

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie

Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen

Untersuchung des Risikos für Herzrhythmusstörungen nach kardialem Gewebeersatz mit künstlichem Herzgewebe aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen

Dissertation

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

vorgelegt von:

Matti Malte Röhl

aus Hamburg

Hamburg 2020

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 03.06.2020**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. med. Alexander Schwoerer

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Hintergrund	1
1.1 Das menschliche Herz	1
1.1.1 Funktion und Anatomie	1
1.1.2 Herz-Zyklus	2
1.1.3 Erregungsbildungs- und Erregungsleitungsmyokard	2
1.1.4 Arbeitsmyokard	4
1.2 Elektrokardiogramm (EKG)	6
1.3 Herzrhythmusstörungen	8
1.4 Herzinfarkt und Herzinsuffizienz	10
1.5 Kardiale regenerative Medizin	11
1.5.1 Induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) und Generation von Kardiomyozyten (KM)	13
1.5.2 Tissue Engineering und Engineered Heart Tissue (EHT)	15
1.5.3 Behandlung des Herzinfarkts und der Herzinsuffizienz mit Methoden der kardialen regenerativen Medizin: In-vivo-Studien von Zell-Therapie- und Tissue Engineering-Ansätzen	16
1.6 Hypothesen und Ziel	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Studienprotokoll und Tiermodell	21
2.2 Differenzierung humaner Kardiomyozyten (KM) aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC)	22
2.3 Differenzierung humaner Endothelzellen (EC) aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC)	22
2.4 Generation von humanem Engineered Heart Tissue (hEHT) und zellfreiem Kontroll-Konstrukt	23
2.5 Implantation der EKG-Transmitter, Kryo-Verletzung und Transplantation der hEHTs bzw. des zellfreien Kontroll-Konstrukts	24
2.6 Telemetrische Parameter- und EKG-Aufnahme	26
2.7 Echokardiographie	27
2.8 Organentnahme mit Histologie und Immunhistochemie	28
2.9 Parameter-/EKG-Analyse und statistische Auswertung	28
2.9.1 Körpertemperatur	31
2.9.2 Physische Aktivität	31
2.9.3 EKG-Wellenform: Herzfrequenz	32

2.9.4 EKG-Wellenform: Arrhythmien	33
2.9.5 Statistische Auswertung	36
3. Ergebnisse	37
3.1 Differenzierung der hiPSC-KM/hiPSC-EC und Generation des hEHTs	37
3.2 Kryo-Verletzung und Transplantation der hEHTs bzw. des zellfreien Kontroll-Konstrukts	38
3.3 Echokardiographie	40
3.4 Parameter-/EKG-Analyse und statistische Auswertung	41
3.4.1 Körpertemperatur	41
3.4.2 Physische Aktivität	43
3.4.3 EKG-Wellenform: Herzfrequenz	47
3.4.4 EKG-Wellenform: Arrhythmien	51
4. Diskussion	65
4.1 Diskussion relevanter Studien der kardialen regenerativen Medizin	66
4.2 Pro- und antiarrhythmische Mechanismen der kardialen regenerativen Medizin	73
4.3 Fazit und Ausblick	79
5. Zusammenfassung	85
6. Summary	86
7. Abkürzungsverzeichnis	87
8. Literaturverzeichnis	90
9. Anhang	98
10. Danksagung	102
11. Lebenslauf	103
12. Veröffentlichungen	104
13. Eidesstattliche Erklärung	105

Untersuchung des Risikos für Herzrhythmusstörungen nach kardialem Gewebeersatz mit künstlichem Herzgewebe aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen

1. Einleitung und Hintergrund

1.1 Das menschliche Herz

1.1.1 Funktion und Anatomie

Die Hauptfunktion des kardiovaskulären Systems ist der Transport von Blut durch den Körper. Dies ermöglicht die lebensnotwendige Versorgung aller Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen.

Das Herz, zentraler Bestandteil dieses Systems, ist ein muskuläres Hohlorgan, welches das Blut durch den Körper pumpt. Das Herz besteht aus vier separaten Kompartimenten, den zwei Vorhöfen (Atrien) und den zwei Herzkammern (Ventrikel), die jeweils durch Vorhof- und Ventrikelseptum voneinander getrennt werden. Zwischen den Vorhöfen und Ventrikeln

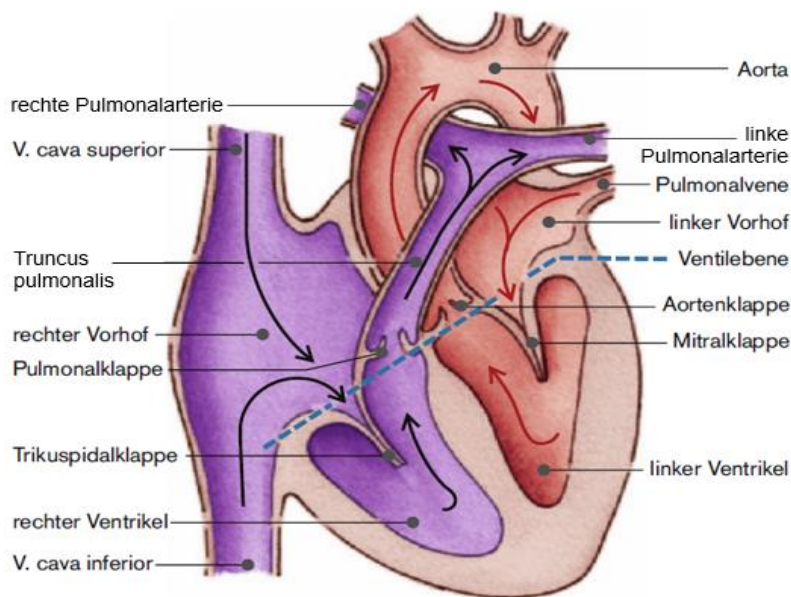


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Anatomie des menschlichen Herzens. Violette Bereiche führen sauerstoffarmes Blut, rote Bereiche sauerstoffreiches Blut (Verändert nach Klinke et al. 2010).

finden sich die Segelklappen, die Trikuspidalklappe im rechten und die Bikuspidalklappe im linken Herzen. Die Ausflusstrakte der beiden Ventrikel, der Truncus pulmonalis rechtsseitig und die Aorta linksseitig, werden durch die zugehörigen Taschenklappen, die Pulmonalklappe und die Aortenklappe, von den Ventrikeln abgegrenzt. Die Herzklappen stellen einen unidirektionalen Blutfluss durch das Herz sicher (Abbildung 1; Levick 2010).

Sauerstoffarmes Blut aus dem gesamten Körper erreicht zunächst über die obere und untere Hohlvene den rechten Vorhof und gelangt dann über die Trikuspidalklappe in den rechten Ventrikel. Der rechte Ventrikel pumpt das Blut durch die Pulmonalklappe und über den Truncus

pulmonalis und die Pulmonalarterien in den Lungenkreislauf (geringer Druck). Dort wird das Blut durch die Lunge mit Sauerstoff angereichert und erreicht über die Pulmonalvenen den linken Vorhof und anschließend von dort aus über die Bikuspidalklappe den linken Ventrikel. Der linke Ventrikel pumpt das Blut durch die Aortenklappe und über die Aorta in den Körperkreislauf (hoher Druck). So versorgt das Herz den gesamten Körper mit sauerstoffreichem Blut. An der Basis der Aorta entspringen außerdem die Koronararterien, welche die Blutversorgung des Herzgewebes selbst gewährleisten (Abbildung 1; Levick 2010).

Die Oberfläche des Herzens wird vom Epikard gebildet, einer Schicht aus Mesothelzellen und Bindegewebe (Levick 2010). Darunter befindet sich der Herzmuskel, das Myokard. Obwohl Kardiomyozyten (KM) den Hauptteil der myokardialen Masse ausmachen, sind etwa 70 % der dort befindlichen Zellen Nicht-KM, d.h. hauptsächlich vaskuläre glatte Muskelzellen, Endothelzellen sowie Fibroblasten, welche die extrazelluläre Matrix (EZM) bilden (Gilsbach et al. 2014; Bergmann et al. 2015; Pinto et al. 2016). Im Herzen existieren zwei verschiedene Haupttypen von KM: Zum einen die kontraktile KM des Arbeitsmyokards und zum anderen spezialisierte KM des Erregungsbildungs- und Erregungsleitungsmyokards (Katz 2011). Die gesamte innere Auskleidung des Herzens, einschließlich der Segelklappen mit ihren Papillarmuskeln und Sehnenfäden, wird vom Endokard, einer dünnen, aus Endothelzellen, Bindegewebe und glatten Muskelzellen zusammengesetzten Schicht, gebildet (Levick 2010).

1.1.2 Herz-Zyklus

Der Herz-Zyklus ist in vier Phasen unterteilt. In der ersten Phase, der ventrikulären Füllung, sind die Segelklappen geöffnet und Blut fließt aus den Vorhöfen in die Ventrikel, um diese mit Blut zu füllen. Die Taschenklappen sind in dieser Phase geschlossen. In der zweiten Phase, der isovolumetrischen Kontraktion, sind alle Herzklappen geschlossen und es kommt zu einer Kontraktion des ventrikulären Myokards. In der dritten Phase, der Ejektion, öffnen sich die Taschenklappen und es kommt zu einem Blutausstrom aus den Ventrikeln in die Aorta und die Lungenstrombahn. In dieser Zeit sind die Segelklappen geschlossen und zudem findet in dieser Phase die Füllung der Vorhöfe mit Blut statt. In der vierten Phase, der isovolumentrischen Relaxation, sind erneut alle Herzklappen geschlossen und das ventrikuläre Myokard entspannt. Anschließend beginnt der Zyklus erneut (Zipes et al. 2019).

1.1.3 Erregungsbildungs- und Erregungsleitungsmyokard

Der Herzschlag wird durch elektrische Impulse des Erregungsbildungsmyokards des Herzens selbst initiiert. Mittels des Erregungsleitungsmyokards wird die elektrische Aktivität auf das gesamte Herz verteilt. Beide Systeme bestehen aus dafür spezialisierten KM und ermöglichen letztendlich durch Stimulation der KM des Arbeitsmyokards eine gesteuerte Kontraktion des ganzen Herzmuskels.

Der primäre Schrittmacher des Herzens ist der im rechten Vorhof, an der Mündung der oberen Hohlvene, befindliche Sinus-Knoten. Dieser besteht aus einer Gruppe von KM, die in Intervallen spontan depolarisieren, um den Herzschlag zu initiieren. Der entstehende elektrische Impuls erreicht die benachbarten atrialen KM und wandert nun von KM zu KM. Diese Depolarisationswelle ruft zunächst eine Kontraktion der Vorhöfe hervor. Die elektrische Aktivität erreicht anschließend den Atrioventrikular-(AV-)Knoten im unteren Vorhofseptum, an dem eine kurze Verzögerung der elektrischen Weiterleitung stattfindet, um eine voneinander getrennte Kontraktion von Vorhöfen und Ventrikeln zu gewährleisten. Das Erregungsleitungsmyokard des His-Bündels leitet die Erregung des AV-Knotens nun innerhalb des oberen Ventrikelseptums weiter und teilt sich anschließend in einen linken und einen rechten Schenkel für den jeweiligen Ventrikel auf. Die Schenkel geben den elektrischen Impuls

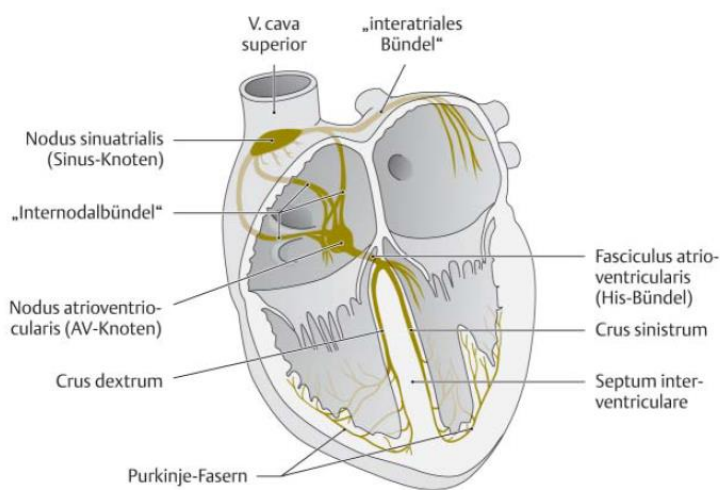


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Erregungsbildungs- und Erregungsleitungsmyokards des menschlichen Herzens (Aumüller et al. 2010).

schließlich an das Purkinje-Faser-System weiter, welches zur gleichzeitigen Stimulation von KM des links- und rechtsventrikulären Arbeitsmyokards führt, die den Impuls nun weiter untereinander fortleiten. So kommt es zur synchronen Kontraktion beider Ventrikel (Abbildung 2; Levick 2010).

Alle Zellen des Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystems sind

prinzipiell in der Lage, spontane Aktionspotentiale zu bilden. Der Sinus-Knoten depolarisiert mit einer hohen Entladungsfrequenz von etwa 60/Minute (unter parasymphathischem Einfluss in Ruhe) und dominiert so die Herzfrequenz. Nur bei seinem Ausfall können deshalb sekundäre Schrittmacher mit niedrigerer Entladungsfrequenz die Erregungsbildungsfunktion übernehmen (zunächst AV-Knoten/His-Bündel: etwa 40/Minute, dann Purkinje-Fasern: etwa 15/Minute; Levick 2010).

Das Ruhemembranpotential der Erregungsbildungs- und Erregungsleitungs-KM, v.a. des Sinus-Knotens, ist instabil und wird durch Kaliumionenausstrom (I_{Kv}) durch Kaliumkanäle bei ca. -60 mV polarisiert gehalten. Durch Veränderung folgender Ionenströme kommt es zu spontanen depolarisierenden Schrittmacherpotentialen: Inaktivierung des Kaliumionenausstroms (I_{Kv}) durch Kaliumkanäle, Natriumioneneinstrom (I_f , I_b , I_{Na-Ca}) durch Natriumkanäle und Natrium-Calcium-Austauscher sowie Calciumioneneinstrom (I_{Ca-L} , I_{Ca-T})

durch L-Typ- und T-Typ-Calciumkanäle. Die Depolarisation des Membranpotentials führt bei Überschreitung des Schwellenwerts zu einem von Calciumioneneinstrom (I_{Ca-L}) durch L-Typ-Calciumkanäle getragenen Aktionspotential (AP). Die Repolarisation der Zelle findet anschließend wieder durch Kaliumionenausstrom (I_{Kv}) durch Kaliumkanäle statt (Levick 2010, Zipes et al. 2019).

Je steiler der Anstieg (z.B. in KM des Sinus-Knotens steiler als in KM des AV-Knotens oder unter sympathischem Einfluss, z.B. bei körperlicher Aktivität) der depolarisierenden Potentialänderung, desto schneller wird die Schwelle zur Auslösung des APs in den KM des jeweiligen schrittmachenden Zentrums erreicht und desto höher ist somit die resultierende Herzfrequenz (Levick 2010).

Durch lokale elektrische Ströme (intrazelluläre Ladung breitet sich durch das Sarkoplasma der Zelle und durch Gap Junctions von Zelle zu Zelle aus, extrazelluläre Ladung durch die Extrazellularflüssigkeit) wird eine Depolarisation der Zellmembranen von antegrad des APs liegenden Zellen hervorgerufen. Bei Überschreitung des Schwellenwerts wird wiederum ein AP in diesen Zellen bewirkt. Die Erregung kann so nun zwischen den KM des Erregungsleitungsmyokards fortgeleitet werden. Aufgrund der Refraktärzeit kürzlich aktivierter Areale verläuft die Erregung unidirektional. Auf Basis derselben physikalischen Mechanismen wird die Erregung schließlich auf die KM des Arbeitsmyokards übertragen und auch unter den kontraktile KM weitergegeben. Das führt letztlich zur Auslösung eines Herzschlags (Levick 2010).

Die Aktivität des Herzens wird durch Nerven und Hormone des autonomen Nervensystems moduliert. Sympathische Aktivität erhöht die Herzfrequenz (positive Chronotropie), beschleunigt die AV-Überleitung (positive Dromotropie) und verkürzt die AP-Dauer der atrialen und ventrikulären KM. Parasympathische Aktivität hingegen erniedrigt die Herzfrequenz (negative Chronotropie; Levick 2010).

1.1.4 Arbeitsmyokard

Die KM des Arbeitsmyokards sind untereinander durch erregungsleitende Gap Junctions, bestehend aus Connexin-Proteinen, verbunden und bilden so eine funktionelle Einheit. Jeder KM beinhaltet Myofibrillen, die wiederum aus den einzelnen kontraktile Einheiten, den Sarkomeren, bestehen. In den Sarkomeren befinden sich, zwischen den aus α -Aktinin (erzeugt Querstreifung der KM) aufgebauten Z-Linien, die kontraktile Myosin- und Aktinfilamente. Außerdem beinhaltet die kontraktile Einheit den regulatorischen Tropomyosin-Troponin-Komplex und elastische Titin-Filamente. An jeder Z-Linie stülpt sich die Zellmembran der KM als T-Tubuli in Richtung des Zellinneren. Die T-Tubuli enthalten wie die äußere Zellmembran reichlich Natrium- und Calciumkanäle, um elektrische Erregung ins Innere des KM zu leiten.

Innerhalb des Sarkoplasmas des KM befindet sich das Sarkoplasmatische Retikulum (SR). Das SR speichert Calciumionen und kann diese bei elektrischer Erregung des KM über Ryanodin-Rezeptoren (RyR) freisetzen, um den kontraktilem Apparat zu aktivieren und danach über Calcium-Pumpen (*SERCA*, *Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*, Calciumpumpe des sarcoplasmatischen und endoplasmatischen Reticulums) wiederaufnehmen (Levick 2010, Zipes et al. 2019).

Der Kontraktionsmechanismus der KM beruht auf einer Verkürzung der Sarkomere durch Gleitbewegungen zwischen den kontraktilem Filamenten. Jede Aktin-Untereinheit besitzt eine Bindungsstelle für einen Myosin-Kopf, die in Ruhe, d.h. bei relaxiertem Herzmuskel, von Tropomyosin, das im Komplex mit Troponin vorliegt, blockiert wird. In Anwesenheit von Calciumionen binden diese an Troponin, woraufhin die Aktin-Bindungsstelle vom Tropomyosin-Troponin-Komplex freigegeben wird und mit dem Myosin-Kopf interagieren kann. Durch Kippen des Myosin-Kopfes während der Bindung gleiten die Filamente aneinander entlang. Hierfür ist Adenosintriphosphat (ATP) und für dessen Synthese wiederum eine ausreichende Versorgung des KM mit Sauerstoff (O_2) notwendig. Nach ATP-Hydrolyse löst sich die Bindung und kann an der nächsten Bindungsstelle erneut eingegangen werden. Dieser Mechanismus findet während der Kontraktion wiederholt und an vielen Myosin-Aktin-Bindungsstellen innerhalb eines Sarkomers gleichzeitig statt (Levick 2010).

Das Ruhemembranpotential der KM des Arbeitsmyokards ist stabil, liegt bei etwa -80 mV und beruht auf polarisierendem Kaliumionenausstrom (I_{K1r}) durch Kaliumkanäle (und hintergründigem Natriumioneneinstrom (I_b)). Das Ionengleichgewicht zwischen Intra- und Extrazellularraum wird durch die Natrium-Kalium-Pumpe und den von ihr abhängigen Natrium-Calcium-Austauscher aufrechterhalten. Das AP im kontraktilem KM wird durch ein AP im Erregungsleitungsmyokard oder in einem benachbarten KM des Arbeitsmyokards hervorgerufen, indem durch lokale Ladungsverschiebungen eine Depolarisation der Zellmembran des KM stattfindet. Bei Überschreiten des Schwellenwerts von ca. -60 mV verändern sich die Ionenleitfähigkeiten der Zellmembran und ein fünfphasiges AP wird generiert. Zunächst findet ein stark depolarisierender Natriumioneneinstrom (I_{Na} , „Overshoot“) durch Natriumkanäle statt (Phase 0). Dann kommt es zu einer transienten Kaliumkanalöffnung mit Kaliumionenausstrom (I_{to}) und somit zu einer partiellen Repolarisation (Phase 1). Anschließender Calciumioneneinstrom (I_{Ca-L}) durch L-Typ-Calciumkanäle generiert das für KM des Arbeitsmyokards typische langandauernde AP-Plateau (Phase 2), welches in seiner späten Phase durch Natriumioneneinstrom durch den Natrium-Calcium-Austauscher unterstützt wird. Nun kommt es durch Kaliumionenausstrom (I_{Kv} , I_{K1r}) durch Kaliumkanäle zur endgültigen Repolarisation (Phase 3) und zuletzt wieder zur Wiederherstellung des Ruhemembranpotentials (Phase 4; Levick 2010).

Die Mechanismen der im Folgenden erläuterten elektromechanischen Kopplung (also des Zusammenhangs des elektrischen Impulses, des APs und der mechanischen Antwort, der Kontraktion) und des Calcium-Zyklus gewährleisten den kontrollierten Herzschlag des Arbeitsmyokards. Erreicht ein AP einen KM, wird seine Membran depolarisiert und der KM erzeugt selbst ein AP, bei dem ein Calciumioneneinstrom (I_{Ca-L} über Dihydropyridin-Rezeptoren, DHPR), u.a. auch in den T-Tubuli, stattfindet. Dieses einströmende Calcium trägt zum einen selbst zur Erhöhung der für die Kontraktion nötigen sarkoplasmatischen Calciumkonzentration bei, zum anderen bewirkt es aber vor allem eine massivere Calciumfreisetzung aus dem SR durch Aktivierung von RyR (Calcium-induzierte Calcium-Freisetzung). Die sarkoplasmatische Calciumkonzentration steigt an, der kontraktile Apparat wird aktiviert und die Zelle und schlussendlich das Herz beginnen zu kontrahieren. Das sarkoplasmatische Calcium wird anschließend hauptsächlich über die SERCA (durch inhibitorisches Phospholamban reguliert) zurück ins SR gepumpt sowie teilweise über den Natrium-Calcium-Austauscher und Calcium-Pumpen nach extrazellulär befördert. Dabei dissoziiert es vom Tropomyosin-Troponin-Komplex und der Herzmuskel relaxiert wieder. Sympathische Aktivität erhöht die systolische sarkoplasmatische Calciumkonzentration, verstärkt dadurch die Quervernetzung der Myosin- und Aktinfilamente und erhöht somit die entwickelte kontraktile Kraft (positive Inotropie; Levick 2010).

1.2 Elektrokardiogramm (EKG)

Im EKG werden die Potentialänderungen auf der Hautoberfläche, die durch die elektrische Aktivität des Herzmuskels entstehen, aufgezeichnet und graphisch dargestellt. Ein physiologisches menschliches EKG besitzt (je nach Ableitung bis zu) fünf Ausschläge (P, Q, R, S und T) pro Herz-Zyklus, die auf die fortschreitende De- bzw. Repolarisation des Herzmuskels

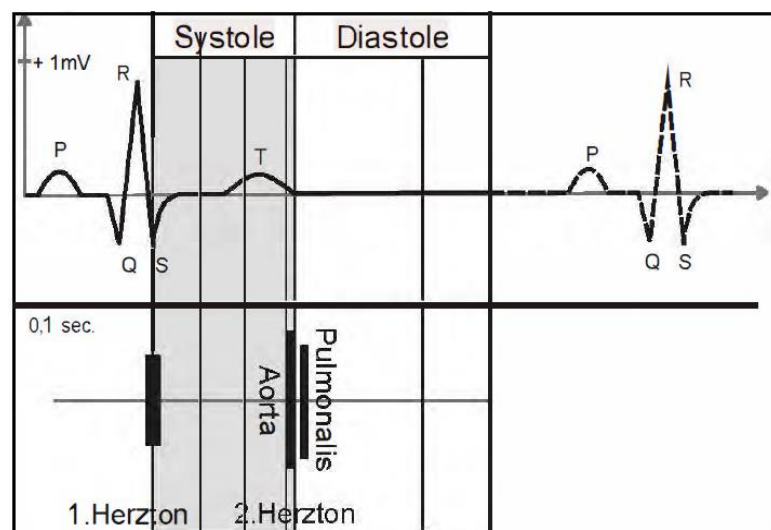


Abbildung 3: EKG des menschlichen Herzens (Verändert nach Herold et al. 2013).

und dadurch auf das Vorliegen eines elektrischen Dipols von erregten (intrazellulär positiv, extrazellulär negativ) zu nicht erregten (intrazellulär negativ, extrazellulär positiv) Arealen zurückzuführen sind. Zwischen den Ausschlägen liegen isoelektrische Phasen, bei denen kein Dipol existiert, da alle KM gleichzeitig erregt oder nicht erregt sind (Abbildung 3).

- P-Welle: Depolarisation der Vorhöfe
- PQ-Strecke: Verzögerung der Erregungsleitung im AV-Knoten, Vorhofkontraktion
- QRS-Komplex: Depolarisation der Ventrikel
- ST-Strecke: Ventrikelkontraktion
- T-Welle: Repolarisation der Ventrikel

Zur Aufzeichnung eines EKGs werden drei Extremitäten-Elektroden (li. Arm, re. Arm, li. Bein) benötigt, mit denen sich drei bipolare (I, II, III nach Einthoven) und drei unipolare (*Augmented Voltage Left, aVL, Augmented Voltage Right, aVR, Augmented Voltage Foot, aVF* nach Goldberger) Extremitäten-Ableitungen, also 6 Kanäle, bilden lassen. Für ein 12-Kanal-EKG werden zusätzlich sechs Brustwand-Elektroden benötigt, mit denen sechs weitere unipolare Brustwand-Ableitungen (V1-V6 nach Wilson) entstehen.

Die Potentialdifferenz, die das EKG aufzeichnet, ist abhängig von der Elektrodenposition und somit der Orientierung der Ableitung relativ zum Dipol. Zeigt eine Ableitung in die Richtung des Dipols (0° - 90°), ist die Erregung als positiver Ausschlag zu sehen. Steht die Ableitung im 90° -Winkel zum Dipol, so wird keine Erregung gemessen. Zeigt die Ableitung in die entgegengesetzte Richtung des Dipols (90° - 180°), ist die Erregung als negativer Ausschlag zu erkennen. Je näher der Winkel

zwischen Ableitung und Richtung des Dipols an 0° oder 180° ist, desto besser die Messung der Potentialdifferenz und desto größer ist auch der Ausschlag in dieser Ableitung. Die Amplitude des Ausschlags wird allerdings ebenfalls durch die Größe des Dipols, also die Masse der erregten KM, beeinflusst. Dementsprechend sind in den unterschiedlichen Ableitungen, je nach ihrer Orientierung, die Ausschläge in unterschiedlicher Ausprägung (größer, kleiner oder auch gar nicht vorhanden) zu erkennen. Sowohl die Ausrichtung als auch die Größe des Dipols verändern sich

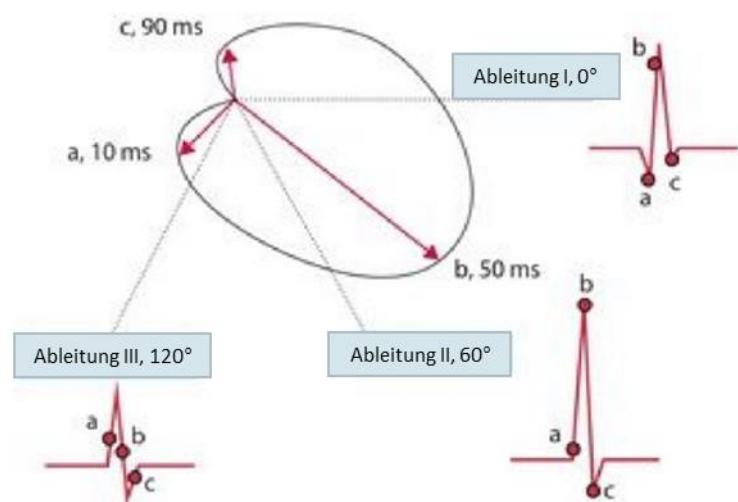


Abbildung 4: Einfluss der sich verändernden Größe und Ausrichtung des Dipols (rote Pfeile) auf die Morphologie des QRS-Komplexes in verschiedenen Ableitungen. Der Dipol ist zu drei verschiedenen Zeitpunkten (a, b, c) dargestellt. Die durch die Ableitungen I, II und III zum jeweiligen Zeitpunkt gemessene vektorielle Komponente wird durch die roten Punkte dargestellt (Verändert nach Levick 2010).

während der Herzaktion und erzeugen die Ausschläge. Der Dipol rotiert während der Depolarisation des Myokards entgegen des Uhrzeigersinns. Beispielsweise verläuft die Depolarisation der Herzspitze (viele KM) nach kaudal (große, positive R-Zacke in II), die späte basale (wenig KM) Ventrikelerregung eher entgegengesetzt nach kranial (kleine, negative S-Zacke in II), und die Repolarisation der Ventrikel in umgekehrter Richtung wie die Depolarisation (Richtung des Dipols wie bei der Depolarisation, T-Welle dementsprechend positiv in II). Somit besitzt jede Ableitung eine spezifische EKG-Morphologie: Vereinfacht zusammengefasst, kann dieselbe Herzerregung, die in Ableitung I einen kompletten mittelgroßen QRS-Komplex hervorruft, in Ableitung II nur durch einen großen (II nahezu im 0°-Winkel zum Dipol) und in Ableitung III durch einen kleinen (III nahezu im 90°-Winkel zum Dipol) RS-Komplex dargestellt werden, da jede Ableitung den Dipol aus einem anderen Winkel detektiert (so zeigt sich bspw. die frühe Erregung des Ventrikelseptums in I als negative Q-Zacke, in II allerdings als Start einer positiven R-Zacke). Die Buchstaben Q, R und S sind demnach nicht fest an eine spezifische Aktivität des Myokards (z.B. Erregung des Septums) gebunden, sondern beschreiben lediglich den Verlauf des EKGs (erster negativer Ausschlag=Q, positiver Ausschlag=R, zweiter negativer Ausschlag=S; Abbildung 4). Die Ausrichtung des größten Dipols bestimmt dabei die elektrische Herzachse und somit den Lagetyp (Levick 2010). Der Abstand zwischen zwei R-Zacken ist definiert als das RR-Intervall, dessen Kehrwert der Herzfrequenz entspricht.

1.3 Herzrhythmusstörungen

Der physiologische Herzrhythmus wird als Sinusrhythmus bezeichnet. Bei Abweichungen vom Sinusrhythmus liegt eine Herzrhythmusstörung vor. Es gibt eine Vielzahl solcher Arrhythmien, die nach verschiedenen Kriterien unterschieden werden können, typischerweise nach ihrer Frequenz (brady- und tachykard) und ihrem Ursprungsort (atrial bzw. supraventrikulär und ventrikulär). Zur Diagnose von Arrhythmien eignet sich am besten das EKG.

Die drei Mechanismen der Arrhythmie-Entstehung sind Automatie, Reentry und getriggerte Aktivität:

- Automatie: Kommt es bei einem dem Sinusknoten untergeordneten Gewebe, beispielsweise durch Ischämie, zur Abnahme des Ruhemembranpotentials, führt dies zu einer gesteigerten Automatie der entsprechenden Zellen. Folglich kommt es zur erleichterten Impulsbildung.
- Reentry: Existieren im Herz Zonen mit unterschiedlicher Leitungsgeschwindigkeit und Refraktärzeit, z.B. bei Vorliegen einer Infarkt Narbe, so kann eine kreisende Erregung (Reentry-Kreislauf) entstehen.
- Getriggerte Aktivität: Kommt es zu einer Impulsbildung durch Nachdepolarisation, wird dies als getriggerte Aktivität bezeichnet. Nachdepolarisationen sind Oszillationen der

Membranspannung. Es werden frühe Nachdepolarisationen (während des APs) und späte Nachdepolarisationen (nach dem AP) unterschieden, die beide in ischämisch geschädigtem Myokard auftreten können. Biochemische Grundlage beider Arten von Nachdepolarisationen ist eine intrazelluläre Calciumüberladung.

Bei Vorliegen eines pathologisch veränderten Myokards können gewisse, v.a. tachykarde ventrikuläre, Arrhythmien gehäuft auftreten:

- Ventrikuläre Extrasystole (*Premature Ventricular Contraction, PVC*): Eine PVC ist ein Herzschlag, der durch ein AP ventrikulärer KM, also durch ein ektopes Erregungszentrum, ausgelöst wird. Da der PVC somit keine reguläre Vorhoferregung vorausgeht, befindet sich vor dem QRS-Komplex der PVC keine P-Welle. Durch die veränderte Erregungsleitung ausgehend von dem ektopen Ursprung der Herzaktivität resultiert im EKG außerdem ein deformierter, atypischer QRS-Komplex. Die anschließende normale Erregungswelle, die vom Sinus-Knoten ausgeht, trifft auf refraktäres Myokard und kann keinen Herzschlag auslösen. Somit entsteht nach der PVC eine kompensatorische Pause bis zum nächsten physiologischen Herzschlag. Eine PVC kann pathophysiologisch oft durch eine späte Nachdepolarisation, die eine getriggerte Aktivität der Zelle zur Folge hat, erklärt werden. Dabei kommt es durch, z.B. aufgrund von Ischämie geschädigte, defekte („leaky“) Ryanodin-Rezeptoren zur Entladung des im SR gespeicherten Calciums (dysfunktionales „Calcium-Handling“, gestörte Calciumhomöostase) während der Diastole (Chen et al. 2009). Die folgende intrazelluläre Calciumüberladung führt zu einer erhöhten Aktivität des depolarisierend wirkenden Natrium-Calcium-Austauschers in der Zellmembran. Überschreitet diese Nachdepolarisation das Schwellenpotential, kommt es zum AP und durch abnormale Weiterleitung der Erregung zum ektop ausgelösten Herzschlag. Zwei konsekutive PVCs werden als Couplet, drei als Triplet bezeichnet.
- Ventrikuläre Tachykardie (*Ventricular Tachycardia, VT*): Folgen viele PVCs hoher Frequenz aufeinander, spricht man von einer VT, die mit erheblichen Einschränkungen der Herzfunktion einhergehen kann. Pathophysiologische Grundlage der VT ist meist ein Reentry-Kreislauf, der die VT aufrechterhält.
- Kammerflimmern (*Ventricular Fibrillation, VF*): VF ist eine völlig ungeordnete Erregung des Herzmuskels, die zu einem massiven Verlust seiner Funktion führt und unbehandelt tödlich endet. Dafür kann eine frühe Nachdepolarisation ursächlich sein, die analog zur späten Nachdepolarisation (s.o.) zu einem ektop ausgelösten Herzschlag während der Repolarisation (T-Welle, vulnerable Periode) des Myokards führt und über multiple Reentry-Kreisläufe das Kammerflimmern hervorruft und unterhält (Levick 2010).

1.4 Herzinfarkt und Herzinsuffizienz

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache weltweit (Lozano et al. 2012), ihre Mortalität ist höher als die aller Krebsarten zusammen (WHO 2014).

Bei einem Herzinfarkt kommt es durch Verschluss einer Koronararterie zu einer herabgesetzten Durchblutung von Teilen des Herzmuskels und somit zu einer Minderversorgung des betroffenen Gewebes mit Sauerstoff (Ischämie) und Nährstoffen. Die Ischämie führt schnell zu einem irreversiblen Schaden am Myokard mit Untergang von KM. Infolgedessen kann es zu einer Einschränkung der myokardialen Pumpfunktion und zu Herzrhythmusstörungen kommen. Im EKG kann sich ein schwerer Myokardinfarkt durch eine ST-Strecken-Hebung zeigen (Zipes et al. 2019). Die Lebenszeitprävalenz des Herzinfarkts ist mit 4,7 % äußerst hoch (Gößwald et al. 2013).

Unter Homöostase beträgt die Turn-Over-Rate der terminal differenzierten KM des adulten menschlichen Herzens lediglich 0,5-1 % pro Jahr und nimmt mit fortschreitendem Alter ab (Bergmann et al. 2009; Bergmann et al. 2015). Tierexperimenten zufolge scheint der prädominante Mechanismus der Regeneration im gesunden Herzen die (partielle) Dedifferenzierung, das Wiedereintreten in den Zellzyklus und die Proliferation präexistierender KM zu sein, weniger die Differenzierung residenter oder einwandernder Progenitorzellen zu KM (Malliaras et al. 2013; Mollova et al. 2013; Senyo et al. 2013; Ali et al. 2014; Li et al. 2018). Aktuelle Beobachtungen lassen vermuten, dass es nach einer Verletzung des Myokards zu einer leicht gesteigerten Zellerneuerung kommen kann (Senyo et al. 2013). Ob dafür dieselben regenerativen Mechanismen wie unter Homöostase verantwortlich sind, ist bislang ebenfalls nicht abschließend geklärt. Auch hier vermutet man als prädominanten Mechanismus eher die Proliferation präexistierender KM statt der Differenzierung von Progenitorzellen (Senyo et al. 2013; Li et al. 2018). Alternativ diskutierte Regenerationsmechanismen sind die Ausschüttung parakriner Faktoren durch Nicht-KM, welche die Proliferation residenter KM anregen sowie eine Aktivierung von epikardialem Gewebe mit der Folge von Neoangiogenese und/oder gesteigerte Kardiomyogenese (Garbern und Lee 2013).

Die endogenen Regenerationsmechanismen des adulten humanen Herzens sind nach Verletzung des Organs nicht ausreichend, um den massiven Verlust an funktionstüchtigen myokardialen Zellen zu kompensieren. Nach dem Infarkt kommt es stattdessen zur Bildung einer unflexiblen, nicht kontraktile Narbe. Typische Folge eines Herzinfarkts sowie anderer Herzerkrankungen, die ebenfalls mit einem Funktionsverlust von Herzmuskelgewebe und/oder Zelltod von KM einhergehen können (z.B. Hypertonie oder Herzklappenerkrankungen), ist die Herzinsuffizienz (Laflamme und Murry 2011). Die Herzinsuffizienz, deren Grundlage vielfältige pathophysiologische Vorgänge und oft ein Mangel an KM sind, zeichnet sich meist durch eine

verminderte kardiale Pumpfunktion und ein erhöhtes Risiko für das Auftreten gefährlicher kardialer Arrhythmien aus (Bigger, Jr. et al. 1977; Harkness et al. 2011).

Aktuell verfügbare medikamentöse Therapien sind lediglich in der Lage, den meist progredienten Verlauf einer Herzinsuffizienz abzuschwächen, können ihn jedoch nicht stoppen, geschweige denn zu einer Umkehr der pathologischen Remodelling-Prozesse sowie des Verlusts an funktionsfähigem Herzmuskelgewebe führen, die die Herzfunktion meist zunehmend einschränken. Sind die oft therapierefraktären Endstadien der Herzinsuffizienz mit ungünstiger Prognose erreicht, verbleiben nur noch zwei Behandlungsoptionen (Muntwyler et al. 2002). Zum einen kann dem Patienten ein linksventrikuläres Herzunterstützungssystem (*Left Ventricular Assist Device, LVAD*) implantiert werden. Das LVAD kann als sogenannte Bridging-Therapie (Überbrückung der Zeit bis zu einer Herztransplantation) oder als terminale Therapie Verwendung finden. Durch 1- bzw. 2-Jahres-Überlebensraten von 80 % bzw. 70 % hat sich das LVAD zu einer etablierten Therapieoption entwickelt, allerdings ist die Implantation des Herzunterstützungssystems mit den Komplikationen einer invasiven Operation und denen einer Langzeit-Antikoagulation sowie diversen anderen möglichen Komplikationen, wie z.B. Infektionen, verbunden (Kirklin et al. 2015). Zum anderen ist die einzige kurative Behandlungsmöglichkeit die Herztransplantation. Mit 1- bzw. 2-Jahres-Überlebensraten von 84,5 % bzw. 72,5 % stellt sie eine äußerst effektive Therapie dar, hat jedoch aufgrund eines massiven Spenderorganmangels und einer lebenslang nötigen Immunsuppression mit ihren unerwünschten Nebenwirkungen, wie z.B. der Entstehung maligner Neoplasien oder einer Niereninsuffizienz, einen problematischen Stellenwert in der klinischen Praxis (Wilhelm 2015). Diese beiden, im Vergleich zur konservativen Therapie wirkungsvolleren, Behandlungsansätze sind aufgrund ihrer vielfältigen Nachteile und Einschränkungen somit auch keine ausreichende Antwort auf die Frage nach der zukünftigen Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere der Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt.

Alle heute etablierten Therapien werden der steigenden Anzahl an Patienten mit Herzinsuffizienz und der damit verbundenen, immer noch sehr schlechten Prognose nicht gerecht (Müller-Werdan und Werdan 2016). Neue Therapiestrategien werden daher dringend benötigt. Die kardiale regenerative Medizin bietet vielversprechende Ansätze zur Entwicklung solcher Strategien.

1.5 Kardiale regenerative Medizin

Ein geschädigtes Herz regenerieren zu können, würde die Heilung von Millionen Patienten mit Herzerkrankungen weltweit bedeuten. Das adulte menschliche Herz ist nach einer Schädigung (z.B. Herzinfarkt) nicht zu einer ausreichenden endogenen Regeneration der KM in der Lage. Das zentrale Ziel der kardialen regenerativen Medizin ist deshalb die Regeneration des

geschädigten Myokards durch Ersatz der verlorenen KM, d.h. mechanische und elektrische Integration von neuen KM in das Empfängermyokard, um neuen funktionstüchtigen Herzmuskel zu generieren. Durch die konsekutive Verbesserung der Pumpfunktion und die Verhinderung von Herzrhythmusstörungen soll die Entwicklung einer Herzinsuffizienz direkt unterbunden werden. Oder, falls bereits eine Herzinsuffizienz besteht, sollen so die mit ihr verbundenen Konsequenzen auf die Herzfunktion behandelt werden.

Drei zentrale Strategien, die sich in ihren Konzepten unterscheiden, aber alle das ambitionierte Ziel verfolgen, im geschädigten Herz neue KM zu generieren, sind Gegenstand aktueller Forschung (Abbildung 5). Einen zusammenfassenden Überblick über alle drei Strategien bieten Arbeiten von Breckwoldt et al. (Breckwoldt et al. 2016), Garbern et al. (Garbern und Lee 2013) und Röhl (Röhl 2017).

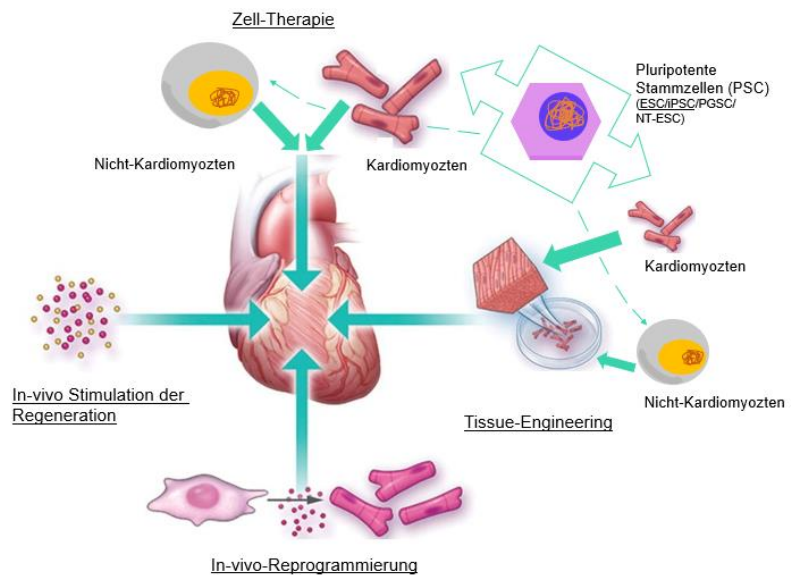


Abbildung 5: Kardiale regenerative Medizin (Verändert nach Garbern und Lee 2013).

