
Einfluss ionisierender Strahlung auf die elektrophysiologischen Eigenschaften kardialer Zellen

Dissertation
Johannes L. Frieß
Biologie



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Einfluss ionisierender Strahlung auf die elektrophysiologischen Eigenschaften kardialer Zellen

Vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt
Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium
genehmigte Dissertation von

Dipl. Biol. Johannes L. Frieß
geboren am 24. März 1984
in Groß-Umstadt

1. Referent: Prof. Dr. Paul G. Layer
2. Referent: Prof. Dr. Markus Löbrich
3. Referent: Prof. Dr.-Ing. Christiane Thielemann

Tag der Einreichung: 06.10.2015
Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2015

Darmstadt 2016
D17

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Johannes L. Frieß, dass ich die vorliegende Dissertation ohne Hilfe Dritter und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis angefertigt habe. Alle Stellen, Daten, Techniken und Materialien, die Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht worden. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

In der abgegebenen Thesis stimmen die schriftliche und elektronische Fassung überein.

Darmstadt, den 30. Dezember 2015

(Johannes L. Frieß)

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen des Projektes ESA-IBER-10 während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter der Hochschule Aschaffenburg. Das Projekt war eine Kooperation des *BioMEMS-Labs* der Hochschule Aschaffenburg, der Arbeitsgruppe Entwicklungsbiologie und Neurogenetik der Technischen Universität Darmstadt und der Biophysik-Gruppe der Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI) in Darmstadt. Finanziert wurde das Projekt von der Deutschen Luft- und Raumfahrtbehörde (DLR) und der *European Space Agency* (ESA). Teile dieser Arbeit wurden in Auszügen bereits in der Fachpresse publiziert und auf nationalen und internationalen Konferenzen in Form von Vorträgen und Postern vorgestellt, andere Teile der Arbeit befinden sich derzeit im Publikationsprozess.

Meinen tiefsten Dank möchte ich Prof. Dr. Paul Layer aussprechen, der nicht nur mein Diplomvater war, sondern mich auch an Prof. Dr.-Ing. Christiane Thielemann vermittelt hat und mir somit diese Doktorarbeit ermöglicht hat. Außerdem möchte ich ihm natürlich für sein Interesse am Projekt, für seine Zusage als Erstkorrektor, die ich nicht als Selbstverständlichkeit betrachte, und für seine liebenswerte, gelassene Art, Fachkompetenz und Geduld danken.

Großer Dank gebührt auch Prof. Dr.-Ing. Thielemann, die mir, einem damals völlig Fremden, dieses Projekt anvertraute und mir dabei stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Ich danke ihr für das anhaltende Interesse, das Engagement, die Motivation und auch Kritik, die diese Arbeit erst möglich gemacht und zu einem erfolgreichen Ende gebracht haben.

Ich möchte Prof. Dr. Marcus Löbrich, Prof. Dr. Gerhard Thiel und Prof. Dr. Alexander Löwer für die unmittelbare Zusage und bedingungslose Übernahme der Koreferate danken.

Dr. Sylvia Ritter danke ich für die unzähligen Male die sie mich bei Strahlzeiten an der GSI betreut und *Paper-Drafts*, *Abstracts* und dergleichen korrigiert hat.

Unablässige Dankbarkeit bringe ich Dr. Anja Heselich entgegen, die ich nicht nur als Kollegin und für ihren unermüdlichen Einsatz für unser Projekt schätze, sondern auch für ihre Fachkompetenz, ihr persönliches Engagement für die Wissenschaft und ihre Kollegen und für ihre Freundschaft.

Ich danke den Mitgliedern der Arbeitsgruppen *BioMEMS-Lab*, Entwicklungsbiologie und Neurogenetik und Biophysik. Hervorheben möchte ich dabei die Kollegen Florian Emmerich, Christoph Nick, Robert Bestel, Margot Mayer, Johannes Forster und Tim Köhler, die mir stets mit konstruktiver Kritik und anregenden Diskussionen hilfreich zur Seite standen. Außerdem danke ich Anke König, Nicole Kaiser, Angelina Haber Naja Benz und Dr. Alexander Helm für ihre Hilfe am Projekt und ihrer Gesellschaft während meiner Arbeit an ihren Instituten.

Ich danke meiner Frau Friederike und meiner Familie für die Unterstützung während meines Studiums und der Doktorarbeit. Besonders Friederike danke ich für die Ermutigung, Geduld, Verständnis und Liebe, die sie mir während der gesamten Zeit entgegengebracht hat.

Inhaltsverzeichnis

Ehrenwörtliche Erklärung	ii
Vorwort	iii
Inhaltsverzeichnis	iv
1.....Motivation	1
2.....Einleitung	3
2.1. Entwicklungsbiologie des Herzes	3
2.2. Elektrophysiologie des Herzes	7
2.2.1. Aufbau der Kardiomyozyten	7
2.2.2. Das kardiale Aktionspotential	9
2.2.3. Reizweiterleitung des Herzens	11
2.2.4. Kontraktion der Herzmuskelzellen	14
2.3. Stand der Technik	16
2.4. Betrachtete elektrophysiologische Parameter extrazellulärer Ableitungen	18
2.4.1. Anzahl aktiver Elektroden	18
2.4.2. Schlagrate	19
2.4.3. Signalausbreitungsgeschwindigkeit	20
2.4.4. Feldaktionspotentialdauer	21
2.4.5. Signalamplituden	22
2.5. Ionisierende Strahlung	22
2.5.1. Röntgenstrahlung	24
2.5.2. Schwerionenstrahlung	25
2.5.3. Kosmische Strahlung	28
2.6. Zielsetzung	29
3.....Material & Methoden	31
3.1. Materialliste	31
3.2. Beschichtung mit Fibronectin	34
3.3. Reinigung der MEA-Chips	34
3.4. Kultivierung primärer, embryonaler Kardiomyozyten aus dem Huhn (<i>Gallus gallus</i>)	34
3.5. Kultivierung der aus hiPSC differenzierten Kardiomyozyten	35
3.6. Ableitung elektrophysiologischer Signale mittels MEA-System	36
3.7. Auswertung elektrophysiologischer Messdaten mittels <i>Dr.Cell</i>	38
3.8. Röntgenbestrahlung	40
3.9. Bestrahlung mit Schwerionen	40
3.10. Statistik	41
4.....Ergebnisse	43
4.1. Ergebnisse der Charakterisierungsversuche	43
4.1.1. Zeitraum elektrophysiologischer Aktivität	43
4.1.2. Aktive Elektroden	44
4.1.3. Schlagrate	45
4.1.4. Signalausbreitungsgeschwindigkeit	46

4.1.5.	Feldaktionspotentialdauer	47
4.1.6.	Signal-Amplituden	49
4.2.	Ergebnisse der Röntgenversuche	50
4.2.1.	Röntgenbestrahlung primärer kardialer Kulturen	50
4.2.2.	Röntgenbestrahlung humaner iPSC-Kardiomyozyten	53
4.3.	Ergebnisse der Schwerionenversuche	56
4.3.1.	Bestrahlung primärer kardialer Kulturen mit Kohlenstoff-Ionen	56
4.3.2.	Bestrahlung humaner iPSC-Kardiomyozyten mit Kohlenstoff-Ionen	58
4.3.3.	Bestrahlung primärer kardialer Kulturen mit Titan-Ionen	61
4.3.4.	Bestrahlung humaner iPSC-Kardiomyozytenkulturen mit Eisen-Ionen	63
4.4.	Ergebnisse der Behandlung mit Pharmazeutika und Röntgenbestrahlung	66
4.4.1.	Röntgenbestrahlung der Pharmazeutika	67
4.4.2.	Röntgenbestrahlung pharmakologisch behandelte Kulturen	68
5.....	Diskussion	72
5.1.	Charakterisierung der Zellsysteme	72
5.2.	Röntgenversuche	74
5.3.	Schwerionenversuche	78
5.4.	Behandlung mit Pharmazeutika und Röntgenbestrahlung	84
6.....	Zusammenfassung	88
7.....	Appendix	1
	Einheitenverzeichnis	1
	Abkürzungsverzeichnis der Größenordnungen	1
	Abkürzungsverzeichnis	2
	Literaturverzeichnis	3
	Curriculum vitae	14
	Publikationen	15
	Poster und Konferenzbeiträge	16

1. Motivation

Die zentrale Fragestellung der Strahlenbiologie behandelt die Wirkung von ionisierender Strahlung auf biologische Systeme. Zwar sind die bei Exposition mit ionisierender Strahlung entstehenden Gesundheitsrisiken bekannt, dennoch sind die Strahlungseffekte auf das Herz immer noch nicht sehr gut verstanden. Dabei ist die Exposition mit hohen Dosen ionisierender Strahlung ein anerkannter Risikofaktor in Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen.

Mehrere Studien haben ein erhöhtes Risiko für Herzkrankheiten und Infarktpatienten durch hohe Strahlenexposition gezeigt [1, 2]. Auch epidemiologische Studien deuten auf ein Risiko für nachteilige kardiovaskuläre Effekte hin, die sich für gewöhnlich mit hoher Latenzzeit entwickeln [3]. Die Effekte der Schwerionenstrahlung auf das kardiovaskuläre System sind besonders in der Strahlentherapie [4, 5], aber auch in der bemannten Raumfahrt, beispielsweise der Mars Mission [6, 7], von Interesse. Die kosmische Strahlung setzt sich aus mehreren Schwerionen-Spezies, Photonen- und Protonen zusammen. Die Effekte von Schwerionenstrahlung auf das kardiovaskuläre System sind nicht vollständig verstanden und resultieren vermutlich aus einer Kombination aus Strahlung und anderen Stressoren. Beispielsweise wurde gezeigt, dass Mikrogravitation Veränderungen im kardiovaskulären System hervorruft [8]. Es wurden bereits verschiedene kardiale Symptome wie ventrikuläre Arrhythmien, verfrühte atriale und ventrikuläre Kontraktion und atrioventrikulärer Block bei Astronauten beobachtet [8-14]. All diese Befunde erhöhen die Bedenken, dass das Auftreten von Störungen im kardialen Rhythmus während langer interplanetarer Missionen ein Problem darstellen könnte. Zusammenfassend, ist das Herz eines Astronauten im Weltraum durch eine Kombination von Stressoren belastet und dadurch eventuell anfälliger gegenüber Strahlenschäden.

So konnte *in vivo* gezeigt werden, dass eine Ganzkörperbestrahlung mit 0,15 Gy Eisen-Ionen eine verringerte Herzfunktion bei Mäusen für bis zu 10 Monate nach Bestrahlung nach sich zog und eine langanhaltende Antwort sowohl auf oxidativen Schaden als auch auf Entzündungen induzierte [15]. Diese Ergebnisse werden von Tungjai *et al.* gestützt [16], die nach Bestrahlung mit Silizium-Ionen erhöhte Aktivität von apoptotischen und inflammatorischen Markerproteinen in Mäuseherz-Lysaten feststellten. Eine Studie von Lehmann *et al.* demonstrierte, dass gezielte Bestrahlung des atrioventrikulären Knotens mit einer Gesamtdosis von 130 Gy Kohlenstoff-Ionen, fraktioniert in Einzeldosen von 10 Gy, keine Arrhythmien in perfundierten Langendorff-Herzen aus dem Schwein hervorrief. [17].

Für Röntgenstrahlung konnte *in vivo* gezeigt werden, dass eine Dosis von 10 Gy das Risiko für Koronarsklerose und Herzdegeneration bei Ratten erhöht [18]. Proteomische Studien an neonatalen Mäuseherzen, die mit bis zu 1 Gy Gammastrahlen behandelt wurden, deuten auf eine langfristige Deregulation von Proteinen hin, die in die inflammatorische Antwort, die metabolischen Prozesse und die Struktur des Zytoskeletts involviert sind [19]. Seemann *et al.* publizierten, dass Röntgenbestrahlung

mit 2 und 8 Gy mäßige Veränderungen in der murinen, kardialen Funktion wie auch progressive strukturelle und mikrovaskuläre Schäden hervorruft [20]. In einer anschließenden Studie fanden sie mehrere Gene, die für Aufrechterhaltung und Schutz der kardialen Funktionen verantwortlich sind und deren Expressionslevel nach Exposition mit 16 Gy Röntgenstrahlung erhöht waren [21].

Unlängst wurden *in vitro* Hinweise erbracht, die zeigen, dass ionisierende Strahlung durch erhöhte Niveaus an reaktiven Sauerstoffspezies die Kalziumstrom-Regulation beeinflusst [22]. Sag *et al.* schlossen, dass diese kardiale Dysfunktion durch erhöhten oxidativen Stress und konstitutiv aktivierte Kalzium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, CAMKII*) verursacht wird.

Dysfunktionen der Zell-Zell-Kommunikation können in Arrhythmien, und im schlimmsten Fall von *Torsade de pointes* in plötzlichem Herztod oder kongestiver Herzinsuffizienz tödlich enden. Angesichts dieser Befunde kann angenommen werden, dass ionisierende Strahlung Veränderungen in der elektrophysiologischen Funktionalität kardialer Myozyten induziert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind besonders für die bemannte Raumfahrt von Interesse. Daher wurde das Projekt von der DLR und der ESA finanziert. Weiterhin könnten die hier erlangten Daten auf Strahlentherapiepatienten übertragen werden. Ein dahingehendes Interesse ist vorhanden, da mehrere klinische Studien ein erhöhtes Risiko auf kardiovaskuläre Erkrankungen nach Strahlentherapie von beispielsweise Brustkrebs belegen [23]. Weiterhin konnte ein nach Strahlenbehandlung erworbenes Long-QT-Syndrom in einer Patientenstudie bereits beobachtet werden [24]. Epidemiologische Studien lassen keinen Zweifel daran, dass ionisierende Strahlung Herz-Kreislauf-Erkrankungen nach sich ziehen kann [25], die genauen Wirkungen und Mechanismen werden bisher jedoch größtenteils vermutet.

2. Einleitung

Zum besseren Verständnis der Arbeit werden zunächst die wissenschaftlichen Grundlagen kurz erläutert. Das Kapitel beginnt mit der embryonalen Entwicklung des Herzes und geht dann zur kardialen Elektrophysiologie über. Der folgende Abschnitt beginnt mit dem Aufbau der Herzmuskelzellen und den charakteristischen Aktionspotentialen und erklärt dann die Reizweiterleitung des Herzes bis hin zur elektromechanischen Kopplung zwischen Aktionspotential (AP) und Muskelkontraktion. Als nächstes wird der Stand der Technik und der aktuelle Forschungsstand bezüglich der Mikroelektroden-Array (MEA)-Technologie skizziert, bevor im nächsten Abschnitt die unterschiedlichen elektrophysiologischen Parameter, die in dieser Arbeit mittels MEA-System untersucht wurden, erläutert werden. Anschließend wird auf die verschiedenen in dieser Arbeit eingesetzten Formen ionisierender Strahlungen eingegangen. Dabei werden zunächst die physikalischen Eigenschaften der Röntgenstrahlung und die Eigenschaften der Schwerionen erläutert. Anschließend werden die kosmischen Strahlungsarten unterschieden und abschließend die Zielsetzung dieser Arbeit beschrieben.

2.1. Entwicklungsbiologie des Herzes

Die erste funktionierende Einheit in der Entwicklung aller Vertebraten ist das kardiovaskuläre System. Entsprechend ist das erste funktionierende Organ das Herz, welches mesodermalen Ursprungs ist. Das Mesoderm wird in das intra- und extraembryonale Mesoderm unterteilt. Das intraembryonale Mesoderm wird wiederum in das axiale, paraxiale, intermediäre und laterale Plattenmesoderm unterteilt. Aus den Zellen des lateralen Plattenmesoderms bildet sich zu beiden Seiten des Primitivstreifens das primitive Herz. Diese Zellen interagieren mit umliegenden Geweben, um für die Entwicklung des Herzes spezifiziert zu werden. Zunächst migrieren die Zellen durch den Primitivstreifen und bilden lateral des Hensen'schen Knotens zwei Gruppen mesodermaler Zellen [26, 27]. Diese Gruppen bilden das kardiogene Mesoderm, aus dem die atriale und ventrikuläre Muskulatur, die Purkinje-Fasern und die Endothel-Auskleidung des Herzes hervorgehen [28]. Die verschiedenen kardialen Zelltypen, die am Aufbau des Herzes beteiligt sind, sind in Abbildung 2.1 dargestellt.

Während der Migration der kardialen Vorläuferzellen wird der posteriore Bereich steigenden Konzentrationen von Retinsäure ausgesetzt. Diese wird vom Mesoderm produziert und bewirkt, dass der posteriore Anteil der kardialen Vorläuferzellen zum „Einfluss“- oder venösen Bereich des Herzes wird.

Die Zelldifferenzierung geschieht unabhängig voneinander in beiden Primordia. Während sie aufeinander zu migrieren, beginnen die apikalen Zellen des ventralen Mesoderms sich von den dorsalen Mesodermzellen zu trennen und bilden ein gemeinsames Epithelium, die perikardiale Kavität [34]. Aus diesen Zellen gehen dann das Endokardium und das Myokardium hervor [35, 36]. Schließlich fusionieren die beiden Primordia. Dies geschieht im Hühnerembryo etwa 29 h nach Beginn der Embryonalentwicklung und beim humanen Fötus etwa drei Wochen nach der Gestation. Die beiden Myocardia vereinen sich zu einem einzelnen Schlauch. Im Hühnerembryo beginnt der Herzschlag noch während der Fusion beider Primordia. Herzmuskelzellen haben die inhärente Fähigkeit zu kontrahieren, so dass isolierte Herzzellen von Ratten- oder Hühnerembryonen noch in Petrischalen weiterschlagen [37, 38]. Die Zellmigrationen sind in Abbildung 2.3 skizziert.

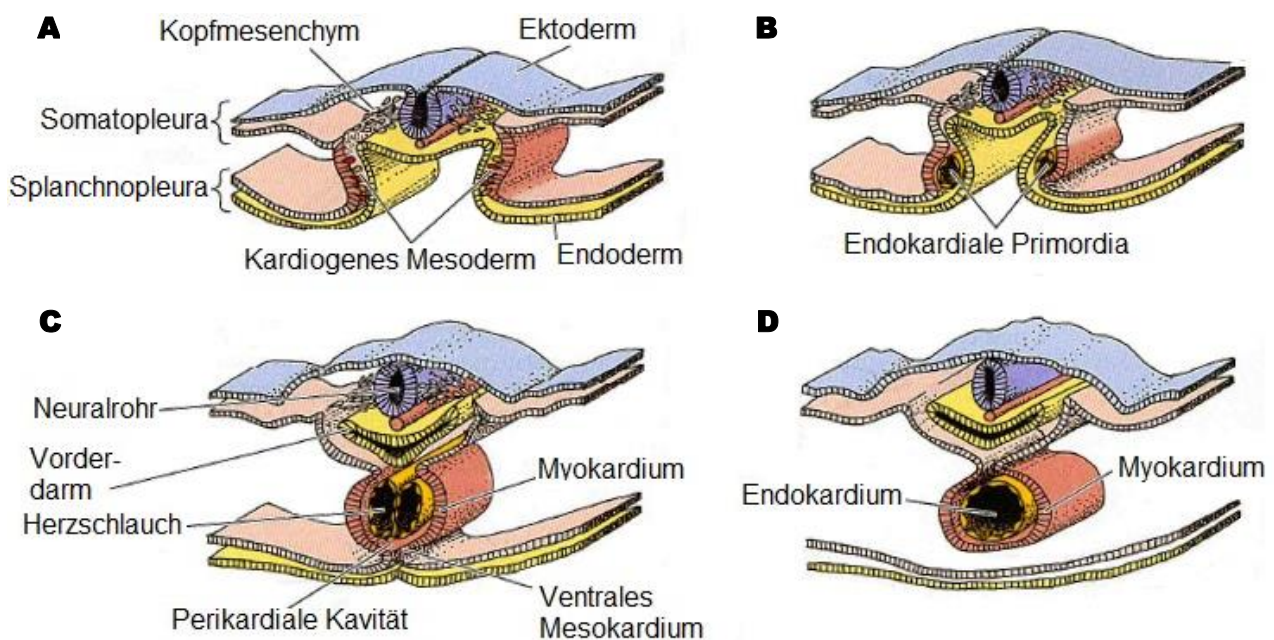


Abbildung 2.3: Das Herz bildet sich im Huhn in mehreren Schritten aus dem splanchnischen lateralen Plattenmesoderm. (A) Aus dem lateralen Plattenmesoderm wandern die Zellen des kardiogenen Mesoderms aus. (B) Sie bilden zwei endokardiale Primordia, die auf einander zu migrieren. (C) Aus den Primordia gehen zwei Herzscläuche hervor, die vom Myokardium umschlossen sind. (D) Die Herzscläuche fusionieren zum Endokardium (modifiziert nach [29]).

Schließlich wird der Rhythmus der Herzkontraktionen durch den *Sinus venosus* koordiniert. Die elektrischen Impulse, die dort generiert werden, initiieren wellenförmig Muskelkontraktionen entlang des röhrenförmigen Herzes. In drei Tage alten Hühnerembryonen und fünf Wochen alten menschlichen Embryonen besteht das Herz aus einem zweikammerigen Schlauch, mit einem Atrium und einem Ventrikel. Durch Windung oder *Looping* dieses Schlauchs wird die ursprüngliche anterior-posterior-Polarität in eine Links-Rechts-Polarität, wie sie im adulten Organismus vorkommt umgewandelt, dargestellt in Abbildung 2.4.

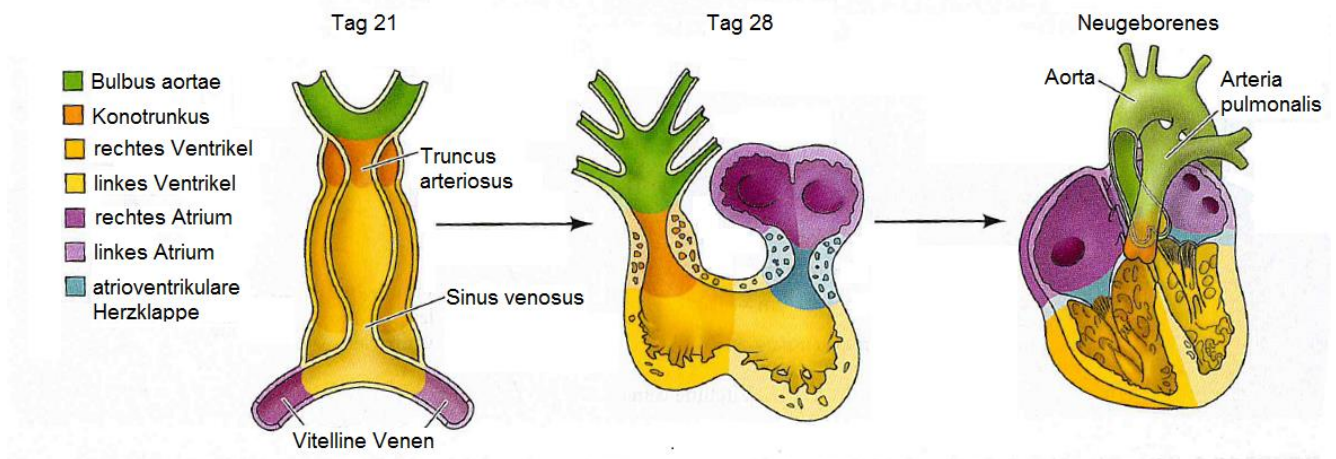


Abbildung 2.4: Während der Bildung der Herzsleife findet ein Polaritätswechsel von anterior-posterior zu links-rechts statt. Zeitgleich entstehen die späteren Herzkammern (Ventrikel) aus dem Herzschlauch und die späteren Vorhöfe (Atria) aus den vitellinen Venen (modifiziert nach [29]).

In Mammalia bildet sich aus dem Endokardium ein endokardiales Kissen, welches den Schlauch in den linken und rechten atrioventrikulären Kanal unterteilt. Zeitgleich wird das primitive Atrium durch zwei Septa partitioniert, die ventral zum endokardialen Kissen wachsen (Abbildung 2.5A, [29]). Das endokardiale Kissen übernimmt während der frühen Herzentwicklung die Funktion der Herzklappen. Während des fortlaufenden Wachstums entwickeln sich spezialisierte Herzklappen, die sowohl den Rückfluss von Blut ins Atrium als auch das Mischen des Blutes beider Herzseiten verhindern. Die Septa zwischen den Atria besitzen Öffnungen, sodass Blut von einer Seite des Herzes in die andere übertreten kann. Dieses Übertreten ist überlebenswichtig für den Fötus, solange noch keine Zirkulation zu funktionierenden Lungen etabliert wurde (Abbildung 2.5B, [29]). Mit dem ersten Atemzug des Neugeborenen schließen sich die septalen Öffnungen und der linke und rechte Blutkreislauf sind vollständig. Das Herz besteht dann aus vier Kammern, bei denen die *Arteria pulmonalis* mit dem rechten Ventrikel und die Aorta mit dem linken Ventrikel verbunden sind [29].

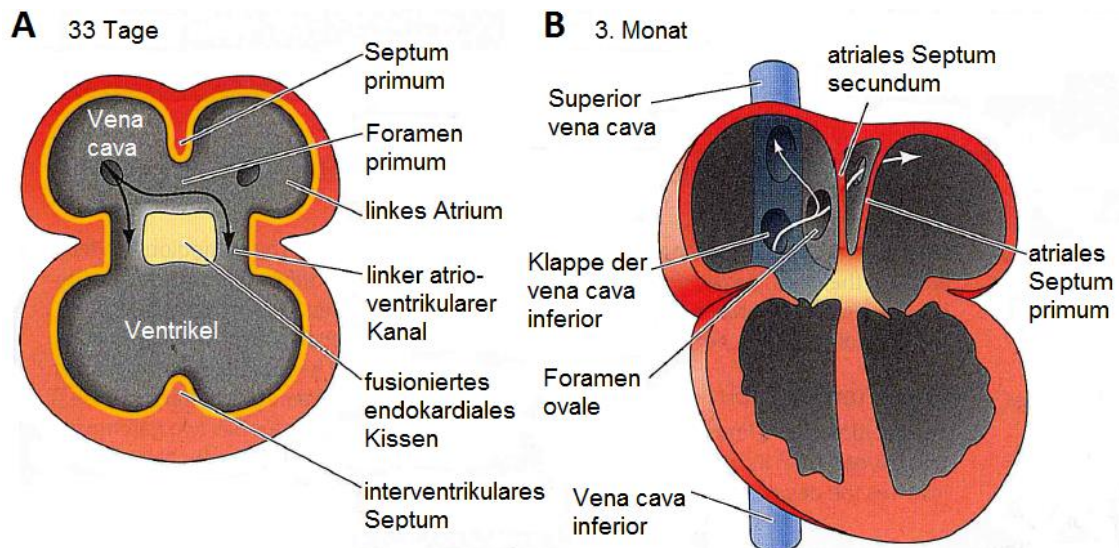


Abbildung 2.5: Die Partitionierung der Herzkammern verändert sich während der Entwicklung des menschlichen Fötus. (A) Etwa am Tag 33 der Entwicklung bilden sich zwei Septa, die den linken vom rechten Atrioventrikularraum trennen. (B) Ab dem dritten Monat des Fötus, verbleibt in den atrialen Septa eine Öffnung, das ovale Fenster (*Foramen ovale*). Dieses ist notwendig damit Blut vom rechten in das linke Atrium übertreten kann. Es schließt sich bei der Geburt (modifiziert nach [29]).

2.2. Elektrophysiologie des Herzes

Die Elektrophysiologie ist das Studium der elektrischen Eigenschaften biologischer Systeme. Sie beinhaltet die Messung von Spannungen und elektrischen Strömen. Dabei reicht das Skalenspektrum von einzelnen Ionenkanälen über Zellen und Gewebe bis hin zu ganzen Organen wie dem Herz. Im Zentrum der Elektrophysiologie stehen dabei Aktionspotentiale als charakteristische Membranpotentialveränderungen. Diese Abweichungen vom Ruhepotential entstehen durch Ionenströme, die in die bzw. aus der Herzmuskelzelle (2.2.1) fließen und in Abschnitt 2.2.2 detailliert erläutert werden. Wie diese Ionenströme im Herz wirken und wie die mit verschiedenen Methoden zu messenden Signale miteinander korrelieren, wird in Abschnitt 2.2.3 erklärt. Schließlich beschäftigt sich Abschnitt 2.2.4 mit der Kopplung von Aktionspotential und Muskelkontraktion in den Kardiomyozyten.

2.2.1. Aufbau der Kardiomyozyten

Die Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) stellen eine besondere Form der quergestreiften Muskulatur dar. Sie vereinen Eigenschaften der Skelett- und der glatten Muskulatur [39]. Wie in Zellen der glatten Muskulatur sind die Zellkerne der Kardiomyozyten zentral lokalisiert. Weiterhin sind die Zellen meist mono-, selten binukleär [40]. Wie Zellen der Skelettmuskulatur weisen Kardiomyozyten quergestreifte Muskelfasern auf. Ebenso verfügen sie über einen schnellen Kalziumzustrom erlaubende Transversaltubuli (T-Tubuli), die weit ins zelluläre Sarkoplasma, bis zu Zisternen des sarkoplasmatischen

Retikulum (SR), reichen. Das SR ist eine spezialisierte Form des glatten endoplasmatischen Retikulums (ER), welches als Kalzium-Ionenspeicher dient. Etwa ein Drittel des Kardiomyozytenvolumens nehmen Mitochondrien ein und etwa die Hälfte des Gesamtvolumens wird von Myofibrillen dominiert [41]. Eine Besonderheit dieser Muskelzellen stellen die Verzweigungen und Verbindungen der Kardiomyozyten untereinander dar. Diese Verbindungen bilden die aufgrund ihrer lichtbrechenden Eigenschaften Glanzstreifen genannten Regionen. Die Glanzstreifen bilden die Abgrenzungen zu den umliegenden Kardiomyozyten. In ihnen befinden sich Desmosomen zur Verankerung der Zellen untereinander, *Gap Junctions*, zur Vermittlung der elektrischen Kopplung und *Fasciae adherens* als Adhäsionspunkte der Aktinfilamente. Über die *Gap Junctions* bilden die 100-150 μm langen Kardiomyozyten anders als Zellen der quergestreiften Muskulatur anstatt eines multinukleären, morphologischen Synzytiums lediglich ein funktionelles Synzytium [40] (Abbildung 2.6). Über ein solches Zellnetzwerk pflanzen sich Aktionspotentiale von Zelle zu Zelle fort. Der Verlauf und das Entstehen eines Aktionspotentials werden im folgenden Abschnitt behandelt.

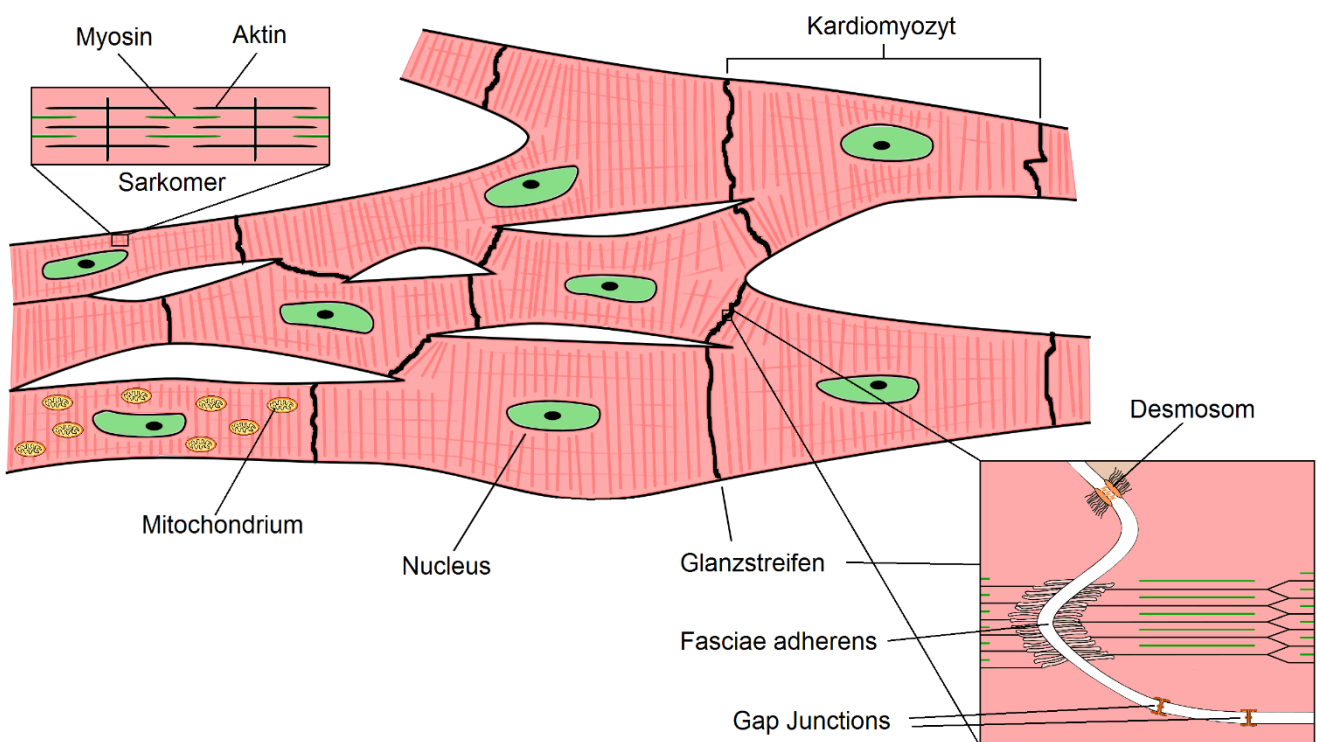


Abbildung 2.6: Kardiomyozyten bilden über die *Gap Junctions* im Glanzstreifen ein funktionelles Synzytium. Einen Großteil des Volumens eines Kardiomyozyten füllen Myofibrillen und Mitochondrien. Die Sarkomere aus Aktin- und Myosinfilamenten entsprechen im Aufbau der quergestreiften Muskulatur. Die wichtigsten Bestandteile des Glanzstreifens sind die Desmosomen, *Fasciae adherens* und *Gap Junctions* (mit freundlicher Genehmigung von und modifiziert nach Johannes Forster).

2.2.2. Das kardiale Aktionspotential

In der Elektrophysiologie ist das kardiale Aktionspotential durch fünf Phasen charakterisiert. Diese Phasen können je nach Zelltyp unterschiedlich stark ausgeprägt sein und daher in variablen Verläufen resultieren. Ein genereller, charakteristischer Verlauf eines kardialen Aktionspotentials ist in Abbildung 2.7 gezeigt. Phase 0 stellt die initiale Depolarisationsphase dar, in der das Membranpotential während der Diastole schnell von negativen auf positive Spannungswerte gebracht wird. In Phase 1 findet eine partielle Repolarisation bis knapp unterhalb von 0 mV statt. Das kardiale Aktionspotential zeichnet sich vor allem durch seine 200-400 ms andauernde Plateauphase (Phase 2) aus, während der das Membranpotential weitestgehend nahe 0 mV verläuft, aber stetig fällt. Während dieser Phase ist die Zelle absolut refraktär, also nicht erneut erregbar. In der anschließenden Phase 3, der finalen Repolarisation, sinkt das Membranpotential wieder auf das Ruhepotential von -90 mV ab. Die bisher aufgezählten Phasen entsprechen in etwa der mechanischen Systole, gefolgt von der Diastole in Phase 4. Diese kann entweder ein stabiles Ruhepotential wie im atrialen und ventrikulären Myokardium sein, oder eine langsame diastolische Depolarisation, die schließlich spontane Aktivität initiiert, wie in den Zellen des Sinusknotens [42]. Auf letztere wird später noch genauer eingegangen.

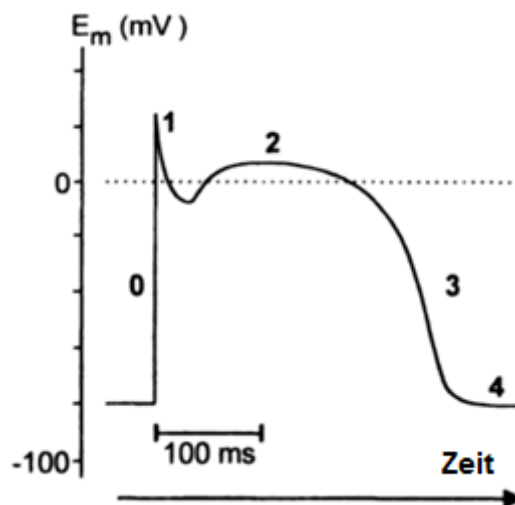


Abbildung 2.7: Das charakteristische, kardiale Aktionspotential ist in fünf Phasen von Phase 0 bis Phase 4 unterteilt. Phase 0: initiale Depolarisation, Phase 1: partielle Repolarisation, Phase 2: Plateauphase, Phase 3: finale Repolarisation, Phase 4: Ruhepotential. Das dargestellte Aktionspotential entspricht dem eines ventrikulären Kardiomyozyts [42].

Während des Ruhepotentials von etwa -90 mV werden Kalium-Ionen (K^+) über den K^+ -Einwärtsgleichrichter (i_{k1}) in das Zellinnere geleitet. Kommt es durch Erregung zu einer Ladungsverschiebung, führt dies zu einer leichten Depolarisation. Diese Stimulation kann entweder von einer durch *Gap Junctions* verbundenen Nachbarzelle ausgehen oder durch spontane Aktivität ausgelöst werden. Erreicht diese Ladungsveränderung den Schwellenwert von -70 mV, werden die

K^+ -Einwärtsgleichrichter schnell inaktiviert und Natrium-Ionen (Na^+) über die Natriumkanäle ins Zellinnere transportiert (i_{Na}). Durch diesen rapiden Natriumeinstrom kommt es zur weiteren, schnellen Depolarisation, dem Aufstrich des Aktionspotentials. Nach Erreichen eines Wertes von -40 mV werden die spannungsabhängigen Natriumkanäle innerhalb einer Millisekunde geschlossen und somit inaktiv. Dennoch erreicht das Membranpotential einen leicht positiven Wert von $+20$ mV (*Overshoot*). Für die anschließende partielle Repolarisation sind ein transienter K^+ -Auswärtsstrom (i_{to}) und Einwärtsstrom von Chlorid-Ionen in die Zelle (i_{Cl}) verantwortlich. In der Plateauphase werden diese repolarisierenden Ströme durch langsamen Einstrom von Kalzium-Ionen (Ca^{2+}) ausgeglichen (i_{Ca}). Diese spannungsabhängige Aktivierung liegt an den L-Typ-Kalziumkanälen, die sich bei Erreichen eines Potentials oberhalb von -40 mV öffnen. Wenn die Kalziumkanäle wieder inaktiv werden, nimmt die Wirkung der repolarisierenden Ströme überhand. In der finalen Repolarisation wirken mehrere Ströme auf das Membranpotential, den überwiegenden Anteil tragen jedoch die Kaliumströme. Dabei ist der K^+ -Auswärtsgleichrichter (i_K) besonders wichtig. Dieser setzt sich aus einer langsamen (i_{Ks}) und einer schnellen Komponente (i_{Kr}) zusammen. Während sich das Membranpotential wieder dem K^+ -Gleichgewichtspotential von etwa -90 mV annähert, übernimmt zunehmend wieder der K^+ -Einwärtsgleichrichter (i_{K1}) die Führung. Nach Ablauf des Aktionspotentials bestimmt dieser das Membranpotential unter elektrischen Ruhebedingungen (Ruhepotential).

Durch Aktionspotentiale kommt es, obwohl das Ruhepotential wieder erreicht wird, zu einem Ionen-Ungleichgewicht innerhalb der Zelle. Daher wird die Ionen-Homöostase durch Ionentauscher wie die Na^+/K^+ -ATPase und den Na^+/Ca^{2+} -Austauscher wiederhergestellt. Die Zelle ist während des Aktionspotentials für etwa 300 ms elektrisch refraktär. Diese lange Refraktärzeit, zu der besonders die Plateauphase beiträgt, ist wichtig, damit das Herz nur Einzelzuckungen ausführt. Dabei wird die Refraktärzeit in die etwa 200 ms andauernde absolute und die etwa 100 ms andauernde relative Refraktärzeit unterteilt. Während Letzterer können bereits weitere, jedoch schwächer ausgeprägte Aktionspotentiale generiert werden.

Den Ursprung der Aktionspotentiale bildet dabei eine besondere Gruppe von Herzmuskelzellen, die Schrittmacherzellen, die sich durch ihre Fähigkeit der autonomen Kontraktion auszeichnen. Schrittmacherzellen generieren spontan Aktionspotentiale, die dann umliegende Kardiomyozyten erregen, wodurch wiederum das Aktionspotential von Zelle zu Zelle weitergeleitet wird. Die Herzmuskelzellen sind miteinander über *Gap Junctions* verbunden. Über diese Verbindungen werden Ionen an die umliegenden Nachbarzellen weitergeleitet und lösen dort ebenfalls Aktionspotentiale aus. Aufgrund der zahlreichen *Gap Junctions* im sogenannten Glanzstreifen bilden die Kardiomyozyten ein funktionelles Synzytium. Die Aktionspotentiale von Schrittmacherzellen unterscheiden sich in ihrem Verlauf von denen des Arbeitsmyokards (Abbildung 2.8). Sie verfügen über kein stabiles Ruhemembranpotential, stattdessen depolarisieren sie spontan und bilden selbstständig Aktionspotentiale. Ihr maximal negatives Potential liegt bei etwa -60 mV. Sie verfügen nicht über den

stabilisierenden i_{K1} -Strom, dadurch depolarisieren die Zellen nach Erreichen von ca. -60 mV langsam spontan. Dies wird hauptsächlich über einen besonderen Na^+ -Einwärtsstrom (i_f) bewerkstelligt. Weiterhin trägt ein spezieller T-Typ K^+ -Kanal zur Depolarisation bei. Erreicht die spontane Depolarisation einen Schwellenwert von etwa -40 mV, werden langsame L-Typ Ca^{2+} -Kanäle aktiviert, die zu einer raschen Depolarisation der Zelle führen. Eine verzögerte Aktivierung des K^+ -Gleichrichters (i_K), verbunden mit der Deaktivierung der Ca^{2+} -Kanäle, bewirkt eine Repolarisation, nachdem ein Membranpotential von etwa $+20$ mV erreicht worden ist. Eine Plateauphase fehlt, da es zu keinem Gleichgewicht der de- und repolarisierenden Ströme kommt. Bei zunehmend negativem Membranpotential deaktivieren die K^+ -Gleichrichter und die Spontandepolarisation beginnt bei etwa -60 mV erneut [43].

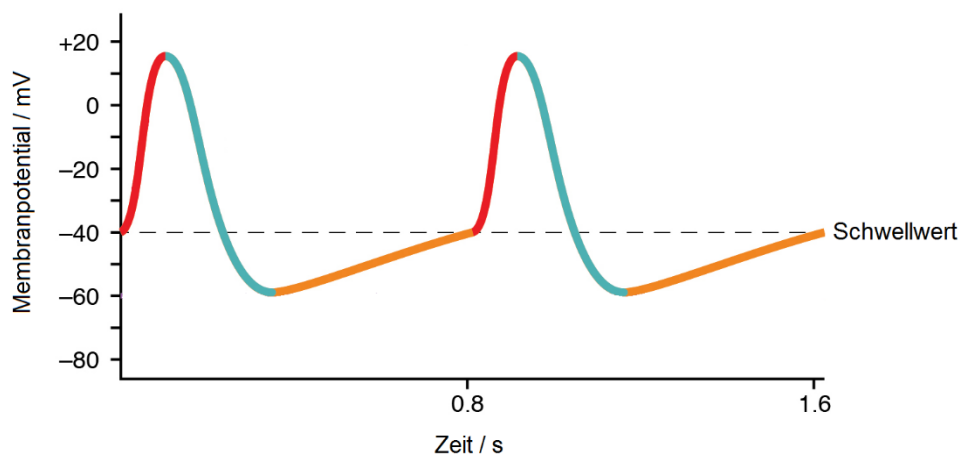


Abbildung 2.8: Kardiale Schrittmacherzellen verfügen weder über eine Plateauphase noch über ein stabiles Ruhepotential. Die verschiedenen Phasen des Aktionspotentials repräsentieren die Aktivität unterschiedlicher Kanäle und Ionenströme. Orange: spontane Depolarisation; langsamer Na^+ -Influx, rot: Depolarisation; schneller Ca^{2+} -Influx, blau: Repolarisation; K^+ -Efflux (modifiziert nach [44]).

2.2.3. Reizweiterleitung des Herzens

Im Herz gruppieren sich die Schrittmacherzellen zu sogenannten Schrittmacherzentren. Ein gesundes Herz verfügt über drei Schrittmacherzentren, die sich durch ihre verschiedenen Frequenzen spontaner Aktionspotentiale und ihrer Lage im Herz voneinander unterscheiden. Die drei Schrittmacherzentren sind der Sinusknoten (*Nodus sinuatrialis*) oder SA-Knoten, der Atrioventrikularknoten (*Nodus atrioventricularis*) oder AV-Knoten und die His-Bündel (*Fasciculus atrioventricularis*). Die Frequenzen, mit denen die Schrittmacherzentren spontane Aktionspotentiale generieren, sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Dabei ist zu beachten, dass der SA-Knoten die höchste Frequenz erreicht und die His-Bündel die geringste. Der SA-Knoten bestimmt daher maßgeblich die Schlagrate des Herzes. Sollte dieser durch Krankheit oder Verletzung ausfallen, gibt der AV-Knoten mit der zweithöchsten Frequenz die Schlagrate des Herzes vor.

Tabelle 2.1: Schrittmacherzentren und ihre Frequenzen spontaner Aktionspotential-Generierung

Schrittmacherzentrum	Frequenz spontaner Aktionspotentiale /min⁻¹
Nodus sinuatrialis	60-80
Nodus atrioventricularis	40-50
Fasciculus atrioventricularis	20-30

Der spindelförmige SA-Knoten liegt an der Einmündung der rechten Hohlvene im rechten Atrium. Von dort aus generiert er Aktionspotentiale, die durch das Arbeitsmyokard weitergeleitet werden. Dieser Reiz geht dann in das linke Atrium und auf die Zellen des AV-Knotens über. Dies führt zur Kontraktion der Vorhöfe und zum Pumpen von Blut in die Ventrikel. Der AV-Knoten liegt zwischen der linken und rechten Vorkammer an der Grenze zu den Hauptkammern. Aufgrund des aus Bindegewebe bestehenden Herzskeletts sind die Vorkammern von den Hauptkammern elektrisch isoliert. Somit stellen der AV-Knoten, der die geringste Weiterleitungsgeschwindigkeit im Herz aufweist, und das His-Bündel die einzige Möglichkeit der Reizweiterleitung zu den Hauptkammern dar. Das His-Bündel liegt distal zum AV-Knoten, reicht bis in die Herzspitze, spaltet sich in den linken und rechten Tawara-Schenkel auf und mündet in die Purkinje-Fasern. Diese Weiterleitung bewirkt die Kontraktion der Ventrikel und das Pumpen des Blutes in den systemischen und pulmonalen Blutkreislauf.

