

Aus der Klinik für
Herz-, Thorax-, Transplantations- und Gefäßchirurgie
der Medizinischen Hochschule Hannover

**Evaluierung eines funktionellen bioartifiziellen
Myokardersatzes zur Restauration von
Myokardinfarkten im Rattenmodell**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
in der Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von Silke Asch
aus Berlin

Hannover 2016

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover am 05.04.2018

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. med. Christopher Baum

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. med. Ingo Kutschka

1. Referent: Prof. Dr. med. Tibor Kempf

2. Referent: Prof.'in Dr. med. dent. Meike Stiesch

Tag der mündlichen Prüfung: 05.04.2018

Prüfungsausschussmitglieder:

Vorsitz: Prof. Dr. med. Reinhold Ernst Schmidt

1. Prüfer: PD Dr. med. Bernhard Schmidt

2. Prüfer: Prof.'in Dr. med. Bettina Wedi

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Abbildungsverzeichnis | iii |
| Tabellenverzeichnis | iv |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Myokardinfarkt: epidemiologische und therapeutische Herausforderungen . . . | 1 |
| 1.1.1 Epidemiologie | 1 |
| 1.1.2 Chronifizierung und Langzeitkomplikationen | 2 |
| 1.1.3 Unzureichende Therapieoptionen | 3 |
| 1.2 Der regenerative Myokardersatz als Therapieansatz | 4 |
| 1.2.1 Regenerationspotential des adulten Myokards und kardiales Tissue Engineering | 4 |
| 1.2.2 Verschiedene Wege zur kardialen Regeneration | 5 |
| 1.2.3 Aktuelle Grenzen des kardialen Tissue Engineerings | 6 |
| 1.3 Projektbeschreibung und Zielsetzungen | 7 |
| 2 Material und Methoden | 9 |
| 2.1 Material | 9 |
| 2.2 Operativer Teil | 9 |
| 2.2.1 Versuchstiere | 9 |
| 2.2.2 Versuchsaufbau | 9 |
| 2.2.3 Infarktmodell | 11 |
| 2.2.4 BCT-Transplantation | 12 |
| 2.2.5 Herz Explantation | 15 |
| 2.2.6 Echokardiographie | 15 |
| 2.3 Histologischer Teil | 15 |
| 2.3.1 Infarktgrößenbestimmung und Graftlokalisierung | 16 |
| 2.3.2 Histologische Färbungen | 18 |
| 2.3.3 Immunfluoreszenzfärbungen | 19 |
| 2.3.4 immunhistochemische Färbungen | 21 |
| 2.3.5 TUNEL-Immunfluoreszenz | 23 |
| 2.3.6 Quantitative Auswertungen | 24 |
| 3 Ergebnisse | 26 |
| 3.1 Histologische Charakterisierung der BCTs in vitro | 26 |
| 3.1.1 BCT-Struktur in vitro | 26 |
| 3.1.2 Zellbesiedlung in vitro | 27 |
| 3.1.3 Zellcharakterisierung in vitro | 27 |
| 3.2 Charakterisierung der BCTs nach Explantation | 31 |
| 3.2.1 Operativer Teil | 31 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.2.2 | BCT-Morphologie und Vitalität | 32 |
| 3.2.3 | BCT Immunogenität | 38 |
| 3.3 | Einfluss der BCTs auf die Herzfunktion | 39 |
| 3.3.1 | Effekte auf die diastolische Herzfunktion | 39 |
| 3.3.2 | Effekte auf die systolische Herzfunktion | 39 |
| 3.3.3 | Integration der Grafts in dem Empfängergewebe | 42 |
| 3.4 | Histologische Charakterisierung der BCTs nach Explantation | 44 |
| 3.4.1 | Kardiomyozyten Population | 44 |
| 3.4.2 | Fibroblasten Population | 46 |
| 3.4.3 | Kardiale Progenitorzellen | 48 |
| 4 | Diskussion | 49 |
| 4.1 | Vorteile der intramyokardialen Implantationstechnik | 50 |
| 4.1.1 | Kontakt zum Empfängermiyokard | 50 |
| 4.1.2 | Graftversorgung und Neovaskularisation | 51 |
| 4.2 | Wirkungsweise der intramyokardialen Grafts | 52 |
| 4.2.1 | Funktionelle Wirkung | 52 |
| 4.2.2 | Wirkung auf zellulärer Ebene | 53 |
| 4.2.3 | Wirkung auf das Zellüberleben | 55 |
| 4.3 | Operative Innovation und Ausblicke | 56 |
| 4.3.1 | Innovative Operationstechnik | 56 |
| 4.3.2 | Weitere Versuche und klinische Anwendung | 57 |
| 4.3.3 | Limitationen | 58 |
| 5 | Zusammenfassung | 60 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 61 |
| 7 | Lebenslauf | 74 |
| 8 | Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nrn. 6 und 7 | 76 |
| 9 | Danksagung | 77 |
| A | Material | 78 |
| A.1 | Operativer Teil | 78 |
| A.2 | Histologischer Teil | 80 |
| A.2.1 | Materialien | 80 |
| A.2.2 | Antikörper und Seren | 82 |
| A.2.3 | Spezifische Färbungen | 84 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------|--|----|
| 2.1 | Versuchsaufbau und Versuchsgruppen, Schema | 10 |
| 2.2 | LAD Ligation, Foto in situ | 11 |
| 2.3 | Epikardial implantiertes BCT, Schema | 12 |
| 2.4 | Material zur intramyokardialen BCT-Implantation, Foto | 13 |
| 2.5 | Intramyokardiale BCT-Implantation, Fotos in situ | 13 |
| 2.6 | Intramyokardiale BCT-Implantation, Schema | 14 |
| 2.7 | Infarktgrößenbestimmung, Masson-Goldner-Färbung | 17 |
| 2.8 | BCT-Zentrum und -Randzone, Durchlicht | 25 |
| | | |
| 3.1 | Struktur der BCTs in vitro, HE-Färbung | 26 |
| 3.2 | BCT-Zellbesiedlung in vitro, HE-Färbung, Immunhistochemie und TUNEL-Assay | 27 |
| 3.3 | Zellcharakterisierung in den K-BCTs, Immunfluoreszenz | 29 |
| 3.4 | Zellcharakterisierung in den F-BCTs, Immunfluoreszenz | 30 |
| 3.5 | Prozentuale Infarktgröße im infarzierten Areal | 31 |
| 3.6 | BCT-Lokalisierung nach Explantation, Masson-Goldner-Färbung | 32 |
| 3.7 | BCT-Morphologie nach Explantation, HE-Färbung | 32 |
| 3.8 | Zellüberleben nach Explantation, GFP-Signal | 33 |
| 3.9 | Zellüberleben nach Explantation, Immunhistochemie | 34 |
| 3.10 | Apoptoseereignisse zum Zeitpunkt der Explantation, TUNEL-Assay | 35 |
| 3.11 | CD31-Nachweis nach Explantation, Immunfluoreszenz | 36 |
| 3.12 | Gefäßpräsenz nach Explantation | 37 |
| 3.13 | Gefäßstrukturen nach Explantation, HE-Färbung und Immunhistochemie | 37 |
| 3.14 | CD11b-Nachweis nach Explantation, Immunfluoreszenz | 38 |
| 3.15 | Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser vor Explantation | 39 |
| 3.16 | Linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser vor Explantation | 40 |
| 3.17 | Echokardiographische Aufnahmen vor Explantation | 41 |
| 3.18 | Grenzschicht zwischen BCT und Empfänger, Masson-Goldner-Färbung | 42 |
| 3.19 | Grenzschichtdicke zwischen BCT und Empfänger | 42 |
| 3.20 | Connexin 45-Nachweis, Immunfluoreszenz | 43 |
| 3.21 | Titin-positive Areale nach Explantation | 44 |
| 3.22 | Titin- und GFP-Nachweis, Kombinierte Immunfluoreszenz-Immunhistochemie | 45 |
| 3.23 | rP4h-positive Areale nach Explantation | 46 |
| 3.24 | rP4h- und GFP-Nachweis, Kombinierte Immunfluoreszenz-Immunhistochemie | 47 |
| 3.25 | Nkx2.5-Nachweis in den Intra-K BCTs nach Explantation, Immunfluoreszenz | 48 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|------|--|----|
| 2.1 | Versuchsgruppen | 10 |
| 2.2 | Masson-Goldner-Trichrom Färbung | 18 |
| 2.3 | Protokoll der Masson-Goldner-Trichrom Färbung | 18 |
| 2.4 | HE-Färbung | 19 |
| 2.5 | Protokoll der HE-Färbung | 19 |
| 2.6 | Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung | 20 |
| 2.7 | Protokoll der immunhistochemischen Färbung | 22 |
| 2.8 | Protokoll der TUNEL-Immunfluoreszenz | 23 |
| | | |
| A.1 | Geräte und Instrumente im operativen Teil | 78 |
| A.2 | Verbrauchsmaterialien im operativen Teil | 79 |
| A.3 | Nahtmaterial im operativen Teil | 79 |
| A.4 | Chemikalien im operativen Teil | 79 |
| A.5 | Geräte im histologischen Teil | 80 |
| A.6 | Verbrauchsmaterialien im histologischen Teil | 81 |
| A.7 | Chemikalien im histologischen Teil | 81 |
| A.8 | Färbekits und -lösungen | 82 |
| A.9 | Verwendete Primäantikörper | 82 |
| A.10 | Verwendete Sekundäantikörper | 83 |
| A.11 | Verwendete Seren | 83 |
| A.12 | Verwendete Isotypenkontrollen | 83 |
| A.13 | Reagenzien der Masson-Goldner-Trichrom Färbung | 84 |
| A.14 | Reagenzien der Hä malaun-Eosin Färbung | 84 |
| A.15 | Reagenzien der Immunfluoreszenzfärbungen | 85 |
| A.16 | Reagenzien der immunhistochemischen Färbungen | 85 |
| A.17 | Reagenzien der TUNEL-Immunfluoreszenzfärbungen | 86 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------|---|
| AIDS | Acquired Immunodeficiency Syndrome |
| AT1 | Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1 |
| BCT | Bioartificial Cardiac Tissue |
| F-BCT | Fibroblasten-BCT |
| K-BCT | Kardiomyozyten-BCT |
| Epi-K BCT | Epikardiales Kardiomyozyten-BCT |
| Intra-F BCT | Intramyokardiales Fibroblasten-BCT |
| Intra-K BCT | Intramyokardiales Kardiomyozyten-BCT |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CD 31 | Cluster of Differentiation 31 |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| FGF | Fibroblast Growth Factor |
| FS | Fractional Shortening |
| GFP | Green Fluorescence Protein |
| HE-Färbung | Hämalaun-Eosin Färbung |
| iPS-Zellen | Induzierte pluripotente Stammzellen |
| LAD | Left Anterior Descending Artery |
| LVEDD | Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser |
| LVEDS | Linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser |
| NYHA | New York Heart Association |
| PBS | Phosphat Buffered Saline |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PTCA | Perkutane Transluminale Koronarangioplastie |
| ROI | Region Of Interest |
| rP4h | Ratten prolyl-4-Hydroxylase |
| RT | Raumtemperatur |
| SEM | Standard Error of the Mean |
| TBS | Tris-gepufferte Saline |
| TdT | Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase |
| TE | Tissue Engineering |
| TUNEL | Terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP Nick End Labeling |
| VAD | Ventricular Assist Device |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| WHO | World Health Organization |

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Myokardinfarkt: epidemiologische und therapeutische Herausforderungen

1.1.1 Epidemiologie

Heutzutage fallen immer noch Millionen Menschen großen Pandemien zum Opfer. Im Jahre 2015 wurden weltweit rund 2,5 Millionen Sterbefälle durch die Infektionskrankheiten AIDS und Tuberkulose registriert [1]. Andererseits starben über 7 Millionen Menschen an ischämischen Herzkrankheiten: koronare Herzerkrankung, akuter und rezidivierender Myokardinfarkt, sowie deren Komplikationen [1]. Diese Krankheiten repräsentieren weltweit die häufigste Todesursache heute [2] und voraussichtlich für die nächsten zwanzig Jahre [3]. Die WHO führte 2008 einen Aktionsplan zur Prävention und Kontrolle der nicht übertragbaren Krankheiten ein, unter denen die kardiovaskulären Erkrankungen an erster Stelle stehen [4]. Ziel des Plans ist die Unterstützung der Prävention, der Forschung und der Risikofaktorenbekämpfung.

Weltweit steigt die Prävalenz der kardiovaskulären Erkrankungen stetig an [5]. Neue Lebensstile fördern eine unausgewogene Ernährung und körperliche Inaktivität. Charakteristische Risikofaktoren für Arteriosklerose, wie erhöhte LDL-Cholesterin Werte, arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus, nehmen zu [6]. Zudem steigt die Prävalenz der koronaren Herzkrankheit mit dem Alter exponentiell an [5], was zu einer zusätzlichen Belastung in industrialisierten Ländern mit alternden Bevölkerungen führt. Aus diesen Gründen existieren seit 2007 die europäischen Leitlinien zur effektiveren Bekämpfung kardiovaskulärer Erkrankungen, die gesunde Ernährung, sportliche Aktivitäten und die Minimierung der Arterioskleroserisikofaktoren zum Ziel haben [7].

In Deutschland stellen die kardiovaskulären Erkrankungen eine große gesundheitliche und finanzielle Last dar [5]. Im Jahre 2014 wurden 39% der registrierten Todesfälle durch Erkrankungen des Kreislaufsystems verursacht [8]. Die chronische ischämische Herzkrankheit, der akute Myokardinfarkt und die Herzinsuffizienz besetzten jeweils Platz 1, 2 und 4 der häufigsten To-

desursachen und stellten zusammen knapp 20% aller Sterbefälle dar [8]. Zwar kam es in den letzten Jahre zu einer Abnahme der Letalität der koronaren Herzkrankheit und des akuten Myokardinfarkts, was hauptsächlich durch die verbesserte Prävention und optimierte Therapie erklärt wird. Dies führt jedoch zu einer steigenden Chronifizierung und einer Zunahme der Langzeitfolgen der ischämischen Herzkrankheit [5].

1.1.2 Chronifizierung und Langzeitkomplikationen

Die koronare Herzkrankheit basiert auf einer Arteriosklerose der Herzkranzgefäße mit Plaquebildung. Ein Myokardinfarkt entsteht durch die Ruptur eines solchen Plaque. Der thrombotische Verschluss des betroffenen Koronargefäßes und der daraus resultierende Sauerstoffmangel führen zu Myokardischämie und Nekrosen im entsprechenden Versorgungsgebiet [6]. Der anschließende Vernarbungsprozess verläuft in mehreren Etappen. Zuerst wandern Granulozyten und Makrophagen ein. Nach etwa zwei Wochen entsteht ein Granulationsgewebe, ausgehend von den Rändern des Infarkts. Innerhalb der nächsten Monate bildet sich ein reifes Narbengewebe aus dichtem Kollagen [9]. Remodelingprozesse führen zu einer Neuordnung der noch vitalen Kardiomyozyten, und schließlich zu einer Ausdünnung und Dilatation des betroffenen Myokardareals [10]. Die fortschreitende Ventrikeldilatation führt zu einem Kontraktilitätsverlust und zu einer Zunahme der systolischen und diastolischen Wandspannung des Ventrikels. Kompensatorisch bildet sich eine reaktive Hypertrophie des umliegenden gesunden Myokards [10, 11]. Diese führt ihrerseits zu einer systolischen Funktionseinschränkung und zu einer weiteren Zunahme der Füllungsdrücke. Es entsteht ein *circulus vitiosus* aus Ventrikeldilatation und zunehmender Hypertrophie mit erhöhtem Sauerstoffverbrauch [9].

Die Folgen eines Myokardinfarkts können klinisch in Früh- und Spätkomplikationen unterteilt werden. Über 7% der Patienten sterben während des Krankenhausaufenthaltes an den Folgen der Frühkomplikationen, größtenteils durch Kammerflimmern und akuter Linksherzinsuffizienz [6, 12]. Weitere Komplikationen, die in diesem Zeitfenster auftreten können, sind Ventrikelruptur mit Herzbeuteltamponade, ischämische Ventrikelseptumdefekte und Infarktperikarditis [6]. Als Spätkomplikationen können ventrikuläre und supraventrikuläre Rhythmusstörungen auftreten und es besteht das Risiko einer Aneurysmenbildung im Infarktbereich [9]. Größe und Lokalisation des Infarkts, sowie das Ausmaß der myokardialen Umbauprozesse determinieren die postinfarzielle Ventrikelpumpfunktion, und somit die Entwicklung einer Herzinsuffizienz und die Langzeitprognose des Patienten [6].

Die Herzinsuffizienz entsteht durch die Abnahme der Myokardkontraktilität im Zusammenhang mit einem erhöhten Sauerstoffbedarf. Unter diesen Bedingungen ist das Herz nicht mehr in der Lage, die peripheren Organe - in Ruhe oder unter Belastung - ausreichend mit Blut zu versorgen [13]. Durch die verminderte Pumpfunktion sind die Patienten nur eingeschränkt belastbar und können unter anderem Lungenödem, Hepatomegalie und periphere Ödeme entwickeln [6]. Die Herzinsuffizienz ist ein progressives klinisches Syndrom, der in etwa 85% der

Fälle eine koronare Herzkrankheit oder ein Herzinfarkt zu Grunde liegt [14]. Das Risiko einer Verschlechterung bis zur Dekompensation ist stets vorhanden und die Prognose ist ungünstig. Die 1-Jahresletalität einer akuten Herzinsuffizienz beträgt über 17%, die der chronischen rund 7% [14].

1.1.3 Unzureichende Therapieoptionen

Nach einem akuten Myokardinfarkt steht die zeitnahe Reperfusion des ischämischen Areal im Vordergrund, um die Ischämiezeit des Gewebes zu minimieren. Die Reperfusion kann mittels perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (PTCA), meist mit folgender Stentimplantation, oder einer Bypassoperation erreicht werden. Darauf folgt die Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern und neuen oralen Antikoagulantien zur Prophylaxe koronarer Re-Thrombosen. Die medikamentöse Herzinsuffizienztherapie mit ACE-Hemmern, Betablockern und Aldosteron-Antagonisten ist für alle Patienten empfohlen [15]. Zusätzlich können Diuretika, Angiotensin-Rezeptor-Neprilysin-Inhibitoren und Hydralazin zum Einsatz kommen [15]. Darüber hinaus können Schrittmacher, implantierbare Kardioverter-Defibrillatoren oder Resynchronisationstherapien indiziert sein [16]. Bei einer weiteren Verschlechterung der Ventrikelpumpfunktion kommen nur die Herztransplantation oder die Implantation eines ventrikulären Assist-Systems in Frage.

Bis heute bleibt die Herztransplantation die *ultima ratio* bei terminaler Herzinsuffizienz. Die 5-Jahres-Überlebensrate nach einer Transplantation beträgt ca. 70% [17]. Im Vergleich zu einer konservativen Therapie profitieren transplantierte Patienten von einer Verbesserung der Prognose, der Belastbarkeit und der Lebensqualität [16]. Dennoch bleibt die Herztransplantation eine ungenügende Therapieoption, vor allem aufgrund des Mangels an Spenderorganen. Seit 2001 steigt in Deutschland die Anzahl der Patienten auf der Organwarteliste [18], dennoch bleibt die Zahl der jährlichen Transplantationen nahezu konstant. Im Jahre 2015 erhielten nur 283 der 773 Patienten auf der Warteliste eine Herztransplantation [19]. Die durchschnittliche Wartezeit auf ein Herz beträgt zwei Jahre, über 30% der Patienten versterben in diesem Zeitraum [20]. Weiterhin besteht die Schwierigkeit einer genauen Klassifikation der Patienten nach Dringlichkeit [21]. Seit der Verschärfung der High-Urgency Kriterien in Jahre 2005 haben Patienten mit häufig vorkommender Blutgruppe und durchschnittlicher Körpergröße ohne High-Urgency-Status wenig Chancen auf ein Spenderorgan [22]. So werden derzeit knapp 90% aller Organe an High-Urgency Patienten vergeben. Dabei handelt es sich um Patienten in fortgeschrittenen und kritischeren Krankheitsstadien, die höhere Komplikationsraten aufweisen [18, 20]. Zu den typischen Komplikationen zählen die akute und chronische Organabstoßung sowie eine Erhöhung der Infektanfälligkeit und der Inzidenz lymphoproliferativer Erkrankungen aufgrund der lebenslangen Einnahme von Immunsuppressiva.

Folglich hat sich in den letzten Jahren die Implantation ventrikulärer Unterstützungssysteme (VAD) als alternatives Therapieverfahren etabliert. Initial wurde die VAD-Implantation zur

Überbrückung bis zur Herztransplantation entwickelt (bridge therapy), und war nicht zur dauerhaften hämodynamischen Unterstützung bestimmt [16]. Jedoch bekamen durchschnittlich nur 25% der VAD-Patienten im ersten Jahr nach der Implantation ein Spenderorgan [23]. Da die körperliche Leistungsfähigkeit von VAD- und herztransplantierten Patienten vergleichbar ist [18] und nur begrenzt Organe zur Verfügung stehen, wurde diese Methode zunehmend auch als Dauertherapie angewandt (destination therapy). Die sofortige Verfügbarkeit ermöglicht eine zeitigere Indikationsstellung, sodass bei elektiven Patienten bessere Ergebnisse erzielt werden können [18]. Doch auch die VAD-Therapie birgt Risiken, wie eine relevante Infektionsgefahr durch die perkutan austretende Driveline, sowie hohe Thromboembolie- und Blutungsraten durch die lebenslange Antikoagulation [24]. Sowohl der Mangel an Spenderorganen als auch die nach wie vor hohen Komplikationsraten der VAD-Therapie limitieren aktuell die Therapieoptionen der fortgeschrittenen Herzinsuffizienz. Aus diesen Gründen wird intensiv an alternativen regenerativen Therapieoptionen der terminalen Herzinsuffizienz geforscht.

1.2 Der regenerative Myokardersatz als Therapieansatz

1.2.1 Regenerationspotential des adulten Myokards und kardiales Tissue Engineering

Bis vor zwanzig Jahren galten Säugerherzen als terminal differenzierte Organe ohne Regenerationspotential [25,26]. Neuere Beobachtungen stellten dies zunehmend in Frage. Bergmann et al. [27] bestimmten anhand der intrazellulären C¹⁴-Konzentration das Zellalter adulter humaner Kardiomyozyten und kamen zu dem Ergebnis, dass ein Teil der Zellen erst im Laufe des Lebens entstanden war. Auf diese Weise wurde eine Turnover-Rate von bis zu 1% pro Jahr im adulten humanen Myokard ermittelt. Darüber hinaus konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass es nach Exzision der Herzspitze in den ersten Lebenswochen zu einem strukturellen Wiederaufbau kommen kann [28]. Es wurde beobachtet, dass auch bei adulten Säugern Kardiomyozyten wieder in den Zellzyklus eintreten können [25]. Im Menschen wurde eine erhöhte Kardiomyozytenproliferations- und Mitoserate in ischämischem Myokard festgestellt [29, 30]. In geschädigten Arealen wurden Progenitorzellen identifiziert, die zu Kardiomyozyten differenzieren können [31]. Zur Herkunft dieser Zellen gibt es verschiedene Beobachtungen. Sowohl kardiales Vorläuferzellen aus dem Knochenmark [32], residente Vorläuferzellen im Myokard [33], als auch Zellproliferation nach Dedifferenzierung adulter Kardiomyozyten [34] wurden als Zellquelle beschrieben.

Neue Therapieansätze basieren auf diesem Regenerationspotential. Das verlorene funktionelle Myokard soll ersetzt und die endogene Regeneration stimuliert werden, um so die Ventrikel-funktion wiederherzustellen. Eine andere Alternative ist das myokardiale Tissue Engineering [35]. Hierbei wird in vitro bioartifizielles myokardiales Gewebe hergestellt, mit dem Ziel, ischämisches Myokard zu ersetzen. Das ideale bioartifizielle Myokardgewebe muss kontraktile

sein und elektromechanisch mit dem Empfänger koppeln. Ideal ist Gewebe autologen Ursprungs um eine Abstoßungsreaktion zu vermeiden [36]. Weiterhin sollte das Transplantat groß genug sein, um suffizient zu einer Verbesserung der Pumpfunktion beitragen zu können. Eine zügige Vaskularisierung des Gewebetransplantates ist zwingend erforderlich, um das Überleben im Empfängermyokard zu gewährleisten [36]. Die verwendeten Zellen sollen eine organähnliche Differenzierung und Verteilung aufweisen, aus Kardiomyozyten, Gefäßen und Bindegewebe bestehen und eine elektrische Einheit bilden [37, 38].

1.2.2 Verschiedene Wege zur kardialen Regeneration

Die zelluläre Kardiomyoplastie besteht in der direkten Applikation von Zellen in eine Infarkt-narbe oder in das umliegende Myokard. Die Injektion erfolgt intramyokardial oder intrakoronar [39, 40]. Die Methode ist einfach und verhältnismäßig wenig invasiv. Sie wurde bereits mit vielen verschiedenen Zellarten durchgeführt, z.B. fetalen Kardiomyozyten [41] und autologen Knochenmark-Zellen [42]. Durch das Fehlen einer unterstützenden Trägersubstanz weist diese Methode jedoch eine Reihe von Nachteilen auf, vor allem einen hohen Zellverlust nach der Injektion. Ein Großteil der applizierten Zellen wird über das venöse Blut in die Lungen abtransportiert [43].

Die Methode des kardialen Tissue Engineerings (TE) stellt solide, drei-dimensionale Konstrukte her, die in vitro mit Zellen besiedelt werden. In diesen Gerüsten können die Zellen untereinander koppeln und eine gewebeähnliche Struktur bilden. Sowohl natürliche (extrazelluläre Matrix Derivate, Fibrinkleber, Alginate) als auch synthetische (verschiedene Polyesterarten) Biomaterialien werden verwendet [44–46]. Mit Gelatine [47], Kollagen-Matrigel®-Kombinationen [48] und verschiedenen synthetischen Polymeren, wie Polyglycolidsäure oder Polylactidsäure [49] konnte ein verbessertes Zellüberleben in vivo nachgewiesen werden. Kürzlich wurden diverse neue synthetische Polymere eingeführt, mit denen Parameter wie Zelladhäsion und Vaskulogenese beeinflusst werden können [50]. Von neonatalen Rattenkardiomyozyten [51] bis hin zu Progenitorzellen aus subkutanem Fettgewebe [45] wurde eine Vielzahl verschiedener Zelltypen für myokardiales TE eingesetzt. Die Reifung der Gewebekonstrukte kann in speziellen Bioreaktoren mechanisch und medikamentös stimuliert werden [35]. Die Transplantation erfolgt meist epikardial [52]. Durch das solide Gerüst bleiben die Zellen in vivo im Verband [44, 47] und schaffen ein proliferationsförderndes extrazelluläres Milieu [53]. Im Gegensatz zur Zellinjektion ist der Zellverlust nach Transplantation solider Gewebe geringer, und eine potentielle elektromechanische Kopplung zum Empfängergewebe wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen beobachtet [47, 54, 55]. Jedoch bleibt die Zelltoderate im Verlauf hoch, da die Transplantate in der Frühphase nach Implantation ischämisch werden können, bevor eine suffiziente Vaskularisation stattgefunden hat [56]. Um die Blutversorgung zu optimieren, können die Gewebe vor Implantation prävaskularisiert werden. Dies gelang Dvir et al. [55] durch die heterotrope Transplantation der Gewebe auf das Omentum, gefolgt von der

epikardialen Transplantation auf das Empfängerherz.

Neue Formen des kardialen TE wurden in den letzten Jahren entwickelt. Mittels temperaturempfindlicher Kulturschalen konnten zwei-dimensionale Zell-Blätter hergestellt werden, sogenannte cell sheets. Die Zellen werden durch die eigenproduzierte, nicht-immunogene extrazelluläre Matrix zusammengehalten, von der überlebens- und reifungsfördernde Signale ausgehen [57]. Sie sind gekoppelt, bilden eine elektrische Einheit, weisen eine hohe Dichte auf und können gestapelt werden [57]. Haraguchi et al. [58] konnten zeigen, dass sich bereits nach einer halben Stunde gap junctions zwischen Zellen verschiedener Blätter bilden. Ebenfalls neu aufkommend ist das Feld des in situ Tissue Engineerings. Dabei werden Zellen zusammen mit einer löslichen Trägersubstanz, die in vivo polymerisiert, intramyokardial appliziert. Diese Methode bietet den Zellen ein Gerüst, fördert dadurch das Zellüberleben nach der Injektion, und bleibt dabei weniger invasiv und einfacher handhabbar als das konventionelle TE [59, 60].

1.2.3 Aktuelle Grenzen des kardialen Tissue Engineerings

Das Generieren quantitativ und qualitativ geeigneter Zellpopulationen stellt eine große Herausforderung dar. Bei einem humanen Myokardinfarkt sterben etwa 1 Milliarde Zellen [61]. Aus verfügbaren postmitotischen Zelllinien können solche Mengen schwer generiert werden [62]. Zimmermann et al. [52] benötigten im Rattenmodell pro Graft 2,5 Millionen Rattenkardiomyozyten, was einem kompletten Rattenherzen entspricht [63]. Demnach können neonatale Zellen nicht in größeren Modellen angewandt werden. Die gleiche Einschränkung weisen endogene kardiale Vorläuferzellen auf, da sie nur in kleiner Zahl im Myokard residieren [62, 64]. Auch autologe Progenitor-Zellen aus dem Knochenmark zeigten keine guten Langzeitergebnisse [42]. Die Aufmerksamkeit lenkt sich folglich zunehmend auf Stammzellen, aus denen große Zellmengen produziert werden können. Embryonale Stammzellen sind pluripotent und können in Kardiomyozyten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen und kardiale Fibroblasten differenzieren. Somit wären sie ein optimaler Zelltyp für das kardiale TE. Jedoch wurden Teratombildungen noch Jahre nach der Zellapplikation beschrieben [65]. Zudem sprechen ethische Limitationen gegen ihren klinischen Einsatz. Induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) dahingegen unterliegen keinen solchen Limitationen, können aus patienteneigenen Stromazellen generiert und ebenfalls in alle Zelllinien differenziert werden. Dennoch können sie zu einer Aktivierung des Immunsystems führen [66]. Außerdem wird zur Reprogrammierung meist eine virale Transduktion eingesetzt, die das Risiko einer Onkogenaktivierung mit sich trägt [67]. Inzwischen stehen neue Methoden nicht viraler Reprogrammierung zur Verfügung [68], dennoch bleibt durch residuelle, pluripotente Zellen im Transplantat nach wie vor ein potentielles Risiko der Teratombildung bestehen [69]. Darüber hinaus reagieren diese Zellen stärker auf Sauerstoff- und Nährstoffmangel in der Frühphase nach Transplantation, was die maximale Menge an effektiv überlebenden Zellen limitiert [62].

Nach einer einfachen Zellinjektion beträgt die Zellretentionsrate im Zielorgan Herz weniger als

10% [54]. Ein Großteil der Zellen wird ausgewaschen oder wandert in andere Organe [70, 71]. Hofman et al. [72] haben nach intramyokardialer Zellinjektion über 85% der Zellaktivität in Leber und Milz gemessen. Eine Zellinjektion mit Fibrinkleber [73] oder Kollagen [74, 75] führt zu besseren Retentionsraten, jedoch bestehen weiterhin Verluste von bis zu 60% [54]. Auch bei soliden Grafts, die eine Dicke von 100 μ m überschreiten oder aus mehr als drei cell sheets bestehen, ist die einfache Diffusion zur Sauerstoff- und Nährstoffversorgung nicht ausreichend. Ein Teil der Zellen wird in vivo hypoxäm und nekrotisch [76, 77]. Darüber hinaus ermöglicht keiner der momentan existierenden TE-Ansätze eine optimale elektromechanische Integration des Transplantates in das Empfängermyokard. Bei der einfachen Zellinjektion wurde bisher keine Interaktion mit dem Empfängermyokard beobachtet [62, 78]. Bei der epikardialen Transplantation sowohl von soliden Geweben als auch von einzelnen cell sheets bildete sich eine Fibroseschicht zwischen Transplantat und Empfänger [48], was eine direkte Kopplung zumindest stark limitiert [36]. Ungewiss bleiben auch die Immunogenität der verwendeten Biomaterialien sowie die Entstehung toxischer Substanzen bei dem Abbau synthetischer Materialien in vivo [44, 52, 79]. Zu allen entwickelten Strategien fehlen zudem gezielte Langzeituntersuchungen auf Nebeneffekte [42, 62, 80].

Fraglich bleibt schließlich die Effektivität der verschiedenen TE-Ansätze, welche noch sehr unterschiedlich eingeschätzt wird [52, 81, 82]. Eine einfache Zellinjektion gewährleistet keine ausreichende passive Wandstabilisierung [70]. Etzion et al. [83] konnten nach intramyokardialer Injektion embryonaler Kardiomyozyten eine signifikant bessere Herzfunktion im Vergleich zur Kontrollgruppe messen, jedoch verschlechterte sich das fractional shortening (FS) wieder innerhalb von zwei Monaten. Cell sheets sind sehr fragil und schwer handhabbar [84]. Zwar können die Blätter überlagert und gekoppelt werden, ab drei Lagen kommt es jedoch zu Nekrosen [77], sodass eine ausreichende mechanische Unterstützung des Infarktareals nicht erreicht wird [62, 77]. Auch bei dem in situ TE besteht die Gefahr einer raschen Matrixdegradation in vivo und somit einer unzureichenden langfristigen Ventrikelunterstützung [85]. Eine ideale Zellmatrix, die die gleiche Konsistenz wie das native Myokard aufweist und sich in der Systole und der Diastole synchron zur Ventrikelwand bewegt, existiert noch nicht [50]. Zimmermann et al. [36, 52] entwickelten ringförmige Grafts, die epikardial auf infarzierte Rattenherzen transplantiert wurden. Nach vier Wochen wurde eine Vaskularisierung und die Bildung von gap junctions nachgewiesen, sowie eine Verbesserung der Ventrikelpumpfunktion, die jedoch die Baseline-Werte nicht überschritt [52]. Die epikardiale Transplantation ist daher eine ungenügende Anwendungsmethode für solide Grafts [62].

1.3 Projektbeschreibung und Zielsetzungen

Es ist bekannt, dass eine intramyokardiale Kollageninjektion auch ohne Zellen zu einer Unterstützung der linksventrikulären Pumpfunktion führt [86], die epikardiale Transplantation eines zellfreien Kollagen-Grafts jedoch nicht [87]. Der Grund dafür könnte sein, dass die in-

tramyokardiale Applikationsmethode eine effizientere Herzwandstabilisierung gewährleistet. Es entsteht ein Wiederlager für kontrahierende gesunde Myokardanteile, über den Frank Starling Mechanismus wird die Ventrikelpumpfunktion unterstützt und eine Ventrikeldilatation verhindert [48, 52]. Weiterhin könnte das Überleben, die Proliferation und die Kopplung von intramyokardial eingebrachten Zellen durch eine große Kontaktfläche mit dem Empfängermyokard gefördert werden. Diese Überlegungen initiierten die vorliegende Arbeit, in der solide TE-Grafts intramyokardial implantiert wurden.

Es wurden solide Gewebegrafts verwendet, da diese durch ihre Zellkomposition und ihre mechanischen Eigenschaften das native Myokard bestmöglich nachahmen. Diese wurden von Kensah et al. in den Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe (LEBAO) der Medizinischen Hochschule Hannover hergestellt. Es handelt sich um solide bioartifizielle Herzgewebe, sogenannte BCTs (Bioartificial Cardiac Tissue), die nach Konsolidierung der Matrix in einem Bioreaktor konditioniert wurden [35]. Das Überleben in vivo und die Funktionalität der BCTs soll in Abhängigkeit zur Applikationsmethode untersucht werden. In einem syngenem Rattenmodell wurden sie entweder epikardial auf die Infarkt Narbe oder intramyokardial in den Infarktbereich transplantiert, sodass beide Methoden direkt miteinander verglichen werden konnten. Um die Wirksamkeit dieser neuen Applikationsmethode in Abhängigkeit der eingebrachten Zellen zu untersuchen, wurden zusätzlich Kardiomyozyten mit Fibroblasten-BCTs verglichen. Die innovative Besonderheit des Projektes besteht dabei in der intramyokardialen Implantation von soliden bioartifiziellen Geweben in einem chronischen Infarktmodell.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

- 1- Welchen Einfluss hat die Implantationsmethode auf das Überleben, die Neovaskularisation und die Fibrosierung der BCTs?
- 2- Hat das Implantationsverfahren (epikardial vs. intramyokardial) und/oder der Zelltyp (Kardiomyozyten vs. Fibroblasten) einen Einfluss auf die Myokardfunktion des Empfängers?
- 3- Integriert das Graft in das Empfängermyokard und bilden sich gap junctions zwischen dem Empfänger und dem Graft?

Das langfristige Ziel soll die Entwicklung eines funktionellen Myokardersatzes zur Rekonstruktion chronisch ischämischen Herzmuskelgewebes sein. Es soll eine einfach anwendbare und klinisch praktikable Applikationsmethode etabliert werden. Eine Verbesserung der Ventrikelpumpfunktion und die Prävention einer Ventrikeldilatation stehen im Vordergrund. Somit sollen die Langzeitfolgen des akuten Myokardinfarkts verhindert und eine neue regenerative Therapieoption entwickelt werden.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

Siehe Tabellen A.1 bis A.12 im Anhang A.

2.2 Operativer Teil

2.2.1 Versuchstiere

Für die Tierversuche wurden 250–300g schwere männliche LEWIS Ratten (Charles River, Köln) verwendet.

Die Gruppenhaltung erfolgte in 1370 cm² großen Käfigen, mit einer maximalen Besatzdichte von 5 Tieren/Käfig. Die Raumtemperatur betrug 19–22°C und die relative Luftfeuchtigkeit 60–80%. Zur Fütterung wurde das total pathogenfreie, pelletierte Trockenfutter Altromin® 1324 TPF (Altromin Spezialfutter, Lage) verwendet.

2.2.2 Versuchsaufbau

Die Untersuchung der Bioartificial Cardiac Tissues (BCTs) in vivo erfolgte in adulten LEWIS Ratten. Durch LAD-Ligatur wurde ein Vorderwandinfarkt induziert (siehe Abschnitt 2.2.3). Nach zwei Wochen wurden die ersten funktionellen Analysen mittels Echokardiographie durchgeführt, dann erfolgte die Reoperation zur BCT-Transplantation. Vier Wochen später wurden mittels Echokardiographie die Graft- und Infarktgröße sowie die Herzfunktion bestimmt. Es folgte die Explantation der Herzen mitsamt BCT und die Explantate wurden kryokonserviert. Die anschließende histologische Aufarbeitung diente der strukturellen und morphologischen Untersuchung von Graft und Empfängermyokard.

Zwei Transplantationsmethoden und zwei verschiedene BCT-Typen wurden verwendet, mit verschiedenen Fragestellungen (siehe Abbildung 2.1). Zuerst wurden mit Kardiomyozyten-BCTs (K-BCTs) die zwei **Transplantationsmethoden**, epikardial (Epi-K) und intramyokar-

dial (Intra-K), in Hinsicht auf BCT-Überleben und Integration sowie Verbesserung der Myokardfunktion verglichen. Als Kontrolle diente die Sham-operierte Gruppe (Sham).

In einem zweiten Schritt wurde der Einfluss der **Zellkomposition** auf Myokardfunktion und BCT-Integration in das Empfängergewebe untersucht. Dafür wurden die K-BCTs mit BCTs verglichen, die ausschließlich mit Fibroblasten besiedelt wurden (F-BCTs). Beide BCT-Typen wurden intramyokardial implantiert (Gruppen Intra-K und Intra-F) (siehe Tabelle 2.1).

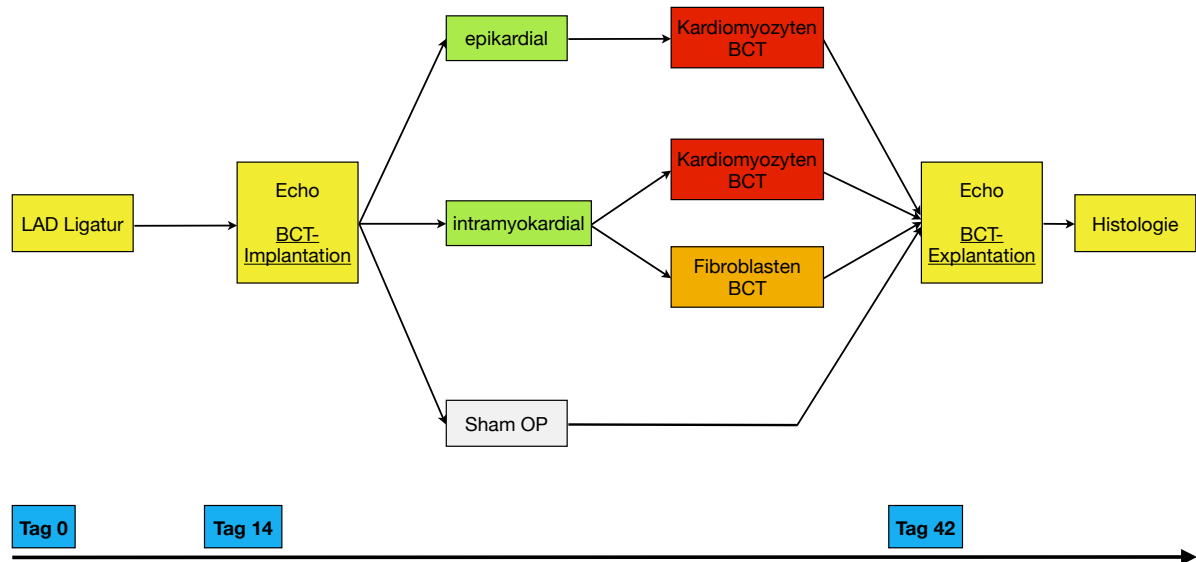


Abbildung 2.1: Versuchsaufbau und Versuchsgruppen

Tabelle 2.1: Versuchsgruppen

| Gruppen | Transplantationsmethode | BCT-Typ |
|---------|--------------------------------------|--------------------|
| Epi-K | epikardial auf die Infarkt Narbe | Kardiomyozyten-BCT |
| Intra-K | intramyokardial in das Infarktgewebe | Kardiomyozyten-BCT |
| Intra-F | intramyokardial in das Infarktgewebe | Fibroblasten-BCT |
| Sham | nur Rethorakotomie | — |

2.2.3 Infarktmodell

In einem standardisierten Eingriff wurde durch Ligatur des *Ramus interventricularis anterior* der *Arteria coronaria sinistra* (LAD) ein Vorderwandinfarkt induziert.

Zur Narkoseeinleitung wurden die Ratten in eine Box mit 3 Vol.-% Isofluran platziert. Nach ausreichender Sedierung wurden sie mit einer 16G Braunüle® endotracheal intubiert, in Rückenlage auf einer Wärmeplatte fixiert und beatmet. Zur Narkoseerhaltung wurde 1,5–2,0 Vol.-% Isofluran mit 4–6L Sauerstoff verwendet, das Beatmungsvolumen betrug 2–3mL und die Atemfrequenz 70/min. Augensalbe wurde aufgetragen. Zur Analgesie diente eine subkutane Applikation von 30µL 50mg/mL Carprofen (Rimadyl®) sowie 30–150µL 10mg/mL Butorphanol (Torbugesic®). Der Thorax wurde rasiert, desinfiziert und es erfolgten die linksseitige anterolaterale Thorakotomie und Perikardiotomie auf Höhe des 3.–4. Interkostalraums. 3–0 Prolene Haltefäden dienten der Fixierung von Rippen und Muskulatur. Die LAD wurde aufgesucht und mit einer 7–0 Prolene Naht dauerhaft ligiert (siehe Abbildung 2.2).

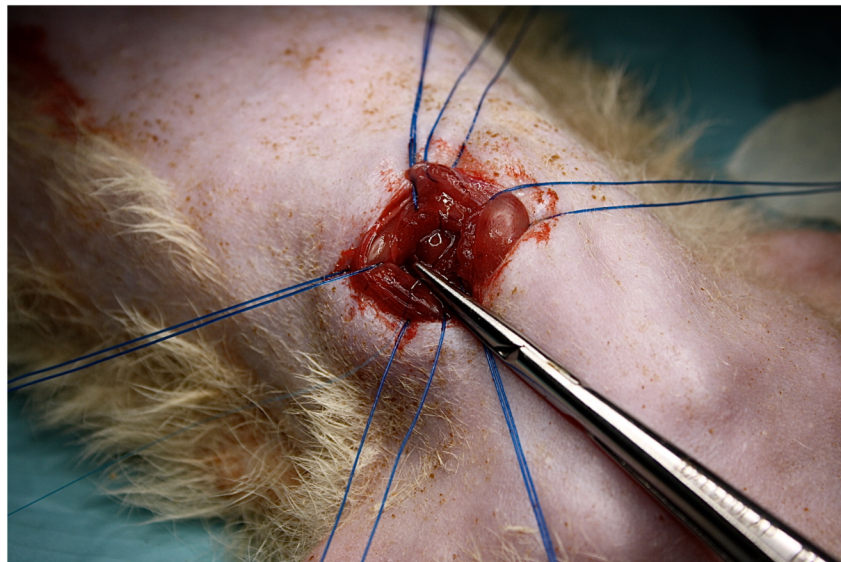


Abbildung 2.2: Operationssitus. Nach der linksseitigen anterolateralen Thorakotomie und Perikardiotomie wird die LAD aufgesucht und mit einer 7–0 Prolene Naht dauerhaft ligiert.

Nach der Blutstillung erfolgte der schichtweise Wundverschluss mit 5–0 Ethibond (Rippen) und 6–0 PermaHand Seide (Muskulatur und Haut). Die Isofluran-Zufuhr wurde gestoppt und die Tiere bis zur Extubation mit Sauerstoff beatmet. Anschließend wurden sie in einer Aufwachbox für mindestens 1 Stunde weiter beobachtet.

Die genaue Bestimmung der Infarktgröße mittels Echokardiographie fand zwei Wochen später statt, unmittelbar vor der Reoperation zur BCT-Implantation (siehe Abbildung 2.1).

2.2.4 BCT-Transplantation

Zwei Wochen nach der Infarktsetzung wurden die BCTs epikardial oder intramyokardial implantiert.

Narkoseeinleitung, Intubation, Narkoseerhaltung und Analgesie wurden gemäß Abschnitt 2.2.3 durchgeführt. Die Tiere wurden in Rückenlage auf einer Wärmeplatte fixiert, das Operationsareal wurde rasiert, desinfiziert und es erfolgte die linksseitige anterolaterale Rethorakotomie. Rippen und Muskulatur wurden mittels 3–0 Prolene Haltefäden fixiert.

Die Infarktzone an der Vorderwand des linken Ventrikels wurde durch die weißliche Verfärbung des Myokards lokalisiert. Am schlagenden Herzen erfolgte die BCT-Implantation (siehe unten). Blutstillung und Wundverschluss verliefen gemäß Abschnitt 2.2.3.

Epikardiale Transplantation

Bedingt durch ihre Herstellung in speziellen Kulturschalen zwischen zwei Metallstäbchen [35], befanden sich an beiden BCT-Enden kleine Ösen (siehe Abbildung 2.4). Durch diese Ösen wurde je ein 8–0 Prolene Faden gezogen. Das BCT wurde in gestreckter Form direkt auf den Infarkttrandbereich positioniert und mithilfe der Fäden an beiden Enden auf das Myokard fixiert (siehe Abbildung 2.3).

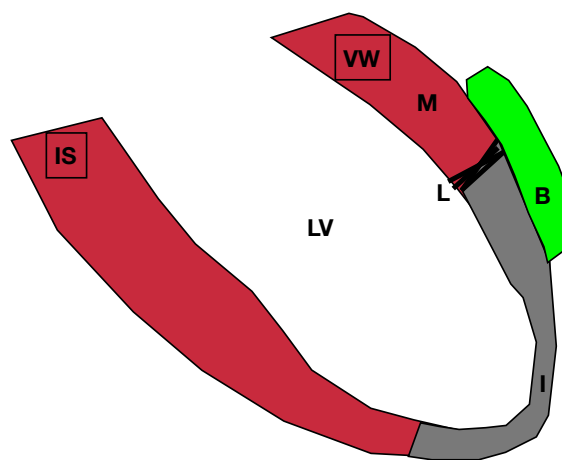


Abbildung 2.3: Schema eines epikardial implantierten BCTs. Das BCT (B) liegt epikardial auf dem Infarkttrandbereich, an der Vorderwand des linken Ventrikels (VW) auf Höhe der LAD-Ligatur (L). M: Myokard, I: Infarktareal, LV: Linker Ventrikel, IS: Interventrikularseptum.

Intramyokardiale Implantation

Für die intramyokardiale Implantation wurde die Stahlkanüle einer 14G Braunüle[®] mit einem Innendurchmesser von 1,7mm benutzt. Ein 7–0 Prolene Faden wurde durch eine der zwei BCT-Ösen gezogen. Die beiden Fadenenden wurden vom spitzen zum stumpfen Ende durch die Hohlzahnleiste geführt, sodass das BCT in das Lumen der Hohlzahnleiste gezogen wurde und dort

längs zu liegen kam. Ein dünner Metallstab wurde vorsichtig von dem stumpfen Ende an in die Hohlneedle geschoben, wodurch das BCT langsam in Richtung des spitzen Endes glitt. So konnte die Position des BCTs innerhalb der Hohlneedle mittels Zug auf die Fäden und Druck auf das Metallstäbchen genau eingestellt werden (siehe Abbildung 2.4).

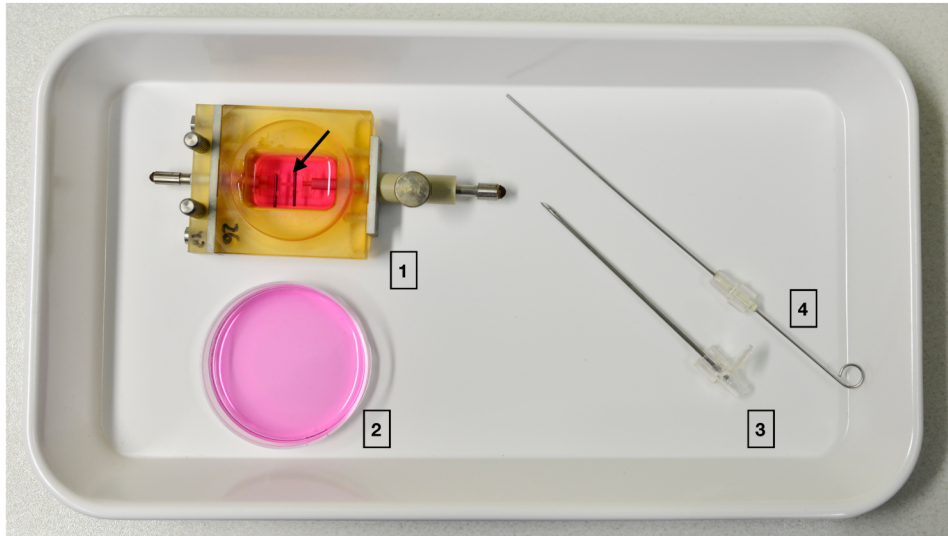


Abbildung 2.4: Material zur intramyokardialen BCT-Implantation. Das BCT wurde in einer speziellen Kulturschale (1) zwischen zwei Metallstäbchen (Pfeil) hergestellt, und im Operationsraum in eine offene Kulturschale (2) überführt. Zur BCT-Implantation dient eine Stahlkanüle (3) und ein Metallstäbchen (4).

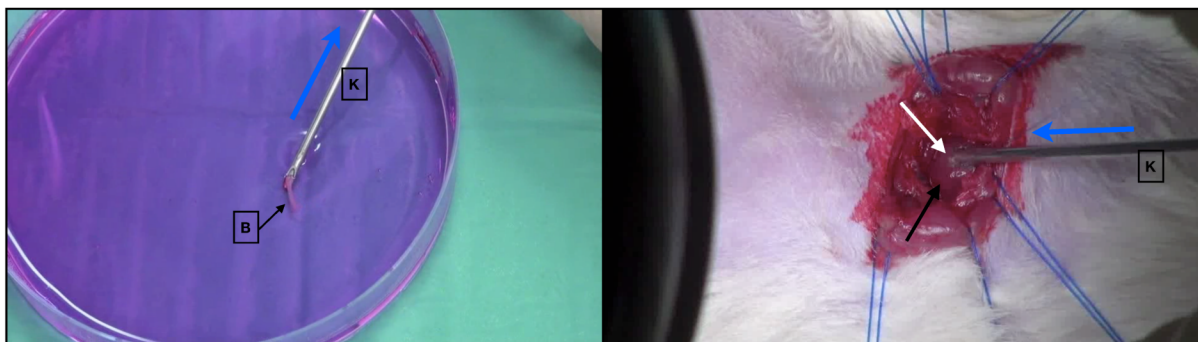


Abbildung 2.5: Verlauf der intramyokardialen BCT-Implantation. *Linkes Bild:* zunächst wird das BCT (B) in das Lumen der Stahlkanüle (K) gezogen. *Rechtes Bild:* das BCT wird anhand der Kanüle intramyokardial in die Infarktwarbe (weißer Pfeil) geschoben. Schwarzer Pfeil: gesunde Wand des linken Ventrikels. Blaue Pfeile: Zug- bzw. Schubruchtung auf das BCT.

Zur BCT-Implantation wurde die Spitze der Hohlneedle direkt in das infarzierte Gewebe eingeführt. Durch leichten Druck auf den Metallstab wurde das BCT in Richtung Hohlneedelspitze bewegt. Zeitgleich wurde die Kanüle langsam herausgezogen, sodass das BCT allmählich in den Einstichkanal innerhalb des Infarkttrandbereiches glitt. Als das BCT vollständig intramyokardial lag wurde die Hohlneedle entfernt und die Einstichstelle mit einer 7–0 Prolene Naht verschlossen (siehe Abbildungen 2.5 und 2.6). Die Transplantation erfolgte in den Infarkttrandbereich.

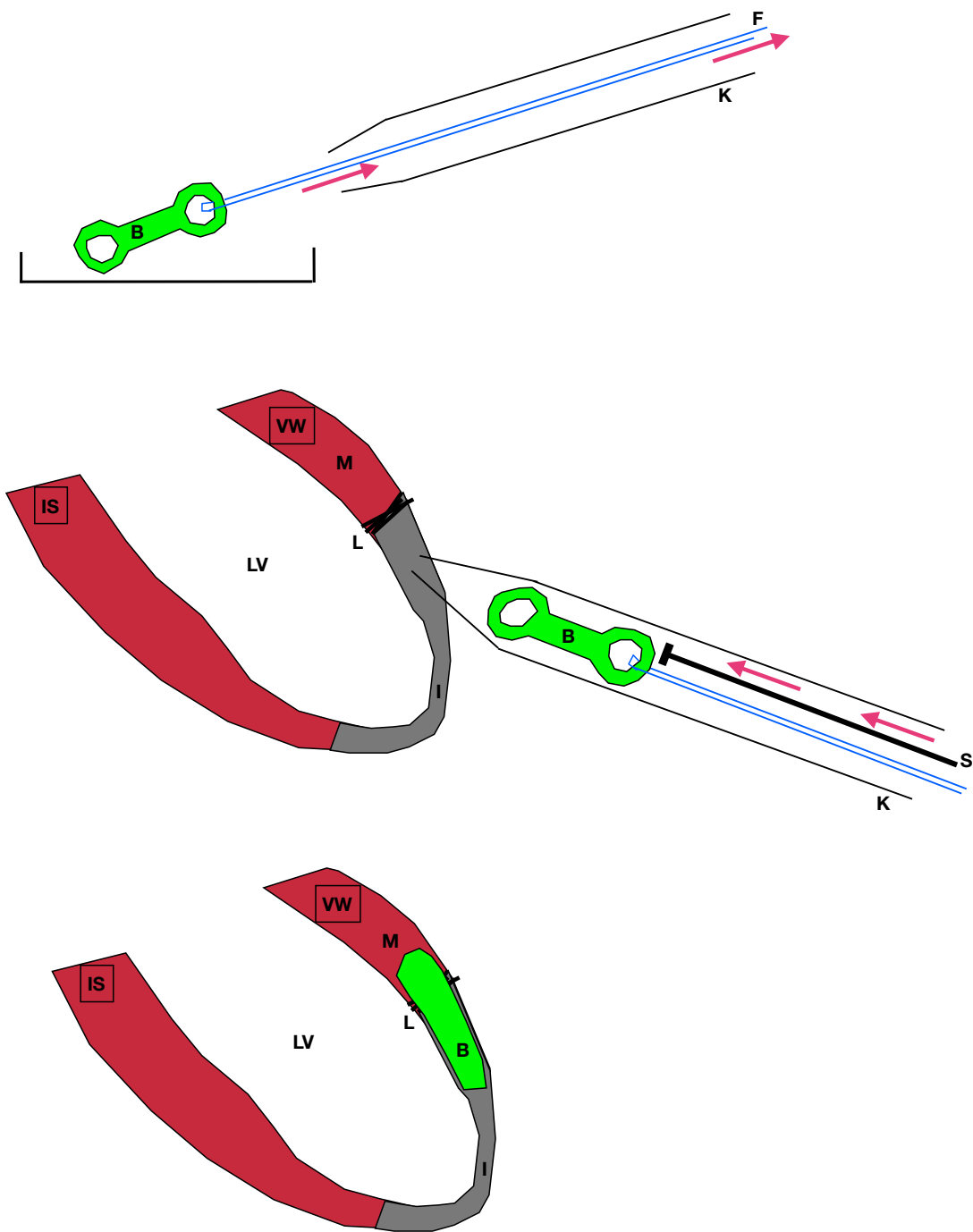


Abbildung 2.6: Schema der intramyokardialen BCT-Implantation. *Oberes Bild:* Das BCT (B) wird anhand eines Fadens (F) in das Lumen der Stahlkanüle (K) gezogen. *Mittleres Bild:* die Kanüle wird in die Wand des linken Ventrikels (LV) unterhalb der LAD-Ligatur (L) eingeführt und das BCT mittels eines Metallstäbchens (S) direkt in die Infarkt Narbe (I) geschoben. *Unteres Bild:* das BCT liegt intramyokardial in der Infarkttrandzone in der Vorderwand des linken Ventrikels (VW), auf Höhe der LAD-Ligatur. M: Myokard, IS: Interventrikularseptum.

Sham-Operation

In der Sham-Gruppe erfolgte eine einfache linksseitige anterolaterale Rethorakotomie ohne weiteren Eingriff am Herzen.

2.2.5 Herz Explantation

Vier Wochen nach Gewebetransplantation wurden die Herzen explantiert. Narkoseeinleitung, Intubation, Narkoseerhaltung und Analgesie fanden gemäß Abschnitt 2.2.3 statt. Die Tötung der Tiere erfolgte durch die Herzexplantation.

Die frischen Explantate wurden mit 0,9%-iger isotoner Kochsalzlösung gespült, um Blut und Zelltrümmer zu entfernen. Die Vorhöfe wurden auf Höhe der Klappenebene abgetrennt und die Ventrikel vollständig zur weiteren histologischen Untersuchung asserviert, in TissueTek® eingebettet und auf Trockeneis gekühlt. Das bei Raumtemperatur (RT) flüssige TissueTek® festigt sich bei niedrigeren Temperaturen und bildete so feste Gewebeblöcke. Diese wurden bis zur weiteren histologischen Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

2.2.6 Echokardiographie

Die echokardiographischen Untersuchungen erfolgten jeweils einen Tag vor der BCT-Implantation und der Herzexplantation (siehe Abbildung 2.1). Gemessen wurden der linksventrikuläre enddiastolische (LVEDD) und endsystolisch Durchmesser (LVESD) sowie das fractional shortening (FS) des linken Ventrikels.

Narkoseeinleitung, Intubation und Narkoseerhaltung wurden gemäß Abschnitt 2.2.3 durchgeführt. Die Tiere wurden in Rückenlage auf einer Wärmeplatte fixiert und Augensalbe wurde aufgetragen. Es wurde ein iE33 Echokardiographiesystem mit einem L15-7io Schallkopf (Philips Medical Systems, Hamburg) verwendet. Der Querschnitt durch linken Ventrikel und BCT auf Höhe der Papillarmuskeln wurde in der Kurzachsenaufnahme sichtbar. In den Längsachsenaufnahmen wurde der linke Ventrikel im Längsschnitt von der Herzspitze bis zur Mitralklappe dargestellt, um LVEDD und LVESD zu bestimmen. Im M-Mode wurden pro Tier mehrere Herzzyklen aufgezeichnet und das FS errechnet.

2.3 Histologischer Teil

Die verschiedenen histologischen Untersuchungen dienen der genauen Infarktgrößenbestimmung sowie der Analyse von Infarkt- und Graftmorphologie. Im Einzelnen wurden Überleben und Vaskularisierung der Grafts sowie die Ausbildung von gap junctions und Entzündungsreaktionen im Implantationsgebiet untersucht.

2.3.1 Infarktgrößenbestimmung und Graftlokalisierung

Anfertigung von Gefrierschnitten

Die Verwendung von Gefrierschnitten wurde bevorzugt, da sich hiermit große Schnittmengen anfertigen lassen (siehe unten). Außerdem kann mit dieser Methode ein Wasserentzug mit folgender Gewebeschrumpfung vermieden werden.

Die Schnittanfertigung erfolgte an den Kryotomen HM 500 OM und HM 560 (Microm, Wall-dorf). Die bei -80°C gelagerten Gewebelöcke waren fest und konnten ohne weitere Einbettung geschnitten werden. Die Proben temperatur betrug -16°C und die Messertemperatur -25°C . Das Präparat wurde eingespannt und von der Klappenebene in Richtung Herzspitze getrimmt. Die Schnittanfertigung begann auf Höhe der LAD-Ligatur, kurz oberhalb des Infarktareals, und wurde bis zur Herzspitze fortgesetzt. Pro Serie wurden sieben Objektträger hergestellt, mit je zwei Transversalschnitten pro Objektträger. Die Schnittdicke betrug $12\mu\text{m}$, zwischen zwei Serien wurden $600\mu\text{m}$ getrimmt. Während des gesamten Schneidvorganges wurde möglichst lichtgeschützt gearbeitet, da eine zu starke Lichtexposition das GFP-Signal der Graftzellen abschwächt (siehe unten). Die Objektträger wurden über Nacht bei RT luftgetrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Der erste Objektträger jeder Serie wurde nach Masson Golder gefärbt und zur Infarktgrößenbestimmung verwendet. Die anderen Objektträger wurden systematisch für die Hämalaun-Eosin -, Immunfluoreszenz- und immunhistochemischen Färbungen sowie den TUNEL-Assay genutzt.

Infarktgrößenbestimmung

Die Infarktgrößenbestimmung erfolgte anhand der Masson-Goldner gefärbten Schnitte (siehe Abschnitt 2.3.2). Von allen Explantaten wurde jeweils der erste Objektträger jeder Serie angefärbt. So erhielt man pro Herz durchschnittlich 8 (4–13) Objektträger mit Transversalschnitten von der LAD-Ligatur bis zur Herzspitze. Der Abstand zwischen zwei sich folgenden Objektträgern betrug jeweils $744\mu\text{m}$ (siehe oben). So wurde der komplette Infarktbereich mit-samt des Grafts lokalisiert und über die gesamte Ventrikelwand dargestellt. Durch das unterschiedliche Färbeverhalten von Bindegewebe und Muskulatur in der Masson-Goldner-Färbung (siehe Tabelle 2.2) ließ sich die Infarktnarbe scharf vom umliegenden Myokard abgrenzen.

Die gefärbten Schnitte wurden 1:1 fotografiert (Canon 1000D, Belichtungszeit 1/60s, Blende 5,6) und mit dem Programm Image J analysiert. Für jeden Schnitt wurde der prozentuale Anteil des transmural infarzierten Gewebes am Gesamtumfang des linken Ventrikels bestimmt. Als transmural infarziert galten die Bereiche, in denen die Infarktnarbe über 50% der Wand-dicke betrug (siehe Abbildung 2.7). Alle Werte eines Herzens wurden gemittelt, und ergaben die prozentuale Infarktgröße im infarzierten Areal.

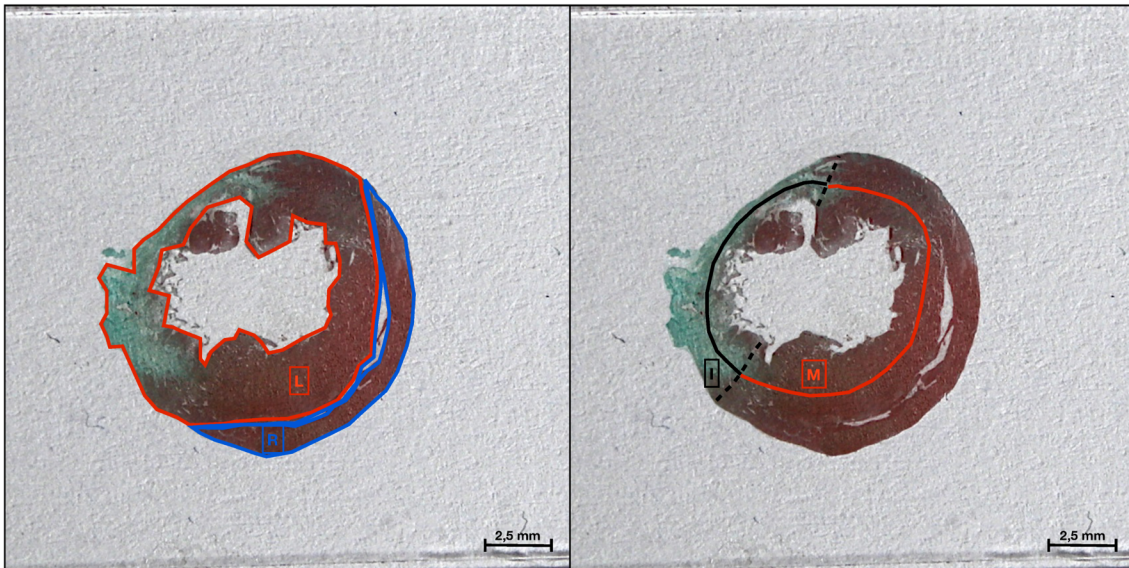


Abbildung 2.7: Infarktgrößenbestimmung anhand der Masson-Goldner-Färbung. *Linkes Bild:* Transversalschnitt durch das Herz mit linkem (rot, L) und rechtem (blau, R) Ventrikel. *Rechtes Bild:* Die Länge des transmural infarzierten Areals (schwarz, I) wurde in Relation zu dem Gesamtumfang des linken Ventrikels gesetzt: gesundes Myokard (rot, M) plus infarzierter Anteil. Als transmural infarziert galten die Bereiche, in denen die Infarktnarbe über 50% der Wanddicke betrug. Die schwarze gestrichelte Linie stellt die Grenze der Infarktzone dar. Maßstab entspricht 2,5mm.

GFP-Signal zur Graftlokalisierung

Durch die Verwendung von GFP (green fluorescence protein)-positiven Zellen zur BCT-Herstellung fluoreszierten diese bei Anregung im 488nm-Bereich grün. Diese Eigenschaft wurde sowohl während der Zellkultur als auch zur histologischen Auswertung genutzt. Direkt nach dem systematischen Schneiden der Herzen (siehe oben) wurden alle Schnitte am Fluoreszenzmikroskop auf das grüne Signal untersucht. So konnten die BCTs genau lokalisiert und bezüglich Zellbesiedlung, Größe und Morphologie charakterisiert werden.

Als zu einem späteren Zeitpunkt Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt wurden, mussten die Schnitte mit 2% Paraformaldehyd (PFA) fixiert werden. Durch diese Fixierung ging das GFP Fluoreszenzsignal verloren und konnte nicht mehr zur Graftlokalisierung genutzt werden. Die Fixierungsversuche mit 4% PFA, 37% PFA-Dampf und Aceton ermöglichten keinen besseren Erhalt des Signals. Dies ist eine häufig beschriebene Einschränkung [88], die durch den Einsatz eines anti-GFP-Antikörpers umgangen werden kann [74].

Aus diesem Grund wurde der GFP-Nachweis nach dem Fixierungsschritt mittels anti-GFP-Antikörper in einer immunhistochemischen Färbung durchgeführt. Diese wurde systematisch mit einer Immunfluoreszenzfärbung gegen Kollagen I kombiniert, um das BCT-Gerüst darzustellen (siehe Abschnitte 2.3.3). Zusätzlich konnte sie mit anderen Immunfluoreszenzfärbungen kombiniert werden (siehe Abschnitte 2.3.3 und 2.3.4).

2.3.2 Histologische Färbungen

Masson-Goldner-Trichrom Färbung

Die Masson-Goldner-Färbung wurde zur Infarktgrößenbestimmung genutzt (siehe Abschnitt 2.3.1). Zusätzlich wurden mit dieser Färbung Fibrosierungsgrad, Myozytenbesiedlung und Grenzschichtdicke zwischen Graft und Empfänger beurteilt (siehe Tabelle 2.2). Folgendes Protokoll wurde befolgt: siehe Tabelle 2.3. Verwendete Lösungen: siehe Tabelle A.13 im Anhang A. Die Objektträger wurden anschließend über Nacht luftgetrocknet und am Lichtmikroskop ausgewertet. Die weitere Aufbewahrung erfolgte lichtgeschützt bei RT.

Tabelle 2.2: Masson-Goldner-Trichrom Färbung

| Kerne | Zytoplasma und Muskulatur | Bindegewebe | Elastische Fasern |
|---------|---------------------------|-------------|-------------------|
| hellrot | blass rosa | blaugrün | ungefärbt |

Tabelle 2.3: Protokoll der Masson-Goldner-Trichrom Färbung

| Färbeschritt | Dauer |
|---|--------|
| Fixierung in Aceton bei -20°C | 8 min |
| Färben mit Weigerts Hämatoxylin | 3 min |
| Spülen unter fließendem Leitungswasser zum bläuen | 13 min |
| Färben mit Goldner-Lösung I | 10 min |
| Spülen in 1%-iger Essigsäure | 30 s |
| Differenzierung mit Goldner-Lösung II | 3 min |
| Spülen in 1%-iger Essigsäure | 30 s |
| Gegenfärben mit Goldner-Lösung III | 15 s |
| Auswaschen in 1%-iger Essigsäure | 3 min |
| Entwässerung mit 70%-igem Alkohol | 30 s |
| Entwässerung mit 96%-igem Alkohol | 30 s |
| Entwässerung mit 100%-igem Alkohol | 6 min |
| Xylol I | 5 min |
| Xylol II | 5 min |
| Objektträger mittels Eukitt® Eindeckmedium und Deckgläschen eindecken | — |

Hämalaun-Eosin Färbung (HE-Färbung)

Die HE-Färbung wurde systematisch durchgeführt und diente der genauen morphologischen

Analyse der Grafts, des Grenzbereiches zum Empfängergewebe und der Beurteilung von eventuell stattgefundenen Immunreaktionen in diesem Bereich (siehe Tabelle 2.4). Folgendes Protokoll wurde befolgt: siehe Tabelle 2.5. Verwendete Lösungen: siehe Tabelle A.14 im Anhang A. Die Objektträger wurden anschließend über Nacht luftgetrocknet und am Lichtmikroskop ausgewertet. Die weitere Aufbewahrung erfolgte lichtgeschützt bei RT.

Tabelle 2.4: HE-Färbung

| | | | |
|-------------|------------|-------------|-------------------|
| Kerne | Zytoplasma | Bindegewebe | Elastische Fasern |
| blauviolett | rot | rot | ungefärbt |

Tabelle 2.5: Protokoll der HE-Färbung

| Färbeschritt | Dauer |
|---|-----------|
| Fixierung in Aceton bei -20°C | 8 min |
| Schnitte an der Luft trocknen lassen | 1 min |
| Spülen in Aqua dest | 1 min |
| Färben mit Hämalaun nach Meyer | 8 min |
| Spülen unter fließendem Leitungswasser zum bläuen | 10 min |
| Spülen in Aqua dest | 1 min |
| Spülen in 95%-igem Alkohol | 10 x 30 s |
| Färben mit Eosin | 20 s |
| Entwässerung mit 95%-igem Alkohol | 5 min |
| Entwässerung mit 100%-igem Alkohol | 2 x 5 min |
| Xylol I | 5 min |
| Xylol II | 5 min |
| Objektträger mittels Eukitt® Eindeckmedium und Deckgläschen eindecken | — |

2.3.3 Immunfluoreszenzfärbungen

Die verschiedenen Immunfluoreszenzfärbungen wurden systematisch durchgeführt und dienten dem Nachweis zellspezifischer Antigene: das Sarkomerprotein Titin für Kardiomyozyten, das Oberflächenprotein CD31 (cluster of differentiation 31) für Endothelzellen, das Rattenkollagenbiosyntheseenzym Prolyl-4-Hydroxylase (rP4h) für Fibroblasten, der kernexprimierte kardiale Transkriptionsfaktor Nkx2.5 für kardiale Vorläuferzellen und das gap junction Protein Connexin 45 für interzelluläre Kontakte. Zusätzlich wurde immer eine 4',6-Diamidin-2-phenylindol

w(DAPI) Färbung durchgeführt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff lagert sich an Adenin-Thyminreiche Bereiche der DNA an und dient dem Kernnachweis.

Der Antigennachweis erfolgte indirekt, mittels zweier Antikörper. Um ein bestimmtes Antigen zu markieren, wurde dieses erst mit dem spezifischen unmarkierten Primärantikörper inkubiert, dann mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet war. So konnte durch das Fluoreszenzsignal des Sekundärantikörpers der Antigen-Primärantikörper-Sekundärantikörper-Komplex lokalisiert und spezifische Proteine nachgewiesen werden. Das Blocken mit Tris-gepufferte Saline + (TBS+) diente der Zellmembranpermeabilisierung und verhinderte unspezifische Antikörperbindungen.

Die Fluoreszenzfarbstoffe der Sekundärantikörper konnten durch die verschiedenen Filterkombinationen der beiden Fluoreszenzmikroskope (siehe Abschnitt A.2.1) in je einer von vier Wellenlängen angeregt werden: 358, 488, 549 oder 649nm. Daher war es möglich, neben der DAPI-Kernfärbung bis zu drei verschiedenen Immunfluoreszenzfärbungen auf einem einzelnen Schnitt zu kombinieren. Folgendes Protokoll wurde befolgt: siehe Tabelle 2.6. Verwendete Antikörper und Seren: siehe Tabellen A.9 bis A.12 im Anhang A. Verwendete Lösungen: siehe Tabelle A.15 im Anhang A. Während des Färbevorgangs befanden sich die Objektträger bei RT in einer feuchten und lichtgeschützten Kammer. Sie wurden über Nacht bei RT luftgetrocknet und anschließend am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die weitere Lagerung erfolgte bei 4°C im Dunkeln.

Tabelle 2.6: Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung

| Färbeschritt | Dauer |
|--|-----------|
| Fixierung in 2%-igem PFA bei RT | 4 min |
| Umrandung der Schnitte auf den Objektträgern mit einem Fettstift | — |
| Waschen in PBS | 3 x 5 min |
| Blocken mit TBS+ | 20 min |
| Waschen in PBS | 3 x 5 min |
| Färben mit bis zu drei Primärantikörpern | 60 min |
| Waschen in PBS | 3 x 5 min |
| Färben mit bis zu drei Sekundärantikörpern | 30 min |
| Waschen in PBS | 3 x 5 min |
| Kernfärbung mit DAPI | 15 min |
| Waschen in PBS | 5 min |
| Objektträger mittels Mounting medium und Deckgläschen eindecken | — |

2.3.4 immunhistochemische Färbungen

Die immunhistochemische Färbung mittels anti-GFP-Antikörper diente dem dauerhaften Nachweis der GFP-positiven Spenderzellen (siehe Abschnitt 2.3.1). So konnten die transplantierten Zellen histologisch vom Empfängermyokard unterschieden werden. In Kombination dazu ermöglichte die Immunfluoreszenzfärbung zusätzlich den Nachweis bereits genannter Antigene (siehe Tabelle A.9). Da es mit den vorhandenen Mikroskopen nicht möglich war, Immunfluoreszenz und Immunhistochemie simultan aufzunehmen, wurden für jeden Bereich zwei Bilder gemacht und gegenübergestellt (siehe Ergebnisse).

Bei der immunhistochemischen Färbung handelte es sich ebenfalls um eine indirekte Nachweismethode, mit einem spezifischen unmarkierten Primärantikörper und einem Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet war. Der Sekundärantikörper war biotinyliert: an das wasserlösliche Vitamin Biotin kovalent gebunden. Nach der Inkubation mit den Primär- und Sekundärantikörpern wurde mit einem Avidin-Biotin-Meerrettichperoxidase (ABC)-Komplex inkubiert. Das Hühnerprotein Avidin ging hochaffine Bindungen mit dem biotinylierten Sekundärantikörper ein. Das dazugegebene Substrat LinRed reagierte mit der Peroxidase und bildete einen roten Niederschlag. Immunhistochemisch wurden GFP-positive Zellen somit rot dargestellt (siehe Ergebnisse). Der Vorteil dieser Methode war ihre hohe Sensitivität, da endogene Peroxidasen und Biotin mittels H_2O_2 und Avidin/Biotin Blocking Solution geblockt wurden. Zusätzlich wurde mit Serum geblockt um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Folgendes Protokoll wurde befolgt: siehe Tabelle 2.7. Verwendete Lösungen: siehe Tabelle A.16 im Anhang A.

Während des Färbevorgangs befanden sich die Objektträger bei RT in einer feuchten und lichtgeschützten Kammer. Sie wurden über Nacht bei RT luftgetrocknet und am Lichtmikroskop ausgewertet. Die weitere Aufbewahrung erfolgte lichtgeschützt bei RT.

Für die kombinierte Immunfluoreszenz-immunhistochemische Färbung wurde erst die Immunfluoreszenz (siehe Tabelle 2.6) dann die Immunhistochemie (siehe Tabelle 2.7) durchgeführt. Lediglich der Fixierungsschritt der Immunhistochemie entfiel. Die gefärbten Objektträger wurden am Fluoreszenz- und am Lichtmikroskop ausgewertet und lichtgeschützt bei $4^\circ C$ gelagert. Des Weiteren konnte die immunhistochemische Färbung mit einer Hämalaun-Kernfärbung kombiniert werden. Dafür wurden die Objektträger nach dem Reaktionsstop in Aqua Dest (siehe Tabelle 2.6) für 4 s in filtrierte Hämalaun-Lösung getaucht. Anschließend wurde für 12 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Eindeckung, Auswertung und Lagerung erfolgten entsprechend der einfachen Immunhistochemischen Färbung.

Tabelle 2.7: Protokoll der immunhistochemischen Färbung

| Färbeschritt | Dauer |
|--|-----------|
| Fixierung in 2%-igem PFA bei RT | 4 min |
| Umrandung der Schnitte auf den Objektträgern mit einem Fettstift | — |
| Waschen in PBS | 3 x 5 min |
| Blocken der endogenen Peroxidasen mit 3%-igem H ₂ O ₂ | 5 min |
| Waschen in PBS | 3 x 5 min |
| Blocken mit 5%-igem Serum | 20 min |
| Waschen in PBS | 3 x 5 min |
| Endogenes Biotin blocken (erster Schritt) mit Avidin Blocking Solution | 15 min |
| Waschen in PBS | 5 min |
| Endogenes Biotin blocken (zweiter Schritt) mit Biotin Blocking Solution | 15 min |
| Waschen in PBS | 2 x 5 min |
| Inkubation mit dem Primärantikörper bei RT | 30 min |
| Waschen in PBS | 3 x 5 min |
| Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper bei RT | 30 min |
| Waschen in PBS | 3 x 5 min |
| Zugabe des ABC-Komplexes | 30 min |
| Waschen in PBS | 3 x 5 min |
| Anfärben mit dem Substrat LinRed, unter Mikroskopkontrolle | 6 min |
| Wenn die gewünschte Farbintensität erreicht ist, weitere Reaktion durch Waschen in Aqua Dest stoppen | — |
| Objektträger mittels Mounting medium und Deckgläschen eindecken | — |

2.3.5 TUNEL-Immunfluoreszenz

Färbung

Der Terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL) Assay beruht auf dem Nachweis von freien 3'OH-Enden in der genomischen DNA apoptotischer Zellen. Das Enzym Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) katalysiert die Bindung von Desoxyuridintriphosphat (dUTP) an diese freien 3'OH-Enden. An dem dUTP war der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein gebunden, sodass die DNA-Strangbrüche in den einzelnen Zellkernen im Fluoreszenzmikroskop sichtbar wurden. DNA-Strangbrüche mit freien 3'OH-Enden sind charakteristisch für apoptotische Zellen, sodass mit diesem Assay ausschließlich jene nachgewiesen wurden, und keine nekrotischen Zellen. Folgendes Protokoll wurde durchgeführt: siehe Tabelle 2.8. Verwendete Lösungen: siehe Tabelle A.17 im Anhang A. Während des Färbeprozesses befanden sich die Objektträger bei RT in einer feuchten und lichtgeschützten Kammer. Sie wurden über Nacht bei RT luftgetrocknet und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die weitere Lagerung erfolgte bei 4°C im Dunkeln.

Tabelle 2.8: Protokoll der TUNEL-Immunfluoreszenz

| Färbeschritt | Dauer |
|--|-----------|
| Fixierung in 2%-igem PFA bei RT | 4 min |
| Umrandung der Schnitte auf den Objektträgern mit einem Fettstift | – |
| Waschen in PBS | 2 x 5 min |
| Zellmembranpermeabilisierung mit Natriumcitratlösung | 30 min |
| Waschen in PBS | 2 x 5 min |
| TUNEL-Reaktion: TdT Enzym- und Fluorescein-Nukleotid Lösung | 90 min |
| Waschen in PBS | 2 x 5 min |
| Kernfärbung mit DAPI | 15 min |
| Waschen in PBS | 2 x 5 min |
| Objektträger mittels Mounting medium und Deckgläschen eindecken | – |

Kontrollen

Als Negativkontrolle wurde das oben aufgeführte Protokoll (siehe Tabelle 2.8) ohne TdT-Zugabe durchgeführt.

Als Positivkontrolle wurden BCTs benutzt, bei denen die Apoptose in vitro induziert wurde. Nach 14 Tagen Kultur wurden diese BCTs für 22 Stunden in einer 1:1000 in normalem Zellkulturmedium verdünnten Staurosporin-Lösung bei 37°C inkubiert. Staurosporin aus *Streptomy-*

ces aktivierte intrinsische Apoptose-Signalkaskaden und induzierte den Zelltod. Anschließend wurde das vollständige Protokoll (siehe Tabelle 2.8) durchgeführt.

2.3.6 Quantitative Auswertungen

Bestimmung der Gefäßdichte in den BCTs

Die Gefäßdichte in den BCTs wurde anhand der CD31-positiven Strukturen bestimmt. Von jedem Herz wurden 3 Schnitte verschiedener Ebenen verwendet. Jeder Schnitt wurde am Fluoreszenzmikroskop mit einem 20er Objektiv abgefahren und die CD31-positiven gefäßähnlichen Strukturen in den BCT-Querschnitten wurden manuell ausgezählt. Das Ergebnis wurde durch die jeweilige BCT-Fläche geteilt. Dies ergab die Gefäßdichte/mm² im BCT. Für die Sham-Gruppe wurden die CD31-positiven gefäßähnlichen Strukturen in 3 Infarktzonequerschnitten manuell ausgezählt und durch die jeweilige Infarktfläche geteilt. Die Werte jeder Gruppe wurden gemittelt und die Gruppen miteinander verglichen.

Quantifizierung der Titin- und rP4h-positiven Bereiche

Für die Quantifizierungen der Titin- und rP4h-positiven Bereiche wurden von jedem Herz 3 Schnitte verschiedener Ebenen verwendet. Auf jedem Schnitt wurde das BCT identifiziert. Aus diesem Bereich wurden am Fluoreszenzmikroskop mit einem 10er Objektiv nach dem Zufallsprinzip 2 ROIs (region of interest) ausgewählt und fotografiert. Alle Bilder wurden mit der gleichen Belichtungszeit aufgenommen. Die Eigenfluoreszenz des gesunden Myokards und des Matrigel[®]s generierte falsch positive Werte in der automatisierten Fluoreszenzintensitätsbestimmung. Aus diesem Grund wurden die Titin- bzw. rP4h-positiven Areale in dem Programm Axiovision 4.7.2 manuell definiert. Für jede ROI wurde der Anteil der Titin- bzw. rP4h-positiven Bereiche berechnet, in % der untersuchten BCT-Fläche. Anschließend wurden alle Werte einer Gruppe gemittelt und die Gruppen miteinander verglichen.

Unterteilung in BCT-Zentrum und -Randzone

Um die Verteilung aller positiv angefärbten Bereiche differenzierter beschreiben zu können, wurde zwischen BCT-Randzone und -Zentrum unterschieden. Im Durchlichtbild konnte die BCT-Gesamtfläche strukturell vom umliegenden Gewebe abgegrenzt werden. Als BCT-Zentrum wurde der Kollagen I-positive Bereich definiert, in dem noch eine deutliche Matrigel[®]-Struktur zu finden war. Die BCT-Randzone ergab sich aus der Subtraktion des BCT-Zentrums von der gesamten BCT-Fläche (siehe Abbildung 2.8).

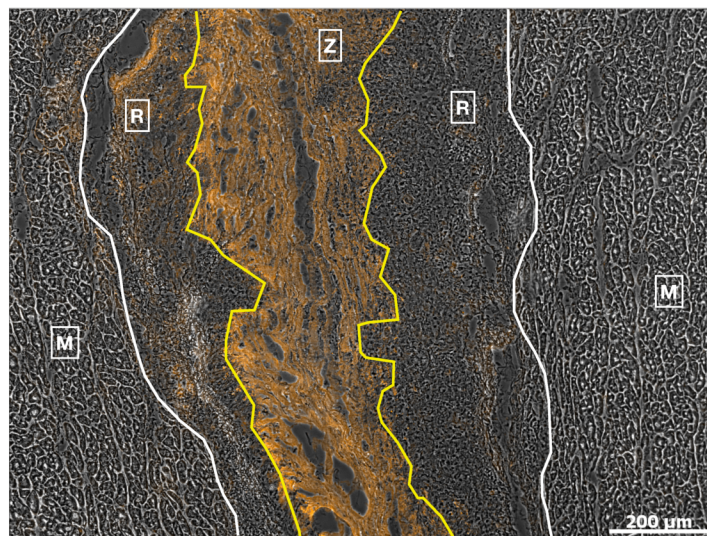


Abbildung 2.8: BCT-Unterteilung in Zentrum und Randzone. Durchlichtbild eines Intra-K BCTs mit Kollagen I Färbung (orange). Die äußere Grenze der BCTs ist im Durchlichtbild sichtbar (weiße Umrandung). Als BCT-Zentrum (Z) wird der Kollagen I-positive Bereich definiert (gelbe Umrandung). Die BCT-Randzone (R) ergab sich aus der Subtraktion des BCT-Zentrums von der gesamten BCT-Fläche. M: gesundes Myokard. Maßstab entspricht 200µm.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Histologische Charakterisierung der BCTs in vitro

3.1.1 BCT-Struktur in vitro

Nach 14 Tagen in Kultur wiesen sowohl die Kardiomyozyten-BCTs (K-BCTs) als auch die Fibroblasten-BCTs (F-BCTs) eine Länge von 6mm und einen Querschnitt von 1,3mm² auf. Die K-BCTs kontrahierten spontan, mit einer Frequenz von 56 Schläge/min. Beide BCT-Typen bestanden aus einem trabekelartigen Matrigel[®]-Gerüst. Mikroskopisch stellte sich das Gerüst aus einzelnen zellbesiedelten Matrixfäden zusammen (siehe Abbildung 3.1). Die K-BCTs präsentierten dickere Matrixfäden, die eine gleichmäßigere parallele Anordnung aufwiesen.

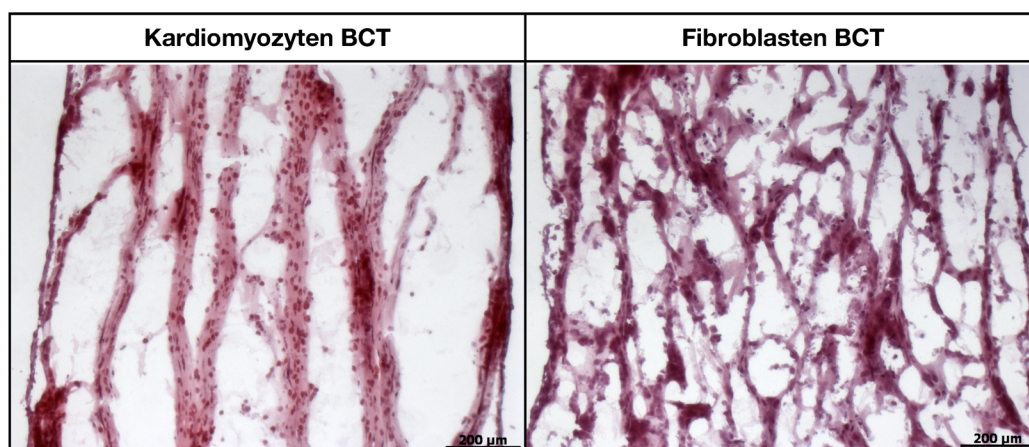


Abbildung 3.1: Struktur der BCTs in vitro, HE-Färbung. Maßstab entspricht 200µm.

Die Zelldichte an den Außenflächen der BCTs war höher als im Zentrum. Dies erklärt sich durch die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Zellen *in vitro*, die ausschließlich durch Diffusion von aussen nach innen erfolgt.

3.1.2 Zellbesiedlung *in vitro*

In beiden BCT-Typen bildeten die Zellen dichte Netzwerke auf den einzelnen Matrixfäden des Matrigel®-Gerüsts. Die Zelldichte in den K-BCTs war sichtbar höher als in den F-BCTs. Der in der Immunhistochemie rote Green Fluorescence Protein (GFP)-Nachweis zeigte, dass die Spenderzellen vor Transplantation das GFP exprimierten (siehe Abbildung 3.2). Das immunhistochemische GFP-Signal konnte daher im Verlauf zur Lokalisierung der Spenderzellen in den GFP-negativen Empfängerherzen genutzt werden.

Der TUNEL-Assay zeigte vereinzelte apoptotische Zellen (siehe Abbildung 3.2), sowohl in den K- als auch in den F-BCTs waren es im Mittel 4 apoptotische Zellen/mm².

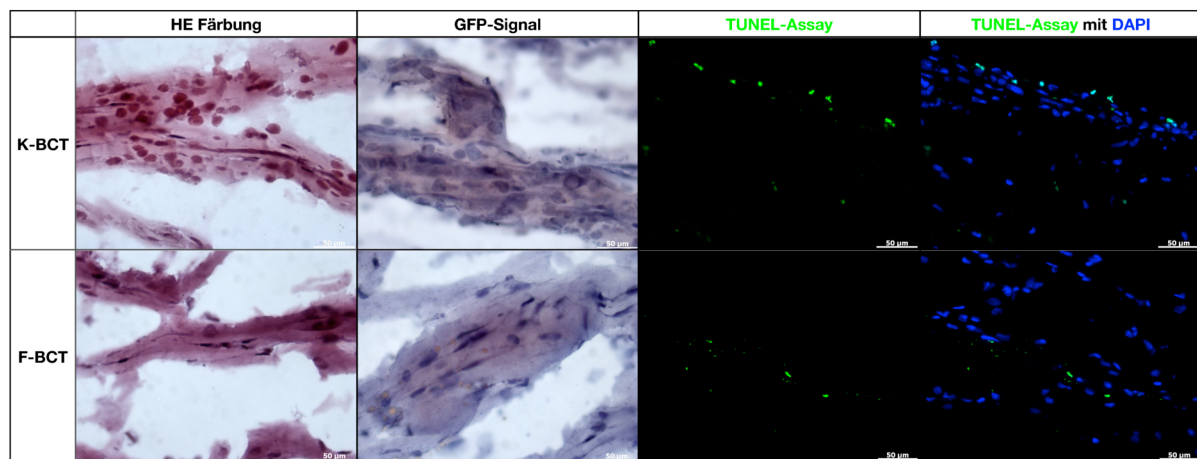


Abbildung 3.2: Zellbesiedlung der BCTs *in vitro*, HE-Färbung, immunhistochemischer GFP-Nachweis und TUNEL-Assay. In der Immunhistochemie sind die GFP-positiven Bereiche rötlich angefärbt, im TUNEL-Assay sind grüne Zellen positiv und somit apoptotisch. DAPI-Kernfärbung in blau. Maßstab entspricht 50µm.

3.1.3 Zellcharakterisierung *in vitro*

Kardiomyozyten-BCTs

Die K-BCTs wurden aus Matrigel® und 1×10^6 neonatalen Rattenherzzellen hergestellt. Sie enthielten somit eine gemischte kardiale Zellpopulation aus Kardiomyozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und weiteren Zellen [35].

Nach 14 Tagen *in vitro* bildeten die Titin-positiven Kardiomyozyten der BCTs einen ausgerichteten Zellverband vornehmlich an der BCT-Oberfläche, der aus mehreren Zellschichten bestand. Die Zellen waren parallel zur Längsachse der BCTs ausgerichtet, was der Zugrichtung der mechanischen Stimulation im Bioreaktor entsprach. Außerhalb dieses Verbandes, im Zentrum der

BCTs, waren nur einzelne Kardiomyozyten zu finden. Auch die CD31-positiven Endothelzellen besiedelten vorzugsweise die BCT-Oberfläche, und formten einen lockereren Zellverband. Über das gesamte BCT verteilt waren wenige prolyl-4-Hydroxylase-positiv (rP4h) Fibroblasten und CD11b-positiv Zellen vorhanden. Bei letzteren könnte es sich um Makrophagen, Lymphozyten sowie Granulozyten handeln. Es wurden einzelne kardiale Vorläuferzellen mit Nkx2.5-positivem Kern nachgewiesen, ein Hinweis auf das Differenzierungspotential der K-BCTs. Vorhandene Connexin 45-positiv Bereiche wiesen auf eine potentielle elektromechanische Kopplung über gap junctions zwischen den Kardiomyozyten hin (siehe Abbildung 3.3).

Fibroblasten-BCTs

Die Herstellung der F-BCTs erfolgte mit $0,5 \times 10^6$ Fibroblasten aus neonatalen Rattenherzen. Durch eine 30 Gy Bestrahlung waren die Zellen teilungsunfähig, womit eine überschießende Fibrose verhindert wurde. Die rP4h Färbung zeigte einen lockereren Fibroblastenverband über das gesamte BCT. Wie in den K-BCTs wurden in der CD11b-Färbung einzelne Leukozyten gefunden. Die Titin, CD31, Nkx2.5 und Connexin Färbungen fielen negativ aus, da die F-BCTs ausschließlich Fibroblasten enthielten (siehe Abbildung 3.4).

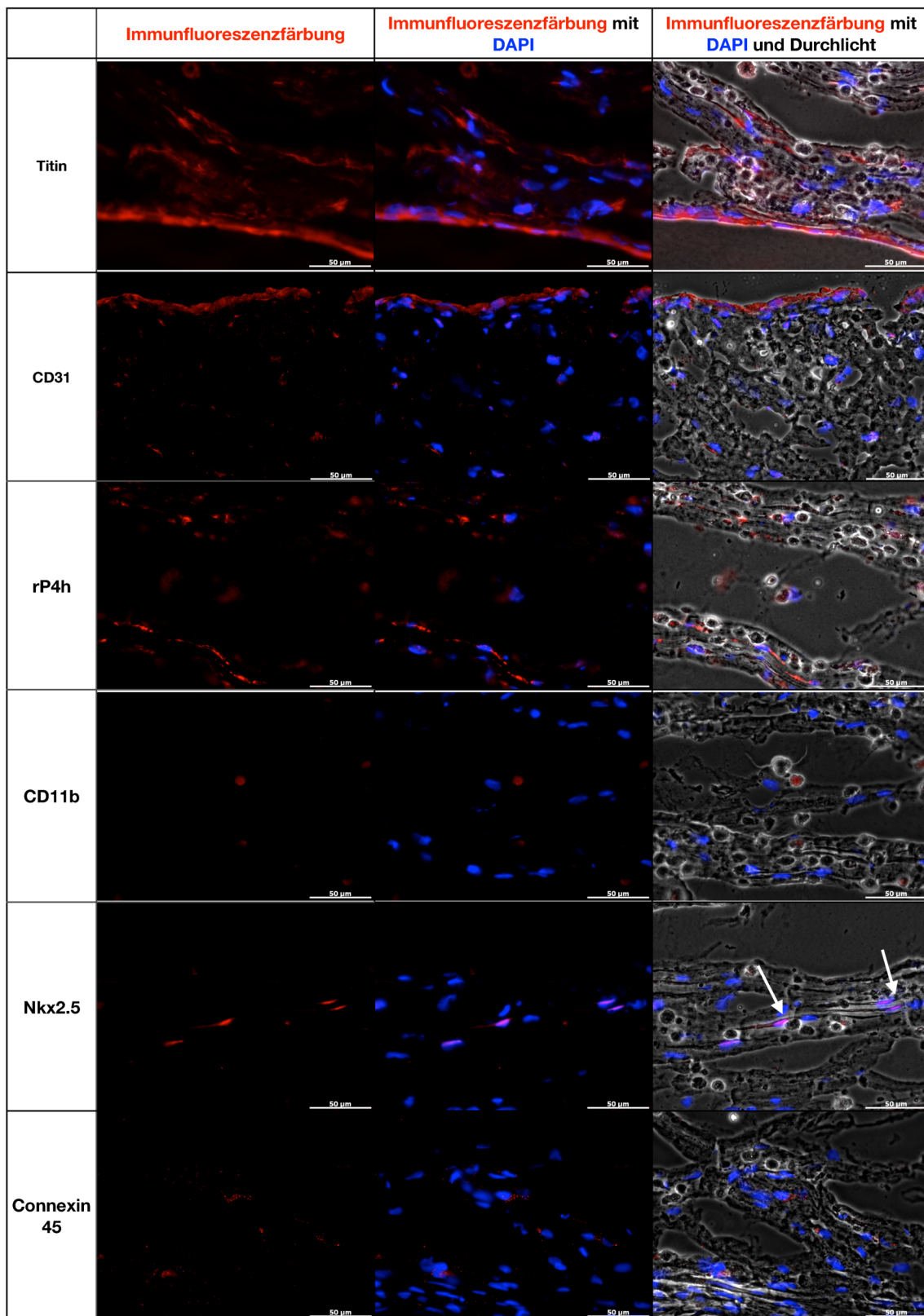


Abbildung 3.3: Zellcharakterisierung der K-BCTs in vitro, Immunfluoreszenzfärbungen. Bei den einzelnen Bildzeilen handelt es sich um den gleichen Bildausschnitt. Die positiven Bereiche für das nachgewiesene Antigen sind rot, die DAPI-Kernfärbung blau. Nkx2.5-positive Zellkerne sind durch weiße Pfeile markiert. Maßstab entspricht 50µm.

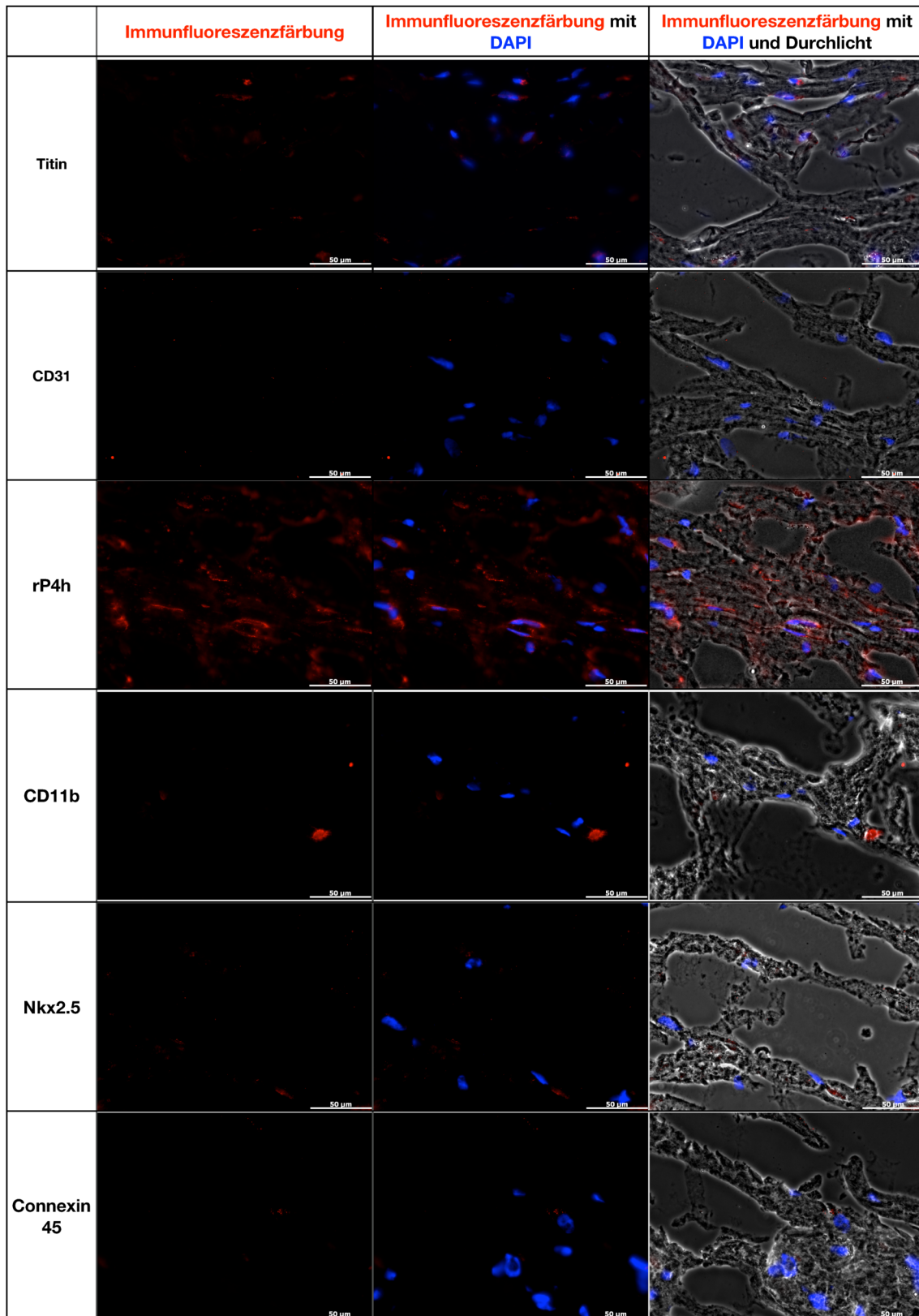


Abbildung 3.4: Zellcharakterisierung der F-BCTs in vitro, Immunfluoreszenzfärbungen. Bei den einzelnen Bildzeilen handelt es sich um den gleichen Bildausschnitt. Die positiven Bereiche für das nachgewiesene Antigen sind rot, die DAPI-Kernfärbung blau. Maßstab entspricht 50µm.

3.2 Charakterisierung der BCTs nach Explantation

3.2.1 Operativer Teil

LAD-Ligatur und Infarktgröße

Die LAD-Ligatur überlebten 92% der Ratten. Für die weiteren Versuche wurden ausschließlich Tiere mit einer eingeschränkten Ventrikelpumpfunktion verwendet, was durch ein post-infarzielles fractional shortening (FS) kleiner als 30% definiert wurde. Dies war in 62% der überlebenden Tiere der Fall. Diese 48 Ratten wurden randomisiert und in 4 Versuchsgruppen aufgeteilt. Jede Gruppe bestand demnach aus n=12 Ratten.

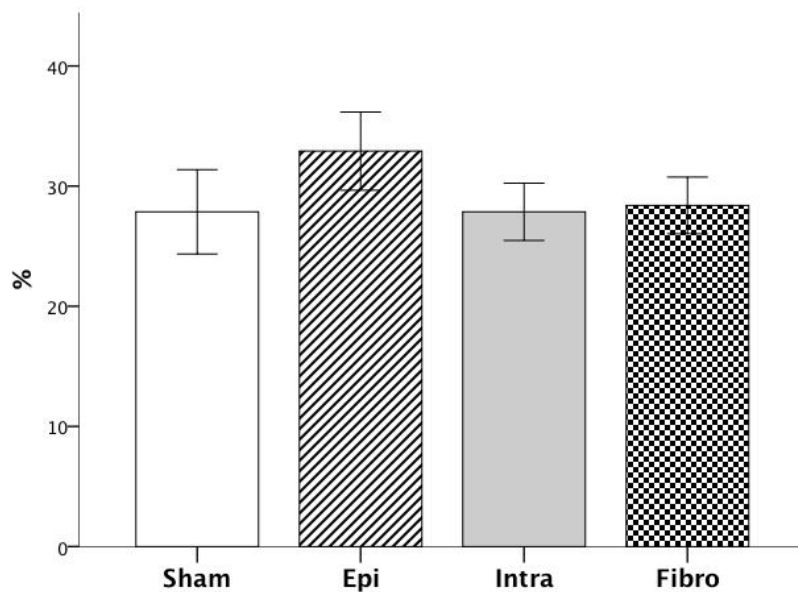


Abbildung 3.5: Prozentuale Infarktgröße im infarzierten Areal (Mittelwert \pm SEM). Kontrolltiere (Sham), Epi-K BCTs (Epi), Intra-K BCTs (Intra) und Intra-F BCTs (Fibro).

Der Infarktbereich betrug durchschnittlich 30% des Ventrikelquerschnittes (siehe Abbildung 3.5). Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Versuchsgruppen, daher konnten alle weiteren Untersuchungen unabhängig der Infarktgröße ausgewertet werden.

Epikardiale und intramyokardiale BCT-Transplantation

Die BCTs konnten vier Wochen nach Implantation an ihrem ursprünglichen Implantationsort lokalisiert werden (siehe Abbildung 3.6). Die epikardialen-BCTs lagen direkt auf der Infarktnarbe auf, die intramyokardialen-BCTs befanden sich in der Infarkttrandzone.

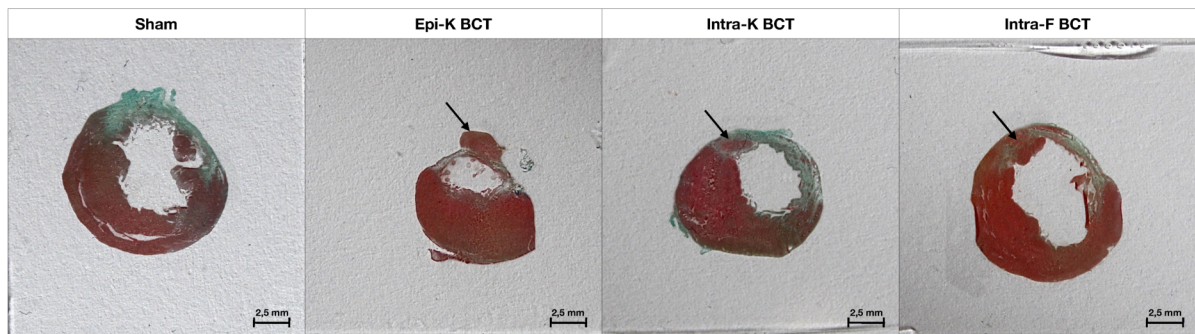


Abbildung 3.6: Querschnitte durch den linken Ventrikel, Masson-Goldner-Färbung zur BCT-Lokalisierung nach Explantation. Die BCTs sind durch schwarze Pfeile markiert. Maßstab entspricht 2,5mm.

3.2.2 BCT-Morphologie und Vitalität

Graft Morphologie nach Explantation

Vier Wochen nach Implantation hatten sich Morphologie und Zellbesiedlung der BCTs deutlich verändert. Der lockere Aufbau wurde durch eine kompaktere Struktur ersetzt. In den K-BCTs war das Matrigel®-Gerüst größtenteils abgebaut, in den F-BCTs war es noch unverändert vorhanden (siehe Abbildung 3.7).

Es konnten zwei Zonen innerhalb der BCTs unterschieden werden: ein zentraler Bereich mit dem noch vorhandenen Matrigel® und eine Matrigel®-arme zellreiche Randzone.

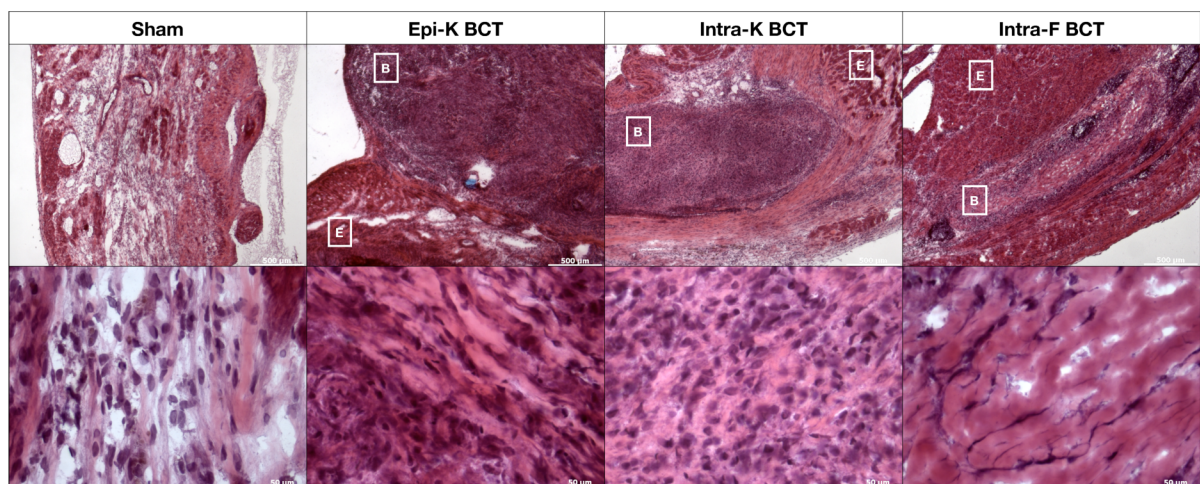


Abbildung 3.7: HE-Färbung zur Darstellung der BCT-Morphologie nach Explantation. *Obere Reihe:* Übergangszone zwischen BCT (B) und Empfängermyokard (E). Maßstab entspricht 500µm. *Untere Reihe:* Vergrößerung eines repräsentativen Bereiches aus der Infarktzone (Sham) bzw. dem jeweiligen BCT-Zentrum. Maßstab entspricht 50µm.

Die Zuordnung der Zellen zum Graft oder zum Empfänger erfolgte anhand des GFP-Signals (siehe unten).

GFP-Signal nach Explantation

Auf den frischen Kryoschnitten konnten die Spenderzellen durch das fluoreszierende GFP-Signal identifiziert werden (siehe Abbildung 3.8).

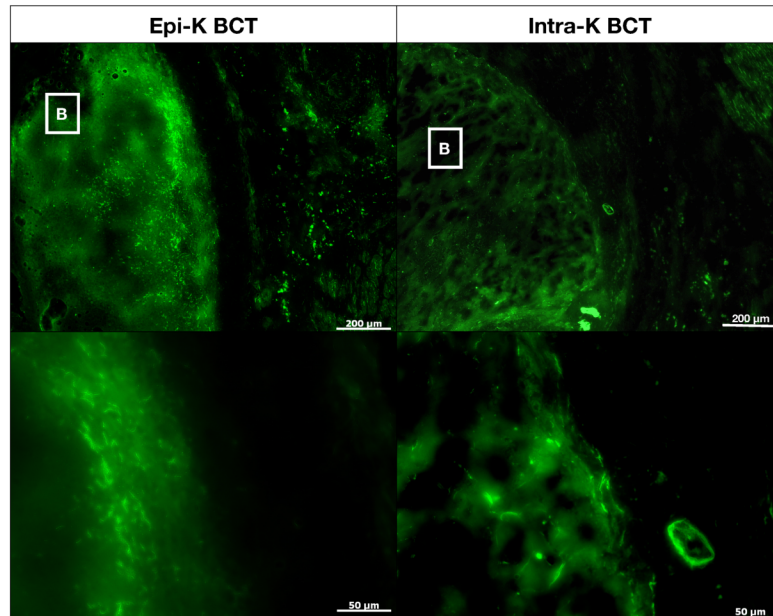


Abbildung 3.8: Grünes GFP-Signal direkt nach Explantation. *Obere Reihe:* Übersichtsbild der BCTs (B). Maßstab entspricht 200µm. *Untere Reihe:* Vergrößerung eines repräsentativen Bereiches aus dem jeweiligen BCT-Randbereich. Maßstab entspricht 50µm.

In den K-BCTs wurden in dem noch vorhandenen Matrigel[®]-Gerüst GFP-positive Zellen gefunden. Auch vier Wochen nach Implantation war das GFP-Signal in den Randbereichen der BCTs am stärksten. In den F-BCTs und in der Sham-Gruppe wurden wie erwartet keine GFP-positiven Zellstrukturen gefunden.

Da das GFP-Signal nach dem Einfrieren und anschließendem Fixieren der Kryoschnitte nicht mehr sichtbar war (siehe Abschnitt 2.3.1), wurde zur Charakterisierung der GFP-positiven Zellareale eine immunhistochemische Färbung durchgeführt (siehe Abbildung 3.9).

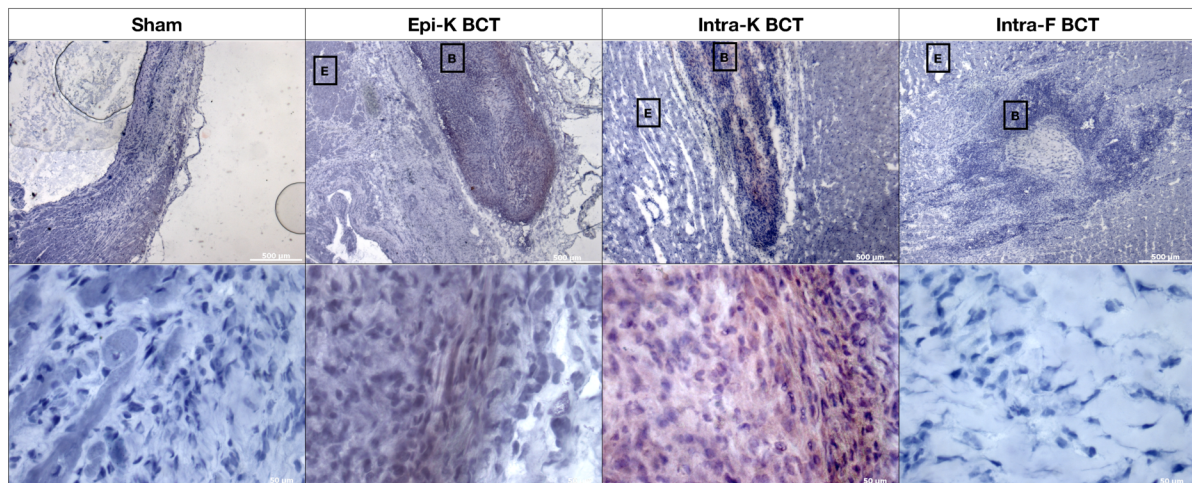


Abbildung 3.9: Immunhistochemischer GFP-Nachweis nach Explantation. Die GFP-positiven Bereiche sind rot, die Hämalaun-Kernfärbung blau. *Obere Reihe*: Übergangszone zwischen BCT (B) und Empfängermyokard (E). Maßstab entspricht 500µm. *Untere Reihe*: Vergrößerung eines repräsentativen Bereiches aus der Infarktzone (Sham) bzw. dem jeweiligen BCT-Zentrum. Maßstab entspricht 50µm.

Die K-BCTs wiesen sowohl in den Randzonen als auch im Zentrum GFP-positive Areale auf. Längliche Zellen in den Randbereichen ähnelten dem randständigen Kardiomyozytenverband vor Implantation (weitere Charakterisierung siehe Abschnitt 3.4). Auch die positiven Zellen im Inneren der BCTs bildeten zusammenhängende Zellverbände. Das GFP-Signal war in den Intra-K BCTs stärker als in den Epi-K BCTs. In den Intra-F BCTs und in der Sham-Gruppe konnten keine GFP-positiven Bereiche gefunden werden.

In allen BCTs fand zusätzlich eine Besiedlung mit GFP-negativen Zellen statt.

Zellvitalität und Vaskularisierung der BCTs

Die TUNEL-positiven, apoptotischen Zellen konzentrierten sich in allen Versuchsgruppen im BCT-Zentrum. Ihr Anteil an der Gesamtzellzahl betrug in allen Gruppen unter 1% (siehe Abbildung 3.10).

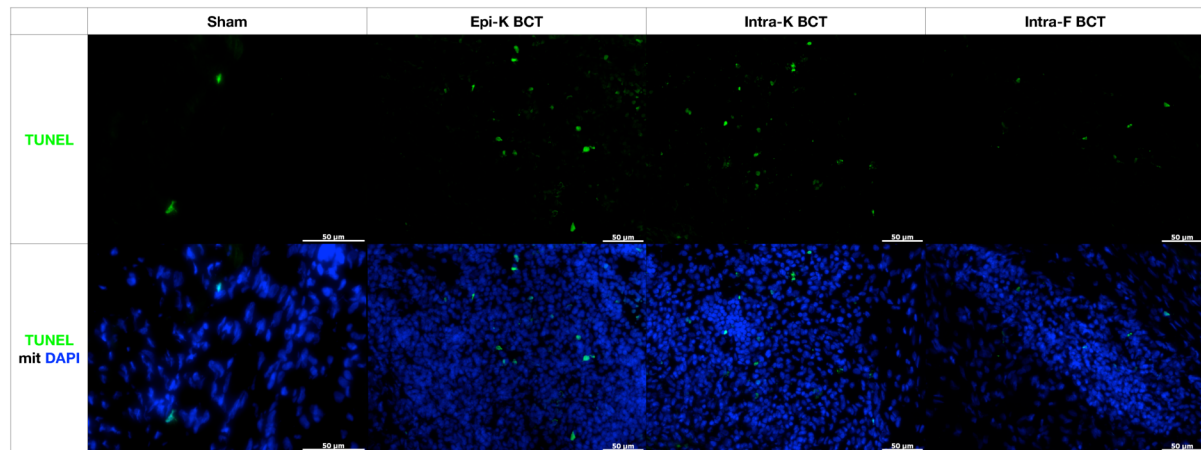


Abbildung 3.10: TUNEL-Assay zum Nachweis der Apoptoseereignisse zum Zeitpunkt der Explantation. TUNEL-positive Zellen in grün, DAPI-Kernfärbung in blau. Gezeigt sind die zentralen Bereiche der Infarktzone (Sham) bzw. der BCTs. Maßstab entspricht 50µm.

In allen Versuchsgruppen wurden CD31-positive, gefäßähnliche Strukturen gefunden. Sie konzentrierten sich in den Randbereichen der BCTs, sowohl in den Grafts als auch im Empfängermyokard. Die Intra-K BCTs enthielten viele klein- und großlumige Gefäßstrukturen von bis zu 100µm Durchmesser (siehe Abbildung 3.11).

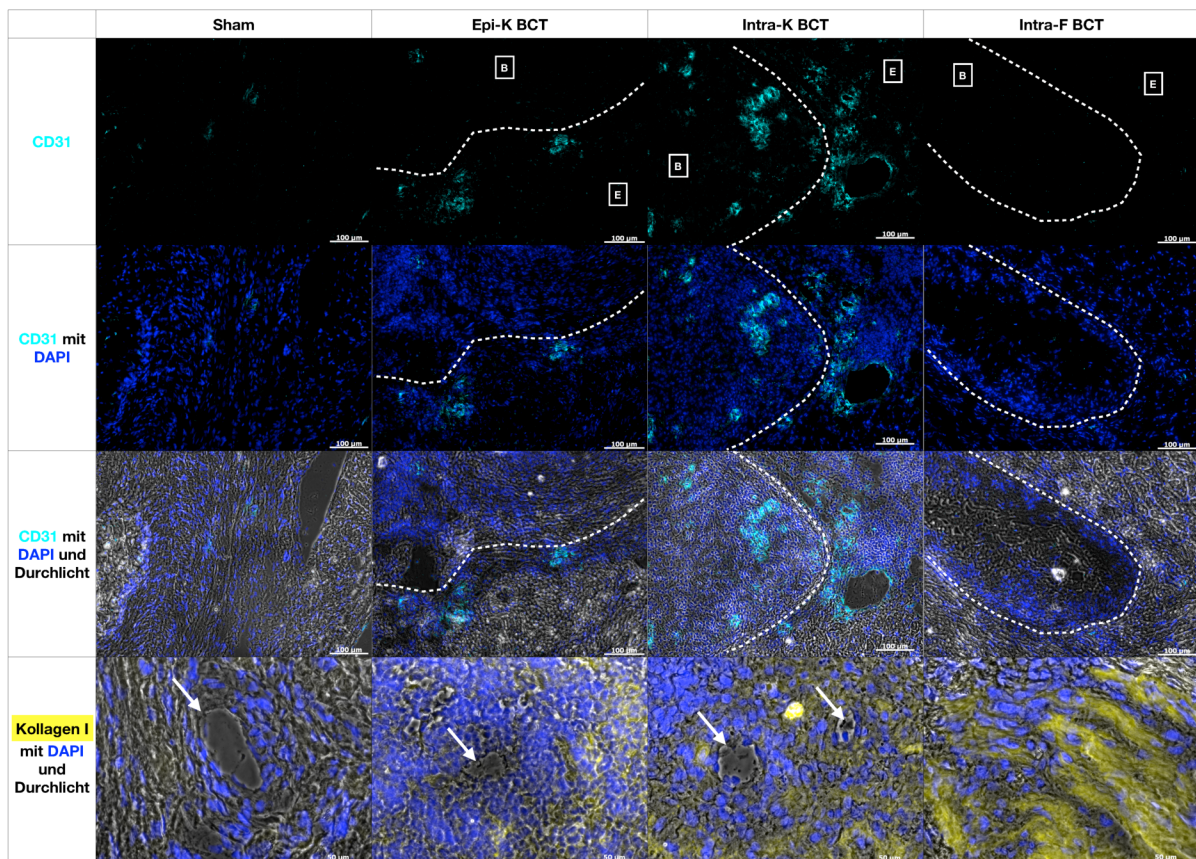


Abbildung 3.11: Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis des Endothelzellmarkers CD31. CD31-positive Zellen in Zyan, Kollagen I in gelb und DAPI-Kernfärbung in blau. *Obere drei Reihen:* Grenze (gestrichelte Linie) zwischen Empfänger (E) und BCT (B). Maßstab entspricht 100µm. *Untere Reihe:* Vergrößerung eines repräsentativen Bereiches aus der Infarktzone (Sham) bzw. dem jeweiligen BCT-Randbereich. Einzelne Gefäßstrukturen sind durch weiße Pfeile markiert. Maßstab entspricht 50µm.

Die Intra-K BCTs enthielten signifikant mehr Gefäßstrukturen im Vergleich zu den Infarktzone der Sham-operierten Tiere ($p=0,008$), den Intra-F BCTs ($p=0,03$) und den Epi-K BCTs ($p=0,0001$). Die Intra-F BCTs hatten eine ähnliche Gefäßkonzentration wie die Infarktzone der Kontrolltiere, die Epi-K BCTs eine geringere (siehe Abbildung 3.12).

Die Gefäßstrukturen in den K-BCTs waren zum Teil GFP-positiv, präsentierten geschlossene Lumina und enthielten Erythrozyten (siehe Abbildung 3.13).

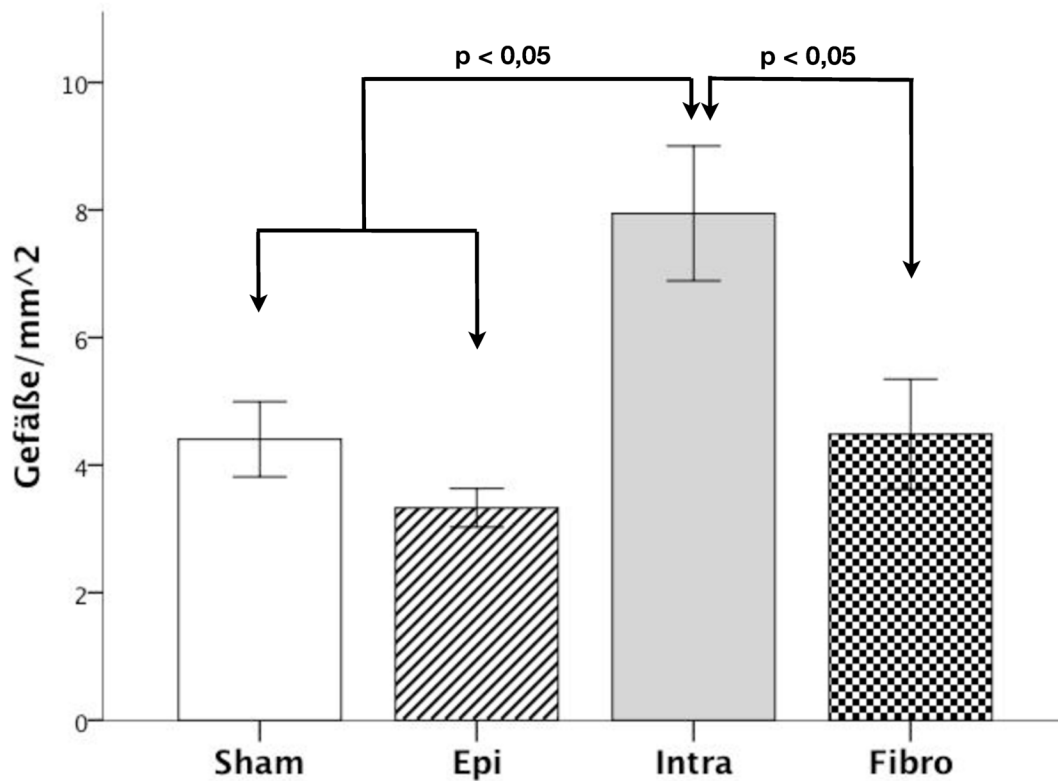


Abbildung 3.12: Quantifizierung der Gefäße in den BCTs nach Explantation. Angegeben ist die Anzahl der CD31-positiven Gefäßstrukturen/mm² (Mittelwert ± SEM).

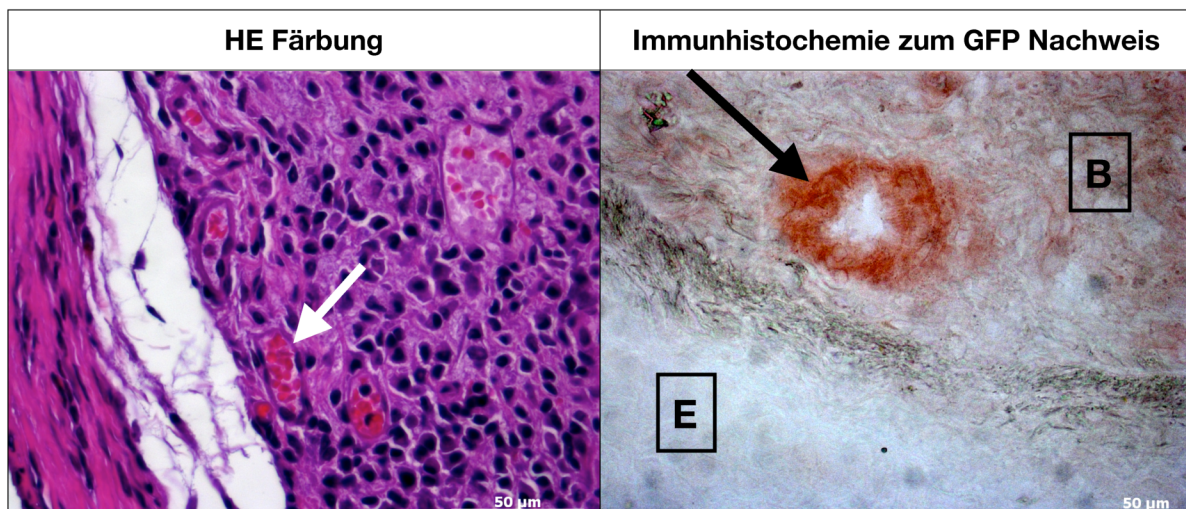


Abbildung 3.13: Nachweis einzelner Gefäßstrukturen in den Grafts nach Explantation. *Linkes Bild:* HE-Färbung eines Epi-K BCTs mit erythrozytengefüllten Gefäßen (weißer Pfeil). *Rechtes Bild:* immunhistochemische-Färbung eines Intra-K BCTs mit einem GFP-positiven Gefäß (schwarzer Pfeil) am Übergang zwischen BCT (B) und Empfänger (E). Maßstab entspricht 50µm.

3.2.3 BCT Immunogenität

Der panleukozytenmarker CD11b diente dem Nachweis von Lymphozyten, Granulozyten und Makrophagen (siehe Abbildung 3.14).

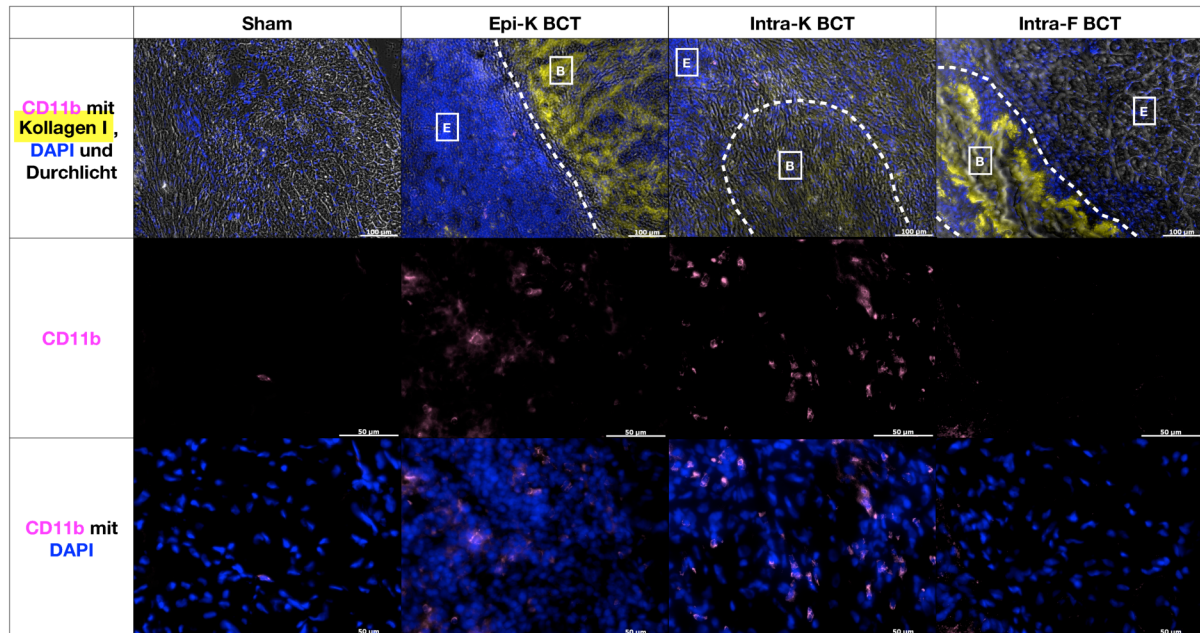


Abbildung 3.14: Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis des Panleukozytenmarkers CD11b. CD11b-positive Zellen in rosa, Kollagen I in gelb und DAPI-Kernfärbung in blau. *Obere Reihe*: Übersichtsbild aus dem Grenzbereich (gestrichelte Linie) zwischen BCT (B) und Empfängermyokard (E). Maßstab entspricht 100µm. *Untere Reihen*: Vergrößerung eines repräsentativen Bereiches aus der Infarktzone (Sham) bzw. dem jeweiligen BCT-Randbereich. Maßstab entspricht 50µm.

In den K-BCTs konzentrierten sich die CD11b-positiven Zellen in den Randzonen, ihr Anteil an der Gesamtzellzahl war gering. In den Sham-operierten Tieren und den F-BCTs wurden vereinzelt CD11b-positive Zellen nachgewiesen.

In der HE-Färbung wurde sichtbar, dass es sich um Lymphozyten und Makrophagen handelte. Die Schnitte wurden von einem unabhängigen Pathologen (Medizinische Hochschule Hannover, Zentrum Pathologie, Forensik und Genetik) untersucht. Dieser konnte keine Zeichen einer überschießenden Immunreaktion oder Abstoßungsreaktion feststellen. Es handelte sich um eine reguläre post-operative inflammatorische Reaktion.

3.3 Einfluss der BCTs auf die Herzfunktion

3.3.1 Effekte auf die diastolische Herzfunktion

Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser

Der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDD) ist der maximale Durchmesser des linken Ventrikels am Ende der Diastole. Ist der LVEDD erhöht, weist dies auf eine linksventrikuläre Dilatation hin.

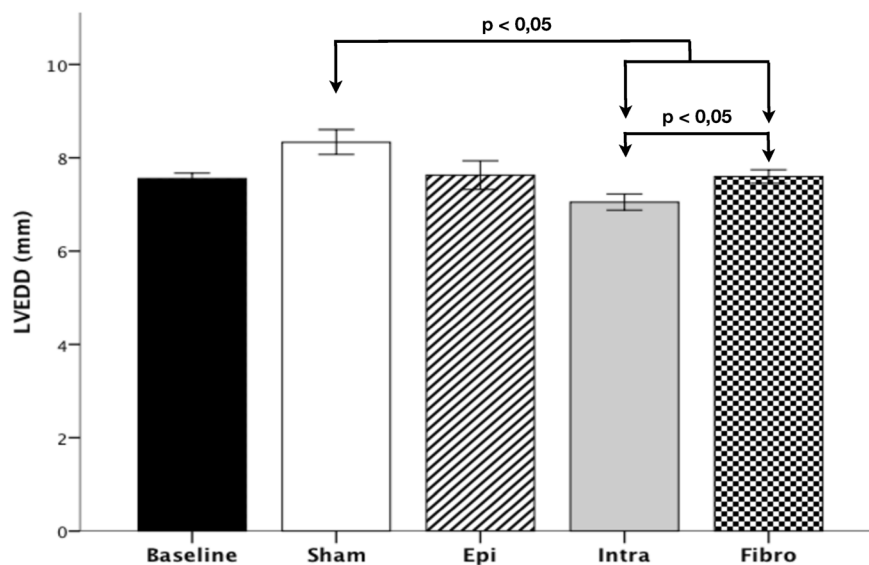


Abbildung 3.15: Echokardiographische Bestimmung des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers (LVEDD) vier Wochen nach BCT-Transplantation, in mm (Mittelwert \pm SEM). Baseline: Mittelwert aller Gruppen vor BCT-Transplantation.

In der Sham-Gruppe kam es sechs Wochen nach dem Infarktereignis zu einer Ventrikeldilatation, mit einer Erhöhung des LVEDDs auf über 8,0mm (siehe Abbildung 3.15). Im Vergleich dazu zeigten alle BCT-Gruppen einen geringeren Anstieg des LVEDDs. Eine signifikante Reduktion des LVEDDs im Vergleich zur Sham-Gruppe war ausschließlich in den intramyokardialen BCTs (Intra-K und Intra-F) zu beobachten, wobei die Intra-K BCTs signifikant bessere Ergebnisse zeigten als die Intra-F BCTs.

3.3.2 Effekte auf die systolische Herzfunktion

Linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser

Der linksventrikuläre endsystolische Durchmesser (LVESD) ist ein Maß für die Ventrikelkontraktion während der Systole. Eine Erhöhung des LVESDs weist auf eine Einschränkung der Kontraktionskraft des Myokards und eine Ventrikeldilatation hin.

Sechs Wochen nach dem Infarkt ereignis wiesen die Sham-Tiere eine eingeschränkte Ventrikel­pumpfunktion auf, mit einer Erhöhung des LVESDs auf über 6,0mm (siehe Abbildung 3.16). In allen transplantierten Gruppen fand im gleichen Zeitraum ein geringerer Anstieg des LVESDs statt. Eine signifikante Reduktion des LVESDs im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde ausschließlich in den Intra-K BCTs gemessen. Die Ergebnisse dieser Gruppe waren zudem signifikant besser als jene der Intra-F BCTs.

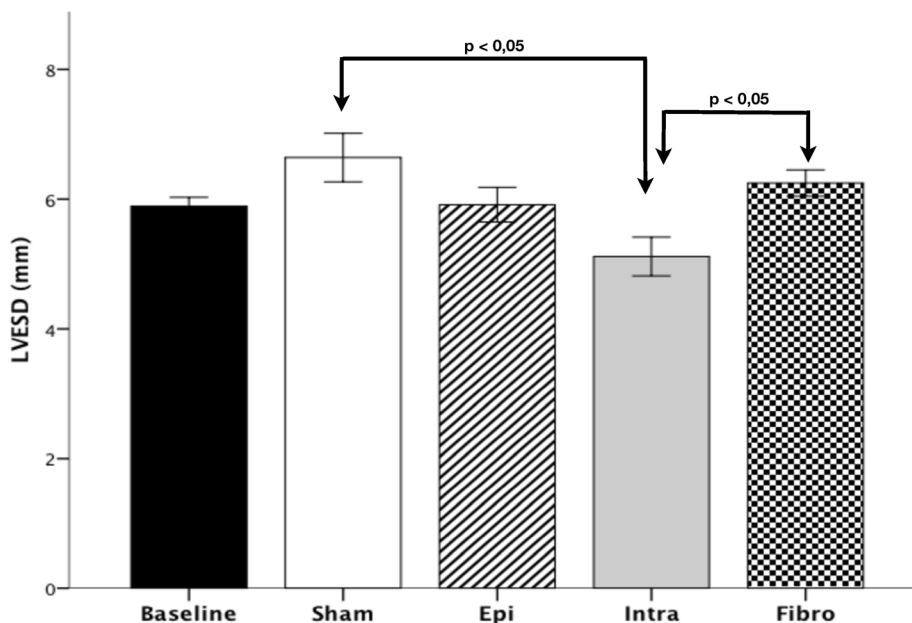


Abbildung 3.16: Echokardiographische Bestimmung des linksventrikulären endsystolischen Durchmessers (LVESD) vier Wochen nach BCT-Transplantation, in mm (Mittelwert \pm SEM). Baseline: Mittelwert aller Gruppen vor BCT-Transplantation.

Fractional Shortening

Das Fractional Shortening (FS) ist der Prozentsatz des linksventrikulären Durchmessers um den sich der linke Ventrikel während der Systole verkleinert. Das FS sinkt bei schlechter Ventrikel­pumpfunktion.

In der Sham-Gruppe und den Intra-F BCTs zeigte sich sechs Wochen nach dem Infarkt ereignis eine stark eingeschränkte Ventrikel­pumpfunktion, mit FS-Werten von $16,8 \pm 1,2\%$ bzw. $17,7 \pm 1,7\%$. Im Vergleich dazu war die Verschlechterung der Pumpfunktion des linken Ventrikels in den Intra-K ($30,6 \pm 2,5\%$) und Epi-K Gruppen ($24,2 \pm 1,6\%$) geringer. Die FS-Werte der Intra-K BCTs waren signifikant höher als jene der F-BCTs und der Sham-Gruppe ($p < 0,05$).

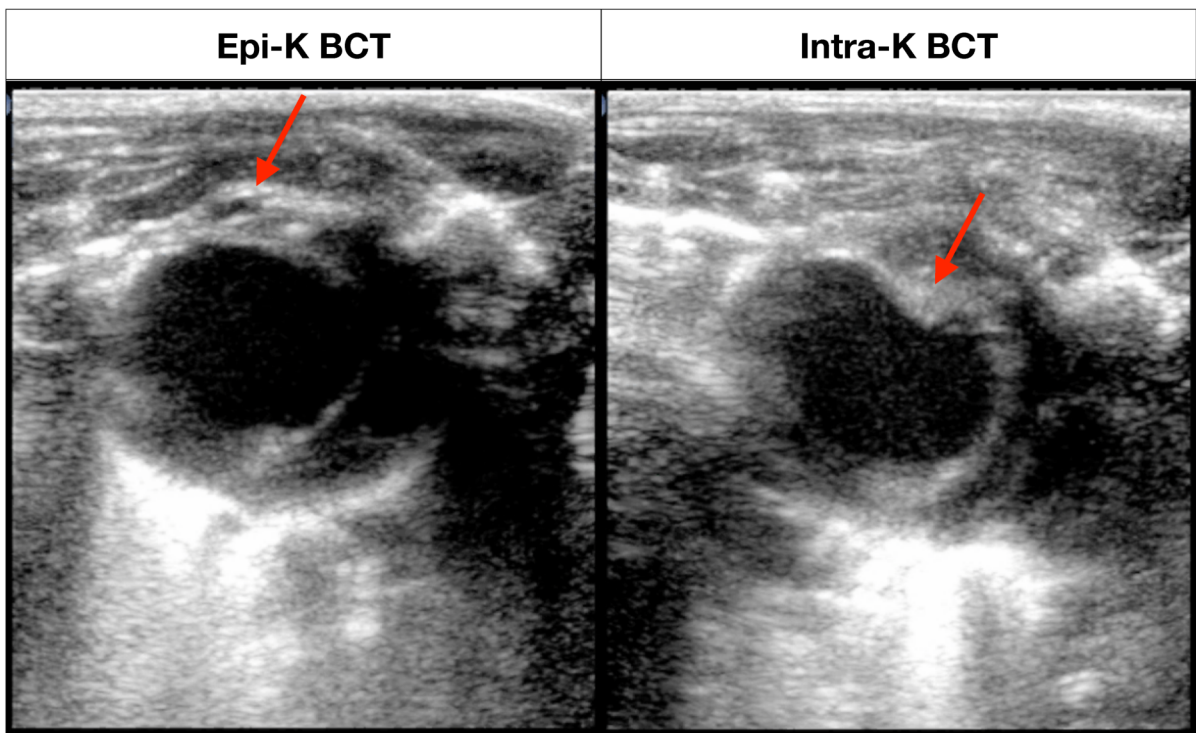


Abbildung 3.17: Exemplarische echokardiographische Aufnahmen in der Querachse, vier Wochen nach BCT-Implantation. Die BCTs sind durch rote Pfeile markiert.

3.3.3 Integration der Grafts in dem Empfängergewebe

Bindegewebige Grenzschicht zwischen Graft und Empfänger

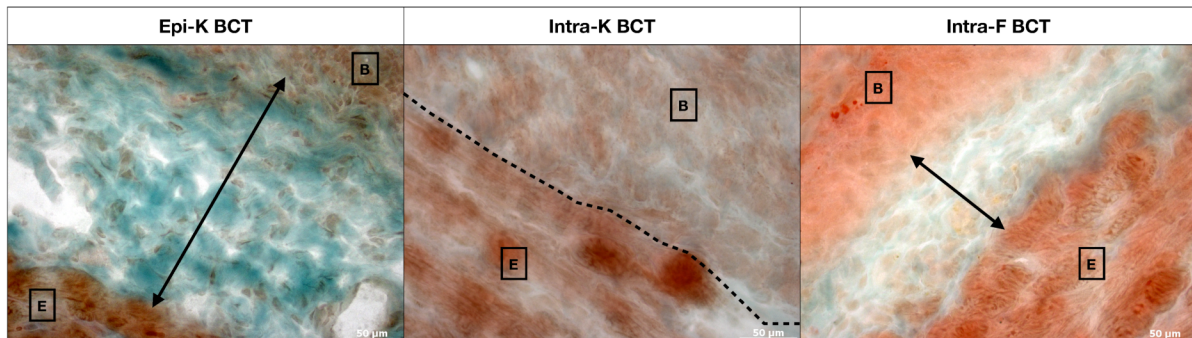


Abbildung 3.18: Masson-Goldner-Färbung zur Darstellung der Kontaktzone zwischen Empfänger- und Spendergewebe. Die bindegewebige Grenzschicht zwischen BCT (B) und Empfänger (E) ist durch einen schwarzen Doppelpfeil gekennzeichnet. In der Intra-K Gruppe ist keine Trennschicht vorhanden, Graft und Empfänger liegen direkt aneinander (gestrichelte Linie). Maßstab entspricht 50µm.

Eine Bindegewebsschicht trennte die Epi-K und Intra-F BCTs von dem Empfängergewebe (siehe Abbildung 3.18). Dabei präsentierten die Epi-K BCTs eine stärkere Abkapselung als die Intra-F BCTs. Im Gegensatz dazu lagen die Intra-K BCTs dem Empfängergewebe nahezu direkt an. Die Trennschicht betrug unter 100µm und war somit signifikant dünner als die der epikardialen Gruppe ($p=0,004$) (siehe Abbildung 3.19).

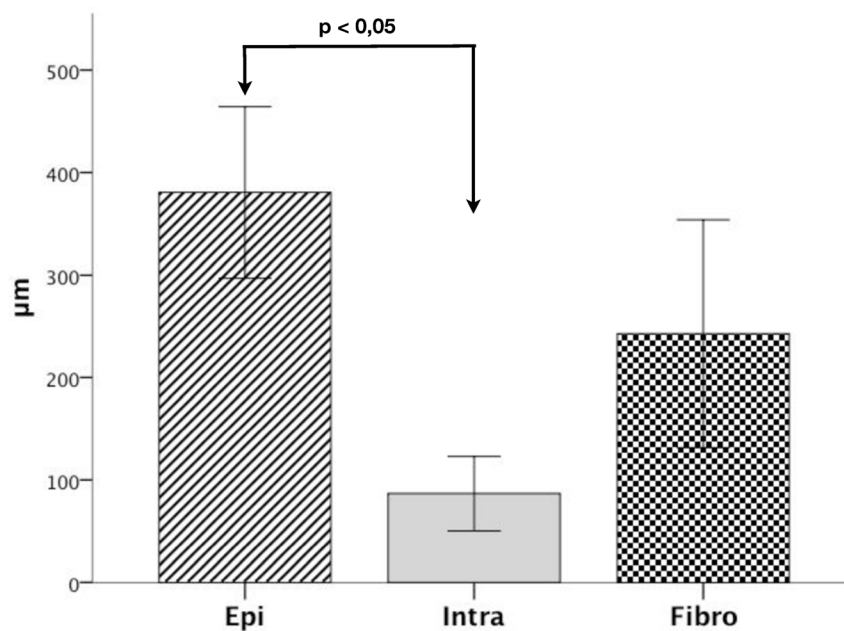


Abbildung 3.19: Bindegewebige Grenzschichtdicke zwischen BCT und Empfängermyokard, in µm (Mittelwert \pm SEM).

Connexin 45-Expression in den Transplantaten

Die Connexin 45-Färbungen wurde zur Darstellung von gap junctions zwischen Transplantat und Empfängermyokard durchgeführt.

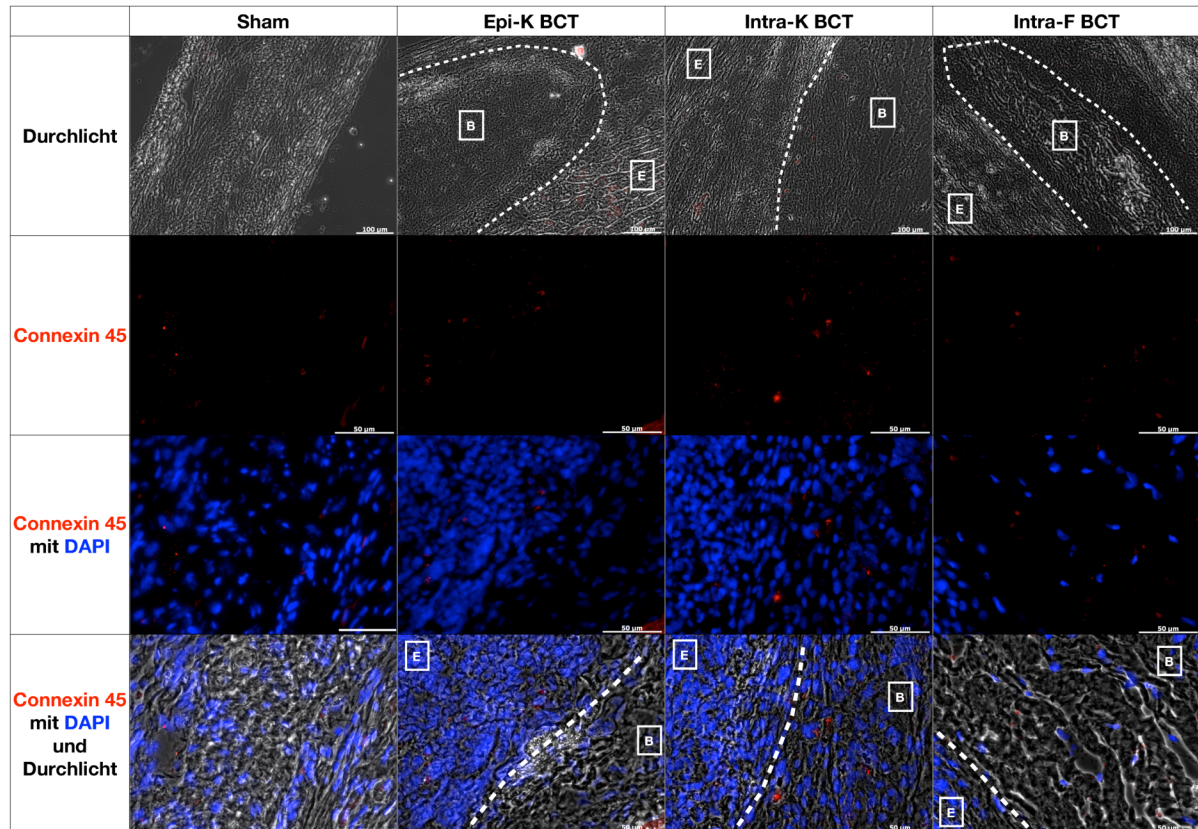


Abbildung 3.20: Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis des gap junction Proteins Connexin 45. Connexin 45-positive Areale in rot, DAPI-Kernfärbung in blau. *Obere Reihe*: Übergangszone (gestrichelte Linie) zwischen Empfängermyokard (E) und BCT (B). Maßstab entspricht 100µm. *Untere Reihen*: Vergrößerung eines repräsentativen Bereiches aus der Infarktzone (Sham) bzw. dem jeweiligen BCT-Randbereich. Maßstab entspricht 50µm.

In vitro zeigten ausschließlich die K-BCTs Connexin 45-positive Bereiche (siehe Abschnitt 3.1.3). Auch nach Explantation wurde in den Intra-K BCT Connexin 45 nachgewiesen, in der Grenzzone zwischen Graft und Empfänger sowie im BCT-Zentrum (siehe Abbildung 3.20). Im Gegensatz dazu enthielten die Epi-K BCTs nur vereinzelte Connexin 45-positive Bereiche in der Grenzzone, jedoch nicht innerhalb der Grafts. In den F-BCTs waren kaum Connexin 45-positive Bereiche zu finden.

3.4 Histologische Charakterisierung der BCTs nach Explantation

3.4.1 Kardiomyozyten Population

Histologie

Durch die kombinierte Immunfluoreszenz-immunhistochemische Färbung konnte die Titin-Expression der Zellen charakterisiert und ihre Herkunft anhand der GFP-Expression untersucht werden.

Die Epi-K und Intra-K BCTs präsentierten nach Explantation ein homogenes GFP-Signal sowie über die gesamten Grafts verteilt Titin-positive Zellen. Die Kardiomyozyten waren nicht mehr parallel zur Längsachse der BCTs ausgerichtet, dennoch bildeten sie einen teilweise geschlossenen Zellverband, orientiert an dem noch vorhandenen Matrigel[®]-Gerüst (siehe Abbildung 3.22).

Quantifizierung

Im Vergleich zu der Infarkt Narbe der Kontrollgruppe enthielten die K-BCTs einen größeren Anteil an Titin-positiven Zellen. Der Titin-Anteil betrug in den Epi-K BCTs durchschnittlich 38% der BCT-Gesamtfläche, die Intra-K BCT enthielten einen signifikant höheren Titin-Anteil von 62% (siehe Abbildung 3.21).

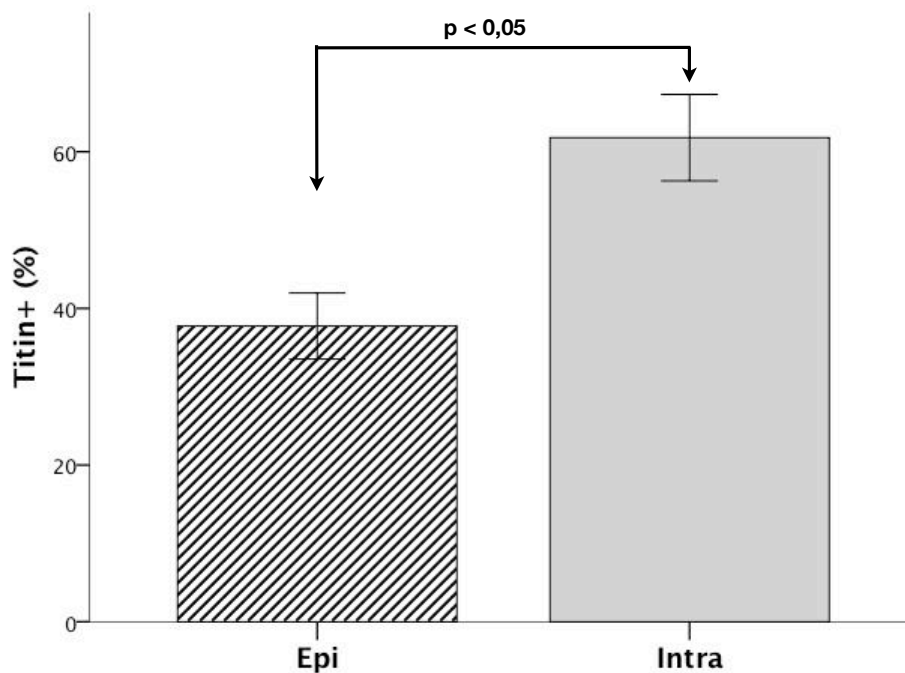


Abbildung 3.21: Quantifizierung der Titin-positiven Areale nach Explantation, in % der BCT-Gesamtfläche (Mittelwert \pm SEM).

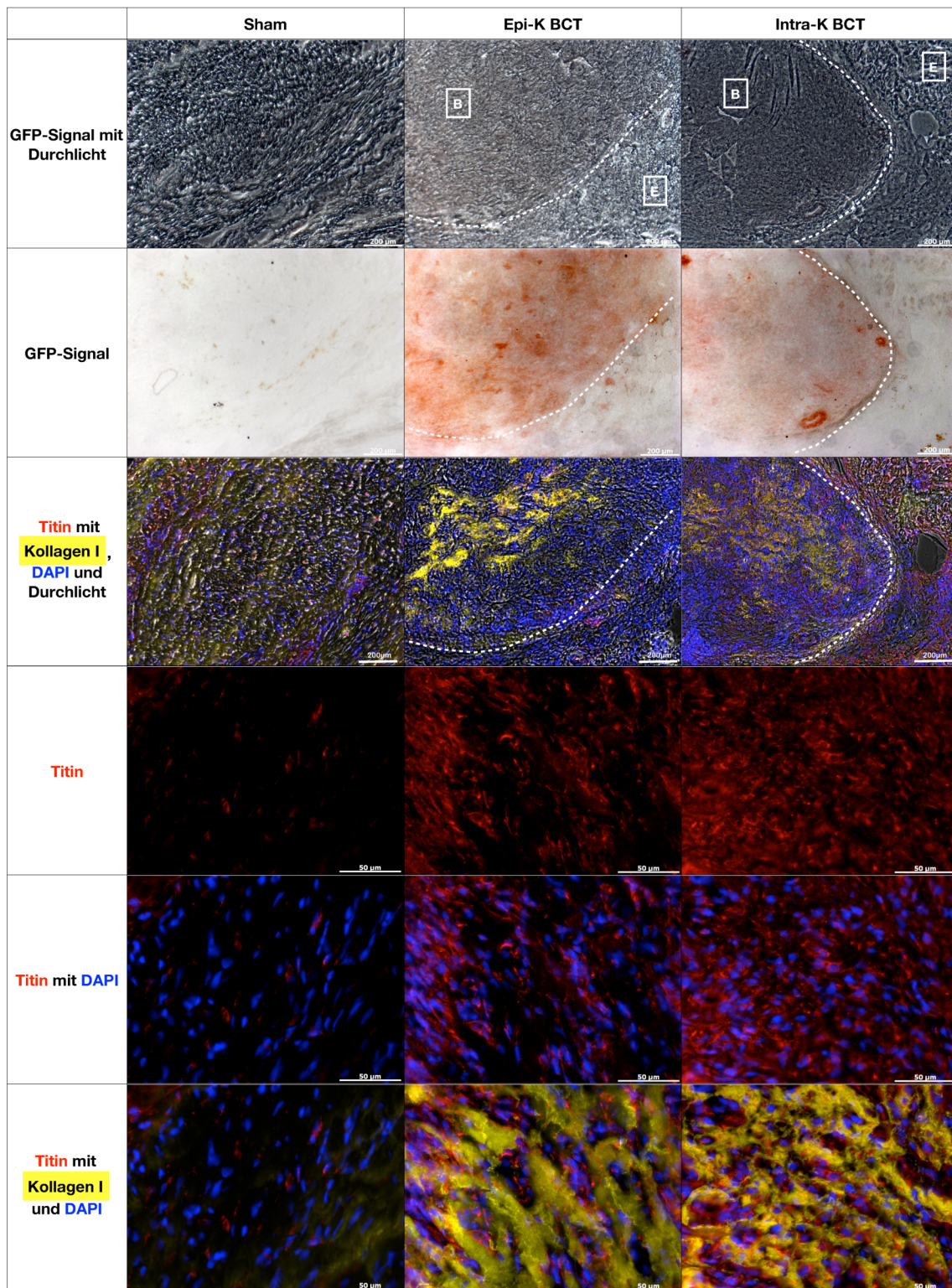


Abbildung 3.22: Kombinierte Immunfluoreszenz-immunhistochemische Färbung zum Nachweis des Kardiomyozytenmarkers Titin und der GFP-Expression. In der Immunhistochemie sind GFP-positive Bereiche rot. In der Immunfluoreszenz ist Titin rot, Kollagen I gelb und die DAPI-Kernfärbung blau. *Drei obere Reihen:* Übergang (gestrichelte Linie) zwischen Empfängergewebe (E) und BCT (B). Maßstab entspricht 200µm. *Drei untere Reihen:* Vergrößerung eines repräsentativen Bereiches aus der Infarktzone (Sham) bzw. dem jeweiligen BCT-Zentrum. Maßstab entspricht 50µm.

3.4.2 Fibroblasten Population

Histologie

Ebenfalls anhand einer kombinierten Immunfluoreszenz-immunhistochemischen Färbung konnte die rP4h-Expression der Zellen charakterisiert und ihre Herkunft anhand der GFP-Expression untersucht werden (siehe Abbildung 3.24).

Die Epi-K und Intra-F BCTs zeigten ein starkes rP4H-Signal im Sinne einer überschüssigen Fibrosereaktion. Der Zellverband war nicht organisiert, es bildeten sich ungeordnete Zellhaufen. Im Gegensatz dazu wurden die Intra-K BCTs durch ein Netzwerk aus einzelnen Fibroblasten besiedelt, das sich entlang des noch vorhandenen Matrigel[®]-Gerüsts aufbaute.

Quantifizierung

Nach Explantation enthielten alle BCTs einen geringeren Anteil an rP4h-positiven Zellen als die bindegewebige Infarkt Narbe der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 3.23). Sowohl in den Epi-K als auch in den Intra-F BCTs betrug der Anteil rP4h-positiver Bereiche über 50% der gesamten BCT-Fläche. In den Epi-K BCTs befand sich ein Großteil der rP4h-positiven Zellen in den BCT-Randzonen, die Intra-F BCTs dahingegen zeigten eine homogene Fibroblastenverteilung. Die Intra-K BCTs enthielten weniger als 25% rP4h-Anteil, signifikant weniger als in allen anderen Versuchsgruppen. Wie in den Epi-K BCTs befanden sich die meisten Fibroblasten an den Übergangszonen zum Empfängergewebe.

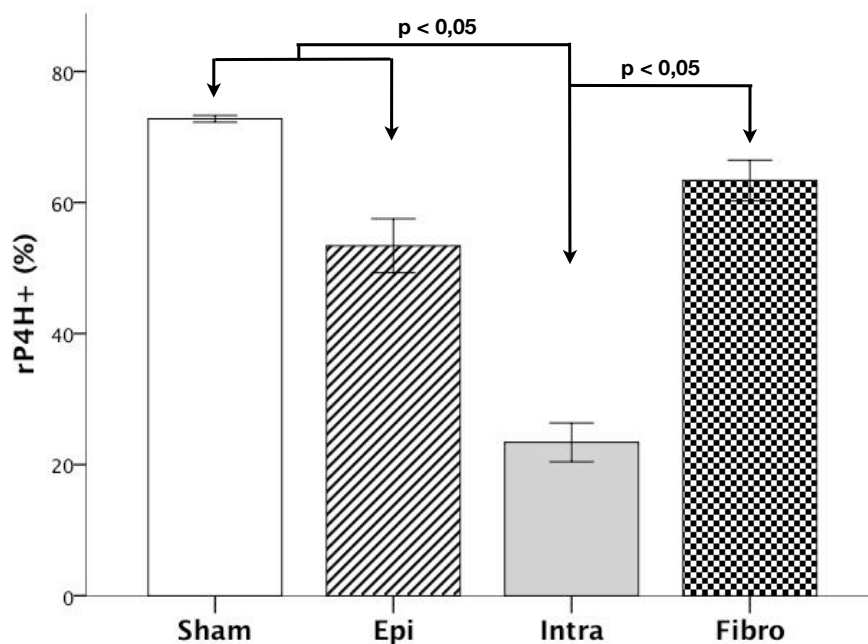


Abbildung 3.23: Quantifizierung der rP4h-positiven Areale nach Explantation, in % der gesamten BCT-Fläche (Mittelwert \pm SEM).

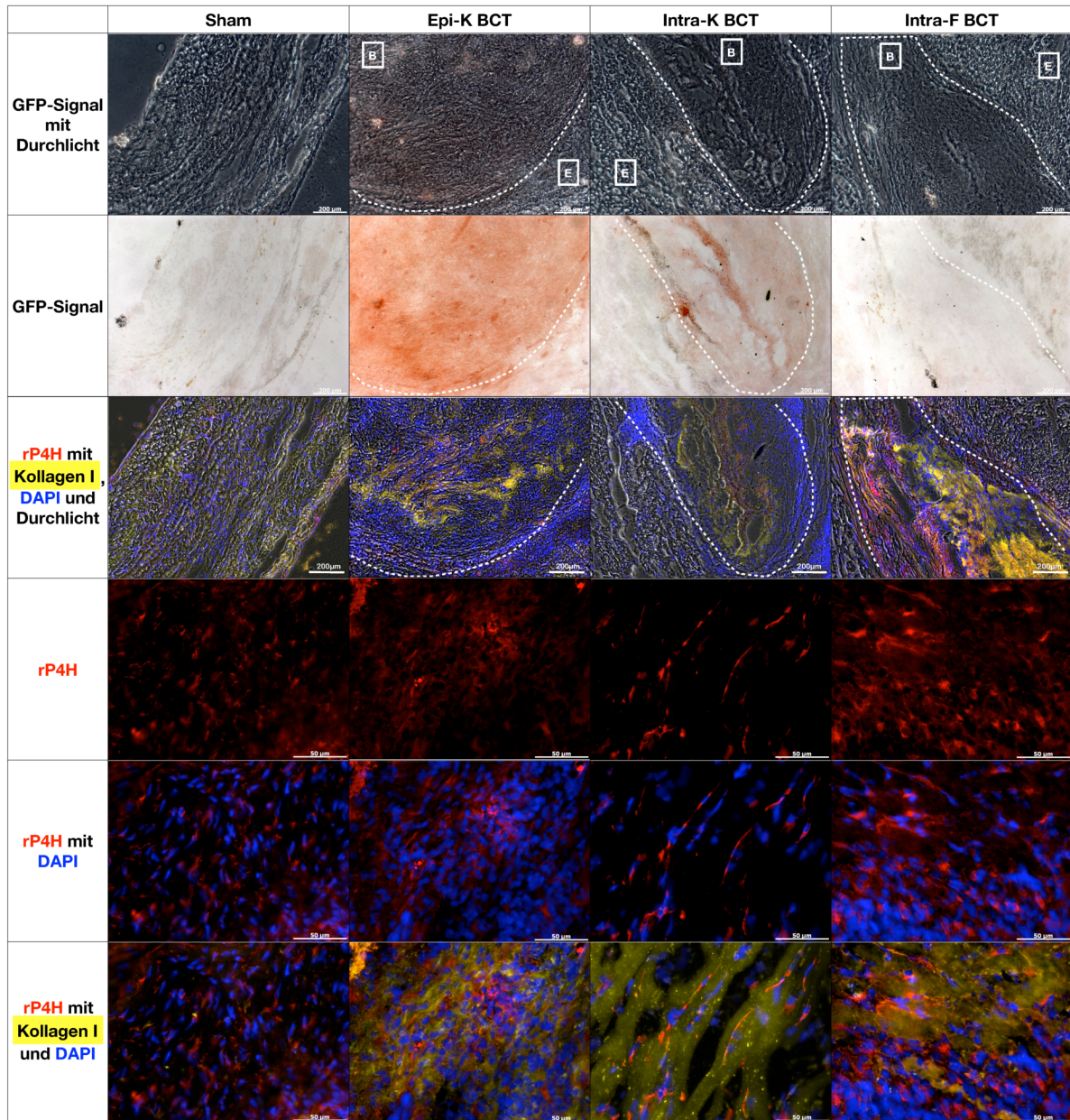


Abbildung 3.24: Kombinierte Immunfluoreszenz-immunhistochemische Färbung zum Nachweis des Fibroblastenmarkers rP4h und der GFP-Expression. In der Immunhistochemie sind GFP-positive Bereiche rot. In der Immunfluoreszenz ist rP4h rot, Kollagen I gelb und die DAPI-Kernfärbung blau. *Drei obere Reihen:* Übergang (gestrichelte Linie) zwischen Empfängergewebe (E) und BCT (B). Maßstab entspricht 200µm. *Drei untere Reihen:* Vergrößerung eines repräsentativen Bereiches aus der Infarktzone (Sham) bzw. dem jeweiligen BCT-Zentrum. Maßstab entspricht 50µm.

3.4.3 Kardiale Progenitorzellen

Zum Nachweis kardialer Progenitorzellen wurde der kardiale Transkriptionsfaktor Nkx2.5 genutzt.

Vor Implantation waren in den K-BCTs einzelne Zellen mit Nkx2.5-positivem Kern zu finden (siehe Abschnitt 3.1.3). Nach Explantation waren ausschließlich in den Intra-K BCTs einzelne Nkx2.5-positive Zellen vorhanden, nicht jedoch in den Epi-K BCTs. Die F-BCTs enthielten weder in vitro noch nach Explantation Nkx2.5-positive Zellen.

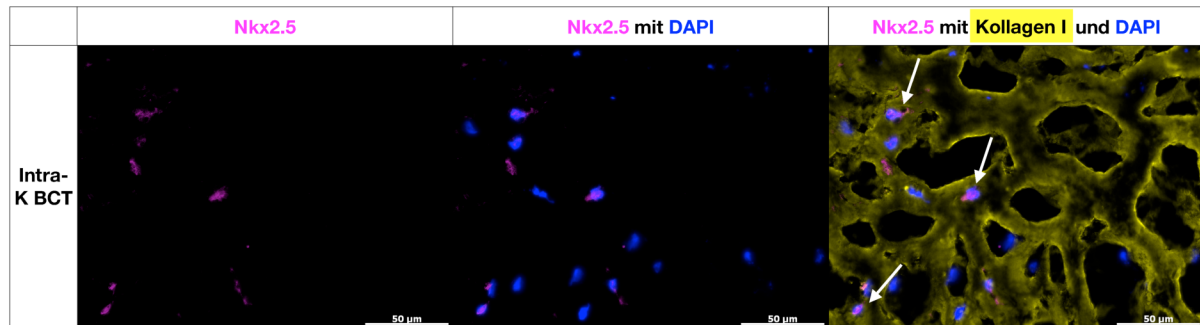


Abbildung 3.25: Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis des kardialen Transkriptionsfaktors Nkx2.5 in einem Intra-K BCT. Nkx2.5 Signal in pink, Kollagen I gelb und DAPI-Kernfärbung blau. Die Nkx2.5-positiven Zellkerne sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet. Maßstab entspricht 50µm.

Kapitel 4

Diskussion

Myokardiales Tissue Engineering ist ein breites Forschungsfeld. Diverse Zellarten und Applikationsformen wurden bereits getestet, bislang ohne markanten Stellenwert in der klinischen Herzmedizin. Die Anfangs tierexperimentell benutzten Zellen waren vorwiegend postmitotisch; im Allgemeinen leicht verfügbar jedoch quantitativ limitiert, wie z.B. neonatale Rattenkardiomyozyten [37]. In den vergangenen Jahren lenkte man den Fokus zunehmend auf Stammzellen. Insbesondere auf induzierte pluripotente Stammzellen, die uneingeschränkt verfügbar sind, keinen ethischen Limitationen unterliegen und in alle kardiale Zellreihen differenzieren können [67]. Bereits in klinischen Studien getestet wurden intrakoronare und endokardiale Zellinjektionen mittels perkutaner Katheterverfahren [89, 90]. Stamm et al. [91] erreichten mit der Injektion patienteneigener CD133+ Stammzellsuspensionen direkt in die Infarkttrandzone während einer Bypass-OP eine Erhöhung der linksventrikulären Ejektionsfraktion um 10%. Doch bieten Zellinjektionen keinerlei mechanische Ventrikelunterstützung, zeigen hohe Zellverluste und ein mäßiges Zellüberleben [54, 70]. Cell sheets, bestehend aus Zellen und deren produzierter extrazellulärer Matrix, können fusionieren, elektrisch koppeln, spontan kontrahieren und lassen sich epikardial fixieren [57, 92]. Dennoch entstehen bereits bei Fusion dreier Zell-Blätter Nekrosen, sodass eine maximale Dicke von 80µm nicht überschritten werden kann [77]. Dreidimensionales Tissue Engineering mit natürlichen [47, 48] oder synthetischen Matrix-Gerüsten [49] gewährleistet dahingegen die Zelladhäsion und somit den Gewebezusammenhalt [44, 47]. Darüber hinaus können die Grafts prävasikularisiert sowie in Bioreaktoren mechanisch und medikamentös stimuliert werden [35, 55]. Zimmermann et al. [52] beschrieben 4 Wochen nach epikardialer Graftimplantation in einem Rattenmodell Vaskularisierung, Bildung von gap junctions sowie eine moderate Verbesserung der Ventrikelpumpfunktion. Unser Ziel war es, eine neuartige Applikationsmethode zur Transplantation solider TE-Grafts zu etablieren und mit der herkömmlichen Methode der epikardialen Transplantation zu vergleichen. Untersucht werden sollte Graftüberleben, Vaskularisation und funktioneller Einfluss auf das ischämische Myokard.

4.1 Vorteile der intramyokardialen Implantationstechnik

4.1.1 Kontakt zum Empfängermyokard

Wir konnten erstmalig 1,3 x 6mm solide Transplantate über eine spezielle Hohlnadeltechnik intramyokardial am schlagenden Herzen einbringen. Epikardiale Transplantate sind stärkeren mechanischen Scherkräften ausgesetzt, etwa durch kontinuierliche Reibung am Perikard oder an der Thoraxwand, als intramyokardiale Transplantate. Dies könnte teilweise die schlechten funktionellen Ergebnisse der epikardialen Implantationsmethode erklären. Hamdi et al. [84] implantierten myoblastenbesiedelte Gelfoam[®]-Grafts epikardial. Trotz hohem Zellgehalt in vitro wurde vier Wochen nach Implantation ein fibröser Umbau der Grafts festgestellt. Unsere Untersuchung bestätigte dies: nach Explantation bestand über 50% der Gesamtfläche der epikardialen BCTs aus fibrotischem Material. Die intramyokardialen BCTs dahingegen präsentieren ein geordnetes Netzwerk aus Spenderfibroblasten, der frühe Vernarbungsprozess war signifikant geringer. Das Einbetten der Grafts direkt in das native Muskelgewebe schützt sie vermutlich vor einem frühen fibrotischen Umbau. Die Ergebnisse unserer epikardialen Grafts widersprechen den Resultaten von Zimmermann et al. [36]. Sie entwickelten solide Grafts aus Kollagen, Matrigel[®] und neonatalen Rattenkardiomyozyten und implantierten diese ebenfalls epikardial in einem syngenem Rattenmodell. Die Implantate konnten ein myokardiales Remodeling in den Empfängertieren verhindern, und es wurde eine elektromechanische Kopplung zwischen Empfängermyokard und Spendergewebe nachwiesen. Die Bildung einer bindegewebigen Trennschicht ist ein bekanntes Phänomen. Yildirim et al. beschrieben nach der epikardialen Transplantation kugelförmiger Grafts eine durchschnittlich 125µm dicke zellfreie Fibroseschicht zwischen Graft und Empfänger [48]. Die Ursachen und Auswirkungen dieser fibrotischen Reaktion sind noch nicht ausreichend geklärt, es steht jedoch fest, dass sie als Diffusionsbarriere wirkt [37], und ein Hindernis für die Bildung zellulärer Kontakte und elektrischer Kopplungen darstellt [93]. Durch die intramyokardiale Implantationstechnik konnte die fibröse Trennschicht signifikant reduziert werden, von durchschnittlich 380µm auf unter 90µm, und somit sowohl das Transplantatüberleben als auch die Bildung von Gap Junctions positiv beeinflusst werden.

Die epikardialen BCTs grenzen nur einseitig durch eine plane Fläche an das Empfängergewebe. Die intramyokardialen BCTs hingegen sind zirkulär mit ihrer gesamten Oberfläche vom Spendergewebe umgeben. Dadurch ist die Möglichkeit einer Interaktion zwischen Spender- und Empfängergewebe höher. Dazu kommt, dass epikardiale Grafts nicht in direktem Kontakt zu den Empfängermyozyten stehen, da sie auf das Epikard genäht werden und so auch epikardiales Fettgewebe interponiert wird. Wir implantierten die intramyokardialen BCT in den Randbereich der Infarktzone. So waren sie in Kontakt mit dem stark vaskularisierten Granulationsgewebe des Infarkttrandbereiches, was für das Zellüberleben insbesondere in der Frühphase essentiell ist. In der Tat konnten Zhang et al. [82] die Anzahl an TUNEL-positiven, apoptotischen Zellen durch eine Injektion in gefäßreiches Granulationsgewebe im Vergleich

zu einer Injektion direkt in die Infarktnarbe um über 50% reduzieren. Zum anderen hatten die Grafts auch direkten Kontakt zu gesundem Myokard, und somit zu einem physiologischen Milieu, das die Proliferation und die terminale kardiale Differenzierung der implantierten Zellen stimuliert [36, 45, 94]. Unsere Untersuchungen bestätigten dies durch die Persistenz der Nkx2.5-positiven kardialen Progenitorzellen in den intramyokardialen Grafts und deren signifikant höheren Titingehalt von 62% gegenüber 38% in den epikardialen Grafts.

Es ist bekannt, dass die reguläre post-ischämische Entzündungsreaktion über Wachstumsfaktoren und Zytokine Zellüberleben und Neovaskularisation fördert [95–97]. Insbesondere IL-6 und TNF- α wirken in niedriger Konzentration kardioprotektiv [97, 98]. Neue Untersuchungen zeigten, dass Mediatoren wie vascular endothelial growth factor (VEGF) und Phosphatidylinositol-3-Kinase durch diese permissive Inflammation aktiviert werden und sowohl das Überleben implantierter Zellen als auch die Wiederherstellung der kardialen Pumpfunktion im Mausmodell unterstützen [99, 100]. Zusätzlich führt die lokale Entzündungsreaktion zur Mobilisation gewebeständiger kardialer Stammzellen [101], und trägt über die örtliche Zerstörung physiologischer Barrieren zu einer besseren Kontaktfindung zwischen Graft und Empfänger bei [52]. Durch die intramyokardiale Implantationsmethode werden Wundflächen erzeugt, welche diese positiven Reaktionen stimulieren könnten. Die moderate Anzahl der CD11b-positiven Zellen in den Explantaten spricht für eine reguläre postoperative inflammatorische Reaktion. In keiner Versuchsgruppe konnten Zeichen einer Abstoßungsreaktion gefunden werden, da es sich in allen Gruppen um eine syngene Transplantation handelte. Darüber hinaus wurden alle nicht zellulären Bestandteile der BCTs, sowohl das verwendete Kollagen, als auch das Matrigel[®] im Rattenmodell als nicht-immunogen beschrieben [60, 86].

4.1.2 Graftversorgung und Neovaskularisation

Nach Implantation erfolgt die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Grafts zunächst über Diffusion. Die Struktur der BCTs, aus einzelnen zellbesiedelten Matrigel[®]-Strängen, bietet in der Frühphase eine Reihe von Vorteilen. Das Matrigel[®] stellt keine signifikante Diffusionsbarriere dar [37] und eine Hypoxie der Zellen ist nicht zu erwarten, da die einzelnen Stränge eine Breite von 100 μ m nicht überschreiten [36]. In unserer Versuchsreihe erfolgte in vivo kein Monitoring, sodass über das Überleben der Zellen in der Frühphase keine genau Daten vorliegen. Dennoch ist bekannt, dass der Sauerstofffluss durch passive Diffusion erfolgt [102]. Es ist anzunehmen, dass die intramyokardialen Grafts durch ihren direkten Kontakt zum stark kapillarisiertem Myokard sowie ihre Nähe zum Endokard und zum blutdurchströmten Ventrikel in den ersten Tagen von einer besseren Sauerstoffversorgung profitierten.

Innerhalb der ersten zwei Wochen beginnt die Neovaskularisation, die langfristig Überleben, Struktur und Funktion der Grafts bestimmt [36, 48]. Nach Explantation enthielten die intramyokardialen Grafts einen signifikant höheren Gefäßanteil als die epikardialen Grafts, durchschnittlich doppelt so viel. Die intramyokardiale Implantationsmethode besitzt in Hinsicht auf

die Neovaskularisation der Grafts diverse Vorteile. Da in der intramyokardialen Gruppe die fibröse Trennschicht zwischen Empfänger- und Spendergewebe signifikant kleiner war, konnte ein wesentliches Hindernis zur Neovaskularisation signifikant reduziert werden [93]. Hierdurch wird auch die Zellmigration in Richtung Spendergewebe vereinfacht. Zum Beispiel für Monozyten und Makrophagen, die wir hauptsächlich in den intramyokardialen Grafts fanden, und die mutmaßlich ebenfalls eine wichtige Rolle in dem Vaskularisierungsprozess spielten. Getriggert durch membranständige Metalloelastasen, bilden sie über Proteolyse "Bohrlöcher" in der extrazellulären Matrix, die als Leitstruktur zur Gefäßeinwanderung dienen [103, 104]. Die größere Kontaktfläche zum Empfänger wirkte sich ebenfalls positiv aus, da eine größere Angriffsfläche für angiogene Wachstumsfaktoren wie VEGF und fibroblast growth factor (FGF) bestand [105], und so eine Konzentrierung der Gefäße in den Randzonen der Grafts stattfand [60]. Da der Gefäßanteil in den intramyokardialen Grafts signifikant höher als in der Kontrollgruppe war, können wir annehmen, dass die intramyokardiale Applikationstechnik die bessere Methode bezüglich Neovaskularisation der Grafts darstellt. Die Gefäßstrukturen setzen sich vermutlich sowohl aus Empfänger- als auch aus GFP-positiven Spenderzellen zusammen. Die Präsenz von Erythrozyten in ihren Lumina beweist, dass sie Anschluss an den Kreislauf des Empfängers hatten. Dies hat durch verschiedene Prozesse stattfinden können. Die Endothelzellen der implantierten Grafts könnten primitive Gefäßstrukturen gebildet und direkten Anschluss gefunden haben, oder einzelne GFP-positive Spenderzellen wurden in den Neovaskularisationsprozess des Empfängers einbezogen. Dieser Vorgang bedarf noch weiterer Untersuchungen.

4.2 Wirkungsweise der intramyokardialen Grafts

4.2.1 Funktionelle Wirkung

Postinfarziell kommt es durch fibrotischen Umbau zu einer Ausdünnung der Ventrikelwand und somit zu einer Ventrikeldilatation [10]. Es ist bekannt, dass eine Narbenstabilisierung durch verschiedene Implantate eine weitere Dilatation verhindert [48], und sich positiv auf die Herzfunktion auswirkt [106, 107]. Diese passive mechanische Wirkung beeinflusst die diastolische Herzfunktion [44] und ist weitestgehend unabhängig von der Natur der eingebrachten Grafts. Auch eine reine Hydrogelinjektion kann über die Verstärkung der Ventrikelwand die mechanische Belastung auf das Myokard reduzieren und eine postinfarzielle linksventrikuläre Dilatation verhindern [108, 109]. Wir konnten mit der intramyokardialen Implantationsmethode im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers erzielen und somit eine weitere postinfarzielle linksventrikuläre Dilatation verhindern. In allen anderen Versuchsgruppen fand eine solche Dilatation statt. Wir sehen die Überlegenheit der intramyokardialen Implantationsmethode auf verschiedenen Ebenen. Der bessere Erhalt der nativen Herzgeometrie ermöglicht eine effektivere Ventrikelwandstabilisie-

rung. Durch die geringere Ventrikeldilatation fehlt der Trigger für intrazelluläre Mechanorezeptoren. Entzündungsreaktion über Mediatoren wie TNF- α , IL-6 und IL-1 β und Fibrosereaktion über Metalloproteinase sind somit reduziert [108]. In der Tat konnten wir in den intramyokardialen Grafts im Gegensatz zu den epikardialen keine überschüssige Fibrosereaktion feststellen. Eine zu starke Vernarbung mit weiterer Versteifung der Ventrikelwand und diastolischer Funktionsstörung wird somit verhindert. Des Weiteren zeigten die intramyokardialen Kardiomyozyten-BCTs signifikant bessere Ergebnisse als die intramyokardialen Fibroblasten-BCTs. Daraus schließen wir, dass die Wirkung der Grafts über eine rein mechanische Unterstützung hinaus reicht und ebenfalls eine zelluläre Komponente hat.

Es wurde mit der intramyokardialen Implantationsmethode eine Verbesserung der Pumpfunktion im Vergleich zu der Kontrollgruppe erreicht: signifikante Reduktion des linksventrikulären endsystolischen Durchmessers und signifikante Erhöhung des fractional shortenings bis auf über 30%. Eine echte Verbesserung der systolischen Herzfunktion kann nur durch das Einbringen von kontraktilen Elementen erreicht werden [48]. Für eine optimale Kontraktilität müssen die bioartifiziellen Gewebe eine native Zellzusammensetzung aufweisen, mit einem Kardiomyozytenanteil um die 30% sowie Fibroblasten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen [37, 110]. Zimmermann et al. [111] konnten in vitro mit Grafts aus nativer Zellzusammensetzung eine doppelt so starke Kraftentwicklung wie mit Grafts aus einer reinen Kardiomyozytenkultur erreichen. In unserer Arbeit wurde der Erhalt der initialen Zellzusammensetzung ausschließlich in den intramyokardialen Kardiomyozyten-Grafts beobachtet (siehe unten). Sie erlauben somit das Einbringen kontraktionsfähiger Kardiomyozyten und könnten so die systolische Pumpfunktion nachhaltig unterstützen. Da wir eine elektromechanische Kopplung zwischen Graft und Empfänger nicht sicher nachgewiesen haben, können wir eine aktive Beteiligung der Grafts an der Ventrikelkontraktion jedoch nicht beweisen. Im Gegensatz dazu leisten die intramyokardialen Fibroblasten-BCTs definitiv keine aktive Unterstützung der Herzfunktion auf zellulärer Ebene, und waren bezüglich der systolischen Ventrikelparameter den intramyokardialen Kardiomyozyten-BCTs signifikant unterlegen.

4.2.2 Wirkung auf zellulärer Ebene

Nach Explantation zeigten die intramyokardialen BCTs einen signifikant höheren Titin-Anteil von über 60% und einen signifikant niedrigeren rP4h-Anteil von unter 25% im Vergleich zu den epikardialen BCTs, sowie ein starkes, homogenes GFP-Signal. Eine überschüssige Fibrose fand nicht statt. Somit erlaubt die intramyokardiale Implantationsmethode den Erhalt aller initial eingebrachten Zellreihen. Diese Zelldiversität ist entscheidend für viele parakrine Reparaturmechanismen. Fibroblasten sind für den Abbau der extrazellulären Matrix durch Matrix-Metalloproteinasen und dessen Neuaufbau verantwortlich [112, 113]. Darüber hinaus sezernieren kardiale Fibroblasten postinfarziell vermehrt pro-inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren, die auf die gesamte Herzzellpopulation Einfluss nehmen [114]. Über pa-

rakrine Effekte von TGF- β 1, FGF-2, IL-1 β und IGF-1 triggern sie die Kardiomyozytenhypertrophie als adaptive Antwort auf mechanischen und metabolischen Stress und wirken somit kardioprotektiv [115–117]. Fibroblasten sezernieren zudem VEGF und stimulieren darüber Endothelzellen und Angiogenese [118]. Endothelzellen wirken über die parakrine Sekretion von Endothelin-1, und stimulieren ebenfalls die Kardiomyozytenhypertrophie [119]. Zudem spielen verschiedene Monozyten Subpopulationen eine wichtige Rolle. Direkt nach Myokardinfarkt kommt es durch Phagozytose und über proinflammatorische und proteolytische Signalwege, mit TNF- α , IL-1 β , Myeloperoxidasen und Matrix-Metalloproteinasen zum Abbau des nekrotischen Gewebes und dadurch zu einer stärkeren Zellmigration. Darauf folgend werden Fibroblastenproliferation und Angiogenese über IL-10 und VEGF stimuliert [120]. Die Makrophagen spielen darüber hinaus, wie bereits erläutert, eine wichtige Rolle in der Gefäßeinsprossung. Es ist bekannt, dass die postinfarzielle Wundheilung positiv korreliert mit der Anzahl an präsenten Monozyten und Makrophagen [120].

Das intramyokardiale Einbringen vitaler Grafts beeinflusste zudem ventrikuläre Remodelingprozesse im infarzierten Gewebe [74, 121]. Zum einen beobachteten wir einen stärkeren Abbau des Matrigel[®]-Stützgerüsts, welches durch Zellen und extrazelluläre Matrix ersetzt wurde. Es ist bekannt, dass Matrigel[®] nur eine temporäre biomechanische Unterstützung für die eingebrachten Zellen darstellt, bis diese ihre eigene extrazelluläre Matrix produzieren [53, 122]. Zum anderen sahen wir Zellmigration, hauptsächlich an der Grenzzone zwischen Graft und Empfängergewebe, in Form von eingewanderten GFP-negativen Zellen. Es handelte sich um teilweise Titin- und rP4H-positive Zellen mit hoher Zelldichte. Li et al. [47] machten eine ähnliche Beobachtung. Fünf Wochen nach der epikardialen Implantation von fetalen kardialen Zellen in einer Gelatinematrix war die Gelatine zum Großteil abgebaut und viele unbekannte Zellen hatten das Transplantat besiedelt. Es könnte sich hierbei um dedifferenzierte Kardiomyozyten handeln. Die Dedifferenzierung ist ein bekannter Überlebensmechanismus für Kardiomyozyten unter hypoxischem Stress, eine Umwandlung in Winterschlafzellen (hibernating myocardium) [123, 124]. Dabei verlieren die Zellen ihre Sarkomerstruktur und sind mit den gängigen Kardiomyozytenfärbungen nicht mehr nachweisbar [125]. In vitro steigert dieser Prozess die Zellproliferation und das Wiedererlangen multipotenter Fähigkeiten [126]. In vivo stellt die Dedifferenzierung einen Hypoxieschutz dar, stimuliert die Revaskularisation nach Myokardinfarkt und trägt zur Geweberegeneration bei [125–127]. Eine andere Erklärung wäre, dass es sich bereits um proliferative Kardiomyozyten handelt, die aus ihrem Winterschlafzustand erwacht sind [128]. Beide Effekte, der Matrixabbau und die Zellbesiedlung, waren in den Kardiomyozyten-BCTs ausgeprägter als in der Fibroblasten-BCTs, und hingen somit vermutlich mit der Zellzusammensetzung der eingebrachten Grafts zusammen.

Eine elektromechanische Kopplung zwischen Graft und Empfänger besteht, wenn sich gap junctions zwischen den beiden gebildet haben, die Empfänger und Spenderkardiomyozyten synchron kontrahieren und somit die Pumpfunktion des Herzens unterstützen. Das Vorhandensein von gap junctions zwischen Graft und Empfänger alleine gilt nicht als Beweis einer

solchen Kopplung. Gerbin et al. [129] transplantierten humane embryonale Stammzellbasierte Kardiomyozyten in einem Rattenmodell entweder als Patch epikardial oder als intramyokardiale Zellinjektion. Während die epikardial transplantierten Zellen mit dem Empfänger nicht kopelten, konnte eine elektromechanische Kopplung der intramyokardial transplantierten Zellen mit dem Empfängermyokard durch GCaMP3 ex vivo Fluoreszenz-Imaging nachgewiesen werden. GCaMP3 ist ein genetisch kodierbarer Calciumsensor, der transgen in Zellen eingebracht werden kann. Er erlaubt die Darstellung der elektrischen Propagation von Aktionspotentialen in Kardiomyozytenverbänden sowohl in vitro als in vivo [129]. Diese Technik stand uns bei der Durchführung unserer Versuche nicht zur Verfügung. In unserer Arbeit waren vor allem in den intramyokardialen Kardiomyozyten-BCTs Connexin 45-positive Bereiche zu finden, hauptsächlich an der Grenze zum Empfängergewebe. Die minimale Trennschicht und die grössere Kontaktfläche zum umgebenden Myokard sehen wir als begünstigende Faktoren. Die epikardialen BCTs zeigten dahingegen nur vereinzelte Connexin 45-positive Bereiche, weniger als vor der Implantation, sodass eine Neubildung elektrischer Verbindungen hier unwahrscheinlich war. Es konnte jedoch nicht mit Sicherheit festgestellt werden, ob einzelne gap junctions zwischen Empfänger und Graft aufgebaut wurden. Zwar bestand eine Korrelation zwischen der Anzahl Connexin 45-positiver Bereiche und den funktionellen Ergebnissen der verschiedenen Versuchsgruppen, dennoch bleibt offen, welche Rolle eine synchrone Kontraktion der Graft- und Empfängerkardiomyozyten dabei spielte.

4.2.3 Wirkung auf das Zellüberleben

Nach Explantation enthielten alle BCTs vitale, GFP-positive Spenderzellen. Dies beweist, dass sowohl die Diffusion in der Frühphase als auch die darauffolgende Neovaskularisation sufficient für das Überleben der implantierten Zellen war. Das stärkere GFP-Signal in den BCT-Randbereichen sowie die Ansammlung der apoptotischen Zellen im BCT-Zentrum sprechen dafür, dass die Versorgung der Grafts zentripetal erfolgte. Das GFP-Signal in den intramyokardialen BCTs war stärker als in den epikardialen BCTs. Yildirim et al. [48] beschrieben lockere Kardiomyozytennetzwerke in ihren epikardialen Grafts zwei Wochen nach Implantation. In unserer Untersuchungsreihe enthielten die epikardialen Grafts nach Explantation ebenfalls ein lockeres Kardiomyozytennetzwerk und einen durchschnittlichen Anteil Titin-positiver Zellen von 38%. In den intramyokardialen Grafts beobachteten wir dichtere Kardiomyozytenverbände, einen signifikant höheren Anteil Titin-positiver Zellen von 62% und sehen dies neben den bereits genannten Faktoren auch als Konsequenz der besseren Diffusion in der Frühphase und der nachfolgenden stärkeren Neovaskularisation. Verschiedene Gruppen beschrieben ein schlechtes Langzeitüberleben nach epikardialer cell sheet Transplantation. Keine oder nur eine geringe Anzahl vitaler Kardiomyozyten konnte nach 4 bis 8 Wochen in den Grafts nachgewiesen werden [56, 130]. Eine Aussage über das Langzeitüberleben unserer Transplantate kann in dieser Arbeit nicht getroffen werden.

Die Neovaskularisation sichert nicht nur die Versorgung des implantierten Grafts, sondern kann über den sogenannten rescue effect auch positive Wirkung auf das Empfängermyokard haben. Hauptsächlich in den Randzonen eines demarkierten Infarktareals findet sich chronisch ischämisches Gewebe. Im Gegensatz zum fibrösen Narbengewebe befinden sich hier noch potentiell funktionsfähige Kardiomyozyten. Dieses hibernating Myokard hat sich auf Ebene der Genexpression der chronischen Ischämie angepasst und ist nur noch eingeschränkt kontraktionsfähig [131, 132]. Page et al. [128] konnten zeigen, dass dieser Zustand durchaus reversibel ist. Nach LAD-Revaskularisationstherapie im ischämischen Schweinemodell beobachteten sie eine Abnahme der reaktiven Kardiomyozytenhypertrophie und eine Zunahme kleiner, cKit-positiver, sich teilender Kardiomyozyten. Die Autoren beschrieben eine Kardiomyozytenproliferation mit Wiedereintritt in die Wachstumsphase sowie die Entstehung neuer Muskelzellen im hibernating Myokard. Darüber hinaus zeigten Yoshizumi et al. [108], dass eine stärkere Vaskularisation des ischämischen Myokards über positive Remodelingprozesse die Ventrikelwanddicke und -funktion positiv beeinflusst. Diese Effekte könnten optimal genutzt werden, wenn unser Modell auf das Großtier oder den Menschen übertragen wird. Dabei kann das ischämische Myokardareal mit einem Bypass revaskularisiert werden. Wie in unserem Modell könnten die BCTs direkt in die chronisch ischämische Ventrikelwand implantiert werden und von der getriggerten Gefäßeinsprossung profitieren.

4.3 Operative Innovation und Ausblicke

4.3.1 Innovative Operationstechnik

In der BCT-Herstellung wurde ein neuartiger Ansatz verfolgt. Nach Konsolidierung der Matrix wurden die Gewebe in einem Bioreaktor konditioniert. Durch zyklische Dehnung wurde die Zellorientierung und -differenzierung sowie die elektrische Kopplung zwischen den Zellen unterstützt und dadurch eine bessere Funktionalität der Grafts erreicht [35].

Innovativ war auch die Implantationsmethode der BCTs. Zum ersten Mal konnten solide Grafts intramyokardial in einem orthotropen Modell implantiert werden. Daraus entstanden zahlreiche Vorteile im Vergleich zur bereits etablierten Methode der intramyokardialen Implantation solider Grafts im heterotropen Transplantationsmodell [74, 75]. In der Versuchsphase ist der operative Aufwand weitaus geringer, eine Phase der kalten Ischämie findet nicht statt, das Risiko einer Infektion und das chirurgische Trauma werden minimiert. Die Hämodynamik der Herzen bleibt unverändert und die funktionelle Auswertung ist analog zur humanen Diagnostik mittels Echokardiographie und MRT-Untersuchung möglich. Darüber hinaus ist diese Implantationsmethode direkt auf den Menschen übertragbar.

4.3.2 Weitere Versuche und klinische Anwendung

Unsere intramyokardiale Operationstechnik wäre in bewährte Großtiermodelle, wie zum Beispiel Schwein oder Schaf, praktikabel und später auch auf den Menschen übertragbar. Jedoch bleibt die maximale Dicke der Konstrukte eine Limitation [36]. Um im Menschen klinisch relevante Ergebnisse zu erreichen, müsste die Größe der Grafts angepasst und eine Dicke von mindestens 1cm erreicht werden [122]. Dies wäre durch die Fusion einzelner Grafts in vitro theoretisch möglich [52,110]. Jedoch muss die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung in vivo vorher ausreichend im Großtiermodell evaluiert werden. Hauptsächlich in den ersten Tagen nach Transplantation, wenn die Gefäßversorgung noch insuffizient ist und das Graft über Diffusion versorgt wird, könnte es zu Ischämien kommen [36, 48]. Vor allem das Zentrum der Grafts wäre in diesem Fall gefährdet, da eine Gefäßeinsprossung dorthin langsamer erfolgt [60]. Um dies zu umgehen, wird an einer Graftvaskularisierung in vitro geforscht. Zum Beispiel über die Entwicklung einer BioVaM, einer biologischen vaskularisierten Matrix aus z.B. dezellularisiertem porcinem Jejunum. Erhaltene Gefäßarkaden werden mit Endothelzellen besiedelt und als Gerüst zum weiteren Tissue Engineering genutzt [133]. Erst wenn eine effektive Methode zur Vaskularisierung entwickelt wurde, wird es möglich sein, massive solide Gewebe herzustellen, die eine ausreichende Dicke für eine humane Anwendung in Form eines totalen Ventrikelwandersatzes aufweisen [52].

Unser Lösungsansatz ist die Implantation kleiner BCTs, sogenannter Mikrografts. Die BCTs, deren einzelnen Trabekel eine Dicke von 100µm nicht überschreiten, würden über Diffusion ausreichend versorgt werden [36]. Eine Gefäßeinwanderung ist im weiteren Verlauf aus den bereits beschriebenen Gründen erforderlich, wäre in der Frühphase jedoch entbehrlich. Durch die engmaschige Implantation multipler Mikrografts könnten diese in vivo Kontakt zueinander finden und ein Netzwerk inmitten des Empfängergewebes bilden, analog zur Mikrografting Methode der Hautinseltransplantation nach Meek in der plastischen Chirurgie [134]. Eine solche Vernetzung konnten wir und andere Arbeitsgruppen in vitro bereits erreichen [110]. Die Mikrograftimplantation sollte in die chronisch ischämische Infarkttrandzone erfolgen. Dadurch könnte die Minderversorgung in diesem Areal aufgehoben, die bereits erwähnten hibernating Kardiomyozyten aktivieren [128], und die in diesem Areal konzentrierten herzeigenen Stammzellen stimuliert werden [128]. Neben den direkten zellulären und funktionellen Effekten der BCTs könnte infolgedessen die Wirksamkeit der Graftimplantation um ein vielfaches potenziert werden.

Folglich könnte die intramyokardiale Implantation multipler BCTs eine kausale Therapieoption nicht transmuraler Teilinfarkte und in Zukunft eine Alternative zu den gängigen chirurgischen Therapien werden. Es müssten weniger Kontraindikationen berücksichtigt werden, Nebenwirkungen und Komplikationen der aktuellen Operationen und der anschließenden medikamentösen Therapien könnten vermieden werden. Eine perkutane Applikationsmethode mittels transarterieller Katheterintervention, analog zu endokardialen Zellinjektionstechniken [90], ist

vorstellbar. Ein entscheidender Nachteil bleibt die erforderliche Immunsuppression im Falle einer allogenen Gewebetransplantation. Diesbezüglich wäre der Aufbau von Gewebebanken mit einem entsprechendem Spender-/Empfängermatching ein vielversprechender Ansatz.

4.3.3 Limitationen

Die benutzten neonatalen Rattenzellen sind zwar einfach zu gewinnen und hypoxieresistent, können jedoch nicht in einem größeren Tiermodell oder im Menschen angewandt werden. Bei einem humanen Myokardinfarkt ist mit einem Verlust von 1 bis 2 Milliarden Zellen zu rechnen. Es muss eine ausreichend proliferative Zellquelle gefunden werden, um solche Zellzahlen generieren zu können [48]. Darüber hinaus sollte die ideale Zellart leicht verfügbar, nicht immunogen und pluripotent sein [110,122]. Bezüglich der elektromechanischen Kopplung in vivo konnten wir nicht mit Sicherheit feststellen, ob nachgewiesene gap junctions auch zu einer synchronen Kontraktion führten. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob eine elektromechanische Kopplung in jedem Fall wünschenswert ist. Auch ohne nachgewiesene elektromechanische Kopplung unterstützen die implantierten Grafts die Herzfunktion [36,135]. Bei nachgewiesener Kopplung kommt es in aktuellen Studien im Großtier mit den derzeit verfügbaren embryonalen Stammzellen und iPS-Zellen zu relevanten Herzrhythmusstörungen [136,137]. Dies kann vor allem in der klinischen Anwendung beim Menschen aufgrund der niedrigen Herzfrequenzen eine Rolle spielen. Ferner könnte die Unterstützung der Ventrikelfunktion durch ein physiologischeres Gerüst weiter optimiert werden. Tatsächlich können weder das Matrigel[®] noch andere zur Verfügung stehende Substanzen die komplexe helikale Struktur des Myokards optimal nachahmen [138].

Folgende Untersuchungen wurden in dieser Studie nicht durchgeführt, könnten aber zusätzliche Erkenntnisse bringen. Die elektromechanische Kopplung könnte anhand von Aktionspotentialmessungen mittels Mikroelektroden Array (MEA) [139] oder GCaMP3 ex vivo Fluoreszenz-Imaging [129] quantifiziert werden. Zum präziseren Monitoring der Vitalität der implantierten Zellen in vivo könnte die Methode des Biolumineszenz Imaging angewandt werden [74,75]. Die dichten Zellverbände im Randbereich zwischen Graft und Empfänger gilt es in Zukunft genauer zu charakterisieren. Darüber hinaus war der Beobachtungszeitraum von 4 Wochen kurz. Eine Untersuchungsreihe über einen längeren Zeitraum in vivo würde Gewissheit bezüglich der potentiell dedifferenzierten Zellen bringen. Auf der Suche nach einer adäquaten Zellreihe zur Anwendung im Großtiermodell und im Menschen, stellten Kensah et al. [140] BCTs aus murinen und humanen iPS-Zellen her. In einer Folgestudie werden diese BCTs nach der hier beschriebenen Methode intramyokardial in infarzierte Herzen von NK-Zellen depletierte Nacktratten implantiert. Diese Ratten sind immundefizient, eine Abstoßungsreaktion ist nicht zu erwarten. Das Konzept einer iPS-Zelltherapie kann derzeit jedoch noch nicht in die Klinik übertragen werden, da die Frage des onkologischen Risikos durch residuelle pluripotente Zellen oder durch propagierte Mutationen der Ausgangszellen noch nicht ausreichend geklärt ist.

Unsere Vision ist es dennoch, patientenspezifische, hochreine humane iPS-Zellen BCTs herzustellen, um damit, mittels multipler intramyokardialer Applikation, chronische Myokardischämien zu therapieren und so einer Herzinsuffizienz vorzubeugen.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Das kardiale Tissue Engineering stellt eine Möglichkeit dar, geschädigtes Myokard zu ersetzen. Jedoch zeigen epikardiale Grafts ein schlechtes Zellüberleben und keine aktive Verbesserung der Ventrikelfunktion. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die intramyokardiale Implantation bioartifizieller Myokardgrafts (BCTs) in einem chronischen Infarktmodell der Ratte funktionell effektiver ist als die epikardiale Transplantation.

Die BCTs wurden aus einem kardialen Zellgemisch GFP-positiver Lewis Ratten hergestellt und in einem Bioreaktor präkonditioniert. Durch LAD-Ligatur wurde in GFP-negativen Lewis Ratten ein Infarkt induziert. Nach 2 Wochen erfolgte die epikardiale oder intramyokardiale Transplantation der BCTs in das Infarktareal. Zusätzlich wurden reine Fibroblasten BCTs intramyokardial implantiert. Nach 4 Wochen wurden die Herzen explantiert.

Die Intra-K BCT integrierten in das Empfängermyokard, während eine signifikant dickere Bindegewebsschicht die Epi-K BCTs vom Empfänger trennte ($p=0,004$). Der Anteil an überlebenden Kardiomyozyten war in den Intra-K BCTs signifikant höher als in den Epi-K BCTs ($p=0,003$), und die Intra-K BCTs zeigten signifikant weniger Fibrose als alle anderen Versuchsgruppen ($p=0,0001$). Die Gefäßdichte war in den Intra-K BCTs signifikant höher als in den Epi-K ($p=0,0001$) und den Intra-F BCTs ($p=0,03$). Die Intra-K BCTs führten zu einer signifikanten Verbesserung der diastolischen und systolischen Ventrikelfunktion im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu den Intra-F BCTs ($p<0,05$), sowie zu einer Verbesserung des FS im Vergleich zu den präoperativen Werten. Zudem enthielten sie nach Explantation am meisten gap junction Proteine und als einzige Nkx2.5-positive kardiale Progenitorzellen.

Sowohl das Überleben als auch die Integration bioartifizieller Grafts konnte durch die intramyokardiale Implantationsmethode verbessert werden. Dadurch wurde die linksventrikuläre Pumpfunktion erhalten und einer Ventrikeldilatation entgegengewirkt. Die intramyokardiale Implantation solider bioartifizieller Grafts in infarzierte Ventrikel stellt somit eine wirkungsvolle Alternative zu der epikardialen Transplantation dar, und könnte in Zukunft im Großtiermodell und im Menschen Anwendung finden.

Kapitel 6

Literaturverzeichnis

- [1] WHO. Mortality and global health estimates. Website. Online erhältlich unter <http://apps.who.int/gho/data/node.\-main.\-PROJNUMWORLD?lang=en>; Abgerufen am 3. August 2016.
- [2] WHO. The Global Burden of Disease, 2004 Update. Broschüre. Online erhältlich unter http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf; Abgerufen am 3. August 2016.
- [3] Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. PLoS medicine. 2006 Nov;3(11):e442.
- [4] WHO. 2008-2013 Action Plan for the Global Strategy for the Prevention and Control of Noncommunicable Diseases. Broschüre. Online erhältlich unter <http://www.who.int/nmh/publications/9789241597418/en/>; Abgerufen am 3. August 2016.
- [5] Tardif JC. Coronary artery disease in 2010. European Heart Journal Supplements. 2010 Aug;12(Suppl C):C2–C10.
- [6] Herold G. Kapitel Kardiologie. In: Innere Medizin, Ausgabe 2011. Herausgeber: Herold, Gerd, Köln; 2011. Seiten 140 - 320.
- [7] Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K, Boysen G, Burell G, Cifkova R, et al . European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. European Heart Journal. 2007 Oct;p. 2375 – 2424.
- [8] Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4 - 2014. Broschüre. Online erhältlich unter <https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html;jsessionid=259C8EBC28B12E26BBBD79E3DB1C7F06.cae3>; Abgerufen am 3. August 2016.
- [9] H Renz-Polster, S Krautzig. Kapitel Herz. In: Basislehrbuch Innere Medizin. 4. Auflage. Elsevier, München; 2008. Seiten 26 - 197.

- [10] Capasso JM, Li P, Zhang X, Anversa P. Heterogeneity of ventricular remodeling after acute myocardial infarction in rats. *American Physiological Society*. 2002 Jul;p. 1–10.
- [11] Zimmerman SD, Criscione J, Covell JW. Remodeling in myocardium adjacent to an infarction in the pig left ventricle. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2004 Dec;287(6):H2697–704.
- [12] Tang EW, Wong CK, Herbison P. Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE) hospital discharge risk score accurately predicts long-term mortality post acute coronary syndrome. *American Heart Journal*. 2016 Dec;153(1):29–35.
- [13] Weil J, Schunkert H. [Pathophysiology of chronic heart failure]. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society*. 2006 Apr;95 Suppl 4:1–15–quiz 16–7.
- [14] Maggioni AP, Dahlström U, Filippatos G, Chioncel O, Leiro MC, Drozdz J, et al. EURObservational Research Programme: regional differences and 1-year follow-up results of the Heart Failure Pilot Survey (ESC-HF Pilot). *European Journal of Heart Failure*. 2013 Jun;15(7):808–817.
- [15] Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal*. 2016 Jul;37(27):2129–2200.
- [16] Deutsche Gesellschaft für Kardiologie. Therapie der Chronischen und Akuten Herzinsuffizienz, Ausgabe 2009. Pocket-Leitlinien; 2009.
- [17] Lund LH, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Christie JD, Dipchand AI, et al. The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-first official adult heart transplant report–2014. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2014 Sep;33(10):996–1008.
- [18] Strüber M, Meyer AL, Malehsa D, Kugler C, Simon AR, Haverich A. The current status of heart transplantation and the development of artificial heart systems. *Deutsches Ärzteblatt international*. 2009 Jul;106(28-29):471–477.
- [19] Eurotransplant. Statistic Overview 2015. Online erhältlich unter http://statistics.eurotransplant.org/index.php?search_type=overview; Abgerufen am 3. August 2016.
- [20] Müller M. Kapitel Herzchirurgie. In: *Chirurgie für Studium und Praxis 2012/13*. 11. Auflage. Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach; 2011. Seiten 121 - 144.

- [21] Kfoury AG, Kobashigawa JA. Prioritizing sensitized heart transplant candidates: a sensitive affair. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2012 Jul;31(7):677–678.
- [22] Komoda T, Hetzer R, Lehmkühl HB. Destiny of candidates for heart transplantation in the Eurotransplant heart allocation system. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2008 Aug;34(2):301–6– discussion 306.
- [23] Strüber M, Sander K, Lahpor J, Ahn H, Litzler PY, Drakos SG, et al. HeartMate II left ventricular assist device; early European experience. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2008 Aug;34(2):289–294.
- [24] Robbins RC, Kohn MH, Portner PM, Oyer PE. The totally implantable novacor left ventricular assist system. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2001 Mar;71(3 Suppl):S162–5– discussion S183–4.
- [25] Carbone A, Minieri M, Sampaolesi M, Fiaccavento R, De Feo A, Cesaroni P, et al. Hamster cardiomyocytes: a model of myocardial regeneration? *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1995 Mar;752:65–71.
- [26] Lutgens E, Daemen MJ, de Muinck ED, Debets J, Leenders P, Smits JF. Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional changes. *Cardiovascular Research*. 1999 Mar;41(3):586–593.
- [27] Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabé-Heider F, Walsh S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science (New York, NY)*. 2009 Apr;324(5923):98–102.
- [28] Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science (New York, NY)*. 2011 Feb;331(6020):1078–1080.
- [29] Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998 Jul;95(15):8801–8805.
- [30] Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. 2001 Jun;344(23):1750–1757.
- [31] Hsieh PCH, Segers VFM, Davis ME, MacGillivray C, Gannon J, Molkentin JD, et al. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nature Medicine*. 2007 Aug;13(8):970–974.

- [32] Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, et al. Chimerism of the transplanted heart. *The New England journal of medicine*. 2002 Jan;346(1):5–15.
- [33] Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003 Sep;114(6):763–776.
- [34] Jopling C, Sleep E, Raya M, Martí M, Raya A, Izpisua Belmonte JC. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature*. 2010 Mar;464(7288):606–609.
- [35] Kensah G, Gruh I, Viering J, Schumann H, Dahlmann J, Meyer H, et al. A novel miniaturized multimodal bioreactor for continuous in situ assessment of bioartificial cardiac tissue during stimulation and maturation. *Tissue engineering Part C, Methods*. 2011 Apr;17(4):463–473.
- [36] Zimmermann WH, Didié M, Wasmeier GH, Nixdorff U, Hess A, Melnychenko I, et al. Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats. *Circulation*. 2002 Sep;106(12 Suppl 1):I151–7.
- [37] Zimmermann WH, Schneiderbanger K, Schubert P, Didié M, Münzel F, Heubach JF, et al. Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circulation Research*. 2002 Feb;90(2):223–230.
- [38] Radisic M, Park H, Shing H, Consi T, Schoen FJ, Langer R, et al. Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004 Dec;101(52):18129–18134.
- [39] Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St John M, Xie JS, Cattaneo S, et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005 Aug;102(32):11474–11479.
- [40] Assmus B, Honold J, Schächinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, et al. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. 2006 Sep;355(12):1222–1232.
- [41] Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG, Field LJ. Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science (New York, NY)*. 1994 Apr;264(5155):98–101.
- [42] Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from

the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation*. 2006 Mar;113(10):1287–1294.

- [43] Martens A, Rojas SV, Baraki H, Rathert C, Schecker N, Zweigerdt R, et al. Substantial early loss of induced pluripotent stem cells following transplantation in myocardial infarction. *Artificial organs*. 2014 Oct;38(11):978–984.
- [44] Leor J, Aboulafia-Etzion S, Dar A, Shapiro L, Barbash IM, Battler A, et al. Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation*. 2000 Nov;102(19 Suppl 3):III56–61.
- [45] Soler-Botija C, Bagó JR, Llucà-Valldeperas A, Vallés-Lluch A, Castells-Sala C, Martínez-Ramos C, et al. Engineered 3D bioimplants using elastomeric scaffold, self-assembling peptide hydrogel, and adipose tissue-derived progenitor cells for cardiac regeneration. *American journal of translational research*. 2014 May;6(3):291–301.
- [46] Jamadi ES, Ghasemi-Mobarakeh L, Morshed M, Sadeghi M, Prabhakaran MP, Ramakrishna S. Synthesis of polyester urethane urea and fabrication of elastomeric nanofibrous scaffolds for myocardial regeneration. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications*. 2016 Jun;63:106–116.
- [47] Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DA, Choi A, Yau TM. Survival and function of bioengineered cardiac grafts. *Circulation*. 1999 Nov;100(19 Suppl):II63–9.
- [48] Yildirim Y, Naito H, Didié M, Karikkineth BC, Biermann D, Eschenhagen T, et al. Development of a biological ventricular assist device: preliminary data from a small animal model. *Circulation*. 2007 Sep;116(11 Suppl):II6–23.
- [49] Ozawa T, Mickle DAG, Weisel RD, Koyama N, Ozawa S, Li RK. Optimal biomaterial for creation of autologous cardiac grafts. *Circulation*. 2002 Sep;106(12 Suppl 1):II76–82.
- [50] Jawad H, Lyon AR, Harding SE, Ali NN, Boccaccini AR. Myocardial tissue engineering. *British medical bulletin*. 2008 Jul;87:31–47.
- [51] Zimmermann WH, Fink C, Kralisch D, Remmers U, Weil J, Eschenhagen T. Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes. *Biotechnology and bioengineering*. 2000 Apr;68(1):106–114.
- [52] Zimmermann WH, Melnychenko I, Wasmeier G, Didié M, Naito H, Nixdorff U, et al. Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nature Medicine*. 2006 Apr;12(4):452–458.
- [53] Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, Scholz H, Wattchow J, Weil J, et al. Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1997 Jul;11(8):683–694.

- [54] Terrovitis J, Lautamäki R, Bonios M, Fox J, Engles JM, Yu J, et al. Noninvasive quantification and optimization of acute cell retention by in vivo positron emission tomography after intramyocardial cardiac-derived stem cell delivery. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009 Oct;54(17):1619–1626.
- [55] Dvir T, Kedem A, Ruvinov E, Levy O, Freeman I, Landa N, et al. Prevascularization of cardiac patch on the omentum improves its therapeutic outcome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009 Sep;106(35):14990–14995.
- [56] Kawamura M, Miyagawa S, Miki K, Saito A, Fukushima S, Higuchi T, et al. Feasibility, safety, and therapeutic efficacy of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte sheets in a porcine ischemic cardiomyopathy model. *Circulation*. 2012 Sep;126(11 Suppl 1):S29–37.
- [57] Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Two-dimensional manipulation of cardiac myocyte sheets utilizing temperature-responsive culture dishes augments the pulsatile amplitude. *Tissue engineering*. 2001 Apr;7(2):141–151.
- [58] Haraguchi Y, Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Electrical coupling of cardiomyocyte sheets occurs rapidly via functional gap junction formation. *Biomaterials*. 2006 Sep;27(27):4765–4774.
- [59] Christman KL, Vardanian AJ, Fang Q, Sievers RE, Fok HH, Lee RJ. Injectable fibrin scaffold improves cell transplant survival, reduces infarct expansion, and induces neovasculature formation in ischemic myocardium. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004 Aug;44(3):654–660.
- [60] Kofidis T, de Bruin JL, Hoyt G, Lebl DR, Tanaka M, Yamane T, et al. Injectable bioartificial myocardial tissue for large-scale intramural cell transfer and functional recovery of injured heart muscle. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2004 Oct;128(4):571–578.
- [61] Laflamme MA, Murry CE. Regenerating the heart. *Nature Biotechnology*. 2005 Jul;23(7):845–856.
- [62] Alcon A, Cagavi Bozkulak E, Qyang Y. Regenerating functional heart tissue for myocardial repair. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2012 Aug;69(16):2635–2656.
- [63] Eschenhagen T, Didié M, Zimmermann H. Review Cardiac tissue engineering. *Transplant Immunology*. 2002 Nov;26(4):383–417.
- [64] Itzhaki-Alfia A, Leor J, Raanani E, Sternik L, Spiegelstein D, Netser S, et al. Patient characteristics and cell source determine the number of isolated human cardiac progenitor cells. *Circulation*. 2009 Dec;120(25):2559–2566.

- [65] Amariglio N, Hirshberg A, Scheithauer BW, Cohen Y, Loewenthal R, Trakhtenbrot L, et al. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS medicine*. 2009 Feb;6(2):e1000029.
- [66] Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011 Jun;474(7350):212–215.
- [67] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov;131(5):861–872.
- [68] Merkl C, Saalfrank A, Riesen N, Kühn R, Pertek A, Eser S, et al. Efficient generation of rat induced pluripotent stem cells using a non-viral inducible vector. *PLoS ONE*. 2012 Dec;8(1):e55170–e55170.
- [69] Lee AS, Tang C, Rao MS, Weissman IL, Wu JC. Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies. *Nature Medicine*. 2013 Jul;19(8):998–1004.
- [70] Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nature Biotechnology*. 2007 Aug;25(9):1015–1024.
- [71] Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*. 2004 Apr;428(6983):668–673.
- [72] Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, Menke A, Arseniev L, Hertenstein B, et al. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation*. 2005 May;111(17):2198–2202.
- [73] Christman KL, Fok HH, Sievers RE, Fang Q, Lee RJ. Fibrin glue alone and skeletal myoblasts in a fibrin scaffold preserve cardiac function after myocardial infarction. *Tissue engineering*. 2004 Mar;10(3-4):403–409.
- [74] Kutschka I, Chen IY, Kofidis T, Arai T, von Degenfeld G, Sheikh AY, et al. Collagen matrices enhance survival of transplanted cardiomyoblasts and contribute to functional improvement of ischemic rat hearts. *Circulation*. 2006 Jul;114(1 Suppl):I167–73.
- [75] Kutschka I, Chen IY, Kofidis T, von Degenfeld G, Sheikh AY, Hendry SL, et al. In vivo optical bioluminescence imaging of collagen-supported cardiac cell grafts. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2007 Mar;26(3):273–280.
- [76] Sarig U, Gigi AYCT, Yao W, Bronshtein T, Dahan N, Freddy BYC, et al. Thick Acellular Heart Extracellular Matrix with Inherent Vasculature: A Potential Platform for Myocardial Tissue Regeneration. *Tissue Engineering Part A*. 2012 Jul;p. 212537.

- [77] Shimizu T. Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues. *The FASEB Journal*. 2006 Feb;p. 70810.
- [78] Zhang P, Zhang H, Wang H, Wei Y, Hu S. Artificial matrix helps neonatal cardiomyocytes restore injured myocardium in rats. *Artificial organs*. 2006 Feb;30(2):86–93.
- [79] Jawad H, Lyon AR, Harding SE, Ali NN, Boccaccini AR. Myocardial tissue engineering. *British medical bulletin*. 2008 Jul;87:31–47.
- [80] Steinhauser ML, Lee RT. Regeneration of the heart. *EMBO molecular medicine*. 2011 Dec;3(12):701–712.
- [81] Landa N, Miller L, Feinberg MS, Holbova R, Shachar M, Freeman I, et al. Effect of Injectable Alginate Implant on Cardiac Remodeling and Function After Recent and Old Infarcts in Rat. *Circulation*. 2008 Mar;117(11):1388–1396.
- [82] Zhang M, Methot D, Poppa V, Fujio Y, Walsh K, Murry CE. Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2001 May;33(5):907–921.
- [83] Etzion S, Battler A, Barbash IM, Cagnano E, Zarin P, Granot Y, et al. Influence of embryonic cardiomyocyte transplantation on the progression of heart failure in a rat model of extensive myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2001 Jul;33(7):1321–1330.
- [84] Hamdi H, Furuta A, Bellamy V, Bel A, Puymirat E, Peyrard S, et al. Cell delivery: intramyocardial injections or epicardial deposition? A head-to-head comparison. *The Annals of thoracic surgery*. 2009 Apr;87(4):1196–1203.
- [85] Habib M, Shapira-Schweitzer K, Caspi O, Gepstein A, Arbel G, Aronson D, et al. A combined cell therapy and in-situ tissue-engineering approach for myocardial repair. *Biomaterials*. 2011 Oct;32(30):7514–7523.
- [86] Dai W, Wold LE, Dow JS, Kloner RA. Thickening of the infarcted wall by collagen injection improves left ventricular function in rats: a novel approach to preserve cardiac function after myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005 Aug;46(4):714–719.
- [87] Simpson D, Liu H, Fan THM, Nerem R, Dudley SC. A tissue engineering approach to progenitor cell delivery results in significant cell engraftment and improved myocardial remodeling. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2007 Sep;25(9):2350–2357.
- [88] Jockusch H, Voigt S, Eberhard D. Localization of GFP in frozen sections from unfixed mouse tissues: immobilization of a highly soluble marker protein by formaldehyde vapor. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2003 Mar;51(3):401–404.

- [89] Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LEJ, Berman D, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet*. 2012 Mar;379(9819):895–904.
- [90] Trachtenberg B, Velazquez DL, Williams AR, McNiece I, Fishman J, Nguyen K, et al. Rationale and design of the Transendocardial Injection of Autologous Human Cells (bone marrow or mesenchymal) in Chronic Ischemic Left Ventricular Dysfunction and Heart Failure Secondary to Myocardial Infarction (TAC-HFT) trial: A randomized, double-blind, placebo-controlled study of safety and efficacy. *American Heart Journal*. 2011 Mar;161(3):487–493.
- [91] Stamm C, Kleine HD, Choi YH, Dunkelmann S, Lauffs JA, Lorenzen B, et al. Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy studies. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2007 Mar;133(3):717–725.
- [92] Miki K, Uenaka H, Saito A, Miyagawa S, Sakaguchi T, Higuchi T, et al. Bioengineered myocardium derived from induced pluripotent stem cells improves cardiac function and attenuates cardiac remodeling following chronic myocardial infarction in rats. *Stem cells translational medicine*. 2012 May;1(5):430–437.
- [93] Reinecke H, Zhang M, Bartosek T, Murry CE. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts. *Circulation*. 1999 Jul;100(2):193–202.
- [94] Soler-Botija C, Bagó JR, Bayes-Genis A. A bird's-eye view of cell therapy and tissue engineering for cardiac regeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012 Apr;1254:57–65.
- [95] Lecour S. Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2009 Jul;47(1):32–40.
- [96] Lecour S, James RW. When are pro-inflammatory cytokines SAFE in heart failure? *European Heart Journal*. 2011 Mar;32(6):680–685.
- [97] Przybyt E, Krenning G, Brinker MGL, Harmsen MC. Adipose stromal cells primed with hypoxia and inflammation enhance cardiomyocyte proliferation rate in vitro through STAT3 and Erk1/2. *Journal of translational medicine*. 2013 Feb;11:3953.
- [98] Nakano M, Knowlton AA, Dibbs Z, Mann DL. Tumor Necrosis Factor- α Confers Resistance to Hypoxic Injury in the Adult Mammalian Cardiac Myocyte. *Circulation*. 1998 Mar;p. 1–10.

- [99] Xie X, Cao F, Sheikh AY, Li Z, Connolly AJ, Pei X, et al. Genetic modification of embryonic stem cells with VEGF enhances cell survival and improves cardiac function. *Cloning and stem cells*. 2007 Jan;9(4):549–563.
- [100] Arslan F, Lai RC, Smeets MB, Akeroyd L, Choo A, Agnor ENE, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem cell research*. 2013 May;10(3):301–312.
- [101] Ellison GM, Torella D, Dellegrottaglie S, Perez-Martinez C, Perez de Prado A, Vincinanza C, et al. Endogenous cardiac stem cell activation by insulin-like growth factor-1/hepatocyte growth factor intracoronary injection fosters survival and regeneration of the infarcted pig heart. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011 Aug;58(9):977–986.
- [102] Kislukhin VV. Regulation of oxygen consumption by vasomotion. *Mathematical biosciences*. 2004 Sep;191(1):101–108.
- [103] Moldovan NI, Goldschmidt-Clermont PJ, Parker-Thornburg J, Shapiro SD, Kolattukudy PE. Contribution of monocytes/macrophages to compensatory neovascularization: the drilling of metalloelastase-positive tunnels in ischemic myocardium. *Circulation Research*. 2000 Sep;87(5):378–384.
- [104] Khmelewski E, Becker A, Meinertz T, Ito WD. Tissue resident cells play a dominant role in arteriogenesis and concomitant macrophage accumulation. *Circulation Research*. 2004 Sep;95(6):E56–64.
- [105] Luo F, Wariaro D, Lundberg G, Blegen H, Wahlberg E. Vascular Growth Factor Expression in a Rat Model of Severe Limb Ischemia. *Journal of Surgical Research*. 2002 Dec;108(2):258–267.
- [106] Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Merante F, Mickle DA. Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1999 Mar;31(3):513–522.
- [107] Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DAG, Zhang J, Mohabeer MK, et al. Cardiomyocyte Transplantation Improves Heart Function. *The Annals of Thoracic Surgery*. 1996 Sep;p. 65460.
- [108] Yoshizumi T, Zhu Y, Jiang H, D'Amore A, Sakaguchi H, Tchao J, et al. Timing effect of intramyocardial hydrogel injection for positively impacting left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Biomaterials*. 2016 Mar;83(c):182–193.

- [109] Wall ST, Walker JC, Healy KE, Ratcliffe MB, Guccione JM. Theoretical impact of the injection of material into the myocardium: a finite element model simulation. *Circulation*. 2006 Dec;114(24):2627–2635.
- [110] Naito H, Melnychenko I, Didié M, Schneiderbanger K, Schubert P, Rosenkranz S, et al. Optimizing engineered heart tissue for therapeutic applications as surrogate heart muscle. *Circulation*. 2006 Jul;114(1 Suppl):I72–8.
- [111] Zimmermann WH, Eschenhagen T. Cardiac tissue engineering for replacement therapy. *Heart failure reviews*. 2003 Jul;8(3):259–269.
- [112] Souders CA, Bowers SLK, Baudino TA. Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circulation Research*. 2009 Dec;105(12):1164–1176.
- [113] Brown RD, Ambler SK, Mitchell MD, Long CS. The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2005 Jan;45:657–687.
- [114] Mitchell MD, Laird RE, Brown RD, Long CS. IL-1beta stimulates rat cardiac fibroblast migration via MAP kinase pathways. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2007 Feb;292(2):H1139–47.
- [115] Schultz JEJ, Witt SA, Glascock BJ, Nieman ML, Reiser PJ, Nix SL, et al. TGF-beta1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. *The Journal of clinical investigation*. 2002 Mar;109(6):787–796.
- [116] Schultz JE, Witt SA, Nieman ML, Reiser PJ, Engle SJ, Zhou M, et al. Fibroblast growth factor-2 mediates pressure-induced hypertrophic response. *The Journal of clinical investigation*. 1999 Sep;104(6):709–719.
- [117] Takeda N, Manabe I, Uchino Y, Eguchi K, Matsumoto S, Nishimura S, et al. Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the murine heart to pressure overload. *The Journal of clinical investigation*. 2010 Jan;120(1):254–265.
- [118] Fujii T, Yonemitsu Y, Onimaru M, Tanii M, Nakano T, Egashira K, et al. Nonendothelial mesenchymal cell-derived MCP-1 is required for FGF-2-mediated therapeutic neovascularization: critical role of the inflammatory/arteriogenic pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2006 Nov;26(11):2483–2489.
- [119] Ito H, Hiroe M, Hirata Y, Fujisaki H, Adachi S, Akimoto H, et al. Endothelin ETA receptor antagonist blocks cardiac hypertrophy provoked by hemodynamic overload. *Circulation*. 1994 May;89(5):2198–2203.

- [120] Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *The Journal of experimental medicine*. 2007 Nov;204(12):3037–3047.
- [121] Martens A, Gruh I, Dimitroulis D, Rojas SV, Schmidt-Richter I, Rathert C, et al. Rhesus monkey cardiosphere-derived cells for myocardial restoration. *Cytotherapy*. 2011 Aug;13(7):864–872.
- [122] Leor J, Cohen S. Myocardial tissue engineering: creating a muscle patch for a wounded heart. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004 May;1015:312–319.
- [123] Thijssen VL, Ausma J, Borgers M. Structural remodelling during chronic atrial fibrillation: act of programmed cell survival. *Cardiovascular Research*. 2001 Oct;52(1):14–24.
- [124] Dispersyn GD, Mesotten L, Meuris B, Maes A, Mortelmans L, Flameng W, et al. Dissociation of cardiomyocyte apoptosis and dedifferentiation in infarct border zones. *European Heart Journal*. 2002 Jun;p. 84957.
- [125] Driesen RB, Verheyen FK, Dijkstra P, Thoné F, Cleutjens JP, Lenders MH, et al. Structural remodelling of cardiomyocytes in the border zone of infarcted rabbit heart. *Molecular and cellular biochemistry*. 2007 Aug;302(1-2):225–232.
- [126] Zhang Y, Li TS, Lee ST, Wawrowsky KA, Cheng K, Galang G, et al. Dedifferentiation and proliferation of mammalian cardiomyocytes. *PLoS ONE*. 2010 Sep;5(9):e12559.
- [127] Dispersyn GD, Ausma J, Thoné F, Flameng W, Vanoverschelde JL, Allessie MA, et al. Cardiomyocyte remodelling during myocardial hibernation and atrial fibrillation: prelude to apoptosis. *Cardiovascular Research*. 1999 Sep;43(4):947–957.
- [128] Page BJ, Banas MD, Suzuki G, Weil BR, Young RF, Fallavollita JA, et al. Revascularization of chronic hibernating myocardium stimulates myocyte proliferation and partially reverses chronic adaptations to ischemia. *Journal of the American College of Cardiology*. 2015 Feb;65(7):684–697.
- [129] Gerbin KA, Yang X, Murry CE, Coulombe K. Enhanced Electrical Integration of Engineered Human Myocardium via Intramyocardial versus Epicardial Delivery in Infarcted Rat Hearts. *PLoS ONE*. 2014 Dec;10(7):e0131446–e0131446.
- [130] Masumoto H, Matsuo T, Yamamizu K, Uosaki H, Narazaki G, Katayama S, et al. Pluripotent stem cell-engineered cell sheets reassembled with defined cardiovascular populations ameliorate reduction in infarct heart function through cardiomyocyte-mediated neovascularization. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2012 Jun;30(6):1196–1205.

- [131] Page B, Young R, Iyer V, Suzuki G, Lis M, Korotchkina L, et al. Persistent regional downregulation in mitochondrial enzymes and upregulation of stress proteins in swine with chronic hibernating myocardium. *Circulation Research*. 2008 Jan;102(1):103–112.
- [132] Fallavollita JA, Malm BJ, Canty JM. Hibernating myocardium retains metabolic and contractile reserve despite regional reductions in flow, function, and oxygen consumption at rest. *Circulation Research*. 2003 Jan;92(1):48–55.
- [133] Andrée B, Bela K, Horvath T, Lux M, Ramm R, Venturini L, et al. Successful re-endothelialization of a perfusable biological vascularized matrix (BioVaM) for the generation of 3D artificial cardiac tissue. *Basic Research in Cardiology*. 2014 Sep;109(6):441.
- [134] Hsieh CS, Schuong JY, Huang WS, Huang TT. Five years' experience of the modified Meek technique in the management of extensive burns. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*. 2008 May;34(3):350–354.
- [135] Wykrzykowska JJ, Rosinberg A, Lee SU, Voisine P, Wu G, Appelbaum E, et al. Autologous cardiomyotissue implantation promotes myocardial regeneration, decreases infarct size, and improves left ventricular function. *Circulation*. 2011 Jan;123(1):62–69.
- [136] Chong JJH, Yang X, Don CW, Minami E, Liu YW, Weyers JJ, et al. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature*. 2014 Jun;510(7504):273–277.
- [137] Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T, Wada Y, Ichimura H, Tanaka Y, et al. Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature*. 2016 Oct;538(7625):388–391.
- [138] Kofidis T, de Bruin JL, Hoyt G, Ho Y, Tanaka M, Yamane T, et al. Myocardial restoration with embryonic stem cell bioartificial tissue transplantation. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2005 Jun;24(6):737–744.
- [139] Halbach M, Pillekamp F, Brockmeier K. Ventricular slices of adult mouse hearts—a new multicellular in vitro model for electrophysiological studies. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2006 Jun;p. 0108.
- [140] Kensah G, Roa Lara A, Dahlmann J, Zweigerdt R, Schwanke K, Hegermann J, et al. Murine and human pluripotent stem cell-derived cardiac bodies form contractile myocardial tissue in vitro. *European Heart Journal*. 2013 Apr;34(15):1134–1146.

Kapitel 8

Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nrn. 6 und 7

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel "Entwicklung eines funktionellen bioartifiziellen Myokardersatzes zur Restauration von Myokardinfarkten im Rattenmodell" in der Klinik für Herz-, Thorax-, Transplantations- und Gefäßchirurgie unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. Ingo Kutschka mit der Unterstützung durch Dr. med. Hassina Baraki, Dr. rer. nat. George Kensah, Dr. rer. nat. Ina Gruh, Christian Rathert und Natalie Schecker ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsverfahren ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Ergebnisse der Dissertation wurden während der 41. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie (DGTHG) im Februar 2012 in Freiburg präsentiert.

Hannover, den

Kapitel 9

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Dr. h.c. Axel Haverich für die Bereitstellung des Themas meiner Dissertation.

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Ingo Kutschka für die wertvolle konstruktive Kritik und ein Engagement, dass weit über den Rahmen dieser Arbeit hinaus reicht.

Ich danke PD Dr. Hassina Baraki für ihren immer wohlgelaunten Einsatz und die engagierte Betreuung meiner Dissertation.

Ich danke Dr. George Kensah und Dr. Julia Dahlmann für die effektive Unterstützung und die ansteckende Begeisterung für die Forschung.

Ich danke Prof. Dr. Ulrich Martin sowie dem gesamten Team des LEBAO für die freundliche Aufnahme und Zusammenarbeit. Dr. Andres Hilfiker für die lehrreichen Journal Clubs, Dr. Ralph Haller für die zahlreichen Hilfestellungen, Natalie Schecker und Christian Rathert für die technische Assistenz.

Ich danke PD Dr. med. Danny Jonigk für die aufschlussreiche interdisziplinäre Zusammenarbeit.

Für alles Andere danke ich meinen Eltern und meiner Schwester.

Anhang A

Material

A.1 Operativer Teil

Tabelle A.1: Geräte und Instrumente im operativen Teil

| Geräte und Instrumente | Hersteller |
|---|---|
| Beatmungsgerät für Kleintiere Harvard Model 683 | Harvard Bioscience, Holliston, USA |
| Echokardiographiesystem iE33 mit L15-7io Schallkopf | Philips Medical Systems, Hamburg |
| Elektrokoagulator Minicutter | KLS Martin, Tuttlingen |
| Haarschneider Contura | Wella Professionals, Darmstadt |
| Lampe KL 1500 LCD | Schott, Mainz |
| MRT Gerät 7 Tesla (300 MHz) | Bruker BioSpin, Ettlingen |
| Nadelhalter | Fine Science Tools, Heidelberg |
| Narkosemittel-Verdampfer Isofluran 19.3 Vapore | Dräger, Lübeck |
| OP Lichtmikroskop SZX7 | Olympus, Hamburg |
| OP Lichtmikroskop SZ51 | Olympus, Hamburg |
| Pinzette spitz und stumpf | Fine Science Tools, Heidelberg |
| Schere groß und klein | Fine Science Tools, Heidelberg |
| Software HEM 3.5 | Notocord, Croissy sur Seine, Frankreich |

Tabelle A.2: Verbrauchsmaterialien im operativen Teil

| Verbrauchsmaterialien | Hersteller |
|--|-------------------|
| Augensalbe Bepanthen® | Bayer, Leverkusen |
| Einmal-Spritzen 1, 2,5, 5, 10mL | Braun, Melsungen |
| Injektionskanülen Sterican® 0,70mm x 30mm | Braun, Melsungen |
| Peripherer Venenkatheter Braunüle® Vasofix 1,1mm x 33mm, 20G | Braun, Melsungen |
| Peripherer Venenkatheter Braunüle® Vasofix 1,7mm x 50mm, 16G | Braun, Melsungen |
| Peripherer Venenkatheter Braunüle® Vasofix 2,2mm x 50mm, 14G | Braun, Melsungen |

Tabelle A.3: Nahtmaterial im operativen Teil

| Nahtmaterial | Hersteller |
|---|----------------------|
| 5–0 Ethibond Excel, 1/2 Kreis Rundkörper-Nadel 13,0mm | Ethicon, Norderstedt |
| 6–0 PermaHand Seide, 3/8 Kreis Rundkörper-Nadel 9,3mm | Ethicon, Norderstedt |
| 3–0 Prolene, 1/2 Kreis Rundkörper-Nadel 17,0mm | Ethicon, Norderstedt |
| 7–0 Prolene, 1/2 Kreis Rundkörper-Nadel 6,5mm | Ethicon, Norderstedt |
| 7–0 Prolene, 3/8 Kreis Rundkörper-Nadel 9,3mm | Ethicon, Norderstedt |
| 8–0 Prolene, 3/8 Kreis Rundkörper-Nadel 6,5mm | Ethicon, Norderstedt |

Tabelle A.4: Chemikalien im operativen Teil

| Chemikalien | Hersteller |
|--|----------------------------------|
| Butorphanol (Torbugesic®) 10mg/mL Injektionslösung | Pfizer Animal Health, Berlin |
| Carprofen (Rimadyl®) 50mg/mL Injektionslösung | Pfizer Animal Health, Berlin |
| Isofluran | Baxter, Deerfield, USA |
| Kontrastmittel Gadotersäure (Dotarem®) 0,5mmol/mL | Guerbert, Villepinte, Frankreich |
| NaCl 0,9% | Braun, Melsungen |
| Schnell-Desinfektionsmittel Bacillol® AF | Bode Chemie, Hamburg |

A.2 Histologischer Teil

A.2.1 Materialien

Tabelle A.5: Geräte im histologischen Teil

| Geräte | Hersteller |
|---|-----------------------------------|
| Digitalkamera AxioCam HSm (Mikroskop Observer.Z1) | Carl Zeiss, Oberkochen |
| Digitalkamera AxioCam MRc (Mikroskop BX40) | Carl Zeiss, Oberkochen |
| Digitalkamera AxioCam MRm (Mikroskop Observer.A1) | Carl Zeiss, Oberkochen |
| Elektrische Pipettierhilfe Pipetus | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt |
| Fluoreszenzmikroskop Axio Zeiss Observer.A1 | Carl Zeiss, Oberkochen |
| Fluoreszenzmikroskop Axio Zeiss Observer.Z1 | Carl Zeiss, Oberkochen |
| Kryotom HM 500 OM | Microm, Walldorf |
| Kryotom HM 560 | Microm, Walldorf |
| Lichtmikroskop BX40 | Olympus, Hamburg |
| Magnetrührer IKA [®] basic | Omnilab-Laborzentrum, Bremen |
| Minizentrifuge Sprout | Biozym, Hessisch Oldendorf |
| Software Axiovision 4.7.2 | Carl Zeiss, Oberkochen |
| Vortexer MS1 Minishaker | Ika-Works, Wilmington, USA |
| Wage BP 210S | Satorius, Göttingen |
| Wage BP 2100S | Satorius, Göttingen |
| Wasserbad GFL 1083 | Heraeus Instruments, Osterode |

Tabelle A.6: Verbrauchsmaterialien im histologischen Teil

| Verbrauchsmaterialien | Hersteller |
|--|---|
| Deckgläschen 24 x 60mm | Menzel-Gläser, Braunschweig |
| Eppendorf-Reaktionsgefäße 0,5, 1 und 2mL | Eppendorf, Hamburg |
| Faltenfilter Rotilabo | Carl Roth, Karlsruhe |
| Fettstift Dako Pen [®] | DakoCytomation, Glostrup, Denmark |
| Kryostat Einwegklingen | Leica Microsystems, Wetzlar |
| Objektträger Super Frost + 25 x 75 x 1,0mm | Menzel-Gläser, Braunschweig |
| Objektträgerkästen Rotilabo | Carl Roth, Karlsruhe |
| Parafilm [®] M | Brand, Wertheim |
| Pipettenspitzen 10, 20 und 1000µL | Sarstedt, Nümbrecht |
| Reaktionsgefäße 15 und 50mL Falcons | Greiner, Frickenhausen |
| Serologische Pipetten 5, 10 und 25mL | Sarstedt, Nümbrecht |
| Tissue Tek [®] Kryoeinbettmedium | Sakura Fintek, Alphen aan den Rijn, Niederlande |

Tabelle A.7: Chemikalien im histologischen Teil

| Chemikalien | Hersteller |
|---|-----------------------------------|
| Aceton | J.T. Baker, Deventer, Niederlande |
| Aqua ad iniectabilia | Braun, Melsungen |
| Bovines Serumalbumin | Sigma-Aldrich, St Louis, USA |
| Dimethylsulfoxid DMSO | Sigma-Aldrich, St Louis, USA |
| Eindeckmedium Fluorescence Mounting medium | DakoCytomation, Glostrup, Denmark |
| Eindeckmedium für die Histologie Eukitt [®] Corbit Balsam | Hecht I., Kiel-Hassee |
| Essigsäure | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ethanol, absolut | Büfa, Lübeck |
| Milli-Q [®] Laborwasser | Merck Millipore, Darmstadt |
| Natriumchlorid NaCl | Sigma-Aldrich, St Louis, USA |
| Natriumcitrat | Sigma-Aldrich, St Louis, USA |
| Natriumhydroxid-Plätzchen NaOH | Merck, Darmstadt |
| Paraformaldehyd | Sigma-Aldrich, St Louis, USA |
| PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ Feststoff Tabletten (PBS w/o) | Sigma, Deisenhofen |
| Staurosporin aus <i>Streptomyces sp.</i> | Sigma-Aldrich, St Louis, USA |
| Tris (hydroxymethyl) aminomethan | Serva, Heidelberg |
| Triton X-100 | Sigma, Deisenhofen |
| Wasserstoffperoxid H ₂ O ₂ 35% | Merck, Darmstadt |
| Xylol | J.T. Baker, Deventer, Niederlande |
| 4,6 Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) | Carl Roth, Karlsruhe |

Tabelle A.8: Färbekits und -lösungen

| Färbekits und -lösungen | Hersteller |
|--|--------------------------------------|
| Avidin Biotin Blocking Kit | Vector Laboratories, Burlingame, USA |
| in situ Cell Death Detection Kit mit Fluorescein | Roche, Indianapolis, USA |
| Eosin Y | Sigma-Aldrich, St Louis, USA |
| LinRed Substratkit für Peroxidase | Linaris, Dossenheim |
| Masson-Goldner Trichrom Färbekit | Carl Roth, Karlsruhe |
| Meyers Hämalaun | Merck, Darmstadt |
| Vectastain Elite ABC Kit | Vector Laboratories, Burlingame, USA |

A.2.2 Antikörper und Seren

Alle Primärantikörper sind gegen Ratte gerichtet.

Alle Sekundärantikörper stammen von der Firma Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA.

Tabelle A.9: Verwendete Primärantikörper

| Antigen Spezifität | Wirt | Ig Klasse | Verdünnung | Hersteller |
|--------------------|-------|-------------------|------------|---|
| CD11b | Maus | IgG _{2a} | 1:50 | Acris Antibodies, Herford |
| CD31 | Ziege | IgG | 1:50 | Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, USA |
| Connexin 45 | Ziege | IgG | 1:100 | Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, USA |
| GFP | Hase | IgG | 1:500 | Molecular Probes, Darmstadt |
| Kollagen I | Maus | IgG ₁ | 1:15000 | Sigma-Aldrich, St Louis, USA |
| Nkx2.5 | Hase | IgG | 1:50 | Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, USA |
| rP4h | Maus | IgG ₁ | 1:200 | Acris Antibodies, Herford |
| Titin | Maus | IgM | 1:30 | Hybridoma Bank, Iowa, USA |

Tabelle A.10: Verwendete Sekundärantikörper

| Wirt | Antigen Spezifität | Anregungs- und Emissionsspektren | Verdünnung |
|-------|--------------------|--|------------|
| Ziege | Hase IgG | Cy3 bis-NHS ester | 1:300 |
| Ziege | Hase IgG | Biotinylierter Antikörper für die Immunhistochemie | 1:1000 |
| Ziege | Maus IgG | Alexa Fluor 488 carboxylic acid | 1:300 |
| Ziege | Maus IgG | DyLight 549-TFP ester | 1:300 |
| Esel | Maus IgM | DyLight 549-TFP ester | 1:300 |
| Ziege | Maus IgM | DyLight 649-TFP ester | 1:300 |
| Esel | Ziege IgG | DyLight 649-TFP ester | 1:300 |

Tabelle A.11: Verwendete Seren

| Seren | Verdünnung | Hersteller |
|---|-------------|---|
| Negativkontrolle Maus IgG ₁ | 100mg/mL | DakoCytomation, Glostrup, Denmark |
| Negativkontrolle Maus IgG _{2a} | 100mg/mL | DakoCytomation, Glostrup, Denmark |
| Negativkontrolle Maus IgM | 100mg/mL | DakoCytomation, Glostrup, Denmark |
| Negativkontrolle Ziege IgG | 200µg/5,0mL | Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, USA |

Tabelle A.12: Verwendete Isotypenkontrollen

| Isotypenkontrollen | Verdünnung | Hersteller |
|-----------------------|------------|---|
| normales Esel Serum | 60,0mg/mL | Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA |
| normales Ziegen Serum | 60,0mg/mL | Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA |

A.2.3 Spezifische Färbungen

Alle Reagenzien der Masson-Goldner-Trichrom Färbung stammen aus dem Carl Roth Masson-Goldner-Trichrom Färbekit.

Tabelle A.13: Reagenzien der Masson-Goldner-Trichrom Färbung

| Lösungen | Anfärbung |
|----------------------|---|
| Weigerts Hämatoxylin | Kernfärbung (hellrot) |
| Goldner-Lösung I | Ponceau (Zytoplasma und Muskulatur in rot) Säurefuchsin (Kollagenfasern in rot) |
| Goldner-Lösung II | Orange G (Erythrozyten in orange) Phosphorwolframsäure (Entfärbung der Kollagenfasern) |
| Goldner-Lösung III | Lichtgrün (Bindegewebe in blau-grün) |

Tabelle A.14: Reagenzien der Hämaun-Eosin Färbung

| Lösungen | Herstellung |
|-------------------|---|
| Hämaun nach Meyer | fertige Lösung, wurde vor jedem Gebrauch filtriert |
| Eosinlösung | 1%-ige Stocklösung (10g EosinY, 200mL Aqua dest, 800mL 95% Alkohol). Bei RT gelagert und vor Gebrauch verdünnt zu einer 0,25%-igen Gebrauchslösung (250mL Eosin Stocklösung, 750mL 80% Alkohol, 5mL Eisessig) |

Tabelle A.15: Reagenzien der Immunfluoreszenzfärbungen

| Lösungen | Herstellung |
|--|---|
| PBS | 1 Tablette auf 200mL Mili-Q Wasser |
| 2%-iges Paraformaldehyd (PFA) | Paraformaldehyd in Pulverform, gelöst in PBS |
| Färbepuffer | PBS mit 1% Rinderserumalbumin (BSA) |
| Tris-gepufferte Saline + (TBS+) | 10%-ige TBS Stocklösung (0,5M Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 1,625M NaCl in 4,0L H ₂ O (pH 7,6)). Lagerung bei 4°C, vor Gebrauch verdünnt zu einer TBS+ Lösung: 95% 1%-iges TBS, 0,025% Triton X-100, 5% tierisches Serum aus der gleichen Spezies wie der verwendete Sekundärantikörper |
| DAPI | 1:30000 in Färbepuffer verdünnt |
| Primär- und Sekundärantikörperlösungen | in Färbepuffer verdünnt (einzelne Verdünnungen siehe Tabellen A.9 und A.10) |

Tabelle A.16: Reagenzien der immunhistochemischen Färbungen

| Lösungen | Herstellung |
|--|---|
| PBS | 1 Tablette in 200mL Mili-Q Wasser |
| 2%-iges Paraformaldehyd (PFA) | Paraformaldehyd in Pulverform, gelöst in PBS |
| Färbepuffer | PBS mit 1% Rinderserumalbumin (BSA) |
| 3%-iges H ₂ O ₂ | verdünnt in Aqua Dest, lichtgeschützt angesetzt |
| 5%-iges Serum | aus der gleichen Spezies wie der Sekundärantikörper, verdünnt in PBS |
| Avidin und Biotin Blocking Solution | gebrauchsfertige Lösungen |
| ABC-Komplex | 2 Tropfen Reagent A und 2 Tropfen Reagent B in 5mL PBS |
| Substrat LinRed | gebrauchsfertige Lösung |
| Primär- und Sekundärantikörperlösungen | in Färbepuffer verdünnt (einzelne Verdünnungen siehe Tabelle A.9 und A.10) |

Tabelle A.17: Reagenzien der TUNEL-Immunfluoreszenzfärbungen

| Lösungen | Herstellung |
|---------------------------------|---|
| PBS | 1 Tablette in 200mL Milli-Q Wasser |
| 2%-iges Paraformaldehyd (PFA) | Paraformaldehyd in Pulverform, gelöst in PBS |
| Natriumcitratlösung | 0,1% Natriumcitrat, 0,1% Triton X-100 in PBS, muss frisch angesetzt werden |
| in situCell Death Detection Kit | TdT Enzym Lösung und Fluorescein-Nukleotid Lösung, beide gebrauchsfertig |