- Direkte zelluläre In-vivo-Reprogrammierung: Nicht-KM, bspw. Fibroblasten einer Infarktnarbe, sollen durch In-vivo-Transdifferenzierung direkt (d.h. unter Umgehung des pluri-/multipotenten Zustands, von einem zum anderen differenzierten somatischen Phänotyp) zu induzierten KM (iKM) umgewandelt/reprogrammiert werden. Dies kann z.B. durch Applikation von Transkriptionsfaktoren durch virale Vektoren, MicroRNAs (von *Ribonucleic Acid*, RNA bzw. Ribonukleinsäure, RNS) oder kleinmolekularen Substanzen erreicht werden. Einen detaillierteren Überblick über diesen Ansatz bietet ein Review von Chen und Qian (Chen und Qian 2015).
- In-vivo-Stimulation der endogenen kardialen Regeneration: Molekulare Interventionen, z.B. die Applikation von viralen Vektoren oder kleinmolekularen Substanzen (Wachstumsfaktoren oder MicroRNAs), sollen die limitierte endogene Wundheilung durch Proliferation von KM und/oder die Angiogenese stimulieren. Diese Methode wurde von Senyo et al. umfassender zusammengefasst (Senyo et al. 2014).
- Zell-Therapie/Tissue Engineering: KM, meist in vitro aus pluripotenten Stammzellen (PSC), d.h. embryonalen Stammzellen (ESC) oder induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) generiert, werden in das verletzte Herz transplantiert. Es

existieren verschiedene methodische Ansätze zur Transplantation der KM. Zum einen können die KM, ggf. in Kombination mit anderen Zellen (z.B. Endothelzellen oder glatte Muskelzellen) und/oder Materialien (z.B. Hydrogelen), in das Empfängerherz appliziert werden (Zell-Therapie). Zum anderen können aus den KM in vitro, ggf. zusammen mit anderen Zellen (z.B. Endothelzellen) und/oder Biomaterialien (z.B. Fibrin), funktionierende Gewebe, d.h. bspw. Zell-Sheets oder Herzmuskel-Patches (z.B. *Engineered Heart Tissue, EHT*) gezüchtet werden, die auf das Herz des Empfängers transplantiert werden können (Tissue Engineering). Einen genaueren Überblick zu diesen Ansätzen bieten die aktuellen Übersichtsarbeiten von Zhang et al., Breckwoldt et al., Pecha et al. und Weinberger et al. (Breckwoldt et al. 2016; Pecha et al. 2016; Weinberger et al. 2017; Zhang et al. 2018).

Neben diesen drei zentralen Strategien, die alle das Ziel der Schaffung neuer KM, also eine sogenannte „echte Regeneration“, verfolgen, existieren diverse weitere Ansätze. Dazu gehören u.a. die Zell-Therapie mit Nicht-KM (bspw. mit Knochenmarkstammzellen), die sogar schon in klinischen Studien positive Effekte entfalten konnte, oder die alleinige Injektion von zellfreien Hydrogelen wie Alginate, eine ebenfalls bereits am Menschen getestete Methode (Clifford et al. 2012; Mann et al. 2016). Wichtige Studien, insbesondere auch mit klinischer Anwendung, wurden in der Übersichtsarbeit von Garbern und Lee zusammengefasst (Garbern und Lee 2013). Nach aktueller Datenlage beruhen die positiven Effekte solcher Therapieansätze, die trotz niedriger Überlebens- und Engraftment-Raten der Nicht-KM vorhanden sind, deshalb hauptsächlich auf parakrinen Mechanismen (z.B. verstärkte Angiogenese, verminderte Apoptose oder anti-inflammatorische Wirkungen durch die transplantierten Zellen und/oder durch unbekannte Stoffe, die von diesen sezerniert werden) und führen weniger zu einer „echten Regeneration“, die man sich von Zell-Therapien und Tissue Engineering erhofft (Ly und Nattel 2009; Garbern und Lee 2013).

1.5.1 Induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) und Generation von Kardiomyozyten (KM)

Für die Generation von humanen KM werden humane pluripotente Stammzellen (*hPSC*) benötigt. hPSC sind die einzige Zell-Quelle, die in der Lage ist, in vitro große Zahlen von humanen KM hervorzubringen (Breckwoldt et al. 2016; Zhang et al. 2018). Als hPSC können humane embryonale Stammzellen (*hESC*) oder humane induzierte pluripotente Stammzellen (*hiPSC*) dienen. hESC wurden erstmals 1998 durch Thomson et al. aus humanen Embryonen im Blastozysten-Stadium gewonnen. Die hESC waren in der Lage, in Zellen aller drei Keimblätter (Endo-, Meso- und Ektoderm) zu differenzieren (Thomson et al. 1998). hESC sind der Prototyp der hPSC und sind eine mögliche Quelle für die unlimitierte Generation von humanen KM mit großer Reinheit (Kempf et al. 2015). Im Jahr 2006 konnte die Arbeitsgruppe

um Yamanaka et al. erstmals iPSC gewinnen, indem sie embryonalen und adulten Fibroblasten von Mäusen über retrovirale Transduktion die Gene für die vier Transkriptionsfaktoren (TF) *c-MYC*, *OCT3/4*, *SOX2* und *KLF4* („Yamanaka-Faktoren“) übertrugen (Takahashi und Yamanaka 2006). Infolgedessen kam es in der somatischen Zielzelle zu einer Überexpression dieser TFs und so zur Aktivierung eines endogenen Pluripotenz-Programmes. Die Expression der exogenen Faktoren nahm wieder ab, während die Expression der endogenen Pluripotenz-Gene der TFs OCT4 und NANOG hochreguliert wurde. Dies wiederum führte zu einer vermehrten Expression von Genen, die die Pluripotenz der Zelle förderten, während die Expression von Genen, die eine Differenzierung der Zelle unterstützten, gehemmt wurde. Die Zelle wurde so zur induzierten pluripotenten Stammzelle. Ein Jahr später konnten analog auch humane Fibroblasten zu humanen iPSC reprogrammiert werden, welche ebenfalls zu Zellen aller drei Keimblätter differenzieren konnten (Takahashi et al. 2007; Yamanaka und Blau 2010). Anschließend können aus hiPSC KM (hiPSC-KM) und andere Zellen, z.B. Endothelzellen, generiert werden. Protokolle, die dabei die embryonale Entwicklung des Herzens rekapitulieren, führen zur Differenzierung von großen Zahlen äußerst reiner KM (Breckwoldt et al. 2017). Bei Transplantation von hiPSC-KM könnte theoretisch auf eine Immunsuppression verzichtet werden, da die hiPSC-KM aus Fibroblasten des jeweiligen Patienten gewonnen werden könnten und somit eine autologe, personalisierte, Patienten-spezifische Zellquelle darstellen (Abbildung 6).

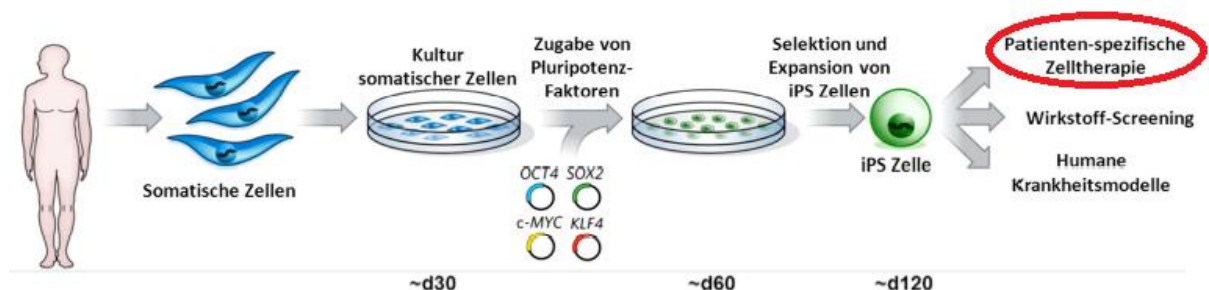


Abbildung 6: Generation und Verwendungsmöglichkeiten von iPSC (Verändert nach Yamanaka und Blau 2010).

Die drei zentralen Anwendungsgebiete in der Herz-Kreislauf-Forschung von iPSC bzw. von aus ihnen differenzierten iPSC-KM sind erstens die regenerative Patienten-spezifische Therapie von erkranktem und geschädigtem Herzmuskel, zweitens die Schaffung humaner kardialer Muskel für Wirkstoffentdeckung und -untersuchung und drittens die Etablierung humaner Krankheitsmodelle zur Erforschung der Pathophysiologie verschiedenster Krankheiten.

1.5.2 Tissue Engineering und Engineered Heart Tissue (EHT)

Verschiedene Ansätze des kardialen Tissue Engineerings verfolgen das Ziel in vitro generierte 3D-Herzmuskel zu entwickeln, um diese anschließend auf ein verletztes Herz transplantieren zu können. Eine Übersicht zu den unterschiedlichen Ansätzen (z.B. Zell-Sheets, ganze dezellularisierte Herzen sowie EHTs) des kardialen Tissue Engineerings mit ihren Methoden, Vor- und Nachteilen, Herausforderungen und offenen Fragen sowie zu ihrem therapeutischen Potential, auch hinsichtlich ihrer klinischen Anwendung, bieten Reviews von Zhang et al., Eschenhagen et al., Hirt et al., Breckwoldt et al., Pecha et al. und Weinberger et al. (Eschenhagen et al. 2012; Hirt et al. 2014b; Breckwoldt et al. 2016; Pecha et al. 2016; Weinberger et al. 2017; Zhang et al. 2018).

Am Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurde das Engineered Heart Tissue (EHT) entwickelt. Für die Generation von EHTs wurden verschiedene Zelltypen verwendet, u.a. embryonale Huhn-KM, neonatale Ratten-KM und hiPSC-KM (Eschenhagen et al. 1997; Zimmermann et al. 2006; Weinberger et al. 2016). Die Zellen wurden dafür in flüssigen Hydrogelen, z.B. Kollagen 1 oder Fibrin, eingeschlossen, um in Gussformen ein dreidimensionales, zwischen Haltern aufgespanntes Herzmuskelkonstrukt zu erzeugen, in dem die Zellen Zell-Zell-Kontakte ausbilden und ihre eigene extrazelluläre Matrix produzieren und so ein funktionelles elektromechanisches Synzytium entwickeln (Zimmermann et al. 2002b; Hansen et al. 2010; Eschenhagen et al. 2012). Wichtige Aspekte, Probleme und offene Fragen der EHT-Herstellung und -Transplantation wurden von Breckwoldt et al., Pecha et al. und Weinberger et al. im Detail diskutiert. Dazu gehören zentrale Aspekte der Zellkomposition des EHTs wie z.B. die Kokultivierung mit Nicht-KM, d.h. z.B. Endothelzellen oder stromalen Zellen, welche die Gewebeformation, die Funktion und das Überleben des Patches und die Bildung vaskulärer Netzwerke unterstützen kann. Ebenso wichtig sind das Aussetzen des EHTs gegenüber einer mechanischen Spannung sowie eine kontinuierliche elektrische Stimulation, welche die In-vitro-Reifung des EHTs und der KM und ebenfalls die Entwicklung von Struktur und mechanischer sowie elektrophysiologischer Funktion des EHTs fördern. Essenzielle Probleme sind u.a. noch die Vaskularisierung und Perfusion in vitro vor bzw. in vivo nach Transplantation des EHTs, was u.a. die maximal mögliche Größe des Konstrukts limitiert sowie die Frage nach dem optimalen Reifegrad der KM für eine Transplantation und das Risiko der Tumorentstehung durch Bioverteilung von Zellen des EHTs im Körper des Empfängers. Offene Fragen beziehen sich aktuell noch auf die optimale Zellzahl und Größe des Transplantats hinsichtlich einer Verpflanzung. Weitere bis jetzt ungeklärte Fragen betreffen die abgestimmteste Nährstoff- und Sauerstoffversorgung bei der Kultivierung, die geeignetste Art (z.B. epi- bzw. endokardial) der Transplantation zur Sicherstellung einer mechanischen und elektrischen Kopplung an das Empfängerherz und ob die korrekte Integration der

transplantierten Konstrukte in die komplexe Architektur des Herzens möglich ist. Nahezu völlig ungeklärt sind die Einflüsse von EHTs auf die Elektrophysiologie des Empfängerherzens. Trotz der oben beschriebenen noch bestehenden Probleme und Fragen lassen sich inzwischen spontan kontrahierende EHTs generieren, die sich hinsichtlich

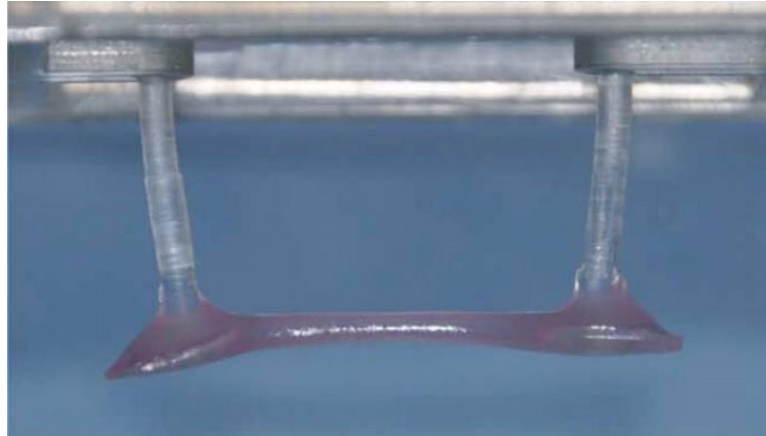


Abbildung 7: EHT zwischen Silikon-Haltern (Verändert nach Weinberger et al. 2016).

ihrer Morphologie (z.B. Organisation der Sarkomere) und Physiologie (z.B. Form des AP, Frank-Starling-Mechanismus, Reaktion auf Hormone) ähnlich einem nativen Herzmuskel verhalten (Abbildung 7; Breckwoldt et al. 2016; Pecha et al. 2016; Weinberger et al. 2017). Die aktuelle Methodik der EHT-Herstellung wurde von Breckwoldt et al. in einem detaillierten Protokoll dargestellt (Breckwoldt et al. 2017).

1.5.3 Behandlung des Herzinfarkts und der Herzinsuffizienz mit Methoden der kardialen regenerativen Medizin: In-vivo-Studien von Zell-Therapie- und Tissue Engineering-Ansätzen

Die Herzinsuffizienz zeichnet sich meist durch eine verminderte kardiale Pumpfunktion und ein erhöhtes Risiko für das Auftreten kardialer Arrhythmien aus. Diese zwei schwerwiegenden Konsequenzen der Herzinsuffizienz, typischerweise ausgelöst durch einen Verlust von KM durch einen Herzinfarkt, sind primäre Angriffspunkte der kardialen regenerativen Medizin. Ziel ist es, die Pumpfunktion zu verbessern bzw. deren fortschreitende Einschränkung zu verhindern und außerdem ein elektrisches Remodelling und so das Risiko für Herzrhythmusstörungen zu vermindern. Diverse In-vivo-Studien an verschiedenen Versuchstieren wurden an Infarkt-Modellen, bei denen bei den Versuchstieren experimentell ein Myokardinfarkt und so in der Folge eine Herzinsuffizienz hervorgerufen wurde, durchgeführt, um zu untersuchen, ob dies möglich ist (s. auch Tabelle 1).

Die Zell-Therapie mittels Injektion von aus hESC und iPSC differenzierten KM konnte in einigen Infarkt-Modellen an verschiedenen Versuchstieren teilweise positive Effekte im Vergleich zu Kontrollgruppen zeigen. Die Injektion von hESC-KM in einem sog. *Prosurvival Cocktail* (PSC, u.a. mit Matrigel, einem Hydrogel und dem Insulinähnlichen Wachstumsfaktor-1, *Insulin-like Growth Factor 1, IGF-1*) ins infarzierte Myokard von Ratten führte zu einer partiellen Remuskularisierung des Infarkts mit Verkleinerung des durch die Ischämie

gebildeten Narbengewebes, einer mechanischen Stabilisierung der kardialen Struktur sowie einer Vaskularisierung und außerdem zu einer Verbesserung der myokardialen Pumpfunktion (Laflamme et al. 2007a). Zusätzlich zur von Shiba et al. ebenfalls beobachteten verbesserten Pumpfunktion konnte die Injektion von hESC-KM im subakuten Meerschweinchen-Infarkt-Modell teilweise zu einer elektromechanischen Kopplung der transplantierten KM mit dem Myokard des Empfängerherzens führen. Zudem konnte die Transplantation eine Verminderung von spontanen (im Vergleich zur Gruppe, die Nicht-KM-hESCs in PSC erhielt) sowie durch elektrische Stimulation induzierten (im Vergleich zur Gruppe mit Nicht-KM-hESCs in PSC sowie auch zur Gruppe mit alleiniger PSC) ventrikulären Herzrhythmusstörungen bewirken (Shiba et al. 2012). Während die Transplantation im subakuten Modell sieben Tage nach Infarkt stattfand und zu den genannten Ergebnissen führte, konnten bei Injektion von hESC-KM nach 28 Tagen im chronischen Meerschweinchen-Infarkt-Modell Probleme bei der elektromechanischen Integration beobachtet werden, während sich die Inzidenz von spontanen Herzrhythmusstörungen dabei allerdings nicht veränderte (Shiba et al. 2014). Wurden die hESC-KM in infarzierte Herzen von nicht-humanen Primaten injiziert, konnten ebenfalls eine Remuskularisierung sowie eine elektrische Kopplung nachgewiesen werden, allerdings kam es zu einem vermehrten Auftreten von spontanen, nicht letalen, ventrikulären Arrhythmien trotz antiarrhythmischer Behandlung mit Amiodaron (Chong et al. 2014). Dieser negative elektrophysiologische Effekt im Großtier-Modell konnte in einer weiteren Studie von Shiba et al., bei der allerdings aus Primaten-iPSC gewonnene KM verwendet wurden, bestätigt werden. Die allogene Transplantation mittels Injektion in durch Herzinfarkt geschädigte Primaten-Hezen konnte zwar eine verbesserte Pumpfunktion bewirken und ebenfalls eine elektromechanische Kopplung der transplantierten Zellen hervorrufen, es zeigte sich jedoch auch ein vermehrtes Auftreten von spontanen ventrikulären Arrhythmien (Shiba et al. 2016). In einer weiteren Studie von Liu et al. an nicht-humanen Primaten, bei der analog zu Chong et al. hESC-KM in die infarzierten Herzen injiziert wurden, führte die Transplantation zu einer Verbesserung der myokardialen Pumpfunktion. Die in der ersten Studie beobachteten proarrhythmischen Effekte konnten allerdings nicht reproduziert werden, und es zeigte sich kein signifikanter Einfluss auf das Risiko für spontane oder induzierte Arrhythmien (Liu et al. 2018). Ye et al. transplantierte eine Kombination aus hiPSC-KM, hiPSC-Endothelzellen (*hiPSC-EC*) und hiPSC-Glatte-Muskelzellen (*hiPSC-SMC*), injiziert durch ein Fibrin/IGF-1-Patch, das als Ergänzung zur Zell-Therapie auf der Infarktregion platziert wurde, im Großtier-Infarkt-Modell am Schwein und auch hier kam es zu einer Verbesserung der myokardialen Pumpfunktion. Nach Injektion von lediglich hiPSC-KM durch das mit der Zell-Therapie kombinierte Fibrin/IGF-1-Patch auf der Infarkt-wunde, kam es nicht zum vermehrten Auftreten von spontanen ventrikulären Rhythmusstörungen. Auch unter aggressiver programmierter elektrischer Stimulation war bei keinem der Tiere dieser Gruppe das Auftreten von

ventrikulären Tachykardien oder von Kammerflimmern zu beobachten (Ye et al. 2014). In einer kürzlich veröffentlichten Studie der Arbeitsgruppe um M. Laflamme beschreibt Romagnuolo et al., dass die intramyokardiale Transplantation von hESC-KM in einem PSC in infarzierte Herzen von Schweinen zwar zur Regeneration des Herzmuskels, jedoch auch zu einem stark erhöhten Risiko für das Auftreten von Herzrhythmusstörungen führte. Im Vergleich zur Kontrollgruppe traten bei den Tieren mit hESC-KM kurz nach der Transplantation deutlich mehr ventrikuläre Tachykardien auf, die wahrscheinlich eher durch fokale Mechanismen und weniger durch Reentry-Kreisläufe bedingt waren (Romagnuolo et al. 2019).

Zell-Sheets aus hiPSC-KM konnten in Untersuchungen an Ratten und Schweinen, die experimentelle Infarkte erlitten, ebenfalls positive Auswirkungen auf die kardiale Funktion zeigen (Kawamura et al. 2012; Masumoto et al. 2014).

EHTs aus neonatalen Ratten-KM konnten erfolgreich auf gesundes Ratten-Myokard transplantiert werden: Die Zellen des EHTs überlebten die Transplantation, die KM reiften nach der Verpflanzung und es kam zu einer Vaskularisierung des Transplantats (Zimmermann et al. 2002a). Außerdem konnte von Zimmermann et al. nach Transplantation von EHTs aus neonatalen Ratten-KM auf infarziertes Myokard von Ratten die Bildung von neuem Myokard auf der Infarkt Narbe und eine Verbesserung der systolischen und diastolischen linksventrikulären Funktion beobachtet werden. Das transplantierte EHT war in der Lage, elektrisch an das Empfängerherz zu koppeln und eine durch den Infarkt hervorgerufene Verzögerung der Erregungsleitung über der Narbenregion zu vermindern. Dabei kam es durch das EHT nicht zu einem vermehrten Auftreten von spontanen Herzrhythmusstörungen (Zimmermann et al. 2006). In einer aktuellen Studie unseres Instituts von Weinberger et al. konnten auch Fibrin-basierte humane EHTs (hEHTs) aus hiPSC-KM die Transplantation auf infarzierte Herzen von Meerschweinchen überleben. Es kam zur Bildung von neuem, bei einem Teil der Versuchstiere elektrisch an das Empfängerherz gekoppeltem, kontraktilem Herzmuskelgewebe im Narbenareal und zu einer Verbesserung des elektrophysiologischen Phänotyps des Herzens (z.B. kürzeres ventrikuläres AP, schnellere Erregungsleitung) sowie der myokardialen Pumpfunktion um 31 % im Vergleich zu vor der Transplantation. Mechanische Stabilisierung oder Effekte durch parakrine Mechanismen wie z.B. verbesserte Synchronizität der Kontraktion oder Neonangiogenese könnten der Grund hierfür sein (Laflamme et al. 2007b). Da jedoch zellfreie Kontroll-Konstrukte sowie lediglich aus Endothelzellen hergestellte *hEETs* keinen Effekt auf die Pumpfunktion hatten, obwohl *hEETs* ebenfalls zu einer verstärkten Neovaskularisierung führten, ließ sich vermuten, dass es wahrscheinlich zumindest z.T. zu einer „echten Regeneration“ kam, bei der die funktionellen Verbesserungen auf die Remuskularisierung zurückgeführt werden konnten (Abbildung 8; Weinberger et al. 2016). In einer kürzlich veröffentlichten Studie gelang es Gao et al., humane kardiale Muskelpatches in klinisch relevante Dimensionen, hergestellt aus einer Fibrin-Matrix

und hiPSC-KM, hiPSC-EC sowie hiPSC-SMC, auf infarziertes Schweine-Myokard zu transplantieren. Es kam infolgedessen u.a. zu einer Verbesserung der linksventrikulären Herzfunktion, ohne dabei das Risiko für das Auftreten von spontanen oder durch programmierte elektrische Stimulation induzierte Herzrhythmusstörungen zu erhöhen (Gao et al. 2018).

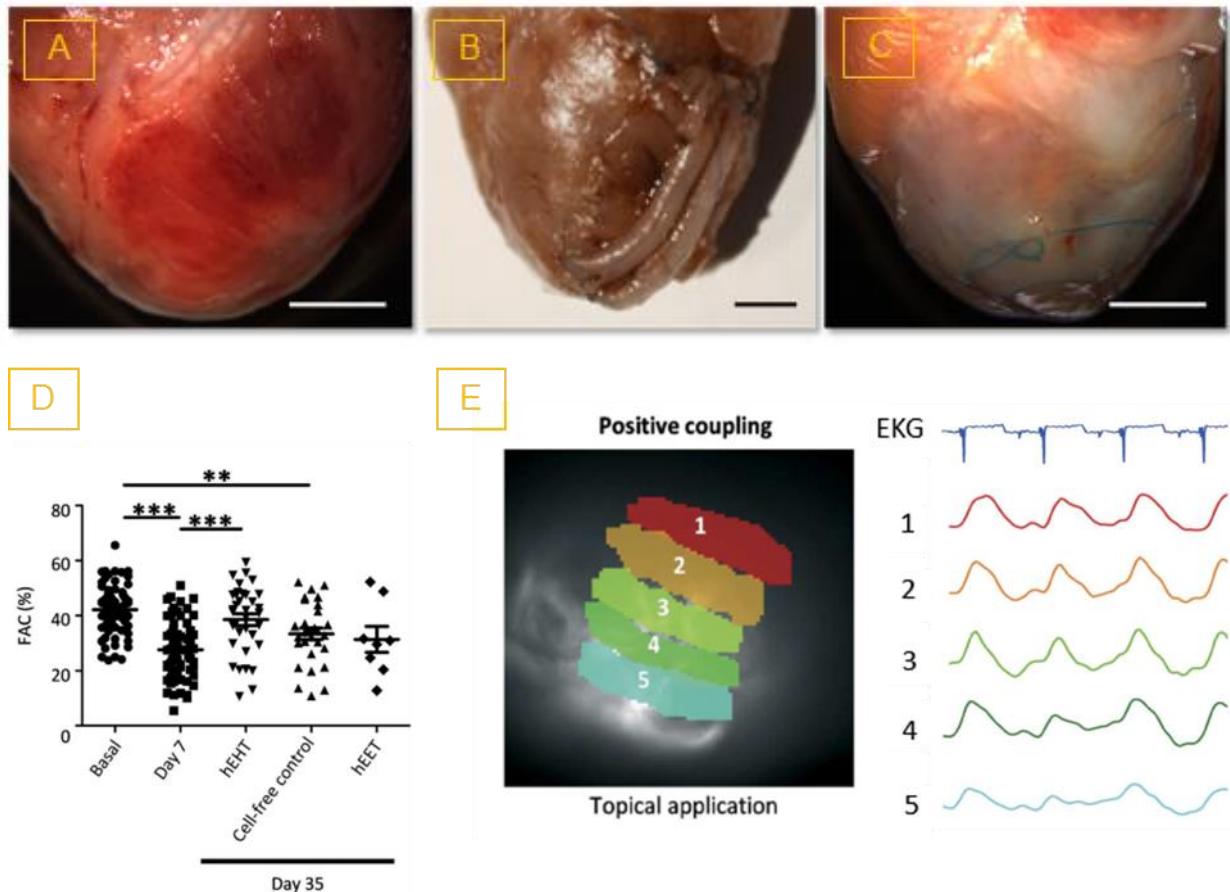


Abbildung 8: Folgen der hEHT-Transplantation (Verändert nach Weinberger et al. 2016).

A: Herz unmittelbar nach Kryo-Verletzung.

B: Herz mit zwei hEHTs unmittelbar nach der Transplantation.

C: Herz mit zwei hEHTs 28 Tage nach der Transplantation.

D: Fractional Area Change (FAC), signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen als Indikator der Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion durch das hEHT.

E: Elektrische Aktivität in der Infarkt-/hEHT-Implantations-Region nach topischer Applikation des Voltage-Tracers RH 237, Beispiel für positive elektrische Kopplung.

1.6 Hypothesen und Ziel

Das zentrale Ziel der verschiedenen hier vorgestellten Ansätze der kardialen regenerativen Medizin ist die „echte Regeneration“ des Herzmuskels durch direkten Ersatz der verlorenen KM. Durch mechanische und elektrische Integration sowie Kopplung der überlebenden transplantierten KM an das Myokard des Empfängerherzens soll neues funktionstüchtiges Myokard entstehen, welches positiven Einfluss auf die funktionellen (Pumpfunktion) und elektrophysiologischen (Arrhythmien) Eigenschaften des Herzens nehmen könnte. Eine elektromechanische Integration und Kopplung, die ein synchrones Schlagen der transplantierten KM mit dem Empfängerherzen sicherstellt, ist wahrscheinlich notwendig, damit die myokardiale Pumpfunktion direkt verbessert (und nicht nur durch parakrine Mechanismen positiv beeinflusst) wird und damit die neuen KM keine Herzrhythmusstörungen auslösen, sondern ggf. sogar das Risiko für diese verringern können.

Einerseits wäre es denkbar, dass so ein positiver Einfluss auf die Elektrophysiologie des Herzens des Empfängers genommen werden kann. Beispielsweise könnten die neuen KM die Ischämie und Narbenbildung in der Infarktregion vermindern, die linksventrikuläre Pumpfunktion verbessern und so das elektrische Remodelling unterbinden, zu einer optimierten elektrophysiologischen Funktion beitragen und Arrhythmien verhindern. Andererseits jedoch könnte z.B. eine fehlerhafte elektromechanische Kopplung zwischen transplantierten KM und dem Empfängermyokard, u.a. ausgelöst durch narbige Veränderungen, zur Entstehung von Reentry-Kreisläufen und so zu Herzrhythmusstörungen führen. Außerdem könnte eine elektrische Automatie spontan aktiver transplantierte KM das Auftreten von Arrhythmien hervorrufen. Ebenso proarrhythmisch könnte eine durch Nachdepolarisation hervorgerufene getriggerte Aktivität einzelner unreifer implantierter KM wirken.

Bis heute existieren jedoch nur begrenzt Daten über die Möglichkeiten zur elektromechanischen Integration und Kopplung und keinerlei Wissen über den Einfluss von transplantierten humanen EHTs (hEHTs) aus hiPSC-KM auf die Elektrophysiologie des Empfängerherzens hinsichtlich des Auftretens von Herzrhythmusstörungen in vivo. Insbesondere in Hinblick auf eine zukünftige klinische Anwendung von hEHTs ist dies allerdings von großer Bedeutung. Es wäre denkbar, dass die transplantierten hEHTs Arrhythmien verursachen, allerdings auch, dass sie das Auftreten von Arrhythmien vermindern können. Ziel dieser Arbeit und Grund für die Durchführung des folgenden Experiments war die Beantwortung der Frage: Erhöht die Transplantation von hEHTs das Risiko für Herzrhythmusstörungen?

2. Material und Methoden

2.1 Studienprotokoll und Tiermodell

Das Hauptziel des durchgeführten Experiments war es, herauszufinden, ob transplantierte hEHTs einen Einfluss auf die Elektrophysiologie des Empfängerherzens haben, d.h. ob sie Arrhythmien verursachen oder umgekehrt deren Auftreten verringern können. Dazu wurden entweder zwei hEHTs aus hiPSC-KM (Versuchsgruppe) oder ein zellfreies Kontroll-Konstrukt (Kontrollgruppe) auf Meerschweinchenherzen transplantiert. Sieben Tage zuvor erfolgte bei den Versuchstieren die Implantation dauerhafter EKG-Transmitter sowie die Induktion einer Kryo-Verletzung zur Simulation eines Infarktes (Abbildung 9). Die Zuteilung der Versuchstiere zur Versuchs- bzw. Kontrollgruppe erfolgte randomisiert. Die Auswertung der EKGs und Echokardiographien erfolgte verblindet.

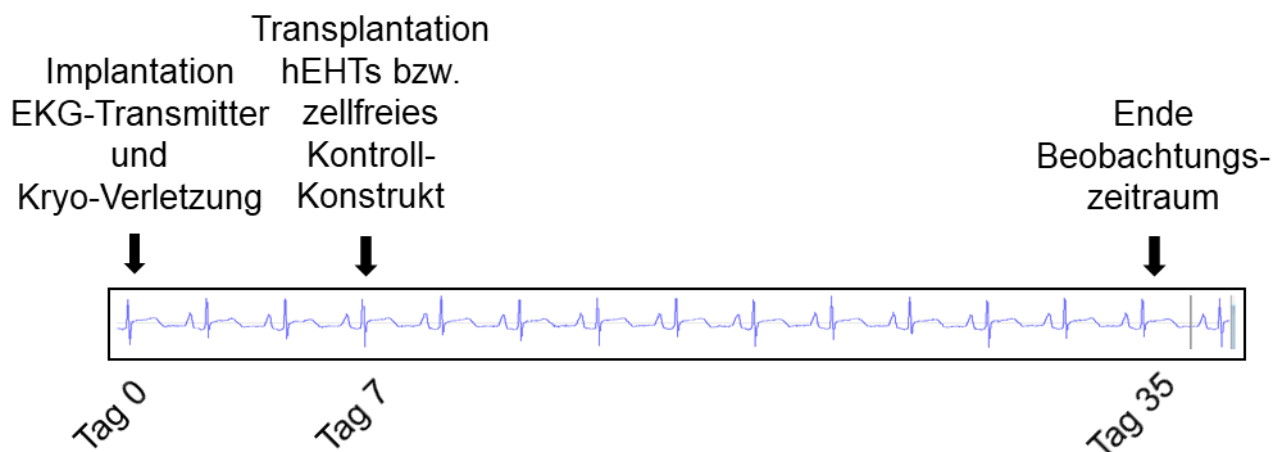


Abbildung 9: Studienprotokoll.

Als Tiermodell für diese Studie wurde das Meerschweinchen ausgewählt. Meerschweinchen haben eine Herzfrequenz von etwa 200 bis 250 Schlägen pro Minute (Shiotani et al. 2007). Humane EHTs zeigen in vitro eine spontane Schlagfrequenz von ca. 50 Schlägen pro Minute und können durch elektrische Stimulation zu höheren Frequenzen, bspw. 120 Schlägen pro Minute, angeregt werden (Hirt et al. 2014a; Weinberger et al. 2016; Lemoine et al. 2017). Dies macht es denkbar, dass die humanen EHTs mit der Herzfrequenz der Meerschweinchen Schritt halten können und so eine mechanische und elektrische Kopplung zwischen hEHT und Empfängerherz möglich wäre. Die kardiale Elektrophysiologie des Meerschweinchens (d.h. Ionenkanäle und AP-Konfiguration der KM) ist der des Menschen sehr ähnlich, was eine Übertragbarkeit auf den Menschen möglich macht und die Chance einer mechanischen und elektrischen Integration des transplantierten Konstrukts humanen Ursprungs erhöht (Shiotani et al. 2005).

Das Vorhaben dieser Arbeit entspricht den Richtlinien des „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ (Publication No. 85-23, überarbeitet 1985) und wurde durch die Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz, Freie und Hansestadt Hamburg genehmigt (61/15).

2.2 Differenzierung humaner Kardiomyozyten (KM) aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC)

Die folgenden Arbeiten wurden durch Frau Dr. rer. nat. Kaja Breckwoldt und Kollegen des Instituts für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Für detaillierte Informationen bezüglich der verwendeten Materialien und angewandten Methoden ist auf die entsprechenden Arbeiten von Breckwoldt et al. sowie Pecha et al. zu verweisen (Breckwoldt et al. 2017; Pecha et al. 2019).

Zunächst erfolgte eine 7-tägige Expansion der hiPSC (Tag -7 bis Tag 0) bis zur mechanisch herbeigeführten Bildung von sogenannten Embryoidkörperchen (*EBs*) an Tag 0 durch ständiges Rühren über Nacht. Diese *EBs* wurden zur mesodermalen Induktion für 3 Tage mit *BMP-4*, Activin A und *bFGF* Insulin-frei kultiviert. Anschließend begann die kardiale Differenzierung, für die zuerst der Wnt-Signalweg inhibiert (Tag 4 bis 11) und Insulin zugesetzt (Tag 7 bis 11) wurde. Von Tag 11 bis 14 wurde die EB-Kultivierung ohne Wnt-Signalweg-Inhibitor durchgeführt. Nach Ende der 10-tägigen kardialen Differenzierung konnten die entstandenen hiPSC-KM dissoziiert und für die Herstellung von EHTs weiterverwandt werden.

Zur Charakterisierung der hiPSC-KM wurden durch Dr. med. Florian Weinberger und Kollegen des Instituts für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf immunhistochemische Färbungen entsprechend der von ihnen zuvor beschriebenen Methode durchgeführt, auf die an dieser Stelle für nähere Informationen verwiesen werden soll (Weinberger et al. 2016). Es erfolgten immunhistochemische Färbungen von α -Aktinin, Troponin T sowie von der atrialen (*MLC2A*) und ventrikulären (*MLC2V*) Isoform der Myosin-Leichtkette. Die Färbungen wurden mikroskopisch an einem Axioskop 2 Mikroskop [Zeiss] untersucht.

2.3 Differenzierung humaner Endothelzellen (EC) aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC)

Die folgenden Arbeiten wurden durch Frau Dr. rer. nat. Kaja Breckwoldt und Kollegen des Instituts für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Für detaillierte Informationen bezüglich der verwendeten Materialien und angewandten Methoden ist auf die entsprechende Arbeit von Pecha et al. zu verweisen (Pecha et al. 2019).

Für die Kultivierung der hiPSCs und die Bildung von Embryoidkörperchen s. 2.2.

Diese *EBs* wurden zur mesodermalen Induktion für 3 Tage mit *BMP-4*, Activin A und *bFGF* Insulin-frei kultiviert. Für die Differenzierung von Endothelzellen (ECs) wurden die *EBs* 12 Tage lang mit *VEGF* und *bFGF* kultiviert. Diese Kultivierung fand 3 Tage lang unter hypoxischen Bedingungen und für weitere 9 Tage unter normoxischen Bedingungen statt. Nach Ende der Differenzierung wurden die *EBs* in Einzelzellen dissoziiert und es wurde eine magnetische Zellseparation (*MACS*) zur Separation CD31-positiver Zellen bis zu einer Reinheit von 95 % durchgeführt. Diese CD31-positiven Zellen wurden im Anschluss mit *VEGF* und *bFGF* bis zur Resuspension und Verwendung für die EHT-Herstellung weiterkultiviert.

2.4 Generation von humanem Engineered Heart Tissue (hEHT) und zellfreiem Kontroll-Konstrukt

Die folgenden Arbeiten wurden durch Frau Dr. rer. nat. Kaja Breckwoldt und Kollegen des Instituts für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Für detaillierte Informationen bezüglich der verwendeten Materialien und angewandten Methoden ist auf die entsprechende Arbeit von Breckwoldt et al. zu verweisen (Breckwoldt et al. 2017).

Zur hEHT-Herstellung wurden die hiPSC-KM in Einzelzellen dissoziiert und die hiPSC-ECs bzw. humane Nabelvenen-Endothelzellen (*HUVECs*) geerntet und resuspendiert. Für die hEHT-Herstellung, welche im 6-well-Format stattfand, wurden pro hEHT 5×10^6 hiPSC-KM und 2×10^6 hiPSC-ECs bzw. *HUVECs* verwendet. Zur hEHT-Generierung wurde die Zellsuspension und Fibrinogen enthaltender hEHT-Mastermix mit Thrombin gemischt und in eine Agarose-Tasche pipettiert. Die zellfreien Kontroll-Konstrukte wurden in der gleichen Weise angefertigt wie die hEHTs, enthielten allerdings weder KM noch ECs bzw. *HUVECs*. Die Größe eines zellfreien Kontroll-Konstrukts entsprach der Größe zweier hEHTs und sollte somit ein vergleichbares Ausmaß an reiner mechanischer Stabilisierung des Empfängerherzens wie zwei hEHTs bewirken. Die hEHTs und zellfreien Kontroll-Konstrukte wurden für 21 Tage kultiviert.

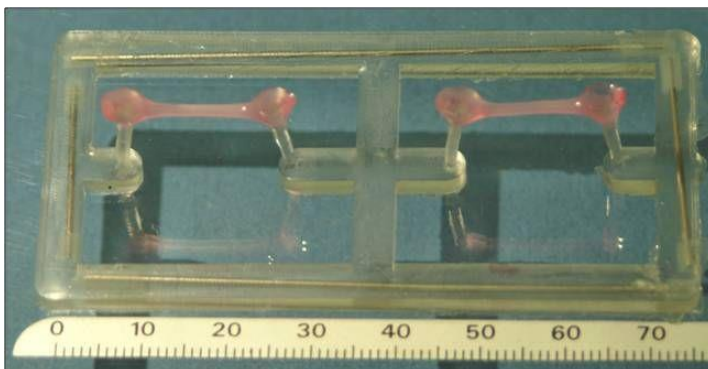


Abbildung 10: Zwei 6-well-Format-hEHTs.

Abstandshalter (Länge: 24 mm, Höhe: 13 mm) und Silikon-Gestelle (Länge: 13 mm, Post-Diameter: 1 mm, Abstand zwischen 2 Posts: 18 mm) für das 6-well-Format-EHT wurden maßgefertigt (Abbildung 10).

Zur Charakterisierung der hiPSC-KM des hEHTs wurden durch Dr. med. Florian Weinberger und Kollegen

des Instituts für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf immunhistochemische Färbungen entsprechend der von ihnen zuvor beschriebenen Methode durchgeführt, auf die an dieser Stelle für nähere Informationen verwiesen werden soll (Weinberger et al. 2016). Es erfolgten immunhistochemische Färbungen von Dystrophin, α -Aktinin, Troponin T, von der ventrikulären (MLC2V) Isoform der Myosin-Leichtkette sowie die Färbung der Kerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). Die Färbungen wurden mikroskopisch an einem Axioskop 2 Mikroskop [Zeiss] untersucht. Außerdem wurden die hiPSC-KM nach Isolation durchflusszytometrisch untersucht.

2.5 Implantation der EKG-Transmitter, Kryo-Verletzung und Transplantation der hEHTs bzw. des zellfreien Kontroll-Konstrukts

Die folgenden Arbeiten wurden im Team mit Herrn PD Dr. med. Simon Pecha, Abteilung für Herz- und Thoraxchirurgie, Universitäres Herzzentrum Hamburg durchgeführt. Die chirurgischen Tätigkeiten wurden von Herrn PD Dr. med. Simon Pecha durchgeführt (Abbildung 11).

Für die erste OP-Prozedur wurden weibliche Meerschweinchen im Alter von vier bis sechs Wochen (Gewicht 280 g bis 370 g) mit Isofluran (2,5 %) anästhesiert. Dann wurden die Versuchstiere in Rückenlage auf einer Wärmeplattform positioniert. Zusätzlich wurde den Versuchstieren 30 Minuten vor Beginn der OP-Prozedur zur Analgesie Carprofen (5 mg/kg Körpergewicht) und Buprenorphin (0,1 mg/kg Körpergewicht) subkutan injiziert.

Zunächst wurde die Haut im OP-Bereich rasiert und eine 1 cm lange Inzision an der rechten Flanke durchgeführt. Ein EKG-Transmitter [PhysioTel ETA-F10, D.S.I.] wurde in einer subkutanen Gewebetasche plziert und mit einer Naht mit 5-0 Prolenefaden fixiert. Mittels Tunnelung wurde die angeschlossene positive EKG-Elektrode im fünften Interkostalraum links zu Liegen gebracht und fixiert, die angeschlossene negative EKG-Elektrode wurde ebenfalls getunnelt und 1 cm lateral der Mitte der oberen Sternallinie rechts fixiert. Diese Anordnung der EKG-Elektroden entspricht einer Ableitung II nach Einthoven.

Anschließend wurde das Versuchstier über eine Tracheotomie intubiert und mechanisch beatmet. Eine linkslaterale Thorakotomie wurde durchgeführt und das Perikard eröffnet. Dann wurde ein Stab aus Aluminium (Durchmesser 0,5 cm), der zuvor in flüssigem Stickstoff gekühlt wurde, viermalig für jeweils 30 Sekunden auf den linken Ventrikel gedrückt und so eine Kryo-Verletzung hervorgerufen.

Sechs bzw. sieben Tage (aus organisatorischen Gründen wurden 17 der 19 überlebenden Versuchstiere an Tag 7 der 2. OP-Prozedur zugeführt, zwei Tiere, eins aus jeder Gruppe, an Tag 6) nach der Kryo-Verletzung wurden in einer zweiten OP mit erneuter Thorakotomie zwei hEHTs bzw. ein zellfreies Kontroll-Konstrukt auf die Herzen der Meerschweinchen

transplantiert. Die Transplantate wurden über dem Infarktareal platziert und mittels Naht am gesunden Myokard neben der Infarktnarbe fixiert, um durch Kontakt zwischen hEHT und nicht geschädigten KM die Chance auf eine elektrische Kopplung zum Herzmuskel des Empfängers zu erhöhen (s. auch Abbildung 8A-C). Anschließend wurden die Meerschweinchen mit Methylprednisolon (2 mg/kg Körpergewicht pro Tag) und Ciclosporin (5 mg/kg Körpergewicht pro Tag) immunsupprimiert, um eine Abstoßung der Muskelkonstrukte humanen Ursprungs zu verhindern. Die Versuchstiere erhielten zur Analgesie außerdem Carprofen (5 mg/kg Körpergewicht pro Tag) und Buprenorphin (0,1 mg/kg Körpergewicht pro 12 Stunden) postoperativ für fünf Tage.

Insgesamt wurden 32 Versuchstiere der ersten OP-Prozedur (Tag 0) zugeführt. Davon verstarben elf der Versuchstiere während der folgenden sechs bzw. sieben Tage oder während der im Anschluss stattfindenden Transplantations-OP (Tag 6 bzw. 7). Zwei weitere Versuchstiere verstarben kurze Zeit nach bzw. am Tag nach der Transplantations-OP (Tag 6 bzw. 7). Den gesamten Beobachtungszeitraum überlebten 19 Versuchstiere. Gemäß der zufälligen Gruppenzuteilung erhielten von diesen 19 Versuchstieren elf Versuchstiere zwei hEHTs bzw. acht Versuchstiere ein zellfreies Kontroll-Konstrukt.

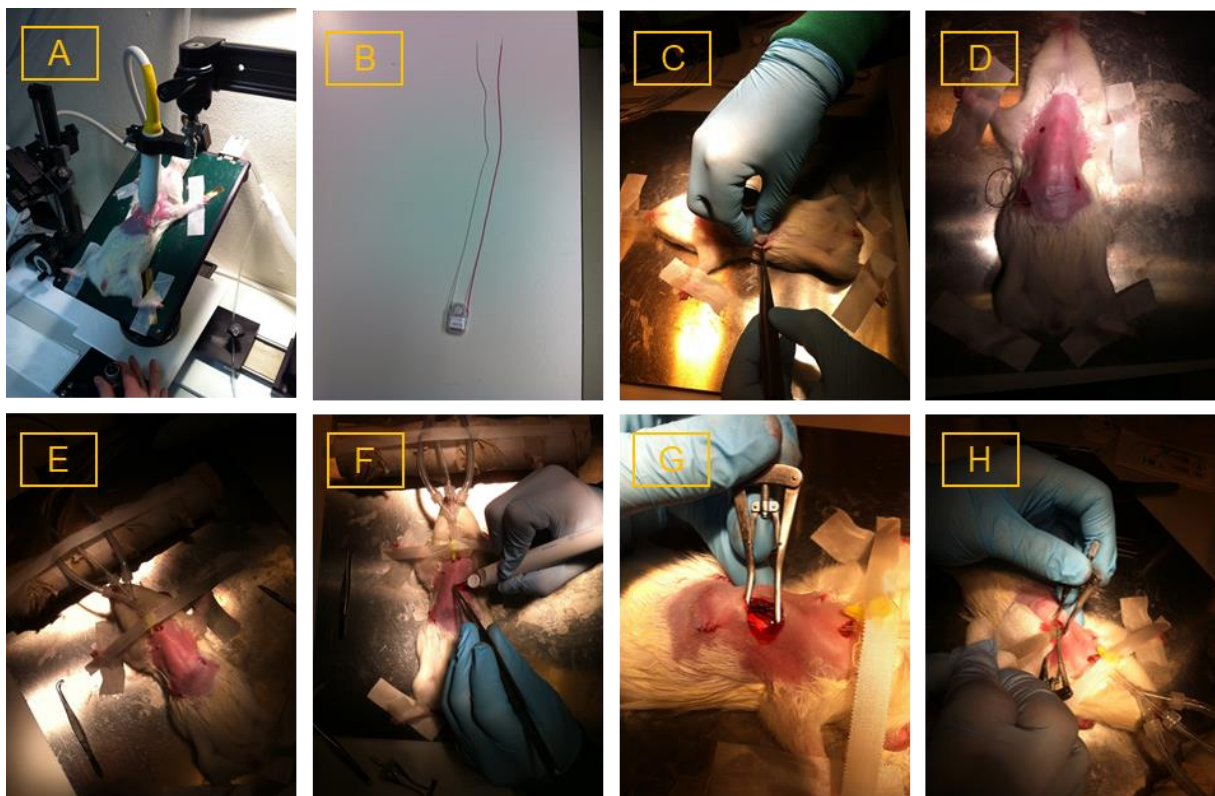




Abbildung 11: OP-Prozeduren.

A: Echokardiographie eines anästhesierten Meerschweinchens in Rückenlage.

B: EKG-Transmitter.

C: Implantation des EKG-Transmitters.

D: Tunnelung der EKG-Elektroden.

E: Maschinelle Beatmung nach Tracheotomie.

F: Linksthorakale Thorakotomie.

G: Eröffnung des Perikards, Blick auf das freiliegende Herz.

H: Kryo-Verletzung des linken Ventrikels.

I: Sichtbare Infarktinduktion auf dem linken Ventrikel.

J: Wundverschluss.

K: Intubiertes Meerschweinchen vor der 2. OP-Prozedur.

L: Herz nach Transplantation eines hEHTs.

2.6 Telemetrische Parameter- und EKG-Aufnahme

Die Parameter- und EKG-Aufnahme begann nach der Implantation der EKG-Transmitter und wurde über einen Zeitraum von durchschnittlich 38 Tagen durchgeführt, in die Analyse wurden jedoch nur Daten bis Tag 35 eingeschlossen (Abbildung 9). Von den 19 Versuchstieren, die länger als einen Tag nach der zweiten Operation überlebten, überlebten alle auch bis zum Ende ihrer individuellen EKG-Aufnahme, davon elf Versuchstiere mit hEHTs und acht Versuchstiere mit zellfreiem Kontroll-Konstrukt.

Während der EKG-Aufnahme befanden sich die Versuchstiere in Einzelkäfigen, die sich auf Empfangsplatten für die Daten der Telemetrie befanden, welche wiederum an zur

Datenspeicherung dienenden Computern angeschlossen waren. Die Versuchstiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Ein Tag-Nacht-Rhythmus der Versuchstiere wurde durch angeschaltetes Licht zwischen sieben Uhr morgens und sieben Uhr abends simuliert. Die Raumtemperatur wurde zwischen 20 und 22 °C und die Luftfeuchtigkeit zwischen 40 und 60 % konstant gehalten.

Die Parameter- und EKG-Aufnahme erfolgte für die überlebenden und eingeschlossenen Versuchstiere aus der Gruppe mit den Nummern 1-14 mit Dataquest A.R.T. [Version 4.3, D.S.I.] und für die überlebenden und eingeschlossenen Versuchstiere aus der Gruppe mit den Nummern 15-33 mit PONEMAH [Versionen 5.2, 6.0 und 6.1, D.S.I.] mit einer Sampling-Rate von 1 Hz.

Die beiden verwendeten Telemetrie-Programme Dataquest A.R.T. und PONEMAH sowie die verschiedenen Versionen sind hinsichtlich der Korrektheit und Genauigkeit der aufgezeichneten Daten als gleichwertig zu betrachten.

Die Parameter Körpertemperatur (Messung durch den Transmitter) und physische Aktivität (Messung durch den Transmitter, misst Bewegung des Versuchstieres in Bezug zur Empfangsplatte) sowie die EKG-Wellenform (Messung durch die an den Transmitter angeschlossenen EKG-Elektroden, diente der Untersuchung von Herzfrequenz und Arrhythmien) wurden alle fünf Minuten für eine Minute aufgezeichnet. Insgesamt wurden die genannten Parameter und die EKG-Wellenform pro Tier für durchschnittlich 7770 Minuten aufgezeichnet.

2.7 Echokardiographie

Die folgenden Arbeiten wurden im Team mit Frau Birgit Geertz und Kollegen des Instituts für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

Die transthorakale Echokardiographie wurde mit einem Vevo 2100 System [VisualSonics] durchgeführt. Die Untersuchung erfolgte jeweils vor der ersten (Tag 0) und der zweiten Operation (Tag 6 bzw. 7) und diente dazu, die Infarktgröße über die Verschlechterung der linksventrikulären Pumpfunktion und über die Größe des linken Ventrikels vor Transplantation von hEHTs bzw. zellfreiem Kontroll-Konstrukt zu bestimmen und sicherzustellen, dass sich diese zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant unterschied.

Die Versuchstiere wurden mit Isofluran (1,5 bis 2,0 %) anästhesiert und auf einer Wärmeplattform in Rückenlage positioniert. Zweidimensionale Darstellungen des Querschnitts des Herzens wurden auf Höhe der Papillarmuskulatur durchgeführt. Parasternale Darstellungen des Längsschnitts des Herzens wurden auf Höhe der Aortenklappe mit gleichzeitiger Darstellung der linksventrikulären Herzspitze vorgenommen.

Die konventionellen Messungen wurden im B-Modus mit einem MS 400 Schallkopf (Frequenz 30 MHz) mit einer Bildrate von 230-400 Bildern/Sekunde durchgeführt.

Gemäß Standardvorgehen wurden die Durchmesser der Vorderwand und der Hinterwand des linken Ventrikels, der linksventrikuläre Gesamtdurchmesser sowie die Fläche der linken Herzkammer untersucht und beurteilt. Aus den gewonnenen Daten wurde der *Fractional Area Change (FAC)* als Indikator der linksventrikulären Pumpfunktion sowie der *Left Ventricular Inner Diastolic Diameter (LVIDd)* als Parameter der Ventrikeldilatation bestimmt.

Alle Bilder wurden digital aufgezeichnet und es wurde eine Offline-Analyse mit der Vevo 2100 Software [VisualSonics] durchgeführt.

2.8 Organentnahme mit Histologie und Immunhistochemie

Die folgenden Arbeiten wurden durch Herrn PD Dr. med. Simon Pecha und Kollegen des Instituts für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf sowie durch Frau Kristin Hartmann der Mauspathologie Facility des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

Die 19 Versuchstiere wurden in tiefer Anästhesie mit Isofluran getötet und die Herzen einschließlich der Transplantate für die histologische Analyse entnommen. Die Herzen wurden in neutral gepufferter 4 % Formaldehyd- und 1 % Methanol-haltiger Lösung mit pH 7,4 fixiert. Anschließend wurden die entnommenen Herzen in 2 mm breite Ringe quergeschnitten, sodass jeder Ring einen verschiedenen Bereich des Herzens (Herzspitze, auf Höhe der Papillarmuskulatur sowie Herzbasis) darstellte. Die Ringe wurden durch Frau Kristin Hartmann in Paraffin eingebettet und die entstandenen Paraffinblöcke zu Paraffinschnitten weiterverarbeitet. Aus jedem Bereich des Herzens wurden durch Frau Kristin Hartmann jeweils immunhistochemische Färbungen von MLC2A, MLC2V, Dystrophin sowie humanem Ku80 angefertigt. Die anschließende Mikroskopie erfolgte an einem Axioskop 2 Mikroskop [Zeiss].

2.9 Parameter-/EKG-Analyse und statistische Auswertung

Die Parameter- und EKG-Analyse wurde unter Verblindung gegenüber der zufälligen Gruppenzuteilung vorgenommen.

Die Analyse der Körpertemperatur erfolgte für die überlebenden und eingeschlossenen Versuchstiere aus der Gruppe mit den Nummern 1-14 mit Dataquest A.R.T. [Version 4.3, D.S.I.] und für die überlebenden und eingeschlossenen Versuchstiere aus der Gruppe mit den Nummern 15-33 mit PONEMAH [Version 6.1, D.S.I.].

Die Analyse der physischen Aktivität erfolgte für die überlebenden und eingeschlossenen Versuchstiere aus der Gruppe mit den Nummern 1-14 mit Dataquest A.R.T. [Version 4.3,

D.S.I.] und für die überlebenden und eingeschlossenen Versuchstiere aus der Gruppe mit den Nummern 15-33 mit PONEMAH [Version 6.11, D.S.I.].

Die Analyse der EKG-Wellenform, d.h. von Herzfrequenz und Arrhythmien, erfolgte für die überlebenden und eingeschlossenen Versuchstiere aus der Gruppe mit den Nummern 1-14 mit PONEMAH [Versionen 5.2 und 6.1, D.S.I.] und für die überlebenden und eingeschlossenen Versuchstiere aus der Gruppe mit den Nummern 15-33 mit PONEMAH [Version 6.1, D.S.I.].

Die beiden verwendeten Analyse-Programme Dataquest A.R.T. und PONEMAH sowie die verschiedenen Versionen sind hinsichtlich der Korrektheit und Genauigkeit der Ergebnisse als gleichwertig zu betrachten.

Eine weitere Bearbeitung der Ergebnisse der Parameter- und EKG-Analyse erfolgte mit Microsoft Excel [Version 15.0, Microsoft Corporation] sowie GraphPad PRISM [Versionen 5.2 und 6.0, GraphPad Software, Inc.].

Die Analyse der Parameter Körpertemperatur und physische Aktivität sowie die Bestimmung der Herzfrequenz aus der EKG-Wellenform wurde über den kompletten Zeitraum bis Tag 35, einschließlich der postoperativen Phasen, vorgenommen, da diese Indikatoren des allgemeinen Gesundheitszustandes der Tiere darstellten und somit auch in diesen Phasen von Bedeutung waren. Bei der Analyse der Arrhythmien anhand der EKG-Wellenform wurden die zwei postoperativen Phasen von 48 Stunden Dauer aus der Analyse ausgeschlossen, um postoperative Artefakte, wie durch die Narkotika hervorgerufene Arrhythmien in den Studienergebnissen zu verhindern. Somit ergaben sich für die Untersuchung der Herzrhythmusstörungen zwei Analyse-Zeitfenster (Abbildung 12).

Von den ursprünglich 19 Versuchstieren, die alle den Beobachtungszeitraum bis zur Organentnahme überlebten, wurden letztendlich 18 Versuchstiere (zehn Versuchstiere: hEHT, acht Versuchstiere: zellfreies Kontroll-Konstrukt) in die finale Auswertung der Parameter- und EKG-Analyse eingeschlossen. Das Versuchstier mit der Nummer 28 (hEHT) wurde nachträglich von der Analyse komplett ausgeschlossen, da es über den gesamten Beobachtungszeitraum (sowohl vor, als auch nach der Transplantation) gekoppelte ventrikuläre Extrasystolen (v.a. Bigemini) zeigte, denen ein anderer pathophysiologischer Mechanismus als den sonst beobachteten Arrhythmien zugrunde lag. Insgesamt zeigte das Versuchstier über die gesamte Zeit mehrere Hunderttausende solcher Extrasystolen und ein Einschluss in die Gruppenanalyse hätte eine Verzerrung der Ergebnisse nach sich gezogen. Zwei weitere Versuchstiere mit den Nummern 2 (zellfreies Kontroll-Konstrukt) und 30 (hEHT) zeigten jeweils auch eine bzw. neun, jedoch kurz andauernde, solcher Episoden. Die darin enthaltenen Extrasystolen wurden für die Analyse der jeweiligen Versuchstiere daher ebenfalls ausgeschlossen.

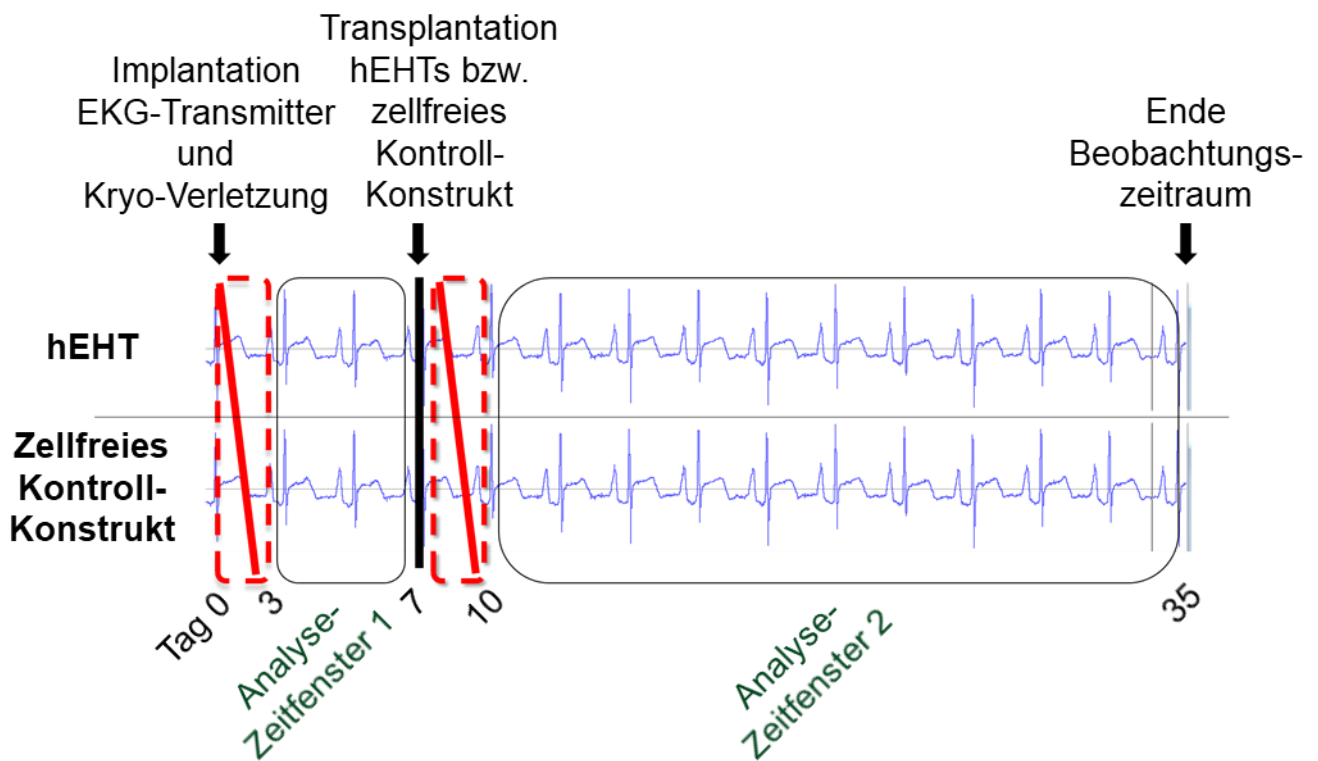


Abbildung 12: EKG-Analyse mit Analyse-Zeitfenster 1 und 2.

Aus technischen und organisatorischen Gründen war die Datenaufzeichnung nicht in allen Fällen komplett vollständig. Siehe bezüglich dieser Datenverluste Zusatztable 1 (genaue Anzahl der Minuten auswertbaren EKGs für die Arrhythmie- und Herzfrequenz-Auswertung und Anzahl der Parameter- und Herzfrequenz-Datenpunkte der jeweiligen Versuchstiere im Beobachtungszeitraum), Anhang.

Die Parameter-Daten sowie die Herzfrequenz-Daten aus der EKG-Wellenform wurden für alle 18 Versuchstiere regelrecht als absolute Werte (d.h. nicht auf die Zeit normiert) über die Beobachtungszeit ausgewertet, da es sich nicht wie bei den Herzrhythmusstörungen um eine Zählung von Ereignissen handelte und da bei dieser Arbeit kein primärer Fokus auf diese Werte gesetzt wurde, sondern diese hauptsächlich zur Bestimmung des Allgemeinzustands der Versuchstiere dienten. Der geschilderte Datenverlust in Relation zur Gesamtzahl gesammelter Daten über Körpertemperatur, physische Aktivität und Herzfrequenz war vernachlässigbar klein und somit für die statistische Auswertung dieser Arbeit nicht relevant.

Für die statistische Auswertung der Häufigkeit von Arrhythmien in den Gruppen, welche den Hauptaspekt dieser Arbeit darstellte, wurden ebenfalls die Arrhythmie-Daten aller 18 Versuchstiere in die Analyse miteinbezogen. Hier wurde jedoch, da (wie oben beschrieben) in beiden Gruppen nicht der gleiche Umfang an auswertbarer Dauer von EKG-Wellenform vorlag und die Gruppen aufgrund der Randomisierung unterschiedlich groß waren, nicht die absolute Anzahl an Arrhythmien pro Gruppe über die Beobachtungszeit zwischen den beiden Gruppen

verglichen. Stattdessen wurden die Arrhythmien pro beobachtete Zeit (die exakte Anzahl Minuten ausgewerteten EKGs jedes Versuchstieres und somit jeder Gruppe inkl. der einzelnen Datenverluste, wurde für die Analyse-Zeitfenster 1 und 2 vorher berechnet, s. Zusatztable 1, Anhang) pro Gruppe zwischen den beiden Gruppen verglichen. Durch die Normierung der Arrhythmie-Häufigkeit auf die beobachtete Zeit wurde eine statistische Vergleichbarkeit der Gruppen hinsichtlich des Auftretens der Herzrhythmusstörungen hergestellt, obwohl nicht exakt gleich viele Minuten EKG-Wellenform in beiden Gruppen vorlag. Das Gleiche galt für die statistischen Auswertungen innerhalb der Gruppen mit dem Vergleich des Auftretens von Arrhythmien pro beobachtete Zeit zwischen den beiden Analyse-Zeitfenstern 1 und 2. Zusätzlich wurden nicht auf die Zeit normierte Darstellungen, z.B. Zeitverläufe mit der Anzahl der Arrhythmien der einzelnen Versuchstiere während der Beobachtungszeit, erstellt.

2.9.1 Körpertemperatur

Die Messung und Untersuchung der Körpertemperatur diente der Überprüfung des allgemeinen Gesundheitszustands der Versuchstiere.

Die Analyse der Körpertemperatur erfolgte für die überlebenden und eingeschlossenen Versuchstiere aus der Gruppe mit den Nummern 1-14 mit Dataquest A.R.T. [Version 4.3, D.S.I.] und für die überlebenden und eingeschlossenen Versuchstiere aus der Gruppe mit den Nummern 15-33 mit PONEMAH [Version 6.1, D.S.I.]. Zunächst wurden die gewonnenen Rohdaten aus der Telemetrie in die genannten Analyse-Programme überführt und dort analysiert, sodass konkrete Werte der Körpertemperatur über den Beobachtungszeitraum für jedes Versuchstier extrahiert wurden. Anschließend wurden diese extrahierten Daten in Excel-Tabellen übertragen und dort durch Umrechnungen mit den jeweiligen Messzeitpunkten korreliert. Außerdem wurden die Daten von Messfehlern (Werte außerhalb des Bereiches von 30-45 °C) bereinigt und auf den konkret erwünschten Analyse-Zeitraum zugeschnitten. Dann wurden die bereinigten und zugeschnittenen Daten in PRISM überführt und dort XY-Tabellen und -Diagramme (X: Messzeitpunkte, Y: Werte der Körpertemperatur) erstellt, sodass Graphen entstanden, die den Verlauf der Körpertemperatur der Versuchstiere über die Beobachtungszeit darstellen. Es wurde die Anzahl der Datenpunkte, die Spannbreite der Werte, also Minimum und Maximum, der Median sowie der Mittelwert bestimmt. Außerdem wurden graphische und statistische Gruppen-Auswertungen hinsichtlich der Körpertemperatur vorgenommen.

2.9.2 Physische Aktivität

Die Messung und Untersuchung der physischen Aktivität der Versuchstiere diente ebenfalls der Überprüfung des allgemeinen Gesundheitszustands der Versuchstiere.

Die physische Aktivität ist ein einheitenloses Maß für die Anzahl der Bewegungen, die die Versuchstiere in ihrem Käfig machten.

Die Analyse der physischen Aktivität erfolgte für die überlebenden und eingeschlossenen Versuchstiere aus der Gruppe mit den Nummern 1-14 mit Dataquest A.R.T. [Version 4.3, D.S.I.] und für die überlebenden und eingeschlossenen Versuchstiere aus der Gruppe mit den Nummern 15-33 mit PONEMAH [Version 6.11, D.S.I.]. Zunächst wurden die gewonnenen Rohdaten aus der Telemetrie in die genannten Analyse-Programme überführt und dort analysiert, sodass konkrete Werte der physischen Aktivität über den Beobachtungszeitraum für jedes Versuchstier extrahiert wurden. Anschließend wurden die extrahierten Daten in Excel-Tabellen übertragen und dort durch Umrechnungen mit den jeweiligen Messzeitpunkten korreliert. Außerdem wurden die Daten von Messfehlern (Werte im mehrstelligen Tausender-Bereich, die durch Störungen entstanden) bereinigt und auf den konkret erwünschten Analyse-Zeitraum zugeschnitten. Dann wurden die bereinigten und zugeschnittenen Daten in PRISM überführt und dort XY-Tabellen und -Diagramme (X: Messzeitpunkte, Y: Werte der physischen Aktivität) erstellt, sodass Balkendiagramme entstanden, die die Werte der physischen Aktivität der Versuchstiere über die Beobachtungszeit darstellen. Außerdem wurden Histogramme generiert, die die Häufigkeitsverteilung der jeweiligen Werte der physischen Aktivität der Versuchstiere sowie der beiden Gruppen im Vergleich abbilden. Es wurde die Anzahl der Datenpunkte, die Spannweite der Werte, also Minimum und Maximum, der Median sowie der Mittelwert bestimmt. Außerdem wurden graphische und statistische Gruppen-Auswertungen hinsichtlich der physischen Aktivität vorgenommen.

2.9.3 EKG-Wellenform: Herzfrequenz

Auch die Messung und Untersuchung der Herzfrequenz diente der Überprüfung des allgemeinen Gesundheitszustands der Versuchstiere. Außerdem lieferte die Herzfrequenz übergreifende Informationen über den Status des kardiovaskulären Systems der Versuchstiere.

Die Analyse der EKG-Wellenform und somit der Herzfrequenz erfolgte für die überlebenden und eingeschlossenen Versuchstiere aus der Gruppe mit den Nummern 1-14 mit PONEMAH [Versionen 5.2 und 6.1, D.S.I.] und für die überlebenden und eingeschlossenen Versuchstiere aus der Gruppe mit den Nummern 15-33 mit PONEMAH [Version 6.1, D.S.I.].

Zunächst wurde die EKG-Wellenform aus der Telemetrie in die genannten Analyse-Programme überführt und dort analysiert, sodass konkrete Werte der Herzfrequenz über den Beobachtungszeitraum für jedes Versuchstier bestimmt werden konnten. Für diese Berechnung der Herzfrequenz musste das Analyse-Programm die R-Zacken im EKG erkennen und markieren können. Dies war nur möglich, wenn zuvor geeignete Werte für

verschiedene Parameter (z.B. Richtwert für die Amplitude der R-Zacken im EKG in mV, anhand derer das Programm nach diesem bestimmten EKG-Ausschlag suchen und diesen dann als R-Zacke erkennen und kennzeichnen sollte) ausgewählt und eingegeben wurden. Die Verbesserung der Erkennung durch das Programm durch Eingabe geeigneter Richtwerte gelang hauptsächlich anhand von Erfahrungsgewinn im Umgang mit den zahlreichen Meerschweinchen-EKGs. Wurden alle R-Zacken erkannt und korrekt gekennzeichnet, konnte das Programm die Herzfrequenz korrekt berechnen, da diese dem Kehrwert des RR-Intervalls entspricht, und pro Minute mitteln. Anschließend wurden die extrahierten Daten in Excel-Tabellen übertragen und dort durch Umrechnungen mit den jeweiligen Messzeitpunkten korreliert. Außerdem wurden die Daten von Messfehlern (Werte außerhalb des Bereichs von 100-450 Schlägen/Minute) bereinigt und auf den konkret erwünschten Analyse-Zeitraum zugeschnitten. Dann wurden die bereinigten und zugeschnittenen Daten in PRISM überführt und dort XY-Tabellen und -Diagramme (X: Messzeitpunkte, Y: Werte der Herzfrequenz) erstellt, sodass Graphen entstanden, die den Verlauf der Herzfrequenz der Versuchstiere über die Beobachtungszeit darstellen. Außerdem wurden Histogramme generiert, die die Häufigkeitsverteilung der jeweiligen Werte der Herzfrequenz der Versuchstiere abbilden. Es wurde die Anzahl der Datenpunkte, die Spannbreite der Werte, also Minimum und Maximum, der Median sowie der Mittelwert bestimmt. Außerdem wurden graphische und statistische Gruppen-Auswertungen hinsichtlich der Herzfrequenz vorgenommen.

2.9.4 EKG-Wellenform: Arrhythmien

Um das Risiko für Herzrhythmusstörungen nach dem kardialen Gewebeersatz zu untersuchen, wurden die aufgezeichneten EKGs der Versuchstiere hinsichtlich des Auftretens schwerer ventrikulärer Arrhythmien analysiert. Das Vorkommen weniger gravierender supraventrikulärer Herzrhythmusstörungen wurde bei der Auswertung nicht mit einbezogen.

Die Klassifikation und Definition der einzelnen Typen von ventrikulären Arrhythmien wurde anhand der Richtlinien für die Studie von Arrhythmien der „Lambeth Conventions“ vorgenommen (Walker et al. 1988; Zimmermann et al. 2006; Shiba et al. 2012).

- **Ventrikuläre Extrasystole (Premature Ventricular Contraction, PVC)**

Eine Erregung im EKG wurde als eine PVC definiert, wenn sie mindestens zwei der drei folgenden Kriterien aufwies:

- 1) Abwesenheit einer detektierbaren P-Welle.
- 2) Verbreiterung des QRS-Komplexes.
- 3) Vorliegen einer postextrasystolischen Pause.

- Couplet

Ein Couplet wurde definiert als zwei konsekutive PVCs.

- Triplet

Ein Triplet wurde definiert als drei konsekutive PVCs.

- Nicht-anhaltende ventrikuläre Tachykardie (*Non-sustained Ventricular Tachycardia, Non-sus VT*)

Eine nicht-anhaltende ventrikuläre Tachykardie wurde definiert als mindestens vier bis maximal 15 konsekutive PVCs.

- Anhaltende ventrikuläre Tachykardie (*Sustained Ventricular Tachycardia, Sus VT*)

Eine anhaltende ventrikuläre Tachykardie wurde definiert als 16 oder mehr konsekutive PVCs.

- Kammerflimmern (*Ventricular Fibrillation, VF*)

Ein Kammerflimmern wurde definiert als die gleichzeitige Abwesenheit definierbarer, voneinander abgrenzbarer QRS-Komplexe und einer isoelektrischen Linie.

Die Analyse der EKG-Wellenform und somit des Auftretens von Arrhythmien erfolgte für die überlebenden und eingeschlossenen Versuchstiere aus der Gruppe mit den Nummern 1-14 mit PONEMAH [Versionen 5.2 und 6.1, D.S.I.] und für die überlebenden und eingeschlossenen Versuchstiere aus der Gruppe mit den Nummern 15-33 mit PONEMAH [Version 6.1, D.S.I.]. Dafür wurde zunächst die EKG-Wellenform aus der Telemetrie in die genannten Analyse-Programme überführt und dort analysiert.

Wie unter 2.9.3 erläutert, konnte das Analyse-Programm die R-Zacken im EKG erkennen und kennzeichnen. Dies war, wie oben bereits beschrieben, jedoch nur möglich, wenn zuvor geeignete Werte für die verschiedenen Parameter, die Einfluss auf die Treffsicherheit bei der Erkennung der R-Zacken hatten, eingegeben wurden. Beispielsweise ließ sich ein beliebiger Richtwert für die Amplitude der R-Zacke im EKG in mV angeben. Dieser musste so gewählt werden, dass er dem realen mV-Wert der Amplitude der R-Zacken nahekam. Traf dies zu, so konnte das Programm gezielt nach R-Zacken suchen, sie erkennen und markieren. Aufgrund zunehmender Übung des Durchführenden und Erfahrung im Umgang mit den EKGs der Meerschweinchen konnten die verschiedenen Parameter geeignet ausgewählt werden. Das Programm konnte letztlich nahezu alle R-Zacken erkennen und korrekt kennzeichnen.

Aufgrund pathophysiologischer Überlegungen bezüglich des Einflusses von ventrikulären Herzrhythmusstörungen auf die Herzfrequenz, genauer auf die Dauer des RR-Intervalls, ließ

sich die im Folgenden erläuterte Methode zum Auffinden von Arrhythmien etablieren. Die oben beschriebenen und definierten Arrhythmien gehen ohne Ausnahme alle mit einer Veränderung der Herzfrequenz bzw. des RR-Intervalls einher. Mithilfe des Analyse-Programms war es möglich, die Herzfrequenz nicht über eine Minute zu mitteln, sondern eine sogenannte „Beat-to-Beat-Darstellung“ zu erzeugen. In dieser Darstellung war für jeden einzelnen über die Erkennung der R-Zacke detektierten Herzschlag bzw. für jeweils zwei konsekutive Herzschläge das RR-Intervall über die Zeit dargestellt. Ein Anstieg der momentanen Herzfrequenz, mit denen alle gesuchten ventrikulären Arrhythmien einhergingen, war als plötzliche Abweichung nach oben in dieser Kurve vom mittleren RR-Intervall („Baseline“) zu erkennen. Zeigte sich bei der Begutachtung dieser Darstellung eine solche Abweichung, konnte zur entsprechenden Stelle in der EKG-Wellenform gesprungen werden und diese jeweilige Stelle direkt im EKG angeschaut und bewertet werden. Zeigte sich dort eine der gesuchten Herzrhythmusstörungen, konnte diese als ein sog. „Event“ markiert, anschließend benannt und gespeichert werden. Die Bewertung und Benennung der jeweiligen Arrhythmie erfolgten anhand der Klassifikation und Definition der gesuchten Arrhythmien.

Kurze Bereiche in der EKG-Wellenform einiger Versuchstiere wiesen Störungen auf, die dazu führten, dass die beschriebene Darstellung der RR-Intervalle nicht korrekt generiert werden konnte, da ggf. die technischen Artefakte als R-Zacken erkannt wurden und an dieser Stelle zu einer Fehlberechnung des RR-Intervalls (extrem hohe Herzfrequenz-Werte, wurden bei der Herzfrequenz-Analyse bereinigt) führten. Hier wurde deshalb die gesamte EKG-Wellenform in ihrer ursprünglichen Darstellung begutachtet, um Arrhythmien erkennen und markieren zu können.

EKG-Segmente mit besonders schwierig beurteilbaren Abweichungen vom Sinusrhythmus wurden in Zusammenarbeit mit zwei weiteren unabhängigen EKG-Experten (Herr Mirko Paske und Herr Prof. Dr. med. Alexander Schwoerer, Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) mit Erfahrungen in der Auswertung von EKGs bei Nagern (insbesondere Mäuse, Ratten und Meerschweinchen) bewertet. Einer dieser Experten (Herr Prof. Dr. med. Alexander Schwoerer) kontrollierte zusätzlich am Ende der Auswertung umfassend die durchgeführte Arbeit.

Die gewonnenen Daten zu allen vorhandenen Arrhythmien während des Beobachtungszeitraumes (abzüglich der zwei postoperativen Phasen von 48 Stunden Dauer) aller Versuchstiere konnten anschließend in Excel-Tabellen übertragen werden.

Weiterverarbeitet wurden die Daten schließlich in PRISM. Dort wurden zuletzt die weiteren graphischen sowie statistischen Einzeltier- und Gruppen-Auswertungen durchgeführt.

2.9.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad PRISM [Versionen 5.2 und 6.0, GraphPad Software, Inc.]. Statistische Signifikanz wurde als $p < 0,05$ definiert und mit dem unpaired t-Test und der zweifaktoriellen Varianzanalyse berechnet.

3. Ergebnisse

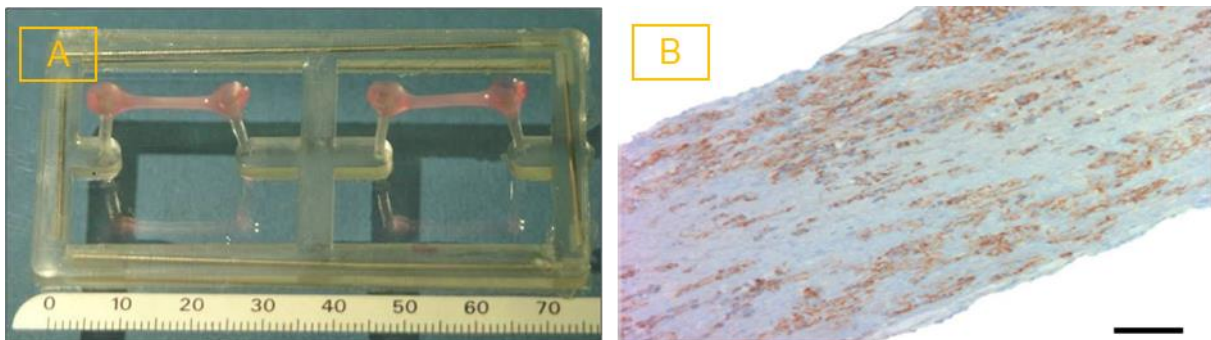
3.1 Differenzierung der hiPSC-KM/hiPSC-EC und Generation des hEHTs

Die Differenzierung der KM wurde mit dem hiPSC-Klon der Zelllinie C25 durchgeführt und erfolgte wie unter 2.2 beschrieben. Mehr als 65 % der differenzierten hiPSC-KM, die zur hEHT-Generation genutzt wurden, waren Troponin T- und α -Aktinin-positiv (65-95 % Reinheit). Die hiPSC-KM exprimierten die atriale Isoform der Myosin-Leichtkette (MLC2A) und nicht die ventrikuläre Isoform (MLC2V), welches ihre Unreife direkt nach der Differenzierung zeigte.

Die Differenzierung der EC wurde ebenfalls aus dem hiPSC-Klon der Zelllinie C25 durchgeführt und erfolgte wie unter 2.3 beschrieben.

Die hEHTs im 6-well-Format wurden wie unter 2.4 beschrieben generiert. 5×10^6 hiPSC-KM und 2×10^6 hiPSC-ECs bzw. HUVECs wurden pro hEHT verwendet. Das hEHT maß nach der Generation 18x3x3 mm (Abbildung 13A). Die hEHTs begannen nach 10-15 Tagen spontan mit einer Frequenz von durchschnittlich 60 Schlägen/Minute zu kontrahieren. Die Immunfluoreszenzfärbung von α -Aktinin (und Troponin T) zeigte eine regelhafte Querstreifung der KM. Die KM ordneten sich im hEHT entsprechend der mechanischen Belastung durch die Halterung, gegen die es auxotone Kontraktionen ausführte, an (Abbildung 13B-D).

Durchflusszytometrien der aus dem hEHT isolierten hiPSC-KM zeigten, dass >95 % der Zellen Troponin T-positiv waren und dass >95 % der Zellen die ventrikuläre Isoform der Myosin-Leichtkette (MLC2V) exprimierten, was darauf hindeutete, dass die hiPSC-KM im hEHT einen Reifungsprozess durchliefen.



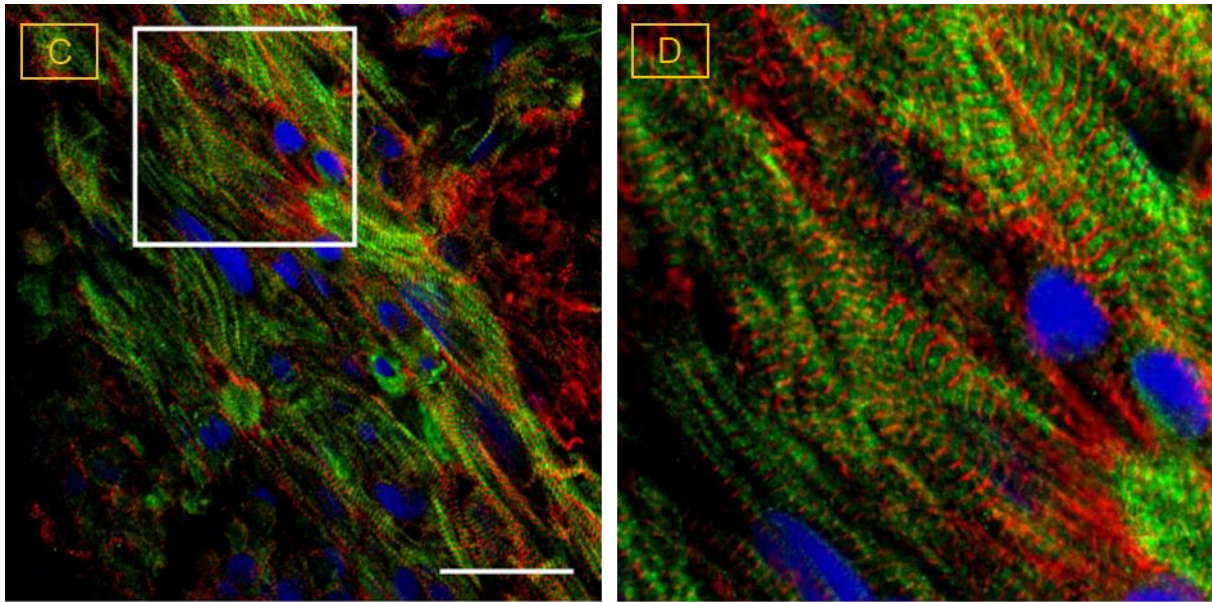


Abbildung 13: Generation und Charakterisierung der Zellen des hEHT.

A: Zwei 6-well-Format-hEHTs.

B: Immunhistochemische Färbung von Dystrophin eines Längsschnittes eines repräsentativen hEHTs nach dreiwöchiger Kultivierung. Maßstab: 100 μ m.

C: Immunhistochemische Färbung von α -Aktinin (grün) und MLC2V (rot). Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. Maßstab: 50 μ m.

D: Immunhistochemische Färbung von α -Aktinin (grün) und MLC2V (rot). Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. Ausschnitt von C in starker Vergrößerung.

3.2 Kryo-Verletzung und Transplantation der hEHTs bzw. des zellfreien Kontroll-Konstrukts

Die Kryo-Verletzung des linken Ventrikels wurde wie unter 2.5 beschrieben induziert. Sechs bzw. sieben Tage nach der Verletzung des Herzens wurden zwei hEHTs bzw. ein zellfreies Kontroll-Konstrukt derselben Größe wie die zwei hEHTs auf die Meerschweinchen-Herzen transplantiert. Durchschnittlich 31 Tage nach der Transplantation wurden die Organe zur histologischen und immunhistochemischen Untersuchung entnommen.

In allen Herzen konnte in der immunhistochemischen Färbung von Dystrophin eine große transmurale Verletzung des linksventrikulären Myokards histologisch nachgewiesen werden (Abbildung 14A). Die Größe der induzierten Infarkte war mit $16,9 \pm 0,1$ % des linken Ventrikels in der Gruppe der Versuchstiere mit hEHT und mit $13,9 \pm 0,1$ % des linken Ventrikels in der Gruppe der Versuchstiere mit zellfreiem Kontroll-Konstrukt ähnlich.

Ebenfalls in der immunhistochemischen Färbung von Dystrophin waren in der Narbenregion des Infarkts bei den Versuchstieren der Gruppe mit hEHT große Bereiche mit Muskelgewebe

sichtbar (Abbildung 14A und 14B). In der Gruppe der Versuchstiere, die nur zellfreie Kontroll-Konstrukte erhielten, waren solche Gewebeinseln aus Muskulatur in der Narbe hingegen nicht detektierbar. Diese Beobachtung ließ vermuten, dass diese Muskelgewebereiche innerhalb der Narbenregion sehr wahrscheinlich auf eine Remuskularisierung durch das hEHT zurückzuführen waren und somit humanen Ursprungs sein mussten. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde eine immunhistochemische Färbung des humanspezifischen Markers Ku80 durchgeführt. Wie erwartet, ließen sich ausschließlich die Zellkerne der KM, die sich in den Bereichen muskulären Gewebes in der Narbenregion befanden, anfärben, was ihren humanen Ursprung und somit eine zumindest partielle Remuskularisierung des Herzens durch das hEHT bewies (Abbildung 14C).

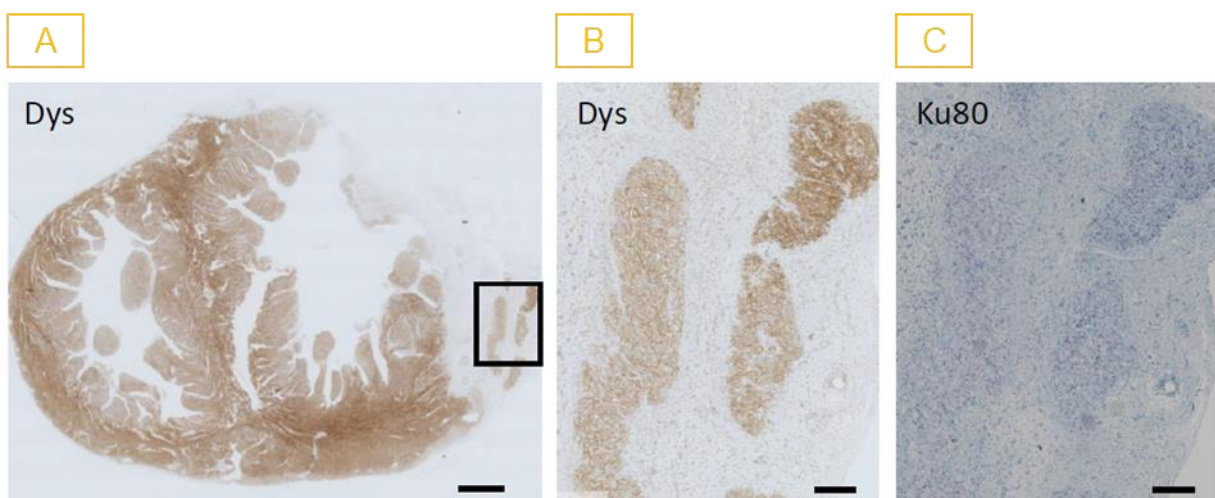


Abbildung 14: Immunhistochemische Untersuchungen der explantierten Herzen mit hEHTs (Verändert nach Pecha et al. 2019).

A: Immunhistochemische Färbung von Dystrophin, repräsentativer Transversalschnitt eines Meerschweinchen-Herzens 28 Tage nach hEHT-Transplantation. Maßstab: 1 mm.

B: Immunhistochemische Färbung von Dystrophin im korrespondierenden Bereich der hEHTs aus A. Maßstab: 200 μ m.

C: Immunhistochemische Färbung von humanem Ku80 im korrespondierenden Bereich der hEHTs aus A. Maßstab: 200 μ m.

Die KM in den mit den Herzen explantierten hEHTs zeigten in der Immunhistochemie ein regelhaftes Färbeverhalten der Sarkomere bzw. von MLC2V, während MLC2A in den KM nur noch wenig vorhanden war. Dies zeigte eine reife ventrikuläre Subtyp-Differenzierung der KM des hEHTs.

3.3 Echokardiographie

Die Echokardiographie wurde vor der ersten (Tag 0) und vor der zweiten (Tag 6 bzw. 7) OP-Prozedur durchgeführt. Sie diente dazu, die Infarktgröße über die Verschlechterung der linksventrikulären Pumpfunktion und über die Größe des linken Ventrikels vor Transplantation von hEHTs bzw. zellfreiem Kontroll-Konstrukt zu bestimmen.

Im Vergleich zur Ausgangssituation an Tag 0 vor Induktion der Kryo-Verletzung, war die FAC an Tag 6 bzw. 7 vor Transplantation von hEHTs bzw. zellfreiem Kontroll-Konstrukt in beiden Gruppen signifikant reduziert (Abbildung 15A). Die LVIDd hingegen veränderte sich in beiden Gruppen trotz Verletzung des linken Ventrikels von Tag 0 bis Tag 6 bzw. 7 nicht signifikant (Abbildung 15B).

Vor der Transplantation von hEHTs bzw. zellfreiem Kontroll-Konstrukt zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied bei dem Vergleich von FAC und LVIDd zwischen den beiden Versuchsgruppen, sodass davon auszugehen war, dass alle Versuchstiere eine vergleichbar starke Verletzung des Herzens und somit Einschränkung der linksventrikulären Pumpfunktion erlitten (Abbildung 15A-B). Dies stand im Einklang mit den späteren Bestimmungen der Infarktgrößen nach Organentnahme und Anfertigung der histologischen Schnitte.



Abbildung 15: Echokardiographie.

A: FAC in Gruppe mit 2 hEHTs/Gruppe mit zellfreiem Kontroll-Konstrukt vor Infarkt-Induktion (Tag 0) sowie vor Transplantation von 2 hEHTs/zellfreiem Kontroll-Konstrukt (Tag 6 bzw. 7). *P<0,05, **P<0,01 (Unpaired t-Test, Mittelwert±SD).

B: LVIDd in Gruppe mit 2 hEHTs/Gruppe mit zellfreiem Kontroll-Konstrukt vor Infarkt-Induktion (Tag 0) sowie vor Transplantation von 2 hEHTs/zellfreiem Kontroll-Konstrukt (Tag 6 bzw. 7). *P<0,05 (Unpaired t-Test, Mittelwert±SD).

3.4 Parameter-/EKG-Analyse und statistische Auswertung

Die Parameter- und EKG-Analyse wurde unter Verblindung gegenüber der zufälligen Gruppeneinteilung wie unter 2.9 beschrieben vorgenommen.

3.4.1 Körpertemperatur

Die Messung und Untersuchung der Körpertemperatur diente der Überprüfung des allgemeinen Gesundheitszustands der Versuchstiere.

Die durchschnittlichen Körpertemperaturen inkl. Standardabweichung über den Beobachtungszeitraum beider Gruppen waren für die Gruppe mit zellfreiem Kontroll-Konstrukt $38,3 \pm 0,1$ °C und für die Gruppe mit hEHT $38,6 \pm 0,1$ °C. Beim Vergleich zwischen den beiden Gruppen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der durchschnittlichen Körpertemperatur über den Beobachtungszeitraum bei einem p-Wert von 0,086 (Abbildung 16). Es ließ sich also für beide Gruppen schlussfolgern, dass die Versuchstiere über den Beobachtungszeitraum einen ähnlichen gesundheitlichen Allgemeinzustand aufwiesen und somit hinsichtlich des Risikos für das Auftreten von Herzrhythmusstörungen (durch erhöhte Körpertemperaturen bzw. Infektionen auslösbar) miteinander vergleichbar waren.

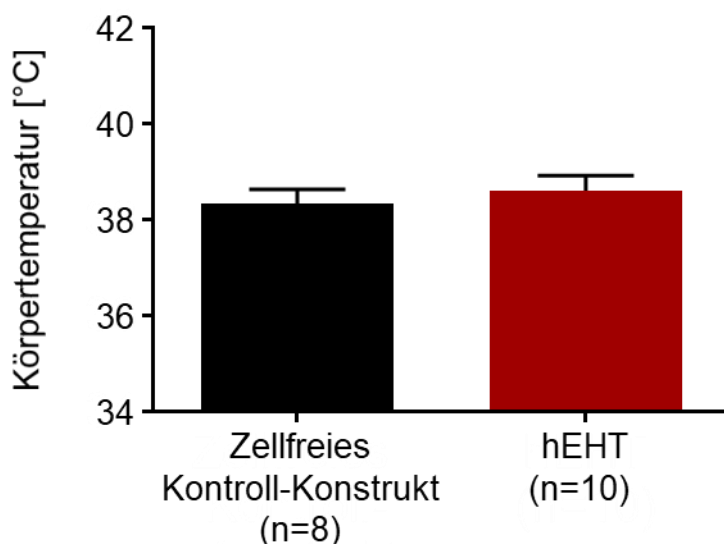


Abbildung 16: Durchschnittliche Körpertemperatur über den Beobachtungszeitraum beider Gruppen, zellfreies Kontroll-Konstrukt (n=8), hEHT (n=10), *p<0,05 (Unpaired t-Test, Mittelwert±SD).

Exemplarisch sind hier zwei Verläufe der Körpertemperatur über die Beobachtungszeit, jeweils von einem Versuchstier aus jeder Gruppe (Versuchstier 1: Zellfreies Kontroll-Konstrukt, Versuchstier 18: hEHT), abgebildet (Abbildungen 17 und 18). Für detaillierte Daten, d.h. für Werte zu jedem einzelnen Versuchstier, ist auf Zusatztabelle 1, Anhang, zu verweisen.

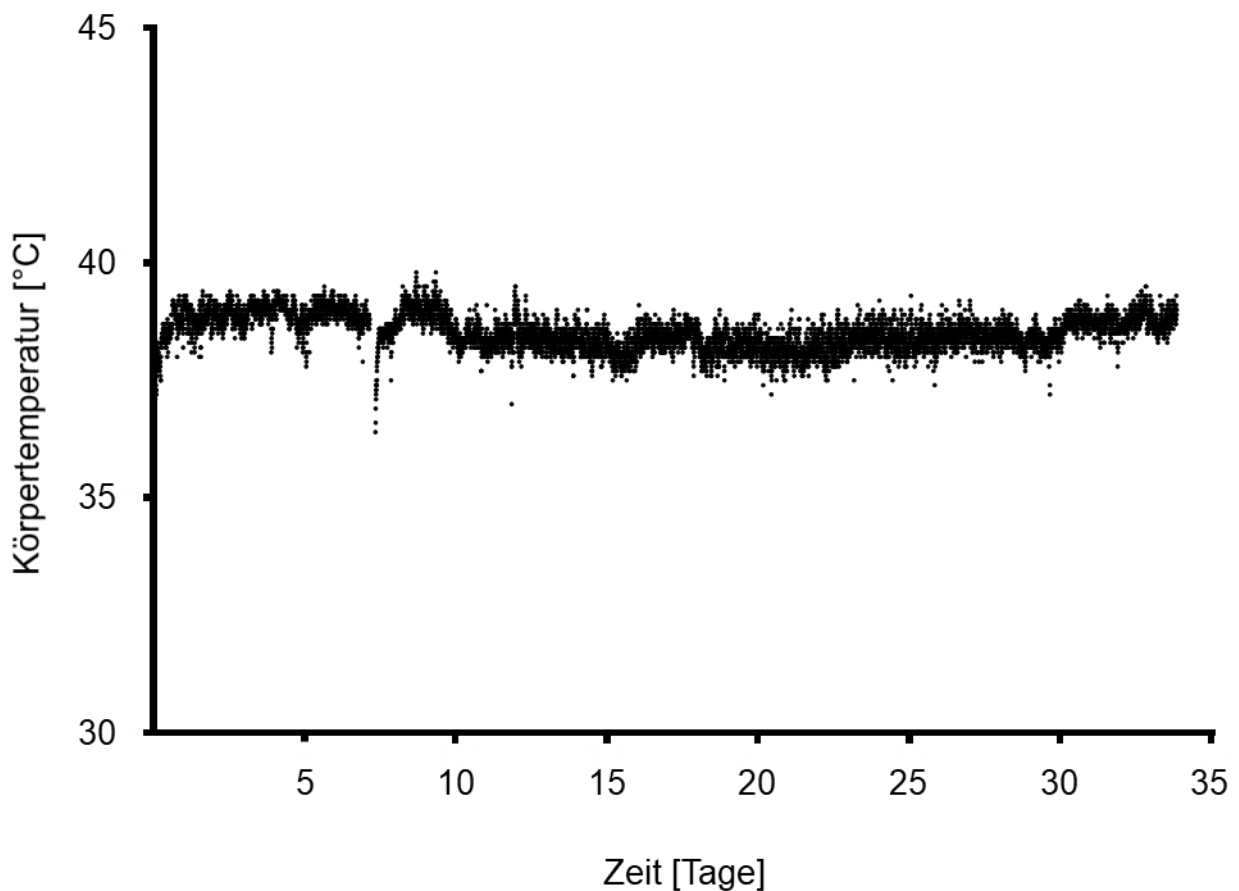


Abbildung 17: Verlauf der Körpertemperatur über die Beobachtungszeit von Versuchstier 1, zellfreies Kontroll-Konstrukt, durchschnittliche Körpertemperatur über die Beobachtungszeit: 38,5 °C (Minimum: 33,8 °C, Maximum: 39,8 °C). Insgesamt 9670 Datenpunkte.

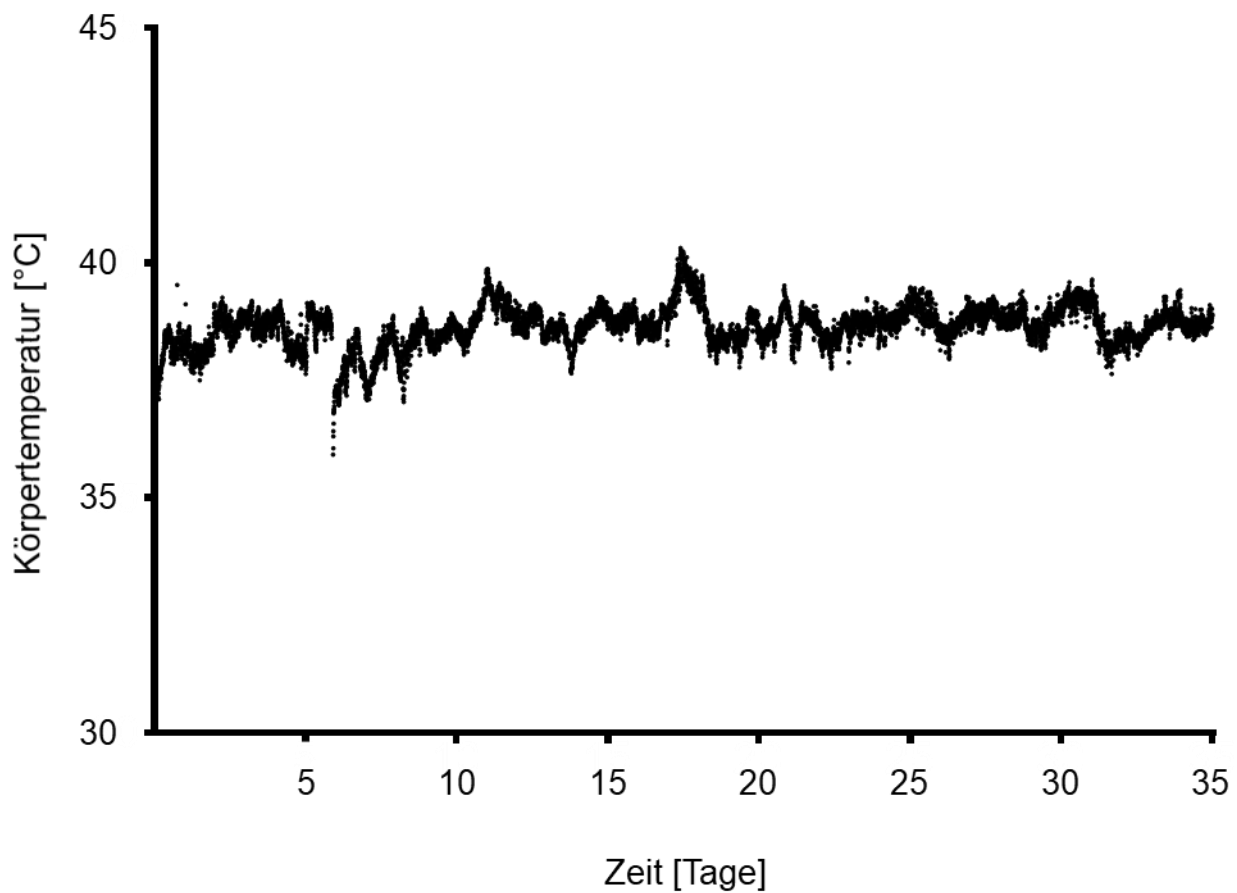


Abbildung 18: Verlauf der Körpertemperatur über die Beobachtungszeit von Versuchstier 18, hEHT, durchschnittliche Körpertemperatur über die Beobachtungszeit: 38,6 °C (Minimum: 35,2 °C, Maximum: 40,3 °C). Insgesamt 10027 Datenpunkte.

3.4.2 Physische Aktivität

Die Messung und Untersuchung der physischen Aktivität diente ebenfalls der Überprüfung des allgemeinen Gesundheitszustands der Versuchstiere.

Die durchschnittliche physische Aktivität beider Gruppen inkl. Standardabweichung über den Beobachtungszeitraum war für die Gruppe mit zellfreiem Kontroll-Konstrukt $2,8 \pm 0,3$ und für die Gruppe mit hEHT $3,5 \pm 0,5$. Beim Vergleich beider Gruppen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der durchschnittlichen physischen Aktivität über den Beobachtungszeitraum bei einem p-Wert von 0,232 (Abbildung 19). Keines der Versuchstiere wies in der Beobachtungszeit über einen längeren Zeitraum ungewöhnlich hohe oder niedrige Werte der physischen Aktivität auf. Dies deutete ebenfalls darauf hin, dass sich alle Versuchstiere über die Beobachtungszeit trotz der OP-Prozeduren und der Verletzung des Herzens in einem guten körperlichen Zustand befanden und in der Lage waren, sich frei im

Käfig zu bewegen. Die Tiere ließen sich somit auch diesbezüglich hinsichtlich des Auftretens von Herzrhythmusstörungen miteinander vergleichen.

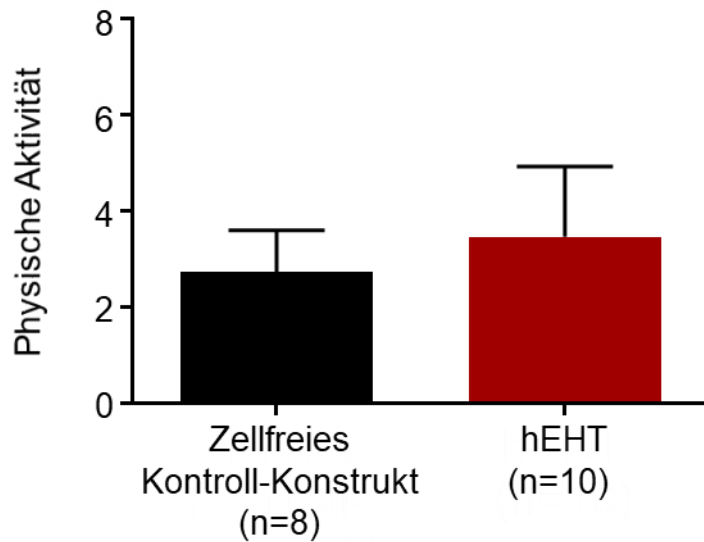


Abbildung 19: Durchschnittliche physische Aktivität über den Beobachtungszeitraum beider Gruppen, zellfreies Kontroll-Konstrukt (n=8), hEHT (n=10), *p<0,05 (Unpaired t-Test, Mittelwert±SD).

Erneut sind hier exemplarisch zwei Diagramme, die die physische Aktivität während der Beobachtungszeit, jeweils von einem Versuchstier aus jeder Gruppe (Versuchstier 10: Zellfreies Kontroll-Konstrukt, Versuchstier 16: hEHT) abbilden, dargestellt (Abbildungen 20 und 21). Für detaillierte Daten, d.h. für Werte zu jedem einzelnen Versuchstier, ist auf Zusatztable 1, Anhang, zu verweisen.

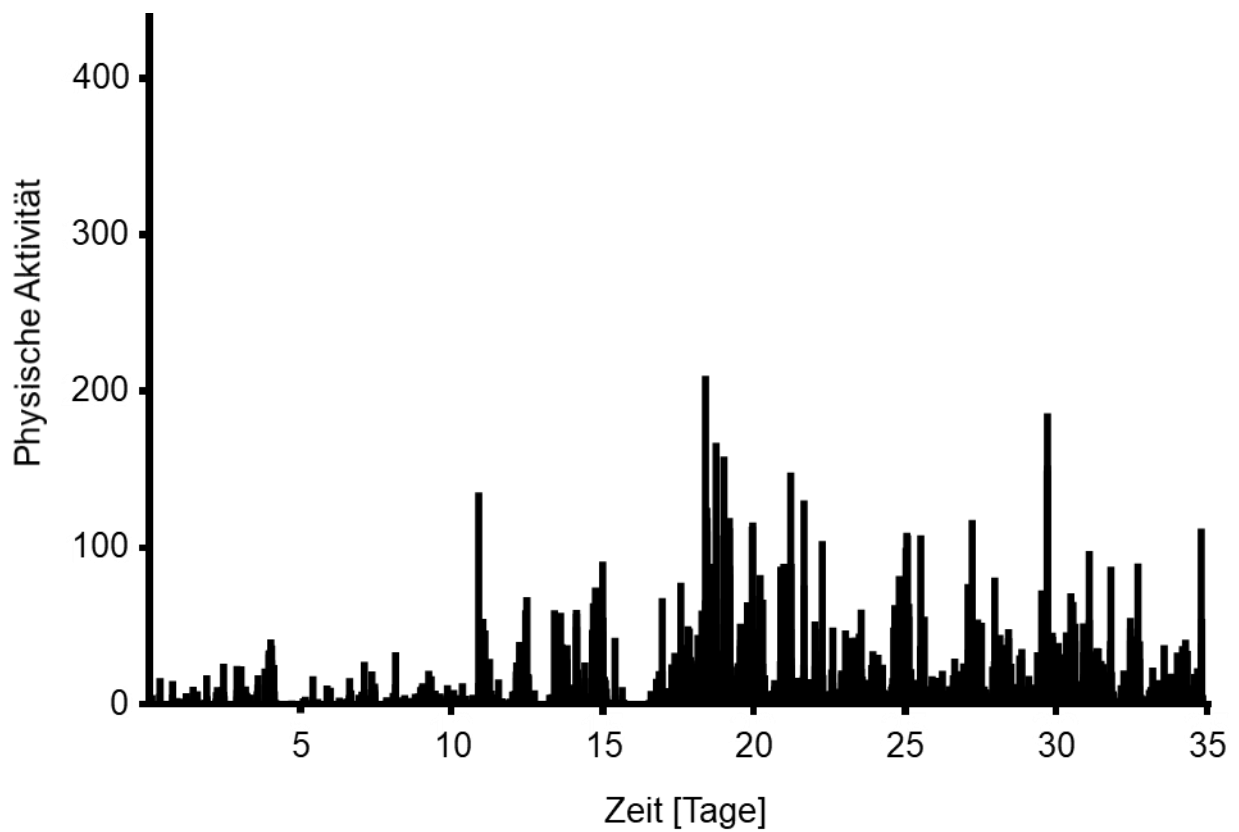


Abbildung 20: Werte der physischen Aktivität über die Beobachtungszeit von Versuchstier 10, zellfreies Kontroll-Konstrukt, durchschnittliche physische Aktivität über die Beobachtungszeit: 3,3 (Minimum: 0,0, Maximum: 210,0). Insgesamt 9731 Datenpunkte.

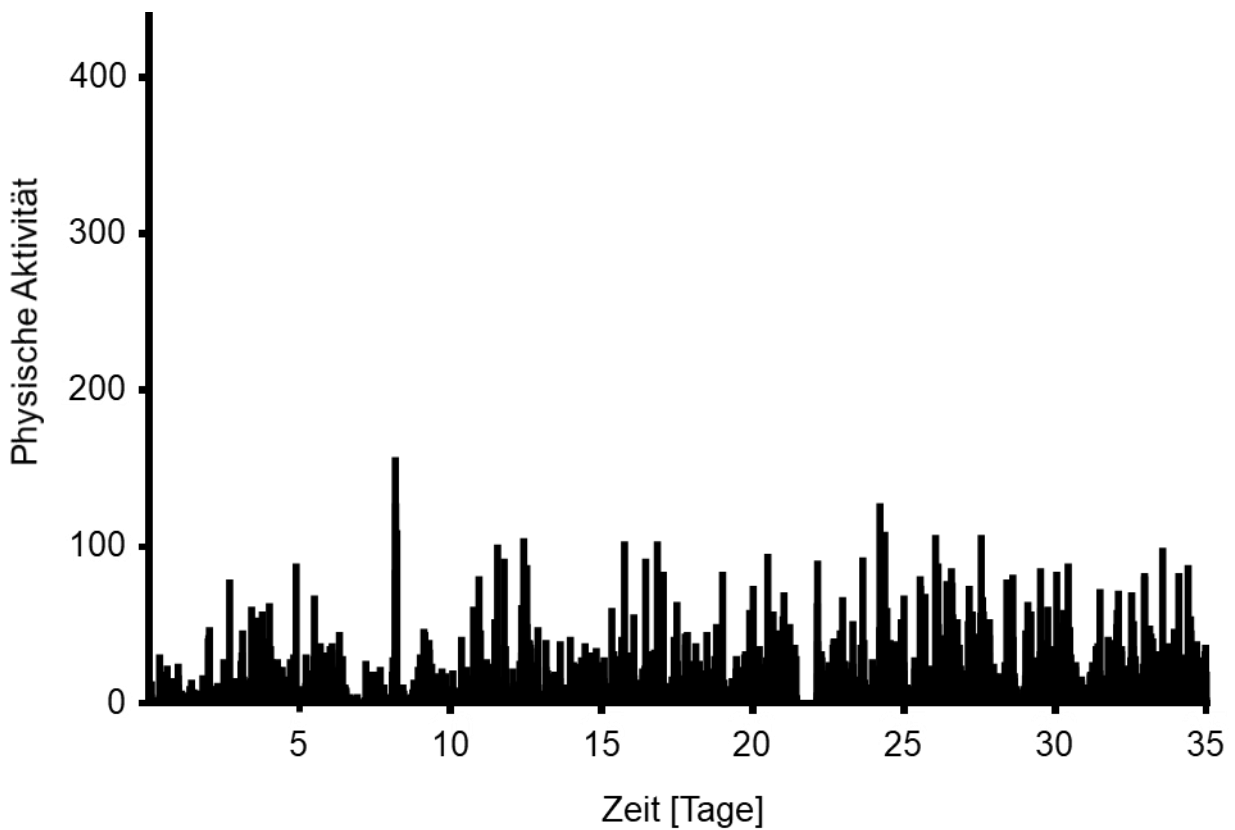


Abbildung 21: Werte der physischen Aktivität über die Beobachtungszeit von Versuchstier 16, hEHT, durchschnittliche physische Aktivität über die Beobachtungszeit: 4,3 (Minimum: 0,0, Maximum: 157,0). Insgesamt 9835 Datenpunkte.

Zusätzlich wurden Histogramme, also Häufigkeitsverteilungen, der physischen Aktivität angefertigt. Exemplarisch abgebildet ist erneut jeweils ein Histogramm zu einem Versuchstier aus jeder Gruppe (Versuchstier 10: Zellfreies Kontroll-Konstrukt, Versuchstier 16: hEHT). Wie bei beiden Versuchstieren zu erkennen ist, sind niedrige Werte der physischen Aktivität deutlich häufiger gemessen worden als hohe Werte. Die Versuchstiere befanden sich dementsprechend meist in einem ruhenden, sitzenden bzw. liegenden Zustand, liefen jedoch auch einen Teil der Beobachtungszeit in ihren Käfigen umher (Abbildungen 22 und 23).

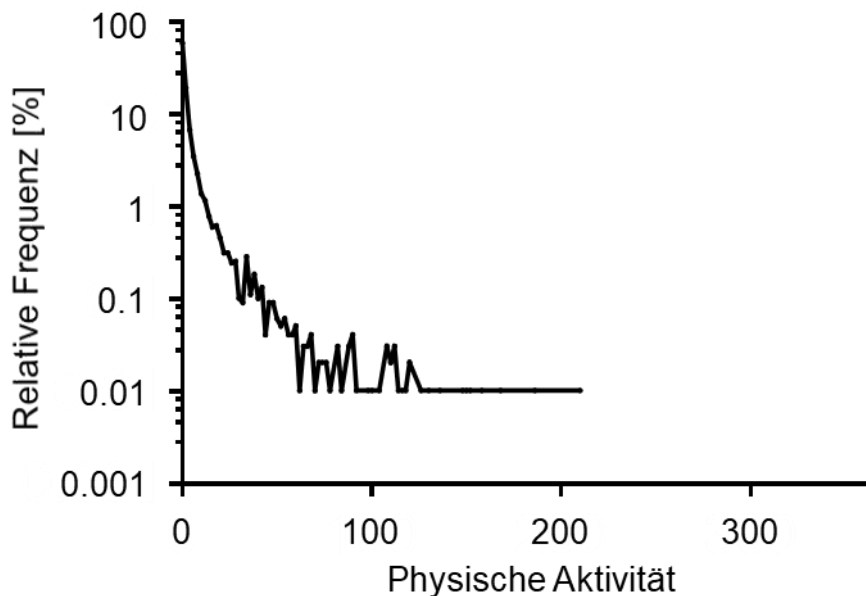


Abbildung 22: Histogramm, Versuchstier 10, zellfreies Kontroll-Konstrukt, physische Aktivität.

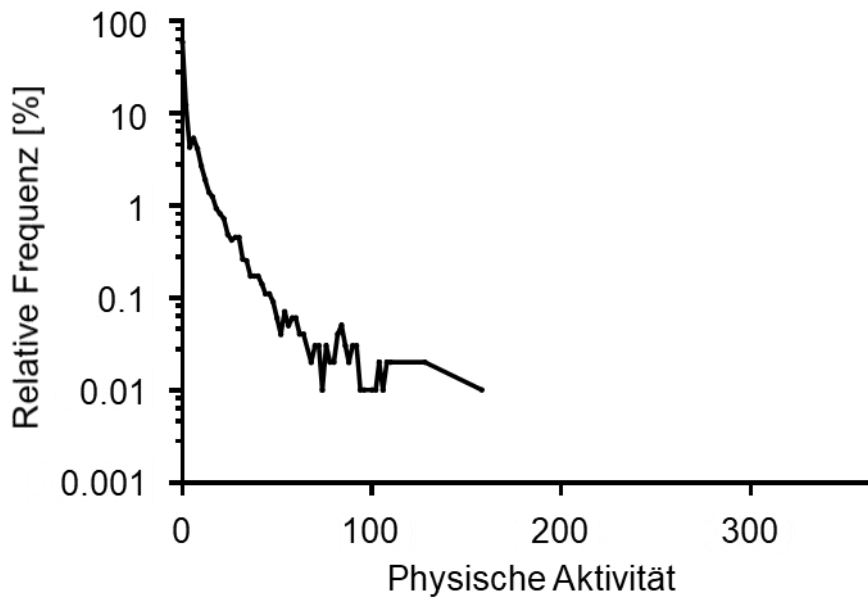


Abbildung 23: Histogramm, Versuchstier 16, hEHT, physische Aktivität.

Dasselbe ist auch in dem Histogramm zu erkennen, in welchem die physische Aktivität für beide Gruppen vergleichend dargestellt ist. Die Versuchstiere beider Gruppen waren über die Beobachtungszeit ähnlich aktiv (Abbildung 24).

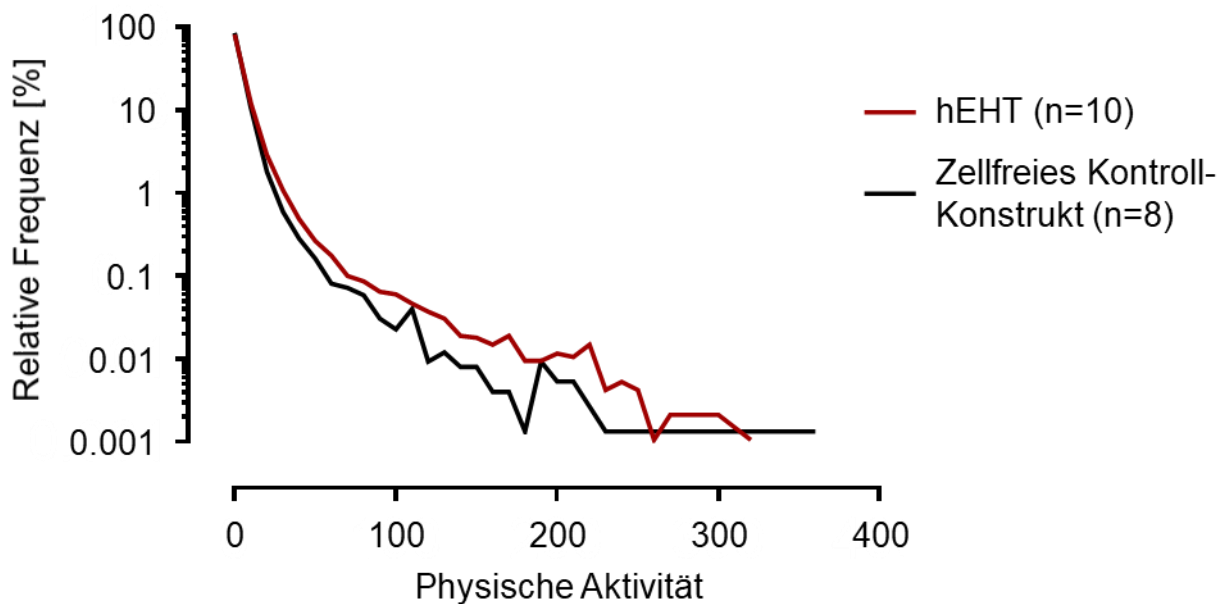


Abbildung 24: Gruppen-Histogramm physische Aktivität.

3.4.3 EKG-Wellenform: Herzfrequenz

Auch die Messung und Untersuchung der Herzfrequenz diente der Überprüfung des allgemeinen Gesundheitszustands der Versuchstiere. Außerdem lieferte die Herzfrequenz

übergreifende Informationen über den Status des kardiovaskulären Systems der Versuchstiere.

Die durchschnittliche Herzfrequenz beider Gruppen inkl. Standardabweichung über den Beobachtungszeitraum war für die Gruppe mit zellfreiem Kontroll-Konstrukt 285 ± 5 Schläge/Minute und für die Gruppe mit hEHT 295 ± 5 Schläge/Minute. Beim Vergleich beider Gruppen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der durchschnittlichen Herzfrequenz über den Beobachtungszeitraum festgestellt werden. Der p-Wert betrug 0,182 (Abbildung 25).

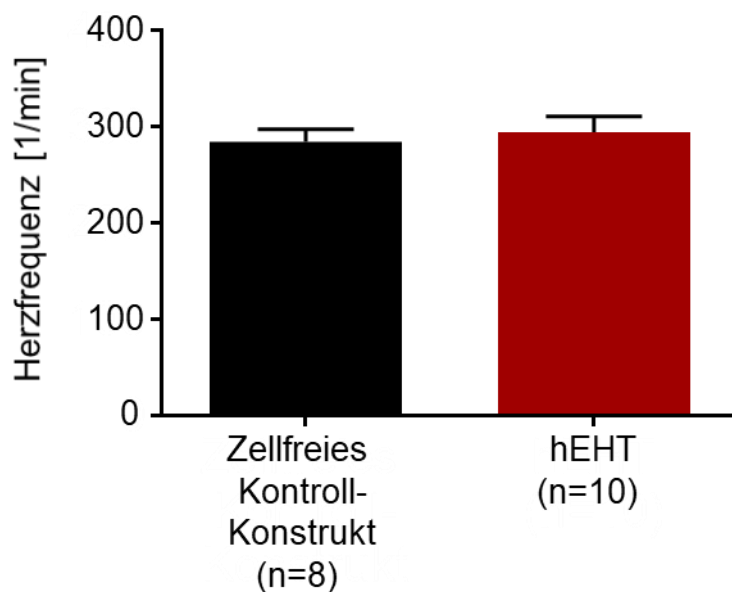


Abbildung 25: Durchschnittliche Herzfrequenz über den Beobachtungszeitraum beider Gruppen, zellfreies Kontroll-Konstrukt (n=8), hEHT (n=10), *p<0,05 (Unpaired t-Test, Mittelwert \pm SD).

Fast alle Versuchstiere zeigten bis auf vereinzelte bradykarde Werte über den gesamten Beobachtungszeitraum eine konstante Herzfrequenz, die um durchschnittlich 290 Schläge/Minute pendelte. Dies implizierte erneut, dass die Versuchstiere trotz der OPs einen guten Allgemeinzustand aufwiesen und dass sich ihr kardiovaskuläres System trotz der Infarkt-Induktion in einem stabilen Zustand befand und die Versuchstiere sich somit hinsichtlich des Auftretens von Herzrhythmusstörungen miteinander vergleichen ließen, was in Einklang mit den Ergebnissen der Parameter steht. Es zeigte sich bei manchen Versuchstieren eine Tendenz zu einer Erhöhung der Herzfrequenz im Zeitraum nach der Transplantations-OP, vermutlich durch postoperative Schmerzen ausgelöst.

Ausnahmen hiervon bildeten die Versuchstiere 17 und 25 (beide hEHT), die über längere Zeiträume Bradykardien aufwiesen, bei denen die Herzfrequenz z.T. deutlich unter Werte von 290 Schlägen/Minute fiel. Bei dem Versuchstier 25 war diese bradykarde Phase auf wenige

Tage nach der 2. OP-Prozedur beschränkt und ließ sich vermutlich auf eben diese zurückführen (z.B. ausgelöst durch die Wirkung der verwendeten Anästhetika). Bei Versuchstier 17 konnte über einen längeren Zeitraum von ca. 20 Tagen Dauer eine deutliche Erniedrigung der Herzfrequenz beobachtet werden, die jedoch kurz vor Ende der Beobachtungszeit zu normalen Werten zurückkehrte und keine letalen Folgen für das Versuchstier hatte. Für Daten zu diesen beiden Versuchstieren s. Zusatztabelle 1, Anhang.

Wieder sind hier beispielhaft zwei Diagramme abgebildet (Abbildungen 26 und 27), die den Verlauf der Herzfrequenz während der Beobachtungszeit von jeweils einem Versuchstier aus beiden Gruppen darstellen (Versuchstier 9: Zellfreies Kontroll-Konstrukt, Versuchstier 20: hEHT). Für detaillierte Daten, d.h. für Werte zu jedem einzelnen Versuchstier, ist auf Zusatztabelle 1, Anhang, zu verweisen.

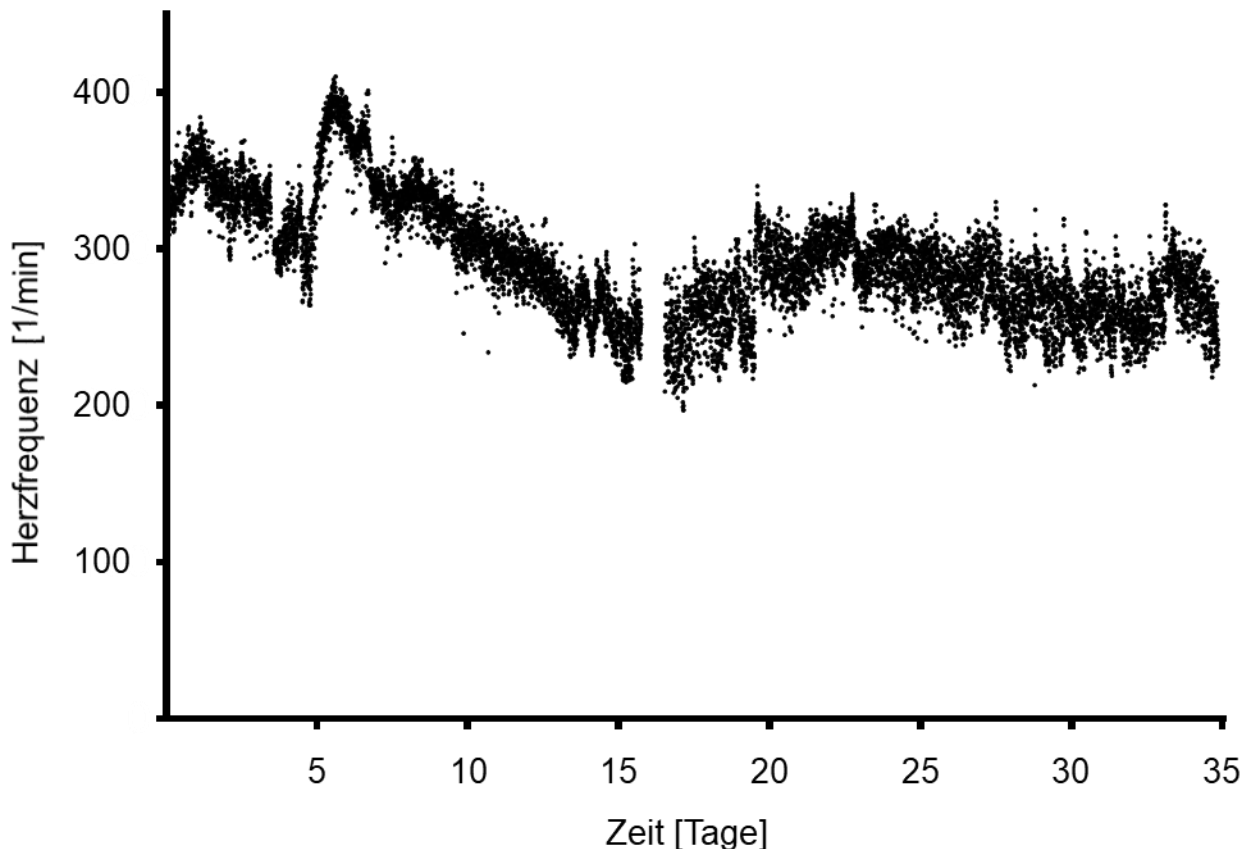


Abbildung 26: Werte der Herzfrequenz über die Beobachtungszeit von Versuchstier 9, zellfreies Kontroll-Konstrukt, durchschnittliche Herzfrequenz über die Beobachtungszeit: 292 (Minimum: 197, Maximum: 410). Insgesamt 9740 Datenpunkte.

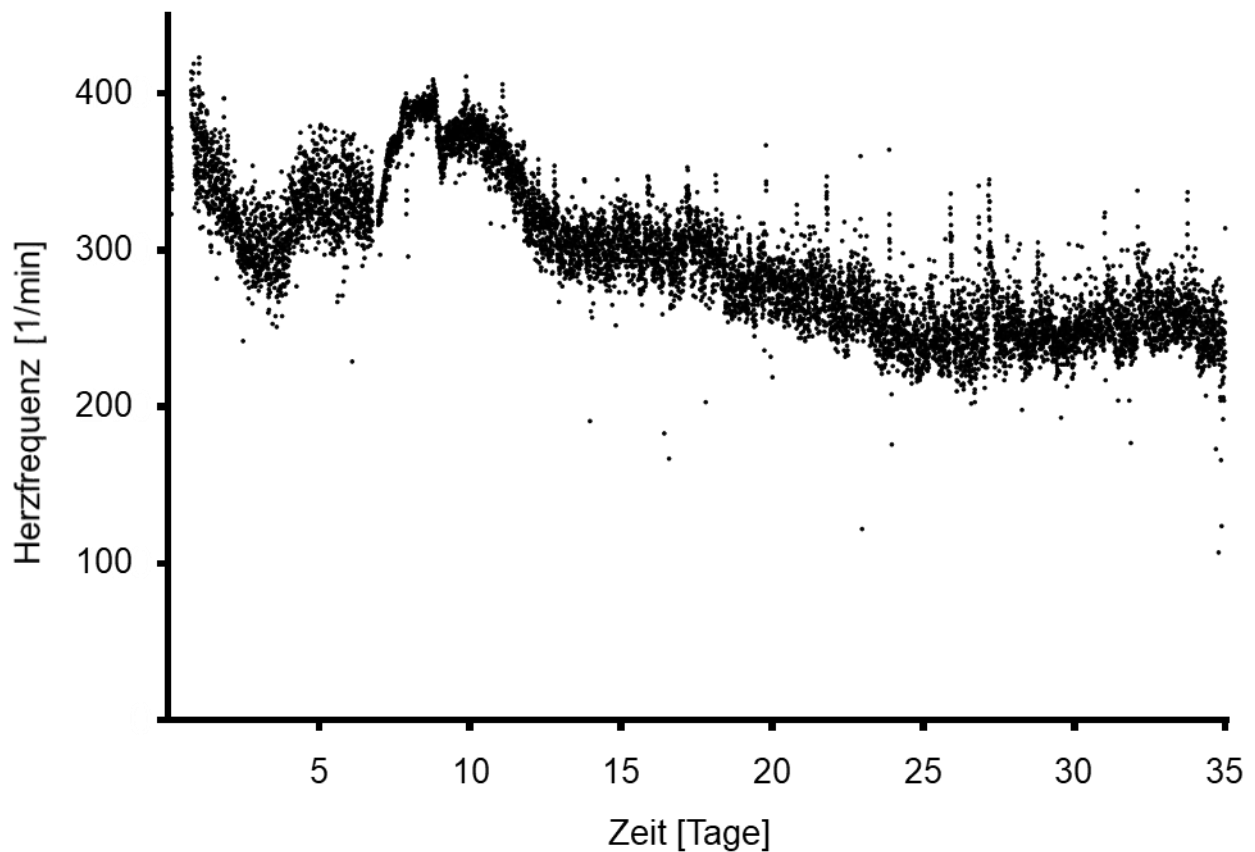


Abbildung 27: Werte der Herzfrequenz über die Beobachtungszeit von Versuchstier 20, hEHT, durchschnittliche Herzfrequenz über die Beobachtungszeit: 295 (Minimum: 107, Maximum: 423). Insgesamt 9797 Datenpunkte.

Es wurden Histogramme, also Häufigkeitsverteilungen, der Herzfrequenz angefertigt. Ebenfalls hier gezeigt sind die Histogramme der Versuchstiere 9 und 20, die die Häufigkeitsverteilung der aufgetretenen Herzfrequenzen repräsentieren (Abbildungen 28 und 29). Zu erkennen ist, dass die Werte der Herzfrequenz beider Tiere nahezu gleichverteilt um die durchschnittliche Frequenz von 290 Schlägen/Minute pendelten. Sehr hohe und niedrige Werte kamen dementsprechend selten vor.

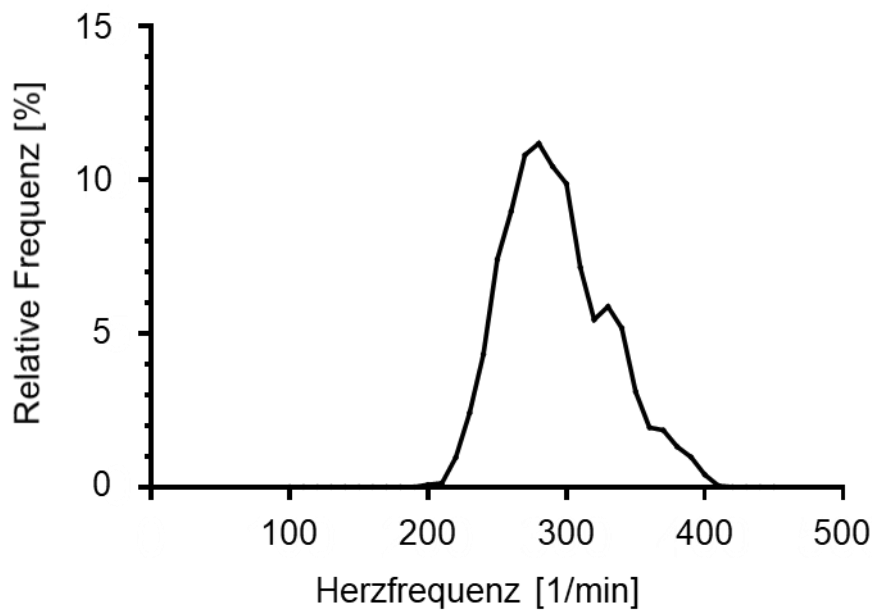


Abbildung 28: Histogramm, Versuchstier 9, zellfreies Kontroll-Konstrukt, Herzfrequenz.

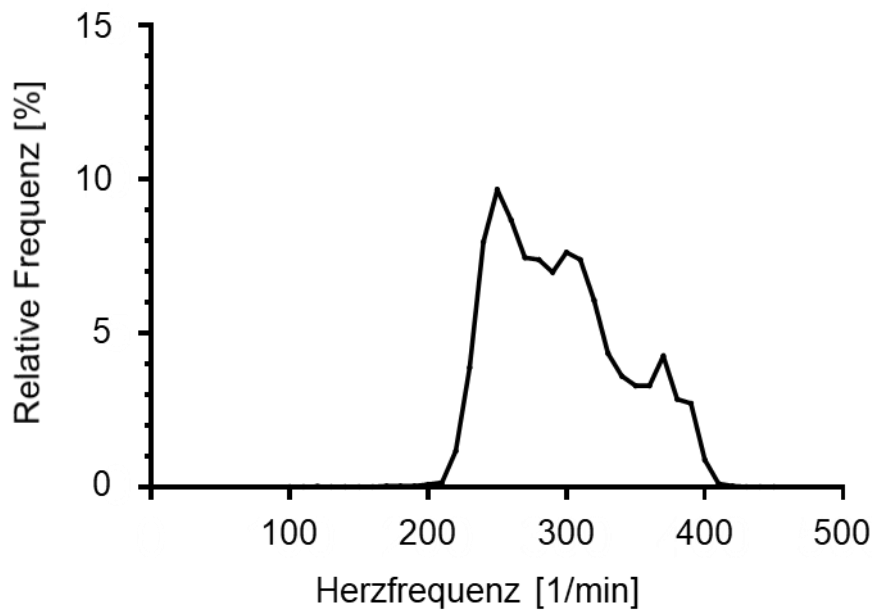


Abbildung 29: Histogramm, Versuchstier 20, hEHT, Herzfrequenz.

3.4.4 EKG-Wellenform: Arrhythmien

Um zu untersuchen, ob die Transplantation der hEHTs auf die infarzierten Herzen der Meerschweinchen zu einem vermehrten Auftreten von ventrikulären Arrhythmien führte, wurden die aufgezeichneten EKGs auf das Vorhandensein von Herzrhythmusstörungen hin analysiert. Ebenso wurde mit den EKGs der Versuchstiere, die als Negativkontrolle zellfreie Kontroll-Konstrukte erhielten, verfahren. Anschließend konnten die Ergebnisse beider Gruppen verglichen werden.

Die vorhandenen EKGs aller eingeschlossenen Versuchstiere ($n_{\text{Gesamt}}=18$, $n_{\text{hEHT}}=10$, $n_{\text{Zellfreies Kontroll-Konstrukt}}=8$) konnten über den gesamten aufgezeichneten Zeitraum analysiert werden.

Bei der Analyse der EKGs zeigten sich in diesen neben einem Sinusrhythmus (der in seiner Morphologie dem des Menschen sehr ähnlich ist; Abbildung 30A) verschiedene Subtypen ventrikulärer Herzrhythmusstörungen (Abbildung 30B-D). Es konnte das Auftreten von ventrikulären Extrasystolen (Premature Ventricular Contraction, PVC), Couplets und Triplets (konsekutive PVCs) sowie nicht-anhaltenden ventrikulären Tachykardien (Non-sustained Ventricular Tachycardia, Non-sus VT) beobachtet werden.

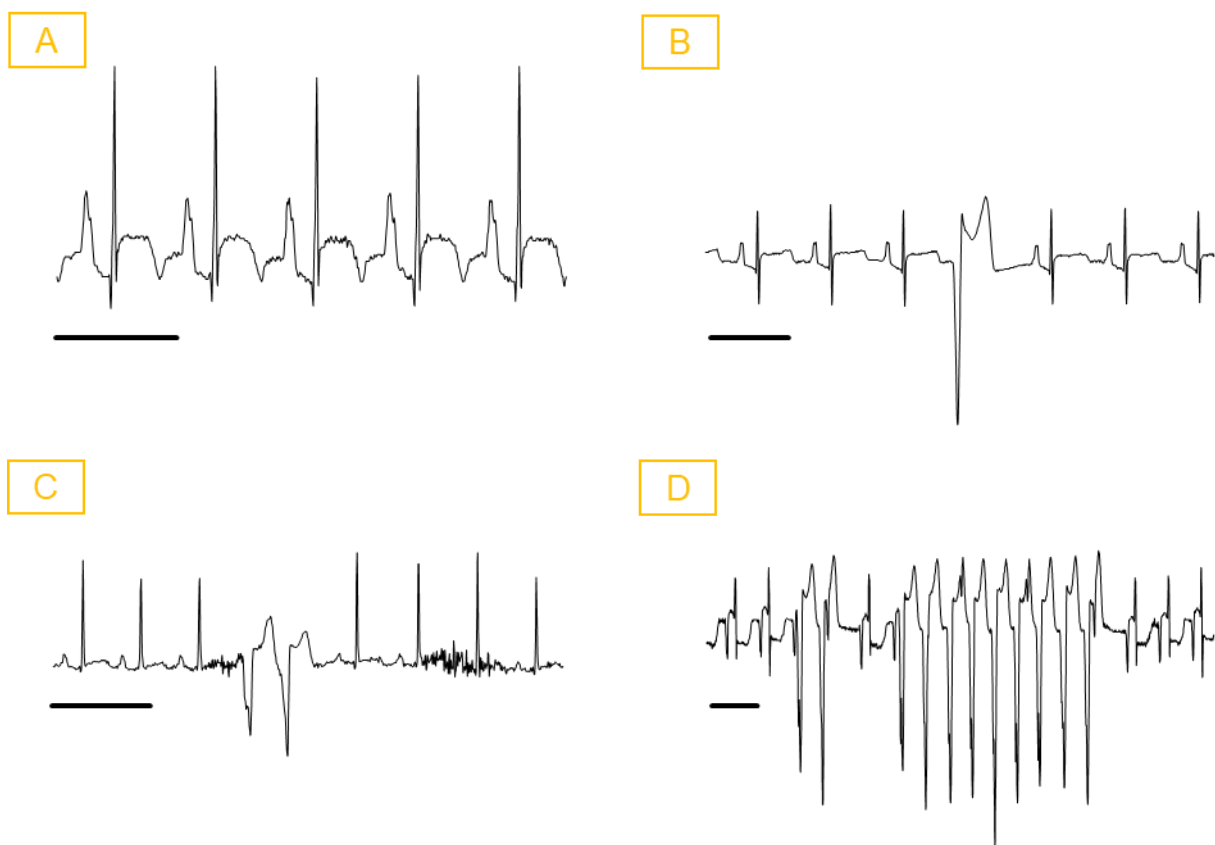


Abbildung 30: Sinusrhythmus und Beispiele ventrikulärer Herzrhythmusstörungen im Meerschweinchen-EKG, exemplarische Ausschnitte (Verändert nach Pecha et al. 2019).

A: Sinusrhythmus. Maßstab: 250 ms.

B: PVC. Maßstab: 250 ms.

C: Couplet. Maßstab: 250 ms.

D: Non-sus VT. Maßstab: 250 ms.

Anhaltende ventrikuläre Tachykardien (Sustained Ventricular Tachycardia, Sus VT) konnten lediglich bei zwei Versuchstieren (Versuchstiere 3 und 12) jeweils einmal detektiert werden.

Dies allerdings im Analyse-Zeitfenster 1, also vor Transplantation von hEHT bzw. zellfreiem Kontroll-Konstrukt. Das Auftreten von Kammerflimmern (Ventricular Fibrillation, VF) konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 36).

Bei allen Versuchstieren konnte im Analyse-Zeitfenster 2 das Auftreten von PVCs detektiert werden, während die anderen Subtypen von Arrhythmien nur bei einem prozentualen Anteil der Tiere der jeweiligen Gruppe im Analyse-Zeitfenster 2 aufgezeichnet werden konnten (Tiere mit jeweiliger Arrhythmie aus der Gruppe mit hEHT bzw. zellfreiem Kontroll-Konstrukt: PVC 8/8 bzw. 10/10, Couplets/Triplets 7/8 bzw. 7/10, Non-sus VT 6/8 bzw. 5/10; Abbildung 31).

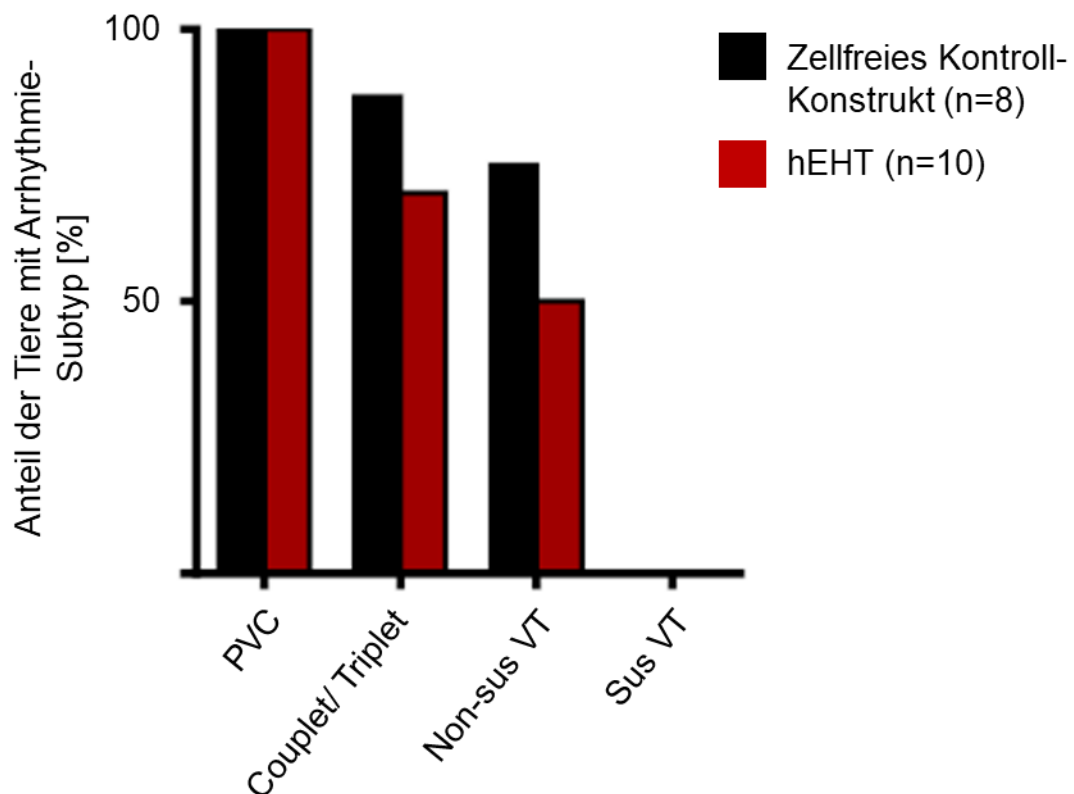


Abbildung 31: Prozentualer Anteil der Versuchstiere der jeweiligen Gruppe mit dem Auftreten der verschiedenen Arrhythmie-Subtypen in Analyse-Zeitfenster 2.

Neben den in der Auswertung einbezogenen ventrikulären Herzrhythmusstörungen zeigten sich bei den Versuchstieren ebenfalls supraventrikuläre Arrhythmien, d.h. Störungen des Herzrhythmus, die ihren Ursprung nicht im Ventrikel, sondern im Vorhof hatten. Dazu gehörten Vorhoffarrhythmien wie der atrioventrikuläre Block (AV-Block), der sinuatriale Block (SA-Block) und supraventrikuläre Extrasystolen. Das Auftreten dieser Rhythmusstörungen wurde zwar bei der Analyse vermerkt und die jeweiligen Stellen im EKG gekennzeichnet, in die Auswertung wurden sie jedoch nicht einbezogen, da hier der Fokus auf lebensbedrohliche ventrikuläre Arrhythmien gesetzt wurde.

Die insgesamt hohe Zahl an Arrhythmien nach Infarkt-Induktion ließ auf deren Erfolg und eine Erhöhung des Risikos für Herzrhythmusstörungen schließen, da in EKGs gesunder Meerschweinchen nur sehr selten Herzrhythmusstörungen zu beobachten sind (Shiba et al. 2012).

Für jeweils ein Versuchstier beider Gruppen (Versuchstier 32: zellfreies Kontroll-Konstrukt, Versuchstier 22: hEHT) sind hier exemplarisch die Zeitverläufe der absoluten Häufigkeit der verschiedenen Arrhythmie-Subtypen über die Beobachtungszeit abgebildet (Abbildungen 32 und 33). Hier war, wie bei allen Versuchstieren, zu erkennen, dass das Auftreten der Arrhythmien zufällig über den gesamten Beobachtungszeitraum zu detektieren war und es keine Häufung zu bestimmten Zeitpunkten gab.

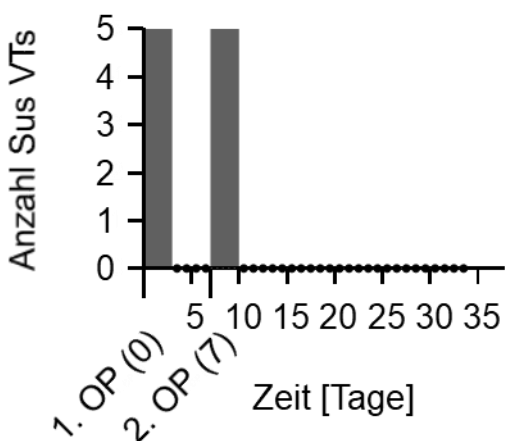
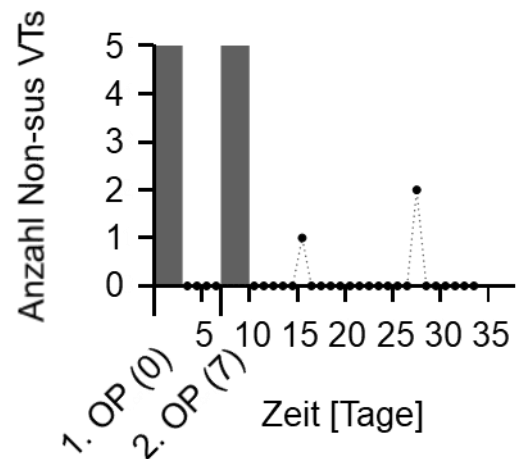
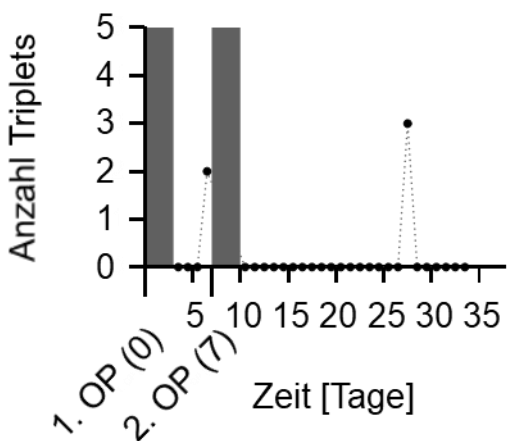
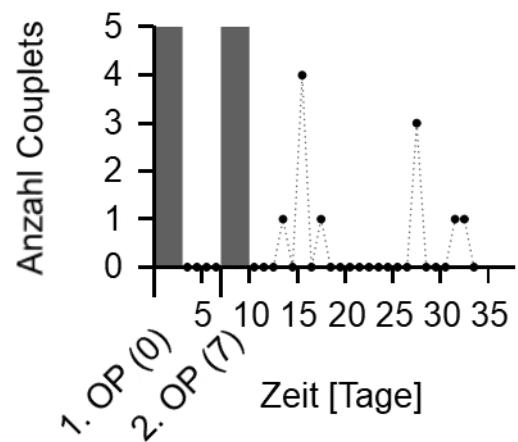
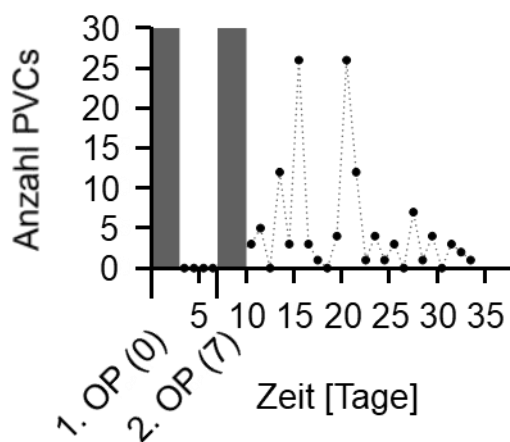


Abbildung 32: Zeitverlauf des Auftretens der verschiedenen Arrhythmie-Subtypen bei Versuchstier 32 (zellfreies Kontroll-Konstrukt) in Analyse-Zeitfenster 1 und 2 (grau hinterlegt sind die von der Auswertung ausgeschlossenen postoperativen Phasen von jeweils 48 Stunden Dauer).

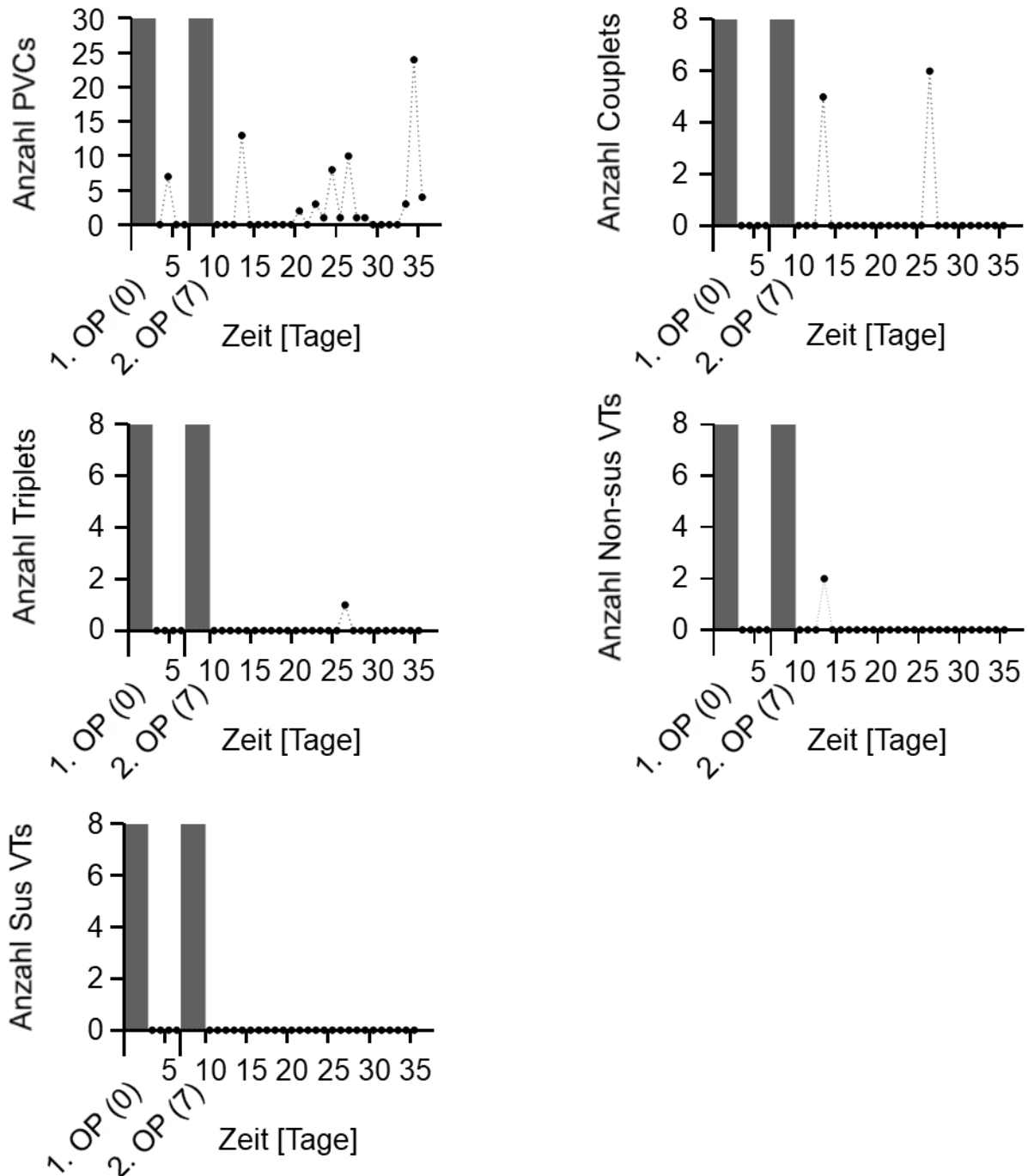


Abbildung 33: Zeitverlauf des Auftretens der verschiedenen Arrhythmie-Subtypen bei Versuchstier 22 (hEHT) in Analyse-Zeitfenster 1 und 2 (grau hinterlegt sind die von der Auswertung ausgeschlossenen postoperativen Phasen von jeweils 48 Stunden Dauer).

Für detaillierte Daten, d.h. für die genaue absolute Anzahl des Auftretens der Gesamtzahl aller Arrhythmien sowie der verschiedenen Arrhythmie-Subtypen absolut und pro 100 Minuten normiert, zu jedem einzelnen Versuchstier, ist auf Zusatztabelle 2, Anhang, zu verweisen.

Auch bei der Darstellung der absoluten Gesamtzahl aller Arrhythmien von allen Versuchstieren sowie des Medians der absoluten Gesamtzahl aller Arrhythmien der beiden Gruppen zeigte sich eine homogene Verteilung des Auftretens von Herzrhythmusstörungen über den gesamten Beobachtungszeitraum ohne Häufung von Arrhythmien in bestimmten Phasen der Beobachtungszeit (Abbildungen 34 und 35).

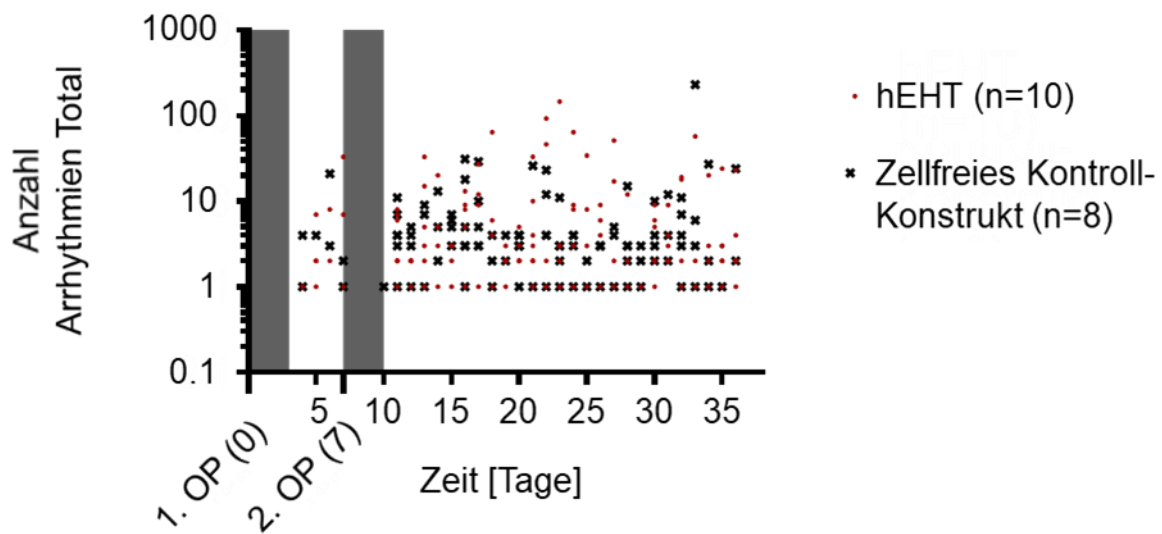


Abbildung 34: Zeitverlauf des Auftretens aller Arrhythmien bei allen Versuchstieren in Analyse-Zeitfenster 1 und 2 (grau hinterlegt sind die von der Auswertung ausgeschlossenen postoperativen Phasen von jeweils 48 Stunden Dauer).

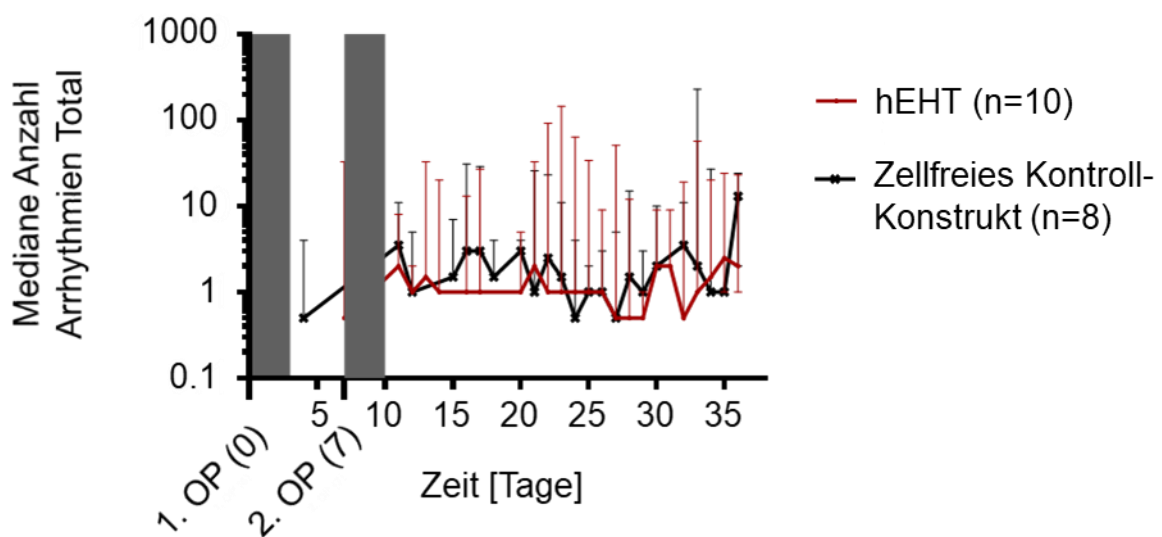
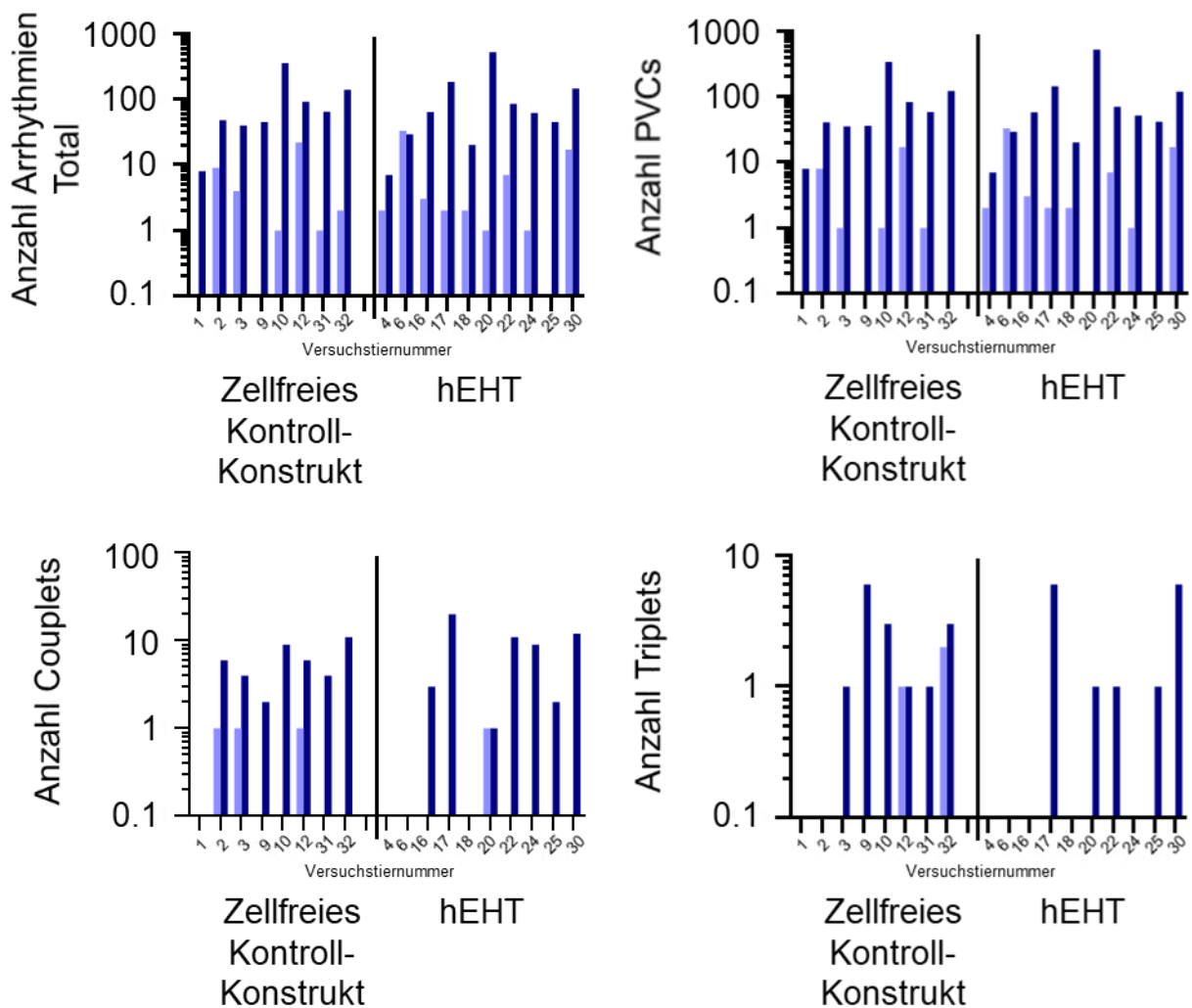


Abbildung 35: Zeitverlauf des Auftretens der medianen Anzahl aller Arrhythmien bei beiden Gruppen in Analyse-Zeitfenster 1 und 2 (grau hinterlegt sind die von der Auswertung ausgeschlossenen postoperativen Phasen von jeweils 48 Stunden Dauer).

Wie in der Abbildung 36 der absoluten Gesamtzahl aller Arrhythmien sowie der absoluten Häufigkeiten der verschiedenen Arrhythmie-Subtypen aller Versuchstiere getrennt für die beiden Analyse-Zeitfenster 1 und 2 zu erkennen, war entsprechend der Dauer der beiden Zeiträume von 4 bzw. 26 Tagen eine deutlich größere Anzahl von Herzrhythmusstörungen im Analyse-Zeitfenster 2 zu beobachten (Ausnahme: Versuchstier 6). Besonders die absolute Häufigkeit von Couplets, Triplets und Non-sus VTs war in beiden Gruppen im Analyse-Zeitfenster 2 meist deutlich größer. Ausgenommen davon ist das Auftreten zweier Episoden von Sus VTs, die beide vor Transplantation zu detektieren waren (Abbildung 36).



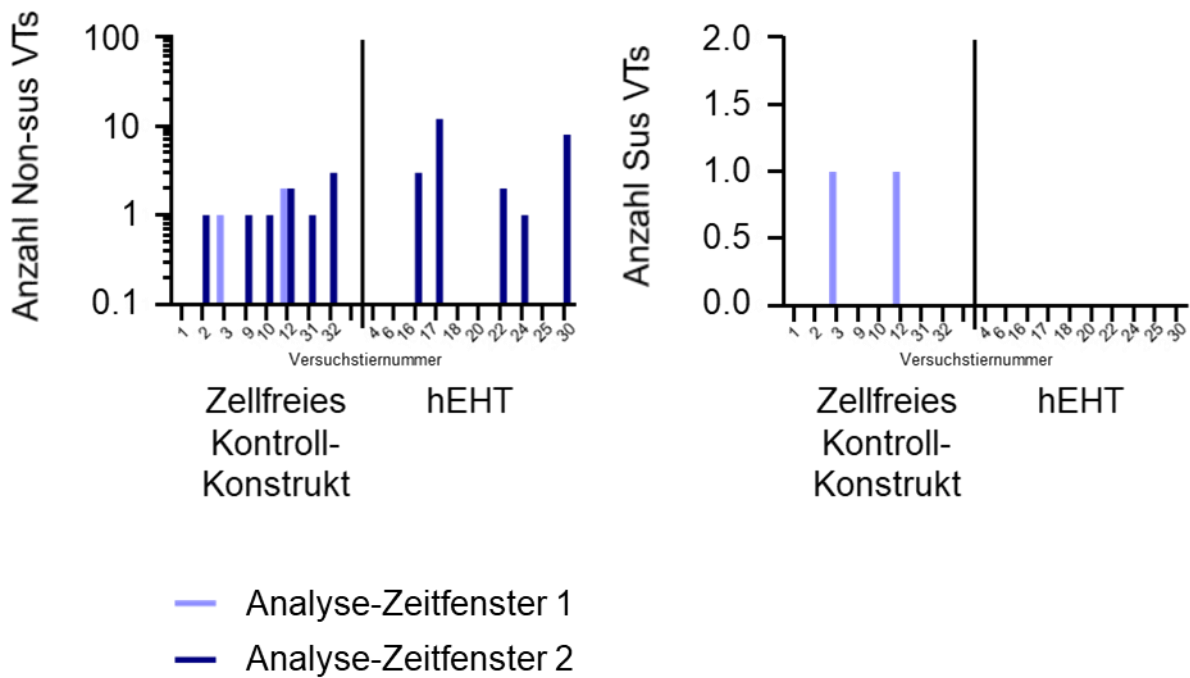
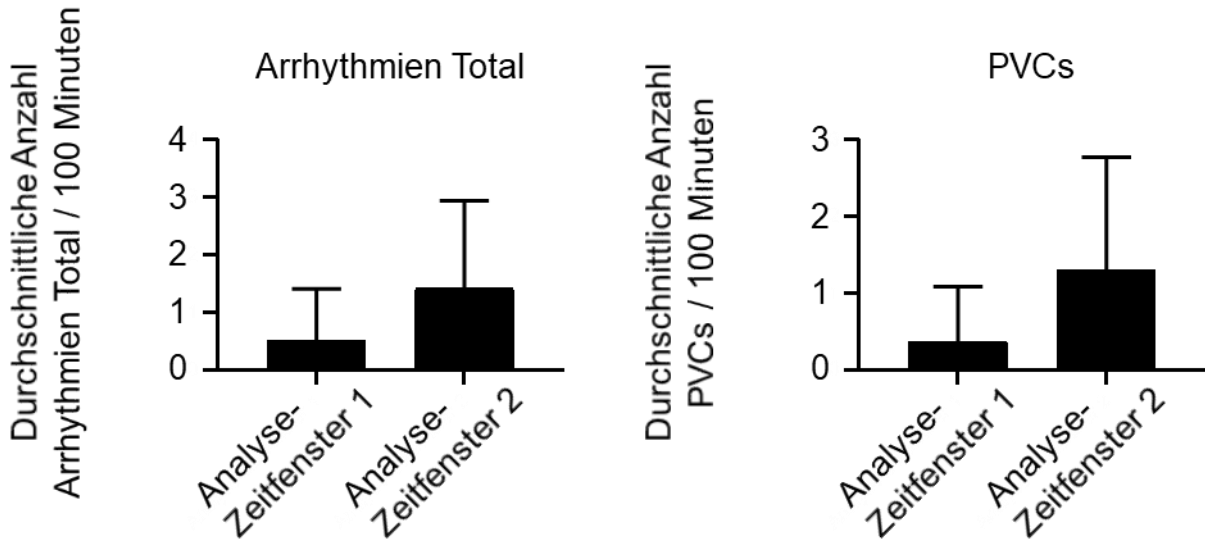


Abbildung 36: Auftreten der Gesamtzahl aller Arrhythmien sowie von PVCs, Couplets, Triplets, Non-sus VTs und Sus VTs aller Versuchstiere in Analyse-Zeitfenster 1 und 2.

Beim Vergleich des Auftretens der Gesamtzahl aller Arrhythmien sowie der verschiedenen Arrhythmie-Subtypen normiert pro 100 Minuten zwischen den zwei Analyse-Zeitfenstern, stellten sich in der Gruppe der Versuchstiere mit zellfreien Kontroll-Konstrukten keine statistisch signifikanten Unterschiede dar (Abbildung 37).



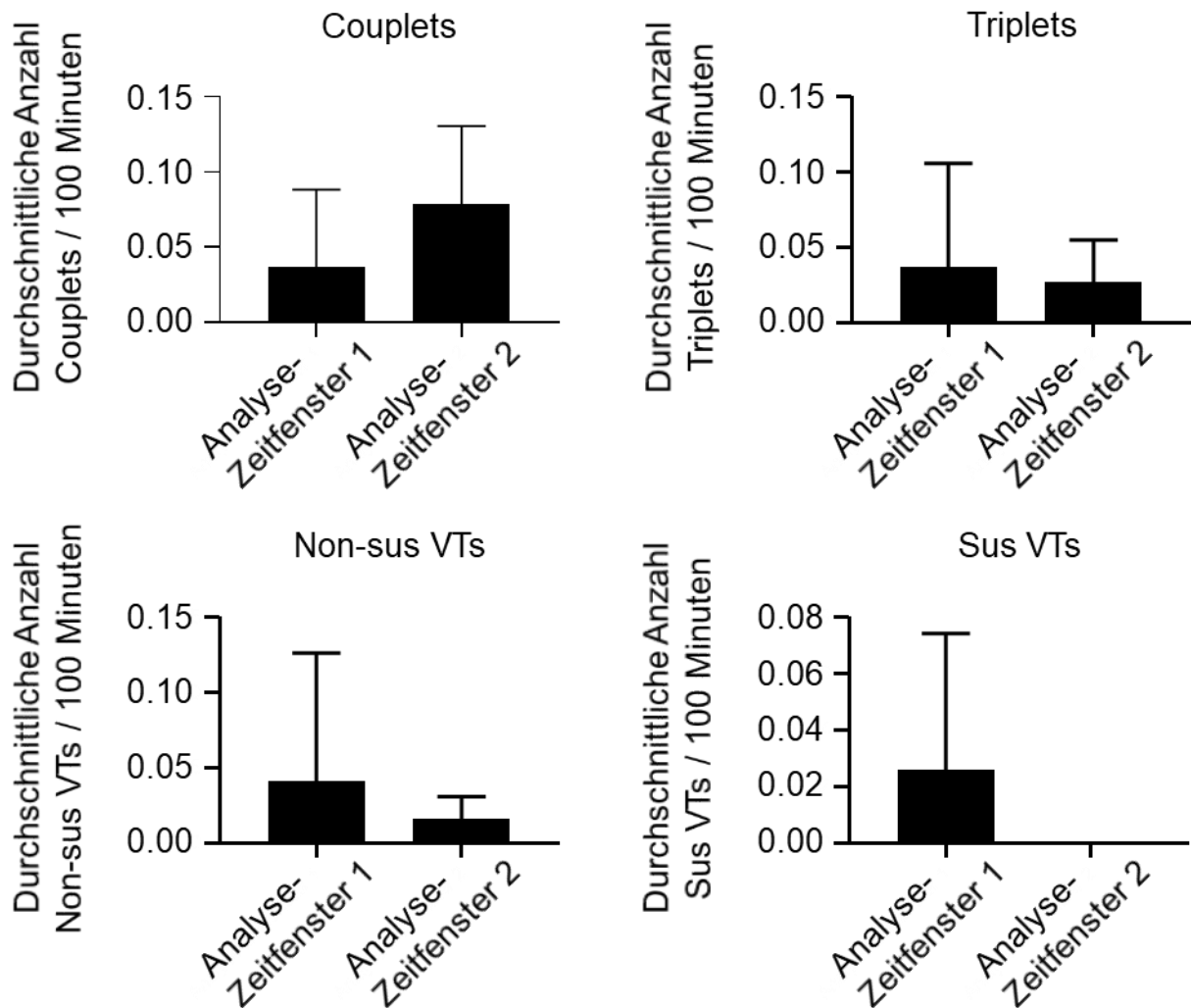
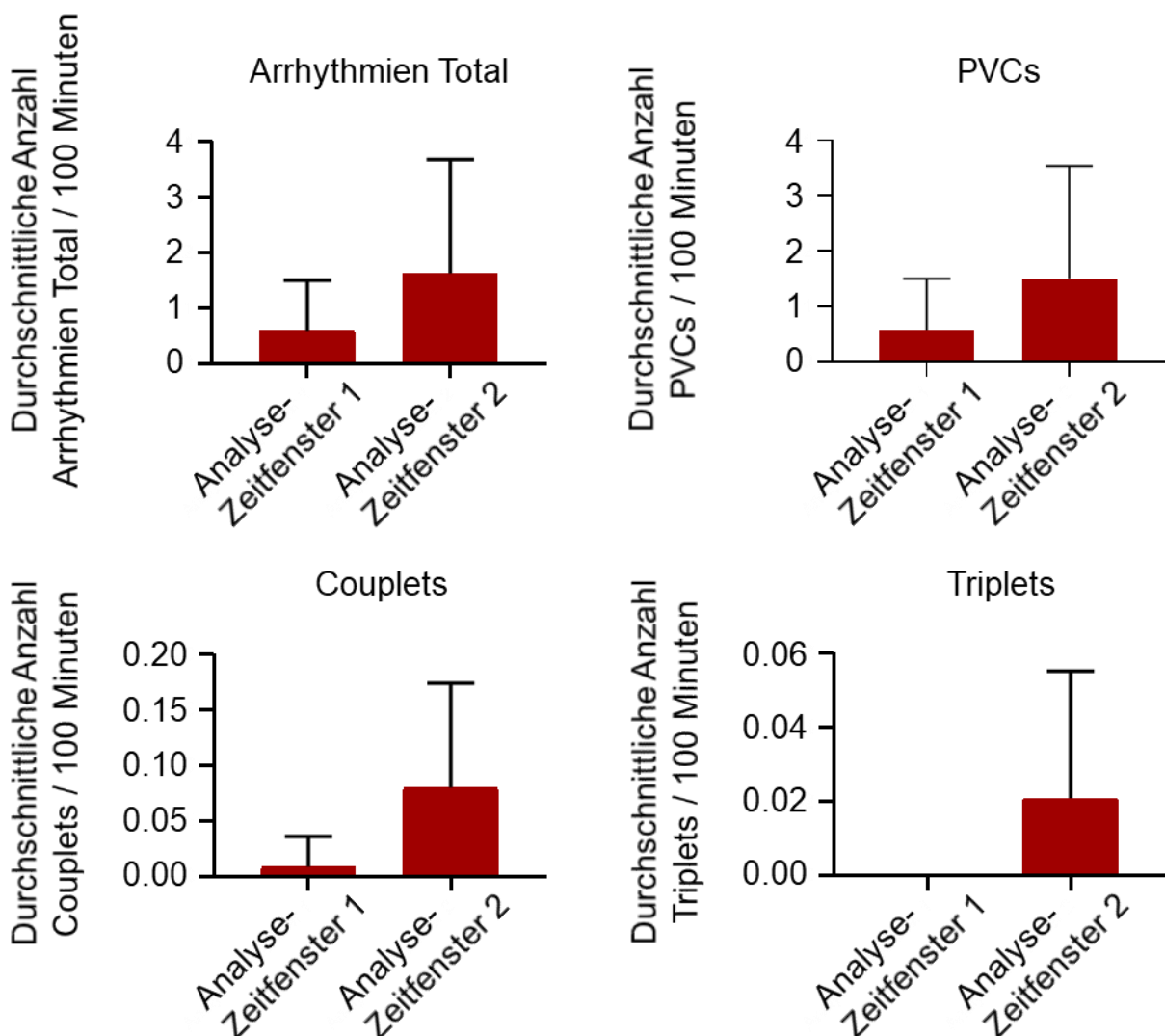


Abbildung 37: Gruppe mit zellfreiem Kontroll-Konstrukt, Analyse-Zeitfenster-Vergleich des Auftretens der Gesamtzahl aller Arrhythmien sowie der verschiedenen Arrhythmie-Subtypen, normiert auf die durchschnittliche Anzahl pro 100 Minuten, * $p < 0,05$ (Unpaired t-Test, Mittelwert \pm SD).

Hinsichtlich des Auftretens der Gesamtzahl aller Arrhythmien konnten in Analyse-Zeitfenster 1 0,517 Arrhythmien Total/100 Minuten und in Analyse-Zeitfenster 2 1,427 Arrhythmien Total/100 Minuten beobachtet werden. Es zeigte sich bei einem p-Wert von 0,165 kein statistisch signifikanter Unterschied. Die Häufigkeit der PVCs betrug in Analyse-Zeitfenster 1 0,377 PVCs/100 Minuten und 1,305 PVCs/100 Minuten in Analyse-Zeitfenster 2. Dies war bei einem p-Wert von 0,130 auch nicht statistisch signifikant unterschiedlich. Die Anzahl an Couplets mit 0,037 Couplets/100 Minuten in Analyse-Zeitfenster 1 und 0,078 Couplets/100 Minuten in Analyse-Zeitfenster 2 war bei $p=0,132$ ebenfalls nicht statistisch signifikant verschieden. Das Auftreten von Triplets betrug im Analyse-Zeitfenster 1 0,037 Triplets/100 Minuten und im Analyse-Zeitfenster 2 0,027 Triplets/100 Minuten. Es zeigte sich mit einem p-Wert von 0,176 kein statistisch signifikanter Unterschied. Ebenfalls mit 0,041 Non-sus VTs/100

Minuten in Analyse-Zeitfenster 1 versus 0,016 Non-sus VTs/100 Minuten in Analyse-Zeitfenster 2 bei $p=0,442$ nicht statistisch signifikant verändert hat sich das Auftreten von Non-sus VTs. Bei 0,026 Sus VTs/100 Minuten in Analyse-Zeitfenster 1 im Vergleich zu 0 Sus VTs/100 Minuten in Analyse-Zeitfenster 2 zeigte sich bei einem p-Wert von 0,155 kein statistisch signifikanter Unterschied.

Beim Vergleich des Auftretens der Gesamtzahl aller Arrhythmien sowie der verschiedenen Arrhythmie-Subtypen normiert pro 100 Minuten zwischen den zwei Analyse-Zeitfenstern in der Gruppe der Versuchstiere mit hEHT zeigten sich, außer bei dem Auftreten von Couplets, ebenso keine statistisch signifikanten Unterschiede (Abbildung 38).



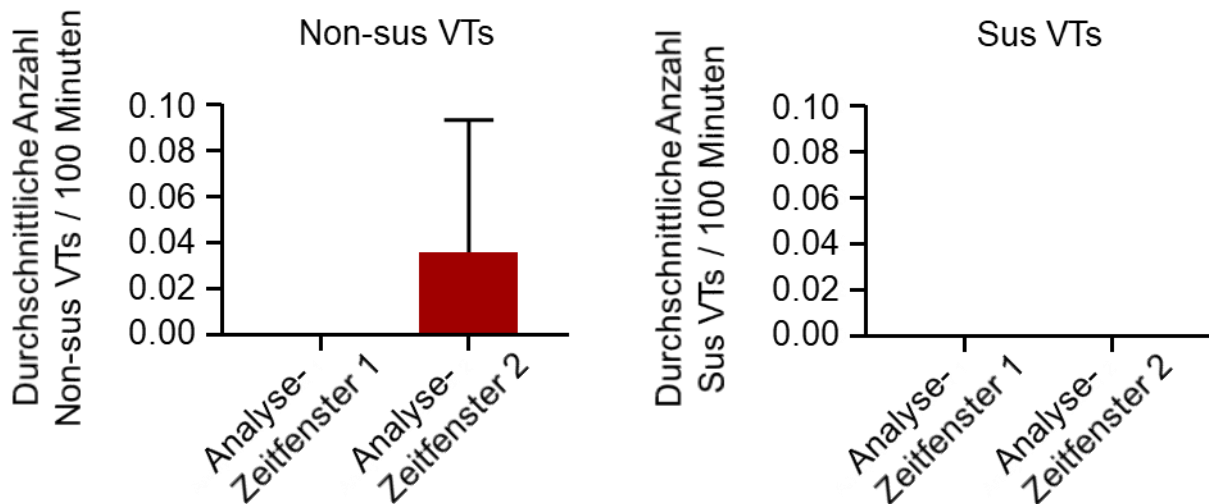


Abbildung 38: Gruppe mit hEHT, Analyse-Zeitfenster-Vergleich des Auftretens der Gesamtzahl aller Arrhythmien sowie der verschiedenen Arrhythmie-Subtypen, normiert auf die durchschnittliche Anzahl pro 100 Minuten, * $p < 0,05$ (Unpaired t-Test, Mittelwert \pm SD).

Bei der Häufigkeit der Gesamtzahl aller Arrhythmien konnte mit 0,597 Arrhythmien Total/100 Minuten in Analyse-Zeitfenster 1 und 1,628 Arrhythmien Total/100 Minuten in Analyse-Zeitfenster 2 bei einem p -Wert von 0,165 kein statistisch signifikanter Unterschied gefunden werden. Ebenso und statistisch bei $p=0,210$ auch nicht signifikant unterschiedlich, kam es zu einer Häufigkeit des Auftretens von PVCs mit 0,588 PVCs/100 Minuten in Analyse-Zeitfenster 1 und 1,504 PVCs/100 Minuten in Analyse-Zeitfenster 2. Als einzige statistisch signifikante Zunahme mit einem p -Wert von 0,033 war diejenige von 0,009 Couplets/100 Minuten in Analyse-Zeitfenster 1 auf 0,080 Couplets/100 Minuten in Analyse-Zeitfenster 2 zu verzeichnen. Kein statistisch signifikanter Unterschied präsentierte sich zwischen 0 Triplets/100 Minuten in Analyse-Zeitfenster 1 und 0,021 Triplets/100 Minuten in Analyse-Zeitfenster 2 bei $p=0,068$. Bei 0 Non-sus VTs/100 Minuten in Analyse-Zeitfenster 1 und 0,036 Non-sus VTs/100 Minuten in Analyse-Zeitfenster 2 stellte sich bei $p=0,061$ kein statistisch signifikanter Unterschied dar. Sus VTs kamen in dieser Gruppe weder in Analyse-Zeitfenster 1 noch in Analyse-Zeitfenster 2 vor.

Somit gab es, mit Ausnahme der statistisch signifikanten Zunahme von Couplets nach der Transplantation in der Gruppe der Versuchstiere mit hEHT, keine statistisch signifikanten Unterschiede bei der Häufigkeit der Gesamtzahl aller Arrhythmien sowie der verschiedenen Arrhythmie-Subtypen pro beobachteter Zeit beider Gruppen bei Vergleich der beiden Analyse-Zeitfenster 1 und 2, wenn auch eine Tendenz zur Zunahme des Auftretens von Arrhythmien bei beiden Gruppen im Analyse-Zeitfenster 2 ersichtlich war.

Beim Vergleich des Auftretens der Gesamtzahl aller Arrhythmien sowie der verschiedenen Arrhythmie-Subtypen normiert pro 100 Minuten in Analyse-Zeitfenster 1 und 2 zwischen den beiden Gruppen konnten ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede beobachtet werden (Abbildungen 39 und 40).

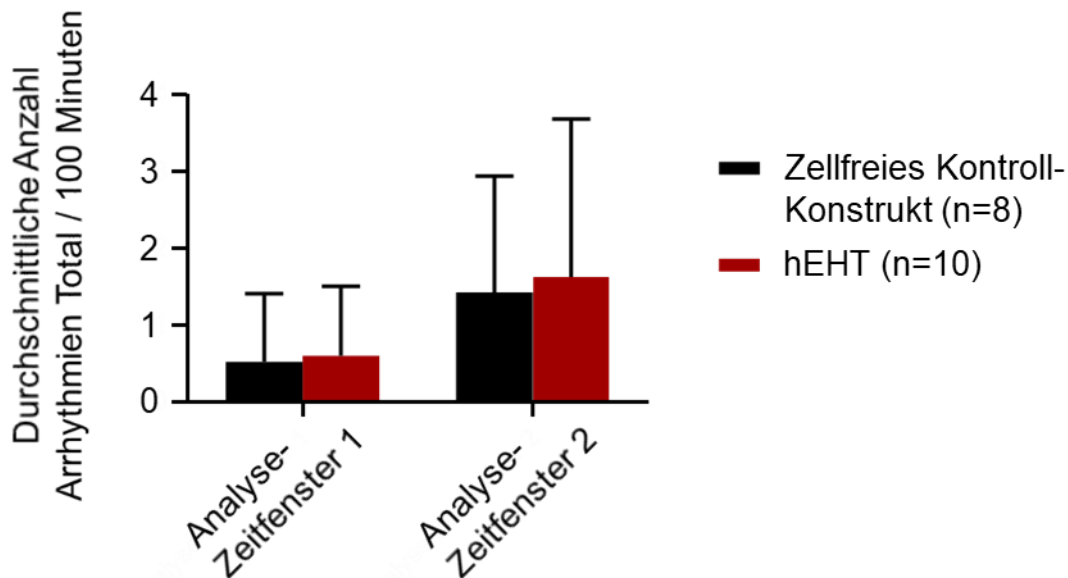


Abbildung 39: Gruppen-Vergleich des Auftretens der Gesamtzahl aller Arrhythmien, normiert auf die durchschnittliche Anzahl pro 100 Minuten, * $p < 0,05$ (Zweifaktorielle Varianzanalyse, Mittelwert \pm SD).

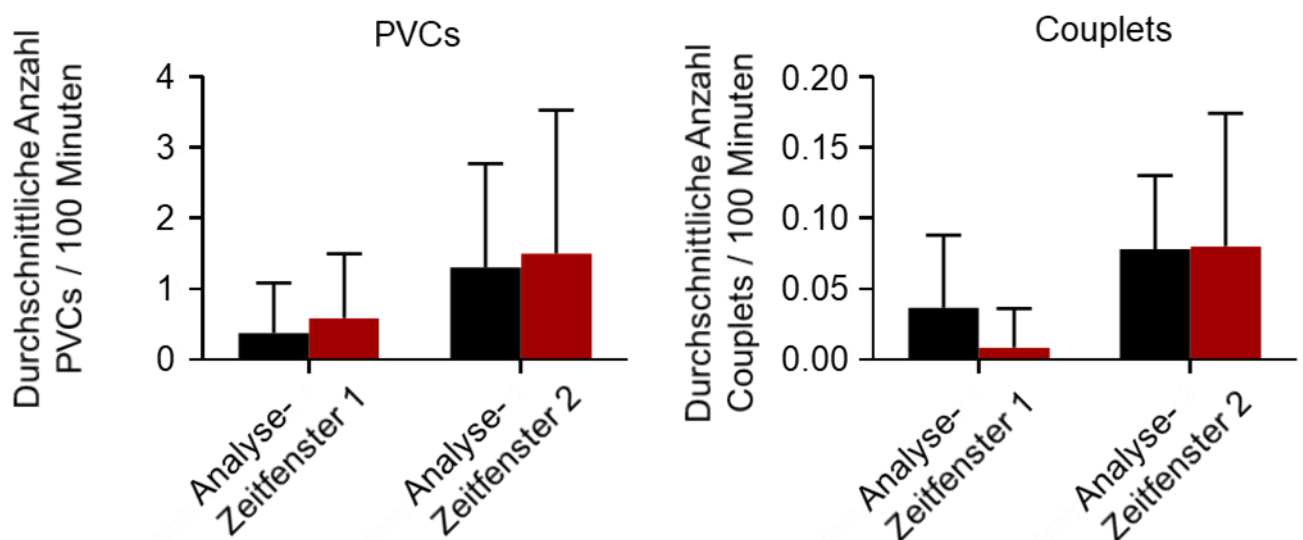
Hinsichtlich des Auftretens der Gesamtzahl aller Arrhythmien konnten für die Gruppe mit zellfreiem Kontroll-Konstrukt in Analyse-Zeitfenster 1 0,517 Arrhythmien Total/100 Minuten detektiert werden, in der Gruppe mit hEHT 0,597 Arrhythmien Total/100 Minuten und in Analyse-Zeitfenster 2 1,427 Arrhythmien Total/100 Minuten bei den Versuchstieren mit zellfreiem Kontroll-Konstrukt versus 1,628 Arrhythmien Total/100 Minuten bei den Versuchstieren mit hEHT. Hier lag bei einem p-Wert von 0,766 kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen vor.

Die Häufigkeit von PVCs mit 0,377 PVCs/100 Minuten in der Gruppe mit zellfreiem Kontroll-Konstrukt und 0,588 PVCs/100 Minuten in der Gruppe mit hEHT in Analyse-Zeitfenster 1 und 1,305 PVCs/100 Minuten bzw. 1,504 PVCs/100 Minuten in Analyse-Zeitfenster 2 bei $p = 0,653$ war ebenfalls statistisch nicht signifikant unterschiedlich. Das Gleiche galt bei einem p-Wert von 0,530 für das Auftreten von Couplets mit 0,037 Couplets/100 Minuten in der Gruppe mit zellfreiem Kontroll-Konstrukt und 0,009 Couplets/100 Minuten in der Gruppe mit hEHT in Analyse-Zeitfenster 1 bzw. 0,078 Couplets/100 Minuten versus 0,080 Couplets/100 Minuten in Analyse-Zeitfenster 2. Triplets konnten im Analyse-Zeitfenster 1 mit 0,037 Triplets/100 Minuten in der Gruppe mit zellfreiem Kontroll-Konstrukt und 0 Triplets/100 Minuten in der

Gruppe mit hEHT und 0,027 Triplets/100 Minuten bzw. 0,021 Triplets/100 Minuten in Analyse-Zeitfenster 2 beobachtet werden. Auch hier gab es bei $p=0,139$ keinen statistisch signifikanten Unterschied. Das Auftreten von Non-sus VTs zeigte sich mit einem p-Wert von 0,552 ebenso wenig statistisch signifikant unterschiedlich bei 0,041 Non-sus VTs/100 Minuten in der Gruppe mit zellfreiem Kontroll-Konstrukt und 0 Non-sus VTs/100 Minuten in der Gruppe mit hEHT in Analyse-Zeitfenster 1 sowie 0,016 Non-sus VTs/100 Minuten versus 0,036 Non-sus VTs/100 Minuten in Analyse-Zeitfenster 2. Zuletzt und bei einem p-Wert von 0,110 erneut ohne statistisch signifikanten Unterschied lag die Häufigkeit von Sus VTs bei 0,026 Sus VTs/100 Minuten in der Gruppe mit zellfreiem Kontroll-Konstrukt versus 0 Sus VTs/100 Minuten in der Gruppe mit hEHT in Analyse-Zeitfenster 1 und 0 Sus VTs/100 Minuten in beiden Gruppen in Analyse-Zeitfenster 2.

Es waren somit keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Auftretens der Gesamtzahl aller Arrhythmien sowie der verschiedenen Arrhythmie-Subtypen pro beobachteter Zeit zwischen den Gruppen in Analyse-Zeitfenster 1 nach Infarkt-Induktion zu messen. Dies stellte eine Vergleichbarkeit der Gruppen (vor Transplantation von zellfreiem Kontroll-Konstrukt bzw. hEHTs) hinsichtlich des Vorhabens der Untersuchung des Risikos für Herzrhythmusstörungen sicher.

Ebenso zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Auftretens der Gesamtzahl aller Arrhythmien sowie der verschiedenen Arrhythmie-Subtypen pro beobachteter Zeit zwischen den Gruppen in Analyse-Zeitfenster 2. Hieraus ließ sich schlussfolgern, dass die Transplantation von hEHTs auf die infarzierten Herzen der Meerschweinchen nicht zu einem erhöhten Risiko für das Auftreten ventrikulärer Herzrhythmusstörungen geführt hat.



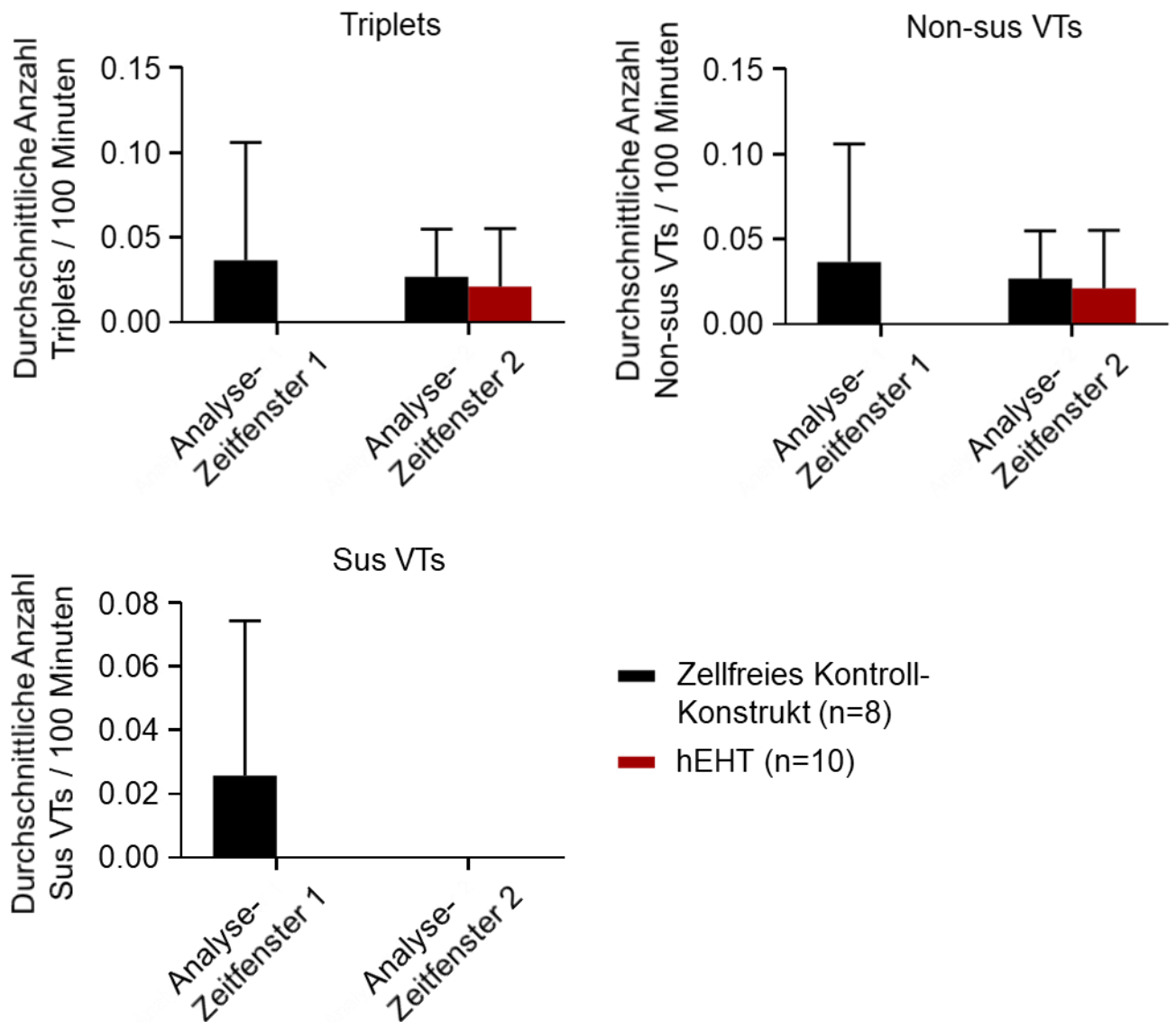


Abbildung 40: Gruppen-Vergleich des Auftretens von PVCs, Couplets, Triplets, Non-sus VTs und Sus VTs normiert auf die durchschnittliche Anzahl pro 100 Minuten, * $p < 0,05$ (Zweifaktorielle Varianzanalyse, Mittelwert \pm SD).

4. Diskussion

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss der Transplantation von humanen EHTs auf die Elektrophysiologie hinsichtlich des Risikos für Herzrhythmusstörungen des Empfängerherzens zu untersuchen.

Dazu wurden aus hiPSC-KM spontan kontrahierende hEHTs generiert und diese auf infarzierte Herzen von Meerschweinchen transplantiert. Nach der Kryo-Verletzung sowie der Implantation der hEHTs bzw. zellfreier Kontroll-Konstrukte wurde eine EKG-Aufzeichnung mit zuvor implantierten Transmittern durchgeführt. Diese sollte den bezüglich des Auftretens von Herzrhythmusstörungen zeitlich hochrelevanten Bereich der Tage und Wochen nach dem Infarkt darstellen. Anschließend wurden die EKGs auf das Vorkommen von spontanen ventrikulären Arrhythmien hin untersucht, um das Risiko für Herzrhythmusstörungen nach dem Gewebeersatz in vivo zu evaluieren.

Der Untergang von KM durch eine Ischämie des Herzmuskels, wie sie beim Myokardinfarkt auftritt, oder die Simulation eines solchen durch Kryo-Verletzung sowie die konsekutive Bildung von Narbengewebe ist mit einem gehäuften Auftreten gefährlicher ventrikulärer Arrhythmien assoziiert. Um bei der Untersuchung des Auftretens von Herzrhythmusstörungen eine Vergleichbarkeit der beiden Gruppen sicherzustellen, und um auszuschließen, dass möglicherweise unterschiedlich große Verletzungen der Herzen der Versuchstiere Einfluss auf das Risiko für Arrhythmien des jeweiligen Versuchstieres nahmen, wurden vor der Transplantation von hEHTs bzw. zellfreier Kontroll-Konstrukte Echokardiographien durchgeführt. Die echokardiographischen Untersuchungen dienten der indirekten Einschätzung der Infarktgröße durch Messung der Parameter FAC und LVIDd. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchstieren der beiden Gruppen, sodass eine Vergleichbarkeit hinsichtlich des Risikos für Herzrhythmusstörungen gegeben war. Dies wurde durch histologische Untersuchungen bestätigt, welche ergaben, dass alle Versuchstiere vergleichbar große transmurale Infarkte des LV erlitten. Die Vergleichbarkeit der Gruppen bezüglich des Arrhythmie-Risikos wurde zusätzlich von den Beobachtungen unterstützt, dass es zum einen keine signifikanten Unterschiede bei der Häufigkeit von Herzrhythmusstörungen zwischen den beiden Gruppen im Analyse-Zeitfenster 1 vor Transplantation von hEHT bzw. zellfreiem Kontroll-Konstrukt gab, und zum anderen davon, dass sich die Gruppen auch bei der Parameter- (Aktivität, Körpertemperatur) und Herzfrequenz-Analyse nicht signifikant unterschieden und alle Tiere trotz Operationen und Verletzung des Herzens in einem guten Allgemeinzustand waren.

Damit die Transplantation des hEHTs überhaupt Arrhythmien hervorrufen konnte, war es nötig, dass die KM des Transplantats die Implantation überlebten. Um zu überprüfen, ob dieses Ziel erreicht wurde, wurden nach der Beobachtungszeit die Organe entnommen und histologisch

untersucht. Bei den Untersuchungen der Herzen aller Versuchstiere der hEHT-Gruppe waren Areale mit Herzmuskelgewebe in der narbigen Infarktregion zu finden. Dieses Herzmuskelgewebe war, wie die immunhistochemische Färbung mit humanem Ku80 zeigte, menschlichen Ursprungs. Die humanen KM des Transplantats überlebten also die Verpflanzung und es kam zumindest zu einer partiellen Remuskularisierung der infarzierten Herzen.

Wie Weinberger et al. 2016 in einer vorherigen Studie (Tabelle 1) unseres Instituts bereits zeigen konnte, war das aus hiPSC-KM und hiPSC-EC hergestellte hEHT nach Transplantation in der Lage, bei einem Teil der Versuchstiere elektrisch an das infarzierte Empfängerherz von Meerschweinchen zu koppeln und zu einer Verbesserung der linksventrikulären myokardialen Pumpfunktion sowie des elektrophysiologischen Phänotyps des Herzens (z.B. schnellere Erregungsleitung) zu führen (s. auch Abbildung 7; Weinberger et al. 2016). Daten zum Auftreten von Arrhythmien nach hEHT-Transplantation waren jedoch bis jetzt nicht vorhanden.

Bei der Analyse der EKGs der vorliegenden Studie (Tabelle 1) zeigten sich zwischen den beiden Gruppen mit hEHTs bzw. zellfreien Kontroll-Konstrukten keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich des Auftretens von Herzrhythmusstörungen. Es waren verschiedene ventrikuläre Arrhythmien (PVCs, Couplets, Triplets, Non-sus VTs, Sus VTs) zu beobachten, doch weder in der Gesamtzahl der Arrhythmien noch hinsichtlich der Häufigkeit der verschiedenen Arrhythmie-Subtypen im Analyse-Zeitfenster 2 (nach Transplantation von hEHTs bzw. zellfreiem Kontroll-Konstrukt) gab es signifikante Differenzen zwischen den beiden Versuchsgruppen. Es zeigte sich also kein Einfluss auf das Risiko für Arrhythmien und somit keine Evidenz für proarrhythmische Effekte der Transplantation von aus hiPSC-KM generierten hEHTs.

4.1 Diskussion relevanter Studien der kardialen regenerativen Medizin

Tabelle 1 stellt die Studiendesigns und Ergebnisse von Weinberger et al., dieses Experiments sowie weiterer relevanter Studien der kardialen regenerativen Medizin, die die Häufigkeit von Herzrhythmusstörungen nach Transplantation von KM untersucht haben, gegenüber.

Zwar existieren keine weiteren Daten zum Arrhythmie-Risiko nach Transplantation von hEHTs aus hiPSC-KM, allerdings gab es Experimente mit Untersuchungen zum Auftreten von Herzrhythmusstörungen nach Transplantation von KM, die aus unterschiedlichen Zellarten gewonnen und mit verschiedenen Methoden in diverse Versuchstiere implantiert wurden.

Zimmermann et al. konnte bei Transplantation von aus neonatalen Ratten-KM hergestellten schleifenförmigen EHTs, trotz Verminderung einer durch den Infarkt hervorgerufenen Verzögerung der Erregungsleitung über der Narbenregion durch das EHT und elektrischer Kopplung bei allen Ratten, keinen Effekt auf das Risiko für spontane Herzrhythmusstörungen

im Ratten-Infarkt-Modell beobachten (Zimmermann et al. 2006). Shiba et al. beschreibt nach Injektion von hESC-KM in infarzierte Meerschweinchen-Herzen eine elektrische Kopplung der KM an das Empfängermiokard bei 60 % der Versuchstiere und sogar einen signifikanten antiarrhythmischen Effekt, da die Versuchstiere, welche die Zellen erhielten, eine verminderte Anzahl durch programmierte elektrische Stimulation induzierter Arrhythmien aufwiesen. Dieser Effekt bei Untersuchung der Arrhythmien unter elektrischer Stimulation stellt jedoch im Gegensatz zum spontanen Auftreten von Herzrhythmusstörungen nach Herzinfarkt (wie in dieser Studie) weniger klinisch relevante Bedingungen dar. Die Häufigkeit spontaner Arrhythmien veränderte sich im Vergleich zur Gruppe ohne hESC-KM nicht (Shiba et al. 2012). Im Kontrast zu diesen Beobachtungen stehen die Ergebnisse der Studie von Chong et al., bei der Makaken hESC-KM ins infarzierte Myokard injiziert bekamen. Bei allen Versuchstieren konnte eine elektrische Kopplung festgestellt werden. Allerdings erhöhte sich durch die Zell-Therapie das Risiko für spontane ventrikuläre Herzrhythmusstörungen sogar unter antiarrhythmischer Behandlung mit Amiodaron signifikant (Chong et al. 2014). Diese Ergebnisse konnten in einer weiteren Studie an Makaken von Shiba et al. bestätigt werden, in der in einer allogenen Transplantation nach Infarkt-Induktion Makaken-iPSC-KM ebenfalls intramyokardial appliziert wurden. Auch Shiba et al. konnte nun bei allen Versuchstieren eine elektrische Kopplung feststellen und es kam zum vermehrten Auftreten spontaner Herzrhythmusstörungen (Shiba et al. 2016). Ye et al. transplantierte im Schwein-Infarkt-Modell hiPSC-KM und konnte wiederum keinen Effekt auf das Arrhythmie-Risiko ausmachen. Es kam weder zum vermehrten Auftreten spontaner ventrikulärer Arrhythmien, noch konnten bei den Versuchstieren unter programmierter elektrischer Stimulation Herzrhythmusstörungen ausgelöst werden (Ye et al. 2014). Gao et al. kam passend dazu zu ähnlichen Ergebnissen: Nach Transplantation eines kardialen Muskelpatches aus hiPSC-KM, -EC und -SMC auf infarzierte Schweineherzen konnte keine Veränderung des Risikos für das Auftreten spontaner oder durch elektrische Stimulation hervorgerufener Herzrhythmusstörungen gemessen werden (Gao et al. 2018). In einer weiteren aktuellen Studie von Liu et al. an nicht-humanen Primaten, bei der analog zu Chong et al. hESC-KM in die Infarktregion injiziert wurden, zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Einfluss auf das Risiko für spontane oder induzierte Arrhythmien. Die vorherigen Ergebnisse der Arbeitsgruppe (Chong et al. 2014) konnten somit nicht reproduziert werden (Liu et al. 2018). In einer kürzlich veröffentlichten Studie der Arbeitsgruppe um Laflamme zeigten sich allerdings abweichende Ergebnisse: Romagnuolo et al. beschreibt, dass die intramyokardiale Injektion von hESC-KM in infarzierte Herzen von Schweinen zu einem stark erhöhten Risiko für das Auftreten von Herzrhythmusstörungen führte. Im Vergleich zur Kontrollgruppe traten bei den Tieren mit hESC-KM kurz nach der Transplantation deutlich mehr und z.T. auch hämodynamisch relevante ventrikuläre Tachykardien auf. Elektrophysiologische Untersuchungen ergaben, dass die Arrhythmien

wahrscheinlich eher durch fokale Mechanismen und weniger durch Reentry-Kreisläufe ausgelöst wurden (Romagnuolo et al. 2019).

Die Ergebnisse dieser Studien sind heterogen und es ist nicht leicht, hieraus Schlüsse zu ziehen. Eine Tendenz scheint sich anhand des Versuchstieres zu ergeben. Während sich in Kleintiermodellen an Meerschweinchen bzw. Ratten keine Effekte zeigten oder sogar ein antiarrhythmischer Effekt (unter programmierter elektrischer Stimulation) messbar war, zeigen die Experimente an Großtieren, besonders an Affen (Ausnahmen: Liu et al., bei dem es nur bei einem der sechs hESC-KM-Empfänger zu gravierenden Arrhythmien kam, und zwei der drei Schwein-Infarkt-Modelle, für mögliche Gründe s.u.), häufiger einen proarrhythmischen Effekt der Transplantation. Dies würde mit der Theorie übereinstimmen, dass Herzen mit höherer Schlagfrequenz und geringerem Gewebevolumen, wie bei Ratten oder Meerschweinchen, eher weniger anfällig für Herzrhythmusstörungen sind als jene mit niedrigerer Frequenz und größerem Volumen, wie die von Menschen, Schweinen oder Primaten. In diesem Fall würde die positive (oder zumindest neutrale) Wirkung von hESC- bzw. hiPSC-KM in Kleintiermodellen überschätzt (Laflamme et al. 2007a; Lalit et al. 2014). Schnellere Herzfrequenzen scheinen die Leitung über natürliche Erregungsleitungswege zu favorisieren und Automatie sowie getriggerteter Aktivität des Transplantats und Reentry-Kreisläufen entgegenzuwirken. Weniger myokardiales Gewebevolumen bietet grundsätzlich gleichzeitig weniger Möglichkeiten zur Entstehung von Reentry-Kreisläufen. Im Großtiermodell kann die maximal verabreichte Zelldosis zudem höher sein und somit das Transplantat selbst ein größeres Volumen aufweisen. Dies könnte die Entstehung und Aufrechterhaltung von Reentry-Kreisläufen innerhalb des Grafts selbst begünstigen. So hatte der Primat mit dem größten hESC-KM-Transplantat in der Studie von Chong et al. interessanterweise tatsächlich auch die meisten Herzrhythmusstörungen (Chong et al. 2014). Romagnuolo et al. konnte jedoch keine Korrelation zwischen Transplantatgröße und Arrhythmie-Risiko feststellen (Romagnuolo et al. 2019). Können die hESC- bzw. hiPSC-KM allerdings nicht mit den hohen Frequenzen des jeweiligen Versuchstieres mindestens Schritt halten, um Effekte zu entfalten, könnte eine mögliche positive Wirkung in diesen Kleintiermodellen umgekehrt unterschätzt werden (Laflamme et al. 2007a). Weitere Untersuchungen, v.a. mit humanen KM, an Großtieren, die aufgrund ihrer Physiologie vermutlich die beste Translation auf den Menschen zulassen, wären dementsprechend sinnvoll.

Liu et al. konnte trotz ähnlicher Methodik wie Chong et al. dessen Ergebnisse an Makaken nicht reproduzieren und keinen Effekt auf das Auftreten von Arrhythmien nachweisen. Die Autoren der Studie sehen die Gründe für das bei dieser Studie allgemein geringere Risiko für Transplantat-assoziierte Arrhythmien in einer anderen Technik der Infarktinduktion und die Ursache der fehlenden Signifikanz der Ergebnisse in den kleinen Gruppengrößen (n=6 bzw. 4). Da allerdings einer der mit hESC-KM behandelten Makaken (n=6) deutlich mehr

Herzrhythmusstörungen entwickelte als die Versuchstiere in der Kontrollgruppe (n=4), wurden bei diesem Makaken weitere elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt. Diese ergaben, dass Transplantate am ehesten durch ektope Impulsgeneration (Automatie oder Nachdepolarisation) und weniger durch Reentry-Mechanismen zur Entstehung von Arrhythmien führen könnten (Liu et al. 2018). Diese Beobachtungen konnten von Romagnuolo et al. reproduziert und bestätigt werden, der ebenfalls fokale Mechanismen und nicht Reentry als wahrscheinlichste Ursache der Transplantat-assoziierten Arrhythmien nennt (Romagnuolo et al. 2019). Dass trotz des Großtiermodelles Schwein in der Studie von Ye et al. ebenfalls keine Effekte beobachtet wurden, könnte noch einen anderen Grund haben: Im Vergleich zu Chong et al. verwendete Ye et al. bei der Injektion eine 100-fach geringe KM-Zell-Dosis. Ye et al. injizierte lediglich zwei Millionen hiPSC-KM (sowie in einem Teil der Studie zusätzlich je zwei Millionen hiPSC-ECs und -SMCs) und beobachtete eine Netto-Engraftment-Rate von ca. 9 % für alle drei Zelltypen. Etwa 27 % der überlebenden Zellen waren KM. Dies bedeutet, dass lediglich ungefähr 180000 KM pro Tier die Transplantation überlebten. Diese Zellzahl ist in Relation zur Gesamtzahl an KM in einem Schweineherz und dessen Größe sehr gering. Möglicherweise ist deshalb der beobachtete positive Effekt auf die myokardiale Pumpfunktion eher auf parakrine Mechanismen zurückzuführen und weniger auf eine „echte Regeneration“ durch Bildung von neuem Myokard. War diese geringe Anzahl von überlebenden KM eventuell gar nicht in der Lage, Arrhythmien zu verursachen, könnte dies zu einer Überschätzung der Sicherheit von Zell-Therapien führen (Chong et al. 2014; Ye et al. 2014). Ye et al. begründet die eigenen positiven Ergebnisse der Arrhythmie-Untersuchungen zum einen ebenfalls mit der geringeren Zelldosis, während jedoch eine weitere Erklärung sei, dass die Therapie zu einer Zytokin-assoziierten Mobilisierung endogener Progenitorzellen führe, welche wiederum bessere Chancen einer elektrischen Integration als exogen zugeführte KM und deren Tochterzellen hätten (Ye et al. 2014). Ähnliches gilt sowohl für die Zellzahl, als auch für die Netto-Engraftment-Rate der Studie von Gao et al., bei der ebenfalls kein Effekt beobachtet wurde (Gao et al. 2018). Um Fehleinschätzungen der Effektivität der Therapie zu vermeiden, sollte die Zahl der im Endeffekt tatsächlich überlebenden, den Graft bildenden KM in zukünftigen Experimenten immer ermittelt und in Zusammenschau mit den Effekten auf die Pumpfunktion bewertet werden. Es ist gut denkbar, dass eine höhere Zell-Dosis und/oder ein besseres Engraftment mit höheren Überlebensraten sowie ein größeres Graftvolumen eher Arrhythmien hervorruft.

Das Engraftment selbst wird wiederum durch die Art der Applikation der Zellen beeinflusst. Möglicherweise sind durch Tissue Engineering-Ansätze höhere Engraftment-Raten möglich, beispielsweise durch während der Kultivierung im 3D-Format stattfindende Reifungsprozesse, welche das folgende Engraftment verbessern, bei Zell-Therapie-Ansätzen jedoch nicht stattfinden können. Auch hierdurch resultieren also relevante Unterschiede zwischen den

Studien. Insgesamt wird in Tabelle 1 ersichtlich, dass die fehlende Standardisierung bei der Durchführung der Experimente ein Problem darstellt. Dies beginnt bei der Wahl der Zellart, aus der die KM differenziert werden, wobei wahrscheinlich davon auszugehen ist, dass sich KM aus ESC und iPSC sehr ähnlich sind und eine Translation von einem auf den anderen Zelltyp durchaus möglich ist (Zhang et al. 2009; Zwi et al. 2009). Die verwendete Zelldosis variiert zudem stark. In Verbindung mit unterschiedlichen Engraftment-Raten resultieren verschiedene Anzahlen überlebender Zellen, welche schlussendlich den Graft bilden und so überhaupt erst eine positive oder negative Wirkung auf die Elektrophysiologie entfalten könnten (s.u.). Auch hier ist der erwähnte, möglicherweise Reentry-Kreisläufe begünstigende Effekt durch ein damit einhergehendes größeres Graftvolumen zu bedenken.

Des Weiteren werden in den unterschiedlichen Studien verschiedene Methoden der Infarktinduktion genutzt, welche Einfluss auf die Ergebnisse haben könnte. Beispielsweise beschreibt Chong et al., dass das Ischämie-Reperfusion-Modell zu lückenhafteren Infarkten mit mehr unbeschädigten Myokardbereichen führt als die Kryo-Verletzung, welches sich auf die Erfolgsaussichten zur elektrischen Kopplung auswirken könnte (Chong et al. 2014). Nach Shiba et al. hat die Kryo-Verletzung den Vorteil, dass sie zu reproduzierbaren Infarktgrößen und -lokalisationen führt und die Variabilität zwischen den Versuchstieren vermindert. Allerdings hat sie (im Gegensatz zur Ischämie-Reperfusion-Methode) ein Absterben aller im Infarktgebiet ansässigen Zelltypen zur Folge und führt somit zu einer Umgebung, in der die Erfolgsaussichten für ein Engraftment und eine Integration der KM wahrscheinlich stark eingeschränkt sind (Shiba et al. 2014). Unterscheiden sich aufgrund einer verschiedenen Methodik oder mangelnder Reproduzierbarkeit einer Methode die Infarktlokalisationen, könnte dies variable Folgen auf den Zustand des Herzens nach der Verletzung haben, beispielsweise bei Verletzung wichtiger Erregungsleitungsbahnen oder autonomer Nerven, welche die Herzfunktion regulieren. Außerdem variieren die resultierenden Infarktgrößen. Vermutlich wird in manchen Studien die Größe des Infarkts bewusst gering gewählt, um die meist hohe Sterblichkeit der Versuchstiere zu senken. Dies könnte jedoch zur Folge haben, dass die Infarktgröße nicht ausreicht, um die Leistung des Herzens und den elektrophysiologischen Status hinreichend einzuschränken. So könnte der Infarkt bei Chong et al. eventuell nur ein subklinisches Ausmaß erreicht haben (Chong et al. 2014). Hinzu kommt, dass Herzen mit größeren Verletzungen gegebenenfalls mehr von der Therapie profitieren als jene mit kleinen Infarkten (Chong et al. 2014). Das Ausmaß der induzierten Infarkte wird verschieden (z.B. Histologie oder Echokardiographie) und im Falle der Echokardiographie nur indirekt durch Bestimmung funktioneller Parameter (z.B. FAC) mit einer untersucherabhängigen Methode gemessen und nicht in denselben Einheiten angegeben (z.B. Fläche des LV oder Masse des LV) oder sogar überhaupt nicht bestimmt (Zimmermann et al. 2006).

Eine ähnliche Problematik gilt für das Ausmaß der Remuskularisierung. Außerdem wird die Evaluation der Bildung von neuem Myokard oft durch das Vorhandensein narbiger Veränderungen nach Infarkt erschwert und eine Abgrenzung des Transplantats (z.B. des hEHTs) zur umgebenden Narbe und dem gesunden Myokard des Empfängers stellt eine Herausforderung dar (Weinberger et al. 2016). Insgesamt sind die Ergebnisse somit nur eingeschränkt vergleichbar, weshalb ein größeres Maß an Standardisierung, möglichst sogar einheitliche Standards, nötig wären.

Auch die hier vorliegende Studie besitzt (neben den bereits diskutierten) weitere Limitationen und es sollten Verbesserungen bei der Durchführung weiterer Experimente vorgenommen werden. Aus oben genannten Gründen wäre es sinnvoll, die gleichen Untersuchungen an Großtieren, deren Herzfrequenz und myokardiales Volumen denen des Menschen ähnlicher sind, durchzuführen, um so eine bessere Translation auf den Menschen zu ermöglichen (Laflamme et al. 2007a; Chong et al. 2014; Lalit et al. 2014). Grundsätzlich könnte die Aussagekraft solcher Experimente durch eine höhere Versuchstierzahl sowie eine kontinuierliche und länger andauernde (da evtl. eine Tendenz zur Abnahme von Arrhythmien mit der Zeit nach Transplantation vorliegt) EKG-Aufzeichnung gesteigert werden. Zudem könnten Untersuchungen der elektrischen Kopplung durchgeführt werden, um über das EKG hinaus auch auf zellulärer Ebene Informationen über die elektrophysiologischen Wechselwirkungen des Transplantats mit dem Empfängermyokard zu sammeln. Dies ist vor allem wichtig, da eine elektrische Kopplung und Integration der neuen KM in den Herzmuskel des Empfängers mit synchroner Kontraktion für eine „echte Regeneration“ (bei der die Verbesserung der myokardialen Pumpfunktion auf Zugewinn synchronisierter kontraktile Einheiten und nicht auf parakrinen Mechanismen basiert) vermutlich nötig sind. Ebenfalls müssen diese Kopplung und Integration wahrscheinlich stattfinden, damit das Transplantat das Risiko für Arrhythmien nicht erhöht oder dieses sogar vermindern kann. Der Goldstandard zur Untersuchung der elektrischen Kopplung ist die Nutzung des Calcium-Sensors GCaMP, der über genetische Modifikation mittels Transgen in die hiPSC-KM des hEHTs eingebracht wird, die das Protein daraufhin zu exprimieren beginnen. Eine anschließende Korrelation des GCaMP-Floureszenzsignals mit dem EKG des Empfängerherzens zeigt, ob eine elektrische Kopplung zwischen Transplantat und Empfängermyokard vorliegt (Shiba et al. 2012). Ebenfalls könnte eine immunhistochemische Darstellung der Connexin 43-Expression und somit der Bildung von Gap Junctions zwischen transplantierten KM und KM des Empfängers erfolgen (s.u.; Chen et al. 2009).

Ebenfalls weiter zu erforschen ist der Einfluss des Ortes der KM-Transplantation auf die Fähigkeit zur elektrischen Kopplung. Die epikardiale Applikation führt zur Bildung einer faserigen Kappe, die die transplantierten KM vom Empfängerherz isolieren könnte (Gerbin et al. 2015; Weinberger et al. 2016). Einerseits wurde von Gerbin et al. bei epikardialer

Transplantation keine elektrische Kopplung beobachtet, während diese bei intramyokardialer Applikation auftrat. Dennoch können auch bei intramyokardialer Injektion durch Wundheilungsprozesse isolierende Bereiche entstehen (Hirt et al. 2014b; Gerbin et al. 2015). Andererseits konnte Weinberger et al. bei einem Teil der Versuchstiere nach epikardialer Transplantation von hEHTs trotz isolierender Strukturen im Transplantationsareal eine elektrische Kopplung nachweisen. Der zugrundeliegende Mechanismus war allerdings unklar. Möglicherweise genügen wenige KM zur Herstellung einer elektrischen Kopplung. Eine weitere Erklärung wäre, dass residente Fibroblasten auch in der Lage sein könnten, eine elektrische Kopplung mit KM zu ermöglichen (Kohl und Camelliti 2007; Weinberger et al. 2016). Auch ein Einfluss parakriner Mechanismen, welche die Erregungsleitung über Empfänger-KM durch die Infarktzone verbessern, ist denkbar (Hirt et al. 2014b). Um die elektrische Kopplung zu verbessern, wurde das hEHT auch mit gesundem Myokard an der Infarktgrenze in Kontakt gebracht; ob dies alleine das Problem der elektrischen Integration löst, ist allerdings unklar (Weinberger et al. 2017). Erschwerend kommt bei epikardialen Ansätzen mit Gewebekonstrukten hinzu, dass sowohl das Epikard selbst, als auch eine epithelartige Zellschicht auf den Gewebepatches zusätzliche elektrische Barrieren zwischen transplantierten KM und Empfänger-KM darstellen (Zimmermann et al. 2002a; Hirt et al. 2014b). Weitere systematische Vergleiche zwischen epi- und myo- sowie auch endokardialer Applikation der KM könnten einen wichtigen Informationsgewinn in dieser Frage bedeuten.

Außerdem scheint die immunbedingte Narbenbildung, die zu einer Isolation von Transplantat und Empfängerherz führen könnte, in xenogenen Ansätzen stärker als in allogenen zu sein, weshalb letzteren Strategien der Vorzug gegeben werden sollte (Zimmermann et al. 2006; Shiba et al. 2016). Allerdings gibt es auch Hinweise, dass selbst eine Transplantation von iPSC zwischen genetisch identischen Mäusen eine Immunreaktion auslösen kann (Zhao et al. 2011). Die inflammatorisch-immunologische Reaktion, die zur Narbenbildung führt, ließe sich jedoch gegebenenfalls noch mehr verringern, indem bestimmte, weniger immunogene somatische Zellen als iPSC-Quelle dienen, da dies letztlich einen Einfluss auf die Immunogenität der aus ihnen differenzierten iPSC-KM haben könnte (Liu et al. 2013). Durch genetische Modifikation lassen sich hypoimmunogene iPSC herstellen, die ebenfalls eine deutlich geringere Immunreaktion des Empfängers hervorrufen (Deuse et al. 2019). Zusätzlich könnte es sinnvoll sein, die Art der Applikation der KM möglichst minimal-invasiv zu gestalten, da die Transplantation als Eingriff als solches schon zu einer Entzündung und somit auch zur Entstehung einer elektrisch isolierenden Narbe führen könnte. So entwickelte Montgomery et al. eine Methode zur minimal-invasiven Injektion kompletter funktioneller Muskelgewebe (Montgomery et al. 2017).

Die Beachtung all dieser Aspekte könnte den Erfolg in Hinsicht auf die elektrische Kopplung vergrößern und zudem könnte so das allgemeine Arrhythmie-Risiko (ausgelöst durch

Entzündungsreaktionen auf die Transplantation als Eingriff per se und auf die Implantation der KM (im immunologischen Sinne) vermindert werden. Sollte es trotzdem zu entzündlich bedingten Problemen bei der elektrischen Kopplung und/oder zu Arrhythmien kommen, könnte eine Immunsuppression, zumindest zeitweise, zum Einsatz kommen.

Ein Aspekt, der auch noch genauer untersucht werden sollte, ist der optimale Zeitpunkt der Transplantation der KM hinsichtlich möglicher positiver Effekte auf Pumpfunktion und elektrophysiologische Herzfunktion. Chronisch geschädigte, bereits insuffiziente Herzen, bei denen der Infarkt schon längere Zeit zurück liegt, weisen bereits starkes Remodelling und Organdysfunktionen sowie vermehrte Fibrose auf. Das wiederum verringert die Überlebenschancen der transplantierten KM und die Erfolgsaussichten auf eine korrekte mechanische und elektrische Integration sowie die Entfaltung positiver Effekte durch die Transplantation im Vergleich zur Implantation in akut geschädigte Herzen. So beobachtete Shiba et al. bereits größere Probleme bei der elektromechanischen Kopplung in einem chronischen Infarktmodell als bei Transplantation der Zellen im akuten Modell (Shiba et al. 2014). Hinsichtlich einer klinischen Anwendung entspricht das akute Modell einer Herzinfarkttherapie, während das chronische Modell der Therapie einer bereits progredienten Herzinsuffizienz nahekommt. In beiden Fällen wäre eine effektive Therapie des geschädigten Herzens mit KM natürlich erwünscht, der Erfolg der Behandlung könnte dabei jedoch abhängig vom Zeitpunkt sehr unterschiedlich sein.

4.2 Pro- und antiarrhythmische Mechanismen der kardialen regenerativen Medizin

Die Strategien der kardialen regenerativen Medizin wie die Zell-Therapie und das Tissue Engineering, die das Ziel verfolgen, das geschädigte Empfängerherz durch Integration neuer KM zu therapieren, könnten einerseits das Risiko für Arrhythmien erhöhen, andererseits vor dem Auftreten von Herzrhythmusstörungen schützen. Zuletzt sollen verschiedene potenzielle Mechanismen diskutiert werden, aufgrund derer die Therapie mit aus Stammzellen gewonnenen KM entweder pro- oder antiarrhythmische Effekte entfalten könnte, und welche Schlüsse sich bei einem Teil der Aspekte daraus für zukünftige Experimente und im Endeffekt auch für die klinische Anwendung ziehen lassen könnten. Neben der Angabe einzelner Quellen, beziehen sich folgende Zeilen auf die Übersichtsarbeit von Chen et al. (Chen et al. 2009). Ergänzt wurde die Zusammenfassung der Aspekte der genannten Übersichtsarbeit mit selbst entwickelten Theorien. Viele der Untersuchungen bezogen sich auf KM, die aus ESC gewonnen wurden, jedoch haben aus iPSC generierte KM einen sehr ähnlichen Phänotyp, womit auch eine Übertragbarkeit auf iPSC-KM möglich ist (Zhang et al. 2009; Zwi et al. 2009).

Im Hinblick auf mögliche proarrhythmische Effekte der regenerativen Therapien ist der Aspekt des Reifegrads der transplantierten KM von großer Bedeutung, da aus Stammzellen (PSC, d.h. ESC oder iPSC) gewonnene KM einen unreifen Phänotyp aufweisen. hiPSC-KM und

hESC-KM sind unreife KM mit Charakteristika fetaler KM: Im Vergleich zu adulten KM sind sie kleiner, mit weniger entwickelter Ultrastruktur, geringerer Sarkomer- und Mitochondrien-Dichte, geringerem Ruhemembranpotential, geringerer AP-Anstiegs-Geschwindigkeit und schwächerer/abwesender adrenerger, inotroper Reaktion und zusätzlichem Auftreten spontaner diastolischer Depolarisation und kontraktiler Aktivität (Yang et al. 2014; Weinberger et al. 2017). Hieraus ergeben sich verschiedene theoretische Nachteile hinsichtlich des Risikos für die Entwicklung von Herzrhythmusstörungen bei der Transplantation dieser unreifen KM aus PSC.

Gap Junctions, gebildet aus verschiedenen Connexinen, sind wichtig für die elektrische Kopplung von KM und die elektrische Erregungsleitung im Herzen. Zellen, bspw. skeletale Myoblasten, die keine Gap Junctions bilden können, koppeln nicht elektrisch an das Empfängergewebe und führen zu Rhythmusstörungen (Gepstein et al. 2010). PSC-KM weisen eine unreife Verteilung von Gap Junctions auf, die derer von neonatalen KM ähnlich ist und auch im pathologischen, geschädigten Myokard vorkommt. Die AP-Leitung über diese weniger entwickelten Gap Junctions ist unvorhersehbar und inhomogen und könnte die Anisotropie und das Auftreten von Arrhythmien fördern. Die Studienergebnisse bezüglich einer elektrischen Kopplung differieren stark. So ist, im Vergleich zur Transplantation von PSC-KM in gesundes Myokard, die Chance auf elektrische Kopplung im verletzten Herz grundsätzlich geringer, aber möglich. Allerdings konnte Shiba et al. nachweisen, dass die Erregungsleitungsgeschwindigkeit trotz elektrischer Kopplung von Graft und verletztem Empfängerherz in der Narbenregion verlangsamt war und somit ein Risiko für Reentry-Phänomene darstellt. Die elektrische Kopplung allein ist also nicht ausreichend, um die pathologische Elektrophysiologie in der Infarktregion komplett zu beseitigen (Shiba et al. 2012; Lundy et al. 2014). In unserer vorherigen EHT-Studie konnte nur bei einem Teil der Tiere eine elektrische Integration nachgewiesen werden (Weinberger et al. 2016). Zwei aktuelle Studien, in welchen kardiale Konstrukte transplantiert wurden, konnten hingegen keine elektrische Kopplung bei Ratten beobachten (Shadrin et al. 2017; Jackman et al. 2018). Möglicherweise lässt sich die elektrische Kopplung jedoch positiv durch genetisch induzierte Expression von Connexinen oder durch Methoden, die die Verteilung von Gap Junctions (z.B. elektrische Stimulation, s.u.) verändern, beeinflussen (Roell et al. 2007).

PSC-KM haben zudem irreguläre Zellformen, die nicht der zylindrischen Form adulter KM entsprechen. Zudem sind sie kleiner. Die Zellform hat jedoch Einfluss auf die Erregungsleitung und die maximale Depolarisationsrate des APs. Durch die unterschiedlichen Zellformen und -größen und konsekutiven Änderungen der Größe des interstitiellen Raumes und/oder der Leitungswiderstände, kann sich die Erregungsleitungsgeschwindigkeit verringern. Dies könnte ebenfalls das Risiko für Herzrhythmusstörungen durch Reentry-Kreisläufe erhöhen.

Die Ionenkanal-Ausstattung der KM ist essenziell für eine normale mechanische und elektrophysiologische Herzfunktion. Adulte KM weisen keine Automatie, jedoch trotzdem eine Erregbarkeit auf und haben typischerweise ein hyperpolarisiertes diastolisches Potential, eine lange AP-Dauer und zeigen keine spontane späte Depolarisation in Phase 4 des APs. PSC-KM hingegen zeichnen sich durch die typischen elektrophysiologischen Charakteristika und die Ionenkanal-Ausstattung unreifer neonataler oder fetaler KM aus. Sie zeigen heterogene, sehr variable APs mit unterschiedlicher Dauer. Diese APs ähneln den APs verschiedener KM-Subtypen und können denen der KM des Sinus-Knotens oder anderer Schrittmacherzentren oder auch atrialer oder ventrikulärer KM entsprechen. Aktuelle Differenzierungsprotokolle können jedoch zunehmend gezielt KM mit ventrikulärem Phänotyp und somit ventrikulären elektrophysiologischen Eigenschaften hervorbringen (Breckwoldt et al. 2017; Lemoine et al. 2018; Horvath et al. 2018). Dennoch können die PSC-KM spontane diastolische Depolarisationen und Automatie und somit arrhythmische Aktivitäten aufweisen (Hirt et al. 2012; Lemoine et al. 2018; Ulmer et al. 2018). Zusammen deutet dies darauf hin, dass PSC-KM nach Implantation leicht zu einem automatischen Fokus werden könnten, von dem PVCs ausgehen, womit das Risiko für Herzrhythmusstörungen steigen würde. Patch-Clamp-Experimente von Zhang et al. an ESC-KM zeigten ebenfalls, dass die KM heterogene AP-Phänotypen und spontane Aktivität aufwiesen und sich leicht zur Entwicklung von Arrhythmien anregen ließen. Die iPSC-KM haben zudem eine geringere Repolarisationsreserve (Lemoine et al. 2018).

Auch Zhang et al. kam deshalb zu dem Schluss, dass PSC-KM als arrhythmogene Quelle an allen drei klassischen Mechanismen der Arrhythmie-Entstehung beteiligt sein könnten: Reentry, Automatie und getriggerte Aktivität durch Nachdepolarisation (Zhang et al. 2002). Romagnuolo et al. hält fokale Mechanismen und weniger die Entstehung von Reentry für die primäre Ursache von Arrhythmien nach Transplantation von hESC-KM (Romagnuolo et al. 2019). Dies wurde auch von Liu et al. in einer aktuellen Studie im Großtiermodell an Primaten beschrieben (Liu et al. 2018). Zusammenfassend deutet die aktuelle Datenlage darauf hin, dass den Transplantations-assoziierten Arrhythmien am ehesten fokale Mechanismen, also Automatie sowie getriggerte Aktivität, zugrunde liegen.

Jedoch existieren Hinweise, dass KM durch das EHT-Format u.a. in ihren elektrophysiologischen Ionenkanal- und AP-Eigenschaften und dem Organisationsgrad der Sarkomere in Richtung reiferer, adulter ventrikulärer Stadien gelenkt werden, was einen Vorteil dieser Strategie der KM-Transplantation darstellt (Weinberger et al. 2016; Breckwoldt et al. 2017; Lemoine et al. 2017; Ulmer et al. 2018). Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die KM im hEHT reifen, da die Expression der reifen, adulten ventrikulären Form der Myosin-Leichtkette MLC2V während der Kultivierung im hEHT zunahm (s. 3.1).

Die Identifikation molekularer und genetischer Faktoren, welche die Entwicklung der Ionenkanal-Ausstattung der KM regulieren und auf die Einfluss genommen werden könnte, wäre dementsprechend von großem Wert. Die Überexpression des Schrittmacher-Kanal-Gens *mHCN2* konnte humane mesenchymale Stammzellen zur Bildung von Gap Junctions zum umgebenden Empfängergewebe und zur Generation spontaner Rhythmen anregen (Potapova et al. 2004). Dies zeigt, dass Genmodifikationen von PSC-KM weitere Erfolge bei der Transplantation bringen könnten. In diesem Sinne konnte die forcierte Expression des Kaliumionen-Kanals *Kir2.1*, der normalerweise nicht von Maus-ESC-KM exprimiert wird, ihren elektrophysiologischen Phänotyp verbessern und nach Transplantation auf infarziertes Mausmyokard das Auftreten von spontanen sowie durch programmierte elektrische Stimulation induzierte Arrhythmien vermindern (Liao et al. 2013). Denkbar wäre also, dass die gezielte genetische Überexpression oder der Knock-Out von Schrittmacher-Kanal-Genen in den PSC-KM Automatie vermindern könnte.

Eventuell ließen sich auch iPSC-KM mit weiter optimierten Eigenschaften, z.B. bezüglich Transplantationserfolg und Arrhythmie-Risiko, gewinnen, indem schon KM als Ursprungszellen zur Reprogrammierung zu iPSC genutzt werden. Dies ist denkbar, da wie Xu et al. beschreibt, iPSC trotz Entdifferenzierung epigenetische Eigenschaften ihrer Ursprungszelle beibehalten (Xu et al. 2012). Auch Gao et al. diskutiert, dass iPSC-KM die aus PSC differenziert wurden, deren ursprüngliche Quelle wiederum Zellen der kardialen Linie waren, einen reiferen Entwicklungsstatus aufweisen (Gao et al. 2018). Somit sind iPSC-KM aus KM eventuell geeigneter für die regenerative Therapie als jene aus Fibroblasten.

Das Herz weist eine intrinsische transmurale und regionale elektrische Heterogenität auf. Beispielsweise verändert sich je nach Schicht des Myokards die Ionenkanal-Ausstattung (v.a. der Kaliumionen-Kanäle) und somit auch die Dauer der APs, was zu einer physiologischen transmuralen Dispersion der Repolarisation führt, die für die normale elektromechanische Herzfunktion nötig ist. Werden nun allerdings unreife PSC-KM, deren Kaliumionen-Kanal-Ausstattung nicht vorhersehbar ist, in undefinierte Schichten des Myokards implantiert, kann dies die physiologische transmurale Dispersion der Repolarisation stören und somit möglicherweise Arrhythmien triggern.

Die intrazelluläre Calciumhomöostase ist essenziell für eine optimale Zellfunktion und die elektromechanische Kopplung, welche eine geregelte Kontraktion des Herzmuskels ermöglicht (s. 1.1.4). Imbalance im intrazellulären „Calcium-Handling“ kann zu elektrischem Alternans und späten Nachdepolarisationen führen, die eine Hauptursache für PVCs und ventrikuläre Arrhythmien darstellen (s. 1.3). In PSC-KM sind die RyR (die für die Calcium-induzierte Calcium-Freisetzung aus dem SR bei der elektromechanischen Kopplung zuständig sind) unterentwickelt und dysfunktional, was zu einer gestörten Calciumhomöostase führt und

so Herzrhythmusstörungen hervorrufen kann. Auch Gao et al. sieht dies als eine mögliche Ursache für regionale Heterogenität der Repolarisation und deshalb PSC-KM als arrhythmogene Quelle (Gao et al. 2018).

Neben den genannten Nachteilen hinsichtlich des Arrhythmie-Risikos bei der Implantation unreifer KM ist nichtsdestotrotz zu erwähnen, dass adulte KM eine Transplantation nicht überleben (Reinecke et al. 1999). Hinzu kommt, dass unreife KM auch gewisse Vorteile, wie z.B. Resistenz gegen Hypoxie (wichtig bei zunächst fehlender Vaskularisierung des Transplantats) und gegen oxidativen Stress aufweisen und eventuell auch eine gewisse elektrophysiologische Plastizität besitzen, die es ihnen ermöglicht, sich durch Reifung nach Transplantation an die Umgebung (z.B. hinsichtlich ihrer Ionenkanal-Ausstattung und AP-Eigenschaften) anzupassen (Halbach et al. 2007; Lalit et al. 2014).

Insgesamt ist es also von großer Bedeutung, den optimalen Reifegrad (Balance zwischen Reife für u.a. elektrophysiologische Kompatibilität mit dem Empfängermyokard und Unreife für u.a. Überlebenschancen und Plastizität der KM) für eine Transplantation zu bestimmen und die KM anschließend mittels reifungsbeeinflussender Methoden (z.B. Langzeitkultivierung, Aussetzen gegenüber einer mechanischen Belastung und elektrische Stimulation) in vitro auf die Implantation vorzubereiten, um eine funktionelle, mechanische und elektrische Integration zu ermöglichen (Domian et al. 2009; Tulloch et al. 2011; Hirt et al. 2014a). So konnte z.B. die chronische elektrische Stimulation des EHTs u.a. die Expression von und die Kopplung mittels Gap Junctions verbessern (Hirt et al. 2014a). Die Nutzung sogenannter Biowire-Plattformen könnte dabei von großem Vorteil sein, da hiPSC-KM durch die Kultivierung auf der Plattform reifen und u.a. bessere elektrophysiologische Eigenschaften, weniger Automatie und eine verbesserte Calciumhomöostase aufwiesen (Sun und Nunes 2016). Auch Gao et al. stellte fest, dass sich unter bestimmten Kultivierungsbedingungen (u.a. dynamische Plattform sowie Kokultivierung mit EC und SMC) positiv Einfluss auf die elektrische Kopplung und die Calciumhomöostase nehmen ließ (Gao et al. 2018). Lasher et al. entwickelte einen speziellen Bioreaktor, der durch elektrische Stimulation u.a. die Connexin-43-Expression und somit die Bildung von Gap Junctions verstärkte (Lasher et al. 2012). Das 3D-EHT-Format selbst unterstützt, wie schon erläutert, ebenfalls die Reifung (s.o.). Mittels dieser Methoden könnte man im besten Fall die Ausbildung reiferer Gap Junctions, einer adulten Zellgröße und -form sowie einer reiferen Ionenkanal-Ausstattung (v.a. hinsichtlich der Funktionalität der Kaliumionen-Kanäle und der Calciumhomöostase) und das Vorkommen von weniger Automatie bewirken.

Das alles ist insbesondere wichtig, da es unwahrscheinlich ist, dass geschädigte Herzen eine Umgebung bieten, die allein ausreicht, um unreife, dysfunktionale PSC-KM in einen reifen Zustand zu überführen. Da humane neonatale KM ca. sechs bis zehn Jahre benötigen, um

hinsichtlich Zellgröße und -form sowie Gap Junction-Verteilung einen adulten Status zu erreichen und man vermuten könnte, dass unreife PSC-KM nach Transplantation ebenfalls mehr Zeit (als einige Wochen) benötigen, um zu reifen und Effekte zu entfalten, wären zusätzlich zu Methoden, die die Reifung beeinflussen und beschleunigen, längere Beobachtungszeiten bei zukünftigen Forschungsvorhaben sinnvoll. Für die Sicherheit, v.a. bei klinischen Anwendungen, ist es wichtig, im Sinne einer Qualitätssicherung den Reifegrad der PSC-KM (z.B. durch Untersuchungen der Genexpressionsprofile der Zellen oder durch funktionelle Untersuchungen ihrer Ionenkanal-Eigenschaften mit Patch-Clamp-Experimenten) vor einer Implantation zu bestimmen.

Neben den Problemen, die sich aus der Unreife der KM aus PSC ergeben, existieren weitere Aspekte mit Einfluss auf das Risiko für Arrhythmien bei der regenerativen Therapie. Das Myokard des linken Ventrikels kann in drei Schichten von Muskelfasern unterteilt werden, die verschieden ausgerichtet sind, um eine optimale Pumpfunktion zu gewährleisten. Die neuen KM durch Injektion oder Transplantation eines Gewebekonstruktes korrekt in dieses komplexe Netzwerk zu integrieren, ist schwierig. Ein Misserfolg in dieser Hinsicht könnte neben asynchronen Kontraktionen, einer insuffizienten Pumpfunktion sowie der Entwicklung einer schädlichen Spannung der Muskelfasern ebenfalls zu lokaler elektrischer Dispersion führen und somit zu einem Arrhythmie-Risiko werden. Hinzukommt, dass die transplantierten KM meist Inseln von Gewebe im Empfängermyokard formen, die mechanisch und v.a. elektrisch nicht optimal in den umgebenden Herzmuskel integriert werden. Diese Gewebeareale aus transplantierten KM sind potenzielle Foci von Automatie und verstärken die Dispersion der Erregungsleitungsgeschwindigkeit und Refraktärzeit. Insgesamt erhöhen sie die elektrische Heterogenität in der Narbenregion, könnten zu Leitungsblockaden und Reentry-Kreisläufen führen und somit eventuell auch das Auftreten von Rhythmusstörungen hervorrufen. Die Entwicklung von Applikationsarten, welche die korrekte räumliche Integration der neuen KM ermöglichen, wäre von Vorteil. Ein weiterer, möglicherweise proarrhythmogener Mechanismus ist, dass die Transplantation der Zellen die Einsprossung von sympathischen Nervenfasern verstärken könnte, was wiederum mit der Entstehung von Herzrhythmusstörungen in Verbindung gebracht wurde.

Im Kontrast dazu könnte die regenerative Therapie mit Implantation von PSC-KM jedoch auch antiarrhythmisch wirken. Hauptsächlich, indem sie endogene proarrhythmische Mechanismen, die typischerweise nach Herzinfarkt oder bei einer Herzinsuffizienz auftreten, abschwächen oder sogar aufheben könnte. Neues myokardiales Gewebe könnte, wenn es angemessen in das Empfängermyokard integriert und elektrisch an dieses koppelt, durch Reduktion der Narbengröße und durch elektrische Resynchronisation sowie verminderte elektrische Heterogenität des Narbenareals Herzrhythmusstörungen verhindern. Eine verbesserte linksventrikuläre Pumpfunktion durch die regenerative Therapie könnte selbst schon den

elektrophysiologischen Zustand des Herzens verbessern, elektrisches Remodelling unterbinden und das Risiko für Arrhythmien vermindern (St John et al. 2003). So konnte Weinberger et al. zeigen, dass sich durch die EHT-Transplantation nicht nur die ventrikuläre Pumpfunktion verbessern ließ, sondern dass sich auch das elektrische Remodelling nach Infarkt vermindern und der elektrophysiologische Status (verkürzte ventrikuläre AP-Dauer und schnellere Erregungsleitung) der Herzen mit EHT verbessern ließ (Weinberger et al. 2016). Die regenerative Therapie könnte durch Entstehung neuen Myokards weitere schädliche Remodelling-Prozesse abschwächen und durch Narben entstandene Leitungsblockaden wieder aufheben. Selbst ohne vollständige elektrische Kopplung wäre eine positive Wirkung auf die defekte Erregungsleitung der Empfänger-KM im Infarktareal möglich. Auch bei völliger Abwesenheit einer „echten Regeneration“ könnten diese Effekte durch parakrine Mechanismen (ausgehend von transplantierten KM und/oder Nicht-KM) hervorgerufen werden. Auch denkbar wäre es, dass die PSC-KM-Transplantation letztlich zu einer Normalisierung von dysfunktionalen Ionenkanal-Expressionsmustern im geschädigten Myokard führt. Hinzu kommt, dass durch die Therapie eine Neovaskularisierung stattfinden kann, die wiederum die Ischämie und dadurch das Risiko für Arrhythmien verringern kann. Unterstützt werden könnten die antiarrhythmischen Mechanismen durch eine, mindestens temporäre, antiarrhythmische Therapie (Chen et al. 2009).

4.3 Fazit und Ausblick

Ob pro- oder antiarrhythmische Mechanismen bei der Therapie mit PSC-KM überwiegen, und ob es eine Antwort auf die Frage gibt, ob die Therapie das Risiko für Herzrhythmusstörungen erhöht, ist auf Grundlage des aktuellen Stands der Forschung nicht sicher zu beantworten. Es ist wahrscheinlich, dass sowohl pro-, als auch antiarrhythmische Effekte gleichzeitig vorhanden sind. Möglich wäre dabei ein Übergang von überwiegend pro- zu vermehrt antiarrhythmischen Effekten, sobald das Empfängerherz durch die Therapie zu regenerieren beginnt und sich die transplantierten KM in die neue Umgebung integrieren. Shiba et al. berichtet passend dazu, dass eine Reifung der implantierten KM in vivo nach Transplantation stattfand und es eine Tendenz zur erfolgreichen elektrischen Kopplung über die Zeit geben könnte, weshalb die proarrhythmischen Effekte möglicherweise nur transient vorherrschend sind (Shiba et al. 2012; Shiba et al. 2016). Auch Romagnuolo et al. stellte kürzlich die Hypothese auf, dass die proarrhythmischen Effekte eventuell lediglich von begrenzter Dauer sein könnten. So zeigte sich kurz nach der Transplantation der hESC-KM in infarzierte Herzen von Schweinen eine starke Zunahme von ventrikulären Tachykardien. Diese nahm allerdings einige Wochen später wieder ab. Der wahrscheinlichste Grund hierfür ist, dass eine Reifung der KM nach Transplantation in vivo stattfand, die deren elektrophysiologischen Eigenschaften verbessert und das Risiko für Arrhythmien dadurch in Folge wieder abnimmt. Dies könnte insbesondere möglich sein, da die Arrhythmien wahrscheinlich durch fokale Mechanismen

entstehen, die direkt auf die transplantierten Zellen zurückzuführen sind und nicht auf Reentry-Kreisläufe. Durch einen reiferen elektrischen Phänotyp könnten diese fokalen Mechanismen verhindert werden. Der Autor stellt außerdem in Aussicht, dass es trotz der Gefahr verminderter Fähigkeit zum Engraftment denkbar ist, direkt reifere, elektrisch weniger autonom aktive KM zu transplantieren (Romagnuolo et al. 2019). Die Explantation der transplantierten KM nach einer gewissen Zeit im Empfängerorganismus und die anschließende Untersuchung der Zellen hinsichtlich ihres (elektrophysiologischen) Reifegrades könnte Aufschluss darüber geben, ob diese weitere Reifung in vivo tatsächlich stattfindet und ob diese sogar positiv zu modulieren sein könnte. Im optimalen Fall existieren vorwiegend antiarrhythmische Mechanismen und gleichzeitig ist es möglich, potenziell proarrhythmische Mechanismen durch gezielte Eingriffe (v.a. auf den Prozess der Reifung) zu vermindern, um im Endeffekt insgesamt einen positiven Einfluss auf die Elektrophysiologie des Empfängerherzens durch die regenerative Therapie nehmen zu können.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass aus hiPSC-KM generierte hEHTs eine Transplantation auf infarziertes Myokard von Meerschweinchen überlebten und zu einer partiellen Remuskularisierung des Empfängerherzens führten. Unter kontinuierlichem telemetrischen EKG-Monitoring konnten keine Anzeichen dafür gefunden werden, dass die hEHT-Transplantation verglichen mit der Transplantation zellfreier Kontroll-Konstrukte das Risiko für ventrikuläre Herzrhythmusstörungen erhöht.

Die von uns durchgeführte Studie lässt sich in den aktuellen Stand der Forschung wie folgt (und wie auch in Tabelle 1 dargestellt) einordnen: Bei dem in unserer Studie verwendeten Kleintiermodell Meerschweinchen zeigte sich durch die Transplantation kein erhöhtes Risiko für Arrhythmien, was mit den Ergebnissen der anderen Studien in Kleintiermodellen in Einklang steht. In Großtiermodellen konnte hingegen eher ein negativer Effekt der Transplantation beobachtet werden. In den Studien, in denen Kardiomyozyten als Gewebepatch transplantiert wurden (wie auch in der vorliegenden), zeigte sich in keinem Fall ein proarrhythmischer Effekt des Transplantats, während sich in mehreren Studien mit Zellinjektion vermehrt Arrhythmien beobachten ließen. In unserer Studie wurden sowohl der Umfang der Remuskularisierung als auch der elektrischen Kopplung nicht untersucht, was die Interpretation der Ergebnisse limitiert. Zudem sollten längere Beobachtungszeiten etabliert werden, da es wahrscheinlich aufgrund einer Reifung der Zellen in vivo eine Tendenz zur Abnahme des Arrhythmie-Risikos über die Zeit nach der Transplantation gibt.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass weitere Forschung an den potenziell pro- und antiarrhythmischen Mechanismen der regenerativen Therapien am Herzen nötig ist, um das Risiko für Herzrhythmusstörungen nach kardialem Gewebeersatz noch besser einschätzen zu können. Dies betrifft insbesondere den Einfluss des Reifegrades der transplantierten Zellen auf

die kardiale Elektrophysiologie des Empfängers. Um eine bessere Übertragbarkeit auf den Menschen zu gewährleisten, sollten weitere Versuche zudem im Großtiermodell stattfinden.

	Chong et al., 2014	Shiba et al., 2016	Liu et al., 2018	Ye et al., 2014	Gao et al., 2018	Romagnuolo et al., 2019	Zimmermann et al., 2006	Shiba et al., 2012	Weinberger et al., 2016 (s. auch Abbildung 7)	Gewebeersatz mit hEHTs aus hiPSC-KM (Pecha et al. 2019)
Versuchstiere (Herzmasse, Herzfrequenz nach Chong et. al) (Chong et al. 2014)	Makaken (37-52 g, 100- 130 Schläge pro Minute)	Makaken (37-52 g, 100- 130 Schläge pro Minute)	Makaken (37-52 g, 100- 130 Schläge pro Minute)	Schweine	Schweine	Schweine	Ratten (1 g, 400 Schläge pro Minute)	Meerschweinchen (3 g, 230 Schläge pro Minute)	Meerschweinchen (3 g, 230 Schläge pro Minute)	Meerschweinchen (3 g, 230 Schläge pro Minute)
Zellart	hESC-KM	Makaken- iPSC-KM	hESC-KM	hiPSC-KM, hiPSC-EC, hiPSC-SMC (Arrhythmie- Studien: hiPSC-KM)	hiPSC-KM, hiPSC-EC, hiPSC-SMC	hESC-KM	Neonatale Ratten-KM	hESC-KM	hiPSC-KM, hiPSC-EC/ HUVECs	hiPSC-KM, hiPSC-EC/ HUVECs
Reinheit der Zellen	73±12 %	83,8±1,0 %	86-99 %	KM: >90 %, EC: Keine Daten, SMC: Keine Daten	KM: 96,4 %, EC: >95 %, SMC: 91,5 %	81,9±3,9 %	Natürliche Zellpopulation	63 %	KM: >65 %, EC: >90 %	KM: >65 %, EC: >90 %
Zellzahl	1x10 ⁹	4x10 ⁸	7,5 x10 ⁶	KM: 2x10 ⁶ , EC: 2x10 ⁶ , SMC: 2 x10 ⁶	KM: 4x10 ⁶ , EC: 2x10 ⁶ , SMC: 2x10 ⁶	KM: 1x10 ⁹	15x10 ⁶ (6 EHTs, 2,5x10 ⁶ KM pro EHT)	1x10 ⁸	KM: 10x10 ⁶ , EC/HUVECs: 4x10 ⁶ (2 hEHTs, 5x10 ⁶ KM und 2x10 ⁶ EC pro hEHT)	KM: 10x10 ⁶ , EC/HUVECs: 4x10 ⁶ (2 hEHTs, 5x10 ⁶ KM und 2x10 ⁶ EC pro hEHT)
Verletzung	Ischämie- Reperfusion	Ischämie- Reperfusion	Ischämie- Reperfusion	Ischämie- Reperfusion	Ischämie- Reperfusion	Ischämie- Reperfusion	Ligatur des Ramus interventricularis anterior	Kryo-Verletzung	Kryo-Verletzung	Kryo-Verletzung

	Chong et al., 2014	Shiba et al., 2016	Liu et al., 2018	Ye et al., 2014	Gao et al., 2018	Romagnuolo et al., 2019	Zimmermann et al., 2006	Shiba et al., 2012	Weinberger et al., 2016 (s. auch Abbildung 7)	Gewebeersatz mit hEHTs aus hiPSC-KM (Pecha et al. 2019)
Infarktgröße	5,2±1,5 % des LV (KM-Gruppe)	8,8±1,0 % der LV-Fläche (KM-Gruppe)	19,9±1,1 % der LV-Masse (KM- Gruppe)	Keine Daten	Ca. 7 % des LV (KM- Gruppe)	34±5,8 % der LV- Fläche (KM- Gruppe)	Keine Daten	13,2±0,9 % der LV-Fläche (KM- Gruppe)	22±8 % der LV- Masse (alle Tiere)	16,9±0,1 % (Gruppe der Versuchstiere mit hEHT), 13,9±0,1 % (Gruppe der Versuchstiere mit zellfreiem Kontroll- Konstrukt)
Implantationstechnik	Zell-Injektion	Zell-Injektion	Zell-Injektion	Zell-Injektion + Fibrin/IGF-1- Patch	Transplantation Gewebe Patch	Zell-Injektion	Transplantation Gewebe-Patch	Zell-Injektion	Transplantation Gewebe-Patch	Transplantation Gewebe-Patch
Netto-Engraftment- Rate (Überleben + Proliferation) der KM	Keine Daten (Nach Berechnung von Ye et al., 2014: Ca. 0,7 %)	Keine Daten	Keine Daten	8,97±1,8 %	10,9±1,8 %	Keine Daten	Keine Daten	Keine Daten	18 %	Keine Daten
Aufbau neuen Myokards/ Remuskularisierung	40 % des Infarktvolumens (2,1±1,1 % des LV)	16,3±5,0 % der Narben- Fläche	11,6±2,3 % des Infarktvolumens (2,2±0,7 % des LV)	Keine Daten	Keine Daten	15,2±3,4 % der Narben-Fläche	443±32 µm neues Muskelgewebe aus EHT	8,4±1,5 % der Narben-Fläche	11,9±23,1 % der Narben-Fläche (2,6 % der LV- Masse)	Keine Daten
Funktioneller Effekt (Echokardiographie)	Kein Effekt	Verbesserung der myokardialen Pumpfunktion	Verbesserung der myokardialen Pumpfunktion	Verbesserung der myokardialen Pumpfunktion	Verbesserung der myokardialen Pumpfunktion	Kein Effekt	Verbesserung der myokardialen Pumpfunktion	Verbesserung der myokardialen Pumpfunktion	Verbesserung der myokardialen Pumpfunktion	Keine Daten
Elektrische Kopplung	Bei 100 % der Versuchstiere	Bei 100 % der Versuchstiere	Keine Daten	Keine Daten	Keine Daten	Keine Daten	Bei 100 % der Versuchstiere	Bei 60 % der Versuchstiere	Bei 29 % der Versuchstiere	Keine Daten

	Chong et al., 2014	Shiba et al., 2016	Liu et al., 2018	Ye et al., 2014	Gao et al., 2018	Romagnuolo et al., 2019	Zimmermann et al., 2006	Shiba et al., 2012	Weinberger et al., 2016 (s. auch Abbildung 7)	Gewebeersatz mit hEHTs aus hiPSC-KM (Pecha et al. 2019)
Arrhythmien (EKG)	Proarrhythmischer Effekt (Gehäuftes Auftreten spontaner Arrhythmien trotz Amiodaron-Behandlung)	Proarrhythmischer Effekt (Gehäuftes Auftreten spontaner Arrhythmien)	Kein Effekt (Kein gehäuftes Auftreten spontaner Arrhythmien, kein Auftreten induzierter Arrhythmien unter programmierter elektrischer Stimulation)	Kein Effekt (Kein gehäuftes Auftreten spontaner Arrhythmien, kein Auftreten induzierter Arrhythmien unter programmierter elektrischer Stimulation)	Kein Effekt (Kein gehäuftes Auftreten spontaner Arrhythmien, kein gehäuftes Auftreten induzierter Arrhythmien unter programmierter elektrischer Stimulation)	Proarrhythmischer Effekt (Gehäuftes Auftreten spontaner Arrhythmien)	Kein Effekt (Kein gehäuftes Auftreten spontaner Arrhythmien)	Kein Effekt bzw. antiarrhythmischer Effekt (Kein gehäuftes Auftreten spontaner Arrhythmien, vermindertes Auftreten induzierter Arrhythmien unter programmierter elektrischer Stimulation)	Keine Daten	Kein Effekt (Kein gehäuftes Auftreten spontaner Arrhythmien)

Tabelle 1: Vergleich relevanter Studien der kardialen regenerativen Medizin.

5. Zusammenfassung

Einleitung und Hintergrund: Aus hiPSC-KM generierte hEHTs konnten im Meerschweinchen-Infarkt-Modell die myokardiale Pumpfunktion verbessern. Jedoch existieren keine Daten zum Einfluss der hEHT-Transplantation auf die Elektrophysiologie des Empfängerherzens. In dieser Studie wurde untersucht, ob das hEHT Einfluss auf das Risiko für das Auftreten ventrikulärer Herzrhythmusstörungen nimmt.

Methoden: Aus hiPSC-KM und hiPSC-EC wurden hEHTs generiert. Die Meerschweinchen wurden einer Kryo-Verletzung des Herzens unterzogen und erhielten implantierbare EKG-Transmitter. Sieben Tage nach Kryo-Verletzung wurden entweder zwei hEHTs oder ein zellfreies Kontroll-Konstrukt auf die infarzierten Herzen transplantiert. Ab dem Zeitpunkt der Kryo-Verletzung wurde für den gesamten Beobachtungszeitraum ein kontinuierliches EKG-Monitoring durchgeführt. Die aufgezeichneten EKGs wurden anschließend auf das Auftreten ventrikulärer Herzrhythmusstörungen (PVC, Couplet, Triplet, Non-sustained VT und Sustained VT) hin untersucht, um das Risiko für Herzrhythmusstörungen nach hEHT-Transplantation im Vergleich zur Transplantation zellfreier Kontroll-Konstrukte zu evaluieren.

Ergebnisse und Fazit: Aus hiPSC-KM generierte hEHTs überlebten eine Transplantation auf infarziertes Myokard und führten zu einer partiellen Remuskularisierung der Herzen. Im Vergleich mit der Transplantation zellfreier Kontroll-Konstrukte zeigten sich im kontinuierlichen telemetrischen EKG-Monitoring keine Anzeichen dafür, dass die hEHT-Transplantation das Risiko für das Auftreten der Gesamtzahl aller ventrikulären Herzrhythmusstörungen oder für das Auftreten der einzelnen Arrhythmie-Subtypen signifikant erhöhte. Diese Ergebnisse liefern erste Beweise für die elektrophysiologische Sicherheit von aus humanen iPSC-KM generierten EHTs, weshalb eine Weiterentwicklung dieser Methode vielversprechend erscheint. Experimente mit hEHTs an Großtier-Modellen und weitere Forschung an den potenziell pro- und antiarrhythmischen Mechanismen der regenerativen Therapie am Herzen sind nötig, um das Risiko für Herzrhythmusstörungen nach kardialen Gewebeersatz noch besser einschätzen zu können.

6. Summary

Introduction and background: Human iPSC-CM-derived engineered heart tissue (hEHT) has been shown to improve left ventricular function in a guinea pig cryo-injury model. However, there are no data regarding the influence of the hEHT on the electrophysiology of the recipient's heart. This study investigated the risk of ventricular arrhythmias after hEHT transplantation.

Methods: hEHTs were generated from hiPSC-CMs and hiPSC-ECs. Left ventricular cryo-injury was induced in guinea pigs and telemetry sensors for continuous ECG monitoring were implanted. Seven days following cryo-injury, two hEHTs or one cell-free construct were transplanted into the surviving animals. ECGs were recorded over the following 28 days. Recordings were analyzed for ventricular arrhythmias (PVC, couplet, triplet, non-sustained VT and sustained VT) in order to evaluate the risk of arrhythmias after hEHT transplantation compared to transplantation of cell-free constructs.

Results and conclusion: Transplanted hiPSC-CM survived and remuscularized injured hearts in a guinea pig cryo-injury model. There was no difference in incidence of ventricular arrhythmias (not in total number nor within subgroups). These results provide first evidence for the electrical safety of hiPSC-CM-derived EHTs, thereby supporting further development of this approach. Additional electrophysiological studies in large animal models and further investigation of pro- and antiarrhythmic effects of hEHT transplantation will be necessary to evaluate the risk of arrhythmias following cardiac regenerative therapies.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AP	Aktionspotential
ATP	Adenosintriphosphat
AV-Block	Atrioventrikulärer Block
aVF	Augmented Voltage Foot
AV-Knoten/-Überleitung	Atrioventrikular-Knoten/-Überleitung
aVL	Augmented Voltage Left
aVR	Augmented Voltage Right
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BMP-4	Bone Morphogenetic Protein-4
CD45	Cluster of Differentiation 45
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DHPR	Dihydropyridin-Rezeptor
EB/s	Embryoid Body/Bodies, Embryoidkörperchen
EC	Endothelial Cell/s, Endothelzelle/n
EKG	Elektrokardiogramm
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAC	Fractional Area Change
hEET	Humanes Engineered Endothelial Tissue
(h)(i)PSC	(human) (induced) Pluripotent Stem Cell/s, (humane) (induzierte) Pluripotente Stammzelle/n
(h)(NT-)ESC	(human/e) (Nuclear Transfer-) Embryonic Stem Cell/s, (Kern Transfer-) Embyronale Stammzelle/n
(h)EHT	(human/es) Engineered Heart Tissue
HUVEC/s	Human Umbilical Vein Endothelial Cell/s, Humane Nabelvenen-Endothelzelle/n

Abkürzung	Bedeutung
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
(i)KM	(induzierte) Kardiomyozyt/en
KLF4	Krüppel-Like Factor 4
LV	Linker Ventrikel
LVAD	Left Ventricular Assist Device, Linksventrikuläres Herzunterstützungssystem
LVIDd	Left Ventricular Inner Diastolic Diameter
MACS	Magnetic Cell Separation, Magnetische Zellseparation
MLC2A/2V	Myosin Light Chain 2A/2V, Myosin-leichte- Kette 2A/2V
O ₂	Sauerstoff
OCT3/4	Octamer binding transcription factor 3/4
OP	Operation
PGSC	Parthenogenetic Stem Cells, Parthenogenetische Stammzellen
PSC	Prosurvival Cocktail
PVC	Premature Ventricular Contraction, Ventrikuläre Extrasystole
RNA	Ribonucleic Acid, Ribonukleinsäure (RNS)
RyR	Ryanodin-Rezeptor
SA-Block	Sinuatraler Block
SERCA	Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase, Calciumpumpe des sarcoplasmatischen und endoplasmatischen Reticulums
SMC	Smooth Muscle Cell/s, Glatte Muskelzelle/n
SOX2	Sex determining region Y (SRY)-box 2
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum

Abkürzung	Bedeutung
(Sus/Non-sus) VT	(Sustained/Non-sustained) Ventricular Tachycardia, Anhaltende/Nicht-anhaltende Ventrikuläre Tachykardie
TF/s	Transkriptionsfaktor/en
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VF	Ventricular Fibrillation, Kammerflimmern

8. Literaturverzeichnis

Ali SR, Hippenmeyer S, Saadat LV, Luo L, Weissman IL, Ardehali R (2014) Existing cardiomyocytes generate cardiomyocytes at a low rate after birth in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 8850-8855.

Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, Wurzinger LJ, Wesker K, Voll M, Vanselow H, Baum K, Lackner C (2010) *Anatomie*. Thieme, Stuttgart.

Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S, Frisen J (2009) Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*, 324: 98-102.

Bergmann O, Zdunek S, Felker A, Salehpour M, Alkass K, Bernard S, Sjöström SL, Szewczykowska M, Jackowska T, Dos RC, Malm T, Andra M, Jashari R, Nyengaard JR, Possnert G, Jovinge S, Druid H, Frisen J (2015) Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell*, 161: 1566-1575.

Bigger JT, Jr., Dresdale FJ, Heissenbuttel RH, Weld FM, Wit AL (1977) Ventricular arrhythmias in ischemic heart disease: mechanism, prevalence, significance, and management. *Prog Cardiovasc Dis*, 19: 255-300.

Breckwoldt K, Letuffe-Breniere D, Mannhardt I, Schulze T, Ulmer B, Werner T, Benzin A, Klampe B, Reinsch MC, Laufer S, Shibamiya A, Prondzynski M, Mearini G, Schade D, Fuchs S, Neuber C, Kramer E, Saleem U, Schulze ML, Rodriguez ML, Eschenhagen T, Hansen A (2017) Differentiation of cardiomyocytes and generation of human engineered heart tissue. *Nat Protoc*, 12: 1177-1197.

Breckwoldt K, Weinberger F, Eschenhagen T (2016) Heart regeneration. *Biochim Biophys Acta*, 1863: 1749-1759.

Chen HS, Kim C, Mercola M (2009) Electrophysiological challenges of cell-based myocardial repair. *Circulation*, 120: 2496-2508.

Chen O und Qian L (2015) Direct Cardiac Reprogramming: Advances in Cardiac Regeneration. *Biomed Res Int*, 2015: 580406.

Chong JJ, Yang X, Don CW, Minami E, Liu YW, Weyers JJ, Mahoney WM, Van BB, Cook SM, Palpant NJ, Gantz JA, Fugate JA, Muskheli V, Gough GM, Vogel KW, Astley CA, Hotchkiss CE, Baldessari A, Pabon L, Reinecke H, Gill EA, Nelson V, Kiem HP, Laflamme MA, Murry CE (2014) Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature*, 510: 273-277.

Clifford DM, Fisher SA, Brunskill SJ, Doree C, Mathur A, Watt S, Martin-Rendon E (2012) Stem cell treatment for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst Rev*, CD006536.

Deuse T, Hu X, Gravina A, Wang D, Tediashvili G, De C, Thayer WO, Wahl A, Garcia JV, Reichenspurner H, Davis MM, Lanier LL, Schrepfer S (2019) Hypoimmunogenic derivatives of induced pluripotent stem cells evade immune rejection in fully immunocompetent allogeneic recipients. *Nat Biotechnol*, 37: 252-258.

Domian IJ, Chiravuri M, van der MP, Feinberg AW, Shi X, Shao Y, Wu SM, Parker KK, Chien KR (2009) Generation of functional ventricular heart muscle from mouse ventricular progenitor cells. *Science*, 326: 426-429.

Eschenhagen T, Eder A, Vollert I, Hansen A (2012) Physiological aspects of cardiac tissue engineering. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 303: H133-H143.

Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, Scholz H, Wattchow J, Weil J, Zimmermann W, Dohmen HH, Schafer 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: 683-694.

Gao L, Gregorich ZR, Zhu W, Mattapally S, Oduk Y, Lou X, Kannappan R, Borovjagin AV, Walcott GP, Pollard AE, Fast VG, Hu X, Lloyd SG, Ge Y, Zhang J (2018) Large Cardiac Muscle Patches Engineered From Human Induced-Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Cells Improve Recovery From Myocardial Infarction in Swine. *Circulation*, 137: 1712-1730.

Garbern JC und Lee RT (2013) Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration. *Cell Stem Cell*, 12: 689-698.

Gepstein L, Ding C, Rahmutula D, Wilson EE, Yankelson L, Caspi O, Gepstein A, Huber I, Olgin JE (2010) In vivo assessment of the electrophysiological integration and arrhythmogenic risk of myocardial cell transplantation strategies. *Stem Cells*, 28: 2151-2161.

Gerbin KA, Yang X, Murry CE, Coulombe KL (2015) Enhanced Electrical Integration of Engineered Human Myocardium via Intramyocardial versus Epicardial Delivery in Infarcted Rat Hearts. *PLoS One*, 10: e0131446.

Gilsbach R, Preissl S, Gruning BA, Schnick T, Burger L, Benes V, Wurch A, Bonisch U, Gunther S, Backofen R, Fleischmann BK, Schubeler D, Hein L (2014) Dynamic DNA methylation orchestrates cardiomyocyte development, maturation and disease. *Nat Commun*, 5: 5288.

Gößwald A, Schienkiewitz A, Nowossadeck E, Busch MA (2013) Prävalenz von Herzinfarkt und koronarer Herzkrankheit bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland. Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsbl*, 56: 650-655.

Halbach M, Pfannkuche K, Pillekamp F, Ziomka A, Hannes T, Reppel M, Hescheler J, Müller-Ehmsen J (2007) Electrophysiological maturation and integration of murine fetal cardiomyocytes after transplantation. *Circ Res*, 101: 484-492.

Hansen A, Eder A, Bonstrup M, Flato M, Mewe M, Schaaf S, Aksehirlioglu B, Schwoerer AP, Uebeler J, Eschenhagen T (2010) Development of a drug screening platform based on engineered heart tissue. *Circ Res*, 107: 35-44.

Harkness JR, Morrow DA, Braunwald E, Ren F, Lopez-Sendon J, Bode C, Budaj A, Scirica BM (2011) Myocardial ischemia and ventricular tachycardia on continuous electrocardiographic monitoring and risk of cardiovascular outcomes after non-ST-segment elevation acute coronary syndrome (from the MERLIN-TIMI 36 Trial). *Am J Cardiol*, 108: 1373-1381.

Herold G (2013) *Innere Medizin*, Herold, Gerd, Köln.

Hirt MN, Boeddinghaus J, Mitchell A, Schaaf S, Bornchen C, Müller C, Schulz H, Hubner N, Stenzig J, Stoehr A, Neuber C, Eder A, Luther PK, Hansen A, Eschenhagen T (2014a) Functional improvement and maturation of rat and human engineered heart tissue by chronic electrical stimulation. *J Mol Cell Cardiol*, 74: 151-161.

Hirt MN, Hansen A, Eschenhagen T (2014b) Cardiac tissue engineering: state of the art. *Circ Res*, 114: 354-367.

Hirt MN, Sorensen NA, Bartholdt LM, Boeddinghaus J, Schaaf S, Eder A, Vollert I, Stohr 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.

Horvath A, Lemoine MD, Loser A, Mannhardt I, Flenner F, Uzun AU, Neuber C, Breckwoldt K, Hansen A, Girdauskas E, Reichenspurner H, Willems S, Jost N, Wettwer E, Eschenhagen T, Christ T (2018) Low Resting Membrane Potential and Low Inward Rectifier Potassium Currents Are Not Inherent Features of hiPSC-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cell Reports*, 10: 822-833.

Jackman CP, Ganapathi AM, Asfour H, Qian Y, Allen BW, Li Y, Bursac N (2018) Engineered cardiac tissue patch maintains structural and electrical properties after epicardial implantation. *Biomaterials*, 159: 48-58.

Kawamura M, Miyagawa S, Miki K, Saito A, Fukushima S, Higuchi T, Kawamura T, Kuratani T, Daimon T, Shimizu T, Okano T, Sawa Y (2012) Feasibility, safety, and therapeutic efficacy of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte sheets in a porcine ischemic cardiomyopathy model. *Circulation*, 126: S29-S37.

Katz AM (2011) *Physiology of the heart*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins Health, Philadelphia, PA.

Kempf H, Kropp C, Olmer R, Martin U, Zweigerdt R (2015) Cardiac differentiation of human pluripotent stem cells in scalable suspension culture. *Nat Protoc*, 10: 1345-1361.

Kirklin JK, Naftel DC, Pagani FD, Kormos RL, Stevenson LW, Blume ED, Myers SL, Miller MA, Baldwin JT, Young JB (2015) Seventh INTERMACS annual report: 15,000 patients and counting. *J Heart Lung Transplant*, 34: 1495-1504.

Klinke R, Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S (2010) *Physiologie*. Thieme, Stuttgart.

Kohl P und Camelliti P (2007) Cardiac myocyte-nonmyocyte electrotonic coupling: implications for ventricular arrhythmogenesis. *Heart Rhythm*, 4: 233-235.

Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, Reinecke H, Xu C, Hassanipour M, Police S, O'Sullivan C, Collins L, Chen Y, Minami E, Gill EA, Ueno S, Yuan C, Gold J, Murry CE (2007a) Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol*, 25: 1015-1024.

Laflamme MA und Murry CE (2011) Heart regeneration. *Nature*, 473: 326-335.

Laflamme MA, Zbinden S, Epstein SE, Murry CE (2007b) Cell-based therapy for myocardial ischemia and infarction: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Pathol*, 2: 307-339.

Lalit PA, Hei DJ, Raval AN, Kamp TJ (2014) Induced pluripotent stem cells for post-myocardial infarction repair: remarkable opportunities and challenges. *Circ Res*, 114: 1328-1345.

Lasher RA, Pahnke AQ, Johnson JM, Sachse FB, Hitchcock RW (2012) Electrical stimulation directs engineered cardiac tissue to an age-matched native phenotype. *J Tissue Eng*, 3: 2041731412455354.

Lemoine MD, Krause T, Koivumaki JT, Prondzynski M, Schulze ML, Girdauskas E, Willems S, Hansen A, Eschenhagen T, Christ T (2018) Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Engineered Heart Tissue as a Sensitive Test System for QT Prolongation and Arrhythmic Triggers. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 11: e006035.

Lemoine MD, Mannhardt I, Breckwoldt K, Prondzynski M, Flenner F, Ulmer B, Hirt MN, Neuber C, Horvath A, Kloth B, Reichenspurner H, Willems S, Hansen A, Eschenhagen T, Christ T (2017) Human iPSC-derived cardiomyocytes cultured in 3D engineered heart tissue show physiological upstroke velocity and sodium current density. *Sci Rep*, 7: 5464.

Levick JR (2010) *An Introduction to Cardiovascular Physiology*. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL.

Li Y, He L, Huang X, Bhaloo SI, Zhao H, Zhang S, Pu W, Tian X, Li Y, Liu Q, Yu W, Zhang L, Liu X, Liu K, Tang J, Zhang H, Cai D, Ralf AH, Xu Q, Lui KO, Zhou B (2018) Genetic Lineage Tracing of Nonmyocyte Population by Dual Recombinases. *Circulation*, 138: 793-805.

Liao SY, Tse HF, Chan YC, Mei-Chu YP, Zhang Y, Liu Y, Li RA (2013) Overexpression of Kir2.1 channel in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes attenuates posttransplantation proarrhythmic risk in myocardial infarction. *Heart Rhythm*, 10: 273-282.

Liu P, Chen S, Li X, Qin L, Huang K, Wang L, Huang W, Li S, Jia B, Zhong M, Pan G, Cai J, Pei D (2013) Low immunogenicity of neural progenitor cells differentiated from induced pluripotent stem cells derived from less immunogenic somatic cells. *PLoS One*, 8: e69617.

Liu YW, Chen B, Yang X, Fugate JA, Kalucki FA, Futakuchi-Tsuchida A, Couture L, Vogel KW, Astley CA, Baldessari A, Ogle J, Don CW, Steinberg ZL, Seslar SP, Tuck SA, Tsuchida H, Naumova AV, Dupras SK, Lyu MS, Lee J, Hailey DW, Reinecke H, Pabon L, Fryer BH, Maclellan WR, Thies RS, Murry CE (2018) Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates. *Nat Biotechnol*, 36: 597-605.

Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Barker-Collo S, Bartels DH, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Bin AA, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, Burch M, Burney P, Carapetis J, Chen H, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahodwala N, De LD, Degenhardt L, Delossantos A, Denenberg J, Des J, Dharmaratne SD, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Erwin PJ, Espindola P, Ezzati M, Feigin V, Flaxman AD, Forouzanfar MH, Fowkes FG, Franklin R, Fransen M, Freeman MK, Gabriel SE, Gakidou E, Gaspari F, Gillum RF, Gonzalez-Medina D, Halasa YA, Haring D, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Hoen B, Hotez PJ, Hoy D, Jacobsen KH, James SL, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Karthikeyan G, Kassebaum N, Keren A, Khoo JP, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Lipnick M, Lipshultz SE, Ohno SL, Mabweijano J, MacIntyre MF, Mallinger L, March L, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGrath J, Mensah GA, Merriman TR, Michaud C, Miller M, Miller TR, Mock C, Mocumbi AO, Mokdad AA, Moran A, Mulholland K, Nair MN, Naldi L, Narayan KM, Nasser K, Norman P, O'Donnell M, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Phillips D, Pierce K, Pope CA, III, Porrini E, Pourmalek F, Raju M, Ranganathan D, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Rivara FP, Roberts T, De Leon FR, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Salomon JA, Sampson U, Sanman E, Schwebel DC, Segui-Gomez M, Shepard DS, Singh D, Singleton J, Sliwa K, Smith E, Steer A, Taylor JA, Thomas B, Tleyjeh IM, Towbin JA, Truelsen T, Undurraga EA, Venketasubramanian N, Vijayakumar L, Vos T, Wagner GR, Wang M, Wang W, Watt K, Weinstock MA, Weintraub R, Wilkinson JD, Woolf AD, Wulf S, Yeh PH, Yip P, Zabetian A, Zheng ZJ, Lopez AD, Murray CJ, AlMazroa MA, Memish ZA (2012) Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380: 2095-2128.

Lundy SD, Gantz JA, Pagan CM, Filice D, Laflamme MA (2014) Pluripotent stem cell derived cardiomyocytes for cardiac repair. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*, 16: 319.

Ly HQ und Nattel S (2009) Stem cells are not proarrhythmic: letting the genie out of the bottle. *Circulation*, 119: 1824-1831.

Malliaras K, Zhang Y, Seinfeld J, Galang G, Tseliou E, Cheng K, Sun B, Aminzadeh M, Marban E (2013) Cardiomyocyte proliferation and progenitor cell recruitment underlie therapeutic regeneration after myocardial infarction in the adult mouse heart. *EMBO Mol Med*, 5: 191-209.

Mann DL, Lee RJ, Coats AJ, Neagoe G, Dragomir D, Pusineri E, Piredda M, Bettari L, Kirwan BA, Dowling R, Volterrani M, Solomon SD, Sabbah HN, Hinson A, Anker SD (2016) One-year follow-up results from AUGMENT-HF: a multicentre randomized controlled clinical trial of the efficacy of left ventricular augmentation with Algisyl in the treatment of heart failure. *Eur J Heart Fail*, 18: 314-325.

Masumoto H, Ikuno T, Takeda M, Fukushima H, Marui A, Katayama S, Shimizu T, Ikeda T, Okano T, Sakata R, Yamashita JK (2014) Human iPS cell-engineered cardiac tissue sheets with cardiomyocytes and vascular cells for cardiac regeneration. *Sci Rep*, 4: 6716.

Mollova M, Bersell K, Walsh S, Savla J, Das LT, Park SY, Silberstein LE, Dos Remedios CG, Graham D, Colan S, Kuhn B (2013) Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 1446-1451.

Montgomery M, Ahadian S, Davenport HL, Lo RM, Civitarese RA, Vanderlaan RD, Wu J, Reis LA, Momen A, Akbari S, Pahnke A, Li RK, Caldarone CA, Radisic M (2017) Flexible shape-memory scaffold for minimally invasive delivery of functional tissues. *Nat Mater*, 16: 1038-1046.

Müller-Werdan U und Werdan K (2016) Chronische Herzinsuffizienz: Die Zahl der Patienten steigt, aber auch die differenzierter Therapien. *Dtsch Arztebl*, 113.

Muntwyler J, Abetel G, Gruner C, Follath F (2002) One-year mortality among unselected outpatients with heart failure. *Eur Heart J*, 23: 1861-1866.

Pecha S, Eschenhagen T, Reichenspurner H (2016) Myocardial tissue engineering for cardiac repair. *J Heart Lung Transplant*, 35: 294-298.

Pecha S, Yorgan K, Rohl M, Geertz B, Hansen A, Weinberger F, Sehner S, Ehmke H, Reichenspurner H, Eschenhagen T, Schwoerer AP (2019) Human iPS cell-derived engineered heart tissue does not affect ventricular arrhythmias in a guinea pig cryo-injury model. *Sci Rep*, 9: 9831.

Pinto AR, Ilinykh A, Ivey MJ, Kuwabara JT, D'Antoni ML, Debuque R, Chandran A, Wang L, Arora K, Rosenthal NA, Tallquist MD (2016) Revisiting Cardiac Cellular Composition. *Circ Res*, 118: 400-409.

Potapova I, Plotnikov A, Lu Z, Danilo P, Jr., Valiunas V, Qu J, Doronin S, Zuckerman J, Shlapakova IN, Gao J, Pan Z, Herron AJ, Robinson RB, Brink PR, Rosen MR, Cohen IS (2004) Human mesenchymal stem cells as a gene delivery system to create cardiac pacemakers. *Circ Res*, 94: 952-959.

Reinecke H, Zhang M, Bartosek T, Murry CE (1999) Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts. *Circulation*, 100: 193-202.

Röhl MM (2017) Studienarbeit Regenerative Medizin am Herz - Stand der Forschung, Hamburg.

Roell W, Lewalter T, Sasse P, Tallini YN, Choi BR, Breitbach M, Doran R, Becher UM, Hwang SM, Bostani T, von MJ, Hofmann A, Reining S, Eiberger B, Gabris B, Pfeifer A, Welz A, Willecke K, Salama G, Schrickel JW, Kotlikoff MI, Fleischmann BK (2007) Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia. *Nature*, 450: 819-824.

Romagnuolo R, Masoudpour H, Porta-Sanchez A, Qiang B, Barry J, Laskary A, Qi X, Masse S, Magtibay K, Kawajiri H, Wu J, Valdman ST, Rothberg J, Panchalingam KM, Titus E, Li RK, Zandstra PW, Wright GA, Nanthakumar K, Ghugre NR, Keller G, Laflamme MA (2019) Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Regenerate the Infarcted Pig Heart but Induce Ventricular Tachyarrhythmias. *Stem Cell Reports*, 12: 967-981.

Senyo SE, Lee RT, Kuhn B (2014) Cardiac regeneration based on mechanisms of cardiomyocyte proliferation and differentiation. *Stem Cell Res*, 13: 532-541.

Senyo SE, Steinhauser ML, Pizzimenti CL, Yang VK, Cai L, Wang M, Wu TD, Guerquin-Kern JL, Lechene CP, Lee RT (2013) Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature*, 493: 433-436.

Shadrin IY, Allen BW, Qian Y, Jackman CP, Carlson AL, Juhas ME, Bursac N (2017) Cardiopatch platform enables maturation and scale-up of human pluripotent stem cell-derived engineered heart tissues. *Nat Commun*, 8: 1825.

Shiba Y, Fernandes S, Zhu WZ, Filice D, Muskheli V, Kim J, Palpant NJ, Gantz J, Moyes KW, Reinecke H, Van BB, Dardas T, Mignone JL, Izawa A, Hanna R, Viswanathan M, Gold JD, Kotlikoff MI, Sarvazyan N, Kay MW, Murry CE, Laflamme MA (2012) Human ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. *Nature*, 489: 322-325.

Shiba Y, Filice D, Fernandes S, Minami E, Dupras SK, Biber BV, Trinh P, Hirota Y, Gold JD, Viswanathan M, Laflamme MA (2014) Electrical Integration of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in a Guinea Pig Chronic Infarct Model. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 19: 368-381.

Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T, Wada Y, Ichimura H, Tanaka Y, Ogasawara T, Okada K, Shiba N, Sakamoto K, Ido D, Shiina T, Ohkura M, Nakai J, Uno N, Kazuki Y, Oshimura M, Minami I, Ikeda U (2016) Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature*, 538: 388-391.

Shiotani M, Harada T, Abe J, Hamada Y, Horii I (2007) Methodological validation of an existing telemetry system for QT evaluation in conscious guinea pigs. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 55: 27-34.

Shiotani M, Harada T, Abe J, Sawada Y, Hashimoto K, Hamada Y, Horii I (2005) Practical application of guinea pig telemetry system for QT evaluation. *J Toxicol Sci*, 30: 239-247.

St John SM, Lee D, Rouleau JL, Goldman S, Plappert T, Braunwald E, Pfeffer MA (2003) Left ventricular remodeling and ventricular arrhythmias after myocardial infarction. *Circulation*, 107: 2577-2582.

Sun X und Nunes SS (2016) Biowire platform for maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Methods*, 101: 21-26.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131: 861-872.

Takahashi K und Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126: 663-676.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282: 1145-1147.

Tulloch NL, Muskheli V, Razumova MV, Korte FS, Regnier M, Hauch KD, Pabon L, Reinecke H, Murry CE (2011) Growth of engineered human myocardium with mechanical loading and vascular coculture. *Circ Res*, 109: 47-59.

Ulmer BM, Stoehr A, Schulze ML, Patel S, Gucek M, Mannhardt I, Funcke S, Murphy E, Eschenhagen T, Hansen A (2018) Contractile Work Contributes to Maturation of Energy Metabolism in hiPSC-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cell Reports*, 10: 834-847.

Walker MJ, Curtis MJ, Hearse DJ, Campbell RW, Janse MJ, Yellon DM, Cobbe SM, Coker SJ, Harness JB, Harron DW, . (1988) The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res*, 22: 447-455.

Weinberger F, Breckwoldt K, Pecha S, Kelly A, Geertz B, Starbatty J, Yorgan T, Cheng KH, Lessmann K, Stolen T, Scherrer-Crosbie M, Smith G, Reichenspurner H, Hansen A, Eschenhagen T (2016) Cardiac repair in guinea pigs with human engineered heart tissue from induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med*, 8: 363ra148.

Weinberger F, Mannhardt I, Eschenhagen T (2017) Engineering Cardiac Muscle Tissue: A Maturing Field of Research. *Circ Res*, 120: 1487-1500.

WHO (2014) Global status report on noncommunicable diseases 2014.

Wilhelm MJ (2015) Long-term outcome following heart transplantation: current perspective. *J Thorac Dis*, 7: 549-551.

Xu H, Yi BA, Wu H, Bock C, Gu H, Lui KO, Park JH, Shao Y, Riley AK, Domian IJ, Hu E, Willette R, Lepore J, Meissner A, Wang Z, Chien KR (2012) Highly efficient derivation of ventricular cardiomyocytes from induced pluripotent stem cells with a distinct epigenetic signature. *Cell Res*, 22: 142-154.

Yamanaka S und Blau HM (2010) Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature*, 465: 704-712.

Yang X, Pabon L, Murry CE (2014) Engineering adolescence: maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ Res*, 114: 511-523.

Ye L, Chang YH, Xiong Q, Zhang P, Zhang L, Somasundaram P, Lepley M, Swingen C, Su L, Wendel JS, Guo J, Jang A, Rosenbush D, Greder L, Dutton JR, Zhang J, Kamp TJ, Kaufman DS, Ge Y, Zhang J (2014) Cardiac repair in a porcine model of acute myocardial infarction with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular cells. *Cell Stem Cell*, 15: 750-761.
Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, Koonce CH, Yu J, Palecek SP, Thomson JA, Kamp TJ (2009) Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res*, 104: e30-e41.

Zhang J, Zhu W, Radisic M, Vunjak-Novakovic G (2018) Can We Engineer a Human Cardiac Patch for Therapy? *Circ Res*, 123: 244-265.

Zhang YM, Hartzell C, Narlow M, Dudley SC, Jr. (2002) Stem cell-derived cardiomyocytes demonstrate arrhythmic potential. *Circulation*, 106: 1294-1299.

Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y (2011) Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*, 474: 212-215.

Zimmermann WH, Didie 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: 1151-1157.

Zimmermann WH, Melnychenko I, Wasmeier G, Didie 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: 452-458.

Zimmermann WH, Schneiderbanger K, Schubert P, Didie M, Munzel F, Heubach JF, Kostin S, Neuhuber WL, Eschenhagen T (2002b) Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ Res*, 90: 223-230.

Zwi L, Caspi O, Arbel G, Huber I, Gepstein A, Park IH, Gepstein L (2009) Cardiomyocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Circulation*, 120: 1513-1523.

Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Mann DL, Tomaselli GF, Braunwald E (2019) Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine. Elsevier, Philadelphia, PA.

9. Anhang

Zusatztable 1:

Gruppe	Versuchstier	Körpertemperatur				
		Anzahl Werte	Minimum	Maximum	Median	Durchschnitt
Zellfreies Kontroll-Konstrukt	Versuchstier 1	9670	33,80	39,80	38,50	38,52
	Versuchstier 2	8310	36,10	40,00	38,40	38,47
	Versuchstier 3	8445	36,40	39,90	38,80	38,77
	Versuchstier 9	9738	35,60	41,40	37,80	37,83
	Versuchstier 10	9732	33,70	40,10	38,00	38,04
	Versuchstier 12	9699	35,90	42,00	38,30	38,29
	Versuchstier 31	9418	33,22	39,92	38,45	38,40
	Versuchstier 32	9411	36,00	40,45	38,40	38,42
hEHT	Versuchstier 4	7924	34,50	39,90	38,40	38,43
	Versuchstier 6	7983	35,10	40,30	38,40	38,43
	Versuchstier 16	9859	35,87	40,49	38,72	38,76
	Versuchstier 17	10007	34,48	40,13	37,75	37,90
	Versuchstier 18	10027	35,20	40,32	38,67	38,63
	Versuchstier 20	9800	35,30	42,61	38,45	38,49
	Versuchstier 22	9686	30,61	44,99	38,60	38,72
	Versuchstier 24	9831	36,28	40,40	38,90	38,83
	Versuchstier 25	9857	35,99	44,85	38,88	38,89
	Versuchstier 30	9414	35,42	40,55	38,99	38,99
Gruppe	Versuchstier	Physische Aktivität				
		Anzahl Werte	Minimum	Maximum	Median	Durchschnitt
Zellfreies Kontroll-Konstrukt	Versuchstier 1	9736	0,0	107,0	1,0	2,5
	Versuchstier 2	8480	0,0	54,0	1,0	1,9
	Versuchstier 3	8482	0,0	72,2	0,8	2,0
	Versuchstier 9	9777	0,0	135,8	0,6	2,4
	Versuchstier 10	9731	0,0	210,0	0,6	3,3
	Versuchstier 12	9763	0,0	189,6	1,4	3,7
	Versuchstier 31	9400	0,0	212,3	0,0	2,0
	Versuchstier 32	9384	0,0	362,6	0,0	4,2
hEHT	Versuchstier 4	7916	0,0	105,2	1,0	2,5
	Versuchstier 6	7975	0,0	221,6	0,2	1,8
	Versuchstier 16	9835	0,0	157,4	0,0	4,3
	Versuchstier 17	9986	0,0	185,9	0,0	3,0
	Versuchstier 18	10016	0,0	297,6	0,0	2,2
	Versuchstier 20	9751	0,0	239,7	0,0	3,0
	Versuchstier 22	9812	0,0	77,2	0,0	3,6
	Versuchstier 24	9766	0,0	244,8	0,0	6,4
	Versuchstier 25	9854	0,0	216,3	0,0	2,5
	Versuchstier 30	9376	0,0	322,0	0,0	5,4

Gruppe	Versuchstier	Herzfrequenz				
		Anzahl Werte	Minimum	Maximum	Median	Durchschnitt
Zellfreies Kontroll- Konstrukt	Versuchstier 1	9608	100	390	301	307
	Versuchstier 2	8305	104	397	251	267
	Versuchstier 3	8426	102	394	280	284
	Versuchstier 9	9740	197	410	288	292
	Versuchstier 10	9734	110	395	282	281
	Versuchstier 12	9692	103	400	278	275
	Versuchstier 31	9412	103	402	272	277
	Versuchstier 32	9410	104	400	304	296
hEHT	Versuchstier 4	6457	101	427	287	292
	Versuchstier 6	6553	194	406	331	322
	Versuchstier 16	9833	102	401	266	280
	Versuchstier 17	9720	100	441	281	280
	Versuchstier 18	10026	139	419	309	319
	Versuchstier 20	9797	107	423	290	295
	Versuchstier 22	9758	100	427	289	288
	Versuchstier 24	9829	147	415	304	308
	Versuchstier 25	9429	100	393	276	274
	Versuchstier 30	9269	100	382	285	290
Gruppe	Versuchstier	Arrhythmien				
		Analyse-Zeitfenster 1 (Minuten Auswertung)	Analyse-Zeitfenster 2 (Minuten Auswertung)			
Zellfreies Kontroll- Konstrukt	Versuchstier 1	1146	7143			
	Versuchstier 2	1150	5998			
	Versuchstier 3	1151	5995			
	Versuchstier 9	898	7226			
	Versuchstier 10	898	7219			
	Versuchstier 12	836	7214			
	Versuchstier 31	1152	6725			
	Versuchstier 32	1152	6724			
	Summe Gruppe	8383	54244			
hEHT	Versuchstier 4	1150	3847			
	Versuchstier 6	1150	3869			
	Versuchstier 16	1152	7296			
	Versuchstier 17	1152	7458			
	Versuchstier 18	864	7458			
	Versuchstier 20	1152	7458			
	Versuchstier 22	1152	7296			
	Versuchstier 24	1152	7296			
	Versuchstier 25	1152	7296			
	Versuchstier 30	1152	6724			
	Summe Gruppe	11228	65998			

Zusatztable 2:

Gruppe	Versuchstier	Analyse-Zeitfenster 1 (Minuten Auswertung)	Arrhythmien					Total
			PVC	Couplet	Triplet	Non-sus VT	Sus VT	
Zellfreies Kontroll-Konstrukt	Versuchstier 1	1146	0	0	0	0	0	0
	Versuchstier 2	1150	8	1	0	0	0	9
	Versuchstier 3	1151	1	1	0	1	1	4
	Versuchstier 9	898	0	0	0	0	0	0
	Versuchstier 10	898	1	0	0	0	0	1
	Versuchstier 12	836	17	1	1	2	1	22
	Versuchstier 31	1152	1	0	0	0	0	1
	Versuchstier 32	1152	0	0	2	0	0	2
	Summe Gruppe	8383						
hEHT	Versuchstier 4	1150	2	0	0	0	0	2
	Versuchstier 6	1150	33	0	0	0	0	33
	Versuchstier 16	1152	3	0	0	0	0	3
	Versuchstier 17	1152	2	0	0	0	0	2
	Versuchstier 18	864	2	0	0	0	0	2
	Versuchstier 20	1152	0	1	0	0	0	1
	Versuchstier 22	1152	7	0	0	0	0	7
	Versuchstier 24	1152	1	0	0	0	0	1
	Versuchstier 25	1152	0	0	0	0	0	0
	Versuchstier 30	1152	17	0	0	0	0	17
	Summe Gruppe	11228						

Gruppe	Versuchstier	Zeitnormierung F1 (/100 Min.)					Total
		PVC	Couplet	Triplet	Non-sus VT	Sus VT	
Zellfreies Kontroll-Konstrukt	Versuchstier 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Versuchstier 2	0,70	0,09	0,00	0,00	0,00	0,78
	Versuchstier 3	0,09	0,09	0,00	0,09	0,09	0,35
	Versuchstier 9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Versuchstier 10	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11
	Versuchstier 12	2,03	0,12	0,12	0,24	0,12	2,63
	Versuchstier 31	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09
	Versuchstier 32	0,00	0,00	0,17	0,00	0,00	0,17
hEHT	Versuchstier 4	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17
	Versuchstier 6	2,87	0,00	0,00	0,00	0,00	2,87
	Versuchstier 16	0,26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,26
	Versuchstier 17	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17
	Versuchstier 18	0,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,23
	Versuchstier 20	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,09
	Versuchstier 22	0,61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,61
	Versuchstier 24	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09
	Versuchstier 25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Versuchstier 30	1,48	0,00	0,00	0,00	0,00	1,48

Gruppe	Versuchstier	Analyse-Zeitfenster 2 (Minuten Auswertung)	Arrhythmien					
			PVC	Couplet	Triplet	Non-sus VT	Sus VT	Total
Zellfreies Kontroll-Konstrukt	Versuchstier 1	7143	8	0	0	0	0	8
	Versuchstier 2	5998	41	6	0	1	0	48
	Versuchstier 3	5995	35	4	1	0	0	40
	Versuchstier 9	7226	36	2	6	1	0	45
	Versuchstier 10	7219	341	9	3	1	0	354
	Versuchstier 12	7214	83	6	1	2	0	92
	Versuchstier 31	6725	59	4	1	1	0	65
	Versuchstier 32	6724	122	11	3	3	0	139
	Summe Gruppe	54244						
hEHT	Versuchstier 4	3847	7	0	0	0	0	7
	Versuchstier 6	3869	29	0	0	0	0	29
	Versuchstier 16	7296	58	3	0	3	0	64
	Versuchstier 17	7458	145	20	6	12	0	183
	Versuchstier 18	7458	20	0	0	0	0	20
	Versuchstier 20	7458	526	1	1	0	0	528
	Versuchstier 22	7296	71	11	1	2	0	85
	Versuchstier 24	7296	52	9	0	1	0	62
	Versuchstier 25	7296	42	2	1	0	0	45
	Versuchstier 30	6724	120	12	6	8	0	146
	Summe Gruppe	65998						

Gruppe	Versuchstier	Zeitnormierung F2 (/100 Min.)					
		PVC	Couplet	Triplet	Non-sus VT	Sus VT	Total
Zellfreies Kontroll-Konstrukt	Versuchstier 1	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11
	Versuchstier 2	0,68	0,10	0,00	0,02	0,00	0,80
	Versuchstier 3	0,58	0,07	0,02	0,00	0,00	0,67
	Versuchstier 9	0,50	0,03	0,08	0,01	0,00	0,62
	Versuchstier 10	4,72	0,12	0,04	0,01	0,00	4,90
	Versuchstier 12	1,15	0,08	0,01	0,03	0,00	1,28
	Versuchstier 31	0,88	0,06	0,01	0,01	0,00	0,97
	Versuchstier 32	1,81	0,16	0,04	0,04	0,00	2,07
hEHT	Versuchstier 4	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05
	Versuchstier 6	0,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,75
	Versuchstier 16	0,79	0,04	0,00	0,04	0,00	0,88
	Versuchstier 17	1,94	0,27	0,08	0,16	0,00	2,45
	Versuchstier 18	0,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,27
	Versuchstier 20	7,05	0,01	0,01	0,00	0,00	7,08
	Versuchstier 22	0,97	0,15	0,01	0,03	0,00	1,17
	Versuchstier 24	0,71	0,12	0,00	0,01	0,00	0,85
	Versuchstier 25	0,58	0,03	0,01	0,00	0,00	0,62
	Versuchstier 30	1,78	0,18	0,09	0,12	0,00	2,17

10. Danksagung

Zunächst gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Eschenhagen, der mir das Forschen an seinem Institut zu diesem interessanten Thema ermöglicht hat. Außerdem bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Hansen für seine tatkräftige Unterstützung als Betreuer meiner Doktorarbeit. Zudem bin ich Herrn Prof. Schwoerer zu ganz besonderem Dank verpflichtet, der mir zu jedem Zeitpunkt meiner Arbeit und auch darüber hinaus wissenschaftlich sowie persönlich helfend zur Seite stand. Ebenfalls danken möchte ich an dieser Stelle Herrn Dr. Weinberger, der mir durch seine thematischen Anregungen half, meinen Horizont hinsichtlich verschiedener Aspekte meines Forschungsthemas zu erweitern. Des Weiteren danken möchte ich Herrn PD Dr. Pecha für die Durchführung aller chirurgischen Tätigkeiten meines Forschungsprojektes sowie Frau Geertz für die echokardiographischen Untersuchungen. Meinen wissenschaftlichen Kollegen am Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie sowie am Institut für Zelluläre und Integrative Physiologie möchte ich für die kollegiale Zusammenarbeit danken.

Außerdem gilt an dieser Stelle ein großer Dank meinen Eltern, die mich auf dem Weg durch das Studium und die Promotion begleitet haben. Ganz besonders möchte ich mich außerdem bei meiner Freundin Eva bedanken, die mich jederzeit unterstützt und durch diese arbeitsintensive Zeit begleitet hat.

11. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Matti Malte Röhl
Geburtsdatum, -ort 22.05.1991, Hamburg

Schulische und akademische Laufbahn

07/2019 – Heute Weiterbildung zum Facharzt für Innere Medizin und Kardiologie, Albertinen-Krankenhaus, Hamburg

07/2015 – Heute Doktorand am Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Promotion zum Thema „Untersuchung des Risikos für Herzrhythmusstörungen nach kardialem Gewebeersatz mit künstlichem Herzgewebe aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen“

10/2012 – 06/2019 Studium Humanmedizin, Universität Hamburg (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf), Hamburg

10/2011 – 09/2012 Studium Molecular Life Science, Universität zu Lübeck, Lübeck

09/2001 – 06/2010 Heisenberg-Gymnasium, Hamburg

08/1997 – 07/2001 Freie Kinderschule Hamburg-Harburg, Hamburg

12. Veröffentlichungen

Pecha S, Yorgan K, Rohl M, Geertz B, Hansen A, Weinberger F, Sehner S, Ehmke H, Reichenspurner H, Eschenhagen T, Schwoerer AP (2019) Human iPS cell-derived engineered heart tissue does not affect ventricular arrhythmias in a guinea pig cryo-injury model. Sci Rep, 9: 9831.

13. Eidesstattliche Erklärung

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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: