remaining myocardium. Bar A = 100 μ m; B = 60 μ m; C-D = 40 μ m, arrows indicate positively stained cells.

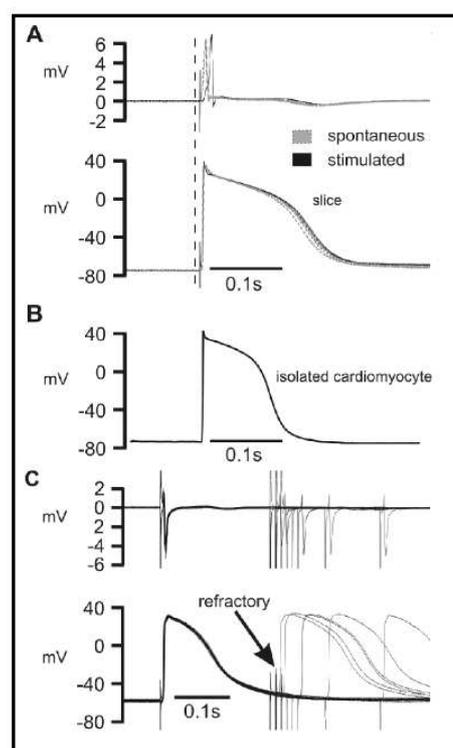


Fig. 2. Intracellular recordings from heart slices: A) FP (upper trace) and AP (lower trace) recordings from a heart slice that displayed both spontaneous (gray; n=6) and triggered (black; n=7) APs. Comparison of stimulated APs (RMP -64 \pm 3 mV, dV/dt 1.19 \pm 0.10 V/s, AMP 86 \pm 3 mV, APD50 134 \pm 2 ms, APD90 193 \pm 8 ms; n=3) and spontaneous APs (RMP -64 \pm 1 mV, dV/dt 0.73 \pm 0.02 V/s, AMP 95 \pm 1 mV, APD50 127 \pm 5 ms, APD90 190 \pm 17 ms; n=5) showed only significant differences in dV/dt. B) Typical spontaneous AP of an isolated ventricular cardiomyocyte. C) FPs (upper trace) and APs (n=15) (lower trace) triggered by paired stimuli showed refractory periods of 230-250 ms.

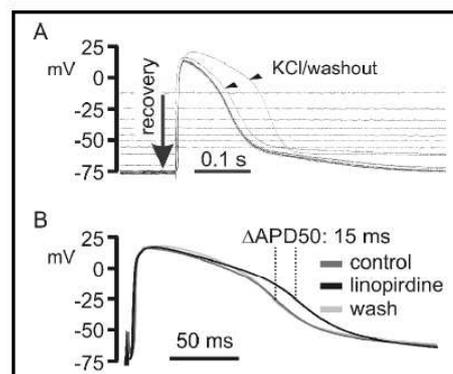


Fig. 3. Pharmacological testing: A) Addition of KCl (50 μ l, 2 M) to the bath resulted in a strong depolarization of the RMP. Continuous perfusion of the recording chamber with normal solution led to a gradual recovery of the RMP (arrow; interval between traces: 10 s). The first two APs after recovery displayed prolonged APDs because of an extended repolarization phase (arrow heads). B) Lengthening of the repolarization phase by linopirdine (10 μ M).

Fig. 4. Spreading of electrical excitation: A) MEA recordings of local FPs averaged over 400 events. B) Two-dimensional color-coded map illustrating the delay of dV/dt_{min}. Isochronic lines suggest impulse propagation in a clockwise direction. Pink areas mark the position of the slice, black dots indicate MEA electrodes.

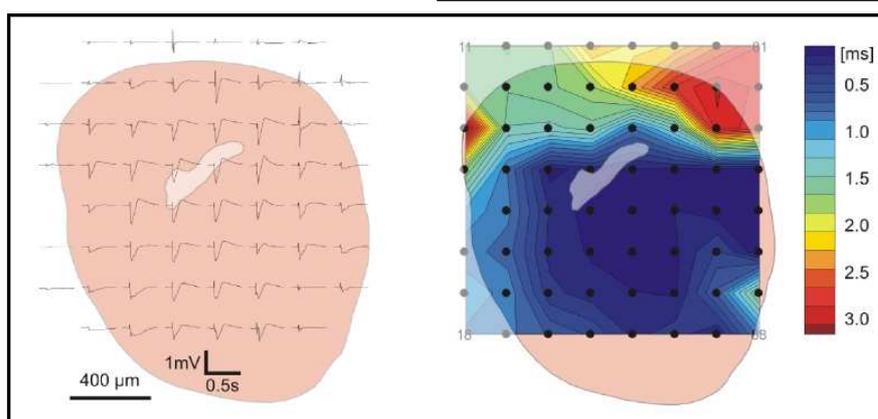


Table 1. Characteristics of stimulated APs recorded from myocardial slices and spontaneous APs of isolated ventricular cells. Values are means \pm SD. N.s., non-significant ($P>0.05$).

Parameter	Slice (stimulated; n=8)	Isolated Cell (spontaneous; n=27)	P-value
RMP (mV)	-65 \pm 8	-65 \pm 5	n.s.
AMP (mV)	82 \pm 14	101 \pm 9	<0.001
APD50 (ms)	116 \pm 18	74 \pm 25	<0.001
APD90 (ms)	191 \pm 25	129 \pm 35	<0.001

from single cells within slices could be maintained for up to 20-45 minutes. APs exhibited a fast overshooting upstroke and a broad plateau phase typical of late stage embryonic ventricular cardiomyocytes (Fig. 2A, lower panel). APs of a cell within a slice that exhibited both stimulated and spontaneous APs were of similar shape (Fig. 2A, lower panel). FPs consisted of a sharp biphasic transient, which lasted approximately 20 ms and corresponded to the fast upstroke of the intracellular recording. A prolonged low voltage deflection usually ending with a negative field coincided with the plateau and repolarization phase of the AP (Fig. 2 A).

APs recorded in slices were compared to current clamp recordings of isolated ventricular cardiomyocytes from embryos of the same differentiation stage. The measurements yielded no significant differences in the resting membrane potential (RMP). However, the amplitude of APs was smaller and the APD50 and APD90 were significantly longer in stimulated cardiomyocytes within the slice than in spontaneously beating isolated cells (Fig. 2B, Tab. 1). To demonstrate another biophysical characteristic, the refractory period of stimulated cardiomyocytes was assessed with a double pulse stimulation protocol. The duration (230-250 ms) in these experiments corresponded to the APD at 92% repolarization (Fig. 2C). Addition of 50 μ l 2 M KCl solution (n=2 slices) resulted in an immediate massive depolarization of the RMP (Fig. 3A). Instead of producing a hypercontraction, the membrane potential recovered to normal values over a period of 90-120 seconds upon continued perfusion with normal solution. During recovery, the first APs that could again be triggered were prolonged; thereafter APs became identical to those before K⁺ administration (Fig. 3A).

In order to assess the utility of this model for pharmacological studies, linopirdine, a specific KCNQ channel blocker, was administered. Linopirdine (10 μ M) induced a delayed repolarization as indicated by the prolongation of the APD50 by 15 ms that could almost be reversed shortly after washout (Fig. 3B). Thus, these results demonstrate that this cardiac slice preparation

recapitulates responses previously observed for single cardiomyocytes.

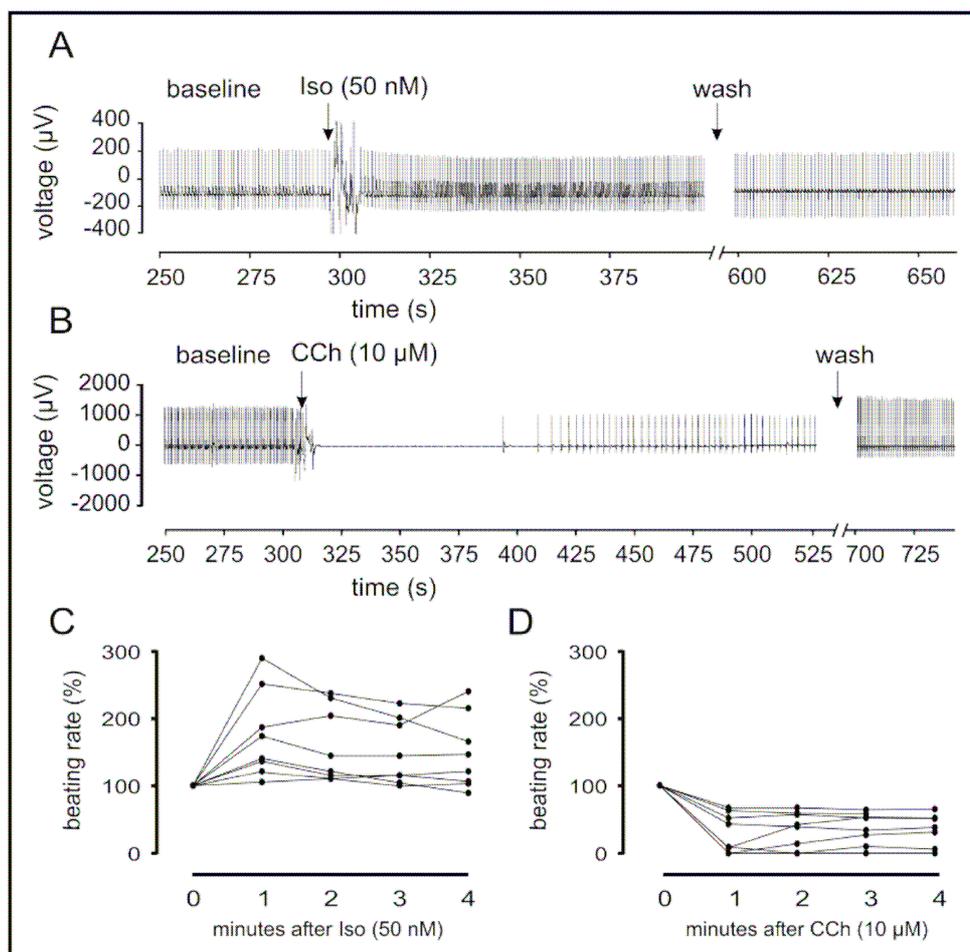
MEAs

MEA recordings of FPs were performed on slices exhibiting spontaneous contractions. Spontaneous beating, in most cases throughout the whole slice, was observed in nearly half of the slices after the temperature was increased to 37°C and Ca²⁺ was added to the extracellular solution. The proportion of spontaneously beating slices remained constant for at least 60 hrs after slicing (median =43%, range =25-48%; n=9) and a few slices even maintained spontaneous rhythmic contractions for one week. The average beating frequency of contracting slices was 56 \pm 38 bpm (n=36).

An example illustrating the feasibility of measuring the spread of electrical excitation in a spontaneously beating slice is shown in Fig. 4B and is based on the timing of the maximal negative intrinsic deflection (dV/dt_{min}) of the FPs displayed in Fig. 4A. A delay map calculated from these results demonstrated a circular conduction route for the electrical impulse. A spontaneously beating slice could be paced using external electrical stimulation resulting in synchronous contractions of the whole slice.

We used pharmacological agonists of muscarinic and beta-adrenergic receptors to evaluate whether these receptors produced the expected modulation of the beating frequency (chronotropy). Isoprenaline (ISO, 50 nM) induced an immediate increase of beating rate reaching a median of 156% (range: 105-289%) of the baseline. This response attenuated 4 min after the beginning of the ISO application (median =134%, range =89-240%; n=8) (Fig. 5 A, C), which is consistent with desensitization of the beta-adrenoceptor. The muscarinic agonist carbachol (CCh, 10 μ M) significantly decreased the beating frequency to 26% of the control rate (range: 0-67%), and on average this suppression persisted for 4 minutes after CCh application (median =44%, range = 0-65%; n=8) (Fig. 5 B & D).

