

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für experimentelle Medizin, Institut für experimentelle Pharmakologie und
Toxikologie

Institutsdirektor: Prof. Dr. Thomas Eschenhagen

Modelle zur Evaluation von Sauerstoffprofilen in künstlichem Herzgewebe *(Engineered Heart Tissue, EHT)*

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Vorgelegt von:

Merle Maria Sander
aus Berlin

Hamburg 2015

Wissenschaftliche Betreuung:

Prof. Dr. Thomas Eschenhagen

Dr. Moritz Seiffert

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 01.07.2016

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:

Prof. Dr. T. Eschenhagen

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:

PD Dr. A. Schwoerer

Für meine Eltern

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 Herzinsuffizienz und koronare Herzkrankheit.....	1
1.1.1 Therapie der koronaren Herzkrankheit.....	2
1.2 Kardiales <i>Tissue Engineering</i>	5
1.2.1 <i>Engineered heart tissue</i> (EHT).....	6
1.3 Sauerstoff.....	9
1.4 Sauerstoffmangel im Gewebe.....	11
1.5 Sauerstoffträger.....	12
1.6 Zielsetzung.....	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Hilfsmittel und Geräte	15
2.2 Substanzen	17
2.3 Lösungen und Puffer.....	18
2.4 Tierhaltung.....	20
2.5 Zellpräparation.....	20
2.5.1 Organentnahme.....	20
2.5.2 Enzymatischer Gewebeaufschluss von Rattenherzen.....	20
2.5.3 Herstellung von Hühner-Embryonen-Extrakt	21
2.6 Herstellung der EHTs	22
2.6.1 Herstellung von Gussformen.....	22
2.6.2 Herstellung der EHTs auf Fibrinbasis im 24-well-Format.....	22
2.7 Kultivierung der EHTs.....	23
2.8 Vitalitätsprüfung mittels Surrogatparameter Kontraktionskraft	23
2.9 Histologische Strukturanalysen	24
2.9.1 Paraffin-Einbettung	24

2.9.2	Färbungen	25
2.9.2.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	25
2.9.2.2	Hypoxyprobe TM -Immunhistochemische Färbung (Pimonidazol-Färbung)	25
2.9.2.3	Dystrophin-Immunhistochemische Färbung.....	26
2.10	Lichtmikroskopie	26
2.10.1	Kardiomyozyten-Anzahl-Bestimmung durch Zählung	26
2.11	Molekularbiologische Untersuchungen.....	27
2.11.1	RNA-Isolation mit der Trizol-Methode.....	27
2.11.2	Herstellung von cDNA (Reverse Transkription).....	27
2.11.3	Primerdesign.....	29
2.11.4	Quantitative realtime qRT-PCR	29
2.11.5	Proteinbestimmung.....	30
2.11.5.1	SDS-PAGE	30
2.11.5.2	Westernblot.....	32
2.12	Sauerstoffmessung mit Sauerstoffsonden	33
2.12.1	Prinzip der Sauerstoffmessung	33
2.12.2	EHTs für die Sauerstoffmessung.....	34
2.13	Behandlung der EHTs mit dem künstlichen Sauerstoffträger Perfluorodecalin und dessen Emulgator Pluronic-F68	34
3.	Ergebnisse.....	35
3.1	Etablierung der unterschiedlichen Interventionen zur Verbesserung der Sauerstoffversorgung des EHTs	35
3.1.1	Behandlung der EHTs mit dem künstlichen Sauerstoffträger Perfluorodecalin und dessen Emulgator Pluronic-F68.....	35
3.1.1.1	Lösung des Sauerstoffträgers mit seinem Emulgator im Medium	35
3.1.1.2	Reihenversuche zur Emulgierung	36
3.1.1.3	Pluronic-F68 – Prüfung auf Toxizität.....	36

3.1.1.4	Herstellung einer Emulsion mit Perfluorodecalin und Pluronic	37
3.1.1.5	Kultivierung der EHTs im Medium mit dem Sauerstoffträger	37
3.1.2	Kultivierung der EHTs unter erhöhter Sauerstoffkonzentration im Inkubator	37
3.1.3	Kultivierung der EHTs auf einem Schwenktisch	37
3.2	Messung der Kontraktionskraft als Surrogat-Parameter für die Vitalität der EHTs.	38
3.2.1	Kontraktionskraft.....	38
3.3	Histologische Evaluation der EHTs.....	45
3.3.1	Pimonidazol-Färbung	45
3.3.1.1	Etablierung der Pimonidazol-Färbung in EHTs	45
3.3.1.2	Bestimmung der hypoxischen Fläche	46
3.3.1.3	Ergebnisse der Pimonidazol-Färbung in EHTs.....	47
3.3.2	Dystrophin-Färbung und Quantifizierung	50
3.4	RNA-Quantifizierung mittels rt-PCR-Methode.....	52
3.5	Proteinquantifizierung (HIF-1 α) mittels Westernblot-Methode.....	58
3.6	Sauerstoffmessung	60
3.6.1	Etablierung der Sauerstoffmessung in EHTs	60
3.6.2	Aufbau der Vorrichtung für die Sauerstoffmessung.....	61
3.6.3	Vorbereitung der Sauerstoffmessung	62
3.6.4	Durchführung der Sauerstoffmessung	62
3.6.5	Videüberwachung der Sauerstoffmessung	64
3.6.6	Ergebnisse der Sauerstoffmessung	64
3.7	Zusammenfassung der gesamten Ergebnisse.....	71
4.	Diskussion	72
4.1	Ziele der Dissertation.....	72
4.2	Behandlung der EHTs mit dem künstlichen Sauerstoffträger Perfluorodecalin... ..	72

4.3	Messung der Kontraktionskraft als Surrogat-Parameter für die Vitalität der EHTs.	73
4.4	Histologische Strukturanalysen	74
4.4.1	Pimonidazol-Färbung in EHTs.....	74
4.4.2	Dystrophin-Färbung in EHTs	75
4.5	Molekularbiologische Untersuchungen	75
4.5.1	RNA-Expression.....	75
4.5.2	Protein-Expression von HIF-1 α	77
4.6	Sauerstoffmessung mit Sauerstoffsonden	77
4.7	Vergleich der gesamten Ergebnisse	78
5.	Zusammenfassung	82
6.	Abkürzungsverzeichnis	84
7.	Literaturverzeichnis	88
8.	Veröffentlichungen.....	96
9.	Danksagung	97
10.	Lebenslauf	98
11.	Anhang	99
12.	Eidesstattliche Versicherung	104

1. Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz und koronare Herzkrankheit

Nach der Weltgesundheitsorganisation „stellt das Syndrom Herzinsuffizienz die Unfähigkeit des Herzens dar, die Körperperipherie mit ausreichend Blut und daher Sauerstoff und Substraten bedarfsgerecht zu versorgen.“ Als Ursache muss eine Funktionsstörung des Ventrikels vorliegen (WHO, 1995). Hingegen müssen nach der *European Society of Cardiology* (1995) zwei der drei der folgenden Kriterien zutreffend sein, um die Definition der chronischen Herzinsuffizienz zu erfüllen:

- 1) Objektivierbare Evidenz, ob unnormale Funktion des Herzens (systolisch oder diastolisch)
- 2) Typische Symptome wie Leistungseinschränkung, Dyspnoe, Natrium- und Flüssigkeitsretention
- 3) Ansprechen auf Therapie.

Die Definition der Herzinsuffizienz ist schwierig, da es sich um ein klinisches Syndrom handelt, bei dem charakteristische Symptome mit einer abnormalen Ventrikel-Funktion einhergehen (Byrne et al. 2004). Zudem ist die Pathogenese der Herzinsuffizienz nicht vollständig geklärt und es gibt viele Ätiologien der Herzinsuffizienz, wobei die koronare Herzkrankheit (ischämische Kardiomyopathie), die arterielle Hypertonie und Herzrhythmusstörungen (v.a. Vorhofflimmern) die Hauptursachen stellen. Abbildung 1 zeigt eine vereinfachte Darstellung der bisher bekannten Pathophysiologie (Krum und Abraham 2009). Da die koronare Herzkrankheit die führende Ursache der chronischen Herzinsuffizienz und zudem die häufigste Todesursache in Deutschland (Statistisches Bundesamt 2013) darstellt, ist die Erforschung neuer Therapieoptionen wichtig.

Normalerweise verfügt das Herz über eine sogenannte „Koronarreserve“. Dies bedeutet, dass das Herz in Ruhe nur einen kleinen Teil des maximal im Blut zur Verfügung stehenden Sauerstoffs verbraucht. Im Falle eines Mehrbedarfs an Sauerstoff, z.B. bei körperlicher Anstrengung oder Stress, wird der Blutfluss in den Koronarien durch Vasodilatation erhöht, sodass eine maximale Sauerstoffausschöpfung möglich ist und damit genug Sauerstoff zur Muskelversorgung bereit steht (Mosher et al. 1964). Im Falle von relevanten Koronarstenosen durch arteriosklerotische Plaques wird der zu Herzmuskel nicht mehr ausreichend

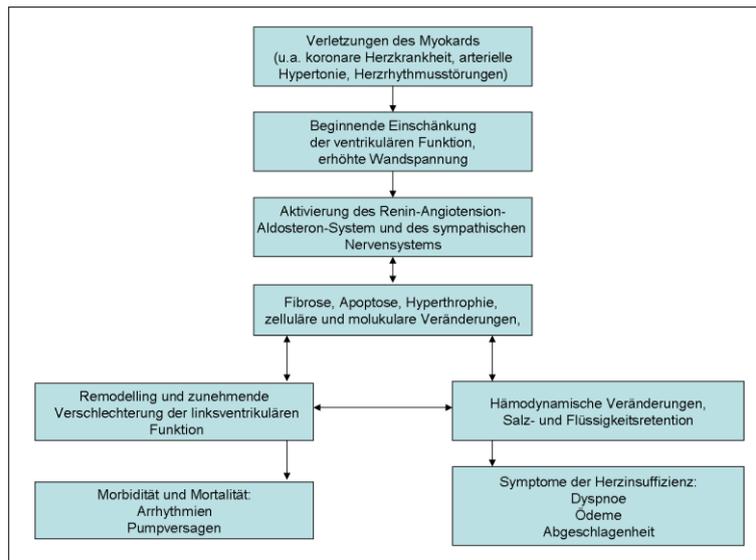


Abb. 1: Vereinfachtes Schema der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz (modifiziert nach Krum und Abraham 2009).

durchblutet und es kommt zur ischämischen Kardiomyopathie. Diese tritt entweder als chronische oder akute koronare Herzkrankheit auf und zeigt sich klinisch häufig als Angina pectoris. Bei unzureichender Revaskularisierung oder Kollateralisation folgt die dauerhafte Unterversorgung des Herzmuskels mit Sauerstoff und Substraten, sodass Teile des Herzmuskels zugrunde gehen und eine funktionslose Narbe gebildet wird (Sun et al. 2002) bzw. der Herzmuskel durch *Remodeling* (Nian et al. 2004) insuffizient wird. Neben der symptomatischen Behandlung der Herzinsuffizienz ist die kausale Therapie der koronaren Herzkrankheit essentiell, um diese Entwicklung zu unterbrechen (Nationale Versorgungsleitlinie der chronischen KHK 2013).

1.1.1 Therapie der koronaren Herzkrankheit

Ziel der Therapieschemata ist es, die Morbidität und Mortalität der Patienten mit koronarer Herzkrankheit zu verringern sowie Symptome zu lindern.

Stufe 1: Medikamentöse Therapie

Die medikamentöse Therapie der koronaren Herzkrankheit ist in folgendem Schema abgebildet (Abb. 2). Grundlage der konservativen und medikamentösen Therapie der KHK ist eine Veränderung des Lebensstils und damit Reduktion der Risikofaktoren, wie v.a. Rauchen (Phillips et al. 1996; Tunstall-Pedoe et al. 1997) Bewegungsmangel (Ekelund et al. 1988; Paffenbarger et al. 1993) und Übergewicht (Bengtsson et al. 1993; Gortmaker et al. 1993). Acetylsalicylsäure (ASS) hemmt irreversibel die Cyclooxygenase und damit die

1. Einleitung

Bildung von Thromboxan A₂ (Vane 1971). Über diesen Mechanismus werden die Thrombozytenaggregation sowie die Thrombenbildung an atherosklerotischen Plaques gehemmt. Durch die Gabe von ASS nach einem Myokardinfarkt konnte die Mortalität signifikant gesenkt werden (ISIS-2 Collaborative Group. 1988, Weisman und Graham 2002).

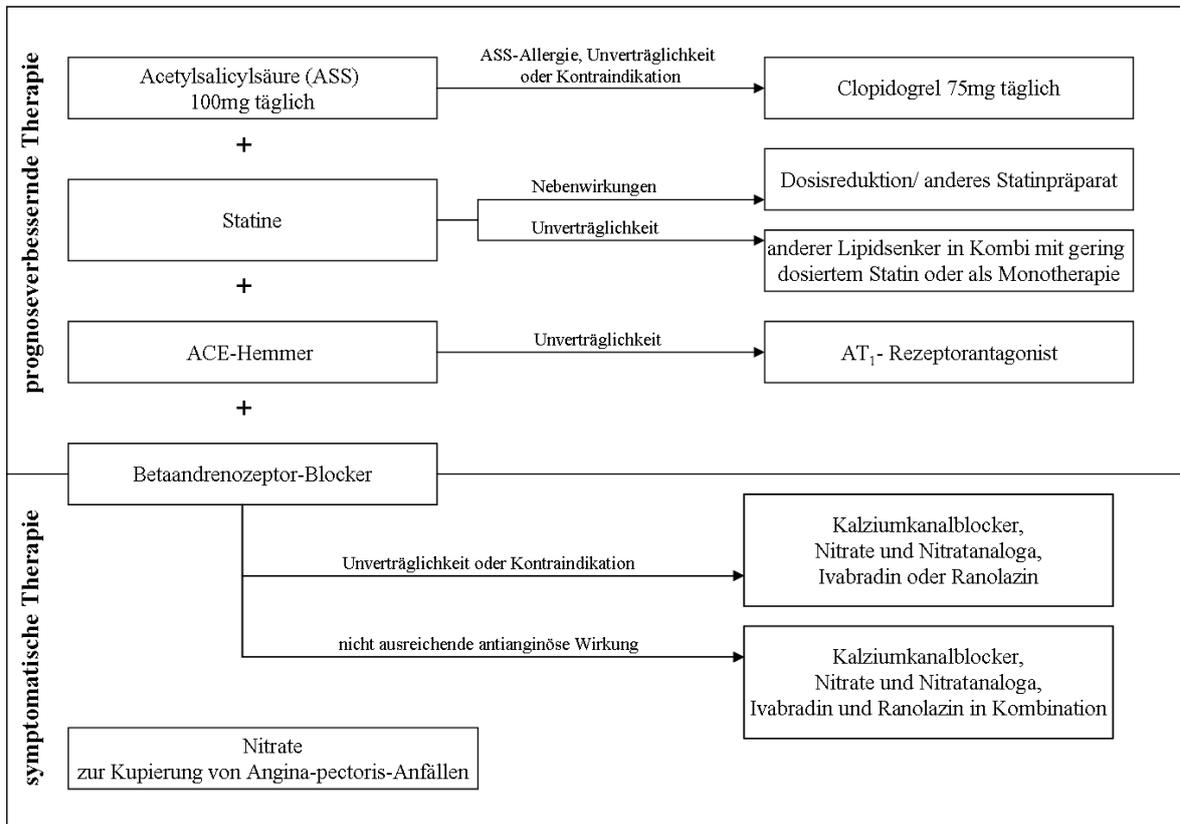


Abb. 2: Schema der medikamentösen Therapie der koronaren Herzkrankheit (Nationale Versorgungsleitlinie der chronischen KHK 2013).

Da die Arteriosklerose mit einer Störung der endothelialen Funktion und Lipideinlagerungen in der Gefäßwand einhergeht (Stary et al. 1995; Guyton 2002), wird zur Senkung des LDL-Spiegels die Gabe eines Lipidsenkers, vorzugsweise eines Statins (HMG-CoA-Reduktase-Hemmer), empfohlen. Diese Empfehlung gilt für Patienten mit KHK, da dadurch die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität signifikant gesenkt werden konnte (Cheung et al. 2004). Statine zeigten diese Resultate nicht nur unabhängig von der Ausgangshöhe des LDL-Wertes (Heart Protective Study collaborative group 2002, Baigent et al. 2005), sondern wiesen neben der Cholesterinsenkung, weitere, pleiotrope Effekte auf (Werner et al. 2002). Da der arterielle Hypertonus einen wesentlichen Risikofaktor für die KHK darstellt (van den Hoogen et al. 2000), wird die Therapie durch prognoseverbessernde (Psaty et al. 1997) und den Blutdruck senkende ACE-Hemmer ergänzt. Enalapril zeigte in mehreren Studien seine

morbiditäts- und mortalitätssenkende Wirkung bei Patienten mit KHK (*The Consensus trial study group* 1987, *The SOLVD Investigators* 1991). Bei Unverträglichkeit und vor allem dem häufig auftretenden Husten (Kubota et al. 1996), können ACE-Hemmer durch die gleichwertig-wirksamen AT₁-Rezeptorantagonisten (Yusuf et al. 2008; Kasanuki et al. 2009) ersetzt werden. Zusätzlich werden bei begleitendem arteriellen Hypertonus Beta-rezeptorblocker gegeben, die den Sauerstoffbedarf des Herzens senken. Dies geschieht durch die kardiale Abschirmung von der Katecholamin-Wirkung auf den Blutdruck, der Herzfrequenz und der Kontraktilität (Gibbons et al. 1999). Weiterhin sind Betarezeptorblocker prophylaktisch wirksam gegen Angina pectoris (Hackam et al. 2010). Die symptomatische Therapie wird durch Nitrate ergänzt, welche die pektanginösen Beschwerden lindern und die Belastbarkeit der Patienten erhöhen (Parker und Parker 1998).

Stufe 2: Interventionelle und operative Therapie

Bei instabiler Angina pectoris und bei Myokardinfarkt kommen zur medikamentösen noch die interventionellen Therapien hinzu. Bei der perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA) wird das Lumen der verengten Koronararterie durch das kurze Aufpumpen eines Ballonkatheters wieder eröffnet. Zum langfristigen Offenhalten kann noch ein Stützsystem (Stent) eingesetzt werden. Diese können in den Ausführungen *Bare metal-* oder *Drug-eluting-*Stent genutzt werden. Letzterer verhindert durch seine Beschichtung mit beispielsweise mTOR-Inhibitoren (Morice et al. 2002) oder dem Mitosegift Paclitaxel (Stone et al. 2004) die Zellproliferation und somit das Restenosieren der Arterie. Die Indikation zur aortokoronaren Bypassversorgung (ACB) besteht bei Patienten mit 3-Gefäß-KHK. Bei diesem Verfahren wird die koronare Stenose mit einem autologen Gefäßtransplantat, meist der A. thoracica interna oder einer Vene, überbrückt und so die arterielle Versorgung des Herzmuskels wiederhergestellt.

Stufe 3: Unterstützende Therapie/ Ersatztherapie

Ist das Herzen im Endstadium der Erkrankung nicht mehr in der Lage seine Pumpleistung auszuführen, können Unterstützungssysteme (*ventricular assistant devices*, VADs) an das Herz angeschlossen werden, dieses in seiner Funktion eine Zeit lang unterstützen und u.a. die Zeit bis zur Transplantation überbrücken (Krum und Abraham 2009). Auch wenn die Implantation zu einer Verbesserung der Lebensqualität der Patienten führt (Oz et al. 1995), kommt es doch häufig zu unerwünschten Ereignissen wie Thrombembolien, Infektionen und

Blutungen (Morgan et al. 2004), sodass die Herztransplantation immer noch den „Goldstandard“ der Behandlung der terminalen Herzinsuffizienz darstellt (D’Addio et al. 2015). Da es aber seit Einführung der Herztransplantation ein steigendes Missverhältnis zwischen Angebot und Nachfrage der Spenderorgane gibt, können nur ein Drittel der Patienten auf der Warteliste diese Therapie in Anspruch nehmen (Eurotransplant 2014, s. Abb. 3). Durch die Diskrepanz von benötigten und tatsächlich transplantierten Herzen ist das kardiale *Tissue Engineering* zur Gewebeersatztherapie in den vergangenen Jahren zunehmend in den Fokus gerückt.

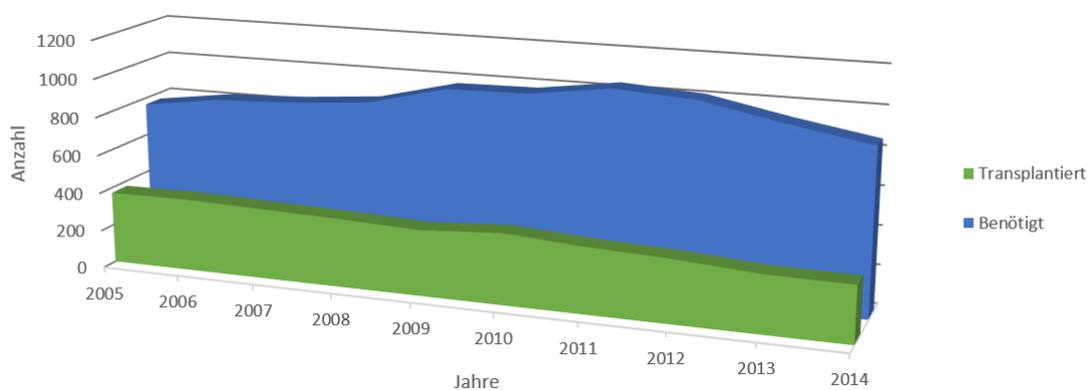


Abb. 3: Herztransplantationen in Deutschland in den Jahren 2005-2014 (nach Daten von Eurotransplant 2015). Der Graph zeigt die Anzahl der Organe in den letzten Jahren. Es wird deutlich, dass die Anzahl der Patienten auf der Warteliste, die ein Herz benötigen, ca. dreimal so hoch ist wie die Anzahl tatsächlich durchgeführter Herztransplantationen.

1.2 Kardiales *Tissue Engineering*

Um künstliches Gewebe *in vitro* zu generieren haben sich mehrere Ansätze etabliert: Zum einen kann die Besiedelung eines synthetischen Zellgerüsts bzw. einer biodegradierbaren Matrix, wie Kollagen (Radisic et al. 2004b) oder Alginat (Leor et al. 2000), mit Zellen erfolgen, bei der sich die Zellen der Umgebungsstruktur der Matrix anpassen und so jegliche Formen annehmen können (Li et al. 1999; Papadaki et al. 2001; s. Abb. 4 A). Des Weiteren eignet sich die Dezellularisierung und anschließende Neubesiedelung von Gewebe dazu, künstliche Gewebe zu schaffen (Ott et al. 2008). Diese haben den Vorteil, dass die neu angesiedelten Zellen ein vorhandenes Organgerüst mit der dazugehörigen Vaskularisation vorfinden. Allerdings benötigt man für diese Art von *Tissue engineering* ein vorhandenes Organgerüst (s. Abb. 4 B). Eine weitere Methode ist die *cell sheet*-Technologie, bei der Zellen, die einschichtig in der Zellkultur gezüchtet, anschließend in mehreren

1. Einleitung

Schichten übereinander gelagert werden und so ein dreidimensionales Gewebe bilden (s. Abb. 4 C). Bei dieser Methode benötigen die ausgesäten Zellen keine Matrix, sondern lösen sich in Zellschichten von der speziellen Zellkulturschale, indem die Temperatur der Zellkultur reduziert wird (Shimizu et al. 2002). Die Hydrogel-Technik stellt die vierte Möglichkeit dar, künstliches kardiales Gewebe, *Engineered heart tissue* (EHT), herzustellen (Eschenhagen et al. 1997). Hydrogel-Bildner, wie die endogenen Matrixproteine Fibrin oder Kollagen, werden genutzt, um einzelne Kardiomyozyten in einen definierten Zellverband zu überführen (s. Abb. 4 D). Die Erforschung dieser dreidimensionalen Gewebeersatztherapie ist vielversprechend, der klinische Einsatz allerdings aktuell noch durch wesentliche Limitationen eingeschränkt.

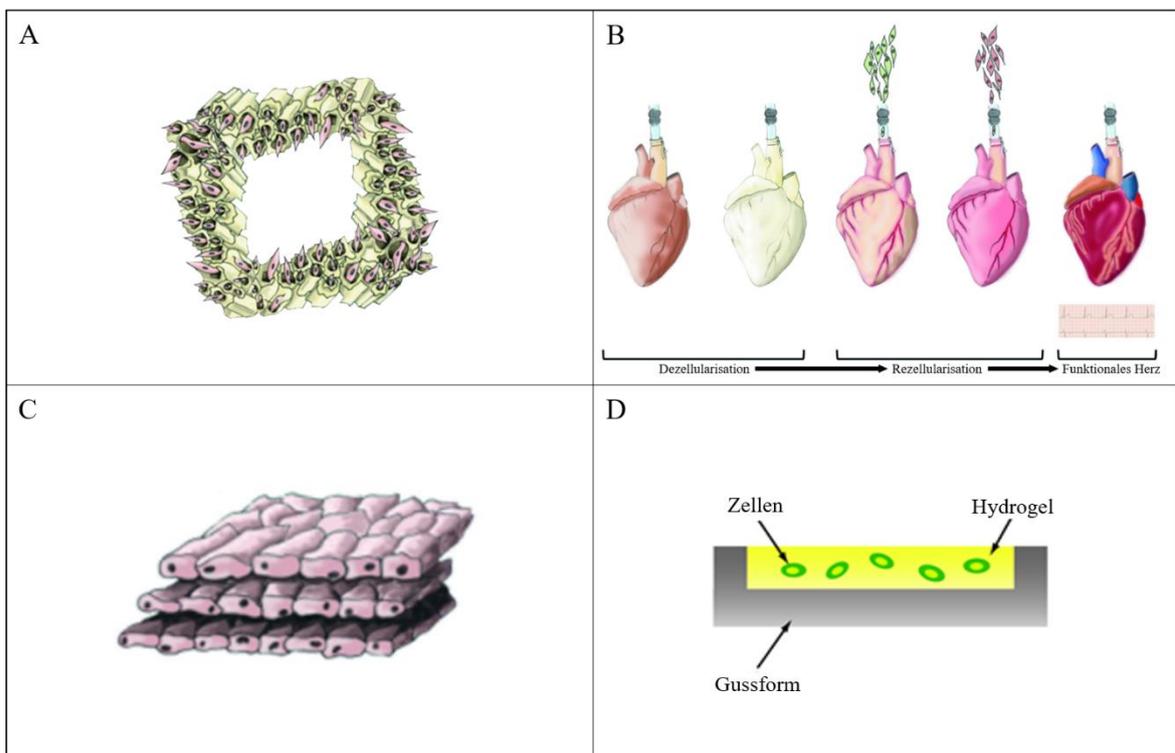


Abb. 4: Techniken des kardialen tissue engineering. A: Eine biodegradierbare Matrix jeglicher Form wird mit Zellen besiedelt (Bild modifiziert nach Gálvez-Montón et al. 2013). B: Ein Herz wird dezellularisiert, anschließend mit neuen Zellen rezellularisiert und es entsteht ein funktionierendes Herz (Bild modifiziert nach Gálvez-Montón et al. 2013). C: Cell sheets können in mehreren Schichten gestapelt werden (Bild modifiziert nach Gálvez-Montón et al. 2013). D: Zellen werden in einer Gussform mit einem Hydrogel gemischt und bilden so einen neuen Zellverband (Bild modifiziert nach Sung und Shuler 2009).

1.2.1 Engineered heart tissue (EHT)

Die von Eschenhagen et al. entwickelte Methode der Zell-Ansiedlung in einer Hydrogel-Matrix lieferte durch die Verwendung von Kollagen Typ I (Eschenhagen et al. 1997) und später von Fibrin (Hansen et al. 2010) als Matrix eine sehr gute Möglichkeit der Ausbildung

1. Einleitung

eines funktionellen Zellverbandes. Dieser setzt sich aus Kardiomyozyten, Fibroblasten und andere Zellen zusammen. Nach der Methode von Hansen et al. 2010, bei der die Zellen unter anderem mit Fibrinogen vermischt werden, welches durch Zugabe von Thrombin in einer Gussform zu Fibrin polymerisiert, bildet sich so ein festes Gel in Form eines Streifens. Das auf diese Weise entstandene EHT ist an zwei Silikonhalterungen befestigt, die zum einen als Halterung im Medium, zum anderen als Vordehnung des kleinen Muskels dienen (s. Abb. 5 und 10B). Die etwa 8 mm langen EHTs, die in 24-well-Kulturschalen kultiviert werden, beginnen nach ca. 6 Tagen spontan zu kontrahieren. Um u.a. die Kontraktionskraft, die Frequenz und die Kontraktionskinetiken standardisiert messen zu können, haben Hansen et al. (2010) ein videooptisches System entwickelt, in welchem die EHTs in der Kulturschale mittels eines Kamerasystems unter definierten Kulturbedingungen gemessen werden können (s. Abb. 5).

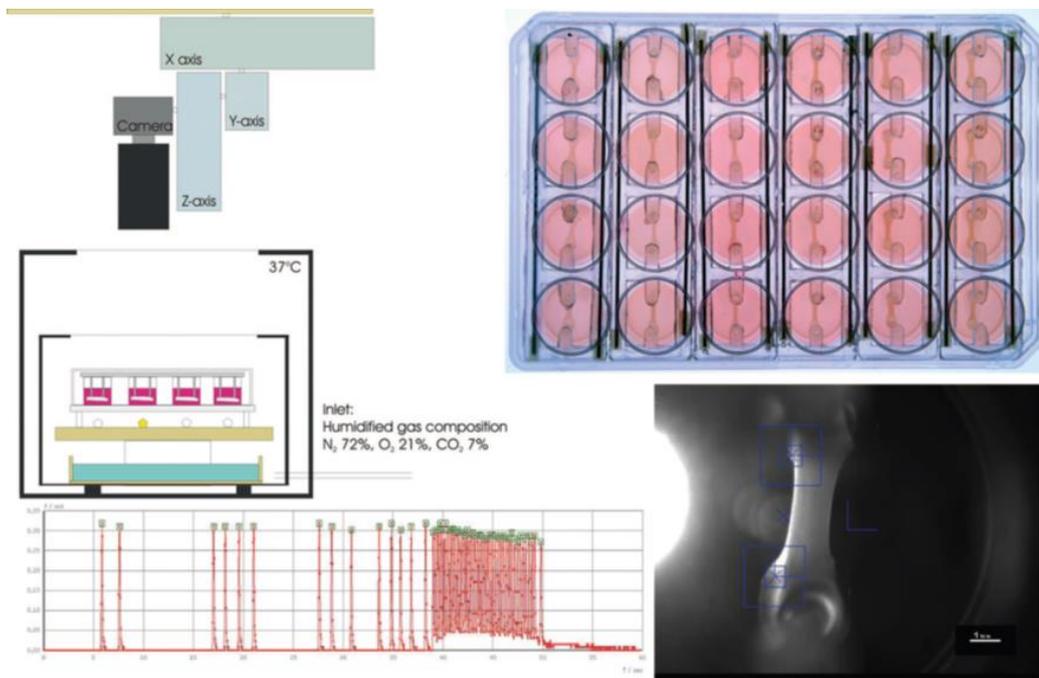


Abb. 5: Engineered heart tissue. Von links oben nach links unten im Uhrzeigersinn: 1: schematische Darstellung des Aufbaus der videooptischen Messanlage während der Messung. Messung erfolgt unter Inkubatorschrank-Bedingungen (37 °C, 72% Stickstoff (N₂), 21% Sauerstoff (O₂) und 7% Kohlendioxid (CO₂)). 2: EHTs im 24-well-Kulturschalenformat, Ansicht von oben. 3: Momentaufnahme eines EHTs während der Messung in der videooptischen Messanlage; die blauen Kästchen bezeichnen die Positionen, an denen die Kontraktion gemessen wird. 4: Der Graph zeigt die Kontraktionen über die Zeit (60 Sek); die grünen Kästchen bezeichnen automatisch erkannte Kontraktionen für die Berechnung der Schlagfrequenz, der Kraft und der Zeiten von u.a. Kontraktion und Relaxation des EHTs (Hansen et al. 2012).

Die EHTs eignen sich zum einen als *in vitro* Modell der Herzfunktion, z.B. zur Testung von pharmakologischen Substanzen, da sie ähnliche Eigenschaften aufweisen wie der native

Herzmuskel, wie z.B. den physiologischen Frank-Starling-Mechanismus und die pharmakologische Reaktion auf Calcium und Isoprenalin (Eschenhagen et al. 2002; Zimmermann et al. 2002; Hansen et al. 2010). So nutzten Schaaf et al. (2011) EHTs aus humanen, embryonalen Stammzellen um in präklinischen Testungen die Toxizität von Arzneistoffen an den EHTs zu testen. Hirt et al. (2012) erhöhten die Nachlast auf EHTs, konnten dadurch eine pathologische Hypertrophie hervorrufen und die EHTs als *in vitro* Modell der kardialen Hypertrophie etablieren. Zum anderen sollen EHTs als kardiales Ersatzgewebe verwendet werden. Versuche, EHTs auf infarzierte Rattenherzen zu transplantieren, demonstrierten, dass die EHTs mit den Herzen zelluläre Verbindungen eingehen, vaskularisiert werden und ihre kontraktile Funktion behalten (Zimmermann et al. 2002b). Weitere Transplantationen von EHTs auf infarzierte Rattenherzen zeigten eine unverzögerte elektrische Koppelung vom Herz auf die EHTs, keinerlei Auftreten von Arrhythmien und eine verbesserte systolische und diastolische Pumpfunktion des zuvor geschädigten Herzens (Zimmermann et al. 2006).

Da die EHTs im etablierten *24-well*-Format aber sehr geringe Gewebevolumina haben und für den Gewebeersatz von ausgedehnten Infarktarealen am Rattenherz bzw. für die zukünftige Therapie am Menschen größere Herzgewebe benötigt werden, wurde im Institut der experimentellen Pharmakologie und Toxikologie um die Arbeitsgruppe Eschenhagen versucht, die EHTs im größeren Maßstab herzustellen. Bei der Entwicklung jener *6-well*-EHTs, welche Abmessungen von 15 x 25 x 3 mm und somit ein 11-fach größeres Volumen hatten, stellte die Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff jedoch den Größen-limitierenden Faktor dar. Da ohne weitere Vaskularisation per Diffusion nur eine Gewebetiefe von 80 – 100 µm erreicht und versorgt werden kann (Shimizu et al. 2006), zeigten sich in der Mitte der EHTs kaum lebendige Zellen. Um die EHTs zu perfundieren und so besser mit Nährstoffen zu versorgen, wurden Alginatefäden in die EHTs integriert und anschließend enzymatisch aufgelöst. Sie hinterließen einen Hohlraum, der mit Nährmedium perfundiert wurde (Vollert et al. 2014). Durch diese Maßnahme konnte die Dichte lebender Kardiomyozyten im EHT signifikant erhöht werden. Diese Methode stellt eine von vielen Ansätzen dar, künstliches Gewebe besser zu perfundieren. So konnten Hydrogele mit Kardiomyozyten, die um perfundierte isolierte arteriovenöse Schleifen gegossen wurden, vaskularisiert (Tee et al. 2012) und anschließend transplantiert werden. Shimizu et al. 2006 konnten, durch repetitives und additives Implantieren von *cell sheets* aus kardialem Gewebe in Subkutangewebe von Ratten, dickes vaskularisiertes Herzgewebe erzeugen. Insgesamt

zeigt dies, dass eine ausreichende Versorgung der Gewebe, vor allem mit Sauerstoff, ab einer bestimmten Größe nur noch durch zusätzliche Vaskularisation dieser möglich ist. Die Versorgung mit Sauerstoff stellt somit einen essentiellen und limitierenden Faktor im *tissue engineering* dar.

1.3 Sauerstoff

Sauerstoff ist essentiell für einen lebenden Organismus wie den menschlichen Körper. Der beim Atmen aufgenommene Sauerstoff bindet im Blut an Hämoglobin, ein Protein, welches entsprechend seiner Konfiguration und den Umgebungseigenschaften Sauerstoff bindet oder ihn abgibt. Nach dem Bohr-Effekt bindet Sauerstoff bei einem hohem pH-Wert durch eine niedrige Kohlestoffdioxid-Konzentration (CO_2) der Umgebung (in der Lunge) leicht an Hämoglobin. Umgekehrt wird Sauerstoff bei niedrigem pH-Wert durch eine hohe CO_2 -Konzentration in der Umgebung (z.B. im kontrahierenden Herzmuskel) leicht abgegeben (Berg et al. 2002). Diese Eigenschaften werden in der Sauerstoffbindungskurve veranschaulicht (s. Abb. 6).

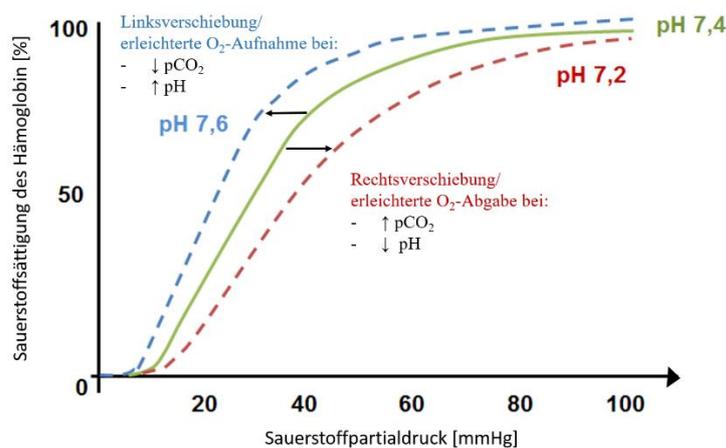


Abb. 6: Sauerstoffbindungskurve Hämoglobin im menschlichen Blut. Auf dem Graphen ist die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins [%] über den Sauerstoffpartialdruck [mmHg] aufgetragen. Bei niedrigem $p\text{CO}_2$ bzw. erhöhtem pH-Wert verschiebt sich die Sauerstoffbindungskurve nach links und Sauerstoff kann leichter an Hämoglobin gebunden werden. Bei hohem $p\text{CO}_2$ bzw. niedrigem pH-Wert kommt es zu einer Rechtsverschiebung der Sauerstoffbindungskurve und Sauerstoff kann leicht vom Hämoglobin abgegeben werden (Abbildung modifiziert nach Sperlich und Düking 2015).

Der Sauerstoff, der in der Körperperipherie abgegeben wird, gelangt in die Zellen und wird dort zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels benötigt. Im erwachsenen Herz erfolgt die Energiegewinnung für den Stoffwechsel zu einem großen Teil durch die Oxidation der Fettsäuren und zu einem kleinen Teil durch die anaerobe und aerobe Glykolyse (Lopaschuk

1. Einleitung

und Jaswal 2010). Das bei der Oxidation der Fettsäuren gebildete Acetyl-CoA wird weiter metabolisiert und liefert das für die Atmungskette benötigte Substrat $\text{NADH} + \text{H}^+$. In den Mitochondrien der Zelle erfolgt dann die Gewinnung von ATP, wobei Sauerstoff hier in der Atmungskette als essentieller Elektronenakzeptor fungiert (s. Abb. 7).

