

**Diplomarbeit**

**Perspektiven der heterologen extrazellulären Matrizes  
für in vitro Studien von kardialen Phänotypen**

eingereicht von

**Christoph Tischler**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde  
(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt am

**Diagnostik & Forschungsinstitut für Humangenetik**

unter der Anleitung von

**Assoz. Prof. Priv.-Doz. Mag. Dr.rer.nat. Christian Windpassinger**

und

**Verena Rupp, PhD**

Graz am 18.06.2019

## **Eidesstattliche Erklärung**

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, am 18.06.2019*

*Christoph Tischler eh.*

## Danksagungen

Mein Dank gilt all jenen Personen, die mir die Möglichkeit zu dieser Arbeit direkt, oder indirekt ermöglicht haben und mich hiermit beim Abschluss meines Medizinstudiums unterstützt haben.

Zuerst möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Großtante bedanken, die mich während der ganzen Studienzeit unterstützt und gestärkt haben. Weiters möchte ich meiner Freundin Lisa für ihren Rückhalt und ihre rücksichtsvolle Art während meiner Prüfungszeiten danken. Dank gilt auch meinen lieben StudienkollegInnen sowie FreundInnen, die stets an mich geglaubt haben und mich motiviert haben, in lernintensiven Zeiten durchzuhalten.

Meine besondere Wertschätzung gilt Assoz. Prof. Priv.-Doz. Mag. Dr.rer.nat. Christian Windpassinger und seinem Team für die Ratschläge und Hilfestellungen bei der Vollendung meiner Diplomarbeit. Hervorheben möchte ich Verena Rupp, PhD und Barbara Ramler.

Ich möchte meine Diplomarbeit Univ.-Ass. Priv.-Doz. Mag. Dr.rer.nat. Dr.scient.med. Thomas Schwarzbraun widmen!

## Zusammenfassung

**Hintergrund.** Laufend entdecken KardiogenetikerInnen neue Mutationen, die potentiell als Auslöser für den plötzlichen Herztod (PHT) in Frage kommen könnten. Jedoch kann nicht bei allen PatientInnen anhand des genetischen Bildes auf den kardialen Phänotyp geschlossen werden, speziell beim Auftreten neuer Mutationen. Ziel dieser Arbeit ist es, durch Laborversuche herauszufinden, welche tierischen Herzen sich besonders gut für in vitro Studien von kardialen Phänotypen eignen könnten.

**Methoden.** Die Mäuse- und Schweineherzen wurden mittels eines modifizierten Protokolls behandelt. Die Dezellularisierung wurde mit einprozentigem Natriumdodecylsulfat (SDS) und einprozentigem Triton X-100 durchgeführt. Anschließend wurden die Herzen zerkleinert, verdaut und auf noch vorhandene Desoxyribonukleinsäure (DNA) getestet. Die Auswertung erfolgte mittels einer DNA-Gehaltsbestimmung beziehungsweise mit einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und spezifischen Primern. Im Fall der Schweineherzen kam für die mikroskopische Untersuchung ein fluoreszierender Farbstoff zum Einsatz.

**Ergebnisse.** Die Fluoreszenzmikroskopie der Schweineherzen konnte keinen eindeutigen Nachweis für intakte Zellkerngruppierungen liefern. Das Ergebnis der anschließenden Proben zeigte in allen vier Fällen einen DNA Gehalt von unter  $0,01\mu\text{g/ml}$ . Im zweiten Analyseschritt erfolgte eine PCR, in dieser schien bei allen Proben eine Bande bei 200 Basenpaaren auf. Dies gilt als Bestätigung für noch vorhandenes DNA Material vom Schwein. Die zweite Versuchsreihe wurde mit Mäuseherzen durchgeführt. Hierbei konnte die Ausgangs DNA Menge von 5376 Nanogramm auf 870,2 Nanogramm reduziert werden. Das entspricht einer Gesamtreduktion von 83,3%.

**Schlussfolgerung.** Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich Mäuseherzen aufgrund ihrer Größe gut eignen würden. Schweineherzen sind auf Basis der jetzigen Erkenntnisse zu groß und weisen eine zu dicke Vorhof- und Kammermuskulatur auf, sodass eine reine Diffusion der Detergenzien nicht ausreicht. Weitere Versuche hinsichtlich der Reproduzierbarkeit und klinischen Anwendung stehen jedoch noch aus.

## Abstract

**Background.** Cardio geneticists are ongoing discovering new mutations that could potentially trigger sudden cardiac death (PHT). However, not all patients are able to affiliate the cardiac phenotype from the genetic picture, especially when new mutations occur. The aim of this work was to find out by laboratory tests which animal hearts could be specifically suitable for in vitro studies of cardiac phenotypes.

**Methods.** The mouse and pig hearts were treated using a modified protocol. Decellularization was performed with one percent sodium dodecyl sulfate (SDS) and one percent Triton X-100. The hearts were then chopped up, digested and tested for the presence of deoxyribonucleic acid (DNA). The analysis is carried out by means of a DNA content determination or a polymerase chain reaction (PCR) and specific primers. In the case of pig hearts, a fluorescent dye was used for microscopic examination.

**Results.** Fluorescence microscopy of pig hearts could not provide obvious evidence of intact cell nucleus groupings. In all four cases, the result of the subsequent DNA samples was less than 0.01 $\mu$ g/ml. In the second analysis step, a PCR was performed, in which a band of 200 base pairs appeared on all samples. This is the validation for still existing DNA material from pigs. The second test series was performed with mouse hearts. The initial DNA quantity was reduced from 5376 nanograms to 870.2 nanograms. This corresponds to a total reduction of 83.3%.

**Conclusion.** The results suggest that mouse hearts are well suited due to their size. Based on current knowledge, pig hearts are too large and have too thick atrial and chamber musculature in order that a pure diffusion of the detergents is not sufficient. However, further trials in terms of reproducibility and clinical application are still pending.

# Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung.....	1
Danksagungen .....	2
Zusammenfassung .....	3
Abstract.....	4
Inhaltsverzeichnis .....	5
Abkürzungsverzeichnis .....	7
Abbildungsverzeichnis .....	9
Tabellenverzeichnis .....	10
1 Einleitung .....	11
1.1 Plötzlicher Herztod .....	11
1.2 Epidemiologie.....	12
1.3 Primär elektrische Herzerkrankungen.....	12
1.3.1 Long-QT-Syndrom .....	14
1.3.2 Short-QT-Syndrom.....	18
1.3.3 Brugada-Syndrom.....	21
1.3.4 Katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie .....	25
1.3.5 ARVC.....	28
2 Material und Methoden .....	32
2.1 Material.....	32
2.1.1 Lösungen & Pulver.....	32
2.1.2 Antibiotikum / Alkohol .....	33
2.1.3 Labormaterialien.....	33
2.2 Versuchsablauf.....	35
2.2.1 Schweineherzen .....	35
2.2.2 Mäuseherzen.....	38

2.2.3	Analyse .....	40
3	Ergebnisse.....	43
3.1	Schweineherzen .....	43
3.1.1	DAPI Färbung .....	43
3.1.2	DNA Gehaltsbestimmung .....	44
3.1.3	PCR.....	45
3.2	Mäuseherzen .....	46
3.2.1	DNA Gehaltsbestimmung .....	46
4	Diskussion .....	48
4.1	Zusammenfassung .....	48
4.2	Interpretation der Methoden und Ergebnisse .....	48
4.3	Limitationen.....	51
4.4	Rückblick & Aussicht.....	52
5	Literaturverzeichnis .....	57

## Abkürzungsverzeichnis

<b>ARVC</b>	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
<b>BrS</b>	Brugada-Syndrom
<b>CPVT</b>	Katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie
<b>DAPI</b>	Diamidinphenylindol
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
<b>DPBS</b>	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
<b>ECM</b>	Extrazelluläre Matrix
<b>EKG</b>	Elektrokardiogramm
<b>Hz</b>	Hertz
<b>ICD</b>	Implantierbarer Kardioverter/Defibrillator
<b>iPS-Zellen</b>	Induzierte pluripotente Stammzellen
<b>JLNS</b>	Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom
<b>Kg</b>	Kilogramm
<b>LQTS</b>	Long QT Syndrom
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mm</b>	Millimeter
<b>mOsm</b>	Milliosmol
<b>ms</b>	Millisekunden
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
<b>PHT</b>	Plötzlicher Herztod
<b>QTc</b>	QT-Zeit corrected (frequenzkorrigierte QT-Zeit)

<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
<b>SQTS</b>	Short-QT-Syndrom
<b>TdP</b>	Torsade de pointes
<b>U</b>	Units
<b>VF</b>	Ventrikuläre Fibrillation (Kammerflimmern)
<b>VT</b>	Ventrikuläre Tachykardie

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Ursachen für einen PHT
Abbildung 2	EKG mit einer QTc Zeit von 612ms
Abbildung 3	EKG bei BrS Typ 1
Abbildung 4	EKG bei ARVC – mit T-Negativierungen über der Vorderwand
Abbildung 5	Red Rocker (Hoefler)
Abbildung 6	Schweineherz nach 168 Stunden in SDS
Abbildung 7	Schweineherz in Triton Lösung
Abbildung 8	Mäuseherz vorher [i] / nachher [ii]
Abbildung 9	Mikroreaktionsgefäß Herz unversehrt / nach Behandlung
Abbildung 10	Arbeitsbank mit Proben und Primern
Abbildung 11	Proben in Agarosegel
Abbildung 12	DAPI Färbung schwarz-weiß eines Schnittpräparats der Kammer
Abbildung 13	Ergebnisse PCR Schweineherzen
Abbildung 14	DNA Gehaltsvergleich der Mäuseherzen

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Schwartz Score
Tabelle 2	Short-QT-Syndrom Score
Tabelle 3	Labormaterialien
Tabelle 4	Programm Thermocycler
Tabelle 5	Ergebnisse Schweineherzen
Tabelle 6	Erste Analyse Mäuseherzen
Tabelle 7	Zweite Analyse Mäuseherzen

# 1 Einleitung

Herz-Kreislaufkrankungen zählen zu den häufigsten Todesursachen europaweit. In der Mehrzahl der Fälle sind ältere Personen davon betroffen. Meistens ist bei der älteren Bevölkerung eine koronare Herzkrankheit oder eine hochgradige dilatative Kardiomyopathie ursächlich für den PHT. In weniger als 10% der Fälle betrifft es jedoch junge Erwachsene, die zuvor scheinbar gesund waren. Unter anderem können folgende Befunde bei einer Autopsie vorkommen: dilatative oder hypertrophe Kardiomyopathie, Entzündungen des Herzmuskelgewebes oder angeborene Anomalien der Koronararterien. Statistisch bleibt nach Abschluss jeder dritten Autopsie unklar, welche Genese den plötzlichen Tod verursacht hat. (1,2).

Weltweit leiden mehr als 25 Millionen Menschen an Herzversagen. Jährlich kommen alleine in den Vereinigten Staaten knapp eine Million Neuerkrankungen hinzu. Neben der massiv eingeschränkten Lebensqualität für PatientInnen, resultieren daraus auch enorme Kosten für das Gesundheitssystem. Mechanische Unterstützungssysteme kommen nur für einen Teil der PatientInnen in Frage. Für die restliche Gruppe ist eine Transplantation der einzige kurative Therapieansatz, der zum jetzigen Zeitpunkt zur Verfügung steht. Hierbei tritt jedoch folgendes Problem auf, dass es viel zu wenige SpenderInnen gibt. Zusätzlich besteht bei jeder Organtransplantation das Risiko der Abstoßung, da es sich um körperfremdes Material handelt (3).

## **1.1 Plötzlicher Herztod**

Der PHT bezieht sich auf den unerwarteten Tod aufgrund einer kardiovaskulären Ursache bei einer Person mit oder ohne vorbestehender Herzerkrankung. Der Tod tritt innerhalb von einer Stunde auf, bedingt durch eine akute klinische Verschlechterung oder es kommt zu einem unerwarteten Tod, der innerhalb von 24 Stunden eintritt.

## **1.2 Epidemiologie**

Die Inzidenz vom PHT in den Vereinigten Staaten beläuft sich auf 180.000 bis 450.000 Fälle pro Jahr. Auf die Gesamtbevölkerung bezogen treten 50 – 100 Fälle pro 100.000 auf. Die Inzidenz steigt markant mit dem Alter an, ungeachtet von Geschlecht oder Herkunft. Die Inzidenz für einen 75-jährigen Mann ist acht Mal höher als bei einem 50-jährigen Mann. In allen Altersgruppen weisen Frauen eine niedrigere Inzidenz als Männer auf.(4)

Die Prävalenz für das angeborene Long-QT-Syndrom (LQTS) liegt bei 1:2000.(5)

## **1.3 Primär elektrische Herzerkrankungen**

Durch Veränderungen im Erbgut kann es zu kardialen Veränderungen kommen. Man kann diese Gruppe in zwei Subgruppen unterteilen. Zur ersten Gruppe zählen Erkrankungen, die mit morphologischen Veränderungen einhergehen, wie beispielsweise Kardiomyopathien oder arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC). Die andere Untergruppe umfasst Erkrankungen, bei denen keine morphologischen Auffälligkeiten bei einer Autopsie beschrieben werden. In diesen Fällen werden maligne Herzrhythmusstörungen bedingt durch Strukturänderungen auf molekularer Ebene, als Ursache angenommen. Hierzu zählen zum Beispiel das Brugada-Syndrom (BrS), LQTS, Short-QT-Syndrom (SQTS) und Katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardien (CPVT). (1)

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf Ionenkanalerkrankungen und deren Auswirkung auf das Reizleitungssystem und die Funktion des Herzens. Als Brücke zu den strukturellen Ursachen wird die ARVC behandelt. Es sind verhältnismäßig wenige davon betroffen, jedoch umfasst diese Gruppe vor allem Kinder und junge Erwachsene, bei denen zuvor meist keine Erkrankung am Herzen diagnostiziert wurde.