Fig. 5. Hormonal modulation of chronotropy: A, B) Original traces recorded with MEAs showing positive (A) and negative (B) chronotropy of spontaneously beating ventricular heart slices in response to ISO (50 nM, A) and CCh (10 μ M, B). The effect was almost completely reversed by washout. C, D) Beating rates during the first 4 min after ISO (n=8, C) or CCh (n=8, D) administration. Each line shows the beating rate of a single slice.



Discussion

Here we demonstrate for the first time that viable ventricular slices can be generated from murine embryonic hearts. Standard histological staining in combination with immunohistological analysis for apoptosis markers demonstrated that cardiac slices were structurally intact except for damage to the outer 2-3 cell surface layers. The viability of this preparation was further validated by the fact that at least 50% of slices exhibited spontaneous beating for up to one week after preparation and that the excitation spread throughout the whole slice. While spontaneous beating in adult cardiomyocytes indicates cell damage and Ca²⁺ overload, it is a typical property of healthy embryonic heart cells [9].

Intracellular recordings of cardiomyocytes in slices revealed a physiological membrane potential and a spike and dome AP morphology. These properties are comparable to those previously described in late embryonic cardiomyocytes by us and other groups [12]. Remarkably, in the slice preparation, the APD was longer than in isolated cardiomyocytes or endocardial right ventricular cells [12]. This as well as the extended refractory period might be due to elevations in extracellular K⁺ within the slice where diffusion is hindered and simultaneous discharge of numerous cells might result in an accumulation of K⁺, or alternatively by disruption of gap junctions during dissociation [13]. Since ATP-sensitive K⁺ (K_{ATP}) channels would shorten the APD, the longer APD suggests that the slices are not hypoxic.

Screening for drug-induced QT-interval prolongation is important for drug safety testing [14]. Long QT syndrome type 1, an autosomal disorder with syncope or sudden death due to ventricular tachyarrhythmias, is caused by mutations of the potassium channel gene *KCNQ1* [15]. Linopirdine is a selective inhibitor of *KCNQ* channels [16] and *KCNQ1* is expressed in the mouse heart during development [17]. We also demonstrate a prolongation of repolarization induced by linopirdine using embryonic slices. A significant additional advantage of tissue slicing is the possibility to study multi-cellular structures, which is demonstrated by the visualization of the spread of excitation wave using the MEA system [10].

Taken together, our results prove that viable tissue slices can be generated from embryonic hearts. The slices have morphologically conserved structures and stable electrophysiological characteristics. This makes it possible to conduct short and long-term experiments of cardiac function, and provides a powerful tool for drug safety studies. Our preparation will also facilitate studies of functional cross-talk between different cell types within the heart at a cellular and molecular level.

Acknowledgements

The work was supported by the Koeln Fortune Program / Faculty of Medicine, University of Cologne. We thank M. Breitbach, P. Sasse and Dr. B. Freedman for helpful comments on the manuscript.

