

Aus dem Max-Planck-Institut für Dynamik und Selbstorganisation,  
Forschungsgruppe: Biomedizinische Physik,  
Göttingen

**„Cardiomyocyten im Chaos —  
Makroskopische Untersuchungen kardialer Arrhythmien *in-vitro*  
unter dem Einfluss elektrischer Pulsfolgen und Parameteränderungen“**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

der Universität Rostock.



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT



Vorgelegt von Claudia Richter,  
geb. am 24.07.1981 in Rostock,  
aus Rostock.

Rostock, Juni 2010

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. D. G. Weiss, Institut für Zellbiologie und Biosystemtechnik,  
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. S. Luther, Max-Planck-Institut für Dynamik und  
Selbstorganisation, Biomedizinische Physik, Göttingen

Tag der Verteidigung: 21.02.2011

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
1.1. PHYSIOLOGIE UND PATHOPHYSIOLOGIE DES KARDIALEN SYSTEMS	2
1.1.1. Das menschliche Herz und seine Erregungsleitung	2
1.1.2. Cardiomyocyten und die Erregungs-Kontraktions-Kopplung	4
1.1.2.1. Pforten von großer Bedeutung – Calciumkanäle, Porter und Rezeptoren	4
1.1.2.2. Elektrophysiologische Signale – Die Erregungs-Kontraktions-Kopplung	6
1.2. KARDIALE ARRHYTHMIEN	8
1.2.1. Klassifizierung von Arrhythmien	8
1.2.2. Nichtlineare Dynamik bei Arrhythmien – Formen der Erregungswellen	10
1.2.3. Defibrillation – Elektrische Schocks, die Leben retten	12
1.2.3.1. Natürliche Heterogenitäten	14
1.3. KARDIALE DYNAMIK – BIOLOGISCHE UND PHYSIKALISCHE FORSCHUNGSANSÄTZE	16
1.4. WELLENDYNAMIKEN IN CHEMISCHEN UND BIOLOGISCHEN SYSTEMEN	17
<b>2. ZIELSTELLUNG</b>	<b>20</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>22</b>
3.1. MATERIAL	22
3.2. METHODEN	27
3.2.1. Primärzellkultur	27
3.2.2. Erzeugung von künstlichen Heterogenitäten	29
3.2.3. Immunfluoreszenz	33
3.2.4. Fluoreszenzmakroskopie und –mikroskopie	35
3.2.4.1. Optische Messaufbauten	38
3.2.4.2. Feldstimulationen der Zellkulturen	39
3.2.4.4. Bildanalysemethoden	41
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>43</b>
4.1. MAKROSKOPISCHER VERSUCHSAUFBAU	43
4.2. GRANULARE STRUKTUREN INNERHALB DER ZELLKULTUR UND IHRE EFFEKTE AUF DIE BILDANALYSE	50
4.3. ÄNDERUNG DER WELLENDYNAMIK DURCH VERWENDUNG VON FELDSTIMULATION	54

4.4. REKRUTIERUNG VIRTUELLER ELEKTRODEN AN KÜNSTLICHEN HETEROGENITÄTEN	56
4.4.1. Abhängigkeit der Feldstärke E vom Radius R der Heterogenitäten	56
4.4.2. Einsatz von Feldstimulation und virtueller Elektroden bei Spiralwellen	63
4.5. VERGLEICH DER GAP JUNCTION-EXPRESSION IN ZELLKULTUR UND GESAMTHERZ	68
4.6. AUSWIRKUNGEN VON PARAMETERÄNDERUNGEN AUF DIE WELLENDYNAMIK	71
4.6.1. Temperaturänderungen	71
4.6.2. Änderung der Wellendynamik bei Carbogenentzug	77
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>81</b>
5.1. REKRUTIERUNG VON GEWEBEHETEROGENITÄTEN ALS VIRTUELLE ELEKTRODEN	81
5.1.1. Verwendbarkeit der Feldstimulation in der Medizin	86
5.2. ETABLIERUNG EINES MAKROSKOPISCHEN ZELLKULTURSETUPS	87
5.3. ZELLKULTURUNTERSUCHUNGEN VON PARAMETERÄNDERUNGEN	88
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>92</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>101</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>102</b>
<b>ANHANG</b>	<b>I</b>
STATISTISCHE ANALYSE DER MESSWERTE AUS DEN HETEROGENITÄTEN-EXPERIMENTEN	I
FILMDATEIEN	II
SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	III
DANKSAGUNG	IV

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
< / ≤	kleiner als / kleiner gleich
> / ≥	größer als / größer gleich
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper (hier: für Immunfluoreszenz-Reaktionen)
AP	Aktionspotential
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	zirka (lat.: circa)
CICR	<i>Calcium-Induced-Calcium-Release</i> (dt.: Calcium induzierte Calciumausschüttung)
cm	Zentimeter [1 cm = 10 <sup>-2</sup> m]
d. h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
E	elektrisches Feld / Feldstärke [V/cm]
ECC	<i>Excitation-Contraction-Coupling</i> (dt.: Erregungs-Kontraktions-Kopplung)
EKG	Elektrokardiogramm
et al.	et alteri (dt.: und andere)
fps	<i>Frames per second</i> (dt.: Bilder / Sekunde)
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
Hrsg.	Herausgeber
I	Strom [Ampere]
ICD	<i>Implantable Cardiac Defibrillator</i> (dt.: Implantierbarer Cardioverter Defibrillator)
IHC	Immunhistochemie
ITO	<i>Indium Tin Oxide</i> (dt.: Indiumzinnoxid), (In <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) <sub>0.9</sub> · (SnO <sub>2</sub> ) <sub>0.1</sub>
°K	Grad Kelvin [1 °C = -273,15 °K]
LED	Licht emittierende Diode

l	Liter
M	Molarität [1 $\mu\text{M} = 10^{-3}$ mM = $10^{-6}$ M = $10^{-6}$ mol/l]
m	Meter
max	Maximum
mg	Milligramm [1 mg = $10^{-3}$ g]
min	Minute [1 h = 60 min]
ml	Milliliter [1 ml = $10^{-3}$ l]
mm	Millimeter [1 mm = $10^{-3}$ m]
ms	Millisekunde [1 ms = $10^{-3}$ s]
mV	Millivolt [1 mV = $10^{-3}$ V]
nm	Nanometer [1 nm = $10^{-3}$ $\mu\text{m}$ ]
PGMEA	Propylenglykolmonomethylethylacetat (1-Methoxy-2-propyl-acetat, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_3$ )
PS	Phasen-Singularität
px	Pixel (Maß der Auflösung von Digitalkamerasensoren)
rpm	<i>Rounds per minute</i> (dt.: Umdrehungen / Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde [1 min = 60 s]
SR	sarkoplasmatisches Reticulum
t	Zeit [1 $\mu\text{s} = 10^{-3}$ ms = $10^{-6}$ s]
U	Spannung [Volt]
u. a.	unter anderem
ugs.	umgangssprachlich
V	Volt
VT	ventrikuläre Tachykardie
VF	ventrikuläre Fibrillation
W	Watt (Maßeinheit der Leistung)
z. B.	zum Beispiel
$\mu\text{CT}$	Mikro-Computertomographie (für kleine Untersuchungsproben)
$\mu\text{g}$	Mikrogramm [1 $\mu\text{g} = 10^{-6}$ g]
$\mu\text{l}$	Mikroliter [1 $\mu\text{l} = 10^{-6}$ l]
$\mu\text{m}$	Mikrometer [1 $\mu\text{m} = 10^{-6}$ m]
$\mu\text{s}$	Mikrosekunde [1 $\mu\text{s} = 10^{-6}$ s]

## Zusammenfassung

Als plötzlicher Herztod wird gemeinhin ein unerwarteter Tod durch kardiale Anomalien bezeichnet, welcher innerhalb einer kurzen Zeitspanne ( $< 1$  h) auftritt.

Eine Möglichkeit zur Verbesserung der Therapie von kardialen Arrhythmien kann eine physikalische Theorie werden. Sie besagt, dass in einem elektrischen Feld nicht erregbare Gebiete zur Depolarisierung des umliegenden Mediums verwendet werden können. Als virtuelle Elektroden könnten solche Heterogenitäten im erregbaren Medium neue Pulse aussenden und damit die Dynamiken der spontanen Wellen beeinflussen. Dabei lässt sich die Anzahl der virtuellen Elektroden mittels der Feldstärke kontrollieren. Bezieht man dies auf das Herz können Teile des Gefäßsystems oder bereits vorhandene Infarkt Narben in einem elektrischen Feld als Ursprung neuer kontrollierter Wellenausbreitungen verwendet werden. Dies würde gleichzeitig eventuell eine Reduzierung der benötigten Energie zur Defibrillation bedeuten.

Um diese Theorie auch in einem biologischen System nachzuweisen, wurden hier Zellkulturen aus neugeborenen Ratten gewonnen und in einem homogenen elektrischen Feld gemessen. Es gelang die Abhängigkeit der benötigten minimalen Feldstärke vom Durchmesser der angesprochenen Heterogenität aufzuzeigen und mit den theoretischen Erwartungen zu vergleichen. Ebenfalls konnten mit Hilfe von virtuellen Elektroden Spiralwellen beeinflusst werden. Die erhaltenen Ergebnisse sprechen für die Eignung der Theorie zur Verwendung in der medizinischen Behandlung von Tachykardien und Fibrillationen.

Außerdem konnte im Verlauf der Arbeit ein Versuchsaufbau etabliert werden, welcher es ermöglicht sowohl die mechanische Aktivität, als auch die Daten der ionendynamischen Prozesse aufzunehmen und zu analysieren. Hierfür wurden die Techniken des bewegungsinduzierten Phasenkontrasts und der Fluoreszenzmarkierung kombiniert. Ferner ist es mit dem neuen Setup möglich makroskopische Zellkulturuntersuchungen durchzuführen mit einer Abbildungsskala von mehreren Zentimetern.

Zur Veranschaulichung der Verwendungsmöglichkeiten und zur Charakterisierung der Wellendynamiken wurden neben den Heterogenitätenexperimenten ebenso die Einflüsse von Parametern, wie Temperatur und pH-Wert, gemessen. Hier konnten die durch die Literatur erwarteten Änderungen festgestellt werden.

## **1. Einleitung**

Als eine der häufigsten Todesursachen haben die Herz-Kreislaufkrankungen ihre traurige Bedeutung in den Industrieländern. Schaut man auf den Bericht des Statistischen Bundesamtes für 2007, machen diese Erkrankungen schon 43,4 % aller Todesfälle in Deutschland aus [102]. Als wichtigste spezifische Todesursachen werden hierbei die chronische ischämische Herzkrankheit und der akute Myokardinfarkt hervorgehoben.

Der Myokardinfarkt tritt meist für den Patienten unerwartet und plötzlich auf, und ist die Folge einer sich schnell ausbreitenden elektromechanischen Fehlfunktion des Herzens. Als eine Therapie werden heute weltweit Herzschrittmacher eingesetzt. Durch periodische elektrische Signale wird so das geschwächte Herzgewebe zu einem normalen Rhythmus angeregt. Andererseits werden auch so genannte implantierbare Defibrillatoren (ICD) eingesetzt. Die kleinen Pulsgeneratoren sollen bei zu schnellem Herzschlag regulierend einwirken. Diese Pulse der ICD werden von den Patienten allerdings oftmals als schmerzhaft empfunden und auch Angstzustände können als Nebenwirkungen auftreten. Um andere Therapiemöglichkeiten aufzutun, müssen aber die Entstehung und die Kontrolle der sich daraus ergebenden Umstände näher untersucht werden.

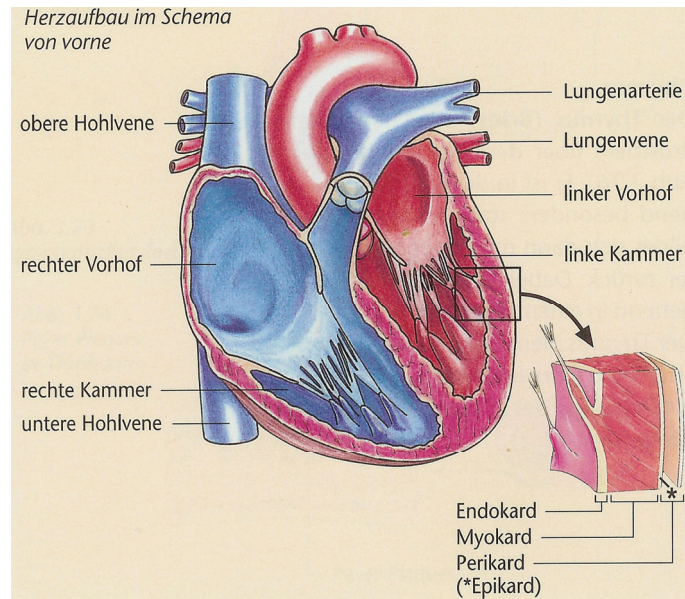
### **1.1. Physiologie und Pathophysiologie des kardialen Systems**

#### **1.1.1. Das menschliche Herz und seine Erregungsleitung**

Im Thorax, geschützt durch die Rippenbögen, befindet sich das Herz. In seiner Funktion als „Pumpe des Lebens“ hält es den versorgenden Blutstrom im Körper aufrecht. Dabei zeigt es sich als ein muskuläres Hohlorgan, welches aus vier separaten Kammern besteht. Man unterscheidet zwischen den zwei Atrien (Vorhöfe) und den beiden Ventrikeln (Herzkammern) (siehe Abb. 1).

Bildlich kann man sich das Herz als eine zweiteilige Pumpe vorstellen. Während die eine Hälfte das Blut in die Lungenarterie, und damit in den Lungenkreislauf pumpt, leitet die zweite Hälfte den Blutstrom über die Aorta in den Körperkreislauf. Als Ventile fungieren dabei die Herzklappen, welche einen Rückstrom des Blutes verhindern.

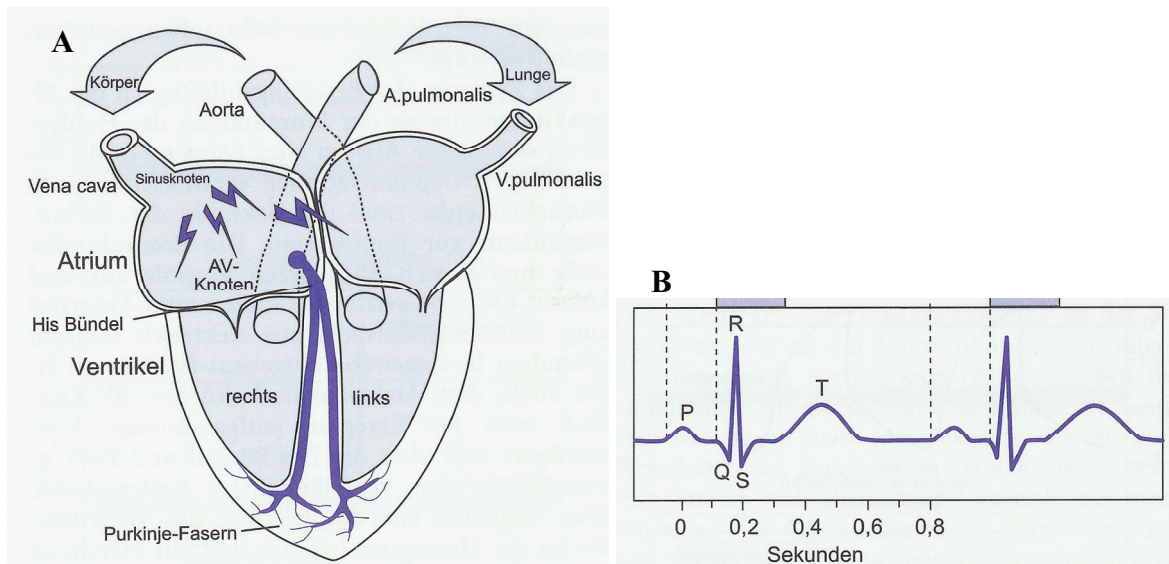




**Abb. 1:** Aufbau des Herzens. Zu sehen ist eine schematische Darstellung des Herzens [92].

Doch wie kommt es zu diesen Pumpbewegungen? Ausgehend vom Sinusknoten im oberen rechten Atrium wird die Kontraktion des Herzmuskels ausgelöst. In ihrer Eigenschaft als eigenständige, oszillierende Schrittmacher geben die Zellen des Sinusknotens Erregungspotentiale an ihre Nachbarzellen ab, was die Kontraktion dieser Zellen zur Folge hat. Zunächst erfolgt die Erregungsleitung über den gesamten rechten Vorhof, um dann auf den linken Vorhof überzugreifen. Mittels des atrioventrikulären Knotens an der Grenze zwischen Atrien und Ventrikeln wird das Potential über die His'schen Bündel und die Purkinje-Fasern an die Herzspitze, den Apex, weitergeleitet. Von dort aus springt die Erregung auf die Kammerwände über, welche dann kontrahieren und dadurch das Blut nach oben in die Arterien drücken. Die Kontraktion des Herzmuskels wird auch als Systole bezeichnet, die Relaxation als Diastole [76]. In Abb. 2 A ist das Erregungsleitungssystem schematisch zu sehen.

Aus der Tatsache heraus, dass die Erregungsleitung auf elektrischen Impulsen beruht, kann man den Herzschlag mit Hilfe von externen Ableitungselektroden auch graphisch darstellen. Die einzelnen Phasen eines solchen Elektrokardiogramms (EKG) sind in Abb. 2 B dargestellt.



**Abb. 2:** Erregungsausbreitung am menschlichen Herzen. Darstellung der Erregungsleitung am Herzen (A) und einer EKG-Kurve mit den einzelnen Phasen (B) [41].

Das EKG setzt sich aus verschiedenen Phasen zusammen; beginnend mit der P-Phase, welche die Anregung der Atrien darstellt, über die Q-Phase, in der sich die Weiterleitung über die Herzscheidewand widerspiegelt. Anschließend folgen die R- und S-Phase, denen die vollständige Exzitation der Ventrikel zugrunde liegt. Abschließend folgt mit der T-Phase die Relaxation der Kammerwände [76].

Anhand eines solchen Kardiogramms lassen sich ohne invasiven bzw. operativen Aufwand Herzerkrankungen verschiedenster Natur ableiten. Neben dem EKG finden in der Medizin auch andere, bildgebende Verfahren, wie z. B. die Echokardiographie, der intrakoronare Ultraschall (ICUS) und die kardiale Röntgenthoraxaufnahme, in der Diagnostik Anwendung [72].

## 1.1.2. Cardiomyocyten und die Erregungs-Kontraktions-Kopplung

### 1.1.2.1. Pforten von großer Bedeutung – Calciumkanäle, Porter und Rezeptoren

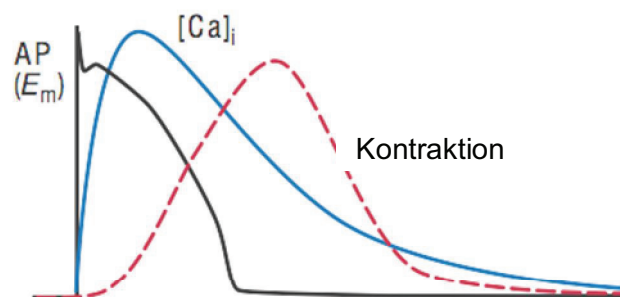
Die kleinste Funktionseinheit des Herzens sind die Cardiomyocyten, oder auch Herzmuskelzellen. Sie bestimmen letztendlich die Leistung des Herzens.

Wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt, beruht die kardiale Funktion auf elektrischen Signalen. Auf Zellebene handelt es sich dabei um das Aktionspotential (AP), welches die

Änderung des Membranpotentials als Funktion der Zeit darstellt. Das Membranpotential wiederum ist abhängig von intra- und extrazellulären Ionenkonzentrationen.

Um diese Gradienten zu steuern, verwendet die Zelle Ionenkanäle, wobei es sich um porenförmige Proteine im Sarkolemma handelt. Man unterscheidet hier zwischen spannungs- und Liganden abhängigen Ionenkanälen. Die verschiedenen Ionenströme geben dem kardialen AP seine charakteristische Form. Deshalb lassen sich die einzelnen Phasen des AP den individuellen Ionenströmen zuordnen (siehe Abb. 3) [17, 87, 88].

Die Membran der Herzmuskelzellen besitzt einen in der Ruhephase ständig geöffneten Ionenkanal für Kalium-Ionen ( $I_{K^+}$ ). Infolgedessen besitzen die Zellen ein Ruhepotential von  $\approx -80$  mV. Eine Erhöhung des Ruhepotentials um 10 mV reicht schon aus um spannungsabhängige Natriumkanäle zu öffnen. Innerhalb weniger Millisekunden verursachen die einströmenden Natrium-Ionen eine Depolarisation der Zelle auf ca. 20 mV, was den  $I_{K^+}$  schließt. Gleichzeitig wird ein transienter Auswärtsstrom der Kaliumionen durch die hochpermeable Membran aktiviert, was die Repolarisation der Zelle einleitet. Durch einsetzende Calciumkanäle wird das AP auf einem Plateau-Niveau gehalten. Nach dem Schließen dieser Kanäle setzt sich die Repolarisation fort und das Ruhepotential wird wieder erreicht. Im Gegensatz zu den Herzmuskelzellen, besitzen die Schrittmacherzellen des Sinusknotens keine ständig offenen Kaliumkanäle, wodurch sich hier kein Ruhepotential einstellen kann. Durch spontane diastolische Depolarisation wird das so genannte Schrittmacherpotential initiiert. Außerdem haben deren Calciumkanäle eine kürzere Öffnungszeit als die der Myocyten.



**Abb. 3:** Zeitlicher Verlauf der Aktionspotentiale und zellulären Reaktionen. Dargestellt ist der Vergleich der Signale von Membranpotential, Calcium und Kontraktion [5].

Für die Kontraktion der Cardiomyocyten sind besonders spannungsabhängige Calciumkanäle von Bedeutung. Sie werden in die sechs Unterklassen L, T, N, P, Q und R eingeteilt, wovon zwei für die Herzmuskelfunktion bedeutend sind. So finden wir den  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal des L- und des T-Typs bei Herzzellen. Kanäle des L-Typs (*Long* - lang anhaltend) werden so genannt, weil sie nach einem elektrischen Signal eine lang anhaltende Öffnungsperiode generieren. Sie sind der Knackpunkt der Erregungs-Kontraktions-Kopplung und der damit verbundenen Calcium induzierten Calciumausschüttung (CICR). Die T-Kanäle (*Tiny* - kleinporige Kanäle) finden sich vor allem im Sinusknoten, wo sie das Schrittmacherpotential beeinflussen.

In der nächsten Nachbarschaft der L-Typ-Kanäle befindet sich das sarkoplasmatische Reticulum mit seinen Ryanodin-Rezeptoren (RyR). Anders als in der Skelettmuskulatur sind die L-Kanäle nicht direkt mit den Ryanodin-Rezeptoren verbunden. Die Öffnung dieser Kanäle wird hier schon durch niedrigste Konzentrationen an freiem Calcium im Cytosol bewirkt. Als Resultat strömt das Calcium aus dem Reticulum und die intrazelluläre Calciumkonzentration steigt. Das hat wiederum zur Folge, dass weitere RyR geöffnet werden und somit das Calcium schneller aus dem SR strömen kann. Dieser Vorgang wird auch Calcium induzierte Calciumausschüttung genannt.

Um diesen Vorgang wieder rückgängig zu machen stehen der Zelle verschiedene Türen zur Verfügung. Zum einen wird das freie  $\text{Ca}^{2+}$  mittels der sarko-endoplasmatischen Calcium-ATPase (SERCA) wieder in das SR zurückgeführt. Zum anderen wird ein Teil über Natrium-Calcium-Antiporter und Calcium-ATPasen in der Zellmembran nach außen geführt.

### **1.1.2.2. Elektrophysiologische Signale – Die Erregungs-Kontraktions-Kopplung**

Für die Kontraktion der Zellen bedarf es einer ganzen Reihe an Faktoren, welche zum Großteil in der Erregungs-Kontraktions-Kopplung (*Excitation-Contraction-Coupling*, ECC) zusammengefasst werden. Bei der ECC wird das Erregungssignal, die Änderung der Membranspannung, in ein Kontrahieren der Zelle übersetzt. Als Übermittler fungiert hier der weit verbreitete Second-Messenger Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Die Änderung der Membranspannung bewirkt eine Öffnung der Calcium-Kanäle des L-Typs. Dadurch gelangt extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle, was an die Ryanodin-Rezeptoren (RyR) des sarkoplasmatischen Reticulums (SR) bindet. Durch diese Bindung öffnen sich die RyR und das  $\text{Ca}^{2+}$  des SR strömt in das Zelllumen. Hier trifft das freie  $\text{Ca}^{2+}$  auf das Myofilamentprotein Troponin C (cTnC). Durch diese Verbindung wird ein Zusammenziehen der Myofilamente möglich. Das Resultat – die Cardiomyocyte kontrahiert. Für eine Relaxation muss das  $\text{Ca}^{2+}$  wieder vom cTnC gelöst

werden. Dafür senkt die Zelle ihre intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ), indem sie freies  $Ca^{2+}$  dem SR zurückführt. Außerdem wird ein Teil des  $[Ca^{2+}]_i$  mittels Natrium-Calcium-Antiportern und ATPasen in der Sarkolemma nach außen geführt. Als vierte Möglichkeit zur Senkung der  $[Ca^{2+}]_i$  stehen außerdem die Calcium-Uniporter der Mitochondrien parat [4, 20, 57].

Alles in allem benötigt die Kontraktion einer Cardiomyocyte ca. 500 ms, wobei drei Phasen unterschieden werden können. Beginnend mit dem Aktionspotential, darauf folgend der so genannte Calcium-Peak und abschließend die Kontraktion (siehe Abb. 3).

Solch eine Signalkaskade bietet allerdings auch viele Angriffspunkte für eine mögliche Störung. Bis dato sind noch nicht alle Störfaktoren bekannt, aber einige wurden entdeckt und noch mehr werden vermutet. So werden Ryanodin-Rezeptoren als Verantwortliche für ein SR-Leck angesehen. Dabei schließt sich der SR-Calciumkanal nicht vollständig, so dass ständig  $Ca^{2+}$  austreten kann. Dadurch wird die kritische  $[Ca^{2+}]_i$  für eine Kontraktion schon wesentlich früher erreicht als unter normalen Umständen. D. h. diese Zelle kontrahiert in kürzeren Abständen als seine Nachbarzellen. Greift dieses Verhalten auf ein größeres Areal an Myocyten über, kommt es zu einer Heterogenität, welche die elektromechanische Funktionsweise des Gewebes empfindlich stören kann. Bis hin zur Fibrillation.

Aber auch die L-Calciumkanäle werden als Verursacher solcher Unregelmäßigkeiten vermutet. Ganz zu schweigen von den elektrischen Verbindungen der Zelle, den Gap Junctions. Mutationen in ihren Bausteinen, den Connexinen, führen zu einer elektrischen Heterogenität im Gewebe und damit zu einer unregelmäßigen ECC [82].

Was als Ursache für Arrhythmien fungiert, kann aber andererseits auch als Ansatzpunkt für mögliche Therapien wirken. So beschäftigt sich die Arbeitsgruppe um Lehnart et al. [65, 66, 67] mit der Regulierung der RyR und ihrem klinischen Einsatz bei Herzpatienten. Zudem lassen sich mit den heutigen Methoden der molekularen Medizin ebenfalls die nahen Verwandten auf mögliche Risiken für eine Herzarrhythmie testen, was den Zeitpunkt eines Therapiebeginns unter Umständen begünstigt. Doch dafür fehlt es im Augenblick noch an validen klinischen Markern in der Diagnostik.

## 1.2. Kardiale Arrhythmien

### 1.2.1. Klassifizierung von Arrhythmien

Eine Arrhythmie stellt im Allgemeinen eine Abweichung der normalen periodischen Funktion dar. Beim Herzen kann das eine Störung zum einen der elektrischen Weiterleitung während der Erregungsleitung und / oder in der Ionenkonzentration, bei der Erregungsbildung, sein. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen den atrialen und den ventrikulären Arrhythmien. Bei einem Auftreten von Arrhythmien in den Vorhöfen ist die Gefahr eines Herztodes vermindert, da das in den Atrien befindliche Blut auch dann noch durch die Herzklappen in die Ventrikel gelangt und somit dem Kreislauf zugeführt wird. Anders ist das bei ventrikulären Normabweichungen. Den Herzkammern obliegt es, das Blut durch starke Kontraktion in den Kreislauf zu pumpen. Bei den verschiedenen Arrhythmietypen wird aber genau das verhindert. Es gelangt nur eine unzureichende Menge an Blut zu den Körperorganen und damit kommt es schnell zu einer Unterversorgung des gesamten Körpers, was im Tod des Organismus enden kann.

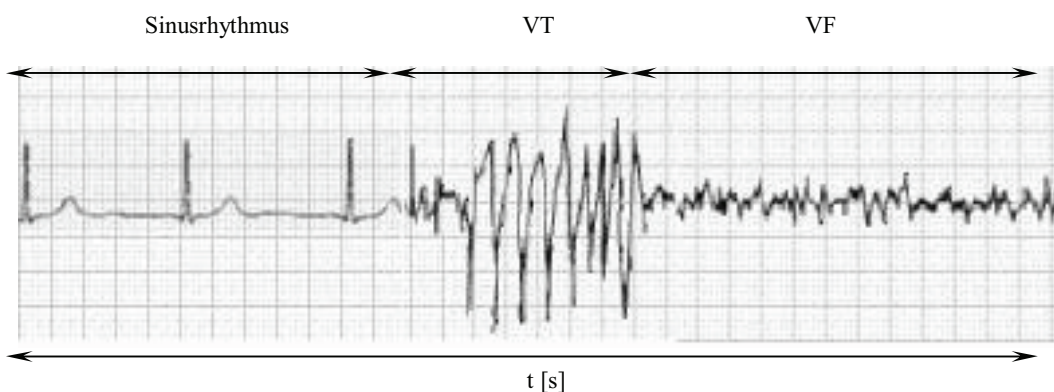
Abhängig von der Herzfrequenz wurden drei Kategorien manifestiert: Bradykardie, Tachykardie und Fibrillation. Patienten mit einer Bradykardie leiden unter stark verlangsamtem Herzschlag ( $< 60$  Schlägen / min, ausgenommen Extremsportler wie z. B. Apnoetaucher). Häufig tritt diese Arrhythmie im Zusammenhang mit einer Schädigung des Sinusknotens, Hyperkaliämie, falschen Medikamentendosierungen und Unterkühlung auf [72]. Sie gilt als nicht-kritisch und gut therapierbar. Im Gegensatz dazu stehen die Tachykardie und die Fibrillation. Dabei stellt die Tachykardie das Gegenstück zur Bradykardie dar. Sie äußert sich in einer stark angestiegenen Schlagfrequenz ( $> 120$  Schläge / min) und wird häufig als „Herzrasen“ bezeichnet. Allgemein werden Tachykardien in supraventrikuläre und ventrikuläre Tachyarrhythmien unterschieden. Bei den supraventrikulären Arrhythmien handelt es sich um Vorhoftachykardien, welche oftmals als Sinus- oder AV-Reentry-Tachykardie auftreten. Wie der Name schon vermuten lässt, zeigt sich bei der Sinustachykardie ein schneller, aber gleichmäßiger Rhythmus auf dem EKG. Es zeigen sich komplette QRS-Komplexe, nur mit kürzeren Zeitabständen. Die AV-Reentry-Tachykardie beruht auf kreisenden Erregungen zwischen Vorhof und Kammer, wobei der AV-Knoten auf diesen Kreisbahnen liegt. Sie tritt meist anfallsmäßig auf und kann ebenso schnell auch wieder enden. Als Therapie stehen sowohl eine medikamentöse Behandlung mit Betablockern, als auch die Verödung des auslösenden Gewebes durch

Hochfrequenzapplikationen oder Kryotechnik. Außerdem können Tachyarrhythmien nach Vorhofflimmern entstehen.

Bei allen Vorhoftachykardien besteht die Gefahr, dass auch die Kammern zu einer erhöhten Schlagfrequenz angeregt werden und die Arrhythmie somit auf die Ventrikel übergreift. Kammertachykardien (= ventrikuläre Tachykardien, VT) können in unaufhörliche (*incessant ventricular Tachycardia*, iVT), anhaltende (*sustained ventricular Tachycardia*, sVT) und nicht-anhaltende VT (*non-sustained VT*, nsVT) eingeteilt werden. Der Unterschied zwischen der sVT und der nsVT ist bei 30 s festgelegt worden. Im EKG macht sich eine VT als verbreiteter QRS-Komplex bei mehr als 120 Schlägen / min bemerkbar. Zur Therapie wird hier die Kardioversion mittels Defibrillatoren eingesetzt, mit anschließender stationärer Behandlung.

Als Sonderfall für beide Tachykardiearten gilt die paroxymale Tachykardie. Sie tritt anfallsweise auf und verursacht Herzschlagfrequenzen von 250-320 Schlägen / min. Ohne schnelle medizinische Hilfe kann diese Form zu einem kardiogenen Schock oder dem Tod führen.

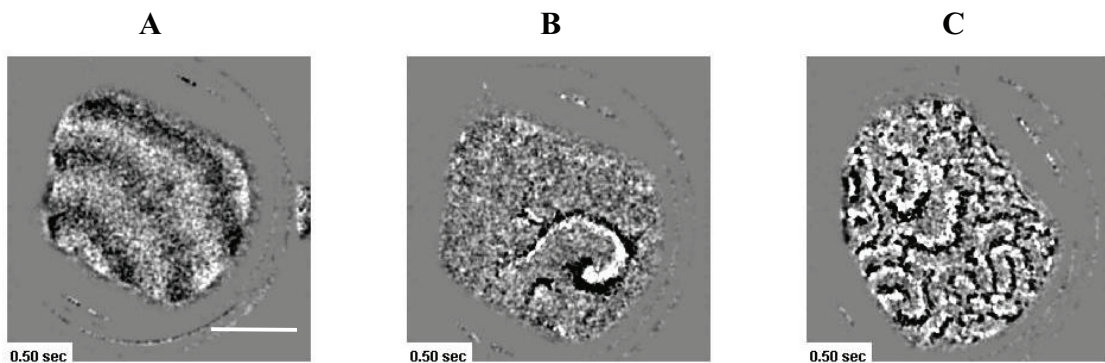
Die Fibrillation als dritte große Arrhythmieklasse beschreibt die ungeordnete Anregung des Herzmuskels, wonach dieser sich nicht richtig kontrahieren kann. Tritt diese Form in den Ventrikeln auf (= ventrikuläre Fibrillation, VF, ugs. auch Kammerflimmern genannt) spricht man auch von einer pulslosen Herzrhythmusstörung. Der Herzmuskel beginnt in Folge von kreisenden Erregungswellen zu flimmern, was dazu führt, dass die Pumpleistung abrupt aufhört. Infolgedessen kommt es zu einem Kreislaufstillstand. Die Schlagfrequenz liegt dabei bei  $> 320$  Schlägen / min. Die sofortige Defibrillation mittels elektrischer Schocks hat sich hier als Therapie durchgesetzt [72].



**Abb. 4:** Beispiel für verschiedene Herzrhythmen. Elektrokardiogramm mit unterschiedlichen Rhythmen [46]. Die Gesamtlänge des EKG beträgt 32 s.

### 1.2.2. Nichtlineare Dynamik bei Arrhythmien – Formen der Erregungswellen

Die Erregungsausbreitung im Herzen erfolgt in Form von Anregungswellen. So kann man sich den normalen Herzrhythmus anhand eines Sees bildlich darstellen. An einer Stelle wird ein Stein in den See geworfen und von dieser Stelle gehen nun kreisförmige Wellen aus. Befindet sich diese Stelle am Ufer, dann werden die Wellen nur in eine Richtung, in Richtung des offenen Wassers, weiterwandern. Wohingegen die Wellen in Richtung Ufer aufgehalten werden. Beim Herzen ist dieser Stein nun der Sinusknoten, welcher die Aktivität auslöst. Das aufhaltende Ufer wird durch die Refraktärzeit der Herzmuskelzellen repräsentiert. D. h. bei einem normalen Sinusrhythmus kann die Erregungsausbreitung mit Hilfe einer ebenen Welle dargestellt werden (siehe Abb. 5).



**Abb. 5:** Wellendarstellung unterschiedlicher Dynamiken; **A)** Sinusrhythmus, **B)** VT, **C)** VF. Die Bilder wurden anhand von Zellkulturen gewonnen (siehe Kapitel 3.2.1). Der Skalierungsbalken in A entspricht 2 cm.

Eine Tachykardie oder gar Fibrillation sind Störungen dieser Wellendynamik. Dabei kann eine Tachykardie dadurch entstehen, dass die ebene Welle auf eine Heterogenität im Gewebe trifft. Die Welle wird unterbrochen und an den Enden der Wellenfronten können Spiralwellen entstehen. Bei der Fibrillation brechen diese Wellen immer mehr auf und es bilden sich weitere, ungeordnete Wellendynamiken aus. Vorstellbar ist das als chaotisches System an Strukturen (siehe Abb. 5), welches auch als raumzeitliches Chaos bezeichnet wird. Die Wellen werden sowohl in ihrer räumlichen Ausbreitung, als auch in ihrer Frequenz, also ihrer zeitlichen Entwicklung, verändert.

Doch wie kommt es zu solchen dynamischen Prozessen im Herzgewebe? Die Erregungswelle am Herzen besteht aus verschiedenen Phasen, zum einen die Anregungsphase und zum anderen die Refraktärphase. Während der Refraktärzeit sind die Zellen nicht durch extrazelluläre Signale erregbar. Im Normalfall kann sich die Welle also nur in eine Richtung



fortpflanzen. Anders ist es, wenn die Welle auf ein Hindernis trifft. Entweder diese Hürde befindet sich komplett in der Refraktärzeit, was einen unidirektionalen Block zur Folge hätte, oder die Ausbreitungsgeschwindigkeit dieses Areals ist im Vergleich zum umgebenden Gewebe verlangsamt. Bei einem unidirektionalen Block kann es zu einem so genannten zirkulären Reentry kommen, d. h. die Erregungswelle läuft um das Hindernis herum und tritt am eigenen Anfangspunkt wieder ein. Es kommt zur Ausbildung einer Spiralwelle. Diese Spirale kann fest an dieser Heterogenität im Gewebe verankert sein (selbsterhaltender Reentry) oder aber die Spiralspitze wandert. Grund hierfür ist wiederum die Refraktärzeit der umliegenden Zellen. Erreicht die Spiralwelle die Zellen, wenn sie gerade wieder erregbar sind, so verkürzt sich deren Ruhezeit. Dieser Prozess kann sich mehrere Male wiederholen, so dass sich die Welle einen Pfad mit der schnellst möglichen Geschwindigkeit sucht.

Für den Übergang der VT zur VF gibt es in der Literatur mindestens zwei Hypothesen [48, 81, 101]. Die multiple Wellen- oder Restitutionstheorie besagt, dass jede durch Wiedereintritt erzeugte Welle lateral instabil ist. Durch die hohe Aktionspotentialdauer (APD) der Dynamik und der vergleichsweise langsameren APD des Gewebes bricht die Struktur immer wieder auf. Es entstehen multiple Wellendynamiken. Die Mother-Rotor-Theorie hingegen, geht von einer stabilen rotierenden Anregung aus, welche erst in einiger Entfernung des Spiralkerns aufbricht. Auch das wiederum durch die Ungleichheit der APD zwischen Spiralwelle und umliegenden Gewebe [48, 119].

In beiden Fällen spielt die Weiterleitungsgeschwindigkeit eine große Rolle. Basierend auf elektrischen Verbindungen zwischen den Cardiomyocyten, den Gap Junctions, ist sie es, welche die Dynamiken am Leben erhält. Kommt es zu Störungen der Leitungsgeschwindigkeit können tachykardiale Wellenstrukturen begünstigt werden. Ursachen solcher Störungen können zum einen Mutationen der Gap Junction-Proteine, den Connexinen, sein, oder aber auch Störungen des Ionenhaushaltes.

### 1.2.3. Defibrillation – Elektrische Schocks, die Leben retten

Die heutige Behandlungsmethode für VT und VF ist die Verabreichung elektrischer Schocks. Dabei applizieren automatische Defibrillatoren, wie man sie z. B. auf Flughäfen findet, hochenergetische Pulse (bis zu 300 J, 1 kV, 30 A, 10 ms) am Patienten. Das der Defibrillation zugrunde liegende Prinzip ist, dass die elektrische Aktivität des Herzmuskels wieder in den Ruhezustand gebracht wird und so sich ein neuer Sinusrhythmus einstellen kann. Doch durch solche Defibrillationsschocks können signifikante Nebeneffekte auftreten. So kann beispielsweise durch Elektroporation das Gewebe geschädigt werden, wodurch Narbenbildung und erneute Rhythmusstörungen begünstigt werden.

An dieser Stelle sollten einmal die physikalischen Begriffe der Elektroden definiert werden. Geht man nach der allgemeinen Definition ist „eine Elektrode [...] ein Elektronenleiter, der im Zusammenspiel mit einer Gegenelektrode mit einem zwischen beiden Elektroden befindlichen Medium in Wechselwirkung steht“ [45]. D. h. als Elektroden werden mechanische Stromleiter gesehen, die mit ihrer Umgebung in Wechselwirkung stehen.

In verschiedenen Simulationen und Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich Spiralwellen, wie bei einer VT, auch durch gezielte Pulse einer einzelnen Elektrode in der Nähe der Spiralspitze mit wesentlich geringerer Energie wegdrängen lassen [6]. Das Problem hierbei ist allerdings, dass man im Herzen nicht dutzende von Elektroden einsetzen kann, damit man jeden möglichen Entstehungsort von Arrhythmien abdeckt. Zum einen würde es durch den Implantationsschritt ebenfalls zu einer Schädigung des Gewebes kommen, und zum anderen wäre die Ansteuerung der Elektroden im Patienten nur schwer zu bewerkstelligen. Doch Pumar et al. haben anhand von Computermodellen gezeigt, dass es neben der Mehr-Elektroden-Variante auch eine gewebeschonendere Methode gibt [84, 104, 105, 124]. Sie führen dabei den Begriff der virtuellen Elektrode ein. Virtuelle Elektroden (vE) bezeichnen lokale Ereignisse in einem elektrischen Feld, von denen ohne direkte Verbindung zu einem Elektronenleiter elektrische Aktivität ausgeht. Im vorliegenden Fall stellen solche vE Hindernisse mit stark verringerter oder blockierter Pulsleitung dar. D. h. man könnte in einem elektrischen Feld anhand von anatomischen Heterogenitäten (z. B. Blutgefäße, Infarkt Narben) im Herzgewebe virtuelle Elektroden generieren. Diese Methode würde für die Kardiologie einen immensen Vorteil haben, da sie ganz ohne invasive Operationen auskommt und für jeden Patienten individuell nutzbar ist. Außerdem wären damit zur Terminierung von Arrhythmien Energiepulse mit signifikant reduzierter Energie nötig, als dies bei den normalen Defibrillations-Schocks erforderlich ist.

Das Wirkungsprinzip der virtuellen Elektroden basiert auf lokalen Änderungen der elektrischen Leitfähigkeit. Sie verursacht eine Umverteilung der intra- und extrazellulären Ströme, was zu einer Änderung des Membranpotentials der Nachbarzellen führt. Es wird also eine Erregungswelle erzeugt, wenn der Schwellwert der umliegenden Zellen erreicht wird.

Die Änderung des Membranpotentials  $e$  an einer Heterogenität in einem elektrischen Feld  $E$  ergibt sich aus der Gleichung für die Wellenausbreitung um das Ruhemembranpotential  $V_{rest}$  [83, 84]:

$$\nabla^2 e - \frac{e}{\lambda^2} = 0; \quad e = V - V_{rest} \quad [G1]$$

$V$  = induziertes Membranpotential       $\lambda$  = Raumkonstante (0,35 mm).

Für Heterogenitäten mit einem Radius  $R$  ergeben sich für das minimal benötigte Feld folgende Gleichungen (oben für zweidimensionale Systeme, unten für dreidimensionale Gewebe) [70]:

$$E_{2\text{dim}} = -\frac{V_t - V_{rest}}{\lambda} \frac{K_1'(R/\lambda)}{K_1(R/\lambda)} \approx 1/R, \quad R \ll 1 \quad [G2]$$

$$E_{3\text{dim}} = \frac{V_t - V_{rest}}{\lambda} \frac{1 + 2\alpha + 2\alpha^2}{1 + \alpha} \quad [G3]$$

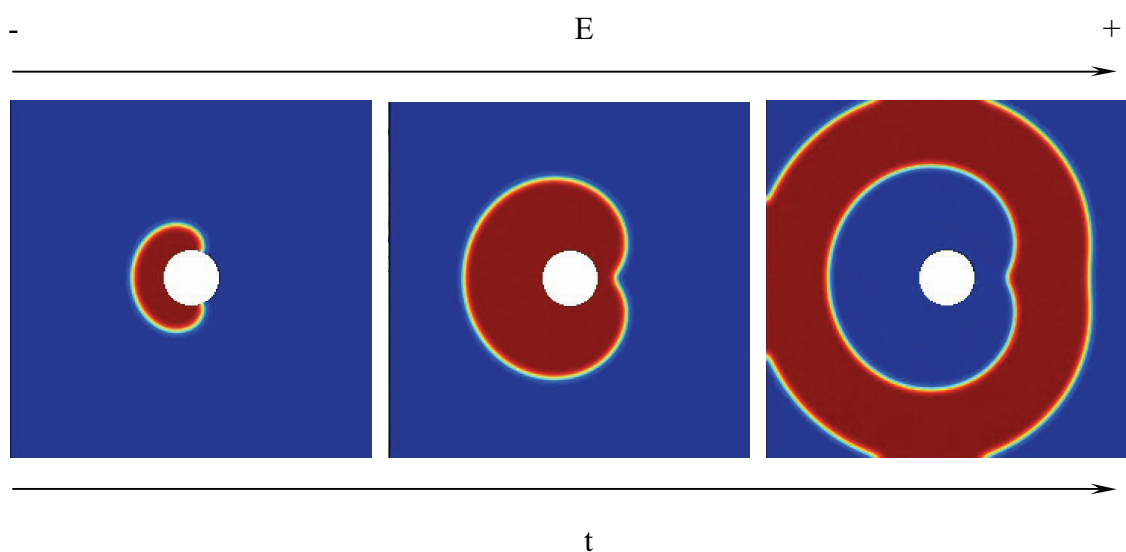
$V_t$  = Anregungsschwelle       $k_l$  = Bessel-Funktion       $\alpha = \lambda/R$

Daraus wird ersichtlich, dass das minimal benötigte elektrische Feld  $E$  zur Generierung von virtuellen Elektroden (vE) abhängig vom Radius der Heterogenitäten ist. Es lässt sich also die Anzahl von vE mittels der Feldstärke kontrollieren. Dabei verhält sich der Durchmesser

umgekehrt zur Feldstärke, d. h. mit abnehmendem Durchmesser steigt die benötigte Feldstärke.

In Experimenten an einzelnen caninen Ventrikeln hat sich das Anti-Fibrillation Pacing (AFP) nach Luther et al. als eine mögliche Methode zur Beendigung von VF erwiesen [70]. Um die Theorie zu validieren werden derzeit Ganzherzversuche und Zellkulturexperimente durchgeführt, welche die Robustheit des AFP bestätigen sollen.

Ziel ist es die Strategie als Behandlungsmethode in die Kardiologie einzuführen und die Defibrillation damit schonender für den Patienten werden zu lassen.



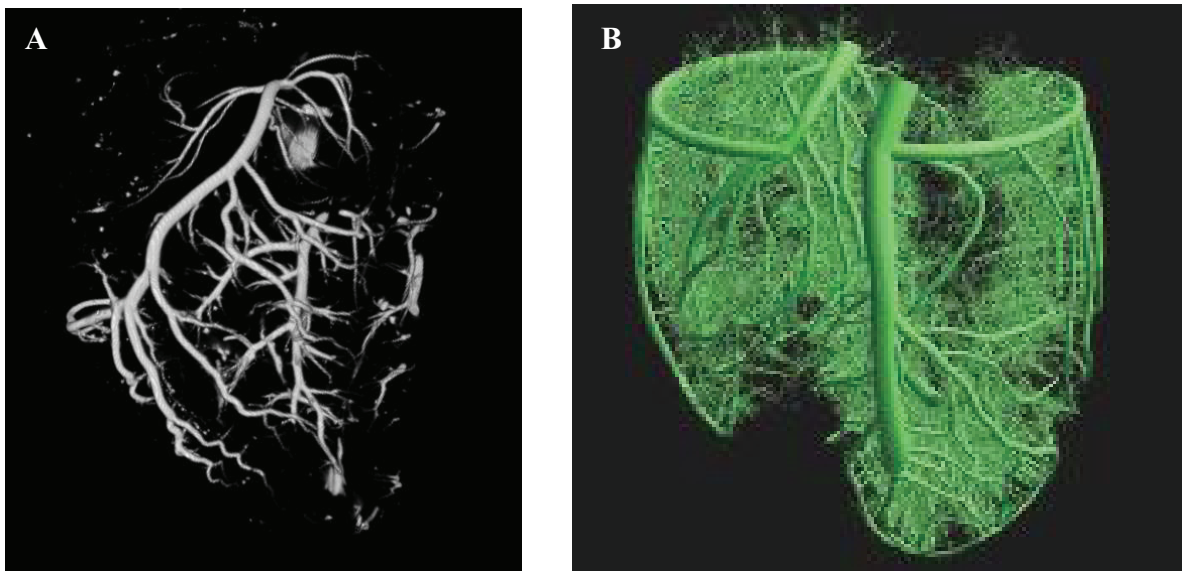
**Abb. 6:** Simulation einer Heterogenität im elektrischen Feld mit kreisförmiger Wellenausbreitung [P. Bitthin]. Rot stellt dabei das Aktionspotential dar und blau das Ruhepotential; der weiße Kreis bezeichnet die Heterogenität.

### 1.2.3.1. Natürliche Heterogenitäten

Bei denen für die vorliegende Arbeit verwendeten Begriff der Heterogenität handelt es sich um strukturelle, physikalische Unterschiede in der Zellkultur bzw. im Gewebe. Dabei handelt es sich um lokal begrenzte Gebiete, die durch eine stark verringerte oder vollständig blockierte Pulsweiterleitung charakterisiert werden. Anders gesagt stellen Heterogenitäten örtliche elektrische Störungen homogenen Mediums dar.

Für die Rekrutierung von virtuellen Elektroden im Herzgewebe können nun zum einen die natürlichen, wie z. B. die Blutgefäße, und zum anderen erworbenen Heterogenitäten, z. B.

Infarktfolgen, verwendet werden, welche nicht über eine elektrische Leitfähigkeit verfügen. Das Herz verfügt über ein weit verzweigtes System an Blutgefäßen, wobei die beiden großen Herzkranzgefäße, die Aorta coronariae sinistra und Aorta coronariae dextra, am ehesten sichtbar sind auf der Herzoberfläche. Von ihnen zweigen sich eine Vielzahl an Gefäßen ab. Um möglichst alle Bereiche und Strukturen des Muskels zu versorgen, ändert sich während der Verästelungen der Durchmesser der Gefäße. D. h. im gesamten Herzen befinden sich potentielle virtuelle Elektroden, deren Anzahl durch die Feldstärke des elektrischen Feldes bestimmt werden kann (siehe *G2* und *G3*). Ebenso ändert sich die Orientierung der Adern, wodurch auch ihr Durchmesser gesehen zur Feldrichtung beeinflusst wird. In Abb. 7 sind zwei Beispiele für das arterielle Blutsystem am Herzen dargestellt, welche die Variabilität desselben verdeutlichen.



**Abb. 7:** Beispiele für das Gefäßsystem des Herzens. **A)**  $\mu$ CT-Aufnahme eines Kaninchenherzens. Dabei werden die Gefäße mittels eines Kontrastmittels und Röntgenstrahlen sichtbar gemacht. **B)** Computermodell des arteriellen Koronarsystems eines Schweineherzens [56].

### 1.3. Kardiale Dynamik – Biologische und physikalische Forschungsansätze

Seit einiger Zeit hat sich die Sichtweise auf das Problem von der rein medizinischen Seite auch auf die naturwissenschaftliche Betrachtungsweise verlegt. So wird das Augenmerk neben symptomatischen Auslösern ebenfalls auf funktionelle Ursachen im Gesamtsystem gelegt. Für die Kontrolle der wellenförmigen Ausbreitungen und die damit eventuell verbundenen Therapiemöglichkeiten gibt es bis dato allerdings zum größten Teil nur Computersimulationen und erste praktische Versuche im *ex-vivo* Experiment.

Daneben eignen sich die Zellkulturen auch für Untersuchungen von grundsätzlicheren Fragestellungen. So haben sich unter anderem Glass et al. mit der Dynamikänderung durch periodische Elektrostimulation beschäftigt. Ihre Beobachtungen reichten über verschiedene allgemeine Eigenschaften von Erregungskinetiken zu nichtlinearen Oszillatoren, wie z. B. Phasenblock und -wiedereintritt. Durch diese und weitere Arbeiten war es möglich die kardialen Zellkulturen als erregbares Medium zu klassifizieren und zu verifizieren [10, 11, 48].

Außerdem werden Cardiomyocytenkulturen auch zur Klärung von zellbiologischen Fragestellungen herangezogen. Die elektrische Verbindung der Zellen durch Gap Junction-Proteine und die damit verbundene Aktionspotentialweiterleitung sind Gegenstand vieler Forschungsprojekte. Zudem tritt auch immer stärker die Beeinflussung der Weiterleitungsgeschwindigkeit durch die Kopplung der schnellen Cardiomyocyten mit den langsameren Myofibroblasten in den Vordergrund [128]. Dafür werden gemeinhin Fluoreszenzfarbstoffe, welche das Transmembranpotential bzw. die intrazelluläre Calciumkonzentration aufzeigen verwendet. Doch gerade diese Fluoreszenzmikroskopie hat ihre Tücken. Die Änderung des Signals durch die spektrale Shift liegt bei den meisten verwendeten Farbstoffen unter 5 %, woraus in der Regel ein geringes Signal-Rausch-Verhältnis folgt. Die Mehrheit der Experimente ist auf eine mikroskopische Skala von einigen Millimetern beschränkt. Die Phasenkontrastmikroskopie ermöglicht es, Zellkontraktion ohne die Zugabe von Farbstoffen zu messen und dies sogar auf einem makroskopischen Maßstab von einigen Zentimetern. Doch da die Kontraktion als letztes Glied der Erregungs-Kontraktions-Kopplung auftritt, lassen sich kaum Rückschlüsse auf die Dynamiken der Membranspannung und des Calciums machen.

Neben diesen Methoden wird in der Literatur auch die Kontaktfluoreszenzmessung beschrieben [31]. Hier werden die Fluoreszenzsignale mittels optischer Glasfasern direkt unter dem Kulturgefäß abgenommen. Das Signal-Rausch-Verhältnis ist verglichen zur

allgemeinen Fluoreszenzmikroskopie erheblich verbessert, doch ist die räumliche Auflösung durch die Abmessungen der optischen Fasern begrenzt. Aber warum ist der größere Maßstab eigentlich so wichtig? Um Alternanzen, also Verschiebungen im Signal, zu detektieren werden häufig Einzelzelluntersuchungen gemacht. Allerdings sieht man dort nur den Einfluss bestimmter Parameter auf eine Zelle oder ein paar wenige Zellverbände. Um die Auswirkungen auf die gesamte Dynamik innerhalb der Kultur zu beobachten und charakterisieren zu können, muss ein größeres Feld abgebildet werden. So lassen sich auch Unterschiede in einzelnen Regionen, von denen man sonst nichts mitbekommen würde, beobachten und dann gezielt mikroskopisch untersuchen.

#### **1.4. Wellendynamiken in chemischen und biologischen Systemen**

Das Phänomen der Wellenausbreitung ist nicht allein auf die Physik beschränkt. Die Bildung spontaner räumlicher und zeitlicher Strukturen in biologischen und chemischen Systemen ist schon häufig beobachtet worden. Es handelt sich dabei im Allgemeinen um Reaktions-Diffusions-Systeme, in denen lokale Änderungen zu einer Wellenausbreitung führen. Chemisch gesehen stellen solche Wellen Konzentrationsänderungen dar, wie man sie z. B. bei katalytischen Reaktionen findet. In der Biologie sind vor allem die Zellaggregation von Amöbenkolonien (Bsp. *Dictyostelium discoideum*), sowie die elektrische Signalweiterleitung an Nervenzellen und Muskelfasern bekannt. Zudem lässt sich auch in selbstorganisierten Katalysereaktionen, wie z. B. der Zuckerabbau während der Glykolyse (hier der Protonenübergang zu NADH), eine dynamische Musterbildung finden.

Ein klassisches Experiment zur Veranschaulichung von chaotischen Systemen ist die Belousov-Zhabotinsky-Reaktion (BZR) [121, 122]. Entdeckt wurde die Reaktion 1950/51 von B. P. Belousov, welcher den Citratzyklus nachstellen wollte, indem er die Oxidation von Zitronensäure durch Ceriumionen katalysierte. Als Ersatz für den enzymatischen Cofaktor  $\text{NAD}^+$  verwendete er eine schwefelsaure Bromatlösung. Die anfänglich gelbe Flüssigkeit vollzog einen periodischen Wechsel zu farblos und zurück. Diese oszillatorische Reaktion kommt durch die Ceriumionen zustande, welche zunächst die Zitronensäure oxidieren (Umschlag zu farblos) und danach von den Bromationen wieder oxidiert werden (Umschlag zu gelb). Erst mehrere Jahre später wurde die Bedeutung dieses Experiments anerkannt und u. a. von A. M. Zhabotinsky weitergedacht. Man fand so eine räumlich kreisförmige Musterbildung (siehe Abb. 8). Die BZR wurde oft als Grundlagenexperiment für dissipative

Strukturen, die in der Chemie, Biologie (z. B. Lotka-Volterra-Modell), Physik und auch Soziologie vorkommen, angesehen [44].

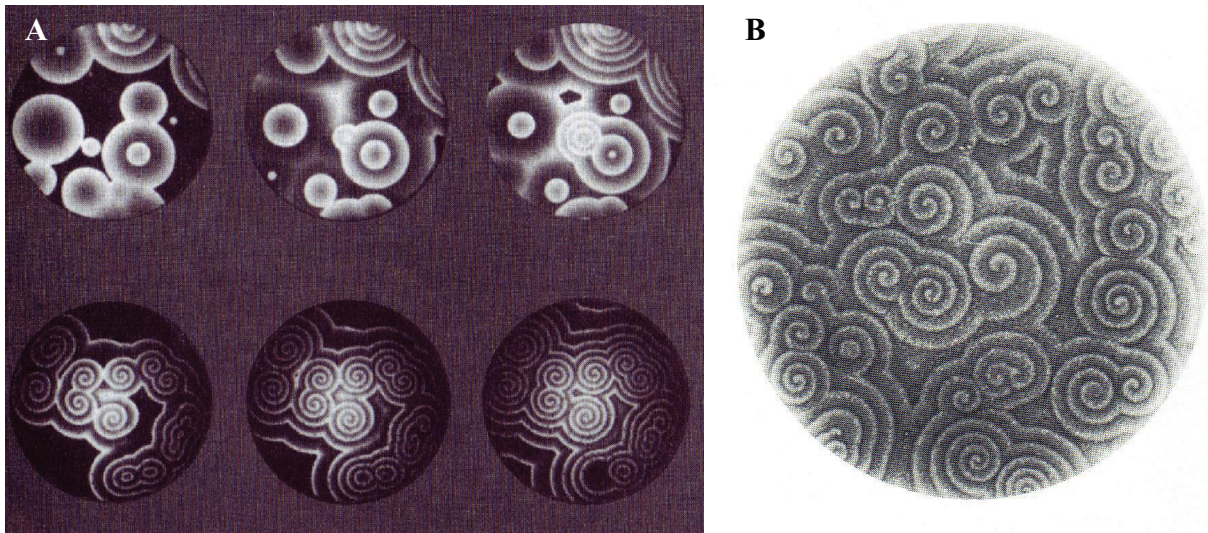
Als ein gutes, experimentelles System zur Beobachtung und Beschreibung von Wellendynamiken hat sich der Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* etabliert. Als Beispiel für die zelluläre Selbstorganisation in räumlicher Musterbildung durch biochemische Signale wurde und wird der Organismus vielseitig untersucht. *D. discoideum* ist eine einzellige Amöbe, welche unter Nährstoffmangel in die Aggregationsphase eintritt. Um die Aggregationsphase einzuleiten wird von einigen dicht beieinander liegenden Zellen cAMP (zyklisches Adenosin-Monophosphat) sekretiert. Zellen im näheren Umfeld können nun mittels ihrer cAMP-Rezeptoren (*cARI*) den Konzentrationsgradienten des chemotaktischen Signals wahrnehmen und reagieren ihrerseits mit orientierten Zellbewegungen entlang des Gradienten in Richtung ansteigender Konzentration und cAMP-Sekretion. Das extrazelluläre cAMP, sowie das am Rezeptor gebundene cAMP werden durch eine Phosphodiesterase gelöst und zerstört, wodurch die Zellen für neue Impulse zugänglich sind [42, 75]. Mit Hilfe der Dark-Field-Optik ist es möglich die so gebildeten Muster aufzuzeigen. Dabei lassen sich u. a. spiralförmige Strukturen erkennen, wie sie in Abb. 8 dargestellt sind. An der Spiralspitze bildet sich dann ein Zellhaufen, welcher sich zu einem Fruchtkörper weiterbildet. Auch bei der Differenzierung der einzelnen Organismen zum Fruchtkörper konnten wellenartige Muster, wie z. B. so genannte Scroll-Waves, beobachtet werden. *Dictyostelium discoideum* wird deshalb auch zur Erforschung der Zelldifferenzierung zu komplexen Organismen herangezogen [26, 80, 115, 122].

Medizinisch interessant sind neben den Herzdynamiken auch die Vorgänge an Neuronen. 1944 entdeckte Leao während seiner Untersuchungen zur Epilepsie die „spreading depression“. Er hatte entdeckt, dass spontan depolarisierende Neuronen Kaliumionen abgeben, wodurch die benachbarten Zellen ebenfalls depolarisieren und die Erregung weiter propagiert wird. Leao fand heraus, dass schon schwache mechanische oder elektrische Stimuli zu einer lokalen Depression führen können, welche einige Minuten andauert und sich kreisförmig ausbreitet. Wie auch im Herzen, können diese Ausbreitungswellen durch Heterogenitäten, wie z. B. Verletzungen, in ihrer Form beeinflusst werden. So konnten Spiralwellen an Hindernissen beobachtet werden. Gouras et al. fanden dieses Phänomen der „spreading depression“ auch in der Retina [121].

Dies sind nur Beispiele für eine Vielzahl von musterbildenden Untersuchungssystemen. Betrachtet man allein schon die ubiquitäre Verbreitung von Calcium als Botenstoff und seine Oszillation in nahezu allen bisher untersuchten eukaryontischen Zellen. Biologische Systeme



zeigen in der zeitlichen Ausrichtung ihrer Musterbildung eine große Variabilität. Dauern angefangen bei Sekunden (z. B. Neuronen, Cardiomyocyten) bis hin zu Tagen sind bereits beschrieben worden. Unter diesem Gesichtspunkt lassen sich auch periodische Ereignisse wie Zellzyklen und Tagesrhythmen hinsichtlich der wellenförmigen Musterbildung erforschen.



**Abb. 8:** Dark-Field-Aufnahmen von Wellendynamiken in chemischen und biologischen Systemen. In **A** ist der zeitliche Verlauf einer Belousov-Zhabotinsky Reaktion dargestellt [121]. **B** zeigt eine Aufnahme von aggregierenden *Dictyostelium discoideum* Amöben [122].

## 2. Zielstellung

Obwohl das Phänomen der Herzarrhythmie schon seit mehreren Jahrzehnten bekannt ist, sterben noch immer weltweit jährlich Hunderttausende von Patienten an eben diesen Herzkrankheiten. Auf Grund dieser Tatsache und der Etablierung neuer Untersuchungsmethoden hat die Forschung auf dem Gebiet der kardialen Dysfunktion in den letzten hundert Jahren an Bedeutung gewonnen.

Weltweit werden heute Schrittmacher und Defibrillatoren implantiert, welche durch elektrische Pulse in die Aktivität des Herzmuskels regulierend eingreifen. Doch werden diese Pulse vom Patienten oftmals als schmerzhaft oder Angst erregend empfunden. Als Grund dafür wird dabei die hohe Energie der Defibrillationspulse angegeben. Um die Pulsenergie auf ein niedrigeres Niveau zu reduzieren, haben Pumar et al. die Theorie der virtuellen Elektroden etabliert, welche besagt, dass durch das Anlegen eines elektrischen Feldes Heterogenitäten zu einer Signalausbreitung angeregt werden können [84]. In dieser theoretischen Arbeit wurde die Abhängigkeit der Feldstärke zum Durchmesser der Inhomogenitäten postuliert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll der experimentelle Nachweis dieser Theorie erbracht werden.

Entscheidend für die experimentelle Untersuchung von Arrhythmien sind Messverfahren, die es erlauben, die raumzeitliche Dynamik des Herzens zu visualisieren. Um diese Wellen sichtbar zu machen, können Fluoreszenzfarbstoffe, die das Transmembranpotential bzw. die intrazelluläre Calciumkonzentration aufzeigen, verwendet werden. Gegenstand dieser Arbeit ist neben der Messung der Fluoreszenzsignale von Membranspannung und Calcium auch die Aufnahme der mechanischen Kontraktion im Zellkulturmodell ohne Verwendung von Farbstoffen.

Mit Hilfe dieser Aufnahmen sollen unter anderem nachstehende Fragen geklärt werden:

- I. Welche Änderungen in den Wellendynamiken sind bei Feldstimulationen zu beobachten?
- II. Lässt sich die von Pumar et al. aufgestellte These über die virtuellen Elektroden im Zellkulturmodell nachweisen?
- III. In wie weit spielt der Heterogenitätendurchmesser eine Rolle bei der Rekrutierung solcher Elektroden?

- IV. Wie ändern sich die Arrhythmieformen raumzeitlich unter Einfluss verschiedener Parameter (z. B. Temperatur)?
- V. Haben hypothermische Einflüsse eine pro-arrhythmogene Eigenschaft?

Zur Beantwortung der obenstehenden Fragen, wird ein Messaufbau entwickelt, welcher die simultane Aufnahme von Membranspannung, intrazellulärem Calcium und Kontraktion ermöglicht. Dadurch sollen zudem folgende methodische Fragestellungen beantwortet werden:

1. Ist es möglich gleichzeitig die Membranspannung, die Calciumdynamik und die Kontraktionsinformation aufzunehmen?
2. Sind diese Messungen auf einem makroskopischen Maßstab anwendbar?

Die so gewonnenen Daten werden in Hinblick auf die Verwendbarkeit in der medizinischen Behandlung kardialer Arrhythmien diskutiert.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

Für die vorliegende Arbeit wurden die unten aufgelisteten Materialien verwendet. Alle hier verwendeten Geräte, Software und Chemikalien sind Trademarks der jeweiligen Firmen und werden im Weiteren nicht mit Lizenzrechtlichen Sonderzeichen versehen.

##### **Geräte für Optik:**

Sonderbau *bestehend aus:*

MVX10

IX71

Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, BRD

Laser-Scanning-Mikroskop

*FluoView FV1000*

Oszilloskop TDS 2024B	Tektronix GmbH, Köln, BRD
Retiga EXi cooled Mono 12bit (CCD-Kamera)	QImaging Corp., Canada
Cascade 128+ (CCD-Kamera)	Photometrics, Tucson, USA
MEA 1060-inv	Multichannel Systems, Reutlingen, BRD
LED Luxeon Star	Quadica Inc., Brantford, USA
Elektronikzubehör Halogenstiftsockellampe	Conrad Electronics, Hirschau, BRD
Pike F-032B (CCD-Kamera)	Alliedvision Technologies, Stadtroda, BRD
Phantom PH-607 (CMOS-Kamera)	Vision Research Inc., Wayne, USA
Laborschaltnetzgerät	Voltcraft, Hirschau, BRD

X95 Profilsystem	
Schienensystem FLS95	
X95 Profilreiter	
Gestellverbindungsreiter	
zentrierender Linsenhalter	
Makrobanksystem-	
komponenten	LINOS Photonics GmbH & Co KG, Göttingen, BRD
Mikrobanksystem-	
komponenten	
Lochblenden mit $\varnothing$	
1 mm, 0.6 mm, 0.3 mm, 0.2 mm	
Halogenlampengehäuse	
Faltenbalg	
<hr/>	
Schwingungsgedämpfte	
Labortische	TMC, Peabody, USA
<hr/>	
<i>Linsen</i>	
PCX 75x75 mm	
PCX 75x150 mm	
<i>Filter Breitband</i>	
550 nm $\pm$ 40 nm	
500 nm $\pm$ 40 nm	
Grün Filter-Additive	
Blau Filter-Additive	
<i>Filter Engbandpass</i>	
515 nm $\pm$ 5 nm	Edmund Optics, Karlsruhe, BRD
520 nm $\pm$ 5 nm	
<i>45° Dichroic Filter</i>	
Gelb	
Blau	
Grün	
<i>Longpass Filter</i>	
610 nm	
One-Surface-Spiegel	
Opalglasdiffuser	

Verlängerungsadapter für C-Mount Filterhalter Spiegelmount Montagestangen mit Gewinde Gewindeadapter Klemmen/Halter	Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching, BRD
Bildverstärkerset C9016-21L3	Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching, BRD
50 mm Objektiv 11-110 mm Zoomobjektiv	Navitar, Rochester, USA
Bipolar operational Power Supply/Amplifier	Kepeco Inc., Flushing, USA
20 MHz Function/Arbitrary Waveform Generator	Agilent Technologies, Böblingen, BRD
Inkubatorkammer Temperaturregler	MPI DS, Göttingen, BRD
Platinblech für Elektroden	Heimerle & Meule GmbH, Pforzheim, BRD
Cascade Modular PC	Cascade Computer, Göttingen, BRD

**Geräte Zellkultur:**

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen, BRD
HeraCell 150 Inkubator	Thermo Electron Corporation, Langenselbold, BRD
Tischkühlzentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, BRD
Pipettierhilfe <i>Pipetboy</i> Vakuumabsaugpumpe	Integra Biosciences GmbH, Fernwald, BRD
Mikroliterpipetten <i>in</i> 0.5-10 µl 10-100 µl 20-200 µl 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, BRD
Sterilbank KS	Thermo Scientific, Langenselbold, BRD
Wasserbad geschlossen	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, BRD

## Software:

Matlab 2008	Mathworks Corp., USA
PVCam	Roper Scientific
Multicamera	© J. Schröder-Schetelig, MPI DS
PH607-Phantom User	Vision Research Inc., USA
SmartView	Alliedvision Technologies, Stadtroda, BRD
Quicktime Pro für Windows	Apple Computer, USA
EMAnalyser	© A. Schlemmer, MPI DS
ImageJ	National Institutes of Health, USA
InkScape	Draw Freely, www.inkscape.org

## Chemikalien:

### Zellkultur

DMEM/F12 (1:1) 1x (11039)	
Fetal Bovine Serum (10270)	
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml (15140)	GIBCO/invitrogen GmbH, Karlsruhe, BRD
Dulbecco's PBS 1x (14190)	
Trypanblau 0.4 % (15250)	
Collagenase Typ II (CLS-2)	Worthington Biochemical Corp., Lakewood, USA
Natrium-L-Ascorbat (A7631)	
Norepinephrine (A0937)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, BRD
Ethanol absolut (8006)	J.T. Baker, Deventer, NL
Carbogen (5 % CO <sub>2</sub> /95 % O <sub>2</sub> )	Air Liquide Deutschland GmbH, Düsseldorf, BRD
DuPont™PerMX™ 3020 mr-Dev 600	micro resist technology GmbH, Berlin, BRD

### Immunfluoreszenz

Anti-Calcium Channel (Rabbit) (C1728)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, BRD
Anti-alpha Actinin (Mouse)	

Anti-Cx43 Antibody (Mouse)

---

Anti-Human Discoidin  
Domain Receptor2 polycl.  
(Rabbit) (PAK 5014) Linaris Biologische Produkte, Wertheim-Bettingen,  
BRD  
Anti-Rabbit IgG:DyLight549  
polyclonal (LST0036D549)

---

Anti-Mouse IgG-Cy3  
conjugated (115-165-062)  
Anti-Mouse IgG-FITC  
conjugated (115-095-062) dianova GmbH, Hamburg, BRD  
IS Mounting Medium  
(AKS38447)

---

Horse-Serum (Vectastain Elite  
Kit) Biozol GmbH, Eching, BRD

---

Paraformaldehyd Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, BRD

---

Roti-Histofix 4 % (P087.3)  
Triton-X100 Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, BRD  
Tween 20

---

Aqua dest. MPI für Experimentelle Medizin, Göttingen

---

**Fluoreszenzfarbstoffe**

Di-4-Anepps (D1199)  
Di-8-Anepps (D3167) Molecular Probes/invitrogen GmbH, Karlsruhe,  
RH237 (S1109) BRD  
Fluo-4FF/AM (F23981)

---

Fluo-3/AM (343242)  
DMSO (317275) Calbiochem/Merck KGaA, Darmstadt, BRD



## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Primärzellkultur

Für die makro- und mikroskopischen Aufnahmen wurden Primärzellen von neonatalen Ratten gewonnen. Dazu wurde zwei Tage alten Ratten der Wistar-Linie das Herz entnommen und enzymatisch aufgearbeitet. Die Ventrikel wurden zerkleinert in ca. 1-3 mm<sup>3</sup> große Stücke. Nach einem Waschschrift in DPBS wurden die Gewebestücke einem Vorkonditionierungsschritt unterzogen. Hierfür wurde das Gewebe in ein Falcon Tube mit 0,5 ml / Herz Collagenase II (300 U/ml, gelöst in DPBS) überführt und für 20 min auf Eis inkubiert, dabei alle drei Minuten geschüttelt. Anschließend wurde der eigentliche Verdau eingeleitet. Die Gewebestücke wurden für 10 min bei 37 °C inkubiert und innerhalb der Inkubationszeit mehrmals geschüttelt. Die Zell-/Gewebesuspension wurde für 2 min in Ruhe bei RT stehen gelassen, das hat zur Folge, dass die größeren Gewebestücke nach unten absinken. Der Überstand wurde verworfen und auf die verbliebenen Gewebestücke wurden 3-5 ml Collagenase II aufgefüllt. Die Inkubationszeit betrug hier 15 min bei 37 °C, wiederum wurde während dieser Zeit die Suspension mehrmals geschüttelt. Für den anschließenden Zentrifugationsschritt wurde die Enzymreaktion mit einem adäquaten Volumen an Kulturmedium abgestoppt. Nach der Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min, wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2 ml Kulturmedium Tag 0-2 (Ansatz siehe Tab. 1) resuspendiert. Die Schritte Zentrifugation und Verdau wurden zweimal wiederholt. Abschließend wurden die Zellsuspensionen gepoolt und mittels einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Eine Trypanblau-Färbung ermöglichte gleichzeitig eine Vitalitätsbestimmung.

Für die Kultur wurden folgende Zellzahlen verwendet:

- |  |                                 |
|--|---------------------------------|
| - Petrischalen mit ø 5 cm                          | 2*10 <sup>5</sup> Zellen / ml   |
| - Objektträger (zugeschnitten auf 3,5 cm x 2,8 cm) | 6*10 <sup>5</sup> Zellen gesamt |

Der Mediumwechsel erfolgte mit komplettem Kulturmedium in den ersten 3 Tagen alle 24 h, ab Tag 3 mit Kulturmedium mit 6 % FBS. Ab Tag 4 wurde der Mediumwechsel auf alle 48 h umgestellt. Zur Messung kamen jeweils Kulturen nach einer Kulturdauer von 6-8 Tagen, soweit sie konfluent gewachsen und ausreichende Aktivität aufzeigten.

Alle Präparationen erfolgten in Abstimmung mit den geltenden Richtlinien für die Tiertötung und wurden mit dem Tierhaus des Max-Planck-Instituts für Experimentelle Medizin

abgesprochen. Die Tiere wurden nur zur Gewinnung von Cardiomyocyten verwendet und danach den Bestimmungen gemäß entsorgt.

**Tab. 1:** Zugabeschema für Kulturmedium Tag 0-2.

<b>Chemikalie</b>	<b>Zugabe</b>
DMEM/F12	
FBS	10 %
Pen./Strep.	1 %
Norepinephrine	1 %

**Tab. 2:** Zugabeschema für Kulturmedium ab Tag 3.

<b>Chemikalie</b>	<b>Zugabe</b>
DMEM/F12	
FBS	6 %
Pen./Strep.	1 %
Norepinephrine	1 %

Um die Aktivität der Zellkulturen auch über einen längeren Kulturzeitraum zu gewährleisten, wurde dem Medium Norepinephrine, auch Noradrenalin genannt, zugesetzt. Dieses natürlich vorkommende Hormon sorgt mit seiner Bindung an die  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren der Cardiomyocyten für eine gleich bleibende Stimulation der Kontraktion.

Ansatz von Norepinephrine:

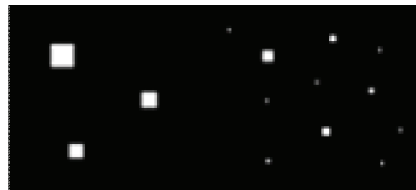
- 0,59 g Natrium-L-Ascorbat werden in 100 ml Aqua dest. gelöst, entspricht einer Lösung von  $c = 30 \text{ mM}$
- die Ascorbat-Lösung kann bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  dunkel gelagert werden (für ca. 2 Monate)
- 80 mg Norepinephrine werden in 25 ml  $30 \text{ mM}$  Ascorbat-Lösung aufgelöst, entspricht einer Stocklösung von  $c = 10 \text{ mM}$
- anschließend durch einen  $0,2 \text{ }\mu\text{m}$  Filter sterilfiltrieren

- die Norepinephrine-Lösung ist bei  $-20\text{ °C}$  für ca. 1 Monat haltbar

### 3.2.2. Erzeugung von künstlichen Heterogenitäten

Für die Experimente zur Untersuchung der Abhängigkeit des elektrischen Feldes zum Durchmesser der Heterogenitäten wurden mittels der Photolithographie Quadrate unterschiedlicher Größe erzeugt. Photolithographische Arbeitstechniken beruhen auf lichtsensitiven Polymeren, den so genannten Photoresistenten. Mit Ihnen lassen sich Strukturen im Mikro- und Nanometerbereich erzeugen, was zu ihrer verbreiteten Anwendung in der Elektronik geführt hat. Dabei wird zwischen Positiv- und Negativresisten unterschieden. Ausschlaggebend für diese Einteilung ist der jeweilig ablaufende Prozess, bei Negativresisten werden die belichteten Gebiete vernetzt und damit stabil verbunden, wohingegen die unbelichteten Regionen mittels eines Entwicklers entfernt werden können. Positivresisten wirken in umgekehrter Richtung.

Muster werden in der Photolithographie durch vorher angefertigte Masken auf die Resiste gebracht. In dieser Arbeit wurden dafür Muster, passend für die vorliegenden Objektträger, mittels der Bildbearbeitungssoftware InkScape angefertigt und ausgedruckt. Die so entstandenen Ausdrücke wurden auf eine Transparentfolie übertragen und durch schwarze Permanenttinte noch lichtundurchlässiger gemacht.

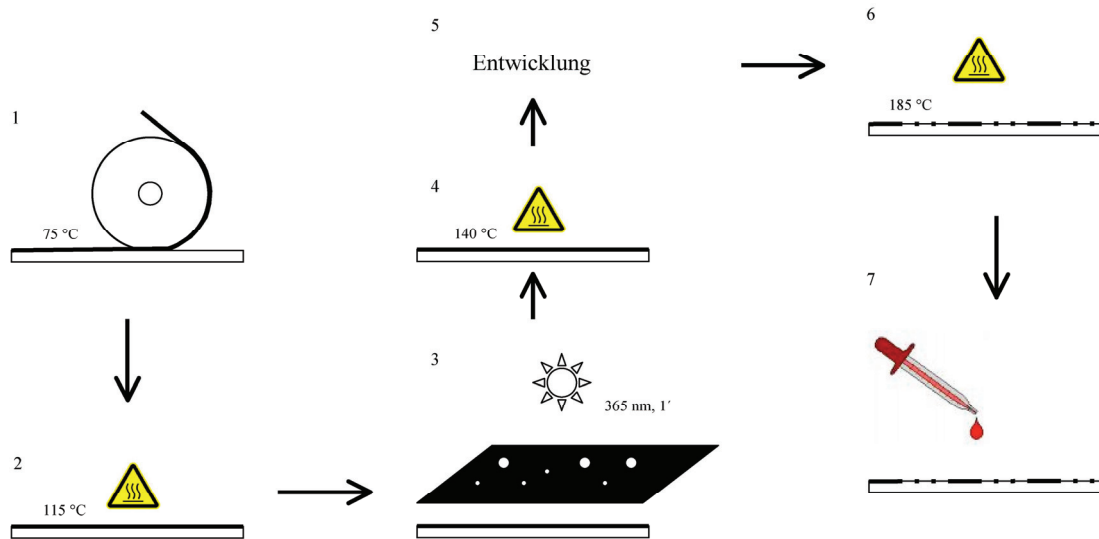


**Abb. 9:** Beispiel für Lithographie-Maske. Dargestellt ist eine der für die Photolithographie verwendeten Maskenvorlagen in Originalgröße.

Zur Erzeugung der hier verwendeten Heterogenitäten wurde ein Trockenfilmresist verwendet. Von Vorteil ist, dass die Trockenfilmresiste bereits mit einer vorgefertigten Schichtdicke ausgeliefert werden. Außerdem sind zum Aufbringen des Resists keine Spin Coater notwendig, wie bei Flüssigfilmresisten.

Für die Erstellung künstlicher Inhomogenitäten wurde folgendes Protokoll verwendet:

- Reinigung des Substrats (hier: Objektträger): Das Substrat sollte frei von Staub und Partikeln sein.
- Laminierung: Um das Photoresist aufzubringen, wird der Trockenfilm bei ca. 75 °C und einer Geschwindigkeit von 1 m/s auf das Substrat laminiert.
- Backen des Resistfilms: Die Objektträger werden für 7 min bei 95-120 °C auf einer Heizplatte gebacken.
- Belichtung: Nach Entfernung des einseitigen Schutzfilms wird eine vorher angefertigte Maske auf das Substrat gelegt und mittels einer Plexi- oder Glasscheibe fixiert. Die Objektträger werden dann für 1 min mit UV-Licht ( $\lambda_{\max} = 365 \text{ nm}$ ) belichtet.
- Backen: Um die Vernetzung durch die Belichtung noch zu verstärken, werden die Objektträger bei min. 140 °C auf einer Heizplatte gebacken für 4 min
- Entwickeln: Mit Hilfe des Entwicklers mr-Dev 600 (Basierend auf PGMEA) wird das unvernetzte Resist entfernt. Inkubation für 2 min bei RT.
- Spülen: Zur Entfernung von Entwickler werden die Substrate mit 2-Propanol für 2 min gespült.
- Trockenschritt: Durch Zentrifugation mit einer Mini-Zentrifuge werden die OTs getrocknet
- Hart-Backen: Auf einer Heizplatte mit > 180 °C werden die OTs hartgebacken, was eine bessere Stabilität auch bei später ständigem Flüssigkeitseinfluss gewährleisten soll.

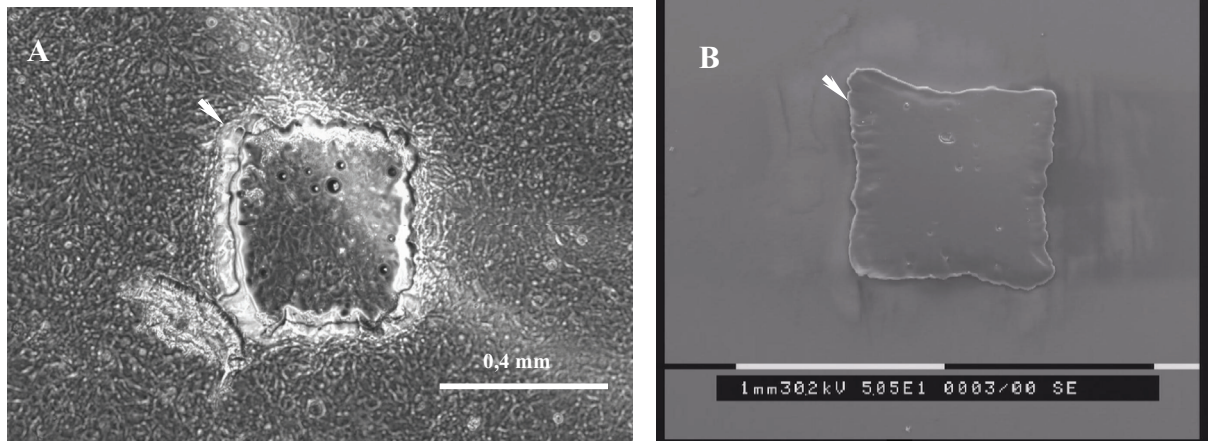


**Abb. 10:** Schematische Darstellung des Photolithographie-Prozesses. Der Prozess ist aufgegliedert in Laminierung (1), Backen (2), Belichtung mit UV-Licht (3), Verfestigung (4), Entwicklung der Strukturen (5), zusätzliches Hartbacken (6) und Zellkultur (7).

Nach den photolithographischen Arbeitsschritten wurden die Schnitte in DPBS für min. 1 h gewaschen und dann für die Zellkultur zugeschnitten. Anschließend wurden die OT unter UV-Licht sterilisiert und mit einer Fibronectinlösung beschichtet (ü. N. bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Mit den hier verwendeten Materialien konnten Heterogenitäten mit einer minimalen Kantenlänge von  $0,25\text{ mm}$  erzeugt werden. Limitierend waren dabei zum einen die Auflösung der angefertigten Masken und die Fokussierung der UV-Lampen.

Die Durchmesser der Heterogenitäten wurden nach den Experimenten mittels mikroskopischer Aufnahmen nachgemessen (siehe Abb. 11).



**Abb. 11:** Licht- und Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von photolithographisch erzeugten Heterogenitäten (siehe Pfeile). **A)** Lichtmikroskopische Aufnahme einer Heterogenität in der Zellkultur, Kulturdauer 7 d. **B)** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme vor der Kultivierung mit Zellen. Die Heterogenitäten wurden vor der Elektronenmikroskopie mit 15  $\mu\text{m}$  Gold besputtert. Die Skalierungsbalken sind jeweils in den Bildern angegeben.

### 3.2.3. Immunfluoreszenz

Vergleicht man die Anordnung der Cardiomyocyten im Ganzherz mit der in der Zellkultur, dann stellt man schnell fest, dass die Zellen ihre Form und Ausrichtung ändern. Während im Organ die Cardiomyocyten rechteckig sind und die Konzentration der Gap Junction-Proteine an den kurzen Seiten am stärksten ist, so sehen die Herzmuskelzellen in Kultur eher kürzer aus und die Connexine der Gap Junctions finden sich über der gesamten Zellmembran gleichmäßig verteilt. Zudem sind die Zelltypen, z. B. Fibroblasten, Muskelzellen und Zellen des Leitungssystems in der Zellkultur mehr miteinander vermischt als beim Organ.

Um die Verteilung der Connexine und Kanalproteine (z. B. der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle) zu veranschaulichen wurde die Methode der Immunfluoreszenz verwendet. Mit Hilfe dieser Technik ließ sich auch das Verhältnis zwischen Herzmuskelzellen und Myofibroblasten visualisieren. So gibt es erste Hinweise, dass die vermehrte elektrische Kopplung zwischen Cardiomyocyten und Myofibroblasten zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit des Reentry führt [128].

Bei der Immunfluoreszenz handelt es sich um ein Verfahren aus der Immunhistochemie (IHC), welches auf der Bindung von Antikörpern (AK) an ein bestimmtes Epitop beruht. Das Epitop stellt hier ein Gebiet bzw. ein Kompartiment im Gewebe oder der Zelle dar, wo sich das gesuchte Antigen befindet. Ziel ist es nun mittels spezifischer Antikörper diese Epitope zu markieren und sichtbar zu machen. Dafür wird das Antigen zunächst von einem so genannten Primärantikörper gebunden. Durch einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper, welcher spezifisch für den Primärantikörper ist, können jetzt nur die Bereiche visualisiert werden, wo auch der Primärantikörper gebunden ist. Es lassen sich durch verschiedene Primär- und Sekundärantikörper auch simultane Färbungen durchführen. Heute findet diese Methodik zum einen Anwendung in der Medizin, dort besonders in der Tumordiagnostik. Da sich hier die betroffenen Gebiete sehr gut von den gesunden Gewebegebieten abgrenzen lassen.

In dieser Arbeit wurde der Primärantikörper *Rabbit Anti-Human Discoidin Domain Receptor 2 (DDR2)* zur Illustration der Verteilung von Cardiomyocyten versus Myofibroblasten verwendet. Die Discoidin-Domain-Rezeptoren gehören zu der Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, welche durch Collagen aktiviert werden. Als solche sind sie in unserem Fall spezifisch für die Myo- und Fibroblasten. Als Marker für Myocyten wurde der monoclonale Primärantikörper gegen das sarkomerische  $\alpha$ -Aktinin gewählt. Das sarkomerische  $\alpha$ -Aktinin stellt die Verankerung der Aktinfilamente in den Z-Scheiben des Sarkomers dar.

Um die Verteilung der Gap Junction sichtbar zu machen, wurde als Primärantikörper ein gegen Connexin 43 (Cx 43) gerichteter monoklonaler AK angewendet. Die Connexine gelten als Bausteine der Gap Junctions, wobei besonders Cx 43 als kardialer Marker gilt.

Zudem stand ein Anti-Calcium Kanal AK zur Verfügung, der gegen die  $\alpha_{1D}$  Untereinheit des L-Typ Kanals gerichtet ist.

Als fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper wurden zu einem die DyLight-AK DyLight488, DyLight549 und DyLight649, sowie FITC- und Cy3-markierte AK eingesetzt.

Die Immunfärbung der Zellkulturen erfolgte anhand folgenden Protokolls:

1. Fixierung der Zellen:

- Medium entfernen > Spülen mit DPBS für 1-2 min
- Inkubation mit 4 % PFA für 20 min
- 2x Spülen mit DPBS für 1-2 min
- Lufttrocknen der Präparate für min. 45 min

2. Permeabilisierung mit 0,1 % Triton-X100 in DPBS

- Inkubation für 20 min bei RT

3. Blockierung unspezifischer Reaktionen

- Inkubation mit 5 % Normalserum (hier: Pferdeserum) und 0,2 % Tween 20 in DPBS für 30 min bei RT

4. 1. Primärantikörper

- Inkubation mit Primärantikörper für 60 min bei RT
- 2x Spülen mit DPBS für 1-2 min

5. 1. Sekundärantikörper

- Inkubation mit Sekundärantikörper für 45 min bei RT und im Dunkeln
- 2x Spülen mit DPBS für 1-2 min

6. 2. Primär-/Sekundärantikörper

- für einen weiteren Primär-/Sekundärantikörper die Schritte 3. und 4. wiederholen
- beide Inkubationsschritte im Dunkeln durchführen



## 7. Eindecken der Präparate

- mit Hilfe von Mounting Medium (Fa. Dianova) die Objektträger mit einem Deckgläschen abdecken
- für Langzeitaufbewahrung die Ränder des Deckgläschen mit transparentem Nagellack verschließen.

Die so gefärbten Präparate wurden bei 4 °C im Dunkeln bis zur mikroskopischen Auswertung aufbewahrt. Für die Analyse wurde ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (Fa. Olympus) verwendet.

Für den Vergleich mit Geweben wurden Gefrierschnitte von neonatalen Rattenherzen (Alter 2 d) angefertigt. Dafür wurden die präparierten Herzen in DPBS zweimal gespült und anschließend mit Hilfe von Tissue Tek am Stempel eines Frigocut bei -20 °C fixiert (Reichert Jung Frigocut 2800 (RJ-F2800)). Anschließend wurden Schnitte mit einer Dicke von 10 µm geschnitten, wobei die Schnittebene horizontal zur Herzausrichtung Basis – Apex verlief.

Zur Visualisierung wurde ein konfokales Laser Scanning Mikroskop (FluoView FV1000, Fa. Olympus) verwendet, wobei die Laserlinien mittels Anregungsfilter und dichroidischen Spiegeln auf die jeweiligen Farbstoffe abgestimmt wurden. Die Bilder wurden jeweils mit einer 60x Vergrößerung aufgenommen.

### 3.2.4. Fluoreszenzmakroskopie und –mikroskopie

In der Literatur findet sich eine Methode der Wellendarstellung am Gewebe immer wieder: die Fluoreszenzmikroskopie. Dabei ist immer wieder die Rede von potentiometrischen Farbstoffen, wie den Di-Anepps- und Fluo-Farbstoffen. Grundsätzlich unterscheidet man bei den Farbstoffen zwischen den Gruppen Slow- und Fast-Response. Zu der Gruppe der Slow-Response gehören z. B. die Carbocyanine, Oxonole und Rhodaminderivate. Es handelt sich hier um kationische oder anionische, membranpermeable Farbstoffe, die auf die diffusionsbedingte Potentialänderung reagieren [40]. Vorteil dieser Gruppe ist die hohe Sensitivität und die damit verbundene hohe Signalintensität. Leider reagieren diese Farbstoffe aber aufgrund des Ionenumverteilungsprozesses nur sehr langsam, was sie für die Aktionspotentialsignale, wie wir sie am Herzen erwarten nicht prädestiniert. Auf der anderen Seite stehen die Fast-Response Farbstoffe, welche schon im Mikrosekundenbereich auf Potentialänderungen reagieren. Sie sind wegen ihrer geladenen Gruppen

membranundurchlässig. Zu ihnen zählen unter anderem die Di-Anepps Farbstoffe und RH-237. Bei der Bindung an die Zellmembran, richtet sich der Farbstoff senkrecht zur Membran aus. Wegen dieser Ausrichtung ist es möglich, dass die durch das Anregungslicht ausgelöste Ladungsneuverteilung parallel zum elektrischen Feld der Sarkolemma verläuft. Eine Membranpotentialänderung bedingt damit eine spektrale Shift des Farbstoffs [69]. Diesen spektralen Unterschied kann man dann mittels unterschiedlicher Emissionsfilter vom Restlicht isolieren und sichtbar machen. Nachteil dieser Gruppe ist allerdings, dass ihre Empfindlichkeit und damit ihre Signaländerung nur sehr gering ist. Sie liegt bei makroskopischen Zellkulturexperimenten bei  $< 5\%$  [29]. Dementsprechend sind beide Gruppen Limitationen unterworfen.

In dieser Arbeit wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Di-4-ANEPPS, Di-8-ANEPPS und RH-237 (Fa. Molecular Probes) für die Darstellung des Membranpotentials verwendet. Zur Visualisierung der Calcium-Dynamiken kamen Fluo-3/AM, Fluo-4FF/AM und Calcium Green/AM (Fa. Invitrogen) zum Einsatz.

Die Fluoreszenzfärbung wurde mittels des folgenden Protokolls angefertigt:

- Farbstoff zu gewünschter Endkonzentration mit Kulturmedium verdünnen
- altes Kulturmedium abnehmen
- Farbstoff/Medium-Gemisch auf die Zellen geben
- Inkubation bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $5\%$   $\text{CO}_2$  für 25-30 min
- 1x Waschen der Zellen mit frischem Kulturmedium
- Ruhephase der Zellen bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $5\%$   $\text{CO}_2$  für 30 min
- Fluoreszenzmakro-/mikroskopie

Für die Farbstoffe wurden untenstehende Endkonzentrationen verwendet:

- Di-4/8-Anepps                      20  $\mu$ M
- RH237                                      20  $\mu$ M
- Fluo-3/AM                              15  $\mu$ M
- Fluo-4FF/AM                              15  $\mu$ M

Nach dem Experiment wurden die Objektträger fixiert und für die Charakterisierung der künstlichen Heterogenitäten vorbereitet.

### 3.2.4.1. Optische Messaufbauten

Die Tatsache, dass die Cardiomyocyten in einer Monolayer-Kultur annähernd durchsichtig für das menschliche Auge sind, macht die Aufgabe sie zu charakterisieren nicht gerade einfach. Doch seit den 30er und 40er Jahren des vorigen Jahrhunderts, als Frits Zernicke seine Entdeckung veröffentlichte, gibt es die Möglichkeit der Phasenkontrast-Mikroskopie [125]. Mit dieser Methode ist es möglich kontrastreiche Bilder von transparenten Proben, wie z. B. Mikroorganismen oder Zellen, zu produzieren. Das Messprinzip beruht auf der Beobachtung, dass Zellen einen anderen Brechungsindex als das umgebende Medium aufweisen. Für eine Phasenkontrastinformation verschiebt man die Phase des Hintergrundlichtes mittels eines optisch dichteren Elements (Phasenring), welches hinter der Brennebene des Objektivs liegt, bis sich eine Interferenz zum Objektlicht einstellt. Dadurch wird das Objektlicht abgeschwächt und die Objekte erscheinen dunkel auf einem hellen Hintergrund [77].

Dieses Verfahren ist im mikroskopischen Maßstab bewährt und besonders in der Biologie und Medizin nicht mehr wegzudenken. Doch für makroskopische Untersuchungen, wobei das Sichtfeld nicht nur einige hundert Mikrometer, sondern mehrere Zentimeter beträgt, wird Kontrastinformation hierbei immer geringer und schlechter. Hwang et al. [48, 50] haben sich dafür einer anderen Methode angenommen und sie als *Propagation-induced Phase Contrast* bezeichnet. Sie bedienen sich hier an der interferometrischen Phasenkontrast-Optik, welche auf einer Kohärenzwellenlänge beruht. Dabei sind die Anforderungen an den optischen Aufbau gering, man benötigt nur eine partiell-kohärente Lichtquelle und eine Lochblende zur Reduzierung der numerischen Apertur. Mit Hilfe eines Linsensystems wird nun das Bildfeld vergrößert (siehe Abb. 16, S.46). Da die Cardiomyocyten bei der Kontraktion ihre Länge ändern, ist es möglich durch die Bildung von Differenzbildern auch ohne Farbstoffe die Propagation von Erregungswellen darzustellen.

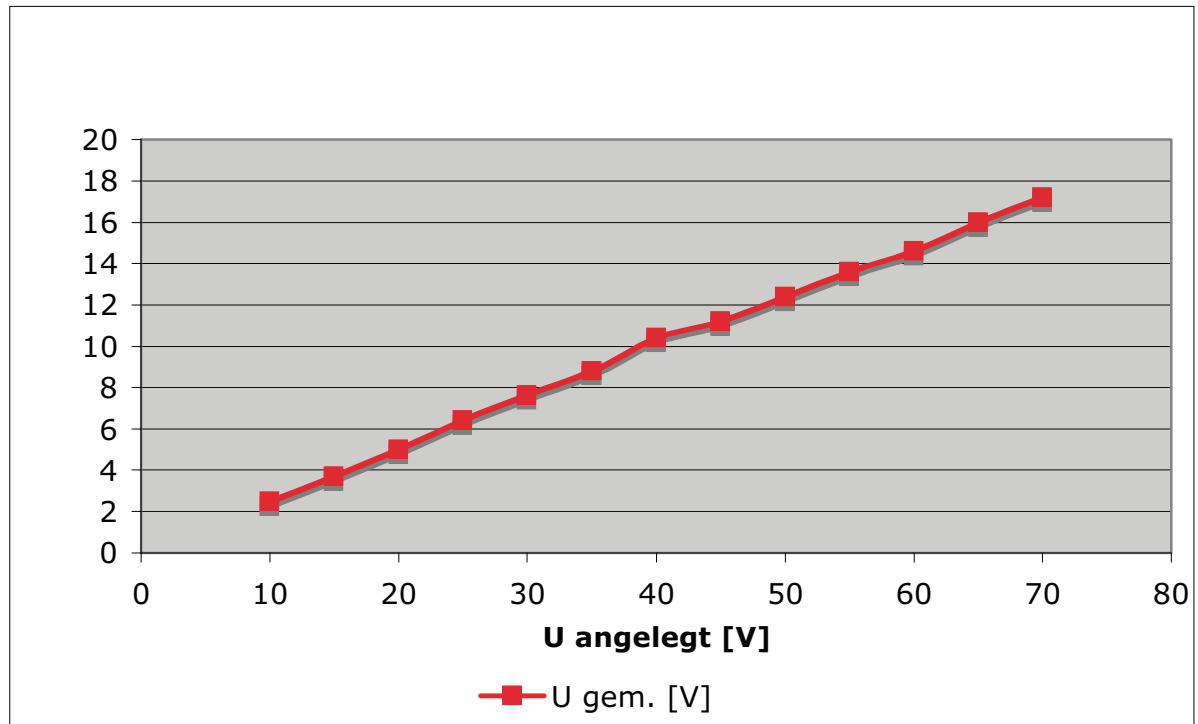
Um die Daten auch aufzunehmen wurden Digitalkameras verwendet. Hier unterscheidet man zwischen den CMOS- (*Complementary Metal Oxide Semiconductor*) und CCD- (*Charged Coupled Device*) Kameras. Diese Kameras beruhen auf dem inneren fotoelektrischen Effekt. Jede Fotodiode des Sensors ist zu einem Kondensator parallel geschaltet, der durch den Fotostrom aufgeladen wird. Dabei ist die Spannung proportional zur Helligkeit. Die üblichen CMOS-Kameras zeigen hier allerdings eine geringere Lichtempfindlichkeit gegenüber den CCD-Kameras, weshalb diese bevorzugt in Experimenten mit wenig Emissionslicht verwendet werden.

Die in dieser Arbeit eingesetzten Kameras sind die CMOS-Kamera Phantom v7.1 (Fa. Vision Research) mit einer maximalen Auflösung von 800 x 600 Pixeln und die CCD-Kameras Pike F-032B (Fa. Allied Vision Technologies) mit 640 x 480 Pixeln und die Cascade 128+ (Fa. Photometrics) mit 128 x 128 Pixeln. Entscheidend ist neben den Auflösungen und Lichtempfindlichkeiten auch die Aufnahmegeschwindigkeit der Kameras. Sie lag für die Kontraktionsaufnahmen bei 400 fps (Phantom v7.1) bzw. 378 fps (Pike F-032B). Für die Fluoreszenzaufnahmen wurden Restlichtverstärker bzw. Bildverstärker (C9016-21, Fa. Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH) verwendet. Mit Ihnen war es möglich, die Lichtintensität der Fluoreszenzsignale um ein Vielfaches zu verstärken. Die Aufnahmegeschwindigkeiten konnten dabei bei 378 fps (Bildausschnitt 320 x 240, Pike F-032B) gehalten werden. Um die Lichtausbeute zu erhöhen wurden die Aufnahmen auch einem sogenannten Binning unterzogen. Dafür werden die Pixel der Bildsensoren in einem vorgegebenen Verhältnis zu einem einzelnen, großen Pixel zusammengefasst. Für die makroskopischen Aufnahmen wurden die Navitar-Objektive TV Zoom Lens 11-110 genutzt. Mit ihnen war es möglich, das Sichtfeld variabel darzustellen.

#### **3.2.4.2. Feldstimulationen der Zellkulturen**

Die Theorie des von Luther et al. [70] vorgeschlagenen AFP (*Anti-Fibrillation Pacing*) beruht auf der Tatsache, dass sich in einem elektrischen Feld  $E$  Heterogenitäten zur Wellenausbreitung anregen lassen. Um das Verhältnis der Feldstärke zum Durchmesser dieser Inhomogenitäten quantitativ zu erfassen, wurden Feldstimulationen der Zellkulturen durchgeführt. Das elektrische Feld wurde mittels Elektroden aus Feinplatinblech, mit einer Länge von 30 mm, einer Höhe von 10 mm und einer Breite von 0,5 mm, erzeugt. Hierfür wurden die Elektroden sich in einem Abstand von 4,1 cm (Makroskop) bzw. 3,2 cm (Mikroskop) parallel gegenübergestellt (siehe Abb. 18 E). Für den makroskopischen Aufbau standen vier Elektroden zur Verfügung, so dass zwei rechtwinklig zueinander stehende Felder erzeugt werden konnten, was eine Induzierung von Spiraldynamiken ermöglichen sollte. Dabei konnten die Elektrodenpaare alternierend durch eine Switchbox angesprochen werden. Zur Erzeugung des Feldes wurden die Elektroden mit einem bipolaren Verstärkers (BOP-100M, 4 A, Fa. Kepco) verbunden. Mit Hilfe dieses Verstärkers ist es möglich, Pulse mit einer Spannung von bis zu 100 V zu erzeugen. Zur Generierung der Pulse wurde ein Funktionsgenerator (20 MHz Funktions-/Arbiträrsignalgenerator, Fa. Agilent) verwendet. Um die Feldstärken individuell einzustellen, wurde das Feld zwischen den Elektroden vermessen.

Hierfür wurden zwei Silberdrähte mit einem Durchmesser von 0,3 mm in einem Abstand von 1 cm in das Feld gebracht. Die Spannung, welche zwischen den Drähten gemessen wurde, ist auf Abb. 12 aufgezeigt.



**Abb. 12:** Kalibrierungskurve des elektrischen Feldes innerhalb der makroskopischen Inkubator-kammer. Dargestellt ist die gemessene Spannung der Referenzelektrode über die angelegte Spannung des elektrischen Feldes. Zur Messung der Feldstärke  $E$  wurden zwei Silberdrähte ( $\varnothing = 0,3$  mm) in einem Abstand von 1 cm benutzt, daraus ergibt sich für  $E$  ein Wert in [V/cm].

Bei den Feldexperimenten wurde die benötigte Pulsfrequenz aus der spontanen Aktivität der Zellen abgelesen. Dabei betrug die Frequenz der Pulse jeweils 10 % mehr als die der Spontanaktivität. Die Pulsdauer lag jeweils bei 10 ms.

Die Daten wurden für die Phasenkontrastaufnahmen mit einer Bildrate von 400 fps und einer Belichtungszeit von 2,5 ms aufgenommen. Für die Fluoreszenzmessungen wurde eine Bildrate von 378 fps und eine Belichtungszeit von 2,5 ms verwendet.

#### 3.2.4.4. Bildanalysemethoden

Die Kameras speicherten die Rohdaten als TIFF-Dateien mit 8-bit bzw. 16-bit Tiefe ab. Um die Informationen sichtbar zu machen, wurden die Daten verschiedenen Analysemethoden unterzogen. Zunächst wurden die Bilder gefiltert. Dafür wurde ein Kernel eingeführt. Dies ist ein räumlicher Filter, der je nach Wert und Orientierung aus den Daten eine Matrix ermittelt. Mit Hilfe solcher Matrices wurde anschließend ein kegelförmiger Filter für jeden Bildpixel berechnet. Dadurch wurde es möglich die zeitlichen und räumlichen Koordinaten jedes aktiven Pixels um den zentralen Bildpunkt zu berechnen.

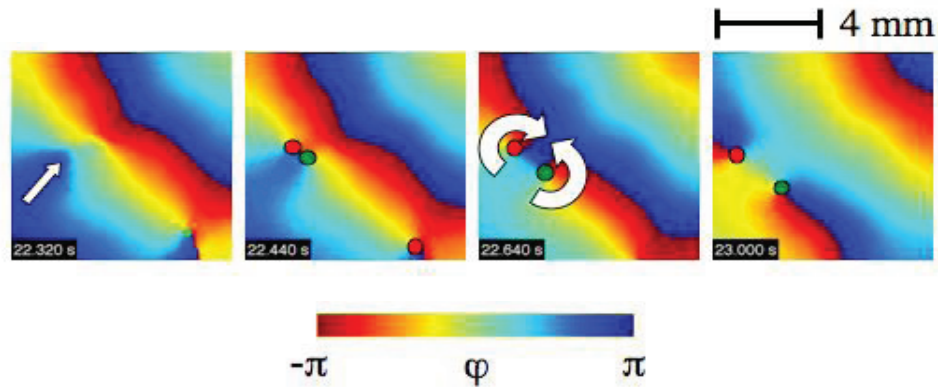
Nach diesen Filterungen wurden Differenzbilder erzeugt. Dabei wurde über mehrere Bilder gemittelt und die Mittelwerte zweier zeitlich getrennter Bildsequenzen von einander subtrahiert. Anschließend wurde zu dem ein Niedrigfrequenzfilter (*Low Pass Filter*) verwendet, wodurch alle Frequenzen über einem festgelegten Wert aus dem Bild entfernt werden. Hierdurch konnte das Hintergrundrauschen gemindert werden.

Für die Aktivierungskarten wurden die Bildinformationen über eine größere Anzahl an Frames ausgewertet. Diese Plots zeigen den zeitlichen Verlauf der Aktivität auf, indem sie die Intensitätsänderungen jedes Pixels nach ihrem zeitlichen Auftreten einordnen. Die Zeit wird hier in Einheiten von Frames gemessen und farblich gekennzeichnet.

Das ebenfalls verwendete pseudo- EKG (pEKG) dient der graphischen Darstellung der Aktivität. Hierfür wurde das Bild in horizontaler und vertikaler Richtung jeweils in zwei Rechtecke aufgeteilt. Die Änderungen der Vierecke einer Richtung wurden dokumentiert und gegen die Zeit aufgetragen.

Um das Aufbrechen der Wellen besser beschreiben und charakterisieren zu können, wurden so genannte Phasen-Singularitäten (PS) gesucht. Zur Ermittlung dieser Singularitäten wurden die Bilder einer Phasenmaske unterzogen, wobei jedem Pixel ein Wert zwischen  $-\pi$  und  $+\pi$  zugeordnet wird (Hilbert-Transformation). Als PS werden nun die Orte bezeichnet, welche im Vergleich zu den umliegenden Punkten eine nicht definierbare Phase aufweisen. Theoretisch sollten diese Orte den Ausgangspunkt einer Wellenpropagation darstellen. In der Literatur wird das gleichzeitige Auftreten von PS und Wellenaufbrüchen genutzt um die Änderung der Wellendynamik zu beschreiben [21, 68]. Um die PS statistisch besser beschreiben zu können, wurden die durchschnittliche Lebenszeit und Geschwindigkeit berechnet. Dazu wurden in der *Nearest-Neighbour-Methode* in einem Umfeld von 8 Pixeln um die Singularität nach derselben PS gesucht. Dieses so genannte Tracking ermittelt also die Trajektorien der PS und wurde für jede Singularität und jeden Frame durchgeführt. Um ein Hintergrundrauschen

möglichst gering zu halten, wurden alle PS mit einer Lebenszeit von  $\leq 2$  Frames aus der Analyse ausgeschlossen.



**Abb. 13:** Beispiel für die Darstellung von Phasen-Singularitäten. Die Farbskala zeigt die Phase  $\varphi$ . Rote und grüne Kreise markieren die Phasen-Singularitäten und ihre Rotierrichtung im (rot) bzw. gegen (grün) den Uhrzeigersinn.

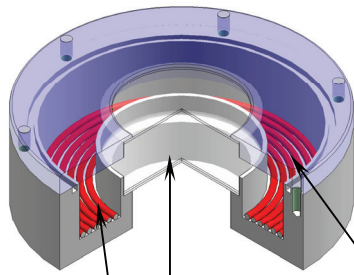
Für die Auswertung der Daten bezüglich der virtuellen Elektroden wurde das Verhältnis der aktivierten Fläche zur Gesamtfläche ermittelt. Hier liegt die bereits erwähnte Aktivierungskarte zu Grunde. Ebenfalls aus der Aktivierungskarte lässt sich die Aktivierungskurve berechnen, welche die Dauer der kompletten Aktivierung darstellt. Ihre erste Ableitung ermöglicht einen direkten Vergleich des Einflusses der unterschiedlichen Feldstärken auf die Zellaktivierung.



## 4. Ergebnisse

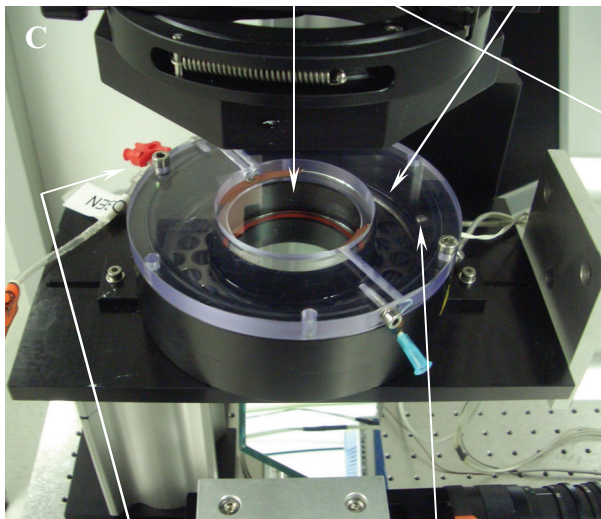
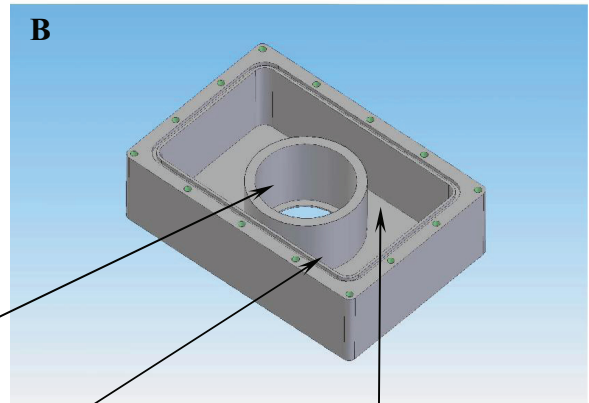
### 4.1. Makroskopischer Versuchsaufbau

Um die Zellexperimente auch über lange Zeit mit stabilen Kulturbedingungen (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, gesättigte Atmosphäre) durchführen zu können, wurden Mini-Inkubatoren gebaut [49]. Mit Ihnen war es möglich die Umgebung eines großen Inkubators, wie er in der Zellkultur verwendet wird, in einem dem Experiment angepassten Maßstab zu generieren. Für die verschiedenen Experimentaufbauten wurden zwei unterschiedliche Mini-Inkubatoren gebaut, welche an die jeweiligen Messmethoden angepasst wurden. In Abb. 14 A ist die Inkubatorkammer für makroskopische Aufnahmen dargestellt. Sie verfügt über eine Doppelverglasung am Probenboden, einer Temperaturregelung (Abb. 14 E) und einer beheizbaren Deckelscheibe aus mit Indiumzinnoxid (ITO) beschichtetem Borosilikatglas, um Kondensation über der Probe zu verhindern. Während der gesamten Experimentlänge konnte eine Temperaturkonstanz von  $\pm 0,2$  °C erreicht werden. Durch das Wasserreservoir im Heizbereich wird eine gesättigte Atmosphäre gewährleistet. Über externe Anschlüsse erfolgte die Versorgung der Zellen mit einem Gasgemisch aus 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Sauerstoff (Carbogen-Gas). Mit Hilfe von weiteren Kanülen ist auch eine Perfusion der Proben in der geschlossenen Kammer möglich, womit eine Kultur von Zellen über mehrere Tage ermöglicht wird. Abb. 14 B zeigt die Kammer für die mikroskopischen Untersuchungen. Sie verfügt ebenfalls über dieselben Anschlüsse für Gas und Perfusion, sowie über eine Temperaturregelung und Deckelheizung. Im Gegensatz zur Makroskop-Kammer wurde sie aber für die Fixierung auf einem Mikroskoptisch eines inversen Mikroskops, die Phasenkontrastmikroskopie und den geringen Arbeitsabstand der einzelnen Objektive angepasst. Durch die kompakte und niedrige Bauweise der Kammern sind sie einfach und schnell einsetzbar.

**A**

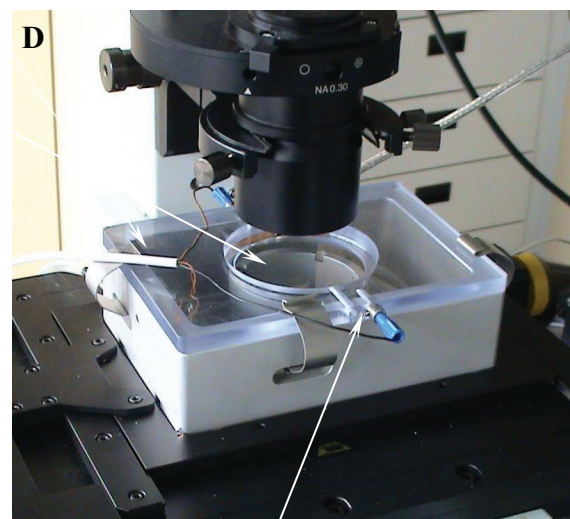
Probenraum

Wasserreservoir

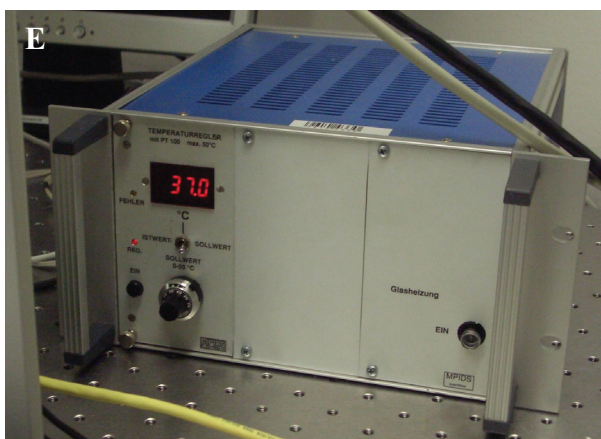
Heizbereich  
(mit Heizspirale)**B**

Gasanschluss

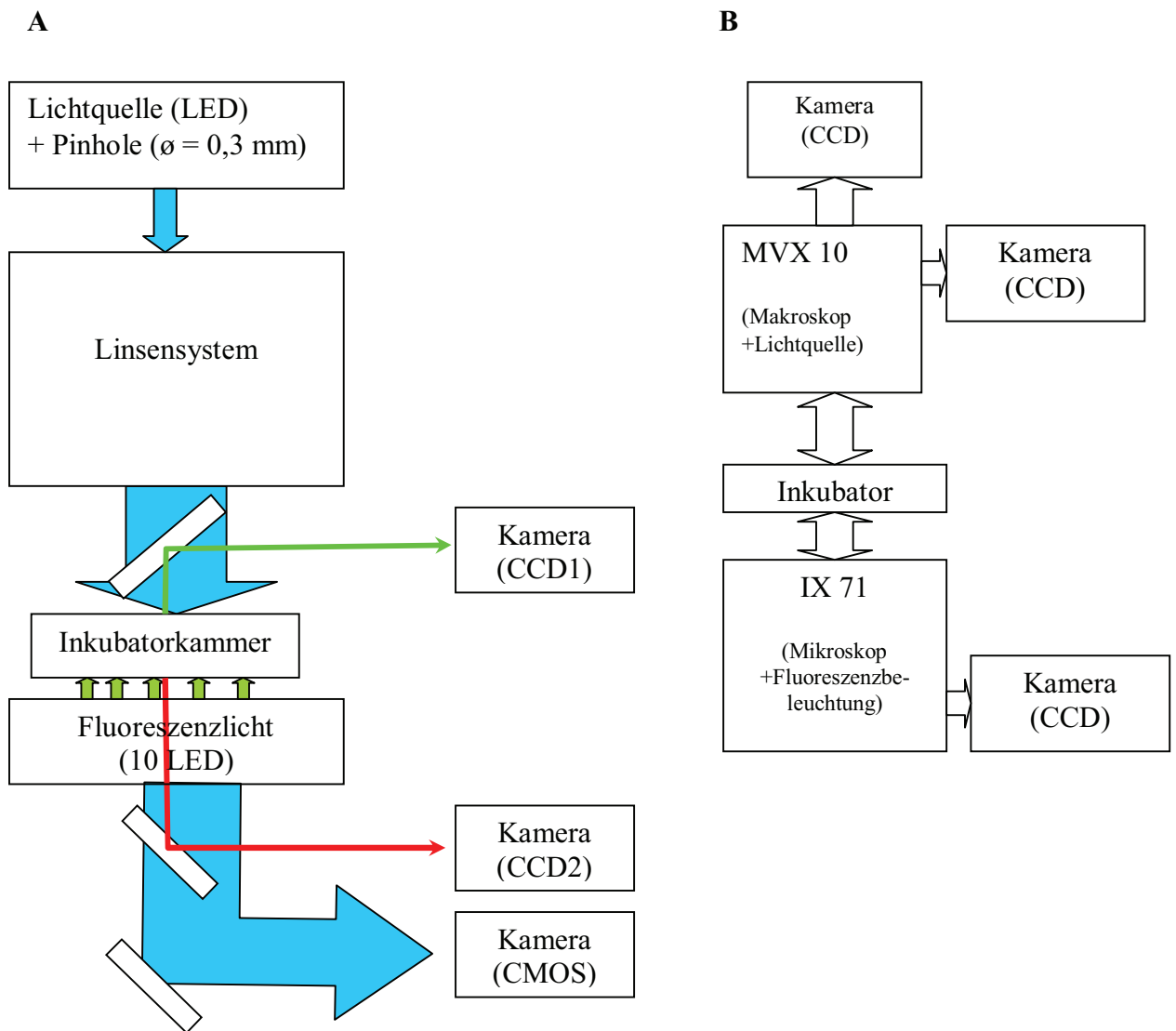
Temperaturfühler



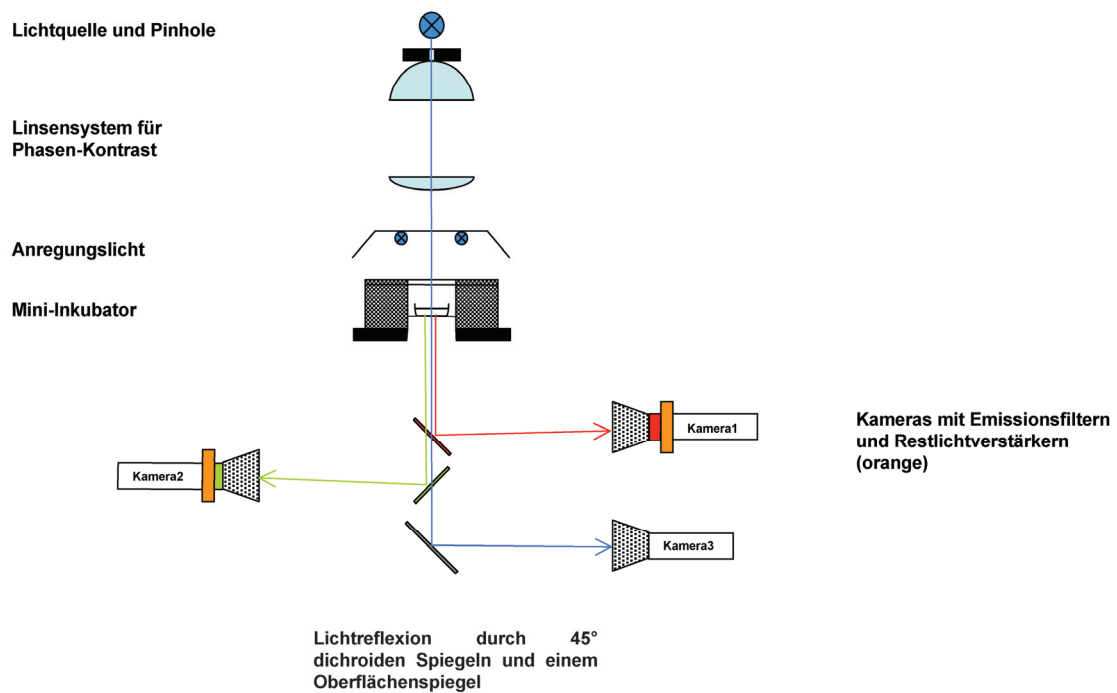
Anschluss Deckelheizung



**Abb. 14:** Die Inkuborkammern für den mikroskopischen und makroskopischen Aufbau. **A)** Schematische Darstellung der Makroskop-Kammer; **B)** CAD-Zeichnung der Mikroskop-Kammer; **C-D)** Aufnahmen der fertigen Mini-Inkubatoren auf dem jeweiligen Setup; **E)** Temperaturregler.



**Abb. 15:** Blockdiagramme der optischen Messaufbauten. **A)** makroskopischer und **B)** mikroskopischer Aufbau.

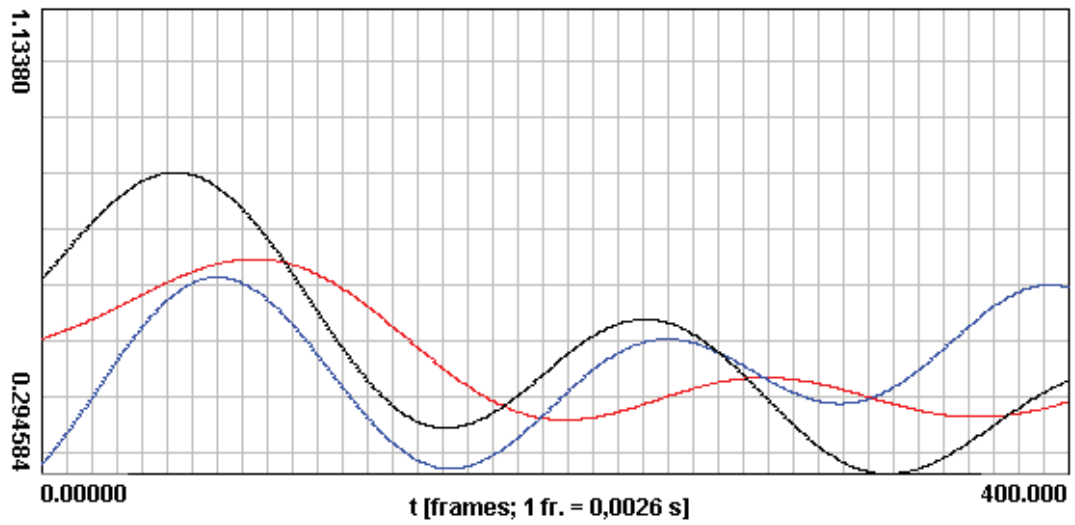


**Abb. 16:** Überblick über die Komponenten des makroskopischen Aufbaus. Dargestellt sind alle optischen Komponenten zur simultanen Messung von Membranspannung, Calcium und Kontraktion.

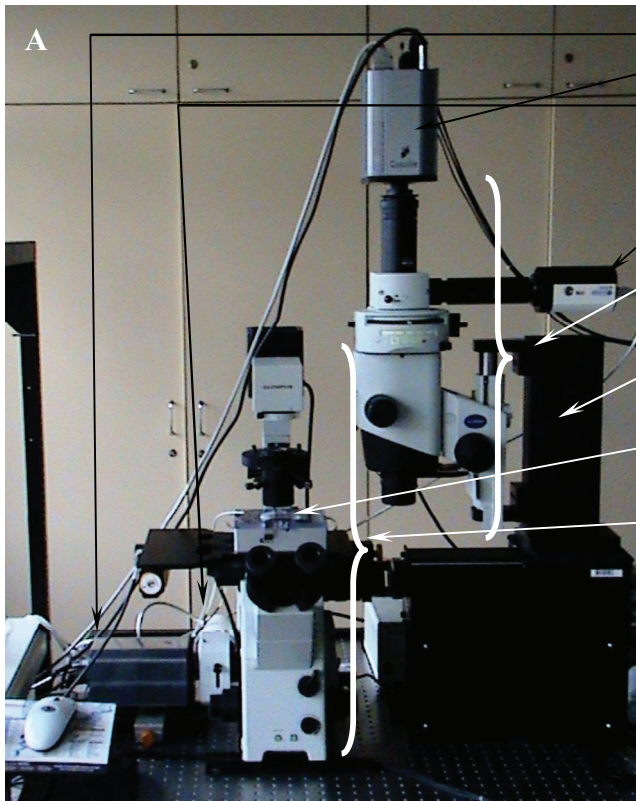
Für den eigentlichen Messaufbau wurden die Methoden der bewegungsinduzierten Phasenkontrasts und der Fluoreszenzmakroskopie kombiniert. Abb. 16 zeigt einen schematischen Überblick über die verwendeten optischen Komponenten.

In dieser Arbeit wurden Zellkulturexperimente sowohl auf einem Fluoreszenzmikroskop (IX 71 und MVX 10, Fa. Olympus), als auch auf einem selbstentwickelten makroskopischen Aufbau gemacht. In Abb. 18 A ist der mikroskopische Experimentaufbau gezeigt und in B das makroskopische Setup. Zur Anregung der Fluoreszenz wurde beim Mikroskop mit einer herkömmlichen Beleuchtung, der X-Cite (Fa. EXFO) gearbeitet. Für das Makroskop standen für einzelne Wellenlängen jeweils 10 LED mit 3 W zur Verfügung. Als Leuchtmittel für den Phasenkontrast wurde eine 5 W LED weiß verwendet. Außerdem wurde eine Lochblende mit einem Durchmesser von 0,3 mm eingebaut.

Durch die Abstimmung von Emissionsfiltern und Anregungslicht wurde es möglich, die Fluoreszenzsignale für Membranspannung und Calcium, sowie die Phasenkontrastsignale der Kontraktion simultan zu messen. Damit konnte die zeitliche Reihenfolge dieser Signale in Übereinstimmung mit der nach der Erregungs-Kontraktionskopplung erwarteten Abfolge visualisiert werden (siehe Abb. 17).

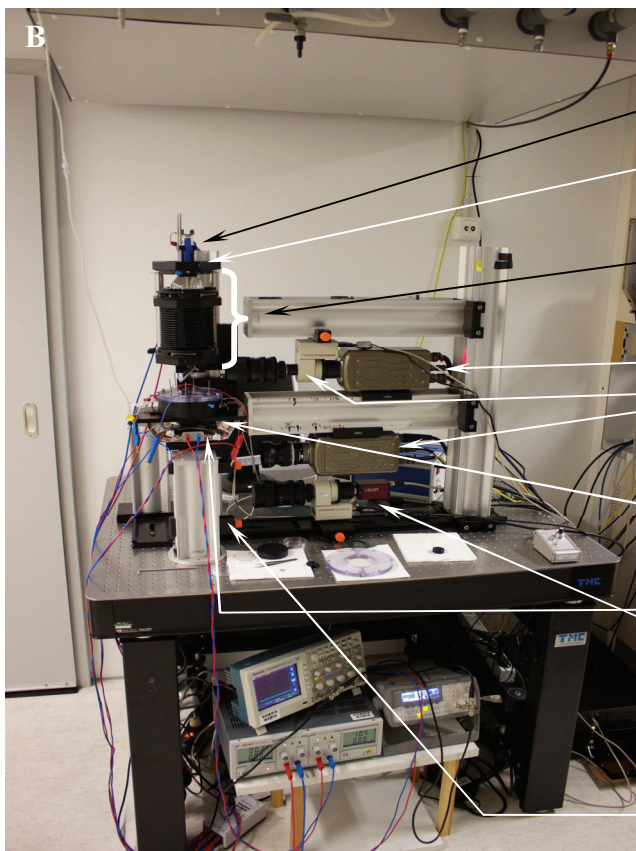


**Abb. 17:** Zeitreihenbeispiele für eine dreifache Messung. Zu sehen sind jeweils die Zeitreihen über einen Pixel von drei simultanen Messungen. Schwarz beschreibt die Aktivität der Membranpotentialmessung, blau steht für die Calciummessung und rot für die Kontraktion. Beim Vergleich der Verläufe aller drei Zeitreihen ist zu erkennen, dass die Maxima (d.h. Auftreten der Welle) zeitlich zueinander verschoben sind. Als erstes tritt das Signal des Membranpotentials auf, gefolgt von Calcium und abschließend die Kontraktion.



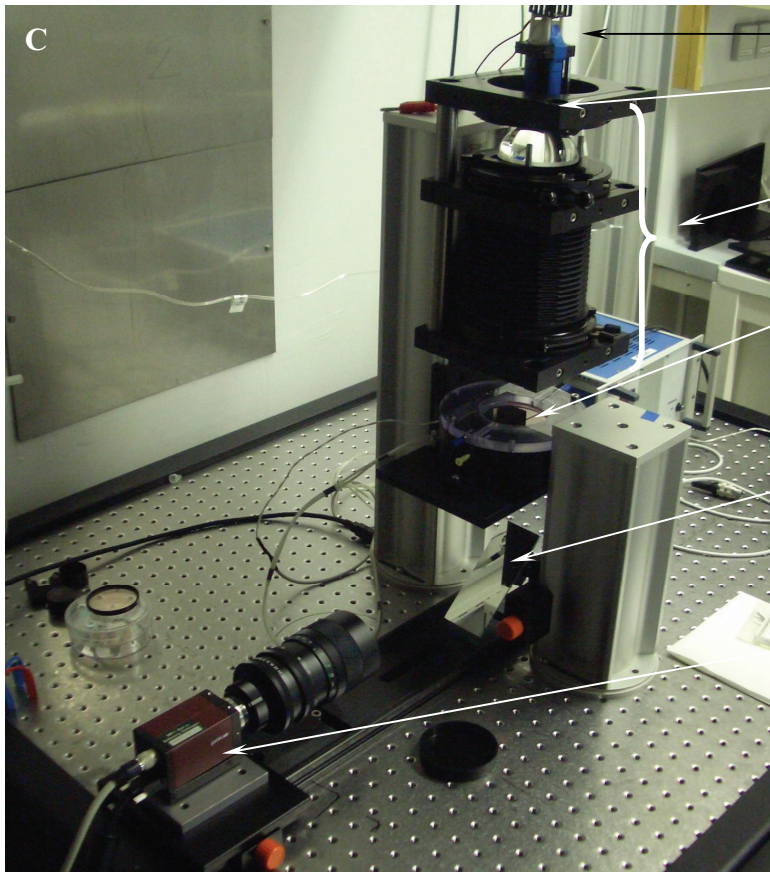
A

- CCD-Kamera (Cascade 128+)
- CCD-Kamera (QImaging EXi)
- Makroskop MVX 10 (Fa. Olympus)
- Verfahrensystem
- Inkubatorkammer
- Mikroskop IX71 (Fa. Olympus)



B

- Lichtquelle (LED)
- Lochblende
- Linsensystem
- CMOS-Kamera (Phantom v.7)
- Restlichtverstärker (C9016-21)
- Umlenkspiegel (45 ° Dichroic)
- Inkubatorkammer
- Fluoreszenzbeleuchtung
- CCD-Kamera (Pike F-032B)
- Umlenkspiegel



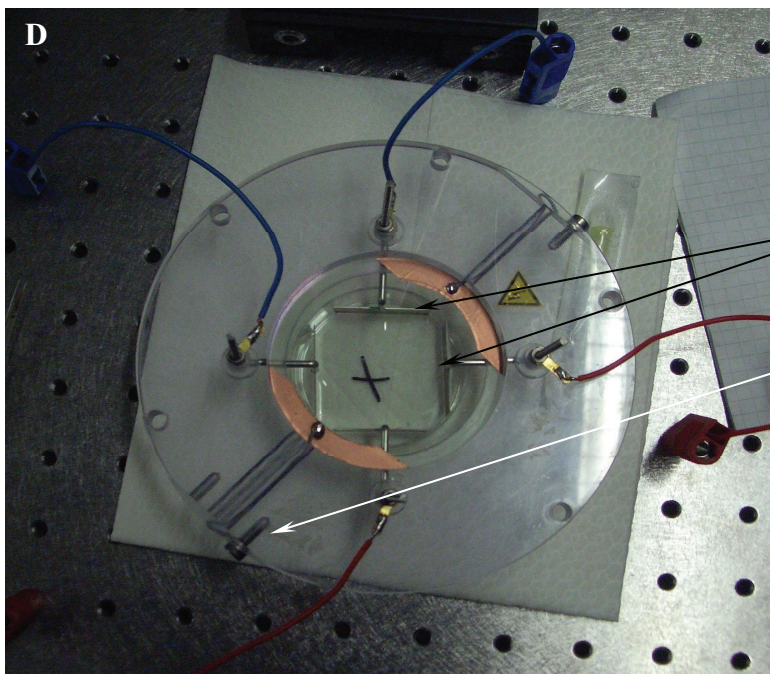
Lichtquelle (LED)  
Lochblende

Linsensystem

Inkubator-kammer

Umlenkspiegel

CCD-Kamera (Pike F-032B)



Elektrode aus  
Feinplatinblech

Anschluss Deckelheizung

**Abb. 18:** Aufbauten für die optischen Experimente; **A)** Sonderbau mit der Kombination von Mikro- und Makroskop (Fa. Olympus); **B)** Phasenkontrastaufbau (modifiziert nach Hwang et al.) in Kombination mit Fluoreszenzaufbau; **C)** Phasenkontrastaufbau für Langzeitmessung der Temperatur- und Ischämie-Einwirkungen; **D)** Abdeckung der Makroskop-Inkubator-kammer. Im Bild zu sehen sind 4 Elektroden aus Feinplatinblech (0,5 x 10 x 30 mm) für die Stimulationsversuche an Heterogenitäten.

## 4.2. Granulare Strukturen innerhalb der Zellkultur und ihre Effekte auf die Bildanalyse

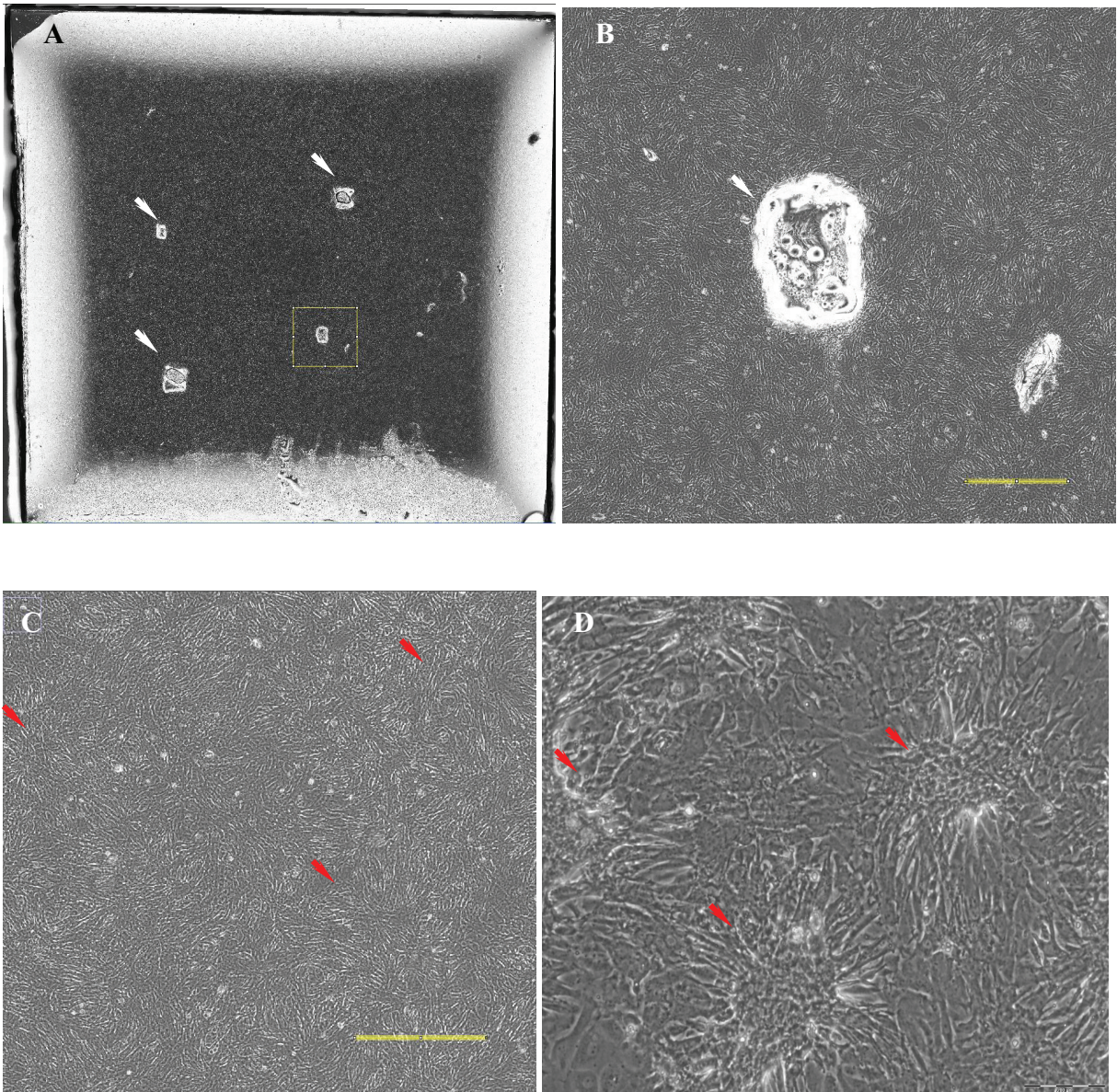
Die für diese Arbeit präparierten Zellkulturen unterschieden sich stark von der Gewebestruktur, wie man sie im Gesamtherz findet. Allgemein sind die Zellen ubiquitär vernetzt und ihre Ausrichtung differiert von Punkt zu Punkt. Besonders auffällig war die Bildung von sternförmigen Clustern, an denen mehrere Zellen zu einem Zellhaufen aggregierten. Von diesen Clustern ausgehend konnte eine Weiterleitung der Aktivität entlang von länglichen Zellstrukturen zu den nächstgelegenen Clustern beobachtet werden. In den Zwischenräumen befanden sich zum größten Teil inaktive Myocyten und Myofibroblasten, sowie einige wenige ausdifferenzierende Cardiomyocyten und Fibroblasten. In Abb. 19 ist eine mikroskopische Aufnahme eines verwendeten Objektträgers (OT), sowie Detailansichten von diesem OT gezeigt. Hier sind deutlich die Clusterformationen zu erkennen.

Diese Ausbildung von Zellanhäufungen hat einen direkten Einfluss auf die Bildanalyse. So zeigt sich bei Aktivierungszeitanalysen, wie sie z. B. für die Aktivierungskarten gebraucht werden, der zeitliche Verlauf eher granular als ebenmäßig.

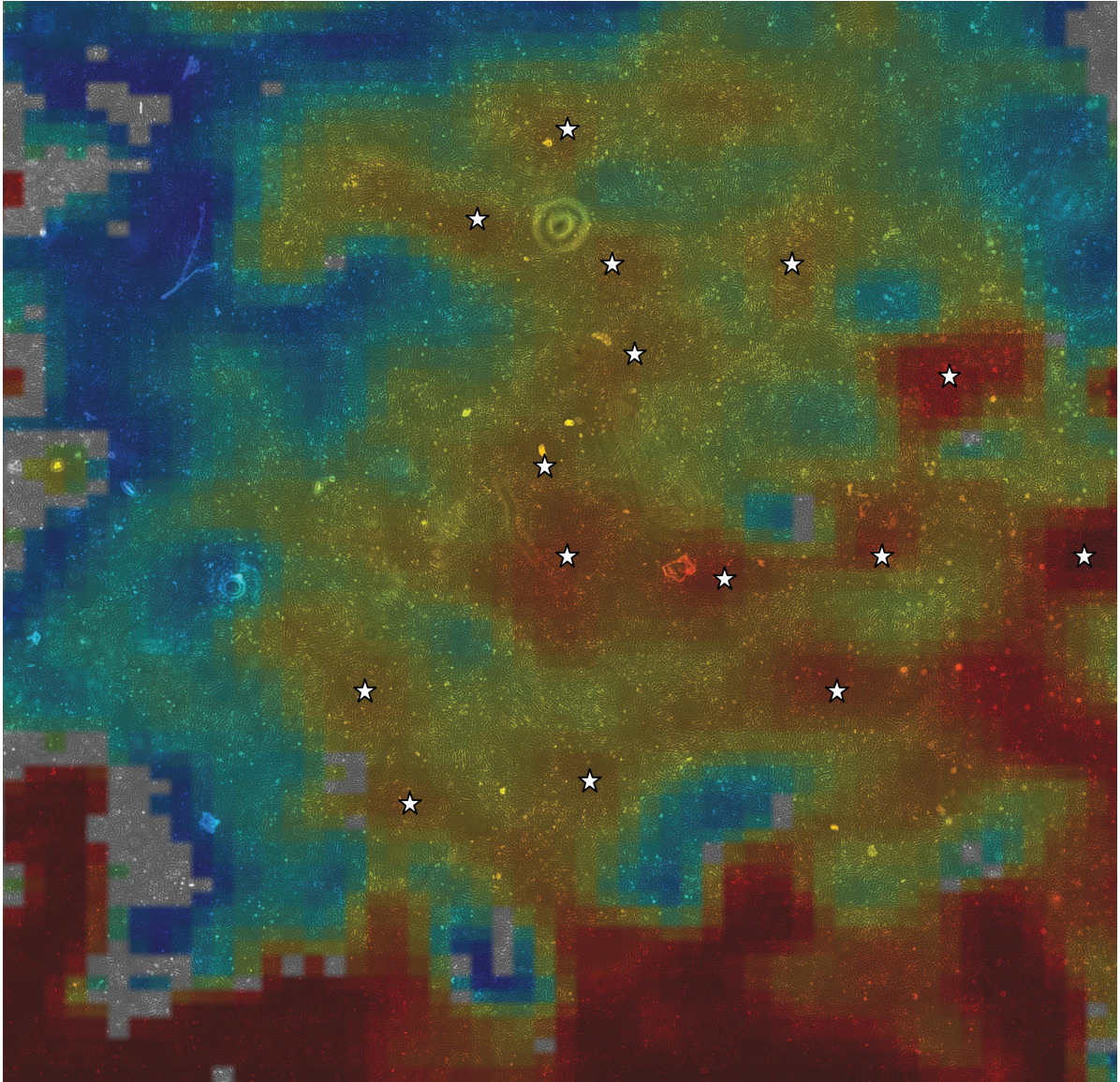
Zudem stellen solche Zellcluster natürliche Heterogenitäten mit bestimmten Durchmessern dar (siehe Abb. 20). Dies erklärt auch, warum ab einer spezifischen Feldstärke  $E$  in den Messreihen scheinbar der gesamte Zellrasen aktiviert wurde. Auf dem makroskopischen Maßstab, wie er hier verwendet wurde, ließ sich die Vielzahl an rekrutierten natürlichen Heterogenitäten nicht mehr auflösen und der Eindruck der Aktivierung des gesamten Zellrasens entstand.

Anhand solcher natürlich gebildeter Heterogenitäten ließen sich ebenfalls Analysen durchführen. Dafür wurden die Aktivierungskarten herangezogen und die Zeit zur vollständigen Aktivierung einer Fläche ermittelt. Analysen hinsichtlich der zugrunde liegenden Anzahl an angesprochenen Zellaggregaten und deren Durchmesser zeigten, dass mit steigender Feldstärke  $E$  auch die aktivierte Heterogenitätenzahl ansteigt. Zudem werden bei höheren  $E$  zunehmend Heterogenitäten mit geringeren Radien angesprochen. Der Vergleich der Aktivierungszeiten (siehe Abb. 21) zeigt außerdem eine Änderung im Anstieg der Aktivierungszeiten mit größeren Feldstärken. Dies lässt sich auf die Ansprecherung einer steigenden Zahl von Heterogenitäten zurückführen. Damit wäre die Möglichkeit einer Kontrolle der Anzahl von virtuellen Elektroden durch die Feldstärke gegeben.

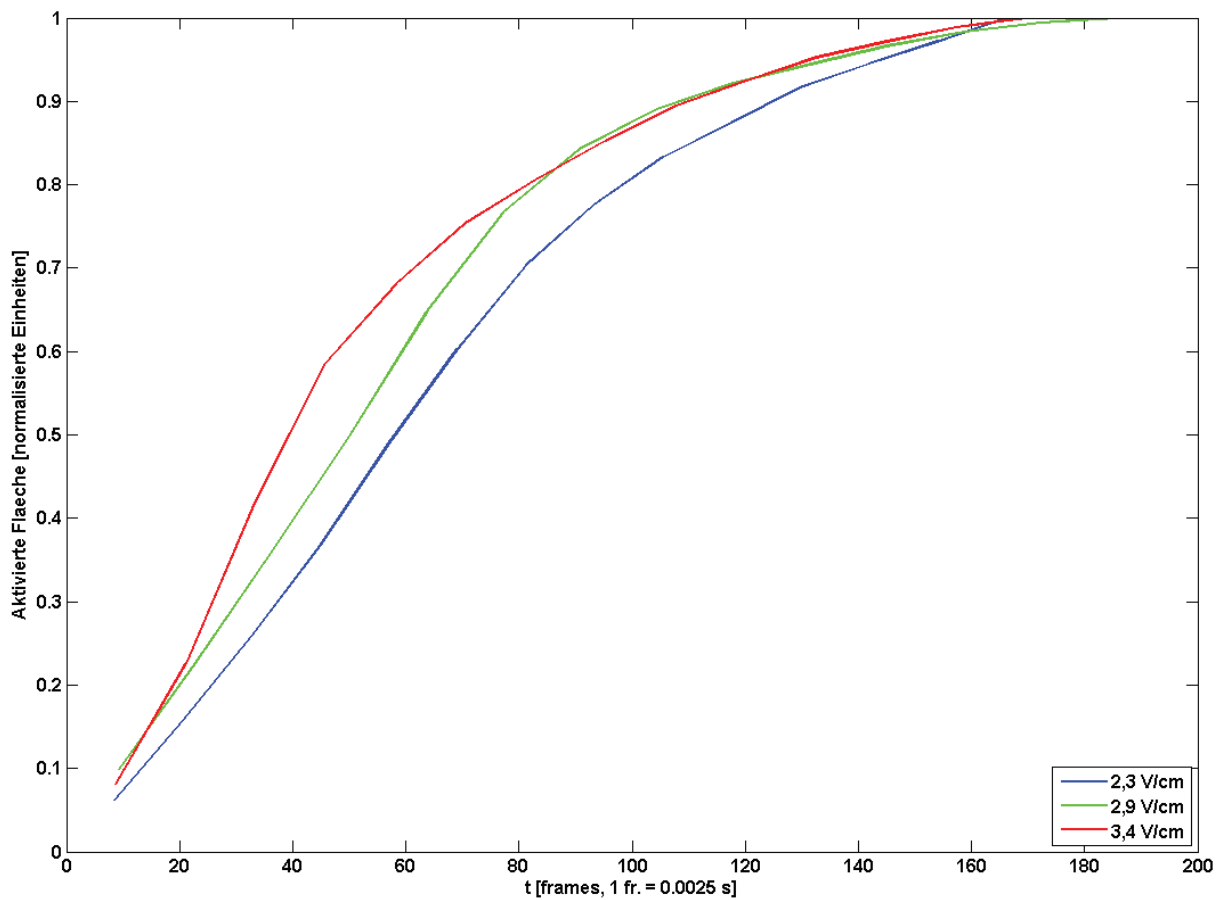




**Abb. 19:** Mikroskopische Aufnahme eines Objektträgers und Detailausschnitt. In **A** ist eine Übersichtsaufnahme eines für die Messreihen verwendeten Objektträgers. Zu sehen sind deutlich die künstlichen Heterogenitäten (weiße Pfeile) mit einer Kantenlänge von 1,2 mm bzw. 0,4 mm. **B** zeigt eine Detailaufnahme aus **A** (siehe gelbes Quadrat) mit einer 0,4 mm Heterogenität und den umliegenden Zellen. Die Unebenheiten innerhalb der Heterogenität resultieren aus Luftblasen im Polymer. **C** ist wiederum eine Detailaufnahme aus **A** und zeigt die Bildung clusterförmiger Zellanhäufungen (siehe rote Pfeile). **D** zeigt eine 20x Vergrößerung einer Zellkultur, wo die Clusterbildung am deutlichsten zu beobachten ist. Der Skalierungsbalken in **B**) und **C**) beträgt 400  $\mu\text{m}$ , in **D**) 200  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 20:** Überlagerung einer mikroskopischen Detailaufnahme der Zellkultur im Phasenkontrast mit Aktivierungskarte. Dargestellt ist eine Überlagerung einer Zellkulturaufnahme mit der dazugehörigen Aktivierungskarte bei einer Stimulation von  $E = 2,8 \text{ V/cm}$ . Man erkennt, wie zunächst einzelne Gebiete (mit Stern gekennzeichnet) aktiviert werden und sich die Erregung von dort ausbreitet. Ursache hierfür sind natürliche Heterogenitäten (durchschnittlicher Durchmesser  $304 \mu\text{m}$ ).



**Abb. 21:** Graphisches Beispiel der Aktivierungszeiten. Die Graphik zeigt die integrierte zeitliche Aktivierung einer Fläche. Es handelt sich dabei um eine Zellpräparation, die verschiedenen Feldstärken ausgesetzt wurde (siehe Legende). Man erkennt, dass mit zunehmender Feldstärke  $E$  sich der Anstieg der zur Aktivierung benötigten Zeit ebenfalls ansteigt. Die Angabe der Fläche ist in normalisierten Einheiten, wobei 1 einer Fläche von 100 % der Gesamtfläche entspricht.

### 4.3. Änderung der Wellendynamik durch Verwendung von Feldstimulation

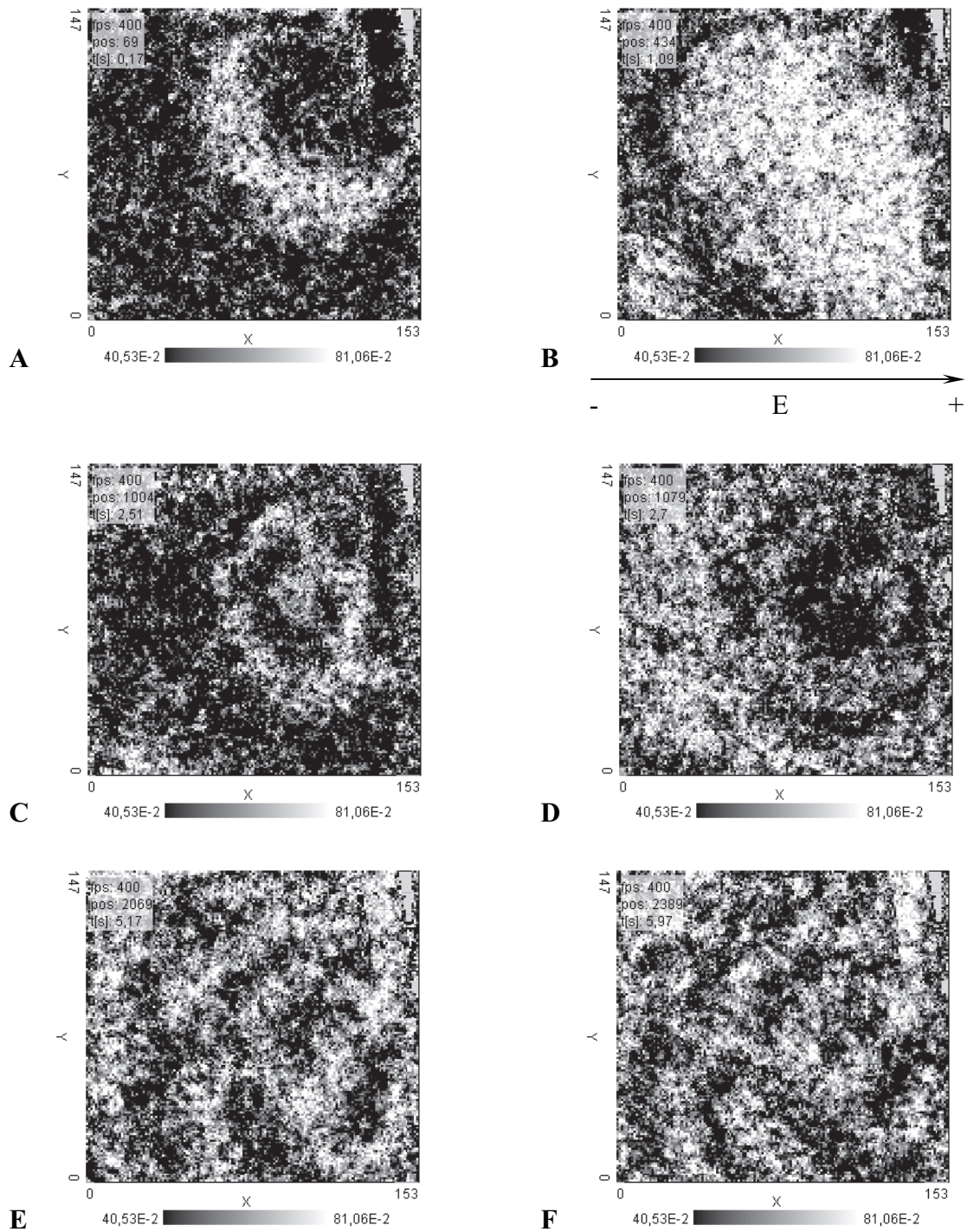
Für die Darstellung inwieweit die spontane Wellendynamik durch die Verwendung von Feldstimulation beeinflusst wird, wurden Fluoreszenzaufnahmen mit Calcium sensitivem Farbstoff durchgeführt. Die Zellkulturen befanden sich hierfür auf mit Fibronectin beschichteten und für die Stimulation zugeschnittenen Objektträgern. Während der Messungen wurden die Kulturbedingungen aufrechterhalten (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigte Atmosphäre).

Mit Hilfe der Plattenelektroden (siehe Abb. 18 D) konnten elektrische Felder mit Feldstärken von 1 V/cm bis 3,6 V/cm angelegt werden. Die Pulsdauer betrug 10 ms und es wurden 12 Pulse hintereinander gegeben. Die Pulsfrequenz lag dabei 10 % höher als die spontane Frequenz der Zellkultur.

In den Experimenten konnte eine deutliche Beeinflussung der Wellendynamik durch die Abgabe von elektrischen Pulsen beobachtet werden. Wie in Abb. 22 zu sehen, konnte eine spontane ebene Welle durch das Anlegen eines elektrischen Feldes verdrängt werden und eine Spirale induziert werden, welche lokal fix war. Diese Dynamik konnte durch die Gabe weiterer Pulse zusätzlich verändert werden. So konnten die vom Spiralkern entfernten Wellenstrukturen zum Aufbrechen stimuliert werden. In dem in Abb. 22 aufgezeigten Experiment hielt diese Dynamik auch nach den Pulszyklen als spontane Aktivität an.

Ähnliche Auswirkungen konnten auch in weiteren Experimenten gezeigt werden, wobei der Übergang von ebener Wellenfront hin zu Spiralen am häufigsten zu sehen war.

Die Filmdatei zu den in gezeigten Versuch befindet sich auf der beiliegenden CD.



**Abb. 22:** Beeinflussung der spontanen Wellendynamik durch Feldstimulation. Dargestellt ist die Änderung der spontanen Aktivität durch das Anlegen eines elektrischen Feldes. Die Feldstärke betrug 2,9 V/cm und es wurde ein Zyklus von 12 Pulsen appliziert. In **A** ist die Spontanaktivität in Form einer ebenen Welle zu sehen. **B** zeigt die Applikation eines Pulses. In **C** und **D** ist die Spiraldynamik zu erkennen. **E** und **F** zeigen die Wellenstrukturen nach dem Puls. Die Ausschnitte zeigen jeweils den kompletten Objektträger, wobei die Achsen in Pixeln angegeben sind (1 px = 0,013 cm). Die zeitliche Einteilung ist in den Bildern ersichtlich (Angabe in s). Die Grauwerte sind im Farbbalken codiert, dabei entspricht Weiß einer Calciumausschüttung und Schwarz dem Ruhezustand.

## 4.4. Rekrutierung virtueller Elektroden an künstlichen Heterogenitäten

### 4.4.1. Abhängigkeit der Feldstärke E vom Radius R der Heterogenitäten

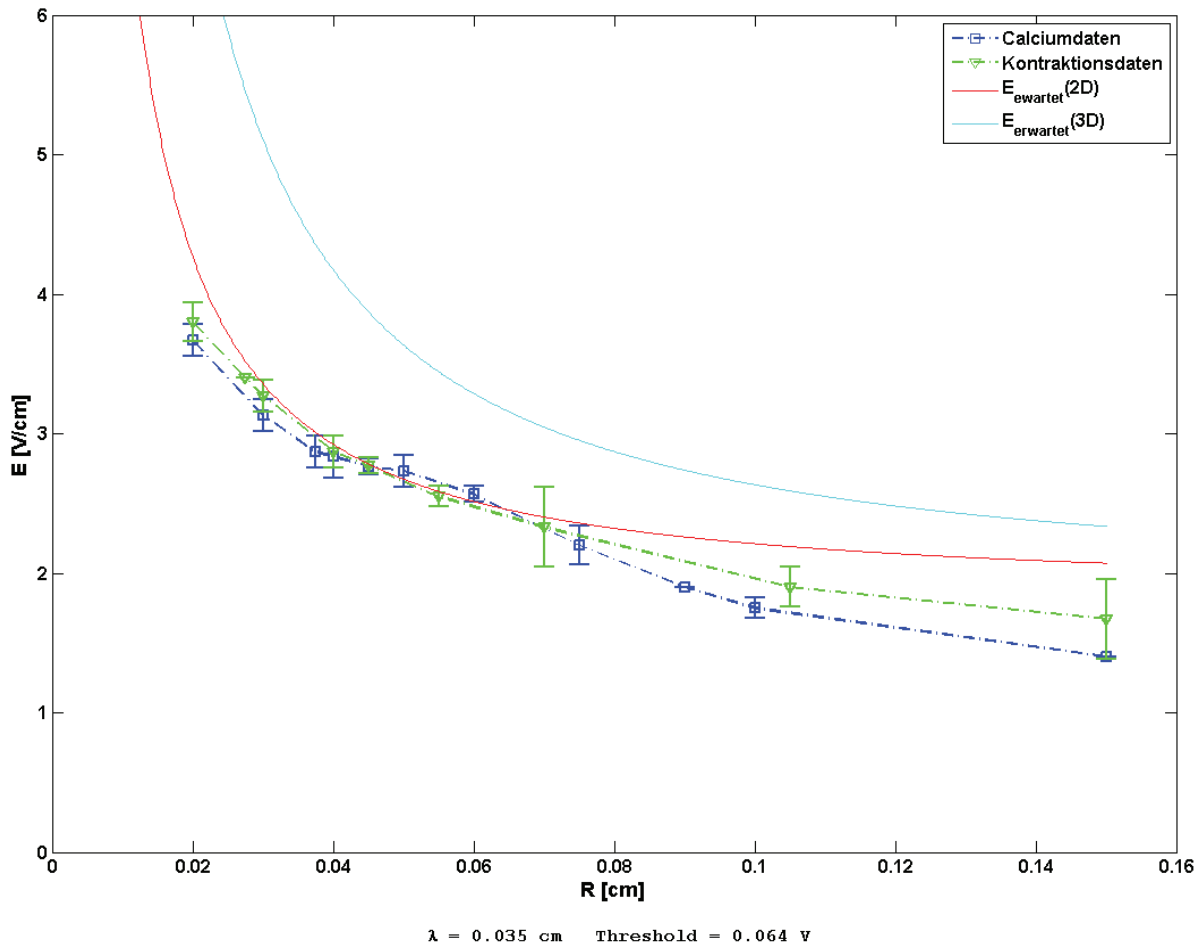
Für Aufnahme der Abhängigkeit der Feldstärke E vom Radius R wurden zum einen Kontraktionsmessungen, und zum anderen Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Beide Messungen konnten an dem beschriebenen makroskopischen Aufbau (siehe Abschnitt 4.1., Abb. 18) durchgeführt werden. Die Zellen wurden auf zugeschnittenen und mit künstlichen Heterogenitäten vorbereiteten Objektträgern kultiviert. Durch die erhöhte Lage der Zellen auf dem Objektträger konnte sichergestellt werden, dass die Zellschicht sich innerhalb des elektrischen Feldes befindet. Bei Zellkulturen auf dem Petrischalenboden würden die Feldelektroden in die Schicht nur hineingedrückt werden und man könnte Randeffekte des erzeugten Feldes nicht ausschließen.

Bei den Versuchen wurden elektrische Felder mit Feldstärken von 1 V/cm bis 5 V/cm erzeugt. Die Pulsdauer betrug jeweils 10 ms.

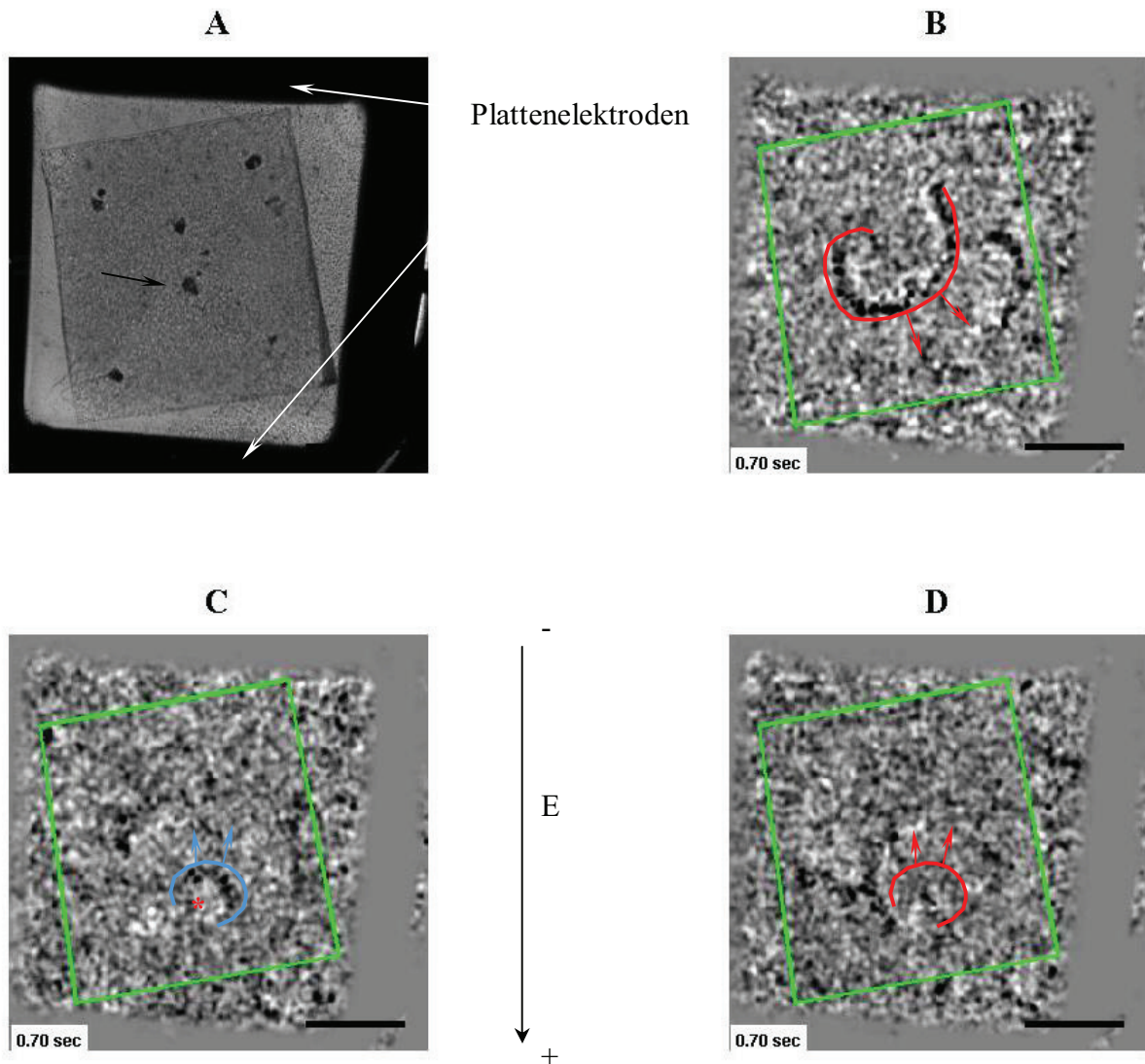
Jeder Heterogenitätenradius wurde mindestens in drei verschiedenen Präparationen gemessen. Die Versuche zeigten eine Abhängigkeit der für die Emission einer Erregungswelle notwendigen Feldstärke E vom Radius R einer Heterogenität, d. h. je kleiner eine Inhomogenität ist, umso größer ist die benötigte Feldstärke um dort eine Aktivität zu induzieren. Für Feldstärken über 4,3 V/cm konnte im Experiment mit künstlichen Heterogenitäten keine lokale Depolarisation an einzelnen Inhomogenitäten gemessen werden, da im Rahmen der experimentellen Auflösung nur eine simultane Depolarisation des gesamten Zellrasens beobachtet werden konnte. Beim Vergleich zeigten die Messdaten vor dem Hintergrund der Messgenauigkeit eine gute Übereinstimmung mit der theoretischen Abhängigkeit der elektrischen Feldstärke vom Radius in zwei Dimensionen (siehe Gleichungen G2 und G3) (Abb. 26, Abb. 27). Ebenfalls war es möglich mit Literaturwerten von Fast et al. [34] eine gute qualitative Übereinstimmung aufzuzeigen (siehe Abb. 27).

Auffällig bei der Aufnahme der Kontraktionsdaten war, dass bei einer Feldstärke von über 4,3 V/cm der gesamte Zellrasen antwortete. Dann war es in den makroskopischen Aufnahmen nicht mehr möglich einzelne Heterogenitäten als Ursprung von Aktivität auszumachen.

Abb. 23 zeigt die Datenpunkte für die Kontraktionsmessungen, sowie der Fluoreszenzaufnahmen und ihre Lage bezüglich der theoretisch erwarteten Feldstärken. Für die Berechnung der Theoriewerte wurde eine Raumkonstante von  $\lambda = 0,035$  cm und ein Aktivierungsschwellenwert von 64 mV zu Grunde gelegt [34].



**Abb. 23:** Vergleich der experimentellen Daten mit Erwartungswerten. Dargestellt ist die Abhängigkeit der für die Emission einer Erregungswelle von einer Heterogenität mit Radius  $R$  notwendigen Feldstärke  $E$ . In blau sind die Messwerte für die Fluoreszenzaufnahmen mit dem Calcium sensitiven Farbstoff. Grün zeigt die gemessenen Daten für die Kontraktionsaufnahmen. Den theoretischen Datenpunkten wurden die Gleichungen  $G2$  und  $G3$  zugrunde gelegt. Da für jeden Heterogenitätenradius 3-4 Messungen mit unterschiedlichen Zellpräparationen durchgeführt wurden, beschreiben die Fehlerbalken jeweils die Standardabweichung über alle Messwerte an diesem Punkt.

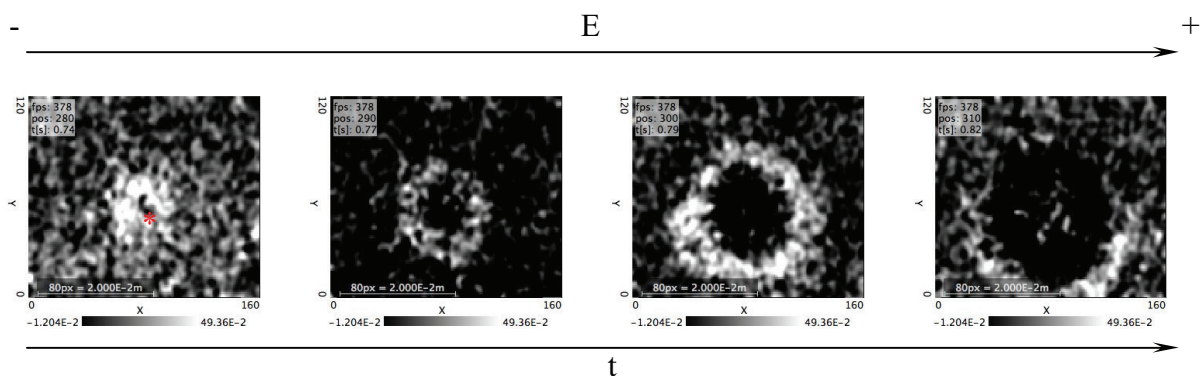


**Abb. 24:** Emission einer Erregungswelle an einer Heterogenität. Dargestellt ist hier die Kontraktion, welche durch Differenzbilderzeugung visualisiert wurde. **A)** Phasenkontrastaufnahme einer Zellkultur mit unterschiedlichen künstlichen Heterogenitäten. Der Pfeil markiert die in C rekrutierte Heterogenität. **B)** Spontanaktivität in der Kultur vor der Feldstimulation. **C)** Durch die Feldstimulation mit  $E = 2,8 \text{ V/cm}$  kommt es zur Emission einer Erregungswelle an der markierten Heterogenität (roter Stern). Bei **D** handelt es sich um die spontane Aktivität nach der Stimulation. Die grüne Umrandung spiegelt jeweils die Lage des Objektträgers wieder. Der Pfeil und der Stern markieren die rekrutierte Heterogenität. Der Skalierungsbalken beträgt 1,5 cm. Zur Veranschaulichung der Wellenfronten wurden deren Konturen farblich nachgezeichnet (rot = Spontanaktivität, blau = gepulste Erregungswelle).



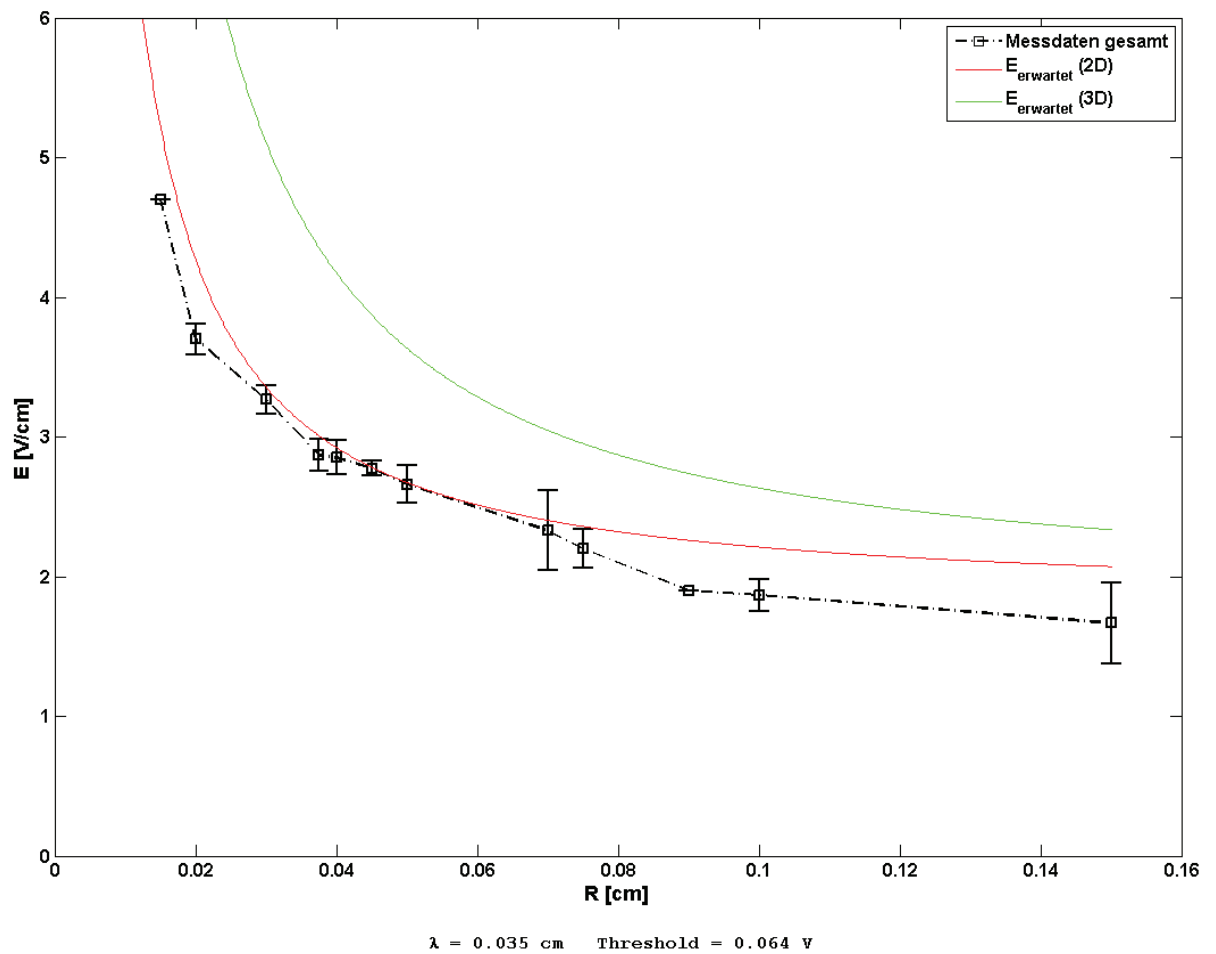
Eine statistische Datenanalyse ist im Anhang zu sehen, welche die zur Berechnung der Theoriekurve an die gefundenen Messwerte benötigten Parameter beschreibt. Demnach lässt sich durch Anpassung der Raumkonstante  $\lambda$  und des Aktivierungsschwellwertes eine theoretische Datenkurve mit dem bestmöglichen Fit berechnen (siehe Abb. 41). Für die Fluoreszenzaufnahmen wurde der Farbstoff Fluo 3/AM verwendet, welcher die Calciumdynamik anzeigt. Verglichen mit der theoretisch berechneten Kurve, lassen sich Messpunkte eher der für 2D-Gewebe erwarteten Kurve anpassen (siehe Abb. 23). Allgemein konnte eine gute Übereinstimmung der Messwerte der Calciumexperimente mit denen der Kontraktionsmessungen gefunden werden.

Doch mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes ließen sich die kleineren Heterogenitäten, mit einem Radius von 0,2 – 0,375 mm, besser darstellen als mit den Kontraktionsdaten. In Abb. 25 ist ein solches Signal als Funktion der Zeit  $t$  zu sehen.

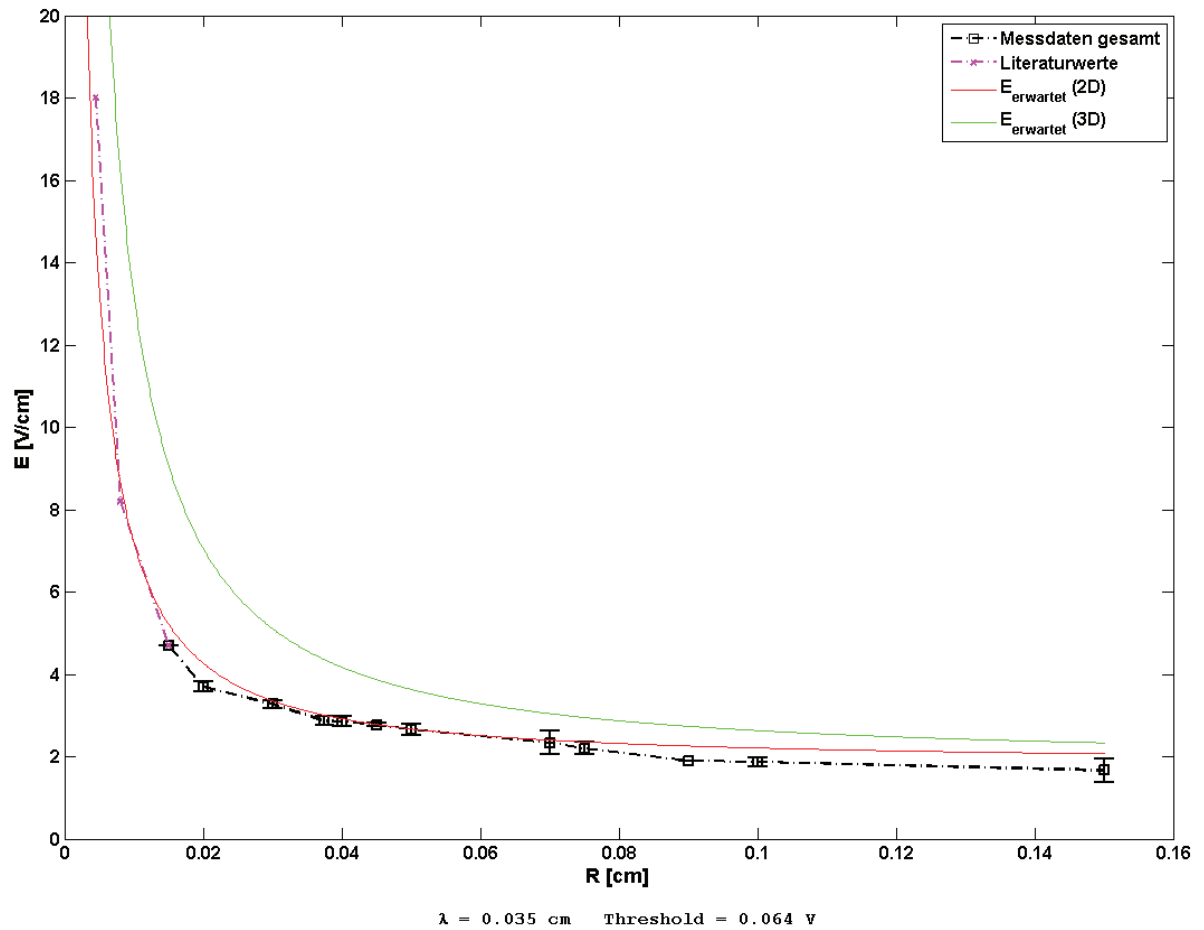


**Abb. 25:** Zeitlicher Verlauf einer induzierten Erregungswelle. Zu sehen ist eine induzierte Welle, ausgehend von einer Heterogenität (roter Stern). Der Durchmesser betrug 1,0 mm und die Feldstärke lag bei  $E = 2,8$  V/cm. Die Aufnahmen wurden mittels Calcium sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs gewonnen. Die Bilder sind zeitlich mit einem zeitlichen Unterschied von 30 ms aufgenommen worden. Die Grauwerte geben den Zeitpunkt der Aktivierung wieder, wobei hell (bis hin zu weiß) aktiviert bedeutet. Der Farbbalken repräsentiert die Intensität des Signals. Die Achsenbeschriftung ist jeweils in Pixel angegeben ([1 px = 250  $\mu$ m]).

Für den Vergleich der experimentellen Werte mit der Literatur, wurden sowohl die Kontraktions-, als auch die Fluoreszenzerggebnisse zusammengefasst und ausgewertet. Für Literaturbeispiele wurden die Experimente von Fast et al. verwendet [34]. Dabei ließen sich die Daten sehr gut zu einer Kurve vereinbaren. Es konnte gezeigt werden, dass die so gewonnene Reihe sehr gut an die theoretischen Werte nach Gleichung  $G2$  gefittet werden kann (siehe Abb. 27). In Abb. 26 sind die zusammengefassten eigenen Ergebnisse im Vergleich zu den Theoriewerten aufgezeigt.

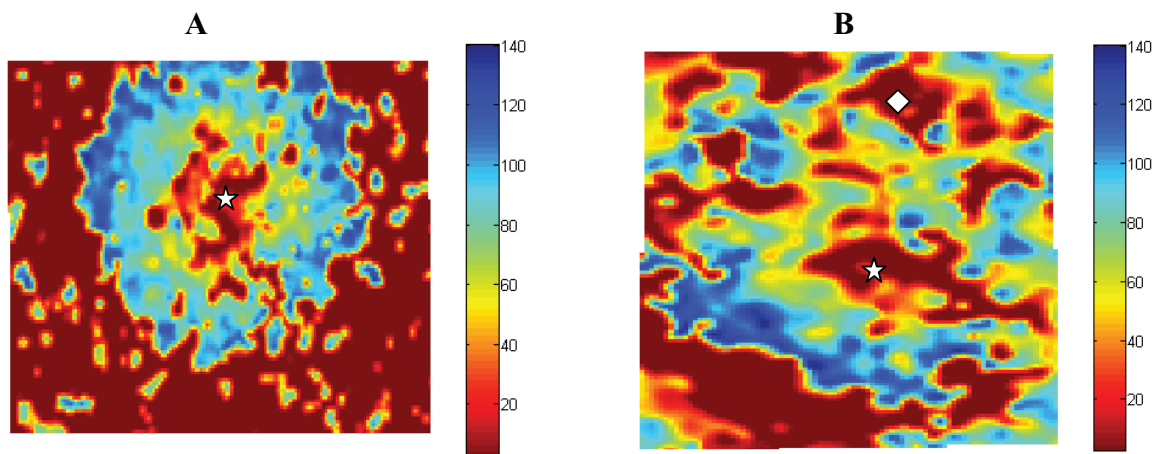


**Abb. 26:** Veranschaulichung der Datenwerte aller gemessenen Zellkulturen. Gemeinsame Graphik der Theoriekurven und der Versuchswerte. Bei den Versuchswerten handelt es sich um die Zusammenfassung aller Daten aus beiden Versuchsteilen (Fluoreszenz und Kontraktion). Die Fehlerbalken beschreiben hier die Standardabweichung über alle Messdaten an diesem Punkt.



**Abb. 27:** Graphische Darstellung der experimentellen Datenpunkte zusammen mit Literaturwerten [34], im Vergleich zu den theoretisch erwarteten Werten nach den Gleichungen  $G2$  und  $G3$ . Zur Berechnung der theoretischen Kurven wurde eine Raumkonstante  $\lambda$  mit 0,035 cm und ein Schwellwert mit 64 mV angenommen. Die Fehlerbalken bezeichnen hier die Standardabweichung aller Messwerte an diesem Punkt.

Um die Abhängigkeit der Feldstärke vom Radius noch besser darzustellen, wurden ebenfalls Kulturen mit künstlichen Heterogenitäten unterschiedlicher Größe stimuliert. Hierfür wurden die Kontraktion und die Fluoreszenz gleichzeitig aufgenommen und ausgewertet. Es zeigte sich, dass bei geringerer Feldstärke nur die größeren Inhomogenitäten angesprochen wurden. Eine gleichzeitige Rekrutierung von großen und kleinen Heterogenitäten wurde erst bei einer höheren Feldstärke beobachtet. Dies bestätigt die Ergebnisse der vorangegangenen Messungen. In Abb. 28 ist eine Aktivierungskarte einer Messreihe zu sehen. Abb. 28 A zeigt die Stimulation mit einer niedrigeren Feldstärke als Abb. 28 B.



**Abb. 28:** Beispiele für Stimulationen mit unterschiedlichen Feldstärken. Dargestellt sind Aktivierungskarten von einer niedrigen (A) und einer höheren Feldstärke (B). In A ist deutlich die Emission einer Erregungswelle an einer Heterogenität (Durchmesser  $d = 1,0$  mm) zu sehen. Bei der höheren Feldstärke erkennt man, dass zwei Heterogenitäten (mit den Durchmessern  $d_1 = 1,2$  mm (weißer Stern) und  $d_2 = 0,8$  mm (weißer Quader)) zur Emission einer Erregungswelle angeregt werden. Die Farbcodierung entspricht dem zeitlichen Verlauf der Aktivierung und orientiert sich an den nebenstehenden Farbbalken, welche in frames angegeben sind (1 fr. = 0,0025 s).

#### 4.4.2. Einsatz von Feldstimulation und virtueller Elektroden bei Spiralwellen

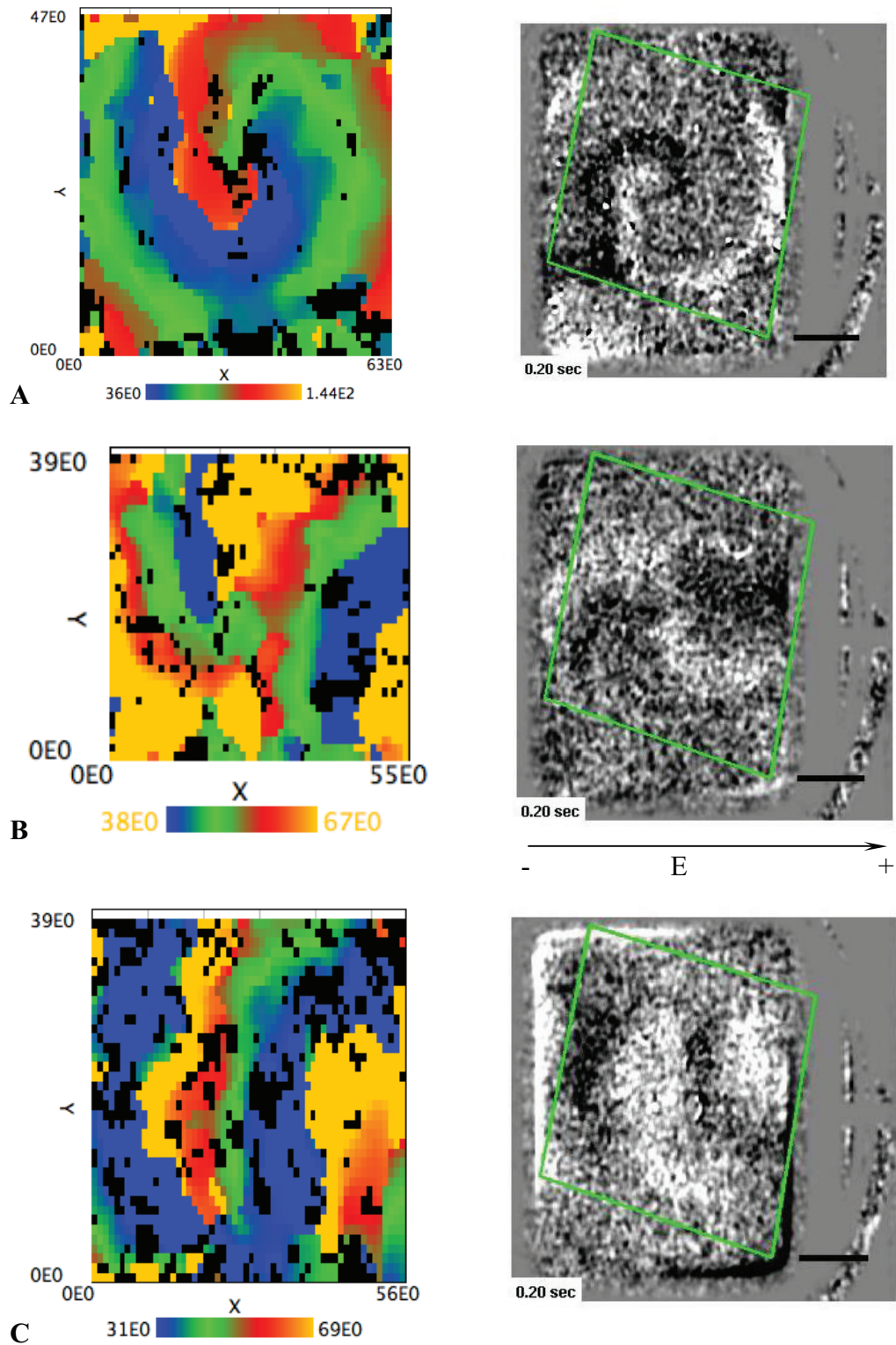
Neben der Ermittlung des Verhältnisses zwischen Radius der Heterogenität und der Feldstärke wurden auch Experimente zur Wirksamkeit induzierter Wellen auf Spiralwellen durchgeführt. Hierfür wurden Zellkulturen auf Objektträgern mit und ohne künstlichen Inhomogenitäten verwendet. Die tachykarde Arrhythmie, welche einer Spiralwelle entspricht, trat entweder spontan auf oder wurde mittels vertikal zueinander verlaufenden Wellen induziert. Die Pulsdauer betrug jeweils 10 ms. Die Anfangspulsfrequenz wurde 10 % höher als die Spiralfrequenz gewählt. Die Einstellung der Feldstärke erfolgte auf der Grundlage der in Abschnitt 4.1.1 dargestellten Messungen.

Während der Untersuchungen waren die Mini-Inkubatoren (siehe Abschnitt 4.1., Abb. 14) auf 37 °C eingestellt und es erfolgte eine ständige Carbogenzufuhr.

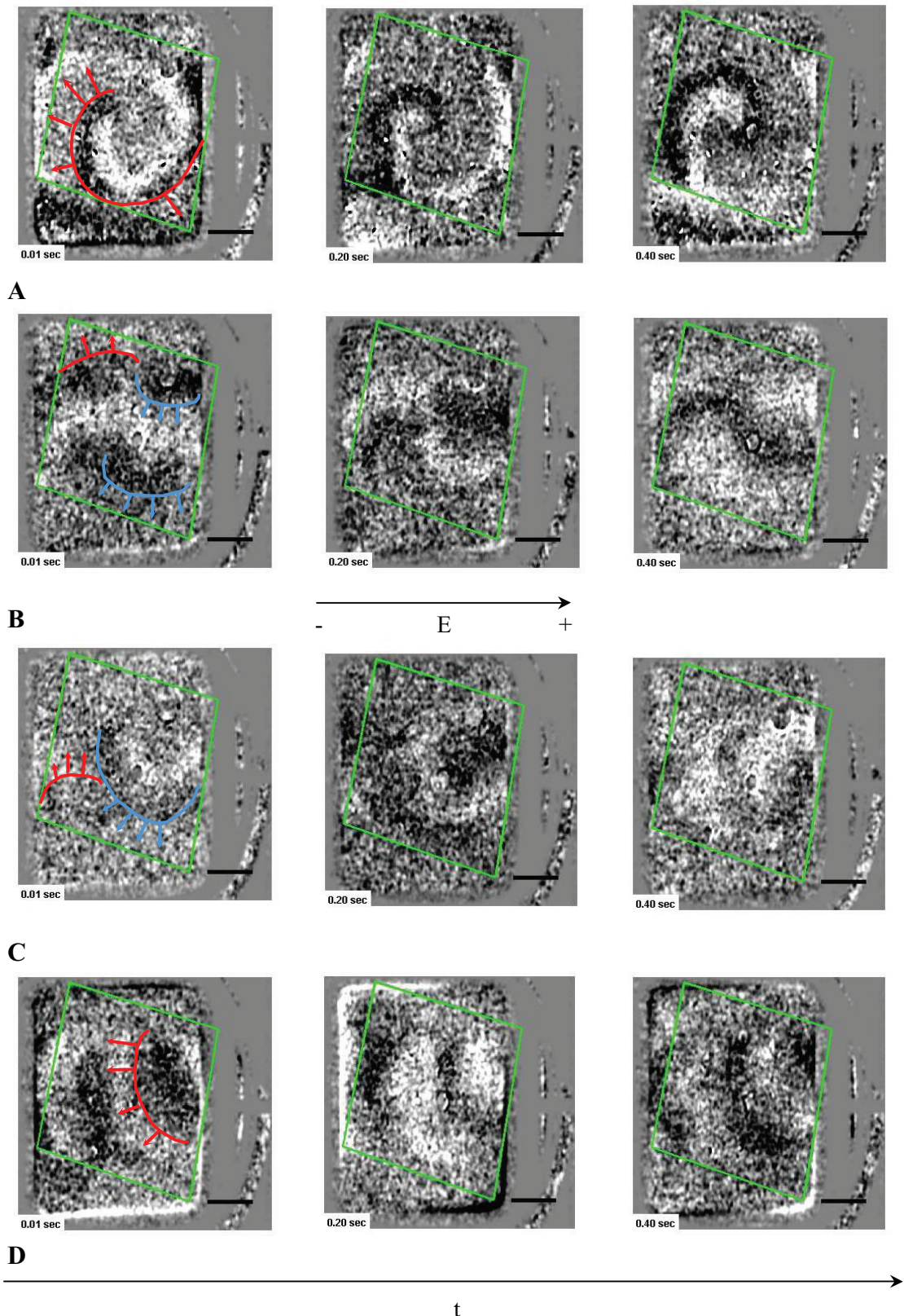
Spiralwellen traten bei den Zellkulturen mit einem Kulturalter von 6 bis 7 d oftmals als Spontanaktivität auf. Langzeitexperimente mit Kulturen im Alter von 14 d zeigten allerdings, dass sich die Spontanaktivität mit zunehmender Kulturdauer zu regelmäßiger periodischer Aktivität, in Form von ebenen Wellen, verschiebt.

Im Nachfolgenden sind exemplarisch die Aktivierungskarten und Differenzbilder von einzelnen Versuchen aufgezeigt, wobei es sich um Kontraktionsaufnahmen handelt. Dies bedeutet, dass dunkle (bis schwarze) Gebiete die Wellenfront aufzeigen und die hellen (bis weiße) Gebiete den Wellenrücken angeben. Abb. 29 zeigt die Aktivierungskarten einer Spiralwelle ( $f = 1,2$  Hz), welche mittels der Folge periodischer Pulse terminiert wurde. Durch anfängliche Stimulation bei einer Feldstärke von  $E = 3$  V/cm und einer Pulsfrequenz von  $f_p = 1,3$  Hz konnte die spontane Spiralaktivität nicht beeinflusst werden. Die Pulswellen inhibierten zwar die Ausbreitung der Aktivität in eine Richtung, konnten aber nicht die Kontrolle übernehmen. Bei einer erhöhten Pulsfrequenz ( $f_p = 2$  Hz) gelang es den Spiralkern an den Rand des Objektträgers (OT) zu drängen und damit aus der Kultur zu verdrängen (Abb. 30). Als spontane Aktivierung nach dem Puls konnten nahezu ebene Wellen von Rand des OT beobachtet werden, welche eine Frequenz von 2 Hz aufwiesen. Für diesen Versuch wurden keine künstlichen Heterogenitäten verwendet.

Damit ließ sich zeigen, dass es möglich ist Tachykardie typische Spiralwellen mittels Feldstimulation zu beeinflussen.



**Abb. 29:** Aktivierungskarten und dazugehörigen Phasenkontrastaufnahmen von **A)** einer Spirale mit  $f_{\text{spirale}} = 1,2$  Hz; **B)** der gleichen Spirale und einem Puls bei  $f_{\text{puls}} = 2$  Hz; **C)** Spontanaktivität nach der Pulsfolge bei  $f_{\text{spontan}} = 2$  Hz. Die Farbaufteilung der Aktivierungskarten gliedert sich von blau für die frühe Aktivität über grün zu rot für die späte Aktivierung. Als Codierung wurde der Farbbalken angegeben in Frames (1 fr. = 0,008 s). Die Lage des Objektträgers im Feld wird durch das grüne Rechteck dargestellt. Der Skalierungsbalken der Phasenaufnahme beträgt jeweils 1,5 cm. Die Achsen der Aktivierungskarten geben jeweils die Größe des Bildes in Pixeln wider.

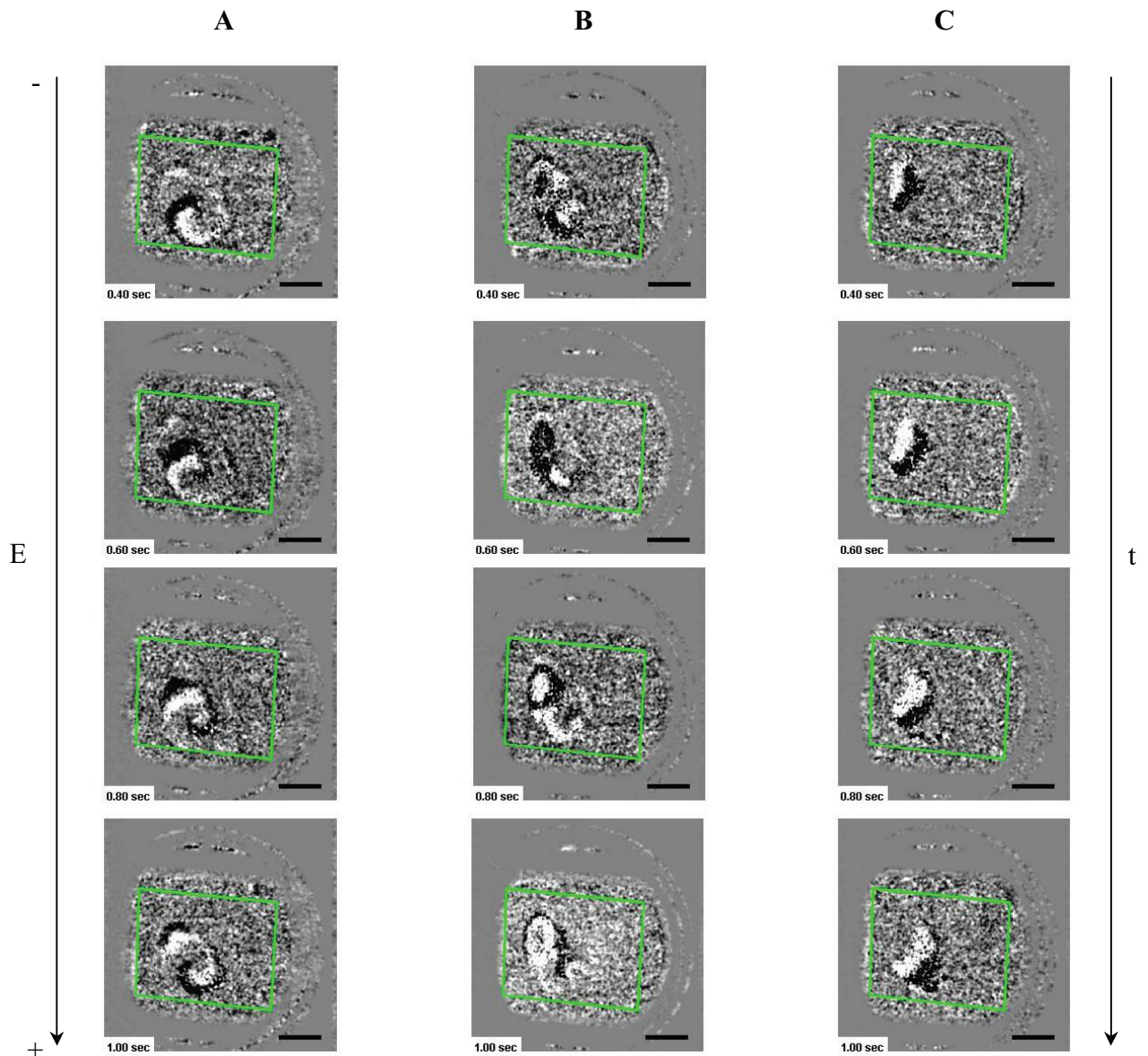


**Abb. 30:** Differenzbilder zu Pulsexperimenten. Dargestellt sind die Differenzbilder zu den Aktivierungskarten in Abb. 29. **A)** Spontanaktivität; **B)** bei Feldstärke von 3 V/cm und einer Pulsfrequenz von 1,3 Hz; **C)** bei einer Pulsfrequenz von 2 Hz; **D)** Spontanaktivität nach der Pulsfolge. Der Skalierungsbalken beträgt jeweils 1,5 cm. Das grüne Rechteck bezeichnet jeweils die Lage des Objektträgers im Feld; der Skalierungsbalken stellt jeweils 1,5 cm dar. Die Bilder wurden mit einem zeitlichen Intervall von 0,20 s aufgenommen. Zur Veranschaulichung wurden die Fronten in die ersten Aufnahmen der Zeitreihen eingezeichnet (spontan = rot, Puls = blau).

Bei den Heterogenitäten-Versuchen wurde die Spirale mittels Aktivierungswellen ausgehend von Inhomogenitäten verdrängt. Dabei breiteten sich die induzierten Wellen kreisförmig von den rekrutierten virtuellen Elektroden aus und konnten so die Spirale in der Kultur eliminieren.

Abb. 31 zeigt die Differenzbilder und die Aktivierungskarten der Spontanaktivität (A), der Pulsfolge und der Spontanaktivität nach der Pulsfolge (B-C). Die dazugehörigen Filmdateien befinden sich auf der beiliegenden CD.





**Abb. 31:** Differenzbilder eines Pulsversuches. Dargestellt sind die Spontanaktivität (A), die Rekrutierung einer natürlichen Inhomogenität bei einer Feldstärke von 5 V/cm und einer Pulsfrequenz von 2 Hz (B), sowie die Spontanaktivität nach dem Puls (C). Der Skalierungsbalken der Differenzbilder beträgt jeweils 1,5 cm. Die Lage des Objektträgers zum angelegten Feld wird jeweils durch das grüne Rechteck aufgezeigt. Die zeitlichen Aufnahmeintervalle betragen 0,20 s.

#### 4.5. Vergleich der Gap Junction-Expression in Zellkultur und Gesamtherz

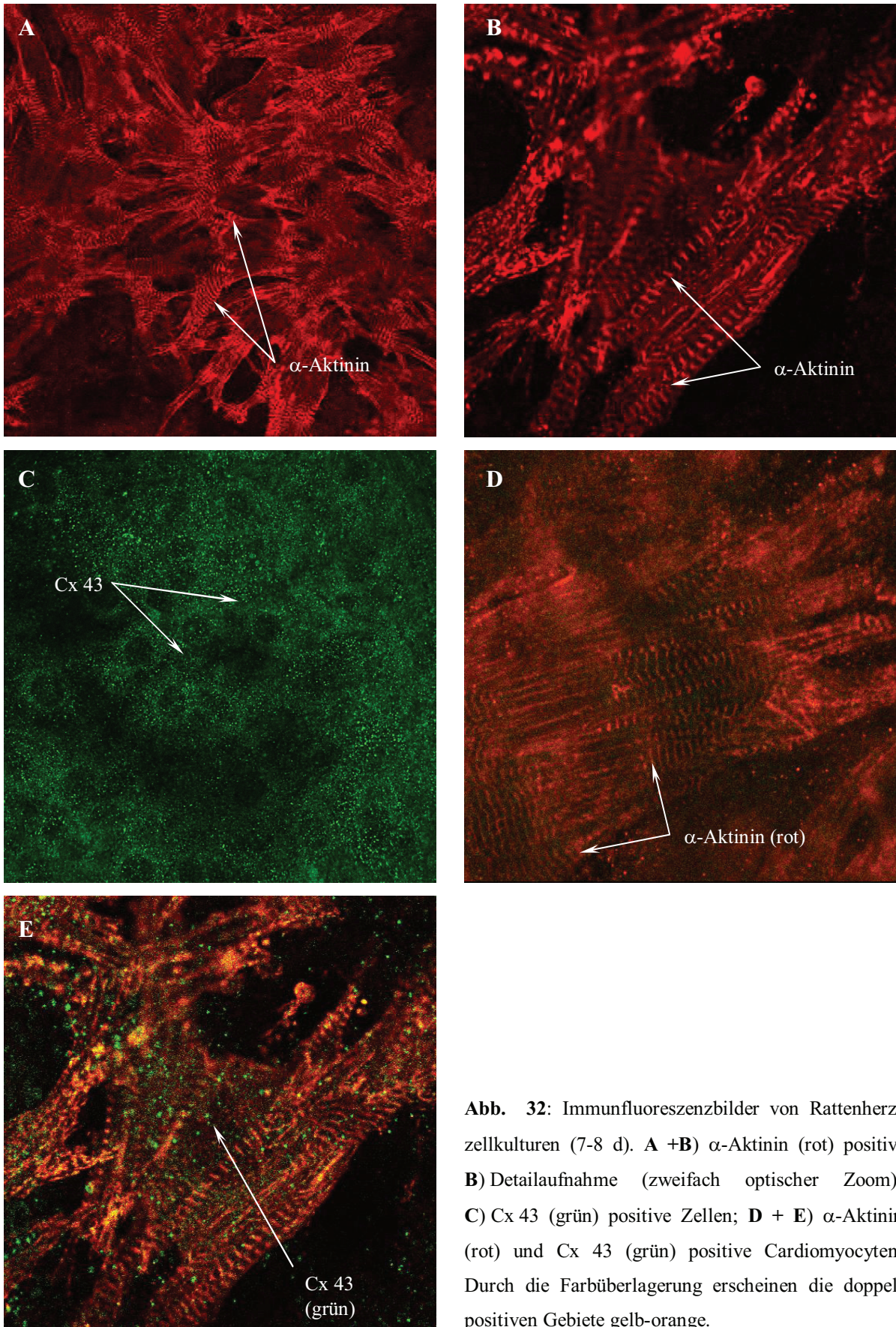
Die für die Wellenaufnahmen verwendeten Objektträger wurden laut dem Immunfluoreszenzprotokoll konserviert und angefärbt. Hierfür standen Antikörper (AK) für das Gap Junction-Protein Connexin 43, das Myocyten spezifische sarkomerische  $\alpha$ -Aktinin und den Fibroblasten-Marker DDR2 zur Verfügung. Als Konjugate wurden die DyLight-Farbstoffe 488, 549 und 649, sowie Cy3 und FITC benutzt.

Die Zellkulturproben wurden positiv auf  $\alpha$ -Aktinin und Connexin 43 (Cx 43) getestet. Dagegen war DDR2 in den Kulturschnitten bei jeder Messung negativ.

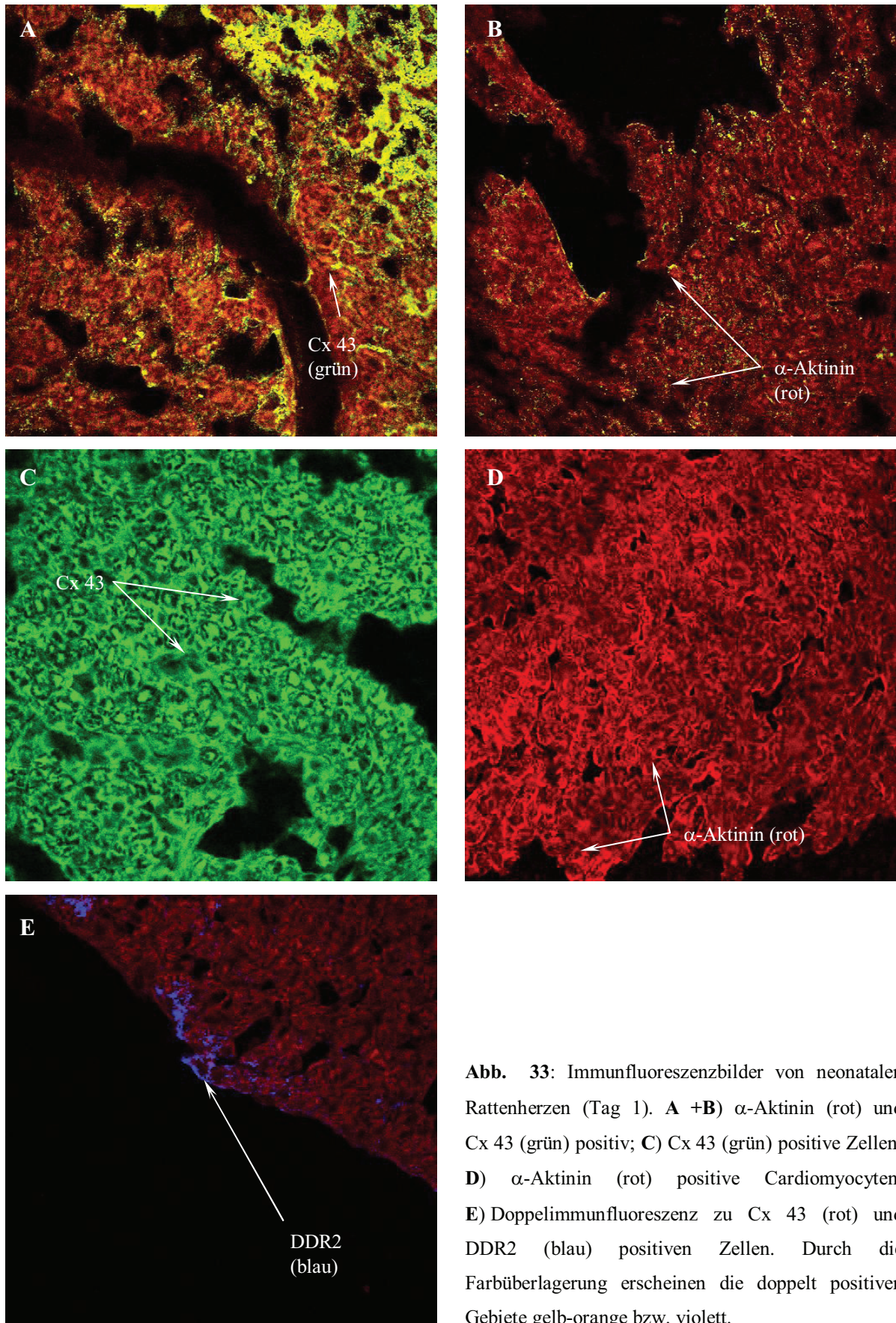
Es zeigte sich, dass die Cx 43-Proteine in der Zellkultur anders verteilt sind, als im adulten Herzen. Beim erwachsenen Herzen sind die Connexine vorwiegend in der Längsrichtung zwischen den einzelnen Myocyten zu finden. Dahingegen ist die Verteilung der Gap Junction-Proteine in der Zellkultur und im neonatalen Herzen eher ubiquitär zu sehen. Auch die Myocyten selbst sind unter Kulturbedingungen zwar ebenfalls in länglichen Bahnen, aber auch in nestähnlichen Clusterstrukturen angeordnet.

DDR2 positive Zellen wurden nur beim Ganzherz gefunden und auch dort waren die Gebiete nur vereinzelt.

In Abb. 32 sind die Fluoreszenzbilder aus der Zellkultur dargestellt. Dem gegenüber stellt Abb. 33 die Mikroskopiebilder für die Ganzherzschnitte dar.



**Abb. 32:** Immunfluoreszenzbilder von Rattenherzzellkulturen (7-8 d). **A +B)**  $\alpha$ -Aktinin (rot) positiv; **B)** Detailaufnahme (zweifach optischer Zoom); **C)** Cx 43 (grün) positive Zellen; **D + E)**  $\alpha$ -Aktinin (rot) und Cx 43 (grün) positive Cardiomyocyten. Durch die Farbüberlagerung erscheinen die doppelt positiven Gebiete gelb-orange.



**Abb. 33:** Immunfluoreszenzbilder von neonatalen Rattenherzen (Tag 1). **A +B)**  $\alpha$ -Aktinin (rot) und Cx 43 (grün) positiv; **C)** Cx 43 (grün) positive Zellen; **D)**  $\alpha$ -Aktinin (rot) positive Cardiomyocyten. **E)** Doppelimmunfluoreszenz zu Cx 43 (rot) und DDR2 (blau) positiven Zellen. Durch die Farbüberlagerung erscheinen die doppelt positiven Gebiete gelb-orange bzw. violett.

## 4.6. Auswirkungen von Parameteränderungen auf die Wellendynamik

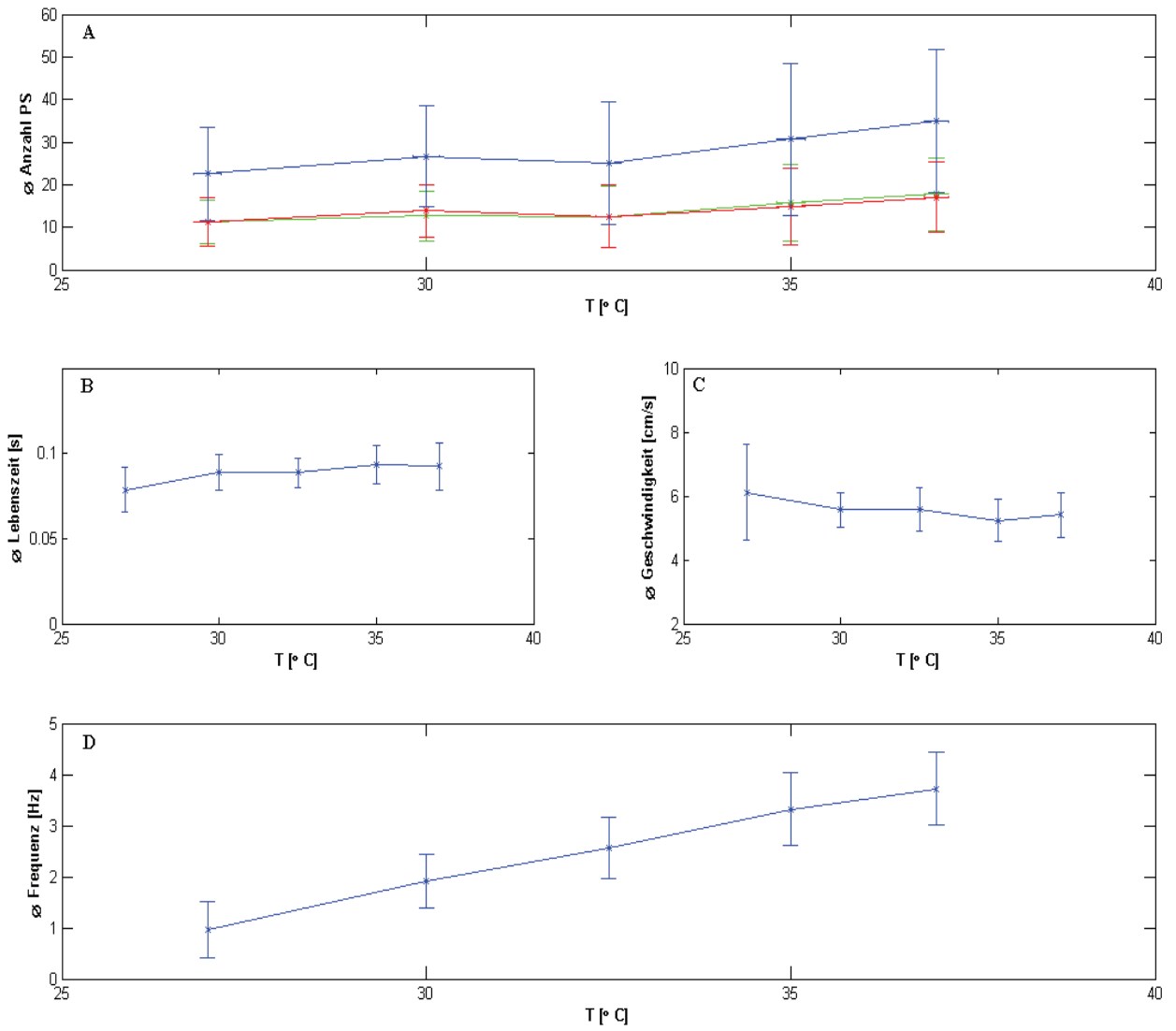
### 4.6.1. Temperaturänderungen

Für die Experimente zur Untersuchung des Temperatureinflusses auf die Wellendynamiken wurde die makroskopische Phasenkontrast-Methode verwendet. Es standen fünf 5 cm-Petrischalen von unterschiedlichen Präparationen zur Verfügung.

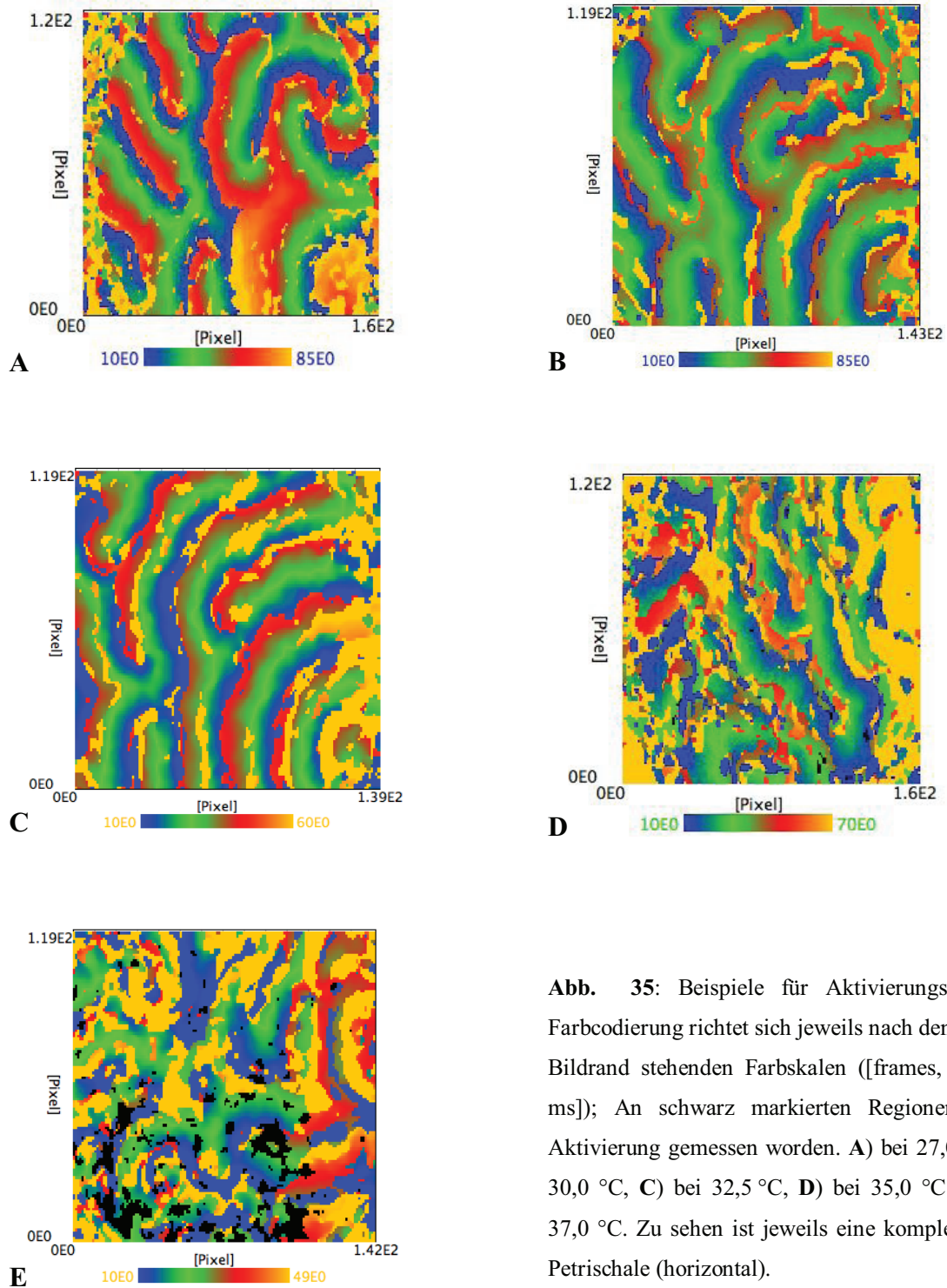
Die gemessenen Temperaturstufen wurden bei 27 °C, 30 °C, 32,5 °C, 35 °C und 37 °C festgesetzt. Nach Erreichen der jeweiligen Temperaturstufe wurden die Kulturen für 20 min auf dieser Stufe gehalten, damit eine Akklimatisierung der Zellen gewährleistet wird.

Zur Charakterisierung des Temperatureinflusses wurden die Phasen-Singularitäten (PS), die Frequenz und die Aktivierungskarten ermittelt. Für die statistische Auswertung der Phasen-Singularitäten wurden deren Anzahl, durchschnittliche Lebenszeit und Geschwindigkeit berechnet.

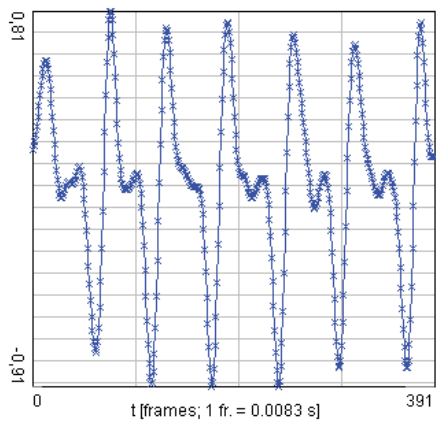
In Abb. 34 sind die Mittelwerte für dominante Frequenz, Anzahl, Lebenszeit und Geschwindigkeit der PS für alle Experimente dargestellt. Es zeigt sich, dass die Anzahl der Phasen-Singularitäten leicht ansteigt mit zunehmender Temperatur. Ebenso erhöht sich die Frequenz der Kontraktionswellen mit steigender Temperatur, was sich auch sehr gut anhand der Aktivierungskarten und Zeitreihen feststellen lässt (Abb. 35, Abb. 36). Die Lebenszeit und Geschwindigkeit der Singularitäten ändern sich hingegen nicht signifikant. Die Geschwindigkeit beträgt 3,7-5,6 cm/s. Anhand der Filmdateien war zu erkennen, dass sich die PS nur in einem kleinen Gebiet von wenigen Millimetern bewegten, d. h. die Singularitäten sind sehr stationär und ändern ihre Lage kaum verglichen zum Ausgangspunkt. Die Lebenszeit der PS lag im Durchschnitt bei 83 ms, was für echte Wellenaufbrüche spricht und nicht für durch Rauschen verursachte Singularitäten.



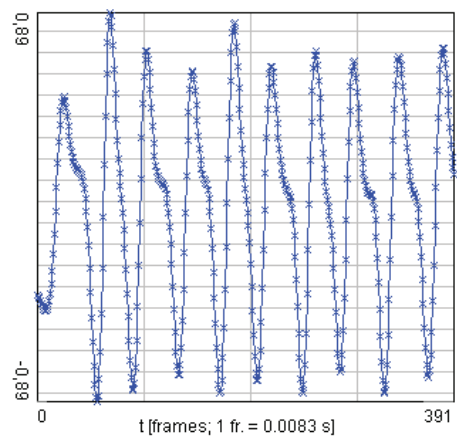
**Abb. 34:** Graphische Darstellung der Durchschnittswerte aller ermittelten Parameter; **A)** Anzahl der Phasen-Singularitäten, aufgeteilt in Gesamtzahl (blau), entgegen (rot) und im Uhrzeigersinn (grün); **B)** Lebenszeit der PS; **C)** Geschwindigkeit der PS; **D)** dominante Frequenz.



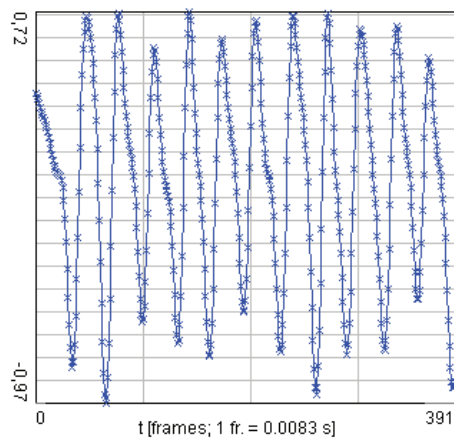
**Abb. 35:** Beispiele für Aktivierungskarten, Die Farbcodierung richtet sich jeweils nach den am unteren Bildrand stehenden Farbskalen ([frames, 1 fr. = 8,3 ms]); An schwarz markierten Regionen ist keine Aktivierung gemessen worden. **A)** bei 27,0 °C, **B)** bei 30,0 °C, **C)** bei 32,5 °C, **D)** bei 35,0 °C und **E)** bei 37,0 °C. Zu sehen ist jeweils eine komplette  $\varnothing$  5 cm-Petrischale (horizontal).



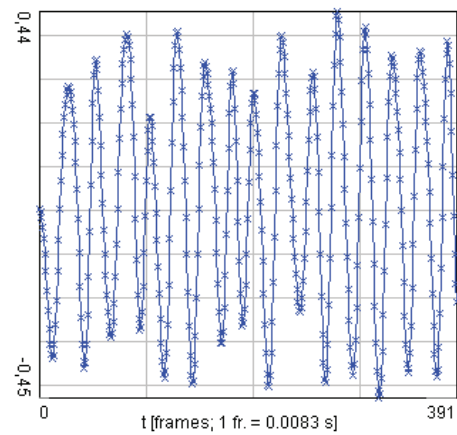
**A**



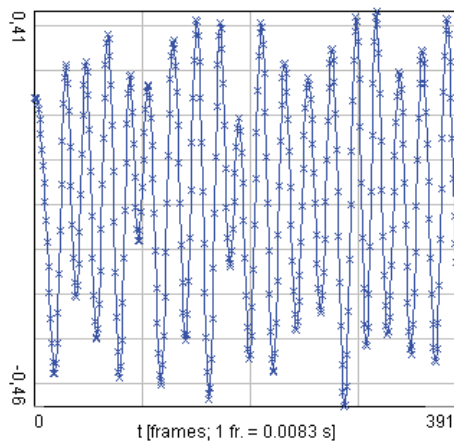
**B**



**C**



**D**



**E**

**Abb. 36:** Beispiele für Zeitreihen. Alle Zeitreihen wurden am gleichen Pixel berechnet (80, 50). **A)** bei 27,0 °C, **B)** bei 30,0 °C, **C)** bei 32,5 °C, **D)** bei 35,0 °C und **E)** bei 37,0 °C. Auf der x-Achse ist die Zeit dargestellt.

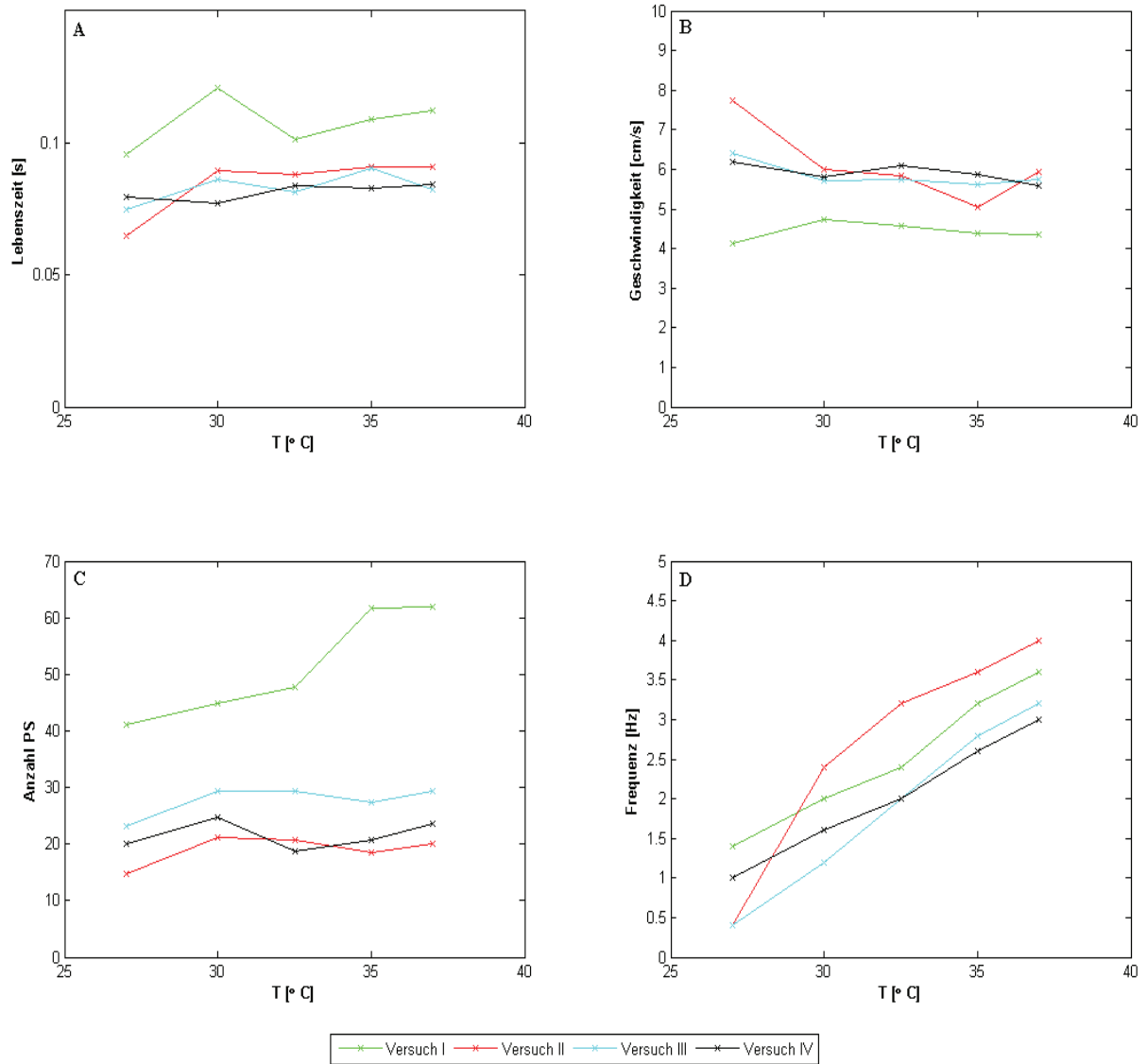


In Abb. 37 sind die gleichen Parameter einzeln für die jeweiligen Experimente aufgetragen. Auffällig sind dabei die Ergebnisse für den Versuch 1. Während sie bei Frequenz, PS-Anzahl und -Geschwindigkeit jeweils dem Trend folgen, zeigen sie bei der Lebenszeit doch stärkere Abweichungen vom allgemeinen Trend. Hier zeigt sich höhere Divergenz mit steigender Temperatur.

Es kann gesagt werden, dass die Änderungen zwischen den Temperaturstufen 30 °C und 35 °C am geringsten sind.

Hingegen zeigen alle untersuchten Proben bei 27 °C die geringste Frequenz, mit ansteigender Tendenz in Richtung der höheren Temperaturstufen. Allgemein kann man erkennen, dass die Frequenz der deutlichsten Änderung unterliegt. Die Zeitreihen an einem Pixel sind in Abb. 36 dargestellt.

Auf der beiliegenden CD sind die Filmdateien zu den gemachten Experimenten gespeichert.



**Abb. 37:** Graphische Darstellung aller gemessener Parameter, aufgespalten in die einzelnen Versuche; **A)** Lebenszeit der PS, **B)** Geschwindigkeit der PS, **C)** Gesamtanzahl der PS und **D)** dominante Frequenz.

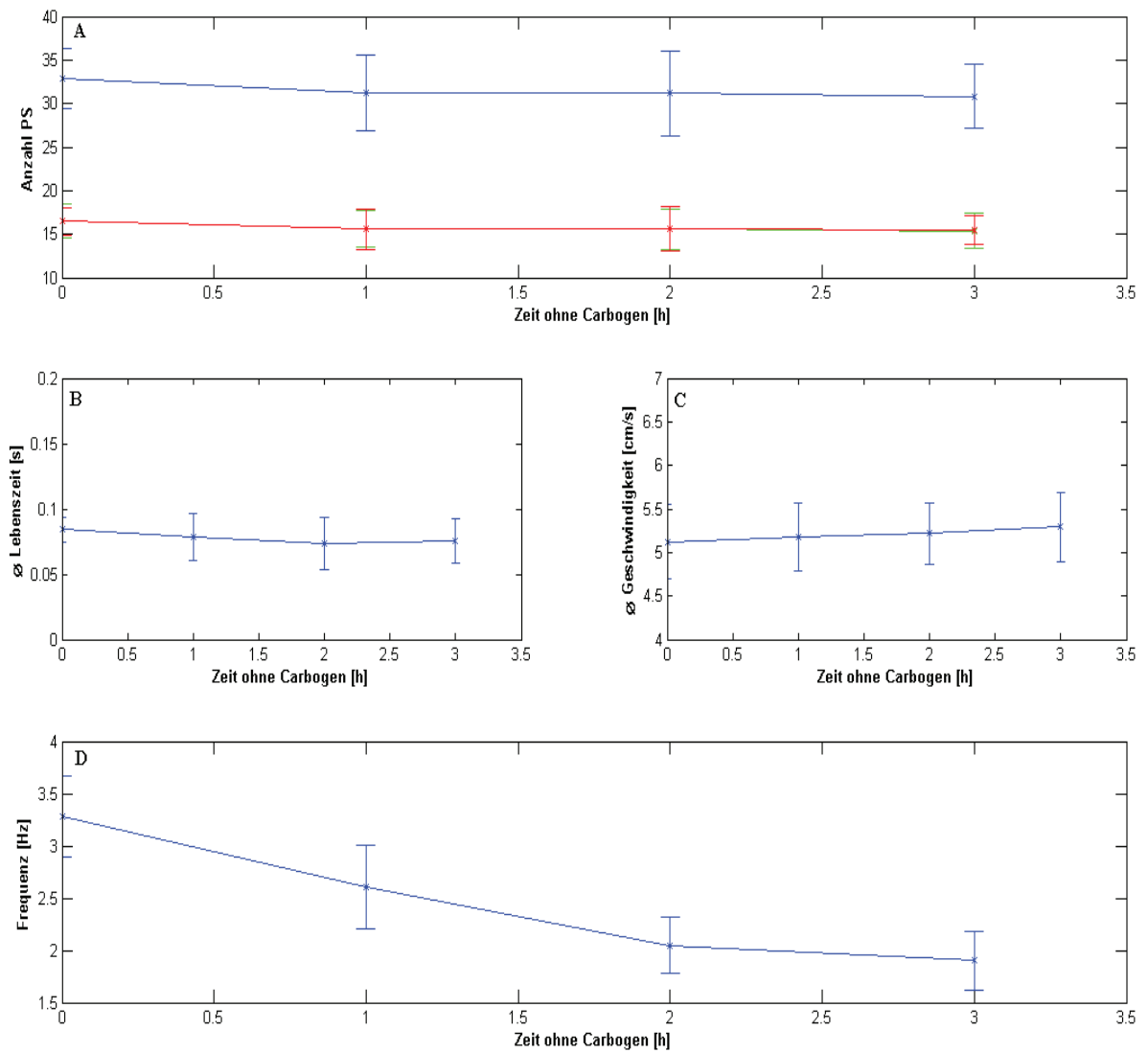
#### 4.6.2. Änderung der Wellendynamik bei Carbogenentzug

Um die Änderung der Wellendynamik bei Carbogenentzug zu charakterisieren, wurden Kulturschalen von vier verschiedenen Präparationen verwendet. Mit Hilfe des makroskopischen Phasenkontrast-Aufbaus war es möglich, die Kontraktion aufzunehmen und bildanalytisch auszuwerten. Die Zellkulturen wurden im Mini-Inkubator bei 37 °C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre gehalten. Nach einer Akklimatisierungsphase von 20 min, wurde die Carbogenversorgung abgeschaltet, d. h. den Zellen wurde kein Sauerstoff von außen zugeführt. Da außerdem auch die Kohlendioxidzufuhr abgeschaltet wurde, konnte auch eine pH-Wert-Verschiebung aufgenommen werden. Der pH-Wert stieg über das gesamte Experiment in einem Bereich von 7,2 auf 8,2, wobei sich eine Verschiebung ins basische Milieu einstellte.

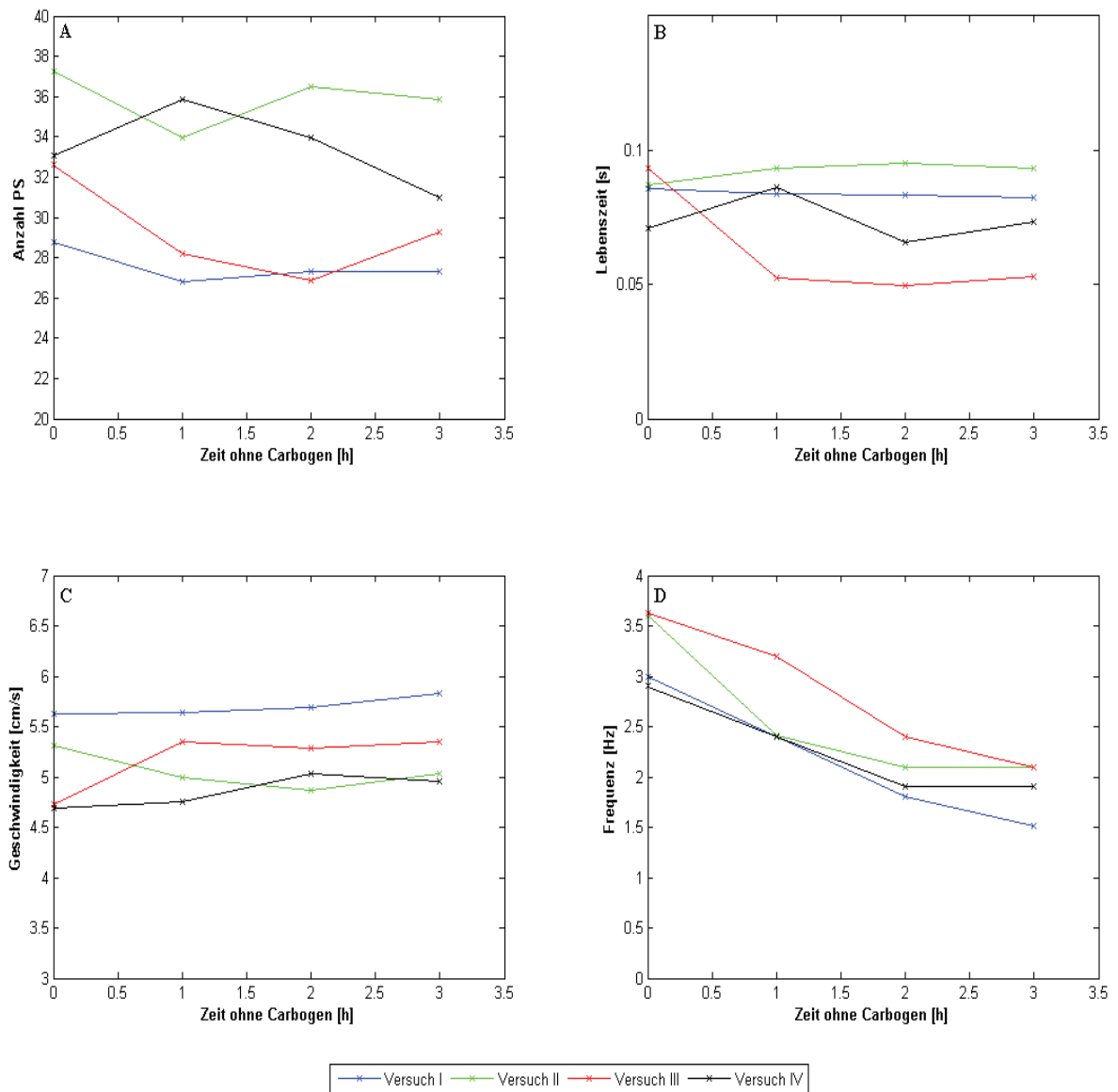
Die Aufnahmezeitpunkte wurden bei 0 h, 1 h, 2 h und 3 h ohne Carbogen festgelegt. Für die pH-Messung wurden Indikatorstäbchen der Firma Macherey-Nagel verwendet.

Die Aufnahmen wurden, ähnlich wie bei den Temperaturexperimenten, auf Phasen-Singularitäten hin analysiert. Zudem wurden ebenfalls die dominanten Frequenzen und Aktivierungskarten ermittelt und miteinander verglichen. Zur Minimierung der Hintergrundeffekte wurden auch hier nur Phasen-Singularitäten mit einer Lebenszeit  $> 16$  ms analysiert.

Die Anzahl der PS zeigte über die gesamte Experimentdauer einen konstanten Trend. Dagegen stieg die durchschnittliche Lebenszeit der PS leicht an, um dann wieder abzufallen. Die durchschnittliche Geschwindigkeit änderte sich kaum und lag bei ca. 5,4 cm/s. Diese Konstanz war auch schon bei den Temperaturexperimenten aufgefallen (siehe Abb. 34). Wiederum zeigte sich die Frequenz als Parameter mit den stärksten Änderungen. Mit zunehmender Zeit ohne Carbogenzufuhr fiel die dominante Frequenz ab. In Abb. 38 sind die Durchschnittswerte der gemessenen Parameter dargestellt. Abb. 39 zeigt die einzelnen Parameterkurven.



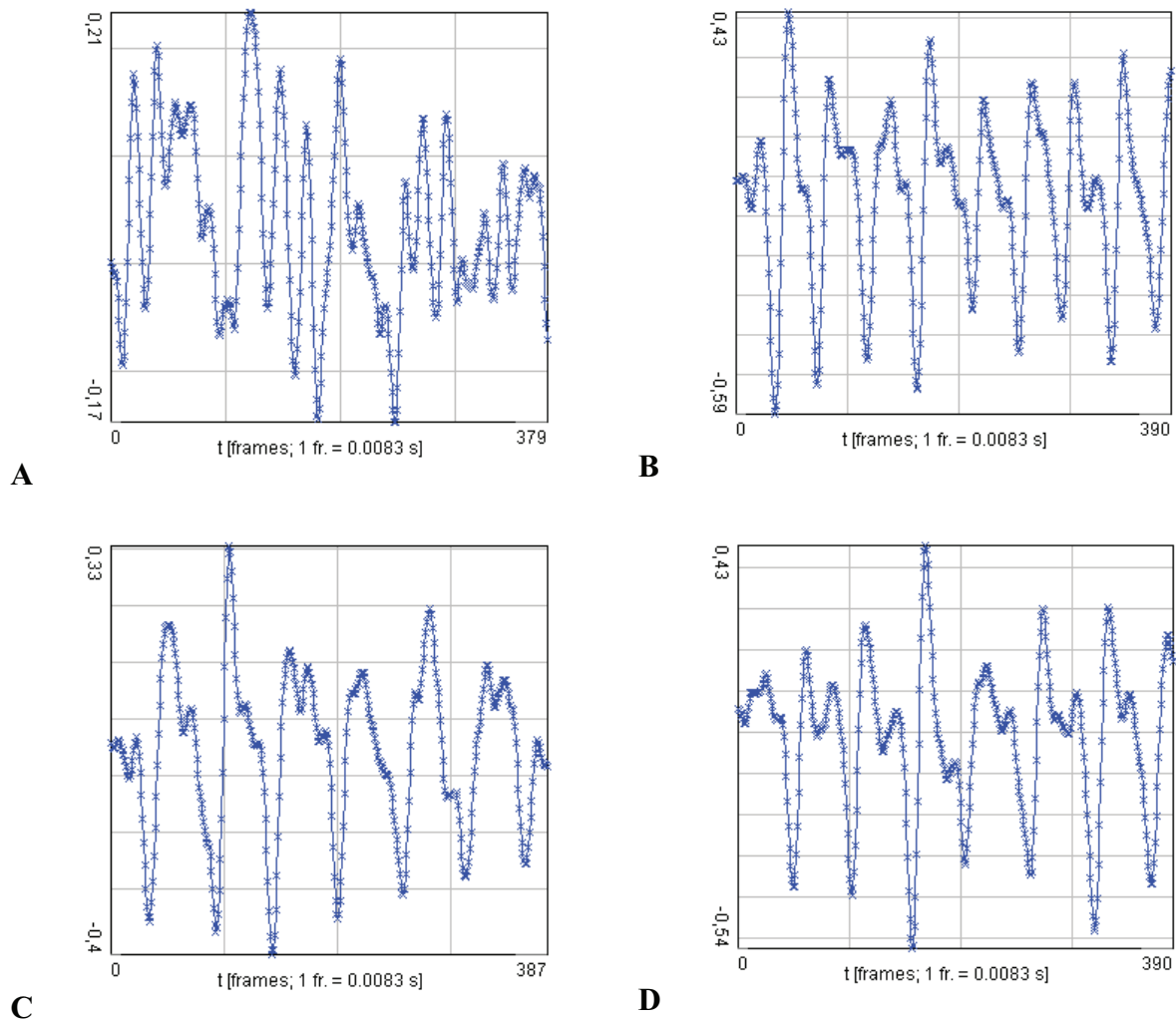
**Abb. 38:** Durchschnittswerte und Standardabweichungen für die Versuche mit Sauerstoffentzug. **A)** Anzahl der Phasen-Singularitäten insgesamt (blau), im (grün) und entgegen dem Uhrzeigersinn (rot); **B)** Lebenszeit; **C)** Geschwindigkeit der PS; **D)** dominante Frequenz.



**Abb. 39:** Darstellung der einzelnen Beobachtungsgrößen für die Sauerstoffentzug-Versuche, **A)** gesamte Anzahl der PS; **B)** Lebenszeit; **C)** Geschwindigkeit und **D)** dominante Frequenz.

Deutlich ist die Frequenzänderung anhand der Zeitreihen zu sehen (Abb. 40). Da die Frequenzänderung  $\Delta f$  über das gesamte Experiment nur durchschnittlich  $\Delta f_t = 1,41$  Hz beträgt, spiegelt sich dies in den Zeitreihen nicht ganz so stark wieder als wie bei den Temperaturexperiment, wo  $\Delta f_t = 2,76$  Hz ist.

Die Verschiebung der Frequenz war reversibel und konnte nach erneuter Zugabe von Carbogen wieder erhöht werden.



**Abb. 40:** Beispiele für Zeitreihen. Alle Zeitreihen wurden alle über einen Pixel (38,38) berechnet. **A)** bei 0 h, **B)** bei 1 h, **C)** bei 2 h und **D)** bei 3 h ohne Sauerstoffzugabe. Auf der x-Achse ist die Zeit t dargestellt.

## **5. Diskussion**

Der vorliegenden Arbeit liegt die Theorie zu Grunde, dass sich die Aktivität des Herzmuskels als Wellenausbreitung darstellen lässt. Dafür können zum einen die elektrische Aktivität mit dem Aktionspotential, sowie die ionendynamische Aktivität mit dem CICR und zum anderen die mechanische Aktivität in Form von Kontraktion untersucht werden. In der Literatur finden sich hierfür viele experimentelle Beispiele [19, 28, 32, 49].

Ziel war es hier die bereits bekannten Methoden zu erweitern und mit Hilfe der Kombination verschiedener Untersuchungsparameter die Einflüsse von elektrischen Feldstimulationen, sowie von äußerlichen Umwelteinflüssen auf die verwendeten Zellpräparationen aufzuzeigen.

### **5.1. Rekrutierung von Gewebheterogenitäten als virtuelle Elektroden**

Cardiomyocyten sind erregbare Zellen, welche durch elektrische Impulse zur Kontraktion angeregt werden. Durch die Kopplung der Zellen entsteht ein erregbares Medium, welches gepulst werden kann. Laut Theorie breitet sich eine Welle hier vom Ausgangspunkt gleichmäßig aus. Dabei durchlaufen alle Elemente drei Phasen: I. die anregbare Phase, II. die erregte Phase und III. die Refraktärphase. Zwar lassen sich die einzelnen Abschnitte durch schneller werdende Pulsfolgen verkürzen, jedoch nur bis zu einer kritischen Länge. Diese Minimallänge wird von den Zellen benötigt um die Ionenkonzentrationen innerhalb und außerhalb der Zellmembran wieder zu regulieren und annähernd auf das Ausgangsniveau zu bringen. Durch gebietsweise Verschiebung der Phasenlängen kommt es zum Aufreißen der anfänglichen, einheitlichen Wellenausbreitung. Oftmals setzen sich Spiralwellen in Gang, deren Rotationspunkt an die Inhomogenität im Medium gebunden, gepinnt ist. Es stellt sich eine Arrhythmie ein. Durch die Ausbreitung der Spiralwelle über das Medium zur selben Zeit, wie die Ausgangsaktivität kommt es zu Unregelmäßigkeiten der Wellenausbreitung im Medium. Weisen beide Wellenursprünge noch Frequenzunterschiede zueinander auf, kann es zu weiteren Aufbrüchen und Annihilationen kommen.

## **Feldstimulation und ihr Einfluss auf die Wellendynamik**

Solche Phänomene in der Wellendynamik sind im Verlauf dieser Arbeit auch bei elektrisch gepulsten Zellkulturen beobachtet worden. Hierfür wurden Zellen auf bearbeiteten Objektträgern gezüchtet und einem elektrischen Feld ausgesetzt. Da dieses Feld mittels zweier Plattenelektroden erzeugt wurde und durch die erhöhte Lage der Zellkultur auf dem Substrat, kann das die Cardiomyocyten umschließende Feld als homogen angesehen werden. Wie bereits in anderen Studien gezeigt wurde [110], führt die Pulsgabe zu einem Stromfluss im Interzellularraum, was wiederum auf das Transmembranpotential einwirkt. D. h. die Antwort des Myokards auf einen Strompuls basiert auf der Erregung vieler einzelner Cardiomyocyten durch den lokalen Stromfluss an der Zellmembran. Dabei hängt die Änderung des Transmembranpotentials stark von Zeit des Stimulus, die Feldstärke, der Polarität des Feldes und der generierten Wellenform des Pulses ab.

Innerhalb eines elektrischen Feldes ist auch die Orientierung der Zelle maßgebend. So zeigt sich das Transmembranpotential entlang der Feldrichtung an einem Ende der Zelle depolarisierend und am anderen hyperpolarisierend [109, 110].

In den hier durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass es möglich ist durch das Anlegen eines elektrischen Feldes bei einer spontanen ebenen Wellenfront eine Spirale zu induzieren (siehe Abb. 22). Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass sich in solch einem Feld auch Widerstände befinden. Dazu zählen Zellverbindung, wie z. B. die Gap Junctions zu den Myofibroblasten [110, 128]. Sie fungieren als „Stromfalle“, indem sie den erzeugten Stromfluss aufnehmen ohne ihn weiterzuleiten. Zudem ist die Orientierung der kultivierten Zellen nicht Kultur überspannend identisch. Es kommt zu Unregelmäßigkeiten in der Wellenausbreitung und dadurch zu Beeinflussung der Wellendynamik.

Außerdem können spontane Aktivitäten durch entgegenkommende Stimulationswellen annulliert werden. D. h. die spontane ebene Wellenfront wird durch eine induzierte ebene Wellenfront aus entgegengesetzter Richtung an der Weiterleitung gehindert, indem die Myocyten in ihre Refraktärzeit versetzt werden. Die Spontanaktivität am Kollisionspunkt der beiden Wellenfronten ausgelöscht.

## **Rekrutierung von Gewebheterogenitäten als virtuelle Elektroden**

Die Unterdrückung der Spontanaktivität gelingt dagegen am ehesten mit der Abgabe eines globalen Defibrillationsschocks, welcher sich durch eine hohe Energiedichte auszeichnet.



Durch die hohe Energie werden sämtliche Widerstände umgangen, sowie sichergestellt, dass alle Zellen gleichzeitig angeregt und in die Refraktärzeit versetzt werden. Doch selbst bei einer erfolgreichen Defibrillation sind die Nebeneffekte des starken Schocks nicht unerheblich. So können sich unter anderem neue nichterregbare Regionen durch Elektroporation bilden. Zudem ist jeder Stromschock auch ein traumatisches Erlebnis für den Patienten [70]. Es verwundert daher nicht, dass nach neuen Methoden der Defibrillation gesucht wird. Daraus haben sich zum einen das Anti-Tachycardia Pacing (ATP) und zum anderen die Feldstimulation (Far Field Pacing, FFP) entwickelt. Beide beruhen auf der Beeinflussung der spontanen Herzdynamik mittels elektrischer Pulsfolgen [6].

Nach der von Pumir et al. vertretenen These [6, 84, 124], lassen sich nicht erregbare Gebiete im Gewebe, so genannte Heterogenitäten, als Ursprung von neu erzeugten Wellen verwenden. Durch das elektrische Feld  $E$  wird das umliegende Gewebe depolarisiert und es breitet sich von der Heterogenität eine Welle aus, welche dann auch als Sekundärquellen oder virtuelle Elektroden bezeichnet werden. Solche virtuellen Elektroden zeigen dabei ein Attribut wie einzelne Zellen in einem elektrischen Feld. Entlang der Feldorientierung zeigen sie auf der einen Seite (Anodenseite) eine Depolarisation und auf der gegenüberliegenden Seite (Kathodenseite) eine Hyperpolarisation (siehe Abb. 6). Somit lassen sich auch die gepinnten Spiralwellen von der Inhomogenität lösen und verdrängen. Hierbei ist allerdings die Zeit der Pulsabgabe entscheidend. Nach Bitthin et al. befinden sich im Übergang von der Refraktärphase zur anregbaren Phasen zwei Zeitfenster, welche als *Vulnerable Window* und *Unpinning Window* bekannt geworden sind [6]. Dabei entspricht das *Unpinning Window* einem Abschnitt des *Vulnerable Window*. Diese und weitere Studien haben gezeigt, dass ein Lösen der Spiralspitze, das so genannte Unpinning, nur erfolgreich innerhalb dieses Zeitfensters ist. Diese Entdeckung kommt dem FFP entgegen, zumal es auf Folgen mehrerer Pulse aufbaut. Der genaue Mechanismus des *Vulnerable Window* und seine Verbindung mit der anregbaren und Refraktärphase sind bis dato noch nicht vollständig geklärt. Allerdings spielt nicht nur die Zeit der Pulsabgabe, sondern auch die angelegte Feldstärke eine Rolle bei dem Verdrängen von ungewollten Spiralwellen.

Computersimulationen und einzelne experimentelle Stimulationen haben gezeigt, dass sich durch die Feldstärke die Anzahl der Sekundärquellen regeln lässt [70]. D. h. die Rekrutierung zeigt eine Korrelation zwischen Feldstärke und Durchmesser der Heterogenitäten. Um diese Abhängigkeit zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit primäre Zellkulturen aus neonatalen Rattenherzen isoliert und auf Objektträger ausplattiert. Durch photolithographische Techniken wurden vorher bereits Heterogenitäten mit bekanntem

Durchmesser auf die Objektträger gedruckt. Die so gewonnenen Kulturen wurden nach einer Kultivierungszeit von sechs bis sieben Tagen mittels Aufnahmen der Fluoreszenz und der Kontraktion mit verschiedenen Feldstärken stimuliert. Sowohl die Farbstoffaufnahmen, als auch die Bewegungsaufnahmen zeigten einen deutlichen Einfluss der Feldstärke auf die Anzahl der virtuellen Elektroden.

Während dieser Promotion ist es erstmalig gelungen die benötigte Feldstärke zur Rekrutierung von künstlichen Elektroden für mehrere unterschiedliche Kantenlängen experimentell zu charakterisieren und mit dem theoretischen Modell zu vergleichen. Angelehnt an die Studien von Fast et al. [34], wurden für Kantenlängen von 0,4 mm bis 3,0 mm jeweils die benötigte Minimalfeldstärke ermittelt. Dabei wurde jeder Durchmesser durch mindestens vier unterschiedliche Präparationen verifiziert. Sowohl die Kontraktionsmessungen, als auch die Fluoreszenzmessungen mit dem Calcium-Farbstoff zeigten, dass die Feldstärke mit abnehmendem Durchmesser ansteigt. Verglichen mit den theoretisch ermittelten Kurven nach Pumar et al. [83, 84] (siehe Gleichung  $G2$  und  $G3$ ), ließ sich die nach Gleichung  $G2$  für zweidimensionale Systeme berechnete Kurve den experimentellen Daten angleichen. Dies spricht zum einen für die aufgestellte Theorie, dass sich natürliche Heterogenitäten, wie z. B. Blutgefäße, als virtuelle Elektroden (vE) verwenden lassen. Zum anderen kann die Zahl der rekrutierten vE durch die eingesetzte Feldstärke bestimmt und reguliert werden. Die hier charakterisierten Durchmesser im Submillimeter- und Millimeterbereich lassen sich auch im Herzgewebe finden.

### **Limitierungen des zweidimensionalen Zellmonolayers**

Die Ursache, dass Fast et al. [34] Messungen mit Heterogenitätendurchmessern viel kleiner als den hier erstellten gelangen, liegt einerseits in der Unterschiedlichkeit der Herstellungsmethoden und andererseits an der Messtechnik. Die von Fast et al. verwendeten Heterogenitäten beruhten nicht auf festen Hindernissen, sondern auf die Erstellung von nicht bewachsenen Flächen ( $\approx$  Löchern) im Zellrasen. Gemessen wurden diese Inhomogenitäten mittels Membranpotential sensitiver Fluoreszenzfarbstoffe in einem mikroskopischen Maßstab. D. h. die Änderung des Transmembranpotentials konnte in diesem System weitaus eher detektiert werden, als in dem für diese Arbeit etablierten Makroskopsetup. Hier zeigte sich bei einer Feldstärke  $> 5$  V/cm die Aktivierung des gesamten Zellrasens, wobei mit den eingesetzten Analysemethoden keine Unterscheidung einzelner Gebiete möglich war.

Die hier gemessenen zweidimensionalen Zellmonolayer zeigen Unterschiede zum adulten Herzen, da das dreidimensionale Gewebe aus mehreren solcher Schichten besteht, welche in ihrer Orientierung gegeneinander verdreht sind. Um die Ungleichheiten näher zu untersuchen, werden zurzeit Stimulationsversuche am perfundierten Ganzherzen gemacht. Auch dabei hat sich die Abhängigkeit der benötigten Feldstärke vom Radius der vE gezeigt. Dabei stellen die Blutgefäße den größten Pool an möglichen vE dar. Mit Hilfe von  $\mu$ CT-Scanaufnahmen (siehe Abb. 7) konnte die Struktur des Gefäßsystems im Nachhinein aufgeklärt werden und deren Lage mit den Fluoreszenzaufnahmen verglichen werden. Für die Charakterisierung der oberflächennahen Heterogenitäten im Gewebe, würden sich die Technik der optischen Kohärenztomographie (Optical Coherence Tomography, OCT) und auch die Ultrasound-Technologie anbieten. Mittels dieser Techniken ist es möglich die oberflächlichen Schichten des Gewebes auf Unregelmäßigkeiten zu untersuchen.

Doch auch das Perfusionsexperiment hat seine Limitationen. Durch die Aufnahme der Fluoreszenzinformationen können nur die Aktivitäten auf der Oberfläche des Gewebes aufgezeigt werden. Was sich im Inneren abspielt ist noch weitestgehend Vermutung. Der Idealfall wäre es, wenn sich die einzelnen Techniken simultan durchführen lassen würden. So könnte sich die OCT auch zur Darstellung der Kontraktion verwenden lassen.

Zum anderen zeigen sich auch Differenzen zwischen den Cardiomyocyten in der Zellkultur und dem adulten Ganzherzen. Schon die Form der Cardiomyocyten ist in der Zellkultur nicht gedehnt und lang gestreckt wie im Organ, obwohl auch die Kultur überwiegend längliche Cardiomyocyten aufweist. Jedoch ist z. B. die Expression der Gap Junction-Proteine im erwachsenen Herzgewebe auf die kurzen Seiten der Zellen konzentriert, um die Signalweiterleitung zu optimieren. In der Zellkultur hingegen ist die Expression der Kanalproteine ubiquitär an der Zellmembran verteilt. Durch die Anfärbung der Kanäle mittels fluoreszenzkonjugierten Antikörpern, konnte aber gezeigt werden, dass die Cardiomyocyten in Kultur eher Attribute von neonatalem Herzgewebe aufzeigen. Dies wurde auch von Camelitti et al. und Spach et al. bestätigt [13, 98].

Hinsichtlich weiterführender Projekte könnte man gedanklich mit den Zellkulturtechniken aus der Literatur [2, 52, 100, 126] spielen, mit denen wäre es möglich Herzgewebe durch die Verfahren des Tissue Engineering herzustellen. Man könnte dann Elektroden auf Nanotechnikbasis in den Zellverband integrieren. Dadurch könnte die elektrische Aktivität und die Zugkräfte, welche bei der Kontraktion entstehen, zu messen und mit den bisherigen Computersimulationen zu vergleichen. Doch bis sich ganze Herzwände mit vergleichbarer Dicke zum Organ erstellen lassen, werden noch einige Experimente gemacht werden müssen.

### 5.1.1. Verwendbarkeit der Feldstimulation in der Medizin

Die Wirksamkeit der virtuellen Elektroden-Theorie wurde sowohl im Computermodell, als auch im Experiment erfolgreich dargestellt. Aber wie könnte man dieses Wissen in die derzeitigen medizinischen Methoden integrieren?

Zurzeit liegen keine zuverlässigen Risikokriterien für die vorbeugende Implantation eines Cardioverter-Defibrillator (ICD) vor [72]. Als eindeutige Anzeichen für eine ICD-Behandlung werden spontan auftretende, anhaltende ventrikuläre Tachykardien, sowie ein überlebter plötzlicher Herztod genannt. Hierbei wird ein ca. 8 cm großes Gerät implantiert, was durch mehrere in der Ventrikelwand verankerte Elektroden verbunden ist. Der Eingriff ist sehr invasiv und die Befestigung der Elektroden kann zu Gewebeschädigungen führen.

Patienten mit einem ICD leiden nicht selten unter Angstzuständen, da das Gerät vor Schockabgabe die Kondensatoren auflädt, was als summendes Geräusch wahrgenommen wird. Zudem können Pulsabgaben mit hoher Energiedichte schmerzhaft für den Patienten sein. Hinzukommt, dass der ICD mit Batterien betrieben wird, welche in regelmäßigen Zeitabständen ausgewechselt werden müssen.

Das Ziel alternativer Techniken wie das FFP ist, die benötigte Energie unter die Schmerzgrenze zu reduzieren. Durch die Reduktion der Energie würde sich zudem erheblich die Batterielaufzeit verlängern.

Neben den Vorzügen aus Patientensicht, dürfen auch die wirtschaftlichen Folgen nicht außer Acht gelassen werden. Durch die Verbesserung der Akkumulatorenlaufzeit wird der zeitliche Abstand vergrößert und die Anzahl der operativen Eingriffe bezüglich des Austausches verringert.

Trotz der ganzen Vorteile ist bis dato noch kein endgültiges Design des neuen ICD verabschiedet worden. Um ein elektrisches Feld mit definierter Feldstärke aufbauen zu können, werden mindestens zwei Elektroden benötigt. Im experimentellen Aufbau wird dies durch zwei Plattenelektroden realisiert, denn dort ist die Form des Feldes deutlich definiert und messbar. Für die Anwendung in einem geschlossenen System wie dem menschlichen Körper fehlt es noch an Erprobungen unterschiedlicher Elektrodenformen. Dabei reichen die Ideen von Netzelektroden, die über das Herz gezogen werden, bis zu Stabelektroden im Innern der Kammer.

Im Interesse der Patienten sollte der Weg zur Entwicklung eines neuen implantierbaren Defibrillators weiterbeschritten werden.

## 5.2. Etablierung eines makroskopischen Zellkultursetups

Für die Untersuchung von Cardiomyocyten ist oftmals die Fluoreszenzmikroskopie die Methode der Wahl. Sie bietet mit Hilfe von spezifischen Farbstoffen Informationen über die Form, Dauer und Alternanzen des Aktionspotentials und der Calciumausschüttung [15, 17, 33, 64]. Doch auch die bewegungsinduzierte Phasenkontrastmethode (*propagation-induced phase-contrast*) kann zur Wellendarstellung benutzt werden [48, 49]. Beide Arbeitsmethoden haben ihre Vor- und Nachteile. So zeigt die Fluoreszenzmikroskopie einen Blick auf die Zusammenhänge zwischen Membranpotential und Calciumtransienten, dafür ist sie in den meisten veröffentlichten Arbeiten auf eine Millimeterskala begrenzt. Auf der anderen Seite besitzt die Phasenkontrastmethode die Möglichkeit der makroskopischen Abbildung mit einer Auflösung von mehreren Zentimetern. Ohne technische Verstärkung ist die Detektion von Fluoreszenzsignalen allerdings nur sehr schwer zu realisieren, zumal das Signal-Rausch-Verhältnis der am häufigsten verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe bei ca. 5 % liegt [29].

Um auch auf einer makroskopischen Skala Fluoreszenz messen zu können, wurde die so genannte Kontaktfluoreszenzmethode (*Contact Fluorescence Imaging*) integriert. Diese basiert auf der direkten Abnahme der Signale durch Glasfasern, welche unter dem Kulturträger befestigt werden [31, 111]. Die Fasern werden dann auf ein Array aus Photodioden gelenkt und das Messsignal auf den Computer übertragen. Zwar erhält man dadurch ein sehr gutes Signal-Rausch-Verhältnis, doch da jede Glasfaser einzeln verbunden werden muss, erreicht man schnell die räumlichen Grenzen.

Für die hier durchgeführten Experimente wurde erstmals eine Kombination aus Phasenkontrast und Fluoreszenzaufzeichnung aufgebaut, mit einem Sichtfeld von 5 cm. Damit ließen sich gängige Zellkulturschalen im Ganzen abbilden.

Dadurch war es möglich sowohl die Bewegungsdaten der Kontraktion, als auch die Fluoreszenzsignale des Membranpotentials und der Calciumdynamik simultan aufzunehmen. Mit Hilfe eines Delay Generators konnten die Kameras mit dem Pulsgenerator synchronisiert werden, so dass Rückschlüsse auf die Beeinflussung durch elektrische Pulsfolgen und der Kopplung zwischen der mechanischen und ionendynamischen Aktivität möglich sind.

Außerdem ist das Aufbaudesign funktional gestaltet, womit eine Erweiterung des Systems für andere experimentelle Projekte erleichtert ist.

Durch den Einsatz von Mini-Inkubatoren konnten die Zellkulturen über mehrere Stunden bei normalen Kulturbedingungen beobachtet werden. Dies erschließt auch neue Einsatzgebiete für zukünftige Fragestellungen.

Als ein sehr schwieriges Unterfangen hat sich die Visualisierung des Membranpotentials mittels sensitiver Fluoreszenzfarbstoffe entwickelt. Dies ist vor allem auf die Tatsache zurückzuführen, dass das Signal-Rausch-Verhältnis gerade bei diesen Farbstoffen sehr gering ist [29, 30]. Selbst durch den Einsatz von Restlichtverstärkern war es nur bedingt möglich solche Signale von Zellkulturen auf einem makroskopischen Maßstab abzubilden. Für die hier diskutierten Daten wurden daher keine Messwerte aus Membranpotentialmessungen verwendet. Doch durch weitere Optimierungsmaßnahmen bezüglich z. B. der Intensität der Beleuchtung könnte in weiteren Studien auch auf Daten des spannungsabhängigen Fluoreszenzsignals verwiesen werden.

### **5.3. Zellkulturuntersuchungen von Parameteränderungen**

Die Tatsache, dass Hypo- und Hyperthermie die elektrophysiologischen Eigenschaften kardialer Zellen beeinflussen ist schon häufig beschrieben worden [53, 95]. Dabei wirkt sich Hypothermie verlängernd auf die Aktionspotentialdauer und die effektive Refraktärzeit aus [18]. Zudem werden die Weiterleitungsgeschwindigkeit und der ins Zellinnere gerichtete Natriumionenstrom verlangsamt. Umgekehrt ist es bei der Hyperthermie. Hier werden die APD und die Refraktärzeit verkürzt. Konsequenterweise gelten sowohl die Hypo-, als auch die Hyperthermie als pro-arrhythmogene Faktoren [108], da durch die Beeinflussung der Aktionspotentialdauer, der Refraktärzeit und der Weiterleitungsgeschwindigkeit lokal neue Heterogenitäten entstehen [90]. Klinisch zeigt sich bei der Hypothermie eine Dysrhythmie mit einer stark verlangsamteten Herzrate und einem gesunkenen arteriellen Druck. Bei beginnender Hypothermie reagiert der Körper noch mit einer Steigerung des Stoffwechsels, was sich als Tachykardie zeigt. Mit zunehmend sinkender Temperatur (ab etwa 31 °C Körpertemperatur) wandelt sich das Bild in eine Bradykardie und Atemdepression [39].

#### **Temperaturänderungen und ihre Auswirkungen auf die Wellendynamik**

Mit dem neuen Experimentaufbau konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich die Frequenz der Zellkontraktionen durch Änderung der Umgebungstemperatur beeinflussen lässt. Neben der Verschiebung der Frequenz der Spontanaktivität zeigte sich auch eine Änderung in der Weiterleitungsgeschwindigkeit. Erwartungsgemäß waren diese Änderungen reversibel.

Die Methode des bewegungsinduzierten Phasenkontrasts kam hier zum Einsatz um die Änderungen im zeitlichen Ablauf der Kontraktion darzustellen. Dabei wurden die Zellkulturen von 37 °C auf 27 °C abgekühlt, gemessen und anschließend auf die jeweiligen Temperaturstufen erwärmt. Zur Akklimation wurden die Kulturen für 20 min auf jeder Temperaturstufe inkubiert vor dem Messen. Es hat sich gezeigt, dass die spontane Aktivität gleich der Umgebungstemperatur ansteigt. Auffällig ist, dass die Wellenstrukturen und auch die Wellenaufbrüche, welche anhand von Phasensingularitäten ermittelt wurden, am konstantesten im Temperaturbereich von 30-35 °C sind. Das bedeutet, die Reizweiterleitung ist am wenigsten thermisch beeinflusst bei Werten um die 35 °C. Interessanterweise ist dies auch die Temperatur, die von den Muttertieren im Nest erzeugt wird, um die Neugeborenen warm zu halten [91]. Da es sich bei den verwendeten Proben um Zellkulturen aus neonatalen Ratten handelt, korrespondieren diese Werte sehr gut.

Zur Klärung der Ursache von Temperatureinflüssen kann die Van t' Hoff'sche Regel herangezogen werden. Diese Faustregel, auch Reaktionsgeschwindigkeit-Temperaturregel (RGT) genannt, besagt, dass chemische Prozesse mit einer erhöhten Temperatur schneller ablaufen (bei einer Erhöhung von 10 °K um den Faktor 2-4). Den Faktor um den sich die Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Temperatursteigerung um 10 °K erhöht nennt man Q10-Wert [95]. Unter diese Regel fallen auch die Kinetik der Ionenkanäle und die Diffusionseigenschaften der Zellmembran. Für erregbare Gewebe/Zellen wird daher angenommen, dass die Temperaturabhängigkeit ein Zusammenspiel von reaktiven Komponenten (z. B. Kinetik des Depolarisierungsstromes, Aktivität von Kanalproteinen) und diffusiven Prozessen widerspiegelt. Bei den hier festgelegten Temperaturstufen handelt es sich nur um geringe Temperaturdifferenzen (10 °C Temperaturdifferenz), weshalb davon ausgegangen werden kann, dass der Q10-Wert über die Experimente hinweg konstant blieb.

In Fluoreszenzversuchen hat sich herausgestellt, dass bei niedrigeren Temperaturen die Calciumdynamik eine stärkere Affinität zur Temperatur hat als das Membranpotential [95]. D. h. bei niedrigeren Temperaturen neigt die Calciumdynamik eher zu Wellenaufbrüchen als die Membranspannung. Umgekehrt ist es bei höheren Temperaturen. Dort führen Störungen der Membranspannung häufiger zu Arrhythmien als Änderungen der Calciumkinetik.

Da in dieser Arbeit für die Temperaturexperimente allerdings nur die Kontraktionsdaten aufgenommen und ausgewertet wurden, kann hier keine eindeutige Identifizierung der ursächlichen Quelle benannt werden. Jedoch sind die gleichzeitige Messung von Membranspannung, Calciumdynamik und Kontraktion bei Temperaturänderungen Gegenstand neuer Versuchsreihen. Damit würden sich ebenfalls neue weiterführende

Fragestellungen beantworten lassen. So könnten mit Hilfe des in dieser Promotion etablierten Versuchsaufbaus auch Auswirkungen von Medikamenten auf die Änderungen der einzelnen Wellenformen unter unterschiedlichem Temperatureinfluss beobachten.

### **Ischämische Auswirkungen auf die Zellaktivität**

Neben den thermischen Einflüssen spielt auch die Versorgung der Zellen eine wichtige Rolle bei der Reizweiterleitung [59, 127]. Das Herz wird durch das Gefäßsystem und dem Blut mit Nährstoffen in Form von Ionen und Stoffverbindungen versorgt. Als häufigste Ursache für einen Herzinfarkt gelten gemeinhin verstopfte Gefäße, womit eine Versorgung des Herzgewebes unterbrochen wird. Dieser Zustand wird als Ischämie bezeichnet. Auf zellulärer Ebene sind die Vorgänge mitunter dramatisch für die Einzelzelle. Unter normalen Umständen gelingt es der Zelle mit Hilfe von sensitiven Ionenkanälen, welche sowohl passiv über den elektrischen Gradienten, als auch aktiv unter Energieverbrauch arbeiten, den Gradienten zwischen dem Extrazellulärraum und dem Zellinneren nahezu auszugleichen. Bei einer Ischämie kommt es nun aber zu einer pH-Wert-Verschiebung im extrazellulären Raum, welche sich auch auf das Zellinnere auswirkt. D. h. Wasserstoffionen ( $H^+$ , Protonen) fehlen. Infolgedessen kommt es zu einer Inhibierung der meisten Ionenströme über die Plasmamembran. Eine Folge ist die extrazelluläre Akkumulation von Kalium ( $K^+$ ), da der passive Efflux von  $K^+$  nicht mehr durch den aktiven  $K^+$ -Influx über die Natrium-Kalium-Pumpe ( $Na^+-K^+$ -Pumpe) ausgeglichen werden kann. Dies hat wiederum Auswirkungen auf das Membran- und Aktionspotential. Das Membranpotential wird bei steigender Konzentration des extrazellulären  $K^+$  ( $[K^+]_e$ ) depolarisiert; das resultierende Aktionspotential weist allerdings eine geringere Amplitude, Anstiegsgeschwindigkeit und Dauer auf. Die verringerte Anstiegsgeschwindigkeit und AP-Dauer sind auch auf den Anstieg des intrazellulären  $Na^+$  zurückzuführen. Daneben ist die Regenerierung der Zelle nach einer Depolarisation beeinträchtigt, was zu einer verlängerten Refraktärzeit führt. Allein dies führt häufig schon zu Arrhythmien. Weitere intrazelluläre Mechanismen sind die Unterbrechung der Elektronentransportkette und den damit verbundenen Protonenhaushalt der Mitochondrien. Ohne den durch die Protonen gesteuerten elektrochemischen Gradienten an der inneren Mitochondrienmembran kann die Adenosintriphosphat (ATP)-Synthase nicht mehr richtig arbeiten. Der ATP-Gehalt sinkt. Um den Verlust des energiereichen ATPs zu kompensieren, reduziert die Zelle sämtliche aktiven Prozesse, worunter auch die Kontraktion fällt. Zudem wird Phosphokreatinin (PCr) zur Gewinnung von ATP aus ADP unter



Freisetzung von Pyrophosphat ( $P_i$ ) verwendet und die anaerobe Glykolyse unter Bildung von Pyruvat und Lactat wird aktiviert und intensiviert [14, 79, 117].

Ebenfalls beeinträchtigt ist der Calciumhaushalt der Zelle. Nach einer Kontraktion wird das  $Ca^{2+}$  aus dem Cytoplasma u. a. ins Mitochondrium geleitet über den  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauscher. Durch die Störung des Protonengradienten der Mitochondrienmembran wird eine Absorption von Calciumionen ausgelöst. Durch die Überladung des Mitochondriums mit  $Ca^{2+}$  wird ein Rettungskanal geöffnet, welcher Calcium ausströmen lässt. Solch ein Vorgang bedarf kein vorausgegangenes Aktionspotential. Dies führt ebenso zu Arrhythmien und Fibrillationen.

Bei einer Ischämiedauer von mehr als 30 min kommt es hier zu einer nur teilweise reversiblen Beeinträchtigung des Energie- und Calciumhaushaltes. Die Zellen neigen zu Nekrose und Fibrolyse [14].

Bei den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde gleichfalls eine Änderung des pH-Wertes beobachtet. Doch durch die Pufferwirkung des eingesetzten Mediums lag die Verschiebung nicht im aciden Bereich, sondern im basischen. D. h. es kam zu einer Akkumulation von Protonen. Dies würde auch erklären, warum eine Reduktion bei der Frequenz der Spontanaktivität ermittelt wurde. Es ist zu vermuten, dass der Überschuss an Protonen zu einer Verschiebung des Gleichgewichts hinsichtlich des aktiven Transports von Ionen stattgefunden hat.

Neben den Änderungen in Frequenz und Ausbreitungsgeschwindigkeit wurde keine nennenswerten Auswirkungen beobachtet. Die Anzahl und Lebenszeit der Phasensingularitäten blieb über die gesamten Experimente hinweg stabil.

Um die Auswirkungen der pH-Wert-Verschiebung in den basischen Bereich besser charakterisieren zu können müssen aber noch Experimente über die hier vorgestellten hinaus unternommen werden. Dabei sollten neben dem pH gleichzeitig auch die Konzentrationen von  $Na^+$  und  $K^+$ , sowie von  $Ca^{2+}$  gemessen werden. Durch die Etablierung des makroskopischen Versuchsaufbaus ist es möglich die Auswirkungen auf die Wellendynamik festzuhalten. Zukünftig kann der vorhandene Aufbau mit Mikroelektroden erweitert werden und so zu einer vollständigen Untersuchung der hier stattfindenden Prozesse beitragen.

## Literaturverzeichnis

1. Ashihara T., Trayanova N.A. „Cell and tissue responses to electric shocks“, *Europace*, Vol. 7, 2005: S155-S165
2. Bankuts K., Gillum N. et al. „Formation of cardiac fibers in Matrigel matrix“, *BioTechniques*, Vol. 44, 2008: 341-348
3. Barr R.C., Plonsey R. „Field Stimulation of 2-D Sheets of Excitable Tissue“, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, Vol. 51, Nr. 3, 2004: 539-540
4. Bers D.M. „Calcium Cycling and Signalling in Cardiac Myocytes“, *Annu. Rev. Physiol.*, Vol. 70, 2008: 23-49
5. Bers D.M. „Cardiac excitation-contraction coupling“, *Nature*, Vol. 415, 2002: 198-205
6. Bitthin P., Squires A. et al. „Phase Resolved Analysis of the Susceptibility of Pinned Spiral Waves to Far Field Pacing in a Two-Dimensional Model of Excitable Media“, *Phil. Trans. R. Soc. A*, Vol. 368, 2009: 2221-2236
7. Boukens B.J.D., Christoffels V.M. et al. „Developmental Basis for Electrophysiological Heterogeneity in the Ventricular and Outflow Tract Myocardium As a Substrat for Life-Threatening Ventricular Arrhythmias“, *Circ. Res.*, Vol. 104, 2009: 19-31
8. Boyden P.A. „Cellular Electrophysiologic Basis of Cardiac Arrhythmias“, *Am. J. Cardiol.*, Vol. 78, Nr. suppl. 4A, 1996: 4-11
9. Bub G., Shrier A. „Propagation through heterogeneous substrates in simple excitable media models“, *Chaos*, Vol. 12, Nr. 3, 2002: 747-753
10. Bub G., Shrier A., Glass L. „Global Organization of Dynamics in Oscillatory Heterogeneous Excitable Media“, *Phys. Rev. Lett.*, Vol. 94, 2005: 028105
11. Bub G., Shrier A., Glass L. „Spiral Wave Generation in Heterogeneous Excitable Media“, *Phys. Rev. Lett.*, Vol. 88, Nr. 5, 2002: 058101
12. Bursac N., Tung L. „Acceleration of functional reentry by rapid pacing in anisotropic cardiac monolayers: Formation of multi-wave functional reentries“, *Cardiovasc. Res.*, Vol. 69, 2006: 381-390
13. Camelliti P., Green C.R. et al. „Fibroblast Network in Rabbit Sinoatrial Node: Structural and Functional Identification of Homogeneous and Heterogeneous Cell Coupling“, *Circ. Res.*, Vol. 94, 2004: 828-835

14. Carmeliet E. „Cardiac Ionic Currents and Acute Ischemia: From Channels to Arrhythmias“, *Physiol. Rev.*, Vol. 79, 1999: 917-1017
15. Cheek E.R., Ideker R.E., Fast V.G. „Nonlinear Changes of Transmembrane Potential During Defibrillation Shocks: Role of Ca<sup>2+</sup> Current“, *Circ. Res.*, Vol. 87, 2000: 453-459
16. Cherry E.M., Fenton F.H. „Visualisation of spiral and scroll waves in simulated and experimental cardiac tissue“, *NJ. Phys.*, Vol. 10, 2008: 125016
17. Choi B.R., Liu T., Salama G. „Calcium Transients Modulate Action Potential Repolarizations in Ventricular Fibrillation“, *IEEE*, 2006: 2264-2267
18. Chorro F.J., Guerrero J. et al. „Effects of acute reduction of temperature on ventricular fibrillation activation patterns.“, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, Vol. 283, 2002: H2331-H2340
19. Christini D.J., Glass L. „Mapping and control of complex cardiac arrhythmias“, *Chaos*, Vol. 12, Nr. 3, 2002: 732-738
20. Clapham D.E. „Calcium Signalling“, *Cell*, Vol. 131, 2007: 1047-1058
21. Clayton R.H., Zhuchkova E.A., Panfilov A.V. „Phase singularities and filaments: Simplifying complexity in computational models of ventricular fibrillation“, *P. Biophys. Mol. Bio.*, Vol. 90, 2006: 378-398
22. Cleland J.G.F., John J. et al. „What is the optimal medical management of ischaemic heart failure?“, *Brit. Med. Bull.*, Vol. 59, 2001: 135-158
23. Cross M., Greenside H. „Pattern Formation and Dynamics in Nonequilibrium Systems“, Cambridge University Press, 2009 UK
24. Dauby P.C., Desai T. et al. „Standing waves in the FitzHugh-Nagumo model of cardiac electrical activity“, *Phys. Rev. E.*, Vol. 73, 2006: 021908
25. de Diego C., Pai R.K. et al. „Spatially discordant alternans in cardiomyocyte monolayers“, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, Vol. 294, 2008: H1417-H1425
26. Dormann D., Vasiev B., Weijer C. „Propagating waves control *Dictyostelium discoideum* morphogenesis“, *Biophys. Chem.*, Vol. 72, 1998: 21-35
27. Efimov I.R., Aguel F. et al. „Virtual electrode polarization in the far field: implications for external defibrillation“, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, Vol. 279, 2000: H1055-H1070
28. Efimov I.R., Nikolski V.P., Salama G. „Optical Imaging of the Heart“, *Circ. Res.*, Vol. 95, 2004: 21-33

29. Entcheva E., Bien H. „Macroscopic optical mapping of excitation in cardiac cell networks with ultra-high spatiotemporal resolution“, *Prog. Biophys. Mol. Bio.*, Vol. 92, 2006: 232-257
30. Entcheva E., Kostov Y. et al. „Fluorescence Imaging of Electrical Activity in Cardiac Cells Using An All-Solid-State System“, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Vol. 51, Nr. 2, 2004: 333-341
31. Entcheva E., Lu S.N. et al. „Contact Fluorescence Imaging of Reentry in Monolayers of Cultured Neonatal Rat Ventricular Myocytes“, *J Cardiovasc. Electrophysiol.*, Vol. 11, Nr. 6, 2000: 665-676
32. Fast V.G. „Simultaneous optical mapping of membrane potential and intracellular calcium“, *J. Electrocard.*, Vol. 38, 2005: 107-112
33. Fast V.G., Cheek E.R. et al. „Effects of Electrical Shocks on  $\text{Ca}_i^{2+}$  and  $V_m$  in Myocyte Cultures“, *Circ. Res.*, Vol. 94, 2004: 1589-1597
34. Fast V.G., Rohr S. et al. „Activation of Cardiac Tissue by Extracellular Electrical Shocks: Formation of `Secondary Sources` at Intercellular Clefts in Monolayers of Cultured Myocytes“, *Circ. Res.*, Vol. 82, 1998: 375-385
35. Fedorov V.V., Lozinsky I.T. et al. „Application of blebbistatin as an excitation-contraction uncoupler for electrophysiologic study of rat and rabbit hearts“, *Heart Rhythm*, Vol. 4, 2007: 619-626
36. Gilmour R.F. Jr., Chialvo D.R. „Electrical Restitution, Critical Mass, and the Riddle of Fibrillation“, *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*, Vol. 10, 1999: 1087-1089
37. Gilmour R.F. Jr., Zipes D.P. „Mechanisms of Disease: new mechanisms of antiarrhythmic actions“, *Nature Clin. Pract.*, Vol. 1, Nr. 1, 2004: 37-41
38. Greenberg H.M., Dwyer E.M. et al. „Interaction of ischaemia and encainide/flecainide treatment: a proposed mechanism for the increased mortality in CAST I“, *Br. Heart J.*, Vol 74, 1995: 631-635
39. Grueskin J., Tanen D.A. et al. „A Pilot Study of Mechanical Stimulation and Cardiac Dysrhythmias in a Porcine Model of Induced Hypothermia“, *Wilderness and Environmental Medicine*, Vol. 18, 2007: 133-137
40. Hallmann J. „Bichromophore Fluoreszenzfarbstoffe als Sonden für Membranpotentiale“, *Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*, 2004: 19-22
41. Heldmaier G., Neuweiler G. „Vergleichende Tierphysiologie – Band 2“, *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 2004: 277ff

42. Hess B. „Periodic patterns in biology“, *Naturwissenschaften*, Nr. 87, 2000: 199-211
43. Hillman E.M.C., Bernus O. et al. „Depth-resolved optical imaging of transmural electrical propagation in perfused heart“, *Optics Express*, Vol. 15, Nr. 26, 2007: 17827-17841
44. <http://de.wikipedia.org/wiki/Belousov-Zhabotinsky-Reaktion>
45. <http://de.wikipedia.org/wiki/Elektrode>
46. <http://www.mpg.de/bilderBerichteDokumente/dokumentation/jahrbuch/2006/stroemungsforschung/forschungsSchwerpunkt/index.html>
47. Hunter P.J., Pullan A.J., Smaill B.H. „Modeling Total Heart Function“, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, Vol. 5, 2003: 147-177
48. Hwang S-m. „Complex Wave Dynamics in In-Vitro Cardiac Systems“, Dissertation am Fachbereich Physik der Universität von Korea, 2004
49. Hwang S-m., Kim T.Y., Lee K.J. „Complex-periodic spiral waves in confluent cardiac cell cultures induced by localized inhomogeneities“, *PNAS*, Vol. 102, Nr. 29: 2005: 10363-10368
50. Hwang S-m., Yea K-h., Lee K.J. „Regular and Alternant Spiral Waves of Contractile Motion on Rat Ventricle Cell Cultures“, *Phys. Rev. Lett.*, Vol. 92, Nr. 19, 2004: 198103
51. Irvanian S., Nabutovsky Y. et al. „Functional reentry in cultured monolayers of neonatal rat cardiac cells“, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, Vol. 285, 2003: H449-H456
52. Jawad H., Ali N.N. et al. „Myocardial tissue engineering: a review“, *J Tissue Eng Regen Med*, Vol. 1, 2007: 327-342
53. Jennings T., Ringo J., Dowse H. „The Relationship of Heart Function to Temperature in *Drosophila melanogaster* and its Heritability“, *J. Exp. Zool.*, Vol. 311A, 2009: 1-8
54. Johnson P.L., Smith W. et al. „Errors Caused by Combination of Di-4 ANEPPS and Fluo3/4 for Simultaneous Measurements of Transmembrane Potentials and Intracellular Calcium“, *Ann. Biomed. Eng.*, Vol. 27, 1999: 563-571
55. Jones P., Lode N. „Ventricular fibrillation and defibrillation“, *Arch. Dis. Child.*, Vol. 92, 2007: 916-921
56. Kaimovitz B., Lanir Y., Kassab G. S. „Large-Scale 3-D Geometric Reconstruction of the Porcine Coronary Arterial Vasculature Based on Detailed Anatomical Data.“, *Ann. Biomed. Eng.*, Vol. 33, Nr. 11, 2005: 1517-1535

57. Katra R.P., Laurita K.R. „Cellular Mechanisms of Calcium-Mediated Triggered Activity in the Heart“, *Circ. Res.*, Vol. 96, 2005: 535-542
58. Kim T.Y., Woo S.-J. et al. „Cardiac beat-to-beat alternations driven by unusual spiral waves“, *PNAS*, Vol. 104, Nr. 28, 2007: 11639-11642
59. Kléber A.G. „Resting membrane potential, extracellular potassium activity, and intracellular sodium activity during acute global ischemia in isolated perfused guinea pig hearts“, *Circ. Res.*, Vol. 52, 1983: 442-450
60. Kléber A.G., Rudy Y. „Basic Mechanisms of Cardiac Impulse Propagation and Associated Arrhythmias“, *Physiol. Rev.*, Vol. 84, 2004: 431-488
61. Kondratyev A.A., Ponard J.G.C. et al. „Dynamic changes of cardiac conduction during rapid pacing“, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, Vol. 292, 2007: H1796-H1811
62. Krinsky V., Pumir A. „Models of defibrillation of cardiac tissue“, *Chaos*, Vol. 8, Nr. 1, 1998: 188-203
63. Lab M.J. „Fibrillation, chaos and clinical control“, *Nature Med.*, Vol. 3, Nr. 4, 1997: 385-386
64. Lan D.Z., Pollard A.E. et al. „Optical mapping of Vm and Cai<sup>2+</sup> in a model of arrhythmias induced by local catecholamine application in patterned cell cultures“, *Pflugers Arch.-Eur. J. Physiol.*, Nr. 453, 2007: 871-877
65. Lehnart S.E., Ackermann M.J. et al. „Inherited Arrhythmias: A National Heart, Lung, and Blood Institute and Office of Rare Diseases Workshop Consensus Report About the Diagnosis, Phenotyping, Molecular Mechanisms, and Therapeutic Approaches for Primary Cardiomyopathies of Gene Mutations Affecting Ion Channel Function“, *Circulation*, Vol. 116, 2007: 2325-2345
66. Lehnart S.E., Mongillo M. et al. „Leaky Ca<sup>2+</sup> release channel/ryanodine receptor 2 causes seizures and sudden cardiac death in mice“, *J. Clin. Inv.*, Vol. 118, Nr. 6, 2008: 2230-2245
67. Lehnart S.E., Terrenoire C. et al. „Stabilization of cardiac ryanodine receptor prevents intracellular calcium leak and arrhythmias“, *PNAS*, Vol. 103, Nr. 20, 2006: 7906-7910
68. Liu Y-B, Peter A. et al. „Spatiotemporal Correlation Between Phase Singularities and Wavebreaks During Ventricular Fibrillation“, *J Card. Electrophysiol.*, Vol. 14, Nr. 10, 2003: 1103-1109
69. Loew L.M. „Potentiometric dyes: Imaging electrical activity of cell membranes“, *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 68, Nr. 7, 1996: 1405-1409

70. Luther S., Fenton F.H. et al. „Taming a Heart gone Wild“ [in progress]
71. Maharaj T., Rodriguez B. et al. „Transmural electrophysiological heterogeneities in action potential duration increase the upper limit of vulnerability“, IEEE, 2006: 4043-4046
72. Mewis C., Riessen R., Spyridopoulos I. (Hrsg.) „Kardiologie compact –Alles für Station und Facharztprüfung“, 2. unveränderte Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2006
73. Moe G.K. „On The Multiple Wavelet Hypothesis Of Atrial Fibrillation“, Arch. int. Pharmacodyn., Vol. CXI, Nr. 1-2, 1962: 183-188
74. Moreno J., Warren M., Jalifé J. „Ionic Currents and Ventricular Fibrillation Dynamics“, Rev. Esp. Cardiol., Vol. 57, Nr. 1, 2004: 69-79
75. Müller S.C., Mair T., Steinbock O. „Traveling waves in yeast extract and in cultures of *Dictyostelium discoideum*“, Biophys. Chem., Vol. 72, 1998: 37-47
76. Müller W. „Tier- und Humanphysiologie: ein einführendes Lehrbuch“, Springer Heidelberg, 1998: 179ff, 306ff
77. Murphy D.B., Oldfield R. et al. „Phase Contrast Microscopy“, Nikon MicroscopyU, [www.nikon.com](http://www.nikon.com)
78. Nass R.D., Aiba T. et al. „Mechanisms of Disease: ion channel remodeling in the failing ventricle“, Nature Clin. Pract., Vol. 5, Nr. 4, 2008: 196-207
79. Owens L.M., Fralix T.A. et al. „Correlation of Ischemia-Induced Extracellular and Intracellular Ion Changes to Cell-to-Cell Electrical Uncoupling in Isolated Blood-Perfused Rabbit Hearts“, Circ., Vol. 94, 1996: 10-13
80. Pálsson E., Cox E.C. „Origin and evolution of circular waves and spirals in *Dictyostelium discoideum* territories“, Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 93, 1996: 1151-1155
81. Panfilov A., Pertsov A. „Ventricular fibrillation: evolution of the multiple-wavelet hypothesis“, Phil. Trans. R. Soc. Lond. A, 359, 2001: 1315-1325
82. Poelzing S., Rosenbaum D. „Nature, Significance, and Mechanism of Electrical Heterogeneities in Ventricle“, The Anatomical Record Part A, Vol. 280A, 2004: 1010-1017
83. Pumir A., Krinsky V. „Unpinning of a Rotating Wave in Cardiac Muscle by an Electric Field“, J. Theoret. Biol., Vol. 199, 1999: 311-319
84. Pumir A., Nikolsky V. et al. „Wave emission from heterogeneities to control chaos in the heart“, Phys. Rev. Lett., Vol. 99, Nr. 20, 2007: 208101

85. Qin H., Huang J. et al. „Mechanisms for Maintenance of Ventricular Fibrillation: The Nonuniform Dispersion of Refractoriness, Restitution Properties, or Anatomic Heterogeneities?“, J. Cardiovasc. Electrophysiol., Vol. 16, 2005: 888-897
86. Raman V., Pollard A.E., Fast V.G. „Shock-induced changes of Ca<sup>2+</sup> and V<sub>m</sub> in myocyte cultures and computer model: Dependence on the timing of shock application“, Cardiovasc. Res., Vol. 73, 2007: 101-110
87. Roden D.M., Balsler J.R. et al. „Cardiac Ion Channels“, Annu. Rev. Physiol., Vol. 64, 2002: 431-475
88. Roden D.M., George A.L. Jr. „The Cardiac Ion Channels: Relevance to Management of Arrhythmias“, Annu. Rev. Med., Vol. 47, 1996: 135-148
89. Roth B.J., Krassowska W. „The induction of reentry in cardiac tissue. The missing link: How electric fields alter transmembrane potential“, Chaos, Vol. 8, Nr. 1, 1998: 204-220
90. Salama G. Kanai A.J. et al. „Hypoxia and Hypothermia Enhance Spatial Heterogeneities of Repolarization in Guinea Pig Hearts: Analysis of Spatial Autocorrelation of Optical Recorded Action Potential Durations“, J. Cardiovasc. Electrophysiol., Vol. 9, Nr. 2, 1998: 164-183
91. Schleif O. „Ein Beitrag zur tiergerechten Haltung der Ratte anhand der Literatur“, Inaugural-Dissertation (Dr. med. vet.), Tierärztliche Hochschule Hannover, 2001: 99
92. Schubert F. „Fachkunde für Arzthelferinnen“, 1. Auflage 7. Druck, Cornelsen Verlag Berlin, 2005: 118
93. Scoote M., Williams A.J. „Myocardial calcium signalling and arrhythmia pathogenesis“, BBRC, Vol. 322, 2004: 1286-1309
94. Sekar R.B., Kizma E. et al. „Ik<sub>1</sub> Heterogeneity Affects Genesis and Stability of Spiral Waves in Cardiac Myocyte Monolayers“, Circ. Res., Vol. 104, 2009: 355-364
95. Shah U., Bien H., Entcheva E. „Cardiac Arrhythmogenesis and Temperature“, IEEE, ThB07.1, 2006: 841-844
96. Shiferaw Y., Sato D., Karma A. „Coupled dynamics of voltage and calcium in paced cardiac cells“, Phys. Rev. E., Vol. 71, 2005: 021903
97. Siegert F., Weijer C. „Spiral and concentric waves organize multicellular *Dictyostelium* mounds“, Curr. Biol., Vol. 5, 1995: 937-943
98. Spach M.S., Heidlage J.F. et al. „Electrophysiological Effects of Remodeling Cardiac Gap Junctions and Cell Size – Experimental and Model Studies of Normal Cardiac Growth“, Circ. Res., Vol. 86, Nr. 3, 2000: 302-311



99. Srinivasan R., Roth B.J. „A mathematical model for electrical stimulation of a monolayer of cardiac cells“, *BioMedical Engineering OnLine*, Vol. 3, 2004: 1-5
100. Stamm C., Steinhoff G. „Kardiales Tissue Engineering“, *Herz*, Vol. 27, 2002: 445-452
101. Starobin J.M., Ziberter Y.I. et al. „Wavelet Formation in Excitable Cardiac Tissue: The Role of Wavefront-Obstacle Interactions in Initiating High-Frequency Fibrillatory-Like Arrhythmias“, *Biophysical Journal*, Vol. 70, 1996: 581-594
102. Statistisches Bundesamt Deutschland – Bericht Todesursachen 2007, [www.destatis.de](http://www.destatis.de)
103. Steinberg B.E., Glass L. et al. „The role of heterogeneities and intercellular coupling in wave propagation in cardiac tissue“, *Phil. Trans. R. Soc.*, Vol. 364, 2006: 1299-1311
104. Takagi S., Pumir A. et al. „A physical approach to remove anatomical reentries: a bidomain study“, *J. Theoret. Bio.*, Vol. 230, 2004: 489-497
105. Takagi S., Pumir A. et al. „Unpinning and Removal of a Rotating Wave in Cardiac Muscle“, *Phys. Rev. Lett.*, Vol. 93, Nr. 5, 2004: 058101
106. Tao T., O'Neill S.C. et al. „Alternans of cardiac calcium cycling in a cluster of ryanodine receptors: a simulation study“, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, Vol. 295, 2008: H598-H609
107. Terlau H., Stühmer W. „Structure and Function of Voltage-Gated Ion Channels“, *Naturwissenschaften*, Vol. 85, 1998: 437-444
108. Tormos A., Chorro F.J. et al. „Analyzing the electrophysiological effects of local epicardial temperature in experimental studies with isolated hearts“, *Physiol. Meas.*, Vol. 29, 2008: 711-728
109. Trayanova N., Gray R.A. et al. „Virtual Electrode-Induced Positive and Negative Graded Responses: New Insights into Fibrillation Induction and Defibrillation“, *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*, Vol. 14, 2003: 756-763
110. Tung L., Borderies J-R. „Analysis of electric field stimulation of single cardiac muscle cells“, *Biophys. J.*, Vol. 63, 1992: 371-386
111. Tung L., Zhang Y. „Optical imaging of arrhythmias in tissue culture“, *J. Electrocardiology*, Vol. 39, 2006: S2-S6
112. Ulrych T.J., Bishop T.N. „Maximum Entropy Spectral Analysis and Autoregressive Decomposition“, *Rev. Geophys. Space Phys.*, Vol. 13, Nr. 1, 1975: 183-200
113. van der Deijl G.B.M., Panfilov A.V. „Formation of fast spirals on heterogeneities of an excitable medium“, *Phys. Rev. E*, Vol. 78, 2008: 012901

114. Vest J.A., Wehrens X.H.T. et al. „Defective Cardiac Ryanodine Receptor Regulation During Atrial Fibrillation“, *Circulation*, Vol. 111, 2005: 2025-2032
115. Weijer C. „Morphogenetic cell movement in *Dictyostelium*“, *Cell Dev. Biol.*, Vol. 100, 1999: 609-619
116. Weiss J.N., Karma A. et al. „From Pulsus to Pulseless: The Saga of Cardiac Alternans“, *Circ. Res.*, Vol. 98, 2006: 1244-1253
117. Weiss J.N., Nademanee K. et al. „Ventricular Arrhythmias in Ischemic Heart Disease“, *Ann. Int. Med.*, Vol. 114, Nr. 9, 1991: 784-797
118. White S.M., Constantin P.E., Claycomb W.C. „Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function“, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, Vol. 286, 2004: H823-H829
119. Wieser L., Nowak C.N. et al. „Mother rotor anchoring in branching tissue with heterogeneous membrane properties“, *Biomed. Tech.*, Vol. 53, 2008: 25-35
120. Wilson L.D., Rosenbaum D.S. „Mechanisms of arrhythmogenic cardiac alternans“, *Europace*, Vol. 9, 2007: v177-v182
121. Winfree A.T. „The Geometry of Biological Time“ 2nd ed., Springer Science+Business Media, 2006: 368ff., 411ff.
122. Winfree A.T. „When Time Breaks Down – The Three-Dimensional Dynamics of Electrochemical Waves and Cardiac Arrhythmias“, Princeton University Press, 1987: 154ff.
123. Wittkowski F.X., Leon L.J. et al. „Spatiotemporal evolution of ventricular fibrillation“, *Nature*, Vol. 392, 1998: 78-82
124. Woods M.C., Sidorov V.Y. et al. „Virtual electrode effects around artificial heterogeneity during field stimulation of cardiac tissue“, *Heart Rhythm*, Vol. 3, Nr. 6, 2006: 751-752
125. Zernike F. „Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects“, *Physica*, Vol. 9, Nr. 7, 1942: 686-698
126. Zimmermann W.H., Schneiderbanger K. et al. „Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct.“, *Circ Res*, Vol. 90, 2002: 223-230
127. Zipes D.P., Wellens H.J.J. „Sudden Cardiac Death“, *Circ.*, Vol. 98, 1998: 2334-2351
128. Zlochiver S., Munoz V. et al. „Electronic Myofibroblast-to-Myocyte Coupling Increases Propensity to Reentrant Arrhythmias in Two-Dimensional Cardiac Monolayers“, *Biophys. J.*, Vol. 95, 2008: 4469-4480

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau des Herzens.....	3
Abb. 2: Erregungsausbreitung am menschlichen Herzen .....	4
Abb. 3: Zeitlicher Verlauf der Aktionspotentiale und zellulären Reaktionen.....	5
Abb. 4: Beispiel für verschiedene Herzrhythmen.....	9
Abb. 5: Wellendarstellung unterschiedlicher Dynamiken .....	10
Abb. 6: Simulation einer Heterogenität im elektrischen Feld. ....	14
Abb. 7: Beispiele für das Gefäßsystem des Herzens. ....	15
Abb. 8: Dark-Field-Aufnahmen von Wellendynamiken in chemischen und biologischen Systemen.....	19
Abb. 9: Beispiel für Lithographie-Maske .....	29
Abb. 10: Schematische Darstellung des Photolithographie-Prozesses. ....	31
Abb. 11: Licht- und Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von photolithographisch erzeugten Heterogenitäten.....	32
Abb. 12: Kalibrierungskurve des elektrischen Feldes .....	40
Abb. 13: Beispiel für die Darstellung von Phasen-Singularitäten.....	42
Abb. 14: Die Inkubator-kammern für den mikroskopischen und makroskopischen Aufbau...	44
Abb. 15: Blockdiagramme der optischen Messaufbauten.....	45
Abb. 16: Überblick über die Komponenten des makroskopischen Aufbaus .....	46
Abb. 17: Zeitreihenbeispiele für eine dreifache Messung.....	47
Abb. 18: Aufbauten für die optischen Experimente. ....	49
Abb. 19: Mikroskopische Aufnahme eines Objektträgers und Detailausschnitt.....	51
Abb. 20: Überlagerung einer mikroskopischen Detailaufnahme der Zellkultur im Phasenkontrast mit Aktivierungskarte .....	52
Abb. 21: Graphisches Beispiel der Aktivierungszeiten .....	53
Abb. 22: Beeinflussung der spontanen Wellendynamik durch Feldstimulation .....	55
Abb. 23: Vergleich der experimentellen Daten mit Erwartungswerten.....	57
Abb. 24: Emission einer Erregungswelle an einer Heterogenität.....	58
Abb. 25: Zeitlicher Verlauf einer induzierten Erregungswelle .....	59
Abb. 26: Veranschaulichung der Datenwerte aller gemessenen Zellkulturen .....	60
Abb. 27: Graphische Darstellung der experimentellen Datenpunkte zusammen mit Literaturwerten .....	61
Abb. 28: Beispiele für Stimulationen mit unterschiedlichen Feldstärken.....	62
Abb. 29: Aktivierungskarten und dazugehörigen Phasenkontrastaufnahmen.....	64

Abb. 30: Differenzbilder zu Pulsexperimenten. ....	65
Abb. 31: Differenzbilder eines Pulsversuches.....	67
Abb. 32: Immunfluoreszenzbilder von Rattenherzzellkulturen .....	69
Abb. 33: Immunfluoreszenzbilder von neonatalen Rattenherzen.....	70
Abb. 34: Graphische Darstellung der Durchschnittswerte aller ermittelter Parameter .....	72
Abb. 35: Beispiele für Aktivierungskarten.....	73
Abb. 36: Beispiele für Zeitreihen .....	74
Abb. 37: Graphische Darstellung aller gemessener Parameter .....	76
Abb. 38: Durchschnittswerte und Standardabweichungen für die Versuche mit Sauerstoffentzug .....	78
Abb. 39: Darstellung der einzelnen Beobachtungsgrößen für die Sauerstoffentzugversuche.	79
Abb. 40: Beispiele für Zeitreihen .....	80
Abb. 41: Graphische Darstellung der statistischen Analyse aus den Heterogenitäten- Experimenten.....	i

## **Tabellenverzeichnis**

Tab. 1: Zugabeschema für Kulturmedium Tag 0-2. ....	28
Tab. 2: Zugabeschema für Kulturmedium ab Tag 3. ....	28

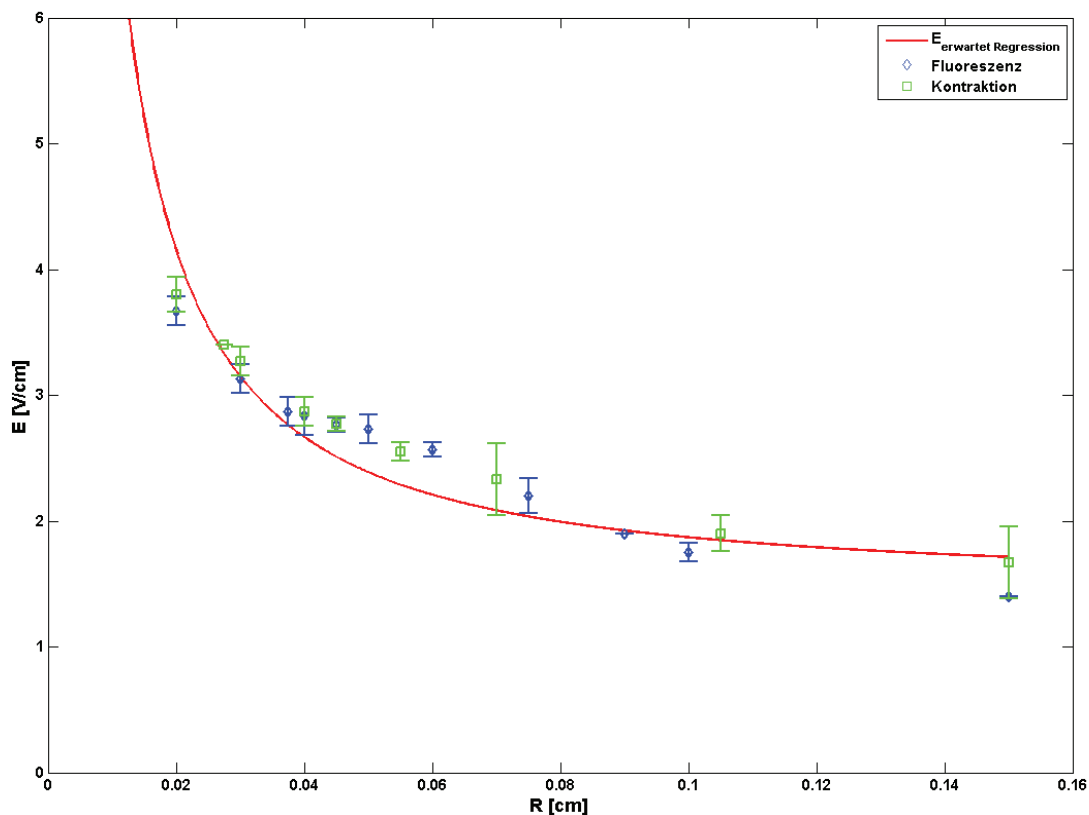
## Anhang

### Statistische Analyse der Messwerte aus den Heterogenitäten-Experimenten

Zur statistischen Analyse der Messwerte aus wurden die Daten einer Regressionsberechnung unterzogen. Dabei wurde nach dem Levenberg-Marquardt Algorithmus die am ähnlichsten verlaufende Theoriekurve berechnet. Es ergaben sich dabei neue Werte für die Raumkonstante  $\lambda$  und das aufzubringende Membranpotential. Bei  $\lambda = 0,0469$  cm und  $V_{\text{threshold}} = 68,18$  mV konnte die entsprechende Theoriekurve ermittelt werden.

Als statistische Parameter wurden zudem berechnet:

- Standardabweichung:  $\text{STABW}_{\lambda} = 0,0025154$  cm  
 $\text{STABW}_{V_{\text{thres.}}} = 0,2077$  mV
- Konfidenzintervall (68,3 %):  $\text{KV}_{\lambda} = 0,04355 \dots 0,049563$  cm  
 $\text{KV}_{V_{\text{thres.}}} = 66,068 \dots 70,365$  mV



**Abb. 41:** Graphische Darstellung der statistischen Analyse aus den Heterogenitäten-Experimenten. Die durchgezogene rote Linie bezeichnet hier die nach neuen Parametern berechnete Theoriekurve für 2D, grüne und blaue Symbole repräsentieren die Messwerte.

## **Filmdateien**

Dieser Dissertation sind für die Abb. 22, Abb. 24, Abb. 25, Abb. 30 und Abb. 31 Filmdateien auf DVD beigefügt. Für die Aktivierungskarten aus Abb. 35 wurden die zugrunde liegenden Phasenkontrast-Aufnahmen als Filmdatei hinterlegt (beschriftet nach Temperatur). Jede Datei wurde einmal ins unkomprimierte AVI-Format (DVD 1) und einmal ins MOV-Format (DVD 2) konvertiert. AVI-Dateien können mit dem Windows Media Player abgespielt werden. Für die MOV-Dateien wird ein anderer Player, z. B. Quicktime Player<sup>®</sup> von Apple<sup>®</sup>, benötigt.

Die Anzeigerate der Filme beträgt jeweils 24 Bilder/s, wobei bei jeder Aufnahme eine Zeitangabe angezeigt wird.

Jede DVD enthält zudem eine elektronische Version der Dissertation.

Der Quicktime Player<sup>®</sup> kann kostenlos bezogen werden unter:

<http://www.apple.com/de/quicktime/player/>.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock,

Claudia Richter

## **Danksagung**

Die vorliegende Dissertation entstand am Max-Planck-Institut für Dynamik und Selbstorganisation in Göttingen. Hiermit möchte ich allen herzlich für ihre Unterstützung danken.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. S. Luther danke ich für das Überlassen des Promotionsthemas und für seine ständige Unterstützung und Betreuung am MPI. Zudem danke ich ihm für das in mich gesetzte Vertrauen während der gesamten Zeit.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. D. G. Weiß danke ich für die Betreuung der Promotion von Seiten des Fachbereichs Biowissenschaften der Universität Rostock und für sein Interesse an der Arbeit.

Ich bedanke mich ferner bei A. Squires, MSc, Dipl.-Phys. P. Bitthin, Dipl.-Phys. D. Hornung und cand. phys. A. Schlemmer für ihre Unterstützung mit der Bild- und Datenanalyse.

Bei Frau B. Kasemann, Frau K. Schneider und Frau M. Kunze, sowie bei S. Khan und M. Chebbok möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung bezüglich der Laborroutine bedanken.

Ohne die Hilfe aus den Werkstätten des Instituts wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen. Dafür möchte ich mich insbesondere bei Herrn U. Schminke, Herrn D. Wolff und Herrn C. Jacob bedanken.

Ferner danke ich Herrn Dr. rer. nat. A. Ahlborn für die Hinweise und praktischen Lehrstunden zu Beginn dieser Promotion.

Bei Herrn Dipl.-Biol. C. Westendorf möchte ich mich für die Stunden am Laser-Scanning-Mikroskop bedanken.



Außerdem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts, dass sie mich so freundlich aufgenommen haben und für ihr reges Interesse an dieser Arbeit

Insbesondere möchte ich der Forschungsgruppe Biomedizinische Physik danken, dass sie mich als Biologin in ihre Physiker-Gemeinde aufgenommen haben. Die Diskussionen und Fragen haben mir oftmals einen Anreiz zum Überdenken von Ansätzen gegeben.

An dieser Stelle gilt mein ganz besonderer Dank allerdings meiner Mutter, Frau Dr. rer. nat. D.-U. Richter. Durch ihr schier grenzenloses Vertrauen und ihren festen Glauben an mich trägt sie den größten Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Vielen Dank.