



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf



Hochschule für Angewandte
Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Sciences

Department Biotechnologie

Bachelorarbeit

Auswirkung von Nachlastveränderung auf die Kontraktionskraft künstlicher Herzmuskelgewebe

Paul Demin

1933686

durchgeführt im

Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie

Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Gutachter: Prof. Dr. phil. nat. Oliver Ullrich (HAW Hamburg)

Gutachter: Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen (UKE Hamburg)

Hamburg, 26.03. 2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
1 Einleitung	1
1.1 Physiologische und pathologische Herzhypertrophie.....	1
1.2 Künstliches Herzgewebe	2
1.3 Pathologische kardiale Hypertrophie im künstlichen Herzmuskelgewebe.....	3
1.4 Fragestellung und Zielsetzung	4
2 Material und Methoden.....	5
2.1 Material	5
2.2 Geräte.....	5
2.3 Chemikalien und Lösungen	6
2.4 Künstliche Herzmuskelkonstrukte (Engineered Heart Tissue)	7
2.4.1 Isolation von neonatalen Rattenkardiomyozyten	7
2.4.2 Herstellung von EHTs	7
2.4.3 Kultivierung von EHTs.....	9
2.4.4 Herstellung der Silikonhalterung.....	10
2.4.5 Erhöhung der Nachlast.....	10
2.5 Statistische Auswertung	15
3 Ergebnisse	17
3.1 Korrelation von Auslenkung der Silikonhalterung mit der Kraft	17
3.1.1 Kontraktilität und Auslenkung der EHTs unter diesen Bedingungen.....	18
3.2 Korrelation von Auslenkung der neuen Silikonhalterung mit der Kraft	21
3.2.1 Kontraktilität und Auslenkung unter den Bedingungen	23
3.2.2 Kontraktilität und Auslenkung unter kontinuierlicher Intervention.....	23
3.3 Zusammenführende Ergebnisse.....	26
4 Diskussion.....	27
4.1 Der Grundgedanke.....	27
4.2 Physikalische Grundlagen	27
4.3 <i>Fractional Shortening</i>	28
4.4 Ergebnisse aus den Zwischenmessungen	29
4.4.1 Diskussion der Ergebnisse unter $k = 1,1 \text{ mN/mm}$	29
4.4.2 Diskussion der Ergebnisse unter $k = 0,47 \text{ mN/mm}$	31
4.5 Schlussfolgerung und Ausblick.....	33
5 Zusammenfassung.....	35

6	Literaturverzeichnis	36
	Danksagung	38
	Eigenständigkeitserklärung	39

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EHT	<i>Engineered heart tissue</i> , künstliches Herzgewebe
FS	<i>Fractional shortening</i> , Verkürzungsfraction
max	Maximal
mm	Millimeter
MPa	Megapascal
n	Anzahl der untersuchten Proben, biologische Replikate
p	p-Wert, Signifikanzniveau
T₃	Trijodthyronin

1 Einleitung

1.1 Physiologische und pathologische Herzhypertrophie

Glaubt man einer Redewendung, so ist Sport Mord. Diese eher humoristische Redewendung hat aber tatsächlich etwas Wahres. So kommt es bei wettkampftreibenden Athleten nicht selten zu plötzlichen Todesfällen, die Folge einer hypertrophen Kardiomyopathie sind (Elliott et al. 2000; Maron und Pelliccia 2006). Dass nicht alles so verteufelt werden darf, sah man an den griechischen Athleten. Vor gut 2500 Jahren war körperliche Arbeit ein fester Bestandteil der Kultur. Griechische Ärzte wie Hippokrates sprachen den physischen Tätigkeiten viele positive Eigenschaften zu. Mit der Industrialisierung veränderte sich das Bild. Maschinen ersetzten körperliche Tätigkeiten in vielen Bereichen, sodass Menschen entweder zu wenig oder zu viel körperliche Arbeit an den Tag legten. Ungefähr zu dieser Zeit, Ende des 19. Jahrhunderts, beschreibt der schwedische Arzt Salomon Eberhard Henschen als Erster das sogenannte Sportherz. Mittels Perkussion untersuchte er das Herz von Langläufern und stellte fest, dass dieses beidseitig vergrößert war. Mit dieser Erkenntnis definierte er die Vergrößerung des Herzens bei Athleten als Sportherz. Nach dieser Entdeckung herrschten kontroverse Ansichten über die Bedeutung der Vergrößerung. Eine Mehrheit der Mediziner sah darin eine ausschließlich maladaptive Anpassung. Mit neueren Untersuchungsmethoden, vorangestellt die Echokardiografie, und damit einhergehend besserem Verständnis in der Kardiologie werden heutzutage zwei Formen der Herzhypertrophie unterschieden, eine pathologische und eine physiologische Form (Rost 1982; Hill und Olson 2008).

Hypertrophie, aus dem Griechischen *hyper* für mehr als normal und *trophe* Ernährung, beschreibt die Vergrößerung eines Organs oder Gewebes durch Zellvergrößerung, während Hyperplasie eine Vermehrung von Zellen darstellt. Dabei ist es jedoch schwierig, einen Phänotyp eindeutig als pathologisch bzw. physiologisch zu deklarieren (Dorn et al. 2003). Besonders im Anfangsstadium lässt sich eine Hypertrophie diagnostisch schwer oder kaum feststellen. Deswegen ist es um so entscheidender, den möglichen Verlauf sorgfältig zu beobachten, denn jede langandauernde Beanspruchung des Herzens mündet in eine Hypertrophie (Dickhuth et al. 2001; Aktories et al. 2013). Als Ursache ist eine Vergrößerung des Myokards und somit einzelner Myozyten anzusehen. Diese adaptive Vergrößerung der Muskelmasse kompensiert die größere Druck- oder Volumenbelastung. Eine physiologische Hypertrophie wird mit Schwangerschaft, chronischem Ausdauertraining und der normalen postnatalen Entwicklung assoziiert. Im Gegensatz dazu spricht man von einer pathologischen Hypertrophie bei chronischer Überlastung des Myokards, beispielweise

hervorgerufen durch eine Aortenklappenstenose. Obwohl es schwierig ist, phänotypisch zwischen den beiden Hypertrophietypen zu unterscheiden, gibt es einige molekulare Hinweise, die eine Unterscheidung erlauben. So geht die pathologische Hypertrophie mit der Reaktivierung eines fetalen Genprogramms einher. Es kommt zu einer vermehrten Expression von atrialen und B-Typ natriuretischen Peptiden (ANP und BNP), α -skeletalem Aktin und der β -Isoform der schweren Myosinkette β -MHC (wobei dieses nur bei Ratten und Mäusen zutrifft). Ferner wird die sarco/endoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) herunterreguliert. Entscheidend ist dabei die Zusammenschau dieser Befunde, während eine isolierte Untersuchung schnell zu falsch positiven Ergebnissen kommt. Ergänzend zu den molekularen Merkmalen kommt es bei der pathologischen Hypertrophie zu Veränderungen des Metabolismus. So werden unter hypertrophen Bedingungen vermehrt Kohlenhydrate und weniger Fettsäuren katabolisiert. (Dorn et al. 2003; Taegtmeyer et al. 2010). Obgleich die Herzhypertrophie bei beiden Typen, pathologisch und physiologisch, durch das Myozytenwachstum begleitend mit der Bildung neuer Sarkomere hervorgerufen wird, sind die Signalwege unterschiedlich. Bei der krankhaften Form spielt Calcineurin, eine Kalzium abhängige Proteinphosphatase, und *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) eine wichtige Rolle (Taigen et al. 2000; Saito et al. 2003). Bei der physiologischen Hypertrophie hingegen nimmt zum Beispiel das Insulin-ähnliche Wachstumshormon (IGF) eine wichtige Rolle ein. Dabei bindet IGF an Rezeptor-Tyrosinkinasen, sodass herzschtzende Kinasen, vor allem die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und Proteinkinase B (Akt), aktiviert werden (Aoyagi und Matsui 2011).

1.2 Künstliches Herzgewebe

Die Herstellung künstlicher Herzmuskelgewebe ist ein Ziel des Forschungsbereich *Tissue Engineering*, ein *interdisziplinäres biomedizinisches Forschungsgebiet* (Bruns 2003). Unter künstlichem Herzmuskelgewebe wird ein dreidimensionales Zellkulturformat von Herzzellen verstanden. Diese *in vitro* Gewebekonstrukte ermöglichen die Erforschung von normalem und pathologischem Gewebe inklusive funktioneller Versuche. Somit sollen komplexe Sachverständnisse besser aufgeklärt werden und dazu beitragen, Gewebefunktionen wiederherzustellen, zu erhalten oder zu verbessern. Derartige Ansätze lassen hoffen, dass in ferner Zukunft das Therapiespektrum kardial erkrankter Patienten erweitert werden und so chronisch Erkrankten Heilung zuteil werden kann. Vorteile des dreidimensionalen Konstrukts gegenüber der herkömmlichen 2D-Kultur sind eine bessere Zell-Zell-Interaktion und gerichtete Kontraktionswiderstände.

Es existieren viele etablierte Methoden, um Kardiomyozyten oder andere Herzzellen in einer 3-dimensionale Matrix herzustellen. Sie unterscheiden sich grundsätzlich in drei

verschiedenen Ansätzen (Hirt et al. 2014). Eine Möglichkeit besteht darin, Zellen auf präformierten Matrices aus synthetischen Polymeren oder Biomaterialien aufzubringen. So wurde ein komplettes Rattenherz von allen Zellen befreit und das biologische Gerüst im Anschluss mit Kardiomyozyten besiedelt (Ott et al. 2008). Der zweite Ansatz kommt ohne Matrices aus. Dabei werden gezüchtete Zellschichten übereinander gestapelt, sodass ein dreidimensionales Konstrukt entsteht (Sandwich-Verfahren). Dieses ermöglicht beispielsweise eine Transplantation dieser Gewebekonstrukte auf ein infarktgeschädigtes Myokard (Shimizu et al. 2002; Dunn et al. 2014;). Bei der dritten Herangehensweise wird die Matrix mit isolierten Zellen suspendiert, die anschließend in eine gewünschte Form gegossen werden kann. Dabei werden Matrixproteine wie Kollagen I (Eschenhagen et al. 1997), Kollagen I und Matrigel (Zimmermann et al. 2002), Matrigel (Morritt et al. 2007) oder Fibrin (Hansen et al. 2010) verwendet, um extrazelluläre Matrices zu erzeugen, in denen die Herzzellen eingebettet werden. Diese stabile und gelartige Konstruktion lässt eine Zell-Zell-Interaktion zu. Nährstoffe werden per Diffusion aus dem Medium zu den Zellen befördert, sodass Zellwachstum- und Differenzierung gewährleistet ist. Ein Vorteil von Fibrin ist, dass es nach Reaktion von Fibrinogen und Thrombin innerhalb weniger Minuten auspolymerisiert. Dadurch wird eine homogene Verteilung der Zellen in der Matrix gewährleistet, die sonst während der Polymerisation durch die Schwerkraft absinken. Ein permanent gerichteter Kontraktionswiderstand wird durch die Aufhängung des Gewebes an flexiblen Silikonstäben gewährleistet. Die Zellen richten sich entlang der Kraftlinien innerhalb des Konstrukts aus. Durch die Anpassung auf ein mit einer Standard-24-Well-Zellkulturschale kompatibles Format wurde eine standardisierte Plattform entwickelt, die sich dank automatischer Kontraktilität-Analysen durch ein videooptisches Messverfahren zum Beispiel als Basis für Arzneimitteltests eignet.

1.3 Pathologische kardiale Hypertrophie im künstlichen Herzmuskelgewebe

Wichtige Erkenntnisse, auf denen diese Arbeit aufbaut, stammen aus der wissenschaftlichen Arbeit von Hirt et al. (2012). In dieser Arbeit wurde ein innovatives *in vitro* Modell vorgestellt, welches eine pathologische kardiale Hypertrophie am künstlichen Herzmuskelgewebe hervorrief. Dabei wurde das Protokoll von Hansen et al. (2010) unter anderem soweit modifiziert, dass Matrigel (komplett) durch eine Fibrinmatrix ersetzt wurde und mehr Zellen in diese Matrix eingebettet wurden. Zudem wurde anstelle eines elastischen Silikonstabs ein hohler und im Außendurchmesser etwas breiterer elastischer Silikonschlauch verwendet, mit denen die *Engineered Heart Tissues* (EHTs) durch Polymerisation von Fibrin eine Verbindung eingingen. Die Silikonschläuche konnten mittels Metallbügeln versteift werden, was zu einer 12fachen Federkonstante im Vergleich zu Kontrollbedingungen führte. Zweck

diese Widerstanderhöhung war ein Anstieg der Nachlast mit der Frage, ob sich damit eine pathologische Hypertrophie hervorrufen lasse. Die bis dahin etablierten *in vitro* Modelle induzierten eine pathologische Hypertrophie durch chemische Substanzen, wie Endothelin-1 (ET-1) und Phenylephrin (PE) (Yue et al. 2000; Zolk et al. 2003), die in dieser Arbeit als Positivkontrolle verwendet wurden. Bei anderen *in vitro* Modelle wurde das Herzmuskelgewebe ebenfalls mechanisch beansprucht, jedoch durch einen Dehnvorgang, in dem die Vorlast und nicht wie hier die Nachlast erhöht wurde (Weil et al. 1998). Die Verifizierung mit einhergehender Validierung dieser neuen Methode erfolgte durch die Feststellung, dass bei den EHTs unter Nachlastverstärkung das hypertrophe Genprogramm reaktiviert wurde, die EHTs einen um knapp 25% bzw. 50% erhöhten Glukoseverbrauch absolut bzw. pro Schlag (vgl. Kapitel 1.1) und zudem eine um 35% verminderte Kontraktionskraft aufwiesen. Weitere pathologische Effekte der Nachlasterhöhung waren eine verlängerte Relaxationszeit und eine verstärkte Fibrose.

Jedoch wurden in dieser Studie auch Hinweise auf eine physiologische Hypertrophie festgestellt. Verglichen wurden dabei histologische Aufnahmen von EHTs, die an den von Hansen et al. (2010) verwendeten Silikonstäben kultiviert worden waren mit solchen, die an den hohlen Silikonschläuchen gewachsen waren. Auffallend war ein vergrößerter Querschnitt der Herzmuskelzellen mit ausgeprägten randlokalisierten Kardiomyozyten. Auch die damit verbundene Steigerung in der Kontraktilität konnte gezeigt werden. So waren Hinweise eines Trainingseffekts zu sehen, die durch den etwas härteren Silikonschlauch hervorgerufen waren.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Kontraktionskraft von künstlichem Herzmuskelgewebe unter Änderung der Nachlast. In Anlehnung an das Protokoll von Hirt et al. (2012) wurde das künstliche Herzgewebe an hohlen Silikonschläuchen kultiviert. Folgende Unterpunkte sollen dabei erfüllt werden:

- Es sollte ein Weg gefunden werden, die Nachlast stufenweise zu verändern.
- Damit sollte der Bereich der Nachlasterhöhung identifiziert werden, in dem es zum Übergang von physiologischer zu pathologischer Hypertrophie kommt.
- Zudem sollte ein Schlauch gefunden werden, der im Außendurchmesser dem im Hansen et al. (2010) verwendeten kompakten Silikonstabes gleicht.
- Dabei würde sich die Fragen stellen, ob sich von diesem neuen Ausgangspunkt physiologische Effekte mit einer Nachlasterhöhung hervorrufen lassen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Bezeichnung	Firma	Artikelnummer
Silikonschlauch ID x AD: 0,5 x 1,3 mm	Fisher Scientific	3100504
Silikonschlauch ID x AD: 0,5 x 1,0 mm	Fisher Scientific	TSR0050025P
GAC Nubryte® <i>Wire type</i> 304 VAR steel; <i>Size</i> 016, <i>length</i> : 14"	GAC	03-016-58
24 Well Multidish	Nunc	144530
Injekt®, Injektionsspritzen, 20 mL	B. Braun	4606205V
Spritzenfilter Filtropur S 0,2	Sarstedt	83.1826.001
Vacuum Filtration „rapid“-Filtermax	TPP	99250
SYLGARD® 184 Elastomer Kit	Dow Corning	24001673921

2.2 Geräte

Bezeichnung	Firma	Artikelnummer
Lichtmikroskop Eclipse TS 100	Nikon	
Videooptische Messapparatur	Eigenbau	
Basler Kamera Typ A602f	Basler	
Zentrifuge, Labofuge 400E	Heraeus	

2.3 Chemikalien und Lösungen

Bezeichnung	Firma	Artikelnummer
Agarose, 2% (in PBS)	Invitrogen	15510-019
Aprotinin, 2 mg/ml (in <i>Aqua ad injectabilia</i>)	Sigma-Aldrich	A1153
<i>Aqua</i> (bidestilliert, deionisiert, pyrogenfrei)	B. Braun	0082479E
<i>Bovines Fibrinogen</i> , 200 mg/ml + 0,5 µg Aprotinin/mg Fibrinogen (0,9% NaCl)	Sigma-Aldrich	F4753
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM, mit 1 g/l D-Glukose und 3,7 g/l NaHCO ₃ , ohne L-Glutamin mit Phenolrot)	Biochrom	F 0415
Ethanol	J.T.Baker	8025
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco	26010
Glutamin	Gibco	25030
<i>Hanks Buffered Saline Solution</i> , HBSS	Gibco	14025050
Hühnerembryonenextrakt	eigene Herstellung	
Hydrocortison (50 µg/ml in 0,9% NaCl)	Merck	H-0396
Insulin	Sigma-Aldrich	I9278-5ML
NaCl 0,9%	Braun	3570160
Penicillin/Streptomycin (100x)	Gibco	15140
Pferdeserum Hitze inaktiviert	Gibco	260500
<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS)	Gibco	14190
Thrombin, 100 U/ml (PBS, <i>Aqua ad injectabilia</i>)	Sigma-Aldrich	T7513

Trijodthyronin, T ₃ , 20 µg/ml 1 N NaOH + 49 ml DMEM)	(1 ml	European Commission – Joint Research Centre	IRMM-469
---	-------	--	----------

2.4 Künstliche Herzmuskelkonstrukte (Engineered Heart Tissue)

2.4.1 Isolation von neonatalen Rattenkardiomyozyten

Für die Herstellung von künstlichen Herzmuskeln wurden Wistar- und Lewis-Ratten im Alter von 0-3 Tagen unter sterilen Bedingungen dekapitiert. Es folgte die Isolation der Herzen mit anschließender Entfernung der Atrien. Die so gewonnen Ventrikel wurden einem fraktioniertem Trypsin/DNAse Aufschluss unterzogen (Eschenhagen et al. 1997). Das zu Grunde liegende, von der Ethik-Kommission der Universität Hamburg genehmigte Protokoll für die Präparation von Kardiomyozyten, wurde standardisiert von den Medizinisch-technischen Assistenten/ -innen June Uebeler und Thomas Schulze durchgeführt.

2.4.2 Herstellung von EHTs

Bevor die *Engineered Heart Tissues* (EHTs) in eine Fibrin Matrix (Hansen et al. 2010) eingebettet worden sind, wurden 3 µl einer 100 U/ml Thrombinlösung in sterile 200 µl Gefäße aliquotiert und diese auf Eis gesetzt. Anschließend wurde in jedes *Well* einer *24-Well*-Zellkulturschale 1,6 ml einer 60 °C heißen 2%igen Agaroselösung pipettiert und ein Teflonplatzhalter darin platziert. Nach Aushärtung wurden diese entfernt und in die darin entstandenen Vertiefungen die Silikonhalterungen eingelegt.

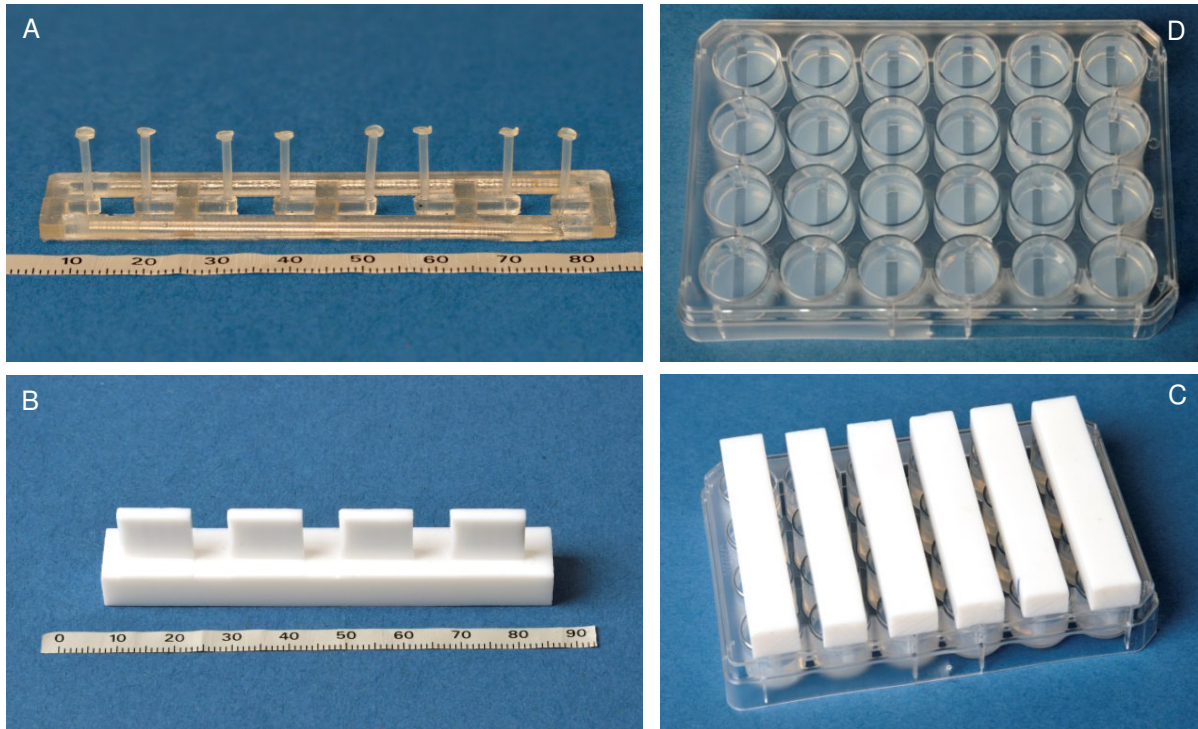


Abbildung 1: Gussformen zur Herstellung von EHTs. Um die EHTs an den Silikonhalterungen (A) mit Hilfe der Fibrin-Matrix zu generieren, wurde jedes Well einer 24-Well-Zellkulturschale mit 1,6 ml einer 60 °C heißen Agarose befüllt. Es folgte das Platzieren der Teflon-Platzhalter, die nach dem Abkühlen wieder entfernt wurden (B, C ,D) und die Silikonhalterungen den Platz einnahmen. Mit freundlicher Genehmigung: Dagmar Claußen, Zentrale Foto- und Grafikabteilung

Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellkonzentration der hergestellten Kardiomyozytensuspension (siehe 2.4.1) ermittelt. Anschließend wurde folgender Mastermix angesetzt und auf Eis gelagert.

Zellsuspension	15 x 10 ⁶ Zellen
2x DMEM*	154 µl
<i>Bovines Fibrinogen</i>	77 µl
Nicht-Kardiomyozyten Medium**	ad 2611 µl

*2x DMEM

20% 10x DMEM
 20% Pferdeserum (inaktiviert)
 2% Penicillin/Streptomycin
 4% Hühnerembryonenextrakt
 in *Aqua ad injectabilia*

**Nicht-Kardiomyozyten Medium

10% fötales Kälberserum
 (inaktiviert)
 1% Penicillin/Streptomycin
 1% Glutamin in DMEM

Für die Herstellung von einem EHT wurden 100 µl des Mastermixes in das vorbereitete Thrombinaliquot gegeben, kurz suspendiert und zügig in die Mulde pipettiert. Ist eine Platte fertig gewesen, wurde diese für 1,5 h bei 37 °C, 7% CO₂ und 40% O₂ im Inkubator gehalten. So konnte sichergestellt werden, dass das Enzym Thrombin Fibrinogen zu Fibrin spaltet, dieses polymerisiert und somit die erwünschte dreidimensionale Matrix entsteht. In der Zwischenzeit wurde in jedes *Well* einer neuen 24-*Well*-Zellkulturschale 1,5 ml EHT-Medium pipettiert. Nach der Inkubationszeit wurden die EHTs mit etwas warmem DMEM überschichtet und weitere 20 min warm gestellt. Somit ließen sich die EHTs besser aus der Agaroseform lösen und wurden schlussendlich in die mit EHT-Medium vorbereitete 24-*Well*-Zellkulturschale umgesetzt

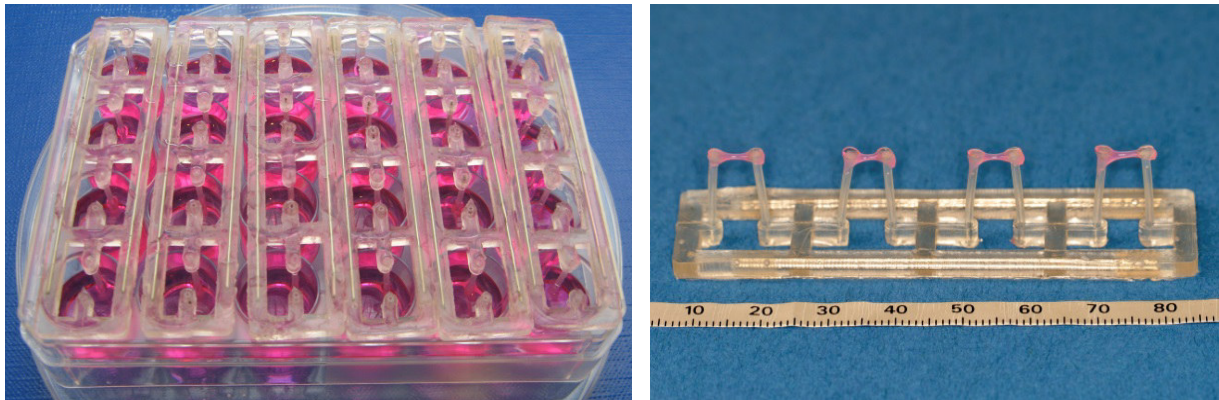


Abbildung 2: Fertige EHTs. Gezeigt sind fertige Herzmuskelgewebe, die sich in EHT-Medium (A) und an der Silikonhalterung befinden (B). Mit freundlicher Genehmigung: Dagmar Claußen, Zentrale Foto- und Grafikabteilung

Zusammensetzung des EHT-Medium

DMEM	(mit 1 g/l D-Glukose, 3,7 g/l NaHCO ₃)
Pferdeserum	10%
Hühnerembryonenextrakt	2%
Penicillin/Streptomycin	1%
Insulin	10 µg/ml
Aprotinin	33 µg/ml

2.4.3 Kultivierung von EHTs

Die Kultivierung der EHTs erfolgte im Inkubator bei 7% CO₂, 40% O₂ und einer Temperatur von 37 °C. Es wurde drei Mal wöchentlich das EHT-Medium gewechselt. 3-4 Tage nach Herstellung der EHTs waren erste lokale Kontraktionen mikroskopisch zu beobachten. Kohärent schlagende EHTs waren ab Tag 8 zu beobachten. Ab Tag 11 nahm die

Kontraktionskraft der EHTs nicht mehr zu, sodass die Pferdeserumkonzentration im Medium auf 4% gesenkt wurde. Ab Tag 13 wurde vollkommen auf Pferdeserum verzichtet und stattdessen Hydrocortison und Trijodthyronin (T_3) in finaler Konzentration von 50 ng/ml bzw. 0,5 ng/ml dem Medium zugesetzt. Das serumfreie Medium wurde, im Gegensatz zum serumhaltigen Medium, täglich gewechselt

2.4.4 Herstellung der Silikonhalterung

Zur Herstellung der Silikonhalterung dienten Gussformen aus Teflon. Diese wurden von dem Ingenieur und Feinmechaniker Bülent Aksehirlioglu angefertigt. Der Silikonrahmen maß 80 mm x 18 mm und war durch drei Stege unterteilt. In diese wurden insgesamt acht Silikonschläuche mit einer Länge von 15 mm eingeführt, sodass 4 Paare mit jeweils 12 mm Abstand entstanden. Innerhalb der Paare betrug der Abstand zwischen den Schläuchen 8 mm. Der Außendurchmesser der Silikonschläuche betrug 1,3 mm bzw. 1 mm, der Innendurchmesser 0,5 mm. An den unteren Enden der Schläuche wurden Silikonscheiben mit einem Durchmesser von 2 mm aufgeklebt. Der Schlauch hatte eine Gesamtlänge von 15 mm, von denen 11,5 mm als flexibel anzusehen waren.

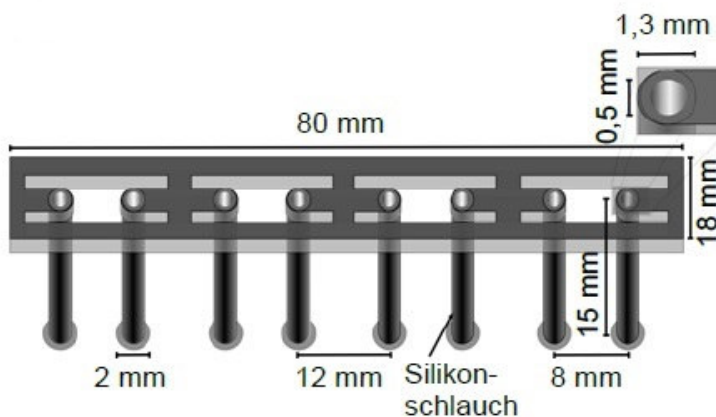


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer Silikonhalterung. Gezeigt sind die Abmessungen einer Silikonhalterung. Mit freundlicher Genehmigung: Dr. Nils Sörensen

2.4.5 Erhöhung der Nachlast

Das zentrale Thema der Arbeit ist die Erhöhung der Nachlast von EHTs. Um die Nachlast variieren zu können, wurden Edelstahlbügel in verschiedenen Längen manuell hergestellt. Diese Bügel wurden dann in Schlauchpaare eingesetzt, sodass sich der Widerstand der Einheit Schlauch-Draht erhöhte. Der Edelstahldraht hatte einen Durchmesser von 0,4 mm, er wurde so gebogen, dass der Schenkelabstand 9 mm betrug. Die 15 mm langen Edelstahlbügel wurden rein händisch produziert, die 5, 7 und 9 mm langen Bügel mit Hilfe von drei individuell hergestellten Teflonzylinder, welche Bohrlöcher in einem Abstand von

9 mm hatten und deren Höhe der Schenkellänge entsprach. Um Kontaminationen auszuschließen, wurden die Edelstahlbügel in 70%igen Ethanol gelagert. Kurz vor der Intervention wurden diese in sterilen Phosphatpuffer übergeführt. In der Regel betrug die Dauer der Intervention 7 Tage unter serumfreien Bedingungen.

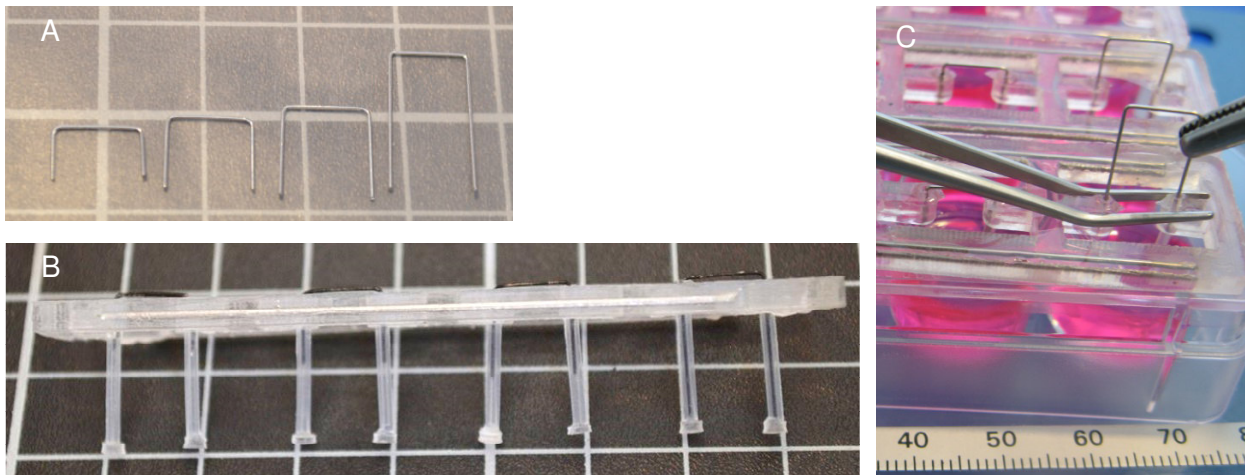


Abbildung 4: Erhöhung der Nachlast mittels Metalbügel. Die stufenweise mechanische Versteifung der Silikonhalterungen wurde mit Hilfe von Metallklammern unterschiedlicher Länge realisiert (A, B). Im *in vitro* Modell wurden Pinzetten zum Einführen zur Hilfe genommen (C). Abb. C: Mit freundlicher Genehmigung: Dagmar Claußen, Zentrale Foto- und Grafikabteilung

2.4.5.1 Videooptische Analyse

Mit Hilfe einer Zellkulturschrank-ähnlichen Einheit, die in unserem Institut entwickelt wurde, konnte unter anderem die Kontraktionskraft der EHTs in der 24-Well-Zellkulturschale unter sterilen Bedingungen videooptisch erfasst werden. Der Deckel dieser Messapparatur bestand aus einer Glasplatte, über der sich eine Basler Kamera befand, die an einem x-y-z-System montiert und über einen PC ansteuerbar war. Unter jedem Well befand sich eine Diode, die als Lichtquelle diente. Damit sich das Medium unter dauerhaftem Lichteinfluss nicht zusätzlich erwärmt, wurde die Beleuchtung mit der Aufnahme synchronisiert. In dieser Apparatur herrschten gleiche Bedingungen wie im Inkubator.

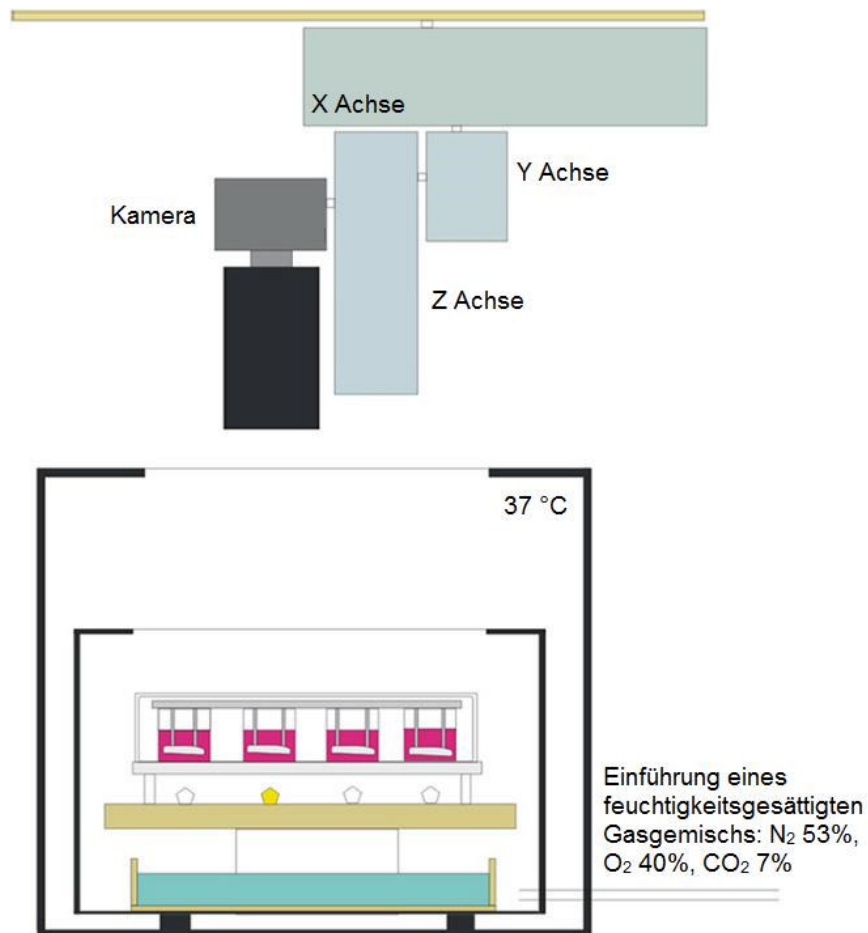


Abbildung 5: Videooptische Messung, schematisch Dargestellung. Dargestellt ist das x-y-z-System mit der Kamera. Darunter befindet sich die Zellkulturschrank-ähnliche Einheit, darin die Zellkulturschale, welche von unten durch LEDs beleuchtet. Die Abbildung ist modifiziert nach Hansen et al. (2010).

Die videooptischen Messungen wurden mit einer eigens hierfür programmierten Software (CTMV, Pforzheim) analysiert. Per Bilderkennung wurden automatisch Messpunkte (angezeigt durch blaue Quadrate) am oberen und unteren Ende der kontrahierenden EHTs gesetzt. Das Programm errechnete aus den Abstandsänderungen der Messpunkte und der elastischen Eigenschaften des Silikonschlauches die Kontraktionskraft. Die Messpunkte wurden in einem Kraft-Zeit-Diagramm festgehalten. Nach jeder vollständigen Messung wurden ferner Durchschnittswerte für die Kraft, Frequenz, Kontraktions- und Relaxationszeit sowie -geschwindigkeit, Ruhelänge, Rhythmizität ausgegeben.

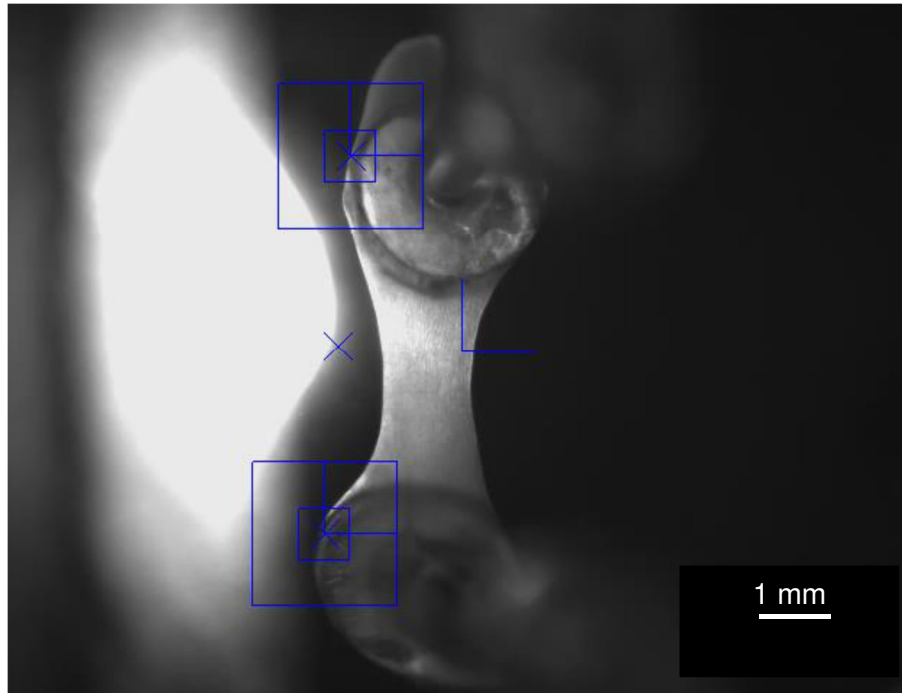


Abbildung 6: Durch die Kamera aufgenommenes Bild zur Kontraktionsanalyse. Gezeigt ist das durch die Kamera aufgenommene Bild eines EHTs in der Aufsicht. Die blauen Quadrate kennzeichnen die Messpunkte, die durch die Software gesetzt wurden. Bei der Kontraktion des EHTs verringerte sich der Abstand der Messpunkte. Aus dieser Längenänderung wurde die Kraftentwicklung berechnet.

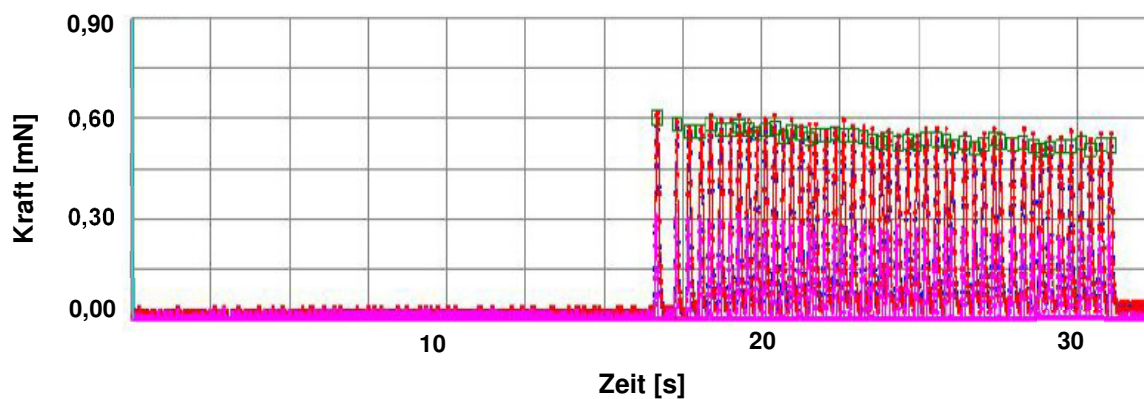


Abbildung 7: Während der Messung aufgezeichnetes Kontraktionsmuster. Die Kraft [mN] ist gegen die Zeit [s] aufgetragen. Das grüne Quadrat zeigt die von der Software erkannte stärkste Kraftentwicklung an, welche in die Kalkulation der durchschnittlichen Kontraktionskraft einbezogen wird.

2.4.5.2 Korrelation der Auslenkung der Silikonschläuche mit der Kraftentwicklung

Die Beziehung zwischen Auslenkung der Silikonschläuche und Kraftentwicklung beschreibt die physikalische Formel in Abbildung 8 (Künne 2001). Diese Formel stellt eine Beziehung

zwischen Kraft (F) und der Auslenkung des Silikonschlauches (δ) her und wurde auch in früheren wissenschaftlichen Arbeiten verwendet (Vandenburg et al. 2008). In dieser Formel fließt der Elastizitätsmodul ein, eine Materialkonstante, die experimentell bestimmt werden musste.

$$F = \frac{3EI\delta}{L^3} \quad , \delta \rightarrow \text{Auslenkung des Silikonschlauches, } mm$$

$$F = \left[\frac{3EI}{L^3} \right] \cdot \delta = k \cdot \delta \quad , L \rightarrow \text{Länge des Silikonschlauches, } mm$$

$$E = \frac{FL^3}{3I\delta} \quad , I \rightarrow \text{Flächenträgheitsmoment mit } I = 0,25\pi(R^4 - r^4), \text{ } mm^4$$

mit R als Außenradius und r als Innenradius des Silikonschlauches

$$, F \rightarrow \text{Kraft, } N$$

$$, E \rightarrow \text{Elastizitätsmodul, } mN/mm^2$$

$$, k \rightarrow \text{Federkonstante, } mN/mm$$

Abbildung 8: Die Vandenburg'sche Formel.

Der Versuchsaufbau zur Bestimmung des Proportionalitätsfaktors zwischen Kraft und Auslenkung oder zur Bestimmung des Elastizitätsmoduls bestand aus der vertikalen Fixierung der Silikonhalterung in eine Plexiglassklemme. Diese Klemme war durch eine oben angebrachte Gewindeschraube in der Höhe justierbar. Am unteren Ende befand sich ein Eisenstift, der in Kontakt zu einer Feinmessuhr (Genauigkeit 0,01 mm) stand, sodass sensible Höhenänderungen der Klemme gemessen werden konnten. Ein Zeiger eines waagrecht aufgestellten Metallzeigers, der nicht in der Höhe verstellbar war, fixierte das Zentrum eines Silikonschlauches. Durch das Anbringen unterschiedlicher Gewichte an den Silikonschlauch wurde das Zentrum nach unten verschoben. Die Gewindeschraube erlaubte schließlich die ursprüngliche Übereinstimmung zwischen Zeiger und Zentrum wieder herzustellen. Aus der abgelesenen Auslenkung (δ) und des angebrachten Gewichts, umgerechnet in Kraft ($F = m \cdot g$), konnte nun ein Auslenkung-Kraft-Diagramm für die Silikonschläuche erstellt und der Elastizitätsmodul berechnet werden. Aus dem Kehrwert der Steigungen wurde schließlich auch der Widerstandsfaktor k bestimmt. Durch Bildung des Quotienten aus den k -Werten vom Silikonschlauch und dem Silikonstab $\left(\frac{k_{\text{Silikonschlauch}}}{k_{\text{Silikonstab}}} \right)$ wurde es möglich, aus der videoptisch ermittelten Kraft (vgl. 2.4.5.1) die Auslenkung mathematisch zu bestimmen. Dieses war nötig gewesen, da die videoptische Messung mit den Basisdaten der Silikonstäbe kalibriert worden war.

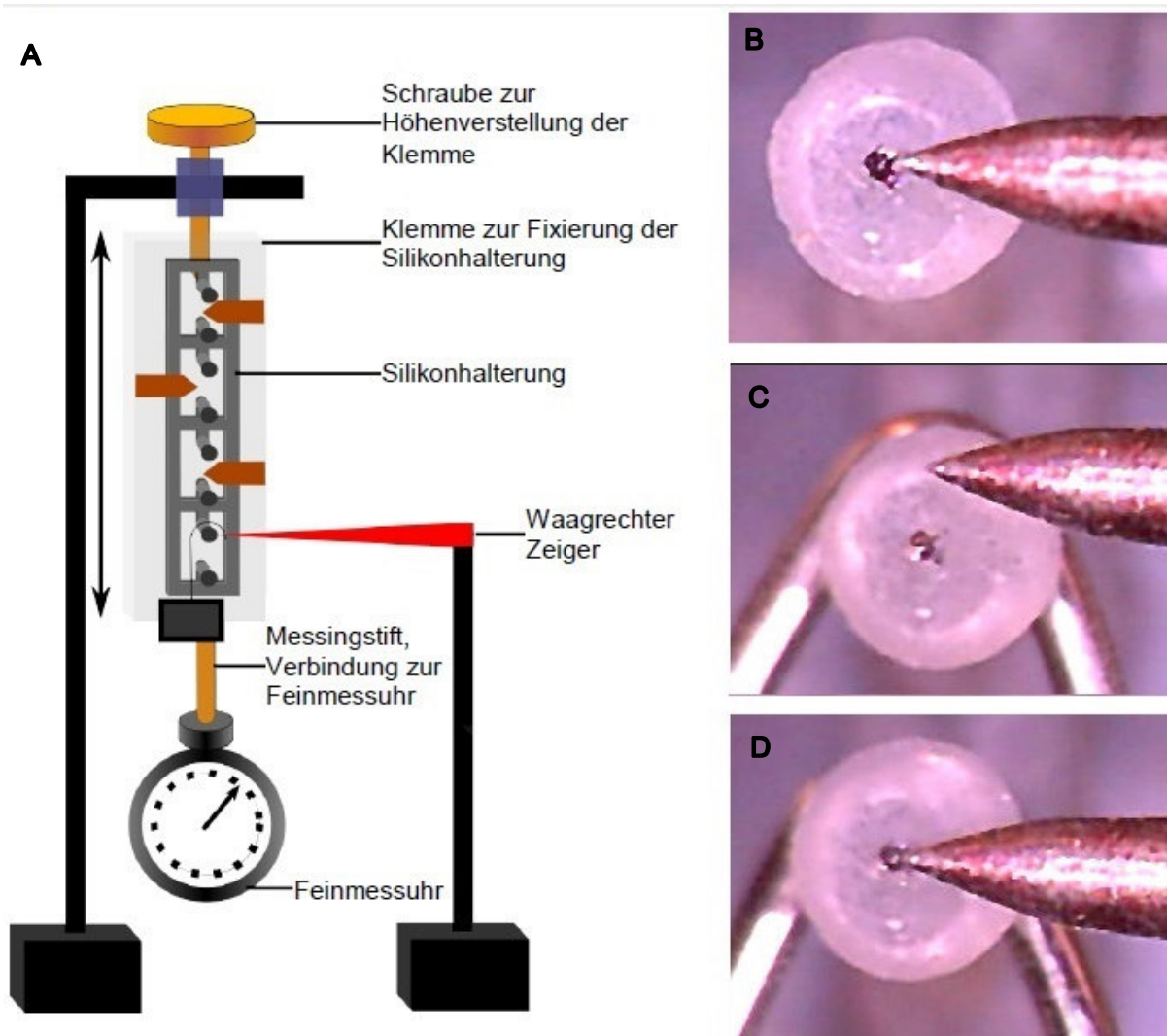


Abbildung 9: Messung der Auslenkung der Silikonschläuche. A: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus B: Silikonschlauch vor Beginn der Messung, zentriert auf den Messzeiger; C: Angehängtes Gewicht biegt den Schlauch, sodass sich das Zentrum nach unten verlagert; D: Erneute Adjustierung der Klemme mit der Zentrierung des Silikonschlauches auf den Zeiger. A: Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Nils Sörensen.

