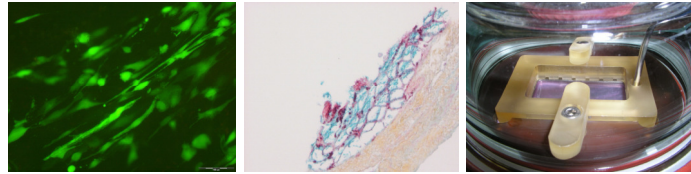


Aus der Abteilung für Herz-, Thorax-, Transplantations- und Gefäßchirurgie
der Medizinischen Hochschule Hannover



Medizinische Hochschule
Hannover



Tissue Engineered Myocardial Patch

Etablierung dezellularisierter biologischer Matrices für das myokardiale Tissue Engineering im Großtiermodell mit Entwicklung eines Mechano-Bioreaktorsystems zur physiologischen Stimulation der Zellkultur

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

vorgelegt von Tilman Calließ
aus Braunschweig
Hannover 2008

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover am 27.10.2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident:	Professor Dr. Dieter Bitter-Suermann
Betreuerin:	Professorin Dr. Heike Mertsching
Referentin:	Professorin Dr. Denise Hilfiker-Kleiner
Korreferent:	PD Dr. Reinhard von Wasielewski
Tag der mündlichen Prüfung:	27.10.2008
Promotionsausschussmitglieder:	Professor Dr. Hermann Haller Professor Dr. Klaus Otto Professor Dr. Christoph Klein

Meinen Eltern Gretl und Jörg Calließ in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

1	Einleitung	4
1.1	Klinische Relevanz und Therapieoptionen	4
1.1.1	State-of-the-Art Therapiekonzepte	4
1.1.2	Neue Strategien in der Behandlung der kardialen Dysfunktion	5
1.2	Myokardielles Tissue Engineering	8
1.2.1	Theoretische Grundlagen und Problemstellungen	9
1.2.2	Aktuelle Modelle im Myokardiellen Tissue Engineering	12
1.3	Unser Konstrukt eines „Tissue Engineered Myocardial Patch“	14
1.3.1	Zielsetzung	14
2	Material	16
2.1	Laborgeräte	16
2.2	Verbrauchsmaterialien	17
2.3	Chemikalien	18
2.4	Zellkulturmedien, Zusätze und Lösungen.....	20
2.5	Antikörper und Seren.....	22
2.6	Verwendetes Probenmaterial	23
2.7	Perfusionssystem zur Dezellularisierung des rechten Ventrikels	23
2.8	Mechano-Bioreaktor MEAT-3D.....	24
3	Methoden	25
3.1	Zweidimensionale Zellkulturtechniken und Kardiomyozytenisolation.....	25
3.1.1	Isolation der Kardiomyozyten	25
3.1.2	Zellzahlbestimmung in der Zählkammer nach Neubauer.....	28
3.1.3	Zweidimensionale Zellkultur	29
3.1.4	Herstellung von Cytospots	30
3.2	Herstellung biologischer Matrices für dreidimensionale Konstrukte	31
3.2.1	Gewebebegewinnung zur Matrixherstellung.....	31
3.2.2	Azellularisierung von Schweinedünndarm zur Herstellung der SIS-Matrix	32
3.2.3	Azellularisierung des rechten Ventrikel-Myokards zur Herstellung der DRV-Matrix.....	33
3.3	Entwicklung eines Mechano-Bioreaktors (MEAT-3D).....	34
3.3.1	Aufbau des Bioreaktors	34
3.3.2	Applikation von mechanischem Stress.....	35
3.3.3	Entwicklung eines Halterahmens	36

3.3.4	Nährstoffversorgung der Zellen im Bioreaktor	36
3.4	Dreidimensionale Zellkultur auf den biologischen Matrices	37
3.4.1	Vorversuche in der Zellkulturschale	38
3.4.2	Rebesiedlung und statische Kultivierung der SIS im Bioreaktor	38
3.4.3	Rebesiedlung und Kultivierung der SIS unter physiologischem Stress.....	40
3.4.4	Rebesiedlung und statische Kultivierung des DRV im Bioreaktor	41
3.4.5	Herstellung von Gefrierschnitten	42
3.4.6	Herstellung von Parafinschnitten	42
3.5	Funktionelle Charakterisierung.....	44
3.5.1	Klinische Chemie	44
3.5.2	Elektrostimulation mit einem Einkammerschrittmacher	45
3.6	Histologische Charakterisierung.....	46
3.6.1	Live/Dead-Assay	46
3.6.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	47
3.6.3	Pentachrom-Färbung nach Movat	48
3.6.4	Immunhistologie.....	50
4	Ergebnisse	54
4.1	Zweidimensionale Zellkulturtechniken und Kardiomyozytenisolation.....	54
4.1.1	Isolation der Kardiomyozyten	54
4.1.2	Zweidimensionale Zellkultur	56
4.2	Herstellung der Matrices.....	58
4.2.1	Azellularisierung von Schweinedünndarm zur Herstellung der SIS-Matrix	58
4.2.1.1	Histologische Charakterisierung.....	59
4.2.2	Azellularisierung des rechten Ventrikel-Myokards zur Herstellung der DRV-Matrix.....	59
4.2.2.1	Histologische Charakterisierung.....	60
4.3	Etablierung des Mechano-Bioreaktors (MEAT-3D)	61
4.4	Dreidimensionale Zellkultur auf den biologischen Matrices	62
4.4.1	Vorversuche in der Zellkulturschale	62
4.4.2	Rebesiedlung und statische Kultivierung der SIS im Bioreaktor	64
4.4.2.1	Funktionelle Charakterisierung	64
4.4.2.2	Histologische Charakterisierung.....	65
4.4.3	Rebesiedlung und Kultivierung der SIS unter physiologischem Stress.....	69
4.4.3.1	Funktionelle Charakterisierung	69
4.4.3.2	Histologische Charakterisierung.....	71
4.4.4	Besiedlung des DRV für den Bioreaktor	74
4.4.4.1	Funktionelle Charakterisierung	74
4.4.4.2	Histologische Charakterisierung.....	75

5	Diskussion	78
5.1	Myokardielles Tissue Engineering	78
5.1.1	Strategien und Problemstellungen im myokardiellen TE.....	79
5.2	Unser Konstrukt eines Tissue Engineered Myocardial Patch.....	82
5.2.1	Entwicklung und Evaluation eines Mechano-Bioreaktors MEAT-3D	83
5.2.2	Etablierung biologischer Matrices für das myokardielle TE.....	85
5.2.2.1	Small Intestine Submucosa.....	85
5.2.2.2	Dynamische Kultivierung der rebesiedelten Small Intestine Submucosa.....	88
5.2.2.3	Decellularised Right Ventricle	89
5.2.3	Etablierung eines Großtiermodells für das Myokardielle TE.....	90
5.3	Schlussfolgerungen und Zukunftsperspektiven	92
6	Verzeichnisse.....	95
6.1	Literaturverzeichnis	95
6.2	Abkürzungsverzeichnis.....	101
7	Zusammenfassung	102
8	Anhang	103
8.1	Lebenslauf.....	103
8.2	Erklärung	105
8.3	Danksagung	106

1 Einleitung

1.1 Klinische Relevanz und Therapieoptionen

In den Industrienationen Europas und Nordamerikas stellen Herz-Kreislaufkrankungen mit rund 45 % die derzeit häufigste Todesursache dar [1]. Einen besonderen Stellenwert nehmen dabei vor allem der Myokardinfarkt und die chronisch ischämischen Herzkrankheiten ein. In der Pathophysiologie dieser Erkrankungen kommt es zum Absterben von Muskelzellen, was wiederum – durch die eingeschränkte Fähigkeit des Myokards sich in ausreichendem Maße zu regenerieren – zu einer Verminderung der Herzfunktion führt. Im weiteren Mechanismus kann dieses zur Herzinsuffizienz mit kompensatorischer Hypertrophie des übrigen Myokards führen. Körpereigene Regulationsmechanismen zum Aufrechterhalten der Herzfunktion liegen in der Aktivierung neurohumoraler Systeme und der Ausschüttung verschiedener Cytokine und Wachstumsfaktoren. Die Herzleistung wird dadurch zwar gesteigert, die übrige noch gesunde Muskulatur ist nun jedoch chronisch überlastet. In der Konsequenz entsteht ein Teufelskreis, in dem noch mehr Zellen zugrunde gehen. Nicht selten kommt es dadurch zur weiteren Vergrößerung des Infarktareals oder gar zum kompletten Organversagen.

1.1.1 State-of-the-Art Therapiekonzepte

Die Therapie dieser Herzerkrankungen stützt sich auf operative wie konservative Maßnahmen. Im akuten Infarktgeschehen nimmt die interventionelle Koronarangiographie mit der Rekanalisation von Stenosen einen besonderen Stellenwert ein. Ihr limitierender Faktor liegt jedoch neben der Gefahr einer Restenose in einem relativ kurzen Zeitfenster für eine erfolgreiche Revaskularisierung. Die medikamentöse Therapie der Herzinsuffizienz und der Postinfarktsituationen konzentriert sich darauf, die Herzarbeit und den Sauerstoffbedarf des Myokards zu senken. Ferner wird versucht, den oben erwähnten Teufelskreis zu durchbrechen und das Herz vor diesen humoralen Botenstoffen zu schützen. Für alle dazu eingesetzten Wirkstoffklassen ist mittlerweile in groß angelegten Studien nachgewiesen, dass sie nicht nur einen positiven

Einfluss auf die Lebensqualität, sondern auch auf die Lebenserwartung der Patienten haben [2].

Trotz der Fortschritte in der konservativen und interventionellen Therapie des akuten Infarkts oder der chronischen Herzinsuffizienz handelt es sich immer noch um eine Erkrankung mit schlechter Prognose. Der bindegewebige Umbau einer Infarktzone kann medikamentös nicht verhindert werden. Je nach Ausprägung entsteht ein kontraktionsunfähiges Narbenareal. Kommt es dann im weiteren Verlauf zu einer Aneurysmabildung oder zur ausgeprägten Dekompensation, bilden herzchirurgische Maßnahmen die letzte Therapieoption.

Die Behandlungsmöglichkeit mit den besten Langzeitergebnissen stellt derzeit die Transplantation vitaler Gewebe respektive des ganzen Herzens dar [3]. Diese Organtransplantationen sind jedoch auf Grund von Komplikationen bei der Immunsuppression, dem möglichen Misserfolg durch Organversagen nach der Transplantation und vor allem durch eine ungenügende Anzahl verfügbarer Spenderorgane sehr limitiert. Somit ist dies als keine perfekte Lösung anzusehen. Im Jahre 2006 wurden in Deutschland insgesamt 385 Herztransplantationen durchgeführt, der Bedarf war allerdings etwa achtmal so hoch [4]. Im Dezember 2006 standen allein in Deutschland 979 Patienten auf der Warteliste zur Herztransplantation. Besonders alarmierend sind die Tatsachen, dass ca. 20% der gelisteten Patienten während der Wartezeit versterben und dass die Zahl der Herztransplantationen durch fehlende Spenderorgane in den letzten 8 Jahren deutlich zurückgegangen ist. Dieses Missverhältnis aus ständig steigender Zahl an Patienten mit Herzerkrankungen und einer zu geringen Anzahl an verfügbaren Organen impliziert die Notwendigkeit, dass neben der Verbesserung der konservativen Therapien und somit der Vermeidung von letalen Herzerkrankungen neue Therapieformen und Strategien entwickelt werden müssen, um dieses Problem langfristig zu lösen.

1.1.2 Neue Strategien in der Behandlung der kardialen Dysfunktion

In den letzten Jahren haben sich verschiedene innovative Strategien in den Fokus der Forschung gestellt, die darauf abzielen, die Probleme der kardialen Dysfunktion im Endstadium zu umgehen. Zwei Ansätze befassen sich dabei mit der Weiterentwicklung mechanischer Lösungsmodelle, wie den künstlichen Herzunterstützungssystemen, oder der Erschließung neuer Organquellen für die Transplantation.

Andere Modelle lassen sich unter dem Oberbegriff „Regenerative Therapien“ zusammenfassen. Sie zielen auf eine Rekonstruktion des geschädigten Herzmuskulgewebes ab. Durch die Transplantation einzelner Zellen oder kompletter künstlich hergestellter Gewebe soll dabei „Gleiches mit Gleichem“ ersetzt werden.

Diese vier Strategien zur Behandlung der kardialen Dysfunktion unterscheiden sich derzeit vor allem durch ihre Machbarkeit in Bezug auf den routinemäßigen klinischen Einsatz oder anders gesagt durch, die bisher erreichten spezifisch gesetzten Ziele. In diesem Kapitel sollen nun kurz der Stand der Dinge und die wichtigsten Problemstellungen der Forschungsgebiete umrissen werden.

Künstliche Herzunterstützungssysteme

Die Künstlichen Herzunterstützungssysteme sind allgemein am nächsten dem klinischen Routineeinsatz, bzw. schon einige Modelle in Schwerpunktzentren im klinischen Gebrauch [3, 5]. Bei den Systemen handelt es sich um mechanische Pumpen, die parallel zum Herzen geschaltet werden und durch eine stetige Pumpleistung die Volumenbelastung verringern bzw. die kardiale Funktion übernehmen. Ursprünglich waren sie als Interimslösung gedacht, um die Herztätigkeit bis zu einer möglichen Transplantation aufrecht zu erhalten. In einigen Fällen, so berichtet, konnte sich das Herz sogar wieder so gut erholen, dass ein Herzersatz gar nicht mehr nötig war [3, 6].

Allerdings sind diese Systeme bis heute mit nicht unerheblichen Komplikationen verbunden. Vor allem Blutungs- und/oder thromboembolische Komplikationen, Systemfehlfunktionen und lokale sowie systemische Infektionen sind beschrieben und stellen bis heute einen gewichtigen limitierenden Faktor dar. Kutane Schnittstellen vieler solcher Systeme für die Energieversorgung und Steuerungseinheiten bergen immer ein unvermeidbares Infektionsrisiko, das es in Zukunft zu umgehen gilt.

Xenotransplantation

Der zweite Forschungsansatz, das Mismatch zwischen Spenderorganen und Organbedarf auszugleichen, ist die Transplantation tierischer Organe. Das erklärte Ziel ist die Züchtung transgener Tiere, die als kompatible Organspender zur Verfügung stehen. Bei der Verwirklichung dieser Strategie stünden transplantierbare Organe in unbegrenzter Anzahl zur Verfügung. Die aktuellen Studien befassen sich vor allem mit porcinen Organquellen für die Xenotransplantation [7], wobei es nach dem der-

zeitigen Stand der Forschung noch nicht gelungen ist, ein solches „kompatibles“ Organ herzustellen [8].

Unüberwundene Hürden verhindern derzeit die breite klinische Einführung der Xenotransplantation. Besonders betont werden die Risiken der Abstoßung und der Übertragung von Infektionserkrankungen [9, 10]. Unterschiedliche Methoden zielen darauf ab, die xenoreaktiven Oberflächenstrukturen der Zellen zu eliminieren, um die problematischen hyperakuten sowie akuten Abstoßungsreaktionen überwinden zu können [11]. Schließlich müssen Konzepte entwickelt werden, die die chronischen Rejektionen verhindern können.

Zelltransplantation

Das Forschungsgebiet der Zelltransplantation zielt auf eine direkte Regeneration von zugrunde gegangenem Gewebe *in situ* ab. Es werden kontraktile Zellen bzw. Vorläufer- oder Stammzellen in die Randzone des geschädigten Myokards implantiert, wodurch eine Regeneration induziert werden soll.

Unterschiedliche Zellarten wurden dazu in der Vergangenheit auf ihr Regenerationspotential und ihren Einfluss auf die Herzfunktion untersucht. Es finden vor allem skeletale Myoblasten [12], embryonale oder neonatale Kardiomyozyten [13, 14] sowie aus dem Knochenmark oder Blut gewonnenen Vorläuferzellen [15, 16, 17] Anwendung. Dabei werden die Myoblasten bereits in der klinischen Anwendung erprobt, wie auch erste Studien zu den Mesenchymalen Stammzellen (MSC) existieren [18]. Der Grundtenor dieser Veröffentlichungen ist, dass sich in den Versuchsreihen ein funktioneller Benefit durch die Therapie nachweisen ließ, vor allem bei der Therapie akuter Ischämiesituationen.

Trotz der erreichten Ergebnisse besteht die Problematik, dass die optimale Zellquelle für den Ersatz der Kardiomyozyten noch nicht gefunden ist [19]. Verwendete Vorläuferzellen zeigen nicht die gewünschte Differenzierung in Myokardzellen, integrieren sich nicht wie erwartet in das Gewebe und weisen teilweise ein arhythmogenes Potential auf. Darüber hinaus stehen technische Probleme bei der Implantation im Vordergrund. Bis heute kann auf den Verbleib der Zellen in der Zielregion und auf die Integration in das Gewebe nach der Implantation keinen Einfluss genommen werden.

Tissue Engineering

Der Therapieansatz Tissue Engineering (TE), mit dem sich auch diese Forschungsarbeit befasst, verfolgt die Idee, insuffizientes, infarziertes Myokard durch artifizielles, autologes und voll funktionelles Ersatzgewebe auszutauschen. Das Ziel ist es, das Originalgewebe möglichst 1:1 im Labor nachzuzüchten und dieses Konstrukt in den Patienten funktionell zu integrieren [20] – eine offensichtlich sehr anspruchsvolle Aufgabenstellung.

Nach dem klassischen Prinzip des TE wird mit Hilfe von drei Komponenten versucht, die komplexe Gewebearchitektur nachzubilden: Isolierte Zellen werden in einer dreidimensionalen Trägermatrix gesiedelt und in speziellen Bioreaktorsystemen zu einem Gewebe kultiviert.

Analog dazu wurden in der Vergangenheit zahlreiche solcher Modelle für das Myokardiale Tissue Engineering entwickelt [s.u.], basierend auf unterschiedlichen Zellquellen, Matrixzusammensetzungen und Kulturmethode. Im Ergebnis war es allen Arbeitsgruppen auch möglich, ein vitales und sogar kontrahierendes Gewebe zu züchten, das wichtige Charakteristika von physiologischem Gewebe aufwies. Für die klinische Anwendung reichen die funktionellen wie biologischen Eigenschaften dieser Gewebe jedoch bis heute nicht aus. Entsprechend beschränkt sich die Forschung in diesem Bereich auf die Verbesserung von *in vitro* Modellen oder bestenfalls tierexperimentellen Versuchsreihen.

Auf die spezifischen Problemstellungen des Therapieansatzes TE sei im folgenden Kapitel gesondert und ausführlich eingegangen, da diese im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen.

1.2 Myokardielles Tissue Engineering

Für den adäquaten Ersatz eines geschädigten Organs muss ein Tissue Engineertes Gewebe vor allem zwei Eigenschaften besitzen: (1.) die Funktionalität des Originalgewebes aufweisen und (2.) biologisch und immunologisch kompatibel zum Empfänger sein. Im Gegensatz zu anderen Bereichen des Tissue Engineerings, wie z.B. artifizierender Haut- und Knorpeltransplantate, die diese Bedingungen bereits erfüllen, ist ein Tissue Engineertes myokardielles Gewebe noch weit von diesem Vorhaben entfernt. Neben einer fehlenden autologen Zellquelle erscheint es im Wesentlichen

weit komplexer und schwieriger die Architektur des Myokards im Vergleich zu diesen Geweben nachzubilden. Hier muss im Prozess des TE den spezifischen Besonderheiten des Herzmuskels Rechnung getragen und entsprechende Modelle entwickelt werden, um diesen zu entsprechen.

Im Fokus der Forschergruppen steht in diesem Zusammenhang vor allem die Gewebsorganisation. Sie wird als Schlüsselstellung zur Funktionalität des Gewebes angesehen [21]. Dabei befassen sich die Studien intensiv mit der Erforschung und Optimierung der drei Komponenten des klassischen Tissue Engineerings. Durch sie lässt sich der Aufbau und die Eigenschaften der Konstrukte beeinflussen. Allerdings ist hier die ideale Kombination noch nicht gefunden worden. Letzten Endes müssen die „optimalen“ Zellen kombiniert mit der „optimalen“ Trägerstruktur im „optimalen“ Milieu kultiviert werden, um das Ziel des Tissue Engineerings zu erreichen. Dabei gibt es bislang noch keine genaue Definition dieser „optimalen“ Komponenten.

In diesem Kapitel soll nun noch einmal ausführlich auf die Besonderheiten des Myokardgewebes, theoretische Bedingungen an die verschiedenen Bestandteile des TE und auf den bisherigen Stand der Forschung eingegangen werden.

1.2.1 Theoretische Grundlagen und Problemstellungen

Die Besonderheiten des physiologischen Herzmuskels sowie die bisher gemachten Erfahrungen der Forscher bilden die theoretische Grundlage für heutige Strategien im Myokardiellen TE. Dabei herrscht ein weitgehender Konsens über die grundlegenden Eigenschaften, die Matrix, Zellen und Zellkultur aufweisen müssen, um im Ergebnis ein funktionelles kompatibles Gewebe züchten zu können. Es ergibt sich in der Konsequenz ein anspruchsvolles theoretisches Bedingungsgeflecht für die Entwicklung der geforderten „optimalen“ Matrix, die Verwendung der „optimalen“ Zellen und die Erforschung des „optimalen“ Milieus, um im Ergebnis zu einem komplexen funktionellen Gewebe zu gelangen. Eine ganze Reihe zum Teil sehr unterschiedlicher Lösungsansätze versucht dabei, diesen Anforderungen gerecht zu werden.

Matrices

Zahlreiche Veröffentlichungen stellen die Trägermatrix als zentrale Komponente im TE heraus, die die Gewebsorganisation und Funktionalität eines Konstruktes beein-

flusst [22, 23]. Dabei ist sowohl die Struktur als auch die Zusammensetzung der verwendeten artifiziellen extrazellulären Matrix (ECM) von Bedeutung [24].

Als Vorbild gilt im Allgemeinen die natürliche ECM der Zellen. Sie wird im Gewebe von den Zellen selbst synthetisiert und trägt im Zusammenspiel mit ihnen zu wichtigen Prozessen wie der Hämostase und der Organisation bei. Die genaue chemische Zusammensetzung dieser natürlichen ECM bzw. die Bedeutung vieler Komponenten ist jedoch im Einzelnen bis heute nicht erforscht oder verstanden worden. Das TE muss sich demzufolge einer Surrogat-Matrix bedienen, deren Biomaterialien und Struktur zumindest den wichtigsten dieser Eigenschaften entspricht.

Die Pioniere des TE Vacanti und Langer [20] entwickelten dem entsprechend drei zentrale Bedingungen für eine solche Trägerstruktur, um optimale Voraussetzungen für das Züchten von vitalem, funktionellem Gewebe zu schaffen. Eine ideale Matrix muss (1.) biocompatibel und biodegradabel sein, (2.) zelluläre Interaktionen sowie die Gewebsorganisation fördern und (3.) den physiologischen und mechanischen Anforderungen des Zielgewebes entsprechen.

Als besondere Problemstellungen erscheint in der aktuellen Diskussion die Frage nach einer optimalen Matrixzusammensetzung und Mikrostruktur. Nach Langer und Vacanti ist die Trägerstruktur für die Förderung der zellulären Interaktion und vor allem der Gewebsorganisation verantwortlich. Dabei spielen deren Porenstruktur und die chemischen Oberflächeneigenschaften der Materialien eine zentrale Rolle. Durch sie können die Adhäsion, Proliferation und Differenzierung, aber auch eine Migration und dreidimensionale Organisation der Zellen beeinflusst werden. Dadurch, dass die bisherigen artifiziellen Herzmuskelgewebe keine befriedigende dreidimensionale Gewebsarchitektur aufwiesen, stellt dieser Punkt einen wichtigen Fokus aktueller Forschungsbemühungen dar.

Die zweite wesentliche Problemstellung bezieht sich auf die suffiziente Nährstoffversorgung der gesiedelten Zellen in der Matrix. In unterschiedlichen TE Geweben zeigt sich ein Gradient in der Zellverteilung und –vitalität entsprechend der Nährstoffdiffusion in dem Konstrukt [25, 26]. Angesichts der geringen Ischämietoleranz und des hohen Sauerstoffbedarfs der Myokardzellen stellt dies eine wesentliche Anforderung an das Matrixdesign für das Myokardielle TE dar. Ein Konstrukt physiologischer Dicke kommt dabei nicht ohne ein Gefäß- und Kapillarnetzwerk aus, und nach dem Stand der Forschung ist es nicht möglich, ein solches Gefäßnetzwerk *in vitro* zu erschaffen [27].

Zellen

Als Definition einer optimalen Zellquelle für das Tissue Engineering gilt, dass es sich um autologe Zellen handeln muß, die in ausreichender Anzahl zur Verfügung stehen und eine hohe Proliferationsfähigkeit sowie Differenzierung besitzen. Demnach kommen reife Herzmuskelzellen für den Einsatz im Myokardiellen TE nicht in Frage. Nach dem derzeitigen Stand der Forschung besteht keine solche adäquate Zellquelle für das Myokardielle TE [21], entsprechend bedienen sich die etablierten Konstrukte bezüglich der Zellquelle Surrogatmodellen. In der Anwendung sind vor allem neonatale Rattenkardiomyozyten, wobei im Vergleich zu humanen Zelllinien gezeigt werden konnte, dass deutliche Unterschiede in der Zellkultur bestehen [28]. Entsprechend ergibt sich aktuell die Notwendigkeit neue Surrogatmodelle zu entwickeln, wie zum Beispiel Großtiermodelle. Allgemeiner Konsens herrscht in der Überzeugung, dass die Frage nach einer adäquaten Zellquelle nur über die Stammzellforschung gelöst werden kann [29, 30].

In Vitro Kultur

Die *in vitro* Zellkultur spielt für die Erzeugung eines funktionellen dreidimensionalen Gewebes eine besondere Rolle. Für das Zellüberleben und -wachstum muss das physiologische Milieu imitiert werden, zur Beeinflussung der Gewebsorganisation und Differenzierung sind exogene Stimuli in der Kultur notwendig [31].

Die Ergebnisse im Tissue Engineering in den letzten Jahren haben deutlich gemacht, dass es nicht möglich ist, funktionelles Gewebe in einem statischen Milieu in einer Zellkulturschale zu erzeugen [32].

Aus diesen Erkenntnissen lässt sich die Notwendigkeit ableiten, Bioreaktorsysteme zu entwickeln, die es erlauben, die spezifische Umgebung der individuellen Gewebe nachzuahmen, um im Rückschluss einen hohen Grad zellulärer Differenzierung und Gewebsorganisation zu erhalten. Einige Arbeiten zu solchen Bioreaktoren stellen die Grundsätze heraus, die ein solches Gerät zu erfüllen hat, um allgemeine physiologische Bedingungen zu schaffen. Es muss (1.) die Sterilität dieser Systeme gewährleistet sein, (2.) ein Mediumzirkulationssystem vorhanden sein, das die Nährstoffversorgung der Kultur und den Gasaustausch mit der Umgebung gewährleistet, und (3.) die Temperatur während der Kulturzeit bei 37 °C garantiert sein.

Unter Berücksichtigung der physiologischen Gegebenheiten des schlagenden Herzens erscheint es sinnvoll, die Kultur einem permanenten physiologischen Dehnungsstress auszusetzen, um diese Bedingungen nachzuahmen.

1.2.2 Aktuelle Modelle im Myokardiellen Tissue Engineering

Durch im Wesentlichen drei unterschiedliche Strategien werden aus den einzelnen Zellen wieder dreidimensionale Gewebe hergestellt: die Zellen werden (1.) auf einer temperatur-abhängigen Oberfläche zu Monolayern gesiedelt, durch Wärmeverfahren abgelöst und zu mehrlagigen Konstrukten aufgeschichtet [33, 34]; (2.) mit einer zunächst flüssigen Matrix vermischt, die in einer Form bzw. Bioreaktor zu einem dreidimensionalen Gewebe ausgehärtet [35, 36], oder (3.) direkt auf eine vorgeformte dreidimensionale Matrix gesiedelt [28, 37, 38].

Die neueste dieser TE-Strategien wurde erst im Jahr 2002 von Shimizu und Kollegen beschrieben [33]. Neonatale Rattenkardiomyozyten werden zunächst als 2-dimensionale kontinuierliche Zellschicht auf temperatur-sensiblen Membranen gesiedelt, nach einer Kulturzeit von vier Tagen durch Absenken der Temperatur von der Kulturoberfläche abgelöst und anschließend mit weiteren Kulturen zu einem mehrlagigen dreidimensionalen Gewebe übereinander geschichtet.

Diese Konstrukte zeichnen sich vor allem durch ihre hohe Zelldichte und die gute Gewebsorganisation aus. Allerdings verfügen sie nicht über ein eigenes Kapillarnetz und bieten auch keine Poren für eine suffiziente Nährstoffversorgung.

Die zweite Strategie im TE von Herzgewebe befasst sich mit der Verwendung von biodegradablen zunächst flüssigen Matrixkomponenten. Sie werden direkt mit einer Zellsuspension vermischt und in eine Form gegossen, in der sie zu einem dreidimensionalen Gewebe aushärten.

Eschenhagen und Zimmermann beschreiben ein *Engineered Heart Tissue* (EHT), bestehend aus neonatalen Rattenherzzellen, einer Matrix aus Typ I Kollagen und weiteren extrazellulären Proteinen wie z.B. Matrigel sowie Zellkulturmedium [36]. Diese Mischung wird in ringförmiger Struktur ausgehärtet und statisch oder unter axialem Dehnungsstress kultiviert. Auch diese EHT lassen sich schichtweise zu einem größeren Gewebekomplex aufbauen [39].

Ein weiteres ähnliches Konstrukt wurde in unserem Labor von Kofidis, Lenz *et al.* entwickelt [35, 40]. Dabei unterscheidet sich die Matrixzusammensetzung nicht wesentlich von der oben beschriebenen. Neben neonatalen Rattenzellen wurde hier jedoch ein Großtiermodell mit porcinen Kardiomyozyten entwickelt.

Der allgemeine Vorteil dieser zweiten Methode liegt in einer gleichmäßigen Verteilung von Zellen über die Konstrukte. Die Lösungsstrategien für die Nährstoffversorgung gestalten sich jedoch ebenso schwierig wie das Erreichen einer physiologischen Gewebsorganisation.

Die dritte große Gruppe artifizierender myokardieller Konstrukte, in die sich auch diese Doktorarbeit einreicht, basiert auf der Verwendung von vorgeformten dreidimensionalen Matrices für das TE. Dieser Ansatz kann als die klassische Herangehensweise zur Erschaffung künstlichen Gewebes angesehen werden, wie es bereits in den neunziger Jahren von Langer und Vacanti publiziert wurde [20, 41].

Für die Herstellung myokardiellen Gewebes auf Grundlage vorgeformter dreidimensionaler Matrices wurden verschiedene Konstrukte beschrieben. Kofidis *et al.* arbeiten mit einem handelsüblichen Kollagenfleece zur Herstellung ihres *Artificial Myocardial Tissue* (AMT) [42, 43], die Arbeitsgruppe um Ren Ke Li benutzt eine sog. Gelfoam Matrix, vornehmlich bestehend aus Gelatine für ihre *Tissue-Engineered Grafts* (TEG) [28, 44], am Massachusetts Institute of Technology (MIT) wurde ein Bindegewebsnetzwerk aus Polyglycolsäure (PGA) entwickelt [23, 45], während die Arbeitsgruppe um Leor und Cohen eine Alignat-Matrix für zahlreiche TE Konstrukte etabliert hat [30, 38]. Bei allen diesen Konstrukten handelt es sich demzufolge um synthetisch hergestellte, biodegradable Trägermatrices, die jeweils mit neonatalen Rattenzellen besiedelt wurden.

Der besondere Vorteil solcher Gewebe besteht in ihrer hohen mechanischen Stabilität und in den Möglichkeiten, die Gewebsorganisation durch die Matrixstruktur vorzugeben. Größtes Defizit dieser Methode ist allerdings eine unphysiologische Verteilung der Zellen im Gewebe. Dabei liegt der heutige Fokus der Untersuchungen vor allem in der chemischen Zusammensetzung sowie der räumlichen Struktur der Materialien. Durch aufwändige Techniken wird versucht, die Netzwerke und Poren nach genau definierten Mustern zu konstruieren.

1.3 Unser Konstrukt eines „Tissue Engineered Myocardial Patch“

Unser Konstrukt eines „Tissue Engineered Myocardial Patch“ (TEMP) besteht im Gegensatz zu den anderen veröffentlichten Modellen aus neonatalen porcinen Kardiomyozyten, die auf eine azelluläre biologische Matrix gesiedelt werden. Es handelt sich somit um ein Großtiermodell und natürliche Trägergewebe im Vergleich zu den Kleintiermodellen und synthetischen Materialien.

Dabei befasst sich diese Arbeit mit der Verwendung zweier unterschiedlicher dezellularisierter biologischer Matrices, der *Small Intestine Subuocosa* (SIS) und dem *Decellularized Right Ventricle* (DRV). Es handelt sich dabei um Schweinedünndarm, bzw. den rechten Ventrikel eines Schweineherzens, die in einem standardisierten Verfahren azellularisiert werden. Bei diesen Prozessen bleibt das ECM-Gerüst erhalten, welches dann als Trägerstruktur unserer Konstrukte dient.

Die SIS wird in anderen Bereichen des Tissue Engineerings bereits als ein etabliertes Modell mit Erfolg für die Züchtung von Harnblase, Haut oder Blutgefäßen eingesetzt [46, 47, 48]. Der DRV wurde in unserem Labor eigens für die Herstellung eines TEMP entwickelt. Offensichtlichstes Benefit dieser biologischen Gewebe gegenüber den synthetischen besteht darin, dass auch nach der Azellularisierung ihre Blutgefäß- und Kapillarstrukturen im Inneren erhalten sind.

Im Sinne des klassischen TE Ansatzes werden diese vorgeformten Strukturen mit neonatalen porcinen Kardiomyozyten besiedelt und im eigens entwickelten Mechano-Bioreaktor (MEAT-3D) kultiviert. Dieser Bioreaktor schafft standardisierte Kulturbedingungen für das Gewebe und bietet darüber hinaus die Möglichkeit, exogene Stimuli für die Zellkultur zu erforschen. So verfügt er z.B. über die Möglichkeit, einen physiologischen Dehnungsstress auf die Kultur auszuüben.

1.3.1 Zielsetzung

Als Zielsetzung dieser Arbeit sind drei Punkte zu formulieren:

1. steht die Etablierung von azellulären biologischen Matrices für das Myokardiale Tissue Engineering im Vordergrund. Es sollen zwei Konstrukte basierend auf SIS und DRV rebesiedelt mit neonatalen Kardiomyozyten aufgebaut und charakterisiert werden.

2. wird ein Großtiermodell mit der Isolation und Kultivierung von porcinen Kardiomyozyten aufgebaut.
3. soll ein Mechano-Bioreaktor entwickelt werden, der die Untersuchung verschiedener Zellkulturbedingungen ermöglicht. Im Speziellen soll hier der Effekt von mechanischem Stress während der Zellkultur am Konstrukt der SIS untersucht und qualifiziert werden.

Im Ergebnis soll ein hochstandardisiertes Herzmuskelkonstrukt für weiterführende *in vitro* Versuche, wie z.B. die Reendotheliasierung des Kapilarsystems der Matrix und Co-Kultursysteme, sowie für *in vivo* Implantationsversuche zur Verfügung stehen.

2 Material

2.1 Laborgeräte

Autoklaviergerät, Fa. FRITZ GÖSSNER

Eindeckautomat, Consul, Fa. SHANDON

Einkammerschrittmacher (temporärer), Meditronic 5348, Fa. MEDITRONIC

Elektronische Präzisionswaage, MC 210 S, Fa. SARTORIUS

Entwässerungsautomat, Hypercenter XP, Fa. SHANDON

Färbeautomat für HE, Varistain 24-2, Fa. SHANDON

Fluoreszenzmikroskop, BX 41, Fa. OLYMPUS

Gamma-Bestrahlungsgerät, Gammacell 2000 (2,7 Gy/min), Fa. MOLSGARD MEDICAL DENMARK

Gefriermikrotom, HM 500 OM, Fa. MIKROM

Gießstation, AP 280, Fa. MICROM

Laminar Flow, Hera Safe[®] HS 18, Fa. HERAEUS

Mikroskop, CK 2, Fa. OLYMPUS

Mikroskop, Eclipse TE 300, Fa. NICON

Mikroskopkamera, DP 50, Fa. OLYMPUS

Mikroskopsoftware, DP-Soft, Fa. OLYMPUS

Mikrowelle

pH-Meter, Microprocessor pH Meter, pH 539, Fa. WTW

Pipetten, eppendorf Research, Fa. EPPENDORF

Pumpe (laminar perfundierend), IPC, Fa. ISMATEC

Pumpe, Volt 220, Typ: MC-MS Ca 4/6, Fa. ISMATEC

Schlittenmikrotom, HM 400, Fa. MICROM

Schüttelwasserbad, 1083, Fa. GFL

Schüttler, Vibrax- VXR, Fa. IKA LABORTECHNIK

Universaldrehvorrichtung (Rollator), Fa. HERAEUS

Wärmeschrank, Cytoperm 2, Fa. HERAEUS

Wärmeschrank, Heracell 240, Fa. HERAEUS

Wasserbad für Parafinschnitte, Fa. TECHNICON

Wasserbad, Typ 1003, Fa. GFL[®]

Wasserpumpe mit Erwärmungsgerät, Typ RM 6 T, Fa. LAUDA
Vakuumpumpe, Fa. KNF LABORPORT
Zählkammer nach Neubauer, Fa. OMNILAB
Zentrifuge, Biofuge fresco, Fa. HERAEUS
Zentrifuge, Multifuge 3S-R, Fa. HERAEUS
Zytozentrifuge, Cytospin 2, Fa. SHANDON

2.2 Verbrauchsmaterialien

6 Well Platten, steril mit Deckel, Fa. GREINER
Braunüle[®], Venenverweilkanüle 18G, Fa. BRAUN Melsungen AG
Cytomation Pen, Fa. DAKO CYTOMATION
Deckgläser (15 x 15 mm; 24 x 60 mm), Fa. MENZEL-GLASER
Diarahmen, 24 x 36, ohne Gläser, Fa. GEPE
Disposable CytofunnelsTM, Fa. SHANDON
Einmalkanülen gelb, Fa. BRAUN Melsungen AG
Einmalspritze 10 ml zweiteilig, Fa. BRAUN Melsungen AG
Einmalspritze 20 ml zweiteilig, Fa. BRAUN Melsungen AG
Einmalspritze 50 ml mit Kanüle, Perfusor, Fa. BRAUN Melsungen AG
Eppendorfreaktionsgefäße, Fa. EPPENDORF
Falconröhrchen 15 ml (steril) , Fa. GREINER
Falconröhrchen 50 ml (steril), Fa. GREINER
Fettstift, Fa. DAKO
Filterkarte für Cytospin weiß, Fa. THERMO SHANDON
Filtrierpapier, 595½, D=185 mm , Fa. SCHLEICHER & SCHUELL
Flaschensterilfilter 0,2 µm, 150 ml, Fa. NALGENE[®] BRAND PRODUCTS
Handschuhe puderfrei (steril), Fa. BIOGEL
Histokapseln, engmaschig, Fa. MICROM
Kleenextuch zweilagig, Fa. KIMBERLY-CLARK
Knopfkanüle aus Metall 1,5, Fa. ACUFIRM
Mikrotomklingen, Type S 35, Fa. FEATHER
Mullkomresse Gazin[®] 10 x 20 cm 12fach, Fa. LOHMANN RAUSCHER

Nahtmaterial Mersilene, grün geflochten, 2-0, nicht resorbierbar, Fa. ETHICON, JOHNSON & JOHNSON Intl.

Objektträger (ca. 76 x 26 mm; geschnitten/Mattrand), Fa. MENZEL-GLASER

OP-Abdecktuch 37,5 x 45 cm, Fa. KLINIDRAPE

Petrischalen versch. Größen Falcon[®], BECTON DICKINSON

Pipettenspitze blau 101–1000 µl, Fa. ROTH

Pipettenspitze farblos (Typ Eppendorf) 0,5–10 µl, Fa. ROTH

Pipettenspitzen gelb 10–100µl, Fa. ROTH

Pumpenschlauch PharMed[®] NSF-51, Fa. ISMATEC

Schrittmacherkabel, Fa. BIOTRONIC

Shandon Histoslides, adhäsiv, Fa. THERMO ELECTRON

Silikonkleber, Dow Corning 734, Fa. Dow Corning

Silikonschlauch, Fa. LANDGRAF

Skalpell mit Griff Figur 21 (steril), Fa. FEATHER

S-Monovette, Fa. SAARSTEDT AG & Co

Spritzenfilter Rotilabo, 0,22 µm, steril, Fa. ROTH

Sterican[®] Einmal-Injektions-Kanüle, 20G, Fa. BRAUN Mels. AG

Sterican[®] Einmal-Injektions-Kanüle, 27G, Fa. BRAUN Mels. AG

Universalschnellbinder, Fa. SAPI SELCO

Untersuchungshandschuhe puderfrei, Fa. KIMBERLY CLARK

Zellkulturflasche Cellstar[®] 75 cm² mit Filterkappen (steril), Fa. GREINER

Zellsieb 40 µm (Falcon[®]-Cellstrainer, Fa. BECTON DICKINSON

2.3 Chemikalien

3-Aminopropyltriethoxy-silan, Fa. SIGMA

Aceton, Fa. J.T. BAKER

Alcainblau, Fa. SIGMA

Albumin Fraktion V, bovine, Fa. SIGMA

Ammoniumhydroxyd, Fa. SIGMA

Brilliant Crocein, Fa. CHROMA

BSA (bovine serum albumin), 96 %, Fa. SIGMA

Calcein AM 1mg/mL, Fa. MOLEKULAR PROBES
Calciumchlorid, Fa. MERK
Collagenase Type 2, Fa. WORTHINGTON
Corbit-Balsam, Einschlussmittel für mikroskopische Techniken, Fa. I. HECHT
Custradiol® Kardioplege Infusionslösung, Fa. Dr. FRANZ KÖHLER CHEMIE
DAB liquid + Substrat-Chromogensystem, Fa. DAKO
DNase II, Type V 71x, Fa. SIGMA
Earle's Medium 199, Fa. GIBCO
EDTA TitriplexIII, Fa. MERCK KGaA Darmstadt
Eisenchlorid, Fa. MERCK
Eisessig, Fa. J.T. BAKER
Eiweiss Glycerin 3T 012, Fa. WALDECK
Eosin, gelblich, Fa. SIGMA
Essigsäure, Fa. J.T.BAKER
Ethanol 100 %, vergällt, Fa. J.T. BAKER
Ethidiumbromid, Fa. SIGMA
Formalin, Fa. SIGMA
Härris' Hämatoxylinlösung (Papanicolaou), Fa. MERCK KGaA Darmstadt
Kaliumchlorid, Fa. MERCK
Kaliumdihydrogenphosphat, Fa. MERCK
Live/Dead-Assay, Fa. MOLEKULAR PROBES
Magnesiumdichlorid, Fa. SIGMA
Mountingmedium Consul-Mount®, Fa. SHANDON
Natriumazid, Fa. ROCHE
Natriumchlorid (NaCl), Fa. MERCK KGaA Darmstadt
Natriumchlorid, 0,9%ige Infusionslösung, Makroflex N, Fa. MACRO PHARMA
Natriumcitrat, Fa. MERK
Natriumdesoxycholat, Fa. SIGMA
Nebacetin® siccum, Fa. YAMANOUCHI
Nitro Solvay® Infus N, Glyceroltrinitrat, 50 ml Infusionslösungskonzentrat, Fa. SOL-
VAY
Parplast Bulk, Fa. TYCO HEALTHCARE
Pepsin aus Schweinemagenmucosa, Aktivität: 3890 U/mg Protein, Fa. ICN BIOME-
DICALS INC.

Phosphat Buffered Saline Tablets, Fa. SIGMA
Phosphowolframsäure, Fa. MERK
Resorcin Fuchsin, Fa. CHROMA
Roti-Histofix[®], phosphatgepuffertes 3,7 % Formalin, Fa. CARL ROTH
Saffron du Gatinais, Fa. CHROMA
Salzsäure 25 %, Fa. MERCK
Säurefuchsin, Fa. CHROMA
Silane, 3-Aminopropyltriethoxy-Silane, Fa. SIGMA
Stickstoff flüssig, Fa. LINDE
Tissue-Tek[®] O.C.T.TM Compound, Fa. SAKURA
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base), Fa. MERCK KGaA Darmstadt
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid, Fa. MERCK KGaA Darmstadt
Trypan blue solution, Fa. SIGMA
Trypsin (1:250), Fa. DIFCO
Trypsin/EDTA 10x konzentriert (0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA), Fa. PAA
Vectastain ABC-Kit, Fa. VECTOR
Wasserstoffperoxid 30 %, Fa. ALDRICH
Xylol, Fa. J.T. BAKER
Zitronensäure, Fa. MERK

2.4 Zellkulturmedien, Zusätze und Lösungen

Minimal Essential Medium (mit Earles Salzen, mit Glutamin), Fa. GIBCO
Fötale Kälberserum (FCS), Fa. GIBCO
Penicillin/Streptomycin, Fa. BIOCHROM
5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdU), Fa. SIGMA

KM-Medium

500 ml Minimal Essential Medium
55 ml FCS
5,6 ml Penicillin/Streptomycin
5,6 ml BrdU-Stock

Stoppmedium

450 ml Earle's Medium 199
100 ml FCS
5 ml Penicillin/Streptomycin (100 IE /ml Penicillin, 100 µg /ml Streptomycin)

BrdU-Stock

135,7 mg 5-Bromo-2'-Deoxyuridine
50 ml Aqua dest. (lösen und sterilfiltrieren)

Phosphat Buffered Saline (PBS)

0,01 M Phosphatpuffer
2,7 mM KCl
137 mM Natriumchlorid

Krebs-Hensleite-Bicarbonat (KHB)

6,4 g NaCl	(110 mM)
0,19 g KCl	(2,6 mM)
0,16 g KH ₂ PO ₄	(1,2 mM)
0,30 g MgSO ₄	(1,2 mM)
0,19 g Glucose	(1,1 mM)
2,38 g HEPES	(10 mM)

1000 ml Aqua dest.
mit HCl oder NaOH auf pH 7,4 titrieren und sterilfiltrieren

Trypsin-Stock

600 mg Trypsin (1:250)
6 ml KHB (über Nacht bei 4 °C auf Schüttler, sterilfiltrieren)

DNase-Stock

100 mg DNase Typ V 71x
50 ml KHB (sterilfiltrieren)

Trypsin/EDTA

100 ml 10x Trypsin/EDTA
900 ml Aqua bidest.

AZ-Lösung

20 g Natriumdesoxycholat
0,5 g Natriumazid
in 500 ml Aqua dest. gelöst

Nebacitin

1 g Nebacitin Substanz (Neomycin 325000 I.E. Bacitracin 25000 I.E)
100 ml PBS oder NaCl gelöst

Zitronensäure-Stock

1,05 g Zitronensäure
50 ml Aqua dest.

Natriumcitrat-Stock

5,882 g Natriumcitrat
200 ml Aqua dest.

2.5 Antikörper und Seren

Primärantikörper:

Anti-Maus IgG1 Antikörper (Negativ-Kontrolle), Fa. DAKO
MF-20, Mouse Polyclonal Antibody, freundlicherweise von J. Beiler
(LEBAO) zur Verfügung gestellt
Troponin T, Cardiac Isoform Ab-1 (Clone 13–11), Mouse Monoclonal
Antibody, Fa. LAB VISION (NEO MARKERS)

Sekundärantikörper:

Horse Anti Mouse, Biotin gekoppelt, Fa. VEKTOR

Seren:

Horse Normalserum, Fa. VEKTOR

2.6 Verwendetes Probenmaterial

Die Darm-Matrix, wie auch das rechte Ventrikel Myokard für den DRV werden aus 6 Monate alten weiblichen Schweinen der Deutschen Landrasse mit einem Körpergewicht von 20–25 kg entnommen.

Die Schweineherzen zur Isolation von neonatalen Kardiomyocyten stammen aus 1-3 Tage alten, 1–1,2 kg schweren Tieren reiner Deutscher Landrasse (DL), bzw. Mischlingen mit über 50 % DL. Die Tiere wurden mit 0,5 ml/kg KG Stressnil anaesthetisiert und mit einer hohen Dosis von 20 ml Propofol euthanasiert.

Die Entnahmen entsprechen den Vorschriften des Tierschutzgesetzes und werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Tierschutznummer für die Gewebegewinnung der Matrices: 509.6-42502-01/484, Tierschutznummer zur Isolation von Kardiomyocyten: 509.6-42502-00/392.

2.7 Perfusionssystem zur Dezellularisierung des rechten VentrikelsKomponenten:

(wenn nicht anders angegeben, hergestellt durch MHH-Forschungswerkstatt)

Glasbehälter mit Gitterzwischenboden und Glasolive am unteren Pol

Luer Lock Anschluss männlich/weiblich, Fa. NEOLAB

Silikonschläuche, Fa. LANDGRAF

Pumpenschlauch und Arretiervorrichtung, Fa. ISMATEC

Metallkanüle mit Luer Lock Anschluss weiblich, Fa. NEOLAB

2.8 Mechano-Bioreaktor MEAT-3D

Komponenten:

(wenn nicht anders angegeben, hergestellt durch MHH-Forschungswerkstatt)

Metallhalterahmen mit 6 Schrauben

Mediumrahmen

Zwischenboden mit Silikonmembran und Stellschrauben

Metallkanüle mit Luer-Lock-Anschluss weiblich, Fa. NEOLAB

Luer-Lock-Anschluss männlich, Fa. NEOLAB

Glaskörper-Druckluft mit Glasolive

Glaskörper-Reaktorraum mit Schraubverschluss und zwei Glasoliven

Vier Silikonschläuche à ca. 20 cm, Fa. LANDGRAF

Zwei Silikonschläuche à ca. 7 cm, Fa. LANDGRAF

Pumpenschlauch und Arretiervorrichtung, Fa. ISMATEC

Mediumreservoirflasche 250 ml, Fa. SCOTT DUCAN

Steriler Luftfilter, Fa. SARTORIUS

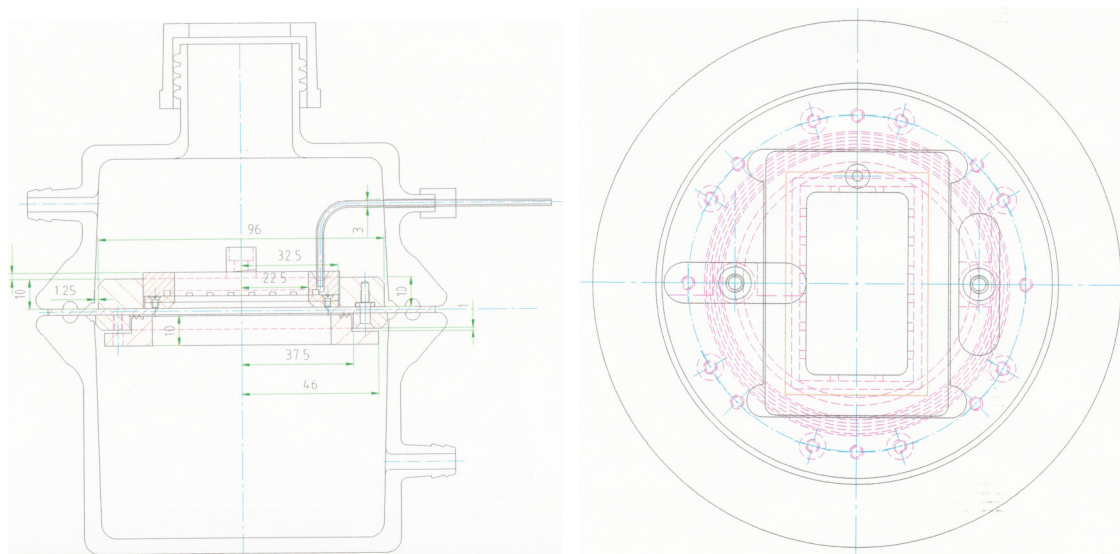


Abb. 2.1: Technische Bauzeichnung des Mechano-Bioreaktors MEAT-3D aus der Forschungswerkstatt der Medizinischen Hochschule Hannover

3 Methoden

3.1 Zweidimensionale Zellkulturtechniken und Kardiomyozytenisolation

Neonatale porcine Kardiomyozyten werden aus den Herzen 1–3 Tage alter Ferkel der Deutschen Landrasse über mehrere aufeinander folgende Verdauschritte isoliert. Dabei erfolgt eine genaue Auswertung der Isolation anhand von Cytospots und über die Neubauer Zählkammer. Es werden zweidimensionale Zellkulturen angelegt und charakterisiert, die als Kontrollen für die dreidimensionalen myokardiellen Konstrukte dienen.

3.1.1 Isolation der Kardiomyozyten

Material: Custradiol

Krebs-Henselite-Bicarbonat (KHB)

Vorverdaulösung:

200 mg Collagenase Typ II

2 ml Penicillin/Streptomycin

200 ml KHB

Verdaulösung:

60 mg Collagenase Typ II

600 µl Penicillin/Streptomycin

1,5 ml Trypsin-Stock

600 µl DNase-Stock

60 ml KHB

CaCl₂ in den Konzentrationen 1mM und 100mM in KHB

KM-Medium

FCS (nicht hitzeinaktiviert)

Die Isolation der Kardiomyozyten erfolgt in drei Schritten. Zunächst werden die Herzzellen mit einer kardioplenen Lösung *in situ* konserviert, um sie während der vierstündigen Isolationsprozedur vor dem Absterben zu schützen. Die Zellisolation

erfolgt dann über einen Vorverdau des Gewebes in einer Langendorf-Apparatur und später in drei weiteren Verdauschritten in einem sterilen Reagenzgefäß (Falconröhrchen).

Herzentnahme

Der Brustkorb des euthanasierten Ferkels wird mittels einer medianen Sternotomie eröffnet. Die Aorta wird dargestellt, knapp oberhalb der Klappenebene mit einem 0,5 cm langen Schnitt ventral inzidiert und mit einer gebogenen Knopfkanüle intubiert. Über die mit einer Ligatur fixierte Kanüle erfolgt die Perfusion der Koronarien mit 250 ml 4 °C kaltem Custradiol und anschließend mit 250 ml eines modifizierten KHB. Dabei sind beide Vorhöfe einzuschneiden, um die Perfusionslösungen auszulassen. Das Herz wird an den *Venae cavae*, der Pulmonalarterie und der Aorta distal der Kanüle abgesetzt und entnommen. Für den Transport vom Operationsaal bis zur Zellisolation im Labor wird das Gewebe bei 4 °C in KHB aufbewahrt.

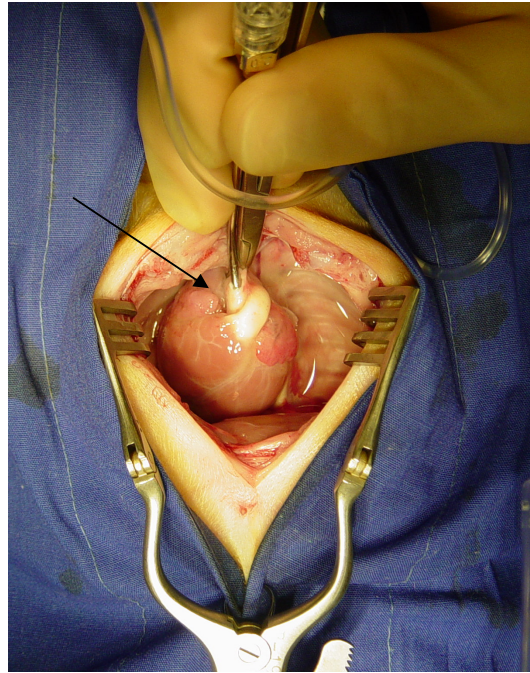


Abb. 3.1: Neonatales Herz im Thorax des Ferkels. Das Herz ist freigelegt und die Koronargefäße werden über die Aorta mit kardiopleger Lösung perfundiert (Pfeil)

Zellisolation

Die Isolation der Kardiomyozyten beginnt in einer modifizierten Langendorf Apparatur nach Watanabe et al. [13]. In diesem System wird die Vorverdauung sterilfiltriert, mit einem Gasmisch aus 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid oxygenisiert und auf 37 °C erwärmt. Mit dieser Flüssigkeit werden anschließend die Koronarien je 10 min perfundiert. Dafür sind die Ostien der Herzkranzarterien direkt mit einer kleinen Knopfkanüle zu intubieren. Der Perfusionsdruck zum Einspülen der Vorverdauung in das Herzgewebe entsteht durch die Flüssigkeitssäule in der Langendorf-Apparatur.

Alle weiteren Isolationsschritte erfolgen steril unter einer Laminar-Flow-Werkbank

und auf Eis. Nach dem Andauen des Gewebes wird das Pericard mit zwei Pinzetten abgezogen und verworfen.

Unter Aussparen der Gefäße entnimmt man das Ventrikel-Myocard und zerkleinert es mit der Schere in einer Petrischale weiter mecha-

nisch, bis es eine breiige Konsistenz

aufweist. Um das Gewebe nicht austrocknen zu lassen, ist etwas KHB hinzuzufügen. Diese Zellsuspension wird zum weiteren Verdau mit einer weitlumigen Pipette in KHB aufgenommen und in einem sterilen 50 ml-Reaktionsröhrchen kurz sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstandes inkubiert man das Zellpellet zum weiteren Verdau mit 20 ml der zweiten Verdaulösung 10 min im Schüttelwasserbad bei 37°C. Der in diesem Verdauschritt gewonnene Überstand wird anschließend abgenommen und zum Stoppen der Collagenase- und Trypsin-Reaktion in ein Reaktionsröhrchen mit 2 ml FCS überführt, während das übrige Pellet durch erneute Zugabe von 20 ml der Enzymlösung weiterverdaut wird. Das Protokoll enthält insgesamt drei dieser Verdauschritte.

Die aus den einzelnen Schritten resultierenden Zellsuspensionen werden getrennt durch einen sterilen Zellfilter gesiebt. Anschließend erfolgt eine Zellzählung mit Trypan-Blau in einer Neubauer Zählkammer auf Zellzahl, Verhältnis lebender zu toter Zellen, lang ausgestreckter Zellen und sich spontan kontrahierender Zellen. Außerdem werden jeweils drei Cytospots angelegt [siehe Kapitel 3.1.4].

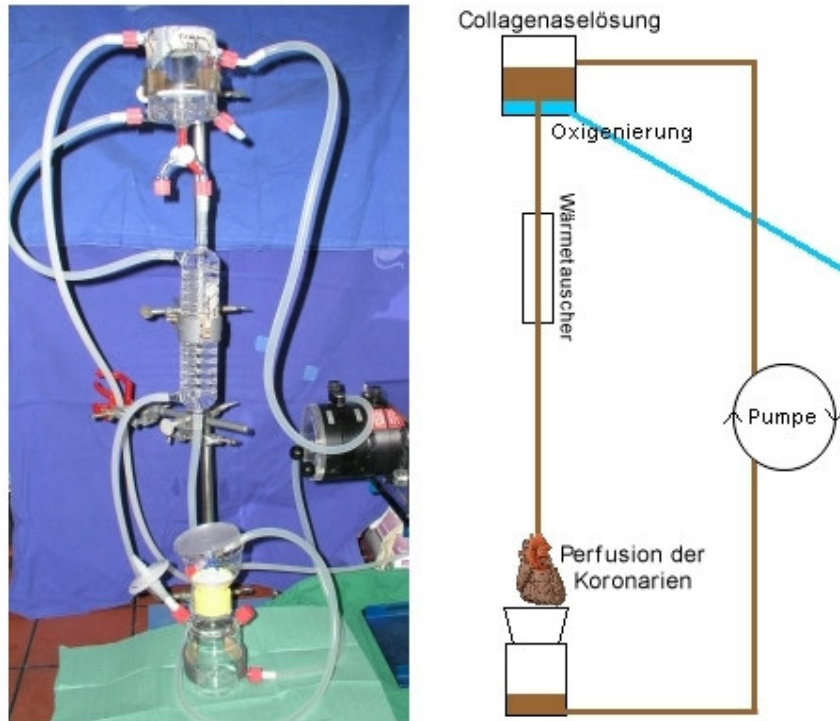


Abb. 3.2: Modifizierte Langendorf-Apparatur zum Vorverdau des Herzens, mit Schemazeichnung (rechts)

Nun wird schrittweise Calcium zugeführt, bis die physiologische Konzentration im Kardiomyozytenmedium von 1,4 mM erreicht ist. Dies erfolgt in drei Schritten:

1. auf 2,5 μ M durch Zugabe von 100 μ l einer 1 mM Ca-Lsg. (40 ml Volumen)
2. auf 75 μ M durch Zugabe von 28 μ l einer 100 mM Ca-Lsg. (40 ml Volumen)
3. auf 175 μ M durch Zugabe von 40 μ l einer 1 mM Ca-Lsg. (40 ml Volumen)

Zwischen jedem Schritt inkubiert die Zellsuspension für 5 min bei 4 °C auf der Schüttelplatte. Zum Transfer in das KM-Medium werden die Zellen 15 min bei 600 U/min und 4 °C abzentrifugiert und anschließend in einer Konzentration von 20 Millionen Zellen/ml Medium aufgenommen.

3.1.2 Zellzahlbestimmung in der Zählkammer nach Neubauer

Material: Trypan-Blau-Lsg.

8 ml Trypan-Blau

10 ml KHB

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl einer Zellsuspension erfolgt in der Neubauer-Zählkammer. Eine Probe aus der Suspension wird mit dem Farbstoff Trypan-Blau inkubiert. Dieser kann durch die defekte Zellmembran toter Zellen eindringen und färbt diese blau ein. Unter dem Mikroskop lassen sich so tote von lebenden Zellen differenzieren und das Verhältnis bestimmen.

Durch nachfolgende Berechnung lässt sich aus der gezählten Zellzahl pro Quadrant der Neubauer-Kammer die Zellkonzentration pro ml in der Suspension berechnen:

Volumen in der Zählkammer:

Kantenlänge eines Quadranten = 1 mm

Abstand zwischen Deckgläschen und Kammer = 0,1 mm

-> Volumen: $0,1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}^2 = 0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \mu\text{l}$

Daraus ergibt sich für 1 ml Zellsuspension:

Verdünnung 1 zu 10 und $0,1 \mu\text{l} = 1/10.000 \text{ ml}$ und 8 gezählten Quadranten

Zellzahl für 1 ml = $(\text{Zellzahl}/8) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10.000$

Zellzählung:

Aus der zu bestimmenden Zellsuspension werden 20 µl entnommen und mit 180 µl der Trypan-Blau-Lösung in einem Eppendorfhütchen vermischt. Die Zellen werden 5 min bei Raumtemperatur mit dem Farbstoff inkubiert. Es folgt die Auszählung aller 8 Quadrante der Zählkammer, nachdem 10 µl der Suspension von beiden Seiten unter das Deckgläschen pipettiert worden sind. Bestimmt werden die Anzahl lebender, toter, lang ausgestreckter und sich spontan kontrahierender Zellen.

3.1.3 Zweidimensionale Zellkultur

Material: PBS
 Trypsin/EDTA
 Stoppmedium
 KM-Medium

In eine 75 cm² Zellkulturflasche werden 20×10^6 Zellen direkt nach der Isolation in 10 ml KM-Medium angesiedelt. Mikroskopische Kontrollen erfolgen am 2., 4., 6., 8. und 10. Tag der Zellkultur. Am zweiten Tag erfolgt ein kompletter Mediumwechsel mit Verwerfen der nicht adhären gewordenen Zellen, ein 50%iger Mediumwechsel folgt am siebten Tag der Kulturperiode. Nach einer Kulturzeit von 12 Tagen wird der Monolayer abtrypsinisiert und aus der Zellsuspension ein Cytospot angelegt. Die Kulturflaschen sind dafür zweimal mit 10 ml PBS zu spülen und anschließend 2 min mit 5 ml Trypsin/EDTA bei 37 °C zu inkubieren. Nach mikroskopischer Kontrolle, dass sich alle Zellen von der Flasche abgelöst haben, wird die Reaktion mit 15 ml des Stoppmediums abgebrochen. Von der resultierenden Zellsuspension erfolgt eine Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer. Anschließend werden die Zellen 15 min bei 600 U/min und 4 °C abzentrifugiert, in KHB resuspendiert und für immunhistochemischen Untersuchungen auf Objektträger aufzentrifugiert.

3.1.4 Herstellung von Cytospots

Material: 3-Aminopropyltriehoxysilane
 Aceton
 Aqua dest.
 KHB

Der Begriff „Cytospot“ bedeutet das Aufzentrifugieren einer Zellsuspension auf einen silanisierten Objektträger. Dabei wird die Suspensionsflüssigkeit von einem Filterpapier aufgesogen. Zur Herstellung eines Cytospots ist eine Zellsuspension mit einer Konzentration von nicht mehr als 100.000 Zellen/ml Flüssigkeit erforderlich. Dementsprechend ist eine vorausgehende Zellzählung, wie in Kapitel 3.6.3 beschrieben, unablässig.

Silanisieren von Objektträgern

Das Silanisieren von Objektträgern verbessert die Oberflächeneigenschaften des Glases, so dass Zellen und Gewebe besser anhaften. Dieses wird durch eine chemische Reaktion zwischen dem Aminopropylsilan und den Hydroxylgruppen des Glasobjektträgers erreicht.

Die Objektträger inkubieren bei Raumtemperatur für 5 min in Aceton und werden anschließend für weitere 5 min in eine 2 %-Aminopropylsilan-Lösung gestellt. Gespült werden diese dann 15 min unter fließendem Leitungswasser und durch kurzes Eintauchen in Aqua dest. Zum Trocknen kommen die Objektträger über Nacht in den Wärmeschrank bei 60 °C.

Aufzentrifugieren der Zellen

Die Zellen werden zunächst 15 min bei 600 U/min abzentrifugiert, in der gewünschten Konzentration in KHB aufgenommen und 200 µl von dieser verdünnten Flüssigkeit in die Shandon Cytospin-Apparatur gegeben. In dem Cytospin schließt sich die Zentrifugation der Zellen auf die Objektträger für 7 min bei 600 U/min an. Nach vorsichtigem Entfernen aus der Halterung werden die fertigen Präparate mindestens 30 min luftgetrocknet und dann bei –20 °C gelagert.

3.2 Herstellung biologischer Matrices für dreidimensionale Konstrukte

Dünndarm und rechter Herzventrikel aus einem Schwein sind die Ausgangsgewebe für die Herstellung der beiden in dieser Arbeit verwendeten azellulären biologischen Matrices, der SIS (Small Intestinal Submucosa) und des DRV (Decellularized Right Ventricle). Sie werden dem Tier im Operationssaal steril entnommen und danach in zwei unterschiedlichen Azellularisierungsverfahren von den nativen Zellen befreit, so dass nur die Proteine der Extrazellulären Matrix erhalten bleiben.

3.2.1 Gewebegewinnung zur Matrixherstellung

Material: Perfusionslösung:
 50 ml Nebacitin
 450 ml 0,9 % NaCl

Zur Gewinnung der SIS-Matrix wird beim narkotisierten, beatmeten Schwein der Bauchraum in der Medianebene eröffnet. Die Artera mesenterica superior wird aufgesucht, mit einer Braunüle[®] kanalüsiert und mit der 4 °C kalten Perfusionslösung gespült, bis sich eine sichtbare Blutleere in den Kapillaren des Versorgungsgebietes eingestellt hat. Faekalreste werden nach distal ausgestrichen und beide Enden des Dünndarms mit einer Ligatur versehen und abgetrennt. Bis zur weiteren Verwendung lagert das entnommene Dünndarmsegment steril in 0,9%iger NaCl-Lösung mit antibiotischem Zusatz bei 4 °C. Zur Herstellung einer gefäßversorgten Matrix werden intraoperativ die afferenten und efferenten Gefäßbäume präpariert, ligiert und am Darmsegment belassen.

Der rechte Herzventrikel wird nach Euthanasie des Tieres mit der Arteria coronaria dextra entnommen. Die Lagerung bis zur Azellularisierung erfolgt steril bei 4 °C in 0,9 %iger NaCl-Lösung mit antibiotischem Zusatz.

3.2.2 Azellularisierung von Schweinedünndarm zur Herstellung der SIS-Matrix

Material: AZ-Lösung
 PBS-Nebacitin Lsg.:
 100 ml Nebacitin
 900 ml PBS
 1,32 % NaCl

Die Azellularisierung des Schweinedarmes wird steril unter einer Laminar-Flow-Werkbank durchgeführt.

Aus dem Schweinedünndarm ist zunächst ein 20 cm langes Stück zu entnehmen, wobei Areale solitärer Lymphfollikel (Peyer'sche Plaques) auszusparen sind. Das gewonnene Ileumsegment wird umgestülpt und durch zwei Waschschriffe mit der PBS-Nebacitin-Lösung von Faekalresten und Bakterien gereinigt. Zur mechanischen Entfernung der Tunica mucosa und Tela submucosa fädelt man den Darm auf eine 10 ml Spritze auf und schabt die luminalen Zelllagen mittels eines Zellschabers ab. Die Matrix ist bei diesem Arbeitsschritt stets feucht zu halten. Im Anschluss wird wiederum die Serosa-Seite nach außen gestülpt und beide Enden des Segmentes mit Nahtmaterial verschlossen. Durch eine zuvor auf einer Seite eingebrachte Venenverweilkanüle befüllt man nun das Lumen zur chemischen Azellularisierung mit der AZ-Lösung und stellt das Gewebe in einem Becherglas mit 400 ml 1,32 %iger NaCl-Lösung bei 4 °C auf den Schüttler. Nach einer Inkubationszeit von 60 min werden die Enden medial der Ligaturen abgeschnitten und verworfen. Die AZ-Lösung wird ausgelassen und anschließend das Matrixgerüst durch erneute Ligation verschlossen. Wie oben beschrieben erfolgt das erneute Befüllen mit PBS-Nebacitin-Lösung durch eine Kanüle. In einem mit der gleichen Flüssigkeit gefüllten Becherglas wird das Gewebe so für 30 min im Schüttelwasserbad bei 37 °C gereinigt.

Zur vollständigen Entfernung des Natriumazids folgen sechs Waschschriffe in PBS und zuletzt sterilisiert man die gewonnene Matrix durch 60 min Bestrahlung mit 150 Gray in einem Gamma-Bestrahlungsgerät.

Bis zur weiteren Verwendung erfolgt die Lagerung in PBS bei 4 °C. Parallel wird immer auch eine Sterilkontrolle im Medium bei 37 °C angelegt.

3.2.3 Azellularisierung des rechten Ventrikel-Myokards zur Herstellung der DRV-Matrix

Die Azellularisierung des rechten Ventrikel-Myokards folgt einer in unserem Labor von Tina Bindeballe entwickelten, standardisierten und auch für diese Arbeit von ihr durchgeführten Methode.

Material: Perfusionslösung A:

50 ml Infusionslösungskonzentrat Glyceroltrinitrat

50 ml 0,9 % Natriumchlorid

AZ-Lösung:

20 mg Natriumdesoxycholat

500 ml Aqua dest.

PBS-Nebacitin-Lösung

Pepsin

Stickstoff, flüssig

Die am Ventrikel verbliebene rechte Koronararterie wird mit einer Knopfkanüle intubiert und proximal mit einer Ligatur um die Kanüle verschlossen. Über diesen Zugang perfundiert man nun die Koronarien und sukzessiv den gesamten Ventrikel mit der Perfusionslösung A und lässt ihn für 75 min in der Lösung inkubieren. Anschließend erfolgt das Einspannen des Gewebes in eine eigens dafür entwickelte Perfusionsapparatur und eine weitere Perfusion des Gefäßnetzes mit einer Pepsinlösung bei Raumtemperatur für 75 min. Die Matrix wird dann aus dem Reaktor entfernt und es folgen mehrere Waschschrte: 3 x kurz Spülen mit PBS und in einer vierten PBS-Pufferflüssigkeit für weitere 30 min auf den Schüttler bei 4 °C.

Ein zweites Mal kommt die Matrix nun in das Perfusionssystem, diesmal wird jedoch die AZ-Lösung für 24 h bei 37 °C durch die Koronarien gepumpt. Es folgt ein Waschvorgang mit PBS.

Zur vollständigen Entfernung der letzten zellulären Bestandteile schließt sich ein Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und ein schnelles Wiederauftauen des Gewebes im Wasserbad bei 37 °C an. Nach einem weiteren Waschschritt wird der Ventrikel noch zweimal für je 24 Stunden mit AZ-Lösung bei 37°C inkubiert und anschließend gründlich mit PBS gespült. Die Sterilisation der Matrix erfolgt durch ei-

ne 60 min Bestrahlung mit 150 Gray. Bis zur weiteren Verwendung lagert das Gewebe bei 4 °C in PBS.

3.3 Entwicklung eines Mechano-Bioreaktors (MEAT-3D)

Für die Generierung dreidimensionalen Gewebes auf der Grundlage unterschiedlicher biologischer Matrices wurde im Rahmen dieser Forschungsarbeit eigens ein neuer Bioreaktor entwickelt. Als ein entscheidendes Merkmal verfügt er über eine mechanische Komponente, die einen Dehnungsstress auf die Kulturen ausüben kann. Darüber hinaus erleichtert der schichtweise Aufbau das Handling der Kulturen.

3.3.1 Aufbau des Bioreaktors

Der Mechano-Bioreaktor basiert auf einem bereits bestehenden und für das Tissue Engineering von Fascien verwendeten, zum Patent angemeldeten System [49]. Er ist aus zwei übereinander angeordneten Glaskörpern aufgebaut, die durch einen Zwischenboden mit einer Silikonmembran voneinander getrennt sind. Der obere Teil ist der eigentliche Reaktorraum für die Zellkultur. Hier wird die rebesiedelte Matrix eingespannt und mit Zellkulturmedium versorgt. Der untere Glaskörper dient als Druckkammer. Durch eine Glasolive kann Luft ein- und ausgelassen werden und so ein Überdruck im unteren Teil erzeugt werden. Die Silikonmembran gibt dem Druck nach und wölbt sich nach oben in den Reaktor vor.

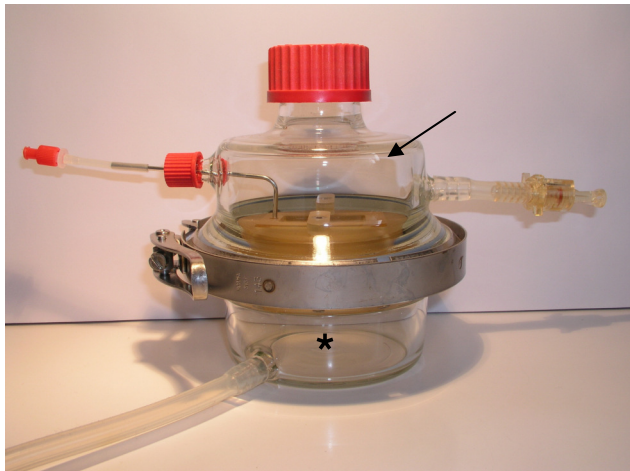


Abb. 3.3: Mechano-Bioreaktor MEAT-3D, Zwei-Kammer-System mit Druckkammer (*) und Zellkulturraum (Pfeil). Über die Knopfkanüle (links) erfolgt der Mediumzufluss, der Schlauchansatz (rechts) wird mit dem Mediumrücklauf verbunden

3.3.2 Applikation von mechanischem Stress

Die Gewebekultur wird in dem Bioreaktor durch Bewegen der Silikonmembran mechanisch gestresst. Die Matrix ist so im Mediumraum fixiert, dass sie der Membran direkt aufliegt und ihr durch einen Flüssigkeitsfilm anhaftet. Eine Drucksteuerung pumpt Luft in bestimmter Frequenz in das Reservoir, bis zum Erreichen eines eingestellten Maximaldruckes. Dieser Druck und der Widerstand aus Membran, Gewebe und Reaktorinhalt bestimmen die Auslenkung der Membran.

In dieser Arbeit wurden Drücke von bis zu 40 mmHg verwandt, was einer Wegstrecke von 1–1,2 cm entspricht.

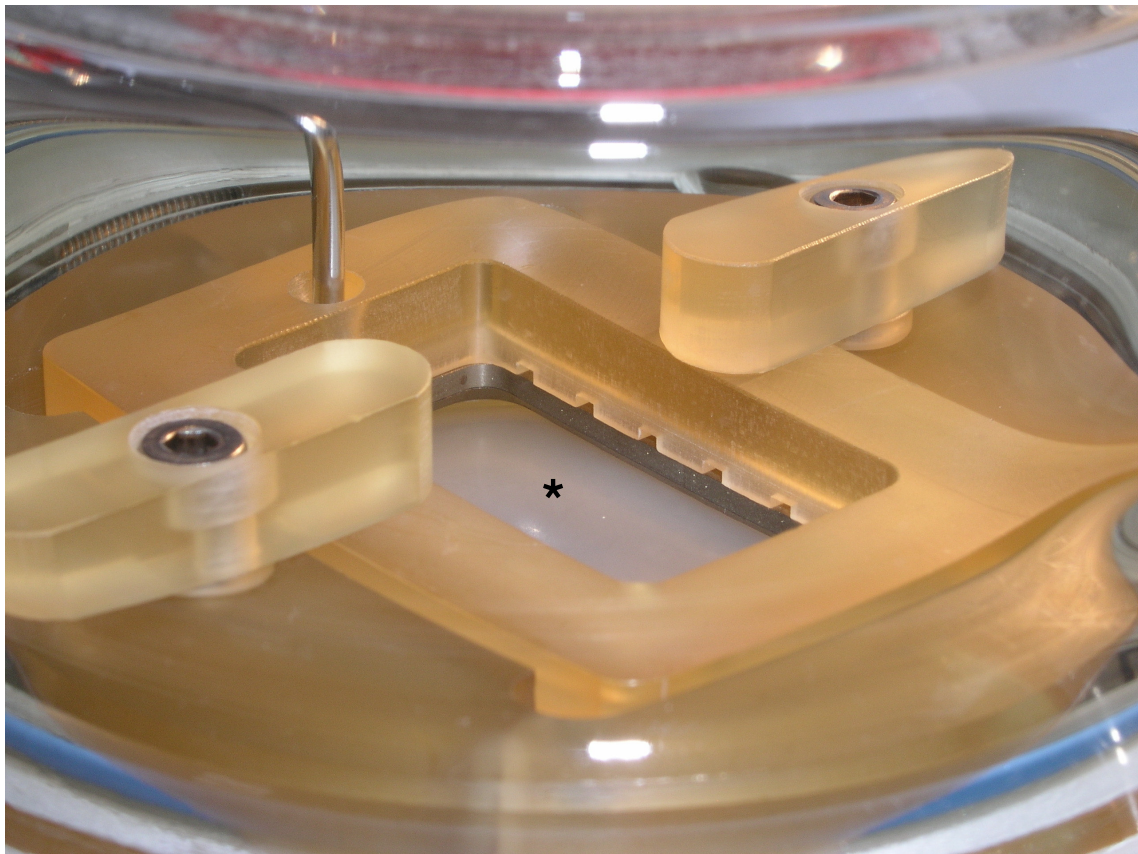


Abb. 3.4: MEAT-3D, Nahaufnahme der Silikonmembran (*). Darüber sind der metallene Halterahmen und der Kunststoff-Nährstoffrahmen eingespannt

3.3.3 Entwicklung eines Halterahmens

Darüber hinaus wurde für das berührungsfreie Handling der Kulturen ein spezielles Halterahmen-System entwickelt. Die Matrix wird auf die Größe des Halterahmens zugeschnitten und mit sechs Schrauben zwischen dem Ober- und Unterteil des Metallrahmens fixiert. Die Besiedlung findet auf Grund der besseren Standardisierbarkeit in einer Kulturschale statt. Nach einem für das Adhärenzieren der Zellen benötigtem Zeitraum wird das Konstrukt im Rahmen in den Reaktor transferiert, ohne die Gewebeintegrität durch das Umsetzen der Kultur zu zerstören. Nach dem „Sandwich-Prinzip“ wird sie mit einem Mediumverteilungsrahmen gedeckelt und durch zwei Stellschrauben über der Silikonmembran fixiert. In diesem Aufbau wird das Gewebe nun wie unten beschrieben kultiviert.

Nach Ablauf der Kulturperiode wird die Matrix samt Halterahmen dem Reaktor entnommen und verbleibt bis zur endgültigen Fixierung des Gewebes eingespannt.

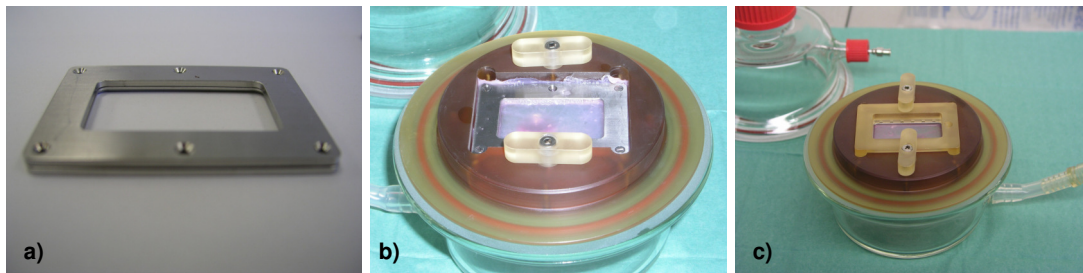


Abb. 3.5: MEAT-3D, a) Halterahmen für die Matrix, b) Halterahmen mit eingespannter SIS-Matrix nach Umsetzen in den Bioreaktor, c) Konstrukt fixiert im Bioreaktor mit aufgesetztem Versorgungsrahmen

3.3.4 Nährstoffversorgung der Zellen im Bioreaktor

Der Reaktorraum verfügt über drei Öffnungen: Zwei Glasoliven für Mediumzu- und -abfluss und einen Schraubverschluss zur Entnahme von Proben und auch für den Mediumwechsel.

Der Versorgung der Zellen mit dem Zellkulturmedium geschieht durch eine gebogene Kanüle auf einer Seite des Reaktors. Sie wird direkt in die obere Öffnung des Mediumrahmens eingeführt. Über ein Kanalsystem im Inneren des Rahmens wird das Kulturmedium verteilt und strömt durch kleine Auslässe von allen Seite über die Zellkultur. Der Abfluss erfolgt über eine Olive auf der gegenüberliegenden Seite des Glaskörpers, die unmittelbar über dem Zwischenboden angebracht ist.

Über ein Schlauchsystem ist eine Reservoirflasche für das Zellkulturmedium mit dem Bioreaktor verbunden. Sie ist für die Oxigenierung der Flüssigkeit wichtig und deshalb mit einem sterilen Luftfilter ausgestattet.

In diesen geschlossenen Kreislauf ist in dem für den Bioreaktor afferenten Schlauch eine laminare Pumpe eingebaut, die einen permanenten Mediumflow durch das System ermöglicht. So wird die Zellkultur ständig mit frischem Medium aus der Reservoirflasche versorgt.

Für die Kultur im Brutschrank

wird der Reaktor leicht schräg gestellt, so dass sich die Abflussolive am tiefsten Punkt befindet. Auf diesem Weg wird das benötigte Mediumvolumen im Reaktor verringert und die Oxygenierung erleichtert. So können unter der Matrix entstehende Luftblasen nach oben entweichen.

Insgesamt ist in diesem Aufbau der Reaktorraum nur etwa zur Hälfte mit Flüssigkeit gefüllt. Es findet auch hier ein Gasaustausch zwischen Medium und Umgebungsluft statt.

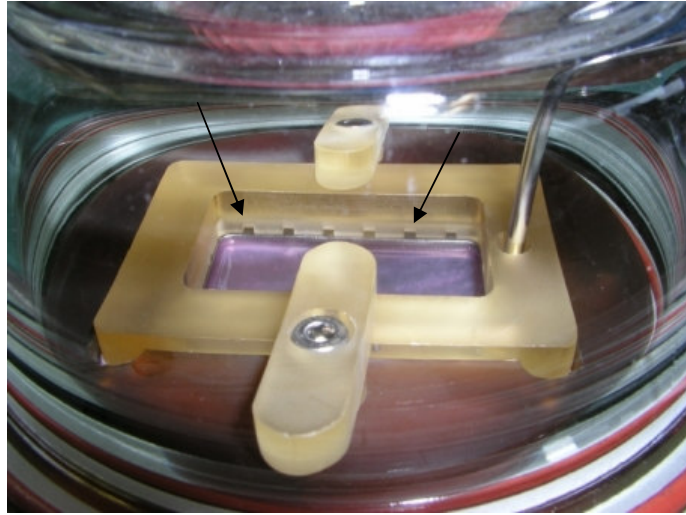


Abb. 3.6: MEAT-3D, Nahaufnahme des Versorgungsrahmens. Die Nährstoffversorgung erfolgt über die Metallkanüle (rechts) und das Kanalsystem im Versorgungsrahmen. Zwei Austrittspunkte mit Pfeilen markiert

3.4 Dreidimensionale Zellkultur auf den biologischen Matrices

Die Isolation von neonatalen porcinen Kardiomyozyten zur Besiedlung der biologischen Matrices erfolgt wie in Kapitel 3.1.1 für die zweidimensionale Kultur beschrieben. In einem Vorversuch zur dreidimensionalen Zellkultur im Bioreaktor wurde die SIS-Matrix in Diarahmen eingespannt und mit verschiedenen Zelldichten besiedelt in einer Petri-Schale kultiviert. Letztendlich findet die Züchtung des myokardiellen Gewebes im Bioreaktor statt. Es wurden dabei parallel drei verschiedene myokardiale Konstrukte aufgebaut und miteinander verglichen:

- I. eine statische Kultur neonataler porciner Kardiomyozyten auf der SIS-Matrix;
- II. ein über den gesamten Kulturzeitraum mechanisch gestresster Ansatz auf der SIS
- III. die Rebesiedlung und Kultivierung der Zellen auf der DRV-Matrix.

Die histologische Charakterisierung der Gewebe erfolgt zu einem späteren Zeitpunkt an Parafinschnitten.

3.4.1 Vorversuche in der Zellkulturschale

Die azelluläre Darmmatrix wird in sterilisierte Diarahmen eingespannt und in einer Petri-Schale mit KM-Medium befeuchtet. Die Besiedlung erfolgt bei je fünf Ansätzen mit 10, 30 und 50 Millionen Herzzellen in 3 ml Medium durch Aufträufeln der Suspension auf das rund 10 cm² große Gewebe. Die Kulturschale wird mit 10 ml Zellkulturmedium aufgefüllt. Dies entspricht also einer gesiedelten Zelldichte von maximal 5×10^6 Zellen/cm² Matrixoberfläche.

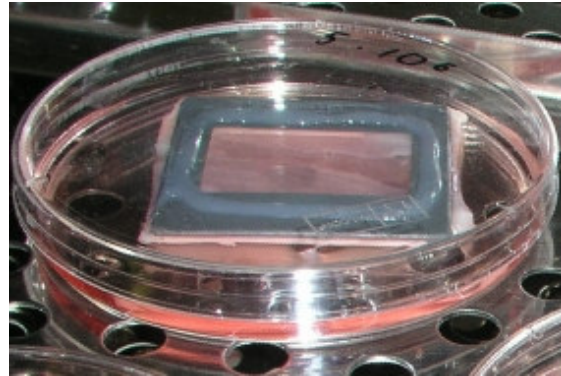


Abb. 3.7: SIS-Matrix, eingespannt in einen Diarahmen, steril in einer Petrischale zur Besiedlung

Nach 48 h erfolgt der Austausch des gesamten Mediums, inklusive der nicht adhärenen Zellen, durch frisches KM-Medium. Am fünften Tag der Kulturperiode erfolgt dann noch ein weiterer Wechsel von 50% der Mediumflüssigkeit.

Nach einer Kulturzeit von 9 Tagen werden Zelldichte und -vitalität des Gewebes mittels eines Live/Dead-Tests untersucht.

3.4.2 Rebesiedlung und statische Kultivierung der SIS im Bioreaktor

Zur Rebesiedlung der SIS mit neonatalen Kardiomyozyten und für die spätere Kultivierung im Bioreaktor wird die Matrix in den MEAT-Metallhalterahmen eingespannt. Dazu eröffnet man das Darmlumen in Längsrichtung, schneidet anschließend das Segment auf die erforderliche Größe zurecht und fixiert es mit sechs Schrauben zwi-

schen Ober- und Unterteil. Dieses Konstrukt wird für 24 Stunden in einer Petrischale mit 10 ml der später verwendeten Nährlösung inkubiert.

Die Kardiomyozyten werden direkt nach der Isolation in einer Konzentration von 60×10^6 Zellen in 3 ml KM-Medium aufgenommen und vorsichtig auf die Matrix geträufelt, entsprechend 5×10^6 Zellen/cm² Matrixoberfläche. Die Umgebung des Rahmens in der Kulturschale ist mit 10 ml Medium aufzufüllen, ohne dass die Mediumräume über dem Metall miteinander kommunizieren.

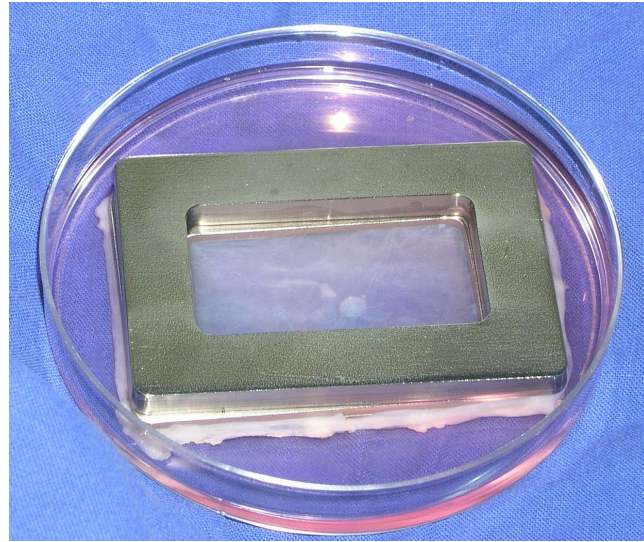


Abb. 3.8: SIS-Matrix, eingespannt in den Halterahmen des Bioreaktors und mit aufliegendem Besiedlungsrahmen zur Besiedlung mit Kardiomyozyten

Nach 24 Stunden wird der Zellsuspension im Rahmeninnenraum

noch einmal 2 ml Zellkulturmedium hinzugefügt, und nach 48 h erfolgt das Umsetzen in den Mechano-Bioreaktor MEAT. Auf die Silikonmembran werden 25 ml KM-Medium pipettiert, damit der Halterahmen eingelegt werden kann, ohne dass sich eine Luftblase unter dem Konstrukt bildet. Gleichzeitig wird so erreicht, dass die Matrix durch den Flüssigkeitsfilm an die Membran anhaftet. Anschließend erfolgt das Befüllen des Reaktorraums über dem Gewebe mit 150 ml der Nährlösung und das Verbinden mit der Reservoirflasche, mit weiteren 50 ml Medium Inhalt. Eine laminare Pumpe lässt die Flüssigkeit mit 15 ml/min im System zirkulieren.

Am sechsten Tag der zehntägigen Kulturperiode wird ein 50%iger Mediumwechsel durchgeführt. An den Tagen 0, 3, 6 und 9 erfolgt die Bestimmung des Glucose- und Laktat-Spiegels, eine Enzymbestimmung im Medium sowie eine Blutgasanalyse. Dazu werden jeweils 2 ml Mediumproben steril über die obere Öffnung des Bioreaktors entnommen.

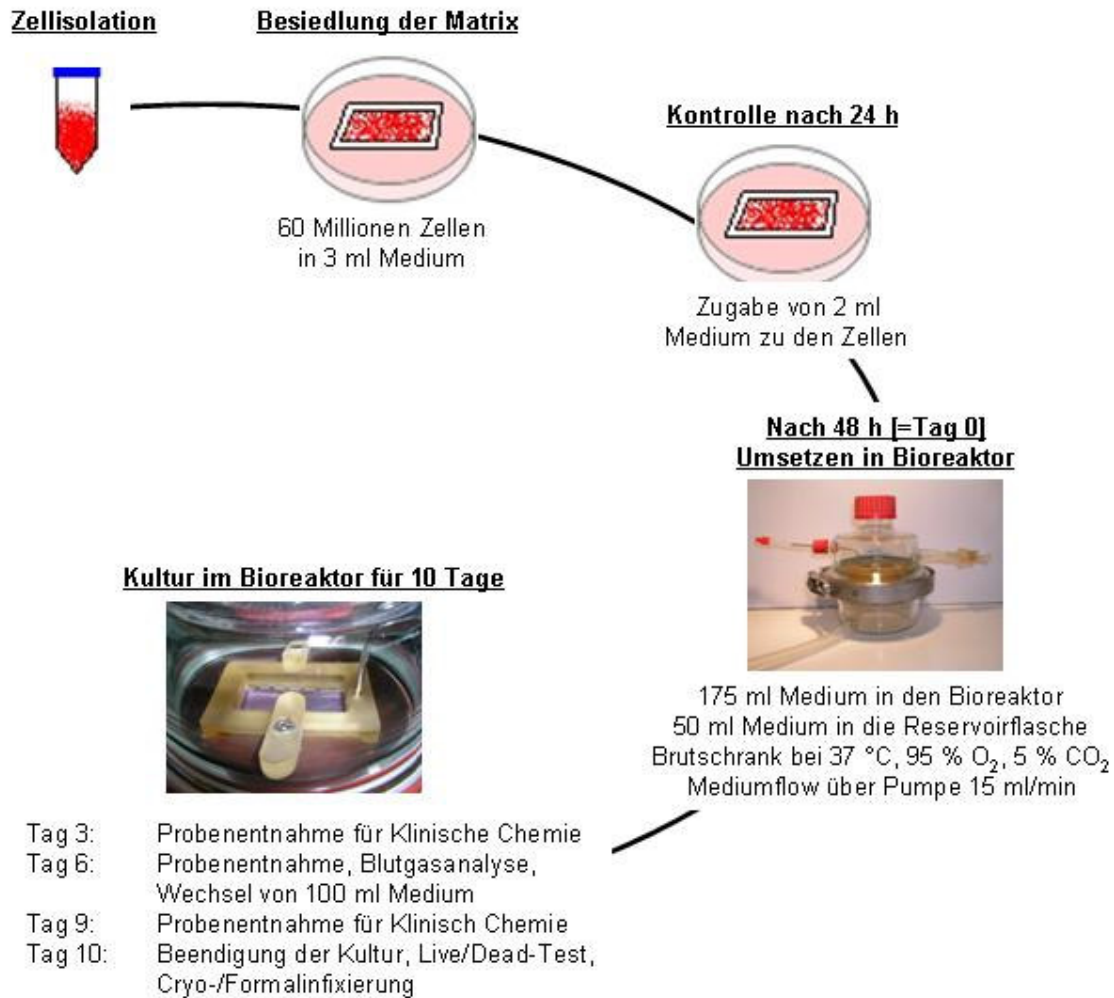
Standardprotokoll Zellkultur im Bioreaktor:

Abb. 3.9: Standardprotokoll der Zellkultur im Bioreaktor MEAT-3D

3.4.3 Rebesiedlung und Kultivierung der SIS unter physiologischem Stress

Die SIS wird genau wie in Kapitel 3.4.2 für die statische Kultur beschrieben, in den Halterahmen eingespannt und mit 60×10^6 Zellen besiedelt. Auch hier erfolgt nach 48 Stunden das Umsetzen in den Bioreaktor. Die Kultivierung wird unter genau gleichen Bedingungen durchgeführt, wie für die oben beschriebene statische Kontrollgruppe: Kulturperiode 10 Tage, Mediumvolumen 225 ml, 50 % Mediumwechsel am sechsten Tag, Pumpgeschwindigkeit 15 ml/min, Mediumproben für Laboruntersuchungen an Tag 0, 3, 6 und 9.

Allerdings wird die Kultur ab Tag 0 im Reaktor permanent mechanisch gestresst. Eine Drucksteuerung pumpt mit einer Frequenz von 12/min Druckluft bis 40 mmHg in das Reservoir unter der Silikonmembran. Diese wird dadurch 1–1,2 cm in vertikaler Richtung gedehnt und sukzessiv auch die darauf anheftende rebesiedelte SIS Matrix.

3.4.4 Rebesiedlung und statische Kultivierung des DRV im Bioreaktor

Der DRV wird für die Rebesiedlung mit Kardiomyozyten in der Kulturschale und für die Kultivierung im Bioreaktor in den Halterahmen eingespannt, wie im Kapitel 3.3.3 beschrieben. Die bis zu 1 cm dicke Matrix muss hierzu im Randbereich, wo sie eingeklemmt werden soll, auf eine Dicke von etwa 0,2 cm geschnitten werden.

Nach einer 24stündigen Inkubation in das Zellkulturmedium werden 60×10^6 Zellen in einer Suspension mit 3 ml KM-Medium mit einer Spritze an 8 verschiedenen Stellen in das Konstrukt injiziert. Es ist eine sehr feine Insulinkanüle zu verwenden, um die Matrixstruktur möglichst nicht zu zerstören. Anschließend füllt man die Petri-Schale, in der die Besiedlung stattfindet, mit 10 ml Medium auf.

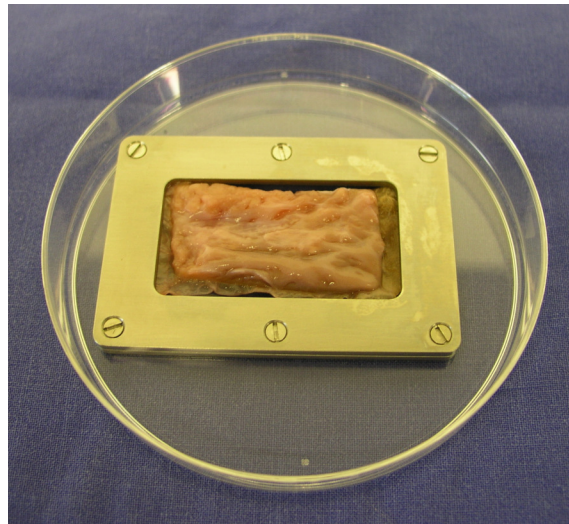


Abb. 3.10: DRV-Matrix, eingespannt in den Halterahmen zur Besiedlung

Nach weiteren 24 h werden noch einmal 3 ml Medium auf das Konstrukt geträufelt, und nach 48 h wird es in den Bioreaktor MEAT umgesetzt. Dieser wird mit 175 ml Kardiomyozytenmedium aufgefüllt und mit einer Reservoirflasche mit 50 ml Mediumvolumen versehen. Der Mediumflow durch das Reaktorsystem während der Kultivierung beträgt 15 ml/min. Die Kulturperiode von 10 Tagen läuft unter statischen Bedingungen ab, ein 50%iger Mediumwechsel erfolgt am sechsten Tag der zehntägigen Kulturperiode. Am 0., 3., 6. und 9. Tag werden 2 ml Mediumproben zur serologischen Untersuchung entnommen.

3.4.5 Herstellung von Gefrierschnitten

Speziell für die Analyse der Live/Dead-Färbung der auf der DRV-Matrix basierenden Konstrukte wurden Gefrierschnitte angefertigt. Dies ist notwendig, um eine zeitnahe Begutachtung zu ermöglichen. Und schließlich sind die Gewebe zu dick, um sie wie die SIS-Matrix nativ unter dem Durchlichtmikroskop ansehen zu können.

Zunächst wird ein Drittel des Gewebes herausgeschnitten und dieses in der Kammer des Gefriermikrotoms unter Verwendung des Einbettungsmediums auf einem Probenstempel bei -25°C aufgefroren. Es ist darauf zu achten, dass man durch das Anschneiden nun Querschnitte durch das Gewebe vorliegen hat. Mit Tissue Tek[®] wird das Konstrukt noch zu einem Gefrierblock gedeckt und mit einigen Trimmschnitten von $50\ \mu\text{m}$ Dicke eine glatte Schnittebene erzeugt. Nun werden von jedem Präparat zehn Stufenschnitte mit einer Schichtdicke von $7\text{--}9\ \mu\text{m}$ erstellt und im Dunkeln auf Objektträger aufgezogen. Anschließend erfolgt das Lufttrocknen der Schnitte und die Lagerung bei -20°C bis zur mikroskopischen Auswertung.

3.4.6 Herstellung von Parafinschnitten

Material: Roti- Histofix[®] gepuffertes Formalin

100 % Ethanol

98 % Xylol

Paraplast

Wasserbad-Lösung:

Abgekochtes Aqua dest.

Eiweiss Glycerin

Formalinfixierung und Entwässerung

Nach Beenden der Zellkultur und der Durchführung der funktionellen Tests (siehe 3.5.2 und 3.6.1) wird das gesamte Konstrukt mit seinem Halterahmen über Nacht in 4 %, pH 7 gepuffertem Formalinaldehyd fixiert. Formalin bewirkt eine Gewebekoagulation durch Vernetzung der Proteine. Ansatzpunkt sind hier vor allem die Aminogruppen, wodurch das Gewebe konserviert wird, dabei die Zell- und Matrixstruktur allerdings erhalten bleibt.

Die dünne SIS wird am Folgetag mit der Unterseite auf ein 20 cm² großes Papierstück aufgelegt, das durch Anhaften der Probe ein Zusammenrollen der Matrix nach der Herauslösung aus dem Halterahmen verhindert. Außerdem ist so eine eindeutige topographische Zuordnung der Seiten im Bioreaktor für die spätere Einbettung möglich. Das Papier wird vorsichtig um die Probe gefaltet, wodurch eine Art Umschlag entsteht. Nach diesem Hilfsschritt folgt das Überführen des Gewebes in eine Histo-kapsel, die dickere DRV-Matrix wird ohne eine Papierhülle eingekapselt.

Für die Einbettung in hydrophobes Paraplast muss die Entnahme zunächst entwässert werden. Dieser Arbeitsschritt wurde in einem Entwässerungsautomaten durchgeführt. Das Protokoll läuft über 15 Stunden, wie folgt:

In Formalin werden die Proben über 1,5 h auf 40 °C erhitzt, danach kommen sie für 2 Stunden in 75 %igen Alkohol, der einmal gewechselt wird. Anschließend durchlaufen die Kapseln für 5 Stunden fünf Stationen mit 100 %igem Ethanol, kommen dann für zweimal 45 min in Xylol und schließlich in flüssiges Paraplast. Die Fixierung mit Paraplast geht bei 60 °C für zunächst 2 Stunden und im zweiten Schritt für 2,5 Stunden vonstatten und ersetzt alle Lösungsmittel im Gewebe durch das Wachs-Kunststoff-Gemisch.

Parafineinbettung und Schneiden

Die Einbettung in Paraplastblöcke zur weiteren histologischen Aufarbeitung erfolgt mit Hilfe einer Gießstation. Es handelt sich dabei um ein Gemisch aus Parafinwachs und einem Kunststoff für verbesserte Schneideeigenschaften.

Das Formalin-fixierte und -entwässerte Gewebe wird seiner Kapsel und dem Papier entnommen und kurz senkrecht auf einer mit etwas flüssigem Paraplast gefüllten Metallform angefroren. Das Auffüllen der Gießform erfolgt mit 60 °C warmen Parafin, was nachfolgend auf –20 °C heruntergefroren wird.

Die Parafinblöcke werden in ein Schlittenmikrotom eingespannt und bis zum vollständigen Anschnitt der Proben abgehobelt. Die Feinschnitte für die Histologie werden in 7 µm Dicke geschnitten. Pro Präparat werden so zehn Stufen produziert. Dabei bedeutet die Bezeichnung „Stufe“, dass immer zwei dieser Feinschnitte genommen und danach die nächsten zehn verworfen werden.

Die gewählten Schnitte sind zunächst in ein 40 °C warmes Wasserbad zu überführen, damit sich die gestauchten Gewebe wieder ausbreiten und sich anschließend auf Objektträger aufziehen lassen. Für die HE-Färbung werden geschliffene, geputz-

te, unbehandelte Glasobjektrager verwandt und für die Pentachrom-Färbung nach Movat sowie die immunhistologischen Farbenungen werden Thermo Shandon Histoslides mit spezieller adhäsiver Oberfläche eingesetzt. Anschließend trocknen die Preparate 15 min bei 80 °C bzw. über Nacht bei 50 °C, um das Parafin ablaufen zu lassen.

Histologische Schnitte, die nicht im direkten Anschluss gefärbt werden, werden luftgetrocknet und bei Raumtemperatur bis zu einer Woche gelagert.

3.5 Funktionelle Charakterisierung

Allgemeine Zellfunktionen werden durch die Analyse von Stoffwechseledukten und -produkten erfasst. Zur Untersuchung der elektrischen Integrität des artifizierten Gewebes sowie der Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten unter Elektrostimulation, erfolgt ein Pacen der Konstrukte am Ende der zehntägigen Kultivierungszeit mit einem externen Einkammerschrittmacher.

3.5.1 Klinische Chemie

Die aus den verschiedenen Ansätzen im Bioreaktor gewonnenen Kulturmediumproben werden direkt nach der Entnahme zur Analyse in die Klinische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover gebracht. Folgende Parameter werden mit Hilfe der aufgeführten Geräte und Methoden bestimmt:^{*}

S-Calcium: Modular, Fa. ROCHE; Atomabsorptionsspektrometrie.

Da die Calciumkonzentration im Zellkulturmedium konstant sein sollte, dient die Analyse vor allem als Referenzwert für die Glukose- und Laktat-Konzentrationen.

S-Glukose: Modular, Fa. ROCHE; Hexokinase-Methode.

Glukose wird als ein Parameter des Zellmetabolismus herangezogen.

P-Laktat: Hitachi 917, Fa. HITACHI; Enzymatische Bestimmung (LDH)

^{*} Auflistung nach Messgröße: Gerät, Hersteller, Methode

Laktat ist das Endprodukt des anaeroben Stoffwechsels der Zellen. Es dient demnach zur Kontrolle des Zellmetabolismus sowie der Sauerstoffversorgung der Zellen.

Blutgase: Blutgasanalysegerät, Fa. RADIOMETER DENMARK; pH und pCO₂ photometrisch mit Glaselektroden, Sauerstoffpartialdruck amperometrisch Messgrößen des Säure-Basenhaushalt werden errechnet.

Die Blutgase werden bestimmt, um die Oxigenierung des Mediums zu kontrollieren und zu prüfen, ob der pH-Wert einem physiologischen Niveau entspricht.

Enzymbestimmung: Modular, Fa. ROCHE; CK, CK-MB und LDH über enzymatische Tests. Die katalytische Konzentration wird über einen Immuninhibitionstest bestimmt.

Mit der Bestimmung der herzmuskelspezifischen CK-MB und der zytoplasmatischen LDH wird kontrolliert, ob es in der Kultur zu einer vermehrten Zellapoptose kommt. Referenzwerte für das Kardiomyozyten-Kulturmedium liegen bei allen drei zu messenden Enzymen < 5 U/l.

3.5.2 Elektrostimulation mit einem Einkammerschrittmacher

Für die Untersuchungen zur elektrischen Integrität des Gewebes und der erhaltenen Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten wurden weitere Konstrukte auf der SIS unter statischen, wie gestressten Bedingungen gezüchtet. Dabei werden vor der Besiedlung und vor dem Einspannen der Matrix in den Halterahmen zwei handelsübliche Schrittmacherelektroden in einem Abstand von etwa 4 cm auf die SIS aufgenäht und in ihr verhakt. Danach erfolgt die Rebesiedlung und Kultivierung des

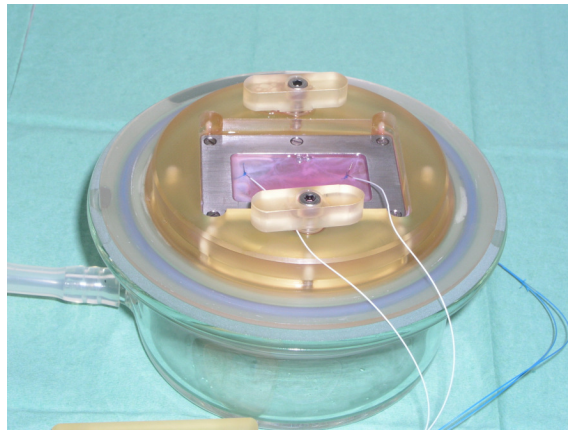


Abb. 3.11: SIS-Matrix, eingespannt in den Bioreaktor mit aufgenähten Schrittmacherelektroden

Gewebes unter standardisierten Bedingungen im Bioreaktor wie in Kapitel 3.4 beschrieben. Nach 10 Tagen Kulturzeitraum wird das Oberteil des Bioreaktors und der Mediumrahmen entfernt und ein kliniküblicher, temporärer Einkammerschrittmacher an die Elektrodenkabel angeschlossen. Die Stimulation der Kardiomyozyten erfolgt

unter der definierten Frequenz von 50/min und langsamer Steigerung der Amplitude von 0 auf 40 mV.

Der Effekt der Stimulation wird zunächst makroskopisch, später in einer Petri-Schale unter dem Durchlichtmikroskop semiquantitativ auf sichtbare Kontraktionen beurteilt.

3.6 Histologische Charakterisierung

Direkt nach Beenden der Versuche werden Zellvitalität und Gewebemorphologie im Live/Dead-Assay analysiert, die Charakterisierung von Gewebezusammensetzung, Zellverteilung und -vitalität erfolgt in histologischen bzw. immunhistochemischen Färbungen am Parafinschnitt.

3.6.1 Live/Dead-Assay

Material: L/D Reagenz:
 16 µl Calcein AM (1:1000)
 2 µl EthD-1 (1:8000)
 16 ml PBS

 PBS

Der Lebend/Tod-Test erlaubt die Unterscheidung zwischen lebenden, stoffwechselaktiven und toten Zellen in der Zellkultur. Es wird eine Reagenz aus den zwei Chemikalien Calcein AM und Ethidium-Homodimer-1 (EthD-1) eingesetzt, die zu Fluoreszenzfarbstoffen umgesetzt werden, bzw. durch chemische Bindung in ihrer Fluoreszenz verstärkt werden.

Calcein AM kann durch die Zellmembran in die Zelle eindringen und wird von unspezifischen, ubiquitär im Zytoplasma vitaler Zellen vorkommenden Esterase in das grün-fluoreszierenden Calcein umgewandelt. Das EthD-1 dringt durch die löchrige Zellmembran toter Zellen ein und bindet an die DNA des Zellkernes, dadurch wird die rote Fluoreszenz des Farbstoffes 40fach verstärkt und sichtbar gemacht.

Das L/D-Assay wird direkt nach Beenden der Zellkultur durchgeführt. Die rebesiedelte Matrix wird samt Halterahmen aus dem Bioreaktor in eine Petri-Schale überführt

und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend werden 4 ml der zuvor angesetzten L/D-Reagenz zugegeben und im Dunkeln für 30 min bei 37 °C inkubiert. Vor der mikroskopischen Untersuchung der Präparate werden diese noch zwei weitere Male mit PBS gewaschen und in Dunkelheit bei 4 °C gelagert.

Die Auswertung erfolgt im direkten Anschluss an die Färbung unter einem Fluoreszenzmikroskop. Die Farbstoffe werden durch eine Quecksilberlampe angeregt und durch einen dreifach Filter (CX 56) beobachtet, wobei die auf der SIS basierenden Konstrukte nicht aus dem Rahmen entfernt werden. Es wird ein Objektträger unter die Matrix gelegt und das gesamte Konstrukt kann nativ mikroskopiert werden. Der rebesiedelte DRV muss aufgrund seiner Dicke zum Mikroskopieren histologisch aufbereitet werden. Im Cryostaten sind dazu Gefrierschnitte in Längs- und Querrichtung anzufertigen und im Dunkeln auf Objektträger aufzuziehen.

Zur Auswertung von Zelldichte und -morphologie werden je zehn Gesichtsfelder in 100facher Vergrößerung von unterschiedlichen Stellen des Konstruktes abfotografiert. Ein Gesichtsfeld hat eine Fläche von 304814 μm^2 auf der die Zellzahl bestimmt wird. Dadurch ist die Hochrechnung der Zelldichte auf 1 cm^2 möglich und auch die Zellausbeute (Verhältnis der adhaerenten Zellen zu den gesiedelten Zellen) kann bestimmt werden:

$$\begin{aligned} \text{Umrechnung:} & \quad 300.000 \mu\text{m}^2 = 0,003 \text{ cm}^2 \\ \text{also:} & \quad \text{Zellzahl} \times 1000/3 = \text{Zellen/cm}^2 \end{aligned}$$

Mit Hilfe des Computerprogramms DP-Soft[®] wird anhand der angefertigten Live/Dead-Bilder die Länge der Zellen ausgemessen. Die Zelllänge dient als Parameter der morphologischen Veränderung (Hypertrophie) der einzelnen Zelle durch den mechanischen Stress.

3.6.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Material: 100 % Ethanol
 98 % Xylol
 Aqua dest.
 Gill[®]-3 Hämatoxylin, (Thermo Shandon)

Eosin-Lösung:

80 ml 2%iges wässriges Eosin
20 Tropfen Eisessig
auf 500 ml Aqua dest.

Consul-Mount[®], (Thermo Shandon)

In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) wirken sukzedan auf den Schnitt der basische Farbstoff Hämatoxylin und der saure Farbstoff Eosin ein. Das Hämatoxylin bindet an die basophilen Strukturen des Zellkerns und stellt diese blau-schwarz da, während das Eosin Zytoplasma und die meisten Interzellulärsubstanzen rötlich anfärbt.

Die Färbung basiert auf hydrophilen Farbstoffen. Aus diesem Grund müssen die hergestellten Parafinschnitte nach dem Ablauen gewässert werden. Dieser Prozess sowie die gesamte Färbung findet in einem Färbeautomaten statt. Pro Arbeitsschritt steht eine Küvette bereit, und alle 1,5 min dreht sich der Automat um eine Station weiter. In dem Protokoll durchlaufen die Objektträger zuerst vier Xylol-Stationen und anschließend eine absteigende Alkoholreihe aus 100 %igem, bzw. 70 %igem Ethanol und Aqua dest. Die Kernfärbung erfolgt für 3 min mit Hämatoxylin und anschließend bläuen die Schnitte 6 min in 60 °C warmen Leitungswasser. Der zweite Färbeschritt erfolgt für 1,5 min in einer Eosin-Lösung. Danach werden die Schnitte in einer Alkoholreihe 2 x 70 %, 1 x 96 % und 1 x 100 % differenziert und entwässert. Nach abschließenden vier Waschschritten in Xylol erfolgt das Eindecken der Präparate zur Stabilisierung und Konservierung in einem Automaten mit Shandon Consul-Mount[®].

3.6.3 Pentachrom-Färbung nach Movat

Material: Alcianblau:

1 g Alcianblau
1 ml Eisessig
100 ml Aqua dest.

Brilliant Crocein Säurefuchsin

Lösung A: 0,1 g Brilliant Crocein
 0,5 ml Eisessig

99,5 ml Aqua dest.

Lösung B: 0,1 g Säurefuchsin

0,5 ml Eisessig

99,5 ml Aqua dest.

Gebrauchslösung:

8 Teile Lsg. A + 2 Teile Lsg. B

Saffron Du Gatinais

6 g Saffron

100 ml 100 % Ethanol

in luftdicht verschlossener Flasche 48 h bei 50 °C extrahieren

Weigerts Eisenhämatoxylin

Lösung A: 1 g Hämatoxylin

100 ml 96 % Ethanol

reifen lassen bis die Farbe rotbraun erscheint

Lösung B: 1,16 g Eisenchlorid

1 ml 25 % Salzsäure

100 ml Aqua dest.

Gebrauchslösung:

Lsg. A + Lsg. B 1:1 mischen

Alkalischer Ethylalkohol

10 ml Ammoniak

90 ml 96% Ethanol

0,5 % Essigsäure

5 % Phosphorwolframsäure

100 % Ethanol

98 % Xylol

Corbit-Balsam

Die Pentachrom-Färbung besteht aus fünf verschiedenen Farbstoffen, die neben der Differenzierung von Zytoplasma und Zellkern, verschiedene extrazelluläre Matrixkomponenten mit unterschiedlichen Farben darstellen. Mineralisierter Knochen und Kollagene werden durch den Saffron-Farbstoff leuchtend gelb angefärbt. Mineralisierter Knorpel erscheint im Endergebnis blau-grün, übriges Knorpelgewebe rötlich bis gelb. Saure Glykosaminoglykane als Ausdruck neu synthetisierten Kollagens

werden durch Alcianblau leuchtend blau angefärbt, während elastische Fasern durch das Brilliant Crocein-Säurefuchsin in einem Rot erscheinen. Das Zytoplasma wird in der Pentchrom-Färbung ebenfalls rötlich dargestellt, der Zellkern färbt sich wie gewohnt durch das Hämatoxylin blau-schwarz an.

Parafinschnitte müssen für diese Färbung zunächst entparafiniert und in Wasser gebracht werden. Hierzu werden sie für 1 Stunde bei 60 °C in einen Trockenschrank gesetzt, durchlaufen dann eine absteigende Alkoholreihe: 2 x 15 min Xylol, 15 min 100 %, je 5 min 96 %, 80 %, 70 % und werden schließlich in Aqua dest. gebracht. Der erste Färbeschritt erfolgt in Alcianblau für 10 min. Danach werden die Schnitte 5 min in Leitungswasser gespült und anschließend mit alkalischem Äthylalkohol für 60 min stabilisiert. Dieser wird 10 min lang unter fließendem Leitungswasser herausgewaschen. Die Präparate werden kurz in Aqua dest. eingetaucht und zum Kernfärben 10 min in filtriertes Eisenhämatoxylin überführt. Nach einem weiteren Spülen in Aqua dest. kommen sie zum Bläuen für 15 min in Leitungswasser. Der nächste Färbeschritt erfolgt für 15 min in Brilliant-Crocein-Säurefuchsin, danach wird kurz mit Essigsäure gespült und mit Phosphorwolframsäure 20 min stabilisiert. Anschließend werden die Objektträger 2 x 2 min mit 0,5 %iger Essigsäure und 3 x 5 min in 100 % Äthylalkohol gespült und danach für 60 min im Dunkeln mit Safran du Gatinais inkubiert. Zum Schluss werden die Proben noch dreimal 3 min lang in 100 % Äthylalkohol gespült, danach entwässert und zum Eindecken in Xylol überführt. Die Konservierung der Präparate erfolgt mit Corbit-Balsam.

3.6.4 Immunhistologie

Material: Citratpuffer (10 mM pH 6,0):

9 ml Zitronensäure-Stock (0,1 M)

41 ml Natriumcitrat-Stock (0,1 M)

450 ml Aqua dest.

Lösung A (Tris-Stock 1,0 molar pH 7,5):

63,5 g Tris HCl

11,8 g Tris Base

auf 500 ml Aqua dest.

Lösung B (NaCl-Stock 5,0 molar):

146,1 g NaCl
auf 500 ml Aqua dest.

1mol CaCl₂:

7,35 g CaCl₂ × 2H₂O
auf 50 ml Aqua dest.

Waschpuffer:

200 ml Lösung A
60 ml Lösung B
2 g BSA
4 ml CaCl₂
auf 2000 ml mit Aqua dest. auffüllen

Aceton

POD-Blockierung:

2 ml 30 % H₂O₂
200 ml Waschpuffer

Normalserum vom Pferd (1:10 verdünnt)

Primärer Antikörper: MF-20 (1:100 verdünnt)

bzw. Troponin T (1:200 verdünnt)

Sekundärer Antikörper (Biotin gekoppelt) Horse anti Mouse (1:50)

Negativkontrolle: Mouse IgG 1 (1:50)

Avidin-POD-Komplex (ABC-Kit):

1 Tropfen Avidin
1 Tropfen Biotin
auf 5 ml Färbepuffer

DAB-Kit:

1 Tropfen DAB
auf 1 ml Puffer

Härris-Hämatoxylin (1:3 in Aqua dest.)

100 % Ethanol

98 % Xylol

Corbit-Balsam

Zur eindeutigen Identifizierung eines bestimmten Zelltyps gegenüber anderer Zellen werden in der Immunhistologie zellartspezifische Antigene bzw. Zellproteine sichtbar

gemacht. In dieser Arbeit sollten Kardiomyozyten gegenüber anderen Zellen abgegrenzt werden. Zum einen, um ihren Anteil an den gesiedelten, also auf den Konstrukten aufgebracht Zellen zu bestimmen, zum anderen um ihre Fähigkeit zum Anwachsen auf der Matrix zu beweisen.

Somit ergeben sich zwei verschiedene Materialien auf denen Kardiomyozyten darzustellen sind. Für die Cytospots aus der Zellisolation wurde in der folgenden Färbung ein MF-20-Antikörper verwendet, der die Myosin Heavy Chains (MHC) in Kardiomyozyten darstellen lässt. Als Parafin-gängiger Antikörper für die Gewebeschnitte wurde ein Troponin-T-Antikörper gewählt, der die Anfärbung von Troponin-T-Proteinen in Muskelzellen erlaubt.

Der immunchemische Nachweis dieser einzelnen Proteine folgt der ABC-Methode: Im ersten Schritt bindet ein spezifischer Antikörper an das zu bestimmende Antigen. Daran wird im zweiten Schritt ein Sekundärantikörper angehaftet, an den ein Biotin-Molekül gekoppelt ist. Nun macht man sich die starke Affinität des Avidins zunutze, Biotin-Moleküle zu binden. Es werden vorgeformte Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexe zugegeben, die sich mit der vierten freien Bindungsstelle des Avidins an die Biotinmoleküle der Sekundärantikörper binden. Jetzt besteht die Möglichkeit, über die Peroxidaseenzyme durch enzymatisches Umsetzen von Chromogen die Antigen-Antikörper-Avidin-Biotin-Komplexe sichtbar zu machen.

Die verwendeten Cytospots fixieren für 8 min bei -20°C in Aceton auf den Objektträgern und trocknen anschließend an der Luft. Parafinschnitte des gezüchteten Gewebes müssen zunächst vollständig entparafiniert werden, um ein Binden des Antikörpers an die Antigene zu ermöglichen. Die Präparate werden zunächst zum Ablaufen des Parafins über Nacht bei 50°C getrocknet. Anschließend kommen sie in einer Küvette in ein großes Becherglas, damit sie vollständig mit Citratpuffer (500 ml) bedeckt werden können. Dieses Konstrukt wird nun in einer Mikrowelle ca. 10 min erhitzt, bis die Pufferflüssigkeit zu kochen beginnt. Das Parafin wird nun über 15 min von den Objektträgern abgekocht. Dabei ist darauf zu achten, dass die Küvette stets mit Pufferlösung bedeckt ist. Anschließend kühlen die Schnitte ca. 30 min auf Raumtemperatur ab und werden in Aqua dest. überführt.

Die einzelnen Präparate werden für die Färbung auf ihrem Objektträger mit einem Fettstift umrandet, um ein Wegschwimmen der aufzubringenden Reagenzien zu

vermeiden. Nach 5minütigem Eintauchen in Waschpuffer werden die unspezifischen zellulären Peroxidase-Enzyme mit Wasserstoffperoxid blockiert. Die Schnitte inkubieren dafür 20 min im Dunkeln in einer 0,3 %igen H_2O_2 -Lösung. Anschließend werden sie wieder für 2 min mit Waschpuffer gespült und im nächsten Schritt blockiert man alle unspezifischen Bindungsstellen für den Sekundärantikörper. Hierzu inkubieren die Schnitte 15 min mit Serum des Tieres, aus dem auch der verwendete Sekundär-AK stammt. Das Serum wird abgeklopft und der in Färbepuffer verdünnte Primärantikörper aufgegeben. Die Inkubationszeit bei Raumtemperatur beträgt eine Stunde beziehungsweise bei 4 °C über Nacht. Parallel zu den Präparaten wird natives Schweineherz als Positiv- bzw. Negativ-Kontrolle mitgeführt. Auf die Negativ-Kontrolle wird statt des MF-20-Antikörpers Maus IgG1 aufgegeben.

Nach der Aufgabe des Primär-AK wird der Objektträger dreimal für 2 min in Waschpuffer gespült, abgetupft und anschließend der mit Färbepuffer verdünnte Sekundär-AK aufgetragen. In der Inkubationszeit von 30 min (bei RT) ist der Avidin-POD-Komplex anzusetzen, der vor dem Auftragen auf die Schnitte 30 min bei 4 °C inkubieren muss. Dann wird der Sekundär-AK abgeklopft und der Avidin-POD-Komplex für 30 min auf die Schnitte aufgetragen. Nach drei weiteren Waschschrritten erfolgt das Zusetzen von Chromogen (DAB Kit) zu den Proben und ein Zeitraum von 7 min wird angesetzt, dieses umzusetzen. Der letzte Färbeschritt leitet sich durch dreimaliges Spülen in Aqua dest. ein. Die Schnitte werden für 5 min in filtriertem Härris-Hämatoxylin gegengefärbt und anschließend zum Bläuen 10 min unter fließendes Leitungswasser gestellt. Die Differenzierung und Entwässerung erfolgt dann durch eine Alkoholreihe (kurz Aqua dest., 2 min 96 %, 2 min 100 %, 2 x 5 min Xylol). Zur Konservierung der Präparate werden diese direkt aus dem Xylol mit Corbit-Balsam eingedeckt.

4 Ergebnisse

4.1 Zweidimensionale Zellkulturtechniken und Kardiomyozytenisolation

Im Rahmen dieser Arbeit werden insgesamt 15 Zellisolationen aus neonatalen porcinen Schweineherzen durchgeführt und qualitativ sowie quantitativ ausgewertet. Aus den gewonnenen Zellen werden pro Isolation jeweils zweidimensionale Zellkulturen in Kulturflaschen parallel zu den dreidimensionalen Ansätzen im Bioreaktor angelegt. Insgesamt 30 Ansätze solcher Monolayer dienen der Überprüfung von Proliferations- und Kontraktionsverhalten sowie dem Nachweis von Kardiomyozyten in der Zellkultur.

4.1.1 Isolation der Kardiomyozyten

Pro neonatalem Schweineherz (12–20 g) werden im Durchschnitt 380 Millionen vitale Zellen isoliert. Sie bilden einen Anteil von 93,12 % ($\pm 5,01$ %) gemessen an der Gesamtzahl der isolierten Zellen. Ein Isolationsergebniss mit 22 % toten Zellen liegt dabei außerhalb des anderthalbfachen des oberen Quartils. Als Ursache für diese hohe Anzahl abgestorbener Zellen sind Komplikationen während der Herzkonservierung *in situ* auszumachen. Auf die anderen gemessenen Parameter der Zellisolation scheint die unzureichende Perfusion mit Custradiol und KHB aber keinen Einfluss zu nehmen, denn es werden keine signifikanten Unterschiede zu den anderen Isolationen gemessen.

Weitere Analysen der Zellen in der Neubauer Zählkammer ergeben einen Anteil lang ausgestreckter Kardiomyozyten an den isolierten vitalen Zellen von 13,5 %. Bei diesen Zellen können in 5,44 % der Fälle spontane Kontraktionen beobachtet werden. Allerdings besteht an dieser Stelle ein Unterschied zwischen den einzelnen Verdau-schritten. Der erste Verdau liefert im Durchschnitt 11 % zuckende Zellen, im zweiten und dritten Verdau ist dies nur in 4 % der lang ausgestreckten Kardiomyozyten zu beobachten. In Bezug auf Zellzahl, -vitalität und dem Anteil langgestreckter Zellen unterscheiden sich die drei Verdau-schritte jedoch nicht signifikant.

	Gesamtzellzahl (x 10 ⁶ Zellen)	Anteil Tote	Anteil Langgestreckte	Anteil Kontrahierende	Anteil 1. Verdau	Anteil 2. Verdau	Anteil 3. Verdau
Iso. 1	472	10,44%	20,34%	0,00%	40,68%	37,08%	22,25%
Iso. 2	450	8,54%	18,44%	3,61%	15,56%	30,44%	54,00%
Iso. 3	222	22,65%	13,51%	3,33%	13,06%	21,62%	22,52%
Iso. 4	330	10,08%	13,94%	2,17%	18,48%	50,30%	31,21%
Iso. 5	382	7,06%	15,18%	5,17%	23,04%	46,34%	30,63%
Iso. 6	345	4,43%	8,12%	3,57%	17,25%	42,17%	40,58%
Iso. 7	399	3,15%	13,14%	1,90%	9,39%	43,43%	47,18%
Iso. 8	520	4,06%	10,00%	1,92%	41,35%	30,00%	28,65%
Iso. 9	264	8,01%	11,17%	0,00%	10,04%	39,96%	50,00%
Iso. 10	572	3,21%	18,95%	1,84%	29,96%	51,27%	18,78%
Iso. 11	472	4,55%	12,38%	6,84%	21,90%	32,59%	45,50%
Iso. 12	208	5,02%	10,34%	13,95%	23,56%	32,21%	44,23%
Iso. 13	335,5	4,28%	10,58%	5,63%	27,42%	34,87%	28,91%
Iso. 14	318	4,50%	13,36%	4,71%	30,50%	30,19%	30,35%
Iso. 15	456	3,29%	13,05%	26,89%	27,52%	42,21%	29,50%
Mittelwerte	383	6,88%	13,50%	5,44%	23,31%	37,65%	34,95%
Stabw.	107				9,84%	8,40%	11,04%

Tab. 4.1: Tabellarische Datenerfassung der Zellisolation mit Gesamtzellzahl der Isolierten Zellen sowie prozentualer Aufschlüsselung der toten, physiologisch langgestreckten und kontrahierenden Zellen sowie der Anteile aus den einzelnen Verdaustritten

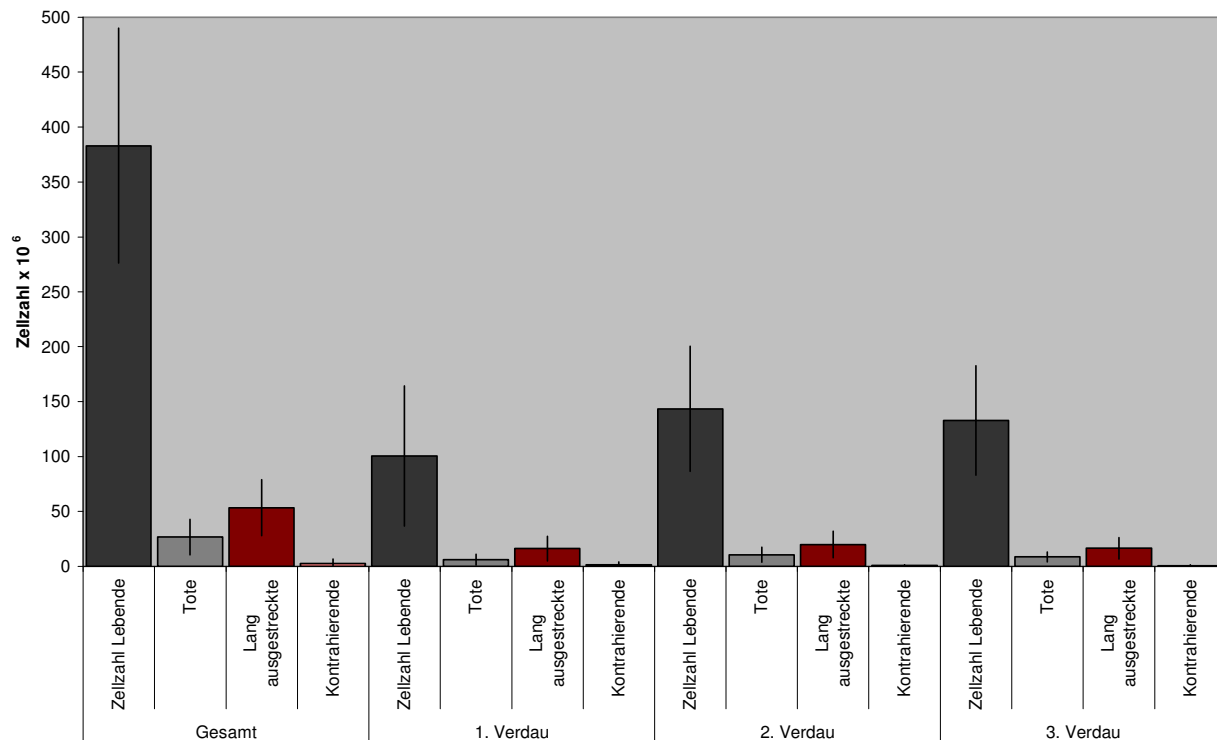


Abb. 4.1: Graphische Darstellung der Zellisolutionsdaten, aufgeschlüsselt nach Verdaustritten mit Säulendiagramm der Mittelwerte und der jeweiligen Standardabweichung

Das Verhältnis von Kardiomyozyten zu Nicht-Kardiomyozyten bei einer Zellisolation wird anhand immunhistochemisch gefärbter Cytospots der einzelnen Verdauschritte ermittelt. Pro Cytospot werden mehrere Gesichtsfelder abfotografiert und die MF-20-positiven und -negativen Zellen ausgezählt. Im statistischen Mittel beträgt der Anteil an Kardiomyozyten 85 % der Zellen aus einer Isolation. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Verdauschritten sind nicht festzustellen.

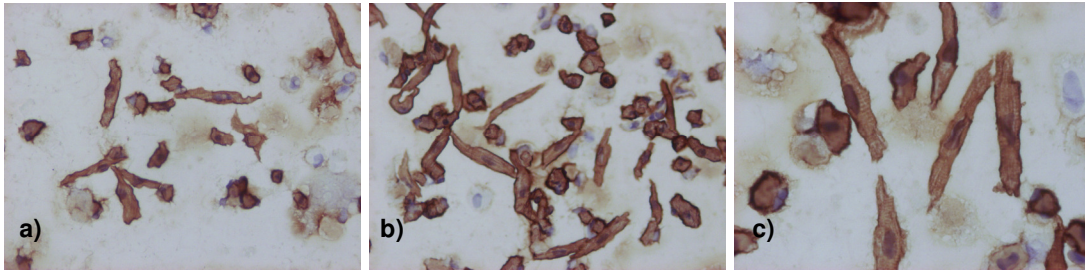


Abb. 4.2: Cytospots aus Zellisolation, Immunhistologie MF-20/DAPI, Zellkerne werden blau, Kardiomyozyten braun angefärbt, a) und b) 200fache Vergrößerung, c) 400fache Vergrößerung

4.1.2 Zweidimensionale Zellkultur

Mikroskopische Kontrollen der zweidimensionalen Zellkulturen ergeben eine Zunahme der Zelldichte binnen der ersten zwei Tage der Kultur. Nachdem der Mediumüberstand mit den nicht adhären Zellen abgenommen und durch neues Medium ersetzt wurde, bleibt die Zelldichte während des gesamten Kulturzeitraumes konstant. Die Proliferation, vor allem die der „Nicht-Kardiomyozyten“, wird erfolgreich durch die Zugabe von BrdU zum KM-Medium unterdrückt.

Morphologisch sind drei verschiedene Zellarten zu beobachten: (1.) Zellen mit einem hellen Randsaum lassen sich gegenüber (2.) platt auf der Oberfläche der Kulturflasche ausgestreckten Zellen abgrenzen sowie (3.) Zellen mit zwei Zellkernen und platter Morphologie. In vier der 30 Zellkulturflaschen können ab dem sechsten Tag einzelne, rhythmisch kontrahierende Zellen mikroskopiert werden, wobei es sich immer um die Zellen mit hellem Randsaum handelt. Die Kontraktionen halten bis zum Kulturende nach zehn Tagen an.

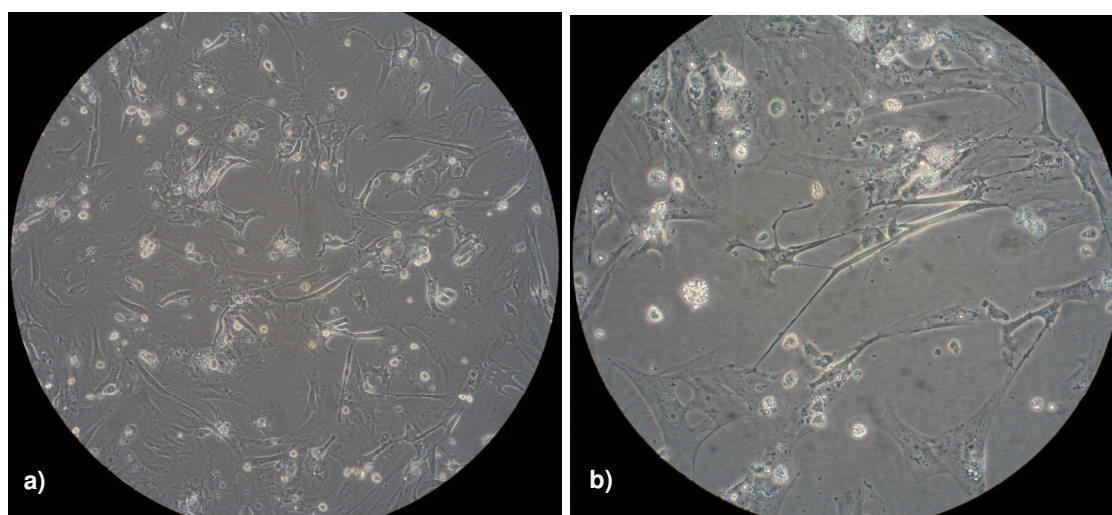


Abb. 4.3: Monolayerkulturen aus Zellisolation nach 5 Tagen, Durchlichtmikroskopie, a) 100fache Vergrößerung, b) 200fache Vergrößerung

Immunhistologie der Cytospots aus den Monolayer-Kulturen

Anhand von immunhistologisch gefärbten Cytospots der Monolayer lässt sich nachweisen, dass unter den adhären Zellen ein großer Anteil MHC-positiver Zellen ist. Nach der zehntägigen Kultivierung in der Zellkulturflasche lässt sich jedoch bei fast keiner Zelle die typische Querstreifung der Herzmuskelzellen ausmachen, wie es für die Kardiomyozyten in den Cytospots direkt nach der Isolation charakteristisch ist. So zeigen

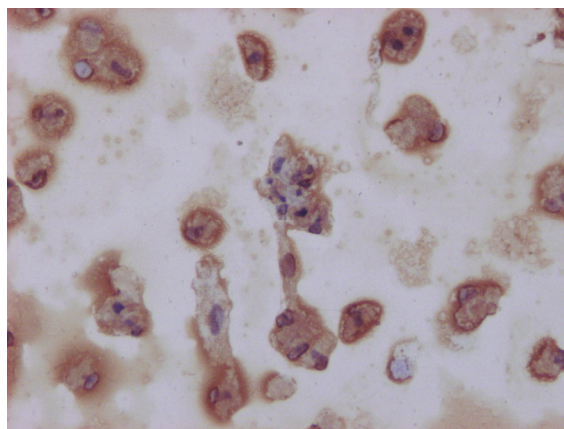


Abb. 4.4: Cytospot der abtrypsinierten Zellen, Immunhistologie MF-20/DAPI, 400fache Vergrößerung

sich viele Zellen auf dem Cytospot mit einem bräunlichen Schleier, so dass eine genaue Aussage zu deren Zelltyp nicht mehr sicher möglich ist.

4.2 Herstellung der Matrices

Mit verschiedenen histologischen bzw. molekularbiologischen Verfahren wird die Zellfreiheit der biologischen Gewebe nach dem Azellularisierungsprozess überprüft, und die Zusammensetzung der Matrixkomponenten charakterisiert.

4.2.1 Azellularisierung von Schweinedünndarm zur Herstellung der SIS-Matrix

Ergebnis der Azellularisierung des Schweinedünndarms ist eine zellfreie biologische Matrix von 0,2 mm Dicke. Bei dieser Methode wird nicht nur das Bindegewebe der Small Intestinal Submucosa (SIS) erhalten, sondern auch die Strukturen der Tunica muscularis und Tunica serosa mit samt der Kapillarstrukturen des nativen Gefäßnetzes.

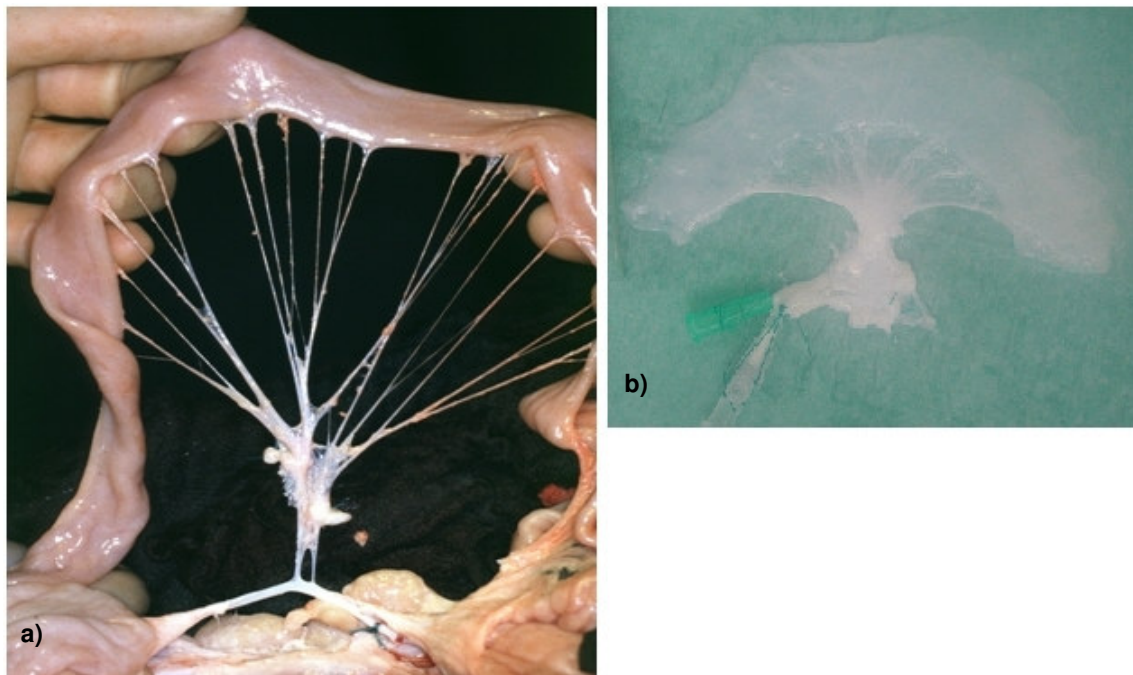


Abb. 4.5: Herstellung der SIS-Matrix, a) intraoperatives Bild der Darmpräparation, b) azellularisiertes Darmsegment, hier mit erhaltener Gefäßstruktur

Eine qualitative Charakterisierung der Bindegewebszusammensetzung wurde bereits von Mertsching et al. durchgeführt [50]. Die Western Blot Analysen dieser Arbeit haben ergeben, dass Kollagene einen Anteil von 92 % und elastische Fasern 5 % des

Matrixbindegewebes ausmachen. Die erhaltenen Kapillarstrukturen werden in einer Elastica-van-Gieson-Färbung durch den spezifischen Nachweis der Basalmembran der Gefäße sichtbar gemacht. Es konnte gezeigt werden, dass diese Strukturen sowie das Bindegewebe der Elastica Interna nach dem Azellularisierungsprozess intakt sind.

4.2.1.1 Histologische Charakterisierung

Die vollständige Azellularisierung der Matrix wird auf Grund der hohen Standardisierung der Methode nur in der HE- und Pentachrom-Färbung überprüft. Alle entnommenen Stichproben aus den Geweben zeigen eine vollständige mechanische Entfernung der Mukosaoberfläche und ein zellfreies Bindegewebsnetzwerk. Die Matrix imponiert in der Färbung nach Movat als homogenes gelblich angefärbtes Kollagenetzwerk

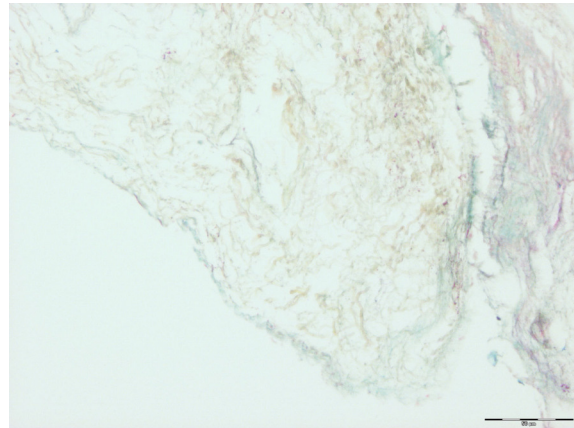


Abb. 4.6: Azelluläre SIS-Matrix, Pentachrom-Färbung, 100fache Vergrößerung

mit vereinzelt rötlich schimmernden elastischen Fasern, vor allem im Bereich kleiner Kapillaren.

4.2.2 Azellularisierung des rechten Ventrikel-Myokards zur Herstellung der DRV-Matrix

Die Azellularisierung des rechten Ventrikel-Myokards wurde von Tina Bindeballe im LEBAO standardisiert und mit 16 Wiederholungen auf die Reproduzierbarkeit der Methode überprüft.

Ergebnis dieser Dezellularisierungsmethode ist eine ca. 50 mm dicke, zellfreie Matrix, bestehend aus einem dichten Netzwerk bindegewebiger Faserzüge. Die qualitative Charakterisierung der Matrixkomponenten durch molekularbiologische Verfahren wurde von Tina Bindeballe im Zuge ihrer Dissertation beschrieben. Zum Beleg der vollständigen Entfernung zellulärer Bestandteile aus dem Gewebe, wurde die DNA

mit einem DNeasy-Tissue-Kit aus der Matrix isoliert und auf ein Agarosegel aufgetragen. Dabei ergibt die gelelektrophoretische Auftrennung dieser Proben einen DNA-Gehalt unter der Nachweisgrenze dieser Methode. In den azellularen Gewebeproben können keine DNA-Reste nachgewiesen werden.

In weiteren Western-Blot-Analysen wurde die Matrix anschließend auf Bestandteile zellulärer Proteine untersucht. Die Verwendung eines Coomassie-Blau-gefärbten Gels zeigt zunächst eine deutliche Abnahme des Gesamtproteingehaltes des DRV verglichen zum nativen Herzgewebe. Die im Ausgangsgewebe noch zahlreich vorkommenden Connexine (Cx 43) lassen sich im Western-Blot im DRV nicht mehr nachweisen, und auch der spezifische Nachweis von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase fällt negativ aus.

4.2.2.1 Histologische Charakterisierung

Die histologische Charakterisierung wurde von Tina Bindeballe im Rahmen ihrer Dissertationsarbeit übernommen. Für diese Arbeit diente als Überprüfung der Zellfreiheit lediglich die Pentachrom-Färbung. In den Ergebnissen zeigen sich mikroskopisch in HE-Färbung keine Zellkerne oder Herzmuskelzellstrukturen in 7 µm dicken Feinschnitten von Proben aus der Peripherie und aus der zentralen Zone des entnommenen rechten Ventrikels. In der Gefäßwand angeschnittener Arteriolen und Venolen befinden sich in 7 von 16 Fällen noch vereinzelt Zellen.

Auf Pentachrom gefärbten Schnitten lassen sich ebenfalls keine Zellkerne oder Zytoplasmastrukturen vom Bindegewebe abgrenzen. Wie schon in der HE-Färbung beobachtet, findet man in den Kapillaren noch vereinzelt Gefäßwandzellen.

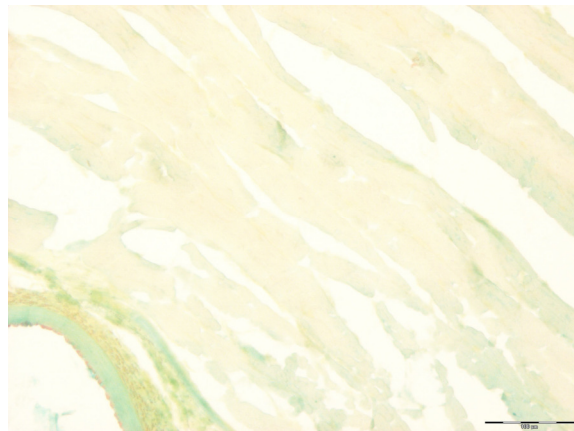


Abb. 4.7: Azellulare DRV-Matrix, Pentachrom-Färbung, im linken unteren Bildrand ist ein azelluläres Blutgefäß angeschnitten, 100fache Vergrößerung

Die dezellularisierte Matrix imponiert wie im nativen Präparat als dichtes Fasernetzwerk aus Kollagenfibrillen. Elastische Fasern kommen nur vereinzelt zur Darstellung.

In angeschnittenen kleineren Gefäßen ist eine Basallamina (elastische Fasern) zu erkennen.

Der Nachweis, dass die Matrix frei von Kardiomyozyten bzw. deren spezifischer zellulärer MHC-Proteine ist, wird in der Immunhistologie über monoklonalen MF-20-Antikörper erbracht.

Während in den Kontrollen aus nativem Schweineherz braun angefärbte Herzzellen mit dunkelblauem Zellkern und deutlich sichtbarer Zytoskelettstruktur dominierten, können in den azellularisierten Proben keine entsprechenden Zellen differenziert werden. Es stellen sich allerdings zart bräunlich erscheinende Bänder entlang der Bindegewebsfasern dar, die im Vergleich zu anderen kollagenen Matrices als unspezifische Hintergrundfärbung interpretiert werden.

4.3 Etablierung des Mechano-Bioreaktors (MEAT-3D)

Der neu entwickelte Mechano-Bioreaktor MEAT-3D wird für die Kultivierung von insgesamt 13 TEMP benutzt. Drei dieser Konstrukte basieren auf der 0,5 cm dicken DRV-Matrix, für alle anderen Ansätze wird die SIS als Trägermatrix eingesetzt. Fünf dieser Konstrukte werden während der Kultivierung im MEAT-3D mechanischem Stress ausgesetzt.

Die in den folgenden Kapiteln detailliert aufgeführten Ergebnisse aus diesen verschiedenen Ansätzen zeigen, dass in dem Mechano-Bioreaktor MEAT-3D eine Züchtung von verschiedenen myokardiellen Geweben unter standardisierten und reproduzierbaren Bedingungen möglich ist. Die Zellvitalität der generierten Konstrukte wurde am Ende der 10tägigen Zellkulturperiode im Durchschnitt mit über 90 % bestimmt. Während des Kulturzeitraumes können Proben steril aus dem Nährmedium entnommen und Mediumwechsel durchgeführt werden. Das Zirkulationssystem für die Nährlösung bewirkt eine Sauerstoffsättigung des Medium von 99 % und eine ständige Versorgung der Zellen mit frisch oxygenisiertem KM-Medium.

Außerdem ermöglicht der Aufbau des Bioreaktors die Kulturen kontrolliert physiologischem mechanischen Dehnungsstress auszusetzen, ohne dass dadurch eine vermehrte Zellapoptose oder ein Abplatzen der Zellen von der Matrix zu beobachten ist. Das verwendete Druckluftsystem zeichnet sich vor allem durch seine gute Regulierbarkeit und vielseitige Einstellungsmöglichkeiten in Bezug auf Frequenz, Wegstre-

cke, Dehnungszeit und Pausenzeit aus. Es lassen sich im MEAT-3D folglich verschiedene Einflussfaktoren auf die Zellkultur untersuchen.

4.4 Dreidimensionale Zellkultur auf den biologischen Matrices

Die 15 in einer Petri-Schale mit unterschiedlichen Zelldichten kultivierten Diarahmenkonstrukte liefern Ergebnisse zur erforderlichen Besiedlungszellzahl und optimalen Besiedlungstechnik.

Die im Bioreaktor generierten statischen Gewebe (n=5) dienen vor allem als Kontrollgruppe für die mechanisch gestressten Konstrukte (n=5). Die Rebesiedlung des DRV soll „außer Konkurrenz“ belegen, dass es im Allgemeinen möglich ist, diese Matrix nach dem Azellularisierungsprozess wieder mit Kardiomyozyten zu besiedeln.

4.4.1 Vorversuche in der Zellkulturschale

Es werden je fünf Diarahmenkonstrukte mit Zelldichten von 1, 3 und 5 Millionen Zellen pro cm² Matrixoberfläche besiedelt. Nach neun Tagen Kultur in einer Petrischale werden sie mittels Live/Dead-Tests auf Zellvitalität und -dichte untersucht.

In 5 der 15 Ansätze kommt es zu einem fast kompletten Absterben der Zellen, weil das leichte Diarahmenkonstrukt auf dem Zellkulturmedium aufschwimmt und so minderversorgt wird. In die nachfolgende Analyse gehen somit die 10 Konstrukte ein, bei denen dies nicht zu beobachten war.

In den Ansätzen mit der geringsten Siedlungsdichte (n=3 mit 1×10^6 Zellen/cm²) ist zu beobachten, dass keine gleichmäßige Zelldichte auf der Matrix vorherrscht. Es werden vornehmlich einzeln gelegene Zellen mikroskopisch sichtbar, die nur kurze Zellausläufer entlang der Kollagenstrukturen bilden. Der Anteil toter Zellen ist sehr hoch, vor allem sind dies Zellen, die nicht in Kontakt mit anderen Zellen stehen.

Bei den mit einer Dichte von 3×10^6 Zellen/cm² besiedelten Konstrukten (n=3) lassen sich Inseln mit hoher Zelldichte, lang ausgestreckte Zellen und fast 100 % vitale Zellen beobachten. Über die gesamte Matrix erhält man jedoch kein homogenes Ergeb-

nis, da auch Areale mit geringerer Zelldichte und einem scheinbar daraus resultierenden hohen Anteil toter Zellen zu finden sind.

Eine Besiedlungsdichte von 5×10^6 aufgetragenen Zellen pro cm^2 Matrixoberfläche ($n=4$) führt zu einer gleichmäßigen hohen Zelldichte über das gesamte Konstrukt. Die Gewebemorphologie erscheint im Live/Dead-Test durch die langen Zellausläufer und Zell-Zell-Kontakte der Herzmuskelstruktur ähnlich. In diesen Konstrukten findet man eine Zellvitalität von 98 %.

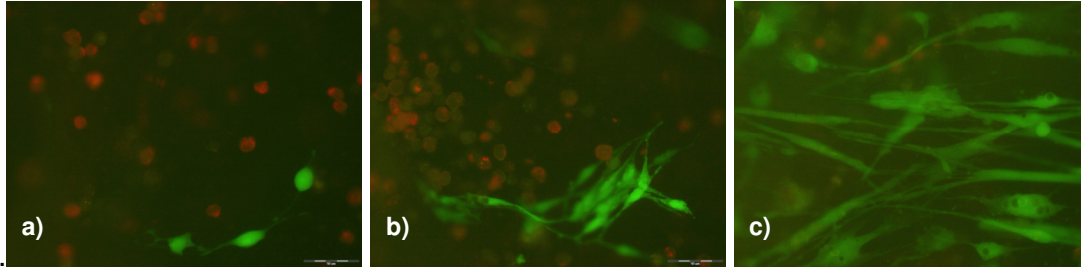


Abb. 4.8: Diaphragmenkonstrukte, Live/Dead-Färbung, Fluoreszenzmikroskopie des gesamten Konstruktes, 200fache Vergrößerung, Zellbesiedlung mit a) 1 Mio. Zellen/ cm^2 , b) 3 Mio. Zellen/ cm^2 und c) 5 Mio. Zellen/ cm^2 . Rote Fluoreszenz: Zellkerne toter Zellen, grüne Fluoreszenz: Zytoplasma lebender Zellen

In weiteren Vorversuchen in 6-Well-Platten kann gezeigt werden, dass 3 ml Mediumvolumen zum Resuspendieren von 60 Millionen Zellen ausreichen, um das Überleben der Zellen in den ersten 48 Stunden nach der Besiedlung zu sichern. Für diesen Nachweis werden die Zellen in einer 6-Well-Kammer gesiedelt und nach 48 Stunden mit einem Live/Dead-Assay angefärbt. Die auf der Platte adhärenen Zellen zeigen eine Zellvitalität von 98 %.

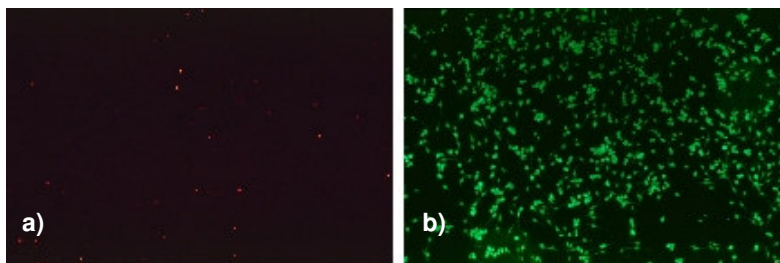


Abb. 4.9: Kardiomyozyten im 6-Well im Überlebensversuch nach 48 h, Live/Dead-Färbung, a) Darstellung rote Fluoreszenz, b) grüne Fluoreszenz

4.4.2 Rebesiedlung und statische Kultivierung der SIS im Bioreaktor

Neonatale porcine Kardiomyozyten, die in einer Dichte von 5×10^6 Zellen/cm² auf die SIS gesiedelt und im Bioreaktor kultiviert werden, bilden eine dichte Zellschicht auf der Oberfläche der Matrix und wandern vereinzelt in die Tiefe des Gewebes. Mit Hilfe der verschiedenen histologischen Methoden lassen sich Charakteristika von Herzmuskelgewebe nachweisen.

Spontane Kontraktionen des gezüchteten Herzmuskelgewebes (n=5) können in der 10tägigen Kulturzeit zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden.

Zur Standardisierung und Reproduzierbarkeit der Methode muss die Besiedlung allerdings in einer Kulturschale – wie beschrieben – stattfinden. Konstrukte, die direkt im Bioreaktor besiedelt werden, weisen signifikant niedrigere Zelldichten auf. Die Ursache dieser Beobachtung scheint das seitliche Abschwimmen der Zellen von der Matrix zu sein, das bei diesem Aufbau nicht vermieden werden kann.

4.4.2.1 Funktionelle Charakterisierung

Klinische Chemie

Über die Konzentrationen von Glucose und Laktat im Zellkulturmedium wird die Stoffwechselaktivität der Zellen überprüft. Glucose ist in der Zellkultur die wichtigste Energiequelle für die Muskelzellen. Unter Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) wird sie in der Glykolyse in Laktat umgesetzt. Diese im ATP konservierte Energie wird für viele Funktionen der Zelle, wie z.B. bei der Proteinbiosynthese oder zur Kontraktion benötigt, und dient somit als Parameter zur Überprüfung der Funktionalität der Zellen.

Der Glucoseverbrauch eines unter statischen Bedingungen im Bioreaktor kultivierten TEMP beträgt im Durchschnitt 0,9 mmol/l Glucose in 10 Tagen. Die Laktatproduktion während dieser Zeit wurde mit 0,6 mmol/l Laktat bestimmt. Die Stoffwechselaktivität vitaler Zellen auf unserem Konstrukt ist demzufolge nachgewiesen, auch wenn der deutliche Anstieg von Laktat auf einen zum Teil anaeroben Stoffwechsel hinweist.

Diese Ergebnisse machen eine Blutgasanalyse des KM-Mediums erforderlich. Wegen des beobachteten anaeroben Stoffwechsels in der Kultur gilt es, die ausreichen-

de Sättigung der Nährflüssigkeit mit Sauerstoff zu überprüfen, die vor allem abhängig von Gaspartialdruck und der Oberfläche der beiden Phasen ist.

Die stichprobenartige Blutgasanalyse der Zellmedien ergibt dabei im Mittel einen pH-Wert von 7,25, der im Vergleich zum physiologischen Normwert von pH 7,36–7,4 etwas zu sauer ist. Der Sauerstoffpartialdruck wurde bei 170 Torr gemessen, was einer physiologischen Sauerstoffsättigung des Mediums von 99 % entspricht.

Die tabellarische und graphische Aufarbeitung dieser Daten erfolgt im direkten Vergleich mit der dynamischen Zellkultur in Kapitel 4.4.3.1 in der Tabelle 4.2 und Abbildung 4.13.

Elektrostimulation mit einem Einkammerschrittmacher

Bei keinem der fünf gezüchteten myokardiellen Patches können spontane, makroskopisch sichtbare Kontraktionen des Gewebes während der Kultur beobachtet werden.

Um zu klären, ob innerhalb des Gewebes eine physiologische Erregungsweiterleitung möglich ist, bzw. ob es möglich ist, die Kardiomyozyten durch elektrische Stimulation zum Schlagen zu bringen, werden die Konstrukte nach Beenden der Kultur mit einem externen Einkammerschrittmacher gepaced.

Auch unter elektrischer Stimulation können keine makroskopisch sichtbaren Kontraktionen des Gewebes ausgemacht werden. Die mikroskopische Betrachtung des stimulierten Gewebes liefert ebenfalls keine neuen Erkenntnisse.

Als Ergebnis dieser sehr einfachen Methode zur Überprüfung der elektrischen Integrität des Gewebes muss folglich formuliert werden, dass die Fähigkeit der Kontraktion porciner Herzmuskelzellen nach der Kultivierung nicht nachgewiesen werden konnte.

4.4.2.2 Histologische Charakterisierung

Live/Dead-Assay

Der Lebend/Tod Test wird in dieser Arbeit zur quantitativen Kontrolle der Zellvitalität auf dem gezüchteten Gewebe herangezogen. Dadurch, dass mit der Calcein-Floureszenz das gesamte Zytoplasma anfärbt wird, die Zellkerne allerdings ausgespart bleiben, lässt sich das Assay auch für die Bestimmung der Zelldichte auf dem Konstrukt und für Untersuchungen zur Zellmorphologie heranziehen.

Nach einer Kulturzeit von 10 Tagen unter statischen Bedingungen im Bioreaktor stellen sich 98 % der Zellen auf der Matrix grün, d.h. als lebend, dar.

In Bezug auf die Gewebemorphologie der statischen TEMP lassen sich physiologische Merkmale von Herzmuskelgewebe wiederfinden. Die Zellen bilden Zytoplasmaausläufer entlang der Kollagenfasern der Matrix und verbinden sich so zu einem Netzwerk mit benachbarten Zellen.

Im Durchschnitt beträgt die Zelldichte eines solchen Konstruktes rund 40.000 Zellen hochgerechnet auf 1 cm² Matrixoberfläche. Es sind im Schnitt also nur 1 % der besiedelten Zellen auf der Matrix adhärend. Die Zellproliferation vor allem der enthaltenen Fibroblasten kann hierbei vernachlässigt werden, weil sie in ihrer Teilung durch das Anhaften von BrdU an die DNA in der S1-Phase der Zellteilungszyklen gehemmt werden.

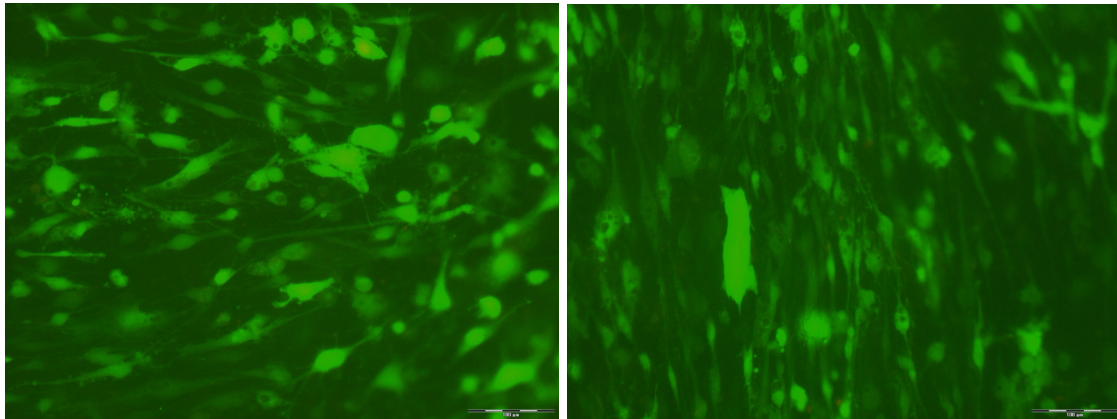


Abb. 4.10: SIS-Matrix, rebesiedelt mit 6×10^6 Zellen/cm² nach statischer Kultur im Bioreaktor, Live/Dead-Färbung, Fluoreszenzmikroskopie des gesamten Konstruktes, 100fache Vergrößerung

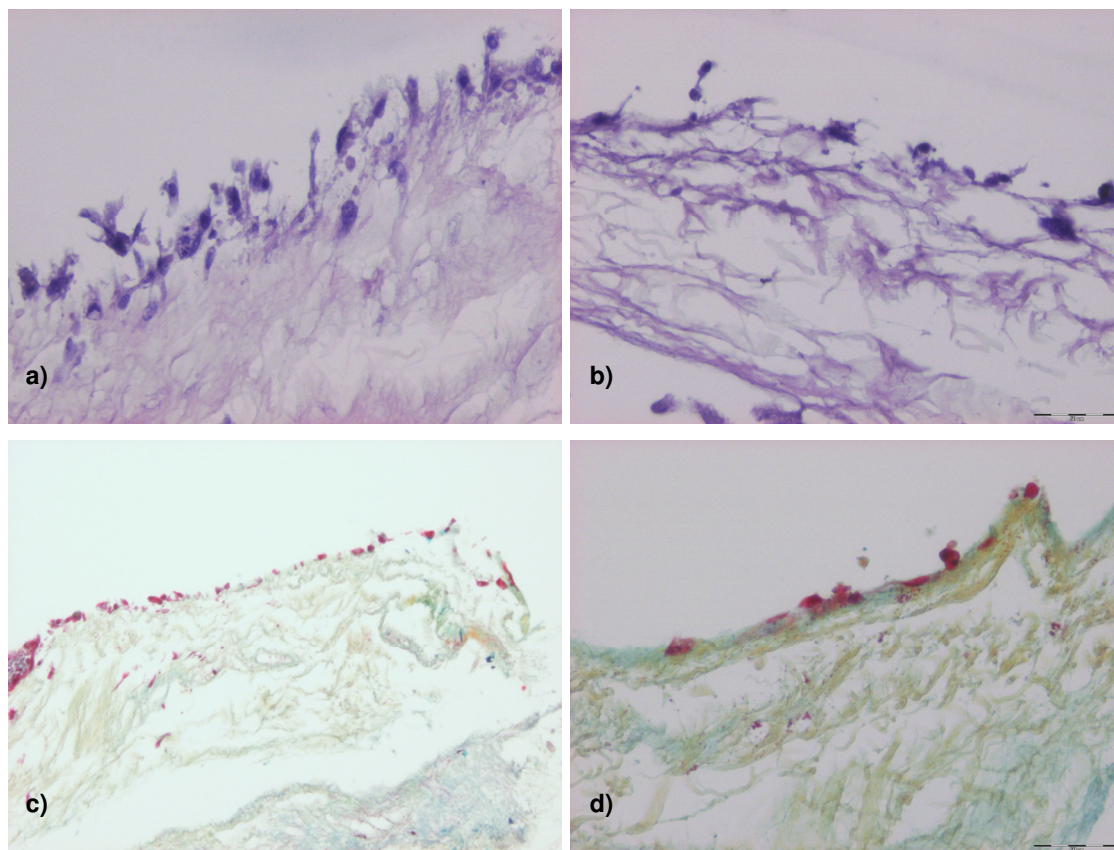
Die Analyse der Zellmorphologie erfolgt durch das Ausmessen der Zelllänge am Computer. An 1129 ausgemessenen Zellen auf der Matrix wird die durchschnittliche Zelllänge im statischen Konstrukt mit 56,8 µm bestimmt (Range: 12–250 µm). Sie liegt also an der unteren Grenze des physiologischen Wertes von 50–100 µm.

HE- und Pentachrom-Färbungen

HE gefärbte Feinschnitte der Präparate lassen sich in der Regel schwer interpretieren, da sich die Matrixfibrillen durch das Eosin häufig stark anfärben und sich dadurch das Zytoplasma nicht sicher abgrenzen lässt. In der Pentachrom-Färbung sind Zellkerne und Zytoplasma durch den höheren Farbkontrast besser zu identifizieren.

Die gefärbten Querschnitte durch das Gewebe zeigen insgesamt einen dichten Zellmonolayer an der Matrixoberfläche. In der Färbung nach Movat lassen sich auch Zellen in der Tiefe gut gegen die Bindegewebsstrukturen abgrenzen.

Besondere Bedeutung hat die Pentachrom-Färbung in dieser Arbeit, unter anderem, weil sie eine Differenzierung der Matrixzusammensetzung erlaubt. Die Matrixstruktur der statisch kultivierten TEMP ist gegenüber der azellularen SIS kaum verändert. Ein Netzwerk aus gelb angefärbten Kollagenstrukturen beherrscht das Bild. Neu gebildete Proteoglykane, die als blaue Areale imponieren, sind auf den Schnitten nur sehr vereinzelt zu finden.



**Abb. 4.11: SIS-Matrix, rebesiedelt mit 6×10^5 Zellen/cm² nach statischer Kultur im Bioreaktor, Parafinschnitte, a) und b) zwei Beispiele HE-Färbung, 200fache Vergrößerung
c) Beispiel Pentachrom-Färbung, 100fache Vergrößerung und d) 200fache Vergrößerung**

Immunhistologie

Der Nachweis von Kardiomyozyten auf der Matrix erfolgt anhand von Parafinschnitten und einer Troponin T-Immunhistologie. Leider zeigt diese Färbemethode eine stark ausgeprägte Hintergrundfärbung, was eine quantitative Aussage über das Ver-

hältnis von Kardiomyozyten zu Nicht-Kardiomyozyten auf der Matrix nicht sicher möglich macht. Die alternativen Färbemethoden am Cryoschnitt liefern eine noch schlechtere Qualität, vermutlich durch die Zerstörung von Zellstrukturen beim Aufarbeitungsprozess.

Auf den Schnitten durch die statischen Kulturen lassen sich deutlich bräunlich gefärbte Zellstrukturen nachweisen, als Nachweis von Kardiomyozyten in der Kultur.

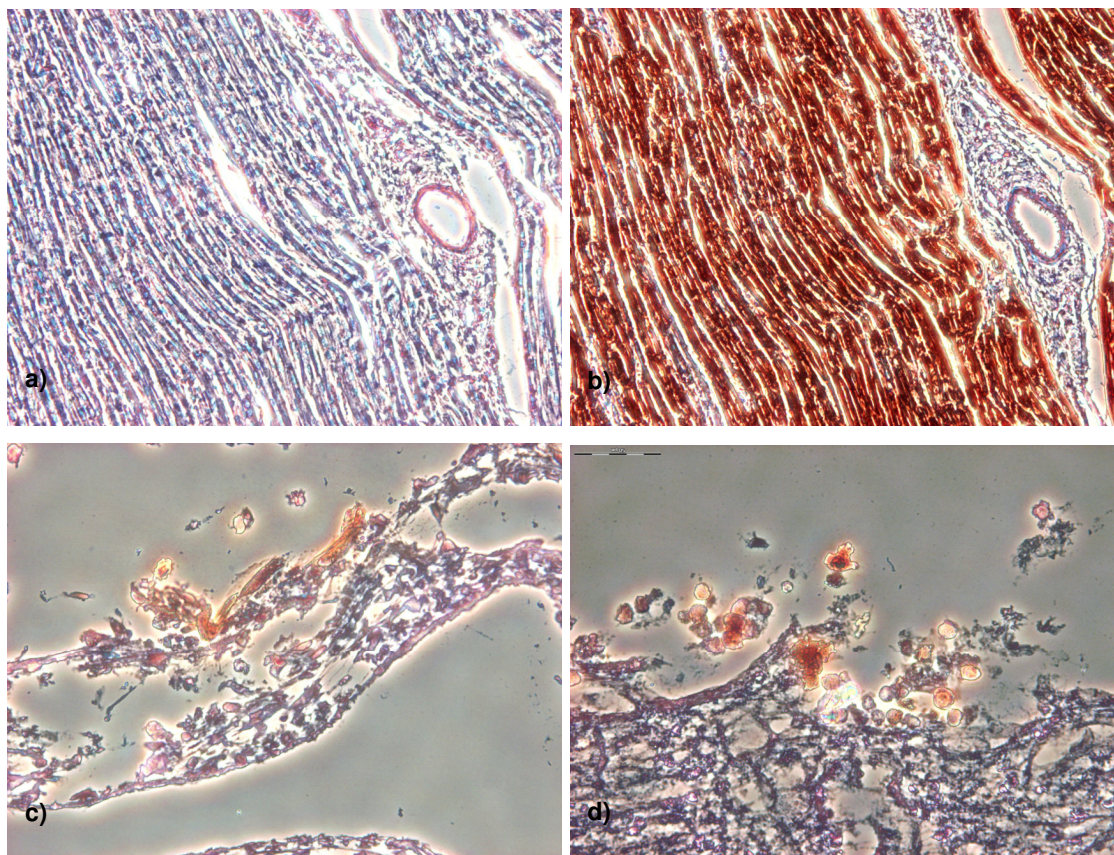


Abb. 4.12: Immunhistologische Troponin T/DAPI-Färbung, Parafinschnitte, a) Herzmuskel nativ als negativ-Kontrolle der Immunhistologie, b) Herzmuskel nativ als positiv-Kontrolle, jeweils 40fache Vergrößerung, c) und d) rebesiedelte, statisch kultivierte SIS-Matrix, zwei Beispiele mit c) 100facher und d) 200facher Vergrößerung

4.4.3 Rebesiedlung und Kultivierung der SIS unter physiologischem Stress

Eindeutiges Ergebnis dieser Arbeit ist, dass physiologischer Stress während der Züchtung von porcinen Herzmuskelzellen auf einer biologischen Matrix *in vitro* viele positive Effekte auf die Stoffwechselaktivität und Gewebemorphologie hat.

Im Einzelnen wird beobachtet, dass die permanente rhythmische Dehnung zu einer funktionellen Zellhypertrophie führt, zu verbessertem Umbau der Matrix durch die Zellen und zu gerichteten, netzartig untereinander verbundenen, Zellbündeln, wie sie für natives Herzmuskelgewebe charakteristisch sind.

Allerdings können auch in diesem Versuchsaufbau bei keiner der Kulturen (n=5) spontane Kontraktionen beobachtet werden.

4.4.3.1 Funktionelle Charakterisierung

Klinische Chemie

Wie schon für statische Kulturen beschrieben, werden als Parameter für die Stoffwechselaktivität der Zellen der Glucoseverbrauch und die Laktatproduktion im Zellkulturmedium gemessen. Diese Werte sind auch erstes Indiz dafür, ob der permanente mechanische Stress einen positiven Einfluss auf die Zellen während der Kultur hat.

Es ist zu beobachten, dass die Zellen über den gesamten Kulturzeitraum einen deutlich höheren Glukoseverbrauch, aber auch eine höhere Laktatproduktion im Vergleich zu der statischen Kontrollgruppe haben. Wie in Tabelle 4.2 und Abbildung 4.13 dargestellt, ist der Verbrauch an Glucose aus dem Zellkulturmedium fast doppelt so hoch, die Laktat-Kurve zeigt eine bis zu $\frac{1}{3}$ höhere Konzentrationen an. Die Werte der graphischen Darstellung beziehen sich auf die jeweiligen Messwerte in einer Mediumkontrolle im Bioreaktor, also ohne Matrix und Zellen.

Die Blutgasanalyse des Zellkulturmediums ergibt sehr ähnliche Werte wie die der statischen Kontrollgruppe. Die Sauerstoffsättigung des KM-Mediums liegt bei 99 %, der pH-Wert im Mittel bei pH 7,25. Sauerstoffpartialdruck und $p\text{CO}_2$ pendeln sich bei 170 Torr, bzw. 38 Torr ein.

	Glukosekonzentration				Laktatkonzentration			
	Tag 0	Tag 3	Tag 6	Tag 9	Tag 0	Tag 3	Tag 6	Tag 9
TEMP 1 statisch	5,4	5,1	5,1	4,8	1,36	1,60	1,93	2,23
TEMP 2 statisch	5,4	5,0	5,1	4,8	1,36	1,58	2,05	2,24
TEMP 3 statisch	5,3	4,9	4,9	4,6	1,36	1,65	2,10	2,47
TEMP 4 statisch	5,4	5,2	5,2		1,56	1,50	1,55	
TEMP 5 statisch	5,3	4,9	4,6		1,38	2,20	2,87	
TEMP 1 dynamisch	5,6	5,2	5,5	4,9	1,33	1,53	1,77	1,78
TEMP 2 dynamisch	5,1	5,1	5,2	5,2	1,48	1,70	1,71	1,71
TEMP 3 dynamisch	5,6	5,4	5,0	4,9	1,55	1,66	1,93	2,61
TEMP 4 dynamisch	5,3		4,6	4,6	1,38	2,34	2,93	2,61
TEMP 5 dynamisch	5,3	4,8	4,5		1,38	2,28	3,10	
Kontrolle	5,4	5,3	5,3	5,3	1,39	1,40	1,40	1,41

Tab. 4.2: Tabellarische Darstellung der gemessenen Serumkonzentrationen an Glukose und Laktat im Kulturmedium in mmol/l. Aufgelistet sind sowohl Messergebnisse der statischen Kulturen im Bioreaktor, als auch der dynamischen Kulturen

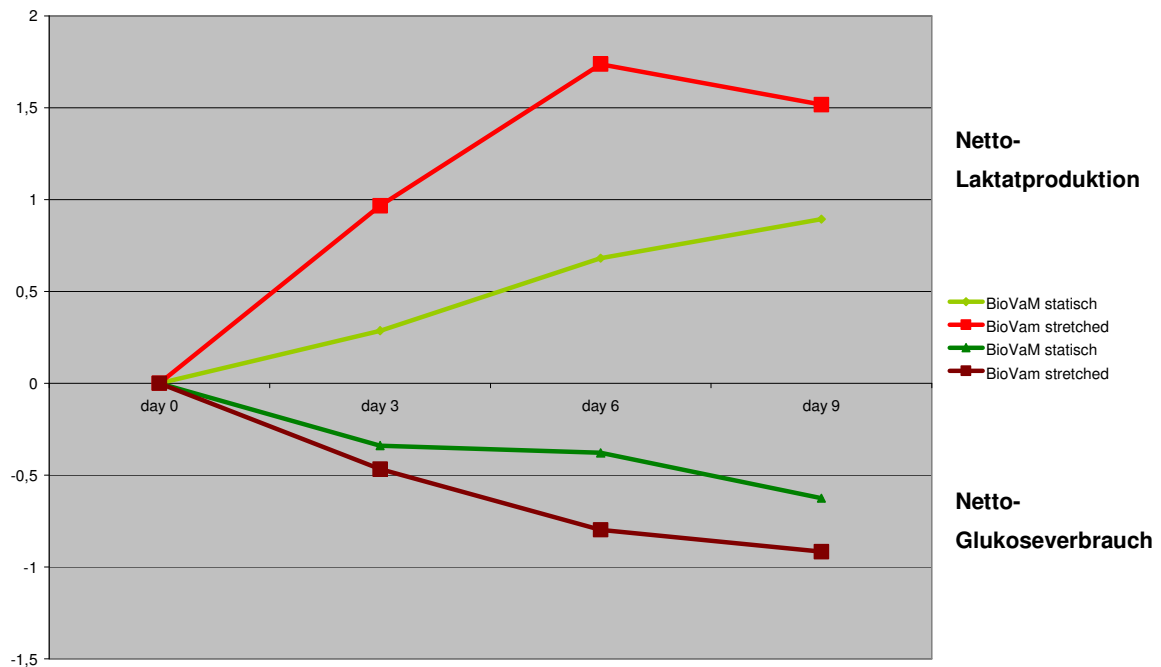


Abb. 4.13: Graphische Darstellung der Mittelwerte des Netto-Glukoseverbrauchs der statischen im Vergleich zu den dynamischen Kulturen, abgeleitet aus Tabelle 4.2 (Angabe in mmol/l)

Zusätzlich zum Nachweis vitaler Zellen auf der Matrix durch die Bestimmung der Stoffwechselprodukte, werden speziell bei den mechanisch gestressten Kulturen die Konzentrationen zytoplasmatischer Enzyme im Medium bestimmt. Es wird damit der

Frage nachgegangen, ob es durch den mechanischen Stress zu einer vermehrten Apoptose oder einem Abplatzen der Zellen kommt.

In allen überprüften Kulturen (n=3) können mit den etablierten Standardverfahren der Blutserumanalyse weder die herzmuskelspezifische CK-MB, noch die ubiquitär in Zellen vorkommende LDH nachgewiesen werden.

Elektrostimulation mit einem Einkammerschrittmacher

In den unter physiologischem Stress kultivierten Konstrukten können keine spontanen, makroskopisch sichtbaren Kontraktionen des Gewebes während der Kultur beobachtet werden.

Auch unter elektrischer Stimulation sind keine funktionellen Unterschiede zur statischen Kultur sichtbar. Weder makroskopisch noch mikroskopisch sichtbare Kontraktionen sind zu dokumentieren.

4.4.3.2 Histologische Charakterisierung

Live/Dead-Assay

Der Lebend/Tod-Test wird auch hier angewendet, um am nativen TEMP Aussagen zur Zellvitalität sowie zu Gewebs- und Zellmorphologie machen zu können.

Nach der 10tägigen Kulturzeit zeigen alle Konstrukte einen Anteil vitaler Zellen von 98 %, also gleich der statischen Kontrollgruppe.

Die Zellen bilden lange Ausläufer und scheinen sich auch hier mit anderen Zellen zu einem Netzwerk zu verbinden. Die Zellen orientieren sich vor allem in Richtung des mechanischen Stresses und ordnen sich so in Reihen an. Das gesamte Gewebe wirkt strukturiert und bekommt eine Orientierung, wie sie bei physiologischem Herzmuskelgewebe vorkommt.

Durch den permanenten Dehnungsstress kommt es außerdem zur Zellhypertrophie, die sich in der Veränderung der Zelllänge zeigt und messen lässt. Die durchschnittliche Zelllänge wurde mit 153 μm bestimmt (Range: 23–528 μm), was einem mehr als dreifachen Zellvolumen gegenüber der statischen Kultur entspricht.

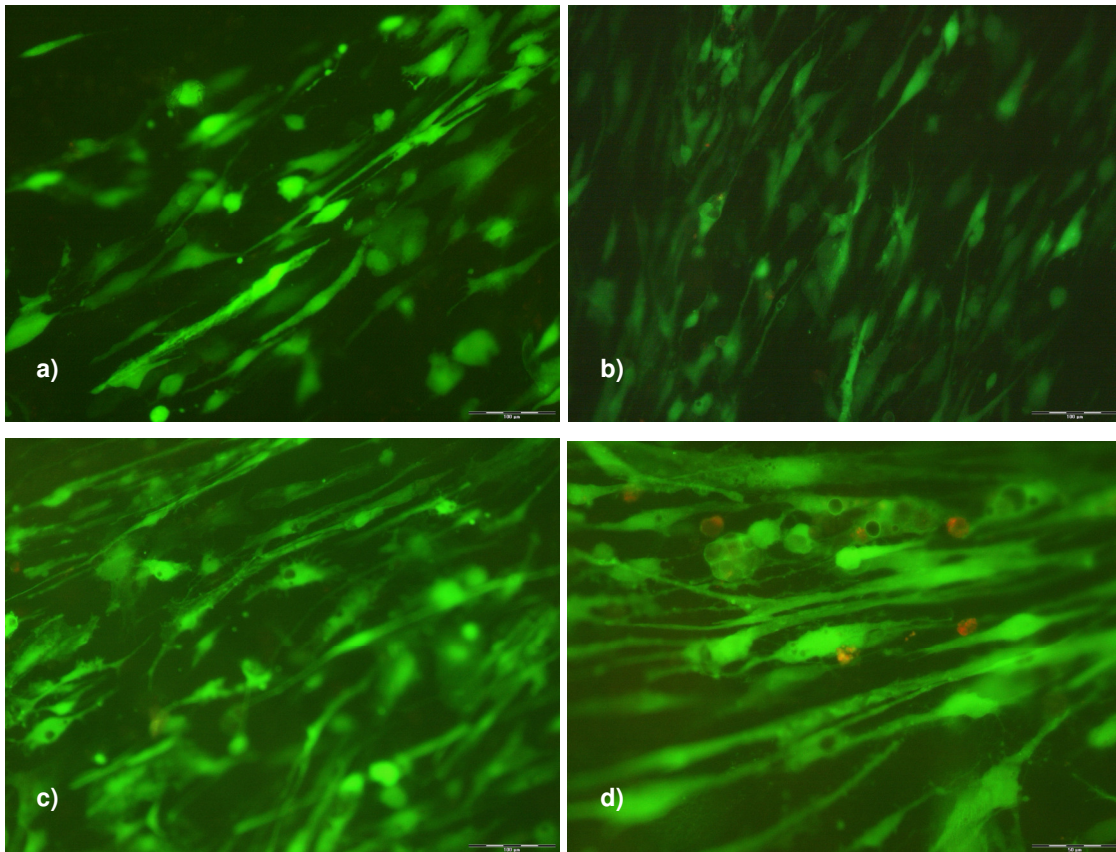


Abb. 4.14: SIS-Matrix, rebesiedelt mit 6×10^6 Zellen/cm² nach dynamischer Kultur im Bioreaktor, Live/Dead-Färbung, Fluoreszenzmikroskopie des gesamten Konstruktes, a), b) und c) 100fache Vergrößerung, d) 200fache Vergrößerung

HE- und Pentachrom-Färbungen

Die HE-Färbung erweist sich auch für die Untersuchung der Gewebemorphologie am mechanisch kultivierten Gewebe nicht als Mittel der Wahl. Die angesprochene Hintergrundfärbung der Kollagenfibrillen fällt noch intensiver aus, als in der statischen Kultur. Grund hierfür mag eine Veränderung der Polarität der Fibrillen sein sowie die daraus resultierenden ionischen Wechselwirkungen der Farbstoffe. Die wesentlichen Unterschiede zur statischen Kultur bilden sich in der Pentachrom-Färbung deutlich besser ab.

Hier zeigt sich zunächst die Masse der Zellen an der Matrixoberfläche, ähnlich der statischen Kultur. Im Gegensatz zu der Kontrollgruppe formen die Zellen aber keinen Monolayer, sondern bilden stellenweise ein dichtes Netzwerk aus mehreren Zelllagen.

Die differenzierte Anfärbung der verschiedenen Bindegewebsstrukturen stellt in diesen Konstrukten blau angefärbte Areale rund um die Zellen und in der Matrix dar. Im

Vergleich zu der nativen azellulären Matrix werden also zahlreiche Proteoglykane als Vorstufe von neuen Bindegewebsstrukturen neu synthetisiert, wobei vor allem der Anteil elastischer Fasern hoch ist.

Die Ergebnisse aus der klinisch chemischen Untersuchung, die zeigen, dass die gestressten Zellen Stoffwechsel-aktiver sind, werden hier durch den Nachweis des wesentlich höheren Umbaus der extrazellulären Matrix untermauert. Bei vielen der angeschnittenen Zellen sind deutlich Zellausläufer entlang der Kollagenfasern zu erkennen, wie es auch schon in dem Live/Dead-Assay beobachtet wird.

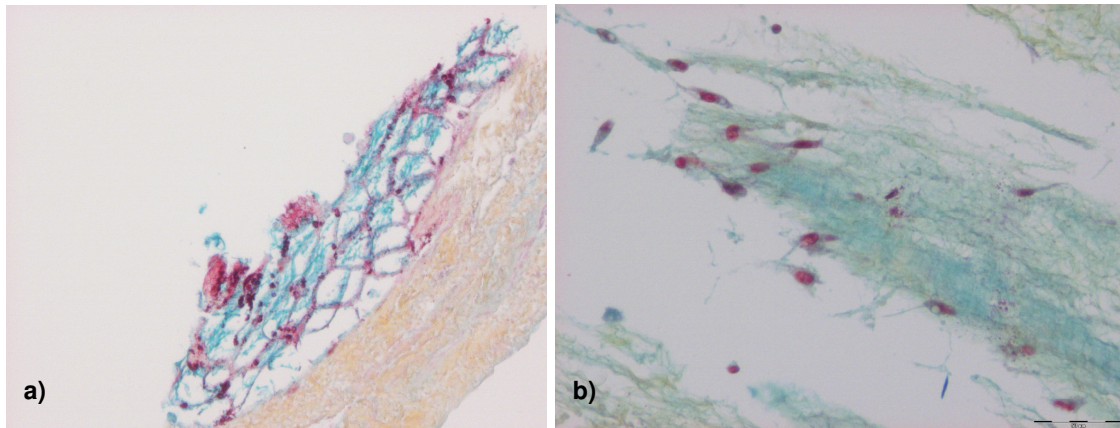


Abb. 4.15: SIS-Matrix, rebesiedelt mit 6×10^6 Zellen/cm² nach dynamischer Kultur im Bioreaktor, Pentachrom-Färbung am Parafinschnitt, Durchlichtmikroskopie, a) 100fache Vergrößerung, b) 200fache Vergrößerung

Immunhistologie

Wie schon für die statische Kultur angesprochen, stellt sich eine Immunhistologie mit dem monoklonalen Antikörper MF-20, bzw. Troponin T als sehr schwierig dar. Die Hintergrundfärbung auf Schnitten durch die gestressten Konstrukte ist noch stärker ausgeprägt, was vermutlich durch elektrostatische Wechselwirkungen bedingt ist.

Eine Aussage über das Verhältnis von Kardiomyozyten zu Nicht-Kardiomyozyten auf der Matrix kann mit dieser Nachweismethode nicht getroffen werden, repräsentative Bilder lassen sich nicht aufführen.

4.4.4 Besiedlung des DRV für den Bioreaktor

Die Besiedlung des DRV unterscheidet sich in ihrer Technik deutlich von der der SIS-Matrix. Zellen auf die Oberfläche zu geben erscheint angesichts der Dicke des Konstruktes, der geringen Fähigkeit der Kardiomyozyten in Gewebe einzuwandern und der Auskleidung der Oberfläche mit Bindegewebe des Endokards wenig sinnvoll. Die Zellen werden demnach an verschiedenen Stellen des DRV injiziert und in L/D-Test und Histologie werden Anwachsverhalten und Verteilung der Zellen im Gewebe untersucht.

Als Ergebnis für die Rebesiedlung der DRV mit neonatalen Kardiomyozyten lässt sich zu diesem Zeitpunkt formulieren, dass es im Prinzip möglich ist, diese Zellen nach dem Azellularisierungsprozess dort anzusiedeln und zu kultivieren. Aufgrund der dichten Matrixstruktur und des großen Volumens des Gewebes ist es allerdings nicht möglich, eine befriedigende Zelldichte über das gesamte Konstrukt zu erhalten. Die mit einer Spritze injizierten Zellen verbleiben zum Großteil in den Stichkanälen und nur eine geringe Anzahl der Zellen wandert in die Matrix ein. Umbauvorgänge des Bindegewebes durch die Zellen können so gut wie nicht dokumentiert werden.

4.4.4.1 Funktionelle Charakterisierung

Klinische Chemie

Auch in diesem Konstrukt wird die Stoffwechselaktivität der Zellen über den Umsatz von Glukose und die Produktion von Laktat bestimmt. Diese Informationen sind besonders deshalb interessant, da sich in den Stichkanälen zur Besiedlung viele Zellen befinden, die nicht auf der Matrixstruktur adhärend sind und wir keine Methode haben um nachzuweisen, ob diese Zellen vital sind. Dennoch ist ein Vergleich der Werte mit den SIS-basierten Konstrukten nicht sinnvoll, weil eine ungefähre Zellzahl in dem DRV auf Grund der ungleichmäßigen Verteilung nicht zu bestimmen ist. Ein theoretischer Wert für den Stoffwechsel einzelner Zellen lässt sich somit nicht er rechnen.

In den mit 60 Millionen Zellen besiedelten Konstrukten findet sich ein Glukoseverbrauch von 0,3 mmol/l. In der 10tägigen Zellkultur werden 0,25 mmol/l Laktat produziert. Da diese Werte für 60 Millionen besiedelte Zellen sehr gering ausfallen, ist

anzunehmen, dass nur noch wenige Zellen stoffwechselaktiv sind. Auf der anderen Seite wird jedoch damit nachgewiesen, dass sich in dem Konstrukt lebende Zellen befinden müssen.

Elektrostimulation

Analog zu den Konstrukten auf der SIS-Matrix werden auch bei den in den DRV gesiedelten Kardiomyozyten keine Kontraktionen beobachtet. Da eine elektrische Integrität über das gesamte Gewebe auf Grund einer zu geringen Zelldichte nicht zu erwarten ist, wird hier auf die Elektrostimulation der Konstrukte mit einem Einkammerschrittmacher verzichtet.

4.4.4.2 Histologische Charakterisierung

Live/Dead-Assay

Nach der 10tägigen Kultur im Bioreaktor wird die Zellvitalität in dem Konstrukt mittels Live/Dead-Assay erforscht. Auf zahlreichen Querschnitten durch die Matrix können auch in der Tiefe des Gewebes vereinzelt vitale Zellen ausgemacht werden. Insgesamt ist die Zelldichte sehr gering, so dass eine signifikante statistische Auswertung mit Verhältnis von lebenden zu toten Zellen nicht möglich ist. Über 75 % der mikroskopierten Zellen stellten sich als vital und stoffwechselaktiv dar.

Trotz der jeweils 10 Stufen durch die Proben wird bei keinem Objektträger ein Stichkanal angeschnitten. In den für die Histologie in Formalin fixierten Gewebeproben werden diese erst im Nachhinein gefunden. Eine Aussage über die Zellvitalität in diesen Arealen ist also nicht möglich.

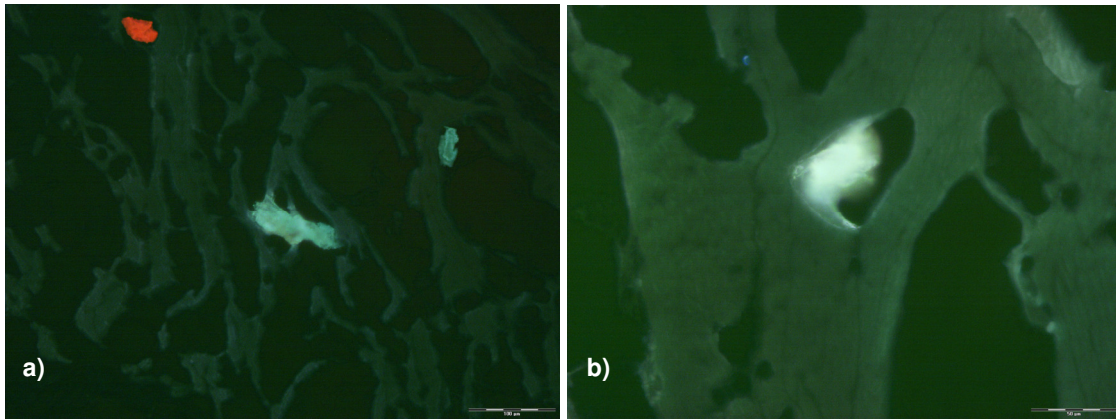


Abb. 4.16: DRV-Matrix, rebesiedelt mit 6×10^6 Zellen/cm² nach Kultivierung im Bioreaktor, Live/Dead-Färbung, Gefrierschnitt, a) 200fache, b) 400fache Vergrößerung

HE- und Pentachrom-Färbungen

Die Zellverteilung im Gewebe wird zunächst mit der HE-Färbung untersucht. Aufgrund der insgesamt sehr geringen Zelldichte im rebesiedelten DRV werden mindestens 15 Stufen durch die Paraffinblöcke geschnitten. Auf einigen Schnitten kann keine einzige Zelle ausgemacht werden, auf anderen findet sich der Injektionskanal von der Besiedlung mit freien und adhärennten Zellen wieder. Die Matrixstruktur stellt sich als ein dichtes Netzwerk dicker Bindegewebsstrukturen mit engmaschigen Poren dar.

In der Pentachrom-Färbung werden das Bindegewebe und die Matrixzusammensetzung nach der Rebesiedlung genauer charakterisiert. Dabei zeigt sich, dass wie in der statischen Kultur auf der SIS die Matrix gegenüber der zellfreien Ausgangszusammensetzung kaum verändert ist. Neu synthetisierte Proteoglykane sind nicht zu mikroskopieren.

Es können vereinzelte, in die Matrix eingewanderte Zellen nachgewiesen werden, die kurze Ausläufer entlang der kollagenen Fibrillen bilden. Außerdem lassen sich die nach der Azellularisierung erhaltenen Gefäßstrukturen in den Präparaten wiederfinden.

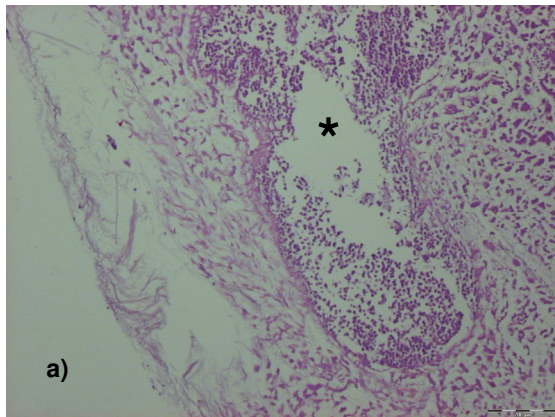
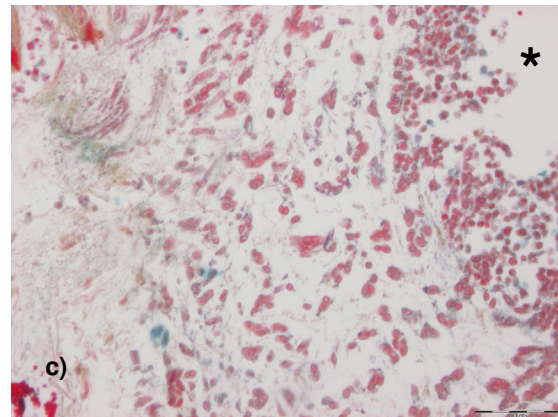
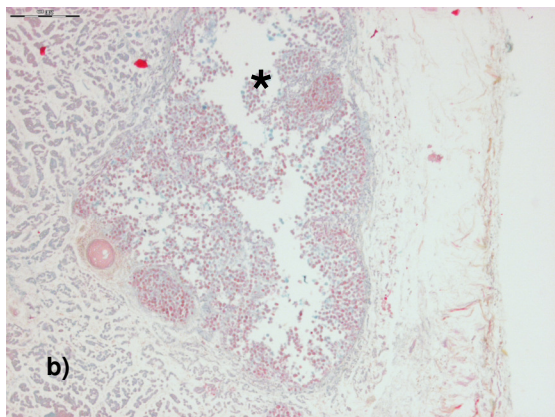


Abb. 4.17: DRV-Matrix, rebesiedelt mit 6×10^6 Zellen/cm² nach Kultivierung im Bioreaktor, Paraffinschnitte, a) HE-Färbung, 40fache Vergrößerung, b) Pentachrom-Färbung, 40fache Vergrößerung und c) in 200facher Vergrößerung. Es sind hier jeweils die Injektionskanäle der Zellbesiedlung angeschnitten (*)



5 Diskussion

Das Tissue Engineering (TE) von Myokardgewebe erscheint als viel versprechender Ansatz für eine kausale Therapie der kardialen Insuffizienzen. Allerdings bestehen nach dem derzeitigen Stand der Forschung ungelöste Problemstellungen und Limitierungen, die einen klinischen Einsatz noch nicht möglich machen. Vor allem fehlt es den entwickelten Konstrukten an dreidimensionaler Gewebsorganisation, einer suffizienten Nährstoffversorgung und demzufolge an der nötigen Funktionalität für den klinischen Einsatz. Hier sind insbesondere weitere Innovationen im Bereich der Trägermatrices und der Kulturmethode notwendig, um komplexere und funktionelle Neogewebe züchten zu können.

In diesem Zusammenhang beschäftigt sich die vorliegende Dissertation mit der Verwendung von azellularisierten biologischen Trägermaterialien als neuen Ansatz für das Myokardiale TE. Die bereits in anderen Bereichen des Tissue Engineerings verwendete Small Intestine Submucosa (SIS) sollte hier etabliert werden. Zudem sollte eine neu entwickelte Matrix, der Decellularised Right Ventricle (DRV), als Trägermaterial für Kardiomyozyten charakterisiert werden.

Ein weiterer Schwerpunkt lag in der Entwicklung eines Mechano-Bioreaktorsystems zur Erforschung unterschiedlicher, dynamischer Kulturbedingungen für das Myokardiale TE. Speziell der Effekt von physiologischem mechanischem Stress während der Kulturperiode sollte charakterisiert werden.

Als ein dritter Aspekt wurde ein porcines Großtiermodell für den Einsatz im Myokardialen TE etabliert. Die verschiedenen Konstrukte, bzw. die statischen wie dynamischen Ansätze wurden histologisch, immunhistochemisch, biochemisch und funktionell charakterisiert.

5.1 Myokardielles Tissue Engineering

Für die Therapie chronischer Herz-Kreislaufkrankungen stehen, wie eingangs aufgeführt, neben den eher symptomorientierten Pharmakotherapien eine Vielzahl innovativer Therapieansätze zur Verfügung. Aufgrund hoher Komplikationsrisiken bei

mechanischen oder xenogenen Verfahren stellen die Regenerativen Therapien als kausales Behandlungskonzept den viel versprechendsten Ansatz für einen dauerhaften Therapieerfolg dar.

In den letzten 10 Jahren sind dabei große Fortschritte in den beiden Forschungszweigen der Regenerativen Therapien erzielt worden. Die Zelltransplantation hat in der Behandlung eines akuten Myokardinfarktes bereits ihren Einzug in die klinische Anwendung geschafft [18]. Zahlreiche positive Effekte im Hinblick auf Regeneration und Funktionsverbesserung des infarzierten Areals sind publiziert. Dennoch lassen sich Kritikpunkte und Limitierungen dieser Zelltherapie bis heute nicht ausräumen. Es lässt sich nach dem Einbringen der Zellen kein Einfluss mehr auf ihren Verbleib oder ihre Integrationen in das Zielgewebe nehmen [51]. Vor allem die Permeabilität der Gefäßwände stellt einen kritischen Parameter für die Zellmigration in das Ischämiegebiet dar. Somit erscheinen besonders im Bereich der chronischen Herzkreislauferkrankungen die Methoden und Ansätze des Tissue Engineerings Erfolg versprechender. Hier können gezielt insuffiziente Areale durch differenzierte Gewebe ersetzt oder durch endokardiale Plastiken unterstützt werden. In der Vergangenheit sind unterschiedliche Konzepte für die Generierung von myokardiellen Neogeweben entwickelt und zahlreiche Meilensteine und Erfolge publiziert worden.

5.1.1 Strategien und Problemstellungen im myokardiellen TE

Das Ziel des Tissue Engineerings ist es, eine Gewebereinheit zu generieren, die die Funktion eines Organs wiederherstellt, bzw. erhält oder verbessert [20, 52]. Entsprechend diesem Anforderungsprofil ist ein komplexes dreidimensionales Konstrukt erforderlich.

Wie eingangs vorgestellt werden zum Teil sehr unterschiedliche Konzepte zum Tissue Engineering von Myokard verfolgt: der schichtweise Aufbau einzelner Kardiomyozyten-Monolayer [33, 53], die Verwendung flüssiger Matrices [39, 54, 36, 35] oder auch definierter vorgeformter Trägermaterialien [43, 44, 28, 55]. Nach den Daten dieser Forschungsgruppen lassen sich im Ergebnis mit allen dieser unterschiedlichen Methoden myokardiale Neogewebe herstellen, die wesentliche funktionelle und morphologische Eigenschaften vom Herzmuskel aufweisen.

Eines der ersten und sehr gut charakterisierten Modelle stellen die EHT der Arbeitsgruppe um Eschenhagen und Zimmermann dar [39, 54, 36]. Durch die Vermischung

von Zellen und flüssiger Matrix weisen die Konstrukte eine hohe und weitgehend gleichmäßige Zellverteilung auf. Histologisch zeigen diese Gewebe durch eine dynamische Kultivierung eine physiologische Morphologie. Es finden sich spindelförmige, ausgerichtete Muskelzellen, eine spontane Kontraktilität mit messbarer Kraftentwicklung wurde nachgewiesen. Allerdings beträgt der Kardiomyozytenanteil gemessen am Gewebsvolumen nur rund 30 %, deutlich defizitär also gegenüber einem physiologischen Anteil von 75 % im nativen Myokard.

Eine deutlich höhere und annähernd physiologische Zelldichte weisen die Neotissue der Arbeitsgruppe um Shimizu und Kollegen auf [33, 53, 56]. Durch ihren schichtweisen Aufbau der dreidimensionalen Gewebe aus Kardiomyozyten-Monolayern erhalten sie ein dicht gepacktes und untereinander vernetztes Gewebe. Gap Junctions zwischen den Zellen lassen sich immunhistochemisch nachweisen. Eine Kontraktilität mit messbarer Kraftentwicklung wird berichtet, wie auch die elektrische Integrität der Gewebe *in vivo*.

Dem gegenüber erscheint die Gewebemorphologie bei den TE-Konstrukten unter Verwendung vorgeformter Matrixstrukturen defizitär. Zwar ist es der Arbeitsgruppe um Kofidis und Kollegen möglich, einen dichten und kontrahierenden Zellverband zu züchten, die Zellverteilung in den Konstrukten ist jedoch weitgehend auf die Oberflächen begrenzt [43, 42]. Auch andere solcher Modelle wie die Tissue Engineered Grafts (TEG) von Li *et al.* weisen einen solchen Zellgradienten auf [44]. Die messbare maximale Kraftentwicklung fällt verglichen mit den anderen genannten Modellen entsprechend geringer aus [43]. Eine signifikante Verbesserung der systolischen linksventrikulären Funktion lässt sich im Implantationsversuch bei TEG dennoch nachweisen [57].

Trotz dieser genannten Eigenschaften und der großen Fortschritte im Tissue Engineering der letzten Jahre, weisen die einzelnen Konstrukte keine ausreichende dreidimensionale Gewebsorganisation und Funktionalität für den klinischen Einsatz auf. Die etablierten Neogewebe aus den genannten Kleintiermodellen sind deutlich in ihrer Größe beschränkt und in der humanmedizinischen Anwendung sind noch weit größere Gewebseinheiten für einen funktionellen Ersatz von Herzmuskel notwendig. Die erzielten Ergebnisse mit der Generierung kontraktiler Konstrukte aus Rattenkardiomyozyten lassen sich darüber hinaus nicht direkt in ein Humanmodell übertragen. Erste Versuchsreihen mit Großtierzellen und humanen Kardiomyozyten haben ge-

zeigt, dass diese für ihren Funktionserhalt weit aufwändigere Zellkulturbedingungen benötigen und in einfachen Modellen keine spontane Kontraktilität aufweisen.

Die wichtigste Schlüsselstelle für eine Verbesserung der dreidimensionalen Organisation, die Züchtung größerer Konstrukte und den Funktionserhalt der Kardiomyozyten liegt hier in der Nährstoffversorgung der Zellen in den Neogeweben. Eine Vaskularisierung bereits *in vitro* ist für die erfolgreiche Kultivierung großer Zellverbände und den erfolgreichen Transfer in den Organismus erforderlich. In den etablierten Modellen ist diese Problematik noch nicht überzeugend gelöst. Entsprechend verfolgen wir in unserem TE-Konzept die Strategie, durch Etablierung innovativer biologischer Matrices die Grundlage für eine spätere *in vitro* Vaskularisierung zu schaffen.

Alle der genannten myokardiellen Neogewebe hängen in der Nährstoffversorgung der Zellen von der Diffusion durch die Konstrukte ab. Nach einer Arbeit von Walles *et al.* beträgt jedoch die maximale suffiziente Diffusionsstrecke in Tissue Engineerten Geweben gerade 800 μm [58]. Für Gewebe mit höherer – physiologischer – Zelldichte ist diese nach dem Fickschen-Diffusionsgesetz sicher weitaus geringer anzusetzen. In der Tumorforschung finden sich beispielsweise Diffusionsgrenzen von 200–300 μm für Gewebe ohne eigene Kapillarisation [59]. Nicht zu vergessen sei hierbei auch, dass die Zellischämie genau für die Krankheiten verantwortlich ist, die durch diese Therapiekonzepte angegangen werden sollen, und dass Kardiomyozyten eine vergleichsweise geringe Hypoxietoleranz aufweisen. Entsprechend sind die vorgestellten Konstrukte deutlich in ihrer Größe beschränkt. Die Arbeitsgruppe Shimizu berichtet von maximal sechs Zelllagen, die über Diffusion noch suffizient versorgt werden [60]. Lenz, Kofidis *et al.* beschreibt einen deutlichen Gradienten in der Zellverteilung und Vitalität entsprechend dem Diffusionsgradienten [40]. Dies wird auch von anderen Arbeitsgruppen unterstrichen und es sind darüber hinaus genaue Diffusionsverteilungen durch artifizielle Gewebe bestimmt worden [25, 26]

Nach dem derzeitigen Stand der Forschung ist die Implementierung eines Kapillarnetzes oder eine Vaskulogenese *in vitro* nicht möglich [27, 61]. Die komplexen Mechanismen der Neoangiogenese sind weitgehend unerforscht – in diesem Verständnis liegt der Schlüssel für eine erfolgreiche Umsetzung *in vitro*. Auch wenn beschrieben ist, dass transplantierte artifizielle Herzmuskelkonstrukte *in vivo* rasch

eine Kapillarisation durch einsprossende Gefäße aufweisen [60, 62, 63, 64], kann dies nicht als befriedigende Lösung angesehen werden. Es kommt jeweils zu einem Größenverlust der implantierten Gewebe und auch die zeitgerechte suffiziente Vaskularisierung im Hypoxietoleranzintervall erscheint fraglich [65].

Eine suffiziente Vaskularisierung bereits *in vitro* ist demzufolge notwendig, um die geforderte dreidimensionale Gewebsorganisation und Funktionalität der Gewebe zu erreichen. Die bisherigen Strategien zur Neoangiogenese in Tissue Engineerten Konstrukten sind vielfältig. Angiogenetische Wachstumsfaktoren als Supplemente zu den Matrixproteinen oder die Co-Kultur endothelialer (Vorläufer-)Zellen und Stammzellen finden hier Anwendung [27]. Dennoch ist kein überzeugendes Ergebnis einer adäquaten Angio- oder Vaskulogenese publiziert. Durch Zusatz von Endothelzellen zu den Kardiomyozytenkulturen beschreibt die Gruppe um Eschenhagen zwar die Ausbildung von rudimentären Kapillarstrukturen, ein Gefäßnetzwerk ist jedoch nicht erkennbar [39]. Die Arbeitsgruppe um Kofidis verfolgt den Ansatz, eine Angiogenese ausgehend von einem nativen Zentralgefäß zu induzieren [40]. Entsprechende Kapillaraussprossungen werden ebenfalls beobachtet, sind jedoch nicht suffizient.

Es besteht also die Notwendigkeit, neue Modelle und Ansätze für die Generierung eines Gefäßnetzwerkes in einem Tissue Engineerten Gewebe zu entwickeln. Idealerweise verfügt die verwendete Trägermatrix bereits über ein eigenes Gefäß- und Kapillarnetzwerk.

Genau dieser Ansatz lässt sich mit den von uns verwendeten azellularisierten biologischen Matrices verfolgen. Bei der Matrixgewinnung und Azellularisierung bleibt die native Gefäßstruktur erhalten. Durch Reendothelialisierung dieser physiologischen Strukturen können autologe Gefäßbäume im Gewebe aufgebaut werden und davon ausgehend eine weitere Angiogenese induziert werden.

5.2 Unser Konstrukt eines Tissue Engineered Myocardial Patch

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Verwendung von innovativen azellularisierten biologischen Trägermaterialien als neuen Ansatz für das Myokardiale TE. Zwei verschiedene Matrices mit unterschiedlicher Struktur und Zusammensetzung sollten hierbei untersucht und als standardisierte Modelle für die weitere Forschung etabliert werden. Trotz beschriebener Defizite vorgeformter Matrixstrukturen im TE bietet die-

ses Modell durch seine erhaltene Gefäßstruktur unserer Ansicht nach das Erfolg versprechendste Konzept zur Verwirklichung einer *in vitro* Vaskularisierung. Die Problemstellung der mangelnden Gewebsorganisation wurde durch die Entwicklung eines Mechano-bioreaktorsystems entsprechend adressiert.

5.2.1 Entwicklung und Evaluation eines Mechano-Bioreaktors MEAT-3D

Nach den klassischen Prinzipien des Tissue Engineerings erfordert die Herstellung eines dreidimensionalen Gewebes eine *in vitro* Kulturphase in einem Bioreaktor. Aus den einzelnen Komponenten wie Zellen und Matrixstrukturen müssen komplexe Gewebestrukturen werden. Dafür ist es zum einen entscheidend, die physiologische Umgebung der Zellen zu imitieren, um Zellüberleben und Wachstum zu garantieren. Zum anderen gilt es, über verschiedene Stimuli die Gewebsorganisation zu fördern. Die Ergebnisse im TE in den letzten Jahren haben deutlich gemacht, dass es nicht möglich ist, funktionelles Gewebe in einem statischen Milieu in einer Zellkulturschale zu erzeugen [32]. Demgegenüber konnte gezeigt werden, dass physiologische Kulturbedingungen einen positiven Einfluss auf die Differenzierung von Zellen und die dreidimensionale Organisation zahlreicher Gewebe *in vitro* haben [66, 67].

Aus diesen Erkenntnissen lässt sich die Notwendigkeit ableiten, Bioreaktorsysteme zu entwickeln, die es erlauben, die spezifische Umgebung der individuellen Gewebe nachzuahmen, um im Rückschluss einen hohen Grad an zellulärer Differenzierung und Gewebsorganisation zu erhalten.

In der aktuellen Literatur sind zahllose Bioreaktordesigns veröffentlicht worden [31, 68]. Dabei handelt es sich um gewebsspezifische, vor allem aber um konstruktsspezifische Aufbauten. Entsprechend war für unser Konstrukt eines Tissue Engineered Myocardial Patch (TEMP) auf Grundlage von dezellularisierten biologischen Trägermatrices, die Neuentwicklung eines Bioreaktorsystems notwendig. Aufbauend auf etablierten statischen und dynamischen Modellen aus unserem Forschungslabor [47, 69, 49] wurde in Zusammenarbeit mit den Forschungswerkstätten der MHH das Mechano-Bioreaktorsystem MEAT-3D entwickelt und produziert.

In aktuellen Veröffentlichungen sind Grundsätze zum Bioreaktordesign für eine Zellkultur wie folgt formuliert [70]: es muss (1.) die Sterilität dieser Systeme gewährleistet sein, (2.) ein Mediumzirkulationssystem vorhanden sein, das die Nährstoffversorgung

der Kultur und den Gasaustausch mit der Umgebung gewährleistet, und (3.) die Temperatur während der Kulturzeit bei 37 °C garantiert sein. In Bioreaktoren wie dem MEAT-3D, unter Verwendung geschlossener Systeme in einem Wärmeschrank und Perfusionssystemen mit einem Mediumreservoir, sind diese Bedingungen weitgehend verwirklicht und garantiert. Es kam bei keinem der durchgeführten Versuche zu einer Verkeimung, die Temperatur wurde über den Wärmeschrank konstant reguliert. Eine Zellvitalität von annähernd 99 % nach 12-tägiger Kultur unterstreicht die grundlegend physiologischen Bedingungen. In Hinblick auf eine suffiziente Nährstoffversorgung der Zellen ergibt sich allerdings ein obligater Verbesserungsbedarf des Bioreaktorsystems. So wurde während der Kultur ein Anstieg von Laktat im Zellkulturmedium und ein stetiger Abfall des pH-Wertes beobachtet.

Allerdings stand bei der Entwicklung des Bioreaktorsystems die Verbesserung der Zellkulturbedingungen durch Nachahmung exogener physiologischer Stimuli im Fokus dieser Forschungsarbeit. Die Ergebnisse statischer Kulturen auf Grundlage vorgeformter Matrixstrukturen wie beispielsweise den AMT weisen eine unbefriedigende Zellverteilung und dreidimensionale Organisation auf. Es bildet sich in der Hauptsache ein Zellmonolayer an der Matrixoberfläche. Nur wenige Zellen migrieren in das Innere des Gewebes. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, die Zellen zur Ausbildung physiologischer Gewebsorganisation in der Kultur zu stimulieren. Unter Berücksichtigung der physiologischen Gegebenheiten des schlagenden Herzens erscheint es sinnvoll, die Konstrukte einem permanenten physiologischen Dehnungsstress auszusetzen.

Bereits mehrere Arbeiten haben in diesem Zusammenhang positive Effekte unterschiedlicher Stimuli auf die Zell- und Gewebsmorphologie beschrieben. Bei der Verwendung von flüssigen Matrixproteinen ergeben sich durch Applikation von chronischem Stress eine Zellhypertrophie und eine verbesserte Funktionalität der Gewebe. Fink *et al.* berichten über die Ausbildung von charakteristischen Muskelzellfasern [66]. Bei der Verwendung vorgeformter Matrices ändert sich die Morphologie der Gewebe durch mechanischen Stress zu einer besseren Zellverteilung in den Konstrukten. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Akhyari und Li zeigen eine induzierte Zellproliferation und die verbesserte Zellmigration in die Tiefe [67].

Unser neu entwickelter Mechanobioreaktor MEAT-3D ermöglicht die Applikation von physiologischem mechanischem Stress auf unsere TEMP-Kulturen. Dabei können diese Ansätze unter identischen Rahmenbedingungen zu den statischen Konstrukten

kultiviert werden. Mittels der Drucksteuerung wird ein zyklischer Dehnungsstress ausgeübt, der vergleichbar mit dem eines schlagenden Herzens ist. Die Evaluation der dynamisch kultivierten Konstrukte im Vergleich zu den statischen lässt eine wesentlich verbesserte Gewebemorphologie erkennen. Es entstehen mehrlagige Gewebe mit spindelförmig vernetzter Zellmorphologie. Auch wurden zahlreiche weitere positive Effekte, wie ein erhöhter Matrixumbau durch die Zellen und eine physiologische Zellgröße und Ausrichtung beobachtet.

5.2.2 Etablierung biologischer Matrices für das myokardiale TE

5.2.2.1 *Small Intestine Submucosa*

In unserem ersten Konstrukt eines Tissue Engineered Myocardial Patch (TEMP) wurde die Rebesiedlung der azellularen, biologischen Small Intestine Submucosa (SIS) mit neonatalen Kardiomyozyten etabliert.

Diese Matrix wird bereits in anderen Anwendungen des Tissue Engineerings verwendet und ist entsprechend gut charakterisiert [47, 71, 72, 48]. Im Vergleich zu synthetisch hergestellten Trägermaterialien zeichnet sie sich durch drei wesentliche Eigenschaften aus [73, 74].

- I. Die Matrix besteht aus allen Bestandteilen eines physiologischen Bindegewebes. Ohne die genauen Mechanismen oder Zusammensetzungen zu kennen, weisen die enthaltenen Wachstumsfaktoren, Zytokine, Strukturproteine, Glykoproteine und Proteoglykane positive Eigenschaften auf das Zellwachstum und die Migration auf [24]. Neben den Strukturproteinen ist diese Gegenwart von Mediatoren einzigartig im TE und nur zu einem Bruchteil derzeit in synthetischen Matrices zu rekonstruieren. Entsprechend werden in vielen der bisherigen Studien positive intrinsische Eigenschaften der biologischen Matrices gegenüber synthetischen herausgestellt [71, 75, 22].
- II. Die Strukturproteine weisen eine physiologische dreidimensionale Struktur auf. Bei der SIS handelt es sich um Bindegewebe, in dem zuvor gerichtete Muskelfasern der Darmmuskulatur angesiedelt waren. Diese Mikrostruktur bleibt nach der Dezellularisierung erhalten [69, 71]. Bei der Rebesiedlung der Bindegewebe dienen diese Strukturen als Orientierung für die Zellen, eine physiologische Organisation wird gefördert [24, 76]. Wie unten weiter aufgeführt, lassen sich bei

den synthetisch hergestellten Modellen mit zufälliger Binnenstruktur diese Effekte nicht oder nur sehr begrenzt erfassen.

- III. Azelluläre biologische Matrices zeichnen sich durch eine sehr hohe Primärstabilität und ein konstantes Remodellingverhalten aus [72, 77]. Nach dem Konzept des Tissue Engineerings dienen die vorgeformten Startermatrices als reine Surrogatstruktur. Es ist gewollt, dass ein gradueller Umbau des Bindegewebes durch die Zellen stattfindet. In dieser Hinsicht haben sich die dezellularisierten Materialien bewährt. Umbauvorgänge laufen auch nach der Implantation *in vivo* sehr konstant ab, es treten keine Fremdkörperreaktionen auf und Immunreaktionen sind selten [75]. Für die besonderen mechanischen Anforderungen am schlagenden Herzen weisen sie eine entsprechend hohe Stabilität auf.

Noch entscheidender als die genannten drei Eigenschaften ist, wie bereits angesprochen die Perspektive einer erfolgreichen *in vitro* Vaskularisation solcher dezellularisierter Matrices. Nach dem allgemeinen Azellularisierungsprozess ist die bindegewebige Kapillarstruktur im Inneren der Matrix erhalten. Mittels immunhistochemischer Färbungen lassen sich die intakten Basallamina der Gefäße sicher nachweisen [69, 73]. Darüber hinaus wurde in unseren Forschungslaboratorien in den letzten Jahren eine neuartige Operations- und Dezellularisierungstechnik entwickelt, die zusätzlich den afferenten und efferenten Gefäßpedikel der Mesenterialgefäße erhält [69, 73, 74]. Die hier beschriebene *Biological Vascularized Matrix* ist eine Weiterentwicklung der SIS Matrix mit komplett erhaltenem bindegewebigem Gefäß- und Kapillarnetzwerk. In der Perfusion lässt sich die erhaltene Funktionalität dieser Gefäße nachweisen wie in Abbildung 5.1 dargestellt ist. Weiter wird von der Arbeitsgruppe Mertsching die erfolgreiche Rekonstruktion der Gefäße durch Reendothelialisierung beschrieben [69]. Damit besteht für die SIS ein einzigartiges Konzept zur *in vitro* Vaskularisierung.

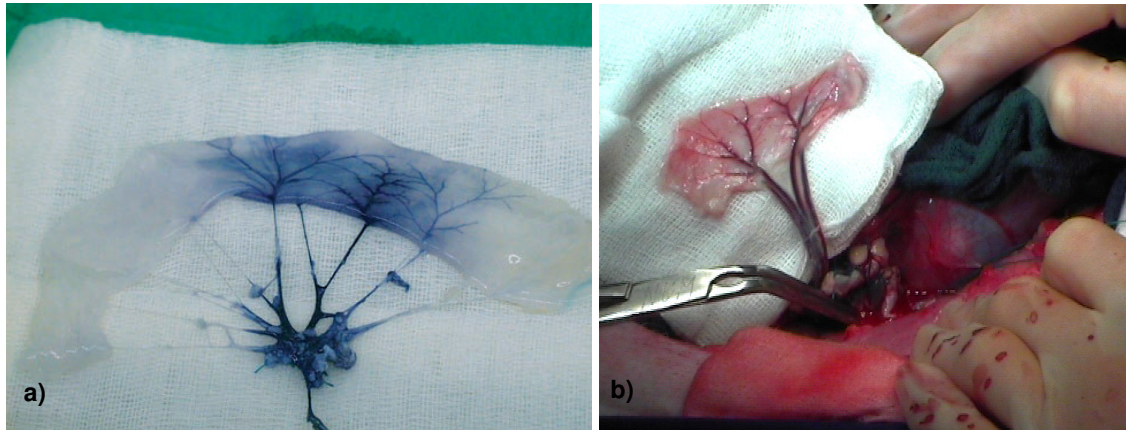


Abb. 5.1: Azelluläre SIS-Matrix mit erhaltener Gefäßstruktur als *Biological Vascularized Matrix*, a) Darstellung des Gefäßnetzwerkes durch Injektion von Trypan-Blau, b) Implantation *in vivo* mit End-zu-Seit-Anastomose der Gefäßpedikel an die Aorta

Die Azellularisierung der SIS bedient sich der genannten etablierten Standardprotokolle, so dass die Zellfreiheit hier einzig in der HE-Färbung überprüft wurde. Zunächst wurde ein Standardprotokoll zur statischen Besiedlung der SIS entwickelt. In den Vorversuchen wurden Besiedlungsmethoden und notwendige Zellzahlen festgelegt. Hier zeigt sich, dass nicht nur die Zelldichte auf den Konstrukten, sondern auch die Zellvitalität entscheidend von der Besiedlungsdichte der Zellen abhängt. Zellen, die vereinzelt auf der Matrix ansiedeln, sterben über den Kulturzeitraum eher ab, als jene die in einem Zellverbund liegen.

Aus diesen Daten wurde ein Besiedlungsprotokoll erarbeitet, welches eine hohe Besiedlungszellzahl und eine 48stündige Adhäsionsphase vorsieht. Nach einer Standardkulturzeit von 10 Tagen im Bioreaktor konnten in der funktionellen und histologischen Evaluation wesentliche Charakteristika von Herzmuskelgewebe nachgewiesen werden. Morphologisch ergaben sich spindelförmige und untereinander vernetzte Muskelzellkulturen. Eine spezifische Darstellung der Kardiomyozyten auf der Matrix gestaltete sich schwierig, da das Bindegewebe eine starke Hintergrundfärbung aufwies. Der sichere Nachweis der Herzmuskelzellen gelang stellvertretend in den Monolayerkulturen, die jeweils parallel zu den Gewebeskulturen angesetzt wurden.

Die sehr hohe durchschnittliche Zelldichte von 400 Zellen/mm² und die nachgewiesene Zellvitalität von fast 99 % ist, verglichen mit dem parallel in unserem Labor entwickelten Modell der Gruppe Kofidis, Lenz *et al.*, deutlich physiologischer [35].

Bereits in diesem simplen statischen Modell eines TEMP werden zentrale Eigenschaften der biologischen Trägermaterialien im Vergleich zu den synthetischen deut-

lich. Die Zellen weisen eine physiologische spindelförmige Morphologie auf. Als zentrale Nachweismethode hat sich hierbei das Live/Dead-Assay bewährt. Es entsteht eine Fluoreszenz des Zytoplasmas stoffwechselaktiver Zellen. Somit werden in der Durchsicht, wie sie bei dem dünnen Gewebe möglich ist, die Zellen in ihrer Morphologie abgebildet. Dabei scheinen sie sich entlang der Bindegewebsstrukturen auszurichten. Es lassen sich gerichtete Zellverbände nachweisen, die der Morphologie von Muskelfasern ähneln. Im Vergleich zu den TE-Modellen mit Verwendung flüssiger Matrices ergibt sich demzufolge ein deutlich positiver Einfluss der Matrix auf die Zellen. In den statischen Konstrukten der Arbeitsgruppe Kofidis weisen die Zellen eine überwiegend runde Zellform auf, während wir physiologische, spindelförmige Kardiomyozyten nachweisen können.

5.2.2.2 Dynamische Kultivierung der rebesiedelten Small Intestine Submucosa

Die beschriebenen statisch kultivierten TEMPs weisen – wie diskutiert – schon wesentliche Charakteristiken physiologischen Herzmuskelgewebes auf. Deutlich defizitär ist jedoch auch in diesen Konstrukten die unzureichende dreidimensionale Gewebsorganisation. Die beschriebene hohe Zelldichte konzentriert sich – wie zu erwarten – auf die Konstruktoberfläche. Entsprechend wurde in dieser Dissertation ein dynamisches Zellkulturmodell für unser TEMP aufgebaut, um die dreidimensionale Gewebemorphologie durch mechanische Stimuli zu verbessern.

Im Ergebnis zeigt sich, dass mechanischer Dehnungsstress einen wichtigen exogenen Faktor für das erfolgreiche Myokardiale TE darstellt. Neben einer deutlich höheren Stoffwechselaktivität der Zellen lässt sich eine verbesserte Gewebsorganisation nachweisen. Entscheidend dabei ist vor allem ein deutlich vermehrter Matrixumbau durch die Zellen. In der Pentachrom-Färbung ließen sich neu gebildete Proteoglykane nachweisen, die Surrogatmatrix war in der direkten Zellumgebung fast vollständig umgebaut. Es ergeben sich mehrlagige Zellverbände mit deutlich netzwerkartiger Strukturierung. Die Übersichtsmikroskopie in der Live/Dead-Fluoreszenz zeigt die Ausbildung der Muskelfasern entlang der Dehnungsvektoren. Darüber hinaus ergibt sich morphologisch eine Zellhypertrophie, verglichen mit den statisch kultivierten Zellen. In Betrachtung der physiologischen Zellgröße von 100–200 µm eines ventrikulären Kardiomyozyten lässt sich hier von einer Normotrophie mit im Durchschnitt 150

µm Länge sprechen, im Gegensatz zu den atrophierten Zellen in statischer Kultur (~50 µm Länge).

5.2.2.3 Decellularised Right Ventricle

In dieser Forschungsarbeit wurde darüber hinaus eine weitere neuartige dezellularisierte biologische Matrix für das Myokardiale TE untersucht, der Decellularised Right Ventricle (DRV). In einem sehr einfachen Modell wurde diese Matrix erstmalig mit Kardiomyozyten rebesiedelt und histologisch evaluiert. Im Ergebnis muss zwar formuliert werden, dass sich diese Matrix in ihrer nativen Form zunächst nicht für den Aufbau eines TEMP eignet, für die Zukunft allerdings für weitere Forschung durchaus interessant ist.

Auf der Suche nach einer optimalen Matrix für das myokardiale TE wurde in den Diskussionsforen zahlreicher Kongresse die Isolierungen der myokardialen extrazellulären Matrix gefordert. Entsprechend den oben aufgeführten Überlegungen zu dezellularisierten biologischen Matrices müsste hier die optimale Struktur und Zusammensetzung für Kardiomyozyten gegeben sein. Neben den Kollagenen und Elastinen sind hier vor allem die Glykoproteine, wie Fibronectin und Laminin, für die Integrität und Funktion des Herzens entscheidend.

Die beschriebene DRV-Matrix wurde in einer Arbeit der Gruppe Walles, Mertsching und Bindeballe *et al.* in unseren Laboratorien entwickelt [unpublizierte Daten, als Dissertation eingereicht]. Über mehrere Arbeitsschritte und Kombination unterschiedlicher etablierter Dezellularisierungsmethoden wird adultes porcines Ventrikelmyokard azellularisiert. Die Bindegewebsstruktur und chemische Zusammensetzung bleibt grundlegend erhalten. Durch den Erhalt der rechten Koronararterien bei der Matrixisolation und Dezellularisierung ist auch bei diesem Konstrukt die oben angesprochene Revaskularisierung theoretisch gegeben. In der genannten Forschungsarbeit ist die Zellfreiheit der Matrix histologisch, immunhistochemisch und in PCR, Westernblot-Techniken, nachgewiesen worden.

In der vorliegenden Arbeit werden nun erstmals diese DRV wieder mit Kardiomyozyten rebesiedelt. Das ca. 3 mm dicke Konstrukt wurde dabei durch multilokale Injektionen mit der gleichen Zellzahl besiedelt, wie oben die SIS-Matrix. Die Ergebnisse der Histologie machen die besondere Schwierigkeit der Besiedlung der DRV deutlich. Es finden sich massenhaft Zellen in den Injektionskanälen, jedoch nur sehr vereinzelt in

der Peripherie. Das relative dicke und dichte Konstrukt erschwert die Migration der Zellen, die dreidimensionale Zellverteilung ist deutlich insuffizient. Auch wenn hier ein sehr einfaches Modell zur Rebesiedlung verfolgt wurde, fehlt es an überzeugenden innovativen Alternativen zu einer gleichmäßigen Zellinstallation. Vom strukturellen Gesichtspunkt erscheint der DRV nicht als gesuchte Matrix für weitere TE Konzepte mit vorgeformten Startergeweben.

Auf der anderen Seite sind wie angesprochen positive Eigenschaften in der Zell-Matrix-Interaktion in Kardiomyozytenkulturen zu erwarten. Unserer Ansicht nach gibt es hierfür bereits diskrete Hinweise in unserem Rebesiedlungsmodell. In den Live/Dead-Assays konnten vereinzelt liegende aber dennoch vitale, stoffwechselaktive Zellen nachgewiesen werden. Das steht im Gegensatz zu den Beobachtungen aus den Vorversuchen, wo isolierte Kardiomyozyten in Kultur häufig absterben. In dem verwendeten Modell lässt sich jedoch nicht sicher beurteilen, in wie weit ein zu erwartender positiver Effekt der Matrix auf die Zellfunktion und Differenzierung besteht.

5.2.3 Etablierung eines Großtiermodells für das Myokardiale TE

Abschließend soll in noch einmal kurz auf die fehlende kontraktile Funktion der TEMP und das verwendete Großtiermodell eingegangen werden.

Im Gegensatz zu den zitierten etablierten TE-Modellen ist in dieser Dissertation ein neonatales Großtiermodell verwendet worden. In der Vergangenheit konnte in unserem Labor bereits erfolgreich die Isolation porciner Kardiomyozyten aus neonatalen Herzen etabliert werden. In der vorliegenden Arbeit ist durch eine weitere Standardisierung der Operation sowie der Isolation diese Methode weiter verbessert worden, so dass es uns möglich war, sehr hohe Zellzahlen mit funktionellen Kardiomyozyten und hoher Zellvitalität zu erhalten. Dabei wird bewusst auf eine weitere Auftrennung zwischen Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten verzichtet, positive Eigenschaften einer Mischkultur für das Tissue Engineering sind publiziert [39, 35]. Dieses Großtiermodell wurde nun für die Rebesiedlung der dezellularisierten biologischen Matrices eingesetzt.

In der aktuellen Literatur wird den verwendeten Zellen im TE weit weniger Aufmerksamkeit geschenkt als den Trägermaterialien und Kulturmethoden. Auch wenn es sich zweifelsohne um eine Schlüsselposition für das erfolgreiche Myokardiale TE

handelt. Nach dem derzeitigen Stand der Forschung besteht keine adäquate Zellquelle für TE-Konstrukte [21].

Der Theorie nach müssen die optimalen Zellen autologen Ursprungs sein, in ausreichender Zahl zur Verfügung stehen und eine hohe Proliferationsrate und Differenzierung aufweisen. Danach kommen reife Herzmuskelzellen für den Einsatz im Tissue Engineering nicht in Frage. Sie haben nicht mehr die Möglichkeit zur Zellteilung und stehen somit nicht in ausreichender Anzahl zur Verfügung. Auch wenn die Entdeckung von kardialen Stammzellen im Myokard in der Vergangenheit beschrieben wurde [78], war es bisher nicht möglich, isolierte adulte Herzzellen in Kultur zu expandieren. Allgemeiner Konsens herrscht hier in der Überzeugung, dass die Frage nach einer adäquaten Zellquelle ausschließlich über die Stammzellforschung gelöst werden kann [29, 30]. Diese Forschung wird in den letzten Jahren parallel zu den Konstruktentwicklungen des Tissue Engineerings durchgeführt und soll in der Vision der Wissenschaftler kooperativ verlaufen [79]. Nach diesem Konzept beschäftigt sich auch eine Forschergruppe in unserem Labor mit der Differenzierung von Kardiomyozyten aus Stammzellen [80, 81].

Entsprechend konzentrieren sich die zitierten Arbeiten im Myokardiellen TE überwiegend auf die Erforschung von Trägermaterialien und Kulturmethoden und bedienen sich bezüglich der Zellquelle Surrogatmodellen. Derzeit werden – wie erwähnt – größtenteils neonatale Rattenkardiomyozyten verwendet. Diese Zellen haben sich in der Vergangenheit durch eine hohe Funktionalität, niedrige Ischämietoleranz und gute Adhäsionseigenschaften ausgezeichnet. Arbeiten von der Arbeitsgruppe um Ren Ke Li mit Verwendung von humanen Kardiomyozyten zeigen deutlich, dass Unterschiede zu den Rattenzellen bestehen. Die humanen Zellen weisen in Kultur keine spontanen Kontraktionen auf [28]. Es wird bereits an diesem einen Beispiel deutlich, dass die Ergebnisse der Rattenzellkulturen nicht vollständig auf das Humanmodell übertragbar sein werden. Entsprechend ergibt sich unserer Ansicht nach die Notwendigkeit hier neue Großtiermodelle zu entwickeln.

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurde mit der routinemäßigen Isolation neonataler porciner Kardiomyozyten und der anschließenden erfolgreichen Kultivierung der Grundstein für ein solches Modell gelegt. Es war möglich, vitale, funktionelle porcine Kardiomyozyten zu isolieren und spontane Zellkontraktionen auch in Kultur nachzuweisen. Im Folgenden war es möglich, diese Zellen in hoher Zelldichte auf den verwendeten Matrices anzusiedeln. Immunhistochemisch ist der Nachweis von

Kardiomyozyten auf den Matrices nur eingeschränkt möglich gewesen. In parallel angelegten Kulturen in Zellkulturflaschen ließen sich erfreulicherweise die Zellen sicher nachweisen.

Dennoch waren in der Kultur keine flächigen, spontanen Kontraktionen der Konstrukte zu beobachten. Auch die unter dynamischen Bedingungen kultivierten TEMP wiesen trotz besserer morphologischer Eigenschaften und unter elektrischer Stimulation ebenfalls keine kontraktile Funktionalität auf.

5.3 Schlussfolgerungen und Zukunftsperspektiven

Der im Rahmen dieser Dissertation entwickelte Mechanobioreaktor MEAT-3D stellt ein innovatives System für die Generierung komplexer dreidimensionaler Neogewebe dar. Das gute Handling der einzelnen Komponenten und Kulturen stellt eine deutliche Weiterentwicklung zu vergleichbaren Reaktormodellen dar. Die Daten aus dieser Forschungsarbeit unterstreichen noch einmal die Notwendigkeit einer exogenen Stimulation im Tissue Engineering. Mit dem MEAT-3D konnte ein hoch standardisiertes mechanisches Stimulationsmodell etabliert werden. Darüber hinaus ergibt sich aktuell die Möglichkeit, dieses System für weitere Forschungsvorhaben zu erweitern. Vor allem multimodale Stimulationskonzepte bieten interessante Perspektiven, welche in dem Reaktor verwirklicht werden könnten. Obligater Weiterentwicklungsbedarf ergibt sich allerdings am Gasaustausch des Zellkulturmediums. Der nachgewiesene anaerobe Stoffwechsel der Zellen ist nicht zu tolerieren. Lösungskonzepte könnten in diesem Punkt eine Anreicherung des Mediums mit Sauerstoffträgern sowie eine spezielle Vorrichtung zur Oxigenisierung der Flüssigkeit sein.

In dieser Arbeit ist für die biologische SIS-Matrix als Ausgangsstruktur ein erfolgreiches Modell für das Myokardiale TE etabliert worden. Für dieses Konstrukt wurde ein Bioreaktorsystem entwickelt, mit dem durch dynamische Kulturbedingungen eine wesentliche Verbesserung der Gewebemorphologie zu erreichen war.

Unserer Bewertung nach weist diese Trägermatrix grundlegende Vorteile gegenüber anderen Konstrukten auf. Eine positive Beeinflussung der Gewebsorganisation durch das Bindegewebe lässt sich nachweisen, was zu einer physiologischen Zellmorpho-

logie der Kardiomyozyten führt. Der entscheidende Benefit sind jedoch die erhaltenen bindegewebigen Kapillarstrukturen, die als ein sehr viel versprechendes Konzept für eine *in vitro* Vaskularisierung erscheinen. Somit stellt unser TEMP ein zukunftsweisendes Ausgangsmodell für die weitere Forschung dar. Die parallel erfolgte Reendothelialisierung der Gefäßmatrix [69] sollte in Zukunft als Co-Kultursystem mit der Kardiomyozyten besiedelten SIS aufgebaut werden.

Kritisch an dem Modell muss sicher die dreidimensionale Gewebsorganisation und Zellverteilung gesehen werden. Trotz der verbesserten Morphologie in den dynamischen Modellen weisen die TEMP noch eine unzureichende Zelldichte und Funktionalität auf. Konzepte einer gleichmäßigen Zellverteilung in den Geweben gestalten sich nach wie vor schwierig. Es bieten sich hier höchstens Siedlungstechniken wie die Zentrifugation von Zellen in die Matrix an [82]. Unserer Auffassung nach ist jedoch vorrangig eine weitere Verbesserung der Stimulationsmodelle notwendig. Multimodale exogene Einflüsse, wie elektrische Stimulation, Wachstumsfaktoren und andere könnten noch einmal zu einer deutlichen Verbesserung und Funktionssteigerung führen. Darüber hinaus erkennen wir die Möglichkeit, komplexere Gewebe auf diesen TEMP weiter aufzubauen. Sowohl die innovativen Arbeiten von Shimizu, als auch neuere Veröffentlichungen der Gruppe Eschenhagen und Zimmermann nutzen den schichtweisen Aufbau von Geweben aus einzelnen Konstrukten [83, 84]. Nach diesem Vorbild ist auch ein schichtweiser Gewebeaufbau auf Grundlage der TEMP denkbar, zumal die SIS als Matrixstruktur ein vergleichsweise dünnes Konstrukt darstellt. Die vaskularisierte SIS könnte in einem solchen Modell die entscheidende Ausgangsstruktur für eine Angiogenese in die darüber liegenden Schichten darstellen.

Die verwendete DRV-Matrix stellt nach unseren Ergebnissen in ihrer Struktur keine adäquate Startermatrix für das Tissue Engineering dar. Eine positive Beeinflussung von Kardiomyozyten durch die Matrix bleibt ihren Nachweis heute noch schuldig. In unserem Forschungslabor sollen in Zukunft Techniken zur Verflüssigung des DRV entwickelt werden, um daraus neue TE-Modelle aufbauen zu können. Hier könnte unserer Ansicht nach ein zukunftsweisendes Matrixmodell entstehen, das vor allem für die Untersuchung von Zell-Matrix-Interaktionen interessant sein könnte. Hier ist auch die Kombination mit den oben genannten TEMP im Sinne eines Schichtaufbaus denkbar.

Mit der routinemäßigen Isolation neonataler porciner Kardiomyozyten und der anschließenden erfolgreichen Kultivierung wurde der Grundstein für ein Großtiermodell im Tissue Engineering von Myokardgewebe gelegt. Dennoch zeigen die fehlende kontraktile Funktionalität der Konstrukte, dass die Zellkulturmethoden für diese anspruchsvollen Zellen noch wesentlich verbessert werden müssen. Aus der geführten Diskussion ergibt sich dennoch, dass dieses Großtiermodell für die weitere TE-Forschung wichtig ist. Durch detaillierte Erforschung und Verbesserung der Zellkulturmethoden können wichtige Erkenntnisse für die Humanzellkulturen gewonnen und die entscheidenden Transplantationsmodelle aufgebaut werden.

Für die weitreichende Zell- und TE-Forschung existiert allerdings der allgemeine Konsens, dass die Zukunft in dem Einsatz von Stammzellen zu suchen ist.

6 Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

1. Quelle: Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4 - Sterbefälle nach ausgewählten Todesursachen, Altersgruppen und Geschlecht; Gestorbene in Deutschland. (2006)
2. Hamad, E., Mather, P. J., Srinivasan, S., Rubin, S., Whellan, D. J., Feldman, A. M. Pharmacologic therapy of chronic heart failure. *Am. J. Cardiovasc. Drugs* (2007) 4; 235-248.
3. Gorler, H., Haverich, A. [Heart transplantation and assist devices]. *Herz* (2004) 7; 695-701.
4. Oosterlee, A., Rahmel, A., van Zwet, W. Eurotransplant Annual Report 2006. (2006)
5. Baughman, K. L., Jarcho, J. A. Bridge to life--cardiac mechanical support. *N. Engl. J. Med.* (2007) 9; 846-849.
6. Hetzer, R., Muller, J., Weng, Y., Wallukat, G., Spiegelsberger, S., Loebe, M. Cardiac recovery in dilated cardiomyopathy by unloading with a left ventricular assist device. *Ann. Thorac. Surg.* (1999) 2; 742-749.
7. Kues, W. A., Niemann, H. The contribution of farm animals to human health. *Trends Biotechnol.* (2004) 6; 286-294.
8. Zhong, R., Platt, J. L. Current status of animal-to-human transplantation. *Expert. Opin. Biol. Ther.* (2005) 11; 1415-1420.
9. Ogata, K., Platt, J. L. Potential applications and prospects for cardiac xenotransplantation. *J. Heart Lung Transplant.* (2004) 5; 515-526.
10. Platt, J. L. Zoonosis in xenotransplantation. *Transplant. Proc.* (2000) 7; 1551-
11. Platt, J. L. Modulation of endothelial cell function in transgenic animals. *Transplant. Proc.* (2001) 1-2; 687-
12. Menasche, P., Hagege, A. A., Vilquin, J. T., Desnos, M., Abergel, E., Pouzet, B., Bel, A., Sarateanu, S., Scorsin, M., Schwartz, K., Bruneval, P., Benbunan, M., Marolleau, J. P., Duboc, D. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* (2003) 7; 1078-1083.
13. Watanabe, E., Smith, D. M., Jr., Delcarpio, J. B., Sun, J., Smart, F. W., Van, M. C., Jr., Claycomb, W. C. Cardiomyocyte transplantation in a porcine myocardial infarction model. *Cell Transplant.* (1998) 3; 239-246.
14. Huwer, H., Winning, J., Vollmar, B., Welter, C., Lohbach, C., Menger, M. D., Schafers, H. J. Long-term cell survival and hemodynamic improvements after neonatal cardiomyocyte

- and satellite cell transplantation into healed myocardial cryoinfarcted lesions in rats. *Cell Transplant.* (2003) 7; 757-767.
15. Nadal-Ginard, B., Kajstura, J., Leri, A., Anversa, P. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ. Res.* (2003) 2; 139-150.
 16. Pittenger, M. F., Martin, B. J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ. Res.* (2004) 1; 9-20.
 17. Wollert, K. C., Meyer, G. P., Lotz, J., Ringes-Lichtenberg, S., Lippolt, P., Breidenbach, C., Fichtner, S., Korte, T., Hornig, B., Messinger, D., Arseniev, L., Hertenstein, B., Ganser, A., Drexler, H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* (2004) 9429; 141-148.
 18. Fazel, S., Tang, G. H., Angoulvant, D., Cimini, M., Weisel, R. D., Li, R. K., Yau, T. M. Current status of cellular therapy for ischemic heart disease. *Ann. Thorac. Surg.* (2005) 6; S2238-S2247.
 19. Murry, C. E., Field, L. J., Menasche, P. Cell-based cardiac repair: reflections at the 10-year point. *Circulation* (2005) 20; 3174-3183.
 20. Langer, R., Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science* (1993) 5110; 920-926.
 21. Zimmermann, W. H., Didie, M., Doker, S., Melnychenko, I., Naito, H., Rogge, C., Tiburcy, M., Eschenhagen, T. Heart muscle engineering: an update on cardiac muscle replacement therapy. *Cardiovasc. Res.* (2006) 3; 419-429.
 22. Kim, B. S., Baez, C. E., Atala, A. Biomaterials for tissue engineering. *World J. Urol.* (2000) 1; 2-9.
 23. Langer, R., Tirrell, D. A. Designing materials for biology and medicine. *Nature* (2004) 6982; 487-492.
 24. Hubbell, J. A. Materials as morphogenetic guides in tissue engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* (2003) 5; 551-558.
 25. Brown, D. A., MacLellan, W. R., Laks, H., Dunn, J. C., Wu, B. M., Beygui, R. E. Analysis of oxygen transport in a diffusion-limited model of engineered heart tissue. *Biotechnol. Bioeng.* (2007) 4; 962-975.
 26. Radisic, M., Malda, J., Epping, E., Geng, W., Langer, R., Vunjak-Novakovic, G. Oxygen gradients correlate with cell density and cell viability in engineered cardiac tissue. *Biotechnol. Bioeng.* (2006) 2; 332-343.
 27. Nomi, M., Atala, A., Coppi, P. D., Soker, S. Principals of neovascularization for tissue engineering. *Mol. Aspects Med.* (2002) 6; 463-483.
 28. Li, R. K., Yau, T. M., Weisel, R. D., Mickle, D. A., Sakai, T., Choi, A., Jia, Z. Q. Construction of a bioengineered cardiac graft. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* (2000) 2; 368-375.
 29. Haverich, A., Mertsching, H., Martin, U. [Differentiation potential of human stem cells-- approaches to tissue engineering and to cell transplantation]. *Z. Arztl. Fortbild. Qualitatssich.* (2002) 6-7; 440-448.

30. Leor, J., Amsalem, Y., Cohen, S. Cells, scaffolds, and molecules for myocardial tissue engineering. *Pharmacol. Ther.* (2005) 2; 151-163.
31. Bilodeau, K., Mantovani, D. Bioreactors for Tissue Engineering: Focus on Mechanical Constraints. A Comparative Review. *Tissue Eng* (2006)
32. Minuth, W. W., Strehl, R., Schumacher, K. Tissue factory: conceptual design of a modular system for the in vitro generation of functional tissues. *Tissue Eng* (2004) 1-2; 285-294.
33. Shimizu, T., Yamato, M., Isoi, Y., Akutsu, T., Setomaru, T., Abe, K., Kikuchi, A., Umezu, M., Okano, T. Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ. Res.* (2002) 3; e40-
34. Shimizu, T., Yamato, M., Kikuchi, A., Okano, T. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials* (2003) 13; 2309-2316.
35. Kofidis, T., Lenz, A., Boublik, J., Akhyari, P., Wachsmann, B., Stahl, K. M., Haverich, A., Leyh, R. G. Bioartificial grafts for transmural myocardial restoration: a new cardiovascular tissue culture concept. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* (2003) 6; 906-911.
36. Zimmermann, W. H., Fink, C., Kralisch, D., Remmers, U., Weil, J., Eschenhagen, T. Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes. *Biotechnol. Bioeng.* (2000) 1; 106-114.
37. Kofidis, T., Akhyari, P., Wachsmann, B., Boublik, J., Mueller-Stahl, K., Leyh, R., Fischer, S., Haverich, A. A novel bioartificial myocardial tissue and its prospective use in cardiac surgery. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* (2002) 2; 238-243.
38. Leor, J., Aboulaflia-Etzion, S., Dar, A., Shapiro, L., Barbash, I. M., Battler, A., Granot, Y., Cohen, S. Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation* (2000) 19 Suppl 3; III56-III61.
39. Naito, H., Melnychenko, I., Didie, M., Schneiderbanger, K., Schubert, P., Rosenkranz, S., Eschenhagen, T., Zimmermann, W. H. Optimizing engineered heart tissue for therapeutic applications as surrogate heart muscle. *Circulation* (2006) 1 Suppl; I72-I78.
40. Kofidis, T., Lenz, A., Boublik, J., Akhyari, P., Wachsmann, B., Mueller-Stahl, K., Hofmann, M., Haverich, A. Pulsatile perfusion and cardiomyocyte viability in a solid three-dimensional matrix. *Biomaterials* (2003) 27; 5009-5014.
41. Vacanti, J. P., Langer, R., Upton, J., Marler, J. J. Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (1998) 1-2; 165-182.
42. Kofidis, T., Ruhparwar, A., Akhyari, P., Haverich, A. A novel contractile artificial myocardial tissue - on the way to the bioartificial heart. *J. Heart Lung Transplant.* (2001) 2; 188-
43. Kofidis, T., Akhyari, P., Boublik, J., Theodorou, P., Martin, U., Ruhparwar, A., Fischer, S., Eschenhagen, T., Kubis, H. P., Kraft, T., Leyh, R., Haverich, A. In vitro engineering of heart muscle: artificial myocardial tissue. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* (2002) 1; 63-69.
44. Ozawa, T., Mickle, D. A., Weisel, R. D., Koyama, N., Ozawa, S., Li, R. K. Optimal biomaterial for creation of autologous cardiac grafts. *Circulation* (2002) 12 Suppl 1; I176-I182.

45. Papadaki, M., Bursac, N., Langer, R., Merok, J., Vunjak-Novakovic, G., Freed, L. E. Tissue engineering of functional cardiac muscle: molecular, structural, and electrophysiological studies. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* (2001) 1; H168-H178.
46. Badylak, S., Liang, A., Record, R., Tullius, R., Hodde, J. Endothelial cell adherence to small intestinal submucosa: an acellular bioscaffold. *Biomaterials* (1999) 23-24; 2257-2263.
47. Gabouev, A. I., Schultheiss, D., Mertsching, H., Koppe, M., Schlote, N., Wefer, J., Jonas, U., Stief, C. G. In vitro construction of urinary bladder wall using porcine primary cells re-seeded on acellularized bladder matrix and small intestinal submucosa. *Int. J. Artif. Organs* (2003) 10; 935-942.
48. Lantz, G. C., Badylak, S. F., Hiles, M. C., Coffey, A. C., Geddes, L. A., Kokini, K., Sandusky, G. E., Morff, R. J. Small intestinal submucosa as a vascular graft: a review. *J. Invest Surg.* (1993) 3; 297-310.
49. Winkler, M., Schüttler, W., Viering, J., Lorenz, R. Patent No. DE10249903 A1 2004.05.19, Mechanischer Bioreaktor. Deutsches Patent- und Markenamt (2004)
50. Mertsching, H., Karim, N., Haverich, A., Bader, A. Investigations on biological safety and immunologic aspects of chimeric bioartificial vessels in xenotransplantation. *Transplant. Proc.* (2000) 5; 1165-
51. Fedak, P. W., Weisel, R. D., Verma, S., Mickle, D. A., Li, R. K. Restoration and regeneration of failing myocardium with cell transplantation and tissue engineering. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* (2003) 3; 277-286.
52. Langer, R. S., Vacanti, J. P. Tissue engineering: the challenges ahead. *Sci. Am.* (1999) 4; 86-89.
53. 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 Eng* (2001) 2; 141-151.
54. Zimmermann, W. H., Schneiderbanger, K., Schubert, P., Didie, M., Munzel, F., Heubach, J. F., Kostin, S., Neuhuber, W. L., Eschenhagen, T. Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ. Res.* (2002) 2; 223-230.
55. Carrier, R. L., Papadaki, M., Rupnick, M., Schoen, F. J., Bursac, N., Langer, R., Freed, L. E., Vunjak-Novakovic, G. Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization. *Biotechnol. Bioeng.* (1999) 5; 580-589.
56. Shimizu, T., Yamato, M., Akutsu, T., Shibata, T., Isoi, Y., Kikuchi, A., Umezumi, M., Okano, T. Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets. *J. Biomed. Mater. Res.* (2002) 1; 110-117.
57. Matsubayashi, K., Fedak, P. W., Mickle, D. A., Weisel, R. D., Ozawa, T., Li, R. K. Improved left ventricular aneurysm repair with bioengineered vascular smooth muscle grafts. *Circulation* (2003) 11219-11225.
58. Walles, T., Herden, T., Haverich, A., Mertsching, H. Influence of scaffold thickness and scaffold composition on bioartificial graft survival. *Biomaterials* (2003) 7; 1233-1239.

59. Polykandriotis, E., Arkudas, A., Horch, R. E., Sturzl, M., Kneser, U. Autonomously vascularized cellular constructs in tissue engineering: opening a new perspective for biomedical science. *J. Cell Mol. Med.* (2007) 1; 6-20.
60. Shimizu, T., Sekine, H., Yang, J., Isoi, Y., Yamato, M., Kikuchi, A., Kobayashi, E., Okano, T. Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues. *FASEB J.* (2006) 6; 708-710.
61. Ucuzian, A. A., Greisler, H. P. In vitro models of angiogenesis. *World J. Surg.* (2007) 4; 654-663.
62. Zimmermann, W. H., Melnychenko, I., Wasmeier, G., Didie, M., Naito, H., Nixdorff, U., Hess, A., Budinsky, L., Brune, K., Michaelis, B., Dhein, S., Schwoerer, A., Ehmke, H., Eschenhagen, T. Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nat. Med.* (2006) 4; 452-458.
63. Shimizu, T., Sekine, H., Isoi, Y., Yamato, M., Kikuchi, A., Okano, T. Long-term survival and growth of pulsatile myocardial tissue grafts engineered by the layering of cardiomyocyte sheets. *Tissue Eng* (2006) 3; 499-507.
64. Eschenhagen, T., Didie, M., Munzel, F., Schubert, P., Schneiderbanger, K., Zimmermann, W. H. 3D engineered heart tissue for replacement therapy. *Basic Res. Cardiol.* (2002) 1146-1152.
65. Laschke, M. W., Harder, Y., Amon, M., Martin, I., Farhadi, J., Ring, A., Torio-Padron, N., Schramm, R., Rucker, M., Junker, D., Haufel, J. M., Carvalho, C., Heberer, M., Germann, G., Vollmar, B., Menger, M. D. Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng* (2006) 8; 2093-2104.
66. Fink, C., Ergun, S., Kralisch, D., Remmers, U., Weil, J., Eschenhagen, T. Chronic stretch of engineered heart tissue induces hypertrophy and functional improvement. *FASEB J.* (2000) 5; 669-679.
67. Akhyari, P., Fedak, P. W., Weisel, R. D., Lee, T. Y., Verma, S., Mickle, D. A., Li, R. K. Mechanical stretch regimen enhances the formation of bioengineered autologous cardiac muscle grafts. *Circulation* (2002) 12 Suppl 1; I137-I142.
68. Dvir, T., Benishti, N., Shachar, M., Cohen, S. A Novel Perfusion Bioreactor Providing a Homogenous Milieu for Tissue Regeneration. *Tissue Eng* (2006)
69. Mertsching, H., Walles, T., Hofmann, M., Schanz, J., Knapp, W. H. Engineering of a vascularized scaffold for artificial tissue and organ generation. *Biomaterials* (2005) 33; 6610-6617.
70. Chen, H. C., Hu, Y. C. Bioreactors for tissue engineering. *Biotechnol. Lett.* (2006) 18; 1415-1423.
71. Badylak, S. F., Record, R., Lindberg, K., Hodde, J., Park, K. Small intestinal submucosa: a substrate for in vitro cell growth. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed* (1998) 8; 863-878.
72. Hiles, M. C., Badylak, S. F., Lantz, G. C., Kokini, K., Geddes, L. A., Morff, R. J. Mechanical properties of xenogeneic small-intestinal submucosa when used as an aortic graft in the dog. *J. Biomed. Mater. Res.* (1995) 7; 883-891.

73. Schultheiss, D., Gabouev, A. I., Cebotari, S., Tudorache, I., Walles, T., Schlote, N., Wefer, J., Kaufmann, P. M., Haverich, A., Jonas, U., Stief, C. G., Mertsching, H. Biological vascularized matrix for bladder tissue engineering: matrix preparation, reseeding technique and short-term implantation in a porcine model. *J. Urol.* (2005) 1; 276-280.
74. Schultheiss, D., Gabouev, A. I., Kaufmann, P. M., Schlote, N., Mertsching, H., Haverich, A., Stief, C. G., Jonas, U. [Biological vascularized matrix (BioVaM): a new method for solving the perfusion problems in tissue engineering]. *Urologe A* (2004) 10; 1223-1228.
75. Hodde, J. Naturally occurring scaffolds for soft tissue repair and regeneration. *Tissue Eng* (2002) 2; 295-308.
76. Kallenbach, K., Leyh, R. G., Lefik, E., Walles, T., Wilhelmi, M., Cebotari, S., Schmiedl, A., Haverich, A., Mertsching, H. Guided tissue regeneration: porcine matrix does not transmit PERV. *Biomaterials* (2004) 17; 3613-3620.
77. Badylak, S. F., Coffey, A. C., Lantz, G. C., Tacker, W. A., Geddes, L. A. Comparison of the resistance to infection of intestinal submucosa arterial autografts versus polytetrafluoroethylene arterial prostheses in a dog model. *J. Vasc. Surg.* (1994) 3; 465-472.
78. Zimmermann, W. H., Eschenhagen, T. Questioning the relevance of circulating cardiac progenitor cells in cardiac regeneration. *Cardiovasc. Res.* (2005) 3; 344-346.
79. Polak, J. M., Bishop, A. E. Stem cells and tissue engineering: past, present, and future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (2006) 352-366.
80. Schwanke, K., Wunderlich, S., Reppel, M., Winkler, M. E., Matzkies, M., Groos, S., Itskovitz-Eldor, J., Simon, A. R., Hescheler, J., Haverich, A., Martin, U. Generation and characterization of functional cardiomyocytes from rhesus monkey embryonic stem cells. *Stem Cells* (2006) 6; 1423-1432.
81. Gruh, I., Beilner, J., Blomer, U., Schmiedl, A., Schmidt-Richter, I., Kruse, M. L., Haverich, A., Martin, U. No evidence of transdifferentiation of human endothelial progenitor cells into cardiomyocytes after coculture with neonatal rat cardiomyocytes. *Circulation* (2006) 10; 1326-1334.
82. Dar, A., Shachar, M., Leor, J., Cohen, S. Optimization of cardiac cell seeding and distribution in 3D porous alginate scaffolds. *Biotechnol. Bioeng.* (2002) 3; 305-312.
83. Haraguchi, Y., Shimizu, T., Yamato, M., Kikuchi, A., Okano, T. Electrical coupling of cardiomyocyte sheets occurs rapidly via functional gap junction formation. *Biomaterials* (2006) 27; 4765-4774.
84. Eschenhagen, T., Zimmermann, W. H., Kleber, A. G. Electrical coupling of cardiac myocyte cell sheets to the heart. *Circ. Res.* (2006) 5; 573-575.

6.2 Abkürzungsverzeichnis

AMT	Artificial Myocardial Tissue
Aqua dest.	Aqua destilliert
ATP	Adenosintriphosphat
AZ-Lösung	Azellularisierungs-Lösung
BrDU	5-Bromo-2'-Deoxyuridine
Ca	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CK	Creatinkinase
CO ₂	Kohlendioxid
DL	Deutsche Landrasse
DNase	Desoxyribonuklease
DRV	Decellularised Right Ventricle
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHT	Engineered Heart Tissue
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
Fa.	Firma
FCS	Fötale Kälberserum
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IM	Immunhistologie
KHB	Krebs-Henseleite-Bicarbonat
KliChi	Untersuchung in der Klinischen Chemie
KM-Medium	Kardiomyozyten-Medium
L/D	Live/Dead
LDH	Lactatdehydrogenase
LEBAO	Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie und Künstliche Organe
Lsg.	Lösung
MEAT-3D	Eigename Bioreaktor (Mechano-Bioreactor for Engineered Artificial Tissue)
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
min	Minuten
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MTE	Myocardial (Myokardiales) Tissue Engineering
NaCl	Natriumchlorid
O ₂	Sauerstoff
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
SIS	Small Intestinal Submucosa
TE	Tissue Engineering
TEG	Tissue Engineered Graft
TEMP	Tissue Engineered Myocardial Patch

7 Zusammenfassung

Das Tissue Engineering von Myokardgewebe erscheint als viel versprechender Ansatz für eine kausale Therapie der kardialen Insuffizienzen. Allerdings bestehen nach dem derzeitigen Stand der Forschung ungelöste Problemstellungen, die einen klinischen Einsatz noch nicht möglich machen. Es fehlt an dreidimensionaler Gewebsorganisation, einer suffizienten Nährstoffversorgung und demzufolge an der nötigen Funktionalität. Hier sind insbesondere weitere Innovationen im Bereich der Trägermatrices und der Kulturmethode notwendig.

In diesem Zusammenhang beschäftigt sich die vorliegende Dissertation mit der Verwendung von azellularisierten biologischen Trägermaterialien als neuen Ansatz für das Myokardiale TE. Dieses Modell bietet nach unserer Überzeugung das erfolgreichste Konzept zur Verwirklichung einer *in vitro* Vaskularisierung, da es über ein physiologisches Gefäßnetz innerhalb der Matrix verfügt.

In dieser Arbeit wird die SIS-Matrix erfolgreich mit Kardiomyozyten rebesiedelt und im Bioreaktor zu einem Gewebe kultiviert, das wesentliche Charakteristika von Myokard aufweist. Die Problemstellung der mangelnden Gewebsorganisation wird durch die Entwicklung und Etablierung eines Mechano-Bioreaktorsystems (MEAT-3D) entsprechend adressiert. Es lassen sich durch Applikation von physiologischem Dehnungsstress zahlreiche positive Effekte auf die Zell- und Gewebemorphologie nachweisen, was noch einmal die Notwendigkeit exogener Stimuli während der Kulturphase unterstreicht.

Als zweites Modell wird die neu entwickelte DRV-Matrix unter gleichen Kulturbedingungen mit Kardiomyozyten rebesiedelt. In der histologischen Aufarbeitung zeigt sich allerdings, dass mit den vorhandenen Besiedlungsmethoden eine suffiziente dreidimensionale Zelldichte in der nativen Matrixstruktur nicht zu erreichen ist.

Darüber hinaus wird in der Arbeit mit der Standardisierung der Isolation neonataler porciner Kardiomyozyten sowie der anschließenden erfolgreichen Kultivierung der Grundstein für ein Großtiermodell im Myokardialen Tissue Engineering gelegt.

Im Ergebnis steht mit unserem Tissue Engineered Myocardial Patch auf Basis der SIS-Matrix ein innovatives Modell für die weiterführende Forschung zur Verfügung, wie z.B. die Reendothelialisierung des Kapillarsystems der Matrix oder für Co-Kultursysteme.

8 Anhang

8.1 Lebenslauf

Tilman Calließ

Haspelmathstr. 3
30449 Hannover

0511 – 26 29 567
0177 – 64 42 867
tilman@calliess.de

Zur Person

Geburtstag	11. Februar 1979
Geburtsort	Braunschweig
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstatus	Ledig
Konfession	Evangelisch-Lutherisch

Schulische Ausbildung

1985 – 1989	Grundschule Münchenhagen
1989 – 1991	Orientierungsstufe Loccum
1991 - 1998	Ratsgymnasium Stadthagen
	Abitur in Mathematik, Geschichte, Deutsch und Physik

Zivildienst

08/1998 – 08/1999	Rettungssanitäter beim Deutschen Roten Kreuz (DRK) Rettungsdienst im Landkreis Schaumburg
-------------------	---

Akademische Ausbildung

Studium

1999 - 2006	Student der Humanmedizin an der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH)
09/2001	Ärztliche Vorprüfung
09/2002	1. Staatsexamen
03/2005	2. Staatsexamen
06/2006	3. Staatsexamen

Dissertation

Seit 10/2002 Experimentelle Doktorarbeit in der Abteilung für Herz-, Thorax-, Gefäßchirurgie, Direktor: Prof. Dr. A. Haverich
Arbeitsgruppe Frau Prof. Dr. H. Mertsching (Leibniz Forschungslaboratorien für Biotechnologie und künstliche Organe (LEBAO)) Forschungsbereich: Tissue Engineering Myokardgewebe

Praktisches Jahr

05/2005 – 08/2005 Innere Medizin, Klinikum Braunschweig
Abteilungen Kardiologie, Nephrologie und Gastroenterologie

08/2005 – 10/2005 Visceralchirurgie, Royal Perth Hospital
Universitätsklinikum der University of Western Australia

10/2005 – 12/2005 Unfallchirurgie, Redcliffe District Hospital
Lehrkrankenhaus der Queensland University, Brisbane/Australien

12/2005 – 04/2006 Orthopädie, Orthopädische Klinik der MHH
Prof. Dr. C. J. Wirth

Praktische Tätigkeiten

10/1998 – 03/1999 Ausbildung zum Rettungssanitäter an der Rettungsschule Goslar im Rahmen des Zivildienstes beim DRK

08/1999 – 06/2004 Aushilfskraft als Rettungssanitäter im Rettungsdienst des Deutschen Roten Kreuzes Schaumburg

12/1999 – 12/2004 Studentische Hilfskraft und Sektionsgehilfe im Institut für Pathologie der Region Hannover unter PD Dr. J. Bernhards

Berufliche Tätigkeit

seit 08/2006 Assistenzarzt in der Orthopädischen Klinik der MHH
Direktor: Prof. Dr. H. Windhagen

Hannover, den 25.01.2008

.....
Tilman Calließ

8.2 Erklärung

(nach § 2 Abs. 2 Nrn. 5 und 6 der Promotionsordnung)

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Tissue Engineered Myocardial Patch - Etablierung dezellularisierter biologischer Matrices für das myokardiale Tissue Engineering im Großtiermodell mit Entwicklung eines Mechano-Bioreaktorsystems zur physiologischen Stimulation der Zellkultur“ in der Klinik für Herz-, Thorax-, Transplantations- und Gefäßchirurgie unter Betreuung von Frau Professorin Dr. H. Mertsching ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

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.

Hannover, den 25.01.2008

.....
Tilman Calließ

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind auf drei internationalen Kongressen als Poster präsentiert und veröffentlicht worden:

- | | |
|---------|--|
| 09/2003 | 30. Jahreskongress der „European Society for Artificial Organs“, Aachen/Deutschland
T. Calliess, B. Wachsmann, T. Bindeballe, A. Lenz, K. Müller-Stahl, T. Kofidis, A. Haverich, H. Mertsching
Cardiac Tissue Engineering – Histological And Functional Characterisation Of A Myocardial Patch, ESAO 2003/Aachen |
| 05/2004 | 7th World Biomaterials Congress, Sydney/Australien
T. Calliess, B. Wachsmann, T. Bindeballe, T. Walles, A. Lenz, T. Kofidis, A. Haverich, H. Mertsching
Myocardial Tissue Engineering – Characterisation Of Different Biological Matrices Under Mechanical Stress, Biomaterials 2004/Sydney |
| 12/2004 | Leibniz Symposium on Transplantation and Regeneration of Thoracic Organs, Hannover/Deutschland |

8.3 Danksagung

Herrn Professor Dr. Axel Haverich danke ich für die Aufnahme als Doktorand und für die guten wissenschaftlichen Rahmenbedingungen zur Erstellung dieser Dissertation.

Frau Professorin Dr. Heike Mertsching danke ich besonders für die hervorragende Betreuung dieser Doktorarbeit und die überaus großzügige Hilfe. Besonders möchte ich mich auch für die Unterstützung bedanken und die Möglichkeiten, die Ergebnisse dieser Arbeit bei Kongressen vorstellen zu können.

Des Weiteren danke ich Frau Tina Bindeballe sowie den Doktoranden der Arbeitsgruppe Dr. Kofidis Herrn Björn Wachsmann, Herrn Knut Müller-Stahl und Herrn Dr. Andre Lenz für die gute Zusammenarbeit, ohne die diese Arbeit nicht hätte realisiert werden können. Vielen Dank für die zahlreichen guten Ideen und die wertvollen Diskussionen.

Einen herzlichen Dank auch an die Mitarbeiter des LEBAO für die hervorragende Unterstützung und den wertvollen wissenschaftlichen Austausch. Im Besonderen seien an dieser Stelle Frau Annette Just, Frau Maike Haupt, Herr Roland Meister und Herr Dr. Thorsten Walles genannt, ohne die eine Menge nicht hätte realisiert werden können.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Privatdozent Dr. Joachim Bernards sowie den Mitarbeitern des Institutes für Pathologie in Gehrden für die Unterstützung und die Bereitstellung der Gerätschaften für die histologischen Nachweismethoden dieser Arbeit. Sie waren mir eine sehr große Hilfe.

Des Weiteren danke ich Frau Dipl.-Dok. Katja Golditz sowie Frau Dipl.-Dok. Yvonne Noll aus meiner jetzigen Abteilung für die überaus engagierte Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Meiner Freundin Sarah möchte ich für ihre Geduld, ihr Verständnis und ihre Unterstützung in den letzten Jahren sehr herzlich Danken.