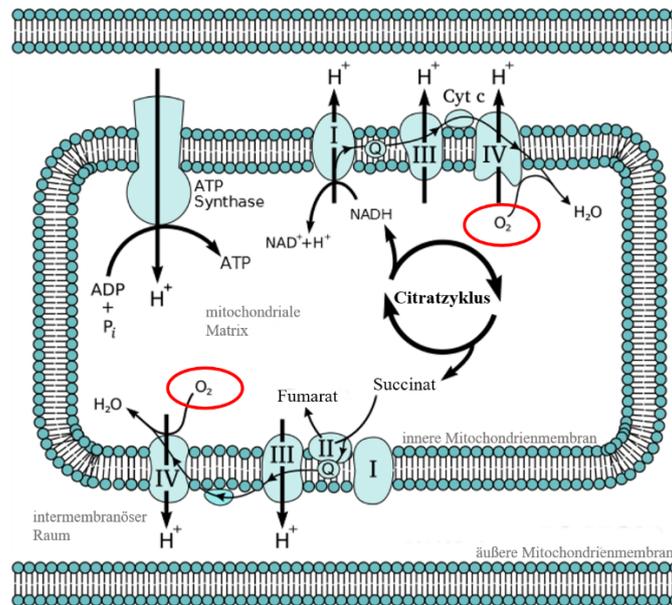


Abb. 7: Atmungskette und Elektronentransport im Mitochondrium (modifiziert nach Hoffmeier 2015).

Die verschiedenen Gewebe und Organe reagieren unterschiedlich sensibel auf eine Unterbrechung der Sauerstoffversorgung. Dies wird vor allem durch ihre Stoffwechselaktivität bedingt. So hat z.B. Knorpelgewebe eine sehr hohe Toleranz gegenüber einer Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr, wohingegen Herzgewebe eine sehr geringe Toleranz aufweist. Ischämiezeiten bei Organtransplantationen machen diese unterschiedlichen Toleranzen gegenüber Sauerstoffmangel deutlich (s. Tab. 1).

Tabelle 1: Ischämiezeiten der einzelnen Organe bei der Organtransplantation (Deutsche Stiftung Organtransplantation 2014)

Organ	maximale Zeitspanne zwischen Organentnahme und -transplantation
Herz	4 - 6 Stunden
Lunge	4 - 6 Stunden
Pankreas	10 - 12 Stunden
Leber	10 - 12 Stunden
Niere	bis zu 24 Stunden

1.4 Sauerstoffmangel im Gewebe

Tritt im Gewebe ein Sauerstoffmangel auf, so gibt es verschiedene Mechanismen, die dies registrieren und auf die Hypoxie reagieren können. Zum einen gibt es Rezeptorzellen in der Karotisbifurkation, die die Sauerstoffversorgung über das Herzminutenvolumen und über die Atemfrequenz regeln. So werden zum Beispiel bei einer niedrigen Sauerstoffsättigung im Blut (Hypoxämie) sauerstoffsensible Kalium-Kanäle an den Rezeptorzellen geschlossen (Peers 1990) und durch deren Depolarisation Signale über die Hirnnerven 9 und 10 (Nervi glossopharyneus und vagus) zum Atemzentrum in der Medulla oblongata geleitet. Daraufhin wird dort eine Steigerung der Atemfrequenz initiiert (Acker 1989; Ito et al. 1999). Zum anderen haben alle Zellen im Körper, die einen Zellkern besitzen, bei einer Veränderung der Sauerstoffversorgung die Möglichkeit, ihr Proteinbiosynthese oder ihre Genexpression an die Stoffwechsellage anzupassen. Bei akuter schwerer und chronischer Hypoxie werden aufgrund des ATP-Mangels die Energie-verbrauchenden Prozesse herunterreguliert, wie z.B. der Zellzyklus (Amellem und Pettersen 1991; Schmaltz et al. 1998) und die Proteinbiosynthese (Kraggerud et al. 1995; Tinton und Buc-Calderon 1999). Zusätzlich wird der Hypoxie-induzierte Faktor-1-alpha (HIF-1-alpha), ein Protein, welches ständig von der Zelle synthetisiert wird, nicht durch Enzyme wie zum Beispiel Ubiquitin markiert und im Proteasom abgebaut (Huang et al. 1996, Salceda und Caro 1997), sondern fusioniert im Nucleus mit HIF-1-beta zu einem Transkriptionsfaktor-Dimer (s. Abb. 8).

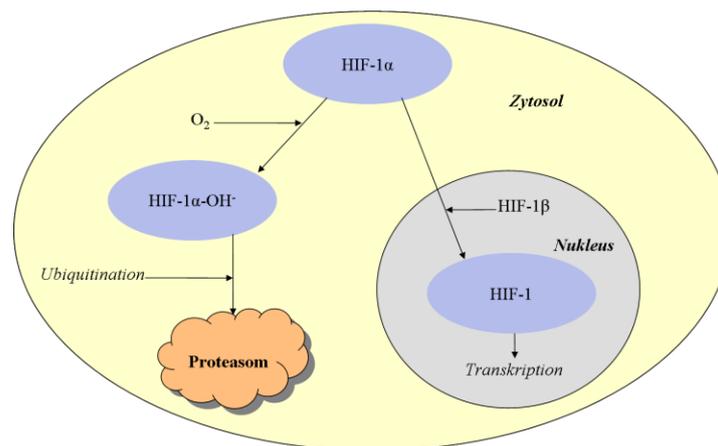


Abb. 8: Metabolismus von HIF-1α in der Zelle (nach Krohn et al. 2008). In Anwesenheit von Sauerstoff wird das Protein HIF-1α mit einer Hydroxy-Gruppe markiert, ubiquitiniert und anschließend im Proteasom abgebaut. Im Abwesenheit von Sauerstoff bindet die HIF-1β-Untereinheit im Nucleus an HIF-1α. Das gebildete Dimer kann nun als Transkriptionsfaktor wirken.

Auf diese Weise wird die Expression von verschiedenen Genen, wie z.B. von Erythropoetin (Semenza und Wang 1992) und VEGF α (Shweiki et al. 1992; Ladoux und Frelin 1993) gesteigert, um der Hypoxie entgegenzuwirken. Die Verwendung künstlicher Sauerstoffträger, welche ein Vielfaches mehr an Sauerstoff als Hämoglobin binden können, stellt eine Möglichkeit dar, Sauerstoffmangel im Gewebe und vor allem beim *tissue engineering* entgegenzuwirken.

1.5 Sauerstoffträger

Sauerstoffträger kommen natürlich im Blut vor, wie z.B. Hämoglobin, oder aber sie können auch chemisch hergestellt werden (künstliche Sauerstoffträger). Die Stoffe müssen die Eigenschaft haben, Sauerstoff dort gut zu binden, wo hohe Sauerstoffpartialdrücke bestehen (z.B. in der Lunge), ihn zu transportieren und ihn leicht wieder abzugeben, wo niedrige Partialdrücke bestehen (z.B. im peripheren Gewebe). Als Erythrozytenersatz dürfen sie zudem weder toxisch noch Allergie-auslösend sein. Da weltweit ein sehr hoher Bedarf an Blut und Blutprodukten besteht (Vamvakas und Taswell 1994), wird ständig nach künstlich hergestellten Alternativen geforscht.

Eine vielversprechende Gruppe der Sauerstoffträger sind die Perflourokarbone (PFCs), welche chemisch inert sind, eine geringe Molekülgröße von ca. 0,2 μm aufweisen (Hämoglobin: 7,4 μm) (Spahn, 1999) und ungefähr 40 - 50 mal mehr Sauerstoff binden als Hämoglobin (Lowe 1999). Sie bestehen vor allem aus Kohlenstoff- und Fluoratomen und sind entweder zyklisch oder linear aufgebaut (s. Abb. 9). Da Perflourokarbone aber hydrophobe Eigenschaften aufweisen, müssen sie emulgiert werden um therapeutisch genutzt werden zu können. Dies kann z.B. mit Lecithin (Spahn, 1999) oder aber auch mit Poloxameren (Tenside zur Emulgierung) wie Pluronic (Anthony et al. 1994) geschehen. Elibol und Mavituna (1995) konnten zeigen, dass emulgiertes Perfluorodecalin mit Pluronic im Medium von *Streptomyces coelicolor* dessen Antibiotikaproduktion signifikant erhöhte. Der emulgierte Sauerstoffträger Perfluorodekalin verbesserte bei humanen Pankreas-Zellkulturen die Inselzellfunktion und deren Lebensfähigkeit (Maillard et al. 2012). Radisic et al. (2006b) verwendeten eine Emulsion mit Perfluorokarbonen um eine mit Kardiomyozyten besiedelte Matrix zu perfundieren. Die mit dem Sauerstoffträger behandelten Konstrukte wiesen signifikant bessere kontraktile Eigenschaften auf als die

1. Einleitung

Kontrollen. Insgesamt stellt sich die Verwendung künstlicher Sauerstoffträger als sehr vielversprechend dar und sollte auch im Bereich des *Engineered heart tissue* erprobt werden.

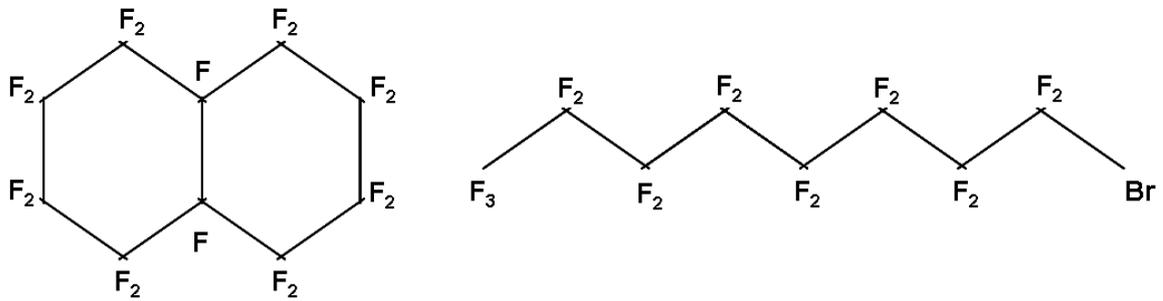


Abb. 9: Chemische Strukturformeln der Perfluorokarbone. Links: Perfluorodecalin. Rechts: Perfluorobrom (F = Fluoratom).

1.6 Zielsetzung

Um herauszufinden, ob und inwieweit die EHTs unter verschiedenen Bedingungen einen Sauerstoffmangel erleiden, verfolgte die Arbeit drei wesentliche Ziele:

1. Die histologische Darstellung der Hypoxie im 24-w-EHT mithilfe des Hypoxiemarkers Pimonidazol. Zudem sollten durch Anfärbung der vitalen Kardiomyozyten mit einem Antikörper gegen das Protein Dystrophin die Zelldichte evaluiert werden.
2. Die Modifikation der Sauerstoffversorgung durch den Einsatz künstlicher Sauerstoffträger, der Erhöhung des Sauerstoffangebotes bei der Inkubation und den Einsatz von Konvektion auf einem Schwenktisch. Hier sollte herausgefunden werden, ob und in welchem Ausmaß die Verwendung der verschiedenen Bedingungen die Vitalität der 24-w-EHTs verändert. Im Zuge dieses Versuches sollte mithilfe der videooptischen Messung festgestellt werden, inwieweit EHTs sich in Bezug auf ihr Kontraktionsverhalten (u.a. Kontraktionsstärke) veränderten. Auch die histologischen Merkmale und molekularbiologischen Parameter sollten entsprechend dargestellt werden.
3. Die apparative Messung des Sauerstoffgehaltes im 6-w-EHT mittels einer motorbetriebenen Sauerstoffsonde, um ein Profil des Sauerstoffgehalts innerhalb des EHTs darzustellen.

2. Material und Methoden

2.1 Hilfsmittel und Geräte

Hilfsmittel oder Geräte	Hersteller
200 µl Eppendorfgefäße PCR-getestet	Eppendorf, Deutschland
384-well Multiply-PCR-Platten	Sarstedt, Deutschland
ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System	Applied Biosystems, USA
Analysewaage Genius	Satorius, Deutschland
Autoklav	Wesarg, Medizintechnik, Deutschland
Bildverarbeitungs-Software Axiovision	Zeiss, Deutschland
Bio Imaging Systems (Chemi Genius2)	Syngene, Vereinigtes Königreich
Branson Sonifier 450 Becherresonator aus Titan	Branson, USA
Deckgläser	Marienfeld, Deutschland
Einbettungsschalen	Polyscience, USA
Eismaschine Scotsman AF-10	Scotsman Ice Systems, USA
Elektrophoresekammer Power pac 200	Bio-Rad, USA
Eppendorf Reaktionsgefäße 500, 1000, 1500, 2000 µl	Eppendorf, Deutschland
Falcon 10, 50 ml	Sarstedt
Frykafluid Durchlaufkühler Multistar	Störktronic, Deutschland
Fuji medical X-Ray Film	Fujifilm, Japan
Gewebezerkleinerer Tissuelizer	Quiagen
Glasgefäße	Schott, Deutschland
Glasschalen	Roth, Deutschland
Heissblock	Leica, Deutschland
Kippwippe SM	Sarstedt, Deutschland
Kühlschrank (+4 bis +8 °C) Profi Line	Liebherr, Deutschland
Kühlzentrifuge J-6B mit Schwenk- becherrotor 5200	Beckman Instruments Inc. USA
Kulturschalen	Nunc, Deutschland
Kurzzeitmesser, mechanisch	Junghans, Deutschland
Laserdrucker (schwarz-weiss)	Canon
Latexhandschuhe	Supermax Healthcare Inc. USA
Mikromanipulator für Sauerstoffmessung	Eigenanfertigung aus der Werkstatt des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des UKE Hamburg, Deutschland
Mikroskop	Carl Zeiss, Deutschland
Mikroskop-Farbkamera	Pollin Electronic, Deutschland
Mikrotom	Leica, Deutschland
Mikrowelle	Sharp, Deutschland
Nanodrop	Thermo scientific, USA
Nanodrop	Thermo Scientific, USA
Neubauer-Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Deutschland

2. Material und Methoden

Nitrilhandschuhe	Supermax Healthcare Inc. USA
Objektträger superfrost	Menzelgläser, Deutschland
Objektträgerboxen	Roth, Deutschland
Objektträgermappe	Roth, Deutschland
Parafilm	American International, USA
PCR-Gerät GENE Amp PCR System 9700	Applied Biosystems
pH-Meter <i>Five easy</i> FE20	Mettler Toledo, Schweiz
Pipetten	Eppendorf, Deutschland
Pipettenspitzen Biosphere Filter Tip 10, 100, 1000 µl	Sarstedt, Deutschland
Präparationsbesteck	Hammacher Instrumente, Deutschland
Protran-Nitrozellulose Transfermembran	Whatman, Deutschland
Quantitativer PCR-Cycler Taqman	Applied Biosystems, USA
rtPCR-Cycler	Applied Biosystems, USA
Sauerstoff- und Temperaturmessgerät Microx TX3	PreSens, Deutschland
Sauerstoffmess-Software	PreSens, Deutschland
Sauerstoffsonde Micro Optode Oxygen Type PSt1	PreSens, Deutschland
Schrittmotor	Eigenanfertigung aus der Werkstatt des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des UKE Hamburg, Deutschland
Schrittmotor-Software Motstep	Pollin Elektronik GmbH, Deutschland
Schüttelrad	Eigenanfertigung aus der Werkstatt des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des UKE Hamburg, Deutschland
Schwenktisch Polymax 1040	Heidolph Instruments, Deutschland
Silikonhalterungen für 2-Post-EHTs	Eigenanfertigung aus der Werkstatt des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des UKE Hamburg, Deutschland
Silikonhalterungen für Mini-EHTs	Siltec GmbH, Deutschland
Sterilfilter (0,2 µm)	Sarstedt, Deutschland
Sterilwerkbank LaminAir HB 2448	Heraeus Instruments, Deutschland
Teflonspacer	Eigenanfertigung
Teflonzylinder	Eigenanfertigung aus der Werkstatt des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des UKE Hamburg, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Deutschland
Tiefkühltruhe (-20 °C)	Liebherr, Deutschland
Tiefkühltruhe (-80 °C)	Liebherr, Deutschland
Tischzentrifuge	Sarstedt, Deutschland
Vortexer REAX2000	Heidolph, Deutschland
Wärmeschrank (37 °C)	Eigenanfertigung aus der Werkstatt des Instituts für Experimentelle und Klinische

2. Material und Methoden

	Pharmakologie und Toxikologie des UKE Hamburg, Deutschland
Wasserbad	Medax Nagel GmbH, Deutschland
Westernblot-Filterpapier Whatman 3 mm	Schleicher und Schuell, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf, Deutschland

2.2 Substanzen

Substanzen	Hersteller
Acrylamid/Bis Solution (40%)	Bio-Rad
Agarose	Invitrogen, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Biorad
Aprotinin	Sigma-Aldrich
Aqua ad injectabilia	Apotheke Roth, Deutschland
Aqua stabil	Julabo, Deutschland
BDM	Apotheke Roth, Deutschland
Bovines Serumalbumin	Sigma, USA
Bromophenol Blau	Sigma, USA
Chloroform	J.T.Baker, Niederlande
DMEM (Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium)	Gibco, Deutschland
DTT	Apotheke Roth, Deutschland
EDTA	Apotheke Roth, Deutschland
Entwickler-Lösung	Kodak, Deutschland
Essigsäure	Merck, Deutschland
Ethanol	Apotheke Roth
Ethanol 99%, vergällt mit 1% Methylethylketon	Apotheke Roth
Fibrinogen	Sigma Aldrich, Vereinigtes Königreich
Fixier-Lösung	Kodak, Deutschland
flüssiger Stickstoff (N ₂)	Linde Gas, Deutschland
Formalin Lösung Roti Histofix	Carl Roth, Deutschland
Glycerol	Merck, Deutschland
Glycin	Apotheke Roth, Deutschland
Guanidinehydrochlorid	Riedel-de Haen, Deutschland
HIF-1-alpha- Antikörper	Novus Biologicals, USA
Hypoxyprobe; Pimonidazol	hpi, USA
Insulin human	Sigma Aldrich, Vereinigtes Königreich
Isopropanol	Roth Apotheke, Deutschland
Kohlendioxidgas (CO ₂)	Linde Gas, Deutschland
Methanol	J.T.Baker, Niederlande
Milchpulver	Apotheke Roth, Deutschland
Millipore-Wasser	Millipore
Natriumazid	Serva, Deutschland
Natriumfluorid	Apotheke Roth, Deutschland
Natriumhydroxid	Roth, Deutschland
PBS	Gibco, USA
Penicillin/Streptomycin	Gibco, USA
Perfluorodekalin	Sigma Aldrich, Vereinigtes Königreich

2. Material und Methoden

Pferdeserum	Gibco, USA
Pierce ECL Western Blotting Substrat	Thermo Scientific, USA
Pluronic	Sigma Aldrich, Vereinigtes Königreich
Ponceau	Sigma, USA
RNase freies Wasser	Qiagen, Niederlande
RNase ZAP Spray	Ambion, USA
Sauerstoffgas	Linde Gas, Deutschland
SDS	Apotheke Roth, Deutschland
Stickstoffgas	Linde Gas, Deutschland
TEMED	Bio-Rad, USA
Thrombin	Biopur
<i>Total-ERK</i> -Antikörper	Thermo Fisher Scientific, USA
Tris-Base	Sigma Aldrich, Vereinigtes Königreich
Trizol-Lösung	Ambion, USA
Tween 20	Sigma, USA

2.3 Lösungen und Puffer

Lösungen oder Puffer	Zusammensetzung
10fach DMEM	665 mg 10fach DMEM-Pulver 5 ml Aqua ad iniectabilia
10fach Elektrophorese-Puffer	30,2 g Tris Base (250 mM) 144 g Glycin (1,92 M) 10 g SDS (1%ig) oder 50 ml SDS (20%ig) auf 1 Liter mit Milipore-Wasser auffüllen
10fach TBS (pH=7,5)	121,1 g Tris base oder 157,6 g Tris-HCl (1 M) 87,66 g NaCl (1,5 M) auf 1 Liter mit Milipore-Wasser auffüllen
1fach Blot-Puffer II	200 ml 5fach Blot-Puffer 200 ml Methanol auf 1 Liter mit Milipore-Wasser auffüllen
1fach TBS-Tween (0,1%ig)	100 ml 10fach TBS 900 ml Milipore-Wasser 1 ml Tween 20
5fach Blot-Puffer II (für Proteine der Größe >80- 100 kDa)	58 g Tris Base (250 mM) 290 g Glycin (1,9 M) 10 g SDS (0,5%ig) auf 2 Liter mit Milipore-Wasser auffüllen
6fach Lämmli	1,2 g SDS 6 mg Bromphenolblau 6 g Glycerol 1,2 ml 0,5 M Tris-HCl (pH=6,8) 0,93 g 0,6 M DTT auf 10 ml mit Milipore-Wasser auffüllen
APS (10%ig)	100 mg Ammoniumpersulfat auf 1 ml mit Milipore-Wasser auffüllen
CBFHH (pH=7,5)	5,36 mM KCl 70,81 mM MgSO ₄ * 7 (H ₂ O) 5,55 mM Glucose

2. Material und Methoden

	0,44 mM KH ₂ PO ₄ 70,34 mM Na ₂ HPO ₄ * 4 (H ₂ O) 20 mM HEPES 136,9 mM NaCl in Aqua ad iniectabilia
EHT-Medium	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (DMEM D-Glucose 1 g/l 3,7 g/l NaHCO ₃) 10% (V/V) Pferdeserum 2% (V/V) Hühnerembryonenextrakt 1% (V/V) Penicillin/Streptomycin 0,1% (V/V) Insulin 0,1% (V/V) Aprotinin
Guanidinehydrochlorid (0,3 M)	Guanidinehydrochlorid 95%iger Ethanol
HEPES (0,2 M)	47,66 g HEPES auf 1 Liter mit Milipore-Wasser auffüllen
Kranias-Puffer	2 ml 1,5 M Tris pH=8,8 1 ml 0,5 M EDTA 6 ml 500 mM NaF 15 ml 20%iges SDS 15 ml Glycerol auf 100 ml mit Milipore-Wasser auffüllen
Milchpulver-Lösung (5%ig)	2,5 g fettarmes Trockenmilchpulver auf 50 ml mit TBS-Tween 0,1% auffüllen
Natrium-Citrat (0,1 M)	2,94 g Natrium-Citrat 10 ml Ethanol (100%ig) auf 100 ml mit Milipore-Wasser auffüllen
NKM	10% FCS inaktiviert 1% Penicillin/Streptomycin 1% Glutamin 88% DMEM
Pferdeserum inaktiviert	Pferdeserum
Ponceau-S-Lösung	0,5 g Ponceau 25 ml 100%ige Essigsäure auf 500 ml mit Milipore-Wasser auffüllen
SDS (20%ig)	20 g SDS auf 100 ml mit Milipore-Wasser auffüllen
TE-Puffer	10 mM EDTA (pH=8) 100 mM Tris-HCl (pH=8)
Tris (0,5 M, pH=6,8)	60,6 g Tris Base auf 1 Liter mit Milipore-Wasser auffüllen
Tris (1,5 M, pH=8,8)	181,7 g Tris Base auf 1 Liter mit Milipore-Wasser auffüllen
Trypsin-Arbeitslösung	1,3 ml Trypsin-Stammlösung 0,6 ml DNase-Stammlösung 0,5 ml Penicillin/Streptomycin auf 50 ml mit CBFHH auffüllen
Trypsin-Stammlösung	700 mg Trypsin 7 ml CBFHH

2.4 Tierhaltung

Für die Zellkultur wurden weibliche und männliche Wistar- und Lewis-Ratten, die aus der Zucht des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorfs stammen, am 0.-3. Tag nach ihrer Geburt, genutzt. Diese wurden bei handelsüblichem Labortierfutter und Leitungswasser gehalten.

Nach Genehmigung durch die Behörde für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg erfolgte die Organentnahme durch qualifiziertes Fachpersonal.

2.5 Zellpräparation

2.5.1 Organentnahme

Die neonatalen Ratten wurden mit einer Schere dekapitiert und sternotomiert. Anschließend wurde das komplette Herz mit einer Pinzette entnommen und sofort in eine Schale mit eisgekühltem CBFHH überführt.

2.5.2 Enzymatischer Gewebeaufschluss von Rattenherzen

Der enzymatische Gewebeaufschluss erfolgte nach einem laboreigenen, standardisierten Protokoll:

Nach der Organentnahme wurden von allen Herzen Vorhöfe und Gefäßreste entfernt und die Herzen in eine neue Petrischale mit sterilem, eisgekühltem CBFHH gegeben. Nun wurden die Herzen zweimal mit CBFHH gespült und dann in einem Volumen von 2 ml CBFHH mit einer gebogenen Präparierschere auf eine Größe von unter 1 mm³ zerkleinert. Dann wurde das Gewebe in ein 50 ml Falcon-Gefäß überführt, sedimentieren gelassen und der Überstand abpipettiert. Nach dem enzymatischen Gewebeaufschluss folgte eine weitere Spülung mit CBFHH, welches nach erneuter Sedimentation abpipettiert wurde. Nun wurde ein der Gewebemenge angepasstes Volumen Trypsin-Stammlösung hinzugegeben und das Falcon-Gefäß für zehn Minuten auf den Schwenktisch gestellt. Der Überstand wurde darauf nach der Sedimentation abpipettiert und verworfen. Die folgenden Schritte wurden solange wiederholt, bis das gesamte Herzgewebe aufgelöst war. Das Gewebe erneut mit entsprechendem Volumen Trypsin-Stammlösung für zehn Minuten auf dem Schwenktisch verdauen lassen und nach Sedimentation den Überstand abnehmen und in ein neues

Sammelgefäß überführen. Dann ein entsprechendes Volumen an DNase-Stammlösung hinzugeben und mit einer weitlumigen Pipette Zellen und Lösung durch 30-maliges Auf- und Abpipettieren vermischen. Nun das Gewebe eisgekühlt sedimentieren lassen und den Überstand in das Sammelgefäß überführen. Die vollen Sammelgefäße sofort fünfzehn Minuten bei 60 G und 4 °C zentrifugieren und den Überstand verwerfen. Das Zellsediment mit 3 ml NKM-Medium wieder in Suspension bringen. Nach vollständiger Auflösung des Herzgewebes alle resuspendierten Zellsedimente in einem Falcon-Gefäß sammeln. Entsprechend dem Volumen an suspendiertem Zellsediment in NKM-Medium DNase-Stammlösung in das Falcon-Gefäß hinzugeben und nach kurzem Schwenken zwei Minuten im 37 °C-Wärmeschrank inkubieren lassen. Falcon-Gefäß anschließend bei 60 G und 4 °C für 15 Minuten zentrifugieren und Überstand verwerfen. Zellsediment in 5 ml NKM-Medium in Suspension bringen und durch einen befeuchteten 100 µm-Sterilfilter in ein neues Falcon-Gefäß geben. Um möglichst wenige Herzzellen zu verlieren, sollen das alte Falcon-Gefäß und anschließend der Sterilfilter mit jeweils 2 ml NKM-Medium gespült werden. Zur Bestimmung des Volumens nun die Suspension mit einer neuen Pipette vermessen. Zur Bestimmung der Zellzahl zuerst die Suspension durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut vermischen und anschließend 50 µl davon mit 450 µl Trypitanblau und 500 µl NKM in einem Eppendorf-Gefäß mischen. Diesen Mix nun in eine Neubauer-Kammer füllen und die Zellkonzentration ausrechnen.

2.5.3 Herstellung von Hühner-Embryonen-Extrakt

Für die Herstellung des Hühner-Embryonen-Extrakts (*Chick Embryo Extract, CEE*) wurden im Labor kontrolliert- bebrütete Eier genutzt. Diese wurden mit Ethanol gesäubert und unter einer *Laminar flow* Werkbank steril mit einer Schere aufgeschlagen und der Hühnerembryo mit einer Pinzette entnommen, dekapitiert und sowohl der Kopf als auch der Körper in ein steriles Gefäß mit eisgekühltem CBFHH überführt. Anschließend wurden die Hühnerembryonen mit einem Vortexer mehrmals zerkleinert. Um überflüssiges Gewebereste zu entfernen wurde der Extrakt mehrmals zentrifugiert und nur der Überstand verwendet. Das so entstandene Extrakt wurde in 10 ml Falcon-Gefäße gefüllt und bei -20 °C tiefgefroren. Zur Qualitätsprüfung wurde eine Probe in der mikrobiologischen Abteilung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) untersucht.

2.6 Herstellung der EHTs

2.6.1 Herstellung von Gussformen

Um die Gussformen für die Herstellung der EHTs zu bereiten, benötigte man 2%iges Agarosegel auf PBS-Basis. Zudem wurden Teflon-Platzhalter genutzt, die in die flüssige Agarose in den Zellkultur-Schalen gesteckt und nach Aushärtung der Agarose entfernt wurden (s. Abb. 10). Dadurch entstand eine Gussform von den Dimensionen 12 x 3 x 3 mm für die 24-well-EHTs und 7 x 25 x 5 mm für die 6-well-EHTs in der Agarose, in die nun der Zell-Fibrin-Mix eingebracht werden konnte.

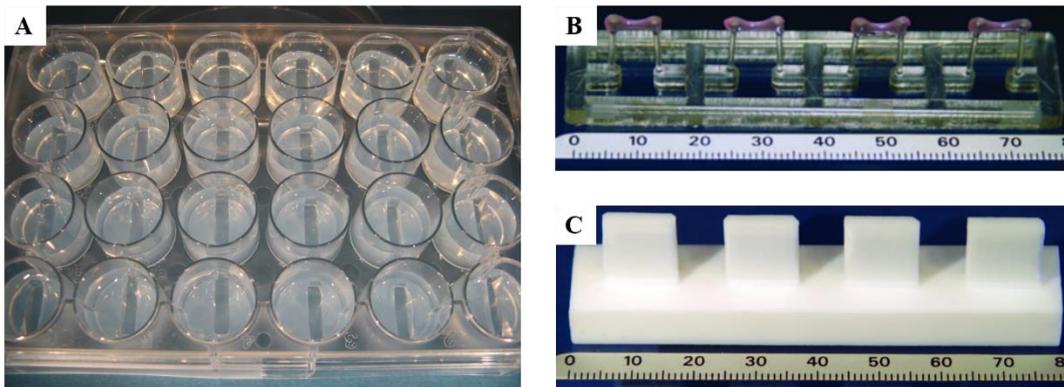


Abb. 10: Herstellung der 24-well-EHTs. A: Agarose-Gussformen; B: Silikon-posts mit EHTs, C: Spacer aus Teflon für das Bilden einer Mulde in der Agarose (B und C nach Hansen et al. 2010).

2.6.2 Herstellung der EHTs auf Fibrinbasis im 24-well-Format

Für die Herstellung von 24 EHTs im 24-well-Format wurde der bei dem enzymatischen Gewebeaufschluss gewonnene Zellmix auf Eis unter einer *Laminar flow* Werkbank verwendet. Thrombin wurde in autoklavierte 200 μ l Eppendorf-Gefäße zu jeweils 3 μ l pipettiert und auf Eis gestellt. Mit einer 10 ml Stab-Pipette wurden jeweils 1,6 ml 60 °C-warme Agarose in jedes well der 24-well-Platte gegeben. Anschließend wurden die Teflon-Platzhalter mittig platziert und ungefähr zehn Minuten gewartet, bis die Agarose ausgehärtet war. In der Zwischenzeit wurden dem eisgekühlten Zellmix im Rundboden-Falcon mit einer 2 ml-Stabpipette, das der Zellkonzentration entsprechende Volumen NKM hinzugegeben und durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Dazu wurden Fibrinogen, Thrombin und zweifach-konzentriertes DMEM gegeben. Die Endkonzentration des gesamten EHT-Mixes enthielt $4,1 \times 10^6$ Kardiomyozyten, 5 mg/ml Fibrinogen, 3 U/ml Thrombin und zweifach-konzentriertes DMEM dem Volumen von Fibrinogen und Thrombin entsprechend. Um eine gute Verteilung des Fibrinogens im Zellmix zu erzielen wurde der gesamte Zellmix zwanzigmal durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Die Teflon-Platzhalter wurden aus der

Agarose entfernt und durch Silikonmatten mit Silikonhalterungen, die in die *wells* der 24-*well*-Platte reichten, ersetzt. Man pipettierte nun pro *well* mit einer 100 µl-Druckpipette 100 µl des Zellmixes, mischte es in den Eppendorf-Gefäßen durch Aspiration mit dem Thrombin und pipettierte diesen EHT-Mix in die Agaroseformen. Nach jeweils acht EHTs musste der Zellmix mit einer Stab-Pipette durchmischt werden, um eine gleichbleibende Zellkonzentration zu erreichen. Nach Fertigstellung der EHT-Platte wurde diese eineinhalb Stunden im Inkubator bebrütet und dann mit 100 µl Fibrinogen-haltigem EHT-Medium überschichtet. Nach weiteren fünfzehn Minuten Bebrütung im Inkubator, wurden die Silikonmatten mit den nun daran polymerisierten EHTs (s. Abb. 10, Bild B) in eine neue 24-*well*-Platte mit je 1,5 ml vorgewärmtem EHT-Medium pro *well* umgesetzt.

2.7 Kultivierung der EHTs

Die EHTs wurden unter sterilen Bedingungen im Inkubator bei 37 °C, 40% Sauerstoff, 7% Kohlendioxid und 98% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Da die EHTs ab dem fünften bis sechsten Tag anfangen zu kontrahieren, musste die Nährstoffzufuhr und die Entfernung der Stoffwechselendprodukte gewährleistet werden. Deshalb wurde jeden zweiten Tag, außer am Wochenende, das aprotininhaltige EHT-Medium gewechselt. Dazu wurde das EHT-Medium im Wärmeschrank auf 37 °C vorgewärmt. Die Kulturschale mit den EHTs wurde aus dem Inkubator entnommen und unter der *Laminar flow* Werkbank wurde das zu wechselnde Medium mittels Einmal-Glaspipetten und Vakuumsauger aus den Schalen entfernt. Gleich darauf wurden 1,5 ml Nährmedium je 24-*well*-Kulturschale wieder aufgefüllt und eine möglichst kurze Phase, in der das EHT in der Schale ohne Medium hängt, zu gewährleisten. Nach vollständigem Wechsel des Mediums wurden die Kulturschalen wieder in den Inkubator gestellt. Die Zusammensetzung des EHT-Mediums zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2: Zusammensetzung des EHT-Mediums

Bestandteil	Volumenprozent an fertigem EHT-Medium
DMEM	86,8%
CEE	2%
Penicillin/Streptomycin	1%
Humaninsulin	0,1%
Aprotinin	0,1%

2.8 Vitalitätsprüfung mittels Surrogatparameter Kontraktionskraft

Um die Vitalität der EHTs zu prüfen, wurde u.a. der Surrogatparameter Kontraktionskraft mittels einer Videoanalyse bestimmt. Im Zuge dieser wurde die EHT-Platte in eine Box

gestellt, in der Sauerstoff, Temperatur und Luftfeuchtigkeit wie im Inkubator eingestellt wurden und mittels einer X-, Y- und Z-Achsen-gesteuerten Videoanalyse gemessen. Mittels dieser Kamera und der speziell angefertigten CTMV-Software war es möglich, die Frequenz (Schläge pro Minute), die Kontraktionskraft (mN), die Anspannungs- und die Relaxationszeit (ms) und deren Beschleunigung (ms) zu bestimmen. Jedes *well* der EHT-Platte wurde vor der Messung manuell mit der Kamera über das Achsensystem angefahren und optimal für die Messung eingestellt und dies abgespeichert. Nach der Voreinstellung wurde das Programm gestartet und jedes EHT je eine Minute gefilmt und gemessen. Anhand dieser Messwerte konnten nun die einzelnen EHTs in ihrer Entwicklung beobachtet und bei verschiedenen Behandlungen miteinander verglichen werden. Die Daten wurden dann mit Hilfe eines Statistikprogrammes (Graphpad Prism®) grafisch dargestellt und ausgewertet.

2.9 Histologische Strukturanalysen

2.9.1 Paraffin-Einbettung

Für die lichtmikroskopische Auswertung wurden die Fibrin-EHTs über Nacht in je 1,5 ml p-Formaldehyd (Histofix) bei 4 °C fixiert und dann in 1% TBS überführt. Um die EHTs weiter histologisch aufzubereiten, mussten sie in einer aufsteigenden Isopropanol-Reihe entwässert und mit Paraffin stabilisiert werden (s. Tabelle 3).

Tabelle 3: Entwässerungsreihe

Schritt	Dauer (Min)	Temperatur (°C)
70% Isopropanol	30	24
80% Isopropanol	30	24
96% Isopropanol I	30	24
96% Isopropanol II	30	24
100% Isopropanol I	30	24
100% Isopropanol II	30	24
100% Isopropanol III	15-30	60
Isopropanol/Histol 1:1	15-30	60
Paraffin I	15-30	60
Paraffin II	15-30	60
Paraffin III	15-30	60

Anschließend wurden die entwässerten Gewebe in Metallförmchen mit 60 °C heißem Paraffin ausgegossen und vierundzwanzig Stunden ausgehärtet. Bevor die Paraffin-Blöcke nun mit dem Schlittenmikrotom aufgeschnitten werden konnten, musste sie für ungefähr eine halbe Stunde auf einer Eisplatte bei -20 °C durchgehärtet werden, um die Schnittqualität

2. Material und Methoden

zu verbessern. Dann wurden 4 µm Schnitte in horizontaler und vertikaler Ebene angefertigt und zum Strecken in ein 37 °C warmes Wasserbad gelegt. Zum Aufziehen wurden Superfrost Objektträger genutzt, auf denen die Schnitte dann vierundzwanzig Stunden bei Raumtemperatur trocknen mussten. Bis zur histochemischen und immunologischen Färbung wurden die Schnitte bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.9.2 Färbungen

2.9.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Um Zellstrukturen wie Zellkern und Zellplasmaproteine einfach darzustellen wurde die Hämatoxylin-Eosin- (H.E.-) Färbung genutzt. Hämatoxylin färbt alle sauren/basophilen Strukturen des Gewebes, wie den Zellkern und die Ribosomen, blau. Eosin ist ein saurer Farbstoff, der alle azidophilen Gewebestandteile, wie kollagene Fasern, Bindegewebe und Zytoplasma, rot färbt. Die Färbung erfolgte nach Protokoll (s. Tab. 4) in der Pathologie des UKE; danach wurden die Schnitte mit Objektgläsern eingedeckelt.

Tabelle 4: Färbeprotokoll für die H.E.-Färbung (bei Raumtemperatur)

Schritt	Dauer (Min)
Histol I	15
Histol II	15
100% Ethanol I	5
100% Ethanol II	5
96% Ethanol I	5
80% Ethanol	5
70% Ethanol	5
Aqua dest. zum Spülen	5
Hämalaunlösung	20
Leitungswasser	10
Aqua dest. zum Spülen	2
Eosinlösung	10
Aqua dest. zum Spülen	2
96% Ethanol I zum Spülen	2
96% Ethanol II zum Spülen	2
100% Ethanol I zum Spülen	2
100% Ethanol II zum Spülen	2
Histol	3-5

2.9.2.2 HypoxyprobeTM-Immunhistochemische Färbung (Pimonidazol-Färbung)

HypoxyprobeTM bzw. Pimonidazol-Hydrochlorid ist ein Molekül, das Hypoxie im Gewebe markiert. Das Molekül wird NADPH unabhängig reduziert und kann dann an Thiolgruppen

von Proteinen binden, welche bei Hypoxie ($pO_2 < 10$ mmHg) im Gewebe frei werden. Die Entwicklung dieser Färbung in EHTs war Bestandteil meiner Dissertation und wird daher im Ergebnisteil 3.3.1 detailliert erläutert.