2.5 Statistische Auswertung

Die Daten werden präsentiert als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*; SEM). Mit n wurde die Anzahl der EHTs bzw. Einzelversuche/-proben bezeichnet. Statistische Testungen wurden per *Students t-Test* für ungepaarte Messungen oder bei mehr als zwei Versuchsgruppen per *One-Way-ANOVA* durchgeführt. Letzterem schlossen sich *Post-hoc-Tests* an, bei Vergleichen ausschließlich zur Kontrollgruppe der *Dunnett's-Multiple-Comparison-Test*, bei Vergleichen zu allen Gruppen der *Newman-Keuls-Multiple-Comparison-Test*. Wurden Versuchsgruppen über einen längeren Zeitraum beobachtet, erfolgte die Anwendung eines *Two-Way-ANOVA* mit

anschließendem *Bonferroni Post-hoc-Test*. Die Analysen wurden mit der GraphPad Prism 5 Software durchgeführt. P-Werte kleiner 0,05 wurden als signifikant bewertet. In den Abbildungen wird das Signifikanzniveau in Form von Sternchen angezeigt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Alle nicht mit Sternchen bezeichneten Vergleiche sind als nicht signifikant anzusehen.

3 Ergebnisse

3.1 Korrelation von Auslenkung der Silikonhalterung mit der Kraft

Eine wichtige Determinante, die es zu bestimmen galt, war der Proportionalitätsfaktor k , der den Widerstand der Schläuche bzw. Schlauch-Metallbügel-Einheit beschreibt. Je tiefer der Bügel in die Silikonhalterung hineinragte, desto höher war der Widerstand (d.h. die Nachlast), gegen den das EHT schlagen musste. Aus der im 2.4.5.2 Unterkapitel genannten Beziehung und den durchgeführten Messungen wurde ein Diagramm erstellt (Abbildung 10)¹. Aus den Kehrwerten der Steigungen ließen sich nun die Proportionalitätsfaktoren (k -Werte) ermitteln. Zudem zeigt Abb. 10 eine lineare Beziehung von Auslenkung und Kraft der einzelnen Silikonschläuche (in dem Kraftbereich, in dem EHTs schlagen). Zwar war die lineare Beziehung in der Formel theoretisch klar und offensichtlich, die praktische Überprüfung mittels Versuch aber von enormer Bedeutung.

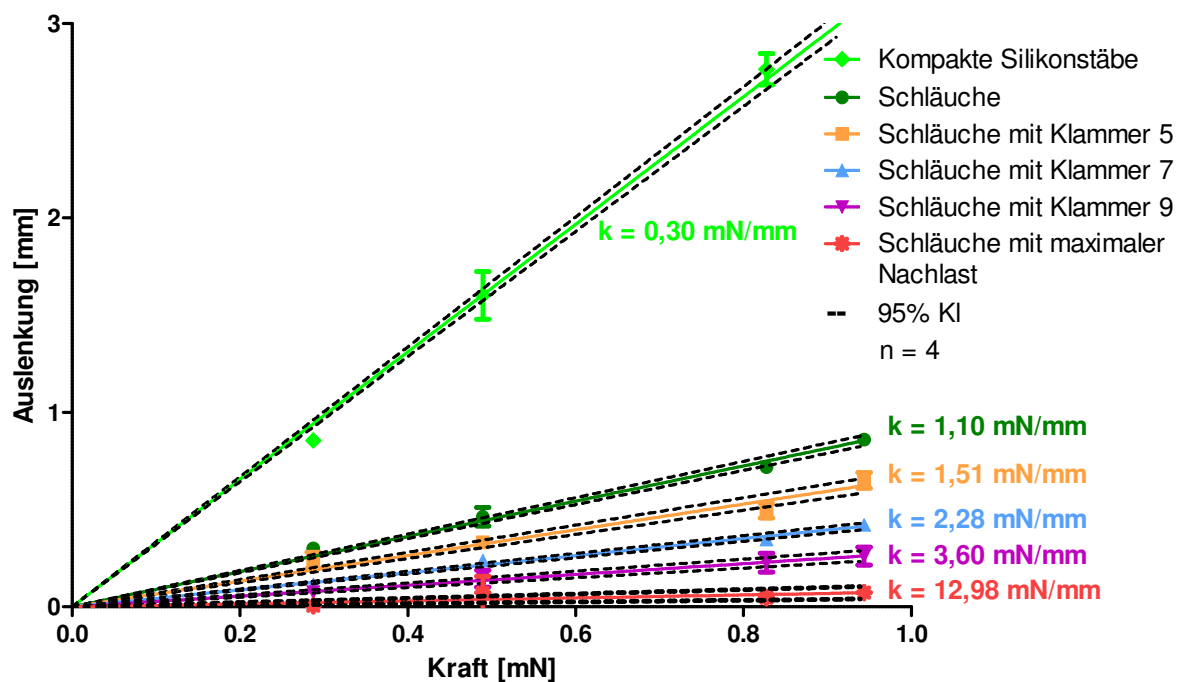


Abbildung 10: Korrelation der Auslenkung der Silikonhalterung mit der Kraft. Gezeigt wird die Auslenkung der Silikonhalterung (kompakte Silikonstäbe und Schläuche mit bzw. ohne Metallbügel) in Abhängigkeit einer angelegten Kraft. Anhand der Messwerte (Symbole) wurde für jede Gruppe eine Regressionsgerade ermittelt (durchgezogene Linie) und mit einem 95%igen Konfidenzintervall umrahmt (gestrichelte Linie). Aus dem Kehrwert der Steigung konnte die Federkonstante ermittelt werden, welche die Härte der einzelnen Gruppen widerspiegelt.

Mit Hilfe der verschiedenen langen Klammern war es nun möglich, den Härtegrad des unteren Endes der Schläuche und somit die Nachlast der EHTs zu vergrößern. Somit war

¹ Zudem wurde das Elastizitätsmodul mit 3,2 MPa bestimmt.

beispielweise das Ende des Schlauches mit der eingeführten Klammer 5 etwa 1,4fach, der mit Klammer 7 etwa 2fach weniger biegsam als der Kontrollschlauch. Die Rückrechnung der Auslenkung aus der ermittelten Kraft der videooptischen Messung erfolgte mit dem Faktor 3,43 mm/mN (Daten beruhen auf früheren institutseigenen Berechnungen).

3.1.1 Kontraktilität und Auslenkung der EHTs unter diesen Bedingungen

Die Intervention erfolgte ab Tag 14, erstreckte sich über 7 Tage und wurde vollständig unter serumfreien Bedingungen durchgeführt. Dabei wurde kurz vor der Intervention eine Messung für die einheitliche Gruppeneinteilung, zusätzlich Zwischenmessungen sowie eine finale Messung kurz nach der Entklammerung durchgeführt. Zwischenmessungen der maximal nachlasterhöhten EHTs (Klammer bis ins Ende geschoben) waren nicht möglich, da der Widerstand durch die Versteifung so hoch war, dass keine sichtbaren Auslenkungen der Post-Enden zu registrieren waren. Diese werden deswegen nicht weiter beschrieben.

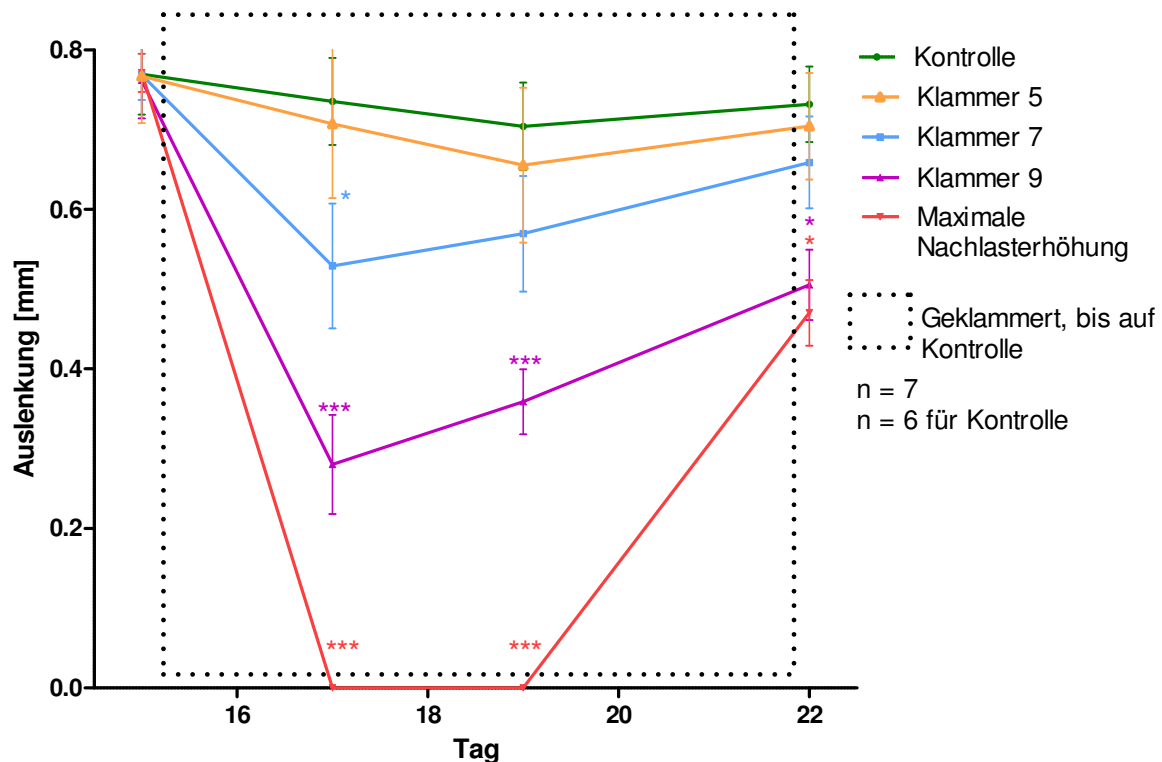


Abbildung 11: Auswirkung der Federkonsten auf die Auslenkung. Federkonstante der Interventionsgruppen: 1,1 – 12,98 mN/mm Gezeigt ist der zeitliche Verlauf der Auslenkung der nachlastverstärkten Gruppen und der Kontrolle, die nicht geklammert wurde. Die Gruppen mit der höchsten Federkonstante (Klammer 9 mit 3,6 mN/mm und AN mit 12,98 mN/mm) zeigten in der Phase der Intervention einen deutlichen Verlust in der Auslenkung, der sich auch nach der Phase signifikant feststellen ließ. Von den beiden anderen geklammerten Gruppen, zeigte nur Klammer 7 kurzzeitig ein signifikante Einschränkung in der Auslenkung. Nach der Intervention gab es zwischen den letzten genannten Gruppen keinen Unterschied zur Kontrollgruppe. Two-Way-ANOVA mit Bonferroni Nachtest, Interventionsgruppen vs. Kontrolle.

Unter Ausgangsbedingungen lag die mittlere Post-Auslenkung in allen Gruppen bei 0,77 mm. Wie in Abbildung 1111 ersichtlich, reduzierte sich die Auslenkung mit steigender Eindringtiefe der Klammer. Die höchste Reduktion war in der Gruppe mit der Klammer 9 ($k = 3,6 \text{ mN/mm}$) und in der Gruppe der maximal nachlasterhöhten EHTs zu beobachten. Dabei fiel die Auslenkung der Gruppen 9 um mehr als 50% auf 0,28 mm am Tag 17 bzw. auf 0,36 mm am Tag 19. Die Auslenkung der Gruppe mit der Klammer 7 verminderte sich um knapp 30%, die der Klammer 5 um maximal 15%. Nach der Intervention lagen die Werte der Klammer 5 und 7 etwa auf dem Niveau der Kontrolle (0,73 mm), die Werte der anderen beiden Gruppen erreichten 70% im Vergleich zur Kontrolle.

Aus den ermittelten Federkonstanten, die in Abb. 10 dargestellt sind, und der Formel aus Abb. 8 konnte aus den Auslenkungen eine Kraft ($F = k \cdot \delta$) ermittelt werden. Aus dem oben beschriebenen Grund konnte für die maximal nachlastverstärkte Gruppe keine Kraft ermittelt werden.

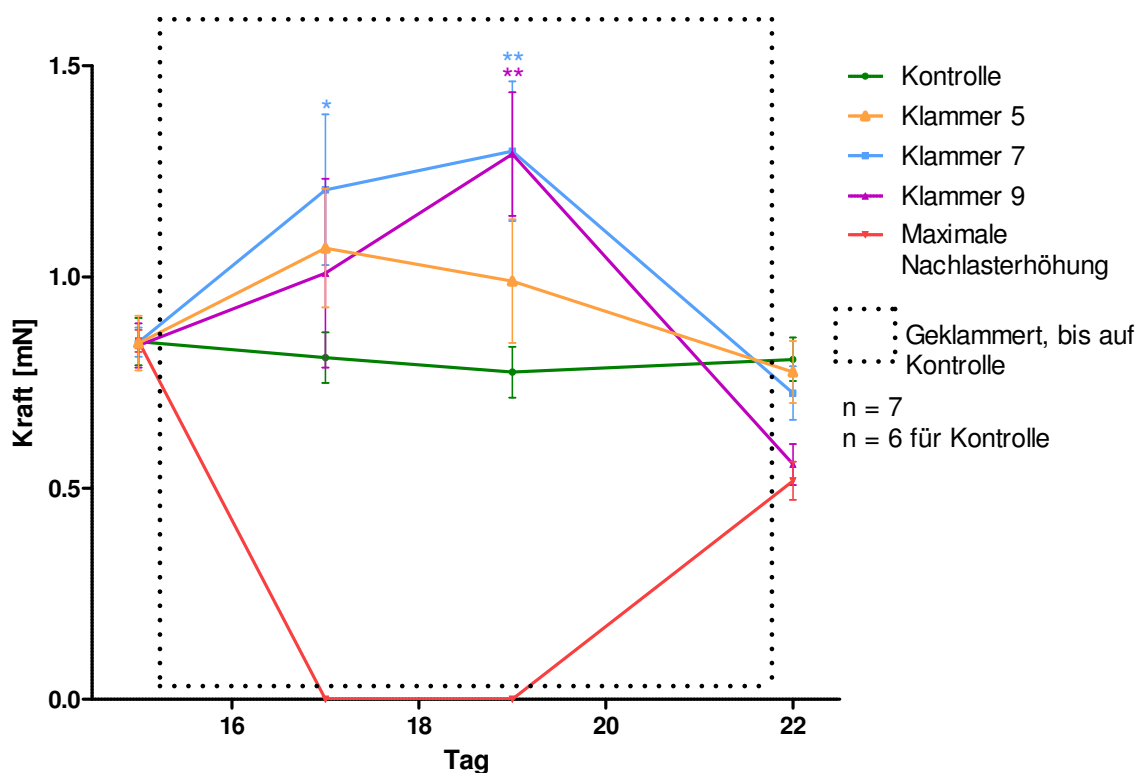


Abbildung 12: Kraftverlauf während und nach Beendigung der Intervention. Federkonstante der Interventionsgruppe: 1.1 – 12,98 mN/mm. Die mit Hilfe der k-Werte berechnete Kraft zeigt bei den Gruppen Klammer 7 und 9 während der Interventionsphase signifikante Unterschiede im Vergleich zu der Kontrolle. Two-Way-ANOVA mit Bonferroni Nachtest, Interventionsgruppen vs. Kontrolle

Abbildung 12 zeigt, dass die nachlastverstärkt kultivierten EHTs während der Intervention alle im Mittel höhere Kräfte generierten als die Kontrollen. Auffällig war aber auch, dass diese erhöhten Kräfte nach der Entklammerung nicht mehr sichtbar waren. Bei den maximal

nachlastverstärkten und den mit Klammer 9 kultivierten EHTs zeigte sich sogar eine verringerte Kraft (= geringere Verkürzung der EHTs an den weichen Silikonposts). Abbildung 13 führt zusammenfassend alle finalen Messungen der Versuchsreihen zusammen. Der Vollständigkeit halber wird die finale Messung aus der ersten Versuchsreihe mitaufgeführt.