References

- ▶1 Edwards FA, Konnerth A, Sakmann B, Takahashi T: A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pflugers Arch* 1989;414:600-612.
- ▶2 Parrish AR, Gandolfi AJ, Brendel K: Precision-cut tissue slices: applications in pharmacology and toxicology. *Life Sci* 1995;57:1887-1901.
- ▶3 Yamashita D, Kohzaki H, Kitagawa Y, Nakashima T, Kikuta A, Takaki M: O₂ consumption of mechanically unloaded contractions of mouse left ventricular myocardial slices. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H54-H62.
- ▶4 Bumashv NA, Edwards FA, Verkhratsky AN: Patch-clamp recordings on rat cardiac muscle slices. *Pflugers Arch* 1990;417:123-125.
- ▶5 Nerbonne JM: Studying cardiac arrhythmias in the mouse — a reasonable model for probing mechanisms? *Trends Cardiovasc Med* 2004;14:83-93.
- ▶6 Fleischmann M, Bloch W, Kolossov E, Andressen C, Müller M, Brem G, Hescheler J, Addicks K, Fleischmann BK: Cardiac specific expression of the green fluorescent protein during early murine embryonic development. *FEBS Lett* 1998;440:370-376.
- ▶7 Tossios P, Bloch W, Huebner A, Raji MR, Dodos F, Klass O, Suedkamp M, Kasper SM, Hellmich M, Mehlhorn U: N-acetylcysteine prevents reactive oxygen species-mediated myocardial stress in patients undergoing cardiac surgery: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126:1513-1520.
- ▶8 Köhling R, Koch UR, Hamann M, Richter A: Increased excitability in corticostriatal synaptic pathway in a model of paroxysmal dystonia. *Neurobiol Dis* 2004;16:236-245.
- ▶9 Fleischmann BK, Duan Y, Fan Y, Schoneberg T, Ehlich A, Lenka N, Viatchenko-Karpinski S, Hescheler J, Fakler B: Differential subunit composition of the G protein-activated inward-rectifier potassium channel during cardiac development. *J Clin Invest* 2004;114:994-1001.
- ▶10 Reppel M, Pillekamp F, Lu ZJ, Halbach M, Brockmeier K, Fleischmann, BK, Hescheler J: Microelectrode arrays: a new tool to measure embryonic heart activity. *J Electrocardiol* 2004;37 Suppl:104-109.
- ▶11 Feld Y, Melamed-Frank M, Kehat I, Tal D, Marom S, Gepstein L: Electrophysiological modulation of cardiomyocytic tissue by transfected fibroblasts expressing potassium channels: a novel strategy to manipulate excitability. *Circulation* 2002;105:522-529.
- ▶12 Wang L, Feng ZP, Kondo CS, Sheldon RS, Duff HJ: Developmental changes in the delayed rectifier K⁺ channels in mouse heart. *Circ Res* 1996;79:79-85.
- ▶13 Lin X, Veenstra RD: Action potential modulation of connexin40 gap junctional conductance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H1726-735.
- ▶14 Shah RR: Drug-induced QT interval prolongation: regulatory perspectives and drug development. *Ann Med* 2004;36:47-52.
- ▶15 Zareba W, Moss AJ, Sheu G, Kaufman ES, Priori S, Vincent GM, Towbin JA, Benhorin J, Schwartz PJ, Napolitano C, Hall WJ, Keating MT, Qi M, Robinson JL, Andrews ML: International LQTS Registry: Location of mutation in the *KCNQ1* and phenotypic presentation of long QT syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003;14:1149-1153.
- ▶16 Robbins J: *KCNQ* potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Ther* 2001;90:1-19.
- ▶17 Franco D, Demolombe S, Kupersmidt S, Dumaine R, Dominguez JN, Roden D, Antzelevitch C, Escande D, Moorman AF: Divergent expression of delayed rectifier K(+) channel subunits during mouse heart development. *Cardiovasc Res* 2001;52:65-75.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Nathalie Jazmati
geboren am 4. Januar 1982 in Rinteln
ledig, deutsch

Eltern: Vater: Dr. Issam Jazmati (HNO-Arzt)

Mutter: Petra Jazmati (Hausfrau)

Geschwister: Aref (25), Siad (22) und Tarek (15) Jazmati

Schulbildung:

1988 - 1992 Grundschule in Hagen

1992 - 2001 Gymnasium in Hagen

20. Juni 2001 Abitur (Note 1,8)

Praktika:

6/2001 - 12/2001 Werbeagentur „werkstudio“ in Düsseldorf

1/2002 - 4/2002 Fotografie-Praktikum in Düsseldorf

Studium:

4/2002 - 5/2008 Medizinstudium an der Universität zu Köln

13. März 2004 Physikum (Note 2,0)

seit 6/2004 Dissertation an der Universität zu Köln unterstützt durch ein Promotionsstipendium der Forschungsförderung *Köln Fortune*

Thema: Optimierung, Standardisierung und

Validierung der Methodik der Präparation

neonataler muriner myokardialer

Gewebeschnitte zur Durchführung

elektrophysiologischer Untersuchungen

8/2005 - 4/2006

Auslandssemester an der Universidad de Malaga unterstützt durch das Austauschprogramm

SOKRATES/ERASMUS

2/2007 - 2/2008

PJ an der Universität zu Köln

7. Mai 2008

2. Staatsexamen (Note 2,0)

Köln, den 17. Juli 2008