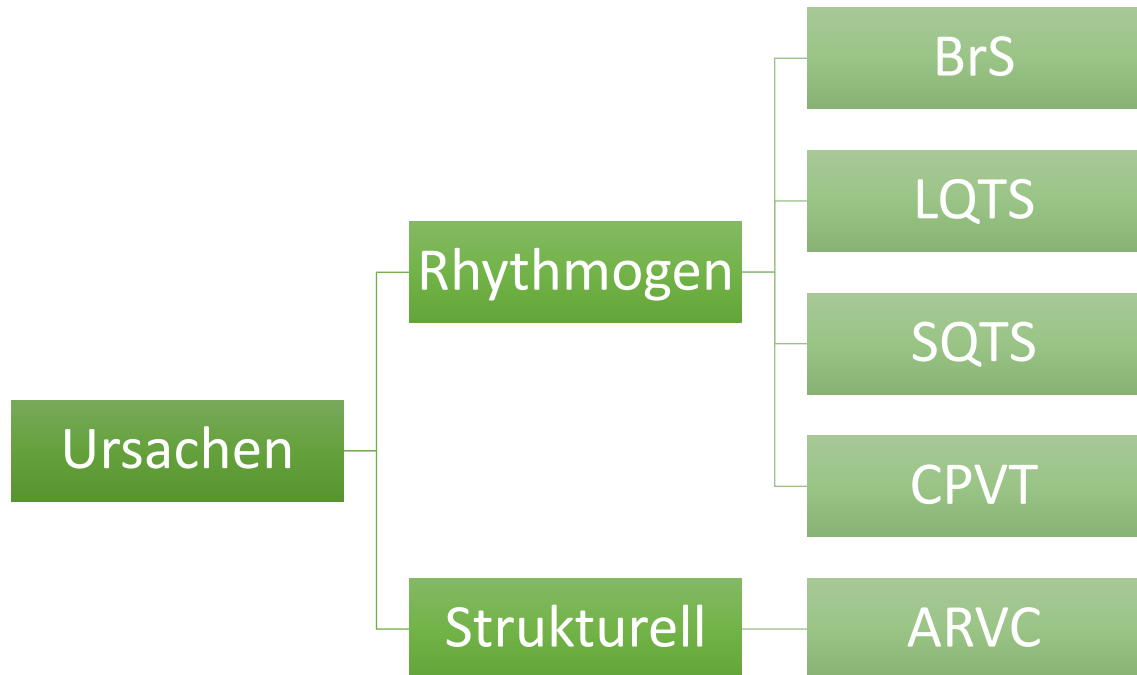


Abbildung 1 Ursachen für einen PHT (eigene Darstellung)

### **1.3.1 Long-QT-Syndrom**

Das LQTS ist eine potenziell lebensbedrohliche kardiale Arrhythmie, bei der es zu einer Verzögerung der Repolarisation der Erregungsleitung kommt. Dies führt zu einer abnormen QT-Zeit und erhöht das Risiko einer Torsade de pointes (TdP) Tachykardie und kann gegebenenfalls einen plötzlichen Herztod als Folge haben.(6)

Eine besondere Form ist das Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom (JLNS). Hier kommt es zu einer Kombination aus LQTS und Innenohrschwerhörigkeit. Ein paar Jahre nach dieser Publikation berichteten die Pädiater Romano und Ward von Familien, bei denen gehäuft QT-Verlängerungen, Synkopen und PHT auftraten. In diesem Fall konnte jedoch keine Innenohrschwerhörigkeit festgestellt werden. Diese Form der Erkrankung war häufiger als das JLNS und wurde nach seinen Entdeckern als Romano-Ward-Syndrom bezeichnet.(7)

#### **1.3.1.1 Klinik**

In vielen Fällen ist eine Synkope die Erstmanifestation der Erkrankung. Selten kommt es primär zu einer malignen Herzrhythmusstörung mit einem Herzstillstand. Abhängig vom Subtyp treten unterschiedliche Trigger in den Vordergrund. Beim LQT1 treten die Symptome während physischer Belastung oder emotionalem Stress auf. Typisch für LQT2 ist das Läuten eines Weckers. Es ist wichtig, eine richtige Diagnose zu stellen, um eine passende Therapie einleiten zu können. Eine mögliche Fehldiagnose wäre Epilepsie, da im Rahmen einer TdP-Tachykardie generalisierte Krampfanfälle auftreten können, bedingt durch einen zerebralen Sauerstoffmangel. Einen Sonderfall stellt LQT3 dar, weil diese PatientInnen überwiegend in Ruhephasen oder im Schlaf symptomatisch werden. Hinweise sind also rezidivierende Synkopen, häufige Palpitationen oder Krämpfe, wenn kein Krampfleiden bekannt ist.(8)

#### **1.3.1.2 Diagnose**

Charakteristisch für die Erkrankung ist das Auftreten einer verlängerten frequenzkorrigierten QT-Zeit (QTc). In einem 12-Kanal-Elektrokardiogramm (EKG) werden folgende Werte als verlängert angesehen: Männer größer 470 Millisekunden (ms) und Frauen größer 480ms in Abwesenheit von strukturellen Herzerkrankungen und nicht Vorhandensein einer sekundären Ursache für eine QT-Verlängerung. Es besteht ein erhöhtes Risiko für Synkopen, Krämpfe und einen plötzlichen Herztod. Jedoch weisen zwischen 10% und 40% genetische Muster eines LQTS auf, zeigen im EKG jedoch eine

der Norm entsprechende QT-Dauer. Sowohl Eigen- als auch Familienanamnese können in Zusammenhang mit einem EKG Hinweise auf die Erkrankung liefern. Hierbei hat sich die Anwendung des Schwartz Scores (siehe Tabelle 1) als hilfreich herausgestellt. Bei diesem Score werden EKG, Familienanamnese und klinische Beschwerden des Betroffenen zusammengeführt und anschließend bewertet.(5)

### Schwartz Score

Parameter			Punkte
<b>EKG</b>	QTc	≥480ms	3
		=460-479ms	2
		=450-459ms (bei Männern)	1
		≥480ms vier Minuten nach Belastung	1
	TdP		2
	T-Wellen-Alternans		1
	T-Wellen Kerbungen in drei Ableitungen		1
	Niedrige Herzfrequenz		0.5
<b>Patientengeschichte</b>	Synkope	Stressinduziert	2
		Ohne Stress	1
	Angeborene Taubheit		0.5
<b>Familien-Anamnese</b>	Familienmitglied mit gesichertem LQTS		1
	Unerklärlicher PHT < 30 Jahre in der Familie		0.5

Tabelle 1 (adaptiert aus dem Englischen nach Schwartz et al.)

Anmerkung: In Abwesenheit von Medikamenten, welche die QT-Zeit beeinflussen. Bezüglich Familiengeschichte: Für das gleiche Familienmitglied dürfen nicht beide Punkte zusammengezählt werden. QTc wird nach der Bazett-Formel berechnet.

### Bewertung

≤ 1 Punkt – geringe Wahrscheinlichkeit für ein LQTS.

1.5 – 3 Punkte – mittlere Wahrscheinlichkeit für ein LQTS.

≥ 3.5 Punkte – sehr hohe Wahrscheinlichkeit für ein LQTS.(9)

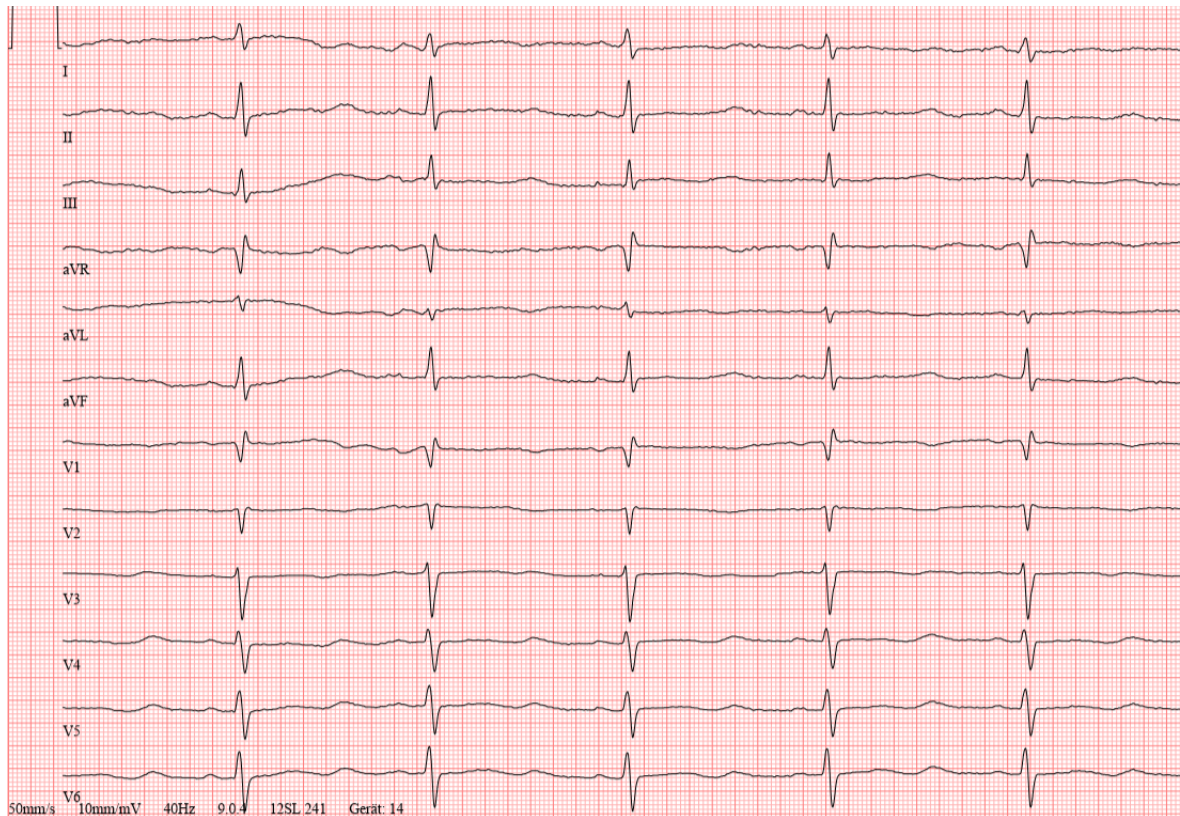


Abbildung 2 EKG mit einer QTc Zeit von 612ms (eigene Darstellung)

### 1.3.1.3 Mechanismus

Das LQTS ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung. Es können sowohl einzelne Mutationen in einem Genlokus, als auch viele Mutationen in unterschiedlichen Genen auftreten. Komplexe Mutationen weisen eine längere QT Zeit als einzelne Genmutationen auf.

Im Anschluss werden die Typen eins bis drei behandelt.

- LQTS1

Hier kommt es zu einer Mutation im *KCNQ1* Gen und es betrifft 40% der kongenital erworbenen QT-Syndrome. Bei Gesunden entsteht hier ein Protein im endoplasmatischen Retikulum, das im Anschluss in die Kardiomyozyten eingebaut wird. Dort ist es für den langsamen Repolarisationsstrom zuständig, besser bekannt als  $I_{Ks}$ . Durch eine Punktmutation oder Frameshift kommt es zu einer Verlangsamung der Repolarisationsdauer, so entsteht im EKG eine verlängerte QT-Dauer. Bedingt durch die verlängerte Repolarisationsdauer sind Träger dieser Mutation anfälliger für Reizleitungsstörungen.

- LQTS2  
Diese Mutation tritt mit einer ähnlichen Häufigkeit wie LQTS1 auf. Bei Typ 2 handelt es sich um eine Mutation im *KCNH2* Gen. Diese kodiert die alpha Untereinheit des Kalium-Einwärtsgleichrichters. Durch das veränderte Gen kommt es zu einer reduzierten Ionenkanalfunktion, die wiederum zu einer verlängerten QT-Dauer führt. Im Unterschied zu Typ 1 ist hier der schnelle Repolarisationsstrom beeinträchtigt kurz IKr.
- LQTS3  
Mutationsort ist in diesem Fall das *SCN5A* Gen. Dieses Gen codiert einen spannungsabhängigen Natriumkanal. Es kommt zu einer erhöhten Transportleistung des Natriumkanals mit konsekutiver Verlängerung der QT-Dauer. Männliche Personen werden im Vergleich zu weiblichen viel früher symptomatisch.(10)

#### **1.3.1.4 Therapie**

Die Standardtherapie erfolgt mittels oraler Einnahme von Betablockern. Mit dieser Maßnahme können Events signifikant reduziert werden. Wiederkehrende Ereignisse unter Therapie kommen bei PatientInnen, die eine niedrige Compliance haben, vor. Mittel der Wahl bei den Subtypen LQT1 und LQT2 ist Propranolol. Am effektivsten wirken Betablocker beim LQT1, da hier die adrenerge Stimulation am ausgeprägtesten ist. Abhängig vom Genotyp gibt es spezielle additive Möglichkeiten. Beim LQT2 kann eine orale Einnahme von Kalium indiziert sein, da der genetische Defekt sehr sensibel auf den Kaliumspiegel reagiert. Angestrebt werden in solch einem Fall hoch normale Kaliumwerte. Eine weitere Therapieoption ist das Einsetzen eines implantierbaren Kardioverter/Defibrillators (ICD). Diese Option soll jedoch HochrisikopatientInnen vorbehalten werden. Dazu zählen: Personen mit überlebtem Herzstillstand, rezidivierende Synkopen und bei Vorkommen vom JLNS. (8)

### **1.3.2 Short-QT-Syndrom**

Das SQTS ist eine seltene vererbliche Ionenkanalerkrankung, deren Kennzeichen eine verkürzte QT-Zeit ist. Sowohl Kalium als auch Calciumkanäle können ursächlich für die Veränderung des Aktionspotentials am Herzen sein. Diagnostisches Mittel der Wahl ist das EKG. Durch die verkürzte QT-Zeit besteht eine erhöhte Gefahr für das Auftreten von Vorhofflimmern, Kammertachykardien oder im schlimmsten Fall einem PHT. Außer den genetischen Dispositionen kommen noch weitere Ursachen für ein kurzes QT-Intervall in Frage. Hierzu zählen hohe Calciumwerte im Blut, eine hohe Herzfrequenz, Übersäuerung des Blutes oder hohe Katecholaminspiegel.(11)

#### **1.3.2.1 Klinik**

In über 40% der Fälle ist der Herzstillstand die Erstmanifestation eines SQTS. Ein weiteres häufiges Symptom sind Palpitationen. Ungefähr ein Drittel der Fälle weisen diese auf. In einem Viertel der Fälle sind entweder Synkopen oder Vorhofflimmern das beschriebene Erstsymptom. Es gibt zahlreiche Auslöser für eine symptomatische Episode dieser Erkrankung. Dazu zählen laute Geräusche in Ruhephasen, während sportlicher Aktivität oder in Routinetätigkeiten im Alltag.(12)

#### **1.3.2.2 Diagnose**

Als Diagnostiktool steht das EKG zur Verfügung. Nach den europäischen Leitlinien für Kardiologie von 2015 muss die QTc-Zeit  $\leq 340\text{ms}$  sein. Des Weiteren kann ein SQTS in Betracht gezogen werden, wenn die QT-Zeit  $\leq 360\text{ms}$  ist und eine oder mehrere der folgenden Konstellationen auftritt: bekannte Mutation, SQTS in der Familie, PHT unter 40 Jahren in der Familie und ein überlebtes Kammerflimmern (VF) oder ventrikuläre Tachykardie bei einem strukturell gesunden Herz. Sollte der Verdacht eines SQTS bestehen, muss ein Ruhe-EKG mit zwölf Ableitungen angefertigt werden. Um die Intervalle exakt bestimmen zu können, sollte die Herzfrequenz 80 Schläge pro Minute nicht überschreiten. Eine besondere Herausforderung stellen in diesem Fall Kleinkinder dar, weil sie physiologischerweise auch in Ruhe eine Herzfrequenz über 100 Schläge pro Minute haben.(13)

SQTS Diagnostik	Punkte
<b>QTc Intervall in ms</b>	
<370ms	1
<350ms	2
<330ms	3
Intervall J-Punkt zur T-Welle <120ms (Ableitung mit der höchsten Amplitude)	1
<b>Patientengeschichte</b>	
Überlebter Herzstillstand in der Anamnese	2
Dokumentierte polymorphe ventrikuläre Tachykardie (VT) oder VF	2
Unerklärliche Synkopen	1
Vorhofflimmern	1
<b>Familienanamnese</b>	
Erst- oder zweitgradiger Verwandter mit hoher Wahrscheinlichkeit für ein SQTS	2
Erst- oder zweitgradiger Verwandter mit negativer Autopsie bei PHT	1
Plötzlicher Kindstod	1
<b>Genotyp</b>	
Genotyp positiv	2
Mutation mit unbestimmter Aussagekraft in einem verdächtigen Gen	1

Tabelle 2 (adaptiert aus dem Englischen nach Gollob et al.)

#### Bewertung

≤ 2 Punkte – geringe Wahrscheinlichkeit

3 Punkte – mittlere Wahrscheinlichkeit

≥ 4 Punkte – hohe Wahrscheinlichkeit für ein SQTS(14)

### 1.3.2.3 Mechanismus

Im Vergleich zum LQTS ist das SQTS weniger gut erforscht. Ein charakteristisches Merkmal ist, dass es zu einer verkürzten Repolarisationsdauer kommt, die als Folge eine erhöhte Bereitschaft für kreisende Erregungen aufweist.(15)

Eine tragende Rolle scheint auch die chemische Verbindung Carnitin zu spielen. In einer kleinen Fallserie kann gezeigt werden, dass bei einem systemischen Mangel die Gabe von

Carnitin zu einem Verschwinden des EKG Musters führt. Bestätigt wird diese Hypothese durch Tierversuche an Mäusen. Das erste Gen, das mit dem SQTS in Verbindung gebracht worden ist, war *KCNH2*, ein spannungsabhängiger Kaliumkanal. Jahre später sind schon in sechs verschiedenen Genen Veränderungen nachgewiesen worden, die für die Erkrankung in Frage kommen. Die Mutationen des Kaliumkanals führen zu einer Steigerung des Ionenflusses im Herzen. Die Folge davon ist, dass das Aktionspotential kürzer wird und wie oben beschrieben anfälliger für Rhythmusstörungen. Neben den Kaliumkanälen können auch Calciumkanäle davon betroffen sein. Ein Beispiel hierfür wäre *CACNB2*, ein spannungsabhängiger Calciumkanal.(13)

#### **1.3.2.4 Therapie**

So wie bei anderen Ionenkanalerkrankungen gibt es auch hier zwei verschiedene Möglichkeiten, zum einen den Einbau eines ICD und zum anderen eine medikamentöse Behandlung. Den Defibrillator sollten PatientInnen erhalten, die einen PHT überlebt haben oder dokumentierte anhaltende VT aufweisen. Ein Nachteil eines ICD ist, dass es durch die Konstellation im EKG von einer prominenten T-Welle kurz nach der R-Zacke zu einer Fehlinterpretation eines kurzen R-Zacken Intervalls kommen kann und somit vermehrt inadäquate Schocks auftreten können. Die zweite Therapieoption kann mittels entsprechender Antiarrhythmika erfolgen. Entweder wird diese Therapie primär eingesetzt oder als Überbrückung bis zur Implantation eines Defibrillators. In Studien konnte gezeigt werden, dass sich Hydroquinidin am besten eignet und die QT-Zeit bis zum Normwert verlängern kann. Klasse 1c und Klasse 3 Antiarrhythmika bringen nicht den gewünschten Erfolg. Der Wirkmechanismus der Quinidine beruht auf einer Blockierung der Natriumkanäle und einer Verlängerung des Aktionspotentials der Herzmuskelzellen. Vorhofflimmern tritt häufig auf und kann mit Propafenon behandelt werden. Abschließend muss jedoch betont werden, dass die Datenlage zur medikamentösen Therapie schlecht ist und nur sehr geringe Fallzahlen vorliegen.(16)

### **1.3.3 Brugada-Syndrom**

Das BrS ist eine erblich bedingte Ionenkanalerkrankung mit einem erhöhten Risiko für VF oder PHT bei einem strukturell gesunden Herzen. Die Diagnose erfolgt mittels EKG, hier tritt ein spezifisches Muster in den Brustwandableitungen auf. Die Prävalenz variiert unter verschiedenen Ethnien, betrifft jedoch häufig Männer. Die Therapie erfolgt über den Einbau eines ICD. Ein neuerer Therapieansatz ist die Katheterablation. Mehrere Gene sind identifiziert, die größte Bedeutung hat hier das Gen *SCN5A*. Die Erstbeschreibung der Erkrankung erfolgte 1992. In den letzten Jahrzehnten gab es einen wesentlichen Fortschritt im Verständnis der genetischen Mechanismen, der Elektrophysiologie, der Diagnostik und der Therapie.(17)

#### **1.3.3.1 Klinik**

Das BrS manifestiert sich häufig zwischen dem dritten und vierten Lebensjahrzent. Das Syndrom ist jedoch schon bei wenige Tage alten Säuglingen und Greisen erstmals diagnostiziert worden. Die höchste Prävalenz liegt in Südostasien vor, hier betrifft es mehr als fünf pro 10000 Einwohner. Die Mehrzahl der Betroffenen ist asymptomatisch. Die Diagnose erfolgt häufig zufällig im Rahmen einer Routineuntersuchung. Eine kleine Gruppe leidet jedoch an nächtlicher unregelmäßiger Atmung, Synkopen oder Palpitation. Die maximale Ausprägung wäre VF oder ein PHT. Ein Fünftel der BrS PatientInnen entwickelt außerdem supraventrikuläre Tachykardien, Vorhofflattern, Vorhofflimmern, oder Präexzitationssyndrome wie zum Beispiel das Wolff-Parkinson-White-Syndrom. Weiters kann eine kreisende Erregungen um den AV-Knoten vorkommen.(18)

#### **1.3.3.2 Diagnose**

Die Diagnosestellung erfolgt durch den speziellen EKG Befund einer ST-Hebung in den rechtspräkordialen Brustwandableitungen V1-V3 plus ein zusätzliches Kriterium von den folgenden: eine Synkope der Person selbst oder von einem Familienmitglied, Kammerarrhythmien oder EKG Hinweise bei einem Familienmitglied. Sowohl EKG Befund als auch klinische Merkmale sind wichtig für den Beweis eines BrS. Zwei verschiedene Muster einer ST-Hebung werden beschrieben: Beim klassischen Brugada Typ 1 EKG zeigt sich eine gewölbte ST-Hebung  $\geq 2\text{mm}$  in Kombination mit einer invertierten T-Welle. Typ 2 stellt eine Kombination aus den ursprünglichen Typen zwei und drei dar. Hierbei ist die ST-Strecke  $\geq 2\text{mm}$  sattelförmig gehoben, wobei die Hebung wieder Richtung isoelektrischer Linie abfällt, aber mindestens 5mm über der Grundlinie

bleibt und danach in eine positive oder biphasische T-Welle übergeht. Die Diagnose für den Typ 1 stellt man, wenn die oben beschriebene EKG Veränderung spontan oder nach Gabe eines Natriumkanalblockers in zumindest einer rechtspräkardialen Ableitung nachgewiesen wird. Für den Typ 2 gilt, dass mehr als eine rechtspräkardiale Ableitung betroffen ist und es nach Gabe eines Natriumkanalblockers zu einer Konversion zu Typ 1 kommt plus eines der folgenden Symptome vorliegt:

1. Dokumentiertes VF
2. Polymorphe VT
3. PHT bei einem unter 45-jährigen Familienmitglied
4. EKG Befund Typ 1 eines Familienmitglieds
5. Induzierbares VF während einer elektrophysiologischen Untersuchung
6. Unklare Synkope, bei der es Hinweise auf eine Tachyarrhythmie gibt
7. Nächtliche agonale Atmung

Folgende Differentialdiagnosen können in Frage kommen: Hypothermie, atypischer Rechtsschenkelblock, Perikarditis, Myokardinfarkt, Aortendissektion, Pulmonalarterienembolie, arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie, Hyperkaliämie oder Hyperkalzämie.(19)

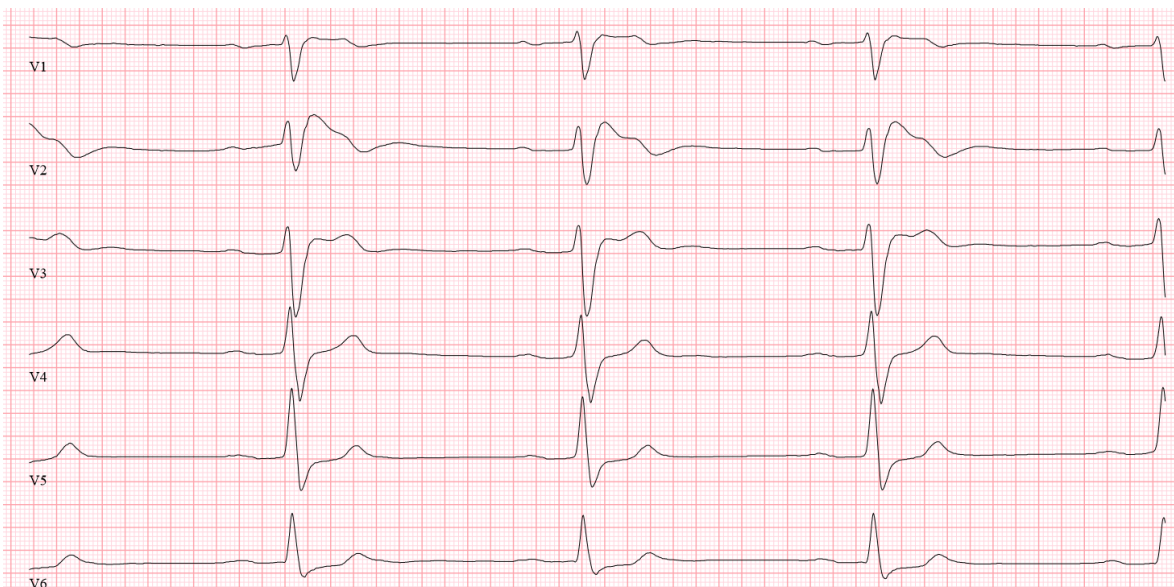


Abbildung 3 EKG bei BrS Typ 1 (eigene Darstellung)

### 1.3.3.3 Mechanismus

Charakteristisch für das BrS sind ST-Strecken Hebungen in den rechts präkordialen Ableitungen. Der genaue Mechanismus ist zum derzeitigen Wissensstand noch nicht vollständig geklärt. Folgende zwei Mechanismen scheinen eine Rolle zu spielen: In der ersten Hypothese wird als Auslöser der transmurale spannungsabhängige Gradient zwischen dem rechten Epikard und Endokard vermutet. Dieses Ungleichgewicht in der Repolarisationsphase führt demnach zu einer ST-Hebung im EKG. Die zweite Hypothese basiert auf einer verlangsamten Leitung im rechtsventrikulären Ausflusstrakt. Regional bedingte Unterschiede in der Leitungsgeschwindigkeit werden durch einen verlangsamten Natriumstrom zusätzlich verschlimmert und können damit ein Trigger für Exzitation sein. BrS ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung. Bei Familien kommt es gehäuft zu einer unvollständigen Penetranz, außerdem kann die Erkrankung in zwei Dritteln der Fälle sporadisch entstehen. Die erste genetische Mutation wurde am *SCN5A* Gen entdeckt. Zurzeit gibt es ungefähr 300 Mutationen, die in unterschiedlichen Genen lokalisiert sind. Neben Natriumkanälen sind auch Kalium- sowie Kalziumkanäle betroffen. Ungeachtet der hohen Zahl an Mutationsstellen, kann in nur einem Drittel der BrS PatientInnen ein genetischer Grund bestimmt werden. Von dieser Gruppe hat jeder Dritte eine Mutation im *SCN5A* Gen. Demzufolge kann in zwei Dritteln der Fälle keine genetische Ursache identifiziert werden. Möglicherweise führen mehrere Faktoren zu der geringen Trefferrate bei genetischen Untersuchungen. So könnte die Mutation zum Beispiel auf einem unbekanntem Locus sitzen. Epigenetische Veränderungen während des Lebenszyklus werden mit dem BrS genauso in Verbindung gebracht. Eine Bradykardie oder vagale Stimulation kann zu einer EKG Dynamik führen und somit verstärkte ST-Hebungen in den präkordialen Ableitungen zeigen. Körpertemperatur und Hormone sind weitere regulierende Faktoren bei einem BrS. Es ist bekannt, dass febrile Zustände das Risiko für eine Arrhythmie erhöhen.(20)

### 1.3.3.4 Therapie

Leitlinienkonform sollte eine ICD Implantation erfolgen, wenn PatientInnen einen Herzstillstand bei einem BrS überlebt haben oder anhaltende Kammertachykardien aufgezeichnet werden konnten. Des Weiteren kann die Implantation angedacht werden, wenn PatientInnen mit BrS Synkopen erleiden, bei denen eine Kammertachykardie als Ursache vermutet wird. Bei fehlenden Symptomen soll kein ICD zum Einsatz kommen. Die Begründung liegt in der niedrigen Komplikationsrate bei asymptomatischen

PatientInnen im Vergleich zu den möglichen Komplikationen nach einem ICD Einbau. Sowohl inadäquate Schocks als auch Ableitungsfehler werden beschrieben. Das Erfassen der EKG Zacken wird durch eine hohe T-Welle erschwert, dieses Problem führt zu einer weiteren Zunahme von inadäquaten Schocks. Ziel einer pharmakologischen Therapie ist die Normalisierung des Aktionspotentials, um arrhythmogene Events zu verhindern. Die medikamentöse Behandlung erfolgt, wenn eine akute Rhythmusstörung behandelt werden soll, als Prävention bei PatientInnen die einen ICD implantiert bekommen haben und inadäquate Schocks erleiden oder als Alternative bei Kontraindikation für die Implantation. Quinidine gehören zur Gruppe der Klasse 1a Antiarrhythmika und werden bei einem gesicherten BrS eingesetzt. Durch die Blockierung der Natriumkanäle sinkt die Erregbarkeit des Herzens. Quinidine werden in der Regel gut vertragen und führen in über 80% der Fälle zu einer Rhythmuskontrolle. Eine Einschränkung in der Therapie stellt die Verfügbarkeit des Medikaments dar, weil viele Mediziner keinen oder nur erschwerten Zugang zu Quinidine haben. Disopyramide gehören zur gleichen Gruppe wie Quinidine und werden zurzeit vor allem bei Kammertachykardien bei BrS eingesetzt. Noch in der Testphase befinden sich Phosphodiesterasehemmer. Diese Medikamentengruppe führt über mehrere Schritte zu einer homogenen Ausbreitung des Aktionspotentials. Damit sollten vor allem kreisende Erregungen im Herzen unterdrückt werden. Bepridil ist ein Kalziumkanalblocker, der bei Angina Pectoris Symptomen angewendet wird und potenziell VF verhindern kann. Folgende Medikamente eignen sich nicht zur Therapie: Amiodaron und Betablocker. Keinesfalls sollten Ajmalin, Procainamid, Flecainid, Propafenon und Pilsicainide angewendet werden, da diese Medikamente kardiale Arrhythmien begünstigen können. Zusammenfassend kann man sagen, dass alle PatientInnen mit passender Indikation einen ICD erhalten sollen. Für alle anderen stehen verschieden Substanzklassen zur Verfügung, wobei Quinidine die größte Bedeutung haben.(21)

### **1.3.4 Katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie**

Hierbei handelt sich um eine Ionenkanalerkrankung ohne Hinweis auf eine strukturelle Herzerkrankung. Charakteristisch für die Erkrankung ist ein normales Ruhe-EKG, jedoch können Kammertachykardien oder VF nach emotionalem Stress oder sportlicher Betätigung auftreten. CPVT wird bei Kindern, Jugendlichen und jungen Erwachsenen beobachtet. Selten ist die Erkrankung die Ursache für einen plötzlichen Kindstod. In einem Viertel der Fälle von symptomatischen PatientInnen sind normale Tagesaktivitäten der Auslöser für eine Rhythmusstörung.(22)

Die Inzidenz wird mit 1:10000 angegeben.(23)

#### **1.3.4.1 Klinik**

Das Leitsymptom ist eine belastungsinduzierte Synkope. In einem Drittel der Fälle ist jedoch ein Herzstillstand die Erstmanifestation der Erkrankung. Wie in der Einleitung erwähnt, findet man keine strukturellen Veränderungen und im Ruhe-EKG findet sich kein sicherer Hinweis auf das Vorhandensein einer CPVT. Bei einem Fünftel der Fälle kann eine Sinusbradykardie beobachtet werden. In einem Mausmodell kann dieser Mechanismus dargestellt werden und dabei kann gezeigt werden, dass es in Erregungszellen zu einem Verlust von Calcium kommt, dies führt in weiterer Folge zu einer Verlangsamung der Herzfrequenz. In einigen Fällen treten im EKG Vorhofflimmern oder eine Sinusknotenstörung auf. Bei einer Belastungsuntersuchung treten zu Beginn monomorphe ventrikuläre Extrasystolen auf. Bei Steigerung der Intensität folgt ein Bigeminus mit anschließenden Kammerarrhythmien. In der Regel verschwinden die EKG Veränderungen nach Belastungsende. Das Auftreten von bidirektionalen Kammertachykardien ist ein dringender Hinweis auf eine CPVT. Bei dieser speziellen Form einer Tachykardie kommt es von Schlag zu Schlag zu einer Achsendrehung um 180 Grad. Eine Digitalisintoxikation und eine spezielle Form des LQTS, nämlich das Andersen-Tawil Syndrom, können diese spezielle Achsendrehung ebenso bedingen.(24)

### **1.3.4.2 Diagnose**

Folgende diagnostische Kriterien sind laut Heart Rhythm Society wegweisend für die Diagnose:

- 1) Die Diagnose kann gestellt werden bei: strukturell normalem Herz und Herzkranzgefäßen, unauffälligem EKG, bei Auftreten von stress- oder katecholamininduzierten bidirektionalen Kammertachykardien, ventrikulären Extrasystolen oder Kammertachykardien bei Personen unter 40 Jahren.
- 2) Die Diagnose erfolgt bei Nachweis einer bekannten Mutation.
- 3) CPVT kann diagnostiziert werden, wenn ein Familienmitglied betroffen ist, ein strukturell gesundes Herz vorliegt und gleichzeitig belastungsinduziert bidirektionale Kammertachykardien oder polymorphe ventrikuläre Extrasystolen auftreten.
- 4) Bei einer jungen Person mit ungeklärter Synkope, unklarem Krampfgeschehen oder plötzlichem Herzstillstand/PHT.

Folgende Erkrankungen soll man Differentialdiagnostisch in Betracht ziehen: LQTS mit normaler QT-Zeit, hypertrophe Kardiomyopathien, isolierte Koronargefäßanomalien und ARVC.(22)

### **1.3.4.3 Mechanismus**

Der Hauptmechanismus ist eine Störung des Ryanodin-Rezeptors vom Subtyp 2, der in Herzmuskelzellen vorkommt. Hierbei handelt es sich um ein großes Protein, das in der Wand des sarkoplasmatischen Retikulums exprimiert wird. Es gibt zurzeit mehrere Versuche, den exakten pathogenetischen Mechanismus zu erklären. Eine häufig genannte Hypothese ist, dass es durch eine Mutation zu einem abgeschwächten Verschlussmechanismus des Ryanodin-Rezeptors kommt und damit zum Verlust von Calcium in der Diastole. Eine weitere Hypothese besagt, dass es durch einen Speicherüberschuss an Calcium zu einer vermehrten Ausschüttung kommt.

Es gibt zahlreiche Subtypen der Erkrankung. Der häufigste Typ von CPVT wird durch eine Abnormalität im Ryanodin-Rezeptor verursacht und ist für mehr als die Hälfte der Fälle verantwortlich. Er wird als CPVT1 bezeichnet. Der Subtyp 2 beruht auf einer genetischen Änderung im Calsequestrin-2 Protein der Herzmuskelzellen.(23)

#### 1.3.4.4 Therapie

CPVT PatientInnen sollen kein anstrengendes Training absolvieren oder Wettkampfsport betreiben. Es ist außerdem äußerst wichtig, dass verschriebene Medikamente exakt nach Verordnung eingenommen werden, da unerwartete kardiale Events vor allem bei fehlender Compliance auftreten. In erster Linie wird ein Betablocker in der maximal verträglichen Dosis empfohlen. Um die Effektivität des verordneten Medikaments zu testen, gilt die Empfehlung, in regelmäßigen Abständen einen Belastungstest durchzuführen. Der nicht selektive Betablocker Nadolol setzte sich gegen andere Betablocker hinsichtlich der Effektivität durch. Eine mögliche Erklärung für die Überlegenheit ist, dass Nadolol eine stärkere negative Chronotropie im Vergleich zu anderen Betablockern aufweist. Daraus resultiert eine niedrigere Schlagfrequenz. Ein weiterer Vorteil ist die lange Halbwertszeit, daher muss Nadolol nur einmal pro Tag eingenommen werden. Der große Nachteil ist, dass das Präparat nicht in jedem Land verfügbar ist. Eine gute Alternative stellt in dem Fall Propranolol dar. Wenn es zu einem Therapieversagen unter alleiniger Betablockergabe kommt, dann bietet sich die zusätzliche Gabe von Flecainid, einem Klasse 1c Antiarrhythmikum, an. Die Effektivität von Flecainid kann erst nach fünf Tagen überprüft werden, da der therapeutische Spiegel nur langsam erreicht wird. Sollte die medikamentöse Therapie nicht in Frage kommen, stehen noch zwei weitere Therapieverfahren zur Verfügung. Durch eine Operation kann ein Teil des sympathischen Nervenstrangs abgelöst werden und eine Überstimulation verhindert werden. Hierbei wird die Hauptversorgung des Herzens mit Noradrenalin unterbrochen. Eine mögliche Komplikation der Operation ist das Horner Syndrom. PatientInnen, die einen Herzstillstand überlebt haben, rezidivierende Synkopen erleiden oder trotz optimaler medikamentöser Behandlung VT erleiden, kommen für eine ICD Implantation in Frage. Ein ICD hat jedoch einige Nachteile. Ein Beispiel hierfür ist, dass sowohl adäquate, als auch inadäquate Schocks durch Stress und Schmerzen sehr hohe Katecholaminspiegel im Blut hervorrufen und so ein elektrischer Sturm ausgelöst werden kann. Noch dazu hängt die Erfolgchance eines Schocks vom zugrunde liegenden Rhythmus ab. VF konnte häufig determiniert werden, bei polymorphen ventrikulären Tachykardien waren die Schocks häufig nicht erfolgreich. In Zukunft spielt die Gentherapie sicher eine große Rolle. Hier versucht man, die veränderten Defekte durch eine Wildtyp DNA zu ersetzen.(24)

### **1.3.5 ARVC**

ARVC, auch bekannt als arrhythmogene rechtsventrikuläre Dysplasie, ist eine seltene kardiovaskuläre Erkrankung, bei der es gehäuft zu VT kommen kann. Die Erkrankung zeigt eine erhöhte Prävalenz bei jungen Leuten und Sportlern. Fontaine beschreibt als erstes die Epsilon Welle als einen speziellen Hinweis im EKG, der auf diese Form der Kardiomyopathie hinweisen kann. ARVC kann klinisch stumm verlaufen oder zu einem PHT führen. Ursächlich für die Erkrankung ist eine pathologische Einlagerung von Fett- und Bindegewebe im rechten Ventrikel.(25)

#### **1.3.5.1 Klinik**

In vielen Fällen liegt das Manifestationsalter der Erkrankung zwischen der zweiten und vierten Lebensdekade. Klassischerweise treten Symptome wie Synkopen, Brustschmerzen oder symptomatische Arrhythmien auf. Die Maximalmalausprägung ist eine Manifestation mit einem primären Herzstillstand als Symptom. In einem Drittel der Fälle treten Symptome erstmals vor dem 30. Geburtstag auf. Leistungssport geht mit einem zweifach erhöhten Risiko für ventrikuläre Arrhythmien einher, außerdem kommt es zu einer früheren Manifestation im Vergleich zu wenig aktiven PatientInnen. Unter Umständen kann es zu intrakardialen Thrombosen kommen. Im Vergleich zur Normalpopulation treten Vorhofrhythmusstörungen häufiger auf. Die Rhythmusstörung wird mit dem männlichen Geschlecht und höherem Alter in Verbindung gebracht.(26)

#### **1.3.5.2 Diagnose**

Die Diagnose einer ARVC erfordert den histologischen Nachweis von Bindegewebe-/Fetteinlagerungen, dazu ist eine Biopsie aus dem Herzen notwendig. Durch die segmentale Einlagerung kann es jedoch schwierig sein, einen Nachweis zu liefern. Die häufigste Biopsielokalisation ist das Kammerseptum, jedoch erfolgt der Befall des Septums erst bei weit fortgeschrittener Erkrankung. 1994 wurden diagnostische Kriterien erstellt, bei der Haupt- und Nebenkriterien berücksichtigt werden. Dazu zählen struktureller Bau, Genetik, EKG, histologische Merkmale und Arrhythmien. Neun von zehn PatientInnen zeigen Auffälligkeiten im EKG. Mehr als die Hälfte zeigt eine T-Wellen Inversion (siehe Abbildung 4) in den vorderen Brustwandableitungen in Abwesenheit eines Rechtsschenkelblocks. Jedoch darf man nicht vergessen, dass dies auch eine Normvariante sein kann und die Möglichkeit besteht, dass der Befund keine pathologische Bedeutung hat. Eine Epsilon Welle hingegen ist ein spezifischer Befund für das Vorhandensein einer

ARVC. Die Welle ist Ausdruck einer späten rechtsventrikulären Depolarisation und tritt am Ende des QRS-Komplexes auf. Dieser Befund kann in einem Drittel der Fälle mit ARVC gestellt werden. Weitere Hinweise auf die Erkrankung können bei einer Echokardiographie gesammelt werden. Auffällige Befunde in diesem Fall sind: dilatierter rechter Ventrikel, dilatierter rechtsventrikulärer Ausflusstrakt, Aneurysmen, eine dichte Trabekelbildung im Bereich der rechtsventrikulären Spitze sowie Dyskinesien. Magnetresonanztomographie und eine Computertomographie komplementieren die Diagnostik. Rechtsventrikuläre Angiographie ist aufgrund der hohen Komplikationsraten obsolet.(27)

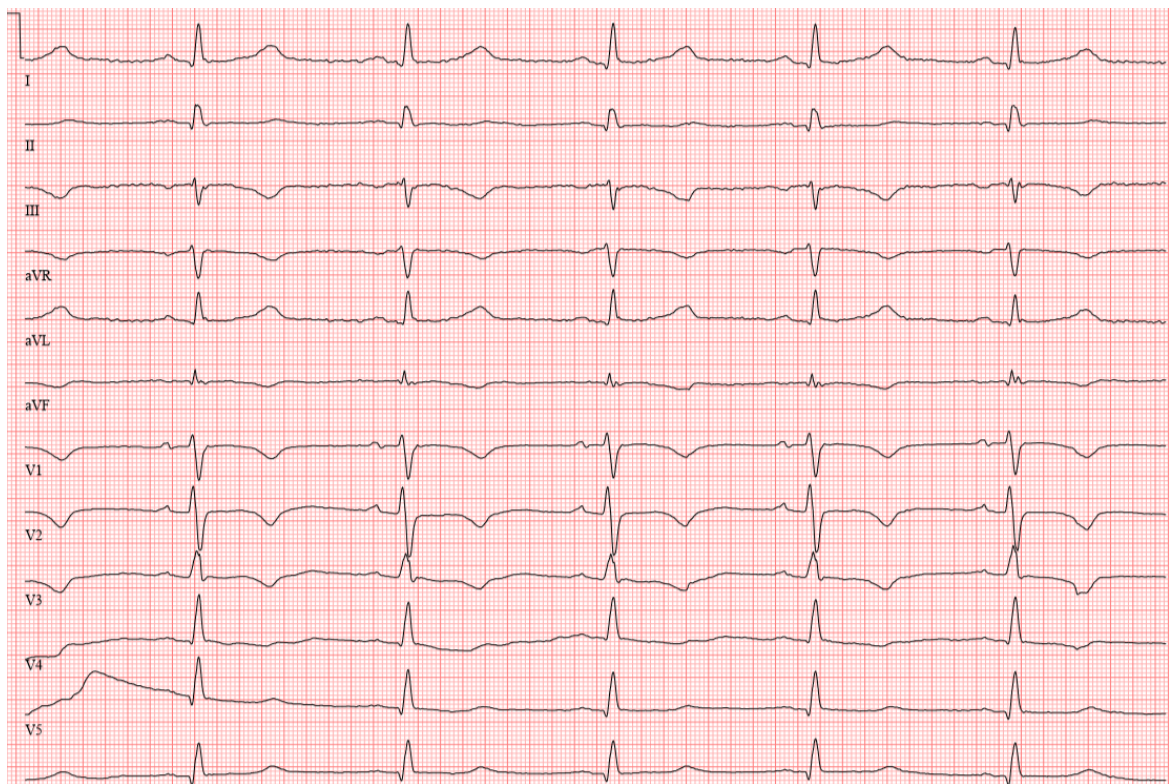


Abbildung 4 EKG bei ARVC – mit T-Negativierungen über der Vorderwand (eigene Darstellung)

### **1.3.5.3 Mechanismus**

ARVC wird als eine Erkrankung der Desmosomen betrachtet. Desmosomen befinden sich nicht nur im Herzen, sondern auch in der Haut. Sie tragen zum einen zur Stabilisierung zwischen den Zellen bei und zum anderen spielen sie eine Schlüsselrolle in der intrazellulären und interzellulären Signalübermittlung. Ursächlich für ARVC ist in den meisten Fällen eine Mutation in Genen, die desmosomale Proteine codieren. Durch die veränderte Desmosomenstruktur können vermehrt lockere Zellverbände auftreten. Die Schäden entstehen vor allem unter mechanischem Stress und Überbelastung. Zusätzlich kommt es über einen komplexen pathogenetischen Weg zu einer gesteigerten Expression von Genen, die zu einer Anreicherung von Fett- und Bindegewebszellen im Myokard führt. In der Regel handelt es bei ARVC um einen autosomal dominanten Erbgang. Äußerst selten handelt es sich um einen rezessiven Erbgang. Führend in der Pathologie der Erkrankung ist der fortschreitende Untergang von Myokardzellen mit darauffolgendem Einbau von Bindegewebe- und Fettzellen in das Myokard. Der Umbau startet im Epikard und breitet sich in der Folge in das Endokard aus und führt schlussendlich zu einer Wandverschmälerung, vor allem des rechten Ventrikels. Zusätzlich begünstigt der Umbau die Entstehung von aneurysmatischen Veränderungen. Der Gewebsumbau betrifft auch Erregungsleitungszellen und hat zur Folge, dass die Weiterleitung verzögert wird und dadurch Arrhythmien begünstigt werden. Zuerst ging man davon aus, dass sich der Umbau auf die rechte Herzhälfte beschränkt. Heute wird die Erkrankung dagegen als genetisch verursachte Kardiomyopathie angesehen, bei der es auch zu einer Beteiligung der linken Herzhälfte kommt.(28)

### **1.3.5.4 Therapie**

Das Therapiemanagement zielt darauf ab, möglichst früh präventiv letale Events zu verhindern. Vor allem aber sollen HochrisikopatientInnen rasch identifiziert und einer Behandlung zugeführt werden. Zurzeit ist der Einbau eines ICD die einzig bewiesene Intervention, welche die Mortalität senkt. Andere Therapiemöglichkeiten, wie Betablocker, Ablation, Transplantation oder Lebensstiländerung können zu einer weiteren Verbesserung der Lebensqualität führen.

Trotzdem ist einer der wichtigsten Schritte, dass die Betroffenen über Ursachen, Symptome, Verlauf und Risiken aufgeklärt werden. So sollten beispielsweise Wettkampfsportarten vermieden werden, da dadurch Arrhythmien begünstigt werden und die Erkrankung schneller fortschreiten kann. Um den kardialen Stress so niedrig wie

möglich zu halten, soll man bei sportlicher Betätigung auf eine niedrige Intensität Wert legen. Betablocker können hierbei Abhilfe schaffen. Sie senken nämlich die Herzfrequenz und den Sauerstoffverbrauch des Herzens. Es hat sich herausgestellt, dass Sotalol im Vergleich zu Natriumkanalblockern wie Verapamil und Amiodaron überlegen ist. Amiodaron sollte in der Therapie gänzlich vermieden werden, da die Gefahr für unerwünschte Nebenwirkungen zu groß ist. Weiters wird nicht empfohlen, Antiarrhythmika als Monotherapie einzusetzen, sondern nur als unterstützende Therapie nach ICD Einbau.

ARVC kann mit der Zeit zu einer Herzinsuffizienz führen. Thromboembolische Geschehen sind eine der Komplikationen, die damit in Verbindung gebracht werden. Bei einer symptomatischen Herzinsuffizienz können deshalb Diuretika, Betablocker und Inhibitoren des Angiotensin-konvertierenden Enzyms verordnet werden. Radiofrequenzablation zählt ebenso zu den unterstützenden Therapieoptionen. Indikation hierfür wäre ein häufiges Auslösen des ICD aufgrund wiederholter ventrikulärer Tachykardien. Bezüglich einer Herztransplantation fehlen systemische Untersuchungen. Außerdem sind die Fallzahlen sehr gering. Die Therapieoption soll den letzten Ausweg darstellen und erst nach Ausschöpfen aller Möglichkeiten in Betracht gezogen werden.(25)

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Der erste Teil der Arbeit befasste sich mit Schweinherzen. Diese wurden nach Rücksprache mit der Fleischerei am Vorabend entnommen und am darauffolgenden Tag abgeholt.

Für die weitere Versuchsreihe wurden Mäuseherzen verwendet, diese wurden von der biomedizinischen Forschungsbank bereitgestellt. Wichtig für die Versuchsreihe war, dass die Herzen bei der Entnahme nicht beschädigt wurden.

#### 2.1.1 Lösungen & Pulver

- Gibco<sup>®</sup> DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) (Life Technologies)  
Hierbei handelt es sich um eine ausgeglichene Salzlösung ohne Kalzium und Magnesium. Die Osmolalität liegt zwischen 270 -300 mOsm/kg. Die Lösung bietet eine vielseitige Anwendung in Zellkulturen. Dazu gehört auch das Auswaschen von Zellen, sowie der Transport von Zellen und Gewebe.
  
- SDS (sodium dodecyl sulfate) (Carl Roth)  
SDS ist ein anionisches Tensid, das als Detergens beispielsweise Waschmittel oder Zahnpasta beigefügt wird. Zu den Eigenschaften zählt eine stark denaturierende Wirkung auf Eiweiße. Der Wirkmechanismus beruht auf der Tatsache, dass unter Anwesenheit von SDS nicht-kovalente Bindungen der Eiweißmoleküle unterbrochen und dadurch zerstört werden. SDS liegt als feines weißes Pulver vor, das gut in Wasser löslich ist.
  
- Triton<sup>™</sup> X-100 (Sigma-Aldrich)  
Hierbei handelt es um das nichtionische Tensid Octxinol-9. Triton X-100 hat im Vergleich zum SDS die Eigenschaft, Proteine nicht zu denaturieren. Jedoch kann es Proteine aus einer Membran herauslösen. Es liegt in einem flüssig-zähen Aggregatzustand vor und ist in Wasser mit Hilfe eines Rührknochens gut löslich.

- Ampuwa® Wasser für Spülzwecke (Fresenius Kabi)  
Es diente sowohl als Trägerlösung für das SDS als auch für Triton X-100. Des Weiteren wurde es zur zwischenzeitlichen Waschung der Herzen verwendet, um Restbestände von anderen Lösungen zu entfernen.

### 2.1.2 Antibiotikum / Alkohol

Zum Schutz vor einer unerwünschten Keimbesiedlung wurde bei den Schweineherzen Gibco® Pen Strep (10,000 Units (U)/Milliliter(ml) Penicillin und 10,000 Mikrogramm ( $\mu\text{g}$ )/ml Streptomycin) (Life Technologies) verwendet.

Es erfolgte nach dem ersten Versuch ein Wechsel auf Gibco® Antibiotic-Antimycotic (10,000 U/ml Penicillin, 10,000  $\mu\text{g}$ /ml Streptomycin und 25  $\mu\text{g}$ /ml Amphotericin B) (Life Technologies), da hier zusätzlich Amphotericin B beigemischt ist, besteht ein Schutz vor einem Pilzbefall.

Beim zweiten Versuch mit Schweineherzen wurde zusätzlich sechsendneunzig prozentiger Alkohol verwendet.

### 2.1.3 Labormaterialien

Die Herzen wurden je nach Größe in Bechergläser zwischen 100 ml bis 2000 ml eingelegt und mit Alufolie abgedeckt. Um die Flüssigkeiten dauerhaft leicht zu durchmischen, wurden die Bechergläser auf eine Rüttelplatte Red Rocker (Hofer) platziert (siehe Abbildung 5).



Abbildung 5 Red Rocker (Hofer) (Eigene Darstellung)

Weitere Labormaterialien sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Accu-jet pro (Brand)
Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf)
Varioklav (SM-Labortechnik)
Parafilm (Pechiney)
Laborwaage (Mettler Toledo)
Objektträger (Thermo Scientific)
Mikroskop Eclipse TE2000-E (Nikon)
Magnetrührer RCT basic (Ika)
Becherglas (Schott Duran)
<b>Sonstige Materialien</b>
Sterile Schere
Skalpell
Deckglas
Glastrichter
Sterile Löffel

*Tabelle 3      Labormaterialien*

## **2.2 Versuchsablauf**

Für den Versuch wurde ein bereits bestehendes Protokoll von Guyett et al.(3) modifiziert und an die Laborgegebenheiten angepasst. Bei diesem Versuch wurden Menschenherzen verwendet und anschließend auf noch vorhandene menschliche DNA untersucht. Der Originalversuch wurde in einem sterilen Reaktor durchgeführt. Um einen ausreichenden Perfusionsdruck zu erreichen sind zusätzlich Gefäße kanüliert und mit einem Computersystem gekoppelt worden. So konnten genaue Daten bezüglich Perfusionsdruck im Ventrikel, aber auch in den Koronargefäßen erhoben werden. Zur Entzellung wurden folgende Lösungen verwendet: Am Anfang wurde eine Stunde eine Lösung aus DPBS und Heparin verwendet. Es folgten 168 Stunden in einer einprozentigen SDS Lösung, gefolgt von 24 Stunden in deionisiertem Wasser. Zur Proteinlösung diente einprozentiges Triton X-100 über 24 Stunden. Im Auswaschprozess kam wiederum DPBS über 168 Stunden zum Einsatz. Die Lagerung erfolgte unter vier Grad Celsius in einer Mischung aus DPBS und Antibiotic-Antimycotic .(3)

### **2.2.1 Schweineherzen**

Die erste Versuchsreihe umfasste zwei Schweineherzen mit einem Gewicht von 450 Gramm je Herz. Sowohl das angegebene Gewicht als auch die anatomischen Verhältnisse kommen einem menschlichen Herzen sehr nahe.

Die Herzen wurden früh morgens vom Schlachthof abgeholt und im Labor grob gereinigt. Um das Blut aus den Herzen zu entfernen, mussten diese über 20 Minuten unter fließendem Wasser gespült und ausgepresst werden. Am Ende dieses Vorgangs waren die Kammern, Vorhöfe und Gefäße frei von Blut und Thromben. Zur besseren anatomischen Orientierung wurde zunächst ein Herz schichtweise von apikal nach basal aufgeschnitten, um die einzelnen Ebenen darzustellen und im Verlauf des Versuches bessere Aufschlüsse über den Vorgang zu bekommen.

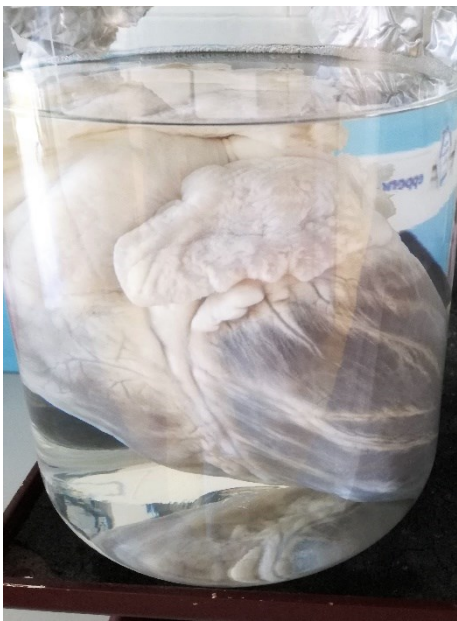
Nun konnten sie in je ein 2000 ml Becherglas mit einer einprozentigen SDS Lösung überführt werden. Um eine Durchmischung der Flüssigkeiten zu erreichen, wurden die Glasgefäße auf die Rüttelplatte gestellt und mit Alufolie abgedeckt. Es wurde zu Beginn auf ein Antibiotikum verzichtet. Der weitere Plan war, dass die Schweineherzen zumindest 168 Stunden in der Flüssigkeit bleiben, aber bereits nach 72 Stunden war eine so starke Verwesung eingetreten, sodass beide Bechergläser aus dem Labor entfernt werden mussten.

Für die zweite Versuchsreihe kamen erneut zwei Schweineherzen zum Einsatz. Der Ablauf bis zur Einlage in die Flüssigkeit entsprach dem aus der ersten Versuchsreihe. Da während der Versuche keine sterilen Bedingungen herrschten, musste zusätzlich zum SDS ein Antibiotikum hinzugefügt werden, in diesem Fall wurde Pen-Strep verwendet. Nach einer weiteren Literaturrecherche wurde außerdem die SDS Konzentration von ein auf drei Prozent erhöht. In dieser Lösung sollten die Herzen so wie im ersten Versuch 168 Stunden verbleiben. Nach 48 Stunden kam es jedoch zu einer leichten Trübung der Flüssigkeit. Die Herzen wurden aus der Flüssigkeit entnommen und mit Wasser für fünf Minuten abgespült. Zusätzlich zum SDS und Pen-Strep wurde nun auch ein 96 prozentiger Alkohol beigemischt. Pro Liter kamen 150 ml Alkohol hinzu. In den folgenden Tagen waren die Bechergläser auf der Rüttelplatte und wurden täglich makroskopisch beurteilt und mittels Geruchsprobe auf einen bakteriellen Befall untersucht. Nach 168 Stunden erfolgte ein erneuter Wechsel der Flüssigkeit, jedoch erfolgte ein Antibiotikawechsel auf Antibiotic-Antimycotic, um auch gegen Pilzbefall einen Schutz bieten zu können, auch hier wurde wieder Alkohol hinzugefügt. Grund für die verlängerte Zeitspanne in SDS war, dass makroskopisch vor allem bei der Herzkammer noch deutliche Muskelanteile sichtbar waren (siehe Abbildung 6).



*Abbildung 6 Schweineherz nach 168 Stunden in SDS (eigene Darstellung)*

Nach exakt 312 Stunden erfolgte der Wechsel von SDS zu einer einprozentigen Triton X-100 Lösung (Abbildung 7). 48 Stunden später sind die Herzen aus dem Becherglas entnommen und für die weitere Konservierung vorbereitet worden. Zuerst erfolgte ein ausgiebiger Waschprozess mit DPBS, wodurch Lösungsrückstände entfernt werden konnten. Zur Konservierung wurde jeweils ein Liter DPBS, 150 ml Alkohol und zehn ml Antibiotic-Antimycotic in ein Becherglas gegeben und die Herzen eingelegt. Einen Tag später wurde die Abdeckung aus Alufolie durch Parafilm ersetzt, um zu verhindern, dass Flüssigkeit verdunstet. Abschließend wurden die zwei Bechergläser in den Kühlschrank transportiert, um dort bei vier Grad Celsius bis zur Analyse gelagert zu werden.



*Abbildung 7 Schweineherz in Triton Lösung (eigene Darstellung)*

### 2.2.2 Mäuseherzen

Für diese Versuchsreihe stellte die biomedizinische Forschungsbank dankenderweise acht Mäuseherzen zur Verfügung. Im Vergleich zu Schweinherzen wiegen Mäuseherzen nur zwischen 0.1-0.2 Gramm, bei einer Größe von vier mal fünf Millimeter. Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen von den ersten zwei Versuchsreihen, wurde das Protokoll minimal modifiziert.

Der Ablauf der Säuberung unterschied sich nicht, da abermals DPBS und gereinigtes Wasser verwendet wurde, um Blutreste und Verschmutzungen zu entfernen. Für die erste Testreihe sind vier Herzen ausgewählt worden. Durch die geringe Größe konnte ein 250 ml Becherglas verwendet werden. In dieses kam eine Lösung aus dreiprozentigem SDS und 2,5 ml Antibiotic-Antimycotic, für alle folgenden Versuche wurde die gleiche Konzentration vom Antibiotikum verwendet, welche daher nicht mehr separat erwähnt wird. Zur dauerhaften Durchmischung sind die Bechergläser wiederum auf der Rüttelplatte (Abbildung 5) platziert worden. In den kommenden Tagen erfolgte stets eine makroskopische Beurteilung sowie eine Geruchsprobe. Nach 96 Stunden nahm das Mäuseherz eine milchige bis klare Farbe an. Nach exakt 168 Stunden erfolgte nach einer kurzen Waschphase in DPBS die Überstellung der Herzen in die einprozentige Triton Lösung. Aufgrund der zähen Konsistenz von Triton X-100 musste die Lösung zuvor über 15 Minuten mit dem Rührknochen vermischt werden.

24 Stunden später kamen die vier dezellularisierten n Herzen in eine DPBS Lösung inklusive Antibiotikum, um für die weitere Analysephase gelagert zu werden. Um den makroskopischen Unterschied darzustellen, sind vor Prozessbeginn und am Ende Fotos angefertigt worden (siehe Abbildung 8).

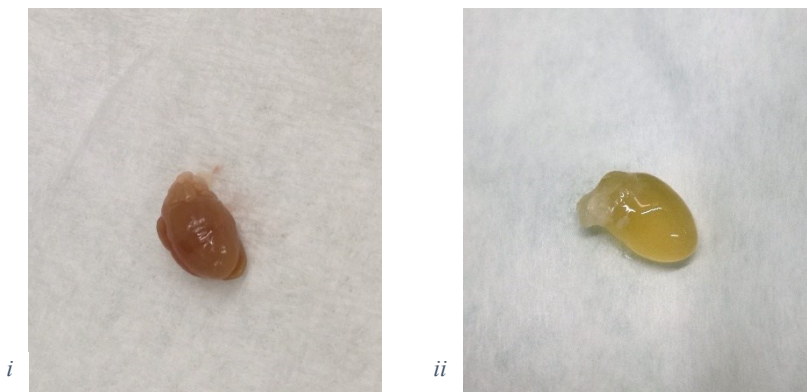


Abbildung 8 Mäuseherz vorher [i] / nachher [ii] (eigene Darstellung)

Für den zweiten Teil blieben vier weitere Herzen übrig, jedoch wurde eines in einer Kochsalzlösung für einen späteren Vergleich des DNA Gehalts konserviert.

Diese drei verbleibenden Herzen wurden in den gleichen Lösungen wie oben beschrieben eingelegt. Der einzige Unterschied war eine verlängerte Einlagezeit in SDS. Alle drei Herzen waren insgesamt über 336 Stunden in SDS eingelegt. Dadurch konnte später ein DNA Vergleich mit den ersten Mäuseherzen durchgeführt werden. Im Waschprozess sowie in der Triton Lösung bestand keinerlei Unterschied zu den ersten vier Herzen.

### 2.2.3 Analyse

Aus einem Schweineherz wurden mittels eines Skalpells hochdünne Stücke auf zwei Objektträger befördert und im Anschluss mit einem Fluoreszenzfarbstoff bedeckt. Als Farbstoff diente DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid) (Carl Roth). Als Bedeckung wurde ein Deckglas auf die Proben gelegt. Die Analyse erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop.

Die DNA Gehaltsbestimmung erfolgte sowohl bei den Schweineherzen als auch bei den Mäuseherzen. Für die Gehaltsbestimmung wurden die Herzen, nach einer ausgiebigen Waschphase mit DPBS, zerkleinert und in ein Mikroreaktionsgefäß überstellt. Vor der Überführung mussten sämtliche Herzen mittels eines sterilen Skalpells zerkleinert werden, um leichter verdaut werden zu können.

Makroskopisch bot sich hier bereits ein großer Unterschied zwischen dem unbehandelten Mäuseherz und jenem Mäuseherz, das nach dem Protokoll dezellularisiert wurde. Das behandelte Herz präsentierte sich farblos bis milchig, wohingegen das unbehandelte eine dunkelrote bis braune Farbe aufwies (siehe Abbildung 9).

Der Verdauungsprozess fand im DNA-Labor auf der Humangenetik statt und wurde dankenderweise unter der Anleitung der zuständigen biomedizinischen Analytikerin durchgeführt. Nach der Zerkleinerung wurde dem Gemisch VWR™ Proteinase K hinzugefügt, damit eine Enzymspaltung stattfinden konnte. Nach ungefähr 24 Stunden waren alle Anteile des Herzens verdaut und nicht mehr sichtbar. Im Anschluss erfolgte die Testung mittels Qubit® Fluorometer 2.0 (Invitrogen), nachdem zuvor eine Standardreihe zum Vergleich angelegt wurde.



Abbildung 9 Mikroreaktionsgefäß Herz unversehrt / Herz nach Behandlung (eigene Darstellung)

Nach der mikroskopischen Beurteilung sowie einer DNA Gehaltsbestimmung der Schweinherzen folgte die Vorbereitung für die PCR Analyse. Zu diesem Zweck mussten vorab spezifische Primer modifiziert und bestellt werden. Folgende zwei Primer wurden für den Versuch verwendet:

a) pig\_MYBPC3 (Myosin bindendes Protein C)

F-Sequenz: 5' ATCTTTGAGTCCATCGGCAC 3'

R-Sequenz: 5' CCAAGGGCCGTGTAATCAAC 3'

b) PERV\_Pol (Porcine endogene Retroviren)

F-Sequenz: 5' CGACTGCCCCAAGGGTTCAA 3'

R-Sequenz: 5' TCTCTCCTGCAAATCTGGGCC 3'

Die Größe des zu erwartenden PCR Amplikons für pig\_MYBPC3 liegt bei 230 Basenpaare und für PERV\_Pol bei 236 Basenpaare.

Insgesamt sind aus den Schweineherzen vier Schnitte entnommen worden, jeweils zwei aus den Vorhöfen und zwei aus den Kammern. Die Proben mussten zu Beginn gewaschen und zerkleinert werden. Zur Verdauung sind pro Mikroreaktionsgefäß 15 Mikroliter( $\mu$ l) Proteinase K hinzugefügt worden. Für die Beschleunigung des Prozesses kam ein Thermo-Rüttler zum Einsatz. Für den PCR Ansatz mussten vier Komponenten in je ein Tube überführt werden:

1. 5 $\mu$ l HotStarTaq<sup>®</sup> Master Mix (Qiagen)
2. 3 $\mu$ l gereinigtes Wasser (Sigma-Aldrich)
3. 1 $\mu$ l Primer
4. 1 $\mu$ l Probe



Abbildung 10 Arbeitsbank mit Proben und Primern (eigene Darstellung)

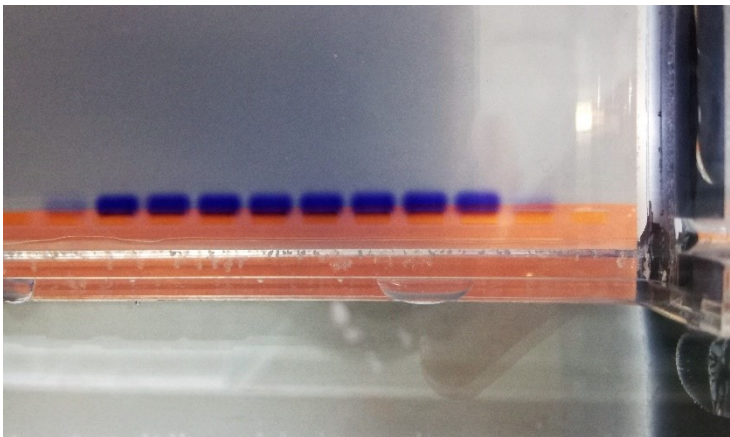
Die acht verschiedenen Tubes waren die nächsten 2,5 Stunden im DNA Engine® Peltier Thermocycler (siehe Tabelle 4).

Temperatur (Grad Celsius)	Zeit (Minuten:Sekunden)	Zyklen
95	15:00	1 Zyklus
95	00:45	35 Zyklen
57	00:30	
72	00:45	
72	10:00	1 Zyklus
6	60:00	1 Zyklus

*Tabelle 4 Programm Thermocycler*

Anschließend konnten die Proben inklusive zwei Standardreihen auf Agarosegel aufgetragen werden (siehe Abbildung 11).

Nachdem die Kammern mit Flüssigkeit gefüllt worden sind, konnte Strom angelegt werden. Die Auswertung erfolgte mittels Biozym® Quantitas DNA Marker, mit einem Größenbereich von 100 Basenpaare bis 1000 Basenpaare. Dies entspricht zehn Banden.



*Abbildung 11 Proben in Agarosegel (eigene Darstellung)*

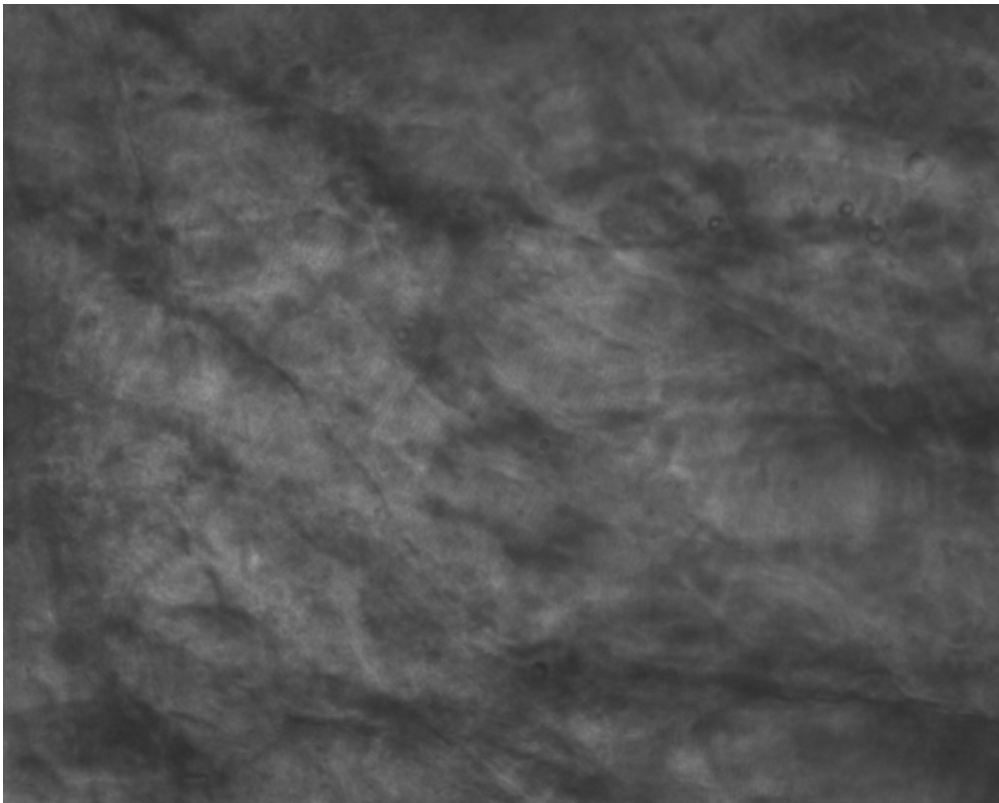
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Schweineherzen

Die Ergebnisse gliedern sich aufgrund der Untersuchungstechnik in drei Teile. Zu Beginn wurden Präparate der Schweineherzen angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. In der DNA Gehaltsbestimmung sind je zwei Proben aus den Vorhöfen und der Kammer untersucht worden. Schlussendlich kann durch die durchgeführte PCR eine exakte Analyse erfolgen.

#### 3.1.1 DAPI Färbung

In der Fluoreszenzmikroskopie konnte kein eindeutiger Nachweis für intakte Zellkerngruppierungen geliefert werden (siehe Abbildung 12). Die Präparate wiesen jedoch kleine Bezirke auf, die sich stärker anfärbten als die Umgebung. Diese Areale können auf Zellreste und Bruchstücke hinweisen. Mikroskopisch konnte kein Unterschied, zwischen den Kammer- und den Vorhofpräparaten beobachtet werden.



*Abbildung 12 DAPI Färbung schwarz-weiß eines Schnittpräparats der Kammer (eigene Darstellung)*

### 3.1.2 DNA Gehaltsbestimmung

Im zweiten Analyseschritt sind vier Proben für die DNA Gehaltsbestimmung vorbereitet worden. Der Unterschied der beiden Proben lag in der Verarbeitung der Schweineherzen. Im Unterschied zur ersten Probe ist die zweite Probe am Beginn des Protokolls zerstückelt worden. Der Grund für diesen Vorgehen war, dass so Klappen und das Endokard makroskopisch besser beurteilt werden konnten. Dadurch konnte der Fortschritt des Entzellungs-Prozesses besser überwacht werden. In der weiteren Verarbeitung und im Messprozess gab es keine Unterschiede der vier Proben.

In der makroskopischen Beurteilung der Schweineherzen war auffallend, dass die muskelschwachen Vorhöfe milchig bis klar zur Geltungen kamen, im Vergleich zu den muskelstarken Kammern, die auch nach der Behandlung rötliche Areale aufwiesen. Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass der reine Diffusionsprozess möglicherweise nicht für die Herzkammer geeignet war.

Sowohl die zwei Proben aus den Kammern als auch die Vorhofproben brachten das Ergebnis, dass die untere Nachweisgrenze des Test-Kit von  $0,01\mu\text{g/ml}$  unterschritten worden ist. Für eine exakte Quantifizierung musste somit eine PCR durchgeführt werden.

Probe	Ergebnis	Einheit
<b>Kammer 1</b>	< 0,01	$\mu\text{g/ml}$
<b>Vorhof 1</b>	< 0,01	$\mu\text{g/ml}$
<b>Kammer 2</b>	< 0,01	$\mu\text{g/ml}$
<b>Vorhof 2</b>	< 0,01	$\mu\text{g/ml}$

Tabelle 5 Ergebnisse Schweineherzen

### 3.1.3 PCR

Im Anschluss erfolgte die Modifikation der spezifischen Primer. Der folgende Analyseschritt dauerte insgesamt 48 Stunden. Die exakte Vorgehensweise kann aus dem Material- und Methodenteil entnommen werden.

Am oberen und unteren Rand befinden sich die beiden Standardreihen. Beide Standards sind exakt aufgetrennt, dies gilt als Beweis für den erfolgreichen Ablauf. Die erste Bande auf der linken Seite des Bildes entspricht 100 Basenpaaren. Das Ergebnis der PCR zeigte einen DNA Nachweis mit einer Größe von 200 Basenpaaren in allen Proben (siehe Abbildung 13). Dies bestätigte das Vorhandensein von Schweine DNA in allen vier Proben.

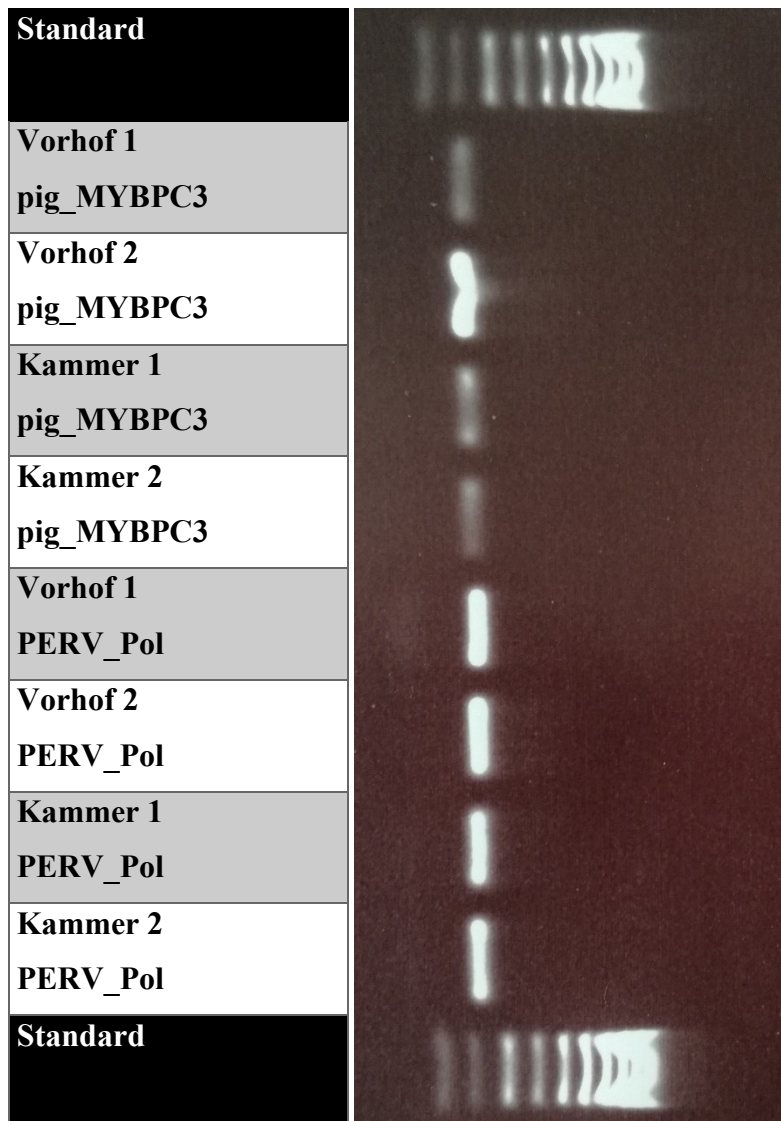


Abbildung 13 Ergebnisse PCR

## 3.2 Mäuseherzen

Im zweiten Ergebnisteil wurden die Mäuseherzen analysiert. Der Messvorgang unterschied sich nicht im Vergleich zu den Schweinherzen. Vor der DNA Vermessung mussten erneut zwei Standards hergestellt werden. Der einzige Unterschied lag in der Verdauungszeit der Herzen. Im Vergleich zu den Schweineherzen waren die Mäuseherzen in einer kürzeren Zeitspanne durch die Protease verdaut.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden ein unbehandeltes und ein behandeltes Mäuseherz analysiert. Makroskopisch erschien das ganze Mäuseherz milchig-klar (siehe Abbildung 8). Sowohl Kammer und Vorhof wiesen keine rötlichen Bezirke mehr auf.

Das unbehandelte Mäuseherz wies eine Gesamt DNA Menge von 5376 ng auf. Aufgrund der großen DNA Menge, war es notwendig, dass die Probe vor dem Messvorgang verdünnt wurde. Das gleiche Messprinzip kam für das behandelte Mäuseherz zum Einsatz. Die Rest DNA Menge nach dem Protokoll war 870,2 ng.

Das Ergebnis entspricht einer Reduktion um 83,8% (siehe Tabelle 5 und Abbildung 14), jedoch konnte in jeder Probe eine Rest DNA Menge nachgewiesen werden.

### 3.2.1 DNA Gehaltsbestimmung

Probe	Ergebnis in ng/ $\mu$ L	Menge in $\mu$ L	Gesamtmenge in ng
<b>Mäuseherz unbehandelt</b>	112	48	<b>5376</b>
<b>Mäuseherz behandelt</b>	91,6	9,5	<b>870,2</b>

Tabelle 6 Erste Analyse Mäuseherzen

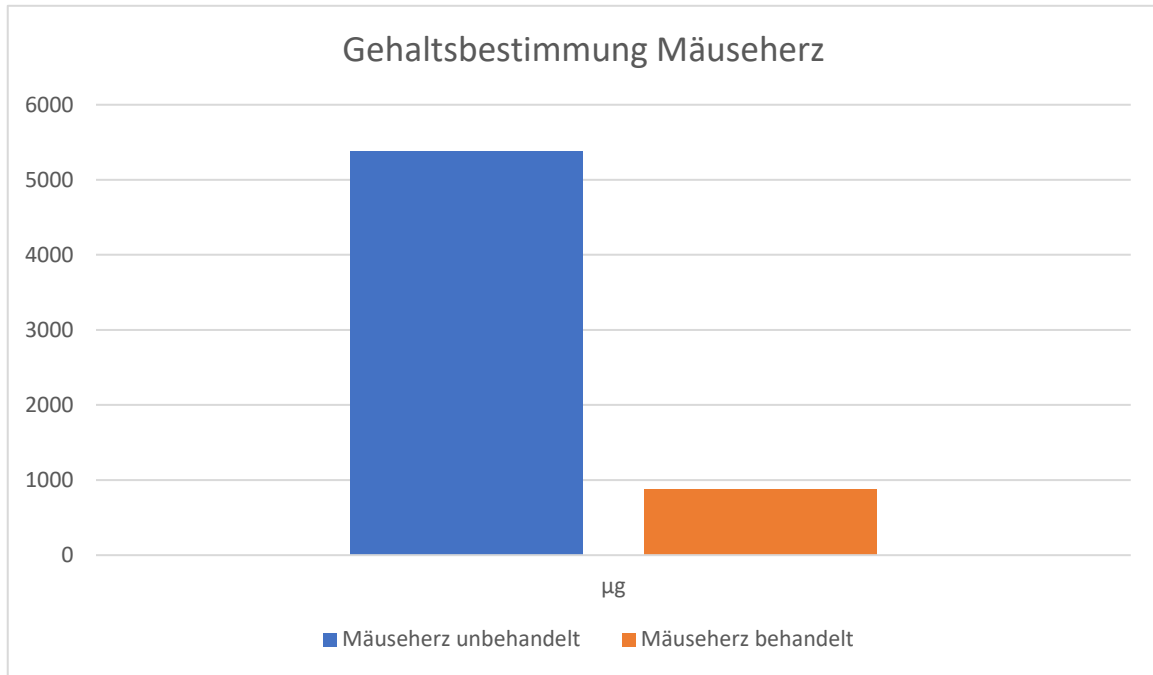


Abbildung 14 DNA Gehaltsvergleich der Mäuseherzen

In der zweiten Testreihe der Mäuseherzen wurden zwei von vier Herzen mit verlängerter Einlagezeit in DPBS analysiert. Nach der Analyse der ersten Mäuseherzen und Vermessung der Rest DNA, war das Ziel eine weitere Reduktion des DNA Gehalts.

Nach der verlängerten Einlagezeit erfolgte erneut eine DNA Gehaltsbestimmung. Makroskopisch konnte keine Farbänderung zum ersten Versuch ausgemacht werden. Auf Basis der bisherigen Vermessungen sollte die DNA Menge somit kleiner als 870,2 ng sein. Das Ergebnis zeigte jedoch das Gegenteil (siehe Tabelle 6). Beide Proben lagen außerhalb des Messbereiches des verwendeten Test Tools.

Probe	Ergebnis in ng/µL
<b>Mäuseherz 1</b>	>10ng/µl
<b>Mäuseherz 2</b>	>10ng/µl

Tabelle 7 Zweite Analyse Mäuseherzen

## **4 Diskussion**

### **4.1 Zusammenfassung**

Ziel dieser Arbeit war eine Versuchsreihe zur Herstellung von extrazellulären Matrices (ECM) tierischen Ursprungs und Analyse des Materials auf residuales Zellmaterial.

Basierend auf der Basis der Arbeit von Guyette et al. (3) ist das

Dezellularisierungsprotokoll an die bestehenden Ressourcen und Möglichkeiten angepasst worden.

Im Anschluss an das Protokoll folgte die Analyse der Gewebstücke auf noch vorhandene DNA Residuen. Abhängig vom tierischen Material kamen unterschiedliche Testtools zum Einsatz. Angewandte Methoden waren: Färbung des Präparats mit fluoreszierendem Farbstoff, Gel-Elektrophorese und DNA Gehaltsbestimmung mittels Qubit.

Basierend auf den Erkenntnissen und Datenanalysen ist das Protokoll modifiziert und erweitert worden. Der Fokus lag dabei stets auf der Herstellung eines DNA freien Gewebestücks.

### **4.2 Interpretation der Methoden und Ergebnisse**

Im Vergleich zur Methodik von Guyette et al.(3) und Sánchez et al.(29) musste der Versuch mit einfacheren Apparaturen und Kontrollsystemen durchgeführt werden. In beiden oben genannten Papers sind die menschlichen Herzen unter sterilen Bedingungen dezellularisiert worden. Durch das geschlossene System war eine Kontamination von außen beinahe nicht möglich.

In beiden Versuchsreihen erfolgte im Anschluss an die Kanülierung die druckkontrollierte Überwachung mittels Monitor. So konnte über Tage hinweg ein konstanter Druck auf das umliegende Gewebe ausgeübt werden. Durch den Druck gelangten die Detergenzien gleichmäßig bis in die muskelstarke linke Kammer. Sánchez et al.(29) beschrieb sehr gut, dass nach drei bis vier Tagen ein makroskopischer Farbverlust auftrat. Der Beginn des Prozesses ist stets bei den Herzanteilen mit dünner Wandstärke eingetreten. So konnte die farbliche Änderungen zuerst an den Gefäßen und wandschwachen Vorhöfen detektiert werden, die Kammeranteile folgen später. Die verwendeten Flüssigkeiten unterschieden sich jedoch nicht. Einzig die Konzentrationen und Verweildauer waren in den Experimenten unterschiedlich.

Schon in meiner ersten Versuchsreihe mit Schweineherzen wurde klar, dass die Keimreduktion und Verunreinigung der Proben einen wesentlichen Bestandteil darstellen. Bereits nach drei Tagen trat eine komplette Verwesung der Proben ein.

Dieses Problem wurde mit der Verwendung von Antibiotic-Antimycotic , höheren SDS Konzentrationen und häufigem Flüssigkeitswechsel umgangen. Wie in den Methoden beschrieben, sind die Bechergläser nur mit Alufolie abgedeckt worden. Durch das offene System bestand natürlich immer die Gefahr einer Kontamination der Proben. Zusätzlich mussten die Herzen für Waschphasen und Flüssigkeitswechsel aus den Gefäßen entnommen werden. Da nicht alle Prozessschritte mit sterilen Instrumenten ausgeführt werden konnten, lag hierin ein weiteres Risiko für eine mögliche Verunreinigung.

In meinem Experiment erfolgte keine Kanülierung der Herzen, somit konnten keine hohen Drücke auf die Kammer ausgeübt werden. Der Druck hing im Wesentlichen nur von dem Umgebungsdruck der Flüssigkeiten ab. Dadurch konnte auch keine dauerhafte Umspülung der Herzen gewährleistet werden. Einen Ausweg stellte die verwendete Rüttelplatte dar. Das Ziel war die Verhinderung einer ruhenden Flüssigkeit beziehungsweise eine geringe Durchmischung der Flüssigkeiten im Becherglas.

Die makroskopischen Veränderungen stimmten mit der Beschreibung von Sánchez PL et al.(29) sehr gut überein. Die Vorhöfe der Mäuseherzen waren bereits nach 48 Stunden milchig bis klar. Die Farbänderung der Kammer dauerte exakt zwei Tage länger.

Guyette et al. (3) verwendete sehr aufwendige und ausführliche Analyseverfahren. Ein wesentlicher Parameter war die Bestimmung noch vorhandener DNA Menge und die Relation zur primär vorhandenen Menge. Folgende Testmarker wurden verwendet: Glykosaminoglykane, Elastin, lösliche und unlösliche Kollagene. In einem weiteren Schritt fand eine immunologische Testung von zahlreichen Cluster of Differentiation Markern statt. Um die Koronargefäße darstellen zu können, erfolgte eine Computertomografie der Gefäße.

Im Unterschied dazu beschränkte sich meine Analyse auf die DNA Gehaltsbestimmung vor und nach Behandlung, beziehungsweise erfolgte bei einer ausgewählten Probe eine DAPI Färbung und bei einer anderen eine PCR.

In der DAPI Färbung des Schweineherzens konnte kein eindeutiger Nachweis intakter Zellkerne geliefert werden, jedoch war die Beurteilung aufgrund der Schnittdicke eingeschränkt. Durch das Fehlen eines Mikrotoms befanden sich so einige Zelllagen übereinander.

In der durchgeführten PCR zeigten alle Proben eine Bande bei 200 Basenpaaren. Dies ist der Beweis für das Vorhandensein einer Rest DNA Menge. Wie im Interpretationsteil der Methoden schon beschrieben, ist es sehr wahrscheinlich, dass der Umgebungsdruck allein nicht ausreicht, sodass die DNA im Probeninnern nicht vollständig entfernt werden kann.

Die Mäuseherzen zeigten hinsichtlich der Funktionalität die beste Reproduzierbarkeit. Der DNA Gehalt der Mäuseherzen konnte bei der ersten Versuchsreihe um 86,3% gesenkt werden. Ott et al. (30) erreicht DNA Mengen von unter 4% in seinem Experiment. Jedoch ist der Aufbau der verwendeten Apparaturen in der Arbeit komplexer und technisch aufwendig. Die Mäuseherzen mit der verlängerten Einlagezeit in DPBS wiesen aus vorerst unklaren Gründen höhere Werte auf. Mögliche Ursachen für dieses unschlüssige Ergebnis ist eine Verunreinigung der Proben oder ein Fehler in der DNA Gehaltsbestimmung.

### **4.3 Limitationen**

Wie bei jeder experimentellen Arbeit gibt es auch bei der vorliegenden gewisse Limitationen und Kritikpunkte, welche die Aussagekraft der Arbeit schmälern. Aufgrund der aufwendigen Aufbereitung und Verarbeitungszeit der Herzen, ist die Fallzahl mit 12 Herzen klein. Die unsterile Arbeitsweise muss natürlich kritisch betrachtet werden, da Verunreinigungen und Keimeinschleppungen dauerhaft möglich sind. Der Versuchsaufbau mit der fehlenden Kanülierung der Gefäße und nicht gegebener Druckkontrolle ist im vorherigen Unterpunkt ausführlich diskutiert worden.

Um eine bessere Vergleichbarkeit zu erzielen, ist es notwendig, dass sämtliche Analysetechniken bei allen Proben angewendet werden. Außerdem muss jede Versuchsreihe auf ihre Reproduzierbarkeit getestet werden. Nur so kann eine Verzerrung des Ergebnisses verhindert werden.

#### **4.4 Rückblick & Aussicht**

Die Notwendigkeit dieses Forschungsbereiches wird deutlich, wenn man sich die Zahl der betroffenen PatientInnen vergegenwärtigt. Knapp 25 Millionen Menschen leiden weltweit unter Herzinsuffizienz und deren Folgen. (3,30)

Daher befassten sich seit einigen Jahren weltweit Forschungsgruppen mit der Thematik ein bioartifizielles Herz herzustellen, um die Problematik der Herzinsuffizienztherapie in den Griff zu bekommen. Ott et al.(30), befasste sich im Jahr 2008 mit der Generierung eines künstlichen Herzens. In ihrer Studie verwendeten sie Rattenherzen, die sie nach der Dezellularisierung mit neonatalen kardialen Zellen oder endothelialen Zellen besiedelten. Anschließend wurden die Herzen für vier Wochen in einen Bioreaktor überführt, dieser simulierte die physiologischen Verhältnisse im Körper. Bereits nach vier Tagen konnte man makroskopisch Kontraktionen beobachten.

Acht Jahre später publizierte Sánchez et al. (29) sein Experiment mit 39 menschlichen Herzen. Etwa zeitgleich präsentierte die Forschungsgruppe rund um Guyette et al. (3) ihr Experiment, das 65 menschliche Herzen inkludiert, die nicht zur Transplantation geeignet waren.

In einer rezenten Arbeit zeigte Blazeski et al. (31) die Möglichkeiten anhand der ARVC gut auf. Es wird mehrmals betont, dass für das Verständnis multizelluläre Verbindungen notwendig sind und die ECM eine tragende Rolle hat. Im Falle der ARVC geht es um genetische Varianten, die zu einem Funktionsdefizit in den Desmosomen führen. In ihrer Versuchsreihe verwendeten sie ein- und mehrschichtige Schnittpräparate aus Schweineherzen. Die Autoren heben den großen Vorteil der Testmöglichkeiten von Schlagkraft, Herzfrequenz, Überleitungsgeschwindigkeit, Aktionspotential und der Tendenz zur Arrhythmiebildung hervor.

Die erste heterotope Transplantation eines Schweineherzen gelang Kitahara et al. (32). Für den Versuch wurden weibliche Schweine mit einem Maximalgewicht von 20kg verwendet. Die Vorbereitung auf die Entnahme fand unter kontrollierten Bedingungen über sieben Wochen statt. Als operativen Zugangsweg wählten sie die mediane Sternotomie. Nach Versorgung der einzelnen Gefäße kam eine kardioplegische Lösung hinzu. Im Anschluss erfolgte die Entnahme aus dem Thorax. Zur Dezellularisierung kamen SDS und Triton X-100 zum Einsatz. Als Sterilisationsmethode verwendeten sie Gammastrahlen. Histologische Schnitte wurden sowohl von unbehandelten, behandelten und transplantierten Herzen angefertigt. Für die neuerliche Besiedelung kamen mesenchymale Schweinestammzellen zum Einsatz. Die Übertragung der Zellen erfolgte entweder mittels Infusion in die Aorta ascendens oder mit direkter Injektion in den linken Ventrikel. Die heterotrope Transplantation mit der Anbindung an die abdominelle Aorta und die untere Hohlvene gelang problemlos. Nach der Transplantation der Herzen, die durch direkte Injektion behandelt wurden, gab es eine kurze Phase, in der die Koronargefäße perfundiert waren. In allen Versuchsreihen konnten histologisch Thrombosen und Entzündungsherde geortet werden.

Der Gerinnungsproblematik bei dezellularisierten Herzen widmete sich Robertson et al. (33). Sein Team beschäftigte sich ausführlich mit der Fragestellung, wie eine Gerinnung nach der Transplantation verhindert werden kann. Selbst unter der Einnahme von Gerinnungshemmern kam es nach erfolgter Transplantation zu einer Thrombenbildung in den Gefäßen. Für ihr Experiment verwendeten sie Rattenherzen. Die Dezellularisierung unterschied sich in den Kernpunkten nicht von den in der Diplomarbeit verwendeten Methoden. Vor der Neubesiedelung mit kardialen Stammzellen sind die Gefäße mit Rattenendothelzellen der Aorta gespült worden. Es kamen drei unterschiedliche Perfusionsvarianten zum Einsatz: eine retrograde Aorta-Perfundierung, eine Spülung des Truncus brachiocephalicus und eine Kombination aus der unteren Hohlvene und des Truncus brachiocephalicus. Der Spülvorgang in dem Bioreaktor dauerte mehrere Tage. Vor der Transplantation der Herzen erfolgte eine ausführliche Analyse inklusive Immunhistochemie. Im Vergleich zu den Herzen, die nicht mit Endothelzellen gespült wurden, wiesen die gespülten einen bis zu achtfach höheren Anstieg an Thrombomodulin auf. Thrombomodulin ist ein wichtiger Regulator in der Gerinnungskaskade und verhindert eine Blutgerinnung. Es stellte sich heraus, dass vor allem die kombinierte Perfusion aus unterer Hohlvene und Truncus brachiocephalicus günstig war. Für in vivo Tests erfolgte

die Transplantation der Herzen in Ratten mit Anastomosierung der Gefäße. Exakt eine Woche später wurde die Explantation durchgeführt, um neuerliche Analysen zu vollziehen. Sowohl histologisch als auch histochemisch konnte gezeigt werden, dass die Gerinnungsaktivierung in den behandelten Herzen geringer war. Eine weitere Erkenntnis war, dass die perfundierten Rattenherzen nach Besiedlung mit neonatalen Stammzellen unter angelegter Spannung höhere Drücke im linken Ventrikel aufwiesen. Somit konnte in vitro eine bessere Kontraktilität nachgewiesen werden.

Neben der Gerinnungsproblematik stellt die Elektrophysiologie und Kontraktilität eine weitere Herausforderung dar. Mit den physiologischen Prozessen beschäftigte sich die Forschungsgruppe rund um Blazenski et al. (34). Aufgrund der Komplexität der biochemischen und biomechanischen Prozesse im Herzen, ergaben sich einige Problemstellungen. Für ihre Versuchsreihen verwendeten sie ECM von Ratten und Schweinen. So wurden Schnittpräparate angefertigt und in einem ersten Schritt dezellularisiert. Aufgrund der dünnen Schnitte war der Prozess nach knapp vier Stunden beendet. Die erneute Besiedlung erfolgte mit neonatalen Zellen. Die Kontraktilitätsmessung wurde nach einem Stimulus mit ein bis fünf Hertz (Hz) durchgeführt. Die Erregungsschwelle lag hier bei etwa zwei Hz. Bei Werten um fünf Hz kam es zu einer Verminderung der Kontraktilität. Einige Schnittpräparate wurden zusätzlich mit Lidocain versehen und im Anschluss elektrisch stimuliert. In den folgenden Tagen wurden täglich Analysen durchgeführt. Bei den Schweinepräparaten konnten zwei Tage nach der Besiedlung koordinierte Kontraktionen detektiert werden. Am siebten Tag nach Besiedlung hatten die Myozyten bereits gut formierte Sarkomere. Zusätzlich war punktuell das Gap Junction Protein Connexin 43 angelegt. Dieses Transmembranprotein ist für den Zell-Zell-Kontakt unabdingbar. Die native ECM enthält zahlreiche Proteine, die wiederum die Myozyten in Hinblick auf Adhäsion, Wachstum und Funktion beeinflussen. Der größte Vorteil der dünnen Slices war, dass sie mittels Mikroskop gut überwacht werden konnten. Abschließend kann man jedoch sagen, dass zur dreidimensionalen Matrix noch einige Hürden überwunden werden müssen.

Einen weiteren Blick in die Zukunft wagt Moser et al. (35) in seiner Publikation. Leber, Lunge, Niere und vor allem das Herz stehen im Fokus der Forschung. Heute gibt es unzählige Methoden, um ein DNA freies Organgerüst herzustellen. Chemische oder enzymatische Detergenzien werden ebenso eingesetzt wie physikalische Methoden, um DNA Material zu entfernen. Ein überlegenes Verfahren für alle Organe steht noch nicht zur Verfügung. Durch residuale DNA Bruchstücke kann es so wie bei einer Allotransplantation zu einer Abstoßungsreaktion kommen. Für die Besiedlung einer ECM gibt es verschiedene Ansatzmöglichkeiten. Jede Zellreihe hat Vor- und Nachteile. Embryonale Stammzellen eignen sich aufgrund ihrer Pluripotenz sehr gut, jedoch gibt es zahlreiche ethische Konflikte in der Verwendung. Eine weitere Option wären induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen). Hierbei handelt sich um umprogrammierte somatische Zellen, die eine gute Verfügbarkeit aufweisen. Die Verwendung in klinischen Studien ist aufgrund der Krebsgefahr eingeschränkt. Es ist bekannt, dass iPS-Zellen zahlreiche Faktoren für die Begünstigung einer Tumorentstehung enthalten. Daher gibt es Bemühungen, iPS-Zellen genetisch umzuprogrammieren, damit das erbliche Risiko minimiert wird.

Die Zellbesiedelung einer ECM am Beispiel von einem Herz beinhaltet die intramurale Zellinjektion und die Gefäßperfusion zur Zelleinschwemmung. Das Problem bei der intramuralen Injektion ist, dass die Zelldichte rund um die Einstichstelle stark abnimmt. Bei einem größeren Organ wären zahlreiche Injektionen notwendig. Ein hohe Anzahl an Einstichen kann jedoch sowohl die ECM als auch die Gefäßabschnitte beschädigen. Ein intaktes Gefäßsystem ist die Grundvoraussetzung, um Thrombosen, Ödeme und hohe Gefäßwiderstände zu verhindern. Der obere Atemweg oder Pulmonalklappen konnten bereits erfolgreich dezellularisiert, mit autologen Stammzellen besiedelt und anschließend transplantiert werden. Interessanterweise zeigten die Organe die Tendenz zum Wachstum und Umbau über eine längere Zeitspanne.

Eine neuartige dreidimensionale Druckvariante zeigte Noor et al. (36) in seiner Arbeit aus dem Frühjahr 2019. Sie fertigten personalisierte kardiale Gewebstücke an, in dem sie eine Biopsie aus dem großen Fettnetz von Menschen und Schweinen entnahmen und im Anschluss in einen zellulären und einen zellfreien Anteil separierten. Die Zellen aus dem zellulären Anteil wurden zu pluripotenten Stammzellen umprogrammiert, mit dem zellfreien Anteil konnte ein spezifisches extrazelluläres Gel produziert werden. Nach der Vermischung der beiden Komponenten war es möglich immun kompatibel

Myozytenpatches zu erstellen. Die Gewebestücke beinhalteten jedoch keine vernetzten Gefäßabschnitte. Die Lösung des Problems war die Herstellung eines zweiten Druckgels, für dieses mussten Endothelzellen umprogrammiert und differenziert werden. Am Ende standen zwei gelartige Druckstoffe zur Verfügung zum einen das spezifische extrazelluläre Gel mit differenzierten Kardiomyozyten zum anderen das Gel mit differenzierten Endothelzellen. Mit dieser speziellen Technik konnten wenige Millimeter (mm) dicke, vaskularisierte und perfundierte Gewebestücke mit einem dreidimensionalen Drucker angefertigt werden. Im nächsten Schritt wurde ein Herz mit einer Länge von 20 mm und einem Durchmesser von 14 mm erfolgreich gedruckt. Aus der Arbeit geht jedoch hervor, dass für größere Organdimensionen eine andere Druckstrategie gewählt werden muss, da das verwendete extrazelluläre Gel nicht für das nötige Gewicht ausgelegt ist.

Abschließend kann man sagen, dass obwohl das Forschungsgebiet noch sehr jung ist, schon viele Prozesse ausgereift sind. Zur vollständigen Herstellung eines funktionsfähigen bioartifiziellen menschlichen Organs sind jedoch noch große Anstrengungen notwendig. Möglich wäre ein Durchbruch in den nächsten zwei Dekaden.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Kaufenstein S, Kiehne N, Neumann T, Pitschner H-F, Bratzke H. Cardiac gene defects can cause sudden cardiac death in young people. *Dtsch Arztebl Int.* 2009;106(4):41–7.
2. Tester D, Ackerman M. The role of molecular autopsy in unexplained sudden cardiac death. [Miscellaneous Article]. *Curr Opin Cardiol* May 2006. 2006;21(3):166–72.
3. Guyette JP, Charest JM, Mills RW, Jank BJ, Moser PT, Gilpin SE, et al. Bioengineering Human Myocardium on Native Extracellular Matrix. *Circ Res.* 2016;118(1):56–72.
4. Deo R, Albert CM. Epidemiology and Genetics of Sudden Cardiac Death. *Circulation.* 2013;125(4):620–37.
5. Giudicessi JR, Ackerman MJ. Genotype- and Phenotype-Guided Management of Congenital Long QT Syndrome. *Curr Probl Cardiol.* 2013;38(10):417–55.
6. Tester DJ, Ackerman MJ. Genetics of Long Qt Syndrome. *Methodist Debaquey Cardiovasc J.* 2014;10(1):29–33.
7. Goldenberg I, Zareba W, Moss AJ. Long QT Syndrome. *Curr Probl Cardiol.* 2008;33(11):629–94.
8. Mizusawa Y, Horie M, Wilde AA. Genetic and Clinical Advances in Congenital Long QT Syndrome. *Circ J.* 2014;78(12):2827–33.
9. Schwartz PJ, Crotti L. QTc behavior during exercise and genetic testing for the long-qt syndrome. *Circulation.* 2011;124(20):2181–4.
10. Bhuiyan ZA, Al-Shahrani S, Al-Aama J, Wilde AAM, Momenah TS. Congenital Long QT Syndrome: An Update and Present Perspective in Saudi Arabia. *Front Pediatr.* 2013;1(November):12–4.
11. Ramalho D, Freitas J. Drug-induced life-threatening arrhythmias and sudden cardiac death: A clinical perspective of long QT, short QT and Brugada syndromes. *Rev Port Cardiol.* 2018;37(5):435–46.
12. Fernández-Falgueras A, Sarquella-Brugada G, Brugada J, Brugada R, Campuzano O. Cardiac Channelopathies and Sudden Death: Recent Clinical and Genetic Advances. *Biology (Basel).* 2017;6(1):7.

13. Pereira R, Campuzano O, Sarquella-Brugada G, Cesar S, Iglesias A, Brugada J, et al. Short QT syndrome in pediatrics. *Clin Res Cardiol.* 2017;106(6):393–400.
14. Providência R, Karim N, Srinivasan N, Honarbakhsh S, Vidigal Ferreira MJ, Gonçalves L, et al. Impact of QTc formulae in the prevalence of short corrected QT interval and impact on probability and diagnosis of short QT syndrome. *Heart.* 2018;104(6):502–8.
15. Tse G, Chan YWF, Keung W, Yan BP. Electrophysiological mechanisms of long and short QT syndromes. *IJC Hear Vasc.* 2017;14:8–13.
16. Rudic B, Schimpf R, Borggreffe M. Short QT Syndrome – Review of Diagnosis and Treatment. *Arrhythmia Electrophysiol Rev.* 2014;3(2):76.
17. Brugada J, Campuzano O, Arbelo E, Sarquella-Brugada G, Brugada R. Present Status of Brugada Syndrome: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol.* 2018;72(9):1046–59.
18. Biphenyls CP. *HHS Public Access.* 2015;91(2):165–71.
19. Sheikh AS, Ranjan K. Brugada syndrome: a review of the literature. *Clin Med (Northfield Il).* 2014;14(5):482–9.
20. Brugada R, Campuzano O, Sarquella-Brugada G, Brugada J, Brugada P. Brugada Syndrome. *Methodist Debakey Cardiovasc J.* 2014;10(1):25–8.
21. Belhassen B, Brodie OT, Michowitz Y. Clinical Review: Drugs and Devices Pharmacological Therapy in Brugada Syndrome. *Arrhythmia Electrophysiol Rev.* 2018;2721(22):135–42.
22. Pérez-Riera AR, Barbosa-Barros R, de Rezende Barbosa MPC, Daminello-Raimundo R, de Lucca AA, de Abreu LC. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, an update. *Ann Noninvasive Electrocardiol.* 2017;(September):e12512.
23. Sumitomo N. Current topics in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Arrhythmia.* 2016;32(5):344–51.
24. Lieve K V., van der Werf C, Wilde AA. Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circ J.* 2016;80(6):1285–91.
25. Idris A, Shah SR, Park K. Right ventricular dysplasia: management and treatment in light of current evidence. *J Community Hosp Intern Med Perspect.* 2018;8(3):101–6.
26. Li KHC, Bazoukis G, Liu T, Li G, Wu WKK, Wong SH, et al. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia (ARVC/D) in clinical practice. *J Arrhythmia.* 2018;34(1):11–22.

27. Rao U, Agarwal S, Gilbert TJ. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC): Case report and review of literature. *Heart Asia*. 2014;6(1):145–9.
28. Cho Y. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Arrhythmia*. 2018;(October 2017):356–68.
29. Sánchez PL, Fernández-santos ME, Angeles M, González-nicolas MA, Acebes JR, Costanza S, et al. Data in Brief Data from acellular human heart matrix. *Data Br*. 2016;8:211–9.
30. Ott HC, Matthiesen TS, Goh S, Black LD, Kren SM, Netoff TI, et al. Perfusion-decellularized matrix : using nature ' s platform to engineer a bioartificial heart. 2008;14(2):213–21.
31. Blazeski A. Engineered Heart Slice Model of Arrhythmogenic Cardiomyopathy Using Plakophilin - 2 Mutant Myocytes. 2018;1–43.
32. Cardiovascular I. Heterotopic transplantation of a decellularized and recellularized whole porcine heart †. 2016;22(February):571–9.
33. Robertson MJ, Dries-devlin JL, Kren SM, Burchfield JS, Taylor DA. Optimizing Recellularization of Whole Decellularized Heart Extracellular Matrix. 2014;9(2).
34. Blazeski A, Kostecki GM, Tung L. studies. 2016;119–28.
35. Moser PT, Ott HC. Recellularization of organs : what is the future for solid organ transplantation ? 2014;
36. Noor N, Shapira A, Edri R, Gal I, Wertheim L, Dvir T. 3D Printing of Personalized Thick and Perfusible Cardiac Patches and Hearts. 2019;1900344.