2.9.2.3 Dystrophin-Immunhistochemische Färbung

Dystrophin ist ein Protein des Zytoskeletts der Muskelzelle und kann mit einem Antikörper gegen Dystrophin immunhistochemisch sichtbar gemacht werden. Die Aufbereitung der EHTs erfolgte wie unter Punkt 2.9 beschrieben. Anschließend wurden die Paraffinschnitte nach dem Ventana Färbeprotokoll in der Neuropathologie (Mousepathologie *Facility*) des UKE 1:200 mit dem Dystrophin-Antikörper und dann mit dem Zweitantikörper (*Anti-mouse histofine Simple Stain MAX Universal immunoperoxidase polymer*) behandelt. Das Dystrophin konnte nun unterm Lichtmikroskop als bräunlich-schwarze Struktur erkannt werden. Die immunhistochemische Färbung wurde nach dem Ventana Färbeprotokoll (s. Anhang) mit der immunhistochemischen Färbemaschine Ventana benchmark xt in der Neuropathologie (Mousepathologie *Facility*) des UKE durchgeführt.

2.10 Lichtmikroskopie

Um morphologische Strukturen zu analysieren wurden das Mikroskop Zeiss Axioskop 2 und das Mikroskop Zeiss Axioskop genutzt. Die Schnitte wurden mit den Digitalkameras Axio Cam color abfotografiert.

2.10.1 Kardiomyozyten-Anzahl-Bestimmung durch Zählung

Die Paraffinschnitte der EHTs mit der Dystrophin-Färbung konnten zur Zählung der Kardiomyozyten-Anzahl verwendet werden. Mithilfe des Lichtmikroskops und der Software Axiovision konnten die EHTs in einer 400fachen Vergrößerung begutachtet und die Kardiomyozyten ausgezählt werden (s. Abb. 12). Durch Markierung der Gesamtfläche der einzelnen EHTs konnte eine Zellzahlbestimmung pro Fläche berechnet und so ein Vergleich zwischen den EHTs mit unterschiedlichen Behandlungen gezogen werden.

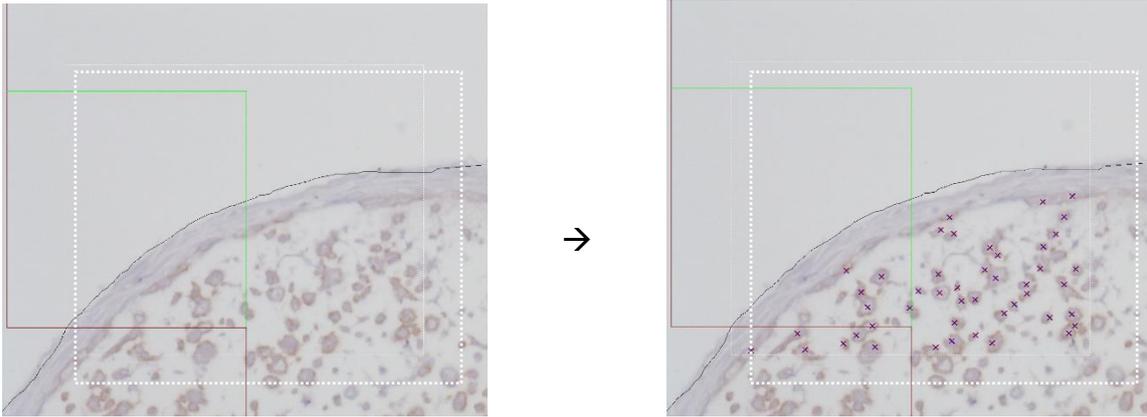


Abb. 12: Zählung der mit *Dystrophin* gefärbten Zellen im EHT mittels der *Axiovision*-Software. Links: Vor Markierung der Zellen; Rechts: Nach Markierung der Zellen im Zählfeld (rote Kreuze in weissem Rahmen).

2.11 Molekularbiologische Untersuchungen

2.11.1 RNA-Isolation mit der Trizol-Methode

Um das Gewebe aufzuschließen und molekularbiologische Untersuchungen daran durchführen zu können, benutzten wir die *TRIzol*-Methode um RNA, DNA und Proteine von überflüssigem Zellgerüst zu trennen. Anschließend konnten die Bestandteile weiterverarbeitet werden. Die RNA-Konzentration wurde mit Hilfe des *Nanodrop* über die Absorption bei der Wellenlänge von 260 nm gemessen. Zudem wurde die Absorption bei der Wellenlänge von 280 nm gemessen, um den Reinheitsgrad der RNA über den Quotienten A_{260}/A_{280} zu berechnen. Bei dieser Methode wurde nach einem standardisiertem Protokoll gearbeitet (Protokoll s. Anhang).

2.11.2 Herstellung von cDNA (Reverse Transkription)

Zur Umschreibung der RNA in cDNA wurde das *High Capacity cDNA reverse transcription kit* verwendet. Die RNA-Proben wurden nach der RNA-Konzentrationsbestimmung mit dem *Nanodrop* auf die jeweils gleiche Konzentration mit RNase-freiem Wasser verdünnt und auf Eis gestellt. In einem separaten *Eppendorf*-Reaktionsgefäß auf Eis wurde nach folgendem Schema die Reaktionsmischung für den jeweiligen Primer zusammengesetzt (s. Tab. 5).

2. Material und Methoden

Tabelle 5: Reaktionsmischung für die Herstellung von cDNA

Inhalt	Volumen pro RNA-Probe (µl)
dNTPs	1
Primer	2,5
Puffer	2,5
Reverse Transkriptase	1

In Eppendorf-Reaktionsgefäßen auf Eis wurden dann nach der folgenden Tabelle (s. Tab. 6) die Probenmischungen für die Umschreibung in cDNA angesetzt.

Tabelle 6: Probenmischung für die Umschreibung in cDNA

Inhalt	Volumen (µl)
RNA-Probe	je nach Konzentration (max. 18)
Reaktionsmischung	7
RNase-freies Wasser	auf 25 auffüllen

Die Probenmischungen wurden nun durch Auf- und Abpipettieren durchmischt, kurz mit der Tischzentrifuge zentrifugiert und mit der PCR-Maschine in cDNA umgeschrieben. Der Umschreibe-Prozess verlief nach folgendem Schema (s. Tab. 7).

Tabelle 7: Umschreibeprozess von RNA in cDNA

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (Min)
1	25	10
2	37	120
3	85	5
4	4	∞

Bis zur Weiterverarbeitung in der quantitativen RT-PCR wurden die cDNA-Proben bei -80 °C tiefgefroren.

2.11.3 Primerdesign

Die Primer wurden über Primer-BLAST entworfen (s. Tab. 8).

Tabelle 8: Primer-Design für die RNA-Bestimmung

Nr.	Oligoname	Sequenz (5'-> 3')	OD	µg	nmol	Vol. für 100 pmol/µl	T [°C]	MW [g/mol]	GC-Gehalt (%)
1	rnHIF-1α forw	GAACCCATTC CTCATCCATCA AAC (24)	15,8	444	61,7	617	61,0	7185	45,8%
2	rnHIF-1α rev	TCTTCTGGCTC ATAACCCATC AAC (24)	13,8	402	55,7	577	61,0	7207	45,8%
3	rnCasp3 forw	AGGTGCGGAG CTTGGAACGC (20)	12,6	349	56,1	561	63,5	6223	65%
4	rnCasp3 rev	TGCGAGCTGA CATTCCAGTGC (21)	14,4	415	64,6	646	61,8	6422	57,1%
5	rnBnip3 forw	CCTGTCGCAGT TGGGCTCCG (20)	12,0	374	61,3	613	65,5	6100	70%
6	rnBnip3 rev	GGGAGCGAGG TGGGCTGTCA (20)	12,4	346	55,1	551	65,5	6279	70%
7	rnVEGFα forw	CGGGCCTCGG TCCAGAAGG G (21)	15,2	440	67,8	678	67,6	6488	71,4
8	rnVEGFα rev	CCCCTTCTGTC GTGGGTGCAG (21)	13,6	425	66,3	663	65,7	6405	66,7%
9	rnEgln3 forw	GTTAACCCGA GACTGGACGA (20)	12,8	346	56,2	562	59,4	6151	55%
10	rnEgln3 rev	CATACCGCTA GGCTTTGCTC (20)	12,8	385	63,8	638	59,4	6043	55%
11	rnGAPDH forw	CTCATGACCA CAGTCCATGC							
12	rnGAPDH rev	TTCAGCTCTGG GATGACCTT							

2.11.4 Quantitative realtime qRT-PCR

Um die Konzentration der mRNA mithilfe der qRT-PCR zu bestimmen, wurde die *SYBR-Green*®-Methode verwendet und die Messung mit dem TaqMan® ABI Prism 7900HT nach der Anleitung des Herstellers (s. Abb. 13 und Tab. 9) durchgeführt.

Tabelle 9: Ablauf der PCR in der qRT-PCR

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (Min:Sek)	Zyklen
1	50	02:00	1
2	95	10:00	1
3	95	00:15	40
	60	01:00	40
4	95	00:15	1
	60	00:15	1
	95	00:15	1

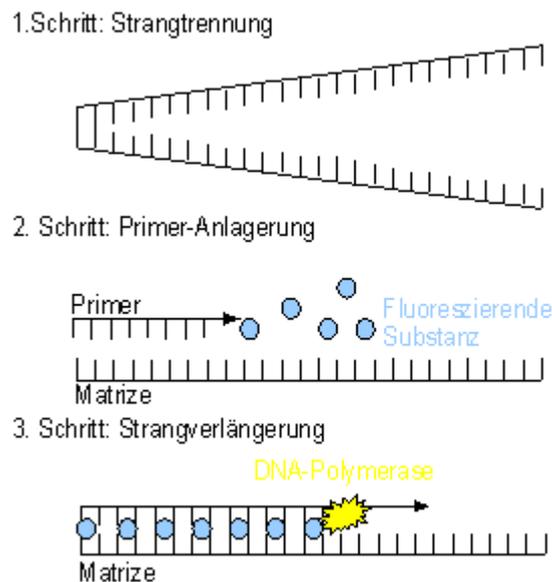


Abb. 13: Schematischer Ablauf der qRT-PCR.

2.11.5 Proteinbestimmung

2.11.5.1 SDS-PAGE

SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) wird genutzt um Proteine ihrer Größe nach in einem Polyacrylamid-Gel aufzutrennen. Die Proteine wandern in einem elektrischen Feld unterschiedlich schnell in Abhängigkeit von ihrer molekularen Größe. SDS ist eine anionische Lösung, die die Proteine gleichsam mit einer negativen Ladung versieht. SDS-PAGE wurde mit der Lämmli-Methode nach Cleveland 1983 durchgeführt. Um die relative Expression von *Hypoxia-inducible factor-1a* (HIF-1 α) im Gewebe zu bestimmen, wurde das durch die Trizol-Methode gewonnene Protein in der SDS-PAGE verwendet. Dazu musste aufgrund der Proteingröße von HIF-1 α von ~110-120 kDa ein 10%iges Polyacrylamid-Gel generiert werden und nach dem Protokoll von Wang und

2. Material und Methoden

Wang (1995) Nitrozellulose-Membranen zum *Blotten* verwendet werden. Die Herstellung des 10%igen Polyacrylamid-Gels wurde nach laboreigenem Protokoll durchgeführt. Für zwei Gele wurden folgende Inhaltsstoffe verwendet (s. Tab. 10 und 11).

Tabelle 10: *Herstellung des Trenngels für den Westernblot*

Trenngel in 50 ml-Becherglas	
4,8 ml	Bidest-Wasser
2,5 ml	40%iges Polyacrylamid
2,5 ml	1,5 M Tris (pH=8,8)
0,1 ml	10%iges SDS
0,1 ml	10%iges APS
4 µl	Temed

Tabelle 11: *Herstellung des Sammelgels für den Westernblot*

Sammelgel in 25 ml-Becherglas	
6 ml	Bidest-Wasser
1,3 ml	40%iges Polyacrylamid
2,5 ml	0,5 M Tris (pH=6,8)
0,1 ml	10%iges SDS
0,1 ml	10%iges APS
10 µl	Temed

Die Inhaltsstoffe des Trenngels wurden verrührt und zwischen die 0,75 mm dicken Glasplatten gegeben. Zur Oberflächenglättung wurde 200 µl Isopropanol auf das Trenngel gegeben. Nach 10 Minuten wurde das Isopropanol abgegossen und das Sammelgel auf das Trenngel pipettiert. Anschließend wurde der Kamm für die Proteintaschen in das Sammelgel gesteckt und nach 30 Minuten entfernt. Die Proteinproben für die Messung wurden auf Eis aufgetaut und zu fünf Volumenanteilen Probe wurde ein Volumenanteil 6fach Lämmli hinzugefügt. Nun wurden die Proben 5 Minuten bei 95 °C auf dem Heizblock aufgeköcht und auf Eis gestellt. Für die Gelelektrophorese wurde das Gel in der Elektrophoresekammer in die Halterung eingespannt und die Kammer mit Blotpuffer gefüllt. Anschließend wurde das Gel wie in Abbildung 2.5 beladen. Als Marker für die Trennung der Proteine nach ihrer Größe wurde ein Proteinstandard in die erste Tasche des Sammelgels pipettiert und die weiteren Taschen mit den Proteinproben beladen. Taschen, die nicht mit Proben beladen wurden, mussten mit 6fach Lämmli beladen werden, da sonst keine saubere Trennung der Proben möglich war. Die Gelelektrophorese wurde in zwei Schritten durchgeführt: zuerst 10 Minuten bei 80 Volt und dann 110 Minuten bei 120 Volt. Die Proteine konnten so beim Durchlaufen des elektrischen Feldes der Größe (kDa) nach im Gel aufgetrennt werden (s. Abb. 14).

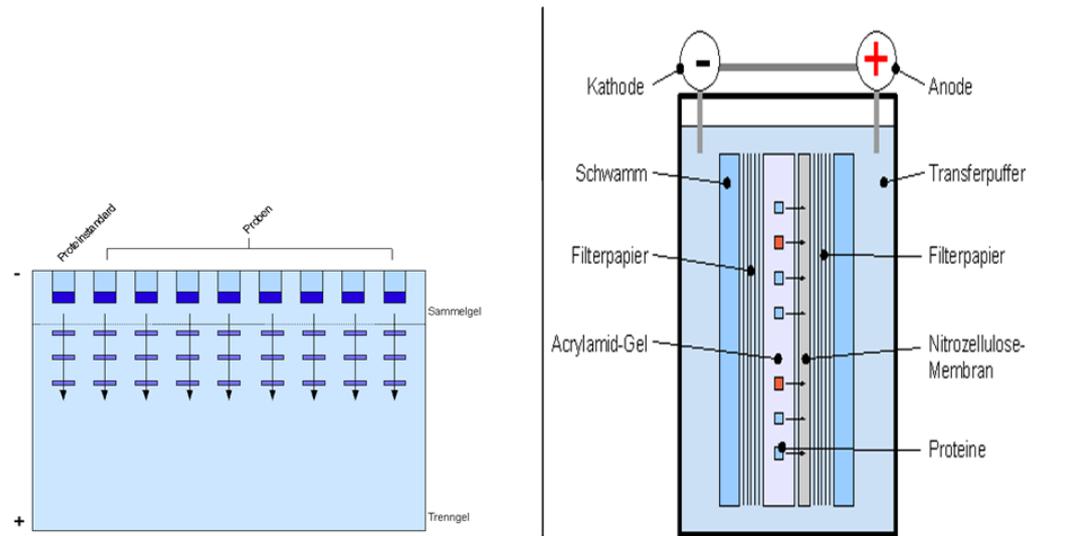


Abb. 14: Links: Schematischer Aufbau und Ablauf der Gelelektrophorese; Rechts: Schematischer Aufbau und Ablauf des Westernblots.

2.11.5.2 Westernblot

Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel zum *Blotten* auf eine Nitrozellulosemembran gelegt und zwischen Filterpapiere in die Blotkammer gepresst. Im sich anschließenden Westernblot-Verfahren wanderten die Proteinbanden im Transferpuffer im angelegten elektrischen Feld (400 mA für 90 Min) aus dem Gel in die Nitrozellulosemembran. Danach wurde die Membran 1 Minute in Ponceau-Färbung gelegt, mit Milliporewasser gewaschen und mit *GeneSnap* im *Chemi Genius² Biomaging System* fotografiert. Die Membranen wurden nun jeweils in zwei Teile geschnitten, sodass jeweils die Anteile der Membran, auf der sich die Proteinladekontrolle *Total-Erk* (~40 kDa) und der gesuchten Proteine HIF-1 α (~110-120 kDa; Tiburcy et al. 2011), getrennt weiterbehandelt werden konnten. Nach dreimal 1-minütigem Waschen mit 1fach TBS-Tween 0,1% wurden die Proteine auf den Membranen 30 Minuten in 5%iger Milchlösung geblockt. Anschließend wurden die Membranen getrennt zweimal 150 Sekunden in 1fach TBS-Tween 0,1% gewaschen. Die Membran mit der Proteinladekontrolle wurde über Nacht auf dem Rollmischer bei 4 °C in 1:1000 *Total-Erk-Antikörper* in 5%iger BSA-Lösung und die Membran mit dem gesuchten Protein unter gleichen Bedingungen mit dem 1:1000 verdünntem HIF-1 α -Antikörper (*Novus Biologicals*) inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Membranen getrennt voneinander dreimal 5 Minuten in 1fach TBS-Tween 0,1% gewaschen und dann 75 Minuten bei Raumtemperatur auf dem

Rollmischer mit 1:10000 *Anti-Rabbit Horseradish* Zweitantikörper in 5%iger Milchlösung inkubiert. Nach dreimal 10-minütigem Waschen in 1fach TBS-Tween 0,1% konnte das *Pierce ECL Western Blotting Substrate Detection Reagent* (Fluoreszenzfarbstoff) auf die Membranen gegeben und 3 Minuten inkubiert werden (s. Abb. 15).

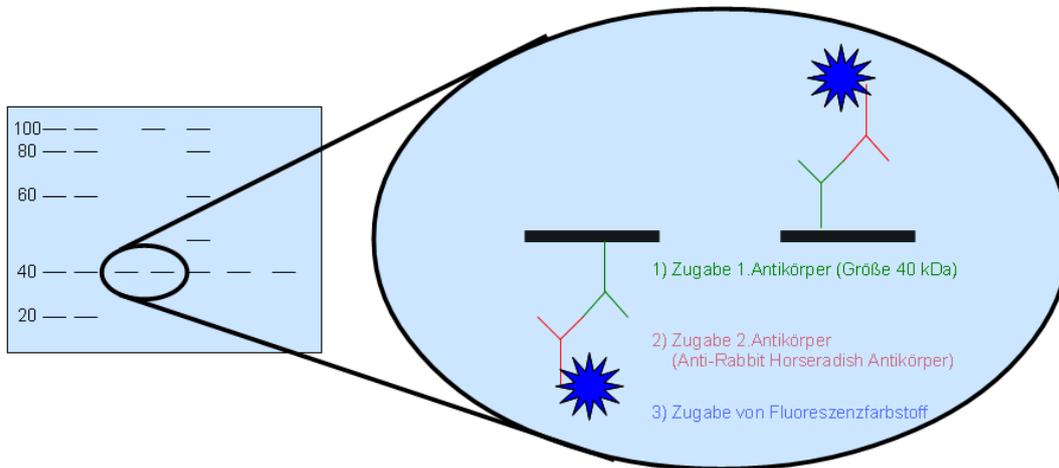


Abb. 15: Funktionsweise der Antikörperbindung und Signalherstellung beim Westernblot.

Nun konnten die Blots entweder in der Dunkelkammer auf Filme entwickelt oder mit GeneSnap im ChemiGenius² über die Fluoreszenzstärke digital entwickelt werden.

2.12 Sauerstoffmessung mit Sauerstoffsonden

2.12.1 Prinzip der Sauerstoffmessung

Für die Sauerstoffmessung im EHT wurden die Sauerstoffsonden *Oxygen Microptode* der Firma Presens genutzt. Das Prinzip der Messung mittels der *Microptode*-Sonden, basiert auf dem Prinzip der Emission und Auslöschung (*Quenching*) von verschiedenen Wellenlängen des Lichtes. Bei der Messung wird Sauerstoff weder verbraucht noch in ein anderes Molekül umgewandelt. Die Sonde emittiert in unterschiedlich-wählbaren Frequenzen Licht mit einer definierten Wellenlänge und kann Licht, das von um die Sonde herum gelegenen Teilchen emittiert wird, registrieren und daraus ein Messsignal formen. Sendet die Sonde Licht aus und in der Umgebung der Sonde befinden sich kein Sauerstoff, so wird das Licht von diesen Teilchen absorbiert und die Sonde kann kein Signal wahrnehmen (s. Abb. 16, oben). Ist aber Sauerstoff vorhanden, so absorbiert dieser das Licht und emittiert Licht in einer umgewandelten Wellenlänge aus, welches von der Sonde registriert wird (s. Abb. 16, unten). Die Sauerstoffmessung erfolgte, indem der Sensor (Sauerstoffsonde) mit dem Sauerstoffmesser Microx-TX der Firma Presens verbunden wurde und dieser wiederum mit der auf einem Computer installierten Visualisierungssoftware.

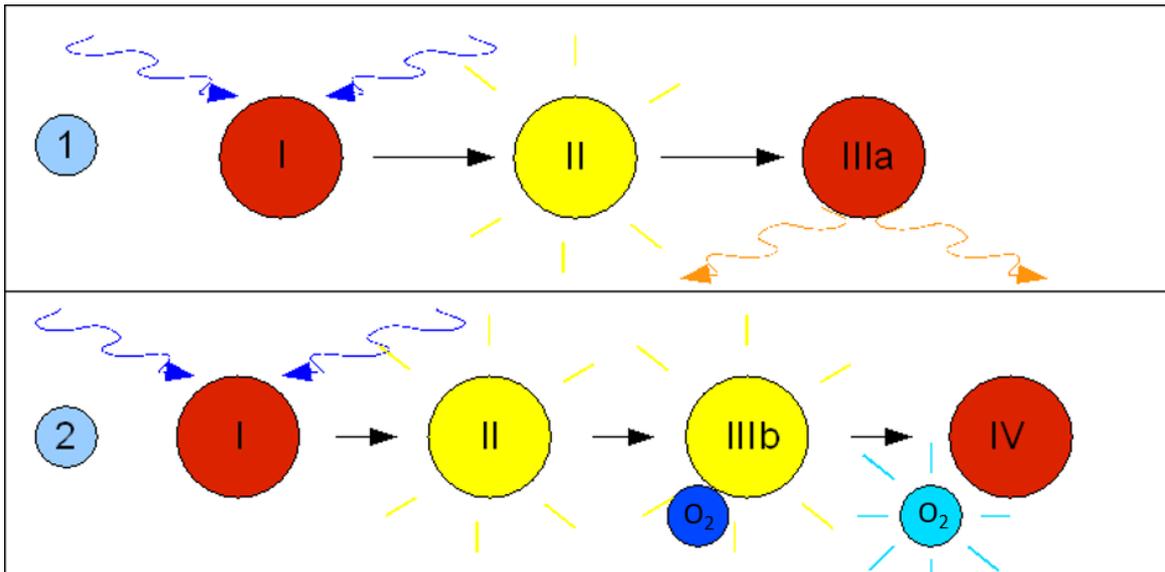


Abb. 16: Funktionsweise der Sauerstoffmessung mit der Microx-TX-Sonde. 1 (oben): In Abwesenheit von Sauerstoff: I: Lichtabsorption des von der Sauerstoffsonde ausgesendeten Lichts, II: angeregter Zustand, IIIa: Lichtemission; 2 (unten): In Anwesenheit von Sauerstoff: I: Lichtabsorption des von der Sauerstoffsonde ausgesendeten Lichts, II: angeregter Zustand, IIIb: Energietransfer durch Kollision mit Sauerstoffmolekül, IV: keine Lichtemission (Abbildung modifiziert nach PreSens 2010).

2.12.2 EHTs für die Sauerstoffmessung

Die Entwicklung der Techniken zur Sauerstoffmessung in EHTs war essentieller Bestandteil meiner Dissertation und wird daher im Ergebnisteil 3.6.1 detailliert erläutert.

2.13 Behandlung der EHTs mit dem künstlichen Sauerstoffträger Perfluorodecalin und dessen Emulgator Pluronic-F68

Die Entwicklung der Behandlung der EHTs mit dem künstlichen Sauerstoffträger Perfluorodecalin war essentieller Bestandteil meiner Dissertation und wird daher im Ergebnisteil 3.1.1 detailliert erläutert.

3. Ergebnisse

Um die Sauerstoffversorgung in den EHTs zu steigern, verfolgten wir drei verschiedene Ansätze: (1) Die Verwendung eines Sauerstoffträgers im Kulturmedium, (2) eine erhöhte Sauerstoffkonzentration im Inkubator und (3) eine Konvektion des Mediums durch Kultur auf einem Schwenktisch. Die Erfolge dieser unterschiedlichen Ansätze wurden im Folgenden durch Analyse von (a) Kontraktionskraft, (b) Histologie auf Hypoxie und Dystrophin-positive Zellen, (c) RNA- und Proteinexpression relevanter Hypoxiemarker und zudem (d) Messung der Sauerstoffmenge im lebenden EHT evaluiert. Da einige der Interventionen und Evaluationsmethoden zuvor noch nicht ausgiebig beschrieben waren, bestand ein großer Teil dieser Dissertation aus der Etablierung selbiger und wird aus diesem Grund in diesem Teil der Arbeit ausführlicher beschrieben.

3.1 Etablierung der unterschiedlichen Interventionen zur Verbesserung der Sauerstoffversorgung des EHTs

3.1.1 Behandlung der EHTs mit dem künstlichen Sauerstoffträger Perfluorodecalin und dessen Emulgator Pluronic-F68

3.1.1.1 Lösung des Sauerstoffträgers mit seinem Emulgator im Medium

Der Sauerstoffträger Perfluorodecalin (PFD) ist ein Molekül, in dem sich viele Fluoratome um ein Kohlenstoffgerüst gruppieren. Aufgrund dieser Anordnung ist Perfluorodecalin kein hydrophiles Molekül, sondern muss mit einem Emulgator in Lösung gebracht werden. Nach dem Protokoll von Zhang et al. (1992) und Elibol und Mavituna (1995) wurde hierzu der Emulgator Pluronic-F68 verwendet. Dazu wurde dieser mit destilliertem Wasser zu einer 10%igen Lösung verdünnt und 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Anschließend wurde die Lösung bei 4 °C gelagert. Das Perfluorodecalin wurde vor Verwendung sterilfiltriert und bei 4°C lichtgeschützt gelagert. Um das Perfluorodecalin mit dem Emulgator in Lösung zu bringen, verwendeten wir die im Protokoll von Zhang et al. (1992) vorgegebene Pluronic-Konzentration von 4 g pro Liter Perfluorodecalin und stellten es in einer Schüttelflasche für zwei Stunden bei 300 Umdrehungen pro Minute auf den Schüttler. Allerdings stellten wir fest, dass nach dieser Prozedur der Emulgator immer noch in Tröpfchenform im Perfluorodecalin vorlag und sich nicht sichtbar etwas gelöst hatte.

3. Ergebnisse

3.1.1.2 Reihenversuche zur Emulgierung

Da das Lösen des Perfluorodecalins mit dem Emulgator auf die oben beschriebene Weise nicht möglich war, wendeten wir andere Mischtechniken (Untraschallbad, Stabmixer, Magnetrührer) und eine erhöhte Emulgator-Konzentration an, um das Perfluorodecalin in Lösung zu bringen. Da Pluronic ab einer gewissen Dosis toxisch sein kann (Elibol und Mavituna 1995), führten wir zuerst eine Versuchsreihe mit Zugabe verschiedener Konzentrationen von Pluronic durch. Wir inkubierten je vier EHTs mit verschiedenen Konzentrationen an Pluronic, welches dem EHT-Medium über 20 Tage hinzugegeben wurde und analysierten u.a. den Parameter Kontraktionskraft. Anhand dieses Parameters wollten wir die mögliche Toxizität und die ideale Konzentration von Pluronic bestimmen.

3.1.1.3 Pluronic-F68 – Prüfung auf Toxizität

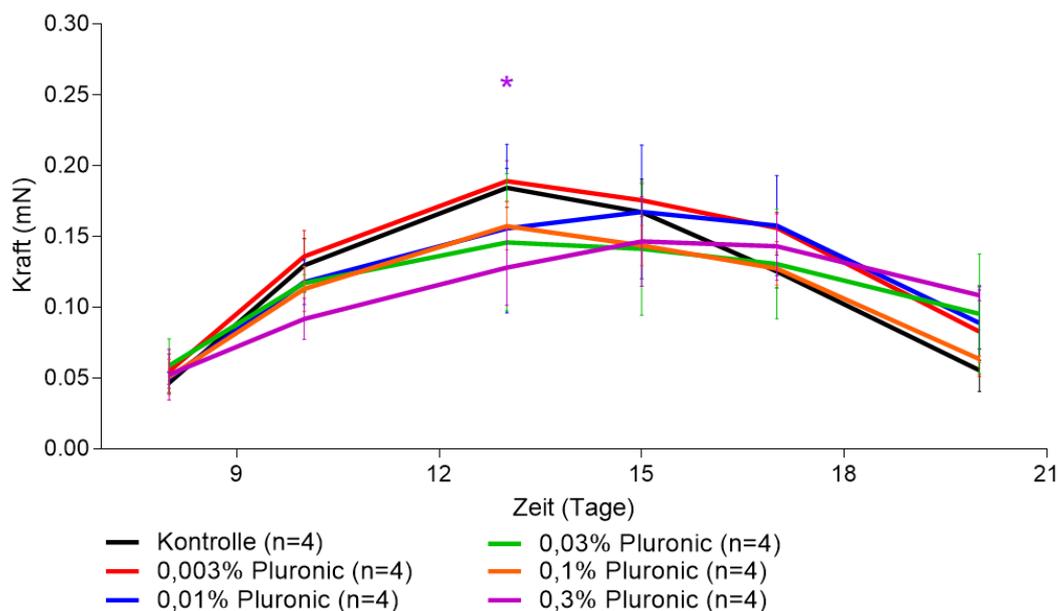


Abb. 17: Vergleich der Kraftentwicklung der EHTs mit unterschiedlichen Pluronic-Konzentrationen im EHT-Medium im Gegensatz zur Kontrolle (aufgetragen ist die Kraft (mN) über die Zeit (Tage); Two-way Anova; *: $p < 0,05$).

Durch den Vergleich der Kraftentwicklungen der EHTs unter Zugabe unterschiedlicher Pluronic-Konzentrationen stellten wir eine Toxizitätsreihe auf. Die Kraftentwicklung der EHTs, die der Pluronic-Zugabe von 0,3% im Medium ausgesetzt waren, zeigten einen signifikanten Abfall der Kraftentwicklung an Tag 13 ($p < 0,05$; s. Abb. 17). Da sich diese signifikante Abweichung bei der höchsten Pluronic-Konzentration zeigte und die Werte

insgesamt große Standardabweichungen aufwiesen, entschieden wir uns für die Verwendung der niedrigst möglichen Pluronic-Konzentration zur Emulgierung des Sauerstoffträgers Perfluorodecalin.

3.1.1.4 Herstellung einer Emulsion mit Perfluorodecalin und Pluronic

Durch die Zugabe von 1% PFD und 0,003% Pluronic in das Basismedium DMEM und daraufhin folgender Sonifizierung im Bechersonifikator für 10 Minuten erreichten wir eine stabile Emulsion ohne nachträgliches Absetzen des Sauerstoffträgers vom Medium. Nach der Sonifizierung wurden die übrigen Bestandteile des EHT-Mediums hinzugegeben.

3.1.1.5 Kultivierung der EHTs im Medium mit dem Sauerstoffträger

Die EHTs mit dem zusätzlichen Sauerstoffträger im Medium wurden unter den gleichen Bedingungen (Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid, Temperatur und Luftfeuchtigkeit) wie die Kontroll-EHTs kultiviert. Nach 21 Tagen wurden jeweils die Hälfte der EHTs der Kontroll- und Interventionsgruppen für die histologische Aufbereitung prozessiert (s. Punkt 3.3), die jeweils andere Hälfte der Gruppe wurde in PBS gespült und in flüssigem Stickstoff für die molekularbiologischen Untersuchungen bei -80 °C tiefgefroren (s. Punkt 3.4 und 3.5).

3.1.2 Kultivierung der EHTs unter erhöhter Sauerstoffkonzentration im Inkubator

Um die Sauerstoffversorgung der EHTs zu verbessern und Unterschiede der verschiedenen Kultivierungs-Bedingungen zu messen, kultivierten wir einen Teil der EHTs bei 40% Sauerstoff. Ansonsten erfolgten die Inkubation und die Messungen wie unter Punkt 2.7 und 2.8.

3.1.3 Kultivierung der EHTs auf einem Schwenktisch

Um die Sauerstoffversorgung der EHTs durch Konvektion zu verbessern und eventuelle Unterschiede der verschiedenen Kultivierungs-Bedingungen zu messen, kultivierten wir einen Teil der EHTs auf einem Schwenktisch im Inkubator bei 40% Sauerstoff. Die übrigen Bedingungen waren analog zu Punkt 2.7 und 2.8 definiert.

3.2 Messung der Kontraktionskraft als Surrogat-Parameter für die Vitalität der EHTs

Zur Messung der Surrogatparameter mit der CTMV-Software wurden die EHTs für die Zeit der Messung in PFD-freies, bei gleichen Inkubator-Bedingungen vorinkubiertes Kardio-myozytenmedium umgehoben, da durch die Trübung des mit dem Sauerstoffträger versetzten Mediums keine videoanalytische Messung möglich war. Zur Vergleichbarkeit wurden auch die EHTs der Kontrollgruppe in neues Medium umgesetzt. Nach Beendigung der Messung wurden die EHTs wieder zurück in ihr Ursprungsmedium überführt. Die Messung erfolgte ansonsten wie in Punkt 2.8 beschrieben.

3.2.1 Kontraktionskraft

Die Messung der Kontraktionskraft erfolgte bei allen Testreihen der EHTs. Um einen Unterschied zwischen den Kontroll-EHTs, den EHTs mit Vehikel-Behandlung und den EHTs mit Sauerstoffträgerbehandlung darzustellen, untersuchten wir die EHTs in drei Testreihen.

Bei der Testreihe Nr. 1 wurden die EHTs (je n=4) unter verschiedenen Bedingungen inkubiert (s. Tab. 12) und die Messungen ab Tag 10 durchgeführt. Die Messungen wurden montags, mittwochs und freitags nach dem Mediumwechsel durchgeführt.

Tabelle 12: Behandlungsschema der EHTs von Testreihe Nr. 1

Bezeichnung	Behandlung (40% O₂, 7% CO₂)	Anzahl
Kontrolle		4
Vehikel	+ je 0,003% Pluronic	4
PFD	+ je 1 %PFD und 0,003% Pluronic	4

Wie in Abbildung 18 sichtbar, ergaben sich folgende Ergebnisse: Die EHTs steigerten ihre Kontraktionskraft im Laufe der Inkubation und erreichten ihre maximale Kontraktionskraft zwischen Tag 15 und 17. Die EHTs mit der Sauerstoffträger-Behandlung entwickelten eine signifikant größere Kontraktionskraft an den Tagen 10, 17 (beide $p < 0,05$), 20 ($p < 0,001$), 22 und 24 (beide $p < 0,001$). Die EHTs mit der Vehikel-Behandlung zeigten keinen signifikanten Unterschied.

3. Ergebnisse

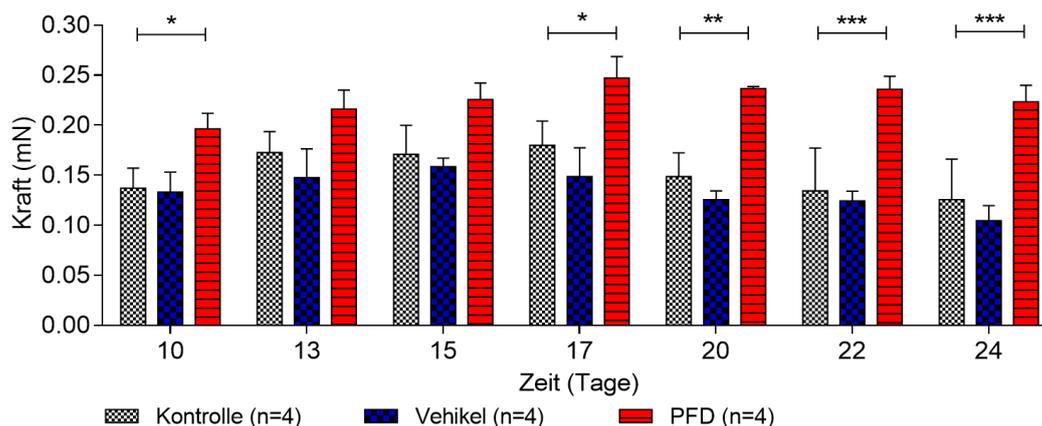


Abb. 18: Kraftmessungen der EHTs aus Testreihe Nr. 1 an verschiedenen Tagen. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ (Two-way Anova).

Um die Ergebnisse der ersten Testreihe zu überprüfen, wurde der Versuch noch in zwei weiteren Testreihen wiederholt. In Testreihe Nr. 2 wurden die EHTs wie die aus Testreihe Nr. 1 behandelt, aber zusätzlich noch EHTs unter gleichen Inkubatorschrank-Bedingungen auf dem Schwenktisch inkubiert. Die Inkubation erfolgte wie in Tabelle 13 angegeben.

Tabelle 13: Behandlung der EHTs aus Testreihe Nr. 2 für die Messungen

Bezeichnung	Behandlung (40% O ₂ , 7% CO ₂)	Anzahl
Kontrolle		8
Vehikel	+ je 0,003% Pluronic	8
PFD	+ je 1% PFD mit 0,003% Pluronic	8
Kontrolle auf Schwenktisch	auf Schwenktisch im Inkubator	8
Vehikel auf Schwenktisch	auf Schwenktisch im Inkubator + je 0,003% Pluronic	4
PFD auf Schwenktisch	auf Schwenker im Inkubator + je 1% PFD und 0,003% Pluronic	8

Wie auch in der ersten Testreihe, ergaben sich signifikante Kraftunterschiede zwischen den Kontroll-EHTs und den EHTs mit der Sauerstoffträger-Behandlung ohne Schwenktisch. An Tag 11 zeigte sich ein Unterschied von +0,07 mN ($p < 0,001$), an Tag 13 von +0,056 mN ($p < 0,001$) und an Tag 15 von +0,054 mN ($p < 0,01$). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontroll-EHTs und den EHTs mit Vehikel-Behandlung (s. Abb. 19). Bei dem Vergleich der EHTs, die auf dem Schwenktisch inkubiert wurden, zeigten sich signifikante Unterschiede der Kraftmessung zwischen den Kontroll-EHTs und den EHTs mit Sauerstoffträger-Behandlung (s. Abb. 20). Die EHTs mit der Sauerstoffträger-Behandlung entwickelten zu Beginn der Messung geringere Kräfte als die Kontroll-EHTs, an Tag 8 sogar mit einem signifikanten Unterschied von -0,085 mN ($p < 0,01$). Im Gegensatz

3. Ergebnisse

zu den Kontroll-EHTs, bei denen die Kraftentwicklung ab Tag 11 eher abnahm, nahm die Kraftentwicklung bei den PFD-EHTs zu. An Tag 15 ergab sich ein signifikanter Unterschied von +0,06 mN, an Tag 20 von +0,083 mN und an Tag 25 von +0,066 mN (alle mit $p < 0,05$).