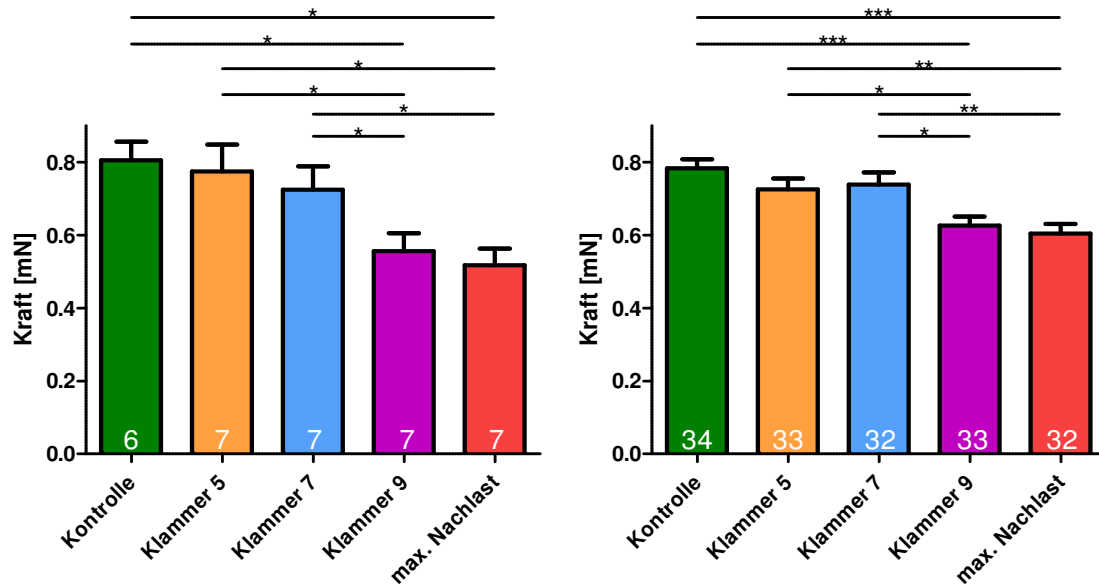


Abbildung 13: Finale Kraft der ersten Versuchsreihe und alle Versuchsreihen zusammengefasst. Im Säulendiagramm sind die Endergebnisse der ersten Versuchsreihe (links) bzw. aller Versuchsreihen (rechts) zusammengefasst. Beide Graphen zeigen tendenziell eine stufenweise Abnahme der Kraft nach 7 Tagen Intervention, wobei sich die Gruppen Kontrolle, Klammer 5 und 7 nicht signifikant voneinander unterscheiden. Erst ab einer Intervention mit höherer Nachlast war eine Abschwächung der Kraft feststellbar. Sowohl Klammer 9 als auch die maximal nachlastverstärkte (max. Nachlast) Gruppe zeigten zwar signifikante Unterschiede im Vergleich zu den restlichen Gruppen, aber keine untereinander.

Abbildung 13 beschreibt einen stufenweisen Abstieg der Kräfte nach der Intervention. Es gab insgesamt drei Wiederholungen unter denselben Bedingungen. Die Endwerte sind in Abb. 13 im rechten Diagramm zusammengefasst. Wie aus Voruntersuchungen bekannt, war ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und der maximal nachlastverstärkten Gruppe zu beobachten, der hier bei 23% lag. Ebenfalls stark ging die Kraft der Gruppe Klammer 9 zurück (20%). Die restlichen Gruppen unterschieden sich in der Auslenkung und damit der errechneten Kraft nicht von der Kontrolle.

Zusammenfassend ließ sich aus den Resultaten trotz der während der Klammerperiode errechneten Zunahme der Kräfte in den wenig und mittelstark geklammerten EHTs (siehe Abb.12) in der finalen Messung in keiner Gruppe eine Kraftzunahme ablesen. Es zeigte sich durchgehend eine Verminderung in der Kraft mit der Eindringtiefe der Klammer in den hohlen Schlauch. Dies könnte darauf hinweisen, dass der hohle Schlauch in der Kontrollgruppe gerade optimal in seiner Nachlast war und daher jede weitere Versteifung zu einer

Verschlechterung (pathologischen Hypertrophie) führte. Daher wurde eine weitere Serie angesetzt, in der die Ausgangsbedingung deutlich weniger steif sein sollte als die bisherige Kontrolle.

3.2 Korrelation von Auslenkung der neuen Silikonhalterung mit der Kraft

Vorversuche zeigten, dass EHTs, die dauerhaft Widerstände mit $k = 1,1 \text{ mN/mm}$ überwinden müssen, eine stärkere Kraft als EHTs generieren, die geringere Widerstände ($k = 0,3 \text{ mN/mm}$) überwinden müssen (siehe Kapitel 1.3). In 3.1 wurde der Bereich jenseits von $k = 1,1 \text{ mN/mm}$ untersucht. Die Aufgabe bestand daher darin, einen neuen Schlauch zu finden, der deutlich elastischer als der bisherige hohle Kontrollschlauch und möglichst ähnlich dem vollen Standard-Silikonpost ist. Die physikalische Formel (s. 2.4.6.2, Abb. 8) zeigt, dass ein neuer Schlauch mit einem niedrigen Außenradius das Flächenträgheitsmoment (I) und somit den Proportionalitätsfaktor k erniedrigt. Gewählt wurde ein Schlauch, mit dem gleichen Außenradius, wie die kompakten Silikonstäbchen (0,5 mm). Der Innenradius betrug 0,25 mm. Da dieser in der Formel in der vierten Potenz eingeht, spielt er eine zu vernachlässigende Rolle. Setzt man die gegebenen Werte in die Formel des Flächenträgheitsmoments ein, ergibt sich ein Wert von $0,0491 \text{ mm}^4$ für den kompakten Silikonstab und $0,0460 \text{ mm}^4$ für den neuen Schlauch. Das Flächenträgheitsmoment sinkt somit um $0,003 \text{ mm}^4$ bzw. 6%.

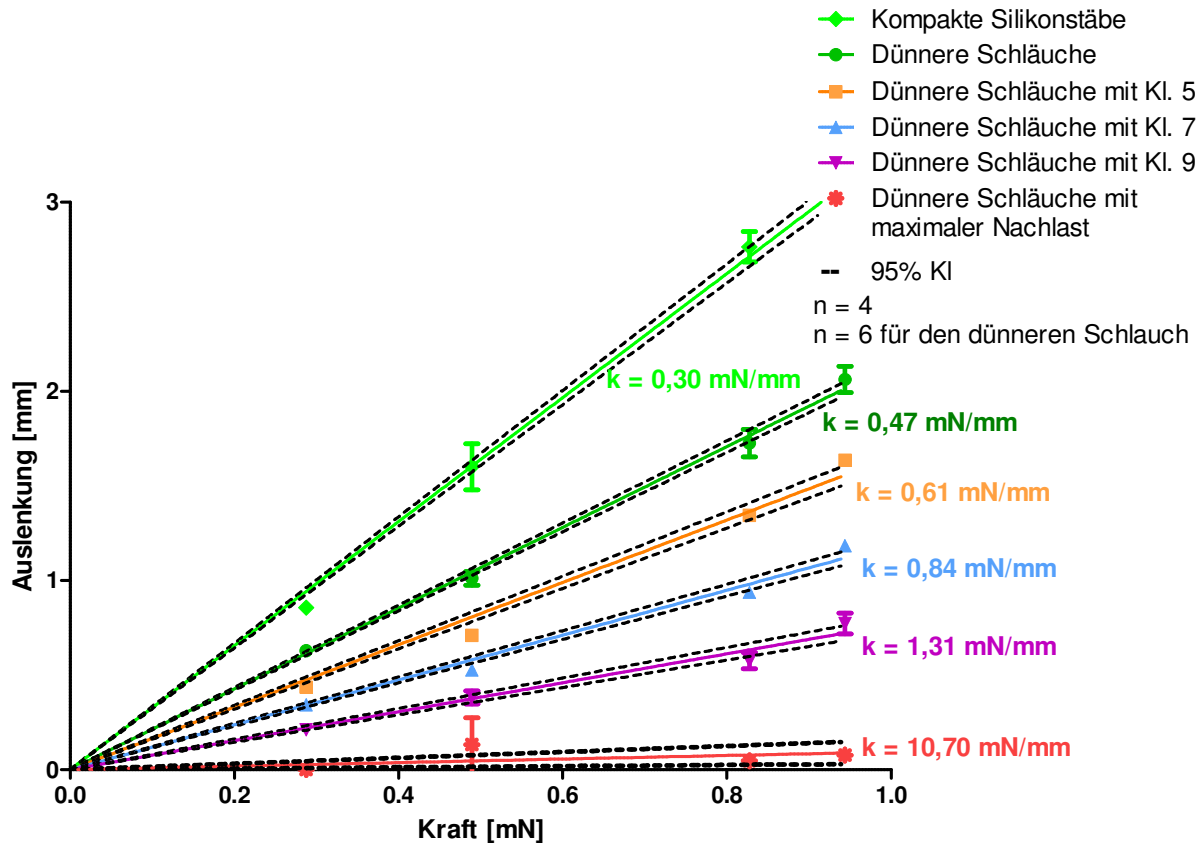


Abbildung 14: Korrelation der Auslenkung der Silikonhalterung mit der Kraft. Gezeigt wird die Auslenkung der Silikonhalterung (kompakte Silikonstäbe und dünnere Schläuche mit bzw. ohne Metallbügel) in Abhängigkeit einer angelegten Kraft. Anhand der Messwerte (Symbole) wurde für jede Gruppe eine Regressionsgerade ermittelt (durchgezogene Linie) und mit ihrem 95%igen Konfidenzintervall abgebildet (gestrichelte Linie). Aus dem Kehrwert der Steigung konnte die Federkonstante ermittelt werden, welche die Härte der einzelnen Gruppen widerspiegelt.

Zwar waren die k -Werte des neuen Schlauchs (folgend als dünnerer Schlauch bezeichnet) und des soliden Stabs nicht exakt gleich (Abb. 14), welches wahrscheinlich in dem nicht gleichen Material zu begründen ist², dennoch konnte nun mit dem dünneren Schlauch das Spektrum der Nachlasterhöhung in Richtung des soliden Stabes erweitert werden. Da der dickere Schlauch einen k -Wert von 1,1 mN/mm aufwies, befanden sich die Interventionen mit der Klammer 9 und die maximale Versteifung des Schlauches außerhalb des Spektrums. Auch stellte die Maximal-Nachlast-Gruppe mit ihrem hohen k -Wert (10,70 mN/mm) wieder eine Positivkontrolle da, die eine pathologische Hypertrophie erwarten ließ.

² Da der dickere und dünner Schlauch vom gleichen Lieferanten stammt, ist es wahrscheinlich, dass jene den gleichen E-Modul von 3,2 MPa aufweisen. Durch die Beziehung der k -Werte lässt sich der Elastizitätsmodul des kompakten Silikonstabs ausrechnen. $k_{\text{dünner Schlauch}} = k_{\text{Stab}} \cdot x$ mit $k = \frac{3 \cdot E \cdot I}{L^3} \rightarrow x = 0,6 = \frac{E_{\text{Stab}} \cdot I_{\text{Stab}}}{E_{\text{dünner Schlauch}} \cdot I_{\text{dünner Schlauch}}} \rightarrow E_{\text{Stab}} = 1,9 \text{ MPa}$ Dieser Wert passte gut zu dem in der videooptischen Messung implementierten Wert (1,7 MPa).

3.2.1 Kontraktilität und Auslenkung unter den Bedingungen

Es wurden insgesamt zwei Durchläufe unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Da in diesem Versuch keine Zwischenmessungen gemacht wurden, setzten sich die Ergebnisse dieser Versuchsreihe ausschließlich aus den Endwerten zusammen.

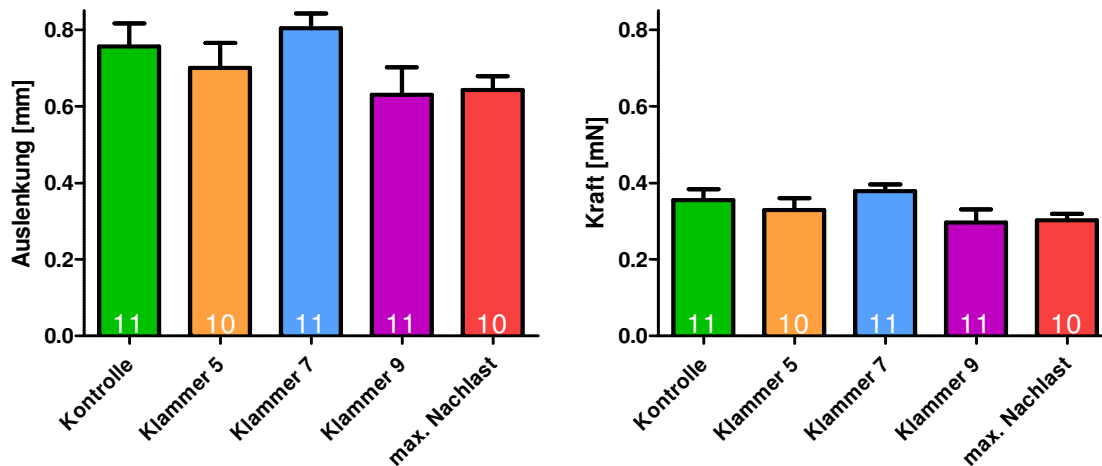


Abbildung 15 Auslenkung und Kraft nach der Intervention der dünneren Schläuche. Aufgetragen sind die Auslenkung und die mit Hilfe der k-Werte ermittelte Kraft. Die Gruppen unterschieden sich nicht voneinander.

Abbildung 15 zeigt die Auslenkung der EHTs an den dünneren Silikonschläuchen (links) mit der dazu errechneten Kraft (rechts). Aufgrund der geringeren Federkonstante des dünneren Schlauches ($k = 0,47 \text{ mN/mm}$) war die resultierende Kraft etwa halb so stark wie die der dickeren Schläuche ($k = 1,1 \text{ mN/mm}$). Die Verteilung der Gruppe in der Abbildung zeigte keinen eindeutigen Trend. Auffallend war zudem, dass zwischen der Kontrollgruppe und den maximal nachlastverstärkten EHTs kein signifikanter Unterschied gemessen wurde.

3.2.2 Kontraktilität und Auslenkung unter kontinuierlicher Intervention

Bei allen bisherigen Versuchen wurde die Intervention ab Tag 14 unternommen. Es war daher möglich, dass die erwarteten Unterschiede zwischen dünnen und stabileren Silikonschläuchen deshalb ausblieben, weil dieser Vergleich vor allem dann gesehen worden war, wenn man die Kultur der EHTs von vornherein an den verschiedenen Schläuchen (früher voll [Hansen et al. 2010] gegen hohl [Hirt et al. 2012]) durchführt. Daher wurde eine letzte Serie durchgeführt, in der EHTs von Beginn an auf den dünnen Schläuchen mit und ohne Klammerung kultiviert wurden. Wie bei vorherigen Serien wurde nach Erreichen einer stabilen Kontraktion der EHTs wieder auf das Pferdeserum komplett verzichtet, sodass für 7 Tage eine serumfreie Bedingung herrschte.

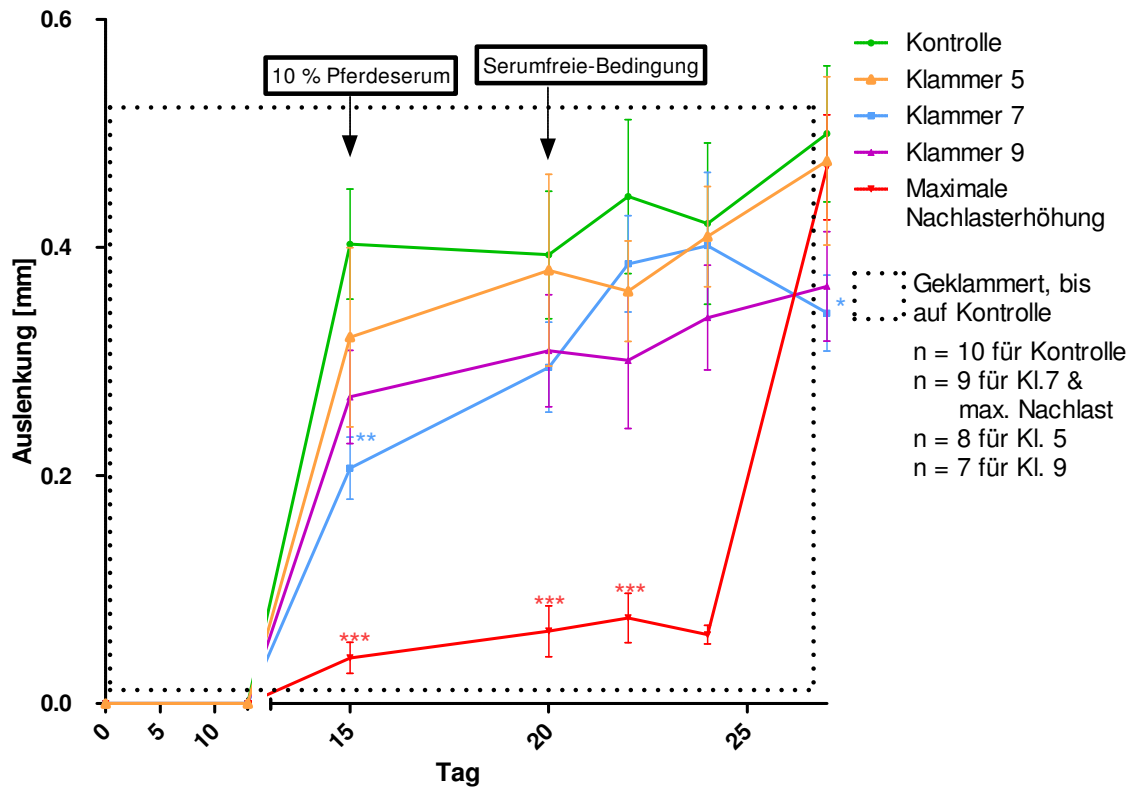


Abbildung 16: Entwicklung der Auslenkung bei der kontinuierlichen Intervention und kurz nach der Intervention. Bei dieser Versuchsreihe begann die Intervention sofort. Die Gruppe Klammer 7 zeigte zu Beginn eine geringere Auslenkung, die mit den Tagen zwar nicht mehr feststellbar war, dafür aber am Tag der Entklammerung. Two-Way-ANOVA mit Bonferroni Nachtest, Interventionsgruppen vs. Kontrolle

Abbildung 16 zeigt, dass die Auslenkung der geklammerten EHTs geringer war als die der Kontrollen. Auffällig war der starke Anstieg der Gruppe Klammer 7 sowie der plötzliche Abstieg am Tag der Entklammerung (Tag 27).

Da auch hier aus der Auslenkung die generierte Kraft der EHTs an den Schläuchen ermittelt werden konnte, wurde ein Kraft-Zeit-Diagramm erstellt.

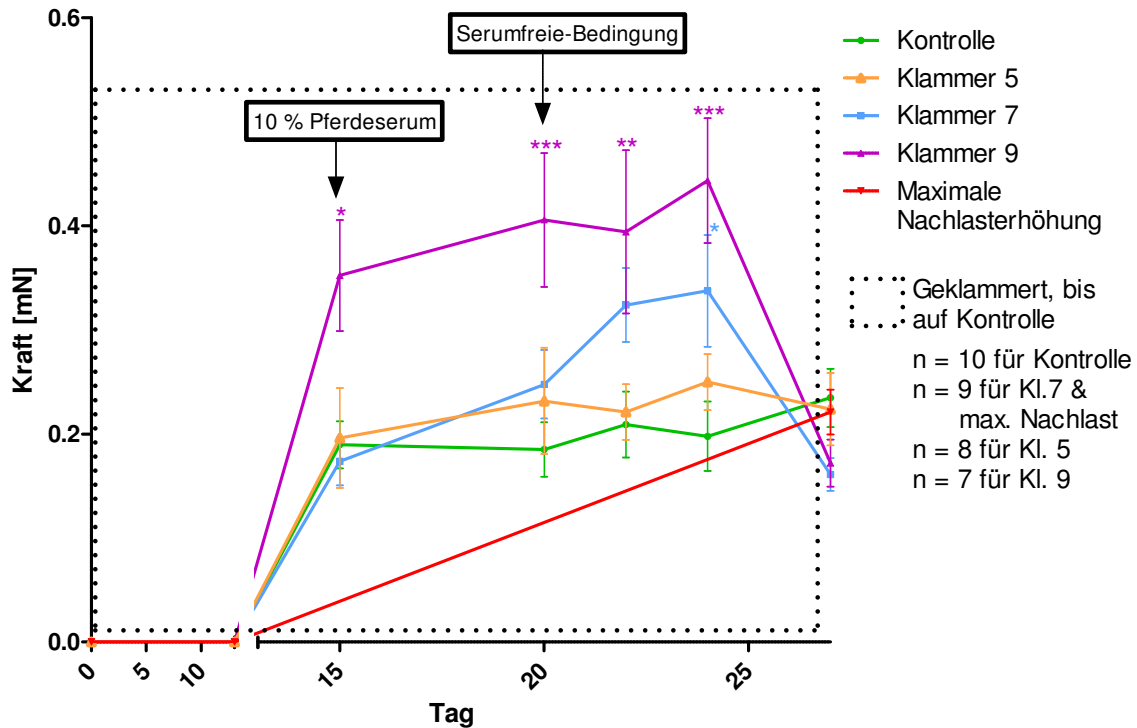


Abbildung 17: Entwicklung der Kraft bei der kontinuierlichen Intervention und kurz nach der Intervention.

Sowohl die Klammer 7-Gruppe als auch die Klammer 9-Gruppe zeigen im Verlauf eine erhöhte Kraft im Vergleich zur Kontrollgruppe. Kurz nach der Intervention fiel dieser auf das Niveau der Kontrolle. Two-Way-ANOVA mit Bonferroni Nachtest, Interventionsgruppe vs. Kontrolle

Die ermittelte Kraft aller Gruppen (Abb. 17) zeigte, dass die geklammerten EHTs in der Interventionszeit (tendenziell Klammer 5-Gruppe) oder statistisch signifikant (Klammer 7- und Klammer 9-Gruppe) mehr Kraft entwickelten als die Kontrollgruppe. Auffällig ist weiterhin, dass die nach Entklammerung ermittelte Kraft in allen Gruppen auf denselben Wert fiel.

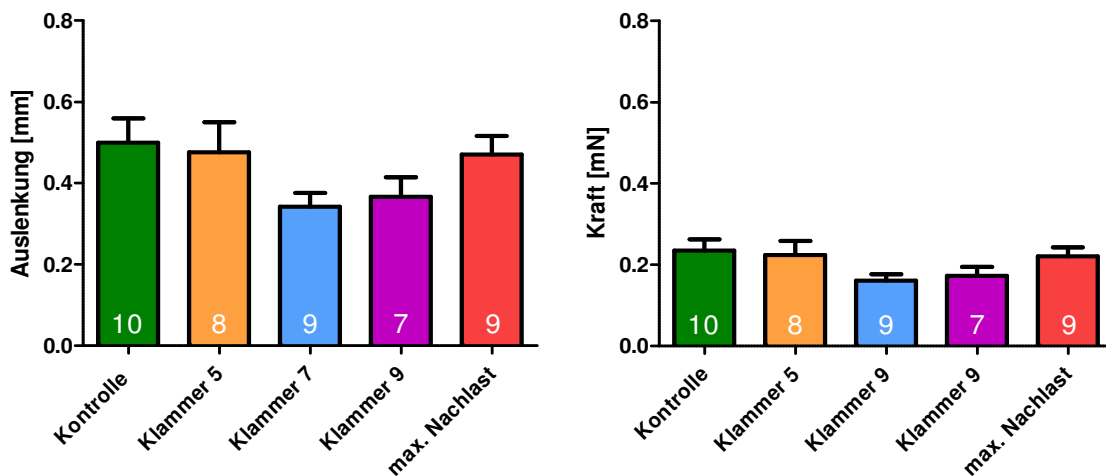


Abbildung 18: Finale Auslenkung und Kraft der kontinuierlichen Intervention. Gezeigt ist die Auslenkung (links) und die Kraft (rechts) eine Stunde nach der 27tägigen Intervention. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

3.3 Zusammenführende Ergebnisse

Die Ergebnisse lassen sich zusammenfassen, indem man alle Ergebnisse in einem Diagramm mit der Federkonstante als Abszisse und der Kraft als Ordinate skizziert.

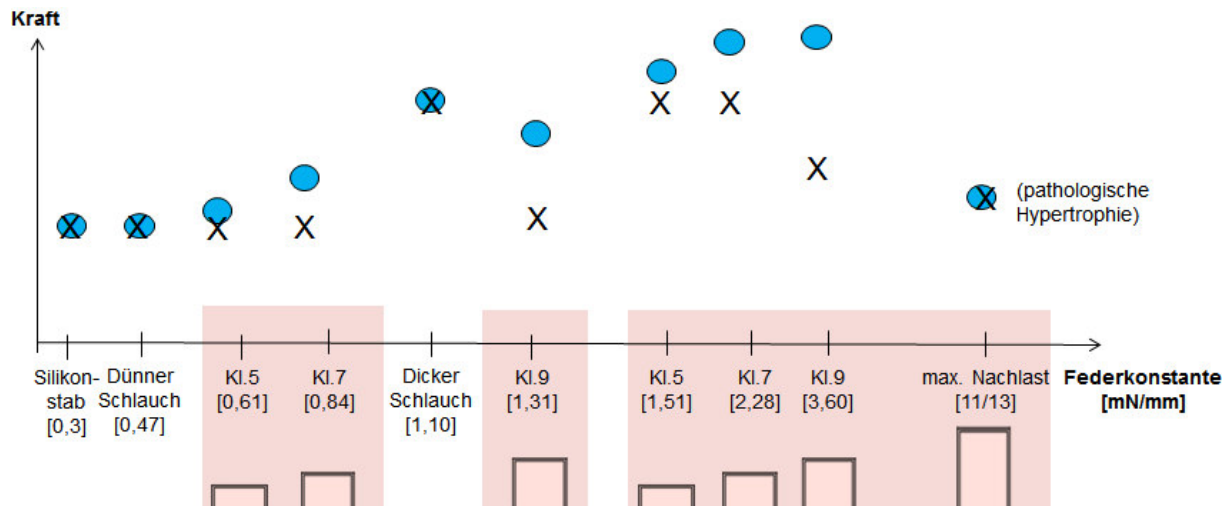


Abbildung 19: Schematische Darstellung aller Ergebnisse. Gezeigt ist das Spektrum der Federkonstanten auf der Abszisse. Dabei hatte der von Hansen et al. 2010 verwendete kompakte Silikonstab den niedrigsten k-Wert. Mit Hilfe zweier unterschiedlich dicker Silikonschläuche und den unterschiedlich langen Metallbügeln (rosa hinterlegt) konnte ein großes Spektrum an Federkonstanten abgedeckt werden. Die aus allen Versuchsserien ermittelten Kräfte nach Entklammerung sind mit dem Symbol x auf der Ordinate aufgetragen. Zusätzlich sind die Kräfte, die am letzten Messzeitpunkt während der Intervention ermittelt wurden, mit dem blau hinterlegten Kreis gekennzeichnet. Das ange deutete Plateau bei k-Werten zwischen 1,1 und 2,28 (bzw. 1,1 und 3,6 für die Kräfte während der Intervention) scheint den Bereich der physiologischen Hypertrophie darzustellen.

Abbildung 19 zeigt, dass beim dickeren Schlauch (Außenradius 0,65 mm) ohne und mit den eingeführten Klammern 5 und 7 ein Plateau in der Kraft festgestellt wurde. Das Einführen längerer Metallbügel führte zu Verringerung der Kraft. Der dünnere Schlauch ($k = 0,47$ mN/mm) zeigte von vornherein eine niedrige Kraft. Das Einführen derselben Klammern konnte zwar zwischenzeitlich eine Kraftzunahme hervorrufen (siehe Abb. 12 und 17, sowie Symbol „blau hinterlegter Kreis“ in Abbildung 19), ging aber nach der Intervention auf das Niveau der Kontrolle zurück. Auffallend ist zudem die niedrige Kraft bei dem k-Wert von 1,31 mN/mm. Normalerweise würde man hier eine Glockenkurve erwarten, das heißt bei niedriger Federkonstante eine geringe Kraft, die mit steigender Federkonstante steigt, ein Plateau erreicht und dann bei zu starker Nachlast wieder absinkt. Eine linksschiefe (negativ schiefe) Verteilung wurde jedoch bei den Kräften während der Intervention (Symbol „blau hinterlegter Kreis“) beobachtet.

4 Diskussion

4.1 Der Grundgedanke

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, den Kontraktionswiderstand künstlicher Herzmuskelgewebe systematisch zu variieren und damit einen Bereich zu identifizieren, bei der erwartete Trainingseffekte durch mäßige Nachlasterhöhung („physiologische Hypertrophie“) in einen krankhaften Zustand übergehen („pathologische Hypertrophie“). Im Einzelnen wurde also untersucht, ob es einen Nachlastbereich gibt, der als eine Art Trainingseffekt interpretiert werden kann und ob man einen Bereich definieren kann, ab dem eine weitere Erhöhung mit einer Schädigung des Herzmuskelgewebes einhergeht. Ein erhöhter Kontraktionswiderstand geht mit einer Erhöhung der Nachlast einher, gleichbedeutend mit einer Mehrbeanspruchung des Herzmuskels während der Systole, und ruft eine Hypertrophie des Myokards hervor. Analoge Effekte sind in tierischen und menschlichen Herzen bei Ausdauertraining (Scheuer 1973; Dickhuth et al. 2001) als auch bei einer Hypertonie und Aortenstenose (Lorell und Carabello, 2000) zu sehen.

4.2 Physikalische Grundlagen

Ermittelt man die Federkonstanten des kompakten Silikonstabs (Außenradius 0,5 mm) und des dickeren Silikonschlauchs (Außenradius 0,65 mm; Innenradius 0,25 mm), so erhält man einen k-Wert von 0,3 bzw. 1,1 mN/mm. Wird nun die physikalische Formel $F = \left[\frac{3EI}{L^3} \right] \cdot \delta$, mit $I = 0,25\pi(R^4 - r^4)$ betrachtet, so ist ersichtlich, dass dabei in erster Linie das Flächenträgheitsmoment I und folglich auch die Federkonstante k erhöht wurde. Da das Material des kompakten Silikonstabs und des Schlauches nicht identisch waren, wurde in zweiter Linie auch der Elastizitätsmodul von 1,7 MPa (kompakter Silikonstab) auf 3,2 MPa (dicker Silikonschlauch) erhöht. Mit dem Einführen der Metallklammern wurde zusätzlich die Länge des frei beweglichen Anteils des Silikonschlauches L so erniedrigt, dass im Extremfall der k-Wert auf bis zu 13 mN/mm erhöht wurde.

Im ersten Teil des Versuchs wurde mit Hilfe der unterschiedlich langen Metallbügel die Federkonstante stufenweise von 1,1 auf 13 mN/mm erhöht. Damit wurde der Zwischenbereich analysierbar, was bisher in diesem System nicht möglich gewesen war. Im zweiten Teil des Versuches wurde ein dünnerer Schlauch jedoch aus gleichem Material verwendet. Die Reduzierung des Außendurchmessers ging mit der Erniedrigung des Flächenträgheitsmoment einher, so dass eine deutlich niedrigere Federkonstante ($k = 0,47$ mN/mm) und damit niedrigere Nachlast realisiert wurde. Mit der Verwendung der gleichen Metallbügel wie aus der ersten Serie konnte nun von diesem neuen Ausgangspunkt die

Federkonstante stufenweise von 0,47 auf 1,31 mN/mm erhöht werden. Zusammenfassend konnte mit der Manipulation der Länge und des Flächenträgheitsmoments ein Nachlastbereich geschaffen werden, der vorher im EHT-System unerforscht war

4.3 *Fractional Shortening*

Der Herzmuskel stellt eine Sonderform unter den Muskeln dar und weist Eigenschaften der glatten als auch der quergestreiften Muskulatur auf. Hier soll speziell auf die Analogie zur Skelettmuskulatur eingegangen werden. Das Arbeitsmyokard weist eine mikroskopisch sichtbare Querstreifung auf. Diese Querstreifung wird durch die kleinste funktionelle Einheit der Myofibrillen/Kardiomyozyten hervorgerufen, den Sarkomeren. Das Sarkomer ist seinerseits aus Myofilamenten zusammengesetzt, die wiederum aus dünnen und dicken Filamenten bestehen. Die dünnen Filamente bestehen aus zwei Proteinsträngen Aktin und Tropomyosin, die umeinander gewickelt sind. Die dicken Filamente bestehen aus Myosin. Die Aktinfilamente sind in Zwischenscheiben (Z-Scheiben) verankert und erstrecken sich in Richtung des Sarkomers. Zwischen den Aktinfilamenten liegen die dicken Myosinketten. Im Ruhezustand besteht keine vollkommene Überlappung beider Ketten, sodass histologisch zwei Banden beobachtet werden können. Die helle isotrope Bande (I-Bande) befindet sich am Randgebiet des Sarkomers und repräsentiert ausschließlich die dünne Kette. Die dunkle anisotrope Bande (A-Bande) stellt hingegen die Länge der schweren Myosinkette dar. Im Zentrum der A-Bande ist ein hellerer Bereich zu erkennen, der als helle Zone (H-Zone) bezeichnet wird und nur aus den schweren Ketten besteht. Im Zentrum der H-Zone liegt die Mittel-Scheibe (M-Scheibe), die das Zentrum des Sarkomers bildet. Kommt es zu einer Kontraktion verkürzt sich das Sarkomer, das heißt die schweren und leichten Ketten überlappen sich vollständig, der Abstand zwischen den Z-Scheiben verkürzt sich, die I-Bande wird kleiner und die H-Zone verschwindet. Durch die in Serie geschalteten Sarkomere wird aus einer Nanobewegung eine makroskopisch sichtbare Kontraktion. Wie stark sich der Muskel dabei verkürzen kann hängt von der A-Bande ab. Im menschlichen Organismus wird die Ventrikelverkürzungsfraction (*fractional shortening*, FS) aus der Subtraktion des linksventrikulären Durchmessers diastolisch und systolisch, dividiert durch den ersteren Parameter errechnet ($(LVIDd-LVIDs)/LVIDd \cdot 100$ in Prozent) und beträgt beim Gesunden im Mittel 20-25% (Katz 2011). Bei der videooptischen Messung der EHTs wurde das FS aus dem Verhältnis aus Ausgangs- und Endposition der blauen Quadrate bei einer Kontraktion ermittelt (s. Abb. 6). Die Werte schwankten je nach Kraft zwischen 10 - 25%. Im EHT-Modell kann vereinfacht das Verhältnis der A-Bande zur Gesamtlänge des Sarkomers zur Berechnung der theoretisch maximal möglichen FS herangezogen werden. Aus institutseigenen Transmissionselektronenmikroskopie-Aufnahmen der Sarkomere der

künstlichen Herzmuskelgewebe (Daten nicht gezeigt) ergab sich somit ein maximales *FS* von ungefähr 35%.

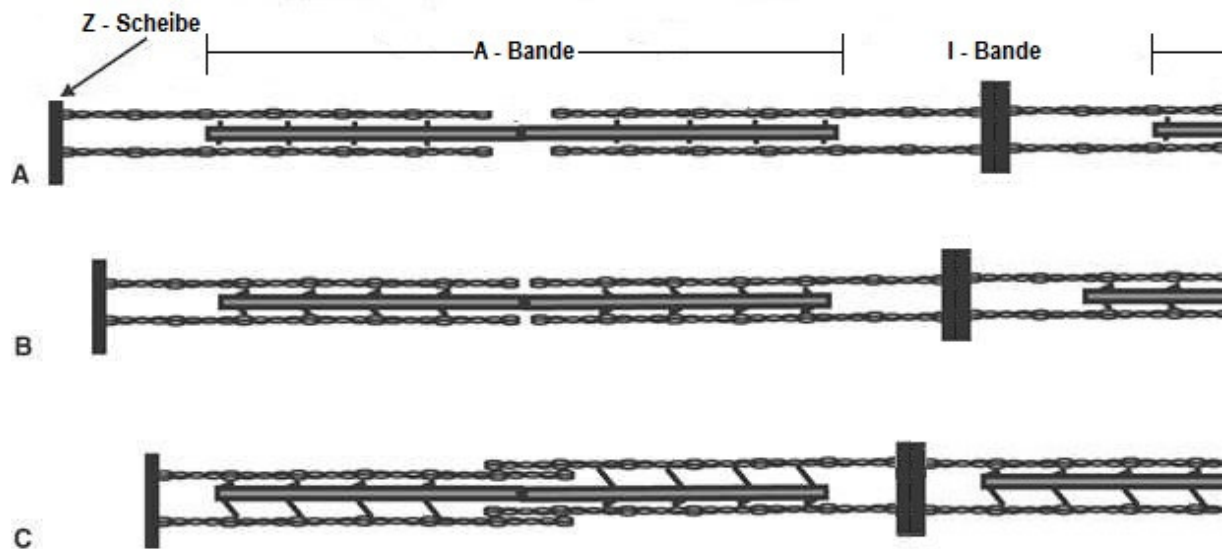


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Sarkomverkürzung. modifiziert nach Katz, 2011

4.4 Ergebnisse aus den Zwischenmessungen

Die videooptische Kraftmessung der EHTs erfolgte anhand der Auslenkung der Silikonhalterungen durch das künstliche Herzmuskelgewebe. Eine höhere Kraft resultierte demzufolge aus einer höheren Auslenkung. Die Auslenkung der Kontroll-EHTs betrug im Durchschnitt 0,71 mm in der ersten Serie bzw. 0,76 mm in der dritten Serie. Das *FS* betrug unter diesen beiden Bedingungen bereits ungefähr 20%.

4.4.1 Diskussion der Ergebnisse unter $k = 1,1 \text{ mN/mm}$

Die Zwischenmessungen der ersten Serie (s. Abb. 12) zeigten, dass die geklammerten EHTs deutlich stärkere Kräfte generierten als die Kontrollgruppe. Die Verkürzung der EHTs war unter geklammertem Zustand etwas geringer, da jedoch der Widerstand sehr hoch war (hoher *k*-Wert), ergab sich eine deutlich höhere Kraft *F* als Produkt aus Auslenkung δ und Widerstand *k*. Um diese Kräfte ohne Klammern (niedriges *k*) aufrechtzuerhalten, hätte die Auslenkung sehr groß sein müssen. Diese theoretische Auslenkung wird in Abbildung 21 im gestrichelten Kasten dargestellt.

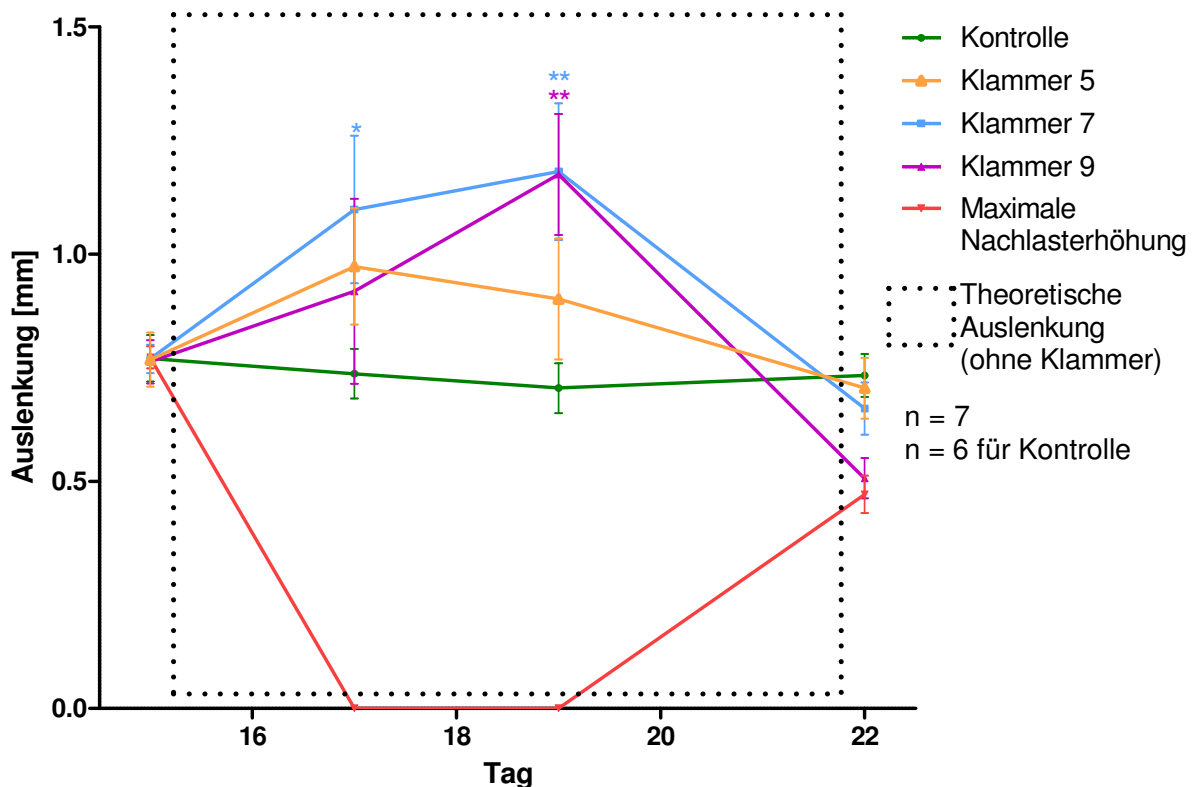


Abbildung 21 Theoretische Auslenkung unter hypothetischen Kontrollbedingung $k = 1,1 \text{ mN/mm}$. Dargestellt ist die theoretische Auslenkung (Bereich im gepunkteten Rechteck), die die nachlastverstärkten EHTs hätten ausüben müssen, wenn sie die generierte Kraft unter Kontrollbedingungen ausüben müssten. Two-Way-ANOVA mit Bonferroni Nachtest, Interventionsgruppe vs. Kontrolle

Die Kontrollgruppe als auch die kurz vor der Intervention stehenden Gruppen erreichten am Tag 15 im Mittel eine Auslenkung von 0,76 mm bei einer FS von 20%. Abbildung 21 zeigt, dass die Auslenkung (Muskelverkürzung) der Kontrollgruppe über die Dauer stabil blieb. Tabelle 1 stellt zusammenfassend die im Vergleich zu der Kontrollgruppe prozentual zusätzliche nötige Auslenkung der geklammerten EHTs dar. Zudem wird in eckigen Klammern die theoretisch notwendige Herzmuskelverkürzung FS in Prozent angegeben.

Tabelle 1: Zusätzliche notwendige Auslenkung der Interventionsgruppen im Vergleich zur Kontrolle

	Klammer 5	Klammer 7	Klammer 9
Tag 17	+32% [26% FS]	+49% [30% FS]	+46% [29% FS]
Tag 19	+28% [26% FS]	+68% [34% FS]	+67% [33% FS]

Der stärkste Unterschied zur Kontrolle weisen sowohl die Gruppe 7 als auch Gruppe 9 auf. In eckigen Klammern ist der FS-Wert wiedergegeben, der sich bei dieser Auslenkung ergeben würde.

Die Tabelle 1 zeigt, dass vor allem die Gruppen 7 und 9 eine deutlich erhöhte Auslenkung hätten vollbringen müssen, um die generierte Kraft während der Intervention auch nach der Intervention zu erbringen. So müssten sich die EHTs, wenn man Tag 19 als Referenz nimmt,

nach der Intervention um mehr als 1,1 mm verkürzen, um eine Kraft von 1,2 mN zu generieren. Dieses würde ein FS von 34% bedeuten, also die maximal vorstellbare Verkürzung der Sarkomere eines EHTs mit vollständigem Verschwinden der I-Bande unter Kontraktion, und konnte nicht erwartet werden. Möglicherweise hat die Intervention mit der Klammer 9 auch schon eine pathologische Hypertrophie hervorgerufen, da ein signifikanter Rückgang der Kraft bzw. Auslenkung um 20% nach der Intervention zu verzeichnen war. Anscheinend war diese Belastung für das Herzmuskelgewebe auf Dauer krankhaft. Die Klammer 7 stellte hingegen eine eher milde Intervention dar. Die Auslenkung fiel nach der Intervention nicht unter das Niveau der Kontrollen. Hier könnte von einem deutlichen Trainingseffekt gesprochen werden, der sich jedoch nicht mehr nach der Intervention, d. h. im entlasteten Zustand messen ließ, da dafür eine zu hohe FS von Nöten gewesen wäre. Gleiche Argumente gelten für die Gruppe mit der Klammer 5, dessen Intervention noch deutlich schonender war.

4.4.2 Diskussion der Ergebnisse unter $k = 0,47 \text{ mN/mm}$

Auch aus den Zwischenmessungen der kontinuierlichen Intervention lassen sich analoge Feststellungen ziehen. Die erreichte Muskelverkürzung der Kontrollgruppe belief sich auf stabile Werte von 20%. In dieser Serie (Serie 3) waren die nachlastverstärkten Gruppen aber ab Tag 0 einer erhöhten Nachlast unterzogen worden. Aus der ermittelten Kraft, die in Abbildung 17 dargestellt ist, lässt sich ein analoges Diagramm wie unter Kapitel 4.4.1 erstellen.

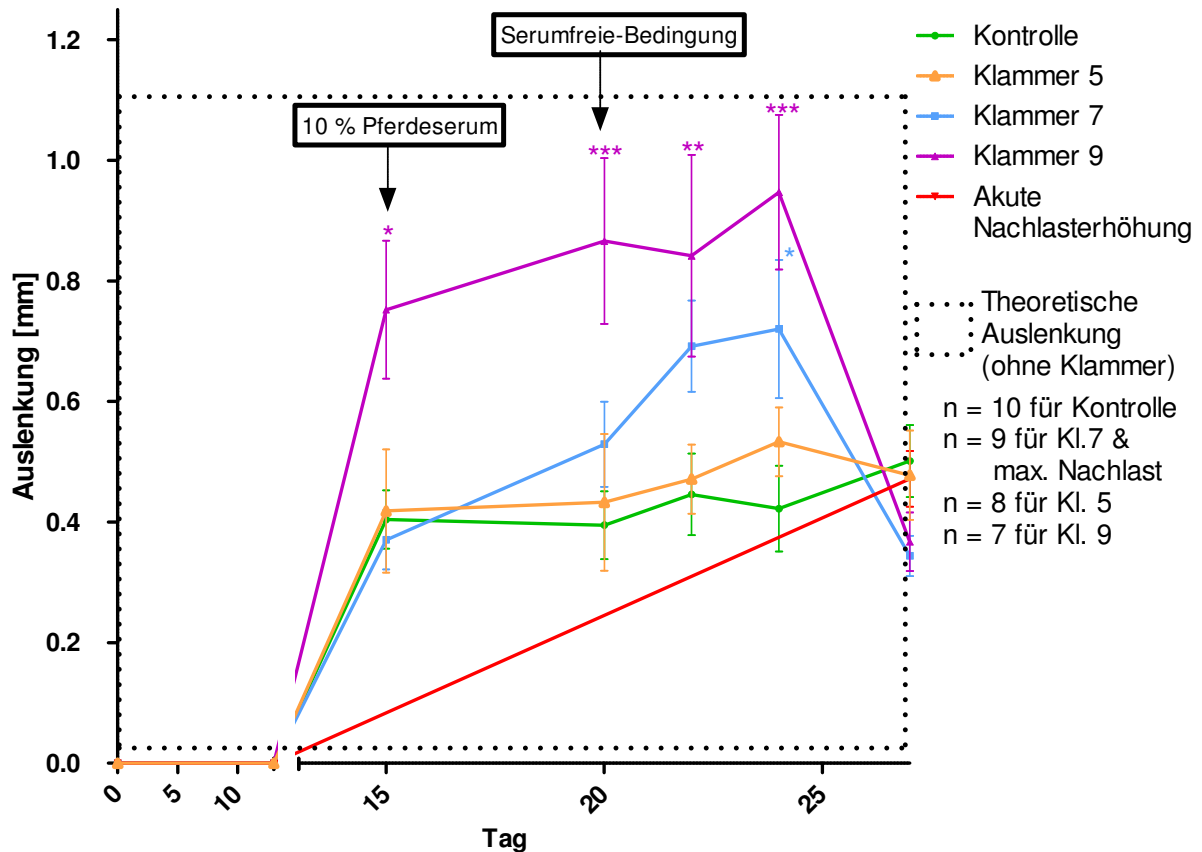


Abbildung 22 Theoretische Auslenkung unter hypothetischen Kontrollbedingungen $k = 0,47 \text{ mN/mm}$.

Dargestellt ist die theoretische Auslenkung (Bereich im gepunkteten Rechteck), die die nachlastverstärkten EHTs aus Serie 3 hätten ausüben müssen, wenn sie die gemessene Kraft unter Kontrollbedingungen hätten ausüben müssen. Two-Way-ANOVA mit Bonferroni Nachtest, Interventionsgruppe vs. Kontrolle

Abbildung 22 zeigt, dass die theoretischen Auslenkungen der nachlastverstärkten Gruppen sehr stark hätten ansteigen müssen. Tabelle 2 repräsentiert den prozentualen theoretischen Zuwachs an Auslenkung (bzw. Herzmuskelverkürzung) im entlasteten Zustand im Vergleich zur Kontrolle. In eckigen Klammern wird erneut die theoretisch notwendige *Fractional Shortening* aufgeführt.

Tabelle 2: Zusätzliche notwendige Auslenkung der Interventionsgruppen im Vergleich zur Kontrolle

	Klammer 5	Klammer 7	Klammer 9
Tag 15	4% [21% FS]	-8% [18% FS]	86% [37% FS]
Tag 20	10% [22% FS]	34% [27% FS]	119% [44% FS]
Tag 22	6% [21% FS]	55% [31% FS]	89% [38% FS]
Tag 24	26% [25% FS]	71% [34% FS]	124% [45% FS]

Besonders die Gruppen Klammer 9 aber auch Klammer 7, weisen eine deutliche erhöhte theoretische Auslenkung im Vergleich zu den Kontrollen auf. In eckigen Klammern ist die *Fractional Shortening* angegeben, die sich bei dieser Auslenkung ergeben würde.

Diese Tabelle 2 weist deutlich erhöhte theoretische Auslenkungen in den Gruppen 7 und 9 auf. Um die Kraft wie bei der Intervention zu erreichen, müssten die entklammerten EHTs eine bis zu 2,2fach höhere Auslenkung als die Kontrolle (Bezug Klammer 9, Tag 20 und 24) erreichen. Eine solche Auslenkung würde ein FS von bis zu 45% bedeuten, eine biologisch nicht mehr mögliche Verkürzung. Auch in der Gruppe Klammer 7 wird bereits die theoretische Grenze ($FS = 35\%$) am Tag 24 erreicht. Diese Tatsache erklärt, warum das Herzmuskelgewebe nicht in der Lage gewesen ist, die Kraft, die es in der Intervention erbracht hat, im entklammerten Zustand zu generieren.

Auffallend ist, dass die Klammer 9-Gruppe die höchste Kraft mit 0.43 mN während der Intervention zeigte. Dies könnte man als Trainingseffekt im Sinne einer physiologischen Hypertrophie betrachten. Vergleicht man nun die k-Werte von Klammer 9 des dünnen Schlauches ($k = 1,31 \text{ mN/mm}$) mit dem des dickerem Schlauches ohne Klammern ($k = 1,1 \text{ mN/mm}$), so befinden sich diese auf fast ähnlichem Niveau. Bezieht man die Fakten aus der wissenschaftlichen Arbeit von Hirt et al. (2012) mit ein, so hat der dort verwendete Schlauch ($k = 1,1 \text{ mN/mm}$) einen physiologischen Effekt hervorgerufen. Dieser Befund würde sich mit den hier erbrachten Daten gut decken.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte eine Erhöhung der Kontraktionskraft von EHTs durch Variierung ihrer Nachlast mit Hilfe von verschiedenen langen Klammern als auch unter Verwendung verschieden dicker Schläuche gezeigt werden. Eine stufenweise Erhöhung der Nachlast mündete in einer stufenweise Erhöhung der Kontraktionskraft im ersten Teil des Versuchs, die jedoch bei zu starker Nachlast abfiel. Die Grenze zur pathologischen Hypertrophie lag in dieser Studie bei einer Federkonstante von etwa 4 mN/mm und einer Interventionsdauer von 7 Tagen. Federkonstanten zwischen $1,1$ und $2,3 \text{ mN/mm}$ schienen einen Trainingseffekt im Sinne einer physiologischen Hypertrophie auszuüben. Im entklammerten und somit entlasteten Zustand konnte keine physiologische Kraftzunahme im Vergleich zu den Kontrollen mehr festgestellt werden, was jedoch nicht überraschend war, wenn man die dafür erforderliche *Fractional Shortening* ausrechnet, die bis zu 45% betrug, was biologisch in einem linearen Gewebe nicht zu erreichen ist. Die gewonnenen Erkenntnisse sollten in Zukunft durch isometrische Kraftmessungen verifiziert werden (Weil et al. 1998). Die Ergebnisse dieser Arbeit werden helfen, EHTs mit maximalen Kontraktionskräften herzustellen, indem man sie gegen eine optimierte Nachlast kontrahieren lässt. Differenzielle Genexpressions- oder Proteinanalysen von physiologisch und pathologisch hypertrophierten EHTs könnten hilfreich sein, um die Signale zu identifizieren, die diese beiden

Hypertrophieentitäten determinieren, und diese Erkenntnisse möglicherweise auch therapeutisch nutzen zu können.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Kardiomyozyten in eine Fibrin-Matrix eingebettet und an Silikonschläuchen befestigt kultiviert. Nach wenigen Tagen der Kultivierung dieser künstlichen Herzmuskelgewebe (*engineered heart tissue*, EHT) setzte ein spontanes vereinzelt Schlagendes des Herzmuskelgewebes ein, welches in den Folgetagen in eine kohärente Form mündete. Das Thema dieser Arbeit beruht auf der wissenschaftlichen Arbeit von Hirt et al. (2012), in der zum ersten Mal mechanisch eine pathologische kardiale Hypertrophie von EHTs durch massive Erhöhung der Nachlast hervorgerufen wurde. Die Nachlast wurde durch das Einführen eines steifen Metallbügels in den Silikonschlauch realisiert, was nach einer Interventionsdauer von 7 Tagen pathologische Auswirkungen hatte, was sowohl durch molekulare Befunde als auch durch videooptische Untersuchungen der Kontraktionskraft bestätigt wurde. Jedoch waren auch Hinweise auf eine Entwicklung der Herzmuskelkonstrukte im Sinne einer physiologischen Hypertrophie feststellbar, wenn die Nachlast nur moderat erhöhte wurde, was ebenfalls durch histologische Techniken und eine erhöhte Kontraktionskraft nachgewiesen wurde. Es stellte sich also die Frage, ob das künstliche Herzmuskelgewebe tatsächlich in der Lage war physiologische Effekte zu zeigen, ähnlich einem positiven längerfristigen Ausdauertraining beim Menschen. Durch die Herstellung verschieden langer Klammern, die in die Silikonschläuche eingeführt wurden, war es in der vorliegenden Arbeit möglich die Nachlast stufenweise zu erhöhen. Ausgehend von Kontrollbedingungen mit einer Nachlast (ähnlich einer Federkonstante) k von 1,1 mN/mm wurden damit erhöhte k -Werte von 1,5; 2,3 und 3,6 mN/mm möglich. Die maximale Versteifung des Schlauches ging mit einer Federkonstante von 12 mN/mm einher. Ergebnisse der Kontraktionskräfte weisen darauf hin dass EHTs mit k -Werten zwischen 1 und 3 mN/mm bei einer Interventionsdauer von 7 Tagen maximale Kontraktionskräfte hatten. Der untere Bereich des Nachlastspektrums wurde mittels eines sehr dünnen Silikonschlauchs mit einer Federkonstante von 0,5 mN/mm sowie den unterschiedlich langen Klammern abgedeckt, mit denen Federkonstanten von 0,6; 0,8 und 1,3 mN/mm realisiert wurden. Auch diese Daten stützen einen starken Trainingseffekt ab 1 mN/mm. Es erscheint wichtig, die Erkenntnisse aus dieser Arbeit mit Hilfe einer isometrischen Kraftmessung (im Gegensatz zu der hier durchgeführten auxotonen Kraftmessung) zu verifizieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden helfen, EHTs mit maximalen Kontraktionskräften herzustellen, indem man sie gegen eine optimierte Nachlast kontrahieren lässt.

6 Literaturverzeichnis

- Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, et al. (2013) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 11th ed. Urban & Fischer Verlag - Elsevier GmbH, München
- Aoyagi T, Matsui T (2011) Phosphoinositide-3 kinase signaling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Curr Pharm Des* 17:1818–1824.
- Bruns J (2003) Tissue Engineering - Neues zum Gewebeersatz im Muskel-Skelett-System. Springer, Steinkopff-Verlag, Berlin
- Dickhuth H-H, Hipp A, Niess A, et al. (2001) Differenzialdiagnostik der physiologischen Herzhypertrophie (Sportherz). *Dtsch Z Sportmed* 52:205–210.
- Dorn GW, Robbins J, Sugden PH (2003) Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ Res* 92:1171–5.
- Dunn D a, Hodge AJ, Lipke E a (2014) Biomimetic materials design for cardiac tissue regeneration. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol* 6:15–39.
- Elliott PM, Poloniecki J, Dickie S, et al. (2000) Sudden cardiac death in familial hypertrophic cardiomyopathy. Identification of high-risk patients. *JACC* 36:2212–8. doi: 10.1055/s-2005-866802
- Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, Scholz H, Wattchow J, Weil J, Zimmermann W, Dohmen HH, Schäfer H, Bishopric N, Wakatsuki T, Elson EL (1997) Three-dimensional cardiomyocytes muscle model reconstitution in a collagen system of embryonic matrix : a new heart. *FASEB J* 11:683–694.
- Hansen A, Eder A, Bönstrup M, Flato M, Mewe M, Schaaf S, Aksehirlioglu B, Schwörer A, Uebeler J, Eschenhagen T (2010) Development of a drug screening platform based on engineered heart tissue. *Circ Res* 107:35–44.
- Hill JA, Olson EN (2008) Cardiac plasticity. *N Engl J Med* 358:1370–1380.
- Hirt MN, Hansen A, Eschenhagen T (2014) Cardiac Tissue Engineering: State of the Art. *Circ Res* 114:354–67.
- Hirt MN, Sörensen N a, Bartholdt LM, Boeddinghaus J, Schaaf S, Eder A, Vollert I, Stöhr A, Schulze T, Witten A, Stoll M, Hansen A, Eschenhagen T (2012) Increased afterload induces pathological cardiac hypertrophy: a new in vitro model. *Basic Res Cardiol* 107:307.
- Katz AM (2011) Physiology of the Heart, 5th ed. Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
- Künne B (2001) Einführung in die Maschinenelemente. Gestaltung - Berechnung - Konstruktion. Teubner Verlag, Stuttgart/Leipzig/Wiesbaden
- Lorell BH, Carabello B a. (2000) Left Ventricular Hypertrophy : Pathogenesis, Detection, and Prognosis. *Circulation* 102:470–479.

- Maron BJ, Pelliccia A (2006) The Heart of Trained Athletes: Cardiac Remodeling and the Risks of Sports, Including Sudden Death. *Circulation* 114:1633–44.
- Morritt AN, Bortolotto SK, Dilley RJ, et al. (2007) Cardiac Tissue Engineering in an In Vivo Vascularized Chamber. *Circulation* 115:353–60.
- Ott HC, Matthiesen TS, Goh S-K, et al. (2008) Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med* 14:213–21.
- Rost R (1982) The athlete ' s heart. *Eur Hear J* 193–198.
- Saito T, Fukuzawa J, Osaki J, et al. (2003) Roles of calcineurin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 35:1153–1160.
- Scheuer J (1973) Physical Training and Intrinsic Cardiac Adaptations. *Circulation* 47:677–680.
- Shimizu T, Masayuki Y, Isoi Y, et al. (2002) Fabrication of Pulsatile Cardiac Tissue Grafts Using a Novel 3-Dimensional Cell Sheet Manipulation Technique and Temperature-Responsive Cell Culture Surfaces. *Circ Res* 90:40e–48.
- Taegtmeyer H, Sen S, Vela D (2010) Return to the fetal gene program: a suggested metabolic link to gene expression in the heart. *Ann N Y Acad Sci* 1188:191–8.
- Taigen T, De Windt LJ, Lim HW, Molkentin JD (2000) Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1196–201.
- Vandenburgh H, Shansky J, Benesch-Lee F, et al. (2008) Drug-screening platform based on the contractility of tissue-engineered muscle. *Muscle Nerve* 37:438–47.
- Weil J, Eschenhagen T, Hirt S, Magnussen O, Mittmann C, Remmers U, Scholz H (1998) Preserved Frank-Starling mechanism in human end stage heart failure. *Cardiovasc Res* 37:541–8.
- Yue TL, Gu JL, Wang C, et al. (2000) Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in hypertrophic agonists, endothelin-1 and phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 275:37895–901.
- Zimmermann W-H, Schneiderbanger K, Schubert P, Didié M, Münzel F, Heubach JF, Kostin S, Neuhuber WL, Eschenhagen T (2002) Tissue Engineering of a Differentiated Cardiac Muscle Construct. *Circ Res* 90:223–230.
- Zolk O, Münzel F, Eschenhagen T (2003) Effects of chronic endothelin-1 stimulation on cardiac myocyte contractile function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:H1248–57.

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen, Institutsleiter der Experimentellen Pharmakologie und Toxikologie der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf, für die Möglichkeit meine Arbeit hier verfasst haben zu dürfen, das in mich gesetzte Vertrauen und die ständige Bereitschaft zur Diskussion. Vor allem durch Ihre Denkansätze konnte aus den eher nüchternen Ergebnissen eine wunderbare Diskussion in der dieser Arbeit gestartet werden.

Herrn Prof. Dr. Oliver Ullrich danke herzlichst ich für die hochschulinterne Betreuung dieser Arbeit. Ihnen und Elisabeth Schäfer verdanke ich auch mein *Knowhow* in der Zellkulturtechnik.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. med. Marc Hirt. Durch seine unermessliche Bereitschaft, konstruktive Kritik und unerschöpfliche Impulse war er einfach der Held und ein sehr²⁰⁰ guter Mentor. Sein großes Engagement war ansteckend, sodass diese Arbeit ohne Marcs Betreuung nur halb so gut gewesen wäre. Ich danke Dir tausendmal für alles!

Nicht zu vergessen sind Jutta Starbatty, June Uebeler und Thmoas Schlulze, durch die die Versuche erst ermöglicht wurden.

Dr. rer. nat. Alexandra Eder und Dr. rer. nat. Ingra Vollert sei hier auch ein Dank auszusprechen für die Unterstützung und das Entgegenkommen in jeglicher Form.

Tessa Werner (MSc) und Ann-Cathrin Kunze (angehende Medizinerin), euch kann man auch gar nicht genug danken. Die Tessa, dich mich mit Kopfrechenaufgaben quälte während sie mich in die fundamentalen Labortätigkeiten einarbeitete. ACK, die aus dem Rauschen der Hoods eine erträgliche Atmosphäre zauberte in dem sie einfach anfang zum Takt der Geräusche zu singen. Hätte ich ACK nicht im Labor.... so würde ich vieles missen.

Danke auch an meine weiteren Kollegen, durch die stets ein harmonisches und amüsanter Arbeitsklima herrschte.

Ich danke meinen Eltern und meiner Schwester für mentale Unterstützung während meines Studiums. Ihr habt die Nerven behalten, wenn ich diese mal verloren habe.

Meinen Freunden danke ich für die Geduld und Einsicht, dass ich nicht immer präsent gewesen bin.

Eigenständigkeitserklärung