In der Medizin kann die Erregungsleitung durch Elektrokardiogramme (EKG) sichtbar gemacht werden. Die gemessenen Signale lassen Rückschlüsse auf pathologische und pharmakologische Einflüsse zu. Im EKG werden die charakteristischen Zacken und Wellen der Signale mit den Buchstaben von P bis U bezeichnet. So zeigt sich die Erregung der Vorhöfe in der P-Welle (Abbildung 2.9). Während der PQ-Strecke durchläuft die Erregung den AV-Knoten und die His-Bündel. Die Q-Zacke entsteht durch das Übergreifen der Erregung auf Teile des Septums. Der Erregungsablauf der Ventrikel-Muskulatur stellt sich aufgrund des mehrfachen Wechsels der räumlichen Orientierung des Ausbreitungsvektors als QRS-Komplex dar. Durch die Rückbildung der Erregung, ausgehend von den Außenschichten des Myokards, entsteht die T-Welle. Die seltener beobachtete U-Welle wird auf die späte Repolarisation der Purkinje-Fasern zurückgeführt. Die mittlere Schlagfrequenz wird über den mittleren Abstand von einer R-Zacke zur nächsten bestimmt [43].

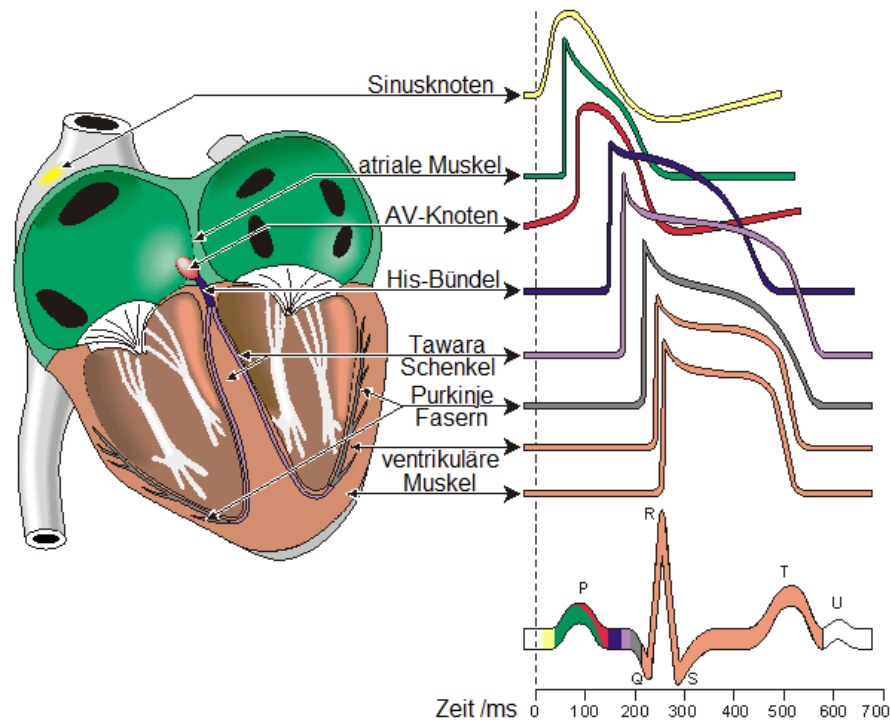


Abbildung 2.9: Das typische EKG-Signal entsteht durch die zeitlich versetzte Überlagerung der einzelnen APs. Die P-Welle entspricht der Erregung der Vorhöfe, ausgelöst durch die spontane Erregung des Sinusknotens. Der QRS-Komplex entsteht durch die Erregung der Hauptkammern. Die T-Welle gibt die Rückbildung der Erregung in den Hauptkammern wieder. Die seltener zu messende U-Welle ist auf die späte Repolarisation der Purkinje-Fasern zurückzuführen (modifiziert nach [45]).

In der Kardiologie gilt das QT-Intervall, also die zeitliche Distanz zwischen Q-Zacken und T-Welle, als wichtiger Parameter bezüglich drohender Arrhythmien [46-48]. Es beschreibt die Depolarisation und Repolarisation der Ventrikel. Eine Verlängerung des QT-Intervalls kann als Indiz für potentiell drohende ventrikuläre Tachykardien wie *Torsade de pointes* und als Risikofaktor bezüglich plötzlichen Herztodes herangezogen werden [24, 49, 50]. Weiterhin lösen verlängerte QT-Intervalle verfrühte Aktionspotentiale während der späten Depolarisationsphase aus, was das Risiko ventrikulärer Arrhythmien oder fatalen Kammerflimmerns erhöht [50]. Abnorme QT-Intervalle können auf genetische [51], oder pharmakologische Ursachen [49] zurückgeführt werden. Aufgrund der mitunter tödlichen Auswirkungen wird seit 2005 in der Pharmaindustrie beinahe jeder neue Wirkstoff einem strikten QT-Screening unterzogen. Meyer *et al.* konnten in diesem Zusammenhang demonstrieren, dass ein solches QT-Screening auch anhand der Mikroelektroden-Technologie möglich ist [52]. Dabei wurden Medikamente, die nachweislich eine QT-Verlängerung bewirken, an Kardiomyozyten getestet, die auf Mikroelektroden kultiviert wurden. Das Ergebnis war eine Verlängerung der gemessenen Feldaktionspotentialdauer (fAPd) [52, 53] (Abbildung 2.10). Daher wird in der Elektrophysiologie an kardialen funktionellen Synzytien das QT-Intervall oft mit der fAPd gleichgesetzt, oder sogar die Feldaktionspotentialdauer ebenfalls QT-Intervall genannt, oder als *QT-like Interval* bezeichnet.

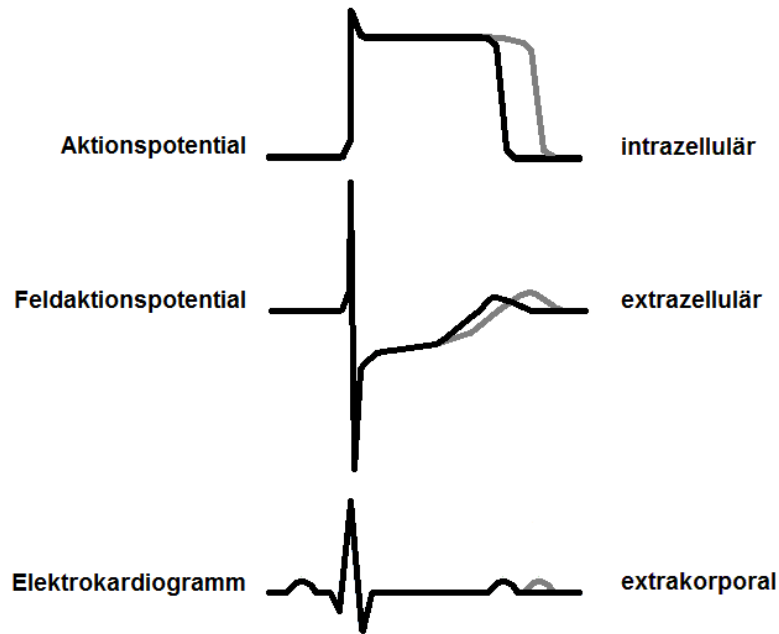


Abbildung 2.10: Einige Chemikalien beeinflussen die mittels verschiedener Methoden zu messenden kardialen Signale. Ein intrazellulär mittels transmembraner Aufnahme gemessenes Aktionspotential im Vergleich zu einem mittels MEA-Technologie extrazellulär gemessenen Feldaktionspotential und einem mittels EKG extrakorporal gemessenen Signal. In Grau ist skizziert, wie sich eine Verlängerung des QT-Intervalls durch Behandlung mit dem Kaliumkanal-Blocker HMR-1098 auf die jeweiligen Signale auswirken würde. Stets verzögert sich die Repolarisation, wodurch sich die Signaldauer erhöht. Auffällig ist die Relation zwischen EKG-Signal und Feldaktionspotential (modifiziert nach [52]).

2.2.4. Kontraktion der Herzmuskelzellen

Unter der elektromechanischen Kopplung wird der Mechanismus verstanden, über den ein Aktionspotential die Kontraktion einer Muskelzelle auslöst. In Herzmuskelzellen findet stattdessen eine elektrochemische Kopplung über Kalzium-Ionen statt. In der ruhenden Zelle beträgt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol nur etwa ein Zehntausendstel der extrazellulären Konzentration. Während der Plateauphase öffnen sich die L-Typ Ca^{2+} -Kanäle und Ca^{2+} strömt ins Zellinnere. Ausgelöst durch diesen initialen Einstrom öffnen sich die Ryanodinrezeptor (RyR2) -Kanalproteine des sarkoplasmatischen Retikulums und weiteres Ca^{2+} strömt ins Zytosol. Dabei wird eine zytosolische Ca^{2+} -Konzentration von 10^{-5} mol/L erreicht – im Vergleich zu 10^{-7} mol/L während der Ruhephase. Kalzium-Ionen binden an Troponin C, ein myofibrilläres Regulatorprotein, wodurch der kontraktile Apparat aktiviert wird, dargestellt in Abbildung 2.11.

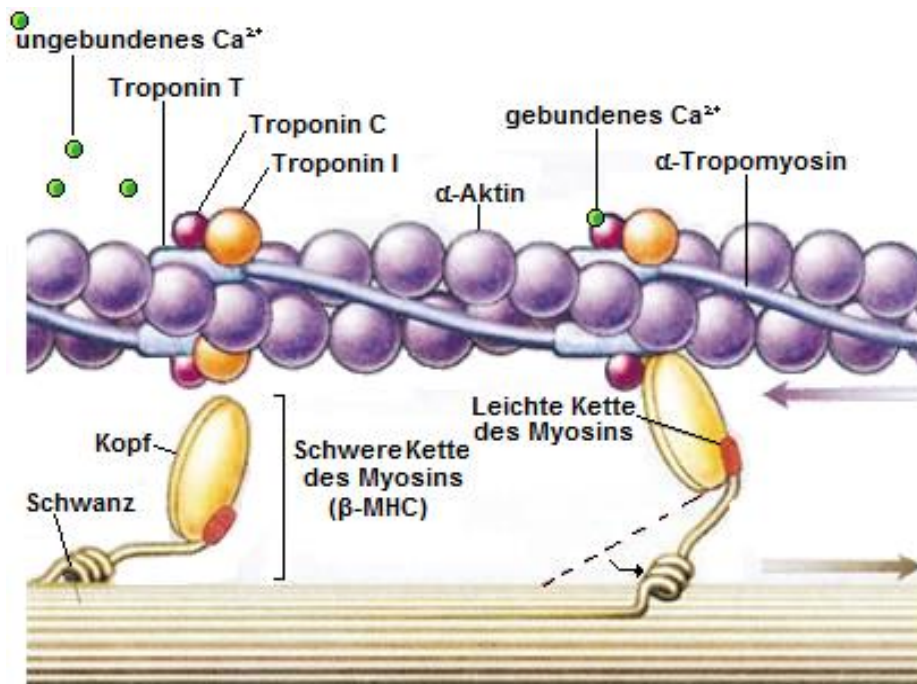


Abbildung 2.11: Die Aktin- und Myosinfilamente der Sarkomere benötigen Ca^{2+} -Ionen, um zu kontrahieren. Durch die Bindung von Ca^{2+} -Ionen an Troponin C des Troponin-Komplexes erfährt Tropomyosin eine Konformationsänderung. Durch diese Konformationsänderung können die Myosinköpfe an Aktinfilamente binden und die Kontraktion initiieren (modifiziert nach [54]).

Der kontraktile Apparat besteht aus gestreifter Muskulatur, also Aktinfilamenten und Myosinfibrillen. Die Aktinfilamente sind von Myotroponin umgeben, welches die Anbindung von Myosin an Aktin verhindert. Reguliert wird Tropomyosin durch den Troponin-Komplex, der sich in Herzmuskelzellen aus den Untereinheiten Troponin C, I und T zusammensetzt. Durch Bindung von Ca^{2+} -Ionen an Troponin C des Troponinkomplexes wird eine Konformationsänderung im Tropomyosin bewirkt. Diese Konformationsänderung legt die Aktinfilamente für die Myosinköpfe frei, die dann unter Adenosintriphosphat (ATP)-Hydrolyse an Aktin binden können. Dies erlaubt die Kontraktion der Herzmuskelzellen [43]. Um die Kontraktion zu beenden, muss nun die Ca^{2+} -Konzentration wieder gesenkt werden. Während in Skelettmuskeln die Kalzium-Pumpe des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) ausreicht, um die Kalzium-Ionen wieder ins SR aufzunehmen, werden in Herzmuskelzellen noch weitere Wege genutzt, wie zum Beispiel der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter NCX und ATP-betriebene Kalziumpumpen, die Kalzium-Ionen entgegen dem Konzentrationsgradienten aus der Zelle befördern. Ein geringer Anteil an Ca^{2+} -Ionen wird sogar in die Mitochondrien aufgenommen [55]. Der kontraktionsbedingte Kalziumtransport wird in Abbildung 2.12 veranschaulicht.

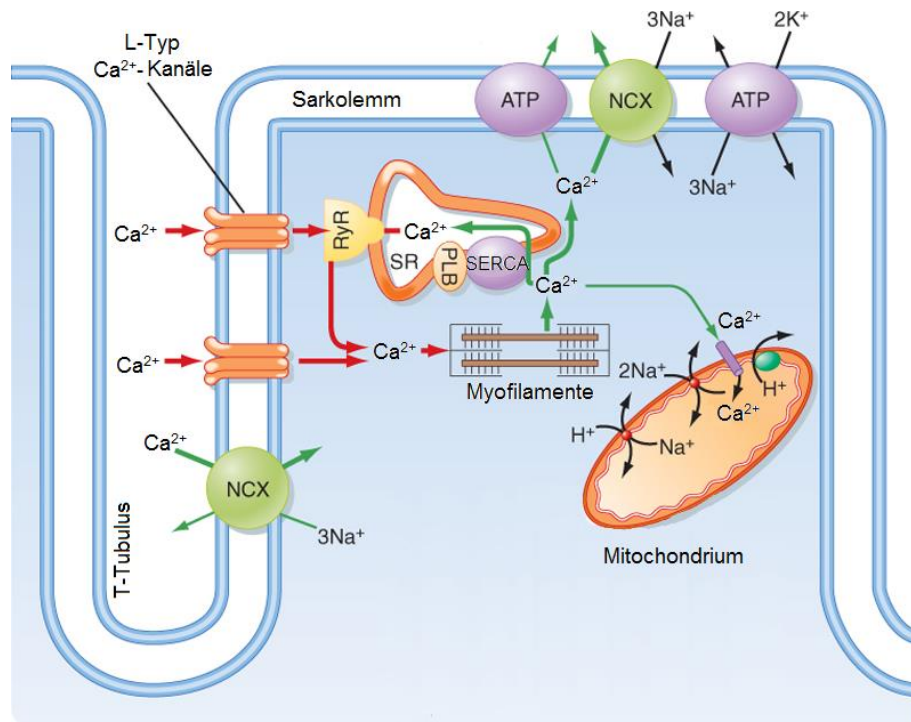


Abbildung 2.12: Der Kalzium-Ionentransport ist für Kontraktion und Relaxation der Kardiomyozyten essentiell. Durch die L-Typ-Kanäle gelangen Ca²⁺-Ionen während der Plateauphase ins Zellinnere und binden an RyR. Daraufhin entlässt RyR weitere Ca²⁺-Ionen aus dem SR ins Zytosol. Diese binden in den Myofilamenten an Troponin C, wodurch die Kontraktion stattfinden kann. Zur Relaxation muss die Ca²⁺-Konzentration im Zytosol wieder gesenkt werden, dazu werden über SERCA und Phospholamban (PLB) unter ATP-Hydrolyse etwa 70% der Ca²⁺-Ionen wieder ins SR aufgenommen. 28% des Gesamtanteils werden über NCX im Verhältnis 1:3 gegen Na⁺-Ionen getauscht. Die verbleibenden 2% der Ca²⁺-Ionen werden entweder von der ATPase entgegen des Konzentrationsgefälles aus der Zelle hinaus gepumpt oder in die Mitochondrien aufgenommen (Modifiziert nach [55]).

2.3. Stand der Technik

Die Methode der Mikroelektroden-Arrays hat sich als besonders vielseitige Herangehensweise zur Untersuchung elektrophysiologischer Signale kardialer Netzwerke herausgestellt. Aufgrund der nicht-invasiven Messmethodik ist es im Gegensatz zur bekannteren intrazellulären Methode des *Patch-Clamp*-Verfahrens möglich, wiederholt Messungen an denselben Netzwerken durchzuführen. Dies ermöglicht sogar, abhängig vom verwendeten Zellkultursystem, die Durchführung von Langzeitstudien. Die Fähigkeit, elektrische Aktivität auf zellulärer Ebene messen zu können, verleiht der MEA-Technologie ein hohes Potenzial für eine Vielzahl von Anwendungen in der Grundlagen- und angewandten Forschung.

Die MEA-Technologie wurde bereits in diversen kardiovaskulären Studien in verschiedenen Modellsystemen eingesetzt. So wurden Experimente an Zellen aus dem Huhn, der Maus, der Ratte und dem Zebrafisch durchgeführt [56-59]. Inzwischen wird die MEA-Technologie vermehrt für Medikamentenstudien genutzt, die bevorzugt an aus humanen Stammzellen gewonnenen Kardiomyozyten durchgeführt werden [60-62]. Der weitverbreitete pharmakologische Einsatz führt zu

einer guten Dokumentation der Methodik. Arbeitsgruppen wie die um Asakura *et al.* haben sich zum Beispiel mit der Auswertung und Konfiguration geeigneter Aufnahmeparameter des MEA-Systems für Medikamentenstudien an aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC)-differenzierten Kardiomyozyten beschäftigt [63].

Um mögliche Fehlerquellen in der Datenakquisition zu reduzieren, untersuchten außerdem Kienast *et al.* die durch multiple Schrittmacherzentren verursachten Veränderungen in mehreren elektrophysiologischen Parametern an primären, embryonalen Hühnerkardiomyozytenkulturen [64]. Abhängig vom Ursprung der Erregung traten dabei Abweichungen von bis zu 14% auf, weshalb ein Nichtbeachten des Erregungsursprungs zu hohen Fehlerraten führen kann. Einen weiteren Aspekt, der einer relevanten Variabilität unterliegt, untersuchten Ben-Ari *et al.* in einer klinisch relevanteren Herangehensweise. Sie erforschten den Zusammenhang zwischen Herzratenvariabilität bei adulten Menschen und der Schlagratenvariabilität der aus deren Keratinozyten generierten iPSC-Kardiomyozyten auf Einzelzellebene und anhand von *Embryoid Bodies*. Dabei stellten sie fest, dass die Variabilität mit kleiner werdendem System ansteigt, was sie auf oszillierende Prozesse des Kalzium-*Handlings*, der mitochondrialen Funktion und die Genexpression und Redox-Zustände der circadianen Rhythmik zurückführen [65].

Den hohen Wert der MEA-Technologie für die klinische Forschung zeigt eine Studie von Friedrichs *et al.* Sie erläutert einen lentiviralen Weg, patienten-spezifische iPSC-Zellen zu gewinnen. Diese wurden *in vitro* zu Kardiomyozyten differenziert und zeigten eine dem Spenderpatient entsprechende *Long-QT*-Charakteristik [66]. Einer anderen Arbeitsgruppe war es möglich, in neonatalen Rattenzellen einen photoinduzierbaren Depolarisationskanal zu entwickeln, der defibrillierend auf Spiralwellenarrhythmien wirkt [67]. Im Bestreben, die Verhältnisse *in vitro* den Begebenheiten *in vivo* anzunähern, publizierten Trantidou *et al.* kürzlich ein Strukturierungsverfahren, welches die Signalweiterleitung über den MEA-Chip dem des nativen Myokardiums annähern soll [68].

Ein ebenso technologisch anspruchsvolles Themengebiet stellt die Kopplung zwischen Zelle und Elektroden dar. Um diese Kopplung zu verbessern, strukturierten Lin *et al.* Mikroelektroden mit vertikalen Iridiumoxid-Nanoröhren, was in einem verbesserten Signal resultierte [69]. Auf demselben Gebiet wurden auch im *BioMEMS-Lab* von Nick *et al.* Erfolge erzielt. Hier wurden Gold-Nanosäulen [70] und Kohlenstoff-Nanoröhren [71] mit hohem Aspektverhältnis auf den Elektroden des MEA-Chips aufgebracht, was zu einer verbesserten Impedanz und zu einer starken Vergrößerung der gemessenen Amplituden führte.

Bezüglich der strahlenbiologischen Anwendung der MEA-Technologie ist die Arbeitsgruppe von Prof. Thielemann an der Hochschule Aschaffenburg die erste, die das MEA-System zur Messung strahleninduzierter Effekte auf die Elektrophysiologie einsetzt. Neben den in dieser Arbeit verwendeten kardialen Zellen wurden auch Bestrahlungen und anschließende Messungen an neuronalen Zellen

durchgeführt. Kortikale Rattenneurone wurden von Mayer *et al.* einer Röntgenstrahlung von bis zu 2 Gy ausgesetzt. Über zwei Wochen in Kultur wurde keine signifikante Reduktion in der Zahl neuronaler *Spikes* gemessen. Dies lässt auf eine hohe Robustheit der Zellen gegenüber ionisierender Strahlung schließen [72]. Im Zuge des vorliegenden Projektes wurden Daten zur Röntgenbestrahlung von primären kardialen Zellen publiziert, auf die später im Detail eingegangen wird [73].

2.4. Betrachtete elektrophysiologische Parameter extrazellulärer Ableitungen

Aktionspotentiale können intrazellulär mittels einer durch die Membran eingebrachten Messelektrode und einer im extrazellulären Medium befindlichen Referenzelektrode gemessen werden. Dabei wird die gemessene Spannung durch die in die Zelle hinein- bzw. hinausfließenden Ionen verursacht. Bei extrazellulären Messungen hingegen liegen sowohl Mess- als auch Referenzelektrode im extrazellulären Medium. Während die deutlich größere Referenzelektrode mit großem Abstand zur Messelektrode und den Zellen positioniert ist, liegt die Messelektrode in direkter Nähe zu den zu messenden Zellen. Den Abstand zwischen Messelektrode und Zelle bildet ein mit Zellkulturmedium gefüllter Spalt von einigen Nanometern Breite. Der durch Aktionspotentiale verursachte Ionenstrom bedingt in diesem Spalt eine schnelle Potentialänderung die über die Mikroelektroden detektiert wird [74]. Diese Signale entsprechen dabei in etwa der ersten Ableitung des intrazellulär zu messenden Aktionspotentials [75].

Zur elektrophysiologischen Untersuchung kardialer Zellen anhand extrazellulärer Ableitungen bietet sich die Betrachtung mehrerer Parameter an. Die im Zuge dieser Arbeit untersuchten Parameter sind die Anzahl der aktiven Elektroden, Schlagrate, Signalausbreitungsgeschwindigkeit, Feldaktionspotentialdauer und die Signalamplituden. Diese sollen in den folgenden Unterabschnitten näher auf ihre Bedeutung hin charakterisiert werden.

2.4.1. Anzahl aktiver Elektroden

Als aktive Elektroden gelten alle Elektroden, auf denen Zellen angewachsen sind und über die extrazelluläre Signale gemessen werden können. Somit erlaubt dieser Parameter eine basale qualitative Aussage über den Bewuchs und die Ausbreitung der Zellkulturen über das Elektrodenfeld. Die Anzahl aktiver Elektroden gibt, über den Verlauf eines mehrtägigen Experiments, Aufschluss über die Adhäsion der Zellkultur auf der Oberfläche des MEA-Chips. Auf einem Standard-MEA mit 60 Elektroden kann die Anzahl aktiver Elektroden aufgrund der Referenzelektrode maximal 59 betragen. Dieser Parameter findet in der Auswertung nur untergeordnet Beachtung, spielt aber bei der Qualitätsevaluierung der Kulturen vor dem Experiment eine maßgebliche Rolle. Kulturen, die bereits vor Beginn der Experimente

nur wenige aktive Elektroden aufweisen, neigen häufig dazu, sich nach kurzer Zeit vollständig von der Oberfläche abzulösen. Dies mag vornehmlich an einer geringen Adhäsion liegen.

2.4.2. Schlagrate

Nach der Aussaat der kardialen Zellen auf der Oberfläche der MEA-Chips bilden die Einzelzellen über *Gap Junctions* ein funktionelles Synzytium. Außerdem bilden sich Schrittmacherzentren, die spontan Aktionspotentiale generieren und diese über das entstandene Zellnetzwerk an benachbarte Zellen weiterleiten. Als Folge dieses Stimulus generieren die benachbarten Zellen ebenfalls Aktionspotentiale und stimulieren wiederum die umgebenden Zellen. Die Folge ist ein das gesamte Netzwerk umfassendes, synchrones Signal, welches in den Kardiomyozyten mit einer Kontraktion verbunden ist. Aufgrund des Fehlens eines stabilen Ruhepotentials in den Zellen der Schrittmacherzentren kommt es zu einer stetig wiederkehrenden Erregung. Diese resultiert in einer rhythmischen Schlagrate. Die Schlagrate ist dabei von mehreren Faktoren abhängig. Die zelluläre Zusammensetzung der Schrittmacherzentren spielt ebenso eine Rolle wie die Temperatur und andere exogene Faktoren wie die Nährstoffversorgung oder die Wirkung eventueller kardioaktiver Chemikalien.

Bei der Messung der Signale wird die Schlagrate anhand des mittleren *Interspike-Intervalls* (ISI) bestimmt (Abbildung 2.13). Das ISI ist die Dauer zwischen den Amplituden zweier Feldaktionspotentiale. Die Standardabweichung des mittleren ISI gibt Auskunft über die Rhythmizität der Kulturen und lässt bei zu hoher Abweichung auf Arrhythmien schließen.

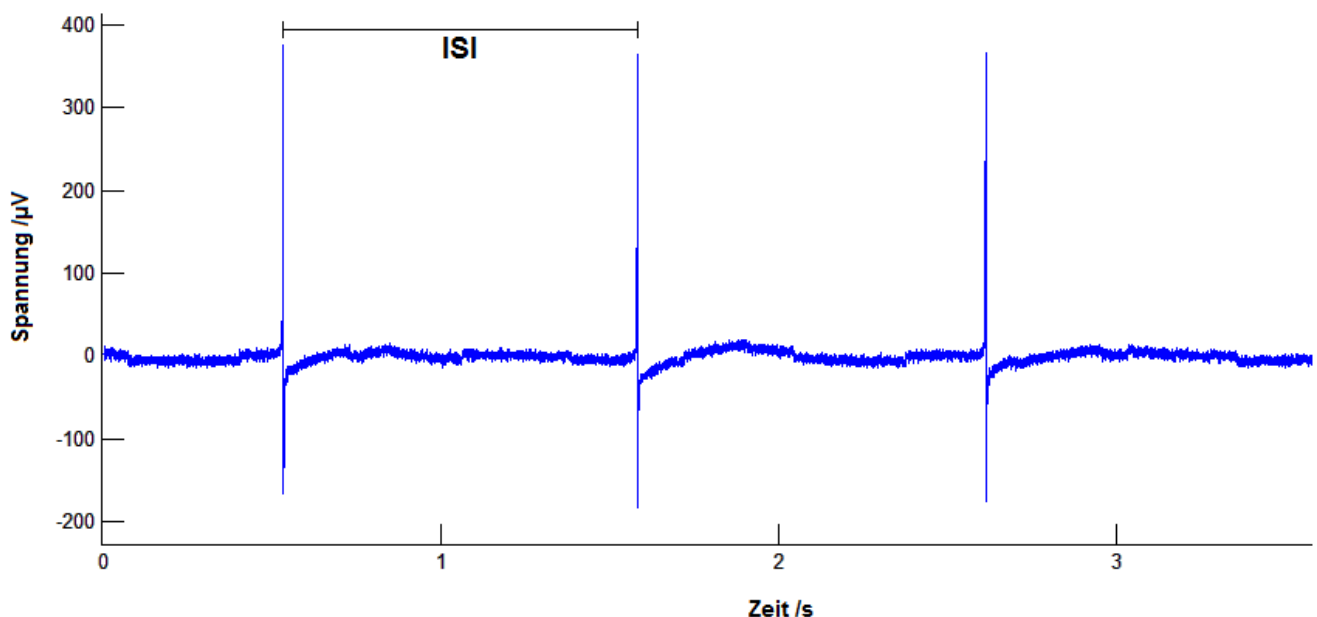


Abbildung 2.13: Die Schlagrate kardialer Zellen auf dem MEA-Chip wird anhand des *Interspike-Intervalls* bestimmt. Die Grafik zeigt typische extrazelluläre Spannungssignale von kardialen Zellen, wie sie von einer Mikroelektrode aufgezeichnet werden, aufgetragen gegen die Zeit. Die Zeit zwischen zwei Spikes wird als *Interspike-Intervall* bezeichnet.

2.4.3. Signalausbreitungsgeschwindigkeit

Die Geschwindigkeit, mit der ein Aktionspotential beginnend im Schrittmacherzentrum über die Distanz des Elektrodenfelds propagiert, ist die *Conduction Velocity* (Ausbreitungsgeschwindigkeit). Da trotz der beinahe synchronen Rhythmik der Aktionspotentiale von Elektrode zu Elektrode kleine zeitliche Unterschiede von wenigen Millisekunden bestehen, kann der Verlauf der Reizweiterleitung über das Elektrodenfeld verfolgt werden (Abbildung 2.14). Dabei wird die endgültige Propagationsgeschwindigkeit vom Schrittmacherzentrum aus von einem Rand des Elektrodenfeldes zum anderen, entlang des Pfades der schnellsten Propagation, bestimmt (siehe Unterpunkt 3.7). Diese Weiterleitung von Aktionspotentialen findet über *Gap Junctions* statt. Es konnte gezeigt werden, dass besonders die Expression und post-translationale Modifikation von Connexin43 (Cx43) durch ionisierende Strahlung erhöht wird [76, 77]. Eine Exposition von ventrikulären Zellen aus Hasen mit Kohlenstoff-Ionen zeigte eine über 12 Monate erhöhte Cx43-Expression [78]. In zahlreichen experimentellen und klinischen Studien wurde berichtet, dass Veränderungen der Cx43-Organisation, -Expression und -Phosphorylierung an der Entstehung ventrikulärer Arrhythmien bei einigen pathologischen Zuständen wie Ischämie, Hypertrophie und Kardiomyopathie beteiligt sind [78-80].

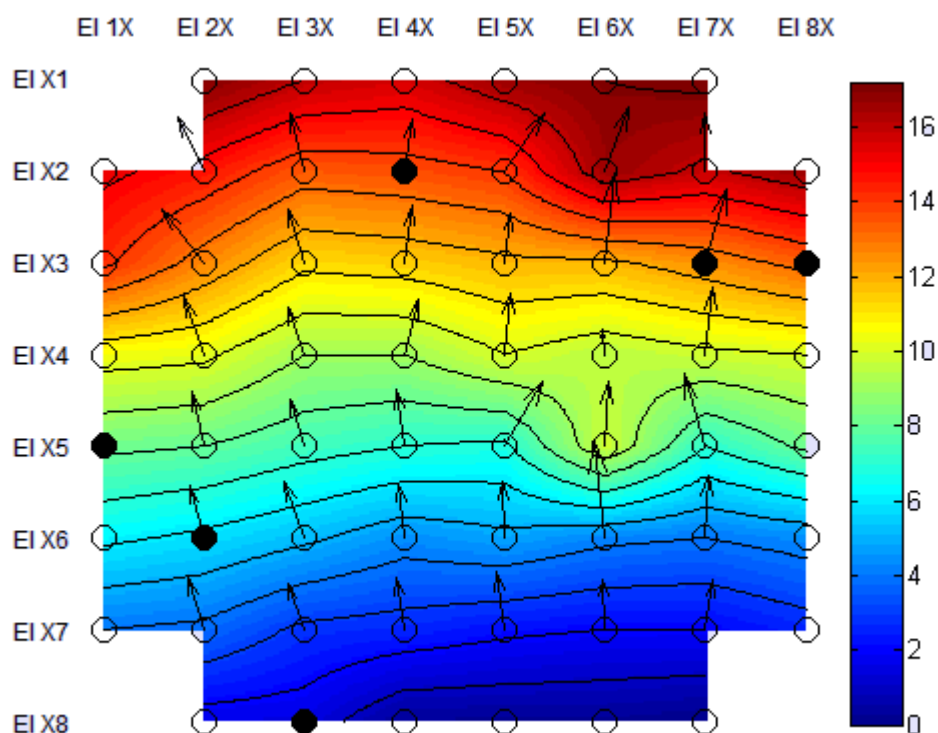


Abbildung 2.14: Die Signalausbreitungsgeschwindigkeit wird über die zeitliche Verschiebung eines Signals bestimmt. Das Falschfarbenbild zeigt die zeitlich verschobene Detektion eines Signals auf dem Elektrodenfeld. Das Signal tritt zuerst rechts unten auf dem Elektrodenfeld auf und erreicht 16 ms später oben rechts den gegenüber liegenden Rand des Elektrodenfeldes. Die eingebledeten Pfeile deuten die Richtung der Propagation an. Die schwarz gefärbten Elektroden wurden aus der vorliegenden Messung entfernt. Für Bereiche zwischen den Elektroden wurden die jeweiligen Werte per Extrapolation ermittelt.

2.4.4. Feldaktionspotentialdauer

Dieser Parameter gibt Aufschluss über die Dauer eines Signals und wird, wie schon in Kapitel 2.2.3 erläutert, mit dem QT-Intervall, wie es in EKG-Messungen bestimmt wird, gleichgesetzt. Die Feldaktionspotentialdauer reicht vom Beginn der Depolarisation bis zum Ende der Repolarisation, die sich in der charakteristischen T-Welle widerspiegelt (Abbildung 2.15). Unter Benutzung der *DrCell*-Software wird die fAPd anhand einer Überlagerung sämtlicher Feldaktionspotentiale einer Elektrode teilautomatisch bestimmt. Die Feldaktionspotentialdauer spielt eine wichtige Rolle in der Pharmakologie, da eine Vielzahl von Medikamenten und andere Stressoren Einfluss auf sie ausüben. Ein verlängertes QT-Intervall birgt das Risiko ventrikulärer Arrhythmien bis hin zur *Torsade de pointes* Tachyarrhythmie [50]. Entsprechend wird das Phänomen mit ventrikulärer Fibrillation (Kammerflimmern) und plötzlichem Herztod in Verbindung gebracht [49, 81].

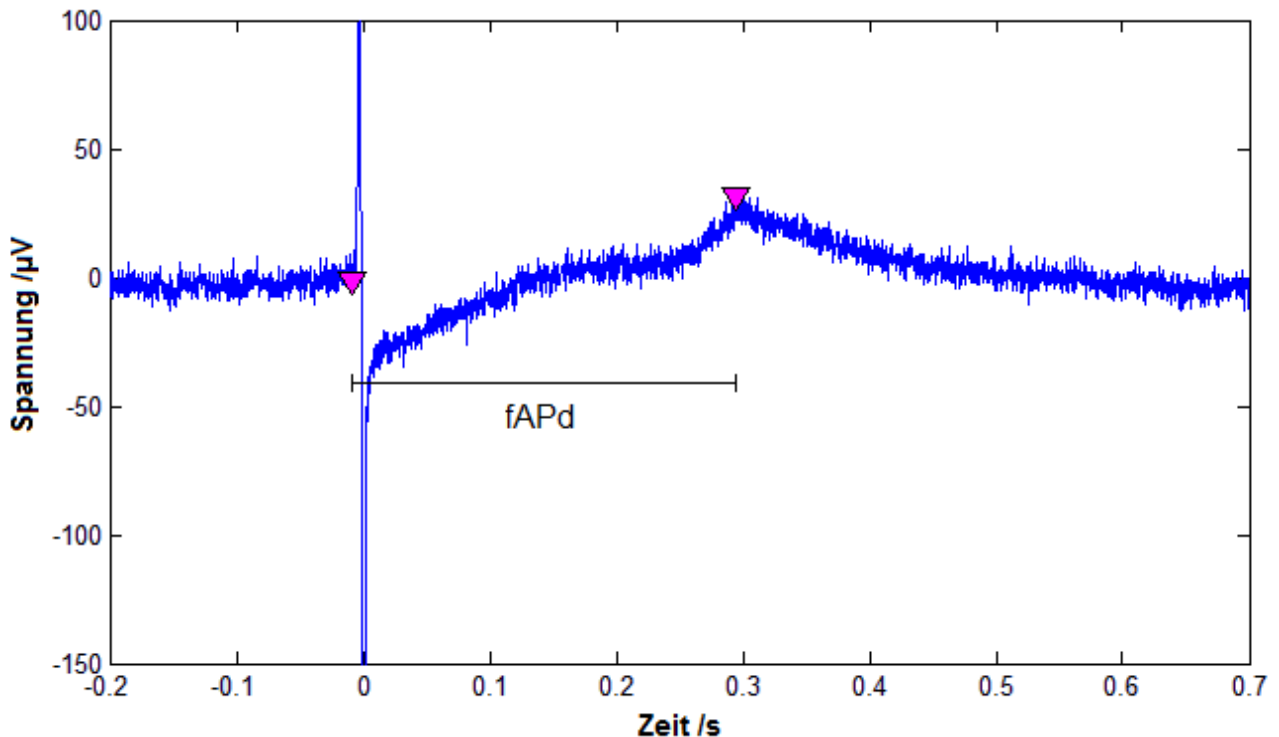


Abbildung 2.15: Die Feldaktionspotentialdauer reicht vom Beginn der Depolarisation bis zum Ende der Repolarisation. Dargestellt ist die Spannungsänderung während eines kardialen Signals, aufgetragen gegen die Zeit. Die Feldaktionspotentialdauer umfasst den Zeitbereich zwischen den roten Pfeilspitzen, beginnend beim Aufstrich zum Spike, der dem Aufstrich des Aktionspotentials entspricht, bis zum Maximum der T-Welle, die das Ende der Repolarisation darstellt.

Wie bei EKG-Messungen üblich, wird auch die gemessene Signaldauer gegen die Schlagfrequenz korrigiert, da die Dauer des QT-Intervalls, bzw. der fAPd, anti-proportional zum RR-Intervall, bzw. dem ISI ist. Eine hohe Schlagrate bedingt somit im gesunden Herz verkürzte QT-Intervalle, während eine niedrige Schlagfrequenz in verlängerten QT-Intervallen resultiert. Es gibt zahlreiche Modelle zur

Frequenzkorrektur von QT-Intervallen. Eine der ältesten dieser Methoden ist die Korrektur nach der Bazett-Formel [82]. Diese empirische Formel findet in adaptierter Form auch Anwendung in dieser Arbeit und wird in Abschnitt 3.10 näher erläutert. Manche alternative Formeln erweitern die Bazett-Formel um einen geschlechts- oder altersspezifischen Faktor [83], wieder andere verwenden anstatt der Quadratwurzel die dritte Wurzel [84]. Nichtsdestotrotz sind diese Formeln lediglich Annäherungen an das Verhältnis zwischen Schlagrate und Signaldauer, welches in der Praxis durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird, wie beispielsweise Stress, hormonelle Bedingungen, Gesundheitszustand und Alter des Patienten. Aus diesen Gründen kann das Verhältnis zwischen Schlagrate und Signaldauer nur schwer in einer in der klinischen Praxis anwendbaren Formel zusammengefasst werden.

2.4.5. Signalamplituden

Die mittels MEA-System zu messenden Amplituden geben Auskunft über die Kopplung zwischen den Zellen und der Elektrode. Hohe Amplituden stehen dabei für eine gute Kopplung. Ebenso lässt dieser Parameter Rückschlüsse über die Adhäsion auf der Elektrodenoberfläche zu. In der vorliegenden Arbeit spielt dieser Parameter jedoch eine untergeordnete Rolle. Die Signalamplituden dienen mehr noch als die Zahl aktiver Elektroden zur qualitativen Evaluierung der Kulturen. Kulturen, die für ein Experiment nicht geeignet sind, können bereits im Vorfeld anhand ihrer kleinen Amplituden erkannt und aussortiert werden.

2.5. Ionisierende Strahlung

Als ionisierende Strahlung werden diejenigen Strahlungen betrachtet, die in der Lage sind, aus den Atomen bestrahlter Materie Elektronen zu lösen. Bei diesem Prozess entsteht mindestens ein sekundäres Elektron, auch δ -Elektron genannt, während ein positiv geladenes Ion zurückbleibt [85]. Daher wird dieser Vorgang Ionisation genannt. Ionisierende Strahlung kann in Partikel- und elektromagnetische Strahlung unterteilt werden. Zur Partikelstrahlung zählen Elektronen, Protonen, Neutronen, α -Partikel und Schwerionen. Abgesehen von der Neutronenstrahlung sind alle diese Partikelstrahlungen direkt ionisierend. Elektromagnetische Strahlung wie Ultraviolett (UV)-, Röntgen- und γ -Strahlung hingegen wirkt indirekt ionisierend [86, 87]. Die verschiedenen Strahlungsarten werden später noch detailliert erläutert. Verfügt das einfallende Partikel über eine entsprechend hohe Energie, kann ein Atom mehrfach ionisiert werden. Die überschüssige Energie geht als kinetische Energie auf das Atom und die freiwerdenden Elektronen über. Bei entsprechender Energie können die Sekundärelektronen in Materie Bremsstrahlung erzeugen, die ebenfalls ionisierend wirkt. Ionisierende Strahlung kann chemische Bindungen aufbrechen, wodurch Radikale entstehen können. Die entstehenden Ionen sind bestrebt, die

verlorenen Elektronen zurückzugewinnen, und gehen daher Bindungen mit umliegenden Molekülen ein. Auf diesem Prinzip beruht die schädliche Wirkung ionisierender Strahlung auf biologische Systeme [88]. Biologische Moleküle gehen nach erfahrener Ionisation Reaktionen und Bindungen ein, durch die ihre Funktion eingeschränkt wird oder sogar verloren geht.

Die pro Masse (m) absorbierte Energie (E) gibt die aufgenommene Energiedosis (D) wieder, die in Gray (Gy) gemessen wird. Ein Gray entspricht nach Formel 2.1 einem Joule (J) pro Kilogramm (kg). Das Gray berücksichtigt allerdings nicht die unterschiedliche Wirkung verschiedener Strahlungen auf spezifische Gewebe. Die Äquivalentdosis (H) ist ein Maß für die biologische Wirkung einer Strahldosis. Sie wird über die Multiplikation der Energiedosis in Gray mit einem dimensionslosen Strahlenwichtungsfaktor (w_R) bestimmt [6]. Die Strahlenwichtungsfaktoren werden experimentell, bzw. durch detaillierte Computersimulationen bestimmt. Photonenstrahlung wie Röntgen- oder γ -Strahlung hat einen Strahlenwichtungsfaktor von 1, während Schwerionen und α -Teilchen unabhängig von der Energie einen Faktor von 20 haben. Die Einheit der Äquivalentdosis ist das Sievert (Sv) (Formel 2.2). Gleiche Äquivalentdosen verschiedener Strahlenarten rufen vergleichbare biologische Wirkungen hervor[89].

$$\text{Energiedosis: } D = \frac{E}{m}; \quad [D] = Gy = \frac{J}{kg} \quad \text{Formel 2.1}$$

$$\text{Äquivalentdosis: } H = D \cdot w_R; \quad [H] = Sv \quad \text{Formel 2.2}$$

Ein weiteres Maß der Strahlenwirkung stellt der Lineare Energietransfer (LET) dar. Der LET beschreibt die Menge abgegebener Energie eines ionisierenden Teilchens an das durchdrungene Material pro Längeneinheit (Formel 2.3) und wird in Kiloelektronenvolt pro Mikrometer (keV/ μ m) angegeben [85]. Der LET kann als indirektes Maß der Ionisationen entlang einer Wegstrecke, besonders für die Strahlenwirkung in biologischen Systemen, betrachtet werden. Je höher die Energie eines ionisierenden Teilchens, desto geringer ist die Interaktion mit dem umgebenden Medium und umso weiter wird sich das Teilchen bewegen, bevor es seine Energie durch Abgabe an das Medium verringert. Durch diese Energieverringerng reduziert sich wiederum auch der relative Abstand bis zur nächsten Interaktion mit dem Medium.

$$\text{Linearer Energietransfer: } LET = \frac{dE}{dx}; \quad [LET] = \frac{keV}{\mu m} \quad \text{Formel 2.3}$$

Strahlung kann in hoch- und niedrig-LET-Strahlung unterschieden werden. Dabei entspricht diese Unterteilung auch der Unterscheidung zwischen dicht und locker ionisierenden Strahlungen. Ein

weiterer Faktor, der dabei berücksichtigt werden muss, ist die Fluenz, also die Anzahl der Teilchen, die auf eine Fläche treffen. Die Fluenz (F) wird für gewöhnlich in Teilchen pro Quadratcentimeter ($1/\text{cm}^2$) angegeben. Entsprechend Formel 2.4 lässt sich über LET, Fluenz und die Dichte des bestrahlten Materials (ρ) die Dosis berechnen [85].

$$\text{Energiedosis: } D = 1,602 \cdot 10^{-9} \cdot \text{LET} \cdot F \cdot 1/\rho \quad \text{Formel 2.4}$$

2.5.1. Röntgenstrahlung

Die schwach ionisierende Röntgenstrahlung zählt zur elektromagnetischen Strahlung. Sie wurde 1895 von Wilhelm Conrad Röntgen entdeckt und trägt im Deutschen seinen Namen. In anderen Sprachen wird oft die Bezeichnung X-Strahlen verwendet, ein Name, den Röntgen selbst benutzte. Bei dieser Strahlung handelt es sich um Photonen mit Energien zwischen 5 und 100 keV und Wellenlängen zwischen 250 und 1 pm. Im elektromagnetischen Spektrum liegen Röntgenstrahlen zwischen ultraviolettem Licht und Gamma-Strahlen. Der Energiebereich zwischen Röntgen- und Gammastrahlung ist nicht klar getrennt. Anders als Gamma-Strahlung entsteht Röntgenstrahlung jedoch durch Elektronenprozesse innerhalb einer Röntgenröhre. Dort werden Elektronen aus einer Kathode mittels Hochspannung durch ein Vakuum auf eine Anode emittiert. Im Anodenmaterial, meistens Wolfram, werden die Elektronen dann gebremst, wodurch drei Strahlungsarten entstehen: die charakteristische Röntgenstrahlung, Röntgenbremsstrahlung und eine Übergangsstrahlung (Lilienfeldstrahlung). Die charakteristische Röntgenstrahlung entsteht durch die Ionisation der Atome in der Anode. Ein von der Kathode emittiertes Elektron trifft auf ein Elektron im Anodenmaterial und schlägt es aus der inneren Schale seines Atoms heraus. Ein Elektron einer äußeren Schale füllt die so entstandene Lücke und gibt dabei Energie in Form von Röntgenstrahlung ab. Die Bremsstrahlung entsteht durch kontinuierliche Abbremsung der Elektronen in der Anode, wobei ebenfalls Photonen abgestrahlt werden.

Die so entstandenen Röntgenstrahlen erzeugen dann wiederum Ionisationen in der bestrahlten Materie. Dies geschieht über die drei Prozesse Photoeffekt, Compton-Effekt und Paarbildung. Beim Photoeffekt trifft ein Röntgenquant auf ein im Atom gebundenes Elektron, welches die gesamte Energie des Photons absorbiert und aus seiner Elektronenschale geschlagen wird. Beim Compton-Effekt wird nicht die gesamte Energie absorbiert, das Photon wird an einem anderen Teilchen gestreut und gibt einen Teil seines Impulses ab. Bei der Paarbildung entsteht aus zwei Röntgenquanten mit ausreichend hoher Energie ein Elektronen-Positronen-Paar. Einzelne Photonen bringen nur einen geringen Energieeintrag in ein mikroskopisches Volumen ein, für eine bestimmte Energiemenge ist eine hohe Anzahl an Photonen notwendig. Dies führt zu einer gleichmäßigen räumlichen Verteilung der

eintreffenden Photonen und der entstehenden Sekundärelektronen. Diese homogene Verteilung wiederum führt zu einer homogenen Energiedosis-Verteilung, wie in Abbildung 2.16 dargestellt [90].

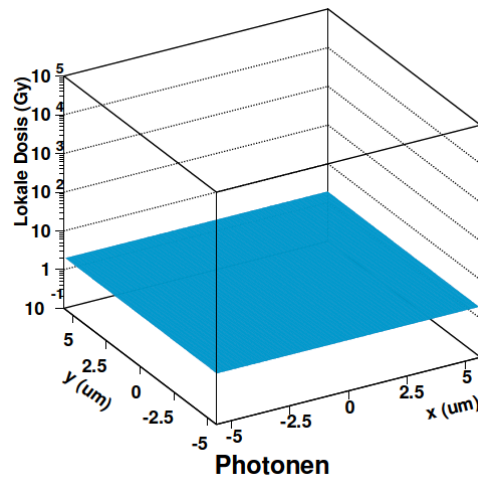


Abbildung 2.16: Die Dosisverteilung von Photonenstrahlung in einem mikroskopischen Volumen ist homogen. Die Photonenstrahlung wie z.B. Röntgenstrahlung weist anders als Bestrahlung mit Schwerionen in einem mikroskopischen Volumen eine homogene Energiedeposition auf [85].

2.5.2. Schwerionenstrahlung

Grundsätzlich werden alle ionisierenden Elemente, die schwerer als Helium bzw. α -Partikel sind, als Schwerionen bezeichnet. In der Natur wird diese Strahlung von Sternen emittiert. Das Leben auf der Erde wird jedoch durch seine Atmosphäre weitestgehend abgeschirmt. Um Schwerionen-Strahlung auf der Erde zu untersuchen, werden Teilchenbeschleuniger benötigt. Eine besondere Form stellt dabei ein Synchrotron oder Ringbeschleuniger dar, wie er von der Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI) in Darmstadt genutzt wird.

Ein Synchrotron besteht aus einem langen, geschlossenen Ringrohr, in dem ein Ultrahochvakuum herrscht. In diesem Vakuum werden die Ionen mit Hilfe von Ablenkmagneten, die über hochfrequente Wechselfelder gesteuert werden, auf extrem hohe Energien beschleunigt und dann auf ihr Ziel geschossen. Ionenstrahlung gehört zur Kategorie der dicht ionisierenden Partikelstrahlung. Der Hauptanteil der Energie wird entlang der Trajektorie des Partikels abgegeben. Die Wahrscheinlichkeit für Ionisationsereignisse nimmt mit zunehmender Distanz von der Trajektorie rapide ab. Diese lokal konzentrierte Energiedosis ist in Abbildung 2.17 schematisch dargestellt [85].

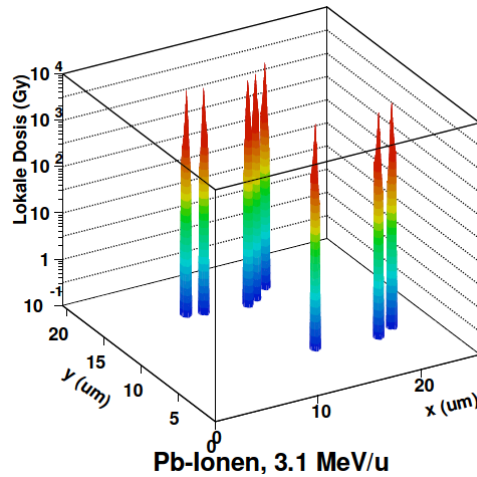


Abbildung 2.17: Die Dosisverteilung von Schwerionen in einem mikroskopischen Volumen ist inhomogen. Schwerionen weisen eine lokal konzentrierte Dosisverteilung auf. Entlang ihrer Flugbahn erreichen sie eine maximale Energiedeposition, die im Bereich von mehreren Größenordnungen liegt. Abseits der Ionentreffer ist die lokale Dosis null [85].

Nach dem Eindringen in Materie beginnt das Teilchen mit Atomen zu interagieren, indem es sie ionisiert, wodurch Sekundärelektronen entstehen. Dabei verlieren die Strahlenpartikel an Geschwindigkeit und Energie. Je langsamer das Partikel wird, umso wahrscheinlicher werden weitere Ionisationsereignisse entlang der Trajektorie. Somit erzeugt der Ionenstrahl entlang seiner Trajektorie eine dichte Ionisationsspur, die hauptsächlich durch Coulomb-Kräfte hervorgerufen wird [91]. Dies ist auch aus Abbildung 2.18 ersichtlich [92]. Dort werden im Querschnitt die Ionisationsspuren von 1 MeV Protonen und Kohlenstoff-Ionen in Wasser verglichen. Die Unterschiede in den gezeigten Ionisationsspuren sind auf den höheren LET der Kohlenstoff-Ionen zurückzuführen.

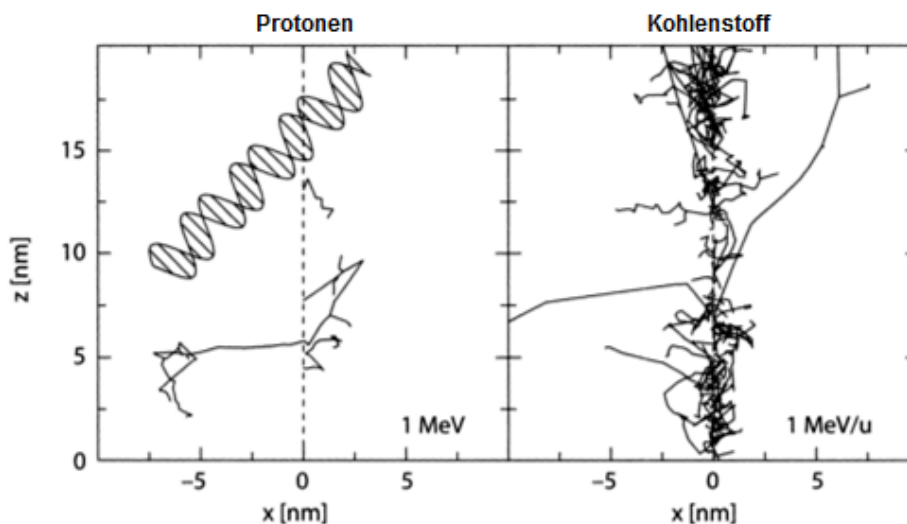


Abbildung 2.18 Kohlenstoff-Ionen haben eine deutlich dichtere Ionisationsspur als Protonen bei 1 MeV Energie in Wasser. Bei gleicher Energie erzeugen Kohlenstoff-Ionen deutlich mehr Sekundärelektronen als ein Protonenstrahl. Der schematisch dargestellte DNA-Strang ist maßstabsgetreu (modifiziert nach [92]).

Die maximale Reichweite der erzeugten δ -Elektronen ist im Vergleich zum Primärpartikel gering und direkt proportional zur Energie des Primärstrahls. Mit sinkender Geschwindigkeit des Primärteilchens erhöht sich auch die Energie, die es deponiert. Bei der maximalen Reichweite wird schließlich ein Großteil der Anfangsenergie abgegeben. Dieses Maximum der Energiedeposition wird *Bragg-Peak* genannt. Abbildung 2.19 zeigt beispielhaft die Tiefenprofile von Kohlenstoff-Ionen mit unterschiedlichen Energien. Aufgrund dieses Tiefendosisprofils finden Protonen- und Ionenstrahlungen Anwendung in der Tumorthherapie. Tiefliegende Tumore können gezielt mit hohen Dosen bestrahlt werden, während das umliegende gesunde Gewebe weitestgehend verschont bleibt [85].

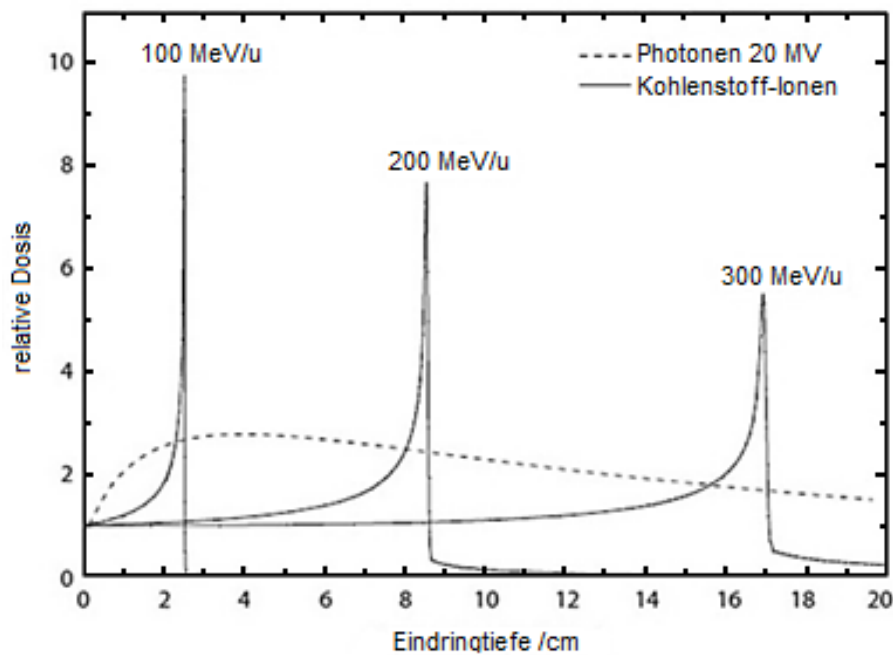


Abbildung 2.19: Kohlenstoff-Ionen mit unterschiedlichen Energien geben die meiste Energie in einem Punkt ab. Die Energieabgabe von Kohlenstoff-Ionen bildet einen *Bragg-Peak*. Mit steigender Energie erhöht sich auch die Eindringtiefe, während sich die Energiedisposition im *Peak* reduziert. Photonen hingegen deponieren ihre Energie relativ gleichmäßig im umliegenden Medium und erreichen die höchste Dosis wenige Zentimeter nach dem Eindringen [85].

Für die Tumorthherapie werden zusätzlich noch die Eingangsenergien variiert, was zu einer Verschiebung des *Bragg-Peaks* führt. In der Überlagerung der einzelnen im Gewebe deponierten Energien entsteht dadurch ein ausgeweiteter *Bragg Peak*, auch *spread-out Bragg Peak* (SOBP) oder *extended Bragg Peak* genannt (Abbildung 2.20) [85]. Mit dem SOBP können Tumore entsprechend ihrer räumlichen Tiefenausdehnung ganzheitlich bestrahlt werden. Dabei werden meist über mehrere Tage fraktionierte Bestrahlungen durchgeführt.

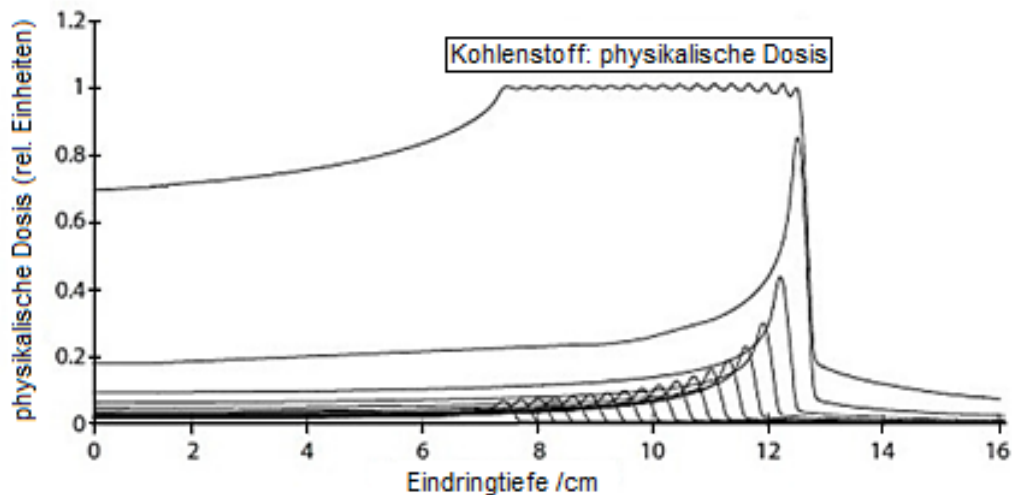


Abbildung 2.20: Der *Spread-out Bragg Peak* entsteht durch die Überlagerung von Bragg-Peaks mit verschiedenen Energien. Über die Variation der Initialenergien von Ionen verschiebt sich der *Bragg Peak*, was eine Verlängerung des Bereichs der maximalen Dosis mit sich bringt (modifiziert nach [85]).

2.5.3. Kosmische Strahlung

Unter den Sammelbegriff der kosmischen Strahlung fallen verschiedene Arten von Partikelstrahlung unterschiedlicher Herkunft. Dabei werden Solarstrahlung (*solar cosmic rays*, SCR), galaktische (*galactic cosmic rays*, GCR) und extragalaktische Strahlung unterschieden. Zur SCR zählen dabei die Strahlen der Sonnenwinde und der Sonneneruptionen, die sich größtenteils aus Protonen-, Elektronen- und α -Partikel-Strahlung mit hoher Teilchenstromdichte zwischen $10^7/\text{cm}^2\text{s}$ und $10^{10}/\text{cm}^2\text{s}$ zusammensetzen. Die Strahlung von Sonneneruptionen erreicht dabei Energien um 10 MeV. Galaktische Strahlung hingegen zeichnet sich durch geringere Teilchenstromdichte, Energien über einem Gigaelektronenvolt und einen Anteil von schweren Ionen aus. Die extragalaktische Strahlung schließlich ist charakterisiert durch ihre immense Energie von bis zu 10^{14} MeV und einer extrem niedrigen Teilchenstromdichte von $10^{-24}/\text{cm}^2\text{s}$.

Die GCR setzt sich zu 87% aus Protonen, 12% α -Teilchen und 1% Schwerionen zusammen. Dabei entspricht die Häufigkeitsverteilung der Atomkerne in etwa der solaren Elementhäufigkeit. Das elementare Spektrum reicht in der GCR von Wasserstoff bis hin zu Uran. Atomkerne schwerer als Eisen sind allerdings selten. Obwohl Schwerionen nur einen geringen Anteil der kosmischen Strahlung ausmachen, stellen sie aufgrund ihres hohen Ionisationspotentials dennoch für Astronauten ein größeres Risiko dar als Protonen.

Abbildung 2.21 veranschaulicht die Beteiligung von Ionen an der kosmischen Strahlung in Hinblick ihrer Ladungszahl.

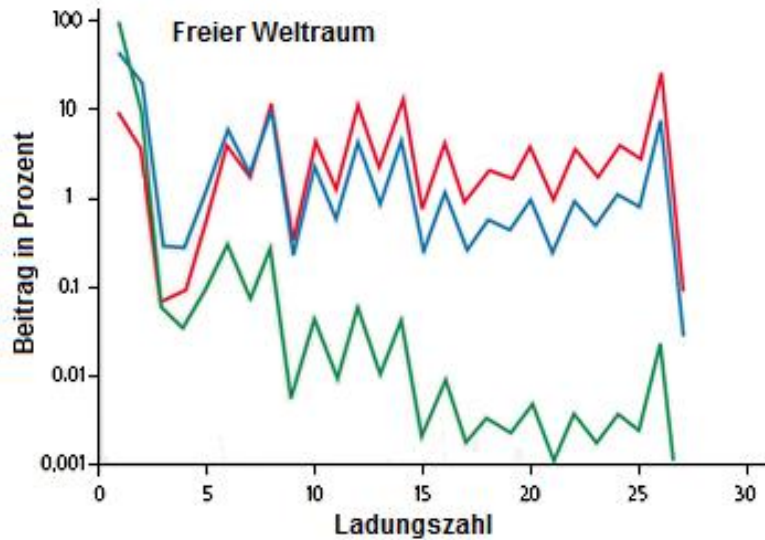


Abbildung 2.21: Schwerionen tragen trotz minimalem Anteil an der Fluenz maßgeblich zur Dosisbelastung im Weltraum bei. Dargestellt sind die Fluenz (grün), die Energiedosis (blau) und die Äquivalentdosis (rot). Die Gesamtheit der Schwerionen trägt einen größeren Anteil zu den drei angegebenen Parametern bei als die häufiger vorkommenden Protonen und α -Teilchen (modifiziert nach [6]).

Astronauten sind im interplanetaren Weltall einer täglichen Ganzkörperdosis von 1-2 mSv ausgesetzt, wohingegen sich auf einer planetaren Oberfläche wie der des Mars oder des Mondes eine Tagesdosis von 0,5 -1 mSv akkumuliert [6, 7]. Die durchschnittliche Strahlendosis auf der Erde liegt beispielsweise in Deutschland zwischen 1 und 5 mSv pro Jahr. Dabei hat die kosmische Strahlung einen Anteil von etwa 300 μ Sv.

2.6. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Erforschung der Einflüsse ionisierender Strahlung auf die elektrophysiologischen Eigenschaften kardialer Zellen. Untersucht werden sollten sowohl Einflüsse von dünn-ionisierender Röntgenstrahlung als auch dicht-ionisierender Schwerionen-Strahlung. Hierzu sollten zum einen die für die Strahlentherapie wichtigen Kohlenstoff-Ionen in einem *spread-out Bragg Peak* als auch schwerere Ionen mit höheren Energien eingesetzt werden, welche in der kosmischen Strahlung vorkommen und somit für die Weltraumforschung und insbesondere für die bemannte Raumfahrt von Interesse sind.

Für diese Untersuchungen sollten zwei kardiale Zellsysteme verwendet werden, zum einen primäre Zellen, isoliert aus den Herzen von Hühnerembryonen der Art *Gallus gallus*, und zum anderen humane aus induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) differenzierte Kardiomyozyten. Erstere zeichnen sich durch ihre einfache Handhabung, Zuverlässigkeit und Zugänglichkeit aus. Außerdem handelt es sich beim Haushuhn um einen der entwicklungsbiologisch am besten untersuchten und charakterisierten

Modellorganismen. Die hiPSC-Kardiomyozyten hingegen haben den Vorteil der Übertragbarkeit, denn in zahlreichen Studien wurde bereits die Ähnlichkeit der induzierten Kardiomyozyten zu denen adulter Menschen beschrieben [93-97].

Während elektrophysiologische Assays schon häufig in der Pharmakologie eingesetzt werden, sind solche Anwendungen in der Strahlenbiologie fast gar nicht vertreten. So ist es nicht verwunderlich, dass nur wenig über potentielle direkte Strahleneffekte auf die Elektrophysiologie kardialer Myozyten bekannt ist. Daher sollte der potentielle Einfluss ionisierender Strahlung auf Kardiomyozyten *in vitro* in dieser Arbeit untersucht werden. Die am häufigsten verwendeten Methoden wie das Langendorff-Herz oder der Patch-Clamp-Assay bieten entweder Einblicke in das ganze Organ oder auf Ebene der einzelnen Zelle [53]. Die MEA-Technologie ermöglicht stattdessen als nicht-invasive Methode die *in vitro*-Untersuchung eines funktionellen, kardialen Synzytiums über einen längeren Zeitraum und sollte daher für diese Arbeit eingesetzt werden, um sowohl Rate und Form der gemessenen Feldaktionspotentiale nach Bestrahlung zu untersuchen, als auch eventuelle Veränderungen der Signalweiterleitung zu analysieren. Zusätzlich zum Einfluss der Bestrahlung auf die Elektrophysiologie der Kulturen sollte weiterhin auch der kombinierte Effekt von kardio-aktiven Medikamenten und ionisierender Strahlung auf die Kardiomyozytennetzwerke untersucht werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten in das übergeordnete Verbundprojekt mit einfließen, in dem begleitend als weitere Endpunkte die Induktion von DNA-Schäden und deren Reparatur untersucht wurden, außerdem die Zellzykluspropagation, die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) und die Induktion von Apoptosen als strahlenbiologische Endpunkte. Gemeinsam mit dieser Arbeit sollte das Projekt so die Risikoabschätzung bezüglich der Strahlenwirkung auf das kardiovaskuläre System in Hinblick auf die bemannte Raumfahrt sowie die Strahlentumorthérapie unterstützen.

3. Material & Methoden

Im Folgenden werden die in der Forschungsarbeit verwendeten Materialien und Methoden beschrieben. Dabei werden zunächst die Materialien aufgelistet und anschließend die Arbeitsschritte der Zellkultur, beginnend von Beschichtung über Präparation, Aussaat und Medienwechsel bis hin zur Fixierung erläutert. In den Abschnitten 3.6 und 3.7 wird auf die Ableitung elektrophysiologischer Signale mittels MEA-System und die anschließende Auswertung eingegangen. Das Kapitel schließt mit den Parametern der Röntgen- bzw. Schwerionenbestrahlung und schließlich einer Erläuterung der angewendeten Statistik in Abschnitt 3.10.

3.1. Materialliste

In den folgenden Tabellen 3.1bis 3.6 sind die in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Chemikalien, in der Zellkultur verwendeten Lösungen, Medienzusätze und Verbrauchsmaterialien, Kits und Enzyme, sowie Software aufgeführt. Die Tabellen beinhalten ebenfalls die Materialien für die im Rahmen des Verbundprojektes ergänzend durchgeführten Versuche.

Tabelle 3.1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav DB-23	Systec, Linden
CO ₂ -Inkubator C-150	Binder GmbH, Tuttlingen
Dosimeter Diados	PTW, Freiburg
Dosimeter SN4	PTW, Freiburg
Feinwaage PCB 350-3	Kern und Sohn GmbH, Batlingen
Fluoreszenzmikroskop <i>Eclipse</i> Ti	Nikon, Düsseldorf
Gefahrstoffabzug Delta System 30	Wesemann, Syke
Kühlschrank mit Tiefkühlfächern	Bosch, Nürnberg
Laborzentrifuge Labofuge 400R	<i>Thermo Scientific</i> , Langenselbold
Laminar Flow-Werkbank (B-[Max-Pro] ² -130)	Berner, Elmshorn
MEA-Chips, 60 TiN 200/30	<i>Multichannel Systems</i> , Reutlingen
MEA-Chips, 6-Well	<i>Multichannel Systems</i> , Reutlingen
MEA-Chips, High Density	<i>Multichannel Systems</i> , Reutlingen
Mikroskop Labovert FS	<i>Leica Microsystems</i> , Wetzlar
Mixer Mini Vortex	VWR, Darmstadt
Neubauer <i>improved</i> Zählkammer	Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen

PC-Einsteckkarte PCI 6255	National Instruments Germany GmbH, München
Photometer <i>Biomate3</i>	Thermo Scientific, Dreieich
Präparationswerkbank HWB 130	Berner, Elmshorn
Röntgenröhre Isovolt DS1	Seifert, Mannheim
Röntgenröhre MCN 165/798704	Philips, Hamburg
Ultraschallsonde SONOPULS GM 70	Bandelin, Berlin
Vorverstärker MEA1060	<i>Multichannel Systems</i> , Reutlingen
Wasserbad	Memmert, Schwabach

Tabelle 3.2: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
BM-Flüssig	Biomed, Oberschleißheim
Chinidin	Sigma Aldrich, München
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Isoproterenol	Sigma Aldrich, München
Trypanblau	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Ultrasonol 7	Roth, Karlsruhe

Tabelle 3.3: In der Zellkultur eingesetzte Lösungen und Medien

Medium / Lösung	Bezugsquelle
<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Sigma, Taufkirchen oder c.c.pro, Oberdorla
Fibronectin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
<i>Ham's F12</i>	Sigma, Taufkirchen oder c.c.pro, Oberdorla
<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> (HBSS)	Sigma, Taufkirchen oder c.c.pro, Oberdorla
<i>iCell Cardiomyocyte Maintenance Medium</i> TM	<i>Cellular Dynamics, Madison, WI, USA</i>
<i>iCell Cardiomyocyte Plating Medium</i> TM	<i>Cellular Dynamics, Madison, WI, USA</i>
<i>iCell Cardiomyocytes</i> TM	<i>Cellular Dynamics, Madison, WI, USA</i>
<i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	Sigma, Taufkirchen oder c.c.pro, Oberdorla
1 × Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%)	Sigma, Taufkirchen oder c.c.pro, Oberdorla

Tabelle 3.4: Zusätze zum Kulturmedium

Zusatz	Bezugsquelle
2% <i>Chicken Serum</i> (CS)	Sigma, Taufkirchen oder c.c.pro, Oberdorla
10% Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma, Taufkirchen oder c.c.pro, Oberdorla
200 mM L-Glutamin	c.c.pro, Oberdorla
0,1% Penicillin/Streptomycin 1000 U/mL; 1000 µg/mL	c.c.pro, Oberdorla

Tabelle 3.5: In der Zellkultur verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Parafilm	Roth, Karlsruhe
Petrischalen Ø 3,5, 90 mm	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen 10, 100, 200, 1000 µL	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen 2, 5, 10, 20 mL	Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße 1,5 mL	Roth, Karlsruhe
T25 Zellkulturflaschen	Greiner, Frickhausen
Zellsieb Porengröße: 0,4 µm	BD Biosciences, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen 15, 50 mL	Roth, Karlsruhe

Tabelle 3.6: Verwendete Software

Software	Hersteller
<i>Dr. Cell</i>	<i>BioMEMS Lab, Aschaffenburg</i>
<i>Excel 2010</i> TM	<i>Microsoft, Redmond, WA, USA</i>
<i>GraphPad Prism</i> TM (3.02)	<i>GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA</i>
<i>LabView</i> TM 8.6	<i>National Instruments, Austin, TX, USA</i>
<i>MATLAB</i> TM R2011b	<i>Mathworks, München</i>
<i>MEA-Recorder 1.13</i>	<i>BioMEMS Lab, Aschaffenburg</i>
<i>NIS Elements</i> TM (3.22)	<i>Nikon, Düsseldorf</i>

3.2. Beschichtung mit Fibronektin

Um den ausgesäten Zellen eine adäquate Adhäsion zu ermöglichen, werden die MEA-Chips und die 15 mm-Coverslips vor Aussaat der Zellen mit Fibronektin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) beschichtet. Hierzu wird das Protein auf die zu beschichtende Oberfläche pipettiert und anschließend für mindestens 3 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Danach werden die MEA-Chips und Coverslips dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und für mehrere Tage im Inkubator getrocknet, um ein späteres Verlaufen der ausgesäten Zellsuspension zu vermeiden.

3.3. Reinigung der MEA-Chips

MEA-Chips können nach abgeschlossenem Experiment mehrfach wiederverwendet werden. Zum Reinigen der MEA-Chips werden die Chips mit dem Detergens Ultrasonol 7 befüllt und für 45 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend werden die Chips in destilliertem Wasser gewaschen und mit 3% BM-Flüssig befüllt, um während 45-minütiger Inkubation bei RT Rückstände zu entfernen. Danach werden die Chips in 70% Ethanol und destilliertem Wasser gewaschen. Vor Wiederverwendung der Chips werden erneut Waschgänge mit 70% Ethanol und destilliertem Wasser durchgeführt, gefolgt von einer 45-minütigen UV-Sterilisation.

3.4. Kultivierung primärer, embryonaler Kardiomyozyten aus dem Huhn (*Gallus gallus*)

Zur Kultivierung zweidimensionaler, schlagender, primärer Kardiomyozytennetzwerke werden die Hühnerembryonen 8 Tage nach Befruchtung und Bebrütung aus den Eiern isoliert. Die Embryonen werden dekapitiert und ihre Herzen in vorgekühltem *Ham's F12* gesammelt. Die Koronargefäße werden mit einer Mikroschere entfernt und verbleibendes Blut mit F12 ausgespült. Die Herzen werden in 1 mL *Hank's balanced salt solution* (HBSS) zerkleinert. Das zerkleinerte Gewebe wird in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt und mit HBSS gewaschen. Anschließend wird das Gewebe enzymatisch dissoziiert. Für die erste Zellfraktion werden 8 mL 1×Trypsin/EDTA zur Suspension hinzugegeben und für 5 min unter sanftem Schwenken inkubiert, gefolgt von 5 min Inkubation bei 37 °C. Der Überstand der ersten Zellfraktion wird verworfen, da er größtenteils nicht kontraktile Zellen wie Fibroblasten enthält. Für alle folgenden Zellfraktionen werden 3,5 mL 1×Trypsin/EDTA hinzugefügt und die Suspension für je 4 min vorsichtig invertiert und danach je 4 min bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wird dann in 15 mL vorgewärmtem Kulturmedium gesammelt, um das Trypsin abzustoppen. Diese Prozedur wird so lange wiederholt, bis das Gewebe vollständig dissoziiert ist. Um verbliebene Zellklumpen zu entfernen, wird die Suspension mit einem Zellsieb (Porengröße: 0,4 μm) gefiltert. Die

gefilterte Suspension wird anschließend in einer Zentrifuge bei $150 \times g$ für 10 min pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 13 mL vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert. Um die Zahl nicht-kontraktile Zellen wie Epithelzellen und Fibroblasten zu verringern, wird die Suspension in eine Kulturflasche transferiert und für 1 h liegend, bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5% CO_2 inkubiert. Eine vollständige Entfernung von Fibroblasten ist dabei nicht angestrebt, da diese für die Ausbildung eines funktionalen Kardiomyozytennetzwerks benötigt werden [98]. Anschließend wird das nun hauptsächlich Kardiomyozyten enthaltende Medium abgesaugt und dessen Zelltitel mit einer Neubauer-*improved*-Zählkammer bestimmt und eingestellt. Die Zellen werden dann auf fibronectinbeschichteten MEA-Chips oder 15 mm-Glascoverslips zu bestimmten Zelldichten ausgesät. Auf die Elektrodenfelder der MEA-Chips wird je ein $100\text{ }\mu\text{L}$ -Tropfen der Zellsuspension mit 6×10^5 Zellen gegeben, während die Coverslips in 24-Well-Zellkulturplatten mit einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen/mL besät werden. Die besäten MEA-Chips werden für 2 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5% CO_2 inkubiert, um eine bessere Adhäsion und Aggregation der Zellen zu gewährleisten, ehe die Kavitäten mit 1 mL Kulturmedium aufgefüllt werden. Der erste vollständige Mediumwechsel erfolgt 48 h nach der Präparation. Medienwechsel werden täglich mindestens 1 h vor elektrophysiologischen Messungen durchgeführt, um eine möglichst stabile Kontraktionsfrequenz zu gewährleisten. Experimente an den so präparierten Zellen beginnen stets 3 Tage nach Präparation.

3.5. Kultivierung der aus hiPSC differenzierten Kardiomyozyten

Zur Kultivierung der aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) differenzierten Kardiomyozyten wird je Versuch ein Cryoröhrchen mit tiefgefrorenen *iCell Cardiomyocytes*TM für 4 min in einem auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgewärmten Wasserbad aufgetaut und in ein 50 mL-Zentrifugenröhrchen überführt. Das Cryoröhrchen wird vorsichtig mit 1 mL *iCell Cardiomyocyte Plating Medium*TM gespült und dieses Medium dann über 90 s vorsichtig tropfenweise der Zellsuspension hinzugefügt. Anschließend werden weitere 8 mL *Plating Medium* vorsichtig über 30 s hinzugegeben. Nach zwei- bis dreimaligem Invertieren des Röhrchens wird der Zelltitel mit einer Neubauer-*improved*-Zählkammer unter Anwendung einer Trypanblau-Färbung bestimmt.

Währenddessen wird die Zellsuspension für 5 min bei $150 \times g$ in einer Zentrifuge sedimentiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet zu einer Zelldichte von 8×10^6 Zellen/mL resuspendiert. Anschließend erfolgt die Aussaat der Zellen auf den Elektrodenfeldern der MEA-Chips oder auf Glascoverslips in $4\text{ }\mu\text{L}$ -Tröpfchen zu je 32.000 Zellen. Die MEA-Chips werden in Petrischalen (Durchmesser: 90 mm) aufbewahrt. Um Evaporation vorzubeugen, wird vor Aussaat der Zellen in jede Petrischale ein mit sterilem Wasser angefeuchtetes Tuch hinzugegeben. Als nächstes werden die ausgesäten Zellen 1 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5% CO_2 inkubiert, um eine bessere Adhäsion und Aggregation der Zellen zu gewährleisten. Nach der Inkubation werden die Kavitäten der MEA-Chips vorsichtig mit 1 mL

Plating Medium befüllt. Danach werden die Zellen weitere 48 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert, bevor auf *iCell Cardiomyocyte Maintenance Medium*TM gewechselt wird. Täglich erfolgt ein halber Mediumwechsel mit *Maintenance Medium*. Sämtliche Experimente beginnen 5 Tage nach Aussaat. Medienwechsel werden stets nach Abschluss der täglichen Messungen durchgeführt, um einer Beeinflussung der elektrophysiologischen Messungen durch Medienzugabe vorzubeugen.

3.6. Ableitung elektrophysiologischer Signale mittels MEA-System

Die Zellen werden auf fibronectinbeschichteten MEA-Chips kultiviert und bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die standardmäßig verwendeten MEA-Chips weisen 60 Titannitrid-Mikroelektroden mit einem Durchmesser von 30 µm auf. Die Elektroden sind in einem 8×8-Array angeordnet. Der Abstand zwischen zwei Elektroden entspricht 200 µm. Die Leiterbahnen sind aus Titan gefertigt und verlaufen 500 µm unterhalb der Glassubstratoberfläche. Ein Glasring umgibt das Elektrodenfeld und erlaubt das Einfüllen von bis zu 1,7 mL Kulturmedium (Abbildung 3.1). Zu den anderen gelegentlich verwendeten MEA-Chips zählen *Multi-Well*- und *High-Density*-Chips. Die Elektroden der *Multi-Well*-Chips liegen in sechs Kavitäten jeweils in einer 3×3-Konfiguration vor. Die Elektroden der *High-Density*-Chips sind in zwei 5×6-Arrays angeordnet, der Elektrodendurchmesser beträgt hier 10 µm bei Abständen von 30 µm. Die Elektroden und Leiterbahnen dieser Chips sind aus Indium-Zinnoxid gefertigt.

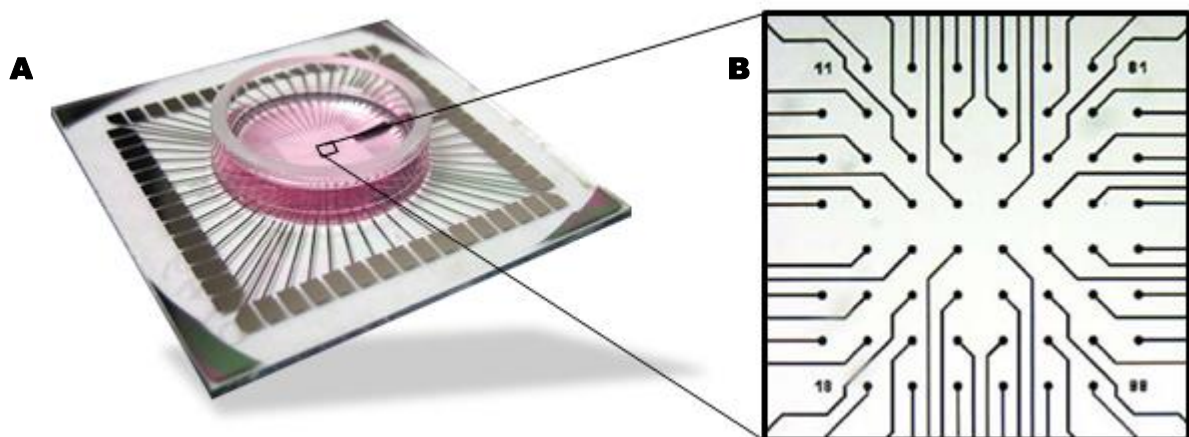


Abbildung 3.1: Der Standard-MEA-Chip verfügt über eine Kavität und 60 Mikroelektroden in einer 8×8-Anordnung. (A) Beim Standard-MEA liegen entlang der Außenkanten 60 Kontaktpads, die über Leiterbahnen mit den Elektroden im Zentrum der durch einen Glasring begrenzten Kavität verbunden sind. (B) die Elektroden messen einen Durchmesser von 30 µm und sind in einer 8×8-Konfiguration mit einem Interlektrodenabstand von 200 µm angeordnet.

Je nach Zellsystem können 3-5 Tage nach Aussaat die ersten Experimente begonnen werden. Für die Ableitung elektrophysiologischer Signale werden die MEA-Chips in den Messkopf des MEA-Systems eingesetzt (Abbildung 3.2.). Dabei wird über einen Temperaturregler die Kultur bei 37°C gehalten. Die Kontaktpads des Chips werden über die im Deckel des Messkopfes befindlichen Federkontakte kontaktiert und die kardialen Signale über einen MEA-1060-Vorverstärker weitergeleitet. Über eine Platine und eine PCI 6255-PC-Einsteckkarte können diese Signale dann in einer LabView™-basierten MEA-Rekorder-Software dargestellt werden [99, 100]. Die Aufnahmen werden jeweils für 1 min mit einer Abtastrate von 1 kHz durchgeführt. Die weitere Auswertung der aufgezeichneten Messungen erfolgt mit der in der BioMEMS-Arbeitsgruppe eigens entwickelten MATLAB™-basierten Software Dr.Cell [101].

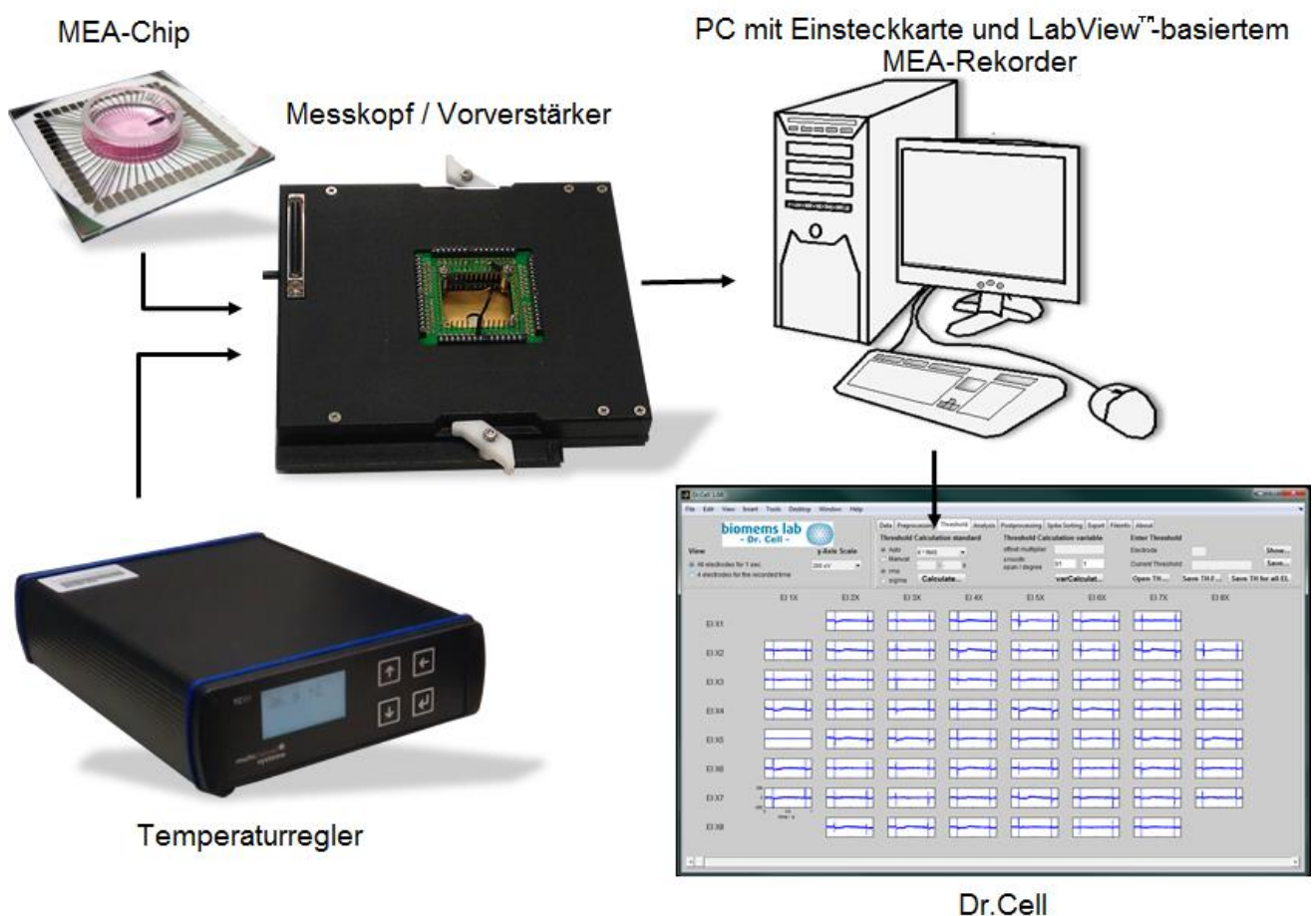


Abbildung 3.2: Das MEA-System besteht aus mehreren zur Aufzeichnung und Auswertung benötigten Komponenten. Ein MEA-Chip mit der darauf kultivierten Zellkultur wird in den Messkopf des Systems eingesetzt und über den Temperaturregler bei 37°C gehalten. Die Signale werden vorverstärkt und an die PCI 6255-Platine weitergeleitet. Am PC werden die Signale über den LabView™-basierten MEA-Rekorder aufgenommen und anschließend mittels der MATLAB™-basierten Software Dr.Cell ausgewertet.

3.7. Auswertung elektrophysiologischer Messdaten mittels *Dr.Cell*

Nach Aufnahme der elektrophysiologischen Messungen werden diese mit dem Programm *Dr.Cell* ausgewertet. Diese Software dient ausschließlich der *Offline*-Auswertung elektrophysiologischer Signale, die mittels MEA-System aufgenommen wurden. Dabei eignet sich *Dr.Cell* sowohl für die Auswertung kardialer als auch neuronaler Signale. Zunächst muss für jede Elektrode einer Messung der Spannungsschwellwert (*Threshold*) bestimmt werden. Der *Threshold* dient der Erkennung von Signalausschlägen (*Spikes*). Jeder *Spike*, der den *Threshold* überschreitet, wird vom Programm als solcher erkannt und der entsprechende Zeitpunkt innerhalb der Messung als sogenannter *Timestamp* gespeichert. Um die *Thresholds* festzulegen, stehen dem Benutzer mehrere Methoden zur Auswahl. Bei der Auswertung kardialer Signale eignet sich das quadratische Mittel, die *Root-Mean-Square*-Methode (RMS) am besten zur *Threshold*-Bestimmung. Die Wurzel der mittleren quadrierten Rauschamplitude einer Elektrode wird mit einem vom Benutzer gewählten Faktor multipliziert. Dieser Wert entspricht dem vom Programm für jede Elektrode berechneten *Threshold*. Zusätzlich können *Thresholds* auch manuell für einzelne oder mehrere Elektroden festgelegt werden. Diejenigen Elektroden, die in der Messung keine *Spikes* zeigen und sich als defekt erweisen, und die Referenzelektrode werden aus der Messung getilgt, wie in den Abbildung. 3.3A-C veranschaulicht. Nach dem Festlegen aller *Thresholds* können diese in einer gesonderten Datei gespeichert werden. Als nächstes folgt der Analyse-Schritt, in welchem *Dr.Cell* die *Spike*-Erkennung durchführt. Hierzu wird eine Refraktärzeit von 200 ms eingestellt. Wenn das Programm nach der Analyse sämtliche *Spikes* auf allen verbliebenen Elektroden erkannt hat, kann mit der tatsächlichen Auswertung begonnen werden.

Hierzu wird dem Benutzer eine Vielzahl verschiedener Optionen zur Auswahl gestellt. *Dr.Cell* berechnet für die Parameter Schlagrate, positive- und negative Amplitude, den Mittelwert, die Standardabweichung und den Median, sowohl für einzelne als auch für alle aktiven Elektroden. Weiterhin gibt das Programm die Zahl der in der aktuellen Messung aktiven Elektroden an. Für die Bestimmung der Feldaktionspotentialdauer erstellt *Dr.Cell* eine Überlagerung aller *Spikes* einer Elektrode. Dies erlaubt dem Benutzer eine Elektrode auszuwählen, die gut erkennbare T-Wellen aufzeigt. Dann können die charakteristischen Punkte des Q-Zacken und der T-Welle manuell markiert werden, woraufhin das Programm die Feldaktionspotentialdauer bestimmt (Abbildung. 3.3D links).

Für die Bestimmung der Geschwindigkeit, mit der ein kardiales Signal von einem Schrittmacherzentrum über das Elektrodenfeld propagiert, kann der Nutzer sich alle gemessenen Schlagereignisse in einzelnen Falschfarbenbildern anzeigen lassen. In diesen Abbildungen werden die *Timestamps* eines *Spikes* farblich dargestellt, die *Timestamps* der Interelektrodenbereiche werden extrapoliert. Der Benutzer wählt diejenigen Ereignisse aus, die ihren Ursprung im selben Schrittmacherzentrum haben, dem gleichen Propagationspfad folgen, vergleichbare Propagationsgeschwindigkeiten aufweisen und daher in die Evaluation mit einbezogen werden sollen. Mittels der

Falschfarbenbilder kann der Nutzer anschließend, wie in Abbildung 3.3D rechts dargestellt, einen Signalpfad durch das Elektrodenfeld legen. Anhand dieses Pfades gibt *Dr.Cell* dann die Signalweiterleitungsgeschwindigkeit mit dem Mittelwert, der Standardabweichung und dem Median an. Die statistische Auswertung wird mittels *Microsoft Excel*[™] durchgeführt.

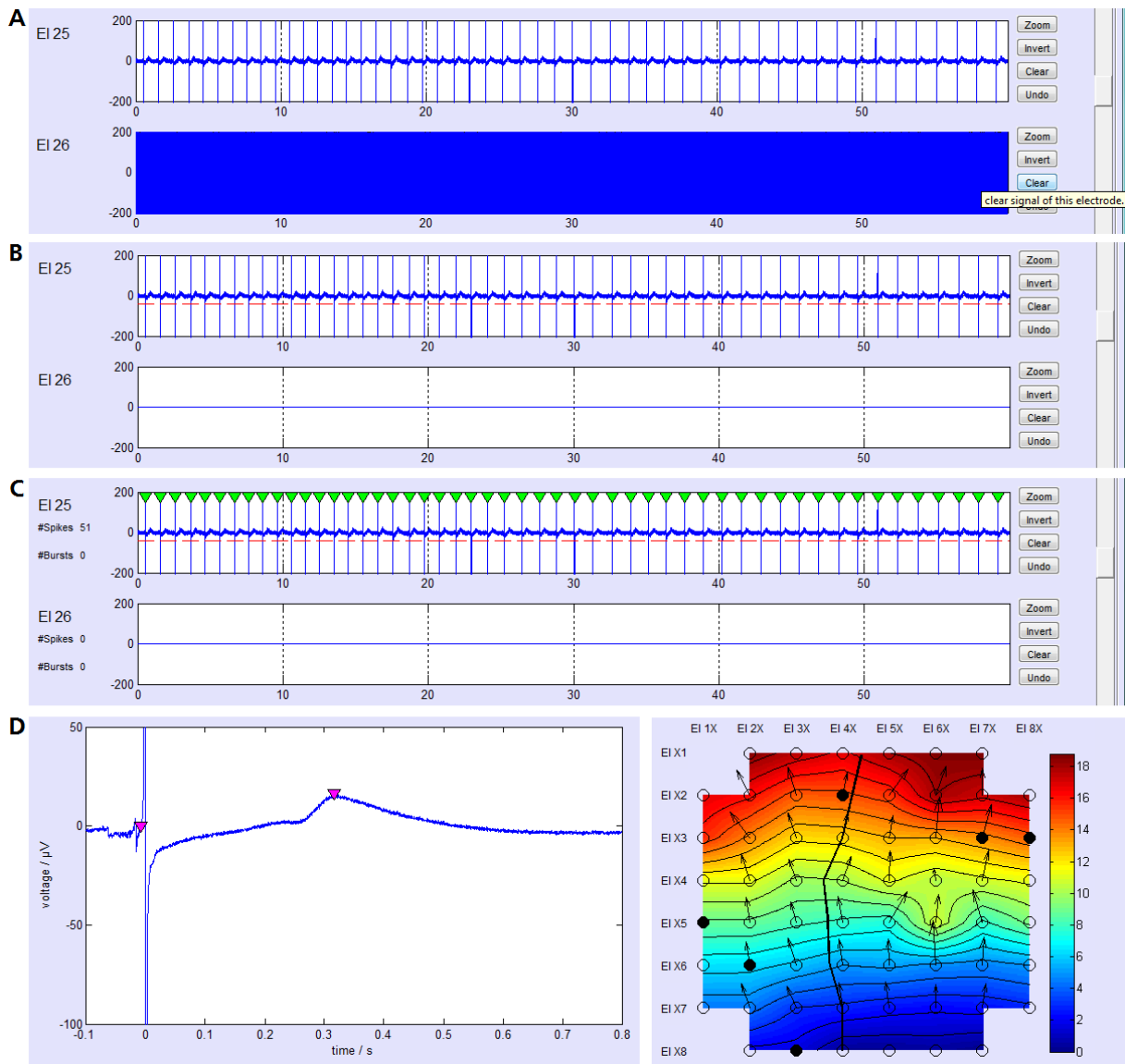


Abbildung 3.3: Zur Auswertung kardialer Signale muss jede Messung eine mehrstufige Prozessierung durchlaufen. Zunächst werden die Schwellwerte mittels RMS-Methode berechnet und alle defekten Elektroden aus der Messung getilgt. (A): zwei beispielhafte Elektroden; Elektrode (EL) 26 ist defekt und muss aus der Messung entfernt werden. (B): EL26 wurde entfernt und in Ei25 ein *Threshold* gesetzt (rote, gestrichelte Linie). (C) Anschließend werden in der Analyse-Berechnung die Spikes, die den Schwellwert überschreiten, als Spikes erkannt und über den *Timestamp* gespeichert (grüne Pfeilspitzen). Unter anderem können die Parameter der Feldaktionspotentialdauer als auch die Ausbreitungsgeschwindigkeit dargestellt werden. (D, links): Zur Bestimmung der Feldaktionspotentialdauer werden die Verläufe der pro Elektrode gemittelten Signale betrachtet und vom Benutzer manuell die Q-Zacke und die T-Welle bestimmt. (D, rechts) Zu jedem *Spike*-Ereignis wird ein Falschfarbenbild, welches die *Timestamps* darstellt, abgebildet. Der Benutzer bezieht alle geeigneten Ereignisse in die Evaluation mit ein und legt den auf die Ereignisse zutreffenden Pfad über das Elektrodenfeld manuell fest.

3.8. Röntgenbestrahlung

Die Röntgenbestrahlung der Zellen erfolgte entweder an der Röntgenröhre der TU Darmstadt oder der GSI. An der TU Darmstadt wird mit einer Spannung von 90 kV, einer Stromstärke von 33,7 mA und einer Entfernung von 39 cm zum Berylliumfenster auf einer Aluminiumplatte gearbeitet, was einer Dosisleistung von 5,23 Gy/min entspricht. An der GSI wird mit einer Spannung von 250 kV, einer Stromstärke von 16 mA und einer Entfernung zum Berylliumfenster von etwa 20 cm bestrahlt. Dies entspricht einer Dosisleistung von 2,0 Gy/min. Die applizierten Dosen von 0,5; 1; 2 und 7 Gy werden mit einem Dosimeter gemessen. Bei jedem Versuch werden unbestrahlte Kontrollen (Sham) durchgeführt. An der TU Darmstadt wurden die Röntgenbestrahlungsversuche an beiden Zellkultursystemen durchgeführt (siehe Abschnitt 4.2), während die Röntgenröhre an der GSI für die pharmakologischen Versuche verwendet wurde (siehe Abschnitt 4.4).

3.9. Bestrahlung mit Schwerionen

Die Schwerionen-Versuche wurden stets an der GSI am Schwerionensynchrotron (SIS) durchgeführt. Dabei wird im Fall der Kohlenstoff-Ionen-Strahlzeiten in *Cave M*, bei allen anderen Ionenspezies in *Cave A* bestrahlt. Da der Ionenstrahl in horizontaler Richtung verläuft, müssen sämtliche zu bestrahlende Proben senkrecht aufgestellt werden. Hierzu werden die auf MEA-Chips gehaltenen Kulturen komplett mit Medium aufgefüllt, auslaufsicher mit Parafilm umwickelt und mit Klebeband an mit 37 °C warmem Wasser gefüllten T25-Zellkulturflaschen befestigt. Die in 24-Well-Zellkulturplatten auf Coverslips gehaltenen Kulturen werden ebenfalls vollständig mit Medium befüllt, unter dem Deckel der Zellkulturplatte mit Moosgummi abgedichtet und mit Parafilm auslaufsicher umwickelt. Um sie orthogonal zum Strahl zu positionieren, werden die Zellkulturplatten in selbstgebauten Haltevorrichtungen aufgestellt. Sämtliche Proben werden im Bestrahlungs-*Cave* auf einem vom Kontrollraum aus gesteuerten Fließband aufgestellt. Die Bestrahlung mit beschleunigten Kohlenstoff-Ionen erfolgt mit einer 25 mm *Spread-out Bragg Peak* in einem Energiebereich zwischen 122 und 153,7 MeV/u mit einem gemittelten LET von 75 keV/ μ m. Dazu wird ein 30 mm-Bolus aus Polymethylmethacrylat verwendet. Die Bestrahlungen mit anderen Schwerionen werden stets mit einer singulären Energie von 1 GeV/u durchgeführt, die jeweiligen LET-Werte sind der nachstehenden Tabelle 3.7: zu entnehmen. Die applizierten Dosen sind 0,5; 1; 2 und 7 Gy.

Tabelle 3.7: Energie und LET der applizierten Ionenspezies

Ionenspezies	Energie	LET
Kohlenstoff	122-153,7 MeV/u	75 keV/ μm
Titan	1 GeV/u	108 keV/ μm
Nickel	1 GeV/u	180 keV/ μm
Eisen	1 GeV/u	155 keV/ μm

3.10. Statistik

Die statistische Auswertung der Daten für DNA-Schäden, Proliferation, Apoptose und ROS nach Röntgenbestrahlung (siehe 4.2) wurde mit der *GraphPad-Prism*[™] (Version 3.02) -Statistiksoftware durchgeführt. Pro unabhängigem Experiment und pro Strahlungsdosis werden 1.000 Zellen in die statistische Bewertung miteinbezogen. Bei Zählung der γH2AX -Foci werden jeweils mindestens 50 Zellen in die Evaluation miteinbezogen.

Die statistische Auswertung der elektrophysiologischen Daten erfolgt mit *Microsoft Excel 2010*[™]. In den gezeigten Daten werden die Messwerte nach Bestrahlung gegen die Messwerte vor Bestrahlung normiert und zur besseren Vergleichsmöglichkeit anschließend nochmals gegen die Kontrolle bzw. Sham des entsprechenden Zeitpunktes nach Bestrahlung. Jedes Experiment wurde mit jeweils mindestens drei Replikaten pro Behandlung durchgeführt. Weitere Details sind den entsprechenden Abbildungen zu entnehmen. Die gezeigten Daten wurden einer Signifikanz-Prüfung mittels t-Test unterzogen. Dabei wurde ein Konfidenz-Intervall (CI) von 95% mit statistischer Signifikanz für $*P < 0,05$, $**P < 0,01$ und $***P < 0,001$ festgelegt.

Um die Messwerte der Feldaktionspotentialdauer mit den gemessenen Schlagraten in Relation zu setzen, wird eine Korrektur über die für extrazelluläre Ableitungen modifizierte Bazett-Formel durchgeführt. Die ursprüngliche Bazett-Formel ist eine empirisch ermittelte Gleichung zur Frequenzkorrektur von QT-Intervallen, die in einem Elektrokardiogramm (EKG) gemessen wurden [82]. Dabei wird die mittlere QT-Zeit durch die Wurzel des mittleren RR-Abstands geteilt (Formel 3.1). Wird diese Gleichung auf extrazelluläre Ableitungen, wie sie mit dem MEA-System durchgeführt werden, übertragen, ergibt sich Formel 3.2. Hier entsprechen das QT-Intervall der Feldaktionspotentialdauer und der RR-Abstand dem *Interspike-Intervall* (ISI), also dem mittleren zeitlichen Abstand zwischen zwei Spikes.

Bazett-Formel

$$QTc = \frac{QT}{\sqrt{RR}}$$

Formel
3.1

Modifizierte Bazett-Formel

$$fAPdc = \frac{fAPd}{\sqrt{ISI}}$$

Formel
3.2

Die Einheit der korrigierten Feldaktionspotentialdauer ist, obwohl rechnerisch nicht korrekt, die Sekunde. In EKG-Messungen werden nach Bazett korrigierte QT-Intervalle, die größer als 430 ms sind, als gefährlich verlängert betrachtet [102]. Näheres hierzu wurde bereits in den Abschnitten 2.2.3 und 2.4.4 erläutert.

4. Ergebnisse

Im nachstehenden Kapitel sind die im Rahmen des Projektes erhaltenen Ergebnisse aufgeführt. Hierbei werden zunächst die Daten der Charakterisierungsversuche erläutert. Anschließend wird in Abschnitt 4.2 auf die Ergebnisse der Röntgenbestrahlungen eingegangen. In Unterpunkt 4.3 werden die Daten der Schwerionen-Strahlzeiten behandelt. Schließlich endet das Kapitel in Abschnitt 4.4 mit der Untersuchung zu den Effekten einer Kombination von Pharmazeutika und ionisierender Strahlung.

4.1. Ergebnisse der Charakterisierungsversuche

In dieser Arbeit werden zwei verschiedene Zellkultursysteme verwendet: die aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierten Kardiomyozyten, im Folgenden kurz hiPSC-Kardiomyozyten genannt, und die primären kardialen Zellen, isoliert aus Hühnerembryonen. Beide Arten unterscheiden sich nicht nur in ihrer Herkunft, sondern auch in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften. Zur Charakterisierung wurden beide Zellsysteme so lange wie möglich kultiviert und täglich Messungen anhand des MEA-Systems durchgeführt. Die Ergebnisse der Charakterisierung sind einander im Folgenden gegenübergestellt.

4.1.1. Zeitraum elektrophysiologischer Aktivität

Die verwendeten Modellsysteme unterscheiden sich in der Dauer, für die sie in Kultur gehalten werden können, bevor sie die spontane Signalgenerierung einstellen. In Abbildung 4.1 sind die Prozentwerte elektrophysiologisch aktiver *in vitro*-Kulturen über den Zeitraum von 20 Tagen dargestellt. Hierbei entspricht 100% der vollen Anzahl der Kulturen (n). Bereits nach Tag 5 *in vitro* (*days in vitro*, *div*) reduziert sich die Zahl funktionaler primärer Kulturen auf die Hälfte, bleibt dann für ungefähr drei Tage konstant, um danach stetig weiter zu sinken, bis die letzte Probe nach 14 *div* ihre Funktionalität einstellt. Bei den humanen Kulturen kommt es erst nach 7 Tagen zu einer Reduktion der elektrisch aktiven Kulturen, bis zu Tag 14 *in vitro* bleibt dann aber die Anzahl der verbleibenden Kulturen bei konstant 59% des Anfangswerts. Die letzten 5 von eingangs 22 humanen Kardiomyozytenkulturen stellen ihre Funktionalität nach 18 Tagen *in vitro* ein.

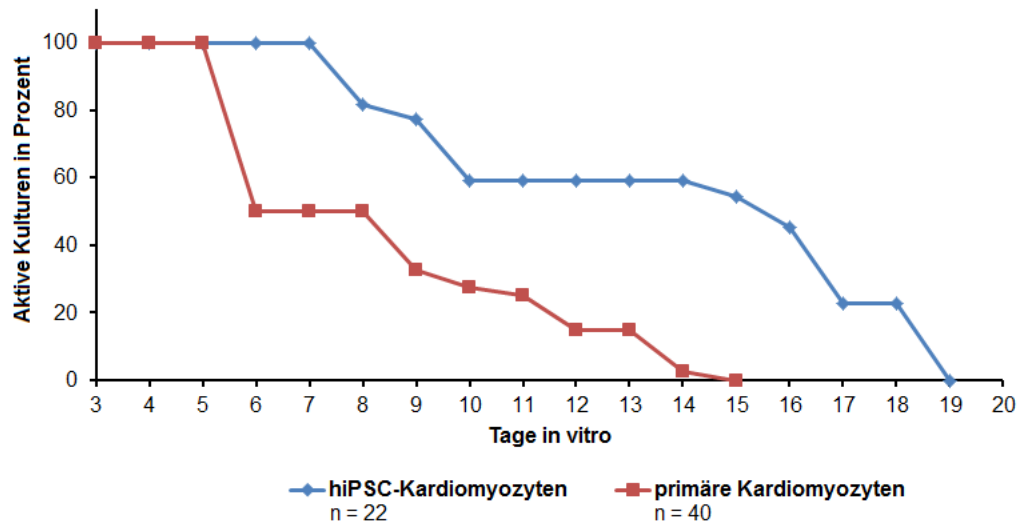


Abbildung 4.1: Die humanen Kardiomyozyten sind in Kultur länger elektrophysiologisch aktiv als primäre Kulturen. Die elektrophysiologisch aktiven Kulturen der aus hiPS-Zellen differenzierten Kardiomyozyten und primärer, kardialer Zellen sind prozentual gegen die Tage *in vitro* aufgetragen. Beide Modellsysteme fallen nach 3- bzw. 5-tägiger Kultivierung auf ein Schulterplateau von 50, bzw. 59% ab und halten dieses für 3 bzw. 5 Tage *in vitro*, bevor sie stetig bis auf null abfallen.

4.1.2. Aktive Elektroden

Die Anzahl der aktiven Elektroden gibt Aufschluss über die flächige Ausbreitung und Adhäsion der Zellen und deren Fähigkeit, spontan messbare Signale zu generieren. Die verwendeten MEA-Chips verfügen über 60 Elektroden, von denen 59 zur Detektion elektrischer Feldpotentiale dienen und eine als Referenzelektrode. Abbildung 4.2 zeigt die Veränderungen der Zahl aktiver Elektroden, beginnend am dritten Tag nach Aussaat. Generell weisen die primären, kardialen Zellen aus Hühnerembryonen höhere Schwankungen auf und tendieren zu niedrigeren Werten als die aus hiPS-Zellen differenzierten Kardiomyozyten. Bis etwa 7 div ist die Zahl der aktiven Elektroden in den humanen Kulturen relativ konstant bei Werten um die 50. An den Tagen 8 und 9 nach Aussaat reduziert sich die Zahl aktiver Elektroden bis auf einen Wert von etwa 40. Die primären Kulturen hingegen weisen neben der hohen Standardabweichung auch große Schwankungen auf, nach 12 und 13 div reduziert sich die Zahl aktiver Elektroden. An Tag 14 nach Aussaat ist von allen 40 embryonalen Kulturen nur noch eine elektrophysiologisch aktiv.

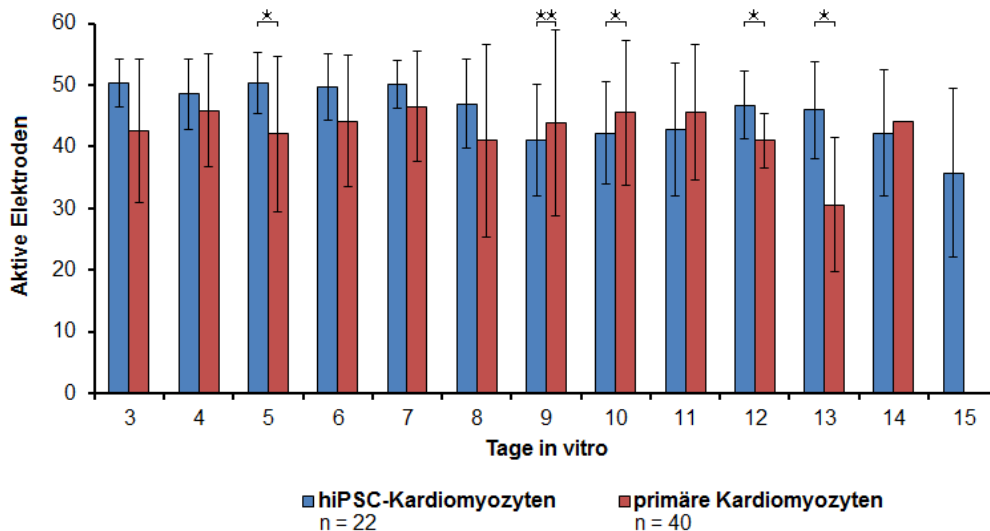


Abbildung 4.2: Die primären, kardialen Kulturen unterliegen größeren Schwankungen in der Zahl aktiver Elektroden. Die Zahlen aktiver Elektroden für aus hiPS-Zellen differenzierte Kardiomyozyten und primäre, kardiale Zellkulturen aus Hühnerembryonen sind gegen die Tage *in vitro* aufgetragen. Die humanen Kulturen zeigen eine Reduktion aktiver Elektroden an Tag 8 und 9 nach Aussaat und weiter ab Tag 13 bis zum Ende der Kulturzeit. Die primären Kulturen zeigen größere Schwankungen bei meist niedrigeren Werten. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test ermittelt (CI=95%, * P <0,05, ** P <0,01).

4.1.3. Schlagrate

Die Schlagrate gibt die Frequenz an, mit der die Zellnetzwerke Aktionspotentiale generieren und weiterleiten. Die Schlagraten der primären Kulturen weisen im Mittel Schwankungen zwischen 0,5 und 0,75 Hz auf. Dabei unterliegen die embryonalen Kulturen meist einer Standardabweichung zwischen 20 und 30%, wie in Abbildung 4.3 zu sehen ist. Die mittlere Schlagrate der humanen Kulturen liegt hingegen zwischen 0,5 und 0,6 Hz mit einer Standardabweichung von 10-22%. Die Unterschiede in den Schlagraten beider Zellkultursysteme sind die meiste Zeit der Kultivierung nicht statistisch signifikant. Lediglich zu Beginn und Ende des Kultivierungszeitraums zeigen die primären Kardiomyozyten eine signifikant höhere Schlagfrequenz.

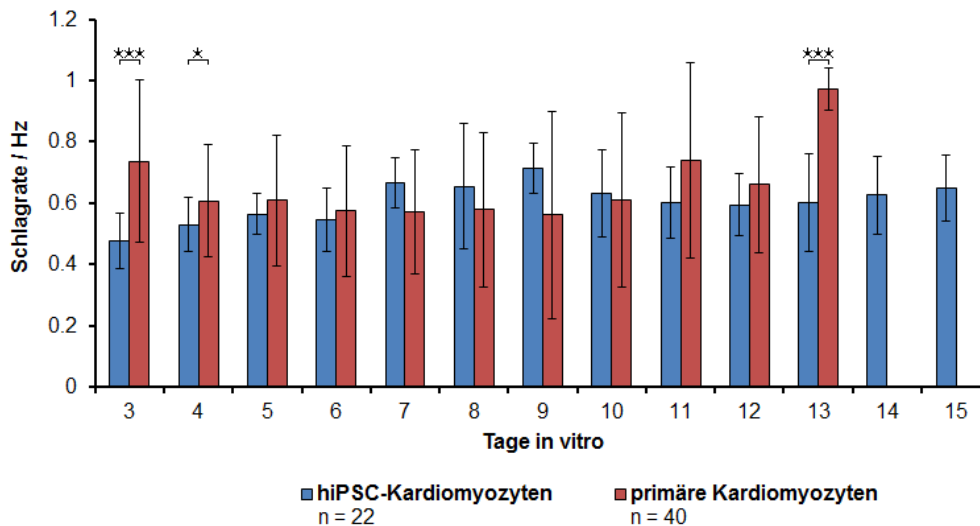


Abbildung 4.3: Beide Kultursysteme zeigen vergleichbare Schlagraten, die primären Zellen schwanken etwas stärker. Die Schlagraten aus humanen hiPSC-Kardiomyozyten und primären kardialen Kulturen in Hertz sind in Abhängigkeit zu Tagen *in vitro* abgebildet. Die Schlagraten der humanen Kardiomyozyten liegen zwischen 0,5 und 0,6 Hz bzw. zwischen 0,5 und 0,75 Hz im Fall der primären Kulturen. Die Standardabweichungen betragen 10-22% bei den humanen, bzw. 20-30% bei den primären Zellen. Die präsentierten Daten zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung. Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test ermittelt (CI=95%, * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$).

4.1.4. Signalausbreitungsgeschwindigkeit

Die Unterschiede in der Signalausbreitungsgeschwindigkeit (*Conduction Velocity*) in den verwendeten Modellsystemen ist in Abbildung 4.4 gezeigt. In humanen Kulturen verläuft die Reizweiterleitung mit im Mittel 164 mm/s gegenüber 87 mm/s bei den primären Kulturen fast doppelt so schnell. Die Standardabweichung liegt bei den humanen Kulturen zwischen 33 und 45% und bei den primären Kulturen zwischen 62 und 78%. Die *Conduction Velocity* der primären, kardialen Kulturen steigt von etwa 50 mm/s am 3. div auf einen Wert von etwa 100 mm/s am 6. div an. Diese Signalausbreitungsgeschwindigkeit behalten die Kulturen bis Tag 10 nach Aussaat relativ konstant bei. Danach fällt die Ausbreitungsgeschwindigkeit wieder bis 14 div auf 30 mm/s ab. Ein solcher Verlauf kann für die humanen Kulturen aufgrund der Schwankungen nicht festgestellt werden. Sie erreichen nach anfänglich zwischen 140 und 170 mm/s schwankender Werte nach 10 div die höchste mittlere Signalausbreitungsgeschwindigkeit mit 235 mm/s. Anschließend sinkt die mittlere *Conduction Velocity* langsam ab und verweilt dann ab 13 div bei etwa 160 mm/s.

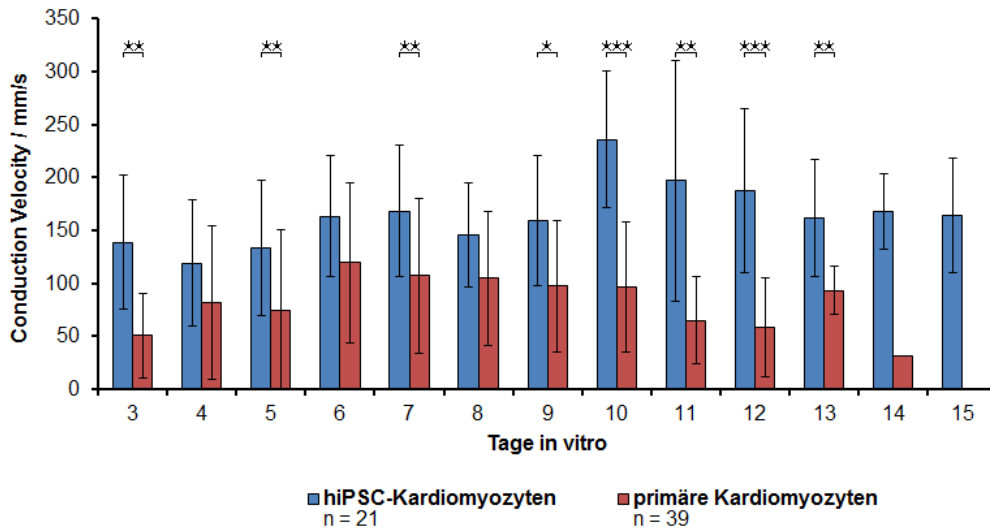


Abbildung 4.4: Die Signalausbreitungsgeschwindigkeit der humanen Kulturen ist höher, aber schwankt auch stärker. Die *Conduction Velocity* in mm/s für die hiPSC-Kardiomyozyten und primären, kardialen Kulturen ist gegen die Tage *in vitro* aufgetragen. Die hiPS-Zellen unterliegen stärkeren Schwankungen und erreichen ihre höchste Signalausbreitungsgeschwindigkeit nach 10 div. Die *Conduction Velocity* der primären Kulturen verläuft flacher und hält ihr Höchstniveau 6 bis 10 div mit etwa 100 mm/s. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Es wurde mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test auf Signifikanzen geprüft (CI=95%, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

4.1.5. Feldaktionspotentialdauer

Die humanen Kulturen mit einer mittleren Feldaktionspotentialdauer (fAPd) von 550 ms zeigen generell deutlich längere Feldaktionspotentiale, verbunden mit stärkeren Schwankungen über die Zeit als auch mit größeren Standardabweichungen zu einzelnen Zeitpunkten, als die primären Kulturen mit einer mittleren fAPd von 270 ms (Abbildung 4.5). Generell ist die fAPd in beiden Zellkultursystemen trotz der deutlichen Unterschiede relativ stabil. Den Höchstwert von 670 ms erreichen die iPSC-Kardiomyozyten an Tag 3 *in vitro* und die niedrigsten Werte mit 480 und 460 ms an Tag 9 und 15 nach Aussaat. Die primären Kulturen zeigen hingegen einen flachen Anstieg bis 8 div, mit einer maximalen Feldaktionspotentialdauer von 310 ms. Anschließend sinkt die fAPd mit einigen Schwankungen wieder ab.

Ein ähnliches Bild ergibt sich bei Betrachtung der um die Schlagfrequenz korrigierten Feldaktionspotentialdauer nach Bazett, dargestellt in Abbildung 4.6. Diese Korrektur dient der Korrelation zwischen fAPd und der Schlagfrequenz. Da beide Parameter abhängig voneinander sind, soll die Korrektur den durch Schlagratenänderung bedingten Einfluss auf die fAPd ausgleichen. Die Höchstwerte der primären, kardialen Zellkulturen liegen hier im Mittel mit 230 ms und 250 ms bei 8 bzw. 13 div. Die längsten Feldaktionspotentialdauern der humanen Kulturen betragen im Mittel 470 ms und ihre Minima erfolgen 10 und 15 Tage nach Aussaat, beide Male mit einem mittleren Wert von 370 ms. Davon abgesehen haben sich an den generellen, zeitlichen Verläufen keine nennenswerten Änderungen eingestellt.

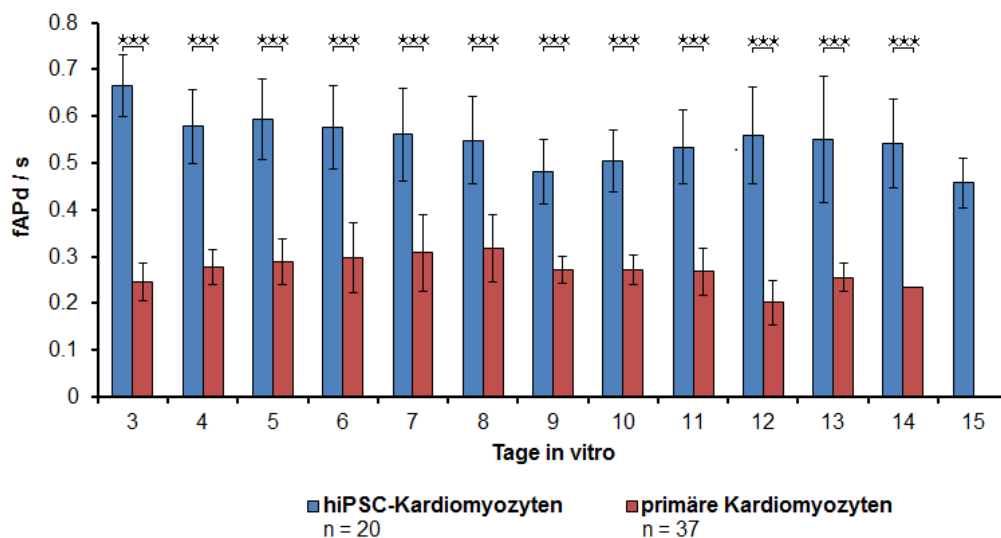


Abbildung 4.5: Die fAPd der hiPSC-Kardiomyozyten ist signifikant länger als die der primären Kulturen. Die Feldaktionspotentialdauer in Sekunden ist gegen die Tage *in vitro* für die hiPSC-Kardiomyozyten und die primären, kardialen Kulturen aufgetragen. Beide Zellkultursysteme behalten relativ konstant die jeweilig vergleichbare Feldaktionspotentialdauer bei. Die humanen Kulturen haben ihr Maximum an Tag 3 nach Aussaat und ihre Minima bei 9 und 15 div. Die primären Kulturen zeigen in ihrer Feldaktionspotentialdauer einen flachen Anstieg bis zu Tag 8 nach Aussaat, gefolgt von einem flachen Abfall. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Es wurde mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test auf Signifikanzen geprüft (CI=95%, *** $P < 0,001$).

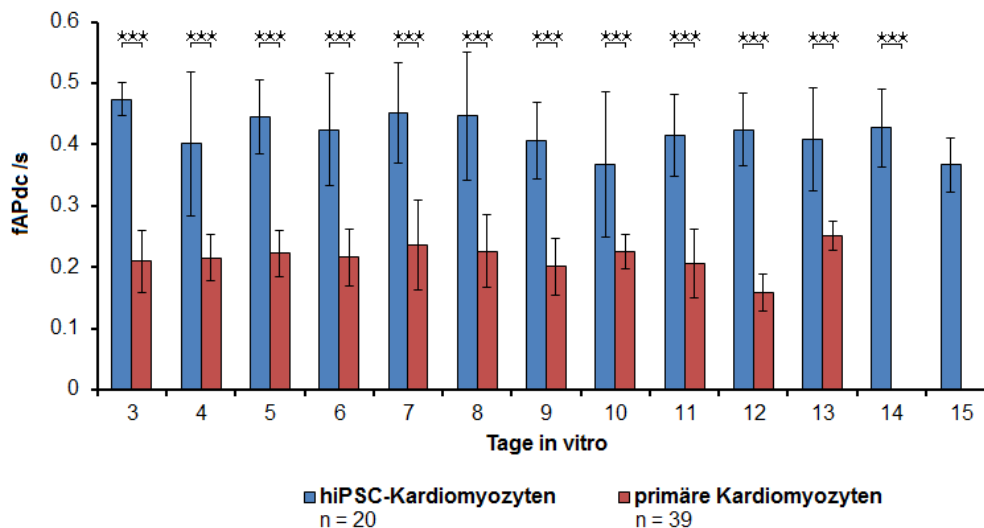


Abbildung 4.6: Nach Korrektur der fAPd gegen die Schlagfrequenz verschieben sich die Maxima und Minima leicht. Die gegen die Schlagfrequenz korrigierte Feldaktionspotentialdauer der aus hiPS-Zellen differenzierten Kardiomyozyten und primären, kardialen Kulturen in Sekunden ist gegen die Tage *in vitro* aufgetragen. Die humanen Kulturen zeigen deutlich höhere Werte, sie erreichen ihre Minima der fAPdc nach 8 und 15 Tagen in Kultur. Der maximale fAPdc-Wert wird bei den primären Zellen an Tag 13 nach Aussaat erreicht, der minimale an Tag 12. Generell zeigen beide Zellkultursysteme relativ stabile Werte. Die präsentierten Daten zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test ermittelt (CI=95%, * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$).

4.1.6. Signal-Amplituden

Die Werte der positiven bzw. negativen Amplituden geben Auskunft über die Kopplung von Elektrode und Zellen. Große Werte der Amplituden stehen dabei für eine gute Kopplung und ein hohes Signal-Rauschverhältnis. Die Abbildungen 4.7 und 4.8 zeigen die Veränderungen der gemessenen Amplituden beider Zellkultursysteme über die Kultivierungszeit. In beiden Modellsystemen sind die Amplituden starken Schwankungen sowohl über die Zeit als auch von Kultur zu Kultur unterworfen. Aufgrund der großen Standardabweichung kann keine Aussage darüber getroffen werden, welches der Modellsysteme grundsätzlich die höheren Amplituden aufweist. Im Mittel erreichen die humanen Zellen positive Amplituden zwischen $+80$ und $+370 \mu\text{V}$ und negative Amplituden zwischen -170 und $-470 \mu\text{V}$. Die primären Kulturen zeigen im Mittel positive Amplituden zwischen $+160$ und $+310 \mu\text{V}$ und negative Amplituden zwischen -290 und $-530 \mu\text{V}$. Es kommen in beiden Modellsystemen auch Einzelwerte jenseits von $\pm 1 \text{ mV}$ vor. Generell kann festgestellt werden, dass die humanen Kulturen an Tag 3 und 4 nach Aussaat statistisch signifikant geringere Amplituden in beide Richtungen aufweisen, die erst ab 5 div ein zu den Amplituden der primären Kulturen vergleichbares Niveau erreichen. Letztere zeigen nach 10 Kultivierungstagen eine starke Verringerung der positiven Amplituden von etwa $100 \mu\text{V}$ auf gemittelte $+180 \mu\text{V}$.

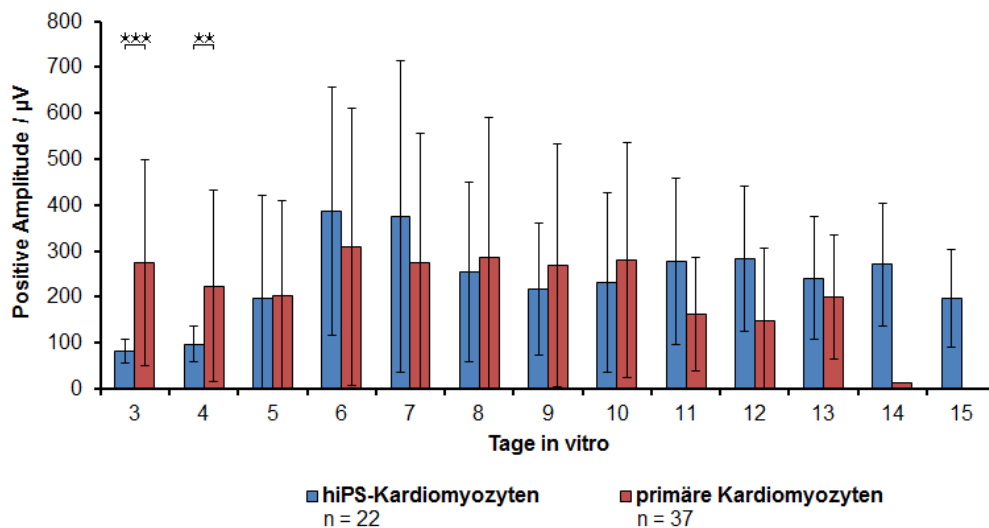


Abbildung 4.7: Die positiven Amplituden beider Modellsysteme sind sehr starken Schwankungen unterworfen. Die positiven Amplituden der aus hiPS-Zellen differenzierten Kardiomyozyten und primärer, kardialer Kulturen sind in Mikrovolt abgebildet und gegen die Tage *in vitro* aufgetragen. Die positiven Amplituden der humanen Kulturen sind an Tag 3 und 4 nach Aussaat mit weniger als $+100 \mu\text{V}$ deutlich kleiner als die der primären Kulturen, erreichen aber anschließend relativ vergleichbare Werte. Beginnend ab 11 div, sinken die Amplituden der embryonalen Kulturen auf etwa $+180 \mu\text{V}$ ab. Die präsentierten Daten zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die Daten wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test auf Signifikanzen geprüft (CI=95%, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

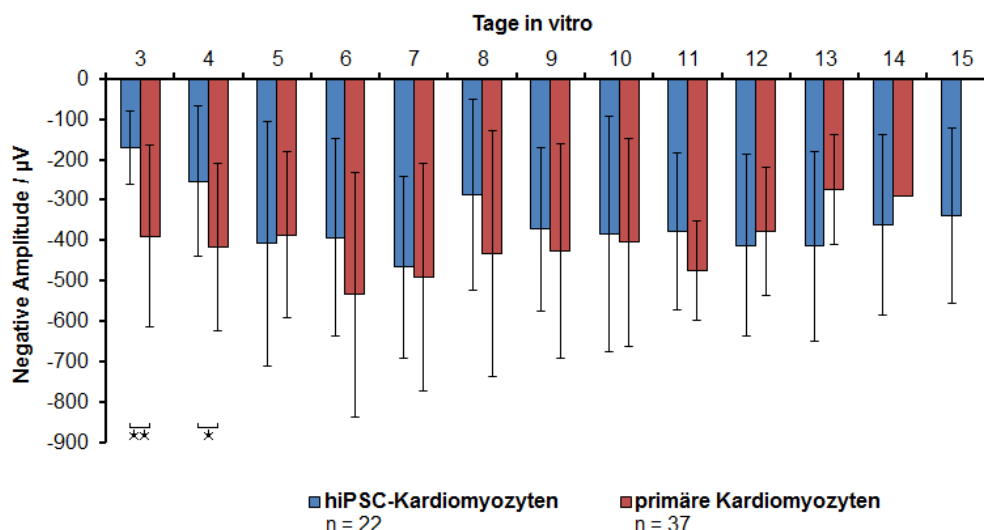


Abbildung 4.8: Die negativen Amplituden beider Modellsysteme zeigen sehr starke Schwankungen. Die negativen Amplituden der aus hiPS-Zellen differenzierten Kardiomyozyten und primärer, kardialer Kulturen sind in Mikrovolt abgebildet und gegen die Tage *in vitro* aufgetragen. Die negativen Amplituden der humanen Kulturen sind an Tag 3 und 4 nach Aussaat noch deutlich kleiner als die der primären Kulturen, erreichen aber anschließend relativ vergleichbare Werte. Die Amplituden der embryonalen Kulturen sind meist etwas größer, erreichen also auch negativere Werte als die hiPSC-Kardiomyozyten-Kulturen. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test ermittelt (CI=95%, * P <0,05, ** P <0,01).

4.2. Ergebnisse der Röntgenversuche

Als Vorexperimente zu den Schwerionen-Bestrahlungen wurden Röntgenversuche mit primären kardialen Zellen der Hühnerembryonen und aus hiPS-Zellen differenzierten Kardiomyozyten durchgeführt. Die Röntgenbestrahlungen und die anschließenden Messungen wurden an der TU Darmstadt durchgeführt. In allen folgenden Versuchen waren die applizierten Dosen 0,5, 1, 2, und 7 Gy. Bei der Schlagrate und der Feldaktionspotentialdauer konnten strahleninduzierte Effekte verifiziert werden.

4.2.1. Röntgenbestrahlung primärer kardialer Kulturen

Bei primären kardialen Zellen zeigte sich, wie in Abbildung 4.9 dargestellt, bereits 30 min nach der Exposition mit Röntgenstrahlung ein dosisabhängiger Anstieg in der Schlagrate für alle außer die mit 7 Gy bestrahlten Proben. Diese verblieben auf dem Niveau der unbestrahlten Kontrollen (Sham). Ein Tag nach Bestrahlung (*after Radiation*, aR) blieben die Schlagraten sämtlicher Proben relativ konstant. An den folgenden Tagen erhöhte sich die Rate in den mit 7 Gy bestrahlten Kulturen, bis sie schließlich an Tag 3 nach Exposition über die Werte der mit 0,5-2 Gy röntgenbestrahlten Proben hinaus anstieg.

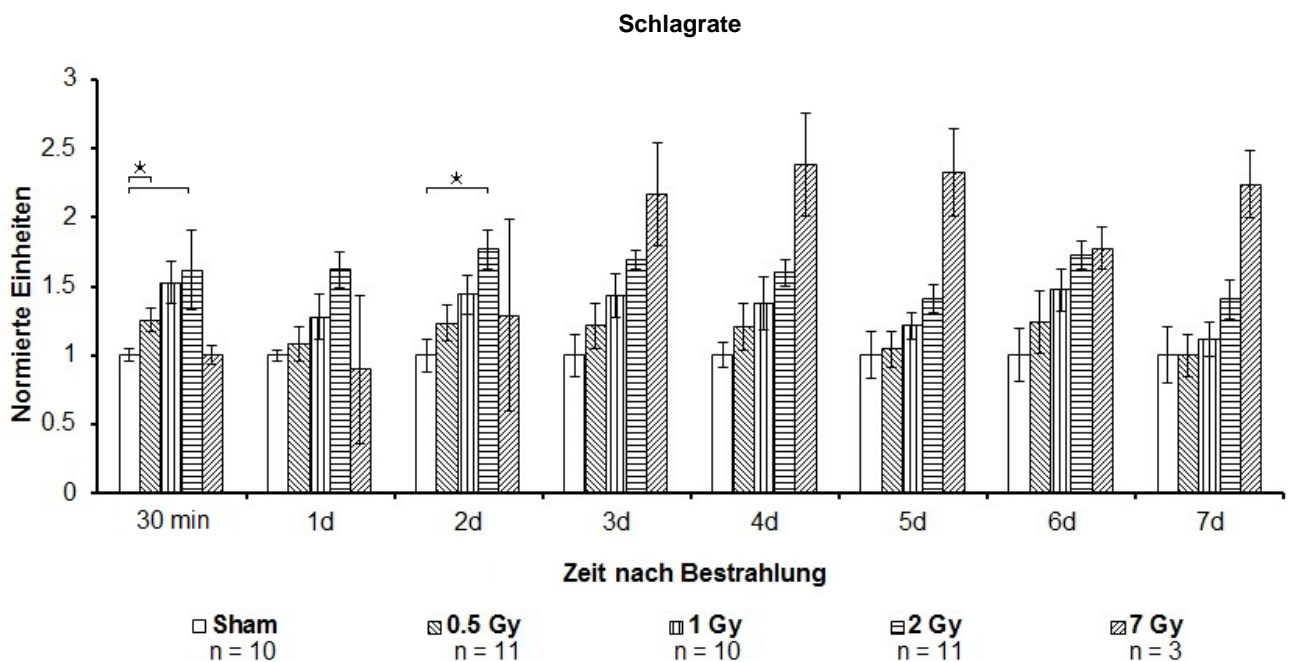


Abbildung 4.9: Nach Röntgenexposition ist die Schlagrate dosisabhängig mit einer zweitägigen Verzögerung der 7-Gy-Proben erhöht. Die Änderungen der Schlagrate primärer Kardiomyozyten sind in normierten Einheiten dargestellt und gegen die Zeit nach Röntgenbestrahlung aufgetragen. Die Schlagrate bleibt nach empfangenen Röntgendosen von bis zu 2 Gy langfristig und dosisabhängig erhöht. Kulturen, die mit 7 Gy bestrahlt wurden, zeigen eine ähnliche Erhöhung, allerdings mit einer zeitlichen Verzögerung von 2 Tagen. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mediane \pm Median Absolute Deviation (MAD). Statistische Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test ermittelt (CI=95%; * $P < 0,05$).

Die Veränderungen der Feldaktionspotentialdauer primärer kardialer Zellen nach Röntgenbestrahlung sind in Abbildung 4.10 gezeigt. Eine leichte, dosisabhängige Verkürzung der Feldaktionspotentiale ist 30 min nach Strahlenexposition gegenüber den unbestrahlten Kontrollen zu erkennen. Die Effekte auf die Feldaktionspotentialdauer sind weniger konsistent als die Effekte, die in der Schlagratenstudie beobachtet werden konnten. Die dosisabhängige Reduktion der Feldaktionspotentialdauer ist an Tag 3 und wieder an Tag 7 nach Bestrahlung klar ersichtlich. Dazwischen liegt eine dreitägige Periode, in der keine systematische Korrelation zur applizierten Dosis möglich ist, da sich die initiale Reduktion an Tag 4 nach Bestrahlung auszubalancieren beginnt. Der hier beobachtete Trend verläuft über einen Zeitraum von 7 Tagen nach Bestrahlung. Die Proben mit einer Röntgenexposition von 2 und 7 Gy zeigen im Vergleich mit den Kontrollen eine Verkürzung der Feldaktionspotentiale. Dieser Effekt ist im Falle der mit 7 Gy bestrahlten Kulturen von Tag 1 bis 7 nach Exposition statistisch signifikant.

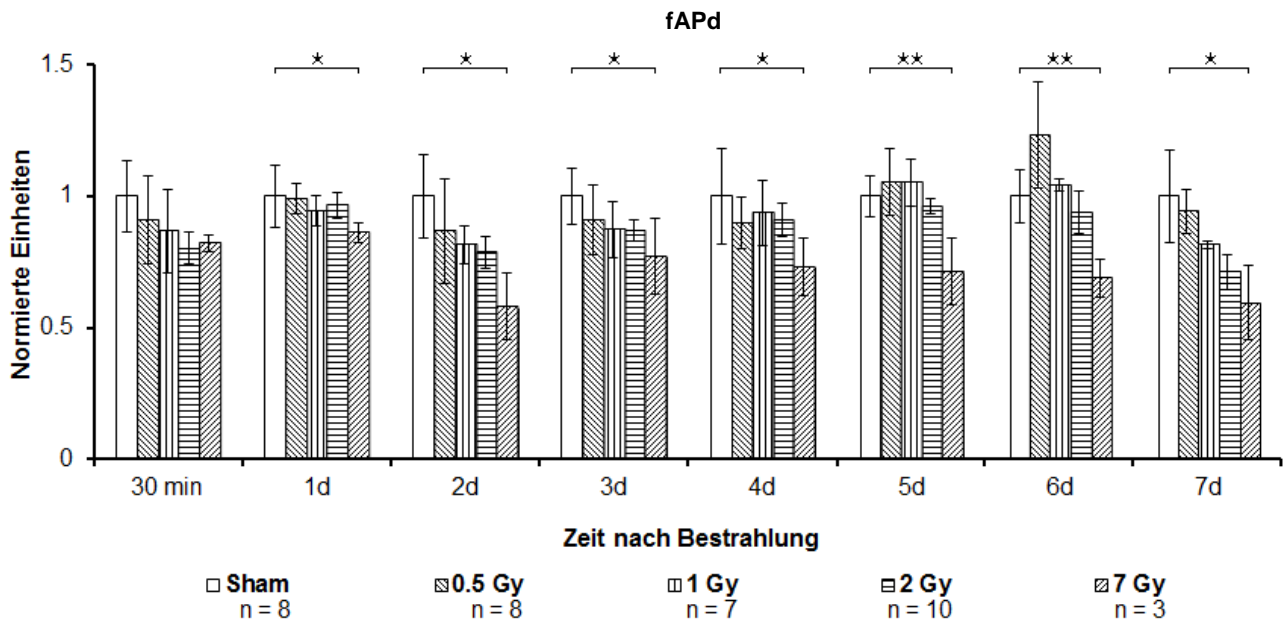


Abbildung 4.10: Die Feldaktionspotentialdauer ist für bis zu 7 Tage nach Röntgenbestrahlung reduziert. Die Feldaktionspotentialdauer primärer Kardiomyozyten ist in normierten Einheiten gegen die Zeit nach Röntgenbestrahlung aufgetragen. Die Feldaktionspotentialdauer ist mit steigender Röntgendosis für bis zu 7 Tage nach Bestrahlung verringert. An Tag 2 und 7 nach Bestrahlung ist die fAPd-Verkürzung dosisabhängig. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mediane \pm MAD. Statistische Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test ermittelt (CI=95%, * $P < 0,05$; ** $P = 0,01$).

Aufgrund der Korrelation zwischen der Schlagrate und der Dauer der Signale wurden die Messwerte der Feldaktionspotentialdauer gegen die Schlagfrequenz korrigiert (fAPdc). Abbildung 4.11 zeigt, dass nach Röntgenbestrahlung keine statistisch signifikanten Abweichungen auftreten. Dies spricht für eine klare Korrelation und bestätigt, dass es durch Röntgenbestrahlung zu keinen signifikant verlängerten Feldaktionspotentialen kommt.

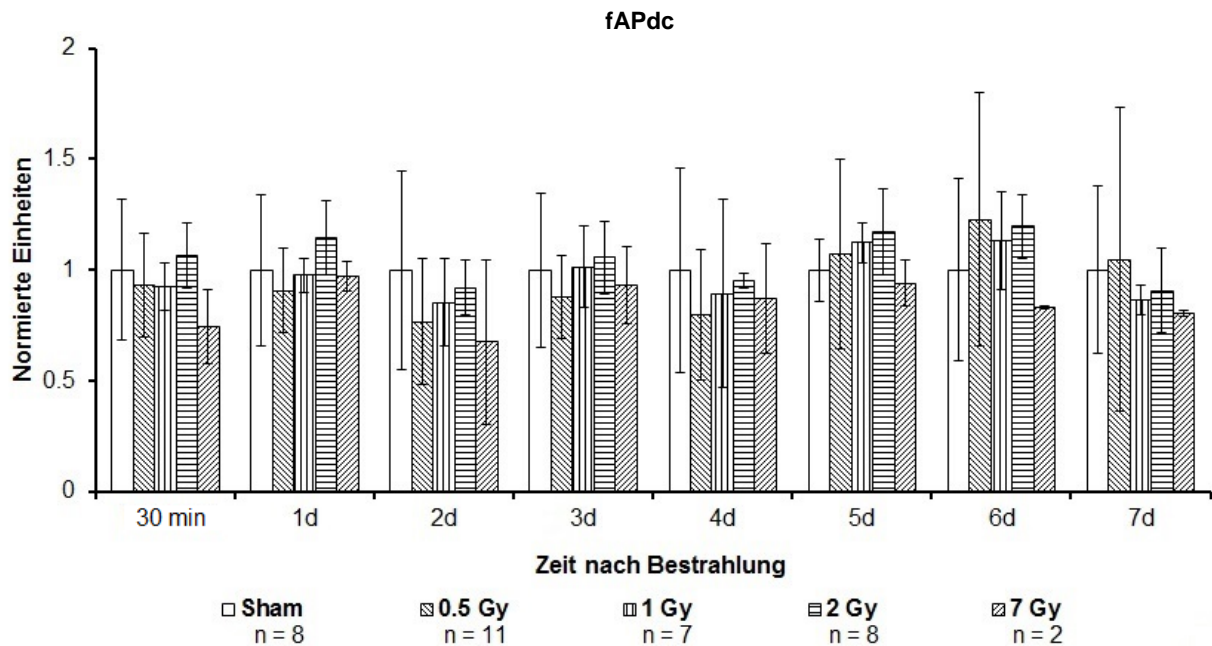


Abbildung 4.11: Nach Röntgenbestrahlung zeigen sich keine statistisch signifikant reduzierten fAPdc-Werte. Die mittels Bazett-Formel korrigierte Feldaktionspotentialdauer der primären kardialen Zellen ist in normierten Einheiten gegen die Zeit nach Bestrahlung aufgetragen. Die gegen die Schlagrate korrigierte Feldaktionspotentialdauer zeigt, dass es keine statistisch signifikanten Abweichungen gegenüber den Shams gibt. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mediane \pm MAD. Statistische Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test ermittelt (CI=95%).

4.2.2. Röntgenbestrahlung humaner iPSC-Kardiomyozyten

Während die primären kardialen Zellen eine klare Erhöhung der Schlagrate als Folge der Bestrahlung aufweisen, ist dies in den humanen iPSC-Kardiomyozyten nicht zu erkennen. Abbildung 4.12 zeigt den gegenteiligen Effekt. Bereits direkt nach Bestrahlung kommt es, mit Ausnahme von den mit 7 Gy behandelten Proben, zu einer minimalen dosisabhängigen Reduktion der Schlagrate. Am Tag nach der Röntgenexposition ist diese Dosisabhängigkeit stärker. Wie auch in den primären Kulturen scheint die Bestrahlung mit 7 Gy eine verzögerte Reaktion nach sich zu ziehen. Die mit 7 Gy bestrahlten Proben holen hier bereits 2 Tage nach Bestrahlung mit den anderen bestrahlten Kulturen auf und zeigen eine reduzierte Schlagrate. Die dosisabhängige Reduktion der Schlagrate ist bis zu 7 Tage nach Bestrahlung sichtbar. Nur die mit 0,5 Gy bestrahlten Proben weisen an Tag 6 nach Röntgenexposition höhere Schlagraten als die unbestrahlten Kontrollen auf.

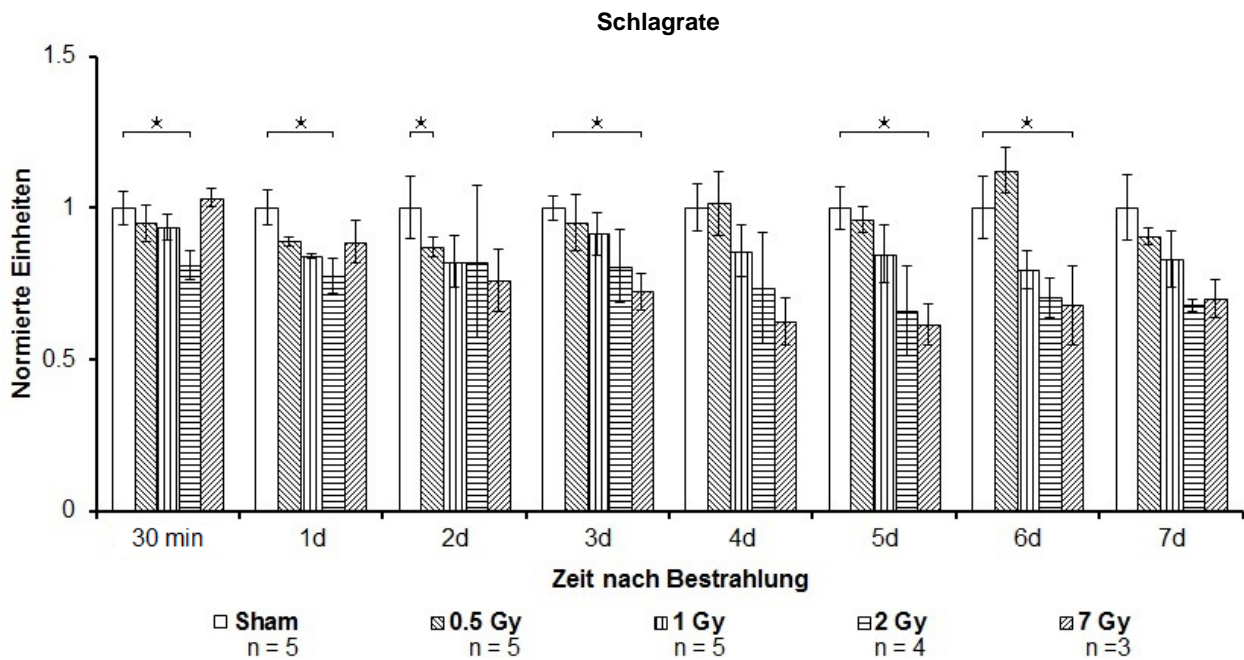


Abbildung 4.12: Die Schlagrate der humanen iPSC-Kardiomyozyten ist für bis zu 7 Tage nach Röntgenbestrahlung reduziert. Die Schlagrate humaner iPSC-Kardiomyozyten ist in normierten Einheiten gegen die Zeit nach Bestrahlung aufgetragen. Die mit 7 Gy bestrahlten Proben zeigen zunächst keine Abweichung vom Kontrollwert, reduzieren jedoch ihre Schlagrate ebenfalls verzögert. An Tag 3 nach Bestrahlung ergibt sich eine vollständig dosisabhängige Verringerung der Schlagrate in allen Proben. Diese Reduktion bleibt bis zu 7 Tage nach Röntgenbestrahlung bestehen. Daten repräsentieren die Mediane \pm MAD. Statistische Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test ermittelt (CI=95%, * P <0,05).

Aus humanen iPSC-Zellen differenzierte Kardiomyozytenkulturen weisen direkt nach Röntgenexposition eine leichte, dosisabhängige Verkürzung der Feldaktionspotentialdauer auf, wie in Abbildung 4.13 zu sehen ist. Anders als in den primären, embryonalen Kulturen sind die hier beobachteten Änderungen weniger stark ausgeprägt. Einen Tag nach Röntgenbestrahlung ist lediglich die Verkürzung der Signaldauer der mit 0,5 Gy behandelten Kulturen statistisch signifikant. Zwei Tage nach Exposition tritt eine signifikante Verlängerung der Potentialdauer in den mit 1 und 7 Gy bestrahlten Proben ein. Die mit 7 Gy bestrahlten Proben zeigen 7 Tage nach Röntgenexposition eine signifikante Verlängerung der Aktionspotentialdauer. Nach der initialen Verkürzung deutet sich in den humanen Kulturen nach Bestrahlung ein genereller Trend zu einer verlängerten Feldaktionspotentialdauer an. Weiterhin weisen die humanen Kardiomyozyten innerhalb der jeweiligen Dosisgruppe eine geringere Variabilität der gemessenen Werte auf als die Kulturen kardialer Hühnerzellen. Dies spiegelt sich besonders in den kleineren Fehlerbalken wider.

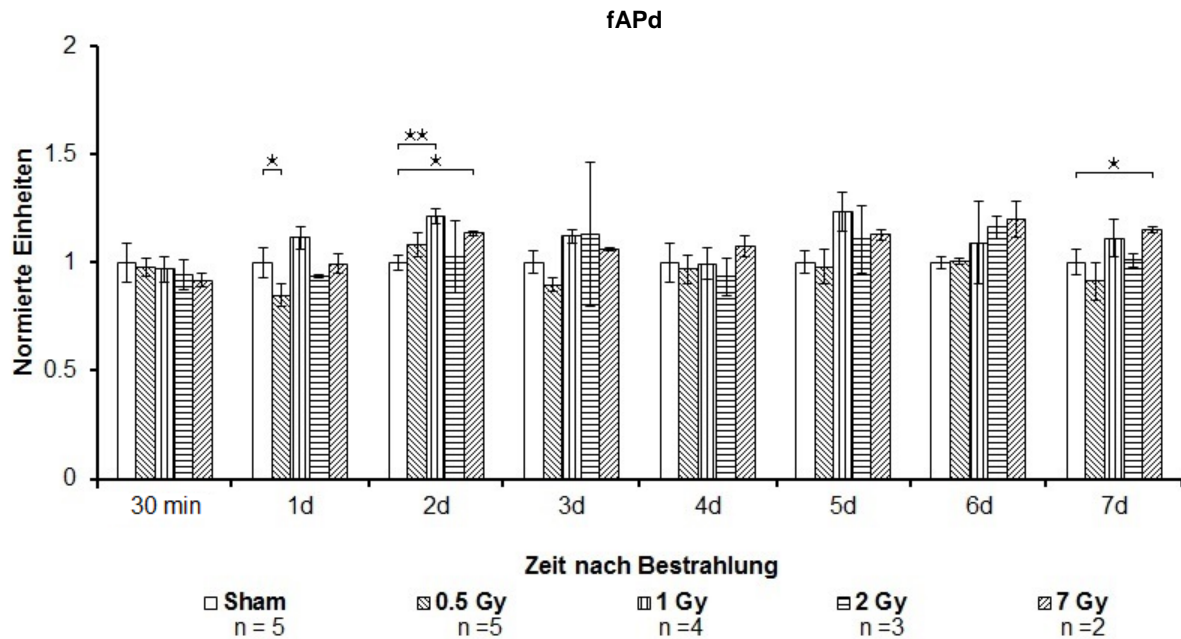


Abbildung 4.13: Nach Röntgenbestrahlung zeigt die Feldaktionspotentialdauer der hiPSC-Kardiomyozyten eine leichte Tendenz zu erhöhten Werten. Die Feldaktionspotentialdauer humaner iPSC-Kardiomyozyten ist in normierten Einheiten gegen die Zeit nach Bestrahlung aufgetragen. Die Feldaktionspotentialdauer in humanen Kardiomyozyten ist direkt nach Röntgenbestrahlung dosisabhängig leicht verringert. An den folgenden Tagen nach Bestrahlung zeigt sich eine Tendenz zu verlängerten Feldaktionspotentialdauern. Ein dosisabhängiges Verhältnis stellt sich lediglich an Tag 6 nach Exposition noch einmal ein. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mediane \pm MAD. Statistische Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test ermittelt (CI=95%, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

Zur Validierung der Korrelation von Schlagrate und Feldaktionspotentialdauer wurden die hier aufgeführten Werte gegen die jeweiligen *Interspike*-Intervalle korrigiert und in Abbildung 4.14 aufgetragen. Ebenso wie bei den primären, embryonalen Zellen weist die korrigierte Feldaktionspotentialdauer keine statistisch signifikanten Abweichungen von den unbestrahlten Kontrollen auf. Daraus folgt, dass die röntgeninduzierte Änderung von entweder der Schlagrate oder der Feldaktionspotentialdauer die Änderung des jeweils anderen Parameters bedingt.

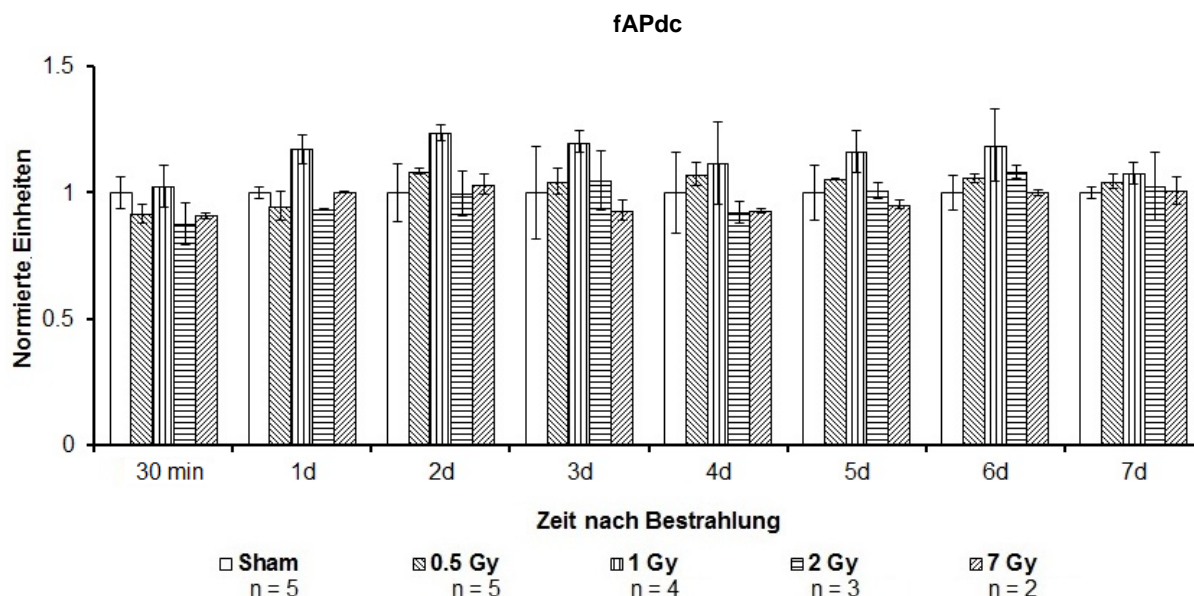


Abbildung 4.14: Die korrigierte Feldaktionspotentialdauer zeigt nach Röntgenbestrahlung eine klare Korrelation. Die mittels Bazett-Formel korrigierte Feldaktionspotentialdauer humaner iPSC-Kardiomyozyten ist in normierten Einheiten gegen die Zeit nach Röntgenexposition aufgetragen. Es treten keine statistisch signifikanten Veränderungen nach Bestrahlung auf. Somit ist eine strahleninduzierte Veränderung des einen Parameters an die Veränderung des jeweils anderen gekoppelt. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mediane \pm MAD. Statistische Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test ermittelt (CI=95%).

4.3. Ergebnisse der Schwerionenversuche

Im Rahmen des Projektes konnten mehrere Strahlzeiten an der GSI mit unterschiedlichen Ionen-Spezies durchgeführt werden, darunter vier Strahlzeiten mit Kohlenstoff- und jeweils eine Strahlzeit mit Eisen- und Titan-Ionen. Bei den Kohlenstoffstrahlzeiten konnten beide Zellkultursysteme untersucht werden, während bei den anderen Schwerionen jeweils nur Daten zu einem der beiden Systeme existieren. Die Ergebnisse werden im nachstehenden Kapitel vorgestellt.

4.3.1. Bestrahlung primärer kardialer Kulturen mit Kohlenstoff-Ionen

Für die Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen standen insgesamt vier Strahlzeiten zur Verfügung. Davon wurden zwei für die Bestrahlung von primären, aus Hühnerembryonen isolierten, kardialen Kulturen und zwei für die Exposition von aus humanen iPSC-Zellen differenzierten Kardiomyozytenkulturen genutzt. Für beide Zellsysteme konnten sowohl elektrophysiologische als auch Daten bezüglich der zellulären Strahlenantwort gewonnen werden. Letztere wurden im Rahmen des Verbundprojektes von Dr. Anja Heselich untersucht.

Die Betrachtung der Schlagrate primärer kardialer, aus Hühnerembryonen isolierter Kulturen nach Exposition mit Kohlenstoff-Ionen zeigt bereits direkt nach Bestrahlung eine dosisabhängige Steigerung der Schlagrate, die bis zu zwei Tage nach Exposition anhält (Abbildung 4.15). Dieser Effekt ist für die mit 7 Gy bestrahlten Proben an Tag 2 nach Exposition statistisch signifikant. Die entsprechende Feldaktionspotentialdauer hingegen zeigt lediglich 4 h nach Bestrahlung eine statistisch signifikante Verlängerung in den mit 0,5 Gy bestrahlten Proben. Auch 1 Tag nach Exposition ist die Feldaktionspotentialdauer der 0,5 Gy-Proben gegenüber den anderen Proben erhöht. Zwei Tage nach Bestrahlungen zeigen alle Proben eine ähnliche Feldaktionspotentialdauer. Am dritten Tag nach Exposition sind die Werte der mit 2 Gy bestrahlten Proben gegenüber den anderen Kulturen verringert.

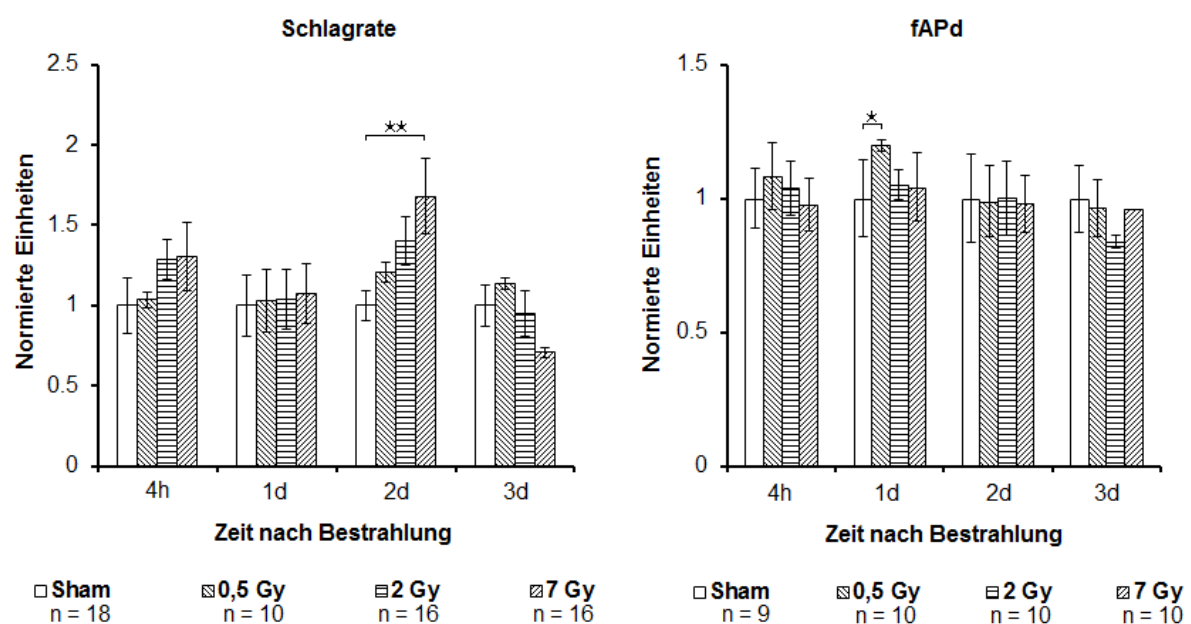


Abbildung 4.15: Die Schlagrate der primären Kulturen ist bis zu zwei Tage nach Bestrahlung dosisabhängig erhöht. Auf die fAPd hat die Bestrahlung fast keine Auswirkungen. Die Schlagrate und Feldaktionspotentialdauer primärer, kardialer Zellkulturen in normierten Einheiten ist gegen die Zeit nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen aufgetragen. Die Schlagrate ist bis zu zwei Tage nach Bestrahlung dosisabhängig erhöht. Die Feldaktionspotentialdauer hingegen ist nur 4 h nach Bestrahlung und einen Tag nach Exposition in den mit 0,5 Gy bestrahlten Proben erhöht. Am 3. Tag nach Exposition ist die fAPd in den 2 Gy-Proben reduziert. Die dargestellten Daten entsprechen den Medianen \pm MAD. Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test ermittelt (CI=95%, * $P < 0,05$).

Die Korrektur der Feldaktionspotentialdauer gegen die Schlagrate nach Bazett ergibt, dass zum Induktionszeitpunkt die Dauer der Feldaktionspotentiale der Kulturen dosisabhängig verlängert ist, wie in Abbildung 4.16 zu sehen. Ein ähnliches, weniger stark ausgeprägtes Verhalten ist auch zwei Tage nach Bestrahlung erkennbar. Einen Tag nach Exposition jedoch ist die fAPdc in den bestrahlten Kulturen verlängert. Das heißt, die Feldaktionspotentialdauer hat sich nicht entsprechend der gesteigerten Schlagrate verkürzt.

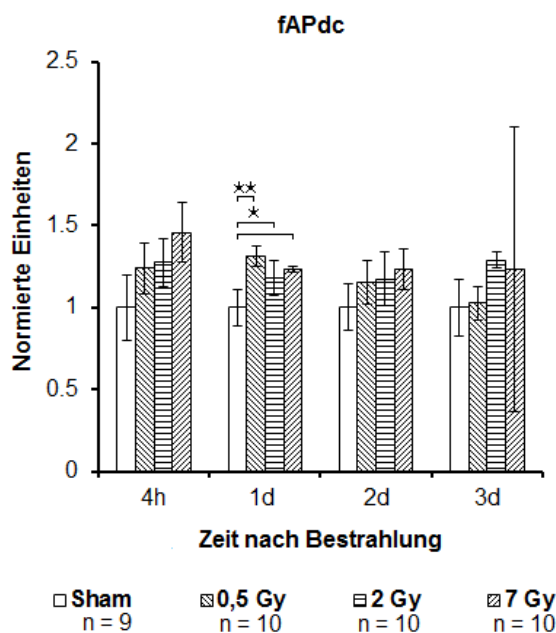


Abbildung 4.16: Einen Tag nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen entsprechen die fAPdc-Werte der bestrahlten Kulturen nicht der Korrelation mit der Schlagfrequenz. Die nach Bazett korrigierte Feldaktionspotentialdauer der primären kardialen Kulturen in normierten Einheiten ist gegen die Zeit nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen aufgetragen. Sowohl 4 h nach Bestrahlung als auch 2 Tage nach Exposition sind die fAPdc-Werte dosisabhängig erhöht. Vier Stunden und von Tag 2 bis 3 nach Bestrahlung scheint, aufgrund fehlender signifikanter Abweichungen, eine gute Korrelation zwischen Schlagrate und fAPd vorzuliegen. Einen Tag nach Bestrahlung ist die frequenzkorrigierte Feldaktionspotentialdauer in den bestrahlten Kulturen statistisch signifikant verlängert. Die gezeigten Daten repräsentieren Mediane \pm MAD. Die Bestimmung der Signifikanzen wurde mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test durchgeführt (CI=95%, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

4.3.2. Bestrahlung humaner iPSC-Kardiomyozyten mit Kohlenstoff-Ionen

In den aus humanen iPS-Zellen differenzierten Kardiomyozyten ergeben sich nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen nur geringfügige Änderungen, sowohl bezüglich der Schlagrate als auch der Feldaktionspotentialdauer (Abbildung 4.17). Lediglich eine Korrelation zwischen beiden Parametern kann an den Werten der mit 0,5 Gy bestrahlten Kulturen abgelesen werden. Dort geht eine statistisch signifikante Erhöhung der Schlagrate mit einer signifikanten Verkürzung der Feldaktionspotentialdauer einher. Generell scheinen die Schlagraten direkt nach Bestrahlung und einen Tag danach zu leicht erhöhten und an Tag zwei und drei nach Exposition zu leicht verringerten Werten zu tendieren, wie an den mit 0,5 Gy bestrahlten Kulturen zu sehen ist. Für die Feldaktionspotentialdauer zeigt sich das entgegengesetzte Bild, wie an den 2 Gy-Kulturen zu erkennen ist. Dennoch sind diese Trends statistisch nicht signifikant.

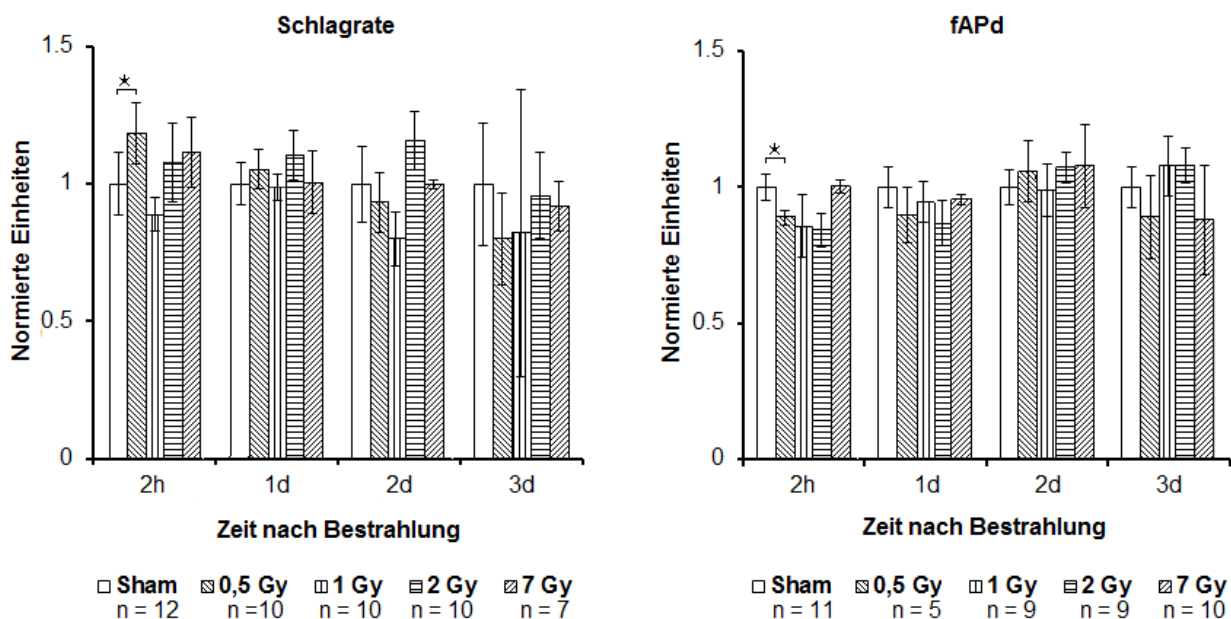


Abbildung 4.17: Weder Schlagrate noch fAPd zeigen nennenswerte Veränderung nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen. Schlagrate und Feldaktionspotentialdauer von aus hiPS-Zellen differenzierten Kardiomyozyten in normierten Einheiten, aufgetragen gegen die Zeit nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen. Beide Parameter zeigen homogen verteilte Werte und keine dosisabhängigen Veränderungen. Lediglich eine Korrelation zwischen Schlagrate und fAPd ist sichtbar, zum einen anhand der 0,5-Gy-Proben 2 h nach Bestrahlung und zum anderen anhand der generellen Trends zu leicht erhöhter Schlagrate, bzw. verkürzter Feldaktionspotentialdauer zu den Zeitpunkten 2 h und einen Tag nach Bestrahlung. An Tag zwei und drei nach Exposition tendieren die bestrahlten Kulturen im Vergleich zu den Sham-Kulturen zu einer leicht verringerten Schlagrate bei gleichzeitig leicht verlängerter fAPd. Die gezeigten Werte entsprechen den Medianen \pm MAD. Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test geprüft (CI=95%, $P < 0,05$).

Die nach Bazett gegen die Schlagrate korrigierten Werte der Feldaktionspotentialdauer sind in Abbildung 4.18 aufgetragen. Die so korrigierten Werte bestätigen eine Verkürzung der Werte der mit 0,5 Gy bestrahlten Kulturen 2 h nach Bestrahlung. Zum selben Zeitpunkt zeigt sich eine ebenso signifikante Verlängerung der Feldaktionspotentialdauer der 2 Gy-Proben. Die anderen Werte weisen keine systematischen strahleninduzierten Veränderungen auf.

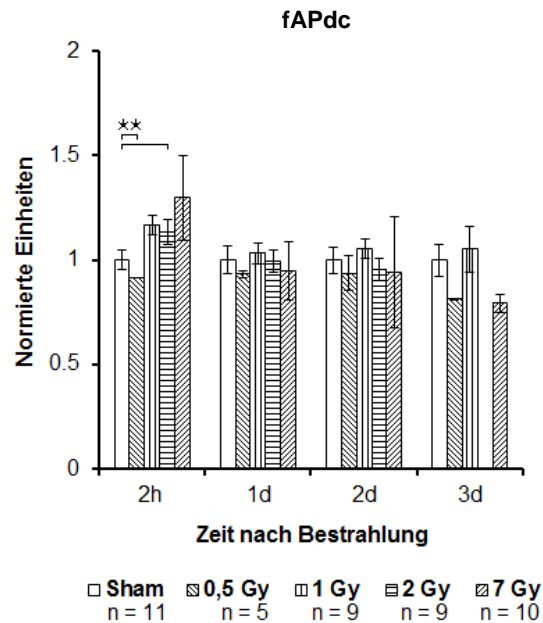


Abbildung 4.18: Zwei Stunden nach Bestrahlung weicht die korrigierte fAPd von der ansonsten klaren Korrelation ab. Die nach Bazett korrigierte Feldaktionspotentialdauer der aus hiPS-Zellen differenzierten Kardiomyozyten ist in normierten Einheiten gegen die Zeit nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen aufgetragen. Lediglich zum Zeitpunkt direkt nach Exposition weichen die Werte der mit 0,5 und 2 Gy bestrahlten Kulturen signifikant von denen der Sham ab. Ansonsten entsprechen die korrigierten Werte in etwa denen der Sham und deuten auf eine gute Korrelation zwischen Schlagrate und Feldaktionspotentialdauer hin. Die dargestellten Werte repräsentieren Mediane \pm MAD. Signifikanztests wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test durchgeführt (CI=95%; ** $P < 0,01$).

Die Signalausbreitungsgeschwindigkeit der humanen Kulturen zeigt nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen eine starke Reduktion (Abbildung 4.19). Bereits direkt nach Bestrahlung deuten die mit 1 bis 7 Gy bestrahlten Proben eine Dosisabhängigkeit dieser Reduktion an. Einen Tag nach Exposition erreichen die Ausbreitungsgeschwindigkeiten aller bestrahlten Proben einen Wert von etwa 40% der Shams. Zwei Tage nach Bestrahlung erreichen die mit 1 bis 7 Gy bestrahlten Proben eine *Conduction Velocity* ähnlich den Sham-Kulturen. Am folgenden Tag fällt die Signalausbreitungsgeschwindigkeit in allen bestrahlten Proben erneut auf etwa 40% der Shams ab.

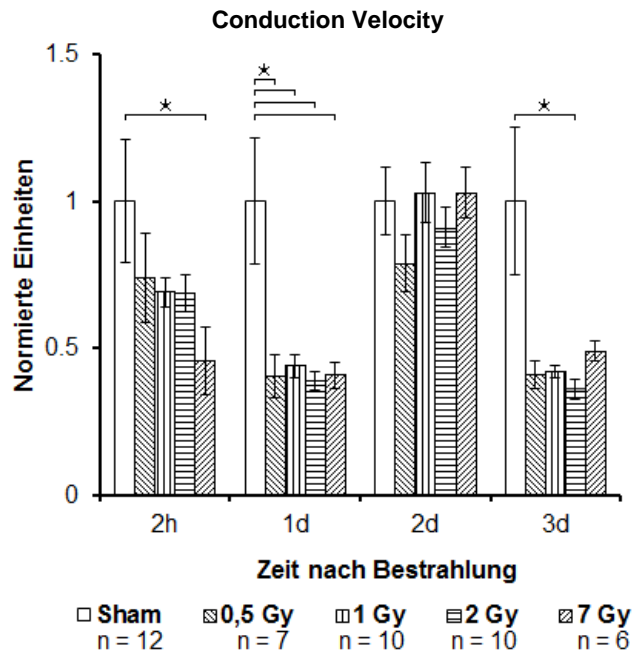


Abbildung 4.19: Die Signalausbreitungsgeschwindigkeit innerhalb humaner Kulturen wird durch Kohlenstoff-Ionenbestrahlung reduziert. Die *Conduction Velocity* der humanen, aus iPS-Zellen differenzierten Kardiomyozytenkulturen ist in normierten Einheiten gegen die Zeit nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen aufgetragen. Bereits 2 h nach Bestrahlung ist eine Reduktion der Signalausbreitungsgeschwindigkeit zu erkennen, die abgesehen von den mit 0,5 Gy bestrahlten Kulturen, dosisabhängig verläuft. Am ersten und dritten Tag nach Bestrahlung liegt die Propagationsgeschwindigkeit aller bestrahlten Proben bei etwa 40% der Shams. Die gezeigten Daten stellen die Mittelwerte \pm Standardfehler dar. Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test berechnet (CI=95%, * $P < 0,05$).

4.3.3. Bestrahlung primärer kardialer Kulturen mit Titan-Ionen

Die Betrachtung der Schlagrate und der Feldaktionspotentialdauer primärer kardialer Zellkulturen nach Exposition mit Titan-Ionen zeigt einen Trend hin zu strahleninduziert verringerten Schlagraten bei gleichzeitig verlängerter Feldaktionspotentialdauer (Abbildung 4.20). Die Schlagratenreduktion ist 3 h nach Bestrahlung am deutlichsten zu erkennen, da hier eine dosisabhängige Verringerung vorliegt, die für die mit 2 und 7 Gy bestrahlten Kulturen statistisch signifikant ist. Diese Verringerung 3 h nach Exposition ist mit einer gleichzeitigen, ebenfalls dosisabhängigen Verlängerung der Feldaktionspotentialdauer verbunden. Besonders die mit 7 Gy bestrahlten Kulturen zeigen ein und zwei Tage nach Exposition eine signifikant verlängerte fAPd. Während drei Tage nach Bestrahlung die Schlagraten der mit 0,5 und 7 Gy bestrahlten Proben verringert und die der 2 Gy-Proben erhöht sind. Dies geht mit einer signifikanten Verlängerung der fAPd der 0,5 und 2 Gy-Kulturen einher.

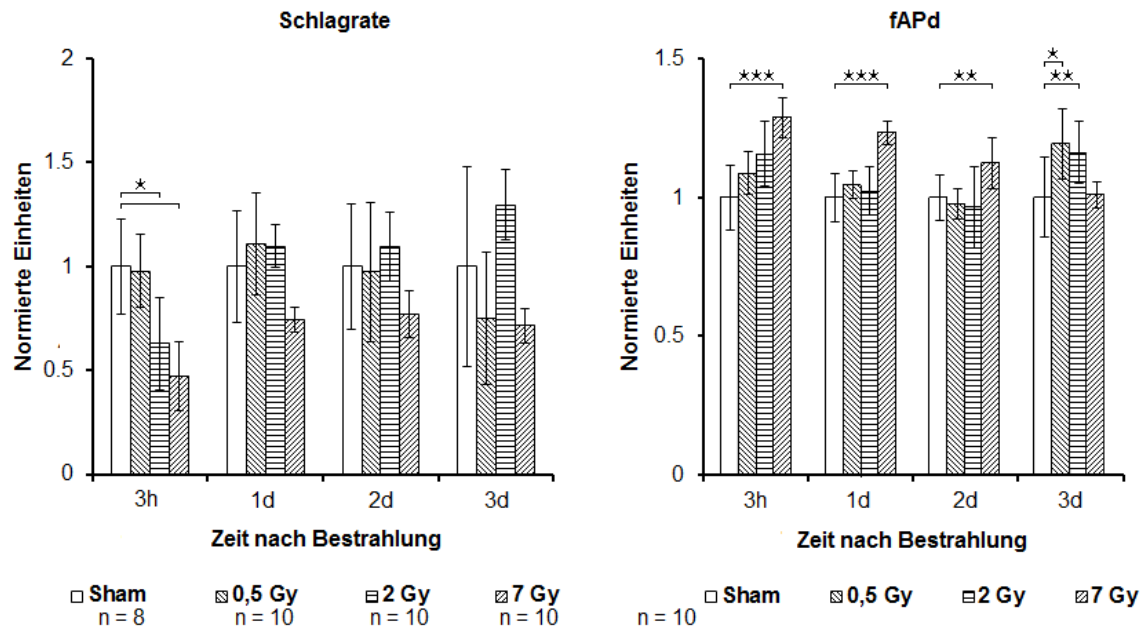


Abbildung 4.20: Die Schlagrate tendiert nach Bestrahlung mit Titan-Ionen zu verringerten, die fAPd zu erhöhten Werten. Die Schlagrate und Feldaktionspotentialdauer primärer kardialer Kulturen ist in normierten Einheiten gegen die Zeit nach Bestrahlung aufgetragen. Bereits 3 h nach Bestrahlung ist die Schlagrate dosisabhängig verringert. Zum selben Zeitpunkt ist die Feldaktionspotentialdauer dosisabhängig erhöht. An den mit 7 Gy bestrahlten Kulturen lässt sich anhand der Schlagrate ein Trend zu verringerten Werten erkennen, während die fAPd einen Trend zu verlängerten Werten aufweist. Die aufgeführten Daten repräsentieren die Mediane \pm MAD. Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test ermittelt (CI=95%, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

Bei Betrachtung der gegen die Schlagrate korrigierten Werte der Feldaktionspotentialdauer wird im Verhältnis eine Verkürzung ersichtlich (Abbildung 4.21). Für alle Messpunkte in bestrahlten Proben ist eine Verkürzung der korrigierten Feldaktionspotentialdauer sichtbar. Eine dosisabhängige Verkürzung 3 h nach Bestrahlung stellt sich ausschließlich für die mit 7 Gy bestrahlten Kulturen als statistisch signifikant heraus. Eine vergleichbare Signifikanz liegt an Tag 3 nach Exposition vor. Zu diesen Zeitpunkten ist die Schlagrate so stark gesunken, dass die verlängerte fAPd nicht mehr der Korrelation nach Bazett entspricht. Das Fehlen von weiteren signifikanten Abweichungen lässt auf eine Korrelation zwischen Schlagrate und fAPd innerhalb der Abweichungstoleranzen schließen.

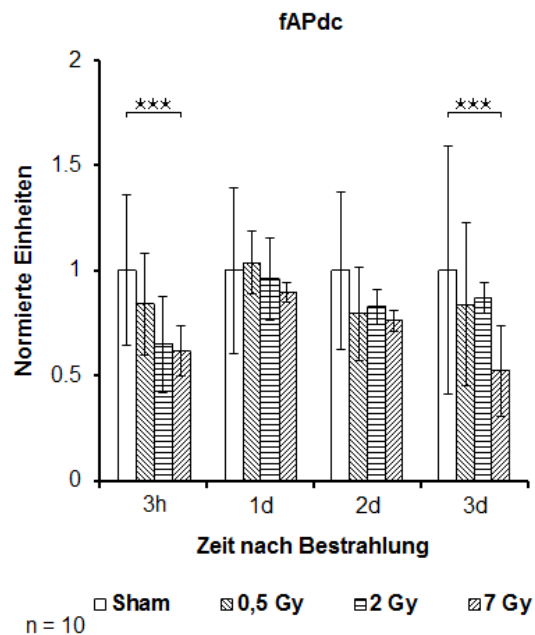


Abbildung 4.21: Die fAPdc der 7 Gy-Proben entsprechen 3 h und 3 Tage nach Bestrahlung nicht der Schlagratenkorrelation. Die mittels Bazett-Formel gegen die Schlagrate korrigierten Werte der Feldaktionspotentialdauer primärer kardialer Kulturen sind in normierten Einheiten gegen die Zeit nach Bestrahlung mit Titan-Ionen aufgetragen. Die fAPdc ist 3 h nach Bestrahlung dosisabhängig reduziert. Über den Zeitraum des Experiments tendiert die korrigierte Feldaktionspotentialdauer exponierter Kulturen zu niedrigeren Werten als die der Sham-Kulturen. Die dargestellten Daten entsprechen den Medianen \pm MAD. Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test bestimmt (CI=95%, *** P <0,001).

4.3.4. Bestrahlung humaner iPSC-Kardiomyozytenkulturen mit Eisen-Ionen

Nach Exposition mit 1 GeV Eisen-Ionen zeigt die Schlagrate der aus humanen iPSC-Zellen differenzierten Kardiomyozytenkulturen einen Trend zu verringerten Werten, während die Feldaktionspotentialdauer leicht verlängerte Werte aufweist (Abbildung 4.22). Dieser Trend ist bereits 2 h nach Bestrahlung zu erkennen. Hier zeigen die mit 1 bis 7 Gy bestrahlten Proben eine Reduktion der Schlagrate. Zugleich liegen die Werte der Feldaktionspotentialdauer derselben Proben auf etwa 120% der Shams. Am deutlichsten ist diese dosisunabhängige Schlagratenverringering am 3. Tag nach Bestrahlung zu erkennen. Zu diesem Zeitpunkt sind die Schlagraten aller exponierten Proben deutlich reduziert. Die fAPd zeigt zu diesem Zeitpunkt jedoch kein klares Bild. Die mit 1 Gy bestrahlten Proben zeigen eine Verlängerung der fAPd auf 134% gegenüber den Sham-Kulturen, während die 7 Gy-Proben etwa den Werten der Shams entsprechen.

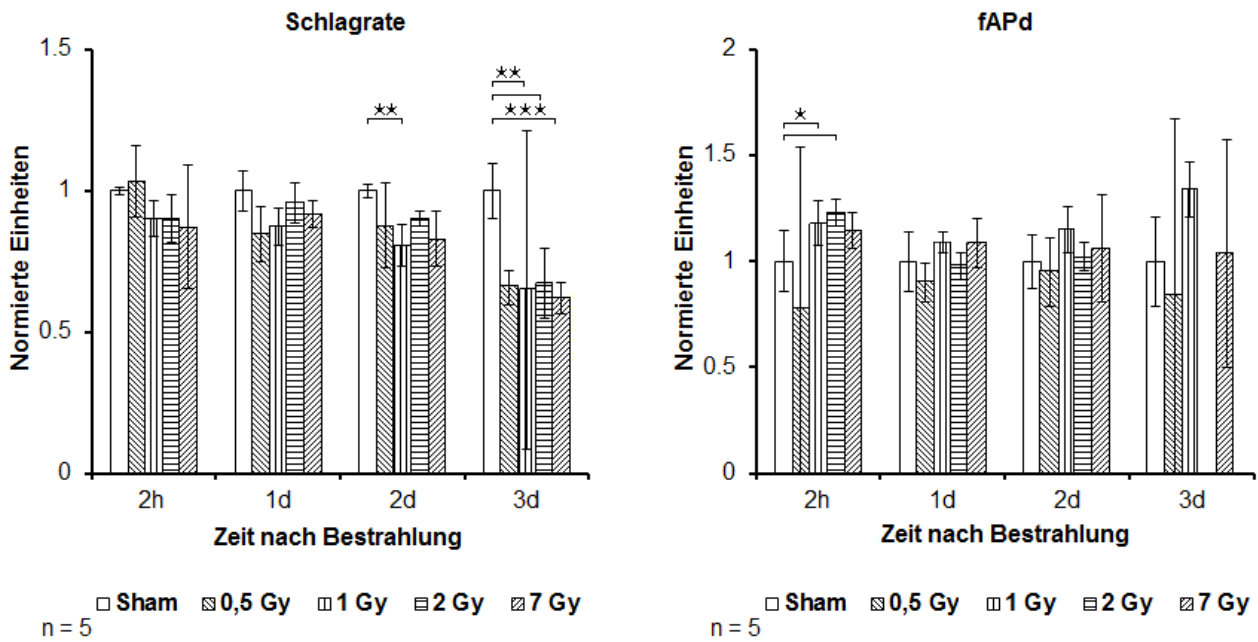


Abbildung 4.22: Nach Eisen-Ionen-Exposition ist die Schlagrate für drei Tage leicht vermindert, die fAPd hingegen tendiert zu leicht erhöhten Werten. Schlagrate und Feldaktionspotentialdauer der hiPSC-Kardiomyozytenkulturen sind in normierten Einheiten gegen die Zeit nach Bestrahlung mit Eisen-Ionen aufgetragen. Bereits 2 h nach Bestrahlung sind die Schlagraten der mit 1 bis 7 Gy bestrahlten Kulturen vermindert, bei gleichzeitig verlängerter Feldaktionspotentialdauer. Die Reduktion der Schlagrate ist 3 Tage nach Bestrahlung in allen bestrahlten Proben ersichtlich. Die gezeigten Daten entsprechen den Medianen \pm MAD. Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test ermittelt (CI=95%, * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001).

Die Korrektur der Feldaktionspotentialdauer deutet auf eine Verlängerung der Signale in den mit 1 bis 7 Gy bestrahlten Proben direkt nach Bestrahlung hin (Abbildung 4.23). Generell treten aber keine statistisch signifikanten Abweichungen von den unbestrahlten Kontrollen auf. Dies ist auf die Korrelation zwischen Schlagrate und Feldaktionspotentialdauer zurückzuführen. Die fAPdc-Werte lagen hier zwischen 330 und 550 ms.

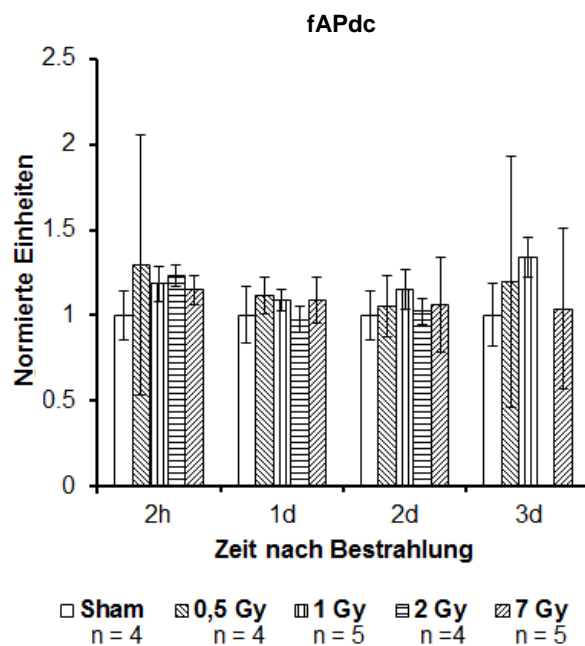


Abbildung 4.23 Nach Bestrahlung mit Eisen-Ionen bleibt die Korrelation zwischen fAPd und Schlagfrequenz relativ gleich. Die nach Bazett korrigierte Feldaktionspotentialdauer der humanen iPSC-Kardiomyozytenkulturen ist in normierten Einheiten gegen die Zeit nach Bestrahlung mit Eisen-Ionen aufgetragen. Die korrigierte Feldaktionspotentialdauer zeigt keine statistisch signifikanten Abweichungen von den Shams. Direkt nach Bestrahlung ist eine nicht signifikante Erhöhung der korrigierten Feldaktionspotentialdauer in den mit 1 bis 7 Gy bestrahlten Kulturen erkennbar. An Tag eins und zwei nach Bestrahlung liegen die Werte nahe der Sham, während drei Tage nach Exposition die Werte der 0,5 und 7 Gy-Proben verkürzt sind. Die gezeigten Daten zeigen die Mediane \pm MAD. Die Daten wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test auf Signifikanzen geprüft (CI=95%).

In Abbildung 4.24 sind die Ergebnisse zur *Conduction Velocity* der humanen iPSC-Kardiomyozyten nach Exposition mit Eisen-Ionen dargestellt. Die Untersuchung der Signalausbreitungsgeschwindigkeit zeigt, dass bereits 2 h nach Bestrahlung eine Verringerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit in allen Proben, die mit 1 bis 7 Gy bestrahlt wurden, auf etwa 75% der Shams stattfindet. Diese Verringerung erreicht einen Tag nach Exposition für alle bestrahlten Kulturen einen Wert von etwa 70% der Shams und bleibt bis zum dritten Tag nach Bestrahlung bestehen, wobei sich die mit 0,5 Gy bestrahlten Kulturen am dritten Tag nach Bestrahlung wieder den Werten der Shams annähern.

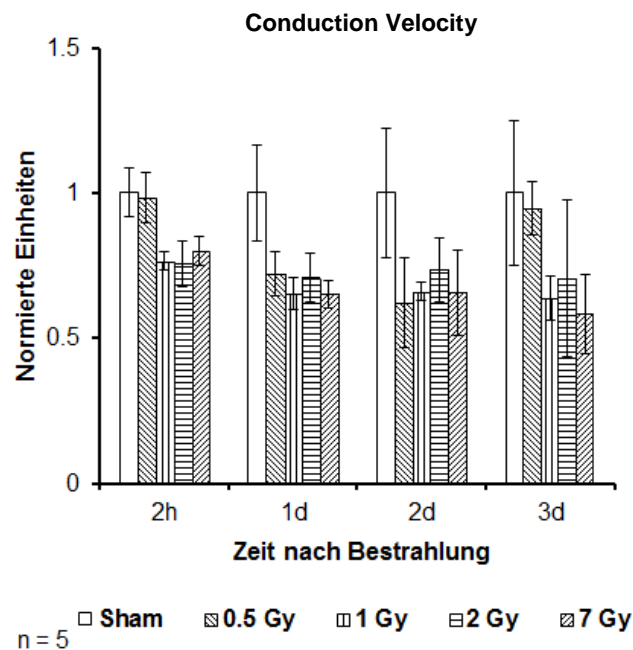


Abbildung 4.24: Die Signalausbreitungsgeschwindigkeit ist in humanen Kulturen nach Eisen-Ionenexposition reduziert. Die *Conduction Velocity* humaner, aus iPSC-Zellen differenzierter Kardiomyozytenkulturen ist in normierten Einheiten gegen die Zeit nach Bestrahlung mit Eisen-Ionen aufgetragen. Bereits 2 h nach Exposition sind die mit 1 bis 7 Gy bestrahlten Proben in ihrer Signalausbreitungsgeschwindigkeit reduziert. An Tag 1 und 2 nach Bestrahlung sind alle mit Eisen-Ionen bestrahlten Kulturen um etwa 30% in ihrer Signalweiterleitungsgeschwindigkeit eingeschränkt. Am dritten Tag nach Exposition zeigen nur die mit 0,5 Gy bestrahlten Proben wieder Werte ähnlich den Sham-Kulturen. Die gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardfehler. Es wurde mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test auf Signifikanz geprüft (CI=95%).

4.4. Ergebnisse der Behandlung mit Pharmazeutika und Röntgenbestrahlung

Um den Einfluss pharmakologischer Substanzen auf die kardiale Elektrophysiologie in Verbindung mit ionisierender Strahlung zu untersuchen, wurden Versuche mit Isoproterenol und Chinidin an den hiPSC-Kardiomyozyten durchgeführt. Isoproterenol ist ein Analogon des Stresshormons Adrenalin, welches im Körper eine sympathische Reaktion auf die Schlagrate des Herzes bewirkt. Chinidin ist vornehmlich ein Natriumkanal-Blocker, der heutzutage nur noch selten in der Therapie gegen beispielsweise Tachyarrhythmien und Vorhofflimmern eingesetzt wird. Dies liegt hauptsächlich an den Nebenwirkungen des Stoffes, zu denen je nach Dosierung AV-Block, *Torsade de pointes* und Tachykardien zählen können. Aufgrund dieser Nebenwirkungen stellt Chinidin ein geeignetes Mittel dar, um eine pathologische Vorbelastung zu simulieren.

Für die Versuche wurden pharmakologisch vorbehandelte Kulturen Röntgenstrahlung ausgesetzt. Um zu gewährleisten, dass die ionisierende Strahlung keine Veränderung an der biochemischen Wirkung der Medikamente zur Folge hat, wurden zunächst lediglich mit den Pharmazeutika versehene Medien bestrahlt und anschließend die Kardiomyozytenkulturen damit behandelt.

4.4.1. Röntgenbestrahlung der Pharmazeutika

Die eingesetzte Endkonzentration im Medium betrug 500 nM für Isoproterenol und 1 μ M im Falle von Chinidin. Als Negativkontrolle wurde mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandeltes Medium verwendet, da DMSO als Lösungsmittel für die Medikamente eingesetzt wurde. Das derart präparierte Medium wurde Röntgenstrahlung von 2 und 7 Gy ausgesetzt. In Abbildung 4.25 sind die auf die Kontrolle normierten Messergebnisse für die Schlagrate und die Feldaktionspotentialdauer gezeigt. Die Schlagraten der hiPSC-Kardiomyozyten weisen einen Tag nach Behandlung mit Isoproterenol eine signifikante Erhöhung auf. Das bestrahlte Isoproterenol zeigt keine signifikante Reduktion in seiner Wirkung auf die Schlagrate. Zum gleichen Zeitpunkt ist auch eine signifikante Verkürzung der Feldaktionspotentialdauer nach Behandlung der Kulturen durch mit 7 Gy bestrahltem Isoproterenol zu erkennen. Unbestrahltes Chinidin bewirkt in der verwendeten Konzentration eine Senkung der Schlagrate. Nach Bestrahlung der Chemikalie fällt die Schlagratensenkung weniger stark aus und ist nicht statistisch signifikant. Außerdem zeigt sich, dass die Feldaktionspotentialdauer nach Applikation von mit 2 Gy bestrahltem Chinidin statistisch signifikant gegenüber den Kontrollen und den mit unbestrahltem Chinidin behandelten Proben verlängert ist.

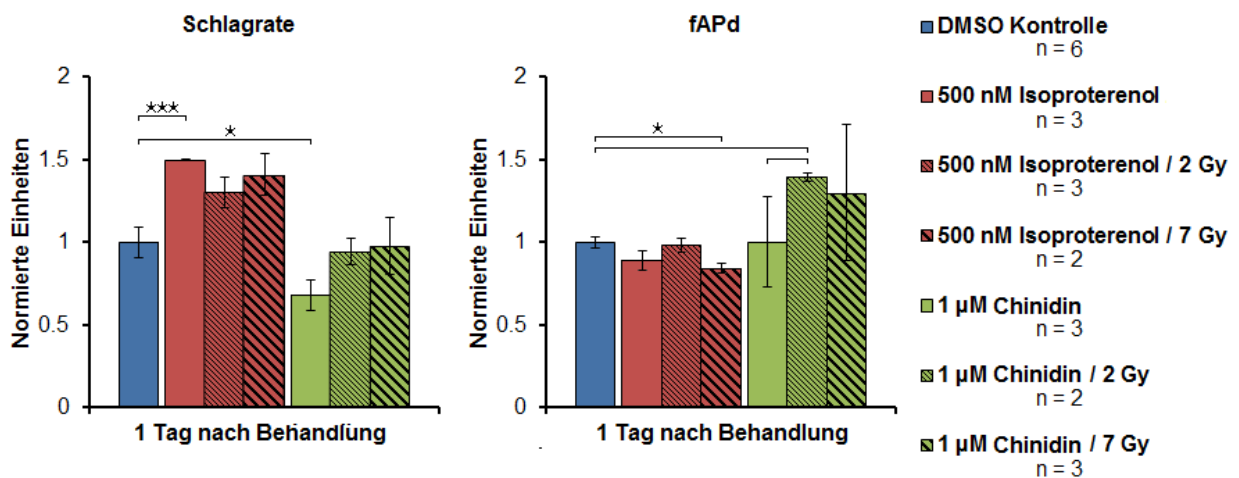


Abbildung 4.25: Röntgenbestrahltes Chinidin zeigt nach Bestrahlung eine veränderte elektrophysiologische Wirkung. Gezeigt ist die auf DMSO-Kontrollen normierte Schlagrate und Feldaktionspotentialdauer der hiPSC-Kardiomyozytenkulturen einen Tag nach Behandlung mit vor Applikation bestrahlten Pharmazeutika. Bestrahltes wie auch unbestrahltes Isoproterenol bewirkt eine erhöhte Schlagrate bei gleichbleibender fAPd. Chinidin bewirkt eine Reduktion der Schlagrate bei gleichbleibender fAPd. 2 Gy Röntgenstrahlung verändern die Wirkung von Chinidin hin zu einer Verlängerung der fAPd. Die dargestellten Daten repräsentieren die Mediane \pm MAD. Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test ermittelt (CI=95%, * $P < 0,05$; *** $P = 0,001$).

Um die Änderung der Feldaktionspotentialdauer zu verifizieren, wurde eine Korrektur nach Bazett vorgenommen (Abbildung 4.26). Dabei zeigt sich, dass lediglich die Verlängerung der Feldaktionspotentialdauer nach Behandlung mit 2 Gy-bestrahltem Chinidin eine statistisch signifikante Abweichung zur DMSO-Kontrolle aufweist, aber nicht zu den mit unbestrahltem Chinidin behandelten Proben. Die mit Isoproterenol behandelten Kulturen zeigen alle eine gute Korrelation zwischen Feldaktionspotentialdauer und Schlagrate. Hierauf deuten besonders die deutlich kleineren Fehlerbalken der mit bestrahltem Isoproterenol behandelten Proben hin.

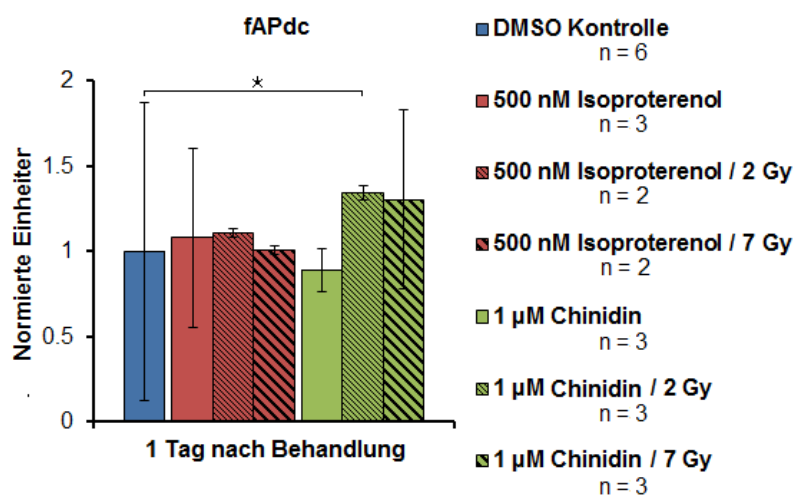


Abbildung 4.26: Das mit 2 Gy bestrahlte Chinidin bewirkt eine statistisch signifikante Verlängerung der fAPdc. Dargestellt ist die nach Bazett korrigierte Feldaktionspotentialdauer (fAPdc) der hiPSC-Kardiomyozytenkulturen in auf die DMSO-Kontrollen normierten Einheiten einen Tag nach Behandlung mit bestrahlten Pharmazeutika. Die korrigierte Feldaktionspotentialdauer bestätigt eine klare Korrelation zwischen fAPd und Schlagrate. Die Verlängerung der fAPd nach Behandlung mit 2 Gy-bestrahltem Chinidin ist statistisch signifikant im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, nicht jedoch zu den mit unbestrahltem Chinidin behandelten Proben. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mediane \pm MAD. Signifikanztests wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test durchgeführt (CI=95%, * $P < 0,05$).

4.4.2. Röntgenbestrahlung pharmakologisch behandelter Kulturen

Nachdem die Effekte von Röntgenstrahlung auf die Pharmazeutika bestimmt wurden, konnte mit der pharmakologischen Behandlung und anschließenden Röntgenexposition fortgefahren werden. Die Kulturen wurden dabei mit identischen Konzentrationen von Isoproterenol bzw. Chinidin wie im Vorexperiment behandelt und direkt im Anschluss einer Dosis von 2 Gy Röntgenstrahlung ausgesetzt. Abbildung 4.27 zeigt die nach Behandlung gemessenen Schlagraten der Kulturen.

Die mit 500 nM Isoproterenol behandelten Proben zeigen bis zu 6 Tage nach Behandlung eine erhöhte Schlagrate gegenüber den DMSO-Kontrollen. Dabei steigt die Schlagrate stetig bis zu Tag 5 nach Behandlung an und erreicht dort ihren Höchstwert, der etwa dem 1,8-fachen der Kontrollen entspricht. An den Tagen 4 und 5 nach Behandlung sind die Schlagratenerhöhungen statistisch signifikant

gegenüber den Kontrollen. Die Schlagrate sinkt 6 Tage nach Behandlung wieder auf das etwa 1,5-fache der Kontrollen.

Die mit Isoproterenol behandelten, bestrahlten Proben weisen einen Tag nach Behandlung eine drastisch erhöhte Schlagrate nahe dem doppelten Wert der Kontrollen auf. Über den Verlauf des Experiments liegt die Schlagrate der bestrahlten Isoproterenol-Proben meist oberhalb der unbestrahlten Proben. Der Höchstwert von etwa dem 2,5-fachen der Kontrollen wird hier ebenfalls an Tag 5 nach Behandlung und Bestrahlung erreicht. Die erhöhten Schlagraten der bestrahlten Isoproterenol-Proben sind an Tag 1 und 6 nach Behandlung und Bestrahlung statistisch signifikant.

Die unbestrahlten Proben, die mit 1 μM Chinidin behandelt wurden, zeigen im Gegenzug eine dauerhaft reduzierte Schlagrate, die im Bereich zwischen 60 und 90% der Schlagraten der DMSO-Kontrollen liegt.

Die mit Chinidin behandelten Kulturen, die zusätzlich bestrahlt wurden, zeigen meist Schlagraten oberhalb der unbestrahlten Chinidin-Kulturen und unterhalb der DMSO-Kontrollen.

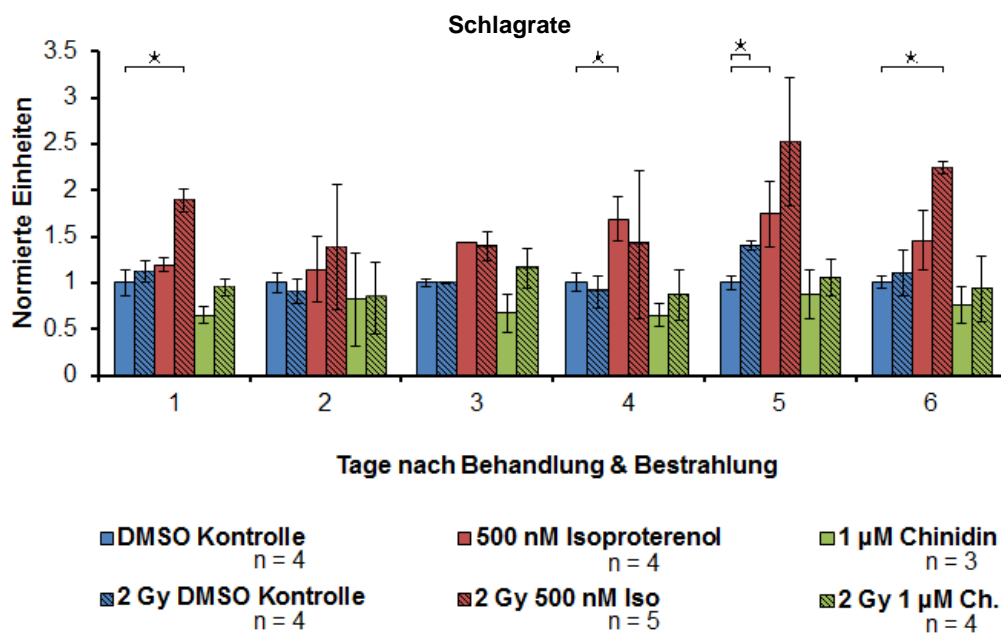


Abbildung 4.27: Die Applikation von Chemikalien und Röntgenstrahlung beeinflusst die Schlagrate von hiPSC-Kardiomyozyten. Aus hiPS-Zellen differenzierte Kardiomyozytenkulturen wurden mit 500 nM Isoproterenol oder 1 μM Chinidin und Röntgenbestrahlung mit 2 Gy behandelt. Die Werte der korrigierten Feldaktionspotentialdauer sind auf die DMSO-Kontrollen normiert und gegen die Tage nach Behandlung und Bestrahlung aufgetragen. Isoproterenol-behandelte Kulturen zeigen eine erhöhte Schlagrate, die nach Bestrahlung noch weiter erhöht ist. Kulturen, die mit Chinidin behandelt wurden, verringern ihre Schlagrate für bis zu 6 Tage nach Zugabe. Dieser Effekt wird durch Bestrahlung vermindert. Die präsentierten Daten geben die Mediane \pm MAD wieder. Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test ermittelt (CI=95%, * $P < 0,05$).

Die Feldaktionspotentialdauer der mit 500 nM Isoproterenol und 2 Gy Röntgenstrahlung behandelten hiPSC-Kardiomyozytenkulturen zeigt eine signifikante Verlängerung 3 und 5 Tage nach Behandlung (Abbildung 4.28). Weiterhin weisen die bestrahlten und mit Chinidin behandelten Kulturen eine verlängerte Feldaktionspotentialdauer gegenüber den DMSO-Kontrollen und den unbestrahlten Chinidin-Kulturen auf. Letztere neigen an Tag 4 und 5 nach Behandlung zu einer verkürzten Feldaktionspotentialdauer. Generell scheinen die bestrahlten Kulturen eine Verlängerung der Feldaktionspotentialdauer erfahren zu haben, die durch medikamentöse Behandlung etwas stärker ausfällt.

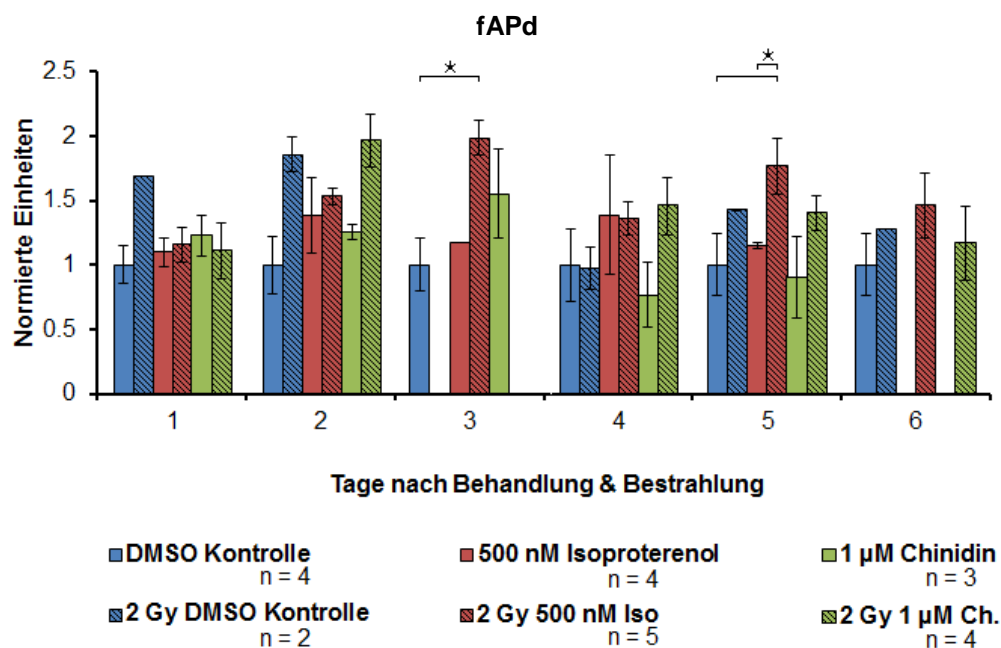


Abbildung 4.28: Röntgenbestrahlung und Applikation von Chemikalien beeinflussen die Feldaktionspotentialdauer. Aus hiPS-Zellen differenzierte Kardiomyozytenkulturen wurden mit 500 nM Isoproterenol oder 1 µM Chinidin und Röntgenbestrahlung mit 2 Gy behandelt. Die Werte der korrigierten Feldaktionspotentialdauer sind auf die DMSO-Kontrollen normiert und gegen die Tage nach Behandlung und Bestrahlung aufgetragen. Die bestrahlten mit Isoproterenol behandelten Kulturen zeigen an Tag 3 und 5 nach Behandlung und Bestrahlung eine signifikant erhöhte Feldaktionspotentialdauer. An Tag 5 ist die fAPd auch signifikant gegenüber den unbestrahlten Isoproterenol-Kulturen verlängert. Die bestrahlten mit Chinidin behandelten Kulturen zeigen ab Tag 2 nach Behandlung und Bestrahlung ebenfalls eine verlängerte Feldaktionspotentialdauer gegenüber den DMSO-Kontrollen und den unbestrahlten Chinidin-Kulturen. Die präsentierten Daten stellen die Mediane ± MAD dar. Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem ungepaartem t-Test geprüft (CI=95%, * $P < 0,05$).

Diese Beobachtung wird durch die Korrektur der Feldaktionspotentialdauer gegen die Schlagrate relativiert (Abbildung 4.29). Zwar zeigt sich, dass nach Behandlung und Bestrahlung alle Kulturen eine gegenüber den Kontrollen erhöhte korrigierte Feldaktionspotentialdauer aufweisen, jedoch liegen die Werte der bestrahlten Chinidin-Kulturen allesamt unterhalb derer der unbestrahlten mit Chinidin behandelten Proben. Letztere zeigen 3 Tage nach Behandlung eine signifikant erhöhte fAPdc. Die Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten mit Isoproterenol behandelten Kulturen fallen hier geringer aus. Die bestrahlten Isoproterenol-Kulturen zeigen 3 und 6 Tage nach Behandlung und

Bestrahlung eine signifikante Erhöhung der korrigierten Feldaktionspotentialdauer gegenüber den unbestrahlten DMSO-Kontrollen. Auffällig sind die Unterschiede zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Kontrollen, da die bestrahlten Proben, außer die mit Chinidin behandelten Kulturen, zumeist deutlich erhöhte fAPdc-Werte aufweisen.

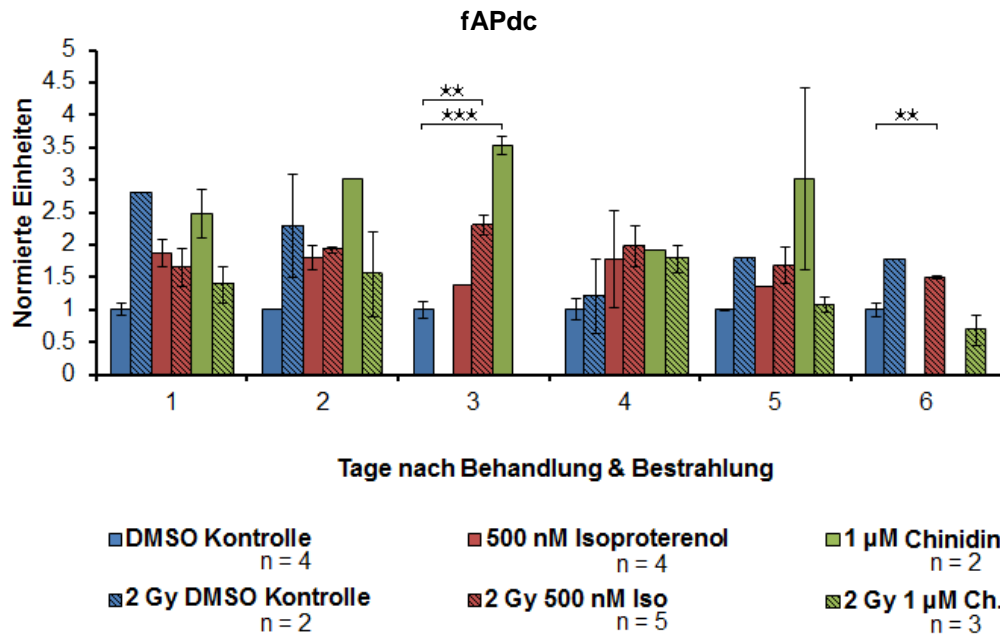


Abbildung 4.29: Alle Kulturen zeigen nach Behandlung erhöhte fAPdc-Werte im Vergleich zu den unbestrahlten DMSO-Kontrollen. Aus hiPS-Zellen differenzierte Kardiomyozytenkulturen wurden mit 500 nM Isoproterenol oder 1 µM Chinidin behandelt und mit einer Röntgendosis von 2 Gy bestrahlt. Die Werte der korrigierten Feldaktionspotentialdauer sind auf die DMSO-Kontrollen normiert und gegen die Tage nach Behandlung und Bestrahlung aufgetragen. Die fAPdc der unbestrahlten mit Chinidin behandelten Proben zeigt erhöhte Werte gegenüber den DMSO-Kontrollen und unbestrahlten Chinidin-Kulturen. Die bestrahlten und unbestrahlten mit Isoproterenol behandelten Proben weisen meist nur geringe Unterschiede auf. Die DMSO-Kontrollen zeigen nach Bestrahlung erhöhte fAPdc-Werte. Die gezeigten Daten entsprechen den Medianen ± MAD. Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test bestimmt (CI=95%, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

5. Diskussion

Im nachstehenden Kapitel werden die Ergebnisse entsprechend ihrer Reihenfolge im Ergebnisteil diskutiert. Zunächst werden in Abschnitt 5.1 die Ergebnisse der Charakterisierung der Zellsysteme behandelt. In Abschnitt 5.2 werden die zu den Röntgenversuchen erhaltenen Ergebnisse diskutiert, während sich Abschnitt 5.3 mit der Diskussion der Ergebnisse zu den Schwerionenversuchen befasst. Beide Abschnitte zu den Versuchen mit ionisierender Strahlung beziehen die im Zuge des Verbundprojektes von Dr. Anja Heselich untersuchten zellulären Endpunkte mit ein. Schließlich werden in Abschnitt 5.4 die Ergebnisse zum Versuch der kombinierten Wirkung von Strahlung und Pharmazeutika diskutiert.

5.1. Charakterisierung der Zellsysteme

Ziel dieser Studie war die Erforschung des Einflusses ionisierender Strahlung auf die Elektrophysiologie kardialer Zellen. Hierzu wurden zwei Zellkultursysteme verwendet. Um die Unterschiede zwischen den Zellkultursystemen herauszuarbeiten, wurden diese einander anhand verschiedener elektrophysiologischer Parameter gegenübergestellt. Zunächst fällt bei Betrachtung der Dauer der elektrophysiologischen Aktivität auf, dass die hiPSC-Kardiomyozyten sich im Mittel länger in Kultur halten lassen, als die primären, kardialen Zellen. In Abbildung 4.1 unterscheiden sich die humanen Zellen von den primären Kulturen durch einen zwei Tage späteren, weniger drastischen Abfall auf 59% Kulturen mit aktiven Elektroden. Weiterhin verweilen die humanen Zellen zwei Tage länger stabil auf diesem Plateau und fallen erst danach an Tag 15 schneller ab als die primären Hühnerkardiomyozyten. Diese drastischen Abfälle in der Zahl aktiver Kulturen liegen daran, dass sich einige der Zellen über die Dauer des Experiments ablösen, bis hin zum vollständigen Verlust des Zellrasens. Dieses Phänomen tritt in den primären Kulturen deutlich stärker auf als in den humanen.

Die Schlagraten beider Zellsysteme sind ähnlich, die Varianz ist in den humanen Zellen etwas geringer (Abbildung 4.3). Im Vergleich der Signalausbreitungsgeschwindigkeiten fällt auf, dass die humanen Zellen generell höhere Werte erreichen, aber auch mit größeren Schwankungen behaftet sind. Die niedrigere Ausbreitungsgeschwindigkeit der primären Zellkulturen könnte durch die Anwesenheit der nicht erregbaren Zellen zu erklären sein. Durch Ankopplung von nicht erregbaren Zellen wie Fibroblasten mittels *Gap Junction*-Kanälen reduziert sich die Reizweiterleitungsgeschwindigkeit aufgrund der Erhöhung der kapazitiven Last [103-105].

Die humanen iPSC-Kardiomyozyten zeigen eine deutlich längere Feldaktionspotentialdauer im Vergleich zu den primären kardialen Zellen. Nach Frequenzkorrektur nach Bazett liegen die Werte der Hühnerkardiomyozyten im Mittel bei 210 ms, während die der humanen Zellen mit 420 ms deutlich darüber und gleichzeitig sehr nahe dem Schwellenwert zum *Long-QT*-Syndrom von 430 ms liegen. Die

Literatur zu den verwendeten *iCell Cardiomyocytes* attestiert den Zellen in Bezug auf ihr genetisches, biochemisches, mechanisches und auch elektrophysiologisches Verhalten zwar eine große Ähnlichkeit zu humanen Kardiomyozyten [93-96]. Besonders in Bezug auf ihre Ionenkanäle sind die *iCell Cardiomyocytes* den adulten humanen Zellen sehr ähnlich [97], jedoch geht keine Publikation auf die native Länge der Feldaktionspotentialdauer ein. In pharmakologischen Studien, die an *iCell Cardiomyocytes* durchgeführt wurden, ist die Feldaktionspotentialdauer einer der bedeutendsten Parameter [60, 62]. Auf die nativ abnorme Länge der Signale oder dass diese nach gängiger Frequenzkorrektur bedenklich verlängerte Werte erreichen, die eher pathologischem Charakter entsprechen, wird dort allerdings nicht eingegangen. Lediglich Ma *et al.* beschreiben in ihrer *Patch-Clamp*-Studie, dass *iCell Cardiomyocytes* Aktionspotentiale aufweisen, die sowohl atrial-, nodal- und ventrikulär-artig sind [95]. Lediglich zu letzteren wird beschrieben, dass sie Feldaktionspotentiale innerhalb des für Menschen typischen Bereichs aufweisen. Die fAPd der anderen beiden Kardiomyozytentypen werden nicht diskutiert. Eine Unterscheidung in unterschiedliche Typen von Kardiomyozyten kann mittels MEA-System nicht vorgenommen werden. Die gemessenen Feldaktionspotentiale entsprechen der Summation der Ionenströme von Zellen in Elektrodennähe. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die atrial- und nodal-artigen Kardiomyozyten eine längere Feldpotentialdauer aufweisen und damit einhergehend die Summation der Signale aller drei Zelltypen ebenfalls verlängern.

Eine Analyse der Amplituden beider Zellsysteme ist aufgrund der hohen intrinsischen Varianz nur begrenzt aussagekräftig. In keinem Versuch dieser Arbeit wurden signifikante Veränderungen bezüglich der Amplituden beobachtet. Die Höhe der Amplituden hängt stark von der Kopplung von Elektrode und Zelle, also der Adhäsion der Zellen an der Elektrodenoberfläche, ab und weniger von intrazellulären elektrophysiologischen Mechanismen. Das spricht zusätzlich dafür, diesem Parameter vor dem Hintergrund elektrophysiologischer Untersuchungen nur eine untergeordnete Rolle zukommen zu lassen.

Einerseits bieten die primären kardialen Kulturen experimentative Vorteile wie die kostengünstige Verfügbarkeit, die einfache Handhabung der Zellkultur, und die kürzere Kultivierungsdauer, bis zuverlässig synchrone Signale gemessen werden können. Nachteilig ist die im Vergleich zu den humanen Kulturen in mehreren Parametern erhöhte Variabilität, welche eine statistische Evaluierung erschwert. Dazu zählt die Anzahl aktiver Elektroden, da sich die primären Zellen nach einigen Tagen der Kultivierung stärker ablösen, was in einigen Fällen dazu führt, dass sich das ganze funktionelle Synzytium von der Oberfläche des Chips ablöst. Auch die Schlagrate ist stärkeren Schwankungen unterworfen. Dies mag darin begründet sein, dass sich bei der Aussaat der primären Zellen auf die MEA-Chips die jeweilige Zusammensetzung der verschiedenen Schrittmacherzellen nicht kontrollieren lässt. Ebenfalls hängen mit dem Ablösen der Zellen höchstwahrscheinlich die größeren Schwankungen in der

Reizweiterleitungsgeschwindigkeit zusammen, da schwache Verknüpfungen entlang der Glanzstreifen zu Zellen der oberen Zelllagen, die sich im Prozess des Ablösens befinden, die Variabilität der Werte erhöhen könnten. Weiterhin wäre der Einfluss mehrerer Schrittmacherzentren mit unterschiedlichen Ausbreitungsvektoren als Erklärung denkbar [106]. Schließlich hat es sich oft als schwierig herausgestellt, in den aus primären Kulturen aufgenommenen Signalen die T-Welle zu identifizieren, was die Auswertung der Feldaktionspotentialdauer erschwert und die Zahl verwertbarer Proben senkt. Zu den modellbedingten Nachteilen zählen der embryonale als auch der primäre Charakter der Zellen, durch den eine Vielzahl entwicklungsbiologischer Prozesse innerhalb der Kulturen Einfluss auf die Elektrophysiologie nehmen könnten, die im adulten Organismus nicht zum Tragen kommen. Weiterhin wurden für jedes Experiment mehrere Embryonen präpariert, und deren Zellen in Suspension gebracht. Trotz standardisierter Protokolle ergaben sich dadurch zwangsläufig interexperimentelle Unterschiede.

Die Vorteile der aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierten Kardiomyozytenkulturen sind neben der bereits beschriebenen Nähe zum Menschen die kommerzielle Verfügbarkeit, die geringere Variabilität und die damit einhergehende Möglichkeit, auch interexperimentell Ergebnisse mit höherer Vergleichbarkeit zu erzielen. Somit sind die humanen Kulturen besser geeignet, um Rückschlüsse auf die Elektrophysiologie des Menschen zu ziehen. Dennoch zeigen gerade Abweichungen von der klinisch etablierten Norm der Feldaktionspotentialdauer bzw. dem etwaigen Pendant des QT-Intervalls auf, dass solche Rückschlüsse nur unter Vorbehalt getroffen werden können. Die Nachteile des humanen Zellkultursystems stellen die schwierigere Handhabung sowie die höheren Kosten dar, die gegebenenfalls den Einsatz größerer Probenzahlen limitieren.

Trotz der hier genannten Vor- und Nachteile sind beide Zellkultursysteme für die Durchführung dieser Studie sehr geeignet. Die primären kardialen Zellen erwiesen sich als ein adäquates Zellkultursystem für die Etablierung der Methodiken, da sie durch ihre einfache Handhabung einen leichteren Zugang zur Datengenerierung gewähren und damit ausgezeichnet für präliminäre Versuche und Hypothesentests geeignet sind. Hingegen eignen sich die humanen Zellen für weiterführende Evaluierungen und *Proof-of-concept*-Experimente, die Rückschlüsse auf Effekte bezüglich der menschlichen Elektrophysiologie gewähren.

5.2. Röntgenversuche

Die Effekte von Röntgenstrahlung auf die verwendeten Zellsysteme wurden innerhalb einer Dosisspanne von 0,5 bis 7 Gy untersucht. Dabei konnten deutlich sichtbare elektrophysiologische und zelluläre Reaktionen beobachtet werden. Die elektrophysiologischen Daten zu den primären Kulturen zeigen einen dosisabhängigen Anstieg der Schlagrate nach Strahlenexposition, der im Falle der mit 7 Gy bestrahlten Proben um zwei Tage verzögert eintritt (Abbildung 4.9). Dieser Anstieg korreliert mit einer

Verkürzung der Feldaktionspotentialdauer (Abbildung 4.10). Die humanen Kulturen hingegen zeigen den gegenteiligen Effekt auf die Schlagrate. Hier bewirkt Röntgenbestrahlung eine dosisabhängige Schlagratenreduktion, die bis zu 7 Tage nach Strahlenexposition anhält (Abbildung 4.12). Die Korrelation dieser Verringerung mit der Feldaktionspotentialdauer ist jedoch weniger eindeutig. Zwar ist eine Dosisabhängigkeit der Werte nur zum Zeitpunkt der Induktion und erneut 6 Tage nach Bestrahlung erkennbar, dennoch tendieren die Werte nach Bestrahlung eher zu einer verlängerten Feldaktionspotentialdauer (Abbildung 4.13). Daher kann vermutet werden, dass ionisierende Strahlung die elektrophysiologische Funktionalität der kardialen Zellen für mindestens 7 Tage nach Bestrahlung beeinflusst.

Während die elektrophysiologischen Änderungen beider Zellkultursysteme kurz nach Exposition auftreten, ist die Verkürzung der Feldaktionspotentialdauer weniger stabil und unterliegt einer höheren Variabilität als die Schlagrate. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Schlagrate, gemessen in Schlägen pro Minute, für alle gemessenen Elektroden desselben MEA-Chips synchron ist, während die Feldaktionspotentialdauer, bestimmt anhand eines gemittelten Signals einer Elektrode, größere Variationen sowohl von Elektrode zu Elektrode als auch von *Spike* zu *Spike* aufweist. Generell sollte eine Erhöhung der Schlagrate mit einer Verringerung der Feldaktionspotentialdauer einhergehen und umgekehrt. In zahlreichen EKG-basierten Studien wird die Schlagrate oder ihr Kehrwert auf verschiedene Weisen mit dem entsprechenden QT-Intervall korreliert [47]. Ein solches Verhältnis wird besonders von den aus primären Kulturen erhaltenen Ergebnissen unterstützt.

Die Korrektur der Feldaktionspotentialdauer gegen das *Interspike*-Intervall nach Bazett [82] ergibt für beide Zellsysteme eine klare Korrelation (Abbildung 4.11). Diese Daten legen nahe, dass Röntgenstrahlung eine veränderte Schlagrate und damit einhergehend eine invers beeinflusste Feldaktionspotentialdauer bewirkt. Warum Röntgenbestrahlung derart gegenteilige Effekte auf die Schlagrate beider Zellkultursysteme ausübt, ist unbekannt, ebenso wie die zugrundeliegenden Mechanismen.

Um Einblick in diese Mechanismen zu erlangen, wurden begleitend zu dieser Arbeit die klassischen Endpunkte der zellulären Strahlenantwort wie die Reparatur von DNA-Schäden und dem Zellzyklusverlauf von Dr. Anja Heselich analysiert [73]. Die Induktion und Reparatur von DSBs nach Behandlung mit ionisierender Strahlung wurde anhand der Histon H2AX-Phosphorylierung untersucht, die in der Umgebung eines DSB stattfindet und daher als Marker zur Identifikation von DSBs genutzt werden kann [107, 108]. DNA-Reparatur und das Fortschreiten des Zellzyklus sind miteinander verbunden [109, 110], daher wurde ebenso die Zahl der S-Phase-Zellen mittels Verfolgung der Inkorporation des Thymidin-Analogons BrdU während der DNA-Replikation [111] analysiert. Um außerdem den Eintritt in die Mitose zu untersuchen, wurde der mitotische Index mittels immunohistochemischer Färbung des phosphorylierten Histons H3 bestimmt, welches den Beginn der Mitose kennzeichnet [112, 113]. Die Ergebnisse zeigen direkt nach Bestrahlung einen dosisabhängigen

Anstieg der γ H2AX-positiven Zellen, aber keine direkte Reduktion an Zellen, die in die S-Phase eintreten. Jedoch kann eine signifikante Reduktion der in die Mitose eintretenden Zellen verzeichnet werden. Dies weist auf eine mögliche Aktivierung des G2/M-, aber nicht des G1/S-*Checkpoints* hin. Hiermit stimmen die Daten von Deckbar *et al.* überein, die den G2/M-*Checkpoint* als schnell aktivierenden Mechanismus beschreiben, während eine Akkumulation in G1/S zu einem späteren Zeitpunkt stattfindet [114-116]. Die Reparaturkapazität der Hühnerkardiomyozyten wurde von Yin *et al.* in DT40 Lymphozyten beschrieben, dort wurden strahleninduzierte DSBs biphasisch mittels nicht-homologem *End-Joining* (NHEJ) und homologer Rekombination (HR) repariert [117]. Die Daten zeigen eine Reparatur der DNA-Schäden über die Zeit. Trotz einer aktiven DNA-Reparatur kann 3 und 6 h nach Bestrahlung keine dosisabhängige Reduktion der S-Phase-Zellen beobachtet werden. Andererseits sind zu diesem Zeitpunkt die Eintritte in die Mitose, sogar statistisch signifikant für die 7 Gy-Proben, verringert. Der Arrest im G2/M-*Checkpoint* vor der Mitose wird ausgelöst um die genomische Stabilität nach Auftreten des DNA-Schadens aufrecht zu erhalten [118, 119]. Dies wird durch die Ergebnisse gestützt, die eine Korrelation zwischen mitotischem Index und DNA-Schaden zeigen, da Proben mit höheren Schadensniveaus geringere mitotische Indices aufweisen.

Die vernachlässigbare Reduktion der S-Phase-Zellen, die auf eine schwache Aktivierung des G1/S-*Checkpoints* kurz nach Bestrahlung hindeutet, könnte ein charakteristisches Merkmal primärer embryonaler Hühnerkardiomyozyten sein. Publierte Daten zu Hühnerzellen wurden in Lymphozyten und Zellen der glatten Muskulatur gesammelt [120-123]. Diese Studien belegen, dass DT40-B-Lymphozyten des *White Leghorn*-Huhns einen durch Zykline und zyklinabhängige Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, cdk) regulierten G2/M-*Checkpoint* nach ionisierender Strahlung durchlaufen, ähnlich dem von Säugerzellen. Weiterhin verfügen sie über einen funktionierenden G1/S-*Checkpoint* [121]. Daten zu myokardialen Rattenzellen zeigen, dass der G1-S-Übergang in primären, neonatalen Myokardzellen ebenfalls über Zykline, cdk's und die Phosphorylierung des Retinablastoma-Proteins reguliert wird [124]. All dies deutet darauf hin, dass aus verschiedenen Quellen bezogene Myozyten in beiden *Checkpoints* akkumulieren. In den verwendeten Hühnerkardiomyozyten kann nur eine marginale Änderung an S-Phase-Zellen beobachtet werden, bei gleichzeitig reduzierter Zahl an Mitosen. Da 24 h nach Bestrahlung eine dosisabhängige Reduktion an S-Phase-Zellen sichtbar ist, ist es möglich, dass die Akkumulation im G1/S-*Checkpoint* in den hier beschriebenen Experimenten später als 6 h nach Exposition stattfindet. Deckbar *et al.* berichten, dass in humanen Fibroblasten der Eintritt in G1/S für gewöhnlich 4-6 h nach Bestrahlung aufgehoben wird [115]. Obwohl in den hier präsentierten Daten die DNA-Schadensreparatur offensichtlich beendet und keine erhöhte Zahl an DSB-positiven Zellen erkennbar ist, verbleibt 24 h nach Exposition immer noch eine dosisabhängig reduzierte Zahl an S-Phase-Zellen. Besonders Proben, die mit 7 Gy bestrahlt wurden, zeigen ein signifikant reduziertes Niveau an proliferierenden Zellen. Dies deutet darauf hin, dass trotz effizienter DNA-Reparatur das hohe

Schadensniveau zum Austritt aus dem Zellzyklus und damit zum sogenannten reproduktiven Zelltod führen kann [125]. Ein Teil dieser Zellpopulation kann auch durch Apoptose gestorben sein, worauf die Tendenz zu einer höheren Zahl apoptotischer Zellen in den mit 7 Gy bestrahlten Proben hinweist. Obwohl die Ergebnisse der Apoptose-Untersuchung aufgrund ihrer hohen Variabilität keine statistische Signifikanz erreichen, ist ein Trend zu erhöhten Zahlen apoptotischer Zellen sichtbar. Dieser Trend ist sogar 24 h nach Bestrahlung dosisabhängig. Leider existieren soweit bekannt keine publizierten Daten bezüglich der Apoptoseraten in primären Hühnerkardiomyozyten.

Es wurde gezeigt, dass oxidativer Stress, wie er unter anderem durch ionisierende Strahlung induziert wird [126], enorme Auswirkungen auf die physiologische Funktionalität von Zellen haben kann. Beispielsweise beobachteten Nojiri *et al.*, dass oxidativer Stress in Mäusen die mitochondriale Atmung bis hin zum Herzversagen stört [127]. Weiterhin beschrieben Akar *et al.*, dass die Wiederherstellung des mitochondrialen inneren Membranpotentials ein bestimmender Faktor post-ischerischer funktionaler Erholung des Herzes in Meerschweinchen ist [128]. Um die Generierung von ROS zu untersuchen, wurden im Zuge des Verbundprojektes von Frau Nicole Kaiser und Frau Angelina Haber die Veränderungen der Katalase-Aktivität und die intrazelluläre Glutathionkonzentration bestimmt [73]. Katalase ist ein für die Reduktion endogener reaktiver Sauerstoffspezies wichtiges Enzym. Ihre Aktivität ist proportional zur in der Zelle herrschenden Wasserstoffperoxid-Konzentration [129]. Glutathion ist ein wichtiges Antioxidans, das in zwei Isoformen vorliegen kann: der reduzierten Sulfhydryl-Form (GSH) und der oxidierten, dimeren Form (GSSG). Das Verhältnis beider Formen kann als ROS-Indikator verwendet werden [130]. Die Ergebnisse zeigen lediglich in den mit 7 Gy bestrahlten Proben einen Trend zu erhöhten ROS-Niveaus, wohingegen andere Studien berichten, dass ionisierende Strahlung dosisabhängige Anstiege von ROS in verschiedenen Karzinom-Zelllinien [126, 131] oder in Mäusen bewirkt [130]. Es ist möglich, dass der hohe kardiotypische ROS-Hintergrund die Ergebnisse beeinflusst [132]. Weiterhin wurde publiziert, dass die intrazelluläre GSSG-Generierung die GSH-Produktion in einem positiven *Feedback-Loop* stimuliert [133].

Dies ist bei Vergleich der Kontrollen mit den 7 Gy-Proben 24 h nach Bestrahlung in beiden, dem ungebundenen GSH und dem oxidierten GSSG, zu erkennen. Höchstwahrscheinlich waren die applizierten Dosen nicht hoch genug, um signifikant erhöhte ROS-Werte in den kardialen Zellen zu induzieren. Diese Behauptung wird durch Sag *et al.* gestützt, die zeigten, dass ungewöhnlich hohe ROS-Werte nach Röntgenbestrahlung primärer, muriner Kardiomyozyten mit 20 Gy auftreten [22]. Da die DNA-Schadensantwort keine klare Korrelation zu den beobachteten elektrophysiologischen Veränderungen aufweist, könnten folgende Studien auf die vorliegenden Mechanismen weiter eingehen. Ein potentieller Mechanismus ist post-translationale Modifikation (PTM) von Proteinen. Diese Modifikationen spielen eine zentrale Rolle in Herzkrankheiten, die mitochondriale, sarkoplasmatische und in die Kontraktion involvierte Proteine betreffen, die bei den hier beobachteten Effekten eine Rolle spielen könnten.

5.3. Schwerionenversuche

In dieser Studie wurden die elektrophysiologischen Effekte von Schwerionenstrahlung auf primäre, kardiale Zellen und auf aus hiPS-Zellen differenzierte Kardiomyozyten untersucht. Es wurden beide Zellkultursysteme mit Kohlenstoff-Ionen in einem SOBP und mit schwereren Ionen wie Titan und Eisen bestrahlt. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Ionenspezies unterschiedliche Effekte auf die Elektrophysiologie der Zellen haben und die verschiedenen Zellkultursysteme unterschiedlich auf die Bestrahlung reagieren.

Wie auch in den vorangegangenen Röntgenversuchen konnten Effekte auf die Schlagrate und die Feldaktionspotentialdauer festgestellt werden. Während nach Röntgenbestrahlung der primären, embryonalen Kulturen die Schlagrate erhöht (Abbildung 4.9) und die fAPd verkürzt waren (Abbildung 4.10), konnte nach identischer Bestrahlung der hiPSC-Kardiomyozyten der gegenteilige Effekt gezeigt werden (Abbildungen 4.12 und 4.13). In beiden Zellkultursystemen konnte eine Korrelation zwischen Schlagrate und Feldaktionspotentialdauer bestätigt werden (Abbildungen 4.11 und 4.14).

Nach Exposition der primären Kulturen mit Kohlenstoff-Ionen in einem SOBP zeigte sich eine ähnliche, wenn auch weniger stark ausgeprägte Erhöhung der Schlagrate wie nach Röntgenbestrahlung. Eine entsprechende Verringerung der fAPd konnte jedoch nicht festgestellt werden (Abbildung 4.15). Damit einhergehend zeigte sich eine Tendenz zu erhöhten fAPdc-Werten, die sich teilweise als statistisch signifikant erwiesen (Abbildung 4.16). Die entsprechende Bestrahlung der humanen Kulturen zeigte zwar keine Veränderung der Schlagrate oder fAPd (Abbildung 4.17), aber direkt nach Bestrahlung ebenfalls signifikant von den Sham-Kulturen abweichende fAPdc-Werte (Abbildung 4.18). Zusätzlich konnte in den hiPSC-Kardiomyozyten eine deutliche Reduktion der Signalausbreitungsgeschwindigkeit gemessen werden (Abbildung 4.19).

Die Tatsache, dass nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen in den primären Kulturen eine Erhöhung der Schlagrate auftritt, nicht aber in den humanen, könnte in der unterschiedlichen phylogenetischen Abstammung der Zellkultursysteme begründet sein. Die primären kardialen Kulturen, die sich neben den Kardiomyozyten aus verschiedenen Zelltypen wie Fibroblasten und Endothelzellen zusammensetzen, könnten gegenüber den reinen iPSC-Kardiomyozyten mehreren Entwicklungsfaktoren ausgesetzt sein. Im Hinblick auf die zuvor betrachteten Ergebnisse der Röntgenbestrahlungen zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede. Zwar steigt die Schlagrate der primären Kulturen nach beiden Bestrahlungen, jedoch bleibt die Verringerung der fAPd nach Kohlenstoff-Ionenexposition aus. Dies widerspricht der inhärenten Korrelation der beiden Parameter, was sich auch in der frequenzkorrigierten Feldaktionspotentialdauer widerspiegelt. Ähnlich verhält es sich mit den humanen Kulturen. Hier zeigten weder Schlagrate noch fAPd nach Kohlenstoff-Ionenbestrahlung die in den

Röntgenexperimenten beobachteten Effekte. Dennoch kommt es hier zu einer signifikanten Abweichung der fAPdc-Werte, wie auch in den primären Kulturen.

Die monoenergetische Bestrahlung mit schwereren Ionen zeigte im Fall der Titan-Ionenexposition der primären Kulturen, entgegen den Ergebnissen nach Röntgen- oder Kohlenstoff-Ionenbestrahlung, eine Tendenz zu einer verringerten Schlagrate bei verlängerter fAPd (Abbildung 4.20). Wie auch nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen zeigt die gegen die Schlagfrequenz korrigierte Feldaktionspotentialdauer statistisch signifikante Abweichungen zur Sham. Hier jedoch sind die Werte verringert (Abbildung 4.21). Die Bestrahlung der humanen Kulturen mit Eisen-Ionen brachte ähnliche, wenn auch abgeschwächte, Tendenzen hervor. Die Schlagrate war leicht vermindert und die fAPd entsprechend leicht erhöht (Abbildung 4.22). Anders als in den übrigen Versuchen mit Schwerionenstrahlung ergaben sich hier keine signifikanten Abweichungen der fAPdc-Werte von den Sham-Kulturen. Lediglich 2 h nach Bestrahlung sind erhöhte Werte festzustellen (Abbildung 4.23). Die Signalausbreitungsgeschwindigkeit war, wie nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen, deutlich verringert (Abbildung 4.24). In den humanen Kulturen zeigen die Ergebnisse nach Eisen-Ionenexposition Parallelen zu denen der Röntgenbestrahlung. Bei Betrachtung der primären Kulturen ergibt sich im Vergleich der Ergebnisse der Titan-Ionen- und Röntgenbestrahlung ein gegensätzliches Bild. Zur besseren Übersicht sind die elektrophysiologischen Tendenzen nach den verschiedenen Bestrahlungen rein qualitativ in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Tabelle 5.1: Elektrophysiologische Tendenzen der Bestrahlungsversuche Die in der Tabelle dargestellten Symbole stehen für einen Anstieg (+) oder eine Reduktion (-) der gemessenen Werte. In Klammern dargestellte Symbole entsprechen einer leichten Veränderung der Werte. Weiterhin steht N/A dafür, dass aufgrund hoher Varianz keine systematischen Veränderungen deduziert werden konnten, und +/- symbolisiert, dass keine Änderungen eingetreten sind. Die Abkürzung CV steht für *Conduction Velocity*.

Zellkultursystem	Bestrahlung	Schlagrate	fAPd	fAPdc	CV
Primäre kardiale Kulturen	Röntgen	+	-	N/A	N/A
	Kohlenstoff	+	+/-	+	N/A
	Titan	-	+	-	N/A
hiPSC-CM-Kulturen	Röntgen	-	(+)	N/A	N/A
	Kohlenstoff	+/-	+/-	+/-	-
	Eisen	-	(+)	N/A	-

Die Mechanismen hinter den strahleninduzierten Veränderungen der Schlagrate und der Feldaktionspotentialdauer sind nicht gut verstanden. Es gilt als erwiesen, dass ionisierende Strahlung die Regulation der Kalzium-Ströme beeinträchtigt [22]. Ebenso ist die Veränderung der Schlagrate ohne die reziproke Veränderung der Feldaktionspotentialdauer nach Bestrahlung mit Schwerionen, wie sie in beiden

Zellkultursystemen nach Kohlenstoff-Ionenexposition auftritt, völlig ungeklärt. Um mehr Einblick in das Ausmaß dieses beobachteten Effekts zu erhalten, wurde die Frequenzkorrektur nach Bazett herangezogen [82]. Bei Betrachtung der fAPdc-Werte zeigt sich, dass es nach Bestrahlung mit Eisen in den humanen Zellen und Titan und Kohlenstoff in den primären zu signifikanten Abweichungen von den Sham-Kulturen kommt. Trotz dieser statistischen Signifikanz erreichen die korrigierten fAPd-Werte keine Werte oberhalb von 430 ms, bei denen korrigierte QT-Intervalle als kritisch verlängert betrachtet würden [102]. Allerdings wäre es möglich, dass die Bazett-Formel nicht zur Frequenzkorrektur extrazellulärer Signal geeignet ist, obwohl auch andere Studien diese Formel zu diesem Zweck verwenden [48] und das QT-Intervall in vielen Studien mit der fAPd gleichgesetzt wird [48, 52, 53, 60, 66, 134]. Eine Methode, um eine möglicherweise fehleranfällige Korrelationsmethode zu umgehen, ist es, die Zellen elektrisch zu stimulieren und ihnen somit eine feste Schlagrate vorzugeben. Meist wird hierzu eine Frequenz von 0,5-1,5 Hz gewählt [48, 135]. Die Verringerung der Schlagrate nach Bestrahlung, wie sie in den humanen Kulturen nach Röntgen und Eisen-Ionenbestrahlung und in den primären Kulturen nach Titan-Ionenexposition verzeichnet wurden, decken sich mit den Beobachtungen von Rebuzzini *et al.* [136]. Dort wurde mittels Videoanalyse eine Erhöhung der Schlagrate nach Bestrahlung von aus murinen embryonalen Stammzellen differenzierten Kardiomyozyten mit 5 Gy Gammastrahlen beobachtet.

Es ist denkbar, dass diese elektrophysiologischen Veränderungen durch oxidativen Stress induziert wurden. Wie in der Literatur gezeigt, können ROS die Aktivität mehrerer Schlüsselproteine bezüglich der kardialen Funktionalität verändern. So zum Beispiel die Aktivität der Ryanodinrezeptoren (RyR2), Kalziumkanäle in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums [137], der NADPH-Oxidase (NOX), ein Protein, das weitere mitochondriale ROS-Produktion über einen ROS-induced ROS-release-Mechanismus auslösen kann [138], CAMKII, welches in die Kalzium-Homeostase und -Wiederaufnahme involviert ist [139], die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), der zentrale Effektor des β -adrenergischen Signalweges [140], und die Stickstoffmonoxidsynthase (NOS1), die in der Modulation der kardialen Repolarisation beteiligt ist [51]. Einzelne oder mehrere dieser Proteine können entweder direkt durch ROS modifiziert werden oder indirekt durch Modifikationen der Kinasen oder Phosphatasen, welche die Funktion dieser Proteine regulieren. Zudem haben unterschiedliche ROS verschiedene Effekte auf die oben genannten Proteine [140]. So konnte gezeigt werden, dass durch Röntgenbestrahlung Kaliumkanäle über H_2O_2 aktiviert werden können [141]. Aufgrund der Unterschiede in der relativen biologischen Wirksamkeit (RBE) und dem LET der applizierten Ionenspezies kann angenommen werden, dass bei Bestrahlung abhängig vom LET des Ions entsprechende Mengen an ROS entstehen. Diese könnten dann die Aktivität mehrerer der zahlreichen einflussnehmenden Proteine beeinflussen und damit letztendlich die gemessenen Effekte in den elektrophysiologischen Messungen bewirken. Bedauerlicherweise war es aufgrund des straffen Zeitplans einer Ionenbestrahlung nicht möglich, innerhalb des passenden Zeitfensters entsprechende ROS-Assays durchzuführen. Um diese Hypothese zu

bekräftigen, müssten weitere Forschungen bezüglich der induzierten ROS und der molekularen Mechanismen der beteiligten Proteine durchgeführt werden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Schwerionenstrahlung eine Reduktion der Signalausbreitungsgeschwindigkeit in den iPSC-Kardiomyozytenkulturen hervorruft. Eine langsame Ausbreitungsgeschwindigkeit kann aufgrund verringerter Membranerregbarkeit und reduzierter *Gap Junction*-Kopplung auftreten [142]. Der gegenteilige Effekt wurde von Amino *et al.* gezeigt, bei welcher gezielte Bestrahlung mit 5-15 Gy Kohlenstoff-Ionen in Hasen eine erhöhte Signalweiterleitung durch eine langanhaltende Expressionsaktivierung von Connexin43 bewirkte [78, 143]. Der Effekt, dass ionisierende Strahlung die interzelluläre Kommunikation durch erhöhte Expression von Cx43 verbessert, wurde auch schon von anderen Forschergruppen beschrieben [76, 77, 144, 145]. Die Ergebnisse, die auf eine erhöhte Signalausbreitung deuten, wurden aus *in vivo*-Experimenten bzw. Organschnitten gewonnen, wo das kardiale Signal durch mehrere Zellschichten hindurch geleitet wird. Bei den verwendeten Kulturen handelt es sich jedoch um mono- bzw. oligo-lagige Kulturen. Daher kann der Zelltod bereits in geringer Zahl, wie er in dieser Arbeit festgestellt wurde, in einer Verringerung der Signalausbreitungsgeschwindigkeit resultieren, unabhängig von erhöhter Cx43-Expression. Somit kann eine Verringerung der Weiterleitungsgeschwindigkeit neben defizienten oder *Gap Junctions* in nicht ausreichender Zahl auch auf eine Abweichung der Ionenkanäle oder den Tod benachbarter Zellen zurückgeführt werden. Eine Studie von Christensen *et al.* postuliert in einem Simulationsmodell, dass die oxidierte Form der Kalmodulinkinase II eine Reduktion der *Conduction Velocity* auslöst [146]. Im Fall der hier präsentierten Ergebnisse mag diese Oxidation durch intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies nach Bestrahlung generiert werden. Um diese Hypothese zu bestätigen, müssten eingehende Untersuchungen bezüglich der Aktivität der Kinase als auch in Bezug auf die Expression und Funktionalität der *Gap Junctions* und im Besonderen von Cx43 nach Bestrahlung durchgeführt werden.

In allen Bestrahlungsversuchen wurde anhand der zusätzlich im Rahmen des Projektes von Dr. Anja Heselich erhobenen Daten, unabhängig von applizierter Strahlenart oder Ionenspezies, eine dosisabhängige Induktion und Reparatur von γ H2AX-Foci festgestellt. Nach 24 h waren die meisten Foci repariert. Die Schadensinduktion zeigt ebenfalls den Unterschied in den Zellkultursystemen. Während für die primären Zellen die 7 Gy-Proben durchschnittlich 29 γ H2AX-Foci pro Zellkern nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen und 19 Foci nach Titan-Ionenbestrahlung zeigen, scheinen die iPSC-Zellen schadensanfälliger zu sein. Hier induzieren 7 Gy Kohlenstoff-Ionen im Mittel 38 Foci pro Zellkern und 7 Gy Eisen-Ionen resultieren in 42 Foci (Daten nicht gezeigt). Dies mag an den unterschiedlichen Zellkerngrößen der Zellkultursysteme liegen. Die Größe der Zellkerne primärer Kardiomyozyten betrug zwischen 73 und 118 μm^2 . Die hiPSC-Kardiomyozyten wiesen im Querschnitt einer Fläche von 93 bis 187 μm^2 etwa um den Faktor 1,3 bis 1,5 größere Zellkerne auf. In Abbildung 5.1 sind sowohl die

anhand der Fluenz und den durchschnittlichen Zellkerngrößen bestimmten theoretischen Treffer nach Bestrahlung mit den unterschiedlichen Schwerionenspezies aufgetragen, als auch die tatsächlich ermittelten γ H2AX-Foci 30 min nach Bestrahlung gegen die Dosis. Dieser Faktor spiegelt sich auch in gewissem Maße in den theoretischen Treffern wider (Abbildung 5.1A und B). Zum Vergleich sind in Abbildung 5.1C und D die Anzahl der γ H2AX-Foci 30 min nach Bestrahlung für die beiden Zellkultursysteme gegen die Dosis aufgetragen.

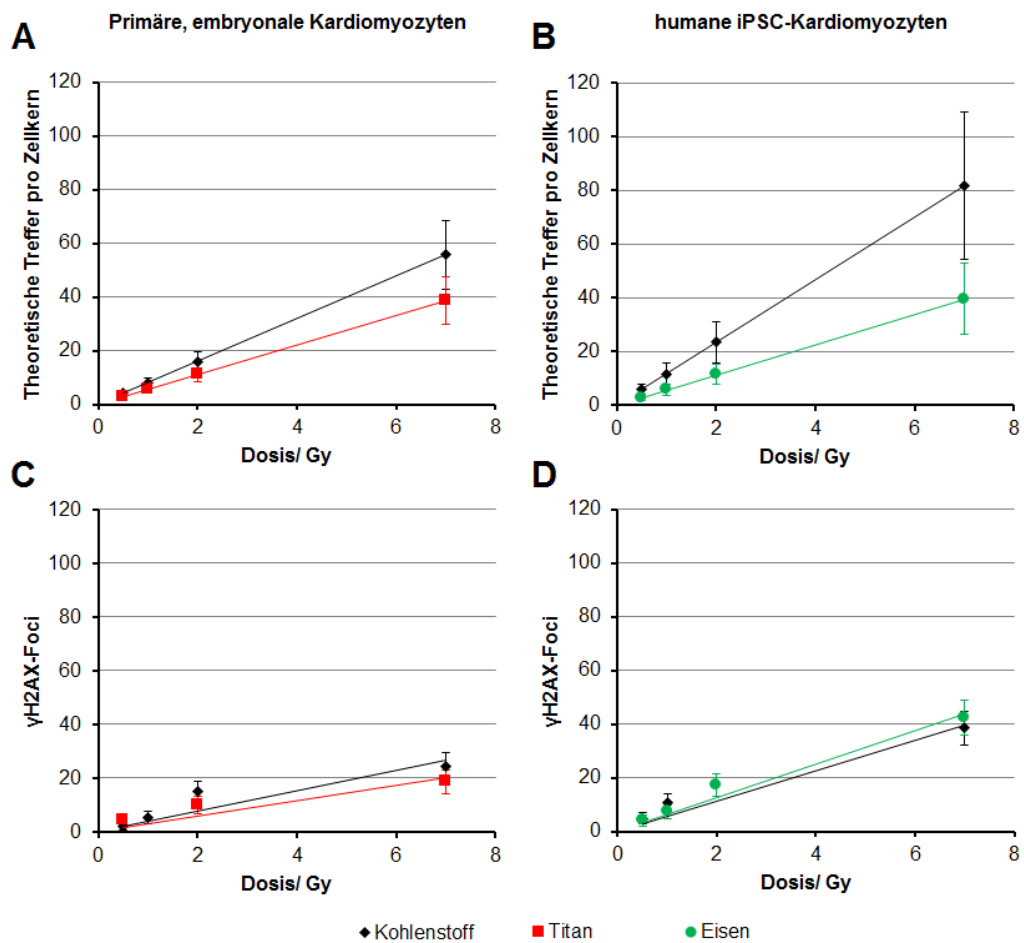


Abbildung 5.1: Die Zahl der theoretischen Treffer pro Zellkern ist höher als die tatsächliche Zahl an γ H2AX-Foci. Die Anzahl theoretischer Treffer pro Zellkern nach Schwerionenbestrahlung ist für die primären und hiPSC-Kardiomyozyten gegen die Dosis aufgetragen (A und B). Dem gegenüber stehen die ebenfalls gegen die Dosis aufgetragenen Zahlen der γ H2AX-Foci 30 min nach Bestrahlung (C und D). Die theoretischen Treffer wurden anhand der Fluenz und den Zellkerngrößen bestimmt. Die Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung der Zellkerngrößen. Die Foci-Zahlen sind als Mittelwerte dargestellt \pm Poissonfehler.

Bei Betrachtung der beiden Grafiken zu den theoretischen Treffern fällt auf, dass Kohlenstoff-Ionenbestrahlung in beiden Zellkultursystemen mehr Treffer verursachen sollte als das jeweilige schwerere Ion. Ebenso sollte die identische Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen in den hiPSC-Kardiomyozyten mehr Treffer erzielen als in den primären. Dies liegt wiederum an den größeren

Zellkernen der hiPS-Zellen, die der Bestrahlung eine größere Angriffsfläche bieten. Ferner sollte eine Bestrahlung mit Titan-Ionen in den Zellen mit den kleineren Zellkernen mehr Treffer verursachen als die schwereren Eisen-Ionen in den Zellen mit den größeren Zellkernen. Dies liegt am höheren LET der Eisen-Ionen und der damit einhergehenden geringeren Fluenz, die zum Erreichen derselben Dosis benötigt wird (siehe Formel 2.4). Experimentell wurde dies von Hada *et al.* gezeigt, die bewiesen, dass mit steigendem LET weniger DNA-Schäden induziert werden [147]. Beim Vergleich der Regressionsgeraden der theoretischen Treffer mit denen der induzierten Foci fällt auf, dass die Steigungen in den Grafiken der theoretischen Treffer stets größer sind als in den entsprechenden Grafiken der Foci. Weiterhin fällt beim Vergleich der Regressionsgeraden auf, dass die zu den Foci deutlich näher beieinanderliegen als die der theoretischen Treffer. Dies liegt zum einen daran, dass nicht jeder Treffer Ionisationen hervorruft und nicht jede Ionisation in einem Doppelstrangbruch resultiert, der durch die γ H2AX-Färbung erkannt würde. Zum anderen findet die mikroskopische Auswertung im selben Winkel statt wie die Bestrahlung. Dies bedeutet, dass die durch ein Ion entstehenden Doppelstrangbrüche beim Durchtritt durch den Zellkern für den Beobachter direkt übereinanderliegen und daher mehrere DSBs für einen einzigen gehalten werden könnten. Ferner treten bei Ionen-Durchtritten durch den Zellkern häufig komplexere Schäden auf, wodurch die Methode der γ H2AX-Färbung dazu neigt, das Gesamtniveau an DNA-Schäden zu unterschätzen [148]. Wohingegen bei Röntgenbestrahlung die Zahl der Foci äquivalent zur Zahl der DSBs ist [149]. Diesbezüglich würde eine ergänzende Untersuchung auf chromosomale Schäden ein genaueres Abbild der relativen biologischen Wirksamkeit liefern.

Zusammenfassend zeigen die Experimente mit Schwerionenstrahlung trotz bislang fehlender mechanistischer Erklärungen sehr interessante, teilweise entgegengesetzte Effekte von hoch-LET-Strahlung auf die funktionellen Synzytien der Kardiomyozytenkulturen. Es wurde gezeigt, dass die Parameter der Schlagrate und Feldaktionspotentialdauer durch ionisierende Strahlung beeinträchtigt werden. Weiterhin zeigte die Bestrahlung der hiPSC-Kardiomyozyten eine durch Schwerionenbestrahlung hervorgerufene Reduktion der Signalausbreitungsgeschwindigkeit. Leider konnten die zur Elektrophysiologie ergänzenden Methoden der Strahlenbiologie keine Ansätze zur mechanistischen Aufklärung der beobachteten Effekte liefern. Hierzu müssten in Zukunft weitere Studien durchgeführt werden. Dabei sollte besonderes Augenmerk auf die Generierung strahlungsinduzierter reaktiver Sauerstoffspezies gelegt werden, da hier möglicherweise die Zusammenhänge zwischen Bestrahlung und den molekularen Auslösern der beobachteten elektrophysiologischen Effekte zu finden sind. Außerdem könnten Untersuchungen zu den Effekten von ionisierender Strahlung der Proteine, die an der Genese der Aktionspotentiale und ihrer Transduktion beteiligt sind, erheblich zum Verständnis der hier dokumentierten Effekte beitragen. Zu diesem Zweck wären *Patch-Clamp*-Studien an bestrahlten Ionenkanälen und *Gap Junctions* besser geeignet.

Die Relevanz der beobachteten Effekte in Hinblick auf Weltraumforschung und Strahlentherapie kann bisher nur schwer abgeschätzt werden. Rückblickend wurden hohe Dosen an Schwerionen appliziert, die näher denen in der Therapie verwendeten sind als Dosen, denen Astronauten bisher ausgesetzt wurden. Die geschätzte Äquivalentdosis, die während einer Mars-Mission inklusive der Zeit auf der Oberfläche des Planeten erwartet wird, beträgt 1 Sv. Die Äquivalentdosen dieser Studie übersteigen diesen Wert etwa um zwei Zehnerpotenzen. Angesichts dieses Umstands und unter Berücksichtigung, dass die beobachteten Effekte eher mild ausfielen, kann ein direktes Risiko auf schwere strahleninduzierte Herzerkrankungen für die bemannte Raumfahrt wahrscheinlich weitestgehend ausgeschlossen werden. Dennoch könnten die erlangten Daten für die Strahlentherapie von Interesse sein. Es wurden nach Bestrahlung mit für die Therapie relevanten Dosen keine elektrophysiologischen Effekte gefunden, die auf eine bekannte Herzkrankheit oder entsprechende Symptomatik hinweisen. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass andere Faktoren wie Medikamente und Stress in Kombination mit Schwerionenstrahlung einen pathologischen Einfluss auf die kardiale Funktionalität haben kann.

5.4. Behandlung mit Pharmazeutika und Röntgenbestrahlung

Eine Vielzahl medikamentöser Substanzen beeinflusst die kardiale Elektrophysiologie. Die meisten Wirkungen dieser Pharmazeutika sind beabsichtigt, oft verfügen die Stoffe aber auch über Nebenwirkungen, von denen sich wiederum einige auf die elektrophysiologische Funktionalität auswirken. In der Pharmaindustrie werden daher eingehende Tests bezüglich des Einflusses von Pharmazeutika auf die kardiale Funktionalität durchgeführt. Zur Durchführung solcher Tests eignet sich besonders die MEA-Technologie. Zahlreiche pharmakologische und toxikologische Studien an verschiedenen Wirkstoffen wurden mittels des MEA-Systems durchgeführt [52, 53, 60, 134, 150-152]. Innerhalb dieser Arbeit wurde mit zwei kardioaktiven Substanzen gearbeitet, zum einen mit dem Kaliumkanalblocker Chinidin und zum anderen mit dem β -adrenergischen Agonist Isoproterenol. Ziel war hierbei die Untersuchung des kombinierten Einflusses aus Bestrahlung und medikamentöser Behandlung auf die Elektrophysiologie von Kardiomyozyten.

Um eine strahleninduzierte Inaktivierung der Wirkstoffe ausschließen zu können, wurden zunächst beide Chemikalien vor Applikation auf die Kulturen einer Röntgenbestrahlung ausgesetzt. Hierbei stellt sich bei Chinidin eine Veränderung der Wirkung ein. Während unbestrahltes Chinidin eine Schlagratenverringerung hervorruft, kommt es nach Behandlung mit bestrahltem Chinidin zu einer verlängerten Feldaktionspotentialdauer (Abbildung 4.25). Diese Verlängerung ist auch nach Frequenzkorrektur im Fall von Bestrahlung mit 2 Gy noch statistisch signifikant (Abbildung 4.26). Obwohl die Anzahl der bestrahlten Chinidin-Proben gering ist, entsprach dieses Ergebnis den Erwartungen, denn bereits in den 80er Jahren wurde eine Studie an Purkinje-Fasern von Hunden durchgeführt, die zeigte, dass Chinidin

bradykardie-abhängige *Early After Depolarisations* (EADs) hervorrufen kann, die zu *Torsade de pointes* (TdP)-Arrhythmien führen konnte [81]. Für die Bestrahlung von Isoproterenol stellen sich keine signifikanten Änderungen der Wirkung ein. Die Schlagrate der mit Isoproterenol behandelten Proben ist erhöht, was auch andere Studien an aus humanen [62, 153] und murinen iPSC- [48, 154], murinen, embryonalen Stammzellen [155] und humanen embryonalen Stammzellen [152] differenzierten Kardiomyozyten gezeigt haben.

Um die Änderung in der Wirkung Chinidins nach Bestrahlung erklären zu können, muss erst die eigentliche Wirkung in der Zelle erläutert werden. Das Molekül Chinidin besitzt mehrere mögliche Bindestellen im Kardiomyozyt. Zum einen kann es an geöffnete Na⁺-Kanäle binden und diese blockieren, dies führt zur Inhibition der Depolarisation und verringert effektiv die Schlagrate. Die sekundär mögliche Bindestelle Chinidins sind Kaliumkanäle, hierdurch wird die Leitfähigkeit der während der Repolarisation aktiven Kanäle herabgesetzt, was zu einer verlängerten Aktionspotentialdauer führt. Die Hypothese ist nun, dass es durch die Bestrahlung der Chemikalie zu einer Veränderung der Bindungsaffinität kommen kann, sodass eine höhere Affinität zu K⁺- als zu Na⁺-Kanälen besteht. Hierzu müsste jedoch die chemische Struktur des Medikaments verändert werden. In Abbildung 5.2 ist die Strukturformel von Chinidin in einer möglichen Reaktion dargestellt. Möglicherweise könnten durch die Röntgenstrahlung im Medium entstandene reaktive Sauerstoffspezies eine Hydrolyse an der Hydroxyl- oder der endständigen Ethergruppe durchführen, was dann zu dem beobachteten Effekt führen könnte. Dies ist allerdings Spekulation, da eine Publikation von Yeola *et al.* beschreibt, dass die Bindung an K⁺-Kanäle tatsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert wird [156].

Nachdem eine vollständige chemische Inaktivierung der Substanzen durch Bestrahlung auszuschließen war, wurden die Kulturen mit den Stoffen behandelt und anschließend einer Röntgenstrahlung von 2 Gy ausgesetzt. Generell sind die Schlagraten aller bestrahlten Proben bis zu 6 Tage nach Bestrahlung gegenüber den unbestrahlten Proben mit gleicher Behandlung erhöht (Abbildung 4.27). Die unbestrahlten, mit Isoproterenol behandelten Proben zeigen die ersten zwei Tage nach Behandlung eine weniger stark erhöhte Schlagrate als im Vorexperiment. Dies mag am höheren Stress liegen, den die Kulturen erfahren haben, da sie einer Sham-Bestrahlung unterzogen wurden. Wie auch im Vorexperiment ist die Schlagrate der unbestrahlten mit Chinidin behandelten Proben reduziert. Die Kulturen, die sowohl mit Chinidin behandelt als auch bestrahlt wurden, zeigen wie im Vorexperiment eine weniger ausgeprägte Senkung der Schlagrate. Ebenso sind die Werte der Feldaktionspotentialdauer in den bestrahlten Kulturen generell erhöht (Abbildung 4.28). Anders als in den Röntgenversuchen ist in diesem Experiment die Feldaktionspotentialdauer der mit 2 Gy bestrahlten DMSO-Kontrolle 1-2 Tage nach Bestrahlung deutlich verlängert, während die fAPd der mit 2 Gy bestrahlten Probe der Röntgenversuche keine merklichen Unterschiede zu den Kontrollen aufweisen (Abbildung 4.13).

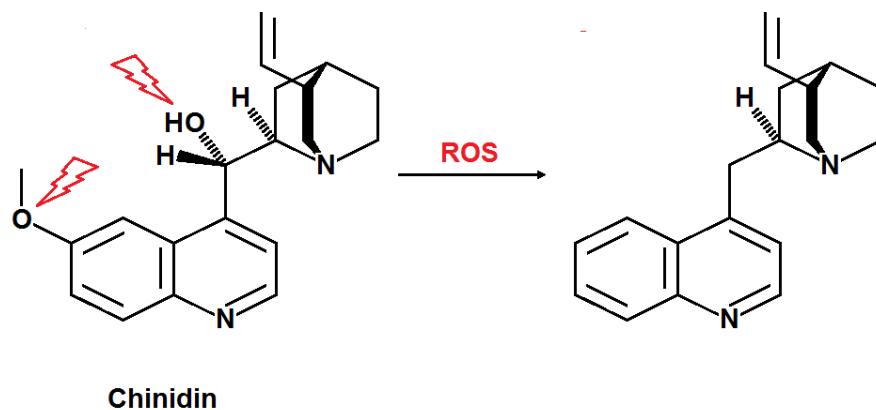


Abbildung 5.2: Die veränderte Wirkung von Chinidin könnte durch Reaktionen mit strahleninduzierten reaktiven Sauerstoffspezies bedingt sein, die bei der Hydrolyse von Wasser in der wässrigen Chinidin-Lösung entstehen. Es wäre vorstellbar, dass die strahleninduzierten ROS Reaktionen mit der Ether- und der Hydroxylgruppe eingehen. Dadurch könnte die Bindungsaffinität gegenüber K^+ -Kanälen erhöht werden. Die Bindung von Chinidin an K^+ -Kanäle aufgrund hydrophober Wechselwirkungen wird stabilisiert [156].

Dies könnte in der geringen Probenanzahl der bestrahlten DMSO-Kontrollen begründet sein oder an den unterschiedlichen Bestrahlungsparametern liegen (siehe 3.8). Die Frequenzkorrektur der Feldaktionspotentialdauer zeigt mehrere Tage nach Behandlung eine Verlängerung in den unbestrahlten mit Chinidin behandelten Proben, nicht jedoch in den bestrahlten. Dies ist verwunderlich, denn zum einen ist dieser Effekt im Vorexperiment nicht aufgetreten und zum anderen war die Verlängerung nach Behandlung mit bestrahltem Chinidin auch nach Frequenzkorrektur statistisch signifikant. Tatsächlich ist bei Konsultation der Bazett-Formel an dieser Stelle eher das Ergebnis des Vorexperiments erstaunlich, denn in einer Studie an murinen und humanen aus embryonalen Stammzellen differenzierten Kardiomyozyten bewirkte Chinidin eine Verringerung der Schlagrate bei gleichzeitiger Verlängerung der fAPd [157]. Jedoch wurde in dieser Studie die höchste einem Patienten verabreichte Chinidindosis von $20 \mu\text{M}$ eingesetzt. Laut einer von Meyer *et al.* veröffentlichten Dosis-Wirkungs-Kurve sollten die eingesetzten $1 \mu\text{M}$ Chinidin eine etwa 10%ige Verlängerung der Feldaktionspotentialdauer bewirken wohingegen Konzentrationen oberhalb von $10 \mu\text{M}$ Verlängerungen von bis zu 70% erzielen [52]. In einer Studie von Stett *et al.* konnten bei einer Chinidinkonzentration von $100 \mu\text{M}$ auch EADs, also echte arrhythmische Feldaktionspotentiale, beobachtet werden [151], was mit der in dieser Arbeit eingesetzten Konzentration nicht beobachtet werden konnte. Die höchste in der Literatur gefundene Konzentration an Chinidin, bei der verlängerte Feldaktionspotentiale gemessen wurden, betrug $150 \mu\text{M}$ [53]. Dies legt nahe, dass die Inkonsistenz der erlangten Ergebnisse auf die geringe Wirkstoffkonzentration zurückzuführen ist. Versuche, die hier aufgeführten Daten anderer Arbeitsgruppen zu reproduzieren, scheiterten, da die Kulturen kurz nach Zugabe von Chinidin in höheren Konzentrationen stets die Funktionalität dauerhaft einstellten (Daten nicht gezeigt).

Die hier gezeigten Effekte lassen den Schluss zu, dass die kombinierte Applikation ionisierender Strahlung und kardioaktiver Substanzen durchaus fähig ist, die Wirkung der verwendeten Chemikalien zu beeinflussen. Dabei werden die verwendeten Substanzen höchstwahrscheinlich keine Einzelfälle darstellen. Somit eröffnen diese Ergebnisse einen präliminären Einblick in ein weites Feld für die zukünftige Forschung. Dabei muss allerdings angemerkt werden, dass in der Klinik beispielsweise die Dosis einer Röntgen-Thorax-Aufnahme einer Äquivalentdosis von 0,1-0,3 mSv entspricht, also um den Faktor 10^4 geringer ist als die hier verwendeten Dosen. Dennoch mag es eine interessante Fragestellung sein, welche Effekte eine solche Röntgen-Aufnahme auf die kardiale Elektrophysiologie eines Patienten ausübt, der Herzmedikamente einnimmt. Deutlich vergleichbarere Dosen treten hingegen in der Strahlentumorthérapie auf. Gerade hier wäre es klinisch relevant, verschiedene pharmakologische Therapeutika von beispielsweise Lungenkrebspatienten auf ihre Interaktion mit der Schwerionenstrahlung zu untersuchen. Besonders im Hinblick auf die für Isoproterenol beobachteten Effekte wären die kombinierten Einflüsse von ionisierender Strahlung und Stress eine interessante Fragestellung, die neben Therapiepatienten und Astronauten auch für andere Berufsgruppen relevant ist, die mit ionisierender Strahlung arbeiten oder bei der Arbeit erhöhten Strahlendosen ausgesetzt sind.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Erforschung des Einflusses ionisierender Strahlung auf die elektrophysiologischen Eigenschaften kardialer Zellen. Dafür wurden kardiale Kulturen mit Röntgen und verschiedenen Schwerionen bestrahlt. Es wurden zwei Zellkultursysteme verwendet, zum einen aus Hühnerembryonen isolierte primäre kardiale Kulturen und zum anderen humane aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte Kardiomyozyten. In Kultur bilden die Zellen ein funktionelles Synzytium und führen aufgrund der Weiterleitung von spontanen Aktionspotentialen synchronisierte Kontraktionen aus. Diese Aktionspotentiale lassen sich mittels MEA-Technologie extrazellulär als Feldaktionspotentiale ableiten und anhand mehrerer Parameter analysieren. Neben elektrophysiologischen Parametern wurden begleitend im Rahmen des Gesamtprojektes von Dr. Anja Heselich auch klassische Endpunkte der Strahlenbiologie wie DNA-Schäden und -Reparatur, Zellzyklusproliferation und die Induktion von ROS und Apoptosen untersucht. Eine weitere Fragestellung zum Einfluss von ionisierender Strahlung war auch die kombinatorische Wirkung aus Röntgenstrahlung und medikamentöser Behandlung auf iPSC-Kardiomyozyten.

Durch Charakterisierung der Zellkultursysteme konnten einige Unterschiede in den elektrophysiologischen Parametern festgestellt werden. Die humanen iPSC-Kardiomyozyten lassen sich länger in Kultur halten, haben eine etwas stabilere Schlagrate und längere Feldaktionspotentialdauer als die primären kardialen Zellen. Insgesamt eignen sich die primären Kulturen für die Etablierung der Methodiken und Hypothesentests, während die humanen Kulturen zur weiterführenden Evaluierung geeignet sind und Rückschlüsse auf die humane Elektrophysiologie ermöglichen.

An beiden Zellkultursystemen wurden Röntgenversuche durchgeführt und für bis zu 7 Tage nach Bestrahlung elektrophysiologisch gemessen. Die hiPSC-Kardiomyozyten zeigten dabei Veränderungen der Schlagrate, sowie in Korrelation dazu einen Einfluss auf die Feldaktionspotentialdauer (fAPd). In den primären kardialen Kulturen waren ebenfalls Schlagrate und dazu korrelierend die fAPd beeinflusst, jedoch wurde hier eine Erhöhung festgestellt, während in den humanen Kulturen eine Verringerung der Schlagrate erfolgte. Begleitende Untersuchungen bezüglich des Zellzyklus deuten zudem auf einen Einfluss auf den G2/M-, jedoch nicht auf den G1/S-Checkpoint in den primären Kulturen hin. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Kulturen in der Lage sind, röntgeninduzierte DNA-Schäden zu reparieren. Jedoch konnten weder signifikant erhöhte Apoptoseraten noch eine vermehrte Induktion von ROS bei Strahlendosen von bis zu 7 Gy detektiert werden. Daher wurden beide Parameter als mögliche Begründungen für die beobachteten elektrophysiologischen Veränderungen ausgeschlossen.

Bei den Schwerionenversuchen wurden beide Zellsysteme mit Kohlenstoff-Ionen und schwereren Ionen wie Titan und Eisen bestrahlt. Dabei wurden die Bestrahlungen mit Kohlenstoff-Ionen stets mittels *spread-out Bragg peak* durchgeführt. Die aus hiPSC-Zellen differenzierten Kardiomyozyten zeigen nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen keine dosisabhängige Änderung der Schlagrate und fAPd. Lediglich

direkt nach Bestrahlung zeigt der fAPdc statistisch signifikant erhöhte Werte. Die Signalausbreitungsgeschwindigkeit der Kulturen war hingegen nach Exposition im Vergleich zur Sham stark reduziert. Die Bestrahlung mit Eisen-Ionen führte in iPSC-Kardiomyozyten zu verringerten Schlagraten bei entsprechend verlängerter fAPd, sowie zu dauerhaft reduzierten Signalausbreitungsgeschwindigkeiten.

Die primären Kulturen zeigen nach Kohlenstoff-Ionenbestrahlung eine für 2 Tage erhöhte Schlagrate bei nach Frequenzkorrektur erhöhten Werten der fAPdc. Auch Bestrahlung mit Titan-Ionen führte zu erhöhten Schlagraten bei entsprechend verkürzten Werten für die fAPd. Bei allen Schwerionenversuchen zeigte sich die erwartete dosisabhängige Induktion von DNA-Schäden, die zum größten Teil innerhalb von 24 h nach Exposition repariert wurden, während in Bezug auf die Apoptoseraten keine dosisabhängigen Muster und keine statistisch relevanten Abweichungen von den Sham-Kulturen auftraten.

Die Kombination von Röntgenstrahlung und Pharmazeutika zeigte, dass bestrahltes Chinidin die Schlagrate in hiPSC-Kardiomyozyten weniger reduziert als unbestrahltes, dafür jedoch die fAPd verlängert. Wohingegen Isoproterenol eine Erhöhung der Schlagrate bewirkt, die bei zusätzlicher Bestrahlung sogar noch weiter gesteigert wird.

Trotz der zahlreichen beobachteten Effekte der Strahlung wie auch der Pharmazeutika auf die Elektrophysiologie der Zellen konnte in den anderen untersuchten Endpunkten kein Mechanismus oder direkter Zusammenhang mit einem dieser Effekte festgestellt werden. Daher sind für weiterführende Studien eingehende Versuche zum Beispiel zur Bestimmung der induzierten reaktiven Sauerstoffspezies zu empfehlen. Ebenso sollten zur Aufklärung der Mechanismen hinter den hier beobachteten Effekten mehrere elektrophysiologisch wichtige Proteine, wie Ionenkanäle und *Gap Junctions*, genauer untersucht werden, besonders in Hinblick auf ihre Interaktion mit ionisierender Strahlung und den damit einhergehenden ROS. Die hier applizierten Dosen ionisierender Strahlung liegen zwar weit oberhalb der Dosen, denen Astronauten im Weltraum bisher ausgesetzt waren, sind jedoch etwa im Bereich der in der Strahlentumorthapie eingesetzten Dosen. Trotz dieser vergleichbar hohen Dosen sind die auftretenden Effekte eher als geringfügig einzustufen und somit allein vermutlich physiologisch unbedenklich. Jedoch zeigt die Kombination von ionisierender Strahlung und Medikamenten, eine Veränderung in der pharmakologischen Wirksamkeit der verabreichten Wirkstoffe. Eine solche Wechselwirkung dürfte daher in folgenden Studien ein äußerst relevantes Thema sein.

7. Appendix

Dieses abschließende Kapitel enthält neben den Verzeichnissen der Einheiten, Größenordnungen, Abkürzungen und der zitierten Literatur noch Lebenslauf und Publikationsliste des Autors.

Einheitenverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Ampere
eV	Elektronenvolt
Gy	Gray
h	Stunde/n
Hz	Hertz
L	Liter
m	Meter
M	Molar; mol/L
min	Minute/n
s	Sekunde/n
Sv	Sievert
u	atomare Masseneinheit
V	Volt

Abkürzungsverzeichnis der Größenordnungen

k	Kilo-;	10^3	m	Milli-;	10^{-3}
M	Mega-;	10^6	μ	Mikro-;	10^{-6}
G	Giga-;	10^9	n	Nano-;	10^{-9}
T	Tera-;	10^{12}	p	Pico-;	10^{-12}

Abkürzungsverzeichnis

AP	Aktionspotential	GSSG	oxidierte, dimere Form von Glutathion
aR	<i>after Radiation</i>	hiPSC	humane induzierte pluripotente Stammzellen
ATP	Adenosintriphosphat	LET	Linearer Energietransfer
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>	LET	Linearer Energietransfer
BrdU	Bromdesoxyuridin	<i>m</i>	Masse
BSA	Bovines Serumalbumin	MAD	<i>Median Absolute Deviation</i>
bzw.	beziehungsweise	MEA	Mikroelektroden Array
CaMKII	<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase II,</i>	NADPH	Nicotinamidadenindinukleotid-phosphat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	NOX	NADPH-Oxidase
CO ₂	Kohlendioxid	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
Cx43	Connexin43	PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase A
<i>D</i>	Energiedosis	PLB	Phospholamban
div	<i>days in vitro</i>	RBE	relative biologische Wirksamkeit
DKK	Dickkopf	RMS	<i>Root Mean Square</i> (quadratisches Mittel)
DMSO	Dimethylsulfoxid	ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
DSB	Doppelstrangbruch	RT	Raumtemperatur; ca. 20 °C
<i>E</i>	Energie	RyR2	Ryanodinrezeptor 2
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	SCR	<i>Solar cosmic rays</i>
EKG	Elektrokardiogramm	SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>	TRITC	Tetramethylrhodamin-isothiocyanat
FITC	Fluorescein-isothiocyanat		
<i>g</i>	Erdbeschleunigung; 9,81 m/s ²	<i>w_R</i>	Strahlungswichtungsfaktor
GCR	<i>Galactic cosmic rays</i>	z.B.	zum Beispiel
GSH	reduzierte Sulfhydryl-Form von Glutathion		

Literaturverzeichnis

- [1] M.J. Adams, P.H. Hardenbergh, L.S. Costine, S.E. Lipschultz, Radiation-associated cardiovascular disease, *Oncology Hematology*, 45 (2001) 55-75.
- [2] S.M. Shankar, N. Marina, M.M. Hudson, D.C. Hodgson, M.J. Adams, W. Landier, S. Bhatia, K. Meeske, M.H. Chen, K.E. Kinahan, J. Steinberger, D. Rosenthal, Monitoring for cardiovascular disease in survivors of childhood cancer: report from the Cardiovascular Disease Task Force of the Children's Oncology Group, *Pediatrics*, 121 (2008) e387-396.
- [3] M.P. Little, E.J. Tawn, I. Tzoulaki, R. Wakeford, G. Hildebrandt, F. Paris, S. Tapio, P. Elliott, Review and meta-analysis of epidemiological associations between low/moderate doses of ionizing radiation and circulatory disease risks, and their possible mechanisms, *Radiation and Environmental Biophysics*, 49 (2010) 139–153.
- [4] J. Wondergem, M. Boerma, K. Kodama, F.A. Stewart, K.R. Trott, Cardiovascular effects after low-dose exposure and radiotherapy: what research is needed?, *Radiat Environ Biophys*, 52 (2013) 425-434.
- [5] E. Chung, J.R. Corbett, J.M. Moran, K.A. Griffith, R.B. Marsh, M. Feng, R. Jagsi, M.L. Kessler, E.C. Ficaro, L.J. Pierce, Is There a Dose-Response Relationship for Heart Disease With Low-Dose Radiation Therapy?, *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, 85 (2013) 959-964.
- [6] M. Durante, F.A. Cucinotta, Heavy Ion Carcinogenesis and Human Space Exploration, *Nat Rev Cancer*, 8 (2008) 465-472.
- [7] F.A. Cucinotta, M. Durante, Cancer risk from exposure to galactic cosmic rays: implications for space exploration by human beings, *The Lancet Oncology*, 7 (2006) 431-435.
- [8] R.L. Summers, D.S. Martin, J.V. Meck, T.G. Coleman, Mechanism of spaceflight-induced changes in left ventricular mass, *Am J Cardiol*, 95 (2005) 1128-1130.
- [9] A.C. Rossum, M.L. Wood, S.L. Bishop, H. Deblock, J.B. Charles, Evaluation of cardiac rhythm disturbances during extravehicular activity, *Am J Cardiol*, 15;79 (1979) 1153-1155.
- [10] J.M. Fritsch-Yelle, U.A. Leuenberger, D.S. D'Aunno, A.C. Rossum, T.E. Brown, M.L. Wood, M.E. Josephon, A.L. Goldberger, An episode of ventricular tachycardia during long-duration spaceflight, *Am J Cardiol*, 81 (1998) 1391-1392.
- [11] A.L. Goldberger, M.W. Bungo, R.M. Baevsky, B.S. Bennett, D.R. Rigney, J.E. Mietus, G.A. Nikulina, J.B. Charles, Heart rate dynamics during long-term space flight: report on Mir cosmonauts, *American heart journal*, 128 (1994) 202-204.
- [12] D.S. D'Aunno, A.H. Dougherty, H.F. DeBlock, J.V. Meck, Effect of short- and long-duration spaceflight on QTc intervals in healthy astronauts, *Am J Cardiol*, 91 (2003) 494-497.
- [13] M.A. Perhonen, F. Franco, L.D. Lane, J.C. Buckey, C.G. Blomqvist, J.E. Zerwekh, Pershock, Cardiac atrophy after bed rest and spaceflight., *J App Physiol*, 91 (2001) 645-653.
- [14] G. Leguay, A. Seigneuric, Cardiac arrhythmias in space. Role of vagotonia., *Acta Astronautica*, 8 (1981) 795-801.
- [15] X. Yan, S.P. Sasi, H. Gee, J. Lee, Y. Yang, R. Mehrzad, J. Onufrak, J. Song, H. Enderling, A. Agarwal, L. Rahimi, J. Morgan, P.F. Wilson, J. Carrozza, K. Walsh, R. Kishore, D.A. Goukassian, Cardiovascular risks associated with low dose ionizing particle radiation, *PLOS ONE*, 9 (2014) e110269.

-
- [16] M. Tungjai, E.B. Whorton, K.N. Rithidech, Persistence of apoptosis and inflammatory responses in the heart and bone marrow of mice following whole-body exposure to ^{28}Si ions, *Radiat Environ Biophys*, 52 (2013) 339-350.
- [17] H.I. Lehmann, D. Richter, H. Prokesch, C. Graeff, M. Prall, P. Simoniello, C. Fournier, J. Bauer, R. Kaderka, A. Weymann, G. Szabo, K. Sonnenberg, A.M. Constantinescu, S.B. Johnson, J. Misiri, M. Takami, R.C. Miller, M.G. Herman, S.J. Asirvatham, S. Brons, O. Jakel, T. Haberer, J. Debus, M. Durante, C. Bert, D.L. Packer, Atrioventricular node ablation in langendorff-perfused porcine hearts using carbon ion particle therapy: methods and an in vivo feasibility investigation for catheter-free ablation of cardiac arrhythmias, *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology*, 8 (2015) 429-438.
- [18] J.E. Baker, B.L. Fish, J. Su, S.T. Haworth, J.L. Strande, R.A. Komorowski, R.Q. Migrino, A. Doppalapudi, L. Harmann, X. Allen Li, J.W. Hopewell, J.E. Moulder, 10 Gy total body irradiation increases risk of coronary sclerosis, degeneration of heart structure and function in a rat model, *International journal of radiation biology*, 85 (2009) 1089-1100.
- [19] M.V. Bakshi, Z. Barjaktarovic, O. Azimzadeh, S.J. Kempf, J. Merl, S.M. Hauck, P. Eriksson, S. Buratovic, M.J. Atkinson, S. Tapio, Long-term effects of acute low-dose ionizing radiation on the neonatal mouse heart: a proteomic study, *Radiat Environ Biophys*, 52 (2013) 451-461.
- [20] I. Seeman, K. Gabriels, N.L. Visser, S. Hoving, J.A.M. Te Poele, J.F. Pol, M.J. Gijbels, B.J. Janssen, F.W. Van Leeuwen, M.J. Daemen, S. Heeneman, Irradiation induced modes changes in murine cardiac function despite progressive structural damage to the myocardium and microvasculature, *Radiotherapy and Oncology*, 103 (2012) 143-150.
- [21] I. Seemann, J.A.M. te Poele, S.J. Luikinga, S. Hoving, F.A. Stewart, Endoglin Haplo-Insufficiency Modifies the Inflammatory Response in Irradiated Mouse Hearts without Affecting Structural and Microvascular Changes, *Plos One*, 24 (2013) e68922.
- [22] C.M. Sag, H.A. Wolff, K. Neumann, M.K. Opiela, J. Zhang, F. Steuer, T. Sowa, S. Gupta, M. Schirmer, M. Hunlich, M. Rave-Frank, C.F. Hess, M.E. Anderson, A.M. Shah, H. Christiansen, L.S. Maier, Ionizing radiation regulates cardiac Ca handling via increased ROS and activated CaMKII, *Basic research in cardiology*, 108 (2013) 385.
- [23] M.J. Hooning, A. Botma, B.M.P. Aleman, M.H.A. Baaijens, H. Bartelink, J.G.M. Klijn, C.W. Taylor, F.E. van Leeuwen, Long-Term Risk of Cardiovascular Disease in 10-Year Survivors of Breast Cancer, *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 99 (2007) 365-375.
- [24] D.G. Kang, S.E. Kim, M.S. Park, E.J. Kim, J.H. Lee, D.G. Park, K.R. Han, D.J. Oh, Acquired Long QT Syndrome Manifesting with Torsades de Pointes in a Patient with Panhypopituitarism due to Radiotherapy, *Korean Circulation Journal*, 43 (2013) 340.
- [25] M. Little, E. Tawn, I. Tzoulaki, R. Wakeford, G. Hildebrandt, F. Paris, S. Tapio, P. Elliott, A systematic review of epidemiological associations between low and moderate doses of ionizing radiation and late cardiovascular effects, and their possible mechanisms, *Radiation research*, 169 (2008) 99-109.
- [26] J.-F. Colas, A. Lawson, G.C. Schoenwolf, Evidence that Translation of Smooth Muscle Alpha Actin mRNA is delayed in the Chick Promyocardium until Fusion of the Bilateral Heart-Forming Regions, *Developmental Dynamics*, 218 (2000) 316-330.
- [27] A. Redkar, M. Montgomery, J. Litvin, Fate Map of Early Avian Cardiac Progenitor Cells, *Development*, 128 (2001) 2269-2279.

-
- [28] T. Mikawa, Determination of heart cell lineages, In S. A. Moody (ed.), Cell Lineage and Fate Determination. Academic Press, San Diego, (1999) 451-462.
- [29] S. Gilbert, Developmental Biology, 8th Edition, Sinauer Associates, Inc., (2006).
- [30] B.H. Alsan, T.M. Schultheiss, Regulation of avian cardiogenesis by FGF8 signaling, Development, 129 (2002).
- [31] M.J. Marvin, G. Di Rocco, A. Gardiner, S.M. Bush, A.B. Lassar, Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm, Genes & development, 15 (2001) 316-327.
- [32] V.A. Schneider, M. Mercola, Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus Laevis*, Genes & development, 15 (2001) 304-315.
- [33] E. Tzahor, A.B. Lassar, Wnt Signals from the neural tube block ectopic cardiogenesis, Genes & development, 15 (2000) 255-260.
- [34] K.K. Linask, N-cadherin localization in early heart development and polar expression of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase, and integrin during pericardial coelom formation and epithelialization of the differentiating myocardium., Developmental Biology, 151 (1992) 213-224.
- [35] F.J. Manasek, Embryonic development of the heart. I. A light and electron microscopic study of myocardial development in the early chick embryo., Journal of Morphology, 125 (1968) 329-365.
- [36] K.K. Linask, K.A. Knudsen, Y.-H. Gui, N-Cadherin-Catenin Interaction Necessary Component of cardiac cell compartmentalization during early Vertebrate Heart Development, Developmental Biology, 185 (1997) 1148-1164.
- [37] I. Harary, B. Farlay, In vitro Studies on Single Beating Rat Heart Cells, Experimental Cell Research, 29 (1963).
- [38] R.L. DeHaan, Regulation of Spontaneous Activity and Growth of Embryonic Chick Heart Cells in Tissue Culture, Developmental Biology, 16 (1967).
- [39] R. Lüllmann-Rauch, Histologie, 5. Auflage, Thieme Stuttgart, (2015).
- [40] M. Schünke, Funktionelle Anatomie - Topographie und Funktion des Bewegungssystems, Thieme, (2000).
- [41] E.D. Canale, G.R. Campbell, J.J. Smolich, Cardiac Muscle, Springer Berlin Heidelberg, (2012).
- [42] E. Carmeliet, J. Vereecke, Cardiac Cellular Electrophysiology, Kluwer Academic Publishers Group, (2009).
- [43] R.F. Schmidt, F. Lang, M. Heckmann, Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie, Springer-Lehrbuch, ISBN 978-3-642-01650-9 (2011).
- [44] J.G. Betts, Anatomy & Physiology, (2013) 787-846.
- [45] J. Malmivuo, R. Plonsey, Bioelectromagnatism - Principles and Application of Bioelectric and Biomagnetic Fields,, Oxford University Press, (1995).
- [46] W. Redfern, L. Carlsson, A. Davis, W. Lynch, I. Mackenzie, S. Palethorpe, P. Siegl, I. Strang, A. Sullivan, R. Wallis, Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval

prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development, *Cardiovascular research*, 58 (2003) 32-45.

[47] K. Hnatkova, D. Kowalski, J.J. Keirns, E.M. van Gelderen, M. Malik, Relationship of QT interval variability to heart rate and RR interval variability, *J Electrocardiol*, 46 (2013) 591-596.

[48] I. Itzhaki, L. Maizels, I. Huber, L. Zwi-Dantsis, O. Caspi, A. Winterstern, O. Feldman, A. Gepstein, G. Arbel, H. Hammerman, M. Boulos, L. Gepstein, Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells, *Nature*, 471 (2011) 225–229.

[49] H. Elming, J. Sonne, H.K. Lublin, The importance of the QT interval: a review of the literature, *Acta Psychiatr Scand*, 107 (2003) 96-101.

[50] V.F. Panoulas, T.E. Toms, K.M. Douglas, A. Sandoo, G.S. Metsios, A. Stavropoulos-Kalinoglou, G.D. Kitas, Prolonged QTc interval predicts all-cause mortality in patients with rheumatoid arthritis: an association driven by high inflammatory burden, *Rheumatology (Oxford)*, 53 (2014) 131-137.

[51] D.E. Arking, A. Pfeufer, W. Post, W.H. Kao, C. Newton-Cheh, M. Ikeda, K. West, C. Kashuk, M. Akyol, S. Perz, S. Jalilzadeh, T. Illig, C. Gieger, C.Y. Guo, M.G. Larson, H.E. Wichmann, E. Marban, C.J. O'Donnell, J.N. Hirschhorn, S. Kaab, P.M. Spooner, T. Meitinger, A. Chakravarti, A common genetic variant in the NOS1 regulator NOS1AP modulates cardiac repolarization, *Nature genetics*, 38 (2006) 644-651.

[52] T. Meyer, C. Leisgen, B. Gonser, E. Günther, QT-screen: high-throughput cardiac safety pharmacology by extracellular electrophysiology on primary cardiac myocytes, *Assay and drug development technologies*, 2 (2004) 507-514.

[53] T. Meyer, K.-H. Boven, E. Günther, M. Fejtl, Micro-Electrode Arrays in Cardiac Safety Pharmacology: A novel Tool to Study QT Interval Prolongation, *Drug Safety*, 27 (2004) 763-772.

[54] J.G. Seidman, C. Seidman, The Genetic Basis for Cardiomyopathy: from Mutation Identification to Mechanistic Paradigms, *Cell Cycle*, 104 (2001) 557-567.

[55] D.M. Bers, Cardiac excitation–contraction coupling, *Nature*, 6868 (2002).

[56] U. Egert, T. Meyer, Heart on a chip—Extracellular multielectrode recordings from cardiac myocytes in vitro, *Practical Methods in Cardiovascular Research*, Springer2005, pp. 432-453.

[57] K. Banach, M.D. Halbach, P. Hu, J. Hescheler, U. Egert, Development of electrical activity in cardiac myocyte aggregates derived from mouse embryonic stem cells, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284 (2003) H2114-H22123.

[58] G. Meiry, Y. Reisner, Y. Feld, S. Goldbergg, M.R. Rosen, N. Ziv, O. Binah, Evolution of action potential propagation and repolarization in cultured neonatal rat ventricular myocytes, *Journal of cardiovascular electrophysiology*, 12 (2001) 1269-1277.

[59] H. Shimizu, J. Schredelseker, J. Huang, K. Lu, S. Naghdi, F.-M. Lu, S. Franklin, H.D. Fiji, K. Wang, H. Zhu, C. Tian, B. Lin, H. Nakano, A. Ehrlich, J. Nakaj, A.Z. Stieg, J.K. Gimezewski, A. Nakano, J.I. Goldhaber, T.M. Vondriska, G. Hajnóczy, O. Kwon, J.N. Chen, Mitochondrial Ca(2+) uptake by the voltage-dependent anion channel 2 regulates cardiac rhythmicity., *Elife*, 15 (2015) 1-20.

[60] Y. Nozaki, Y. Honda, S. Tsujimoto, H. Watanabe, T. Kunimatsu, H. Funabashi, Availability of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in assessment of drug potential for QT prolongation, *Toxicology and applied pharmacology*, 278 (2014) 72-77.

-
- [61] Y. Asai, M. Tada, T.G. Otsuji, N. Nakatsuji, Combination of functional cardiomyocytes derived from human stem cells and a highly-efficient microelectrode array system: an ideal hybrid model assay for drug development., *Curr Stem Cell Res Ther*, 5 (2010) 227-232.
- [62] L. Guo, R.M. Abrams, J.E. Babiarz, J.D. Cohen, S. Kameoka, M.J. Sanders, E. Chiao, K.L. Kolaja, Estimating the risk of drug-induced proarrhythmia using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 123 (2011) 281-289.
- [63] Asukura K, S. Hyashi, A. Ojima, T. Taniguchi, N. Miyamoto, C. Nakamori, C. Nagasawa, T. Kitamura, T. Osada, Y. Honda, C. Kasai, H. Ando, Y. Kanda, Y. Sekino, S. K., Improvement of acquisition and analysis methods in multi-electrode array experiments with iPS cell-derived cardiomyocytes., *Journal of pharmacological and toxicological methods*, (2015).
- [64] R. Kienast, M. Stöger, M. Handler, F. Hanser, C. Baumgartner, Alterations of field potentials in isotropic cardiomyocyte cell layers induced by multiple endogenous pacemakers under normal and hypothermal conditions., *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 307 (2014) H1013-H1023.
- [65] M. Ben-Ari, R. Schick, L. Barad, A. Novak, E. Ben-Ari, A. Lorber, J. Itskovitz-Eldor, M.R. Rosen, A. Weissman, O. Binah, From beat rate variability in induced pluripotent stem cell-derived pacemaker cells to heart rate variability in human subjects., *Heart Rythm* 11 (2014) 1808-1818.
- [66] S. Friedrichs, D. Malan, Y. Voss, P. Sasse, Scalable Electrophysiological Investigation of iPS Cell-Derived Cardiomyocytes Obtained by a Lentiviral Purification Strategy., *J Clin Med*, 4 (2015) 102-123.
- [67] B.O. Bingen, M.C. Engels, M.J. Schali, W. Jangsangthong, Z. Nesthati, I. Feola, D.L. Ypey, S.F. Askar, A.V. Panfilov, D.A. Pijnappels, A.A. de Vries, Light-induced termination of spiral wave arrhythmias by optogenetic engineering of atrial cardiomyocytes., *Cardiovascular research*, 104 (2014) 194-205.
- [68] T. Trantidou, C.M. Terrasciano, D. Kontziampasis, E.J. Humphrey, T. Podromakis, Biorealistic cardiac cell culture platforms with integrated monitoring of extracellular action potentials., *Sci Rep*, (2015).
- [69] Z.C. Lin, C. Xie, Y. Osakada, Y. Cui, B. Cui, Iridium oxide nanotube electrodes for sensitive and prolonged intracellular measurement of action potentials., *Nat Commun*, 5 (2014).
- [70] C. Nick, S. Quednau, H. Sarwar, F. Schlaak, C. Thielemann, High aspect ratio gold nanopillars on microelectrodes for neural interfaces *Microsystem Technologies*, 20 (2014) 1849-1857.
- [71] C. Nick, S. Yadav, R. Joschi, J.J. Schneider, C. Thielemann, A three-dimensional microelectrode array composed of vertically aligned ultra-dense carbon nanotube networks, *Appl Phys Lett*, 107 (2015).
- [72] M. Mayer, S. Ritter, C. Thielemann, Electrophysiological Effects of Ionising Radiation on Cortical Rat Neurons in vitro, *GSI Scientific Report 2014* (2015) accepted for print.
- [73] J.L. Frieß, A. Heslich, S. Ritter, A. Haber, N. Kaiser, P.G. Layer, C. Thielemann, Electrophysiological and cellular characteristics of cardiomyocytes after X-ray irradiation., *Mutation Research*, 777 (2015) 1-10.
- [74] D.A. Borkholder, Cell based biosensors using microelectrodes., *Dissertation, Stanford University*, (1998).
- [75] S. Ingebrandt, C.K. Yeung, W. Staab, T. Zetterer, A. Offenhäusser, Backside contacted field effect transistor array for extracellular signal recording., *Biosens Bioelectron.*, 2003 (2006) 4.

-
- [76] E.I. Azzam, Expression of CONNEXIN43 Is Highly Sensitive to Ionizing Radiation and Other Environmental Stresses, *Cancer Research*, 63 (2003).
- [77] D. Glover, J.B. Little, M.F. Lavin, N. Gueven, Low dose ionizing radiation-induced activation of connexin 43 expression, *International journal of radiation biology*, 79 (2003) 955-964.
- [78] M. Amino, K. Yoshioka, D. Fujibayashi, T. Hashida, Y. Furusawa, W. Zareba, Y. Ikari, E. Tanaka, C. Mori, S. Inokuchi, I. Kodama, T. Tanabe, Year-long upregulation of connexin43 in rabbit hearts by heavy ion irradiation., *Am J Physiol Hearst Circ Physiol*, 298 (2010) H1014-H1021.
- [79] H.J. Jongsma, R. Wilders, Gap junctions in cardiovascular disease., *Circ Res*, 86 (2000) 1193-1197.
- [80] N.J. Severs, A.F. Bruce, E. Dupont, S. Rothery, Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium., *Cardiovascular research*, 80 (2008) 9-19.
- [81] P. Kannankeril, R.D. M., D. Darbar, Drug-Induced Long QT Syndrome, *Pharmacological Reviews*, 62 (2010) 760-781.
- [82] H.C. Bazett, An analysis of the time-relations of electrocardiograms, *Heart*, 7 (1920) 353-367.
- [83] A. Sagie, M.G. Larson, R.J. Goldberg, J.R. Bengtson, D. Levy, An improved method for adjusting the QT interval for heart rate (the Framingham Heart Study), *The American journal of cardiology*, 70 (1992) 797-801.
- [84] L.S. Fridericia, The duration of systole in the electrocardiogram of normal subjects and of patients with heart disease, *Acta Medica Scandinavica*, 53 (1920) 469-486.
- [85] M. Scholz, Effects of Ion Radiation on Cells and Tissues, *Advances in Polymer Science*, 162 (2003) 95-155.
- [86] ICRU, Report 85: Fundamental quantities and units for ionizing radiation, *Journal of the ICRU*, 11 (2011) 1-31.
- [87] G.R. Choppin, J. Lilkenzin, J. Rydberg, *Radiation Effects on Matter*, Radiochemistry and Nuclear Chemistry, Elsevier, 3rd Edition (2002).
- [88] ICRU, Report 86: Quantification and reporting of low-dose and other heterogeneous exposures.pdf>, *Journal of the ICRU*, 11 (2011).
- [89] H. Krieger, *Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlungsschutzes*, Springer, Spektrum, 4. Auflage (2012).
- [90] E. Hall, A. Giaccia, *Radiobiology for the radiologist*, 6th ed., Wolters Kluwer Health 2006.
- [91] G. Kraft, M. Krämer, Track Structure and DNA Damage, *Adv Space Res*, 14 (1994) 151-159.
- [92] U. Weber, G. Kraft, Comparison of Carbon Ions Versus Protons, *The Cancer Journal*, 15 (2009) 325-332.
- [93] J.D. Cohen, J.E. Babiarez, R.M. Abrams, L. Guo, S. Kameoka, E. Chiao, J. Taunton, K.L. Kolaja, Use of human stem cell derived cardiomyocytes to examine sunitinib mediated cardiotoxicity and electrophysiological alterations, *Toxicology and applied pharmacology*, 257 (2011) 74-83.
- [94] L. Guo, J.Y. Qian, R.M. Abrams, H.M. Tang, T. Weiser, M.J. Sanders, K.L. Kolaja, The electrophysiological effects of cardiac glycosides in human iPSC-derived cardiomyocytes and in guinea

pig isolated hearts., *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 27 (2011) 453-462.

[95] J. Ma, L. Guo, J.S. Fiene, B.D. Anson, J.A. Thomson, T.J. Kamp, K.L. Kolaja, B.J. Swanson, C.T. January, High purity human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: electrophysiological properties of action potentials and ionic currents, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301 (2011) H2006-H2017.

[96] J.E. Babiarz, M. Ravon, S. Sridhar, P. Ravindran, B. Swanson, H. Bitter, T. Weiser, E. Chiao, U. Certa, K.L. Kolaja, Determination of the human cardiomyocyte mRNA and miRNA differentiation network by fine-scale profiling, *Stem cells and development*, 21 (2012) 1956-1965.

[97] M. Fine, F.-M. Lu, M.-J. Lin, O. Moe, H.-R. Wang, D.W. Hilgemann, Human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for studies of cardiac ion transporters., *Am j Cell Physiol.*, 305 (2013) C481-C491.

[98] P. Sil, S. Sen, Angiotensin II and myocyte growth: role of fibroblasts, *Hypertension*, 30 (1997) 209-216.

[99] J. Steininger, Signalverarbeitung für zellbasierte Biosensoren, Diplomarbeit, Hochschule Aschaffenburg, (2005).

[100] R. Bestel, Signalverarbeitung für zellbasierte Biosensoren, Bachelorthesis, Hochschule Aschaffenburg, (2010).

[101] C. Nick, M. Goldhammer, R. Bestel, F. Steger, A.W. Daus, C. Thielemann, DrCell – A Software Tool for the Analysis of Cell Signals recorded with Extracellular Microelectrodes, *Signal Processing: An International Journal (SPIJ)*, (2013) 96-109.

[102] C.L. Schwartz, W.L. Hobbie, S. Truesdell, L.C. Constone, E.B. Clark, Corrected QT Interval Prolongation in Anthracycline-Treated Survivors of Childhood Cancer, *Journal of Clinical Oncology*, 11 (1993) 1609-1910.

[103] J.P. Fahrenbach, R. Mejia-Alvarez, K. Banach, The relevance of non-excitabile cells for cardiac pacemaker function, *The Journal of physiology*, 585 (2007) 565-578.

[104] V. Jacquemet, C.S. Henriquez, Loading effect of fibroblast-myocyte coupling on resting potential, impulse propagation, and repolarization: insights from a microstructure model, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294 (2008) H2040-2052.

[105] S. Mureli, C.P. Gans, D.J. Bare, D.L. Geenen, N.M. Kumar, K. Banach, Mesenchymal stem cells improve cardiac conduction by upregulation of connexin 43 through paracrine signaling, *Am j Heart Circ Physiol*, 304 (2012).

[106] R. Kienast, M. Stöger, M. Handler, F. Hanser, B. C., Alterations of field potentials in isotropic cardiomyocyte cell layers induced by multiple endogenous pacemakers under normal and hypothermal conditions., *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 307 (2014) H1013-H1023.

[107] L. Kuo, L. Yang, γ H2AX - A Novel Biomarker for DNA double strand breaks, *In Vivo*, (2008) 305-309.

[108] R. Scully, A. Xie, Double strand break repair functions of histone H2AX, *Mutat Res*, 750 (2013) 5-14.

- [109] K. Rothkamm, I. Kruger, L.H. Thompson, M. Lobrich, Pathways of DNA Double-Strand Break Repair during the Mammalian Cell Cycle, *Molecular and Cellular Biology*, 23 (2003) 5706-5715.
- [110] D. Deckbar, P.A. Jeggo, M. Lobrich, Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints, *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 46 (2011) 271-283.
- [111] T. Takahashi, R.S. Nowakowski, V.S.J. Caviness, BUdR as an S-Phase marker for quantitative studies of cytokinetic behaviour in the murine cerebral ventricular zone., *Journal of Neurocytology*, (1992) 185-197.
- [112] K. Shibata, M. Inagaki, K. Ajiro, Mitosis-specific histone H3 phosphorylation in vitro nucleosome structures, *European Journal of Biochemistry*, (1990) 87-93.
- [113] M.J. Hendzel, Y. Wei, M.A. Mancini, A. Van Hooser, T. Ranalli, B.R. Brinkley, D.P. Bazett-Jones, C.D. Allis, Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation., *Chromosoma*, 6 (1997) 348-360.
- [114] D. Deckbar, J. Birraux, A. Krempler, L. Tchouandong, A. Beucher, S. Walker, T. Stiff, P. Jeggo, M. Lobrich, Chromosome breakage after G2 checkpoint release, *The Journal of cell biology*, 176 (2007) 749-755.
- [115] D. Deckbar, T. Stiff, B. Koch, C. Reis, M. Lobrich, P.A. Jeggo, The limitations of the G1-S checkpoint, *Cancer Res*, 70 (2010) 4412-4421.
- [116] J. Lukas, C. Lukas, J. Bartek, Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time., *DNA Repair*, (2004) 997-1007.
- [117] H.L. Yin, Y. Suzuki, Y. Matsumoto, M. Tomita, Y. Furusawa, A. Enomoto, A. Morita, M. Aoki, F. Yatagai, T. Suzuki, Y. Hosoi, K. Ohtomo, N. Suzuki, Radiosensitization by hyperthermia in the chicken B-lymphocyte cell line DT40 and its derivatives lacking nonhomologous end joining and/or homologous recombination pathways of DNA double-strand break repair., *Radiation Research*, (2004) 433-441.
- [118] H.L. Hartwell, T.A. Weinert, Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events, *Science*, (1989) 629-634.
- [119] R.G. Syljuasen, S. Jensen, J. Bartek, J. Lukas, Adaptation to the ionizing radiation-induced G2 checkpoint occurs in human cells and depends on checkpoint kinase 1 and Polo-like kinase 1 kinases, *Cancer Res*, 66 (2006) 10253-10257.
- [120] H. Dodson, E. Bourke, L. Jeffers, P. Vagnarelli, E. Sonoda, S. Takeda, W. Earnshaw, A. Merdes, C. Morrison, Centrosome amplification induced by DNA damage occurs during a prolonged G2 phase and involves ATM, *The EMBO Journal*, (2004) 3864-3872.
- [121] E. Bourke, J. Brown, S. Takeda, H. Hochegger, C. Morrison, DNA damage induces Chk1-dependent threonine-160 phosphorylation and activation of Cdk2., *Oncogene*, (2010) 616-624.
- [122] M. Filgueiras, A. Morrot, P.M. Gomes Soares, M.L. Costa, C. Mermelstein, Effects of 5-Fluorouracil in Nuclear and Cellular Morphology, Proliferation, Cell Cycle, Apoptosis, Cytoskeletal and Caveolar Distribution in Primary Cultures of Smooth Muscle Cells, *PLOS ONE*, 8 (2013).
- [123] A. Mocciaro, E. Berdugo, K. Zeng, E. Black, P. Vagnarelli, W. Earnshaw, D. Gillespie, P. Jallepalli, E. Schiebel, Vertebrate cells genetically deficient for Cdc14A or Cdc14B retain DNA damage checkpoint proficiency but are impaired in DNA repair, *The Journal of cell biology*, 189 (2010) 631-639.

-
- [124] M. Tamamori-Adachi, Critical Role of Cyclin D1 Nuclear Import in Cardiomyocyte Proliferation, *Circulation Research*, 92 (2002) 12e-19.
- [125] G.W. Barendsen, Mechanisms of cell reproductive death and shapes of radiation dose--survival curves of mammalian cells, *International journal of radiation biology*, 57 (1990) 885-896.
- [126] J.K. Leach, G. Van Tuyle, P.-S. Lin, R. Schmidt-Ullrich, R.B. Mikkelsen, Ionizing Radiation-induced, mitochondria dependent generation of Reactive Oxygen/Nitrogen, *Cancer Research*, (2001) 3894-3901.
- [127] H. Nojiri, T. Shimizu, M. Funakoshi, O. Yamaguchi, H. Zhou, S. Kawakami, Y. Ohta, M. Sami, T. Tachibana, H. Ishikawa, H. Kurosawa, R.C. Kahn, K. Otsu, T. Shirasawa, Oxidative stress causes heart failure with impaired mitochondrial respiration, *The Journal of biological chemistry*, 281 (2006) 33789-33801.
- [128] F.G. Akar, M.A. Aon, G.F. Tomaselli, B. O'Rourke, The mitochondrial origin of postischemic arrhythmias, *The Journal of clinical investigation*, 115 (2005) 3527-3535.
- [129] H. Aebi, Catalase in vitro, *Methods Enzymol*, 105 (1984) 121-126.
- [130] Z. Barjaktarovic, D. Schmaltz, A. Shyla, O. Azimzadeh, S. Schulz, J. Haagen, W. Dorr, H. Sarioglu, A. Schafer, M.J. Atkinson, H. Zischka, S. Tapio, Radiation-induced signaling results in mitochondrial impairment in mouse heart at 4 weeks after exposure to X-rays, *PLOS ONE*, 6 (2011) e27811.
- [131] T. Yamamori, H. Yasui, M. Yamazumi, Y. Wada, Y. Nakamura, H. Nakamura, O. Inanami, Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint, *Free radical biology & medicine*, 53 (2012) 260-270.
- [132] J.R. Hom, R.A. Quintanilla, D.L. Hoffman, K.L. de Mesy Bentley, J.D. Molkenin, S.S. Sheu, G.A. Porter, Jr., The permeability transition pore controls cardiac mitochondrial maturation and myocyte differentiation, *Developmental cell*, 21 (2011) 469-478.
- [133] P.D. Vivancos, T. Wolff, J. Markovic, F. Pallardo, C. Foyer, A nuclear glutathione cycle within the cell cycle, *Biochem J*, 431 (2010) 169-178.
- [134] K.H. Gilchrist, G.F. Lewis, A. Gay, K.L. Sellgren, S. Grego, High-throughput cardiac safety evaluation and multi-parameter arrhythmia profiling of cardiomyocytes using microelectrode arrays, *Toxicology and applied pharmacology*, S0041-008X (2015) 1-9.
- [135] M.D. Halbach, U. Egert, J. Hescheler, K. Banach, Estimation of Action Potential Changes from Field Potential Recordings in Multicellular Mouse Cardiac Myocyte Cultures, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 13 (2003) 271-284.
- [136] P. Rebuzzini, L. Fassina, F. Mulas, R. Bellazzi, C.A. Redi, R. Di Liberto, G. Magenes, J. Adjaye, M. Zuccotti, S. Garagna, Mouse embryonic stem cells irradiated with gamma-rays differentiate into cardiomyocytes but with altered contractile properties, *Mutation Research*, 756 (2013) 37-45.
- [137] X.H. Wehrens, S.E. Lehnart, S. Reiken, J.A. Vest, A. Wronska, A.R. Marks, Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: a critical mediator of heart failure progression, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (2006) 511-518.

-
- [138] D.B. Zorov, M. Juhaszova, S.J. Sollott, Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review, *Biochimica et biophysica acta*, 1757 (2006) 509-517.
- [139] P.D. Swaminathan, A. Purohit, S. Soni, N. Voigt, M.V. Singh, A.V. Glukhov, Z. Gao, B.J. He, E.D. Luczak, M.-L.A. Joiner, W. Kutschke, J. Yang, J.K. Donahue, R.M. Weiss, I.M. Grumbach, M. Ogawa, P. Chen, I. Efimov, D. Dobrev, P.J. Mohler, T.J. Hund, M.E. Anderson, Oxidized CAMKII causes cardiac sinus node dysfunction in mice, *Journal of Clinical Investigation*, 121 (2011) 3277-3288.
- [140] C.M. Sag, S. Wagner, L.S. Maier, Role of oxidants on calcium and sodium movement in healthy and diseased cardiac myocytes, *Free radical biology & medicine*, 63 (2013) 338-349.
- [141] C.S. Gibhardt, B. Roth, I. Schroeder, S. Fuck, P. Becker, B. Jakob, C. Fournier, A. Moroni, G. Thiel, X-ray irradiation activates K(+) channels via H2O2 signaling., *Sci Rep.*, 5:13861 (2015) 1-11.
- [142] R.M. Shaw, Y. Rudy, Ionic mechanisms of propagation in cardiac tissue. Roles of the sodium and L-type calcium currents during reduced excitability and decreased gap junction coupling., *Circ Res*, 81 (1997) 727-741.
- [143] M. Amino, K. Yoshioka, T. Tanabe, E. Tanaka, H. Mori, Y. Furusawa, W. Zareba, M. Yamazaki, H. Nakagawa, H. Honjo, Heavy ion radiation up-regulates Cx43 and ameliorates arrhythmogenic substrates in hearts after myocardial infarction, *Cardiovascular research*, 72 (2006) 412-421.
- [144] K. Liu, M. Kaspar, A. Bierhaus, S. Langer, M. Müller, K.R. Trott, Connexin 43 expression in normal and irradiated mouse skin., *Radiation research*, 147 (1997) 437-441.
- [145] M. Kaspar, O. Traub, T. Reimann, L. Bjermer, H. Grossmann, M. Müller, K.-W. Wenzel, Upregulation of gap junction protein connexin43 in alveolar epithelial cells of rats with radiation-induced pulmonary fibrosis, *Histochem Cell Biol*, 106 (1996) 419-424.
- [146] M.D. Christensen, W. Dun, P.A. Boyden, M.E. Anderson, P.J. Mohler, T.J. Hund, Oxidized calmodulin kinase II regulates conduction following myocardial infarction: a computational analysis, *PLoS computational biology*, 5 (2009) e1000583.
- [147] M. Hada, B.M. Sutherland, Spectrum of complex DNA damages depends on the incident radiation, *Radiat Research*, 165 (2006) 223-230.
- [148] M. Durante, J.S. Bedford, D.J. Chen, S. Conrad, M.N. Cornforth, A.T. Natarajan, D.C. van Gent, G. Obe, From DNA damage to chromosome aberrations: Joining the break, *Mut Res*, 756 (2013) 5-13.
- [149] E.P. Rogakou, C. Boon, C. Redon, W.M. Bonner, Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-Strand Breaks In Vivo, *The Journal of cell biology*, 146 (1999) 906-915.
- [150] M. Reppel, P. Igelmund, U. Egert, F. Juchelka, J. Hescheler, I. Drobinskaya, Effect of cardioactive drugs on action potential generation and propagation in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 19 (2007) 213-224.
- [151] A. Stett, U. Egert, E. Guenther, F. Hofmann, T. Meyer, W. Nisch, H. Haemmerle, Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377 (2003) 486-495.
- [152] T. Meyer, P. Sartipy, F. Blind, C. Leisgen, E. Guenther, New cell models and assays in cardiac safety profiling, *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 3 (2007) 507-517.

-
- [153] A.L. Lahti, V.J. Kujala, H. Chapman, A.P. Koivisto, M. Pekkanen-Mattila, E. Kerkela, J. Hyttinen, K. Kontula, H. Swan, B.R. Conklin, S. Yamanaka, O. Silvennoinen, K. Aalto-Setälä, Model for long QT syndrome type 2 using human iPS cells demonstrates arrhythmogenic characteristics in cell culture, *Disease models & mechanisms*, 5 (2012) 220-230.
- [154] F. Nguemo, T. Saric, K. Pfannkuche, M. Watzele, M. Reppel, J. Hescheler, In vitro Model for Assessing Arrhythmogenic Properties of Drugs Based on High-resolution Impedance Measurements, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 29 (2012) 819–832.
- [155] Y.A. Abassi, B. Xi, N. Li, W. Ouyang, A. Seiler, M. Watzele, R. Kettenhofen, H. Bohlen, A. Ehlich, E. Kolossov, X. Wang, X. Xu, Dynamic monitoring of beating periodicity of stem cell-derived cardiomyocytes as a predictive tool for preclinical safety assessment, *British journal of pharmacology*, 165 (2012) 1424-1441.
- [156] S.W. Yeola, T.C. Rich, V.N. Uebele, M.M. Tamkun, D.J. Snyders, Molecular Analysis of a Binding Site for Quinidine in a Human Cardiac Delayed Rectifier K⁺ Channel. Role of S6 in antiarrhythmic drug binding., *Circ Res.*, 78 (1996) 1105-1114.
- [157] H. Liang, M. Matzkies, H. Schunkert, M. Tang, H. Bonnemeier, J. Hescheler, M. Reppel, Human and Murine Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Serve Together as a Valuable Model for Drug Safety Screening, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2010 (2010) 459–466.
- [158] Y. Gavrieli, Y. Sherman, S.A. Ben-Sasson, Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation, *Journal of Cell Biology*, 119 (1992) 493-501.
- [159] I. Rahman, A. Kode, S.K. Biswas, Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method, *Nature protocols*, 1 (2006) 3159-3165.
- [160] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding., *Anal. Biochem.*, 7 (1976) 248-254.

Curriculum vitae

Persönliches

Name: **Johannes L. Friess**
Adresse: Ramperstorffergasse 46
1050 Wien
E-Mail: JohannesFriess@gmx.net
Geburtstag: 24. März 1984
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet



Bildungsweg

Seit Sept. 2011 **Promotion an der Hochschule Aschaffenburg in Kooperation mit der Technischen Universität Darmstadt**
Thema: Einfluss ionisierender Strahlung auf die Elektrophysiologie kardialer Zellen.

März 2013 **Fortbildung zum Projektleiter und Beauftragten für biologische Sicherheit**

Seit Okt. 2004 **Biologie Studium (Diplom), Technische Universität Darmstadt**
Vertiefungssäulen: Zell- und Entwicklungsbiologie, Genetik und Mikrobiologie
Abschlussnote: 1,0, mit Auszeichnung

Aug. 1994 – Juli 2003 **Max-Planck-Schule, Groß-Umstadt, Abschluss**
Abschluss: Abitur (2,7)
Leistungskurse: Biologie und Englisch

Beruflicher Werdegang

Okt. 2003 – Juni 2004 **Wehrpflicht als Sanitäter, Luftwaffen-Sanitätsstaffel III/Luftwaffen-Ausbildungsregiment 3, Germersheim**

- Ausbildung zum Sanitäter abgeschlossen
- Über 500 Patientenakten verwaltet
- Arzttermine von Soldaten und Rekruten koordiniert

Juli 2008 und Juli 2009 **Hilfswissenschaftler und Betreuer im Genetik-Grundpraktikum, Technische Universität Darmstadt**

- Studierenden die grundlegenden Methodiken der Genetik und Molekularbiologie vermittelt
- Studierende auf Abschlussprüfung vorbereitet

Sonstige Fertigkeiten

Sprachen: Deutsch (Muttersprache), Englisch (C2), Französisch (A2)

Computerfertigkeiten Microsoft Office (Word, Excel, Powerpoint), ImageJ
Mikroskop-Software (Axio Visio)

Engagement Ehrenamtliche Teilnahme in Aufbau und Service bei jährlichem Musik-Festival (TrafficJam)

Publikationen

J. L. Frieß, A. Heselich, S. Ritter, N. P. Benz, P. G. Layer and C. Thielemann,
Effects of heavy ion exposure on the electrophysiology of primary embryonic cardiomyocytes *in vitro*,
Manuskript in Präparation

J. L. Frieß, A. Heselich, S. Ritter, A. Haber, N. Kaiser, P. G. Layer and C. Thielemann,
Electrophysiologic and cellular characteristics of cardiomyocytes after X-ray irradiation,
Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 777 (2015) 1–10.

J. L. Frieß, A. Heselich, S. Ritter, P. G. Layer and C. Thielemann,
Electrophysiologic and molecular characteristics of cardiomyocytes after heavy ion irradiation in the
frame of the ESA IBER-10 program, *Journal of Radiation Research*, 55 (2014) i40-i41.

A. Helm, S. Frank, J. Frieß, C. Thielemann, M. Durante and S. Ritter
Purified cultures of mouse embryonic stem cell-derived cardiomyocytes of electrophysiological studies
with ionizing radiation, *GSI Scientific Report*, (2013) 211

J. Frieß, A. Heselich, S. Ritter, P. G. Layer and C. Thielemann,
Effect of X-rays and titanium ions on cardiomyocyte cultures,
GSI Scientific Report, (2013) 480.

M. Materna, A. Helm, P. Hessel, J. Frieß, C. Thielemann, D. Pignalosa, W. Mäntele, M. Durante and S.
Ritter, First electrophysiological studies on mouse embryonic stem cell-derived cardiomyocytes,
GSI Scientific Report, (2012) 441.

J. Frieß, A. Heselich, S. Ritter, A. W. Daus, P.G. Layer and C. Thielemann,
Electrophysiological Effects of Heavy Ion Irradiation on Cardiomyocytes,
GSI Scientific Report, (2012) 219.

C. Thielemann, S. Ritter and P. Layer, J. Frieß, A. Daus, F. Steger and A. Heselich,
Cellular effects of space radiation with relevance to cardiovascular diseases,
GSI Scientific Report, (2011) 560.

F. Steger, S. Ritter, A. Daus, J. Frieß and C. Thielemann,
Analysis of electrophysiological characteristics of cardiomyocytes following radiation exposure,
GSI Scientific Report, (2011) 556.

Poster und Konferenzbeiträge

J. Frieß, A. Heselich, S. Ritter, P. G. Layer and C. Thielemann,
Electrophysiological characteristics of cardiomyocytes after heavy ion exposure,
GBS, Darmstadt, Germany, 2013.

J. Frieß, A. Heselich, S. Ritter, A. W. Daus, P. G. Layer and C. Thielemann,
Electrophysiologic and Molecular Characteristics of Cardiomyocytes after Heavy Ion Irradiation in the
frame of the ESA IBER-10 Program,
Heavy Ion in Therapie and Space Radiation Symposium, Chiba, Japan, 2013.

S. Ritter, M. Durante, A. Helm, F. Steger, A. W. Daus, J. Frieß and C. Thielemann,
Assessment of cardiotoxicity of heavy ions in vitro: generation and electrophysiology of
cardiomyocytes, 39th COSPAR Scientific Assembly, Mysore, India, 2012.

F. Steger, J. Frieß, A.W. Daus, S. Ritter, P. G. Layer and C. Thielemann,
Analysis of electrophysiological characteristics of cardiomyocytes following radiation exposure,
MEA Meeting, Reutlingen, Germany, 2012.

C. Thielemann, S. Ritter, P. Layer, J. Frieß, A. W. Daus, F. Steger and A. Heselich:
IBER10 - Cellular effects of space radiation with relevance to cardiovascular diseases
ESA Conference, Life in Space for Life on Earth, Aberdeen, Scotland, 2012.