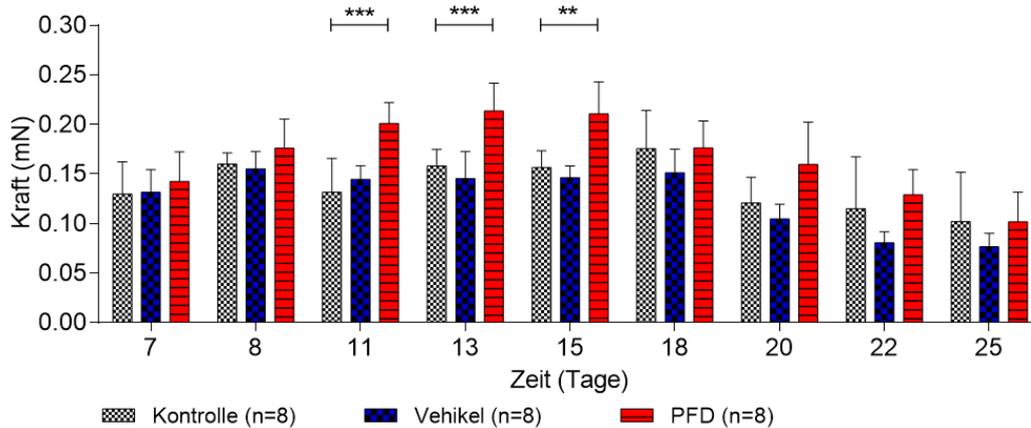


Abb. 19: Kraftmessungen der EHTs aus Testreihe Nr. 2 ohne Schwenktisch. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ (Two-way Anova).

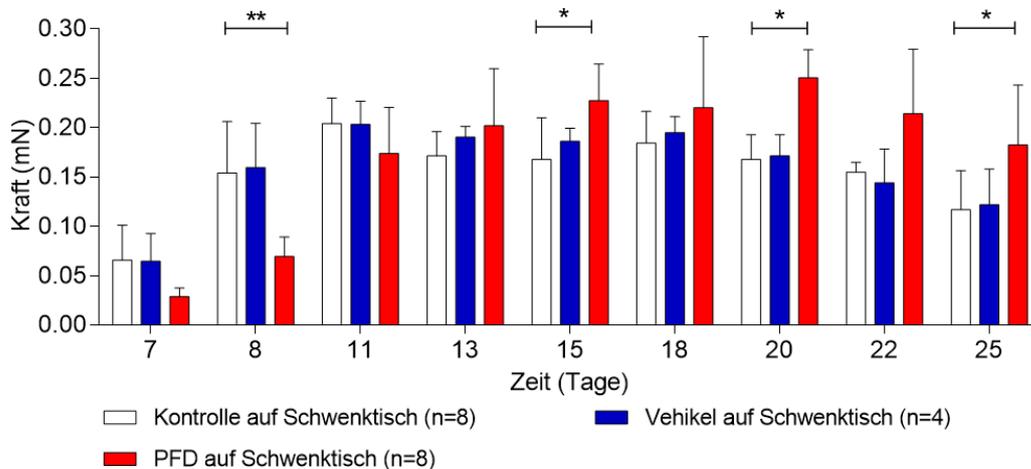


Abb. 20: Kraftmessungen an EHTs aus Testreihe Nr. 2 auf dem Schwenktisch. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ (Two-way Anova).

Die Kontroll-EHTs auf dem Schwenktisch entwickelten zu Beginn der Messung eine signifikant geringere Kraft (Tag 7: -0,064 mN, $p < 0,01$) als die Kontroll-EHTs, die ohne Schwenktisch inkubiert wurden (s. Abb. 21). Dies änderte sich aber ab Tag 11, an dem eine signifikant größere Kraftentwicklung von +0,073 mN ($p < 0,001$) bei den EHTs auf dem Schwenktisch gemessen wurde. An den folgenden Tagen der Messung entwickelten die EHTs auf dem Schwenktisch tendenziell größere Kräfte als die EHTs ohne Schwenktisch.

3. Ergebnisse

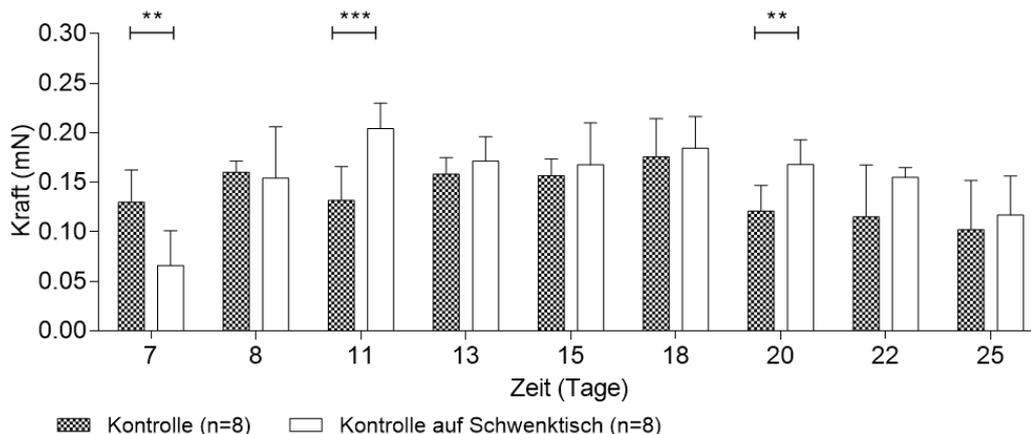


Abb. 21: Vergleich der Messwerte der Kontroll-EHTs aus Testreihe Nr. 2. Vergleich der Kraftmessungen: Kontrolle gegen Kontrolle auf Schwenktisch. . **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ (t-Test).

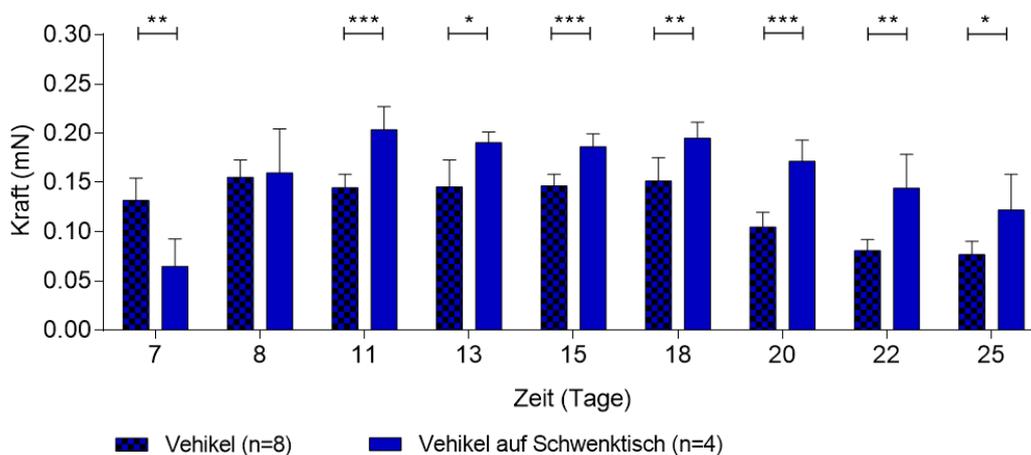


Abb. 22: Vergleich der Kraftmessungen zwischen Vehikel-EHTs ohne und mit Schwenktisch. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ (t-Test).

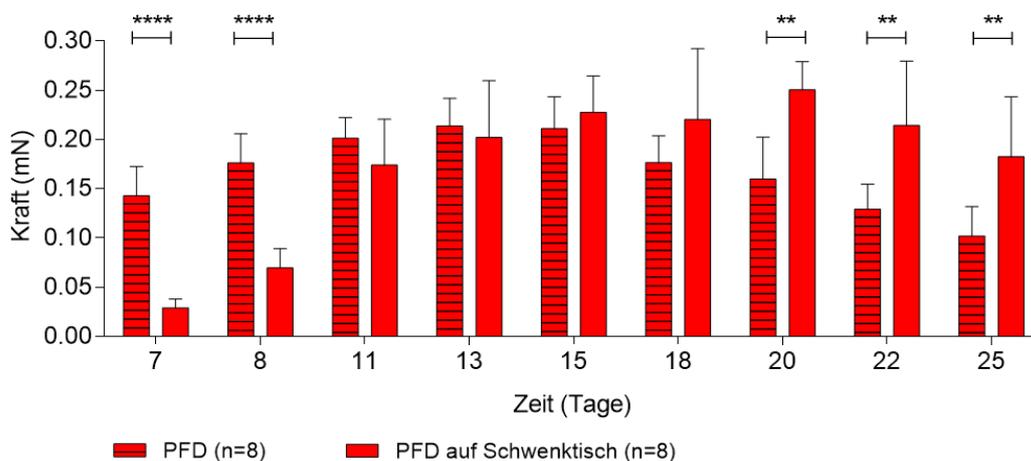


Abb. 23: Vergleich der Kraftmessungen zwischen PFD-EHTs ohne und mit Schwenktisch. **: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$ (t-Test).

Wie bei dem Vergleich der Kontroll-EHTs ohne und mit Konvektion auf dem Schwenktisch, ergab sich beim Vergleich der EHTs mit Vehikel-Behandlung ohne und mit Schwenktisch, dass die EHTs auf dem Schwenktisch anfangs signifikant geringere Kräfte entwickelten als die EHTs ohne Schwenktisch. Im Verlauf zeigten sich aber deutliche Kraftsteigerungen letzterer EHTs, sodass sich signifikant größere Kraftentwicklungen an den Tagen 11 bis 25 messen ließen als bei den EHTs ohne Schwenktisch (s. Abb. 22). Die EHTs mit der Sauerstoffträger-Behandlung zeigten beim Vergleich zwischen den EHTs ohne und mit Schwenktisch folgende Ergebnisse: Die EHTs ohne Schwenktisch entwickelten zu Beginn der Messungen (Tage 7 und 8; je $p < 0,001$) signifikant größere Kräfte als die EHTs auf dem Schwenktisch. An den darauf folgenden Tagen der Messungen steigerten die EHTs auf dem Schwenktisch ihre Kraftentwicklung bis zu ihrem Maximum an den Tagen 20 und 22, und erreichten signifikant größere Kräfte als die EHTs ohne Schwenktisch: Tage 20, 22 und 25 (jeweils $p < 0,01$). Die EHTs ohne Schwenktisch entwickelten ihre Kraftmaxima an den Tagen 13 und 15; bis zum Ende der Messungen nahm deren Kontraktionskraft dann stetig ab (s. Abb. 23).

In Testreihe Nr. 3 wurden die EHTs wie die EHTs wie in Tab. 14 gezeigt ohne Verwendung des Schwenktisches behandelt.

Tabelle 14: Behandlung der EHTs aus Testreihe Nr. 3

Bezeichnung	Behandlung	Anzahl
Kontrolle 40%	40% O ₂ , 7% CO ₂	7
Vehikel 40%	40% O ₂ , 7% CO ₂ + 0,003% Pluronic	4
PFD 40%	40% O ₂ , 7% CO ₂ + 1% PFD und 0,003% Pluronic	8
Kontrolle 21%	21% O ₂ , 7% CO ₂	8
Vehikel 21%	21% O ₂ , 7% CO ₂ + 0,003% Pluronic	8
PFD 21%	21% O ₂ , 7% CO ₂ + 1% PFD und 0,003% Pluronic	8

Wie auch bei den ersten beiden Testreihen bei 40% Sauerstoff (s. Abb. 18 und 19) erreichten die EHTs mit der Sauerstoffträger-Behandlung eine signifikant größere Kontraktionskraft als die Kontroll-EHTs. Bei 40% Sauerstoff ergaben sich signifikante Unterschiede an den Tagen 8 ($p < 0,001$) und 10 ($p < 0,05$; s. Abb. 24). Es ergab sich kein signifikanter Kraftunterschied zwischen den Kontroll-EHTs und den EHTs mit Vehikel-Behandlung. Bei den EHTs, die bei 21% Sauerstoff inkubiert wurden ergab sich auch ein signifikanter Kraftunterschied zwischen den Kontroll-EHTs und den EHTs mit Sauerstoffträger-Behandlung. Die EHTs mit der Sauerstoffträger-Behandlung entwickelten an Tag 10 +0,058

3. Ergebnisse

mN ($p < 0,01$), an Tag 13 $+0,057$ mN ($p < 0,05$) und an Tag 20 $+0,06$ mN ($p < 0,01$) mehr Kraft als die Kontroll-EHTs bei gleicher Sauerstoff-Inkubation (s. Abb. 25). Es zeigte sich auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen der Kraftentwicklung der Kontroll-EHTs und den EHTs mit Vehikel-Behandlung.

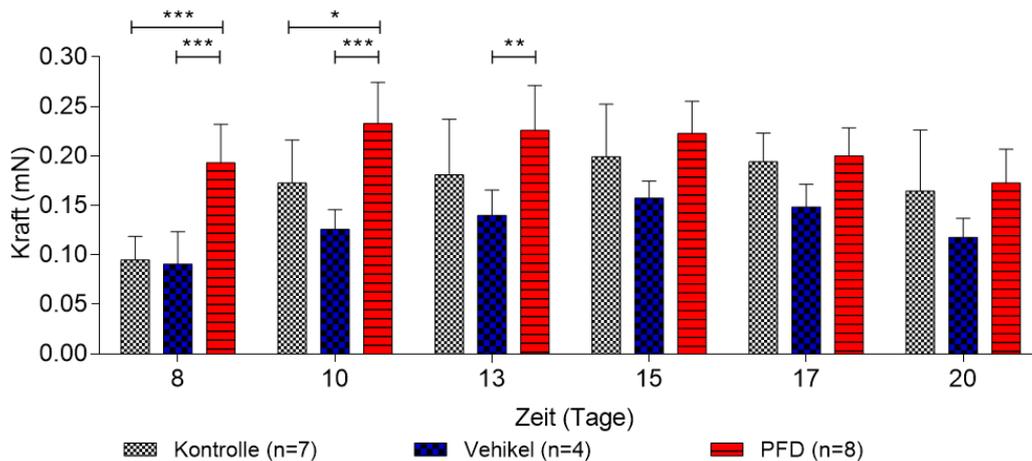


Abb. 24: Kraftmessungen von EHTs aus Testreihe Nr. 3 bei 40% Sauerstoff. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ (Two-way Anova).

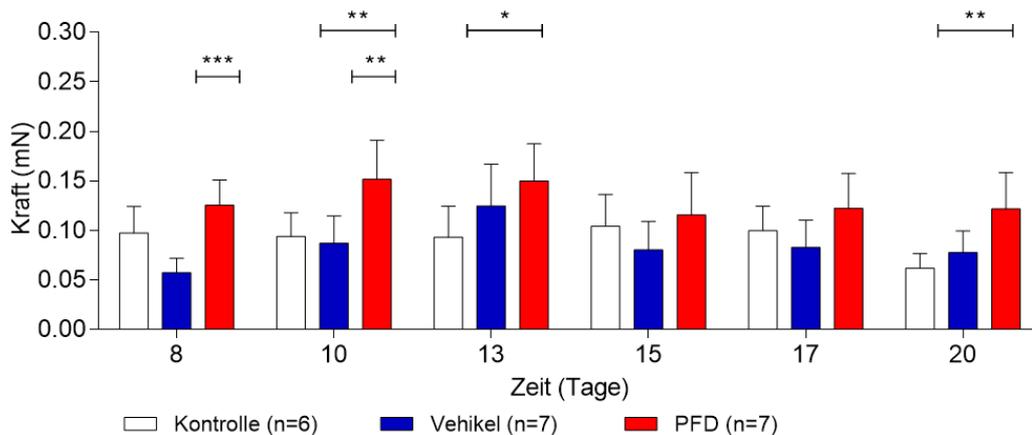


Abb. 25: Kraftmessungen von EHTs aus Testreihe Nr. 3 bei 21% Sauerstoff. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ (Two-way Anova).

Beim Vergleich der Kontroll-EHTs bei 40% Sauerstoff und 21% Sauerstoff ergaben sich an fast allen Messtagen signifikante Kraftunterschiede. Die EHTs bei 40% Sauerstoff entwickelten signifikant größere Kräfte: $+0,079$ mN ($p < 0,01$) an Tag 10, $+0,088$ mN ($p < 0,05$) an Tag 13, $+0,095$ mN ($p < 0,01$) an Tag 15, $+0,094$ mN ($p < 0,001$) an Tag 17 und $+0,1$ mN ($p < 0,01$) an Tag 20 (s. Abb. 26). Wie auch bei den Kontroll-EHTs, entwickelten die Vehikel-EHTs bei 40% Sauerstoff, größere Kräfte als die Vehikel-EHTs bei 21%

3. Ergebnisse

Sauerstoff. Die EHTs bei 40% Sauerstoff-Inkubation erreichten ihre Kraftmaxima an den Tagen 15 und 17 und entwickelten an diesen Tagen auch signifikant größere Kräfte als die EHTs mit 21% Sauerstoff-Inkubation (s. Abb. 27). Auch der Vergleich der EHTs mit der Sauerstoffträger-Behandlung bei 40% bzw. 21% Sauerstoff zeigte, dass die PFD-EHTs bei 40% Sauerstoff signifikant größere Kräfte entwickelten. An den Tagen 8, 10 und 13 mit $p < 0,01$, an den Tagen 15 und 17 mit $p < 0,001$ und an Tag 20 mit $p < 0,05$ (s. Abb. 28).

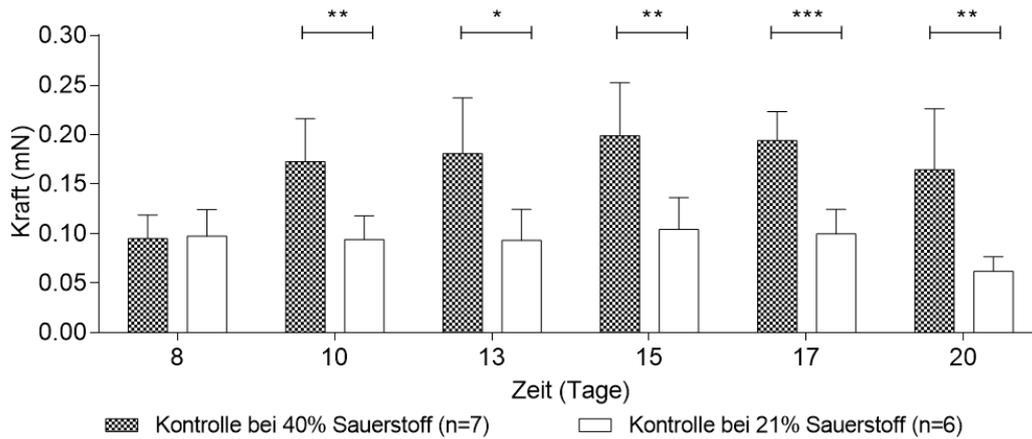


Abb. 26: Kraftvergleich zwischen Kontroll-EHTs aus Testreihe Nr.3 (s. Tab. 14) bei 40% und 21% Sauerstoff an verschiedenen Messtagen. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ (t-Test).

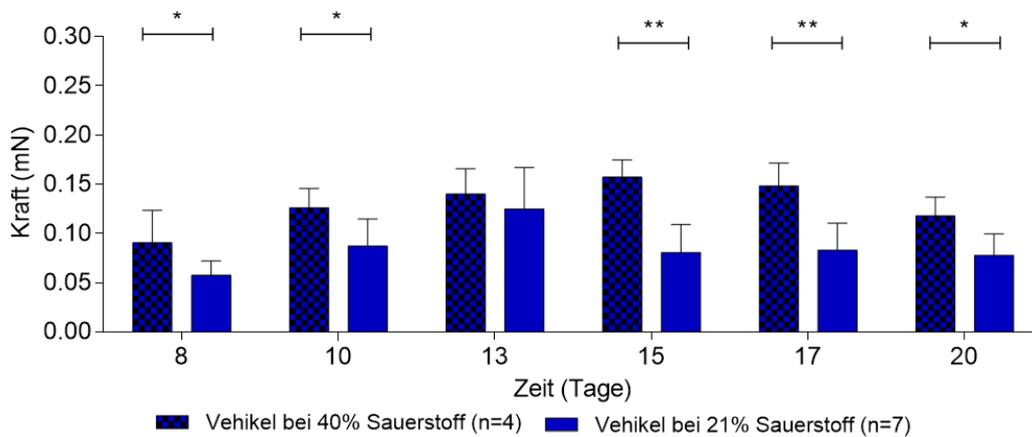


Abb. 27: Kraftvergleich zwischen Vehikel-EHTs aus Testreihe Nr.3 (s. Tab. 14) bei 40% und 21% Sauerstoff an verschiedenen Messtagen. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ (t-Test).

3. Ergebnisse

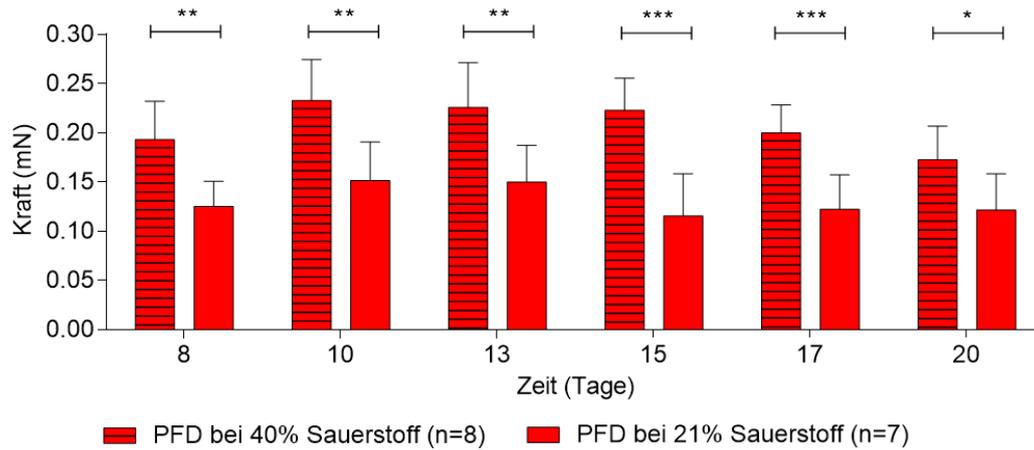


Abb. 28: Kraftvergleich zwischen PFD-EHTs aus Testreihe Nr.3 (s. Tab. 14) bei 40% und 21% Sauerstoff an verschiedenen Messtagen. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ (t-Test).

Um die Ergebnisse der Kontraktilitäts-Messungen zu verdeutlichen, sind sie in Tabelle 15 noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 15: Übersicht der Ergebnisse der Kontraktilitäts-Messungen der EHTs unter verschiedenen Kultivierungs-Bedingungen; Vergleich jeweils der oberen Zeile gegenüber der unteren (O: nicht angewendet; X: angewendet; +: signifikant gesteigerte Kontraktilität an mind. 2 Messtagen; ++: signifikant gesteigerte Kontraktilität an mind. 5 Messtagen, +/-: kein Unterschied).

PFD	Schwenktisch	40% Sauerstoff	Kontraktilität
O	X	X	+ im Vergleich zur unteren Zeile
O	O	X	
X	X	X	+ im Vergleich zur unteren Zeile
X	O	X	
O	O	X	++ im Vergleich zur unteren Zeile
O	O	O	
X	O	X	++ im Vergleich zur unteren Zeile
X	O	O	
X	O	X	+ im Vergleich zur unteren Zeile
O	O	X	
X	O	O	+ im Vergleich zur unteren Zeile
O	O	O	

3.3 Histologische Evaluation der EHTs

3.3.1 Pimonidazol-Färbung

3.3.1.1 Etablierung der Pimonidazol-Färbung in EHTs

Um die Proteine in der Hypoxie markieren zu können, wurde das Pimonidazol-Hydrochlorid in der Verdünnung 1:100 zu dem EHT-Medium in den wells der Kulturschalen gegeben und eine Stunde im Inkubator inkubiert. Dann wurden die EHTs in eine im Inkubator

3. Ergebnisse

vorinkubierte 30 mM BDM-Lösung überführt und zehn Minuten darin belassen. BDM (Butandionmonoxim) inhibiert einen transienten, auswärts-gerichteten Kaliumkanal (Xiao und McArdle 1995) und einen L-Typ-Kalzium-Kanal (Eisfeld et al. 1997) in der Herzmuskelzelle und es kann zu keiner Kontraktion mehr kommen. Die Zelle verbraucht keinen Sauerstoff mehr und es werden keine falsch-positiv hypoxischen Areale mit Pimonidazol-Hydrochlorid markiert.

Anschließend wurden die EHTs in PBS gewaschen und dann in je 1,5 ml 4 °C-kaltes Formaldehyd transferiert und über Nacht fixiert. Die Herstellung der Paraffin-Schnitte erfolgte wie in Punkt 2.9.1 beschrieben. Pimonidazol-Hydrochlorid kann mit dem Pimonidazol-Antikörper (*Pimonidazole antibody IgG₁ mouse*) detektiert werden. Dieser wurde in der Verdünnung von 1:50 verwendet. Nachdem man das Gewebe mit dem Zweitantikörper (*Biotin-conjugated F(ab')₂ antimouse second reagent*) behandelt hat, färben sich die hypoxischen Bereiche im Gewebe braun an (s. Abb. 29).

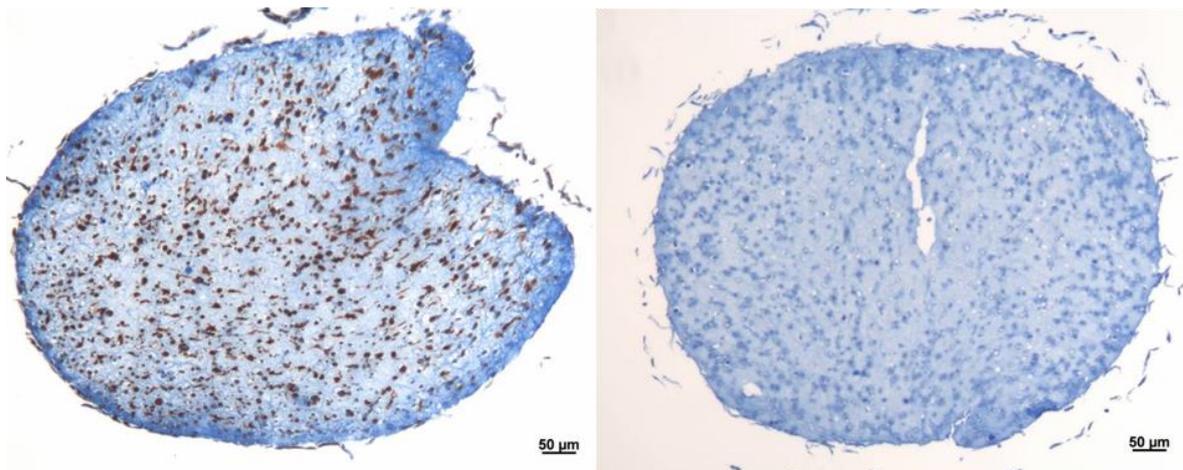


Abb. 29: Pimonidazol-Färbungen bei EHTs. Links: nach 4 Stunden Inkubation unter 5% O₂; Rechts: nach 4 Stunden Inkubation unter 53% O₂.

Die immunhistochemische Färbung wurde nach dem Ventana Färbeprotokoll (s. Anhang) mit der Färbemaschine Ventana benchmark xt in der Neuropathologie (Mauspathologie Facility) des UKE durchgeführt.

3.3.1.2 Bestimmung der hypoxischen Fläche

Um die hypoxische Fläche der Paraffinschnitte mit Pimonidazol-Färbung bestimmen zu können, wurde ein Lichtmikroskop und die Software Axiovision Release 4.8 verwendet. Mithilfe dieser konnten die Bereiche, die die braune hypoxiemarkierende Fläche darstellten,

fotografiert und gemessen werden und in Relation zur Gesamtfläche des jeweiligen EHTs gesetzt werden. So konnte ein Vergleich zwischen den EHTs mit unterschiedlichen Behandlungen gestellt werden.

3.3.1.3 Ergebnisse der Pimonidazol-Färbung in EHTs

Bei der Messung der mit der Pimonidazol-Färbung gefärbten hypoxischen Bereiche im EHT, gab es zwei verschiedene Testreihen. Die Testreihe A waren die EHTs, die bei 40% Sauerstoff und 7% Kohlenstoffdioxid über 21 Tage inkubiert wurden. Es gab in dieser Reihe zwei verschiedene Gruppen (s. Tab. 16; s. Abb. 30), die jeweils drei verschiedenen Behandlungen unterzogen wurden. Die Positivkontrolle stellte ein bei 5% Sauerstoff inkubiertes EHT dar.

Tabelle 16: *Behandlung der EHTs aus Testreihe A*

Bezeichnung	Behandlung (40% O₂, 7% CO₂)	Anzahl
Kontrolle		3
Vehikel	+ je 0,003% Pluronic	4
PFD	+ je 1% PFD mit 0,003% Pluronic	4
Kontrolle auf Schwenktisch	auf Schwenktisch im Inkubator	1
Vehikel auf Schwenktisch	auf Schwenktisch im Inkubator + je 0,003% Pluronic	2
PFD auf Schwenktisch	auf Schwenktisch im Inkubator + je 1% PFD und 0,003% Pluronic	3

Die Angabe der Messung erfolgte über die hypoxisch-markierte Fläche als Prozentangabe zum Verhältnis zur Gesamtschnittfläche des jeweiligen EHTs. Wie in Abbildung 31 erkennbar, zeigten die PFD-EHTs auf dem Schwenktisch eine sehr geringe hypoxische Fläche. Es gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kontroll-EHTs und den EHTs mit PFD-Behandlung, den Kontroll-EHTs auf dem Schwenktisch mit und ohne PFD-Behandlung. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied in der hypoxischen Fläche zwischen den Vehikel-EHTs ohne Schwenktisch und die EHTs mit PFD-Behandlung auf dem Schwenktisch ($p < 0,001$). Zudem wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den EHTs mit PFD-Behandlung und den EHTs mit PFD-Behandlung auf dem Schwenktisch deutlich ($p < 0,05$). Zu bemerken ist, dass die Kontroll-EHTs und die Vehikel-EHTs auf dem Schwenktisch aufgrund zu kleiner n-Zahlen nicht mit in die statistische Auswertung genommen werden konnten.

3. Ergebnisse

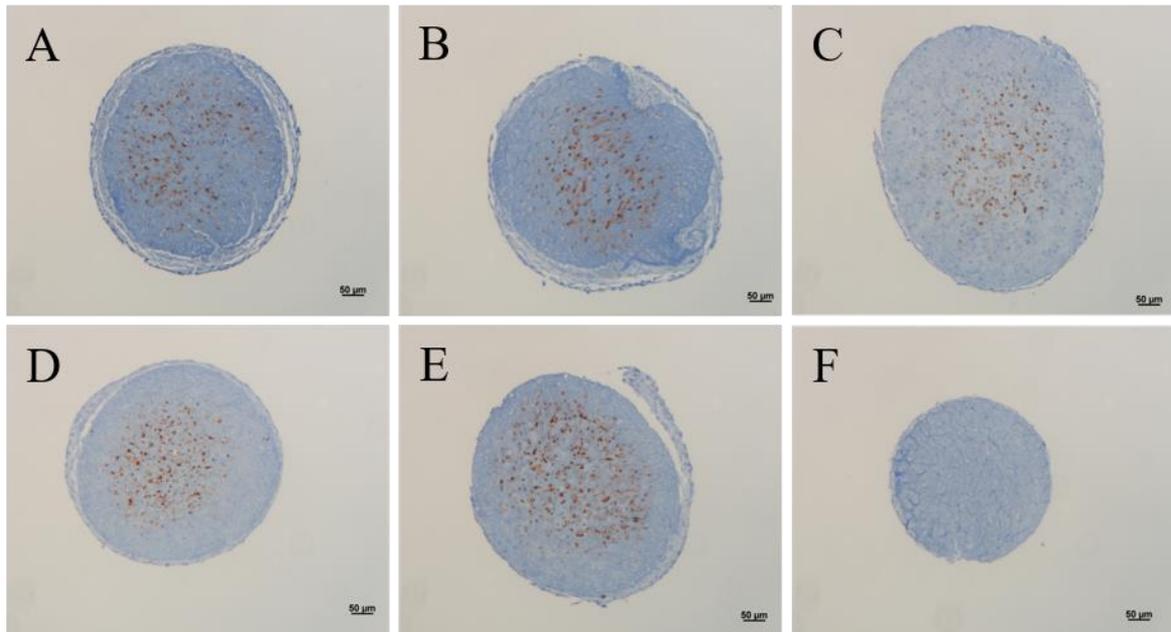


Abb. 30: Pimonidazol-Färbung von EHTs aus Testreihe A. A: Kontrolle, B: Vehikel, C: PFD, D: Kontrolle auf Schwenktisch, E: Vehikel auf Schwenktisch, F: PFD auf Schwenktisch (Maßstab: 50 µm).

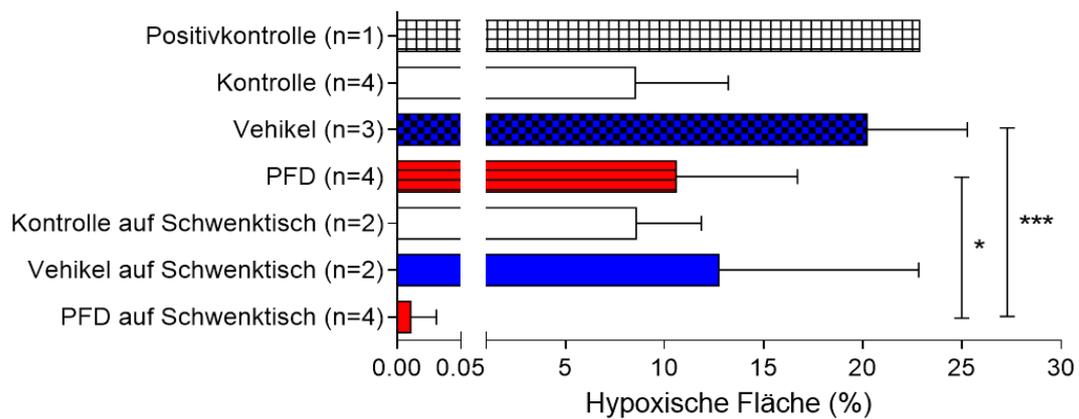


Abb. 31: Prozentualer Anteil der hypoxischen Fläche von der Gesamtfläche der EHTs aus Testreihe A. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$ (One-way Anova).

Testreihe B waren die EHTs, die bei 7% Kohlenstoffdioxid, aber zwei unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen inkubiert wurden (s. Tab. 17; s. Abb. 32).

Tabelle 17: Behandlung der EHTs aus Testreihe B

Bezeichnung	Behandlung	Anzahl
Kontrolle 40%	40% O ₂ , 7% CO ₂	3
Vehikel 40%	40% O ₂ , 7% CO ₂ + 0,003% Pluronic	1
PFD 40%	40% O ₂ , 7% CO ₂ + 1% PFD und 0,003% Pluronic	4
Kontrolle 21%	21% O ₂ , 7% CO ₂	3
Vehikel 21%	21% O ₂ , 7% CO ₂ + 0,003% Pluronic	3
PFD 21%	21% O ₂ , 7% CO ₂ + 1% PFD und 0,003% Pluronic	3

3. Ergebnisse

Es wurde kein signifikanter Unterschied der hypoxischen Fläche zwischen den Kontroll-EHTs bei 40% Sauerstoff und den Kontroll-EHTs bei 21% Sauerstoff festgestellt. Auch gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kontroll-EHTs bei 40% Sauerstoff und den EHTs bei 40% Sauerstoff und PFD-Behandlung. Es wurde eine signifikante Verringerung der hypoxischen Fläche bei den EHTs bei 40% Sauerstoff mit PFD-Behandlung im Gegensatz zu den EHTs bei 21% Sauerstoff mit Vehikel-Behandlung deutlich ($p < 0,01$; s. Abb. 33). Beim Vergleich der beiden Testreihen A und B zeigte sich eine große Variabilität der hypoxischen Flächen, da sich in Testreihe A insgesamt größere hypoxische Flächen zeigten (s. Abb. 31 und 33).

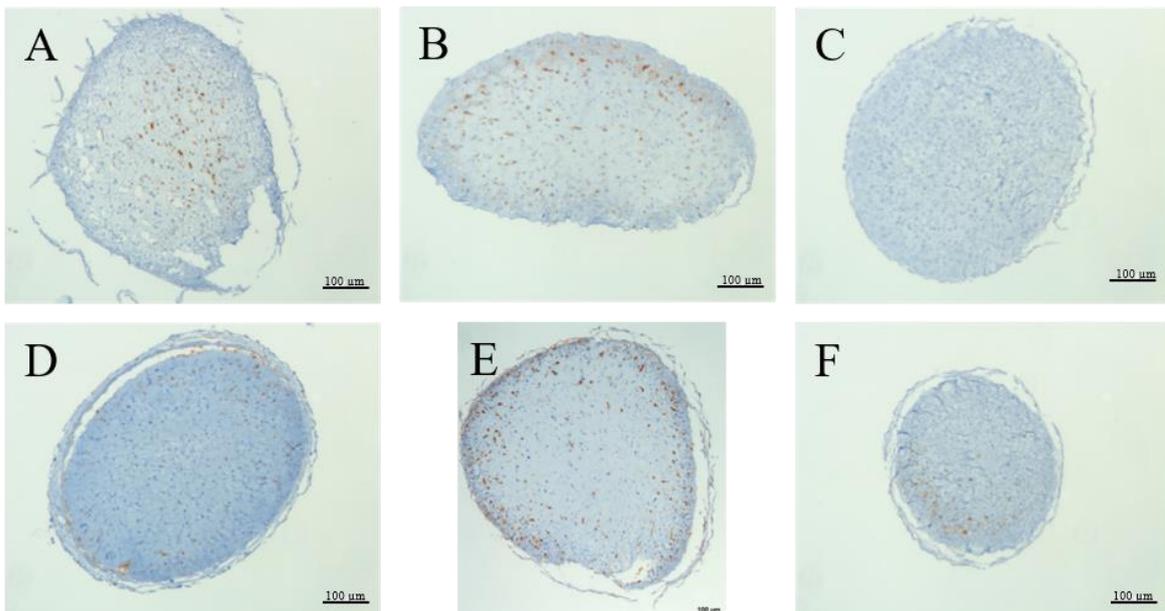


Abb. 32: Pimonidazol-Färbung von EHTs aus Testreihe B. A: Kontrolle 40% O₂, B: Vehikel 40% O₂, C: PFD 40% O₂, D: Kontrolle 21% O₂, E: Vehikel 21% O₂, F: PFD 21% O₂ (Maßstab: 100 µm).

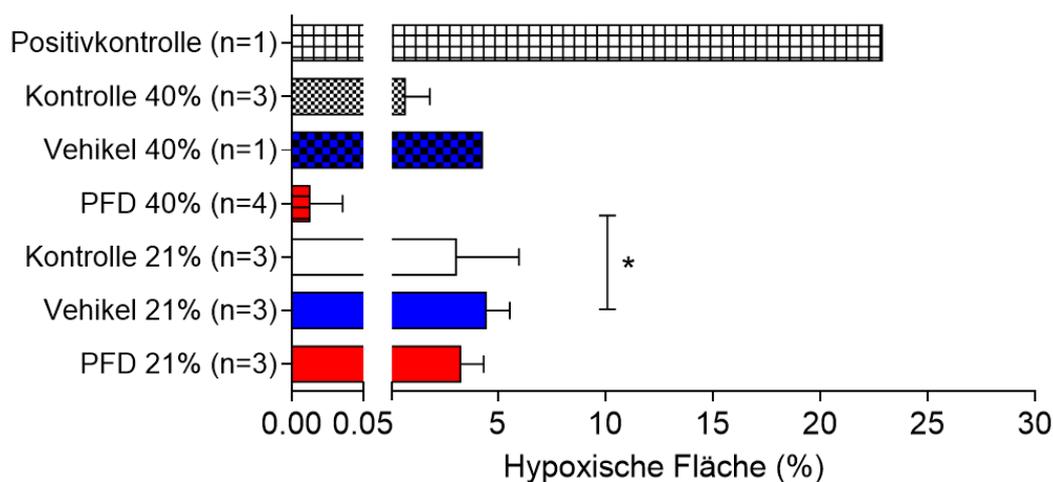


Abb. 33: Prozentualer Anteil der hypoxischen Fläche an Gesamtschnittfläche der EHTs aus Testreihe B. *: $p < 0,05$ (One-way Anova).

Tabelle 18: Übersicht der Ergebnisse der Messung der hypoxischen Flächen der EHTs unter verschiedenen Kultivierungs-Bedingungen (O: nicht angewendet, X: angewendet, +: vergrößerte Fläche, -: verkleinerte Fläche, +/-: kein Unterschied der Flächen).

PFD	Schwenktisch	40% Sauerstoff	Hypoxische Fläche
O	X	X	+/- im Vergleich zur unteren Zeile
O	O	X	
X	X	X	- im Vergleich zur unteren Zeile
X	O	X	
O	O	X	+/- im Vergleich zur unteren Zeile
O	O	O	
X	O	X	+/- im Vergleich zur unteren Zeile
X	O	O	
X	O	X	+/- im Vergleich zur unteren Zeile
O	O	X	
X	O	O	+/- im Vergleich zur unteren Zeile
O	O	O	

3.3.2 Dystrophin-Färbung und Quantifizierung

Bei den Auszählungen der Zellen der Gewebeschnitte, die mit dem Zytoskelett-Marker Dystrophin angefärbt wurden, gab es zwei verschiedene Testreihen. Testreihe A waren die EHTs, die bei 40% Sauerstoff und 7% Kohlenstoffdioxid über 21 Tage inkubiert wurden. Es gab in dieser Reihe zwei verschiedene Gruppen (s. Tab. 19), die jeweils drei verschiedenen Behandlungen unterzogen wurden.

3. Ergebnisse

Tabelle 19: Behandlung der EHTs aus Testreihe A

Bezeichnung	Behandlung (40 % O ₂ , 7 % CO ₂)	Anzahl
Kontrolle		3
Vehikel	+ je 0,003% Pluronic	4
PFD	+ je 1% PFD mit 0,003% Pluronic	4
Kontrolle auf Schwenktisch	auf Schwenktisch im Inkubator	1
Vehikel auf Schwenktisch	auf Schwenktisch im Inkubator + je 0,003% Pluronic	2
PFD auf Schwenktisch	auf Schwenktisch im Inkubator + je 1% PFD und 0,003% Pluronic	3

Die Angabe der Auszählung erfolgte als Zelldichte (Zellen/mm²) in den jeweiligen EHTs. Wie in Abbildung 34 sichtbar, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontroll-EHTs, den EHTs mit dem Sauerstoffträger Perfluorodecalin, den Kontroll-EHTs auf dem Schwenktisch und den EHTs mit der PFD-Behandlung auf dem Schwenktisch. Es zeigte sich auch keine signifikant höhere Zelldichte zwischen den EHTs mit PFD-Behandlung zu den EHTs mit PFD-Behandlung auf dem Schwenktisch. Zwischen den EHTs auf dem Schwenktisch wurde jeweils kein signifikanter Unterschied sichtbar. Eine signifikant höhere Zellzahl zeigte sich bei den PFD-EHTs auf dem Schwenktisch im Gegensatz zu den Vehikel-EHTs ohne Schwenktisch ($p < 0,05$).

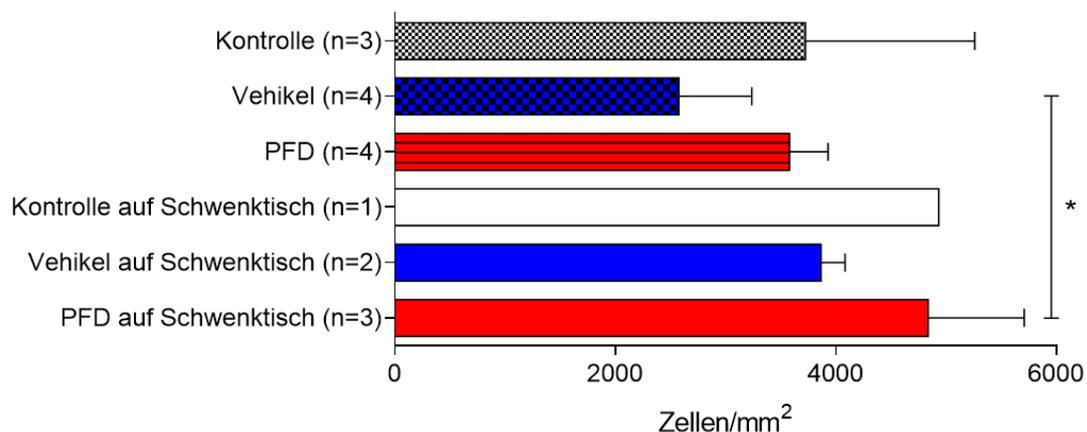


Abb. 34: Zelldichte im EHT aus Testreihe A unter verschiedenen Bedingungen. *: $p < 0,05$ (One-way Anova).

Bei Testreihe B wurden die EHTs in zwei Gruppen über 21 Tage bei unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen inkubiert. Die Behandlung der EHTs erfolgte nach Tab. 20. Wie in Abbildung 35 sichtbar, zeigte sich ein signifikante Reduktion der Zellzahl bei den Vehikel-EHTs bei 21% Sauerstoff im Gegensatz zu den PFD-EHTs, die bei 40% Sauerstoff inkubiert wurden ($p < 0,05$). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Zelldichte zwischen den Kontroll-EHTs und den EHTs mit PFD-Behandlung, weder bei 40%iger noch bei 21%iger Sauerstoffinkubation.

3. Ergebnisse

Tabelle 20: *Behandlung der EHTs aus Testreihe B*

Bezeichnung	Behandlung	Anzahl
Kontrolle 40%	40% O ₂ , 7% CO ₂	3
Vehikel 40%	40% O ₂ , 7% CO ₂ + 0,003% Pluronic	1
PFD 40%	40% O ₂ , 7% CO ₂ + 1% PFD und 0,003% Pluronic	4
Kontrolle 21%	21% O ₂ , 7% CO ₂	3
Vehikel 21%	21% O ₂ , 7% CO ₂ + 0,003% Pluronic	3
PFD 21%	21% O ₂ , 7% CO ₂ + 1% PFD und 0,003% Pluronic	3

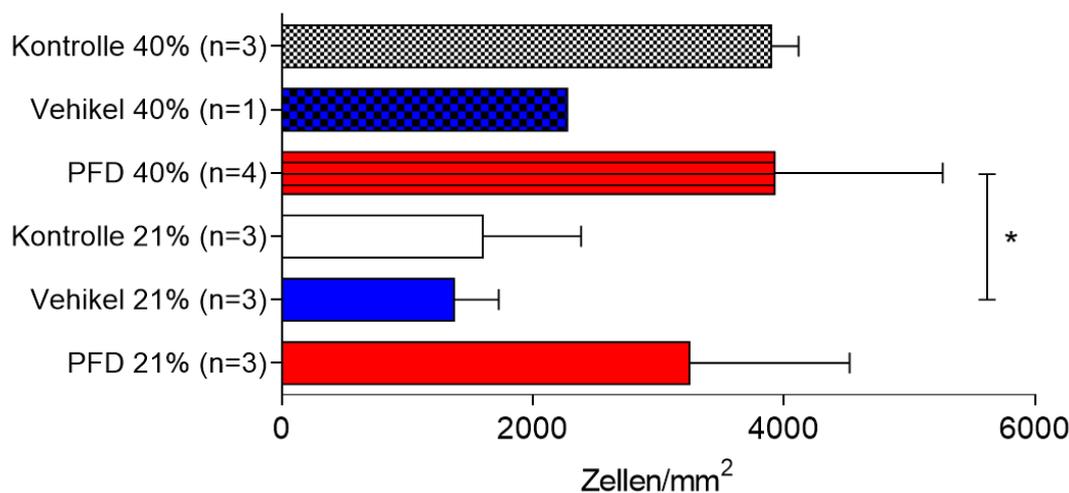


Abb. 35: *Zellichte in EHTs aus Testreihe B unter verschiedenen Bedingungen. **: $p < 0,01$ (One-way Anova).*

3.4 RNA-Quantifizierung mittels rt-PCR-Methode

Durch die RNA-Quantifizierung mittels rt-PCR-Methode konnte bestimmt werden, wie stark die RNA für die Proteinbiosynthese in den EHTs reguliert wurde.

Es wurde die RNA von HIF-1 α , einem Marker für Hypoxie, Casp3 (Caspase 3), einem Marker für die Apoptose und VEGF α (*Vascular endothelial growth factor*), einem Marker für verstärkte Induktion von Gefäßwachstum u.a. bei Hypoxie, bestimmt. Zudem wurde die Expression von EglN3 bzw. PHD3 (*Prolyl hydroxylase domain-containing Protein 3*), einem weiteren Marker für Hypoxie, der u.a. an der Regulation von HIF-1 α beteiligt ist (Appelhoff et al. 2004), gemessen. Die RNA von Bnip3 (*Bcl-2/ adenovirus E1B 19-kDa interacting protein 3*), einem pro-apoptotischen und durch HIF-1 α in der Hypoxie hochregulierten Protein (Dlamini et al. 2015), wurde zusätzlich bestimmt.

Es wurde eine Messreihe A durchgeführt, bei der die EHTs wie die EHTs der Testreihe A (s. Tab. 19) kultiviert wurden.

3. Ergebnisse

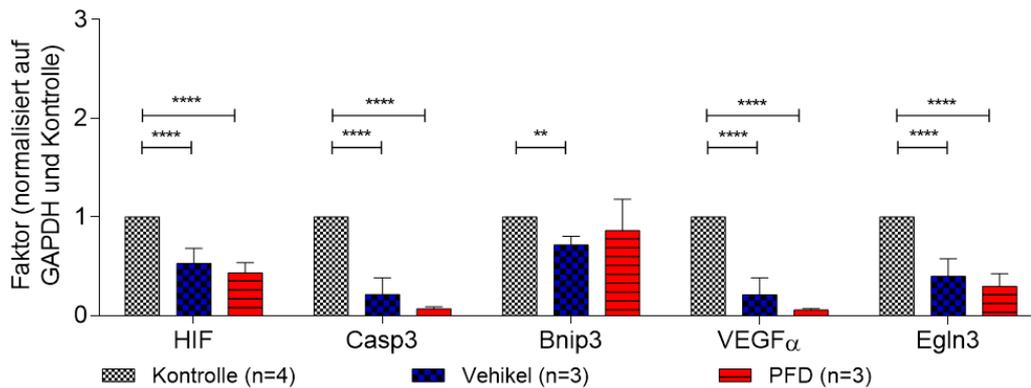


Abb. 36: Messreihe A: RNA-Expression im Vergleich zu den Kontroll-EHTs bei 40% Sauerstoff ohne Schwenktisch. **: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$ (Two-way Anova).

Beim Vergleich der RNA-Expression der Kontroll-EHTs mit den Vehikel-EHTs und den PFD-EHTs ohne Schwenktisch bei 40% Sauerstoff, zeigten sich einige signifikante Unterschiede: HIF, Casp3, VEGF α und EglN3 wurden bei den EHTs mit PFD-Behandlung signifikant weniger exprimiert als bei den Kontroll-EHTs (alle $p < 0,0001$). Bei der Expression von Bnip3 zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Auch beim Vergleich der Expression von Bnip3 zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Auch beim Vergleich der Kontroll-EHTs mit den Vehikel-EHTs zeigte sich, dass HIF, Casp3, VEGF α und EglN3 mit $p < 0,0001$ und Bnip3 mit $p < 0,01$ signifikant geringer exprimiert wurden (s. Abb. 36).

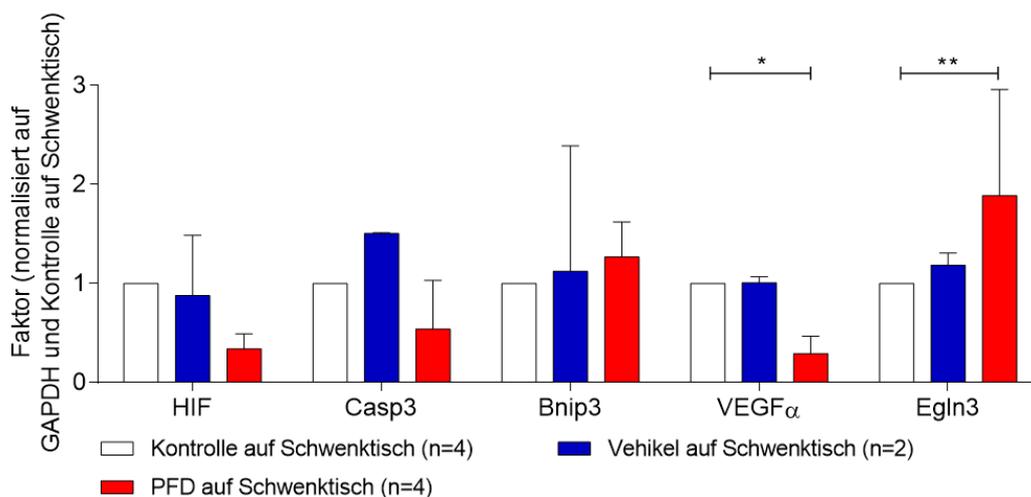


Abb. 37: Messreihe A: RNA-Expression im Vergleich zu den Kontroll-EHTs bei 40% Sauerstoff auf dem Schwenktisch. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ (Two-way Anova).

3. Ergebnisse

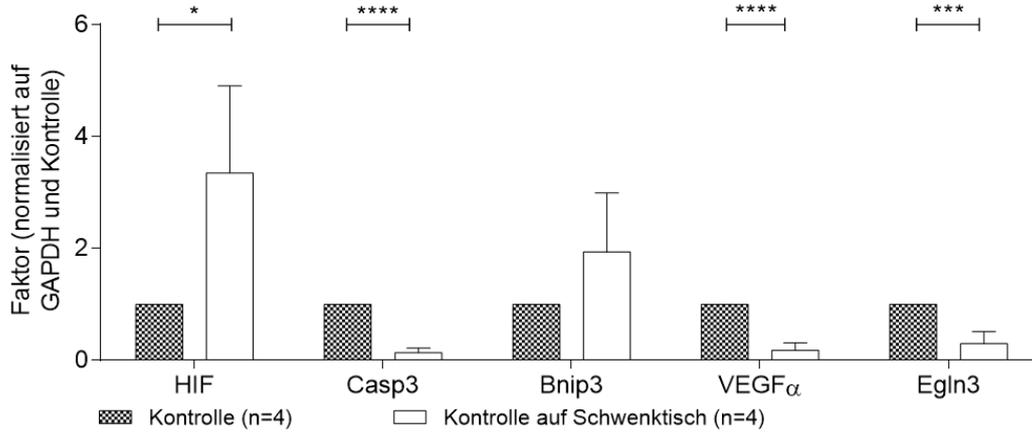


Abb. 38: Messreihe A: RNA-Expression der Kontroll-EHTs ohne Schwenktisch im Vergleich zu den Kontroll-EHTs auf dem Schwenktisch (alle bei 40% Sauerstoff). *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$ (t-Test).

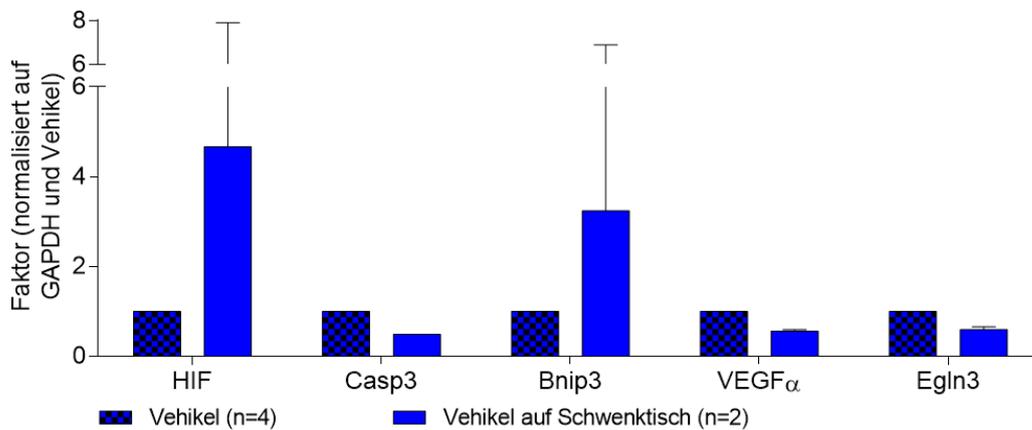


Abb. 39: Messreihe A: RNA-Expression der Vehikel-EHTs ohne Schwenktisch im Vergleich zu den Vehikel-EHTs auf dem Schwenktisch (alle bei 40% Sauerstoff).

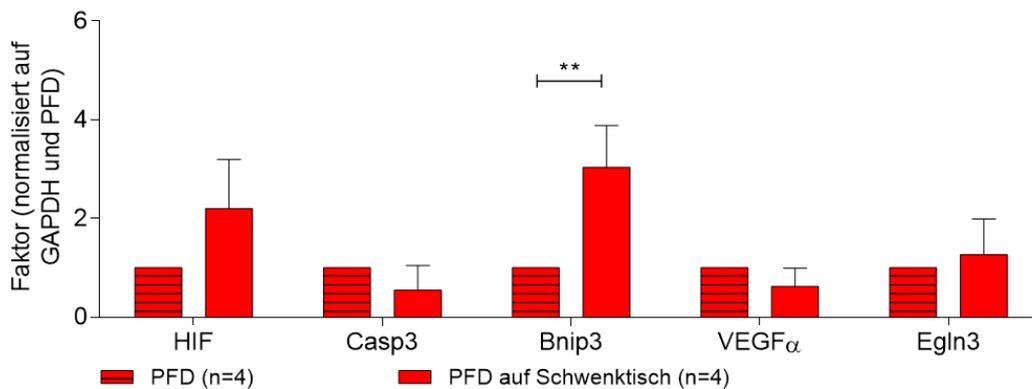


Abb. 40: Messreihe A: RNA-Expression der PFD-EHTs ohne Schwenktisch im Vergleich zu den PFD-EHTs auf dem Schwenktisch (alle bei 40% Sauerstoff). **: $p < 0,01$ (t-Test).

3. Ergebnisse

Beim Vergleich der RNA-Expression der EHTs auf dem Schwenktisch bei 40% Sauerstoff (s. Abb. 37), zeigte sich, neben einer signifikant verminderten Expression von VEGF α im Vergleich von Kontroll-EHTs mit PFD-EHT ($p < 0,05$), eine erhöhte Expression von Egl n 3 im Vergleich von Kontroll-EHTs mit PFD-EHTs ($p < 0,01$). Die Vehikel-EHTs auf dem Schwenktisch konnten aufgrund der zu geringen n-Anzahl nicht in die statistische Berechnung einbezogen werden (s. Abb. 37 und 39). Die Kontroll-EHTs ohne Schwenktisch exprimierten signifikant weniger HIF ($p < 0,05$), aber signifikant mehr Casp3, VEGF α (beide $p < 0,0001$) und Egl n 3 ($p < 0,001$) als die Kontroll-EHTs auf dem Schwenktisch (s. Abb. 38). Signifikant weniger Bnip3 ($p < 0,01$) exprimierten die PFD-EHTs ohne Schwenktisch als die Kontroll-EHTs auf den Schwenktisch (s. Abb. 40). Zudem wurde eine Messreihe B durchgeführt, bei der die EHTs wie die EHTs der Testreihe B (s. Tab. 20) kultiviert wurden.

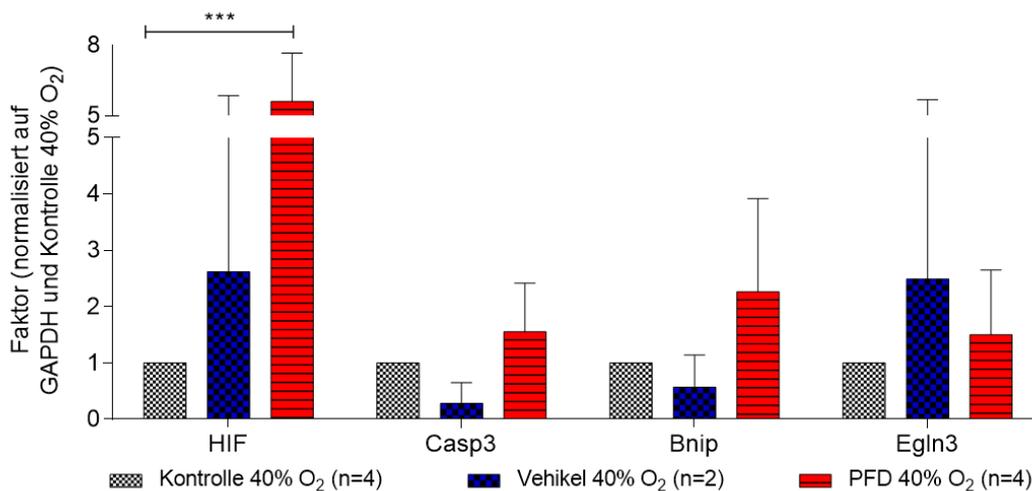


Abb. 41: Messreihe B: RNA-Expression im Vergleich zu den Kontroll-EHTs bei 40% Sauerstoff. Analyse durch Two-way Anova, ***: $p < 0,001$.

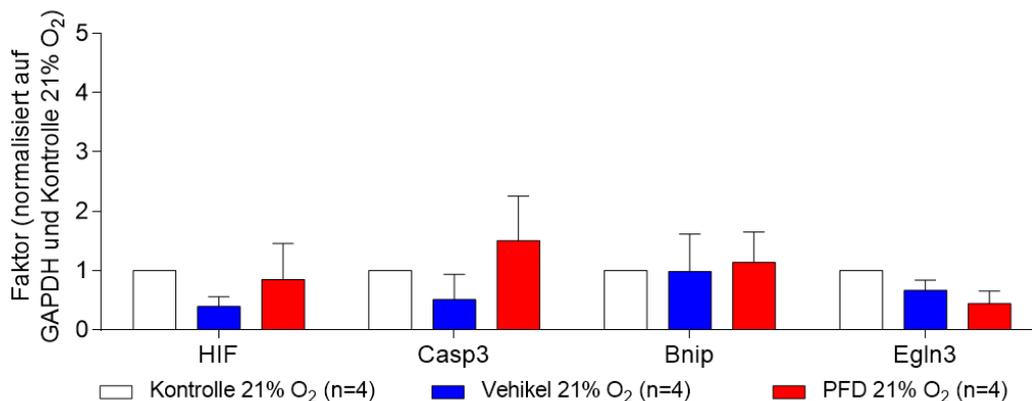


Abb. 42: Messreihe B: RNA-Expression im Vergleich zu den Kontroll-EHTs bei 21% Sauerstoff.

3. Ergebnisse

Bei der Analyse der Ergebnisse der Messung der EHTs, die bei 40% Sauerstoff kultiviert wurden, zeigte sich, dass die EHTs, die mit dem Sauerstoffträger PFD behandelt wurden, eine signifikant erhöhte RNA-Expression von HIF-1 α aufwiesen als die Kontrollen ($p < 0,001$, *Two-way Anova*). Bei den übrigen Messungen wurden keine Unterschiede bei der RNA-Expression deutlich (s. Abb. 41). Bemerkenswert ist, dass die PFD-EHTs bei 40% Sauerstoff in Testreihe A geringere RNA-Expressionsmuster aufweisen als die Kontroll-EHTs, in Testreihe B es sich aber genau andersherum verhält (Vergleich Abb. 36 und 41). Die Vehikel-EHTs bei 40% Sauerstoff konnten aufgrund zu geringer n-Anzahl nicht in die statistische Berechnung einbezogen werden.

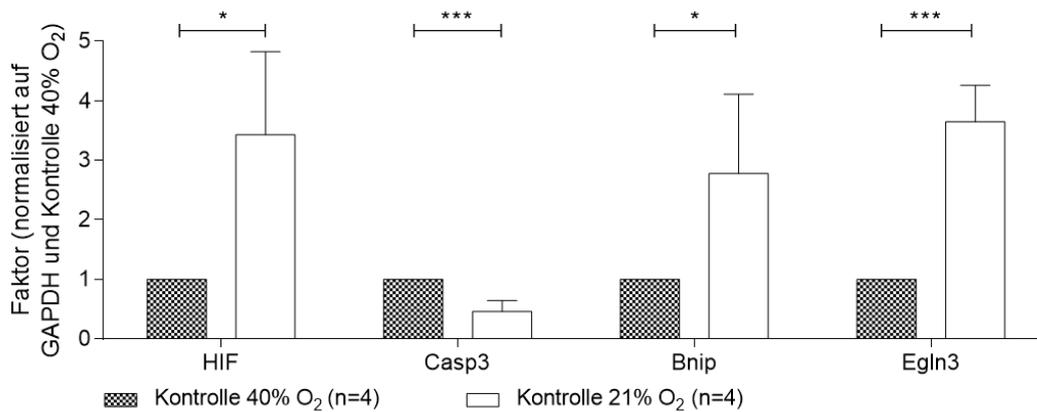


Abb. 43: Messreihe B: RNA-Expression der Kontroll-EHTs bei 21% Sauerstoff im Vergleich zu den Kontroll-EHTs bei 40% Sauerstoff. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$ (t.Test).

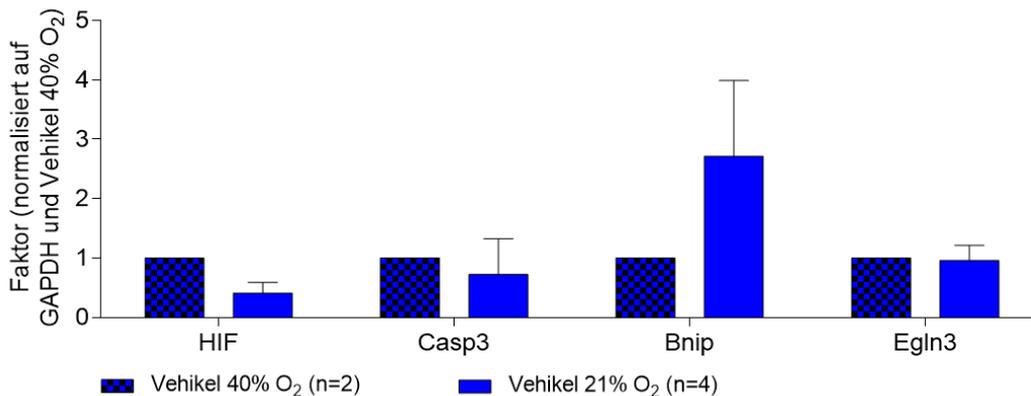


Abb. 44: Messreihe B: RNA-Expression der Vehikel-EHTs bei 21% Sauerstoff im Vergleich zu den Vehikel-EHTs bei 40% Sauerstoff.

3. Ergebnisse

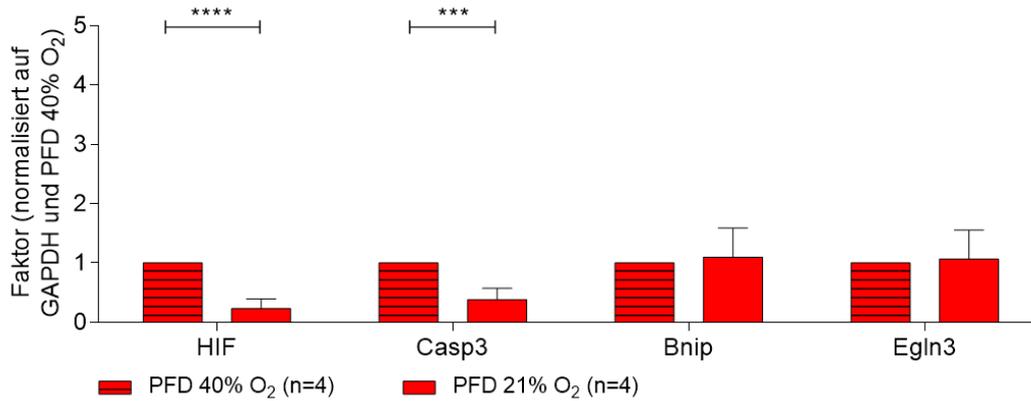


Abb. 45: Messreihe B: RNA-Expression der PFD-EHTs bei 21% Sauerstoff im Vergleich zu den PFD-EHTs bei 40% Sauerstoff. ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$ (t-Test).

Bei der Analyse der Ergebnisse der Messung der EHTs, die bei 21% Sauerstoff kultiviert wurden, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den EHTs mit unterschiedlichen Behandlungen (s. Abb. 42).

Bei dem Vergleich der Kontroll-EHTs, die bei 40% bzw. 21% Sauerstoff kultiviert wurden (s. Abb. 43), zeigte sich eine signifikant höhere Expression von HIF-1 α um den Faktor 3,4 ($p < 0,05$), Bnip um den Faktor 2,8 ($p < 0,05$) und EglN3 um den Faktor 3,7 ($p < 0,001$) bei den EHTs, die bei 21% Sauerstoff kultiviert wurden. Casp3 wurde um den Faktor 0,5 ($p < 0,001$; alle Analysen mittels t-Test) weniger exprimiert. Die Vehikel-EHTs konnten aufgrund zu geringer n-Anzahl nicht in die statistische Erhebung mit einbezogen werden (s. Abb. 44). Die PFD-EHTs bei 21% Sauerstoff exprimierten HIF-1 α um den Faktor 0,23 ($p < 0,0001$) und Casp3 um den Faktor 0,38 ($p < 0,001$) weniger als die PFD-EHTs bei 40% Sauerstoff (s. Abb. 45). Bei den übrigen Vergleichen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der RNA-Expression. Die Ergebnisse der gesamten RNA-Messungen wurden noch einmal in Tabelle 21 zusammengefasst.

3. Ergebnisse

Tabelle 21: Übersicht der Ergebnisse der Messung der RNA-Expression der EHTs unter verschiedenen Kultivierungs-Bedingungen; Vergleich der jeweils oberen Zeile mit der unteren (X: Anwendung, O: keine Anwendung, ST: Schwenktisch, ↑: gesteigerte Expression, ↓: geringere Expression, +/-: kein Unterschied in der Expression, %: nicht gemessen, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$; Versuch 1 und 2 erfolgten unter gleichen Bedingungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten; in der Tab. wird jeweils der obere Teil der Zeile mit der unteren verglichen).

	PFD	ST	40% O ₂	HIF-1α	Casp3	Bnip3	VEGF	Egln3
Versuch 1: gegenüber	X	O	X	↓****	↓****	+/-	↓****	↓****
	O	O	X					
Versuch 2: gegenüber	X	O	X	↑****	+/-	+/-	%	+/-
	O	O	X					
gegenüber	X	X	X	+/-	+/-	+/-	↓*	↑**
	O	X	X					
gegenüber	O	O	X	↓*	↑****	+/-	↑****	↑****
	O	X	X					
gegenüber	X	O	X	+/-	+/-	↓**	+/-	+/-
	X	X	X					
gegenüber	X	O	O	+/-	+/-	+/-	%	+/-
	O	O	O					
gegenüber	O	O	X	↓*	↑****	↓*	%	↓****
	O	O	O					
gegenüber	X	O	X	↑****	↑****	+/-	%	+/-
	X	O	O					

3.5 Proteinquantifizierung (HIF-1α) mittels Westernblot-Methode

Die Bestimmung der Expression des Proteins *Hypoxia-inducible-factors-1-alpha* (HIF-1α) mittels Westernblot-Methode wurde an zwei verschiedenen Versuchsreihen durchgeführt. Dabei wurden die Messergebnisse jeweils auf die Ladekontrolle normalisiert. Bei Versuchsreihe A wurden die EHTs unter sechs verschiedenen Bedingungen kultiviert (s. Tab. 19). Die Auswertung ergab folgende Ergebnisse:

Bei der Analyse der Ergebnisse zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von HIF-1α (s. Abb. 46; Analyse mittels *One-way* Anova). Die Vehikel-EHTs auf dem Schwenktisch konnten nicht mit in die statistische Berechnung aufgenommen werden, da eine zu geringe n-Zahl vorlag.

3. Ergebnisse

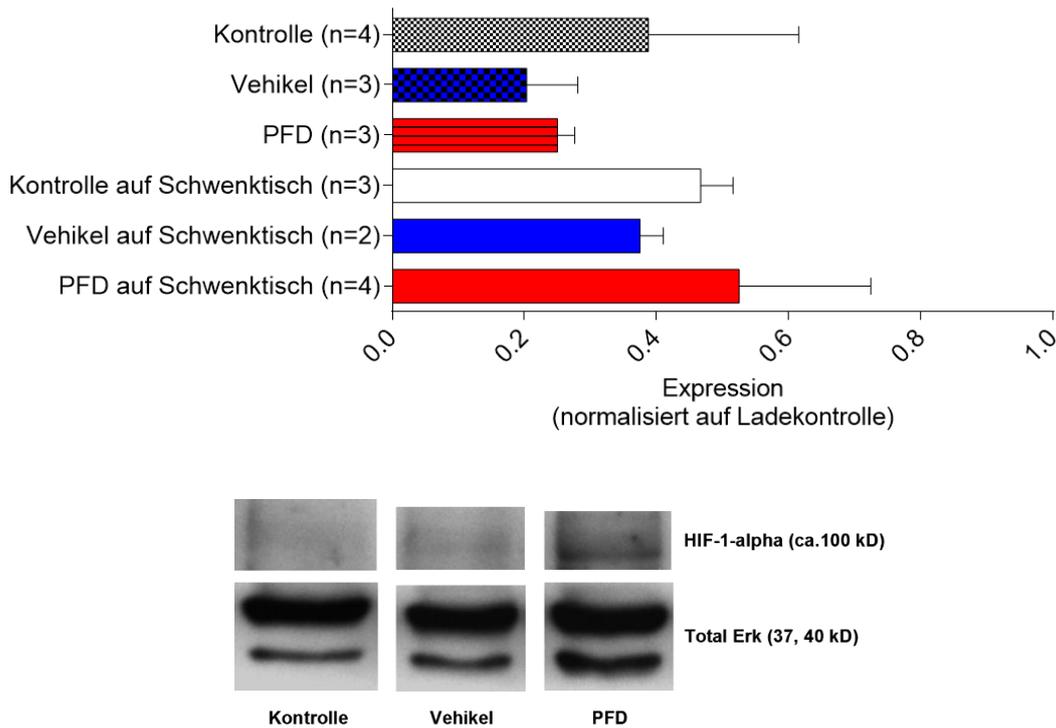


Abb. 46: Oben: Expression von HIF-1 α in EHTs aus Versuchsreihe A (Mittelwerte mit Standardabweichung, One-way Anova); unten: Westernblot der Proteine HIF-1 α und Total Erk der Kontroll-, der Vehikel- und der PFD-EHTs.

Bei Versuchsreihe B wurden die EHTs unter sechs verschiedenen Bedingungen kultiviert (s. Tab. 18). Bei der Analyse der Ergebnisse zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression von HIF-1 α unter allen Bedingungen (s. Abb. 47, Analyse mittels One-way Anova). Die Vehikel-EHTs bei 40% Sauerstoff sowie die PFD-EHTs bei 40% Sauerstoff mussten wegen zu geringer n-Zahl aus der statistischen Berechnung herausgenommen werden.

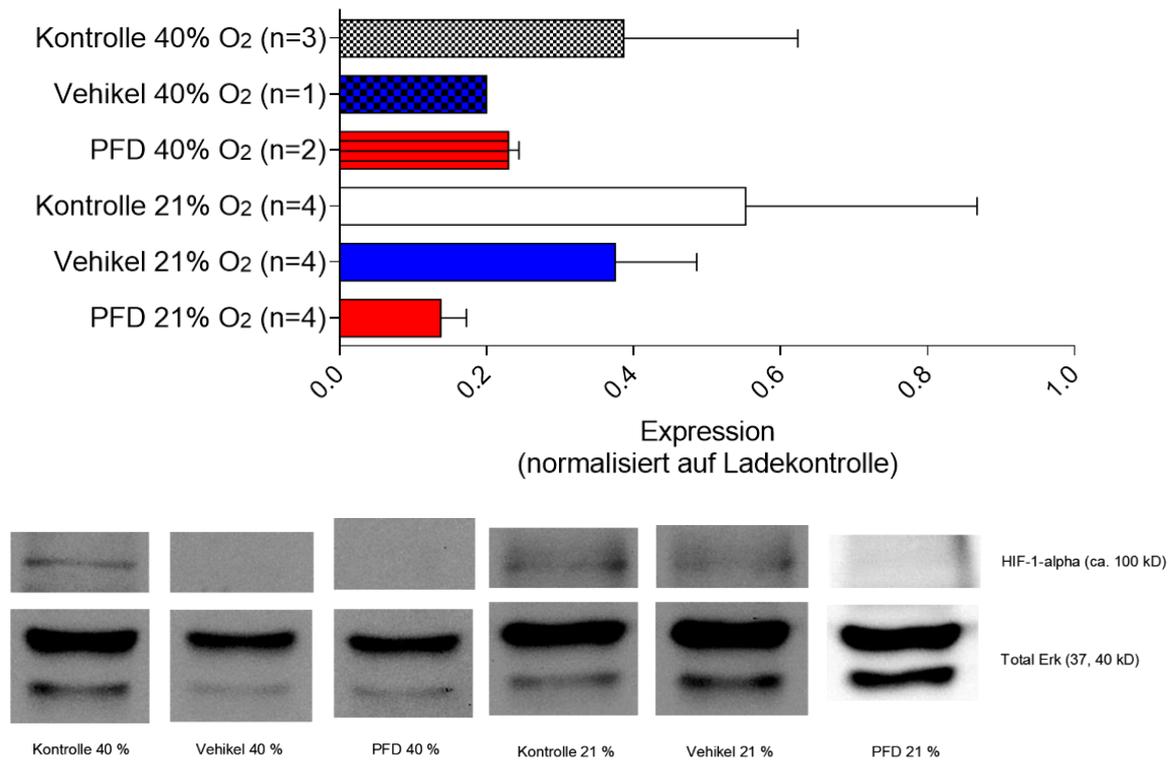


Abb.47: Oben: Expression von HIF-1α in EHTs aus Versuchsreihe B (One-way Anova; Mittelwerte mit Standardabweichung); unten: Fluoreszenzstärke der Proteine HIF-1α und Total Erk.

3.6 Sauerstoffmessung

3.6.1 Etablierung der Sauerstoffmessung in EHTs

Da die EHTs im 24-well-Format mit ihrer Größe von 12 x 3 x 3 mm zu klein für die Sauerstoffmessung mit der Sauerstoffsonde waren, mussten EHTs im 6-well-Format bzw. 2-p-Format mit einer Größe von 7 x 25 x 5 mm verwendet werden (s. Abb. 48). Auch diese besitzen einen annähernd runden Querschnitt wie die 24-well-EHTs. Die Herstellung der 6-well-EHTs erfolgte wie die der 24-well-EHTs (s. Punkt 2.6), mit an die Größe angepassten Mengen der Inhaltsstoffe. Das Endvolumen betrug das 11fache des Volumens eines 24-well-EHT und besaß die gleichen Endkonzentrationen (s. Punkt 2.6.2).

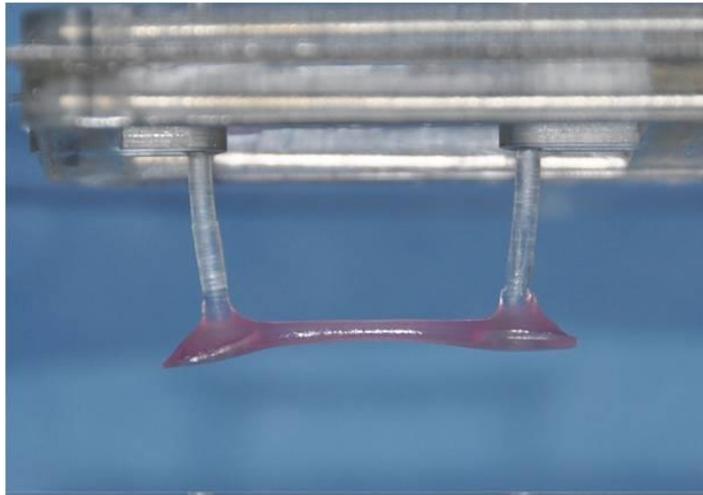


Abb. 48: EHT im 6-well- bzw. 2-p-Format an zwei Silikonhalterungen (Quelle: UKE, Institut für experimentelle Pharmakologie und Toxikologie, unbekannter Urheber).

3.6.2 Aufbau der Vorrichtung für die Sauerstoffmessung

Die Vorrichtung mit dem Schrittmotor, der die Sauerstoffsonde durch das Gewebe bewegt, wurde in der hauseigenen Werkstatt auf eine Halterungsplatte befestigt und an ein Zahnradsystem angeschlossen, sodass die rotierende Motorbewegung in eine lineare umgeformt werden konnte (Bülent Aksehirlioglu). Die Sauerstoffsonde konnte dann in der Halterung befestigt und so kontrolliert vorwärts und rückwärts bewegt werden (s. Abb. 49). Dieses wurde durch den Anschluss an einem Computer mit dem Programm MotStep ermöglicht. Bei diesem konnte die Rotation des Schrittmotors und somit eine definierte Fortbewegungsgeschwindigkeit der Sauerstoffsonde festgelegt werden. Zusätzlich war es möglich die Dauer der Fortbewegung anzugeben.

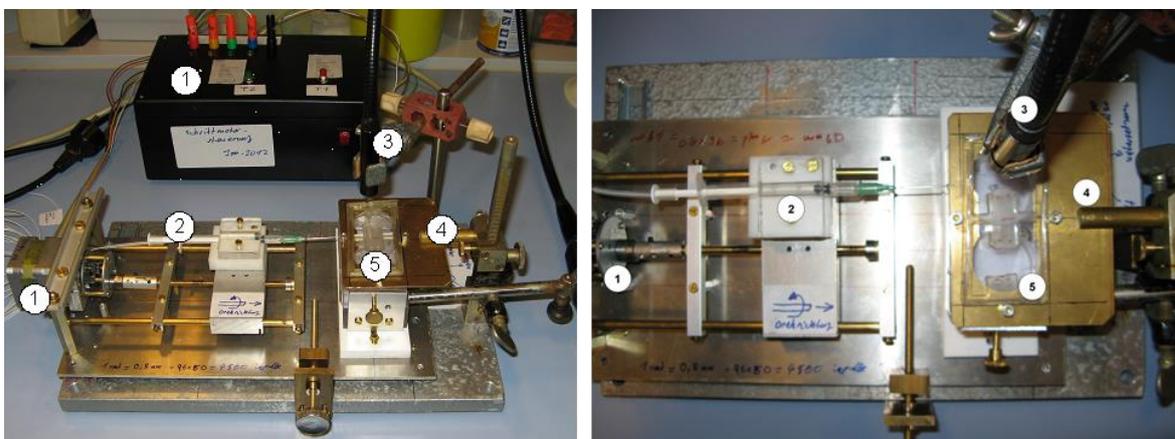


Abb. 49: Sauerstoff-Messapparatur. Links: Gesamtansicht; Rechts: Aufsicht. Nummerierung: 1: Schrittmotor, 2: Sauerstoffsonde, 3: Mikroskopkamera, 4: Hebebühne, 5: Silikonhalterung mit EHT in well.

3.6.3 Vorbereitung der Sauerstoffmessung

Bevor die Sauerstoffmessung im Medium oder Gewebe erfolgen konnte, mussten die Sauerstoff- und Temperatursonde nach Hersteller-Protokoll kalibriert werden. Dazu wurden zwei Kalibrationsgefäße, eins mit 0% Sauerstoffsättigung (100% Stickstoff) und das andere mit einer 21%igen Sauerstoffsättigung bei wasserdampfgesättigter Luft, genutzt. Die Sauerstoffsonde wurde nun mit dem Microx-TX-Gerät und mit der Software *OxyView-TX3-V6.02* verbunden. Nach Kalibrierung der Sonde wurde diese nun in der Haltapparatur des Schrittmotors befestigt. Anschließend wurde eine Kulturplatte mit sechs *wells* so zersägt, dass nur noch zwei *wells* übrig blieben. In die Seitenwand eines *wells* wurde mit einem Bohrer auf der Hälfte der *well*-Höhe ein Loch gebohrt, welches für die Punktion des EHTs mittels der Sonde benötigt wurde. Dieses Loch wurde von außen mit Parafilm abgedichtet, sodass das EHT-Medium später nicht auslaufen konnte. Anschließend wurde die Kulturplatte sowie die Halteapparatur des Schrittmotors sorgfältig mit 70%igem Ethanol gesäubert. Nun wurden je 11 ml vorgewärmten EHT-Mediums in die *wells* der Kulturschale pipettiert und die Kulturschale auf der Messapparatur befestigt. Das vorgenerierte 6-*well*-EHT wurde an seiner Silikonhalterung aus der alten Kulturschale in die an der Messapparatur angebrachte Hebebühne eingebracht und mithilfe dieser in das EHT-Medium des *wells* versenkt. Das EHT wurde so positioniert, dass es genau auf der Höhe des Loches in der *well*-Wand hing und so waagrecht von der Seite mit der Sauerstoffsonde punktiert werden konnte. Die Temperatursonde wurde so befestigt, dass sie in dem zweiten *well* die Temperatur im EHT-Medium messen konnte. Dann wurde die Sonde in der Kanüle durch das Loch in der Wand des *wells* gestochen und so platziert, dass sie ausgefahren noch nicht das EHT berührten konnte, aber sich die Kanülenspitze noch innerhalb des *wells* befand. Nun wurde die Mikroskop-Kamera an einer Halterung über der Kulturschale befestigt und die gesamte Apparatur in den Inkubatorschrank gestellt. Nach Anschließen des Schrittmotors, der Sauerstoffsonde und der Mikroskop-Kamera an den Computer konnte mit der Messung begonnen werden.

3.6.4 Durchführung der Sauerstoffmessung

Die Sauerstoffmessung wurde im Visualisierungsprogramm in einem x-y-Achsendiagramm dargestellt, mit der gemessenen Sauerstoffsättigung in der Einheit Torr auf der y-Achse und der Messzeit (in s) auf der x-Achse. Torr ist eine Maßeinheit des Druckes. Ein Torr entspricht dem Druck von einem Millimeter-Quecksilbersäule (mmHg). Zuerst wurde eine Messung

durchgeführt um das Sauerstoffsättigungsprofil durch das EHT zu erstellen. Dazu wurde der Schrittmotor auf eine Geschwindigkeit von 200 $\mu\text{m}/\text{min}$ und die Sauerstoffsonde auf eine Messfrequenz von 3 Hertz (Hz) eingestellt. Nun wurde die Spitze der Sonde bis zum Rand des EHTs vorgefahren und dort gestoppt. Hierbei wurde das EHT nicht von der Sonde berührt. Dann wurde die Geschwindigkeit auf 10 $\mu\text{m}/\text{min}$ verringert und mit der Messung durch das EHT begonnen. Die Sonde wurde durch den Schrittmotor so bewegt, dass die Sonde von der Seite, mittig in Längs- und Querachse, in das EHT eingestochen und vorgeschoben wurde. So konnte man den Verlauf der Sauerstoff-Werte durch das EHT von Rand zu Rand dokumentieren. Durch die Elastizität des EHTs durch den Fibringehalt wurde das EHT ein wenig vor der Spitze der Sauerstoffsonde hergeschoben. Nach Durchstechen der Sonde auf der anderen Seite des EHTs und Messung im Medium herum, wurde der Schrittmotor gestoppt. Ein vollständiges Sauerstoffprofil durch das EHT an Tag 0 (Tag des Generierens des EHTs) war nun erstellt (s. Abb. 50).

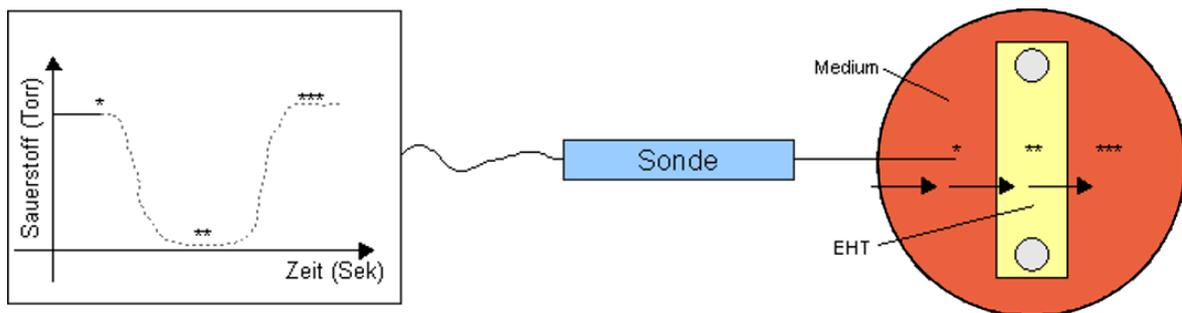


Abb. 50: Erstellen eines Sauerstoffgraphen durch den Querschnitt eines 6-well-EHT bzw. 2-p-EHT (Aufsicht; *: Einstich EHT, **: Mitte EHT, ***: Durchstich aus dem EHT heraus).

Um den Verlauf der Sauerstoff-Werte in den nächsten Tagen in der Mitte des EHTs zu protokollieren wurde nun die Sonde rückwärts bis zu Mitte des EHTs zurückgezogen und dort belassen. Die Messungsfrequenz der Sonde wurde auf 1/60 Hz heraufgesetzt und das EHT knapp 24 Stunden bis zur nächsten Messung im Inkubatorschrank belassen. Die Messung des Sauerstoffprofils wurde die nächsten sieben Tage im Abstand von jeweils 24 Stunden wiederholt und danach jeweils wieder die Sondenspitze in der Mitte des EHT-Gewebes platziert (s. Abb. 51). Während der Messung wurde alle zwei Tage das Medium des EHTs gewechselt, indem das gebrauchte Medium mit einer Stabpipette abgesaugt wurde und sofort durch frisches, bereits inkubiertes Medium ersetzt wurde.

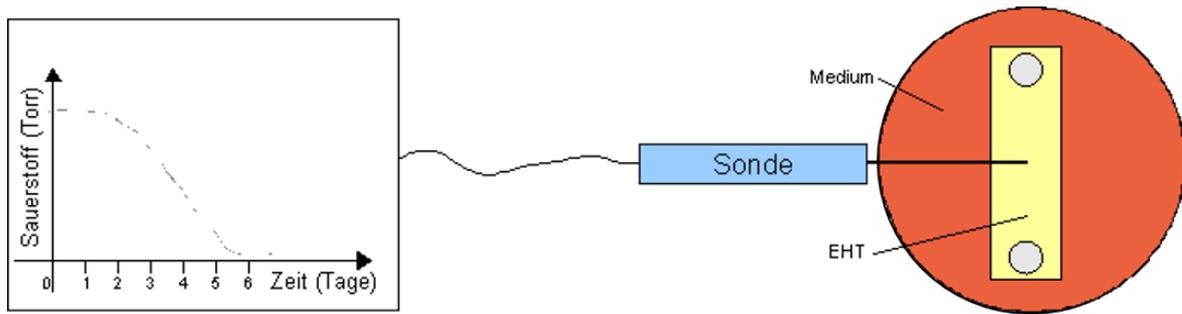


Abb. 51: Veränderung der Sauerstoffwerte in der Mitte eines 6-well- bzw. 2-p-EHT über die Zeit (Aufsicht).

3.6.5 Videoüberwachung der Sauerstoffmessung

Um die Sondenbewegung durch das EHT und das Medium zu verfolgen, wurde diese mittels einer Farb-Mikroskopkamera aufgezeichnet. Die Kamera wurde vor Beginn der ersten Messung senkrecht über dem *well* in der Kulturschale installiert.

3.6.6 Ergebnisse der Sauerstoffmessung

Bei den Sauerstoffmessungen im 6-w-/ 2-post-EHT wurden zwei verschiedene Messweisen durchgeführt. Die erste Messweise sollte die Veränderung des Sauerstoff-Gehaltes durch den Querschnitt des EHTs darstellen. Die Werte wurden in x-y-Diagrammen dargestellt, in denen die Sauerstoffwerte im EHT gegen die Zeit und Sondenaktion (Einstich – Mitte – Durchstich) im EHT aufgetragen wurden. Die zweite Messweise sollte die Veränderung des Sauerstoff-Wertes innerhalb des EHTs über die gesamte Messzeit darstellen. Die Werte wurden in x-y-Diagrammen dargestellt, in denen die gemittelten Sauerstoffwerte gegen die Messtage aufgetragen wurden. Es wurden drei Messreihen zu unterschiedlichen Zeiten durchgeführt.

In Messreihe 1 zeigten sich, wie in Abbildung 52 sichtbar, folgende Ergebnisse für die erste Messweise: Beim Durchfahren des EHTs an den verschiedenen Tagen der Reifung stellten sich folgende Ergebnisse dar: An Tag 0 zeigte sich am Rand des EHT ein Sauerstoffwert von ungefähr 260 Torr, der bis zur Mitte des EHTs kontinuierlich auf ca. 75 Torr abfiel und dann wieder auf ca. 240 Torr anstieg. Der schnelle Anstieg des Sauerstoffwertes am Ende der Messung lässt sich dadurch erklären, dass das EHT sehr elastisch war und von der Spitze der Messsonde gebogen wurde. Das EHT schob sich eine ganze Zeit vor der Messsonde her, bevor diese das EHT vollständig durchstechen konnte.

3. Ergebnisse

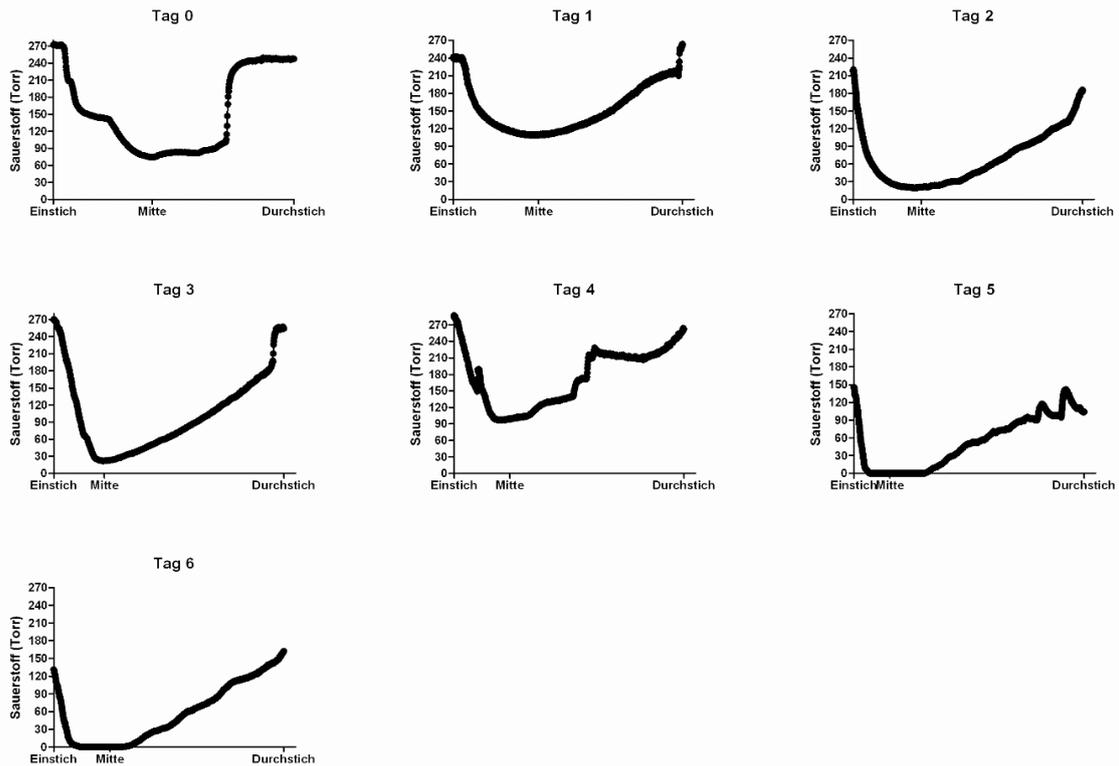


Abb. 52: Erste Messweise der Sauerstoff-Messung der Messreihe 1. In den Graphen ist der Sauerstoffwert (Torr) über die Strecke (Einstich – Mitte – Durchstich) aufgetragen.

Konsistent über den gesamten Messzeitraum zeigte sich, dass die Sauerstoffwerte am Rand des EHTs ihr Maximum, an Tag 0 bei ca. 260 Torr, an Tag 6 bei 120 Torr, und in der Mitte des EHTs ihr Minimum, an Tag 0 ca. 75 Torr, an Tag 6 ca. 0 Torr, ausprägten. Der Sauerstoffmesswert nahm kontinuierlich vom Rand zur Mitte hin ab und von der Mitte bis zum gegenüberliegenden Rand wieder zu. Auch zeigte sich, dass sich die gesamte Kurve im Laufe der Messtage weiter nach unten verschob, also sowohl die Sauerstoffwerte am Rand des EHTs, als auch die Sauerstoffwerte in der Mitte des EHTs, geringer wurden. So beliefen sich zum Beispiel die Randwerte in den Tagen 0-4 auf Sauerstoffwerte zwischen 200 und 280 Torr und an den Tagen 5 und 6 auf Sauerstoffwerte zwischen 120 und 150 Torr. Ähnlich zeigte sich der Verlauf der Messungen jeweils in der Mitte des EHTs; so beliefen sich die Werte an den Tagen 0 und 1 auf ungefähr 75 Torr bzw. 120 Torr, an den Tagen 5 und 6 aber war in der EHT-Mitte ein Sauerstoffwert von 0 Torr messbar. An Tag 4 zeigte sich Schwankungen und ein Anstieg der Sauerstoffwerte während der Messung, was am ehesten auf ein Artefakt zurückzuführen ist, da sich die Messungen durch die Elastizität des EHTs und der Ungenauigkeit der Punktion etwas schwierig gestaltete.

Die Messreihe 2 wurde wie die Messreihe 1 durchgeführt. Wie in Abbildung 53 sichtbar, ergaben sich bei der ersten Messweise folgende Ergebnisse: Beim Durchfahren des EHTs in Messreihe 2 zeigte sich wieder, dass konsistent über den gesamten Messzeitraum der Sauerstoffwert an den Rändern des EHTs höher lag als in der Mitte des EHTs. Wie auch in Messreihe 1 verschob sich die gesamte Kurve der Messwerte im Laufe des Messzeitraumes weiter nach unten. So zeigte sich an Tag 0 der Sauerstoffwert bei 240 Torr am Rand und 100 Torr in der Mitte, an Tag 3 bei 250 Torr am Rand und bei 50 Torr in der Mitte und an Tag 6 bei 120 Torr am Rand und 0 Torr in der Mitte. Bei dieser Messreihe begann das EHT zwischen Tag 4 und Tag 5 an sich leicht zu kontrahieren und an Tag 6 kontrahierte es sich bereits kräftiger.

Messreihe 3 wurde wie die ersten beiden Messreihen durchgeführt, nur mit der ergänzenden dritten Messweise, dass nach jeder ersten Messweise der Schwenktisch für ca. zehn Minuten eingeschaltet und der Sauerstoffwert in der Mitte des EHTs gemessen wurde. Es ergaben sich die in Abbildung 54 sichtbaren Ergebnisse für die erste Messweise. Beim Durchfahren des EHTs in der dritten Messreihe zeigte sich erneut konsistent während der gesamten Messung, dass der Sauerstoffmesswert an den Rändern des EHTs höher war als in der Mitte des EHTs. Auch fielen die Messwerte der gesamten Kurve wieder im Laufe der Messung ab. So fanden sich an Tag 0 der Messung Werte von ca. 230 Torr an den EHT-Rändern und Werte von ca. 40 Torr in der Mitte des EHTs. An den Tagen 2, 3, 4 und 5 blieb der Wert an den Rändern des EHTs relativ konstant zwischen 210 und 240 Torr, sank aber in der Mitte des EHTs auf 0 Torr ab. Ab Tag 6 sank dann auch der Sauerstoffwert am Rand des EHTs auf Werte zwischen 160 und 180 Torr ab und blieb bis zum Ende der Messung dort. Das EHT begann zwischen dem sechsten und siebten Tag an sich sichtbar zu kontrahieren. Insgesamt zeigte sich bei allen drei Messreihen bei der ersten Messungsart trotz ähnlicher Tendenzen der Sauerstoffwerte eine gewisse Variabilität der Ergebnisse.

3. Ergebnisse

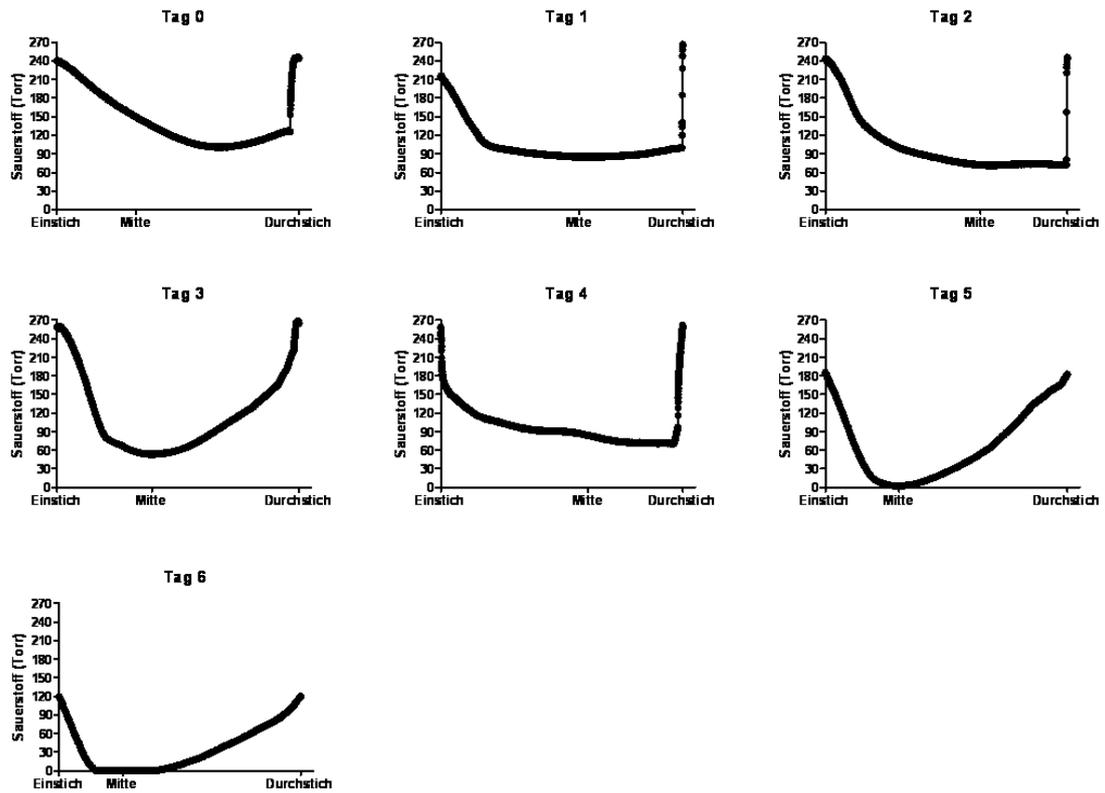


Abb. 53: Erste Messweise der Sauerstoff-Messung der Messreihe 2. In den Graphen ist der Sauerstoffwert (Torr) über die Strecke (Einstich – Mitte – Durchstich) aufgetragen.

3. Ergebnisse

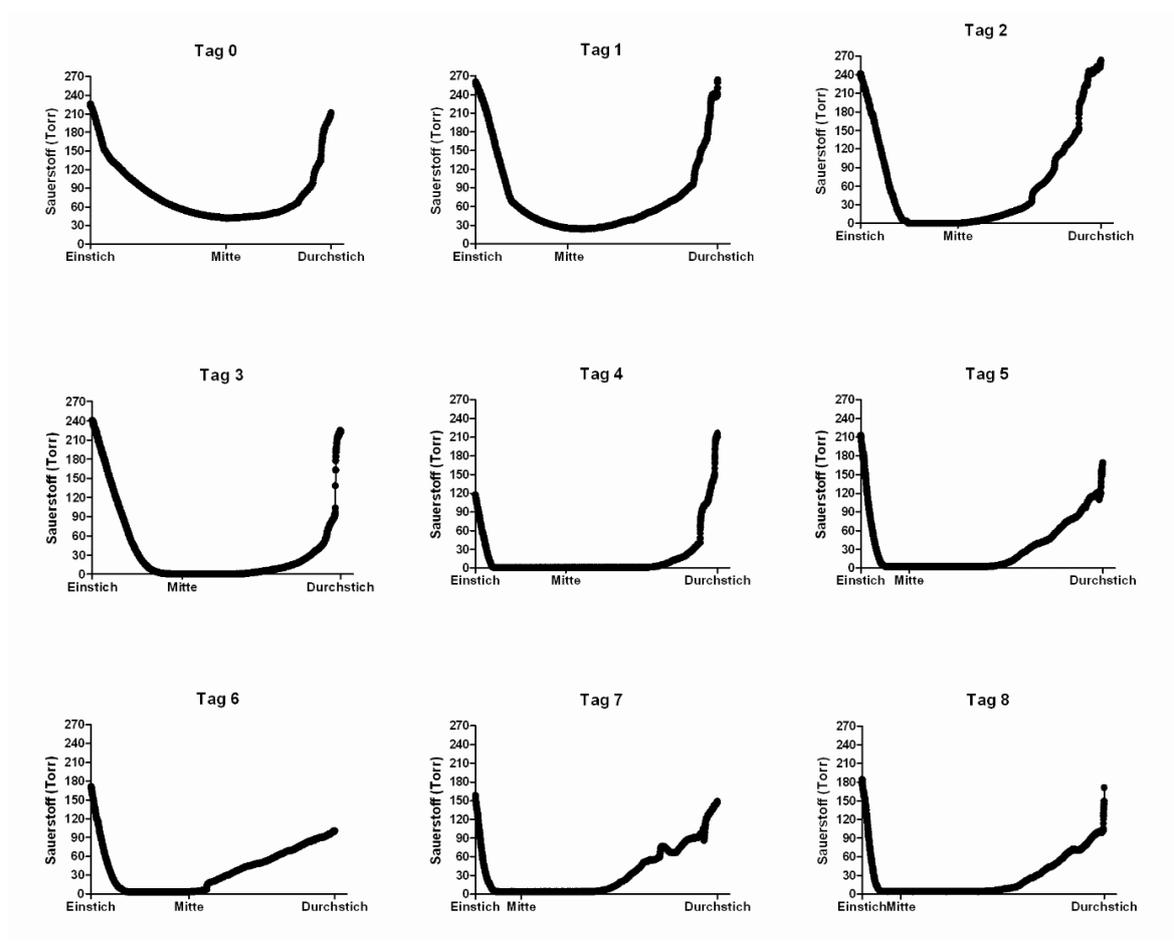


Abb. 54: Erste Messungsart der Sauerstoff-Messung der Messreihe 3. In den Graphen ist der Sauerstoffwert (Torr) über die Strecke (Einstich – Mitte – Durchstich) aufgetragen.

Bei der dritten Messreihe wurde nach jeder Messung der ersten Messweise der Schwenktisch für ca. zehn Minuten eingeschaltet und der Sauerstoffwert in der Mitte des EHTs gemessen. Es ergaben sich die in Abbildung 55 sichtbaren Ergebnisse. In den ersten drei Tagen stieg der Sauerstoffwert in der Mitte des EHTs beim Einschalten des Schwenktisches deutlich an, sodass an Tag 1 ein Anstieg von knapp 20 Torr auf ungefähr 120 Torr, an Tag 2 von 1 Torr auf knapp über 120 Torr und an Tag 3 von 0 auf 120 Torr messbar war. An Tag 4 wurde der Sauerstoffwert innerhalb des EHTs durch das Einschalten des Schwenktisches nicht beeinflusst, sondern blieb konstant bei unter 2 Torr. An den Tagen 5 und 6 zeigte sich ein geringer Anstieg des Wertes auf ungefähr 20 bzw. 25 Torr. An den Tagen 7 und 8 waren kaum Änderungen des Sauerstoffwertes messbar. Jedes Mal, wenn der Schwenktisch nach ungefähr 12 Minuten wieder ausgeschaltet wurde, sank der Sauerstoffwert rasch wieder auf den Ausgangswert vor der Einschaltung des Schwenktisches ab.

3. Ergebnisse

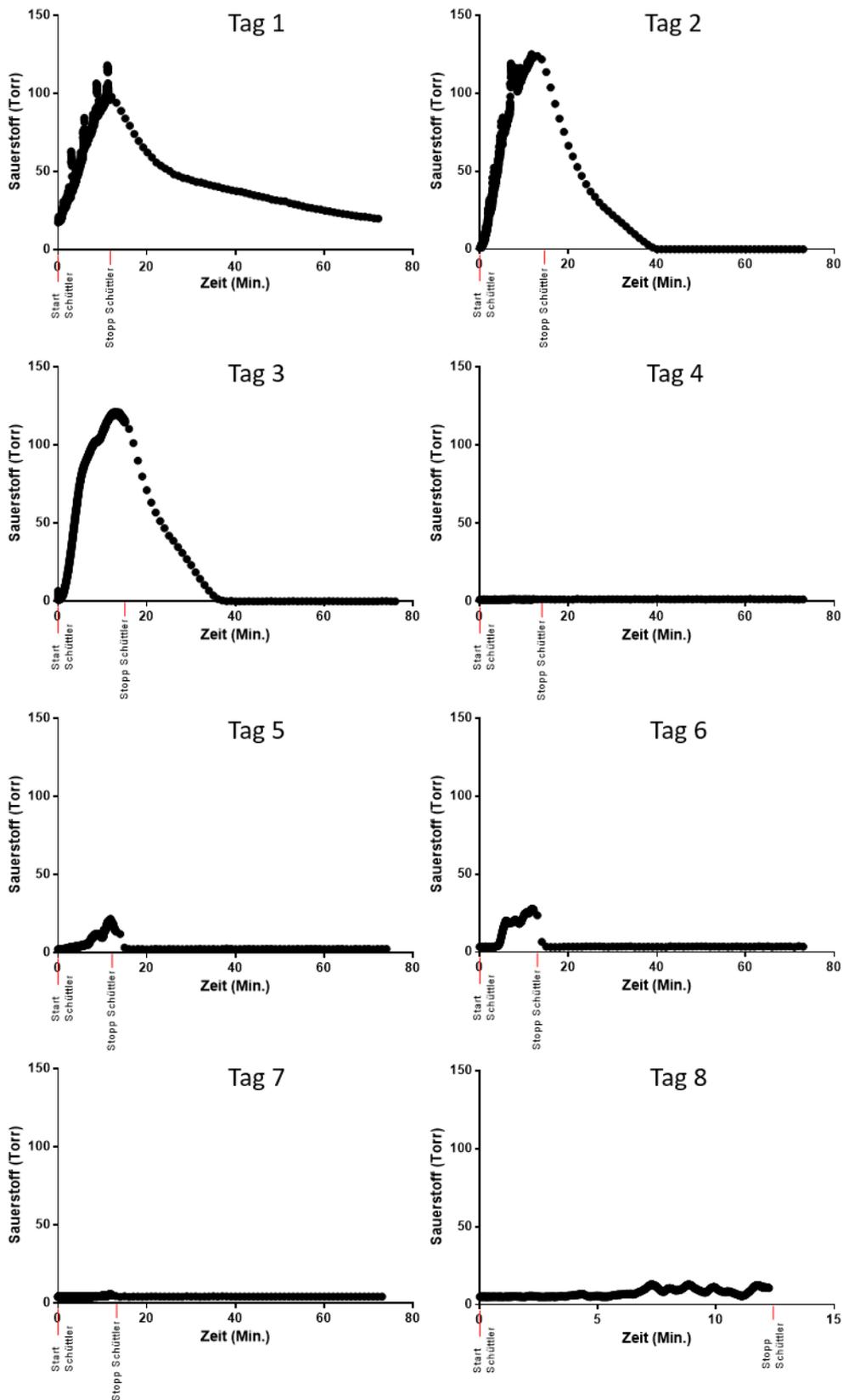


Abb. 55: Ergebnisse der dritten Messweise in der Mitte des EHTs aus Messreihe 3 bei Schwenktisch-Einsatz. In den Graphen ist der Sauerstoffwert (Torr) über die Zeit (Min.) aufgetragen (die Markierung „Start/Stop Schüttler“ bezeichnet den Zeitpunkt, an dem der Schwenktisch an- bzw. wieder ausgeschaltet wurde).

3. Ergebnisse

Alle drei Messreihe beinhalteten die zweite Messweise, bei der die Sonde in der Mitte des EHTs belassen wurde und so der Verlauf der Sauerstoffwerte während des gesamten Messzeitraumes dargestellt werden konnte. Es wurden die Mittelwerte der Ergebnisse der einzelnen Messreihen (s. Anhang) mit den jeweiligen Standardabweichungen im x-y-Diagramm visualisiert. Auf der y-Achse wurde der Sauerstoffwert (Torr) gegen die Zeit (Tagen) aufgetragen (s. Abb. 56).

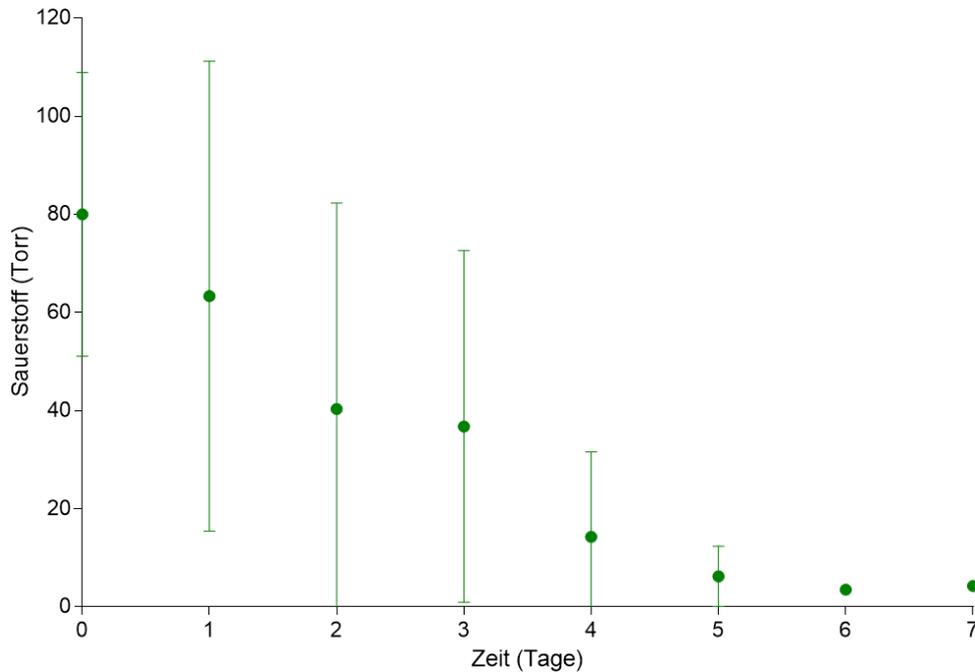


Abb. 56: Mittelwerte alle drei Sauerstoffmessungen der dritten Messweise mit Standardabweichungen.

Es zeigte sich, dass die Durchschnittswerte der Sauerstoffmessung aus der Mitte des EHTs im Laufe der Messung abnahmen. So zeigte sich bei der Messung von Tag 0 auf Tag 1 ein durchschnittlicher Wert von ca. 80 Torr ($SD=23,6$), der aber in den folgenden Tagen auf niedrigere Werte abfiel. An Tag 1 wurden ca. 64 Torr ($SD=39,1$), an Tag 2 ca. 40 Torr ($SD=34,3$) und Tag 3 ca. 37 Torr ($SD=29,3$) gemessen. Die Aufzeichnung mittels einer Videokamera zeigte, dass die EHTs ab Tag 4 anfangen leicht zu kontrahieren und an Tag 6 bereits kräftig kontrahierten. Ab diesen Kontraktionen fielen die Sauerstoffwerte weiter ab, sodass an Tag 4 ca. 14 Torr ($SD=14,2$), an Tag 5 ca. 6 Torr ($SD=5,0$) und an den Tagen 6 und 7 ca. 4 Torr ($SD=0$) gemessen wurden. Die Werte fielen also von ca. 80 Torr zu Beginn der Messungen konstant ab und erreichten am Ende der Messungen Werte um 4 Torr. Die Mittelwerte der Messungen zeigten eine erhebliche Standardabweichung.

3.7 Zusammenfassung der gesamten Ergebnisse

Zusammenfassend können folgende Ergebnisse gezeigt werden:

- I. Wir erreichten durch die Sonifizierung im Bechersonifikator und den Einsatz von Pluronic-F68 die Herstellung einer stabilen, nicht-toxischen Emulsion ohne nachträgliches Absetzen des Sauerstoffträgers vom Medium (s. Punkt 3.1.1.3 und 3.1.1.4).
- II. Sowohl Perfluorodecalin, als auch die Kultur auf dem Schwenktisch und bei 40% Sauerstoff, konnten die Kontraktionskraft der EHTs signifikant steigern (s. Tab. 15).
- III. Die Verwendung des Sauerstoffträgers bei 40% Sauerstoff in Kombination mit der Konvektion auf dem Schwenktisch zeigte eine signifikante Reduktion der hypoxischen Fläche im Gegensatz zu den EHTs, die nur bei 40% Sauerstoff und dem Sauerstoffträger inkubiert wurden (s. Punkt 3.3.1.3).
- IV. Keine der getesteten Bedingungen zeigte Einfluss auf die Anzahl der Dystrophin-positiven Zellen (s. Punkt 3.3.2).
- V. Bei der Bestimmung der RNA-Expression mittels rt-PCR zeigten sich keine eindeutigen und kongruenten Ergebnisse der Messungen (s. Punkt 3.4).
- VI. Die Proteinexpression von HIF-1 α mittels Westernblot zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Kultivierungsbedingungen (s. Punkt 3.5).
- VII. Die Sauerstoffmessung mittels Nadelsonde zeigte folgende Ergebnisse (s. Punkt 3.6):
 - i. Ein Abfall der Sauerstoffwerte von der Oberfläche zur Mitte des EHTs hin.
 - ii. Ein Abfall der Sauerstoffwerte im Verlauf der Messung mit zunehmender Reifung und Verdichtung der EHTs.
 - iii. Eine Verbesserung der Sauerstoffwerte innerhalb des EHTs durch Konvektion auf dem Schwenktisch.

4. Diskussion

4.1 Ziele der Dissertation

Herz-Kreislauf-Erkrankungen bilden mit der koronaren Herzkrankheit die häufigste Todesursache. Aufgrund des Mangels an Spenderorganen zur Therapie der terminalen Herzinsuffizienz werden alternative Therapieansätze benötigt und das kardiale *tissue engineering* stellt eine dieser Möglichkeiten dar. Das *Engineered heart tissue* von Eschenhagen et al. (1997) und dessen Weiterentwicklung durch die Arbeitsgruppe (Hansen et al. 2010) verfolgt die Nutzung und Optimierung der EHTs zur Testung pharmakologischer Substanzen als kardiales Surrogat und zur Gewebeersatztherapie, z.B. bei ischämischer Kardiomyopathie oder kardialen Fehlbildungen. Der funktionelle Gewebeersatz ist allerdings nur mit Geweben größeren Ausmaßes therapeutisch von Nutzen. Die Versorgung größerer Gewebe durch Diffusion ist jedoch limitiert, da die Diffusion nur ca. 100 µm ins Gewebe reicht (Shimizu et al. 2006). In Transplantaten relevanter Größe kommt es im Inneren des Gewebes aufgrund limitierter Sauerstoff-Diffusion vermehrt zur Apoptose (Brown et al. 2008). Die Evaluation und Optimierung der Sauerstoffversorgung der EHTs im 24-w-Format nach Hansen et al. (2010) und im 6-w-Format war Ziel dieser Arbeit. Dafür wurden an den 24-w-EHTs Kontraktilitätsmessungen, als Surrogat-Parameter für die Vitalität der Kardiomyozyten, durchgeführt und immunhistochemische Färbungen mit dem Hypoxiemarker Pimonidazol und dem Zellmarker Dystrophin durchgeführt. Um die Versorgung der EHTs mit Sauerstoff zu verbessern wurde der künstliche Sauerstoffträger Perfluorodecalin eingesetzt. Die Etablierung dieser Substanz mit seinem Emulgator im Medium war ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Zudem wurde in 6-w-EHTs die Sauerstoffmessung mittels einer Nadelsonde etabliert um die Sauerstoffprofile innerhalb des EHTs im Querschnitt und im zeitlichen Verlauf zu evaluieren.

4.2 Behandlung der EHTs mit dem künstlichen Sauerstoffträger Perfluorodecalin

Um die Sauerstoffzufuhr der 24-well-EHTs zu verbessern, verwendeten wir einen künstlichen (synthetischen) Sauerstoffträger. Derzeit liegen zwei Substanzarten als Sauerstoffträger vor: Erythrozyten-Ersatzkonzentrate (RBCs) und Sauerstoffträger ohne Zellen. Letztere teilen sich in zwei Untergruppen, in die Sauerstoffträger auf Hämoglobin-Basis (HBOC) und die synthetischen Sauerstoffträger, v.a. die Perfluorokarbone (PFCs) (Ness und Cushing 2007), wie z.B. Perfluorodecalin. In Medien mit PFCs ist die

Sauerstofflöslichkeit im Gegensatz zu Wasser oder Blutplasma um das 20-25fache erhöht (Lowe 1999). Allerdings erfolgt die Sauerstoff-Sättigung in PFCs nach dem Henry'schen Gasgesetz linear zum Partialdruck des Gases; demnach sind hohe Sauerstoff-Partialdrücke notwendig, um viel Sauerstoff in Lösung zu bringen (Fabian 2011).

Perfluorokarbone wurden klinisch als intravenös verabreichte Atemgas-Transporter (Spahn et al. 1999) oder beim Einsatz von Herz-Lungen-Maschinen bei kardialen Bypass-Operationen (Tremper et al. 1980) verwendet. Aufgrund der komplizierten Handhabung, der Instabilität der Substanz, der unerwünschten Wirkungen (Fluosol™) und des erhöhten Risikos von Schlaganfällen (Oxygent™), wurden zwei vielversprechende Sauerstoffträger wieder vom Markt genommen (Ness und Cushing 2007). Andere Sauerstoffträger sind noch in der klinischen Erprobung, aber ihre klinische Entwicklung erfolgt langsam aufgrund mangelnder Investitionen und kommerzieller Erfolgsaussichten (Niiler 2002). Die PFCs dienen aber nur als Sauerstoffträger und nicht als Blutersatz, da sie die übrigen komplexen Funktionen des Blutes nicht ersetzen können (Zuck et al. 2015). Die chemisch inerten und lipophilen PFCs können mit verschiedenen Emulgatoren, wie z.B. Pluronic-68, Lecithin oder Triglyzeriden in Lösung gebracht werden (Kim und Greenburg 2004). Wir konnten zeigen, dass Pluronic-F68 in den eingesetzten Konzentrationen nicht toxisch auf die Kardiomyozyten wirkte (s. Punkt 3.1.1.3) und verwendeten es als Emulgator, um das PFC Perfluorodecalin im Medium zu lösen (s. Punkt 3.1.1.4).

4.3 Messung der Kontraktionskraft als Surrogat-Parameter für die Vitalität der EHTs

Wir konnten zeigen, dass sich keine signifikanten Unterschiede bei den Kraftmessungen der jeweiligen Kontroll-EHTs zu den Vehikel-EHTs ergaben. Das Vehikel, der Emulgator Pluronic, beeinflusste also nicht die Kraft und auch nicht die übrigen Kontraktionszeiten (wie Kontraktions- oder Relaxationszeit, s. Anhang) der EHTs und bestätigte somit den negativen Toxizitätsversuch (s. Punkt 3.1.1.3). EHTs, die bei 40% Sauerstoff inkubiert wurden, entwickelten in allen Behandlungsgruppen (Kontrolle, Vehikel, PFD) signifikant größere Kräfte als die EHTs, die bei 21% Sauerstoff inkubiert wurden. Auch die EHTs auf dem Schwenktisch (Kontrolle, Vehikel, PFD) entwickelten signifikant größere Kräfte als die EHTs ohne Schwenktisch. Die signifikanten Kraftsteigerungen, die bei dem Vergleich 40% gegen 21% Sauerstoff und EHTs mit und ohne Schwenktisch auftraten, schienen aber bei den PFD-EHTs noch gesteigert zu werden (s. Abb. 23 und 28). Die Sauerstoffträger sind

durch ihre Funktion in der Lage, Stoffwechsel signifikant zu verbessern, was wir in unseren Versuchen durch die Kraftsteigerungen zeigen konnten (s. Tab. 15). Unsere Ergebnisse werden gestützt durch ähnliche Beobachtungen von Radisic et al. (2006b), die bei Versuchen an isolierten Kardiomyozyten zeigten, dass sich bei der Kultivierung der Zellen mit einem Perfluorokarbon-Sauerstoffträger eine größere Menge DNA, gesteigerte kardiale Marker und eine signifikant verbesserte kontraktile Funktion der Zellen nachweisen ließ.

4.4 Histologische Strukturanalysen

4.4.1 Pimonidazol-Färbung in EHTs

Pimonidazol bindet spezifisch an hypoxische Zellen. In der Normoxie wird Pimonidazol von reduzierenden Enzymen metabolisiert, während es in der Hypoxie bei Sauerstoffspannungen unter 10 mmHg kovalent an Thiol-Gruppen von Proteinen und DNA bindet und mit Anti-Pimonidazol-Antikörpern sichtbar gemacht werden kann (Gross et al. 1995). Choi et al. (2008) konnten zeigen, dass die Herzen unter hypoxischen Bedingungen gehaltener Kaninchen positiv mit Pimonidazol angefärbt werden konnten. Auch wir konnten in den Anfangsversuchen mit Pimonidazol zeigen, dass EHTs, welche vier Stunden einer Hypoxie (5% Sauerstoff) ausgesetzt waren, eine massive Färbung des Gewebes durch Pimonidazol aufwiesen. Im Gegensatz dazu, wiesen EHTs, welche vier Stunden einer Hyperoxie (53% Sauerstoff) ausgesetzt waren, überhaupt keine Färbung auf. Damit konnten wir die Funktionalität der Färbemethode nachweisen.

In den Reihenversuchen, in denen wir daraufhin EHTs langfristig verschiedenen Sauerstoffsättigungen aussetzten, konnte allerdings kein signifikanter Unterschied in der Färbung mit Pimonidazol zwischen den Kontroll-EHTs bei 40%iger und bei 21%iger Sauerstoffinkubation gezeigt werden. Die EHTs bei 21% Sauerstoff zeigten lediglich eine Tendenz zur größeren hypoxischen Fläche. Beim Vergleich der EHTs mit und ohne Schwenktisch zeigten sich signifikant geringere hypoxische Flächen bei den PFD-EHTs auf dem Schwenktisch im Gegensatz zu den PFD-EHTs ohne Schwenktisch. Die Kombination aus Verwendung des Sauerstoffträgers und die Konvektion durch den Schwenktisch scheint den signifikanten Unterschied auszumachen (s. Tab. 18).

4.4.2 Dystrophin-Färbung in EHTs

Bei den histologischen Untersuchungen der Dystrophin-Färbung, welche das Zellgerüst-Protein Dystrophin in vitalen Kardiomyozyten anfärbt, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Zellzahlen unter den verschiedenen Kultivierungs-Bedingungen (s. Abb. 34 und 35). Vollert et al. (2014) konnten jedoch zeigen, dass perfundierte EHTs in der direkten Umgebung des künstlichen Gefäßes eine erhöhte Anzahl vitaler Kardiomyozyten aufwiesen. Möglicherweise wiesen die EHTs, die bei unseren Kontraktilitäts-Messungen besser abschnitten, nicht aufgrund einer erhöhten Zellzahl größere Kräfte auf, sondern aufgrund einer Hypertrophie der einzelnen Zellen, da die Zellzahl unbeeinflusst blieb.

4.5 Molekularbiologische Untersuchungen

4.5.1 RNA-Expression

Die kardio-spezifische Rolle von HIF-1 α ist noch wenig verstanden, doch deutet vieles darauf hin, dass HIF-1 α eine zentrale Rolle beim Schutz der Zelle vor hypoxischem Stress spielt (Wu et al. 2015). Lee et al. (2000) fanden erhöhte mRNA und erhöhtes Protein von HIF-1 α und VEGF α in Ventrikelbiopsien von Patienten mit Herzinfarkt oder akuter Ischämie des Herzens.

Da HIF-1 α unter Hypoxie in der Zelle akkumuliert und so mit seiner zweiten Untereinheit HIF-1 β zu einem Transkriptions-Dimer fusionieren kann, kommt es unter anderem zur Transkription und Translation von Genen, die u.a. die Glykolyse, mitochondriale Funktionen, Zellüberleben, die Widerstandsfähigkeit gegenüber oxidativem Stress, aber auch die Apoptose beeinflussen (Loor und Schumacker 2008). So kommt es zu einer gesteigerten Expression von Erythropoetin- (Semenza und Wang 1992), VEGF α - (Shweiki et al. 1992; Ladoux und Frelin 1993), Bnip3- (Bruick 2000) und Glukosetransporter-1- und -3-Expression (Ebert et al. 1995). Bei unseren Messungen der RNA-Expression kamen jedoch inkongruente Ergebnisse heraus, da sich z.B. bei zwei verschiedenen EHT-Versuchsreihen trotz vergleichbarer Bedingungen gegensätzliche Ergebnisse zeigten. So war die Expression der Hypoxiemarker bei der ersten Versuchsreihe unter Anwendung von PFD erniedrigt, bei der zweiten jedoch zeigte sich eine signifikant vermehrte Expression von HIF-1 α unter PFD. Auch sollten die Hypoxiemarker, da sie teilweise co-induziert werden (Lu et al. 2005), gleichermaßen ansteigen bzw. abfallen. In unseren Versuchen zeigten sich jedoch teilweise gegensätzliche Verläufe. So zeigte sich eine signifikante Reduktion der

Expression von HIF-1 α , Bnip3 und Egl3 bei den Kontroll-EHTs unter 40% Sauerstoff im Gegensatz zu den Kontroll-EHTs bei 21% Sauerstoff, jedoch kam es zu einer signifikanten Steigerung von Casp3 (s. Tab. 21). Greijer et al. (2005) konnten zeigen, dass bei Hypoxie 45 Gene hochreguliert werden - 40 davon (89%) durch HIF-1 α , u.a. auch das proapoptotische Protein Bnip3 (Bruick 2000). HIF-1 α ist somit auch an der Regulation der Apoptose beteiligt (Loor und Schumacker 2008). Bei Hypoxie kommt es zudem zu einem Wechsel der Energiegewinnung von der oxidativen Phosphorylierung zur anaeroben Glykolyse – dieser Vorgang wird als „Pasteur-Effekt“ bezeichnet. Letzterer Prozess wird durch HIF-1 α beeinflusst, da es die Induktion verschiedener glykolytischer Enzyme steigert (Iyer et al. 1998), u.a. die AMP-aktivierte Proteinkinase (Minchenko et al. 2003).

In der Normoxie erfolgt der Abbau von HIF-1 α über eine Markierung des Proteins mittels Hydroxylierung durch HIF-Prolyl-Hydroxylasen (*PHDs*)/Egl3s (Ivan et al. 2001; Jaakkola et al. 2001). Da ihre katalytischen Untereinheiten Sauerstoff als Substrat benötigen, kann man sie als zelluläre Sauerstoffmesser ansehen (Epstein et al. 2001). Tiburcy et al. (2011) zeigten, dass sich bei EHTs auf der Basis von Kollagen-I und Inkubation unter 21% Sauerstoff keine Hinweise auf Hypoxie ergaben, da weder die mRNA des hochsensitiven Hypoxiemarkers PHD3/Egl3 noch von HIF-1 α erhöht waren. Eine Erhöhung von VEGF α wurde als nicht Hypoxie-induziert interpretiert. Da in jenen Versuchen aber Kollagen und nicht Fibrin als Hydrogel-Basis diente, könnte die geringere Dichte des Hydrogels einen möglichen Unterschied in der Sauerstoffversorgung der EHTs darstellen. Auch die Verwendung einer geringeren Zellzahl ($2,5 \times 10^6$ im Gegensatz zu $4,1 \times 10^6$ in unseren EHTs) muss bei der Betrachtung dieser Ergebnisse beachtet werden.

Zellen tolerieren eine Ischämie für eine gewisse Zeit; wird aber ein kritischer Zeitpunkt überschritten, führt die Kombination aus Hypoxie und Azidose im Gewebe zu Nekrose und/oder Apoptose (Loor und Schumacker 2008). Die Toleranz des Herzgewebes gegenüber einer (zeitlich begrenzten) schweren Ischämie kann durch vorheriges *ischemic preconditioning* verbessert werden, indem das Gewebe repetitiv kurzer, nicht letaler Ischämie ausgesetzt wird (Murry et al. 1986; Bolli 2001). Auch Hsieh et al. (2015) konnten dies *in vitro* an Kardiomyozyten zeigen. Inwieweit diese Beobachtungen auch in EHTs gelten, wäre eine interessante zukünftige Fragestellung.

4.5.2 Protein-Expression von HIF-1 α

Bei Hypoxie kommt zu einer Steigerung der Genexpression und Synthese des Proteins HIF-1 α . Nicht geklärt ist, wie genau diese Steigerung der Translation zustande kommt bzw. wie sie durch die Hypoxie initiiert wird. In unseren Versuchen zeigte sich keine signifikant gesteigerte Protein-Expression, auch nicht bei den Versuchen, bei denen die RNA-Expression von HIF-1 α gesteigert war. Da jedoch die RNA-Expression auch keine eindeutigen Ergebnisse unter den verschiedenen Kultivierungs-Bedingungen zeigte, muss die gesamte Versuchsreihe bzw. die Durchführung an den EHTs eher kritisch betrachtet werden.

4.6 Sauerstoffmessung mit Sauerstoffsonden

Um eine Methode zur Messung von Sauerstoff durch den Querschnitt eines EHTs und zudem im Verlauf über die Zeit messen zu können, wurde im Rahmen der Dissertation die Messung von Sauerstoff mittels einer Nadelsonde etabliert. Sauerstoffmessungen mit Nadel-Sonden gehören zu den wenigen Methoden, bei denen Sauerstoff über die Zeit gemessen werden kann (Koch und Evans 2015). Sie werden auch genutzt, um in der Tumorforschung den Grad der Hypoxie in Tumoren zu messen (Jenkins et al. 2000; Bentzen et al. 2003). Zwei wichtige Aspekte ließen sich bei unseren Messungen im 6-w-EHT darstellen: (1) Die Sauerstoffkonzentration war von der Oberfläche zum Zentrum des EHTs stark rückläufig und (2) die Sauerstoffwerte nahmen im Verlauf mit der Reifung, Kontraktion und Verdichtung der EHTs kontinuierlich ab. Die großen Standardabweichungen bei der Berechnung der Mittelwerte kam durch die relative Ungenauigkeit der Messung mittels der Sonde zustande, da die EHTs sehr elastische Eigenschaften aufweisen und die Ausrichtung der Nadelsonde und die Punktion nur ein einer Ebene möglich waren. Zwischenzeitlich kam es zum Auftreten von Artefakten, wie z.B. an Tag 4 der Messreihe 1. Durch die Elastizität der EHTs ergab sich auch die unterschiedliche Lage der „Mitte“ der EHTs auf der zeitlichen Messachse. Mit Hilfe eines Mikromanipulators und der videooptischen Aufzeichnung versuchten wir diese Ungenauigkeiten zu minimieren.

Bei den Messungen in der Mitte des EHTs im zeitlichen Verlauf traten abfallende Sauerstoffwerte auf, welche aber durch Konvektion bei Einschalten des Schwenktisches teilweise angehoben werden konnten. Auch Radisic et al. (2006a) konnten bei Versuchen an kardialen Konstrukten zeigen, dass bei Einsatz von Konvektion und somit Umspülung der

Konstrukte, innerhalb dieser signifikant erhöhte Sauerstoffwerte gemessen werden konnten als bei Konstrukten in statischen Medien. Dieser, vermutlich durch eine bessere Diffusion bedingte, Effekt war bei unseren Messungen nur an den ersten drei Messtagen darstellbar. Anschließend zeigte sich keine relevante Änderung der Sauerstoffkonzentration trotz Konvektion. Dies ist möglicherweise in der Verdichtung des EHTs bedingt, welche mit der Reifung der EHTs über die Zeit zunimmt (Hansen et al. 2010) und die Diffusion des Sauerstoffes erschwert haben könnte. Zusätzlich zeigte sich eine deutliche Reduktion der gemessenen Sauerstoffkonzentration mit dem Kontraktionsbeginn der EHTs bei entsprechend gesteigertem Verbrauch im Rahmen der Kontraktionen. Beim Erstellen des Sauerstoffprofils im Querschnitt zeigten sich zu Beginn der Messungen (Tage 0-2) Sauerstoffwerte von ca. 100 Torr, was dem Sauerstoffpartialdruck von 100 mmHg in arteriellem Blut entspricht. Das arterielle Blut erreicht diese Werte in einer Umgebung mit einer Sauerstoffsättigung von 21% - die EHTs wurden aber bei 40% Sauerstoff inkubiert. Im weiteren Verlauf sanken die Sauerstoffwerte dann weiter ab, sodass gegen Ende der Messung die Werte bei fast 0 Torr lagen (s. Abb. 52-56). Es muss also eine relevante Hypoxie im Inneren der EHTs vorliegen, was die Relevanz der Fragestellung bestätigt. Gerne hätten wir diesen Versuch auch im 24-w-EHT durchgeführt um dessen Sauerstoffprofil darzustellen und eine Aussage über die Sauerstoffversorgung zu treffen, jedoch eignete sich das 24-w-Format aufgrund der geringen Größe nicht zur Sondenmessung.

4.7 Vergleich der gesamten Ergebnisse

Beim Vergleich der Ergebnisse der Kraftmessungen der verschiedenen EHTs mit der Größe der hypoxischen Flächen, der Zellzahl der Dystrophin-positiven Zellen, der RNA-Expression und der Protein-Expression zeigten sich vielfältige Ergebnisse. Die EHTs, die bei 40% Sauerstoff inkubiert wurden, entwickelten in allen Behandlungsgruppen (Kontrolle, Vehikel, PFD) signifikant größere Kräfte als die EHTs, die bei 21% Sauerstoff inkubiert wurden. Bei der Messung der hypoxischen Fläche dieser EHTs mit verschiedenen Sauerstoffbehandlungen zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll-, Vehikel- und PFD-EHTs. Bei der Auszählung der Dystrophin-positiven Zellen ergaben sich zwischen den verschiedenen Sauerstoffbehandlungen keine signifikanten Unterschiede. Obwohl die EHTs bei 21% Sauerstoff geringere Kontraktions-Kräfte entwickelten als bei 40%, lässt sich dies nicht auf eine geringere Zahl an vitalen

Kardiomyozyten oder eine vermehrte Expression von Hypoxie-Markern zurückführen. Die Bestimmung der RNA-Expression wies eine gesteigerte HIF-1 α -, Bnip- und EglN3-Expression bei den Kontroll-EHTs bei 21% Sauerstoff im Vergleich zu 40% Sauerstoff auf, jedoch eine geringere Casp3-Expression. Demnach wurden bei den Kontroll-EHTs bei geringerer Sauerstoff-Inkubation ein Teil der Hypoxiemarker verstärkt induziert. Beide zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Protein-Expression von HIF-1 α . Die PFD-EHTs bei 40% Sauerstoff wiesen jedoch gegensätzlicher Weise eine höhere Expression von HIF-1 α und Casp3 auf als die PFD-EHTs bei 21% Sauerstoff. Beim Vergleich der Protein-Expression von HIF-1 α , den hypoxischen Flächen und der Zellzahl zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen. Dies könnte, da eine geringere Kraftentwicklung und eine größere hypoxische Fläche messbar waren, auf eine verstärkte Hypoxie hindeuten, bei der die gesamte Proteinbiosynthese herabreguliert wurde. Kommt es zu einem chronischen Zellschaden, kann HIF-1 α nicht mehr exprimiert werden und die Expressionsrate nimmt ab.

Bei den EHTs auf dem Schwenktisch entwickelten die Kontroll-EHTs und die PFD-EHTs größere Kräfte als die korrespondierenden EHTs ohne Konvektion auf dem Schwenktisch. Die Pimonidazol-Färbung zeigte bei den PFD-EHTs auf dem Schwenktisch eine signifikante Reduktion der hypoxischen Fläche im Gegensatz zu den PFD-EHTs ohne Konvektion auf dem Schwenktisch. Bei der Dystrophin-Färbung zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede. Auch bei der RNA-Expression ergaben sich keine eindeutigen Unterschiede. Die Proteinexpression ergab zudem keinerlei signifikante Unterschiede. Unsere Sauerstoffmessungen mittels der Nadel-Sonde unterstützen zum Teil die Beobachtung, dass die EHTs mit Konvektion auf dem Schwenktisch aufgrund verbesserter Sauerstoffversorgung innerhalb des EHTs (s. Abb. 55) größere Kontraktions-Kräfte entwickeln können. Bei den Pimonidazol-Färbungen konnten wir die verminderte Hypoxie nur bei den PFD-EHTs auf dem Schwenktisch nachweisen.

Die Kraftsteigerung, die bei den EHTs mit Sauerstoffträger-Behandlung sichtbar wurde, deutet auf eine Verbesserung der Sauerstoff-Versorgung der Zellen hin, da diese in der Lage sind, größere Kräfte zu entwickeln. Es war jedoch nicht eindeutig nachweisbar, ob die Kraftsteigerung tatsächlich durch eine Verbesserung der Sauerstoffversorgung zustande gekommen ist, da die Hypoxie-Färbungen und mRNA-Ergebnisse keine eindeutig kongruenten Ergebnisse aufwiesen. Die sehr aufwändige Methode des Medium-

Sonifizierens vor der Behandlung der EHTs mit dem Sauerstoffträger macht die Behandlung aber für den standardisierten Gebrauch bei allen EHTs nicht praktikabel.

Radisic et al. (2006b) berechneten in ihrem Modell über die Sauerstoffsättigung von PFC-Emulsionen, dass eine 6,4 Vol.-%ige Sauerstoffträgers-Emulsion etwa die doppelte Sauerstoff-Bindungskapazität des normalen Mediums besitzt. Die von uns verwendete Emulsion beinhaltete nur 1% PFD. Größere Volumenanteile des Sauerstoffträgers hätten die Versorgung der EHTs möglicherweise noch gesteigert. Da die von uns durchgeführten Interventionen (Steigerung der Sauerstoffkonzentration, Konvektion und Sauerstoffträger) keine eindeutigen und überzeugenden Effekte erbrachten, müssten die Konstrukte vaskularisiert werden, um deren Sauerstoffversorgung langfristig und nachhaltig zu verbessern. Vor allem künstliche Gewebe größeren Formates, wie unsere 6-w-EHTs, benötigen aufgrund der von uns im Sonden-Versuch nachgewiesenen, deutlichen Minderversorgung mit Sauerstoff, eine verbesserte Versorgung durch Vaskularisation. Es müssen dichte Gefäßnetze im Gewebe wachsen bzw. in ihnen generiert werden, um eine suffiziente Versorgung analog natürlicher Herzmuskelgewebe zu garantieren, wo die Gefäße in einem ungefähren Abstand von 20 μm verlaufen und das Myokard versorgen (Korecky et al. 1982). EHTs enthalten eine Vielzahl an Nicht-Kardiomyozyten, u.a. auch primitive Kapillaren, was auf eine organähnliche Struktur hinweist (Eschenhagen et al. 2002). Diese primitiven Formen von Kapillaren müssten noch weiterentwickelt werden, um die EHTs ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen.

Lovett et al. (2009) stellten die verschiedenen Möglichkeiten der Vaskularisierung beim *tissue engineering* dar, u.a. die Verwendung von Gewebegerüsten mit vorgefertigten Mikrokanälen, die mit Zellen besiedelt werden, von Bioreaktoren zur Perfusion der Gewebe und Gefäße/Kanäle, die in Hydrogel-Matrices eingebettet werden. Carrier et al. (2002a) konnten durch Perfusion besiedelter Polymergerüste eine verbesserte räumliche Verteilung der Zellen und eine erhöhte Expression kardialer Marker bewirken. Durch die Einlage biodegradabler Alginatfäden, die enzymatisch aufgelöst werden können und so einen perfundierbaren Hohlraum im Hydrogel hinterlassen (Vollert et al. 2014), ist es möglich das Gewebe zu perfundieren. Allerdings müsste zur optimalen Versorgung des Gewebes ein ganzes Netzwerk von Kanälen hergestellt werden. Hirt et al. (2014) kritisieren den Begriff der „vaskularisierten kardialen Transplantate“ jedoch, da sie derzeit weder suffizient *in vitro* perfundiert würden, noch direkt an die Blutversorgung des Transplantatempfängers

angeschlossen werden könnten. Trotz dieser vielversprechenden Ansätze scheint es also noch ein weiter Weg bis zur optimalen Versorgung des künstlich hergestellten Gewebes mit Nährstoffen und v.a. Sauerstoff zu sein.

5. Zusammenfassung

Engineered heart tissue (EHT) stellt bei dem herrschenden Organspende-Mangel eine mögliche zukünftige Behandlungsoption dar, um krankes oder fehlgebildetes Herzgewebe zu ersetzen. Allerdings ist die Größe der Transplantate durch die Versorgung des Gewebes per Diffusion bislang begrenzt sodass die Konstrukte bislang nicht in therapeutisch nutzbaren Größen hergestellt werden können. Die Limitation liegt vor allem in der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Gewebe.

In dieser Arbeit sollte die Sauerstoffversorgung in EHTs mithilfe unterschiedlicher Methoden evaluiert werden. Aus methodischen Gründen erfolgte dies an zwei unterschiedlichen Größen, den kleineren 24-w-EHTs und den größeren 6-w-EHTs. Durch die Messung mit der Nadelsonde im 6-w-EHT konnten wir feststellen, dass die Sauerstoffkonzentration innerhalb der EHTs von der Oberfläche zur Mitte der Konstrukte signifikant abfiel, und diese Reduktion im Reifungsprozess der EHTs noch zunahm. Durch Konvektion war dieser Effekt zum Teil reversibel. Im 24-w-EHT erfolgten die weiteren Untersuchungen zur Charakterisierung von Hypoxie und Sauerstoffversorgung. Bei der videooptischen Messung zeigte sich eine bessere Kontraktilität der bei 40% Sauerstoff inkubierten EHTs im Vergleich zu solchen, die bei 21% Sauerstoff inkubiert worden waren. Um die Versorgung der EHTs mit Sauerstoff zu verbessern, wurde in dieser Arbeit die Verwendung des künstlichen Sauerstoffträgers Perfluorodecalin etabliert, welcher zu einer weiteren Steigerung der Kontraktilität führte. Durch Konvektion auf dem Schwenktisch zeigte sich ein zusätzlicher positiver Effekt auf die Kontraktionskraft der EHTs. Zum Teil konnten diese Hinweise auf eine verbesserte Sauerstoffversorgung durch eine verminderte Hypoxie-Fläche (Pimonidazol-Färbung) bekräftigt werden. Allerdings ließen sich bei der Messung der Kardiomyozyten-Zellzahl (Dystrophin-Färbung) keine signifikanten Unterschiede bei den verschiedenen Bedingungen darstellen. Messungen von RNA- und Protein-Expression als Hinweise auf Hypoxie in den EHTs konnten ebenfalls keine eindeutige Bestätigung der Hypoxie in den unter unterschiedlichen Bedingungen kultivierten EHTs erbringen.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die EHTs in Abhängigkeit von der Größe unter einer Hypoxie leiden, welche sich im Laufe der Reifung und Verdichtung des EHTs noch verstärkt. Positiv auf die Oxygenierung wirkten sich höhere Sauerstoffkonzentrationen

während der Inkubation, die Verwendung der Sauerstoffträgers Perfluorodecalin und der Konvektion aus. Die Sauerstoffversorgung bleibt derzeit noch ein größenlimitierender Faktor für die Nutzung von EHTs im klinischen Einsatz der Gewebeersatztherapie.

6. Abkürzungsverzeichnis

A

A.	Arteria, Arterie
Abb.	Abbildung
ACB	Aortokoronarer Bypass
ACE-Hemmer	<i>Angiotensine-Converting-Enzyme-Hemmer</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintri-phosphat
AT ₁ -Rezeptor	Rezeptorunterart Nr.1 für Angiotensin-II

B

BDM	<i>2,3-Butanedione Monoxine</i>
Bnip	<i>Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa interacting protein</i>
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise

C

°C	Grad Celsius
Casp	Caspase
CEE	<i>Chick embryo extract</i> , Hühnerembryonenextrakt
cDNA	<i>complementary-desoxyribonucleic acid</i> , Komplementäre DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
Ct	<i>Cycle threshold</i>

D

dl	Deziliter
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleintriphosphat

E

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHT	<i>Engineered heart tissue</i> , künstliches Herzgewebe
ESC	<i>European society of cardiology</i> , europäische Kardiologengemeinschaft
et al.	und weitere

F

F	Fluoratom
---	-----------

G

g	Gramm
G	x-fache Erdbeschleunigung

H

6. Abkürzungsverzeichnis

H ⁺	Wasserstoffion
HBOCH	<i>hemoglobine-based oxygene carriers</i> ; auf Hämoglobin-Basis bestehende Sauerstoffträger
HCl	Salzsäure
H.E.	Hämatoxylin/Eosin
HIF-1 α	<i>Hypoxia inducible factor 1α</i> , Hypoxie induzierter Faktor 1 α
HIF-1 β	<i>Hypoxia inducible factor 1β</i> , Hypoxie induzierter Faktor 1 β
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A
H ₂ O	Wasser
Hz	Hertz (s ⁻¹)
I	
IgG	Immunglobulin Unterklasse G
K	
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
kPa	Kilopascal (Einheit des Drucks)
L	
l	Liter
LDL	<i>Low density lipoprotein</i> , Lipoprotein niederer Dichte
M	
M	Molmasse
μ m	Mikrometer
mA	Milliampere
Min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule (Einheit des Drucks)
mM	Millimol
mN	Millinewton
mRNA	<i>messenger-ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
ms	Millisekunde
mTOR	<i>mechanistic/mammalian Target of Rapamycin</i> , Ziel des Rapamycin im Säugetier
N	
n	Anzahl der untersuchten Proben, Replikate
N	Newton, Kraft: 1 kg x m x s ⁻¹
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrid
NKM	Nicht-Kardiomyozyten-Medium

O

O₂ Sauerstoff
OH⁻ Hydroxy-Gruppe

P

p p-Wert, Signifikanzniveau
p *post*; Silikonhalterung des EHTs
PBS *Phosphate buffered saline*, Phosphat-gepufferte Salzlösung
pCO₂ Partialdruck von Kohlenstoffdioxid
pmol Picomol
pO₂ Partialdruck von Sauerstoff
PFD Perfluorodecalin
pH *potentia Hyrogenii*, negativer dekadische Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität ($\text{pH} = -\log_{10} \alpha (\text{H}^+)$)
PHD HIF-Prolyl-Hydroxylasen
PTCA Perkutane transluminale Koronarangioplastie
PCR *Polymerase chain reaction*, Polymerase-Kettenreaktion
P/S Penicillin/Streptomycin

Q

qPCR *quantitative real time polymerase chain reaction*, quantitative Echtzeit-PCR

R

RBC *red bloodcell concentrate*, Erythrozythenkonzentrat
RNA Ribonukleinsäure
rpm *rounds per minute*, Umdrehungen pro Minute
RT-qPCR Reverse-Transkriptions-quantitative Echtzeit-PCR
RV *Relaxation velocity*, Relaxationsgeschwindigkeit

S

SDS-PAGE *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sek Sekunde
s Sekunde
s. siehe
SD *Standard deviation*, Standardabweichung
SEM *Standard error of mean*, Standardfehler

T

Tab. Tabelle
TBS *Tris-buffered Saline*; Tris-gepufferte Saline
TEMED Tetramethylethylendiamin
TM *Trademark*; eingetragenes Warenzeichen

U

U Unit; Einheit
u.a. unter anderem

6. Abkürzungsverzeichnis

UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
V	
v.a.	vor allem
VAD	<i>ventricular assistant device</i> , Ventrikelunterstützungssystem
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VHF	Vorhofflimmern
W	
w	<i>well</i> ; Mulde in Inkubationsplatte
WHO	<i>World Health Organisation</i> , Weltgesundheitsorganisation
X	
x	Multiplikationszeichen
Z	
z.B.	zum Beispiel

7. Literaturverzeichnis

- Acker H (1989) PO₂ chemoreception in arterial chemoreceptors. *Annu Rev Physiol* 51:835–44.
- Amellem O, Pettersen EO (1991) Cell inactivation and cell cycle inhibition as induced by extreme hypoxia: the possible role of cell cycle arrest as a protection against hypoxia-induced lethal damage. *Cell Prolif* 24:127–41.
- Anthony P, Davey MR, Power JB, Washington C, Lowe KC (1994) Synergistic enhancement of protoplast growth by oxygenated perfluorocarbon and Pluronic F-68. *Plant Cell Rep* 13:251–5.
- Appelhoff RJ, Tian Y, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Gleadle JM (2004) Differential Function of the Prolyl Hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the Regulation of Hypoxia-inducible Factor *. 279:38458–38465.
- Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, Kirby A, Sourjina T, Peto R, Collins R, Simes R (2005) Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 366:1267–78.
- Bengtsson C, Björkelund C, Lapidus L, Lissner L (1993) Associations of serum lipid concentrations and obesity with mortality in women: 20 year follow up of participants in prospective population study in Gothenburg, Sweden. *BMJ* 307:1385–8.
- Bentzen L, Keiding S, Nordmark M, Falborg L, Hansen SB, Keller J, Nielsen OS, Overgaard J (2003) Tumour oxygenation assessed by 18 F-fluoromisonidazole PET and polarographic needle electrodes in human soft tissue tumours. *Radiol Oncol* 67:339–344.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2002) Hemoglobin Transports Oxygen Efficiently by Binding Oxygen Cooperatively.
- Bolli R (2001) Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J Mol Cell Cardiol* 33:1897–1918.
- Brown MA, Iyer RK, Radisic M (2008) Pulsatile perfusion bioreactor for cardiac tissue engineering. *Biotechnol Prog* 24:907–20.
- Bruick RK (2000) Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci* 97:9082–9087.
- Byrne J, Davie AP, JJ M (2004) Clinical assessment and investigation of patients with suspected heart failure. *Caring Hear Fail patient - a Textb Healthc Prof* 75–91.
- Carrier RL, Rupnick M, Langer R, Schoen FJ, Freed LE, Vunjak-Novakovic G (2002) Perfusion improves tissue architecture of engineered cardiac muscle. *Tissue Eng* 8:175–88.
- Cheung BMY, Lauder IJ, Lau C-P, Kumana CR (2004) Meta-analysis of large randomized controlled trials to evaluate the impact of statins on cardiovascular outcomes. *Br J Clin Pharmacol* 57:640–51.
- Choi Y-H, Cowan DB, Nathan M, Poutias D, Stamm C, del Nido PJ, McGowan FX (2008) Myocardial hypertrophy overrides the angiogenic response to hypoxia. *PLoS One*

- 3:e4042.
- Cleveland DW (1983) Peptide mapping in one dimension by limited proteolysis of sodium dodecyl sulfate-solubilized proteins. *Methods Enzymol* 96:222–9.
- D’Addio F, Margonato D, Pensato U, Borgese L, Potena L, Fiorina P (2015) Novel therapeutic and diagnostic management of heart transplant patients. *Hear lung Vessel* 7:198–207.
- Deutsche Stiftung Organtransplantation (2014) Hintergrundinformation Deutsche Stiftung Organtransplantation. *Veröffentlichung, Dtsch Stiftung Organtransplantation* 1–3.
- Dlamini Z, Tshidino SC, Hull R (2015) Abnormalities in Alternative Splicing of Apoptotic Genes and Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci* 16:27171–27190.
- Eisfeld J, Mikala G, Varadi G, Schwartz A KU (1997) Inhibition of Cloned Human L-Type Cardiac Calcium Channels by 2, 3-Butanedione Monoxime Does Not Require PKA-Dependent Phosphorylation Sites. *Biochem Biophys Res Commun* 492:489–492.
- Ekelund LG, Haskell WL, Johnson JL, Whaley FS, Criqui MH, Sheps DS (1988) Physical fitness as a predictor of cardiovascular mortality in asymptomatic North American men. The Lipid Research Clinics Mortality Follow-up Study. *N Engl J Med* 319:1379–84.
- Elibol M, Mavituna F (1995) Effect of perfluorodecalin as an oxygen carrier on actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Appl Microbiol Biotechnol* 43:206–210.
- Epstein ACR, Gleadle JM, McNeill L a, Hewitson KS, Rourke JO, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian Y, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, et al. (2001) C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107:43–54.
- Eschenhagen T, Didié M, Heubach J, Ravens U, Zimmermann W-H (2002) Cardiac tissue engineering. *Transpl Immunol* 9:315–21.
- Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, Scholz H, Wachtow J, Weil J, Zimmermann W-H, Dohmen HH, Schäfer H, Bishopric N, Wakatsuki T, Elson EL (1997) Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *FASEB J* 11:683–94.
- Fabian TC (2011) Perfluorocarbons. *J Trauma* 70:S42–S44.
- Gálvez-Montón C, Prat-Vidal C, Roura S, Soler-Botija C, Bayes-Genis A (2013) Cardiac tissue engineering and the bioartificial heart. *Rev española Cardiol* 66:391–9.
- Gibbons RJ, Chatterjee K, Daley J, Douglas JS, Fihn SD, Gardin JM, Grunwald M a, Levy D, Lytle BW, O’Rourke R a, Schafer WP, Williams S V, Ritchie JL, Cheitlin MD, Eagle K a, Gardner TJ, Garson a, Russell RO, Ryan TJ, et al. (1999) ACC/AHA/ACP-ASIM guidelines for the management of patients with chronic stable angina: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Management of Patients With Chronic Stable Ang. *J Am Coll Cardiol* 33:2092–2197.
- Gortmaker SL, Must A, Perrin JM, Sobol AM DW (1993) Social and economic consequences of overweight in adolescence and young adulthood. *N Engl J Med*

329:1008–12.

Greijer a. E, van der Groep P, Kemming D, Shvarts a., Semenza GL, Meijer G a., van de Wiel M a., Belien J a M, van Diest PJ, van der Wall E (2005) Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor I (HIF-I). *J Pathol* 206:291–304.

Gross MW, Karbach U, Groebe K, Franko a. J, Mueller-Klieser W (1995) Calibration of misonidazole labeling by simultaneous measurement of oxygen tension and labeling density in multicellular spheroids. *Int J Cancer* 61:567–573.

Guyton JR (2002) Clinical assessment of atherosclerotic lesions: Emerging from angiographic shadows. *Circulation* 106:1308–1309.

Hackam DG, Khan N a, Hemmelgarn BR, Rabkin SW, Touyz RM, Campbell NRC, Padwal R, Campbell TS, Lindsay MP, Hill MD, Quinn RR, Mahon JL, Herman RJ, Schiffrin EL, Ruzicka M, Larochelle P, Feldman RD, Lebel M, Poirier L, et al. (2010) The 2010 Canadian Hypertension Education Program recommendations for the management of hypertension: part 2 - therapy. *Can J Cardiol* 26:249–258.

Hansen A, Eder A, Bönstrup M, Flato M, Mewe M, Schaaf S, Aksehrioglu B, Schwörer A, Uebeler J, Eschenhagen T (2010) Development of a Drug Screening Platform Based on Engineered Heart Tissue. *Circ Res* 107:35–44.

Heart Protective Study collaborative group (2002) MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 360:7–22.

Hirt MN, Hansen A, Eschenhagen T (2014) Cardiac tissue engineering: state of the art. *Circ Res* 114:354–67.

Hirt MN, Sörensen NA, 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* 107:307–323.

Hoffmeier K (2015) Atmungskette und Elektronentransport an der Mitochondrienmembran. 2015.

van den Hoogen PCW, Feskens EJM, Nagelkerke NJD, Menotti A, Nissinen A, Kromhout D (2000) The Relation between Blood Pressure and Mortality Due to Coronary Heart Disease among Men in Different Parts of the World. *N Engl J Med* 342:1–8.

Hsieh A, Feric NT, Radisic M (2015) Combined Hypoxia and Sodium Nitrite Pretreatment for Cardiomyocyte Protection In Vitro. AICHE. doi: 10.1002/btpr.2039

Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Franklin Bunn H (1996) Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its α subunit. *J Biol Chem* 271:32253–32259.

ISIS-2 Collaborative Group. (1988) Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both or neither among 17.187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. *Lancet* 332:349–360.

Ito S, Ohta T, Nakazato Y (1999) Characteristics of 5-HT-containing chemoreceptor cells of the chicken aortic body. *J Physiol* 515 (Pt 1:49–59.

Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic a, Asara JM, Lane WS,

- Kaelin WG (2001) HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292:464–468.
- Iyer N V, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler M, Yu Y, Semenza GL (1998) Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev* 12:149–162.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian Y, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Hebestreit HF, Mukherji M, Scho CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001) Targeting of HIF-1 α to the von Hippel–Lindau Ubiquitylation Complex by O₂-Regulated Prolyl Hydroxylation. *Science* (80-) 292:468–472.
- Jenkins W, Evans S, Koch C (2000) Hypoxia and necrosis in rat 9L glioma and morris 7777 hepatoma tumors: comparative measurements using EF5 binding and the Eppendorf needle electrode. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 46:1005–1017.
- Kasanuki H, Hagiwara N, Hosoda S, Sumiyoshi T, Honda T, Haze K, Nagashima M, Yamaguchi J -i., Origasa H, Urashima M, Ogawa H (2009) Angiotensin II receptor blocker-based vs. non-angiotensin II receptor blocker-based therapy in patients with angiographically documented coronary artery disease and hypertension: the Heart Institute of Japan Candesartan Randomized Trial for Evaluation in . *Eur Heart J* 30:1203–1212.
- Kim H, Greenburg A (2004) Artificial oxygen carriers as red blood cell substitutes: A selected review and current status. *Artif Organs* 28:813–828.
- Koch CJ, Evans SM (2015) Optimizing Hypoxia Detection and Treatment Strategies. *Semin Nucl Med* 45:163–176.
- Korecky B, Cm H, Rakusan K (1982) Functional capillary density in normal and transplanted rat hearts . 60:7039787.
- Kraggerud SM, Sandvik JA, Pettersen EO (1995) Regulation of protein synthesis in human cells exposed to extreme hypoxia. *Anticancer Res* 15:683–6.
- Krum H, Abraham WT (2009) Heart failure. *Lancet* 373:941–955.
- Kubota K, Kubota N, Pearce GL IW (1996) ACE-inhibitor-induced cough, an adverse drug reaction unrecognised for several years: studies in prescription-event monitoring. *Eur J Clin Pharmacol* 431–7.
- Ladoux A FC (1993) Hypoxia is a strong inducer of vascular endothelial growth factor mRNA expression in the heart. *Biochem Biophys Res Commun* 195:1005–1010.
- Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW TP (2000) Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med* 342:626–33.
- Leor J, Aboulafia-Etzion S, Dar A, Shapiro L, Barbash IM, Battler A, Granot Y, Cohen S (2000) Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation* 102:III56–61.
- Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle D a, Choi a, Yau TM (1999) Survival and function of bioengineered cardiac grafts. *Circulation* 100:II63–I69.
- Loor G, Schumacker PT (2008) Role of hypoxia-inducible factor in cell survival during myocardial ischemia-reperfusion. *Cell Death Differ* 15:686–690.

- Lopaschuk GD, Jaswal JS (2010) Energy metabolic phenotype of the cardiomyocyte during development, differentiation, and postnatal maturation. *J Cardiovasc Pharmacol* 56:130–40.
- Lovett M, Lee K, Edwards A, Kaplan DL (2009) Vascularization strategies for tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* 15:353–70.
- Lowe KC (1999) Perfluorinated blood substitutes and artificial oxygen carriers. *Blood Rev* 13:171–184.
- Lu M, Chang H, Chang C, Wang B, Shyu K (2005) Temporal and spatial expression of hypoxia-inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor in a rat model of myocardial ischemia with or without reperfusion. *J Formos Med Assoc* 104:707–14.
- Maillard E, Juszcak MT, Langlois A, Kleiss C, Sencier MC, Bietiger W, Sanchez-Dominguez M, Krafft MP, Johnson PR V, Pinget M, Sigrist S (2012) Perfluorocarbon emulsions prevent hypoxia of pancreatic β -cells. *Cell Transplant* 21:657–669.
- Minchenko O, Opentanova I, Caro J (2003) Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family (PFKFB-1–4) expression in vivo. *FEBS Lett* 554:264–270.
- Morgan J a., John R, Lee BJ, Oz MC, Naka Y (2004) Is severe right ventricular failure in left ventricular assist device recipients a risk factor for unsuccessful bridging to transplant and post-transplant mortality. *Ann Thorac Surg* 77:859–863.
- Morice M, Serruys P, Sousa J, Fajadet J, Hayashi E, Perin M, Colombo A, Schuler G, Barragan P, Guagliumi G, Molnar F, Falotico R (2002) A randomized comparison of a Sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med* 346:1773–1780.
- Mosher P, Ross J, McFate PA, Shaw RF (1964) Control of coronary blood flow by an autoregulatory mechanism. *Circ Res* 14:250–9.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74:1124–1136.
- Nationale Versorgungsleitlinie der chronischen KHK (2013) Nationale Versorgungsleitlinie: Chronische KHK Langfassung. 2:
- Ness PM, Cushing MM (2007) Pursuit of an Alternative to the Donor Red Blood Cell. 131:
- Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P (2004) Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res* 94:1543–1553.
- Niiler E (2002) Setbacks for blood substitute companies. *Nat Biotechnol* 20:962–3.
- Ott HC, Matthiesen TS, Goh S-K, Black LD, Kren SM, Netoff TI, Taylor D a (2008) Perfusion-decellularized matrix: using nature’s platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med* 14:213–21.
- Oz MC, Goldstein DJ, Pepino P, Weinberg AD, Thompson SM, Catanese KA, Vargo RL, McCarthy PM, Rose EA, Levin HR (1995) Screening scale predicts patients successfully receiving long-term implantable left ventricular assist devices. *Circulation* 92:III169–73.
- Paffenbarger RS, Hyde RT, Wing AL, Lee IM, Jung DL (1993) The association of changes

- in physical-activity level and other lifestyle characteristics with mortality among men. *N Engl J Med* 328:538–45.
- Papadaki M, Bursac N, Langer R, Merok J, Vunjak-Novakovic G, Freed LE (2001) Tissue engineering of functional cardiac muscle: molecular, structural, and electrophysiological studies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H168–H178.
- Parker JD PJ (1998) Nitrate Therapy for Stable Angina Pectoris. *N Engl J Med* 338:520–31.
- Peers C (1990) Hypoxic suppression of K⁺ currents in type I carotid body cells: selective effect on the Ca²⁺(+)-activated K⁺ current. *Neurosci Lett* 119:253–6.
- Phillips AN, Wannamethee SG, Walker M, Thomson A, Smith GD (1996) Life expectancy in men who have never smoked and those who have smoked continuously: 15 year follow up of large cohort of middle aged British men. *BMJ* 313:907–8.
- Psaty BM (1997) Health Outcomes Associated With Antihypertensive Therapies Used as First-Line Agents_{title>A Systematic Review and Meta-analysis}. *JAMA J Am Med Assoc* 277:739.
- Radisic M, Malda J, Epping E, Geng W, Langer R, Vunjak-Novakovic G (2006a) Oxygen gradients correlate with cell density and cell viability in engineered cardiac tissue. *Biotechnol Bioeng* 93:332–43.
- Radisic M, Park H, Chen F, Salazar-Lazzaro JE, Wang Y, Dennis R, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G (2006b) Biomimetic approach to cardiac tissue engineering: oxygen carriers and channeled scaffolds. *Tissue Eng* 12:2077–2091.
- Radisic M, Park H, Shing H, Consi T, Schoen FJ, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G (2004) Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:18129–34.
- Salceda S, Caro J (1997) Hypoxia-inducible Factor 1a (HIF-1a) Protein Is Rapidly Degraded by the Ubiquitin-Proteasome System under Normoxic Conditions. *J Biol Chem* 272:22642–22647.
- Schaaf S, Shibamiya A, Mewe M, Eder A, Stöhr A, Hirt MN, Rau T, Zimmermann W-H, Conradi L, Eschenhagen T, Hansen A (2011) Human Engineered Heart Tissue as a Versatile Tool in Basic Research and Preclinical Toxicology. *PLoS One* 6:e26397.
- Schmaltz C, Hardenbergh PH, Wells a, Fisher DE (1998) Regulation of proliferation-survival decisions during tumor cell hypoxia. *Mol Cell Biol* 18:2845–2854.
- Semenza GL, Wang GL (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12:5447–5454.
- Shimizu T, Sekine H, Yang J, Isoi Y, Yamato M, Kikuchi A, Kobayashi E, Okano T (2006) Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues. *FASEB J* 20:708–10.
- Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Akutsu T, Setomaru T, Abe K, Kikuchi A, Umezumi M, Okano T (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:e40.
- Shweiki D, Itin a, Soffer D, Keshet E (1992) Vascular endothelial growth factor induced

- by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359:843–845.
- Spahn D, van Bremp R, Theilmeier G, Reibold J, Welte M, Messmer K (1999) Perflubron Emulsion Delays Blood Transfusions in Orthopedic Surgery. *Anesthesiology* 91:1195–1208.
- Spahn DR (1999) Blood substitutes. Artificial oxygen carriers: perfluorocarbon emulsions. *Crit Care* 3:R93–R97.
- Sperlich B, Düking P (2015) Atemgastransport. <http://wiki.sportsandscience.de/wiki/transport-der-atemgase-im-blut/> 9–11.
- Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW (1995) A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis : A Report From the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 92:1355–1374.
- Statistisches Bundesamt (2013) Todesursachenstatistik 2013.
- Stone G, Ellis S, Cox D, Hermiller J, O’Shaughnessy C, JT M, Turco M, Caputo R, Bergin P, Greenberg J, Popma J, Russell M (2004) A polymer-based, Paclitaxel-eluting stent in patients with coronary heart disease. *N Engl J Med* 350:2239–2246.
- Sun Y, Kiani MF, Postlethwaite AE, Weber KT (2002) Infarct scar as living tissue. *Basic Res Cardiol* 97:343–7.
- Sung JH, Shuler ML (2009) A micro cell culture analog (microCCA) with 3-D hydrogel culture of multiple cell lines to assess metabolism-dependent cytotoxicity of anti-cancer drugs. *Lab Chip* 9:1385–1394.
- Tee R, Morrison WA, Disting GJ, Ph D, Liu G, Choi YS, Hsiao ST, Hons BS, Dilley RJ (2012) Transplantation of engineered cardiac muscle flaps in syngeneic rats. *Tissue Eng Part A* 18:1992–9.
- The Consensus trial study group (1987) Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Engl J Med* 316:1429–35.
- The SOLVD Investigators (1991) Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. *N Engl J Med* 325:293–302.
- Tiburcy M, Didié M, Boy O, Christalla P, Döker S, Naito H, Karikkineth BC, El-Armouche A, Grimm M, Nose M, Eschenhagen T, Zieseniss A, Katschinski DM, Hamdani N, Linke W a., Yin X, Mayr M, Zimmermann WH (2011) Terminal differentiation, advanced organotypic maturation, and modeling of hypertrophic growth in engineered heart tissue. *Circ Res* 109:1105–1114.
- Tinton SA, Buc-Calderon PM (1999) Hypoxia increases the association of 4E-binding protein 1 with the initiation factor 4E in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett* 446:55–9.
- Tremper K, Lapin R, Levine E, Friedman A, Shoemaker W (1980) Hemodynamic and oxygen transport effects of a perfluorochemical blood substitute, fluosol-DA. *Crit Care Med* 8:7449405.
- Tunstall-Pedoe H, Woodward M, Tavendale R, A’Brook R, McCluskey MK (1997) Comparison of the prediction by 27 different factors of coronary heart disease and

- death in men and women of the Scottish Heart Health Study: cohort study. *BMJ* 315:722–9.
- Vamvakas EC, Taswell HF (1994) Epidemiology of blood transfusion. *Transfusion* 34:464–70.
- Vane JR (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 232–5.
- Vollert I, Seiffert M, Bachmair J, Sander M, Eder A, Conradi L, Vogelsang A, Schulze T, Uebeler J, Holnthoner W, Redl H, Reichenspurner H, Hansen A, Eschenhagen T (2014) In vitro perfusion of engineered heart tissue through endothelialized channels. *Tissue Eng Part A* 20:854–63.
- Wang GCY, Wang Y (1995) Rapid differentiation of bacterial species with multiple probes of different lengths in a single slot blot hybridization. *Appl Environ Microbiol* 61:4269–4273.
- Weisman SM, Graham DY (2002) Evaluation of the benefits and risks of low-dose aspirin in the secondary prevention of cardiovascular and cerebrovascular events. *Arch Intern Med* 162:2197–2202.
- Werner N, Nickenig G LU (2002) Pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Basic Res Cardiol* 97:105–116.
- World Health Organisation (1995) Definition der chronischen Herzinsuffizienz.
- Wu J, Bond C, Chen P, Chen M, Li Y, Shohet R V., Wright G (2015) HIF-1 α in the heart: Remodeling nucleotide metabolism. *J Mol Cell Cardiol* 82:194–200.
- Xiao Y, McArdle JJ (1995) Activation of protein kinase A partially reverses the effects of 2,3-butanedione monoxime on the transient outward K⁺ current of rat ventricular myocytes. *Life Sci* 57:335–343.
- Yusuf S, Teo KK, Pogue J, Dyal L, Copland I, Schumacher H, Dagenais G, Sleight P AC (2008) Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events. *N Engl J Med* 358:1547–59.
- Zhang Z, al-Rubeai M, Thomas CR (1992) Effect of Pluronic F-68 on the mechanical properties of mammalian cells. *Enzyme Microb Technol* 14:980–3.
- Zimmermann W-H, Didié M, Wasmeier GH, Nixdorff U, Hess A, Melnychenko I, Boy O, Neuhuber WL, Weyand M, Eschenhagen T (2002a) Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats. *Circulation* 106:I151–I157.
- Zimmermann W-H, Melnychenko I, Wasmeier G, Didié M, Naito H, Nixdorff U, Hess A, Budinsky L, Brune K, Michaelis B, Dhein S, Schwoerer A, Ehmke H, Eschenhagen T (2006) Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nat Med* 12:452–8.
- Zimmermann W-H, Schneiderbanger K, Schubert P, Didié M, Münzel F, Heubach JF, Kostin S, Neuhuber WL, Eschenhagen T (2002b) Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ Res* 90:223–30.
- Zuck TF, Riess JG, Biro GP, Zuck TF (2015) Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences Current Status of Injectable Oxygen Carriers Current Status of Injectable Oxygen Carriers. doi: 10.3109/10408369409084678

8. Veröffentlichungen

Vollert, I. Seiffert, M. Bachmair, J. **Sander**, M. Eder, A. Conradi, L. Vogelsang, A. Schulze, T. Uebeler, J. Holnthoner, W. Redl, H. Reichenspurner, H. Hansen, A. & Eschenhagen, T. 2014. In vitro perfusion of engineered heart tissue through endothelialized channels. *Tissue engineering. Part A*, 20(3-4), pp.854–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24156346>

(*): both authors contributed equally to this work

9. Danksagung

Ich danke Herrn Professor Eschenhagen für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit der Durchführung der Doktorarbeit in seinem Institut und dem mir damit entgegenbrachten Vertrauen. Während der Bearbeitung der Dissertation habe ich gelernt wissenschaftlich zu arbeiten und konnte so meinen akademischen Horizont erweitern.

Mein besonderer Dank gilt Moritz Seiffert, der mir als Betreuer meiner Dissertation hilfreich zur Seite stand und mich mit seinem Enthusiasmus und seinem positiven Denken unterstützt hat. Auch Ingra Mannhardt möchte ich besonders danken, da sie mich wie eine zweite Betreuerin sehr bei meiner Arbeit im Labor und auch moralisch beim Schreiben der Dissertation unterstützt hat.

Zudem gilt mein Dank Bülent Aksehirlioglu, der mich durch den Bau verschiedenster Apparaturen, v.a. der Vorrichtung zur Sonden-Sauerstoffmessung, unermüdlich unterstützt hat. Auch Thomas Schulze möchte ich sehr danken, da er mich stets bei den Versuchen unterstützte und ich immer auf seine Hilfe zählen konnte. Vielen Dank zudem an Arne Hansen, Alexandra Eder, Sebastian Schaaf, Gerlinde Raasch, Frank Neumann, Justus Stenzig, Jutta Starbatty, David Letuffe-Brenière und an alle anderen MitarbeiterInnen für die freundliche Unterstützung und nette und bereichernde Zeit (u.a. beim Feuerzangenbowle-Abend). Melanie Neumann aus der Mousepathologie *Facility* der Neurobiologie danke ich für die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen und der freundlichen Bereitstellung der Geräte zur histologischen Auswertung. Xiaoqin Hua aus dem TSI Lab möchte ich für die Unterstützung bei der Aufarbeitung der histologischen Proben danken.

Meinen Eltern und meinen Geschwistern danke ich, dass sie immer für mich da sind und mich ausnahmslos unterstützen und mir zur Seite stehen, wenn ich sie brauche. Ich könnte mir keine bessere Familie mit mehr Liebe und Rückhalt wünschen.

Zum Schluss: Annelie, Franzi, Marion, Lisa, Kathrin, Laura – vielen Dank für die seelische Unterstützung und das Zusammendurchstehen der guten und der schlechten Phasen der Arbeit. Ohne die gegenseitige Unterstützung wäre dies sehr schwierig geworden.

Herr P. – vielen Dank für alles!

10. Lebenslauf

11. Anhang

➤ Protokoll RNA-Präparation

Vorbereitung:

- PBS zum EHTs spülen
 - Stickstoffbehälter, Stickstoff, Stickstoff-Eppendorf-Gefäße (beschriftet), Brille, Handschuhe
 - Box mit Eis
 - RNase free Spray, RNase-freies Wasser (30 µl je EHT)
 - Trizol-Lösung (300 µl je EHT)
 - Pinzette/Spatel
 - RNase-frei: 2 ml Eppendorf-Gefäße für Gesamtansatz, 1,5 ml Eppendorf-Gefäße für RNA (alles beschriftet)
 - Metallkügelchen für Tissuelyzer (1 je EHT)
 - Chloroform (60 µl je EHT)
 - Isopropanol (150 µl je EHT)
 - 75%iger Ethanol (300 µl je EHT)
 - RNase-freie Pipettenspitzen (blau, gelb)
-
- Zentrifuge auf 4 °C vorkühlen
 - Arbeitsplatz, Pipetten und Metallkügelchen mit RNase-free Spray und Ethanol säubern
 - EHTs von Matten abziehen und 6x in PBS waschen, Stickstoff-Eppendorf-Gefäß in Stickstoff stellen (Stickstoff in Styroporhalter gießen), EHT in Tube geben, zudrehen, in Stickstofftank legen – anschließend bei -80 °C tiefrieren
 - EHT aus der Kühltruhe holen, auf Eis stellen, bisschen antauen lassen, mit Pinzette in 2 ml Eppendorf-Gefäß überführen, je 300 µl Trizol dazugeben, je ein Metallkügelchen dazu und bei 30 Hertz 2 Minuten in den Tissuelyzer
 - wenn trübe Suspension entstanden ist:
Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten (in der Zeit die Metallkügelchen mit Magnet aus den Eppendorf-Gefäßen holen: Magnet an Deckel, Gefäß auf den Kopf stellen, wieder umdrehen-Kugel bleibt hängen - Tube leicht schräg halten, vorsichtig Deckel öffnen, dann Magneten entfernen- Kugel fällt raus)
 - nun unter dem Abzug je 60 µl Chloroform hinzugeben zur Phasentrennung
 - 15 Sekunden vortexen (alle Gefäße gleichzeitig auf Ständer)
 - 3 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
 - 15 Minuten bei 4 °C und 12.000 G zentrifugieren (3 Phasen entstehen)
 - oberste wässrige Phase vorsichtig in je ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß abpipettieren und weiterverwenden (andere Phasen für DNA- und Proteinpräparation verwenden)
 - zur wässrigen Phase je 150 µl Isopropanol geben und kurz vortexen
 - 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
 - 10 Minuten bei 4 °C und 12.000 G zentrifugieren
 - Überstand abgießen, indem man den Gefäß schnell über einem Papiertuch umstürzt und über das Tuch zieht
 - Pellet mit 300 µl 75%igem Ethanol waschen
 - leicht anvortexen, sodass sich das Pellet von der Wand löst
 - 5 Minuten bei 4 °C und 7.500 G zentrifugieren

- Überstand abgießen (s.o.) und Pellet bei offenem Deckel und Raumluft bzw. bei 37 °C auf Heizblock trocknen lassen (dauert ca. 3 Std.)
- je 30 µl RNase-freies Wasser dazugeben
- 10 Minuten (!) bei 55-60 °C auf Heizblock inkubieren, kurz anvortexen, sofort auf Eis stellen und bei -80 °C tiefrieren oder weiterverwenden
- Samples aus -80 °C nehmen und auf Eis stellen
- auftauen lassen, Leermessung-Eppendorf-Gefäß mit RNase-freiem Wasser füllen
- Nanodrop: User eingeben, Nucleic Acid [RNA] , graue Pipetten-Spitzen und Pipette, 1) Tara [Measure] mit Leer-Gefäß, 2) Blank [Blank] mit Leer-Gefäß, 3) Gefäß vortexen und 1.2µl der Probe auf Nano-Drop-Abnehmer pipettieren, zuklappen, 'Measure', Datenfeld Eingabe → wenn alles gemessen – 'Exit' - unter Nano-Drop-Daten Datei in nemo kopieren, mit Excel öffnen und überflüssige Daten löschen
- (Wichtig: ng/µl – A260 – A 280 – A260/280 – 260/230)
- neue Excelspalte mit Wert (ng/µl)*30/1000 =Menge RNA/EHT in µg
- Proben wieder bei -80 °C einfrieren!

➤ Immunhistochemische Färbungen mit dem Ventana benchmark xt 2.6.8, Version 1

1 Ziel und Zweck

Vollautomat für immunhistologische Färbungen.

2 Anwendung

Immunhistochemisches Labor, Raum 285

3 Beschreibung

3.1 Gerätekonfiguration

- Ventana benchmark xt
- PC auf MS XP Basis mit dem Ventanaprogramm (NexES Version 9.30)
- Etikettendrucker EBAR II (Etiketten Labelkit 1418702 Ventana)
- Tintenstrahldrucker HP Deskjet D4260

3.2 Reagenzien

(Lagerung der Vorräte in Schrank Nr. 3 auf dem Flur):

- EZ Prep(tm) Konzentrat 950-120 2L Ventana Roche
- 2. LCS (ready-to-use) 650-010 2L Ventana Roche
- 2xSSC (Konzentrat) 950-110 2L Ventana Roche
- Reaction buffer (Konzentrat) 950-300 2L Ventana Roche
- CC1 (ready-to-use) 950-124 2L Ventana Roche
- CC2 (ready-to-use) 950-123 2L Ventana Roche
- Detection KIT für PAP

Ultraview Universal DAB Detection Kit, Ventana Roche, #760 500 bestehend aus

- 25ml ultraview Universal DAB Inhibitor
- 25ml ultraview Universal HRP Multimer
- 25ml ultraview Universal DAB Chromogen
- 25ml ultraview Universal DAB H²O²
- 25ml ultraview Universal DAB Copper

• Detection KIT für APAAP:

Ultraview Universal Alkaline Phosphatase RED Detection Kit, Ventana Roche, #760-501 bestehend aus

- Ultraview Universal AP Red Enhancer
- Ultraview Universal AP Red Multimer
- Ultraview Universal AP Red Naphthol
- Ultraview Universal AP Red Fast Red A
- Ultraview Universal AP Red Fast Red B

• Zusätzliche Reagenzien

- Bluing Reagent Ventana Roche, # 760-2037
- Hematoxylin Ventana Roche, # 760-2021
- Amplifier A Ventana Roche, # 253-2122
- Amplifier B Ventana Roche, # 253-2123
- Protease 1 Ventana Roche, # 760-2018

2.6.8 Ventana Version 01

Seite 2 von 3

3.3 Lösungen

- EZ Prep: 18 Liter aqua dest + 2 Liter EZ Konzentrat
- 2xSSC: 10 Liter Aqua dest + 2 Liter 2xSSC Konzentrat
- Reaction buffer: 18 Liter Aqua dest + 2 Liter Reaction buffer

3.4 Ablauf

3.4.1 Vorbereitung

- Das Gerät verfügt über 35 Reagenzienstationen inkl. Detektionskits und 30 Plätze für Objektträger.
- Sämtliche Reagenzien müssen vor dem Gebrauch auf dem Gerät registriert werden, sonst können sie nicht benutzt werden.
- Die Registrierung erfolgt über einen Datenknopf an der Verpackung über das Programm „Ventanaprodukte registrieren“.
- Erst nach einer doppelten Registrierung können die Produkte angewandt werden.
- Für einen Färbelauf benötigt man also immer das gewünschte Detektionskit und die 5 zusätzlichen Reagenzien.
- Der minimale Stand der Füllmenge der Verbrauchslösungen für einen kompletten Lauf mit 30 Objektträgern ist mit einem schwarzen Strich auf den entsprechenden Vorratsbehältern gekennzeichnet.

3.4.2 Durchführung eines kompletten Färbelaufs

- Paraffin- oder Kryostatschnitte aus dem Brutschrank/bzw. Kühlschrank nehmen (die Paraffinschnitte sollten mindestens 20min bei 60° C abgelaufen sein).
- Die Paraffinschnitte müssen handschriftlich mit der Probennummer, ggf. dem Unterblock und der gewünschten Färbung gekennzeichnet sein (bei jedem zu bestimmenden Antikörper sollte eine Positivkontrolle pro Tag mitgeführt werden und diese auf dem Etikett mit K vermerkt werden).
- Zuerst werden die Objektträger nach E-Nummern sortiert und in einer Reihe auf den Tisch gelegt. Die Reihenfolge sollte erst nach der Etikettierung wieder aufgelöst werden.
- Nun gibt man die gewünschten immunhistochemischen Markierungen ein (maximal 30).
- Nach Auswahl der Färbungen werden für jeden Objektträger die zugehörige E-Nummer, Blocknummer und ggf. zusätzliche Informationen wie z.B. „K“ für Kontrolle eingegeben. Nachdem noch einmal die Angaben auf den Objektträgern und denen auf dem Bildschirm verglichen wurden, erfolgt durch Klick auf das Icon „Drucken“ der Etikettendruck.
- Nach Überstreifen der Schutzschicht ist das Etikett verklebefertig.
- Nun werden die Spender mit den benötigten Antikörpern in die Racks gestellt.
- Jeder Antikörper hat einen eigenen Spender, dieser ist mit dem Antikörpernamen, der Verdünnung und Datum im Farbcode des ansetzenden Mitarbeiters zu versehen. Im Ventana-Programm wird der Spender dem vorher getesteten Färbeprotokoll zugewiesen.
- Nach Öffnen der Objektträgerschublade werden alle Objektträger mit dem Barcode nach innen in das Karussell gelegt. Die Schublade wird geschlossen.
- Mit dem Icon „Lauf starten“ wird die Anzahl der zu färbenden Objektträger manuell eingetragen.
- Die Ventana überprüft vor dem Start zuerst, ob die auf den Etiketten vermerkten Färbungen mit den Reagenzien übereinstimmen und ob genug Verbrauchspuffer vorhanden ist. Bei jeglichen Abweichungen stoppt der Färbelauf und gibt eine Fehlermeldung aus.
- Ein normaler Färbelauf dauert 195 min. Austestung eines Antikörpers

3.4.3 Bestimmung der Vorbehandlung und Inkubationszeit

Zur Austestung neuer Antikörper werden sogenannte Titrationsläufe durchgeführt. In diesen Färbeläufen werden die Vorbehandlung und die Inkubationszeit variiert. Die Verdünnungen sowie die eigentliche Titration werden vom Anwender vorgegeben.

Folgende Vorbehandlungen sind vordefiniert:

- T. oV = ohne Vorbehandlung
- T. oVA = Titration ohne Vorbehandlung mit Applifizierung
- T. CC1m = Citratpuffer mit 30min Einwirkzeit
- T. CC1mA = Citratpuffer mit 30min Einwirkzeit mit Applifizierung

- T. CC1Std = Citratpuffer mit einer Stunde Einwirkzeit
 - T. CC1StdA = Citratpuffer mit einer Stunde Einwirkzeit mit Aplifizierung
 - T. CC2m = EDTApuffer mit 30min Einwirkzeit
 - T. Kryo = für Kryostatschnitte ohne Entparaffinierung
- 2.6.8 Ventana Version 01

3.4.4 Erstellung eines Färbeprotokolls

Antikörper definieren: Möchte man einen neuen Antikörper verwenden, muss man ihn definieren. Dies geschieht über die Icons "Registrieren", "Auffüllbare Antikörper eintragen" und "Neuen Antikörper eintragen". Spender zuweisen: Jeder Antikörper wird in einen eigenen Spender gefüllt. Dieser wird über "Registrieren" und "Ventana Produkte registrieren" über den Datenknopf zweimal eingelesen. Die Nummern der Spender kann man vorher auswählen. Auf die Frage "Sofort füllen" antwortet man mit ja und "füllt" den Spender mit dem entsprechenden Antikörper. Die Menge ist mit bis zu 25 ml frei wählbar. Protokolle erstellen: Jeder Antikörper braucht ein eigenes Protokoll, in dem die einzelnen Parameter der Vorbehandlung, die Dauer der Antikörperinkubation und die Gegenfärbung festgelegt sind. Um ein neues Protokoll zu erstellen, wählt man "Protokolle" und "Protokolle erstellen/ändern". Am einfachsten verwendet man ein schon vorhandenes Protokoll und ändert die aktuell gewünschten Parameter durch Anklicken. Die entsprechende Nummer des Antikörperspenders muss eingetragen werden. Über "Speichern als" wird der gewünschte Name eingetragen.

4 Zuständigkeit, Qualifikation

Durch die Firma Ventana eingewiesen sind folgende Mitarbeiter:

Dr. Christian Bernreuther, Dr. Melanie Neumann, Herr Martin Haberkorn, Frau Ulrike Rumpf, Frau Sibylle Damme, Frau Yvonne Pulkenat

5 Dokumentation

- Die Färbeläufe werden durch das Gerät protokolliert, gespeichert und ausgedruckt.
- Der Ausdruck der Färbeläufe inklusive der Kontrollen wird im Ordner „Immunhistochemische Kontrollen“ abgelegt.

6 Hinweise und Anmerkungen

Farbcodes der MTLAs: Schwarz: Hr. Haberkorn; Grün: Fr. Rumpf, Blau: Fr. Damme

7 Mitgeltende Unterlagen

- Bedienungsanweisung
- Handbuch im PDF-Format auf dem Ventanarechner

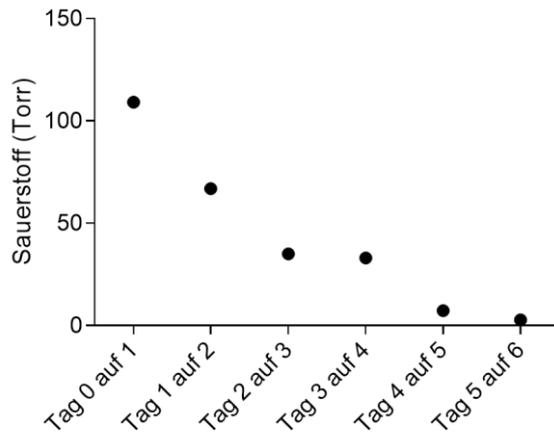
Freigabevermerk: Das Original dieser SOP ist beim QMK archiviert. Die SOP wird im 3-Jahres-Intervall – bei Bedarf vorher – überprüft. Eine eingezogene Version dieser SOP ist für 10 Jahre zu archivieren. Diese SOP wurde heute in das QM-Handbuch des Institutes aufgenommen und ist damit gültig.
Hamburg, den 23.09.2009

Autor: Haberkorn Prof. Dr. M. Glatzel Prof. Dr. C. Hagel
Leitung QMK

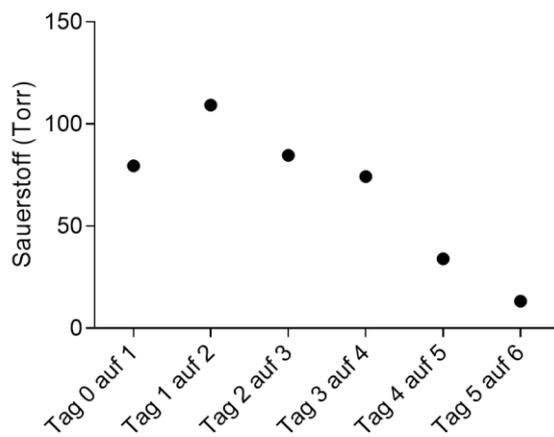
➤ Sauerstoffmessungen

➤ Einzelne Messungen in der Mitte der EHTs über die Zeit

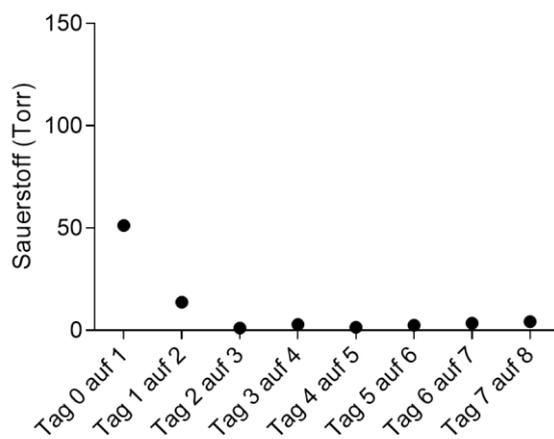
Messung Nr. 1



Messung Nr. 2



Messung Nr. 3



12. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: