

Aus der Klinik für kardiovaskuläre Chirurgie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg

**Etablierung eines standardisierten *in vitro* Modellsystems  
zur Vaskularisierung azellulärer kardialer extrazellulärer  
Matrix:  
Das *Coronary Artery Tissue-Flap Model***

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von  
Alexander Kranz

2017

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Florian Simon

In großer Dankbarkeit meinen Eltern  
gewidmet.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

- Hug Aubin, Alexander Kranz, Jörn Hülsmann, Antonio Pinto, Mareike Barth, Andrey Fomin, Artur Lichtenberg, Payam Akhyari, *A novel native derived coronary artery tissue-flap model*. Tissue Engineering Part C Methods, 2013. 19(12): p. 970-80.
- Hug Aubin, Alexander Kranz, Jörn Hülsmann, Antonio Pinto, Mareike Barth, Andrey Fomin, Artur Lichtenberg, Payam Akhyari, *Cover Art*. Tissue Engineering Part C Methods, 2013. 19(12).
- Hug Aubin, Alexander Kranz, Jörn Hülsmann, Artur Lichtenberg, Payam Akhyari, *Decellularized whole heart for bioartificial heart*. Methods in Molecular Biology, 2013. 1036: p. 163-78.
- Jörn Hülsmann, Hug Aubin, Shahbaz T. Bandesha, Alexander Kranz, Volker R. Stoldt, Artur Lichtenberg, Payam Akhyari, *Rheology of perfusates and fluid dynamical effects during whole organ decellularization: A perspective to individualize decellularization protocols for single organs*. Biofabrication, 2015. 7(3): p. 035008.

## Zusammenfassung

Trotz beachtlicher Fortschritte auf dem Gebiet des myokardialen *Tissue Engineerings* stellt die funktionelle Vaskularisierung eines bioartifiziellen Herzmuskelgewebes auch heute noch eine große Herausforderung dar. Ziel dieser Arbeit war es daher, ein biologisches, kardiales *in vitro* Modellsystem zu entwickeln, mit dessen Hilfe es möglich ist, neue Strategien zur Vaskularisierung *tissue engineerter* Myokards zu evaluieren.

Dafür wurden Rattenherzen mittels eines softwaregesteuerten Langzeit-Perfusionssystems standardisiert dezellularisiert. Das Gefäßsystem der azellulären Herzen wurde anschließend mithilfe verschiedener perfusionsbasierter sowie histologischer Verfahren untersucht. Durch retrograde Perfusion der Aorta ascendens konnten sowohl nicht-endotheliale Zellen als auch humane Nabelschnurendothelzellen im Koronarsystem der dezellularisierten Rattenherzen angesiedelt und kultiviert werden. Einem mikrochirurgischen Präparationsverfahren folgend wurden die rebesiedelten Organe zu einem kardialen Matrixmodell weiterverarbeitet. Rebesiedlungs-Effektivität, Vitalität und metabolische Aktivität der intrakoronar kultivierten Zellen konnten mithilfe verschiedener Vitalitäts- und eines Stoffwechsel-Assays quantitativ und qualitativ analysiert werden. Im Zuge der Etablierung einer kontrollierten Kokultur erfolgte zudem die Besiedlung einer zuvor re-endothelialisierten EZM mit neonatalen Rattenkardiomyozyten. Mittels selektiver Koronarostien-Kanülierung und Perfusion mit humanem Vollblut konnte die Hämokompatibilität azellulärer und rebesiedelter Gefäße analysiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine große Anzahl Rattenherzen *in toto* standardisiert dezellularisiert werden. Die Integrität des koronaren Gefäßsystems sowie wichtige makro- und mikroskopische Charakteristika der Organanatomie konnten dabei erhalten werden. Darüber hinaus war es möglich, den de-endothelialisierten Gefäßbaum der zellfreien Organgerüste einer umfassenden und hochselektiven Rebesiedlung zu unterziehen. Durch mikrochirurgische Präparation der re-endothelialisierten Organe sowie durch zusätzliche Besiedlung extravasaler EZM-Kompartimente mit kardialen Zellen konnte schließlich ein biologisches, vaskularisiertes, kardiales *in vitro* Modellsystem, das *Coronary Artery Tissue-Flap Model* (CATFM), geschaffen werden. Auch nach erfolgreicher Rebesiedlung blieben die Integrität der Gefäß-EZM sowie deren Durchgängigkeit für Vollblutkomponenten bis hin zum Kapillarbett vollständig erhalten.

Das hier entwickelte CATFM bietet die Möglichkeit, Re-Endothelialisierungskapazität, Endothelfunktion sowie zelluläre Interaktion in einem standardisierten, biologischen, kardialen *in vitro* Modellsystem zu untersuchen. Zusätzlich zur Evaluation von Strategien zur funktionellen Vaskularisierung bioartifizieller Gewebe könnte das CATFM künftig auch als Testsystem für pharmakologische Studien und Analysen zur Stammzellendifferenzierung weitere Anwendungsbereiche erschließen.

## **Abstract**

Despite remarkable progress in the field of tissue engineering and regenerative medicine the vascularization of a three dimensional bioartificial myocardium still remains a major challenge. Hence, it was the object of the present study to establish a standardized biologically derived cardiac *in vitro* model that allows us to develop new strategies to create a functional vascularized myocardium.

Therefore in this study rat hearts were decellularized *in toto* by standardized coronary perfusion through automated software-controlled retrograde aortic perfusion. Protein diffusivity analysis, blood perfusion of the coronary arteries as well as different histological analyses were used to assess the coronary artery vessel system after decellularization. Through selective coronary perfusion via retrograde aortic perfusion the coronary vessel system of the *in toto* decellularized rat hearts was seeded with different cell types (standard murine fibroblast cell line and human umbilical vein ECs). A standardized coronary artery tissue-flap model (CATFM) was created by microsurgical dissection of the decellularized and subsequently reseeded whole hearts into two tissue flaps adherent to the ascending aorta and encasing the left and right coronary artery, respectively. Seeding efficacy, cell viability and metabolic activity were analyzed by assessing the intracellular esterase activity and plasma/nuclear membrane integrity as well as the cellular low density lipoprotein uptake. For controlled coculture with primary cardiac cells the re-endothelialized extracellular matrix was surface seeded with cardiac cells from neonatal rat hearts. For evaluation of vessel patency and sealing for cellular blood components before and after recellularization, coronary ostia of the above-mentioned tissue flaps were selectively catheterized and perfused with citrated whole blood.

In this study a large number of rat hearts were successfully decellularized *in toto* by means of a highly standardized decellularization process, conserving the patency and integrity of the de-endothelialized coronary artery vessel system including crucial ECM characteristics. Retrograde aortic perfusion allowed for selective seeding of the coronary artery system. Microsurgical dissection of the recellularized whole hearts and subsequent surface seeding of the tissue flaps enabled additional controlled coculture with cardiac cells. In all repopulated tissue flaps, the catheterized part of the coronary artery system was still patent, demonstrated by blood perfusion that revealed repopulated vessels to ensure perfusibility of cellular blood components even down to capillary-like structures.

The coronary artery tissue-flap model offers a patent and perfusable coronary vascular architecture with a preserved cardiac extracellular matrix, therefore mimicking nature's input to the highest possible degree. This offers the possibility to study re-endothelialization and endothelial function of different donor cell types and their interaction with cardiac cells in a standardized biologically derived cardiac *in vitro* model, while establishing a real-cardiac-like test system for *in vitro* drug testing and stem cell differentiation studies.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AcLDL</b>	<i>Acetylated Low-Density-Lipoprotein</i>	<b>EZM</b>	Extrazelluläre Matrix
<b>AHA</b>	<i>American Heart Association</i>	<b>FCS</b>	<i>Fetal Calf Serum</i>
<b>ApoB-100</b>	ApolipoproteinB-100	<b>HDMECs</b>	<i>Human Dermal Microvascular Endothelial Cells</i>
<b>AVI</b>	<i>Audio Video Interleave</i>	<b>hEGF-5</b>	<i>Human Epidermal Growth Factor 5</i>
<b>BAECs</b>	<i>Bovine Aorta Endothelial Cells</i>	<b>HUVECs</b>	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
<b>BCEs</b>	<i>Bovine Capillary Endothelial Cells</i>	<b>IE</b>	Internationale Einheit
<b>bFGF</b>	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>	<b>ITZ</b>	Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin	<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>CATFM</b>	<i>Coronary Artery Tissue-Flap Model</i>	<b>LDL</b>	<i>Low-Density-Lipoprotein</i>
<b>CD31</b>	<i>Cluster of Differentiation 31</i>	<b>NCD</b>	<i>Noncommunicable diseases</i>
<b>CMFDA</b>	5-Chlormethylfluorescein-Diacetat	<b>NIH</b>	<i>National Institutes of Health</i>
<b>CMPX</b>	Chlormethyl-TPX	<b>NSF</b>	<i>National Science Foundation</i>
<b>CNN</b>	<i>Connective tissue growth factor nephroblastoma overexpressed</i>	<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>CT</b>	Computertomographie	<b>PDGF</b>	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-Phenylindol	<b>PECAM-1</b>	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1</i>
<b>DCA</b>	<i>Dichloroacetic Acid</i>	<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaglandin I <sub>2</sub> /Prostacyclin
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	<b>PID</b>	Proportional-Integral-Differential
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>	<b>RAAS</b>	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
<b>ECFCs</b>	<i>Endothelial Colony Forming Cells</i>	<b>RDG</b>	Arginin-Glycin-Asparagin
<b>ECGS</b>	<i>Endothelial Cell Growth Supplement</i>	<b>SDS</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>	<b>t-PA</b>	<i>Tissue-type Plasminogen Activator</i>
<b>EHD</b>	Ethidium Homodimer	<b>U/min</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>EPCR</b>	<i>Endothelial Protein C Rezeptor</i>	<b>VE-Cadherin</b>	<i>Vascular Endothelial Cadherin</i>
<b>EPCs</b>	<i>Endothelial Progenitor Cells</i>	<b>VEGF</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
<b>ExMI</b>	<i>Experimental Molecular Imaging</i>	<b>vWF</b>	Von-Willebrand-Faktor

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>I</b>
<b>Abstract</b>	<b>II</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Klinische Situation</i>	1
1.1.1 Epidemiologie kardiovaskulärer Erkrankungen	1
1.1.2 Myokardschädigung und terminale Herzinsuffizienz	1
1.2 <i>Tissue Engineering</i>	3
1.2.1 Myokardiales <i>Tissue Engineering</i>	5
1.2.2 Funktionelle Vaskularisierung <i>tissue engineerter</i> Konstrukte	9
1.2.3 Aktuelle Vaskularisierungsstrategien	13
1.3 <i>Zielsetzung der Arbeit</i>	16
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1 <i>Material</i>	19
2.1.1 Explantation und Präparation der Herzen	19
2.1.2 Dezellularisierungsprotokoll	19
2.1.3 Epoxidharzperfusion und Mikro-Computertomographie	19
2.1.4 Protein-Diffusions-Analyse	20
2.1.5 Zellkulturstudien	20
2.1.6 Histologie	21
2.1.7 Geräte	22
2.1.8 Langzeitperfusionssystem	22
2.1.9 Spendertiere	26
2.2 <i>Methoden</i>	27
2.2.1 Explantation und Präparation der Herzen	27
2.2.2 <i>In toto</i> Dezellularisierung der Rattenherzen	28
2.2.3 Dezellularisierungsprotokoll	29
2.2.4 Koronargefäßdarstellung durch Epoxidharz-Perfusion	31
2.2.5 Mikro-Computertomographie	32
2.2.6 <i>Coronary Artery Tissue-Flap Model</i>	33
2.2.7 <i>In vitro</i> Rebesiedlung der <i>tissue-flaps</i>	36
2.2.8 Protein-Diffusion	40
2.2.9 Evaluierung der Hämatokompatibilität mittels Blut-Perfusion	42
2.2.10 Zellkulturstudien	43
2.2.11 <i>Live-Cell-Imaging</i>	46
2.2.12 Stoffwechsel-Assay mittels <i>Dil-AcLDL-Uptake-Assay</i>	49
2.2.13 Histologie	49
2.2.14 Statistik	52

<b>3 Ergebnisse</b>	<b>53</b>
3.1 <i>In toto</i> Dezellularisierung der Rattenherzen	53
3.1.1 Beurteilung der dezellularisierten Herzen	53
3.1.2 Histologie der EZM und der dezellularisierten KoronargefäÙe	54
3.1.3 KoronargefäÙdarstellung durch Epoxidharz-Perfusion	56
3.1.4 Mikro-Computertomographie	59
3.2 <i>Etablierung eines standardisierten in vitro</i> Modellsystems	60
3.2.1 <i>Coronary Artery Tissue-Flap Model</i>	60
3.2.2 Protein-Diffusions-Analyse	62
3.2.3 Blut-Perfusion azellulärer KoronargefäÙe	68
3.3 <i>In vitro</i> Rebesiedlung der <i>tissue-flaps</i>	70
3.3.1 Selektive Rebesiedlung des Koronarsystems der <i>tissue-flaps</i>	70
3.3.2 Histologische Analyse der rebesiedelten KoronargefäÙe	71
3.3.3 Vitalität der Zellen in den rebesiedelten <i>tissue-flaps</i>	74
3.3.4 Selektive Re-Endothelialisierung	77
3.3.5 Metabolische Aktivität der Endothelzellen	79
3.3.6 Blut-Perfusion der rebesiedelten KoronargefäÙe	80
3.3.7 Erweiterung des Modellsystems mit kardialen Zellen	83
<b>4 Diskussion</b>	<b>86</b>
4.1 <i>Eignung und Limitationen der angewandten Methoden</i>	87
4.1.1 Perfusionsbasierte Rattenherz-Dezellularisierung	87
4.1.2 <i>Coronary Artery Tissue-Flap Model</i>	91
4.1.3 <i>In vitro</i> Rebesiedlung des <i>Coronary Artery Tissue-Flap Model</i>	92
4.1.4 Hämokompatibilitätsanalysen	98
4.1.5 Histologie	100
4.2 <i>Bewertung der erzielten Ergebnisse</i>	102
4.2.1 Vaskularisierte EZM als biologische Gerüststruktur	102
4.2.2 Rebesiedlungskapazität des <i>Coronary Artery Tissue-Flap Model</i>	104
4.2.3 Perfusionsanalysen am <i>Coronary Artery Tissue-Flap Model</i>	106
4.3 <i>Perspektive des Coronary Artery Tissue-Flap Model</i>	107
4.3.1 Modellsystem für Vaskularisierungsstudien	107
4.3.2 Kardiales <i>in vitro</i> Testsystem	108
4.3.3 Myokardiales Ersatzgewebe	110
4.3.4 Vollständig bioartifizielles Herz	111
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>113</b>
<b>Anhang</b>	<b>125</b>
<b>Danksagung</b>	<b>130</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Klinische Situation

### 1.1.1 Epidemiologie kardiovaskulärer Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen in der heutigen Zeit weltweit eine der Haupttodesursachen dar. An allen Todesfällen, die auf nicht übertragbare Erkrankungen (engl. *noncommunicable diseases*, NCDs) zurückzuführen waren, hatten Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems im Jahr 2012 einen Anteil von 46,2% [1]. Die absolute Anzahl der weltweiten Todesfälle belief sich dabei auf 17,5 Millionen [1]. Damit reiht sich die Gruppe kardiovaskulärer Erkrankungen deutlich vor den Krebserkrankungen (21,7% der NCD-Todesfälle 2012), den Erkrankungen der Atemwege (10,7%) und dem Diabetes mellitus (4%) ein [1]. Sowohl bei Männern als auch bei Frauen machen dabei die ischämischen Herzerkrankungen mit 45% beziehungsweise 37% an allen kardiovaskulären Erkrankungen den bei Weitem größten Anteil aus [2]. Auch in Europa und Deutschland sind Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die führende Todesursache [3-5]. So sind sie in Europa mit 47% für nahezu die Hälfte aller Todesfälle verantwortlich [3] und auch in Deutschland können in der Altersgruppe der über 65-Jährigen 50% aller Sterbefälle bei den Männern und 41% bei den Frauen auf Erkrankungen des Kreislaufsystems zurückgeführt werden [5].

### 1.1.2 Myokardschädigung und terminale Herzinsuffizienz

Eine Schädigung des Herzmuskelgewebes unterliegt dem Einfluss verschiedener Faktoren [6]. Dazu zählen unter anderem die arterielle Hypertonie, die koronare Herzerkrankung, der Diabetes mellitus, Erkrankungen der Herzklappen sowie die linksventrikuläre Hypertrophie [6]. Letztlich führen nahezu alle kardialen Erkrankungen zu einer Einschränkung der Pumpfunktion des Herzens und somit zu einer Herzinsuffizienz [7]. Die Herzinsuffizienz stellt dabei einen Zustand dar, bei dem das Herz nicht in der Lage ist, die peripheren Organe – in Ruhe oder unter Belastung - mit Blut und damit mit Sauerstoff zu versorgen [6]. Das *American College of Cardiology* und die *American Heart Association* definieren die Herzinsuffizienz als ein komplexes klinisches Syndrom, das grundsätzlich aus

jeder funktionellen oder strukturellen Herzerkrankung hervorgehen kann und die Fähigkeit des Ventrikels, sich mit Blut zu füllen oder Blut auszuwerfen, einschränkt [7].

Die Herzinsuffizienz ist der häufigste Grund der stationären Krankenhausaufnahme in Deutschland [8]. Damit kann sie heutzutage als eine der kostenintensivsten chronischen Erkrankungen angesehen werden, wobei in den westlichen Industrienationen die Kosten der stationären Versorgung bei Patienten mit Herzinsuffizienz 50 bis 70% der Krankheitskosten ausmachen [8, 9]. In Zukunft wird sogar noch mit einer Steigerung der Gesundheitskosten zu rechnen sein, da von einer weiteren Zunahme der Prävalenz und Inzidenz der Herzinsuffizienz ausgegangen werden kann [10]. Dies liegt in der aktuellen demographischen Entwicklung sowie im medizinischen Fortschritt begründet, der zu einer Reduktion der Letalität ischämischer Herzerkrankungen führt [10]. Trotz eines deutlichen Rückgangs der Sterblichkeit nach dem Auftreten einer Herzinsuffizienz ist die Prognose einer unbehandelten Herzinsuffizienz immer noch schlecht. Obwohl sich in den vergangenen Jahrzehnten ein deutlicher Rückgang der Mortalität der Herzinsuffizienz eingestellt hat, liegt die 5-Jahres-Mortalitätsrate nach Diagnosestellung immer noch bei etwa 50% [11, 12]. Dabei zeigen sich stadienabhängige 5-Jahres-Überlebensraten, die entsprechend der Klassifikation der Schweregrade der Herzinsuffizienz durch die *American Heart Association* (AHA) für die Stadien A bis D jeweils 97%, 96%, 75% und 20% betragen [13]. Das Stadium D bezeichnet dabei einen Zustand, bei dem eine refraktäre Herzinsuffizienz vorliegt, die einer besonderen Intervention bedarf [14].

Auch wenn das Myokard des erwachsenen Herzen über ein gewisses Maß an Regenerationskapazität verfügt [15, 16], reicht diese dennoch nicht aus, um den Funktionsausfall durch eine ausgedehnte Myokardschädigung, zum Beispiel im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes, zu kompensieren. Der mit dem Untergang vitalen Herzmuskelgewebes einhergehende Funktionsverlust kann somit als irreversibel angesehen werden [17].

Nach Ausschöpfung aller konservativen und teils auch operativen Therapieoptionen gilt die Herztransplantation als *ultima ratio* zur Behandlung einer terminalen Herzinsuffizienz [18]. Erhebliche Einschränkung erfährt diese Therapieoption allerdings durch den Mangel an verfügbaren Spenderorganen. Im Jahr 2014 wurden in Deutschland insgesamt 294 Herztransplantationen

durchgeführt [19]. Auf der Warteliste für eine alleinige Herztransplantation waren im selben Jahr jedoch 842 Patienten zu finden [19]. Eine vergleichbare Diskrepanz zwischen Angebot und tatsächlichem Bedarf lässt sich auch im Falle anderer Spenderorgane beobachten. Gemäß neuerer Angaben durch die Organisation *Eurotransplant* stellt sich die Situation auch für Lungen oder Nieren ähnlich prekär dar [19].

## **1.2 Tissue Engineering**

Eine noch junge Forschungsdisziplin, die versucht, Lösungsansätze für die Problematik der Organknappheit zu entwickeln, ist das *Tissue Engineering*. Der Begriff *Tissue Engineering* wurde erstmals 1987 durch Mitglieder der *US National Science Foundation* (NSF) eingeführt [20]. Nur ein Jahr später erfolgte die offizielle Definition des Begriffs auf einer durch die NSF organisierten Konferenz in Lake Tahoe in Kalifornien [20]. *Tissue Engineering* wurde hierbei beschrieben als die Anwendung von Methoden und Prinzipien aus dem Bereich des Ingenieurwesens und der Biowissenschaften, um ein fundamentales Verständnis von Struktur-Funktions-Beziehungen in normalen und pathologisch veränderten nativen Geweben zu schaffen und einen biologischen Gewebeersatz zu entwickeln, der es ermöglicht, verschiedene Gewebefunktionen wiederherzustellen, aufrechtzuerhalten oder zu verbessern [20]. 1993 veröffentlichten Robert Langer und Joseph Vacanti in der Fachzeitschrift *Science* einen Artikel, der die neue Forschungsdisziplin erstmals umfassend charakterisierte [21]. In diesem Artikel beschrieben die beiden Autoren das *Tissue Engineering* als neues Forschungsgebiet, welches danach strebt, einen funktionellen Ersatz für erkranktes Gewebe herzustellen [21]. Das Ziel des *Tissue Engineerings* ist demnach die Herstellung funktioneller, dreidimensionaler Gewebe außerhalb des Körpers, die in Größe, Form und Funktion den jeweiligen Bedürfnissen angepasst werden können, noch bevor sie schließlich in den Körper implantiert werden [20]. So soll ein für den individuellen Patienten einzigartiges Ersatzgewebe generiert werden, das sowohl Regenerations- als auch Umbauvorgänge ermöglicht und zudem über ein gewisses Wachstumspotential verfügt [22]. Letztere Eigenschaft ist vor allem in der Kinderherzchirurgie von großem Interesse, da dadurch repetitive Eingriffe vermieden werden könnten [22].

Die Herstellung solcher bioartifizieller Gewebe beruht meist auf der Besiedlung dreidimensionaler biologischer oder synthetischer Trägersubstanzen und Gerüststrukturen mit verschiedenen Zellen [23]. Die Gerüststrukturen dienen dabei als formgebende Schablonen, die den Zellen idealerweise ein geeignetes Milieu zur Verfügung stellen, welches Zelladhäsion, -wachstum, -migration und -differenzierung unterstützt und damit letztlich die Entstehung eines funktionellen Gewebes fördert [23, 24]. Zur Optimierung zellulärer Wachstums- und Differenzierungsvorgänge werden im *Tissue Engineering* häufig auch biochemische und/oder physikalische Stimuli eingesetzt [23]. Die chemische Stimulation erfolgt dabei nicht selten in Form biologischer Signalmoleküle wie zum Beispiel bestimmter Wachstumsfaktoren, während zur mechanischen Stimulation Bioreaktorsysteme eingesetzt werden [23]. Gerüststrukturen, Zellen und physikochemische Stimuli stellen folglich die drei Basiskomponenten des *Tissue Engineerings* dar, deren Kombination die Herstellung eines funktionellen bioartifiziellen Gewebes ermöglichen soll [23, 24].

Seit der Begriffseinführung 1987 wurden im Bereich des *Tissue Engineerings* bemerkenswerte Fortschritte gemacht, so dass in den vergangenen Jahren bereits einige *in vitro* hergestellte Gewebe klinische Anwendung erfuhren. Als womöglich bekanntestes Beispiel ist hier die Implantation einer *tissue engineerter* Trachea zu nennen [25]. Dafür wurde die Trachea einer verstorbenen Spenderin mittels eines detergenzien- und enzymbasierten Dezellularisierungsprotokolls von ihren zellulären Bestandteilen befreit. Anschließend erfolgte die Rebesiedlung des dadurch entstandenen Organ-Gerüsts mit Epithel- und Knorpelzellen, die zuvor mittels Biopsien aus dem Respirationstrakt und dem Knochenmark der späteren Empfängerin gewonnen wurden. Das derart *in vitro* erzeugte Gewebe konnte schließlich als Ersatz für den aufgrund einer Tuberkulose hochgradig geschädigten linken Hauptbronchus der Patientin implantiert werden [25]. Die Ergebnisse der Arbeiten von Paolo Macchiarini, der als erster die Implantation einer *tissue engineerter* Trachea durchgeführt und beschrieben hatte, sind aufgrund der aktuellen Kritik an der Arbeit Macchiarinis allerdings nur eingeschränkt beurteilbar [26]. Paolo Macchiarini sieht sich seit dem vergangenen Jahr dem Vorwurf wissenschaftlichen Fehlverhaltens ausgesetzt, so dass das Karolinska-Institut im März 2016 seine Zusammenarbeit mit dem Chirurgen

beendete [26]. Zur abschließenden Beurteilung der Arbeit von Macchiarini sind weiterführende Untersuchungen angesetzt [26].

Als ein weiteres Beispiel für den klinischen Einsatz bioartifizieller Gewebe sind *tissue engineerete* Herzklappen zu nennen, die Kindern mit einem Klappenitium implantiert werden konnten [27]. Diese Herzklappen verfügen über den großen Vorteil, als biologisch aktive Klappen mit den heranwachsenden Kindern mitzuwachsen [27]. Auch die Implantation einer *tissue engineereten* Pulmonalarterie bei einem vier Jahre alten Mädchen mit Pulmonalatresie [28] und die Implantation bioartifizieller Harnblasen bei jungen Patienten, die an einer gestörten Blasenfunktion aufgrund einer Myelomeningozele litten [29], konnten bereits erfolgreich durchgeführt werden. Dies sind alles Beispiele für einen heute schon stattgefundenen klinischen Einsatz *tissue engineerter* Gewebe.

### **1.2.1 Myokardiales *Tissue Engineering***

Das myokardiale *Tissue Engineering* ist ein junger, aufstrebender Forschungsbereich, der es sich zum Ziel gesetzt hat, einen funktionellen, bioartifiziellen Gewebeersatz für erkranktes Myokard zu generieren, um dessen reduzierte Funktion unterstützen oder sogar gänzlich kompensieren zu können [30]. Darüber hinaus könnten *tissue engineerete* kardiale Gewebe auch als *in vitro* Testsysteme Verwendung finden, die es uns ermöglichen würden, ein fundierteres Verständnis der Biologie des Herzen und der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen zu entwickeln [30].

Um ein solches bioartifiziell Herzmuskelgewebe herstellen zu können, wurden im Verlauf der vergangenen Jahre zahlreiche Strategien entwickelt. Vereinfacht lassen sich hierbei rein zellbasierte Verfahren [31, 32] von denjenigen Strategien unterscheiden, die zur Herstellung eines *tissue engineereten* Myokards auf die Verwendung von Zellen in Kombination mit verschiedenartigen Trägersubstanzen und Gerüststrukturen zurückgreifen [33-38].

Bereits in den späten 1950er Jahren gelang es Moscona, sphäroide Zellaggregate aus Kardiomyozyten zu erzeugen, die aus embryonalen Hühnerherzen isoliert worden waren [31]. Da diese Kardiomyozyten lediglich unter kontinuierlichen Kreisbewegungen in einem Erlenmeyerkolben kultiviert worden waren, verdeutlichte dieser Versuch, dass kardiale Zellen eine generelle Tendenz zeigen,

zu aggregieren und dadurch eine dem Myokard ähnliche Verbindung einzugehen. Eine weitere lediglich zellbasierte Methode besteht in der Herstellung kontraktiler myokardialer Konstrukte auf der Basis zweidimensionaler *Zell-Monolayer* aus neonatalen Rattenkardiomyozyten [32]. Um die konfluenten *Zell-Monolayer* vom Boden der verwendeten Kulturgefäße abzulösen, ohne dabei den Zellverband durch die Verwendung von Enzymen aufzuheben, werden bei diesem Verfahren die speziellen Eigenschaften eines temperatursensitiven Polymers (poly(N-isopropylacrylamide)) genutzt. Dieses dient der Beschichtung der Kulturgefäße und ermöglicht es, durch Temperaturreduktion den konfluenten *Monolayer* neonataler Kardiomyozyten im Verband von diesen zu lösen. Die Kombination mehrerer solcher *Zell-Monolayer* ermöglicht schließlich die Anfertigung dreidimensionaler myokardialer Konstrukte. Morphologisch und funktionell gekoppelt, verfügen diese Zellschichten über eine spontane kontraktile Aktivität [32].

Neben diesen rein zellbasierten Methoden existieren zahlreiche weitere Strategien, die auf der Kombination von kardialen Zellen mit verschiedenen biokompatiblen Trägersubstanzen und Gerüststrukturen basieren. Als solche Trägersubstanzen kommen in der Regel entweder Hydrogele [33-37] oder dezellularisierte native Gewebe und sogar ganze Organe zum Einsatz [38]. Darüber hinaus existieren einige neuere Verfahren, die diese beiden Trägersubstanzen und deren spezielle Eigenschaften kombinieren [39-41].

Unter den Hydrogelen werden natürliche von synthetischen Formen unterscheiden [33]. Natürliche Hydrogele bestehen dabei in der Regel aus natürlich vorkommenden Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) [34]. So zum Beispiel das der murinen Sarkom Zelllinie Engelbreth-Holm-Swarm entstammende Matrigel® [34]. Dieses setzt sich überwiegend aus Laminin, Kollagen Typ IV und Enactin zusammen [34]. Synthetische Hydrogele hingegen beinhalten Substanzen wie Polyethylenglycol, Polylactide, Polylactid-co-Glycolid, Polycaprolacton, Polyacrylamid oder Polyurethane [35]. Der Vorteil derjenigen Hydrogele, die sich zu großen Anteilen aus EZM-Komponenten zusammensetzen, liegt darin, über ähnliche mechanische Eigenschaften wie ein natürliches Gewebe zu verfügen und zudem hochgradig biokompatibel und biologisch aktiv zu sein [33]. Nachteilig gegenüber den synthetischen Gelen ist die eingeschränkte Kontrolle über deren physikochemische Eigenschaften, die Schwierigkeit, deren Abbaurate zu

modifizieren sowie eine ausreichende Sterilisierung und Aufreinigung dieser Stoffe sicherzustellen [33]. Letztlich ist es durch die Einbettung von kardialen Zellen in Hydrogele möglich, *ex vivo* dreidimensionale Gewebekonstrukte herzustellen. Die Beschaffenheit der Hydrogele erlaubt es dabei, die dreidimensionale Konfiguration dieser Konstrukte zu modifizieren und gegebenenfalls bestehenden anatomischen Verhältnissen anzupassen. Als eines der dafür wohl bekanntesten Beispiele aus dem Bereich des kardiovaskulären *Tissue Engineerings* sind hier die ringförmigen kardialen Konstrukte zu nennen, die von Zimmerman et al. entwickelt wurden [37]. Mithilfe spezieller Gussformen konnte ein Gemisch aus Typ I Kollagen, Matrigel® und neonatalen Rattenkardiomyozyten in eine Ringform gebracht werden. Diese wiederum ermöglichte es schließlich, das gesamte *tissue engineerete* Konstrukt einer gleichmäßigen mechanischen Konditionierung in Form einer repetitiven Dehnung zu unterziehen [37]. Als sackförmiges myokardiales Gebilde konnte eine solche Hydrogel-Zell-Kombination in einem *in vivo* Versuch über ein Rattenherz gestülpt werden in der Hoffnung, so oder in ähnlicher Form einmal als biologisches ventrikuläres Unterstützungssystem eingesetzt werden zu können [36]. Die hydrogel-basierten myokardialen Konstrukte weisen eine dem nativen, differenzierten Myokard sehr ähnliche Morphologie auf und verfügen, wie auch die oben beschriebenen *Zell-Layer*, über eine spontane kontraktile Aktivität [37]. Durch die bereits genannte mechanische Stimulation der Zell-Hydrogel-Verbände kann eine Optimierung dieser Eigenschaften erreicht werden [37].

Neben der Verwendung von Hydrogelen ist die Rebesiedlung dezellularisierter nativer Gewebe und Organe ein weit verbreitetes Verfahren nicht nur im Bereich des kardiovaskulären *Tissue Engineerings* [42]. Dezellularisierungsstrategien zielen darauf ab, sämtliche Zellen aus einem Gewebe auszuwaschen und dadurch eine zellfreie EZM zu erhalten, die in ihrer natürlichen Architektur und Zusammensetzung sowie in ihren mechanischen Eigenschaften möglichst unverändert bleibt [17]. 2008 gelang es der Arbeitsgruppe um Doris Taylor, ein ganzes Rattenherz zu dezellularisieren und die dadurch erhaltene kardiale EZM mit neonatalen Rattenkardiomyozyten und endothelialen Zellen zu besiedeln [38]. Die vollständige Dezellularisierung der Organe konnte durch antegrade Perfusion der Koronargefäße der Rattenherzen mit einer SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) -haltigen Lösung erreicht werden. Während sich die dezellularisierten Herzen in der histologischen Untersuchung vollkommen frei von Zellkernen und kontraktile

Elementen darstellten, zeigte sich die kardiale EZM hochgradig konserviert. Matrixkomponenten wie Kollagen Typ I und III, Laminin und Fibronectin, die arteriellen und venösen Basalmembranen der Koronargefäße sowie die Ausrichtung und Zusammensetzung der Faserbestandteile konnten erhalten werden. Der Dezellularisierung der Herzen folgte die Rebesiedlung der kardialen EZM mit neonatalen Rattenkardiomyozyten und die Kultivierung in einem Bioreaktorsystem. Mit dessen Hilfe konnte eine kontinuierliche Perfusion der Organe mit Nährmedium gewährleistet werden. Bereits 8 Tage nach erfolgter Rebesiedlung zeigten die Herzen nach elektrischer Stimulation makroskopisch sichtbare Kontraktionen. Die Pumpfunktion dieser Herzen entsprach dabei in etwa 2% der eines adulten Rattenherzens und zu 25% der eines 16-wöchigen fetalen humanen Herzens [38]. Trotz dieser bei Weitem noch unzureichenden Pumpfunktion verdeutlichte diese Arbeit auf eindrucksvolle Weise das Potential, *in vitro* funktionelles Herzmuskelgewebe oder sogar ein ganzes Herz auf der Basis einer durch Dezellularisierung gewonnenen kardialen EZM zu erzeugen.

Die natürliche EZM bietet als Gerüststruktur den großen Vorteil, nicht nur über eine bereits vorbestehende dreidimensionale makroskopische Gewebearchitektur zu verfügen, sondern den verwendeten Zellen auch eine natürliche Mikroumgebung zur Verfügung zu stellen [42]. Es ist bekannt, dass die EZM einen nicht unwesentlichen Einfluss auf das Zellverhalten nimmt und somit an verschiedenen Vorgängen wie zum Beispiel der Zelladhäsion, -proliferation, -differenzierung und -migration teilhat [43-45]. Um von diesen bedeutenden Eigenschaften einer intakten EZM profitieren zu können, werden hohe Anforderungen an die verschiedenen Dezellularisierungs-Verfahren gestellt. Von einem idealen Dezellularisierungsprotokoll wird erwartet, ein Gewebe selektiv von allen zellulären Bestandteilen sowie potentiell immunogene Antigenen zu befreien und dabei die Zusammensetzung, die physiologischen Eigenschaften und die mechanische Integrität der EZM weitestgehend zu bewahren [46].

Neben denjenigen *Tissue-Engineering*-Verfahren, die sich entweder die Verwendung von Hydrogelen oder von dezellularisierten extrazellulären Matrices zu Nutze machen, existieren verschiedene Arbeiten, welche die Kombination beider Trägersubstanzen beschreiben [39-41]. Dieser Ansatz zielt darauf ab, die jeweiligen Vorteile beider Materialien zu kombinieren. Als Beispiel für ein solches Verfahren können myokardiale Matrix-Hydrogele angesehen werden, die durch

Lyophilisierung und enzymatische Verdauung einer dezellularisierten kardialen EZM gewonnen werden [39]. In Form einer intramyokardialen Injektion nach Myokardinfarkt wurden diese Hydrogele bereits im Klein- und Großtiermodell eingesetzt. Im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe konnte mithilfe dieser Maßnahme die Pumpfunktion der infarzierten Herzen verbessert werden [41]. Ein weiteres Beispiel für den kombinierten Einsatz verschiedenartiger Trägersubstanzen stellt die in einer 2014 veröffentlichten Arbeit beschriebene Verbindung eines hydrogel-basierten kardialen Konstrukts mit der EZM eines dezellularisierten Schweinedarmsegments dar [40]. Dieses Verfahren machte es unter anderem möglich, durch die spezielle Matrixarchitektur des dezellularisierten Darmsegments eine geordnete Ausrichtung der Kardiomyozyten innerhalb des Hydrogel-Konstruktes zu induzieren.

Um die Ausrichtung von Kardiomyozyten innerhalb *tissue engineerter* Gewebe und damit auch deren Funktionalität im Sinne eines einheitlichen, synchronen und gerichteten Kontraktionsablaufs zu optimieren, wurden im Laufe der Zeit viele unterschiedliche Methoden entwickelt [40, 47-49]. Neben der oben bereits beschriebenen mechanischen Konditionierung konnte gezeigt werden, dass sich auch durch elektrische Stimulation *tissue engineerter* myokardialer Konstrukte *in vitro* nicht nur deren Funktionalität, sondern auch deren ultrastrukturelle Eigenschaften verbessern ließen [47]. Darüber hinaus verdeutlichen verschiedene Arbeiten die Bedeutung der zugrundeliegenden Matrixbeschaffenheit für die Ausrichtung und Differenzierung kardialer Zellen [40, 48, 49]. Durch die Modifikation der verwendeten Kulturoberflächen und der zellulären Mikroumgebung kann erheblicher Einfluss auf das Wachstums- und Differenzierungsverhalten der Zellen genommen werden. Solche Modifikationen beinhalten zum Beispiel die parallele Anordnung von Kollagenfasern in zweidimensionalen Zellkulturversuchen [49] oder die Veränderung der Mikroarchitektur dreidimensionaler Hydrogelstrukturen unter Verwendung von *Micropatterning*-Techniken mittels UV-Fotolithografie [48].

### **1.2.2 Funktionelle Vaskularisierung *tissue engineerter* Konstrukte**

Trotz der vielversprechenden Fortschritte im Bereich des myokardialen *Tissue Engineerings* existieren gegenwärtig immer noch einige zentrale Herausforderungen, die es zu meistern gilt, um eines Tages ein klinisch

anwendbares funktionelles Ersatzgewebe für erkranktes Myokard herstellen zu können [30]. Eine dieser Herausforderungen besteht in der funktionellen Vaskularisierung *tissue engineerter* Gewebe, die von einigen Autoren sogar als größte Herausforderung im *Tissue Engineering* angesehen wird [50].

Die Versorgung nahezu aller nativer Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie der Abtransport metabolischer Abfallprodukte erfordern ein komplexes, funktionierendes Gefäßnetzwerk [51]. Aber auch für eine uneingeschränkte Funktion des Immunsystems sowie für Entwicklungs-, Heilungs- und Regenerationsprozesse ist ein intaktes Gefäßsystem von entscheidender Bedeutung [52].

In einem solchen Gefäßsystem zweigen sich arterielle Gefäße immer weiter auf, bis sie schließlich ein dicht verwobenes Netz aus Kapillargefäßen formen. Hinter dem Kapillarbett vereinen sich diese Kapillaren zu Venolen, die sich wiederum zu Venen zusammenschließen, welche letztlich über die obere und untere Hohlvene den Abstrom des venösen Blutes zum rechten Herzen gewährleisten. In den meisten nativen Geweben befinden sich die Zellen in einem maximalen Abstand von 200  $\mu\text{m}$  zum nächstgelegenen Kapillargefäß [53], was in etwa der größtmöglichen Diffusionsstrecke von Sauerstoff im Gewebe entspricht [54].

Das Gefäßsystem des Herzens verfügt dabei über einen besonders komplexen Aufbau, der an den speziellen Anforderungen des arbeitenden Herzmuskelgewebes ausgerichtet ist [55]. Die das Herz versorgenden Arterien entspringen in Form einer linken und einer rechten Koronararterie der Aorta ascendens. Die Koronarostien sind dabei im Aortensinus gelegen, welcher unmittelbar kranial der Aortenklappe lokalisiert ist. Die größeren epikardial gelegenen Koronararterien zweigen sich schrittweise in immer kleiner werdende Arterien auf, die in das Herzmuskelgewebe eindringen. Diese intramural gelegenen Gefäße teilen sich weiter auf in Arteriolen und Kapillaren, die letztlich die Kardiomyozyten unmittelbar umgeben. Die venösen Gefäße des Herzens verlaufen überwiegend in Begleitung der Arterien, bevor sie schließlich das venöse Blut über den Koronarvenensinus in den rechten Vorhof drainieren [55].

Dem enormen Sauerstoffbedarf der Kardiomyozyten geschuldet [56] befindet sich immer mindestens ein Kapillargefäß in unmittelbarer Nachbarschaft einer Herzmuskelzelle [57]. Der Abstand zwischen einer kapillären Endothelzelle und dem nächstgelegenen Kardiomyozyten misst dabei nur etwa 1  $\mu\text{m}$  [55], bei einem

interkapillären Abstand von ungefähr 20  $\mu\text{m}$  [58]. Diese eindrucksvolle Gefäßdichte und die dadurch maximal reduzierte Diffusionstrecke gewährleisten einen optimalen Sauerstoff- und Nährstoffaustausch zwischen Blut und Herzmuskelgewebe [55]. Darüber hinaus sind durch die nur minimale Distanz zwischen Endothelzellen und Kardiomyozyten bestmögliche Voraussetzungen für eine direkte Interaktion der beiden Zelltypen geschaffen. Es ist mittlerweile bekannt, dass das Zusammenspiel zwischen Endothel und Myokard nicht nur während der embryonalen Kardiogenese, sondern auch für grundlegende physiologische Funktionen des Herzens von elementarer Bedeutung ist [57].

Als Endothel wird dabei die Gesamtheit aller Endothelzellen bezeichnet, die in Form einer konfluenten Zellschicht die luminaire Oberfläche der Blutgefäße bedecken [59]. Nicht nur für die Entwicklung und Funktion des Herzens, sondern auch im Rahmen vieler für das Herz und den Gesamtorganismus bedeutsamer physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge spielt das Endothel eine entscheidende Rolle [59-63].

So kommt ihm eine herausragende Bedeutung in der Aufrechterhaltung eines Gleichgewichtes zwischen pro- und antithrombotischen Prozessen zu [61]. Ein funktionierendes Endothel nämlich schafft die Voraussetzung für einen ungehinderten Blutfluss durch das Gefäßsystem, indem es die unkontrollierte Entstehung eines Thrombus verhindert. Dies wird durch die endotheliale Expression verschiedener antithrombotisch wirkender Mediatoren erreicht, wozu neben zahlreichen anderen das transmembranäre Protein Thrombomodulin, der gewebespezifische Plasminogenaktivator (*tissue-type plasminogen activator*, t-PA) oder der endotheliale Protein-C-Rezeptor (EPCR) gezählt werden [59]. Andererseits übernimmt das Endothel die essentielle Aufgabe, im Falle einer Verletzung der Gefäßwand die Entstehung eines lokalen Thrombus zu fördern, indem es auch prothrombotische Substanzen wie zum Beispiel den Von-Willebrand-Faktor (vWF) oder den Gerinnungsfaktor Gewebethromboplastin (*tissue factor*) synthetisiert [59]. Neben seinem bedeutenden Einfluss auf die Homöostase des Gerinnungssystems dient das Endothel auch als semipermeable Barriere, die für einen geordneten Austausch von Flüssigkeiten und den darin gelösten Substanzen zwischen Blut und Interstitium verantwortlich ist [63]. Der Stoffaustausch zwischen den beiden Kompartimenten erfolgt dabei entweder über trans- oder parazelluläre Transportwege. Als dynamische Barriere greift das

Endothel in diese Transportprozesse ein. Es ist in der Lage, die parazelluläre Permeabilität durch die Expression oder den Abbau interzellulärer Adhäsionsproteine zu modifizieren [63]. Darüber hinaus werden von Endothelzellen auch Zelladhäsionsproteine und verschiedene Signalmoleküle exprimiert, die eine exakt koordinierte Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen und damit die Leukodiapedese im Rahmen inflammatorischer Geschehen ermöglichen [62]. Auch an der Regulation des Gefäßtonus und damit auch des Blutdruckes ist das Endothel maßgeblich beteiligt [61]. Durch die Synthese und Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) durch die Endothelzellen wird eine Relaxierung der glatten Gefäßmuskelzellen erreicht [61]. Einen ähnlichen Effekt erzielt auch das der Gruppe der Prostaglandine angehörende Prostacyclin (Prostaglandin I<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>), das ebenfalls von Endothelzellen synthetisiert wird [61]. Als Gegenspieler dieser wichtigen vasodilatatorisch wirkenden Substanzen agiert das Peptid Endothelin, welches die Gefäßmuskulatur zur Kontraktion anregt [61]. Neben zahlreichen weiteren, den Gefäßtonus beeinflussenden Substanzen wird auch der Vasokonstriktor Endothelin von Endothelzellen bereitgestellt [61]. Außer den bereits genannten Funktionen wirken Endothelzellen zudem als wichtige Initiatoren der Angiogenese, die als Hauptmechanismus im Zuge der Entstehung neuer Gefäße bei Erwachsenen angesehen wird [60].

Angesichts dieser zahlreichen Aufgaben und Funktionen wird deutlich, wie wichtig ein gut endothelialisiertes und reich verzweigtes Gefäßnetzwerk für die Vitalität und Funktionalität *tissue engineerter* Gewebe und Organe ist. Insbesondere im Rahmen künftiger *in vivo* Anwendungen wird die Blut-Perfusion dieser artifiziellen Gewebe über ein funktionierendes Gefäßsystem für deren langfristiges Überleben nach einer Implantation von entscheidender Bedeutung sein. Bisher beschränkt sich das Spektrum erfolgreicher *in vivo* Anwendungen vor allem auf relativ dünne oder avaskuläre Gewebe wie zum Beispiel Haut oder Knorpelgewebe [51]. Die geringeren metabolischen Ansprüche dieser Gewebe erlauben den Verzicht auf ein reich verzweigtes Gefäßsystem. Für die Herstellung dickerer und metabolisch anspruchsvollerer Gewebe wie des Myokards stellt die funktionelle Vaskularisierung allerdings eine elementare Voraussetzung dar. Sie gilt nach wie vor als eine der bedeutendsten Herausforderung bei der Herstellung vieler Gewebe und Organe [50]. Deren Realisierung könnte daher als ein bedeutender

Fortschritt im Bereich des *Tissue Engineerings* und der regenerativen Medizin angesehen werden [51].

### 1.2.3 Aktuelle Vaskularisierungsstrategien

Im Laufe der letzten Jahre wurden viele verschiedene Strategien entwickelt, um der Herausforderung zu begegnen, bioartifizielle Gewebe mit einem funktionellen Gefäßsystem auszustatten [50]. Den weitaus meisten dieser Strategien liegen prinzipiell zwei verschiedene Ansätze zugrunde, die entweder auf einer *in vitro* oder einer *in vivo* induzierten Vaskularisierung *tissue engineerter* Gewebe basieren [50]. Darüber hinaus spielen der Einsatz verschiedener Wachstumsfaktoren und Adhäsionsproteine sowie die Auswahl einer für die funktionelle Vaskularisierung bioartifizieller Gewebe idealen Zelllinie eine bedeutende Rolle [50].

#### *In vitro* Vaskularisierung *tissue engineerter* Gewebe

Um *in vitro* bioartifizielle Gewebe mit einem funktionellen Gefäßsystem herstellen zu können, werden in der Regel verschiedene Gerüststrukturen mit vaskulären Zellen besiedelt [50].

Biologische Gerüststrukturen, die durch die Dezellularisierung verschiedener Gewebe oder ganzer Organe gewonnen wurden, bieten den großen Vorteil, bereits über ein präformiertes, natürliches Gefäßnetzwerk und ein hohes Maß an Biokompatibilität zu verfügen [50]. Als Beispiele für derartige biologische Gerüststrukturen können dezellularisierte Schweinedarmsegmente [64], Rattennieren [65] oder auch dezellularisierte Rattenherzen [38] genannt werden. Durch Rebesiedlung mit endothelialen Zellen können die zunächst avitalen Gefäßstrukturen dieser Organe mit einer funktionellen Zellschicht ausgekleidet werden.

Als synthetische Gerüststrukturen hingegen kommen häufig Hydrogele zum Einsatz [50]. Um die Porosität der Hydrogele und damit auch deren Vaskularisierungspotential zu vergrößern, ist es möglich, die Vernetzung der enthaltenen Polymere zu verändern [66]. Auch durch die Anwendung sogenannter *Electrospinning*-Verfahren wird versucht, poröse Gerüststrukturen aus Polymerlösungen herzustellen [67]. Angelehnt an das natürliche Kapillargefäßsystem

befassen sich wiederum andere Ansätze damit, verschiedene Hydrogel-Materialien mit einem System tubulärer Hohlräume zu versehen [68]. Dieses Ziel verfolgend wurden in den letzten Jahren zahlreiche Methoden etabliert, die von verschiedenen Gussverfahren [69] über *Photopatterning*-Techniken [70] bis hin zu sogenannten *Bioprinting*-Verfahren [71] reichen. All diese Methoden vereint die Bestrebung, die Mikroarchitektur der verwendeten Trägersubstanzen kontrolliert modifizieren zu können. Dadurch soll es ermöglicht werden, Hydrogel-Konstrukte mit einer porösen Struktur oder gar einem komplexen, dem nativen Blutgefäßsystem ähnlichen Netzwerk aus Mikrokanälen auszustatten. Der Stoffaustausch soll auf diese Weise auch im Inneren größerer und damit künftig klinisch anwendbarer Hydrogel-Konstrukte optimiert werden. [68]. Synthetische Trägersubstanzen verfügen zwar nicht über ein natürliches, vorgeformtes Gefäßsystem, haben aber in der Regel den Vorteil einer größeren Formvariabilität und einer einfacheren Produktion in größeren Stückzahlen mit einheitlichen Eigenschaften [50].

#### *In vivo* Vaskularisierung *tissue engineerter* Gewebe

Neben denjenigen Verfahren, die darauf abzielen, *tissue engineerter* Gewebe *in vitro* mit einem funktionellen Gefäßsystem auszustatten, existieren weitere Strategien, durch die primär avaskuläre Gewebe nach deren Implantation eine Vaskularisierung *in vivo* erfahren sollen [50]. Diese Vaskularisierung *in vivo* basiert in erster Linie auf natürlichen Angio- und Vaskulogenese-Prozessen [50]. Als Angiogenese wird dabei die Aussprossung von Kapillaren aus bereits bestehenden Blutgefäßen bezeichnet [72]. Der Begriff Vaskulogenese beschreibt hingegen einen Vorgang, bei dem es durch die Neuordnung noch undifferenzierter Endothelzellen *in situ* zur Entstehung neuer Gefäßstrukturen kommt [73].

Im Rahmen der *in vivo* Vaskularisierung werden zunächst avaskuläre Gewebe nach deren Implantation in einen Empfängerorganismus von Gefäßen infiltriert [50]. Die auf diese Weise prävaskularisierten Konstrukte können dann, nach deren Explantation, einem weiteren Organismus implantiert werden [74]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich innerhalb kurzer Zeit Anastomosen zwischen dem implantierten prävaskularisierten Gewebe und dem Gefäßsystem des Empfängers ausbilden können [74]. Ein häufig angewandtes System zur *in vivo*

Vaskularisierung artifizierender Gewebekonstrukte ist das arteriovenöse Gefäßschleifenmodell (*AV-Loop-Model*) [53]. Durch ein venöses Gefäß oder eine synthetische Gefäßprothese wird ein Shunt zwischen einem venösen und einem arteriellen Gefäßabschnitt angelegt, wodurch eine arteriovenöse Gefäßschleife erzeugt wird. Diese Gefäßschleife wird in eine Kunststoffkammer eingebettet, die entweder nur die arteriovenöse Gefäßverbindung an sich [75] oder zusätzlich extrazelluläre Matrixmaterialien zur Vaskularisierung enthält [76]. Mithilfe dieses Systems, das sich die natürlichen Angio- und Vaskulogenese-Prozesse zu Nutze macht, ist es möglich, vaskularisierte Konstrukte unterschiedlicher Gewebearten *in vivo* anzufertigen. So wurde das arteriovenöse Gefäßschleifenmodell bereits zur Vaskularisierung von artifiziellem Knochen [77], Herz- [78] und auch Skelettmuskel ähnlichem Gewebe [79] angewandt. Auch unter Verwendung der bereits beschriebenen Zell-*Monolayer* wurde schon versucht, *in vivo* ein vaskularisiertes, kardiales Gewebekonstrukt zu erzeugen [80]. Dabei gelang es, mehrere *Monolayer* neonataler Kardiomyozyten im Zuge wiederholter Operationen im Subcutangewebe von Ratten zu einem etwa 1 mm dicken myokardialen Gewebe aufzuschichten. Die schrittweise Kombination der einzelnen Zellschichten in zeitlichen Intervallen von bis zu drei Tagen ermöglichte die zwischenzeitliche Einsprossung eines dichten Gefäßnetzwerkes in die Zellschicht-Konstrukte [80].

#### Zur Vaskularisierung eingesetzte Wachstumsfaktoren und Adhäsionsproteine

Wie eingangs bereits erwähnt, umfassen die Vaskularisierungsstrategien im *Tissue Engineering* auch die Verwendung verschiedener Wachstumsfaktoren [81]. Dazu zählen unter anderem bedeutende Angio- und Vaskulogenesefaktoren wie zum Beispiel der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) oder auch der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) [81, 82]. Diese spielen eine entscheidende Rolle bei der Bildung neuer Blutgefäße. Insbesondere an Prozessen wie der Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen, der Zellmigration und der Ausbildung tubulärer Zellformationen sind diese beiden Faktoren maßgeblich beteiligt [82]. Durch die Integration derartiger Wachstumsfaktoren in *tissue engineerte* Gewebekonstrukte lässt sich deren Vaskularisierungspotential optimieren [83]. So konnte gezeigt werden, dass sich die Ausbildung von Gefäßen in einem porösen Polymergerüst durch die Einbindung von VEGF und dem Wachstumsfaktor Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) deutlich verbessern

lässt [83]. Zur Optimierung der Zelladhäsion und zur kontrollierten räumlichen Anordnung von Zellen innerhalb dreidimensionaler Gerüststrukturen können deren zu Grunde liegende Trägersubstanzen zum Beispiel mit der RDG- (Arginin-Glycin-Asparaginsäure) Peptidsequenz ausgestattet werden, die für die Ausbildung von Zellkontakten mit dem Matrixprotein Fibronectin von entscheidender Bedeutung ist [84, 85]. Vor diesem Hintergrund wird auch die Beschichtung von Trägersubstanzen mit Fibronectin erfolgreich angewendet [86].

#### Zur Vaskularisierung verwendete Zellarten

Neben der Auswahl einer idealen Trägersubstanz und deren Modifikation durch die Applikation verschiedener Wachstumsfaktoren und Adhäsionsproteine spielt auch die Frage nach der Verwendung einer geeigneten Zelllinie eine wichtige Rolle [50]. Im Rahmen verschiedener *in vitro* Modelle zur Untersuchung von Angio- und Vaskulogenese wurden bisher verschiedene endotheliale Zellen verwendet [87]. Darunter sind unter anderem humane Nabelschnurendothelzellen (HUVECs), humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMECs), bovine aortale Endothelzellen (BAECs) oder auch bovine kapilläre Endothelzellen (BCEs) zu finden [87]. Als nachteilig bei der Verwendung solcher primärer Endothelzellen können deren limitierte Verfügbarkeit sowie eingeschränkte Proliferationskapazität angesehen werden [88]. In den vergangenen Jahren wurden daher vermehrt auch endotheliale Progenitorzellen (EPCs) wie zum Beispiel sogenannte Endothel-Kolonie-bildende-Zellen (ECFCs) eingesetzt [52]. In mehreren Arbeiten konnte zudem gezeigt werden, dass sich durch die Kokultivierung von Endothelzellen mit nicht-endothelialen Zellen die Vaskularisierung bioartifizieller Gewebe positiv beeinflussen lässt [89-91]. Diese Beobachtung konnte unter anderem für die Kokultivierung mit Osteoblasten [91], Präadipozyten [89] und auch Fibroblasten [90] gemacht werden. Für den positiven Einfluss einer zweiten Zelllinie scheinen insbesondere parakrine Effekte verantwortlich zu sein, welche die erwünschten Angiogenese-Prozesse induzieren und aufrechterhalten [92].

### **1.3 Zielsetzung der Arbeit**

Auch wenn in den vergangenen Jahren bereits zahlreiche vielversprechende Fortschritte im Bereich des kardiovaskulären *Tissue Engineerings* gemacht wurden, stellt uns die Suche nach einem bioartifiziellen Gewebeersatz für

erkranktes Myokard auch gegenwärtig noch vor große Herausforderungen. Als eine der größten Hürden, die es dabei auf dem Weg zum *tissue engineerter* myokardialen Gewebeersatz zu überwinden gilt, kann die funktionelle Vaskularisierung *tissue engineerter* Gewebe angesehen werden [50]. Die Bewältigung dieser Herausforderung scheint für die Entwicklung eines vitalen, ausreichend großen und damit klinisch anwendbaren Herzmuskelgewebes unumgänglich zu sein. Daher bedarf es kardialer Modellsysteme, mit deren Hilfe wir die komplexe Biologie der Koronargefäße und des Myokards replizieren und damit besser verstehen können.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, ein solches *in vitro* Modellsystem durch die Rebesiedlung einer natürlichen, kardialen EZM zu entwickeln. Dafür sollten in einem ersten Schritt native Rattenherzen unter Verwendung eines softwaregesteuerten Langzeitperfusionssystems mittels druckkontrollierter Koronarperfusion *in toto* standardisiert dezellularisiert werden. In einem weiteren Schritt sollte die auf diese Weise gewonnene dezellularisierte kardiale EZM funktionellen Untersuchungen unterzogen werden.

Um aus den *in toto* dezellularisierten Rattenherzen ein standardisiertes, kardiales *in vitro* Modell herstellen zu können, sollte im Rahmen dieser Arbeit außerdem ein standardisiertes Präparationsverfahren entwickelt werden. Dadurch sollte die kardiale EZM einer einfachen und direkten makro- und mikroskopischen Beurteilung zugänglich gemacht werden, ohne dabei auf die Möglichkeiten einer sterilen Kultivierung sowie einer selektiven koronararteriellen Perfusion verzichten zu müssen.

Um die Rebesiedlungs- und insbesondere auch die Re-Endothelialisierungskapazität der dezellularisierten EZM zu untersuchen, zielte diese Arbeit außerdem darauf ab, das kardiale *in vitro* Modell mit verschiedenartigen Zelltypen zu besiedeln. Nebst der Verwendung einer murinen Fibroblasten-Zelllinie sollten dafür auch humane Endothelzellen und neonatale Rattenkardiomyozyten zum Einsatz kommen. Darüber hinaus sollte durch die simultane Besiedlung des Intra- und Extravasalraumes mit letztgenannten Zelltypen die Etablierung einer kontrollierten, dreidimensionalen Kokultur innerhalb des kardialen Matrix-Gerüsts erreicht werden. Zur Evaluation der Rebesiedlungsverfahren sollten deren Effektivität, Selektivität und Funktionalität quantitativ und qualitativ untersucht werden.

Angesichts potentieller *in vivo* Anwendungen *tissue engineerter* Gewebe in naher Zukunft war es zudem vorgesehen, im Rahmen dieser Dissertation auch die Hämokompatibilität des kardialen Modellsystems *in vitro* zu untersuchen. Dafür wurden sowohl azelluläre als auch rebesiedelte Koronargefäße des beschriebenen Modellsystems einer Perfusion mit humanem Vollblut unterzogen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Explantation und Präparation der Herzen

Venenverweilkanüle (17G)	B. Braun, Art.-Nr.: 4268156S-01
Nahtmaterial (Polypropylen, 3-0)	Ethicon, Art.-Nr.: EH7694H
Titan-Gefäßclips	Vitalitec, Art.-Nr.: J1108-1
Jonosteril®	Fresenius Kabi, PZN: 7815900
Heparin-Natrium	Rotexmedica GmbH, PZN: 3862340
Isofluran	Actavis, PZN: 07253744
Xylazinhydrochlorid	Bayer AG, PZN: 1320422
Ketavet®	Pfizer, PZN: 03151811

#### 2.1.2 Dezellularisierungsprotokoll

SDS Pellets	Carl Roth, Art.-Nr.: CN30.2
Natriumdesoxycholat	Amresco, Art.-Nr.: 0613
Natriumazid	Carl Roth, Art.-Nr.: K 305.2
PBS	Gibco, Art.-Nr.: 14190-094
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Art.-Nr.: 15140

#### 2.1.3 Epoxidharzperfusion und Mikro-Computertomographie

1ml Spritze	B. Braun, Art.-Nr.: 9161406V
E 20 plus, rot (Epoxidharz)	Biodur®, Art.-Nr.: KEP04A1.0
E 20 plus Härter (Härter für E 20 plus)	Biodur®, Art.-Nr.: KEH05A0.6
Röntgenkontrastmittel	GE Healthcare GmbH, PZN: 2708401

### 2.1.4 Protein-Diffusions-Analyse

Präzisions-Spritzenpumpe	B. Braun, Art.-Nr.: 8713820
50ml Spritze	B. Braun, Art.-Nr.: 8728844F
28G Mikrokatheter	Vygon, Art.-Nr.: 1261.206
BSA, Alexa Fluor® 555 conjugate	Invitrogen Corp., Art.-Nr.: A34786
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: A7906-100G
Bildschirm-Recorder-Software	Bandisoft, Bandicam

### 2.1.5 Zellkulturstudien

DMEM + GlutaMAX™-I	Gibco, Art.-Nr.: 21885
Fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: F7524
Trypsin/EDTA	Gibco, Art.-Nr.: 25200-056
Endothelzellmedium	Promocell, Art.-Nr.: C22120
Collagenase II	Gibco, Art.-Nr.: 17101-015
Calcein/Ethidiumbromid	Invitrogen Corp., Art.-Nr.: L3224
Propidium Iodid	Invitrogen Corp., Art.-Nr.: P 3566
SYBR® Green	Invitrogen Corp., Art.-Nr.: S-7567
CMFDA	Invitrogen Corp., Art.-Nr.: C2925
CMPX	Invitrogen Corp., Art.-Nr.: C34552
Dil-acLDL	Invitrogen Corp., Art.-Nr.: L-3484
Kollagen	Corning, Art.-Nr.: 354236
L-Glutamin	Gibco, Art.-Nr.: 25030-024
6-Well-Platte	Starlab GmbH, Art.-Nr.: CC7672-7506
24-Well-Platte	Starlab GmbH, Art.-Nr.: CC7672-7524
PP-Röhrchen, steril (50ml)	Greiner Bio-One GmbH, Art.-Nr.: 227261
Gewebekulturflasche (75cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One GmbH, Art.-Nr.:658175
3ml Spritze	B. Braun, Art.-Nr.: 4617022V

20ml Spritze	B. Braun, Art.-Nr.: 4617207V
100 µm Zellsieb	Biologix, Art.-Nr.: 15-1100

### 2.1.6 Histologie

Roti <sup>®</sup> -Histokitt II (Einschlussmittel)	Carl Roth, Art.-Nr.: T160.1
Jung Einbettmedium	Leica, Art.-Nr.: 020108926
Roti <sup>®</sup> -Histofix 4%	Carl Roth, Art.-Nr.: P087.3
Shandon Gill 3 Hematoxylin	Thermo Scientific, Art.-Nr.: 6765009
Eosin B	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: 861006-100G
Xylen	VWR Int. GmbH, Art.-Nr.: 28973.328
Essigsäure (Eisessig), 100%	Merck KGaA, Art.-Nr.: 1.00066.1000
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: 101158002
Formaldehyd-Lösung, 37%	NeoLab, Art.-Nr.: 4025.1000
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: S-1648
Alcianblau 8GX	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: A5268-10G
Hematoxylin	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: H3136-25G
Eisen(III)-chlorid Hexahydrat	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: 236489-100G
Jod	Carl Roth, Art.-Nr.: 7935.1
Kaliumjodid	Carl Roth, Art.-Nr.: 8491.1
Brilliantcrocein R	Chroma/Waldeck, Art.-Nr.: 1B-109
Säurefuchsin	Chroma/Waldeck, Art.-Nr.: 1B-525
Phosphorwolframsäure Hydrat	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: 79690-100G
Saffron du Gatinais	Chroma/Waldeck, Art.-Nr.: 5A-394
Salzsäure, 37%	Merck KGaA, Art.-Nr.: 1.00317.1000
Ammoniumhydroxid	Carl Roth, Art.-Nr.: CP17.1
Vectashield <sup>®</sup> mit DAPI	Vector Laboratories, Art.-Nr.: H-1200
Rhodamine phalloidin	Invitrogen Corp., Art.-Nr.: R415

Aceton	Merck KGaA, Art.-Nr.: 1.00013.2500
PBS	Sigma-Aldrich, Art.-Nr.: 79382-50TAB

### 2.1.7 Geräte

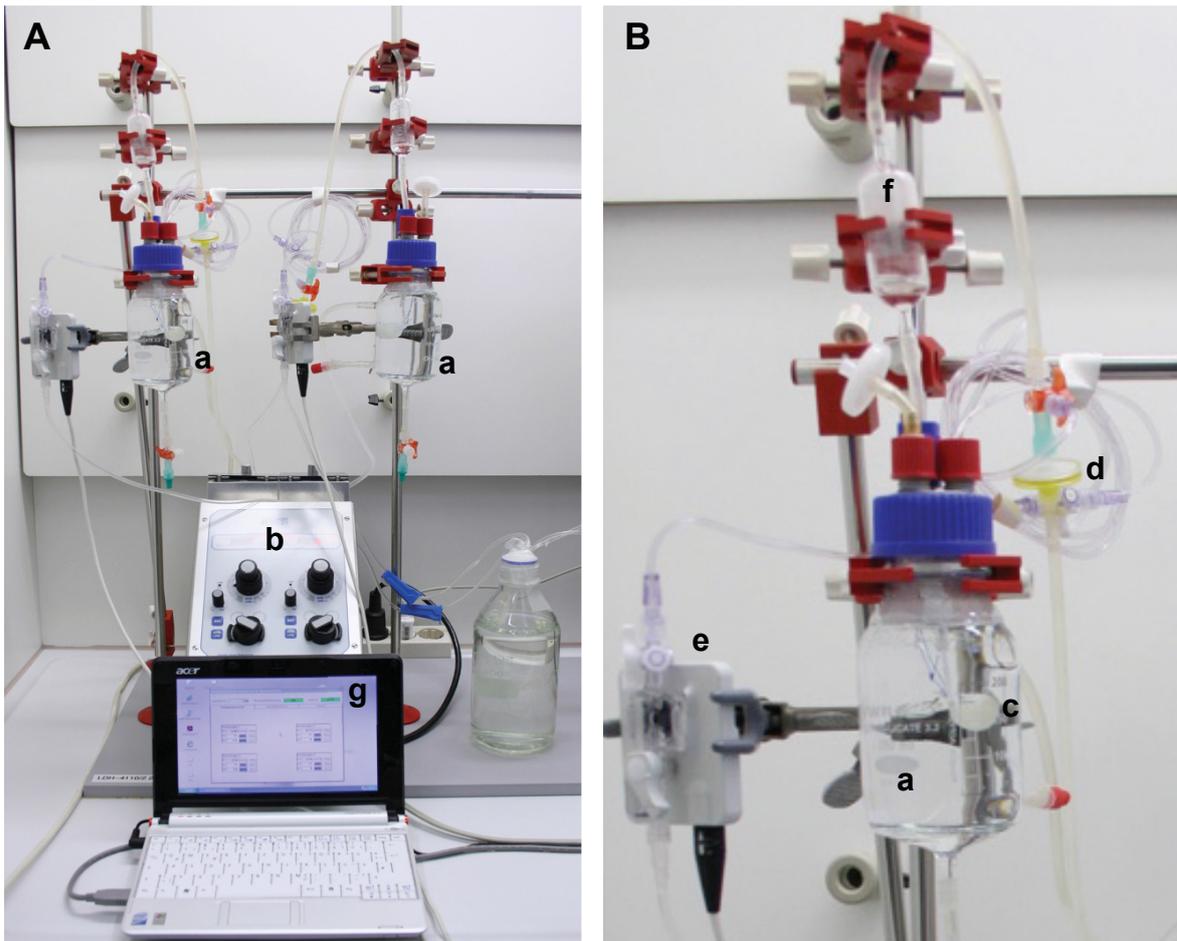
Inversmikroskop DM IL LED	Leica
Durchlichtmikroskop DM 2000	Leica
Lichtquelle EL 6000	Leica
Mikroskopkamera DFC425 C	Leica
Leica Application Suite, Version 3.8.0	Leica
Stereo-Mikroskop SLM 1	Karl Kaps
Konfokalmikroskop LSM 700	Zeiss
Spiegelreflexkamera EOS 400d	Canon
Kryostat CM 1950	Leica
Sicherheitswerkbank Herasafe KS 18	Thermo Scientific
Brutschrank Hera cell 240i	Thermo Scientific
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus

### 2.1.8 Langzeitperfusionssystem

Für die Dezellularisierung der Rattenherzen wurde ein automatisiertes Organperfusionssystem (Abb. 1) verwendet, das in der Arbeitsgruppe von Prof. Lichtenberg entwickelt worden war [93]. Es ermöglicht die *in toto* Dezellularisierung ganzer Rattenherzen durch einen softwaregesteuerten Regelkreis, der die druckkontrollierte Perfusion des Koronarsystems mit den entsprechenden Dezellularisierungslösungen vollautomatisiert steuert. Der Perfusionskreislauf beinhaltet dabei das zu dezellularisierende Rattenherz, während der softwaregesteuerte Regelkreis die Aufrechterhaltung eines kontinuierlich konstanten Druckes innerhalb dieses Perfusionskreislaufs ermöglicht.

### Perfusionskreislauf

Der geschlossene Perfusionskreislauf setzt sich dabei aus einem Silikonschlauch und einer Perfusionskammer zusammen. Bei der Perfusionskammer handelt es sich um eine 250 ml fassende, eigens hergestellte Laborglasflasche (Abb. 1 B). Sie beinhaltet das zu dezellularisierende Herz und ist über einen Ein- und einen Auslass mit je einem Ende des Silikonschlauches verbunden und somit in den Perfusionskreislauf integriert. Der Einlass wird von einem der beiden freien Enden des Silikonschlauches gebildet, das durch einen speziell dafür angelegten Zugang über den Deckel der Glasflasche in diese hineinragt. Den Auslass stellt eine Glasolive an der Seitenwand der Perfusionskammer dar, die mit dem anderen Ende des Silikonschlauches verbunden ist. Die Förderung des Perfusats durch das Schlauchsystem wird von einer Rollerpumpe (Abb. 1 A) bewerkstelligt, in die der Silikonschlauch eingespannt ist. Insgesamt werden zwei Doppelpumpen mit je zwei Rollerpumpen verwendet, so dass zeitgleich unabhängig voneinander vier Perfusionskreisläufe betrieben werden können. Je einer dieser Kreisläufe kann dabei zur Dezellularisierung eines Herzens herangezogen werden. Die Perfusion der Rattenherzen erfolgt dabei retrograd über die mit einer 17G-Venenverweilkanüle kanülierte Aorta ascendens. Diese Kanüle steht wiederum über einen Luer-Lock-Anschluss direkt mit dem in die Perfusionskammer hineinragenden zuführenden Schenkel des Schlauchsystems in Verbindung. Die Drainage des Perfusats vollzieht sich, nach Passage des Koronarsystems, über den rechten Vorhof. Das Perfusat wird dabei von der Perfusionskammer aufgefangen und über den Auslass der Kammer wieder in den Perfusionskreislauf eingespeist. Das zu dezellularisierende Rattenherz (Abb. 1 B) ist dabei innerhalb der Perfusionskammer zu jedem Zeitpunkt des Dezellularisierungsprozesses vollständig von Perfusat umspült. In Serie vor das Organ geschaltet befinden sich außerhalb der Perfusionskammer ein Spritzenvorsatzfilter (Polyethersulfon-Membran, 0,45 µm Porengröße) (Abb. 1 B), ein Drucksensor (Abb. 1 B) und eine Blasenfalle (Abb. 1 B). Der Filter dient dazu, den im Zuge der Dezellularisierung anfallenden Zelldebris aus der Dezellularisierungslösung zu entfernen. Durch die Blasenfalle wird ein Einschwämmen von Luftblasen in die Koronargefäße der Herzen und damit deren Verlegung verhindert. Über den Drucksensor erfolgt die Erfassung der im Perfusionskreislauf herrschenden Druckverhältnisse.

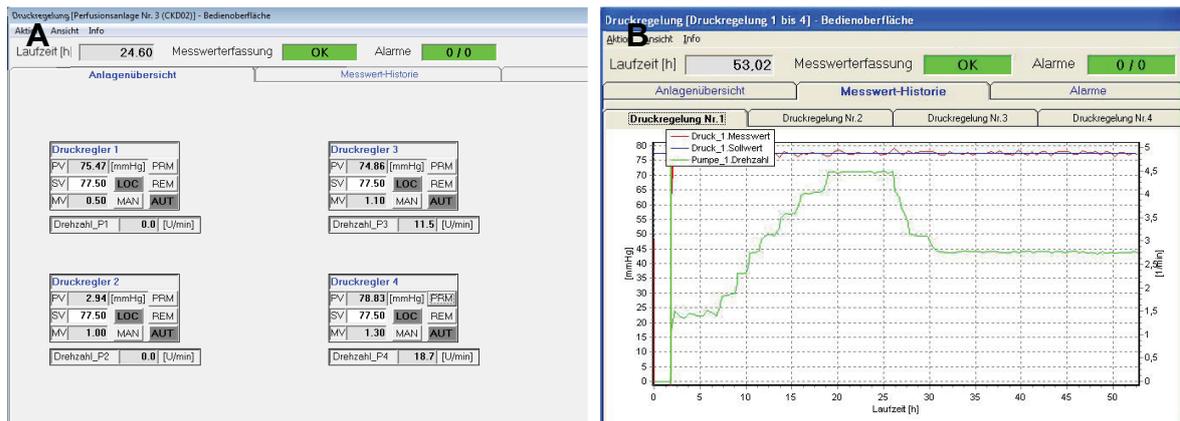


**Abb. 1: Softwaregesteuertes Langzeitperfusionssystem zur standardisierten Organ-Dezellularisierung.** (A), Ansicht zweier Perfusionskreisläufe. (B), Detailansicht von Perfusionskammer und Komponenten des Perfusionskreislaufs. a, Perfusionskammer; b, Doppelpumpe mit zwei Rollerpumpen; c, Dezellularisiertes Rattenherz innerhalb der Perfusionskammer; d, Spritzenvorsatzfilter; e, Drucksensor; f, Blasenfalle; g, Notebook mit Steuerungssoftware. Abbildung veröffentlicht: Hug Aubin, Alexander Kranz, Jörn Hülsmann, Artur Lichtenberg, Payam Akhyari, *Decellularized whole heart for bioartificial heart*. *Methods in Molecular Biology*, 2013. 1036: p. 163-78. Wiedergabe vom Verlag (Springer Science+Business Media New York) genehmigt.

### Softwaregesteuerter Regelkreis

Das zentrale Steuerelement des Regelkreises ist die eigenes geschriebene und auf einem mit Windows betriebenen Notebook (Abb. 1 A) installierte Steuerungssoftware. Das Messsignal des unmittelbar vor dem Rattenherz in Reihe geschalteten Drucksensors wird nach Umwandlung in einem Messwerterfassungsmodul an die Steuerungssoftware weitergeleitet. Diese ermittelt dann über einen PID (Proportional-Integral-Differential)-Kontrollalgorithmus die erforderliche Drehzahl der Rollerpumpen, um einen zuvor vom Benutzer festgelegten Druck-Sollwert aufrechtzuerhalten. Dabei wird der Druck für

jeden Perfusionskreislauf gesondert erfasst und entsprechend geregelt, so dass simultan vier autonome Dezellularisierungsprozesse unterhalten werden können. Das von der Software auf Grundlage des PID-Kontroll-Algorithmus generierte Signal wird nach Umwandlung durch ein Steuerungsmodul letztlich an die Rollerpumpen übermittelt. Auf diese Weise gelingt es, den gewählten Perfusionsdruck während des gesamten Zeitraums der Dezellularisierung automatisch konstant zu halten. Über die Desktopansicht der Steuerungssoftware kann zu jedem Zeitpunkt der laufenden Perfusion der vom Drucksensor erfasste Druck-Istwert in entsprechender Angabe in mmHg abgelesen werden (Abb. 2 A). Außerdem wird über die Benutzeroberfläche der Software stets die aktuelle Pumpendrehzahl sowie der gewählte Druck-Sollwert angezeigt (Abb. 2 A). Der Perfusionsdruck sowie die Pumpendrehzahl werden darüber hinaus während des gesamten Dezellularisierungsprozesses aufgezeichnet und als Kurvenverlauf entlang einer Zeitachse dargestellt (Abb. 2 B).



**Abb. 2: Benutzeroberfläche der Steuerungssoftware.** (A), Anzeige der Druck Soll- und Istwerte sowie der aktuellen Pumpendrehzahlen für jeden der vier Perfusionskreisläufe. (B), Aufzeichnung und Darstellung des zeitlichen Verlaufs des Perfusionsdruckes sowie der Pumpendrehzahl während des Dezellularisierungsprozesses.

### Bestandteile des Langzeitperfusionsystems

Laborglasflasche (Perfusionskammer) Schott-Duran, Art.-Nr.: 21 801 24 5

Silikonschlauch Roth, Art.-Nr.: 9580.1

Rollerpumpe Stöckert, Art.-Nr.: 10-25-00

Spritzenfilter (hydrophil, 0,45 µm) Sartorius GmbH, Art.-Nr.: 16555K

3-Wege-Hahn B. Braun, Art.-Nr.: 4095120

Drucksensor	Smiths Medical, Medex™ LogiCal®-Drucksensor, MX 1960
Messewerterfassungsmodul	Advantech, ADAM-4018 Remote-I/O-Modul
Steuerungsmodul	Advantech, ADAM-4024 Remote-I/O-Modul
Steuerungssoftware	engineo GmbH
Notebook	Acer, Aspire one ZG5
Betriebssystem	Microsoft, Windows XP Home Edition

### 2.1.9 Spendertiere

Als Spendertiere für die *in toto* Dezellularisierung von Rattenherzen dienten ausschließlich gesunde männliche Wistar-Ratten mit einem Lebendgewicht zwischen 350 und 450 g. Alle Versuchstiere wurden über die Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Direktor: PD Dr. med. vet. Martin Sager) bezogen. Sämtliche Organentnahmen wurden gemäß dem durch das LANUV NRW (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, Leibnizstraße 10, 45659 Recklinghausen) genehmigten Organentnahmeantrag (Aktenzeichen A/224/2009) durchgeführt.

Als Spendertiere für die Isolation neonataler Rattenkardiomyozyten kamen neonatale Wistar-Ratten zum Einsatz. Die Entnahme aller für die Zellisolation herangezogenen Herzen fand entsprechend dem durch das LANUV NRW genehmigten Organentnahmeantrag (Organentnahmeantrag ZETT HHU 093/13) statt.

Vor Ausführung der im Folgenden aufgezeigten tierexperimentellen Versuche durch den Doktoranden hat dieser an der 40-stündigen versuchstierkundlichen Einführung für wissenschaftliche Mitarbeiter, Doktoranden und Studenten durch die Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erfolgreich teilgenommen und damit den Fachkundenachweis gemäß § 9 des geltenden Tierschutzgesetzes erworben.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Explantation und Präparation der Herzen

Die Explantations- und Präparationsarbeiten wurden im Tier-OP des Instituts für Experimentelle Chirurgie der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf (Universitätsklinikum Düsseldorf, Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie, Moorenstr. 5, 40225 Düsseldorf) durchgeführt. Die Narkotisierung der Tiere erfolgte zunächst in einer luftdicht verschlossenen Glasglocke. Dabei wurde zu dem sich in der Glasglocke befindlichen Versuchstier ein mit Isofluran getränkter Tupfer hinzugefügt, wodurch nach wenigen Minuten eine Narkotisierung des Tieres erreicht wurde. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde dem Spendertier ein 3%-iges Isofluran-Sauerstoff-Gemisch über eine Gesichtsmaske zugeführt. Vor Beginn der Operation erfolgte eine einmalige subkutane Injektion von Xylazin (8 mg/kg KG) und Ketamin (120 mg/kg KG). Nach Erlöschen der Schutzreflexe wurde mittels einer medianen Laparotomie der Bauchraum eröffnet. Das Anheben und Verlagern des Darmkonvoluts nach extraabdominell ermöglichte den Zugang zum Retroperitoneum. Mittels zweier Wattestäbchen wurde dann sowohl die Vena cava inferior als auch die Aorta abdominalis vorsichtig vom umliegenden Gewebe befreit. In einem nächsten Schritt erfolgte die Injektion von 1000 IE Heparin-Natrium in die Vena cava inferior. Für die Punktion des Gefäßes diente eine 27G-Kanüle. Um eine ausreichende systemische Zirkulation des Heparins zu erreichen, wurde nach der Injektion 5 min abgewartet, bevor die Dosis der Gasnarkotika maximal erhöht wurde und die anschließend durchgeführte Durchtrennung der Aorta abdominalis zum Ausbluten des Tieres führte. Unmittelbar danach wurde der Thorax durch eine mediane Sternotomie eröffnet. Durch die Entfernung von Perikard und Thymus gelang die Freilegung des Herzens, des Aortenbogens sowie der supraaortalen Äste, die in einem nächsten Schritt in ihrem Verlauf möglichst distal abgesetzt wurden. Anschließend wurde unmittelbar kranial ihrer Durchtrittsstelle durch das Zwerchfell auch die thorakale Aorta durchtrennt und das Herz aus dem Thorax entnommen. Mittels einer 17G-Veneverweilkanüle erfolgte dann die Kanülierung der Aorta ascendens, wobei die Spitze der Kanüle stets distal der Aortenklappe zu liegen kam, so dass während des gesamten sich anschließenden Dezellularisierungsprozesses eine suffiziente Perfusion der Koronararterien sichergestellt war. Zur Fixierung der

Kanüle wurde ein Polypropylenfaden der Stärke 3-0 verwendet. Dabei wurden je drei Knoten zwischen den zweiten und dritten supraaortalen Ast sowie über den Truncus brachiocephalicus gelegt. Um schließlich das koronare Gefäßsystem von möglicherweise noch verbleibenden Blutkoageln zu befreien, wurden die Koronararterien mit 50 ml einer heparinisierten Jonosteril®-Infusionslösung (10.000 IE Heparin-Natrium/Liter Infusionslösung) vorsichtig manuell perfundiert. Die dafür verwendete 50 ml fassende Perfusorspritze wurde zu diesem Zweck auf die Venenverweilkanüle aufgesetzt und die Lösung so unter nur leichtem Druck und optischer Kontrolle durch das koronare Gefäßbett geleitet. Alle hier dargestellten Operations- und Präparationsschritte wurden unter Verwendung eines Stereo-Mikroskops durchgeführt. Die Dauer der gesamten Operation bis hin zum Zeitpunkt der Herzentnahme umfasste 10 min. Die Präparation der explantierten Herzen beanspruchte weitere 2 min. Dabei wurde das entnommene Rattenherz während der gesamten Präparationsarbeiten *ex-situ* regelmäßig mit Jonosteril®-Infusionslösung befeuchtet, um ein Austrocknen des Organs zu verhindern.

### **2.2.2 *In toto* Dezellularisierung der Rattenherzen**

Unverzüglich nach der Organentnahme, der Kanülierung der Aorta ascendens sowie der Perfusion der Koronargefäße mit heparinisierte Jonosteril®-Infusionslösung wurden die Rattenherzen dem Dezellularisierungsprozess zugeführt. Dieser erfolgte unter Verwendung des Organperfusionssystems, wofür das Rattenherz über die Venenverweilkanüle mit dem Schlauchsystem des Perfusionssystems verbunden wurde. Zuvor waren das gesamte Schlauchsystem sowie die Perfusionskammer des Langzeitperfusionssystems mit der Dezellularisierungslösung befüllt worden. Im Zuge der Konnektion von Verweilkanüle und Schlauchsystem wurde stets darauf geachtet, Lufteinschlüsse in den Perfusionsskreislauf zu vermeiden. Sobald das zu dezellularisierende Rattenherz mit dem Perfusionssystem verbunden war, wurden die Rollerpumpen des Systems gestartet. Dafür wurde der Steuerungssoftware ein Druck-Sollwert von 77,5 mmHg vorgegeben. Dieser Wert liegt etwas unterhalb des bei der Ratte physiologisch vorherrschenden mittleren arteriellen Druckes von etwa 85 mmHg [94]. Er wurde gewählt, um eine ausreichende Perfusion und somit vollständige

Dezellularisierung der Herzen bei zugleich größtmöglicher Schonung der EZM zu erreichen [93]. Außerdem wurde darauf geachtet, nur diejenigen Herzen für die Dezellularisierung zu verwenden, die über eine unversehrte Aorta ascendens sowie eine intakte Aortenklappe verfügten, da nur unter diesen Voraussetzungen ein ausreichender supralvalvulärer Druckaufbau erzielt werden kann. Dieser wiederum garantiert eine suffiziente Koronarperfusion und damit die vollständige Dezellularisierung der Rattenherzen.

Mithilfe der Aufzeichnung der Perfusionsparameter konnte rückblickend eine Bewertung des Perfusionsverlaufs vorgenommen werden. Dies erlaubte indirekt eine orientierende Einschätzung der Dezellularisierungsqualität. So konnten Herzen, bei denen zum Beispiel aufgrund einer größeren Gefäßleckage der für eine suffiziente Dezellularisierung erforderliche Perfusionsdruck nicht aufrecht erhalten werden konnte, von einer weiteren Verwendung ausgeschlossen werden.

### 2.2.3 Dezellularisierungsprotokoll

Bei dem für die *in toto* Dezellularisierung der Rattenherzen verwendeten Dezellularisierungsprotokoll handelt es sich um ein speziell für diese Arbeit leicht modifiziertes Protokoll [95], welches auf einem im Labor von Prof. Lichtenberg etablierten Protokoll beruht [93].

Der Dezellularisierungsprozess dauert 6 Tage. Er beinhaltet die Perfusion der Rattenherzen mit drei verschiedenen aufeinander folgenden Lösungen (Lösung I-III), die sich wie folgt zusammensetzen (Tabelle 1):

Dezellularisierungslösung	Zusammensetzung
Lösung I	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,5% Natriumdesoxychololat (DCA)</li> <li>• 0,5% Natriumdodecylsulfat (SDS)</li> <li>• 0,05% Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) in Aqua bidest.</li> </ul>
Lösung II	0,05% Natriumazid (NaN <sub>3</sub> ) in Aqua bidest.
Lösung III	1% Penicillin/Streptomycin in PBS

**Tabelle 1: Zur *in toto* Organdezellularisierung verwendete Dezellularisierungslösungen und deren Zusammensetzung.**

Dezellularisierungsschritt	Dauer		Lösung	Funktion
	[h]	[d]		
1	0-12	1	I	Solubilisierung von Adhäsions- und Membranproteinen, Aufhebung der Zell-Matrix-Kontakte, Zellyse
	13-24	1	I	
	25-36	2	I	
	37-48	2	I	
2	49-72	3	II	Zellaufschluss durch osmotischen Schock, Auswaschung von Zelldebris
3	73-96	4	III	Auswaschung von Zelldebris und des zelltoxischen Natriumazids
	97-120	5	III	
	121-144	6	III	

**Tabelle 2: Dauer, jeweils verwendete Lösungen und Funktion der einzelnen Dezellularisierungsschritte der *in toto* Organdezellularisierung.** [h], Stunde; [d], Tag.

Während der ersten 48 Stunden wird Lösung I (Tabelle 1) für die Dezellularisierung der Rattenherzen verwendet (Tabelle 2). Die beiden Detergenzien DCA und SDS bewirken dabei, durch Solubilisierung von Adhäsions- und Membranproteinen, ein Loslösen der Zellen von den Komponenten der EZM sowie eine allgemeine Zellyse. In dieser ersten Phase des Dezellularisierungsprozesses wird die verwendete Lösung, jeweils im Abstand von 12 Stunden, insgesamt viermal erneuert (Tabelle 2).

Für weitere 24 Stunden erfolgt dann die Perfusion der Herzen mit Lösung II (Tabelle 1 und 2). Das wie bereits in Lösung I verwendete Aqua bidest trägt dabei durch Erzeugung eines osmotischen Schocks ergänzend zum Zellaufschluss bei. Darüber hinaus bewirkt die Perfusion mit Aqua bidest. die Entfernung des im Rahmen der Zellyse anfallenden Zelldebris aus EZM und Koronargefäßen. Das in Lösung I und II verwendete Natriumazid (Tabelle 1) dient der Verhinderung einer bakteriellen oder mykotischen Kontamination der Herzen während des Dezellularisierungsvorgangs.

Abschließend wird unter Verwendung von Lösung III (Tabelle 1) die myokardiale Matrix von noch potentiell vorhandenem Zelldebris befreit (Tabelle 2). Außerdem kann mithilfe dieser Lösung auch das zuvor gebrauchte zytotoxische Natriumazid

aus Matrix und Koronarsystem ausgewaschen werden. Eine bakterielle Kontamination der Organe wird von diesem Zeitpunkt an durch Penicillin/Streptomycin, das dem verwendeten PBS hinzugefügt ist, verhindert. Die Perfusion der Herzen mit Lösung III erfolgt für weitere 72 Stunden. Dabei wird auch während dieser letzte Phase der Dezellularisierung die verwendete Lösung zweimal im Abstand von je 24 Stunden erneuert (Tabelle 2).

Für das Erneuern oder den Wechsel der verschiedenen Dezellularisierungslösungen wird die Perfusion der Herzen kurzzeitig unterbrochen. Nachdem der Deckel der Perfusionskammer geöffnet worden ist, kann die gebrauchte Lösung vorsichtig abgegossen und durch die jeweils neue Lösung ersetzt werden. Die Lagerung der dezellularisierten Herzen erfolgt bei 4 °C in 1% Penicillin/Streptomycin in PBS.

#### **2.2.4 Koronargefäßdarstellung durch Epoxidharz-Perfusion**

Um zu zeigen, dass auch nach dem Dezellularisierungsprozess die Integrität und Offenheit der Koronararterien noch erhalten war, wurde das Koronarsystem der dezellularisierten Rattenherzen mittels Epoxidharz dargestellt.

Dazu wurden die dezellularisierten Herzen *in toto* mit einem Gemisch aus Epoxidharz und dazugehörigem Härter perfundiert. Das leicht visköse Harz bot dabei gegenüber fluideren Lösungen den Vorteil einer längeren Verweildauer in den Lumina der Koronargefäße, ohne in das umliegende Gewebe zu diffundieren. Trotz der leicht erhöhten Viskosität konnten auch kleinkalibrige Gefäße erfasst werden, was letztlich die Durchführung des im Folgenden beschriebenen quantitativen Auswertungsverfahrens ermöglichte.

Unmittelbar vor der Perfusion wurde das Epoxidharz mit dem Härter in einem Verhältnis von 1:0,55 unter ständigem Rühren vermischt. Im Anschluss daran wurde das Gemisch mit einer 1ml-Spritze aufgezogen. Hierbei wurde stets darauf geachtet, keine Luftblasen im Harz-Härter-Gemisch zu erzeugen. Die zu perfundierenden Rattenherzen konnten anschließend über die kanülierte Aorta ascendens mithilfe der 1ml-Spritze manuell, unter leichtem Druck, mit dem Harz-Härter-Gemisch retrograd perfundiert werden. Mit einer digitalen Spiegelreflexkamera wurden umgehend nach abgeschlossener Perfusion hochauflösende makroskopische Aufnahmen der Herzen angefertigt. Pro Herz wurden vier Bilder

aufgenommen, wobei die Herzen zwischen jeder der vier Aufnahmen 90° um ihre Längsachse gedreht wurden. So konnte jedes Herz in seinem gesamten Umfang erfasst und dabei sowohl das Stromgebiet der linken als auch das der rechten Koronararterie vollständig abgebildet werden. Vor dem Hintergrund der translumineszenten dezellularisierten Matrix stellten sich die perfundierten Gefäße dabei gut kontrastiert dar. Die hochauflösenden Aufnahmen wurden anschließend dazu verwendet, die Anzahl der perfundierten Äste der rechten und linken Koronararterie bis hin zu den Abgängen vierter Ordnung zu quantifizieren.

### **2.2.5 Mikro-Computertomographie**

Um eine computertomographische Darstellung des Koronarsystems zu ermöglichen, wurde dem Gemisch aus Epoxidharz und Härter ein in der Klinik gängiges Röntgenkontrastmittel hinzugefügt. Auf diese Weise konnte mittels eines Mikro-Computertomographen (Mikro-CT) eine Angiographie des dezellularisierten Koronarsystems durchgeführt werden. Dafür wurde der Epoxidharz-Härter-Mischung jodhaltiges Röntgenkontrastmittel (5%<sub>Vol.</sub>, entsprechend 775 µl auf 15,5 ml Harz-Härter-Gemisch) beigemischt. Nach der oben beschriebenen Perfusion der Herzen folgte das Aushärten des Gemisches aus Harz, Härter und Kontrastmittel für 24 Stunden. Sowohl während dieser Zeit als auch während der Durchführung der Mikro-CT-Untersuchung befand sich das dezellularisierte Rattenherz in einem 50 ml-Falcon, umspült von PBS mit 1% Penicillin/Streptomycin. Aus dem gewonnenen CT-Datensatz wurde anschließend eine 3D-Rekonstruktion der dezellularisierten Koronargefäße erstellt.

Die Mikro-CT-Untersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit dem Institut für Experimentelles Molekulares Imaging (ExMI) des Universitätsklinikums Aachen (ExMI, Universitätsklinikum RWTH Aachen, Pauwelsstraße 30, 52074 Aachen).

### 2.2.6 *Coronary Artery Tissue-Flap Model*

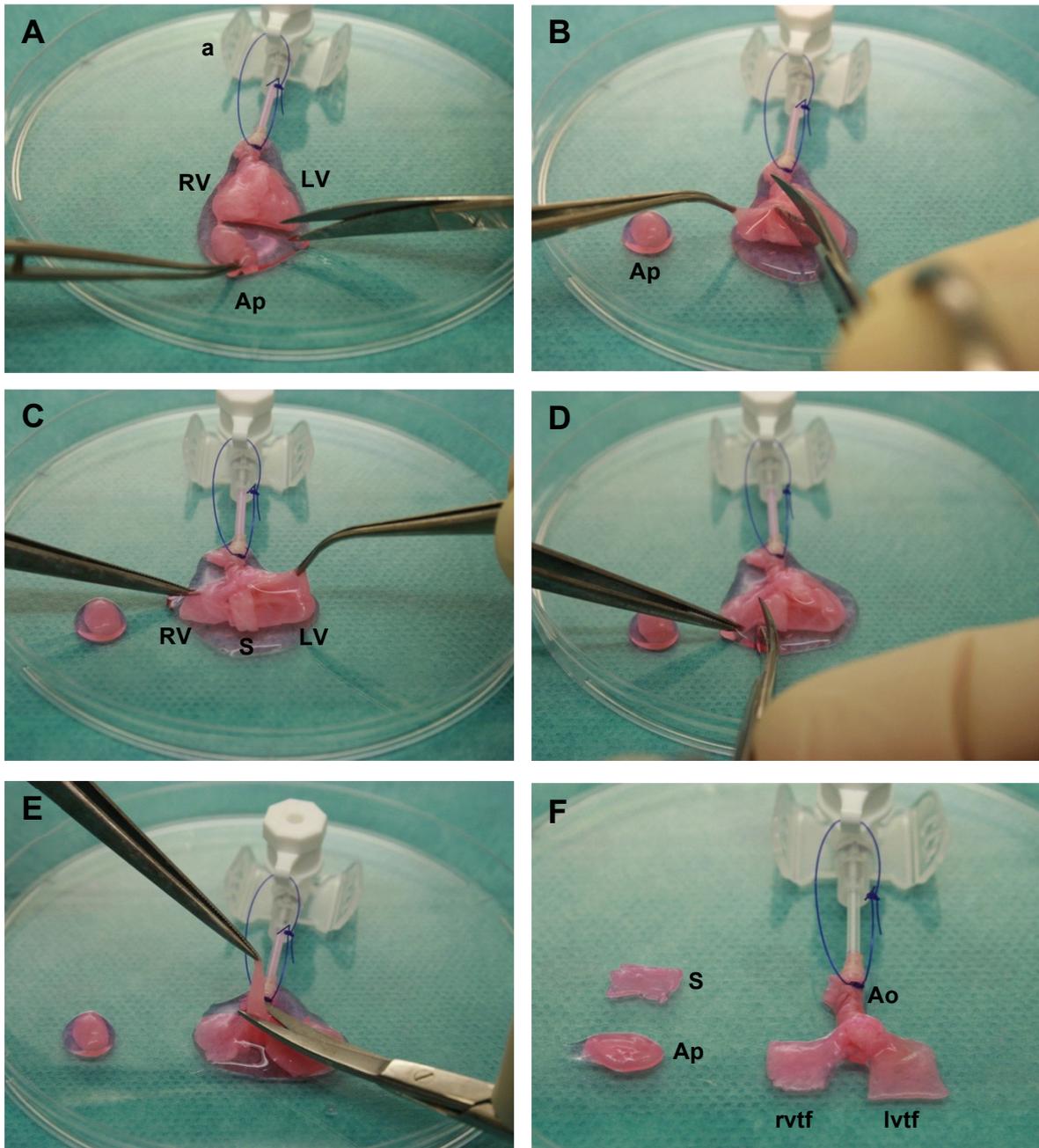
Um aus den dezellularisierten Rattenherzen ein standardisiertes *in vitro* Modellsystem zur Vaskularisierung azellulärer kardialer EZM zu generieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit das sogenannte *Coronary Artery Tissue-Flap Model* (CATFM) entwickelt. Dabei handelt es sich um ein standardisiertes Konstrukt, welches durch mikrochirurgische Präparation aus dezellularisierten Rattenherzen generiert wird. Es besteht aus zwei jeweils dem rechten und linken Ventrikel zugehörigen Gewebestücken (engl. *tissue-flaps*), die über die Aorta ascendens miteinander verbunden sind. Beide *tissue-flaps* werden jeweils über die rechte beziehungsweise linke Koronararterie (engl. *coronary artery*) sowie deren Ausläufer perfundiert.

Ausgehend von einem *in toto* vorliegenden dezellularisierten Rattenherz vollzogen sich die mikrochirurgischen Präparationsarbeiten stets in vier standardisierten Arbeitsschritten (Abb. 3). In einem ersten Schritt erfolgte die Abtrennung der Herzspitze vom übrigen Herzen, wodurch sowohl zum rechten als auch zum linken Ventrikel ein Zugang von apikal geschaffen wurde (Abb. 3 A). Über diesen Zugang konnten dann in einem weiteren Arbeitsschritt der rechte und linke Ventrikel zunächst ventralseitig vom Ventrikelseptum getrennt werden (Abb. 3 B). Dies gab den Blick in beide nun eröffnete Ventrikel frei (Abb. 3 C). Der dritte und somit vorletzte Präparationsschritt beinhaltet schließlich die dorsale Abtrennung der Ventrikelwände vom Ventrikelseptum (Abb. 3 D), welches abschließend möglichst nahe der Herzbasis abgesetzt wurde (Abb. 3 E).

Das auf diesem Wege erstellte CATFM-Konstrukt setzt sich folglich immer aus der Wand des rechten und linken Ventrikels sowie der Aorta ascendens mitsamt der Aortenklappe zusammen. Die Ventrikelwände liegen dabei in Form zweier annähernd quadratischer Gewebelappen vor (Abb. 3 F). Beide Gewebelappen, die im Folgenden auch als *tissue-flaps* bezeichnet werden, sind dabei mit der Aorta ascendens verbunden (Abb. 3 F). Sie repräsentierten nahezu die gesamte rechtsbeziehungsweise linksventrikuläre myokardiale EZM und beinhalten jeweils die rechte, respektive linke Koronararterie mitsamt deren Ästen.

Für eine Reihe von Versuchen war die selektive Perfusion des rechts- bzw. linksventrikulären *tissue-flaps* notwendig. Hierzu wurden die *tissue-flaps* unter Erhalt des jeweiligen Koronarostiums von der Aorta ascendens abgesetzt. Auf

diese Weise konnten die rechte und linke Koronararterie direkt über deren jeweiliges Koronarostium mittels eines 28G-Katheters kanüliert werden. Die selektive Perfusion der *tissue-flaps* über diesen Katheter wurde dann entweder manuell oder unter Gewährleistung einer kontinuierlich gleichbleibenden Flussrate mithilfe einer Spritzenpumpe durchgeführt. Auf diese Weise wurde sowohl dezellularisiertes als auch rebesiedeltes myokardiales Gewebe einer standardisierten Perfusion zugeführt.



**Abb. 3: Standardisierte Arbeitsschritte zur Erstellung des *Coronary Artery Tissue-Flap Model*.** (A), Abtrennung der Herzspitze. (B), Ventrale seitige Abtrennung der rechten und linken Ventrikelwand vom Ventrikelseptum (exemplarisch hier nur für den rechten Ventrikel dargestellt). (C), Blick in die beiden eröffneten Ventrikel nach ventrale seitiger Abtrennung beider Ventrikelwände vom Ventrikelseptum. (D), Dorsale seitige Abtrennung der rechten und linken Ventrikelwand vom Ventrikelseptum (exemplarisch hier nur für den rechten Ventrikel dargestellt). (E), Basisnahe Abtrennung des Ventrikelseptums. (F), Fertiggestelltes CATFM. Ao, Aorta ascendens; RV, rechter Ventrikel; LV, linker Ventrikel; S, Ventrikelseptum; Ap, Apex; rvtf, rechtsventrikulärer *tissue-flap*; lvtf, linksventrikulärer *tissue-flap*; a, Venenverweilkanüle (17G) in der Aorta ascendens und chirurgisches Nahtmaterial zur Fixierung des Herzens an der Kanüle. (A,B,D,E), Arbeitsschritte. (C,F), Übersichtsaufnahmen.

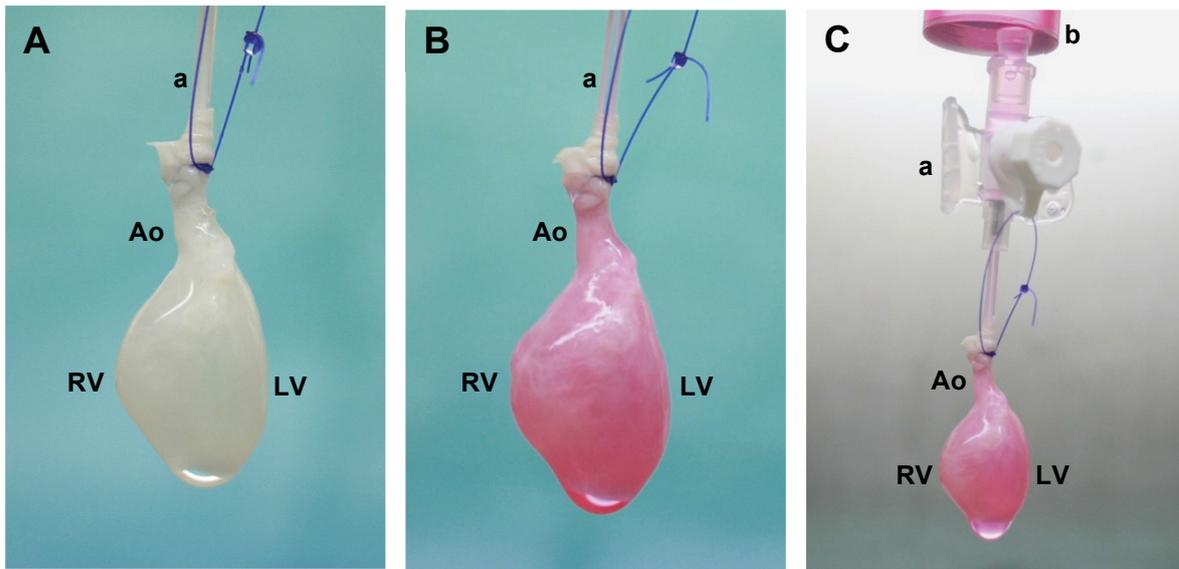
### **2.2.7 *In vitro* Rebesiedlung der *tissue-flaps***

Die *in vitro* Rebesiedlung der *tissue-flaps* umfasste die selektive Repopulation sowohl der de-endothelialisierten KoronargefäÙe als auch des umliegenden oberflächlichen perivaskulären Gewebes.

#### Selektive Rebesiedlung des Koronarsystems

Für die *in-vitro* Rebesiedlung der KoronargefäÙe der *tissue-flaps* wurde ein Besiedlungsverfahren etabliert, das sich in zwei zeitlich voneinander getrennte Arbeitsschritte gliederte. Der erste Schritt umfasste dabei die Ansiedlung von Zellen in den KoronargefäÙen eines *in toto* vorliegenden dezellularisierten Rattenherzens. In dem darauf folgenden zweiten Arbeitsschritt wurde aus diesem rebesiedelten Herz dann das CATFM erstellt. Für die Rebesiedlung des Koronarsystems wurden im Rahmen dieser Arbeit sowohl eine murine Fibroblastenzelllinie (3T3-Zellen) als auch primäre humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVECs) benutzt.

Vor dem ersten Arbeitsschritt, der eigentlichen Rebesiedlung, wurden die Koronararterien der dezellularisierten Rattenherzen zunächst mit 20 ml eines auf 37 °C vorgewärmten Zellkulturmediums manuell perfundiert. Dies erfolgte über die Kanülierung und anschließende retrograde Perfusion der Aorta ascendens mittels einer 17G-Veneverweilkanüle und einer 20ml-Spritze. Dieser Schritt diente im Wesentlichen dazu, die im Rahmen der Zwischenlagerung der Herzen kollabierten KoronargefäÙe wieder zu eröffnen und das KoronargefäÙsystem mit Zellkulturmedium zu präkonditionieren. Unmittelbar darauf folgte die eigentliche Rebesiedlung der KoronargefäÙe. Dafür wurden die Koronararterien via Aorta ascendens mit  $5 \times 10^5$  Zellen/ml Zellsuspension, analog dem oben beschriebenen Verfahren, perfundiert. Pro Herz wurden hierbei 1,5 ml Zellsuspension mittels einer 3ml-Spritze appliziert (Abb. 4 B und C).



**Abb. 4: *In vitro* Rebesiedlung des Koronarsystems.** (A), *In toto* dezellularisiertes Rattenherz vor der retrograden aortalen Perfusion mit einer Zellsuspension. (B) und (C), *In toto* dezellularisiertes Rattenherz während der retrograden aortalen Perfusion mit einer Zellsuspension. Ao, Aorta ascendens; RV, rechter Ventrikel; LV, linker Ventrikel; a, Venenverweilkanüle (17G) und chirurgisches Nahtmaterial zur Fixierung des Herzens an der Kanüle; b, Spritze mit Zellsuspension in Kulturmedium.

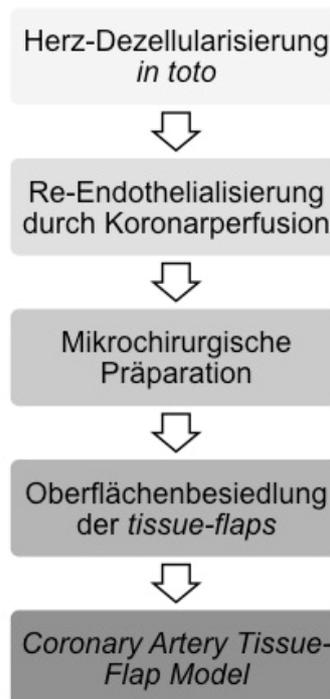
Anschließend wurde ein Titan-Gefäßclip auf die Aorta ascendens gesetzt und die Aorta mitsamt der Venenverweilkanüle distal des Clips durchtrennt. Das Herz konnte daraufhin in eine 6-Well-Platte überführt werden, in der es für 24 Stunden bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert wurde. Während der gesamten Inkubationszeit war das Herz vollständig mit Kulturmedium bedeckt.

Nach 24 Stunden Inkubationszeit konnte dann im zweiten Arbeitsschritt aus dem zuvor rebesiedelten Rattenherz durch mikrochirurgische Präparation das CATFM erstellt werden. Dieses wurde dann für weitere fünf Tage unter den bereits genannten Kulturbedingungen inkubiert. Dabei fand alle 12 Stunden sowohl in der 6-Well-Platte als auch im koronaren Gefäßsystem eine Erneuerung des Kulturmediums statt. Dies erfolgte im Falle der Koronargefäße durch vorsichtige manuelle Perfusion von 1 ml Kulturmedium über die Aorta ascendens mittels einer 1ml-Spritze. Auch die *tissue-flaps* waren im Verlauf der gesamten Inkubationszeit vollständig von Kulturmedium umspült. Bei allen Arbeitsschritten, die eine Perfusion der Koronargefäße beinhalteten, war es von besonderer Bedeutung, stets darauf zu achten, alle Perfusionslösungen vor deren Verwendung sorgfältig zu entlüften. Dies war erforderlich, um Lufteingüsse in den Gefäßen und somit deren Verlegung zu vermeiden.

Besiedlung der epimyokardialen Oberfläche der *tissue-flaps*

Für eine kontrollierte Kokultur innerhalb der *tissue-flaps* wurde zusätzlich zur selektiven Besiedlung des Koronarsystems die epimyokardiale Oberfläche der *tissue-flaps* mit neonatalen Rattenkardiomyozyten besiedelt. Hierzu wurden die *tissue-flaps* 24 Stunden nach Besiedlung der Koronargefäße und unmittelbar nach Überführung in das CATFM von der Aorta ascendens abgesetzt. Die freien *tissue-flaps* wurden dann in je ein *Well* einer 24-*Well*-Platte überführt. Anschließend wurde sowohl auf den rechts- als auch den linksventrikulären *tissue-flap* 0,5 ml einer Zellsuspension aus neonatalen Kardiomyozyten ( $2 \times 10^5$  Kardiomyozyten/ml Kulturmedium) pipettiert. Auf diese Weise konnte die gesamte Oberfläche der *tissue-flaps* mit Zellsuspension bedeckt werden. Nach 6 Stunden erfolgte dann ein Austausch des Zellkulturmediums. Die weitere Inkubationszeit nach erfolgter Oberflächenbesiedlung betrug 24 Stunden. Unmittelbar vor der mikroskopischen Analyse der Kokulturversuche wurden die rebesiedelten *tissue-flaps* mit PBS gewaschen.

Alle hier aufgezeigten Arbeitsschritte wurden unter streng sterilen Bedingungen an einer *Laminar-Flow*-Sicherheitswerkbank durchgeführt. Abbildung 5 fasst die Arbeitsschritte zur Erstellung des vollständig rebesiedelten CATFM zusammen.



**Abb. 5:** Grafische Darstellung zur Abfolge der erforderlichen Arbeitsschritte ausgehend vom *in toto* dezellularisierten Rattenherz bis hin zum funktionellen *Coronary Artery Tissue-Flap Model*.

### Kontrolle des Besiedlungserfolges

Für eine möglichst frühzeitige, sowohl qualitative als auch quantitative Einschätzung des Besiedlungserfolges wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei verschiedene Methoden etabliert:

Zum einen wurde 24 Stunden nach erfolgter Rebesiedlung der Rattenherzen die bei der Herstellung des CATFM überschüssige Herzspitze auf das Vorhandensein von Zellen in den Koronargefäßen untersucht. Dafür wurde die Herzspitze lichtgeschützt für 5 min mit Vectashield® Eindeck-medium mit 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) vollständig bedeckt und anschließend mithilfe eines Durchlichtmikroskops unter Verwendung des entsprechenden Fluoreszenzfilters untersucht. Die Zellkerne der in den Koronargefäßen neu angesiedelten Zellen stellten sich dabei blau fluoreszierend dar. Unter der Annahme einer Perfusion der Koronargefäße von basal nach apikal konnte beim Vorhandensein von Zellen in der Herzspitze auch auf eine Besiedlung weiter basal gelegener Gefäßabschnitte geschlossen werden.

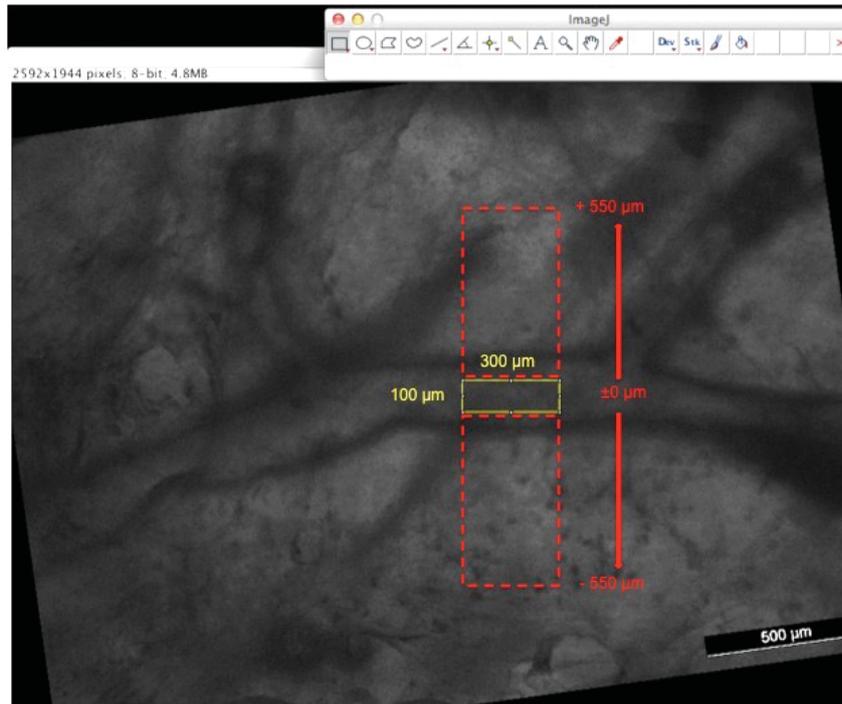
Zum anderen wurde die Anzahl der Zellen bestimmt, die durch das Rebesiedlungsverfahren in die Koronargefäße eingebracht worden war. Hierfür wurde das im Zuge der Rebesiedlung anfallende Perfusat der Zellsuspension, nach Durchlauf durch das zu besiedelnde Herz, in einem 50ml-Falcontube aufgefangen und anschließend bei Raumtemperatur für 5 min mit 1300 U/min zentrifugiert. Das dadurch entstandene Zellpellet wurde anschließend mit 1 ml PBS resuspendiert. Mithilfe einer Neubauer Zählkammer und Trypanblau konnte aus dieser Zellsuspension schließlich die Anzahl der Zellen bestimmt werden, die durch das Rebesiedlungsverfahren das Gefäßsystem entweder primär nicht erreicht hatten oder nicht in diesem verblieben waren. Um nun auch diejenigen Zellen zu erfassen, die, noch bevor eine ausreichende Adhärenz zur umliegenden vaskulären Matrix hergestellt worden war, wieder aus den Koronargefäßen ausgeschwemmt wurden, erfolgte eine Bestimmung der Zellzahl auch aus der 6-Well-Platte, in welcher die rebesiedelten Herzen inkubiert wurden. Diese Zählung fand 4 Stunden nach abgeschlossener Rebesiedlung statt und umfasste sowohl die Zellen aus dem Kulturmedium als auch die am Boden der 6-Well-Platte adhärennten Zellen. Letztere wurden dafür mit 1 ml einer vorgewärmten Trypsin-EDTA-Lösung (Trypsin 0.05% in 0.53 mM EDTA) unter mikroskopischer Kontrolle vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst. Das Stoppen der Trypsinisierung erfolgte

mit 2 ml eines zellspezifischen Kulturmediums. Nach Zentrifugation unter den oben beschriebenen Bedingungen und Resuspension des Zellpellets in 1 ml PBS erfolgte auch hier mittels Neubauer Zählkammer und Trypanblau die Bestimmung der in der 6-Well-Platte vorhandenen Zellzahl. Durch Summierung der ermittelten Zellzahlen aus Perfusat und 6-Well-Platte und Bestimmung der Differenz zur initial für die Besiedlung verwendeten Anzahl von Zellen konnten schließlich indirekt die absolute und die relative Zellzahl errechnet werden, die erfolgreich in den Koronargefäßen verblieben war.

### 2.2.8 Protein-Diffusion

Zur genaueren fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der dezellularisierten Gefäße wurde das azelluläre Koronarsystem der *tissue-flaps* mit bovinem Serumalbumin (BSA) perfundiert. Dieses BSA war an den Farbstoff Alexa Fluor® 555 gebunden. Auf diese Weise konnte die Diffusion des BSA über die Gefäßwand der Koronarien hinweg in die umliegende EZM fluoreszenzmikroskopisch erfasst und so einer semi-quantitativen Analyse zugeführt werden. Zur Perfusion der Koronargefäße wurden die Koronarostien mittels einer 28G-Kanüle selektiv kanüliert. Zur Sicherstellung einer über den gesamten Untersuchungszeitraum von 60 min hinweg gleichbleibenden Flussrate von 0,1 ml/min wurde eine Präzisions-Spritzenpumpe verwendet. Die Perfusionslösung setzte sich aus einem an Alexa Fluor® 555 gebundenen BSA und nativem BSA (0,0025% beziehungsweise 0,1% in PBS gelöst) zusammen. Um den zeitlichen Verlauf der Diffusion des markierten BSA vom Gefäßlumen aus in das umliegende Gewebe darstellen zu können, wurde eine Serie fluoreszenzmikroskopischer Bilder erstellt. Diese erfasste stets einen zuvor festgelegten repräsentativen Gefäßabschnitt des Koronarsystems sowie die daran angrenzenden EZM. Die erste Aufnahme der Serie bildete dabei den Zustand unmittelbar vor Perfusionsbeginn ab. Alle weiteren Bilder wurden nach dem Start der Perfusion in jeweils 10-minütigen Intervallen bis einschließlich zur 60. min nach Perfusionsbeginn aufgenommen. Sämtliche fluoreszenzmikroskopischen Bilder wurden dabei mit einem Invers-Mikroskop unter Verwendung der immer gleichen Aufnahmeparameter angefertigt. Bei der Auswahl eines geeigneten repräsentativen Gefäßabschnittes wurde darauf geachtet, dass dieser über eine

Kaliberstärke von etwa 100  $\mu\text{m}$  verfügte und in der umliegenden EZM keine größeren Kollateralgefäße zu liegen kamen. Um nun die Fluoreszenzintensität als Maß für die Menge an diffundiertem BSA zu quantifizieren, wurden die Bilder mittels der Bildanalyse-Software *ImageJ* (NIH) ausgewertet (Abb. 6). Dafür wurde zu jedem Messzeitpunkt sowohl im Lumen des Gefäßes als auch orthogonal zur Gefäßlängsachse, in jeweils festgesetzten Abständen zum Gefäßlumen, die mittlere Fluoreszenzintensität innerhalb einer standardisierten Fläche von  $0,03 \text{ mm}^2$  gemessen. Beginnend in einer Entfernung von 150  $\mu\text{m}$  zur Gefäßwand erfolgte dies jeweils in einheitlichen Intervallen von 100  $\mu\text{m}$  an vier weiteren Messpunkten bis hin zu einer Distanz von 550  $\mu\text{m}$  sowohl ober- als auch unterhalb des dargestellten Gefäßabschnittes. Für die Fluoreszenzintensität wurde von einer direkten Proportionalität zur Konzentration an konjugiertem BSA ausgegangen. Als Maß für die Fluoreszenzintensität diente dabei der mittlere Grauwert aller Bildpunkte in dem standardisierten Bildausschnitt. Dieser konnte mithilfe einer integrierten Funktion von *ImageJ* im Bereich der genannten Fläche von  $0,03 \text{ mm}^2$  ermittelt werden. Dazu wurde jedes Bild (RGB-Farbbilder mit je 8 bit pro Farbkanal) in seine drei Farbkanäle (roter, gelber und blauer Farbkanal) aufgespalten. Aufgrund des Emissionsmaximums von Alexa Fluor® 555 bei 580 nm wurde für alle Messungen ausschließlich der rote Kanal verwendet. Vor Beginn der Perfusion wurde für jeden der fünf oben genannten Messpunkte der durch die Hintergrundfluoreszenz der EZM erzeugte Grauwert ermittelt. Dieser wurde dann von den entsprechenden während der laufenden Perfusion erhobenen Werten subtrahiert. Auf diese Weise konnte der Einfluss der Eigenfluoreszenz der EZM auf die übrigen Messwerte eliminiert werden. Alle erhobenen Werte stellten folglich ausschließlich die Fluoreszenzintensität dar, die durch die Diffusion des markierten BSA hervorgerufen wurde. Anschließend wurden alle erhobenen Werte in Relation zur Fluoreszenzintensität im perfundierten Gefäßabschnitt gesetzt.



**Abb. 6: Bildschirmaufnahme der Benutzeroberfläche von *ImageJ* mit Kennzeichnung der Flächen, die zur Quantifizierung der mittleren Fluoreszenzintensität herangezogen wurden.** Gelbes Rechteck, Begrenzung der 0,03 mm<sup>2</sup> umfassenden Fläche innerhalb derer, jeweils in verschiedenen Entfernungen zum analysierten Gefäßabschnitt, die mittlere Fluoreszenzintensität ermittelt wurde; Rote Rechtecke (begrenzt durch gestrichelte Linien), gesamte Messfläche bis hin zu  $\pm 500 \mu\text{m}$  Entfernung zum untersuchten Gefäßabschnitt.

### 2.2.9 Evaluierung der Hämatokompatibilität mittels Blut-Perfusion

Um zu evaluieren, ob sowohl nach Dezellularisierung als auch nach erfolgter Rebesiedlung des Koronarsystems dessen Gefäße auch noch für zelluläre Blutbestandteile durchgängig blieben, wurden sowohl azelluläre als auch mit 3T3-Zellen rebesiedelte *tissue-flaps* mit Vollblut perfundiert. Bei dem verwendeten Blut handelte es sich um humanes Blut, das unmittelbar vor dessen Verwendung einer peripheren Vene entnommen wurde.

Die Analyse und Auswertung der Perfusions-Versuche fand sowohl an einem Stereomikroskop als auch unter Verwendung eines Invers-Mikroskops statt. Über eine am Stereomikroskop angebrachte digitale Spiegelreflexkamera konnten hochauflösende Fotos der mit Blut perfundierten Koronargefäße angefertigt werden. Mittels einer an der C-Mount-Schnittstelle des Invers-Mikroskops montierten Mikroskopkamera und einer Bildschirm-Recorder-Software wurden darüberhinaus digitale Videoaufnahmen der Koronargefäße während deren Perfusion mit Blut aufgenommen. Die Mikroskopkamera stand dabei mit einem

Computer in Verbindung, über dessen Bildschirm die Aufnahmen der Kamera in Echtzeit wiedergegeben wurden. Mithilfe der Bildschirm-Recorder-Software konnten letztlich AVI-Videoaufnahmen eines zuvor festgelegten Bildschirm-ausschnittes erstellt werden.

### **2.2.10 Zellkulturstudien**

Alle Zellkulturversuche fanden unter sterilen Bedingungen an einer Laminar-Flow-Sicherheitswerkbank statt. Die Kultivierung aller Zellen und zellbesiedelten Konstrukte erfolgte in einem Zellkultur-Brutschrank bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit.

#### Murine embryonale Fibroblasten (3T3-Zellen)

Für die Etablierung des *Coronary Artery Tissue-Flap Model* wurden NIH-3T3-Zellen verwendet. Dabei handelt es sich um eine murine embryonale Fibroblasten-Zelllinie, die freundlicherweise vom Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt wurde. Die 3T3-Zellen wurden nach dem Auftauen in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* mit GlutaMAX™-I, 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin) überführt. Dieses Medium diente auch im Zuge der gesamten weiteren Verwendung der 3T3-Zellen als Kulturmedium. Die 3T3-Zellen wurden in T75 Zellkulturflaschen kultiviert und zweimal pro Woche in einem Verhältnis von 1:3 gesplittet. Dafür wurde das in der Kulturflasche befindliche Medium abgesaugt und verworfen, der auf dem Flaschenboden angewachsenen Zellrasen mit 10 ml PBS gewaschen und unter mikroskopischer Kontrolle mittels 5 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung (Trypsin 0.05% in 0.53 mM EDTA) gelöst. Die Trypsinwirkung wurde mit 5 ml Kulturmedium gestoppt und die auf diese Weise gewonnene Zellsuspension bei Raumtemperatur für 5 min mit 1300 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde die überstehende Trypsinlösung abpipettiert und das verbleibende Zellpellet in Zellkulturmedium resuspendiert. Mittels einer Neubauer Zählkammer und Trypanblau-Färbung wurde dann die Zelldichte bestimmt. Im Anschluss daran wurden die Zellen entweder für eine spätere Verwendung weiterkultiviert oder in

die gewünschte Zelldichte überführt und für die beschriebenen Versuche verwendet.

#### Humane Nabelschnurendothelzellen (HUVECs)

Für die funktionelle Rebesiedlung des Gefäßsystems der *tissue-flaps* wurden die Koronargefäße der dezellularisierten Rattenherzen mit HUVECs re-endothelialisiert. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten HUVECs wurden freundlicherweise von Frau Prof. Kögler vom Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ) des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

Unmittelbar nach dem Auftauen wurden die HUVECs in *Endothelial Cell Growth Medium MV* überführt. Dieses Medium war mit 5% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin, 0,001% *human Epidermal Growth Factor 5 (hEGF-5)*, 0,4% *Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS)*, 0,1% Hydrokortison und 9% Heparin supplementiert und diente im Rahmen aller Versuche, die mit den HUVECs durchgeführt wurden, als Kulturmedium. Für die Kultivierung der Zellen wurden T75-Zellkulturflaschen verwendet, die zuvor mit Kollagen (5 µg/cm<sup>2</sup>) beschichtet worden waren. Sobald die Zellen in den Kulturgefäßen eine Konfluenz von 60-70% erreicht hatten, wurden sie in einem Verhältnis von 1:3, wie oben beschrieben, gesplittet. Für alle Versuche wurden ausschließlich HUVECs der 5.-8. Passage eingesetzt.

#### Neonatale Rattenkardiomyozyten

Im Zuge der Etablierung einer kontrollierten, funktionellen Kokultur im *Coronary Artery Tissue-Flap Model* wurde die epikardiale Oberfläche von zuvor mit HUVECs re-endothelialisierten *tissue-flaps* mit neonatalen Rattenkardiomyozyten besiedelt. Die hier verwendeten Kardiomyozyten wurden eigens für diese Arbeit aus den Herzen neonataler Ratten (Alter: 1-5 Tage) isoliert. Der Isolierungsprozess folgte dabei einer dreistufigen Vorgehensweise: Der Explantation der Herzen schloss sich unverzüglich der enzymatische Verdau der kardialen EZM an, bevor im dritten und letzten Schritt die Kardiomyozyten von den Nicht-Kardiomyozyten getrennt wurden. Im einzelnen wurde nach Dekapitation der neonatalen Ratten deren Thorax entlang des Sternums mit einer spitzen Schere eröffnet, wodurch das nun freiliegende Herz mithilfe einer feinen Pinzette aus der Thoraxhöhle entnommen

und in eine sterile Petrischale mit eiskaltem PBS überführt werden konnte. Anschließend wurden die so gewonnenen Herzen mit einer feinen Schere zu einem Gewebebrei zerminzt und in ein 50 ml Falcon überführt. Auf diese Weise sollte eine Vergrößerung der Gewebeoberfläche und damit eine Minimierung der Diffusionswege für die anschließend eingesetzten Enzyme erreicht werden. Nun wurde das Myokardgewebe in 5 ml einer zuvor angesetzten, vorgewärmten Enzymlösung (400 U/ml Collagenase II in PBS mit 0,05% Trypsin) für 5 min bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Die so erzeugte Suspension wurde daraufhin mit einer 10 ml Pipette aufgenommen und durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 100 µm filtriert. Das Filtrat wurde verworfen, das zurückbleibende Myokardgewebe hingegen zur Vorbereitung auf vier weitere 15 minütige Inkubationsschritte bei 37 °C im Wasserbad wieder in ein 50 ml Falcon überführt. Nach jeder Inkubation wurde die Suspension erneut filtriert und jeweils in frischen Falcons, die je 10 ml kaltes Zellkulturmedium (DMEM mit GlutaMAX™-I und 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin) beinhalteten, aufgefangen und auf Eis gelagert. Der im Zuge der Filtrationsvorgänge anfallende Filterkuchen wurde dabei jedes Mal in ein frisches Falcon gefüllt und einem erneuten Verdau durch die oben genannte Enzymlösung ausgesetzt. Nach Abschluss des letzten Inkubationsschrittes wurden die vier zellhaltigen Falcons für 6 min bei 300 g zentrifugiert. Die auf diese Weise erzeugten Zellpellets wurden anschließend in oben genanntem Zellkulturmedium resuspendiert. Zur Trennung der Kardiomyozyten von allen anderen im Myokard vorhandenen Zellen wurde die unterschiedliche Adhärenz-Geschwindigkeit der verschiedenen Zellarten ausgenutzt (sogenanntes *Pre-Plating*). Dafür wurden die Zellsuspensionen in eine T225 Zellkulturflasche gegeben und für 90 min inkubiert. Der die Kardiomyozyten beinhaltende Überstand aus dem Kulturgefäß wurde dann in ein 50 ml Falcon pipettiert, zentrifugiert und schließlich zur Kultivierung und weiteren Verwendung in neue T225 Flaschen überführt.

#### Kokultivierung von Endothelzellen und Kardiomyozyten

Das für die Kokultivierung von HUVECs und Kardiomyozyten verwendete Kulturmedium setzte sich im einem Verhältnis von 1 : 1 aus den beiden jeweils oben genannten zellspezifischen Kulturmedien zusammen.

### 2.2.11 *Live-Cell-Imaging*

Aufgrund der Translumineszenz sowie der geringen Dicke der kardialen EZM wurden die *tissue-flaps* für ein *Live-Cell-Imaging* genutzt. Dies erfolgte im Rahmen der Durchführung zweier *Live/Dead-Assays* sowie der Anfärbung der für die Rebesiedlung verwendeten Zellen mittels verschiedenfarbiger *Celltracker*.

Bei allen im Folgenden genannten Arbeitsschritten wurde immer darauf geachtet, das lichtempfindliche Färbereagenz beziehungsweise die damit angefärbten Zellen vor einer zu starken Lichteinwirkung zu schützen.

#### *Live/Dead-Assay* mit Calcein-AM und Ethidium Homodimer

Die Vitalität der in den *tissue-flaps* kultivierten Zellen wurde mithilfe eines *Live/Dead-Assays* (Invitrogen Corp.) untersucht, das auf der Verwendung der beiden Reagenzien Calcein-AM und Ethidium Homodimer beruht. Das nicht fluoreszierende Calcein-AM diffundiert dabei über die Membran der Zellen hinweg nach intrazellulär, wo es von unspezifischen Esterasen zum deutlich grün fluoreszierenden Calcein umgesetzt wird. Die intrazelluläre Esteraseaktivität und die damit einhergehende grüne Fluoreszenz der Zellkörper wurden dabei als Indikator für die Vitalität der untersuchten Zellen gewertet. Ethidium Homodimer hingegen vermag es nicht, über intakte Zellmembranen hinweg ins Innere der Zellen zu diffundieren. Ist die Zellmembran allerdings beschädigt, kann Ethidium Homodimer ins Zellinnere vordringen und an die DNA der Zellen binden, was zu einer deutlich gesteigerten roten Fluoreszenz des Stoffes führt. Rot fluoreszierende Zellen wurden somit als beschädigte oder gar tote Zellen aufgefasst.

Für das *Live/Dead-Assay* wurden die rebesiedelten *tissue-flaps* gemäß den Herstellerangaben zunächst mit PBS gewaschen. Dies erfolgte sowohl durch das Pipettieren von 2 ml PBS in das Kulturgefäß als auch durch manuelle retrograde Perfusion der Aorta ascendens mit zweimal je 500 µl PBS mit einer 1 ml-Spritze. Im Anschluss daran wurden 3 ml der Färbelösung mit Calcein-AM (2 µM, entsprechend 2 µl 4 mM Calcein-AM auf 4 ml PBS) und Ethidium Homodimer (4 µM, entsprechend 4 µl 2 mM Ethidium Homodimer auf 4 ml PBS) in das Kulturgefäß gegeben, so dass die *tissue-flaps* vollständig von der Färbelösung bedeckt waren. Mit einem weiteren Milliliter der angesetzten Färbelösung wurde

zusätzlich über die Aorta ascendens das koronare Gefäßsystem perfundiert. Anschließend wurde das *Coronary Artery Tissue-Flap Model* für 40 min im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Die qualitative Auswertung des Vitalitäts-Tests erfolgte unmittelbar nach abgeschlossener Inkubation und erneutem Waschen in PBS an einem Invers-Mikroskop. Die *tissue-flaps* wurden dafür von der Aorta ascendens abgesetzt und anschließend ohne weitere Verarbeitung zwischen einem Objektträger und einem Deckglas fixiert und direkt mikroskopiert.

#### Live/Dead-Assay mit SYBR<sup>®</sup> Green und Propidium Jodid

Neben dem oben beschriebenen Vitalitäts-Assay mit Calcein-AM und Ethidium Homodimer wurde ergänzend ein weiteres *Live/Dead-Assay* (Invitrogen Corp.) unter der Verwendung von SYBR<sup>®</sup> Green und Propidium Jodid durchgeführt. SYBR<sup>®</sup> Green und Propidium Jodid interkalieren in die DNA der zu untersuchenden Zellen. Während SYBR<sup>®</sup> Green ungehindert über Zellmembranen hinweg ins Zellinnere gelangt, kann Propidium Jodid nur bereits defekte Zellmembranen überwinden. Dies führt letztlich dazu, dass SYBR<sup>®</sup> Green vitale Zellen grün fluoreszieren lässt, wohingegen tote und somit durch Propidium Jodid gefärbte Zellen rot fluoreszierend zur Darstellung kommen.

Zur Durchführung dieses Assays wurden rebesiedelte *tissue-flaps* zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml der SYBR<sup>®</sup> Green/Propidium Jodid-Färbelösung (10 µl SYBR<sup>®</sup> Green und 100 µl Propidium Jodid auf 2 ml PBS) in einer 6-Well-Platte für 30 min im Zellkulturbrutschrank inkubiert. 1 ml der Färbelösung wurde dabei direkt auf die *tissue-flaps* pipettiert, während der verbleibende Rest der Lösung über die Aorta ascendens direkt in das koronare Gefäßbett geleitet wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeit und einem weiteren Waschschrift konnten die gefärbten Proben schließlich an einem Konfokalmikroskop qualitativ ausgewertet werden. Dafür wurden die *tissue-flaps* von der Aorta ascendens abgesetzt und direkt mikroskopiert.

#### CMFDA-Labeling der HUVECs

Um die Anordnung und Ausbreitung der HUVECs im koronaren Gefäßsystem im Sinne eines *Live-Cell-Tracking* untersuchen zu können, wurden die Zellen vor ihrer Verwendung mittels CMFDA markiert. CMFDA diffundiert frei über die Membran der zu untersuchenden Zellen hinweg nach intrazellulär. Dort wird es

durch eine von Esterasen katalysierte Reaktion sowie durch Bindung an Thiole zu einem grün fluoreszierenden und nun membranimpermeablen Farbstoff umgesetzt.

Zur Markierung mit CMFDA wurden die in Suspension vorliegenden HUVECs für 45 min in 5 ml der CMFDA-Färbelösung (12,5 µM, in serumfreiem Kulturmedium) im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 min bei 1300 U/min zentrifugiert, der dadurch generierte Überstand an Färbelösung verworfen und das Zellpellet in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Die auf diese Weise entstandene Zellsuspension konnte daraufhin einer erneuten, nun 30-minütigen Inkubation im Brutschrank zugeführt werden. Dieser folgte unmittelbar eine weitere 5-minütige Zentrifugation bei 1300 U/min. Das hierbei erneut erzeugte Zellpellet wurde dann abschließend durch die für die gewünschte Zelldichte erforderliche Menge an Kulturmedium wieder in Suspension gebracht. Die qualitative Auswertung der mit CMFDA-markierten, grün-fluoreszierenden HUVECs re-endothelialisierten *tissue-flaps* erfolgte am Konfokalmikroskop.

#### CMTPX-Labeling der neonatalen Rattenkardiomyozyten

Um während der kontrollierten Kokultur fluoreszenzmikroskopisch eine sichere Differenzierung zwischen den epikardial angesiedelten Kardiomyozyten und den in den Koronargefäßen kultivierten HUVECs (mittels CMFDA markiert) vornehmen zu können, wurden die Kardiomyozyten mit CMTPX angefärbt. So war es möglich die beiden Zelltypen, die gezielt in verschiedenen Kompartimenten ein und derselben kardialen EZM angesiedelt worden waren, sicher zu unterscheiden. Außerdem konnten durch die rote Fluoreszenz der mit CMTPX markierten Kardiomyozyten deren Verteilung und Ausbreitung auf der Oberfläche der *tissue-flaps* besser beurteilt werden.

CMTPX diffundiert frei über die Zellmembran der Kardiomyozyten hinweg nach intrazellulär. Dort wird es zu einem membranimpermeablen Farbstoff umgesetzt. Im Gegensatz zu dem bereits beschriebenen CMFDA ist gemäß der Herstellerangaben im Falle von CMTPX keine enzymatisch katalysierte Reaktion erforderlich, um durch die Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 577 nm eine rote Fluoreszenz des Stoffes hervorzurufen.

Die Markierung der Kardiomyozyten mit CMTPX erfolgte analog der oben beschriebenen Anfärbung der HUVECs mittels CMFDA. Demnach wurden auch

die Kardiomyozyten, in Suspension vorliegend, für 45 min in 5 ml der CMTPIX-Färbelösung (12,5 µM, in serumfreiem Kulturmedium) inkubiert. Nach Abschluss aller weiteren für eine erfolgreiche Markierung der Zellen erforderlichen Arbeitsschritte konnten die Kardiomyozyten dann auf der epikardialen Oberfläche der *tissue-flaps* angesiedelt werden.

Die qualitative Analyse der mit den Kardiomyozyten rebesiedelten EZM beziehungsweise der Kokultur von HUVECs und Kardiomyozyten erfolgte schließlich am Konfokalmikroskop.

### **2.2.12 Stoffwechsel-Assay mittels *Dil-AcLDL-Uptake-Assay***

Um deren Stoffwechselaktivität zu evaluieren, wurden die in den Koronargefäßen kultivierten HUVECs einem *Dil-AcLDL-Uptake-Assay* unterzogen. Mithilfe dieses Assays konnte die Aufnahme von *Low-Density-Lipoprotein* (LDL) in die Endothelzellen fluoreszenzmikroskopisch analysiert werden.

Zur Beurteilung einer vorhandenen funktionellen Stoffwechselaktivität wurde das Gefäßsystem dezellularisierter Herzen zunächst re-endothelialisiert. Nach 24-stündiger Kultivierung wurde das rebesiedelte Koronarsystem dieser Herzen dann mittels einer 1 ml-Spritze über die noch in der Aorta ascendens liegende Venenverweilkanüle mit 1 ml der *Dil-AcLDL*-Färbelösung (10 µg *Dil-AcLDL*/ml Kulturmedium) vorsichtig manuell perfundiert. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation im Zellkulturbrutschrank wurde aus den Herzen das *Coronary Artery Tissue-Flap Model* erstellt und für weitere 24 Stunden kultiviert. Nach abschließendem Waschen der Proben in PBS erfolgte die qualitative Auswertung des Stoffwechsel-Assays am Konfokalmikroskop.

### **2.2.13 Histologie**

Sowohl die mikroskopische Untersuchung der rebesiedelten als auch der azellulären *tissue-flaps* erfolgte nicht nur durch direkte Mikroskopie der translumineszenten EZM mittels Licht- und Konfokalmikroskop, sondern auch durch die Anfertigung histologischer Färbungen von Kryoschnitten. Dafür wurden die *tissue-flaps* nativ oder unmittelbar nach abgeschlossener Kultivierung für 15 min in säurefreier (pH 7) phosphatgepufferter Formaldehydlösung (4%) fixiert.

Anschließend folgte das Einbetten des fixierten Gewebes in ein Medium für Gefrierschnitte. Mithilfe eines Kryostats wurden dann 6 µm dicke Schnitte der *tissue-flaps* angefertigt. Dabei war die Schnittebene stets parallel zur Oberfläche der *tissue-flaps* ausgerichtet. Auf diese Weise konnten die Koronargefäße in einem möglichst langstreckigen Verlauf im Längsschnitt erfasst werden. Die Lagerung der für die Histologie eingebetteten Proben erfolgte bei -80 °C.

#### Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Mittels der Hämatoxylin-Eosin-Färbung konnte ein guter Überblick über die Verteilung und Anordnung der in den Koronargefäßen neu angesiedelten Zellen gewonnen werden. Das Hämatoxylin färbt dabei Zellkerne dunkelblau an, während der Farbstoff Eosin die Bestandteile der EZM magentafarben zur Darstellung kommen lässt. Der auf diese Weise erzeugte farbliche Kontrast ermöglichte eine rasche und sichere Identifizierung der Zellen inmitten der kardialen EZM.

Im Zuge der Färbeprozedur wurden die Kryoschnitte zunächst für 1 min in Hämatoxylin getaucht. Darauf folgte ein jeweils 1 minütiges Bad in Aqua dest., 5%-igem Eisessigwasser, erneut in Aqua dest., dann in Leitungswasser und schließlich in 70%-igem Ethanol. Anschließend wurden die Schnitte für 15 min in Eosin gefärbt, durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und letztlich für zweimal je 1 min mittels Xylol entfettet und in Eindeckmedium eingebettet.

#### Movat's Pentachrom-Färbung

Ergänzend zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden die Kryoschnitte mit der Movat's Pentachrom-Färbung gefärbt. Diese stellt Zellkerne dunkelblau oder schwarz, Zytoplasma rot, Kollagen gelb bis orange, elastische Fasern braun und Glykosaminoglykane grün dar [96]. Durch diese feine farbliche Differenzierung der verschiedenen Matrixkomponenten wurde das Identifizieren vor allem kleinkalibriger Gefäßstrukturen inmitten der umliegenden Matrix erheblich erleichtert. So waren Koronargefäße aufgrund des relativ hohen Gehalts der Gefäßwände an elastischen Fasern innerhalb der EZM als dunkel angefärbte lumenhaltige Strukturen zu erkennen. Dadurch war es letztlich auch möglich, die Lage der neu in den dezellularisierten Rattenherzen angesiedelten Zellen sicher als intra- oder extravasal zu charakterisieren.

Vor Beginn der Färbung wurden die Kryoschnitte für 10 min in säurefreier (pH 7) phosphatgepufferter Formaldehydlösung (4%) fixiert. Vor und nach dieser Fixierung erfolgte je ein Waschschrift in Aqua dest. für jeweils 5 min. Im Anschluss daran wurden die Proben 10 min lang in Bouin'scher Lösung (300 ml Pikrinsäure, 100 ml 27-40%-ige Formaldehydlösung, 20 ml 100%-iger Eisessig) gefärbt, die zuvor auf 50 °C vorgewärmt worden war. Bevor die Schnitte dann in einem weiteren Färbeschritt für 5 min in 5%-iges Natriumthiosulfat überführt werden konnten, wurden sie 10 min lang unter fließendem kaltem Leitungswasser gespült. An das Bad in Natriumthiosulfat schlossen sich drei weitere Waschschriffe, nun für dreimal je 2 min in Aqua dest., an. Für die Dauer von 20 min erfolgte dann die Färbung der Proben mittels Alcianblau (2 g Alcianblau in 200 ml Aqua dest.). Sowohl vor als auch nach der darauffolgenden 10-minütigen Stabilisierung der Proben in alkalischem Alkohol (360 ml 96%-iger Ethanol, 40 ml 40%-iges Ammoniumhydroxid) wurden diese erneut für je 3 min unter fließendem kaltem Leitungswasser gespült. Vor seiner Verwendung wurde der alkalische Alkohol auf 60 °C erhitzt. Als nächstes Reagenz diente die Weigert's Färbelösung (60 ml 2%-iges Hämatoxylin, 40 ml Eisenchlorid, 20 ml Jodlösung). Nach 9-minütigem Bad in dieser Lösung wurden die Kryoschnitte wie bereits beschrieben unter fließendem Wasser und anschließend dreimal in Aqua dest. gewaschen. Der nächste Arbeitsschritt beinhaltete die Färbung der Proben für 1 min in Crocein-Säurefuchsin-Färbelösung (80 ml Brilliant Crocein R, 20ml Säurefuchsin). Darauf folgten erneut drei Waschschriffe in Aqua dest., bevor die Schnitte für 5 min in 5% ige Phosphorwolframsäure (25 g Phosphorwolframsäure in 500 ml Aqua dest.) getaucht wurden. Anschließend wurden die Proben für 5 min in 1%-igen Eisessig überführt, um daraufhin erneut dreimal in Aqua dest. gewaschen zu werden. Vor dem letzten Färbeschritt in alkoholischem Safran (12 g Safran du Gatinais in 200ml 100%-igem Ethanol) erfolgte die Dehydratisierung der Proben für 1 min in 96%-igem Ethanol und dann für zweimal je 1 min in 100%-igem Ethanol. Die Färbedauer in alkoholischem Safran betrug 8 min. Abschließend wurden die histologischen Schnitte für zweimal je 1 min in 100%-igem Ethanol erneut dehydratisiert, für weitere dreimal 5 min mittels Xylol entfettet und nach darauffolgender Lufttrocknung in Eindeckmedium eingebettet.

### Phalloidin-Färbung

Um die Morphologie der Zellen innerhalb der *tissue-flaps* beurteilen zu können, wurde deren Zytoskelett mit Phalloidin Rhodamin angefärbt. Das Phalloidin bindet dabei hochselektiv an F-Actin, wodurch eine fluoreszenzmikroskopische Analyse des Zytoskeletts und somit indirekt auch der Zellmorphologie ermöglicht wurde.

Vor der Färbung mit Phalloidin Rhodamin wurden die Kryoschnitte für 10 min in säurefreier (pH 7) phosphatgepufferter Formaldehydlösung (4%) fixiert. Anschließend folgte die Entwässerung der Schnitte für 5 min in -20 °C kaltem Aceton. Sowohl vor als auch nach jedem dieser beiden Arbeitsschritte wurden die Proben je 2 mal in PBS gewaschen. Auf jeden Schnitt konnten daraufhin 40 µl der Phalloidin-Färbelösung (5 µl der 6,6 µM Stocklösung in 200 µl PBS versetzt mit 1% BSA) pipettiert werden. Nach 20-minütiger lichtgeschützter Inkubation bei Raumtemperatur, anschließendem Waschschrift in PBS und Lufttrocknung erfolgte das Einbetten der Kryoschnitte in einem DAPI-haltigem Eindeckmedium.

#### **2.2.14 Statistik**

Für alle repetitiven Versuche wurde stets eine Probenzahl von mindestens  $n=3$  verwendet. Alle quantitativen Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

### **3 Ergebnisse**

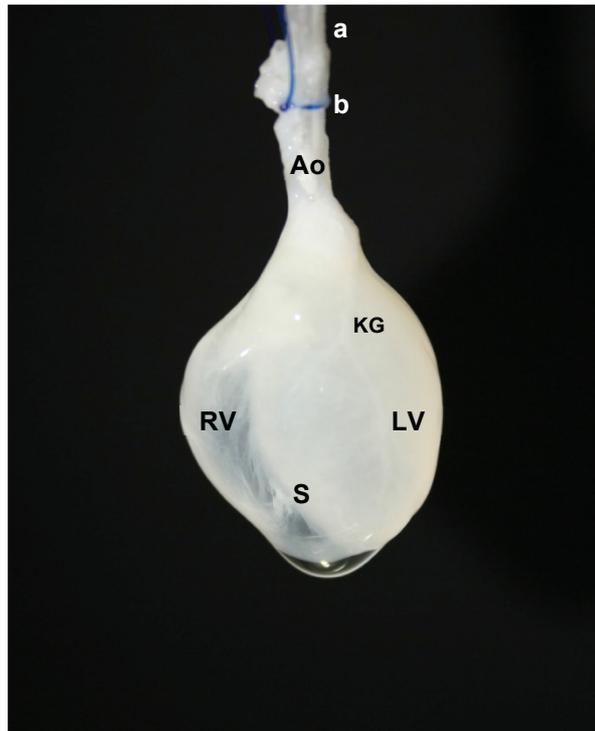
Zur besseren Übersichtlichkeit sind in diesem Kapitel nur einige der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten quantitativer und semi-quantitativer Analysen repräsentativ dargestellt. Die Gesamtheit der erhobenen Rohdaten kann dem tabellarischen Anhang dieser Arbeit (Tabellen 3-7) entnommen werden.

#### **3.1 *In toto* Dezellularisierung der Rattenherzen**

##### **3.1.1 Beurteilung der dezellularisierten Herzen**

Mittels des Langzeitperfusionssystems und des Dezellularisierungsprotokolls wurden im Rahmen dieser Arbeit 160 Rattenherzen dezellularisiert. Durch das hierbei angewandte softwaregesteuerte Dezellularisierungs-Verfahren, basierend auf einer kontinuierlich druckkontrollierten Organperfusion, konnte ein hoher Grad an Standardisierung gewährleistet werden. Dabei konnten nicht nur die natürliche makroskopische Morphologie und Anatomie der Organe in ihrer ursprünglichen Form vollständig erhalten (Abb. 7), sondern auch die kardiale EZM nahezu restlos von allen zellulären Bestandteilen befreit werden (Abb. 8-10).

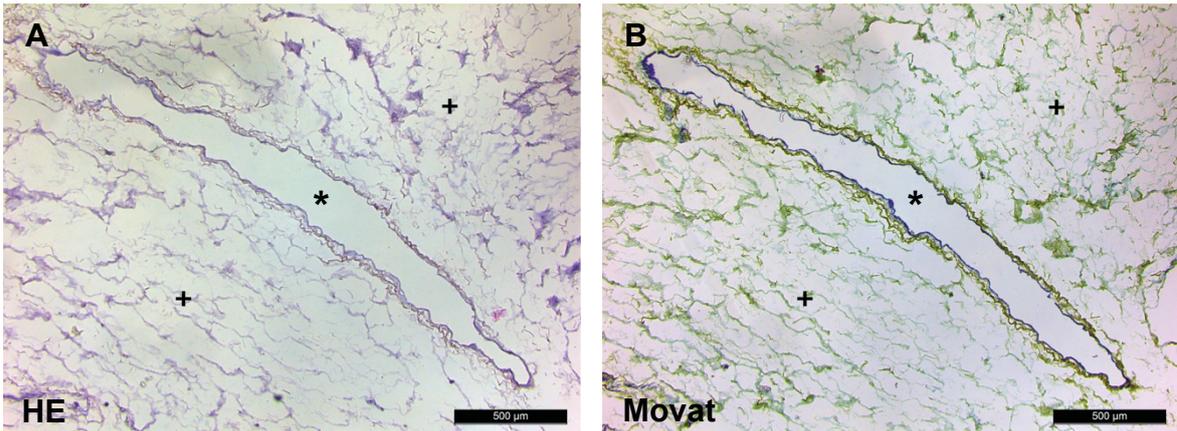
Um im Rahmen dieser Arbeit einen konstanten Dezellularisierungs-Standard und somit Vergleichbarkeit gewährleisten zu können, wurden die dezellularisierten Organe in regelmäßigen Abständen sowohl makro- als auch mikroskopisch untersucht. Nur diejenigen dezellularisierten Rattenherzen, die über eine vollständig erhaltene Organmorphologie sowie zugleich über eine suffizient dezellularisierte kardiale EZM verfügten, wurden für die im Folgenden beschriebenen Experimente verwendet.



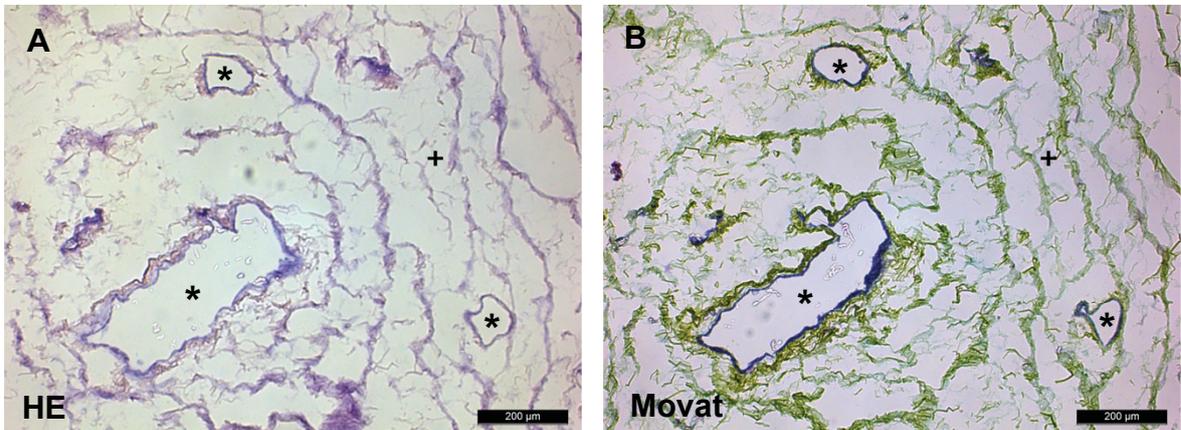
**Abb. 7: *In toto* dezellularisiertes Rattenherz.** Repräsentative makroskopische Ansicht eines *in toto* dezellularisierten Rattenherzens. Ao, Aorta ascendens; RV, rechter Ventrikel; LV, linker Ventrikel; S, Ventrikelseptum; KG, Koronargefäß; a, Venenverweilkanüle; b, Polypropylenfaden (zur Fixierung des Herzens an der Venenverweilkanüle).

### 3.1.2 Histologie der EZM und der dezellularisierten Koronargefäße

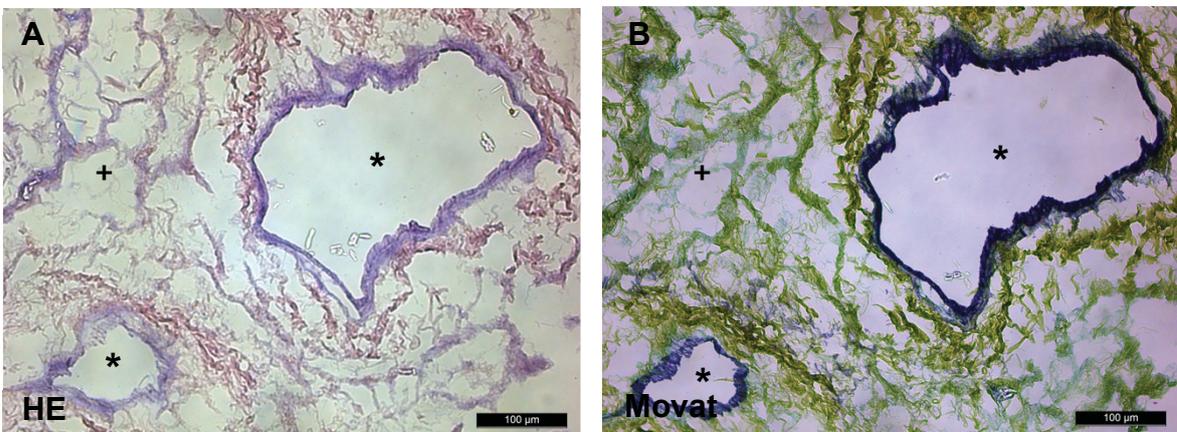
Zur mikroskopischen Beurteilung der dezellularisierten Koronargefäße wurden histologische Gefrierschnitte der dezellularisierten Rattenherzen erstellt. Diese zeigten ein intaktes, zellfreies Koronarsystem, umgeben von einer vollständig azellulären kardialen EZM (Abb. 8-10). Die Dezellularisierung der Rattenherzen mithilfe des perfusionsbasierten Dezellularisierungs-Verfahrens führte folglich nicht nur zu einer Elimination aller extravasal gelegenen Zellen (Abb. 8), sondern auch zu einer vollständigen Entfernung der Endothelzellen aus den nativen Koronargefäßen (Abb. 9 und 10). Die Lumina der Koronargefäße stellten sich dabei auch in der mikroskopischen Untersuchung offen und frei von im Zuge der Dezellularisierung anfallendem Zelldetritus dar (Abb. 8-10).



**Abb. 8: De-endothelialisierte Koronargefäße und kardiale EZM I.** Repräsentative mikroskopische Ansichten eines großkalibrigen de-endothelialisierten Koronargefäßes und der umliegenden kardialen EZM. (A), Hämatoxylin-Eosin- und (B), Movat's Pentachrom-Färbung. (A) und (B) 50x (Maßstab 500 µm). \*, Lumen eines dezellularisierten Koronargefäßes; +, perivaskuläre EZM.



**Abb. 9: De-endothelialisierte Koronargefäße und kardiale EZM II.** Repräsentative mikroskopische Ansicht de-endothelialisierter Koronargefäße und der umliegenden kardialen EZM. (A), Hämatoxylin-Eosin- und (B), Movat's Pentachrom-Färbung. (A) und (B) 100x (Maßstab 200 µm). \*, Lumina dezellularisierter Koronargefäße; +, perivaskuläre EZM.



**Abb. 10: De-endothelialisierte Koronargefäße und kardiale EZM III.** Repräsentative mikroskopische Ansichten de-endothelialisierter Koronargefäße und der umliegenden kardialen EZM. (A), Hämatoxylin-Eosin- und (B), Movat's Pentachrom-Färbung. (A) und (B) 200x (Maßstab 100 µm). \*, Lumina der dezellularisierten Koronargefäße; +, perivaskuläre EZM.

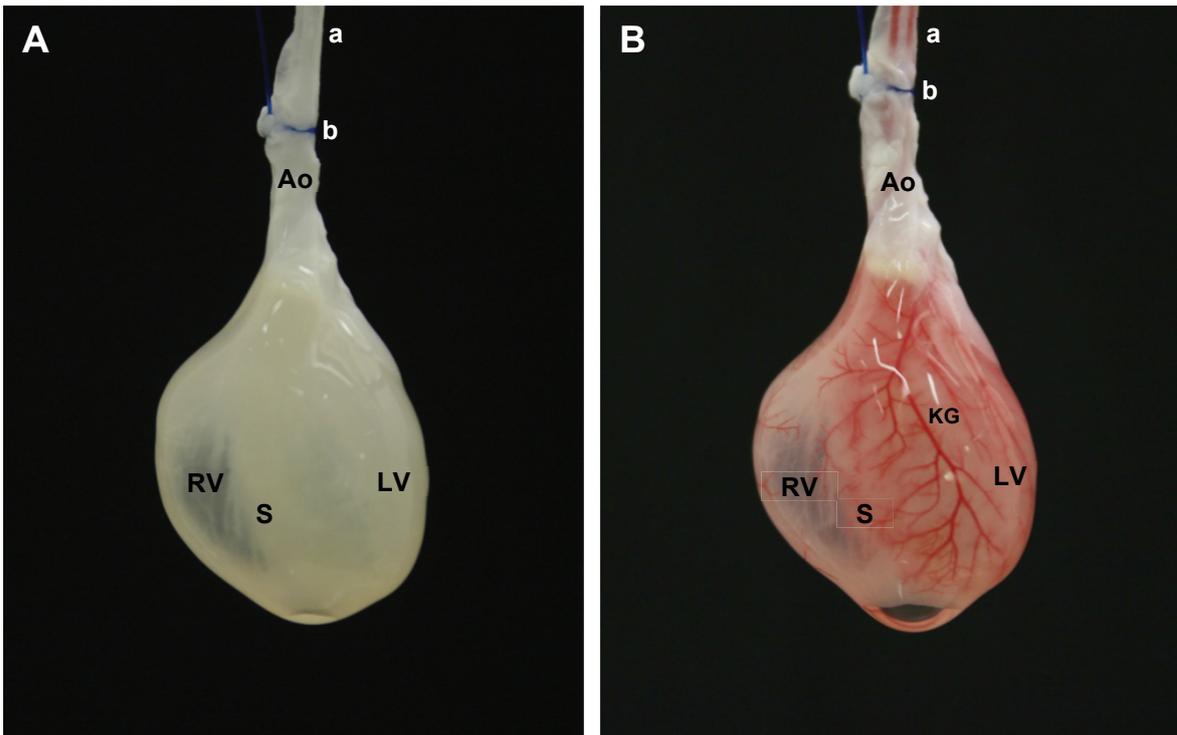
Die Movat's Pentachrom-Färbung ließ darüber hinaus auf den Erhalt wichtiger EZM-Komponenten schließen. So waren in den mikroskopischen Untersuchungen der kardialen EZM deutlich sowohl grünblau als auch gelblich angefärbte Matrixbestandteile zu erkennen, was für den Erhalt von Glykosaminoglykanen und Kollagen sprach (Abb. 8-10, jeweils B). Auch die Basalmembran der Koronargefäße war mithilfe dieser Färbung gut erkennbar. Sie kam als dunkel angefärbte Linie zur Darstellung, welche die Gefäßwände lumenseitig begrenzte (Abb. 9 und 10, jeweils B). Nukleäre oder zytoplasmatische Rückstände in Form dunkel beziehungsweise rötlich angefarbter Strukturen konnten hingegen nicht beobachtet werden (Abb. 8-10, jeweils B).

Mittels des perfusionsbasierten Dezellularisierungs-Verfahrens war es demnach möglich, ein dezellularisiertes Koronarsystem sowie eine zellfreie perivaskuläre EZM zu erzeugen und dabei die Integrität und den Aufbau sowohl der Gefäßstrukturen als auch der umliegenden EZM nahezu vollständig zu erhalten.

### **3.1.3 Koronargefäßdarstellung durch Epoxidharz-Perfusion**

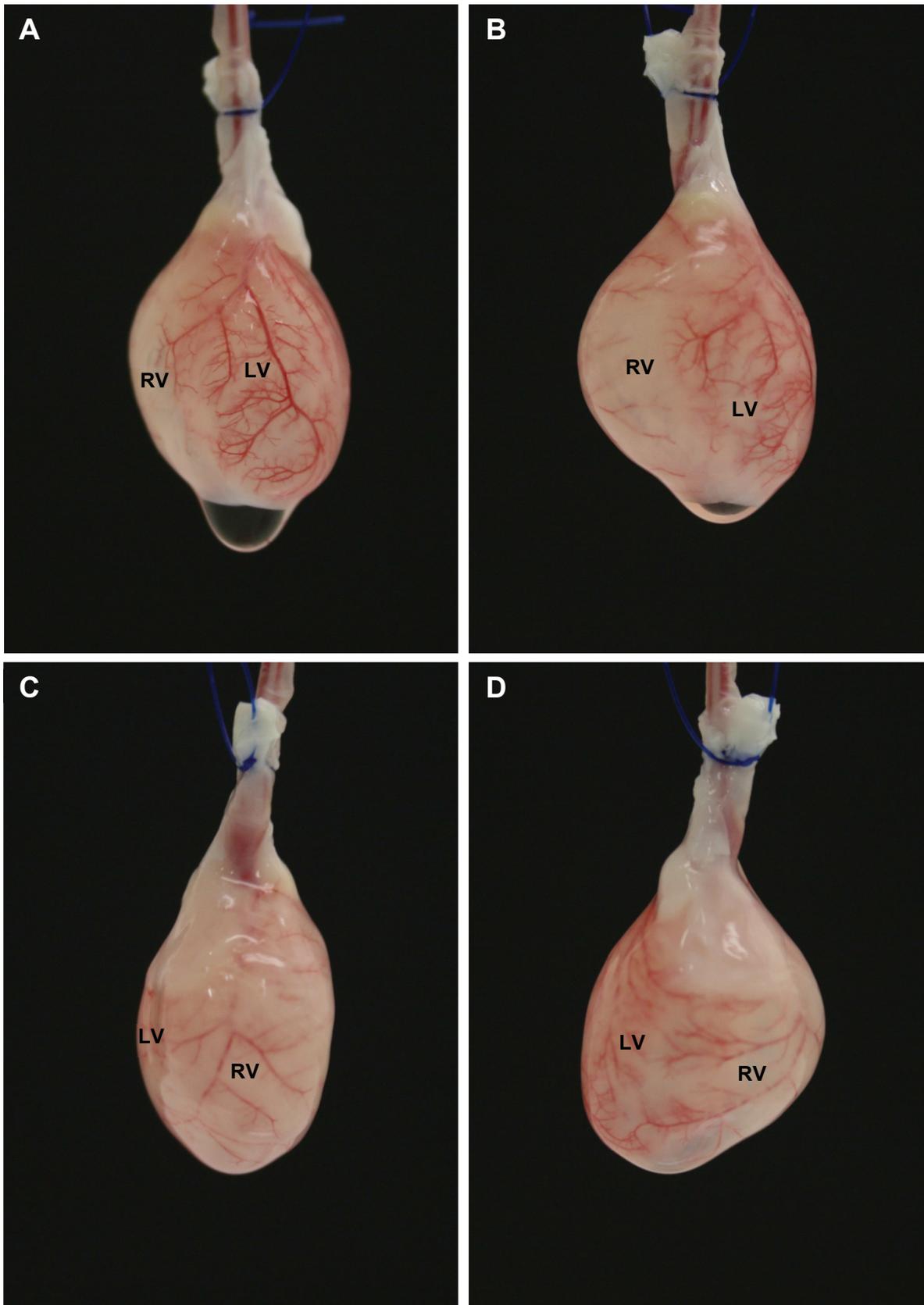
Zur makroskopischen Darstellung des azellulären Koronarsystems wurden die *in toto* dezellularisierten Rattenherzen mit einem roten Epoxidharz-Härter-Gemisch perfundiert (Abb. 11).

Die retrograde Perfusion der Aorta ascendens mit dem farbigen Epoxidharz führte dabei zu einer gleichmäßigen Verteilung des Perfusats im gesamten rechts- und linkskoronararteriellen Gefäßsystem. Auch kleinkalibrige, kapillarähnliche Gefäße konnten im Zuge der Perfusion mit Epoxidharz gefüllt werden, ohne dass dabei der Übertritt von größeren Mengen des Harzes aus den Gefäßlumina in die umliegende EZM zu beobachten war (Abb. 11 B). Dies ließ sowohl auf die vollständig erhaltene Integrität als auch die Durchgängigkeit des Koronarsystems nach dem Dezellularisierungsprozess schließen.



**Abb. 11. Koronargefäßdarstellung mittels Epoxidharz-Perfusion I.** Repräsentative makroskopische Aufnahmen eines *in toto* dezellularisierten Rattenherzens vor und nach Perfusion der Koronargefäße mit einem roten Epoxidharz-Härter-Gemisch. (A), *In toto* dezellularisiertes Rattenherz. (B), *In toto* dezellularisiertes Rattenherz nach Perfusion der Koronargefäße mit einem roten Epoxidharz-Härter-Gemisch. Ao, Aorta ascendens; RV, rechter Ventrikel; LV, linker Ventrikel; S, Ventrikelseptum; KG, Koronargefäß; a, Venenverweilkanüle (17G); b, Polypropylenfaden (zur Fixierung des Herzens an der Venenverweilkanüle).

Eine semi-quantitative Analyse der makroskopisch sichtbar perfundierten Koronaräste anhand jeweils vier hochauflösender makroskopischer Aufnahmen pro Rattenherz ( $n=4$ ) (Abb. 12) ergab  $21 \pm 11$  perfundierte Koronargefäße vierter Ordnung, ausgehend von der rechten Koronararterie, und  $47 \pm 19$  perfundierte Koronargefäße vierter Ordnung, ausgehend von der linken Koronararterie (Abb. 13). Die Rattenherzen verfügten demnach auch nach erfolgter koronarperfusionsbasierter Dezellularisierung weiterhin über vollständig durchgängige und in ihrer Integrität unbeeinträchtigte Koronargefäße. Dies galt sowohl für große aortennahe als auch für kleine kapillarähnliche Gefäßabschnitte, da trotz Perfusion mit dem Epoxidharz-Gemisch keine Leckagen in das umliegende Gewebe beobachtet werden konnten.



**Abb. 12: Koronargefäßdarstellung mittels Epoxidharz-Perfusion II.** Vier repräsentative makroskopische Ansichten eines *in toto* dezellularisierten Rattenherzens nach Perfusion der Koronargefäße mit einem roten Epoxidharz-Härter-Gemisch. (A), Dezellularisiertes Rattenherz nach Perfusion mit rotem Epoxidharz. (B)-(D), Drei weitere Ansichten desselben Rattenherzens, wobei vor jeder der drei Aufnahmen das Herz jeweils 90° um seine vertikale Achse entgegen dem Uhrzeigersinn gedreht wurde. RV, rechter Ventrikel; LV, linker Ventrikel.

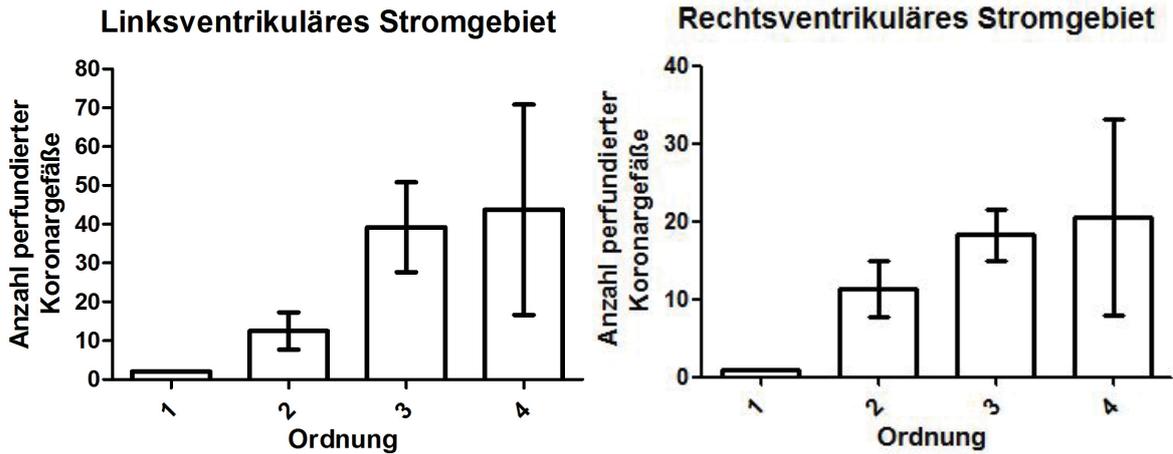
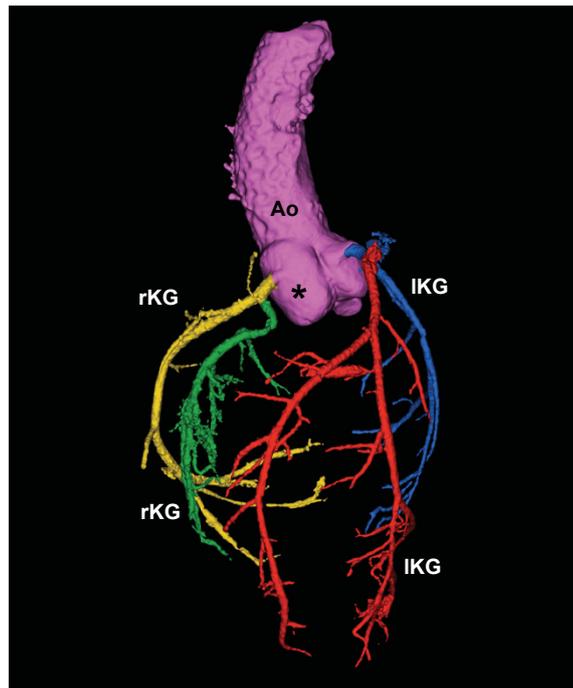


Abb. 13: Anzahl der mit Epoxidharz perfundierten Gefäße des links- und rechts-koronararteriellen Gefäßsystems.

### 3.1.4 Mikro-Computertomographie

Durch Beimischung eines röntgendichten Kontrastmittels zur Epoxidharz-Mischung konnte das Koronarsystem der dezellularisierten Rattenherzen ( $n=2$ ) im Mikro-CT visualisiert werden (Abb. 14). Die 3D-Rekonstruktion des im Rahmen dieser Untersuchung gewonnenen Datensatzes lässt deutlich erkennen, dass die Rattenherzen auch nach perfusionsbasierter Dezellularisierung noch über eine suffizient schließende Aortenklappe verfügten, die den Übertritt von Harz in den linken Ventrikel verhinderte und dabei eine ausreichende Füllung der Koronararterien gewährleistete (Abb. 14). Die größeren Koronargefäße stellten sich auch in dieser Untersuchung offen und ihrem natürlichen Verlauf gegenüber weitestgehend unverändert dar. Ein Austritt des Perfusats aus dem Gefäßsystem in die angrenzende EZM konnte auch hier nicht beobachtet werden, was auf die Unversehrtheit der hier abgebildeten dezellularisierten Koronargefäße schließen ließ (Abb. 14).



**Abb. 14: Mikro-CT-Angiographie.** 3D-Rekonstruktion einer Mikro-CT-Angiographie der de-endothelialisierten Koronargefäße. Ao, Aorta ascendens; \*, Aorten-klappe; IKG, Koronargefäß aus dem Stromgebiet der linken Koronararterie; rKG, Koronargefäß aus dem Stromgebiet der rechten Koronararterie.

## 3.2 Etablierung eines standardisierten *in vitro* Modellsystems

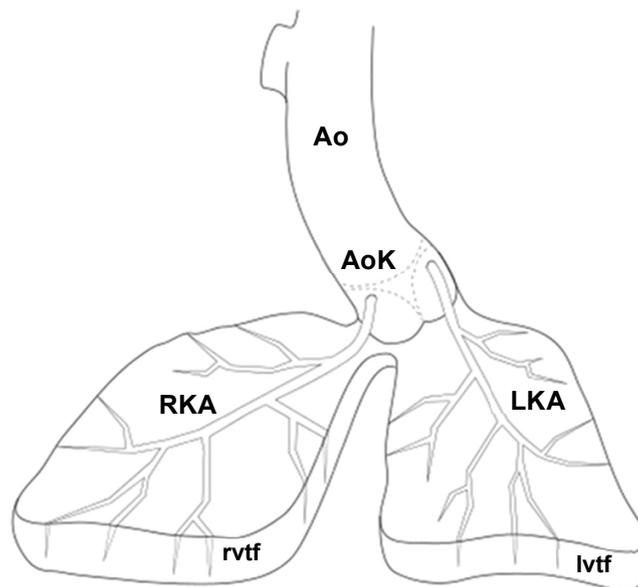
### 3.2.1 *Coronary Artery Tissue-Flap Model*

Ausgehend von den *in toto* dezellularisierten Rattenherzen und deren durch das angewandte Dezellularisierungs-Verfahren hochgradig präservierter EZM sowie dem intaktem Koronarsystem wurde im Rahmen dieser Arbeit ein standardisiertes *in vitro* Modellsystem zur Vaskularisierung azellulärer kardialer EZM etabliert. Dieses Modellsystem wurde *Coronary Artery Tissue-Flap Model* (CATFM) genannt (Abb. 15).

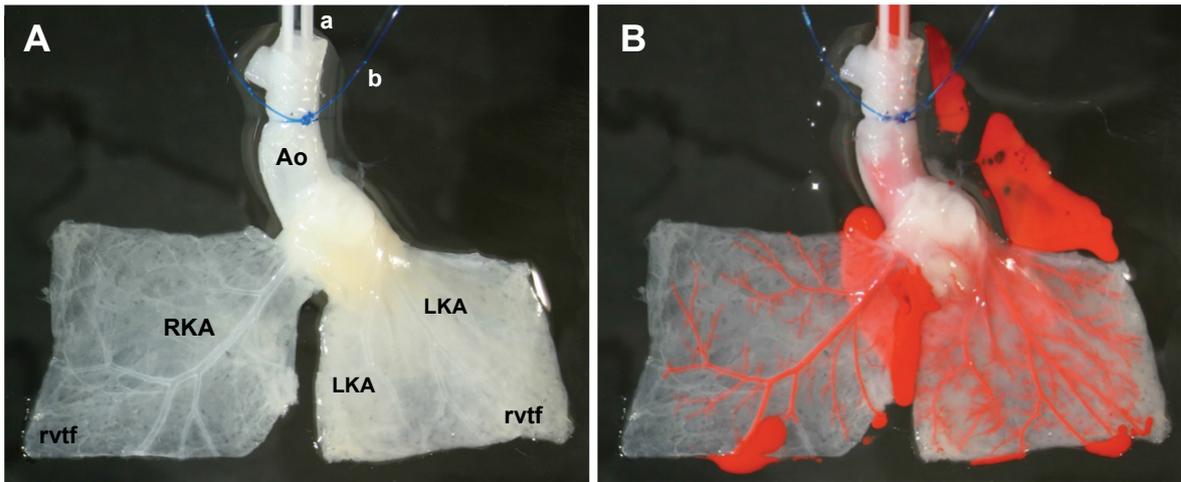
Zur Anfertigung des CATFM wurden durch ein standardisiertes mikrochirurgisches Präparationsverfahren aus einem dezellularisierten Rattenherz zwei annähernd quadratische Gewebelappen (*tissue-flaps*) gewonnen, die über eine Fläche von je etwa 0,5 bis 1 cm<sup>2</sup> verfügten und dem rechten beziehungsweise dem linken Ventrikel entstammten. Beide *tissue-flaps* waren mit der Aorta ascendens verbunden und wurden jeweils von der rechten beziehungsweise linken Koronararterie und deren Ästen vollständig durchzogen und perfundiert (Abb. 16). Durch das standardisierte Präparationsverfahren entstanden folglich zwei

azelluläre und vollständig vaskularisierte Bereiche kardialer EZM, die stets über eine definierte Größe sowie einheitliche Matrixeigenschaften verfügten und zudem in hohem Maße die natürlichen Eigenschaften des nativen Myokards wiedergaben. Unter diesen Eigenschaften sind insbesondere die spezielle Gefäßarchitektur des Herzmuskelgewebes sowie der besondere ultrastrukturelle Aufbau der myokardialen EZM zu verstehen.

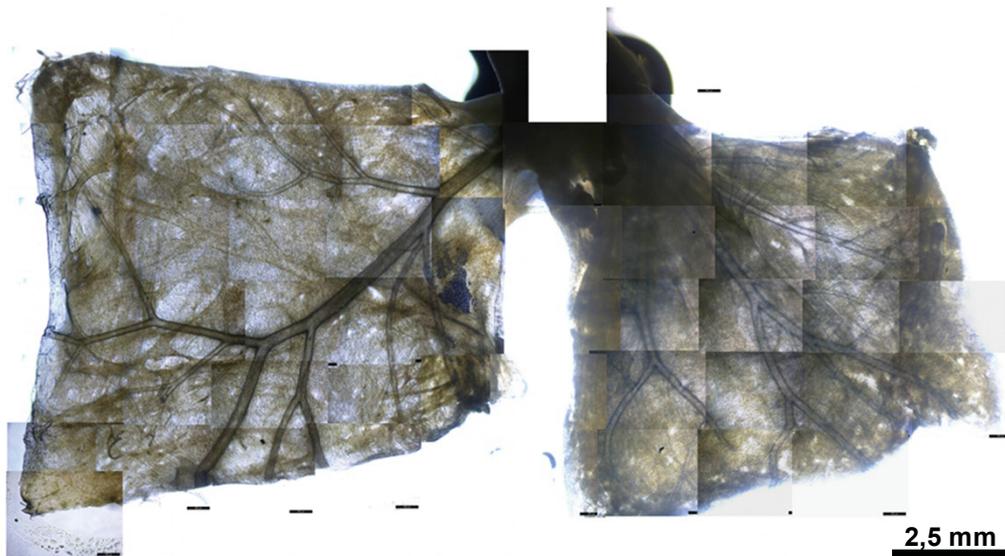
Die Translumineszenz des dezellularisierten Myokards und die geometrischen Proportionen der Rattenherzen ermöglichten zudem die direkte Visualisierung der in den *tissue-flaps* enthaltenen Koronargefäße im Sinne eines *Live Imaging* (Abb. 17). Darüber hinaus wurde die Darstellung des Koronarsystems durch die dreidimensionale Konfiguration des CATFM erheblich erleichtert. Gegenüber der ursprünglichen Anatomie der Rattenherzen konnte die ventrikuläre Matrix, nun in Form der *tissue-flaps*, in einer Ebene, zum Beispiel auf einem Objektträger liegend, ausgerichtet werden. Dadurch wurde eine nahezu überlagerungsfreie Darstellung des koronaren Gefäßbaumes erreicht. Dies wiederum ermöglichte es, nicht nur große epikardiale, sondern auch kleinere, subendokardial gelegene Gefäße direkt zu analysieren (Abb. 17).



**Abb. 15: Coronary Artery Tissue-Flap Model I.** Schematische Darstellung des *Coronary Artery Tissue-Flap Model*. Ao, Aorta ascendens; AoK, Aortenklappe; RKA, rechte Koronararterie; LKA, linke Koronararterie; rvtf, rechtsventrikulärer *tissue-flap*; lvtf, linksventrikulärer *tissue-flap*.



**Abb. 16: Coronary Artery Tissue-Flap Model II.** (A), Coronary Artery Tissue-Flap Model. (B), Coronary Artery Tissue-Flap Model nach Perfusion der Koronargefäße mit einem roten Epoxidharz-Härter-Gemisch. Ao, Aorta ascendens; RKA, rechte Koronararterie; LKA, Äste der linken Koronararterie; rvtf, rechtsventrikulärer *tissue-flap*; lvtf, linksventrikulärer *tissue-flap*; a, Venenverweilkanüle (17G); b, Polypropylenfaden (zur Fixierung des Coronary Artery Tissue-Flap Model an der Venenverweilkanüle).



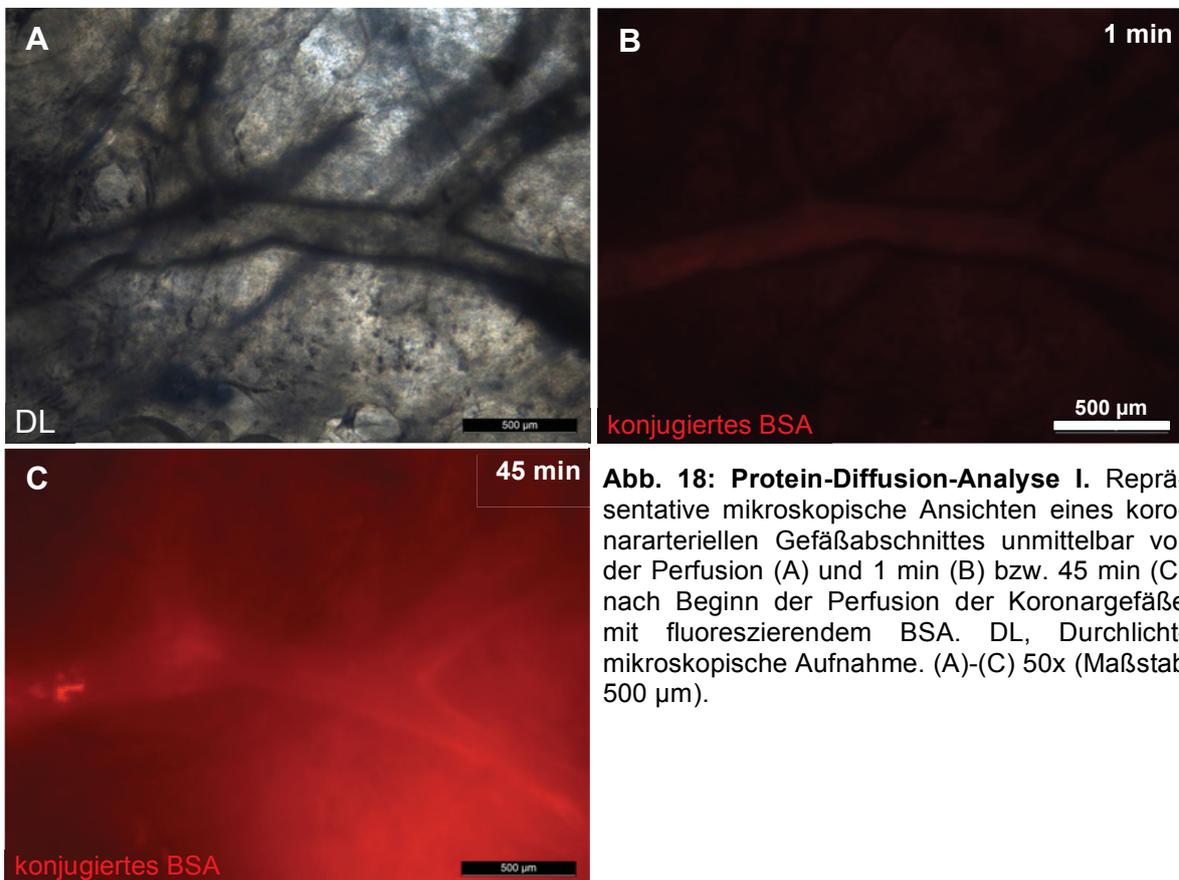
**Abb. 17: Coronary Artery Tissue-Flap Model III.** Collage durchlichtmikroskopischer Aufnahmen des Coronary Artery Tissue-Flap Model. 4x (Maßstab 2,5 mm).

### 3.2.2 Protein-Diffusions-Analyse

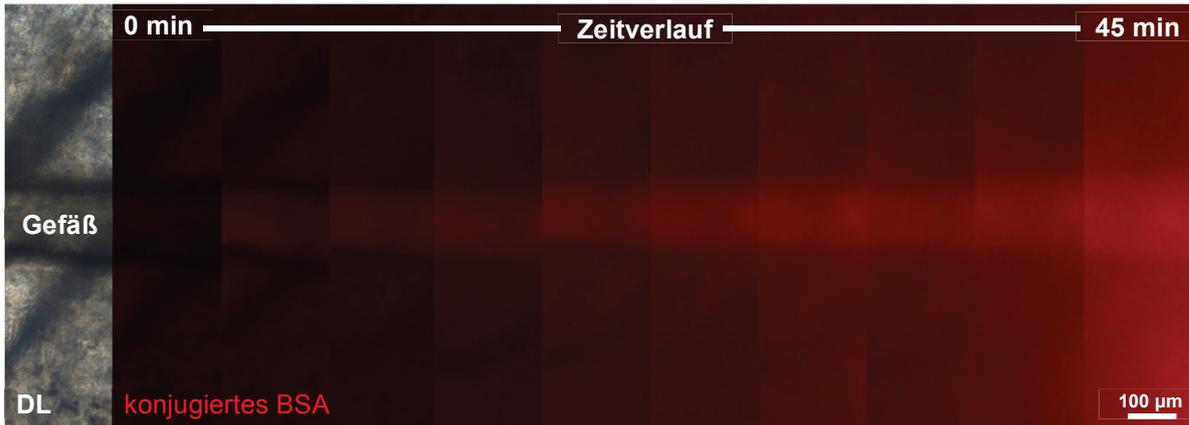
Um die funktionelle Integrität des dezellularisierten Koronarsystems innerhalb des CATFM auch auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurde eine Protein-Diffusions-Analyse durchgeführt. Hierbei wurde das Gefäßsystem der *tissue-flaps*

mittels einer fluoreszenzmarkierten Albumin-Lösung perfundiert und die Diffusion dieser Lösung in die umliegende EZM semi-quantitativ analysiert.

Während der gesamten Perfusionsdauer konnten dabei im Bereich der untersuchten Gefäßwände keine relevanten Leckagen in Form punktueller Extravasationen des fluoreszierenden Albumins beobachtet werden (Abb. 18 B und C). Die Gefäße innerhalb der *tissue-flaps* verfügten folglich auch nach abgeschlossener Dezellularisierung über eine weitgehend unversehrte, zellfreie Gefäßwand samt intakter Basalmembran, die auch weiterhin über eine suffiziente Barrierefunktion zur Trennung von Intra- und Extravasalraum verfügte (Abb. 18 und Abb. 19).



**Abb. 18: Protein-Diffusion-Analyse I.** Repräsentative mikroskopische Ansichten eines koronararteriellen Gefäßabschnittes unmittelbar vor der Perfusion (A) und 1 min (B) bzw. 45 min (C) nach Beginn der Perfusion der Koronargefäße mit fluoreszierendem BSA. DL, Durchlichtmikroskopische Aufnahme. (A)-(C) 50x (Maßstab 500 µm).



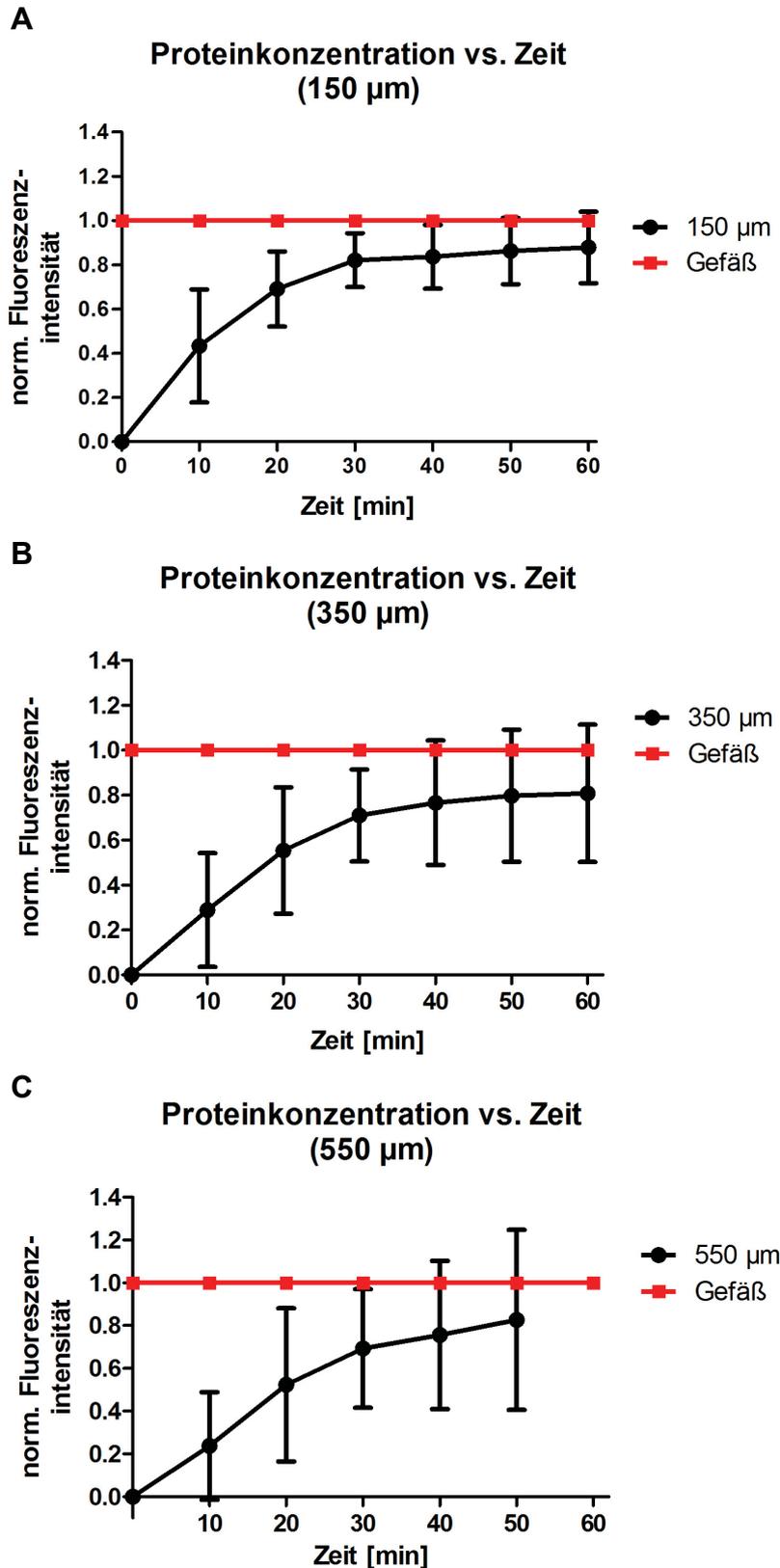
**Abb. 19: Protein-Diffusions-Analyse II.** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Abbildung der Diffusion des konjugierten BSA aus dem Lumen des untersuchten Gefäßes in die umliegende EZM, abgebildet im zeitlichen Verlauf von 0 bis 45 min. Die fluoreszenzmikroskopischen Einzelbilder stellen die Fläche dar, innerhalb der die Fluoreszenzintensität des markierten BSA bestimmt wurde. DL, Durchlichtmikroskopische Aufnahme des untersuchten Koronargefäßes unmittelbar vor Perfusionsbeginn. 50x (Maßstab 100 µm).

Abbildung veröffentlicht: Hug Aubin, Alexander Kranz, Jörn Hülsmann, Antonio Pinto, Mareike Barth, Andrey Fomin, Artur Lichtenberg, Payam Akhyari, *A novel native derived coronary artery tissue-flap model*. Tissue Engineering Part C Methods, 2013. 19(12): p. 970-80. Wiedergabe vom Verlag (Mary Ann Liebert, Inc.) genehmigt.

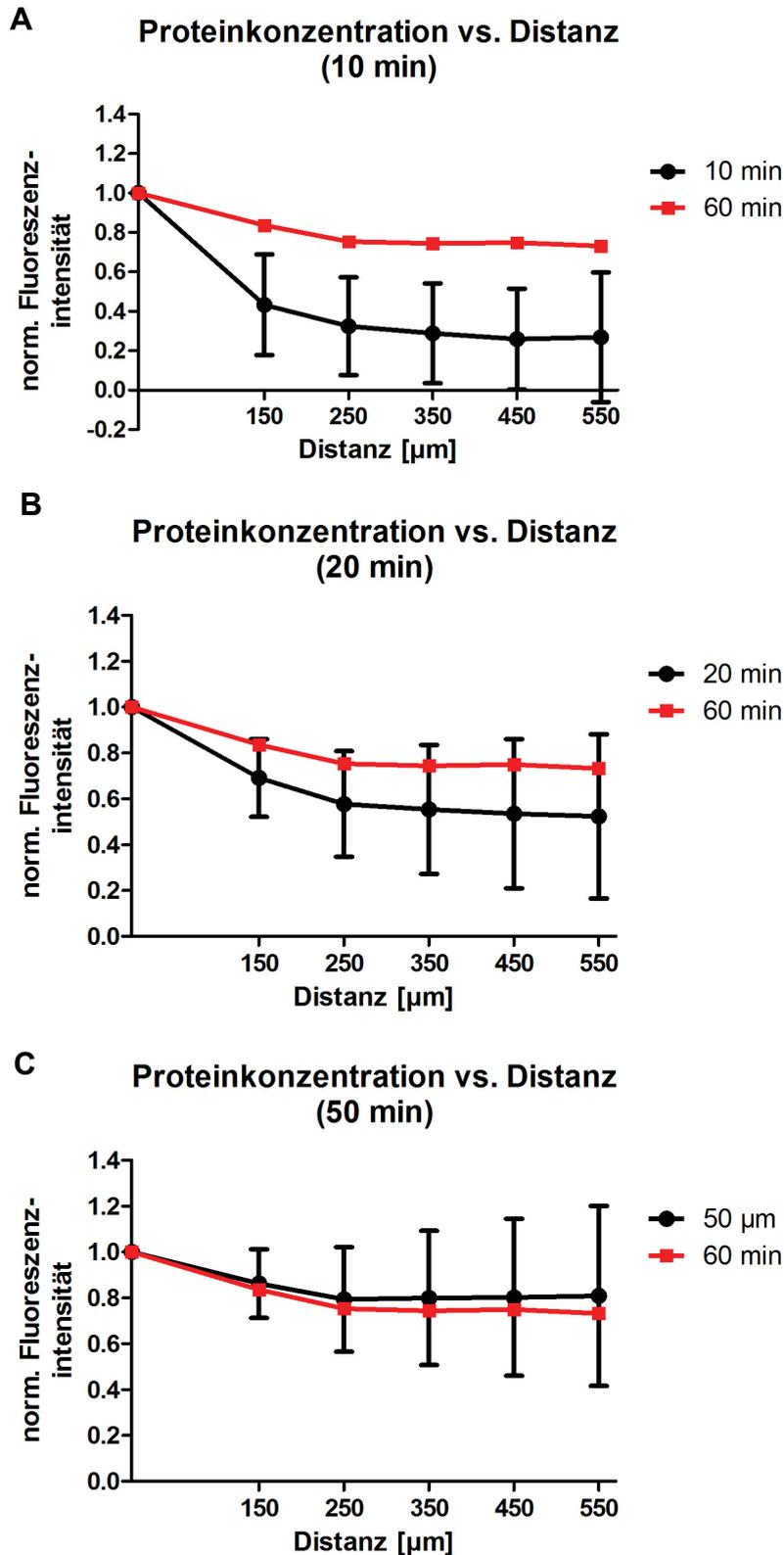
In der semi-quantitativen Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität zeigte sich eine kontinuierliche Diffusion des fluoreszenzmarkierten Albumins aus den untersuchten Gefäßlumina in die angrenzende EZM, wo sich das BSA im zeitlichen Verlauf zunehmend anreicherte. Dieser zeitliche Verlauf der Diffusion ließ sich für jeden der erfassten Messpunkte, also in jeweils unterschiedlichen Entfernungen zum analysierten Koronargefäß, beobachten. Repräsentativ ist dies für drei Messpunkte, die in 150 µm, 350 µm und 550 µm Entfernung gesetzt wurden, grafisch dargestellt (Abb. 20). Dabei ist zu erkennen, dass die normierten Fluoreszenzintensitäten (normiert in Relation zur Fluoreszenzintensität im Gefäßlumen), nach anfänglich jeweils kontinuierlichem Anstieg, letztlich einen Sättigungswert erreichten. In 150 µm Entfernung zum perfundierten Gefäßabschnitt lag der Sättigungswert der norm. Fluoreszenzintensität nach 30 min bei  $0,82 \pm 0,04$ . Im Abstand von 550 µm hingegen stellte er sich nach 50 min ein und betrug dann  $0,81 \pm 0,29$  ( $n=4$ ). Darüber hinaus konnte mit zunehmender Entfernung zum Gefäßlumen eine Abnahme der norm. Fluoreszenzintensität beobachtet werden (Abb. 21). So betrug die norm. Fluoreszenzintensität 10 min nach Perfusionsbeginn im Abstand von 150 µm  $0,43 \pm 0,26$ , während sie in einer

Entfernung von 550  $\mu\text{m}$  zum selben Untersuchungszeitpunkt nur noch bei  $0,27 \pm 0,34$  ( $n=4$ ) lag (Abb. 21).

Die azellulären Gefäßwände als Gerüststrukturen der zuvor nativen Koronargefäße gewährleisteten folglich eine gerichtete Diffusion des fluoreszenzmarkierten Albumins aus dem Gefäßlumen in die umliegenden EZM. Ohne einen vorschnellen Austritt des Perfusats durch eine potentiell beschädigte Gefäßwand beobachten zu können, zeigte sich im zeitlichen Verlauf der Untersuchung eine kontinuierliche Diffusion des Albumins in das angrenzende Gewebe. Diese Beobachtungen ließen auf die molekulare Integrität der vaskulären Gerüststrukturen schließen, die trotz des 6-tägigen perfusionsbasierten Dezellularisierungs-Verfahrens weitestgehend erhalten werden konnte.



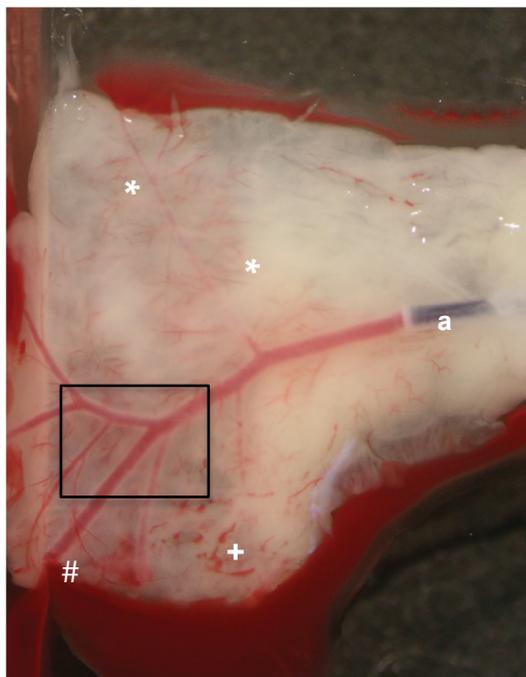
**Abb. 20: Graphische Darstellung der normierten Fluoreszenzintensitäten I.** (A), (B) und (C), Zeitlicher Verlauf der mittleren Fluoreszenzintensität ( $n=4$ , Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) in 150  $\mu\text{m}$ , 350  $\mu\text{m}$  beziehungsweise 550  $\mu\text{m}$  Entfernung zum perfundierten Gefäßabschnitt. Abbildung modifiziert nach: Hug Aubin, Alexander Kranz, Jörn Hülsmann, Antonio Pinto, Mareike Barth, Andrey Fomin, Artur Lichtenberg, Payam Akhyari, *A novel native derived coronary artery tissue-flap model*. Tissue Engineering Part C Methods, 2013. 19(12): p. 970-80. Wiedergabe vom Verlag (Mary Ann Liebert, Inc.) genehmigt.



**Abb. 21: Graphische Darstellung der normierten Fluoreszenzintensitäten II.** (A), (B) und (C), Verlauf der mittleren Fluoreszenzintensität ( $n=4$ , Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) mit zunehmender Entfernung zum perfundierten Gefäßabschnitt 10 min, 20 min beziehungsweise 50 min nach Beginn der Perfusion des Gefäßsystems mit konjugiertem BSA. Abbildung modifiziert nach: Hug Aubin, Alexander Kranz, Jörn Hülsmann, Antonio Pinto, Mareike Barth, Andrey Fomin, Artur Lichtenberg, Payam Akhyari, *A novel native derived coronary artery tissue-flap model*. Tissue Engineering Part C Methods, 2013. 19(12): p. 970-80. Wiedergabe vom Verlag (Mary Ann Liebert, Inc.) genehmigt.

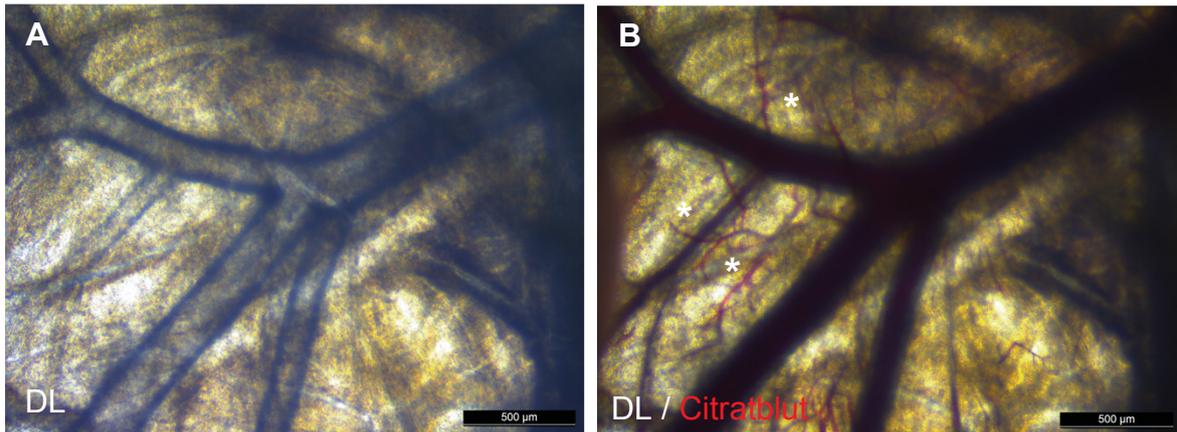
### 3.2.3 Blut-Perfusion azellulärer Koronargefäße

Zur Analyse der Hämokompatibilität der dezellularisierten Koronargefäße wurde das Gefäßsystem des CATFM mit Citratblut perfundiert. Die dezellularisierten Koronarien erwiesen sich dabei für alle zellulären Bestandteile des Vollblutes vollständig passierbar. Dies galt sowohl für große epikardiale als auch für kleine kapilläre Gefäßabschnitte (Abb. 22 und 23 B). Größere Extravasationen von Erythrozyten in die umliegenden EZM konnten nicht beobachtet werden. Lediglich punktuell kam es im Bereich kleinkalibriger Gefäße zu einem geringfügigen Übertritt von Blut in das angrenzende Gewebe (Abb. 22). Im Randbereich der *tissue-flaps* erfolgte die Drainage des Citratblutes primär aus den großlumigen Koronargefäßen, die hier in Form offener Gefäßstümpfe endeten (Abb. 22). Die während der Perfusion der *tissue-flaps* angefertigten Videoaufnahmen veranschaulichten den Blutfluss durch das koronare Gefäßsystem (Abb. 24). Außerdem ließen die Aufnahmen beobachten, wie während der Perfusion, unter steigendem Perfusionsdruck, zunehmend auch kleinste Koronargefäße von Blut durchströmt wurden (Abb. 24 D).

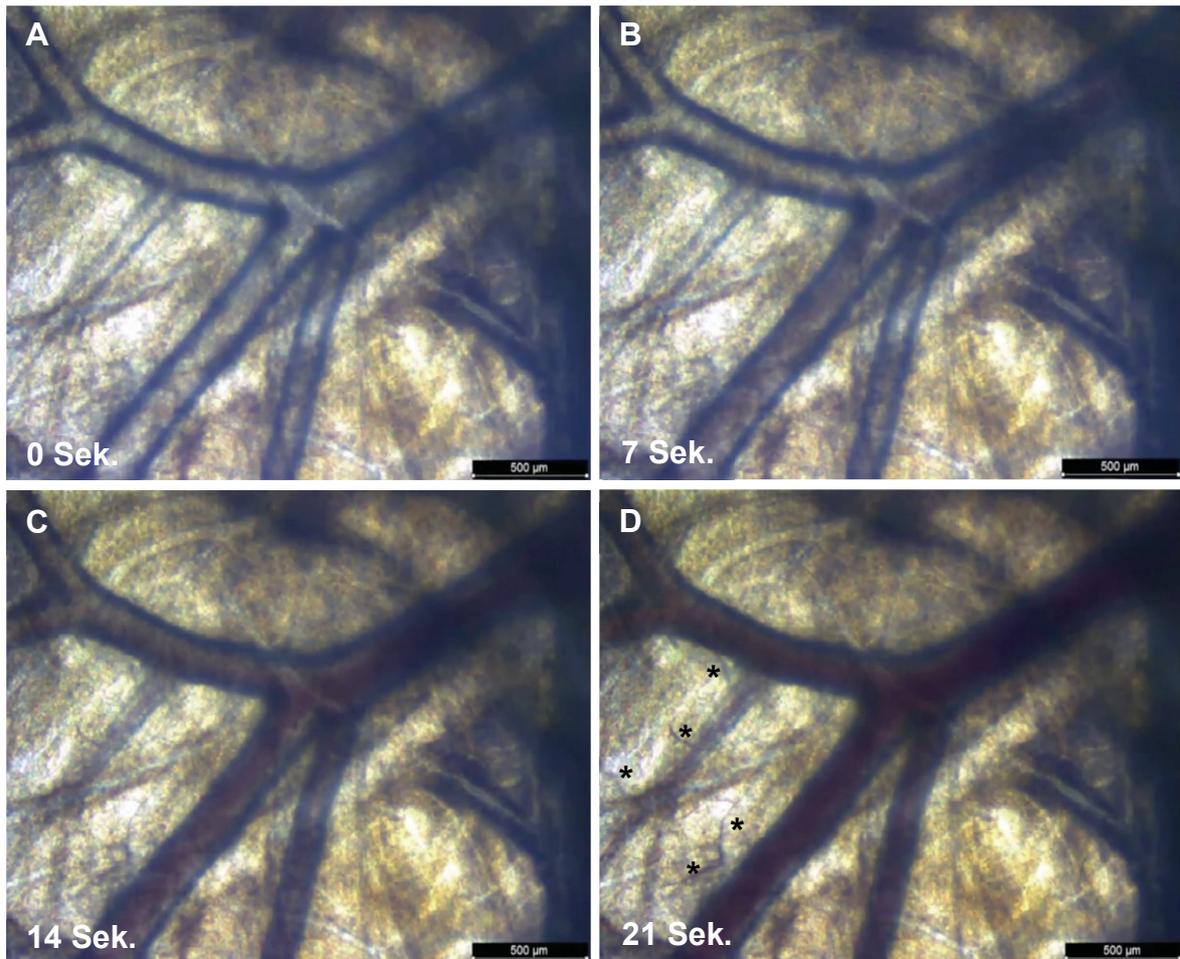


**Abb. 22: Blut-Perfusion dezellularisierter *tissue-flaps* I.** Repräsentative stereomikroskopische Aufnahme eines mit Blut perfundierten *tissue-flaps*. a, 28G-Katheter in Koronargefäß; \*, mit Blut perfundierte kleinkalibrige Gefäße; +, Extravasation von Blut im Bereich kleiner Koronargefäße; #, Drainage des Blutes im Randbereich des *tissue-flaps*; schwarzes Rechteck, Bildausschnitt, der in Abb. 23 vergrößert dargestellt ist.

Die Blut-Perfusion des dezellularisierten Gefäßsystems verdeutlichte folglich, dass die koronaren Gefäßgerüste, einschließlich kleinster Gefäße, für zelluläre Vollblutbestandteile vollständig passierbar waren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Gefäßwand der dezellularisierten Koronarien über eine ausreichende Barrierefunktion verfügte, um den Austritt von Blut in das perivaskuläre Gewebe zu verhindern.



**Abb. 23: Blut-Perfusion dezellularisierter *tissue-flaps* II.** Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der dezellularisierten Gefäße eines *tissue-flaps* unmittelbar vor (A) und während (B) der koronararteriellen Citratblut-Perfusion. DL, Durchlicht; \*, mit Blut perfundierte kleinkalibrige Gefäße. (A) und (B) 50x (Maßstab 500 µm).



**Abb. 24: Blut-Perfusion dezellularisierter *tissue-flaps* III.** Den Videoaufnahmen entnommene Bilderreihe zur Abbildung des zeitlichen Verlaufs der Blut-Perfusion dezellularisierter Koronargefäße. (A), Koronargefäße vor Perfusionsbeginn. (B) – (D), Koronargefäße 7, 14 und 21 Sekunden nach Perfusionsbeginn und kontinuierlicher Erhöhung des Perfusionsdruckes. \*, mit Blut perfundierte kleinkalibrige Gefäße. (A)-(D) 50x (Maßstab 500µm).

### 3.3 *In vitro* Rebesiedlung der *tissue-flaps*

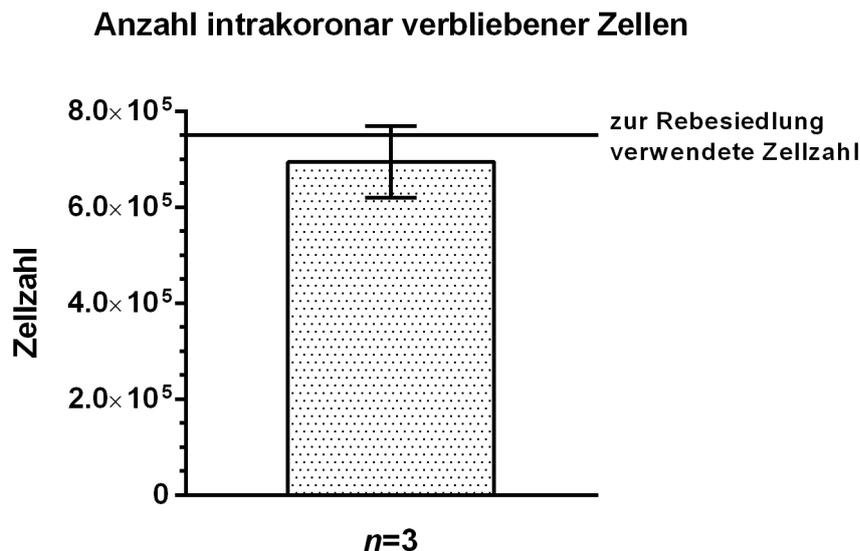
Die *in vitro* Rebesiedlung der *tissue-flaps* umfasste die selektive Rebesiedlung des Koronarsystems durch retrograde Koronarperfusion sowie die Besiedlung der oberflächlichen, perivaskulären EZM mit kardialen Zellen.

#### 3.3.1 Selektive Rebesiedlung des Koronarsystems der *tissue-flaps*

##### Effektivität der Besiedlungstechnik

Für die Etablierung der selektiven Rebesiedlungstechnik des Koronarsystems der *tissue-flaps* wurden die Koronargefäße mit einer Zell-Suspension perfundiert (3T3-Zellen,  $5 \times 10^5$  Zellen/ml Zellsuspension). Um die Effektivität der Besiedlungstechnik untersuchen zu können, wurde die Anzahl derjenigen Zellen bestimmt, die

nach retrograder aortaler Perfusion in den Koronargefäßen verblieben waren. Hierbei zeigte sich, dass letztlich  $92,7\% \pm 10\%$  der für die Rebesiedlung eingesetzten Zellen erfolgreich in das koronare Gefäßsystem der *tissue-flaps* ( $n=3$ ) eingebracht werden konnten (Abb. 25).

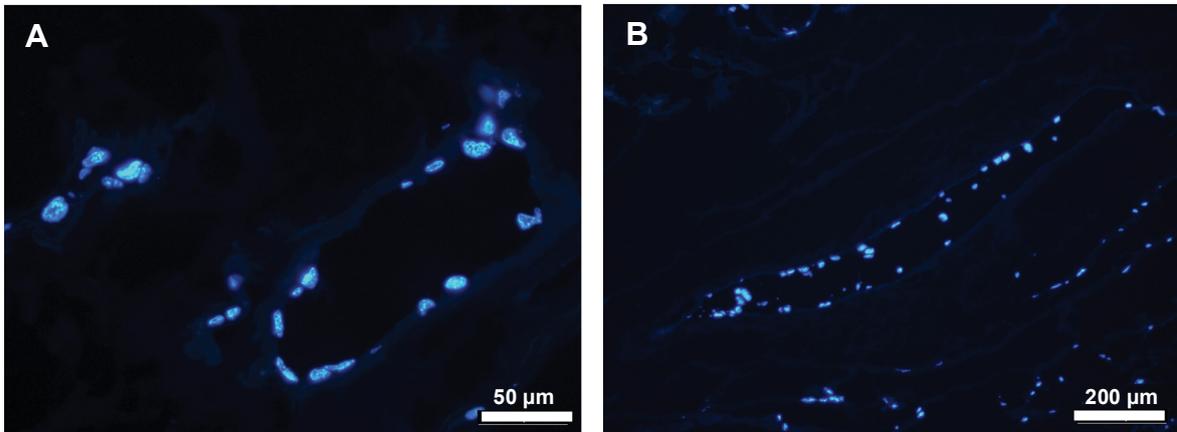


**Abb. 25: Effektivität der selektiven Rebesiedlung des Koronarsystems.**

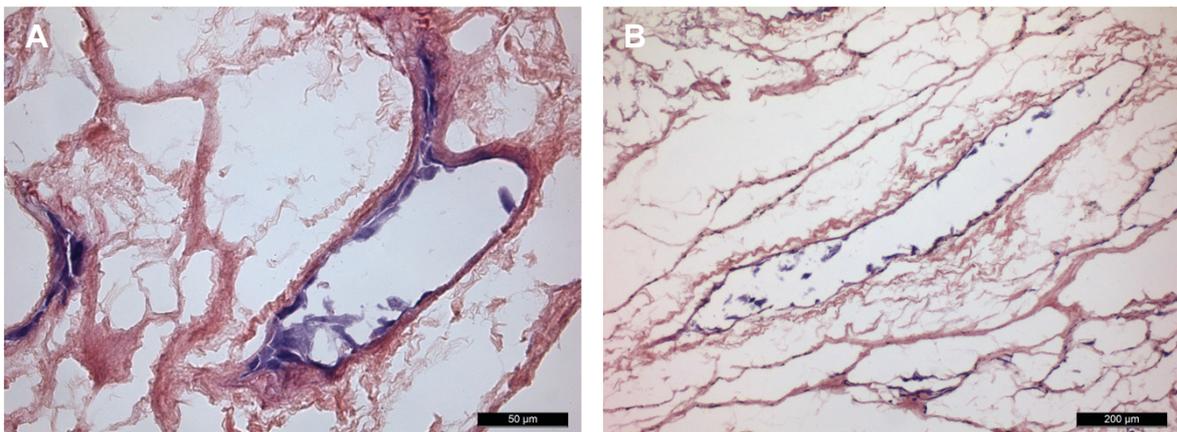
### 3.3.2 Histologische Analyse der rebesiedelten Koronargefäße

Bereits mittels der DAPI-Kernfärbung konnte durch die zirkulär beziehungsweise in einer Reihe angeordneten Zellkerne auf eine intraluminale Ansiedlung sowie auf eine ausgeprägte Gefäßwandadhärenz der Zellen geschlossen werden (Abb. 26). Auch in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung war eine derartige Anordnung der Zellkerne zu erkennen. Darüberhinaus konnte ein direkter Kontakt der Zellen zur umliegenden EZM beobachtet werden (Abb. 27). Mithilfe der Movat's Pentachrom-Färbung war es schließlich möglich, einzelne EZM-Komponenten differenzierter zur Darstellung zu bringen, wodurch Gefäßstrukturen inmitten der kardialen EZM sicher als solche identifiziert werden konnten (Abb. 28). So zeigten sich in dieser Färbung deutlich intraluminal angesiedelte Zellen, die in direktem Kontakt zur Gefäßwand standen, während sich die perivaskuläre EZM vollkommen zellfrei darstellte (Abb. 28). Auch vereinzelte, kleinere Ansammlungen von Zellen

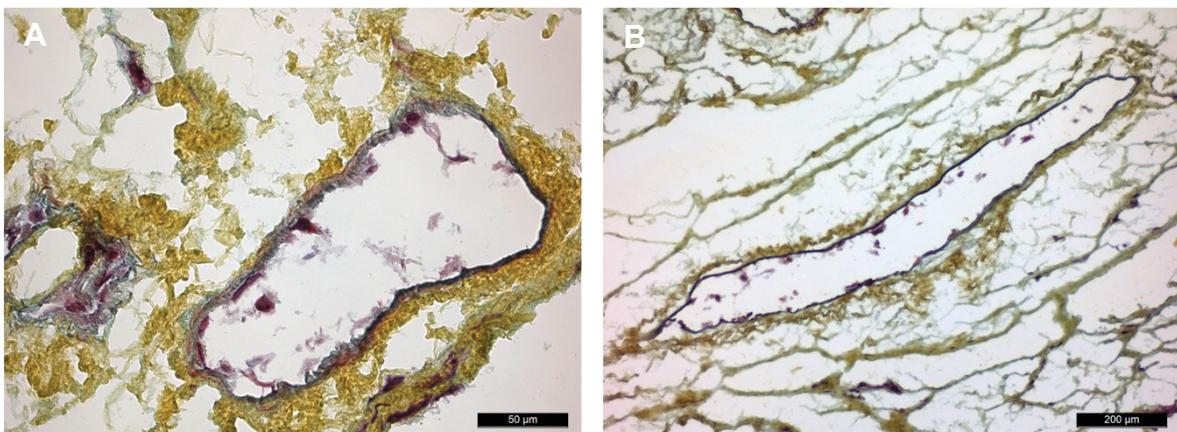
innerhalb der EZM konnten nach genauerer Analyse benachbarter histologischer Schnittebenen mittels dieser Färbung als intravasal gelegen identifiziert werden.



**Abb. 26: *In vitro* rebesiedeltes Koronarsystem I.** Repräsentative histologische Bilder der Koronargefäße nach Dezellularisierung und anschließender Rebesiedlung mit 3T3-Zellen. (A) und (B), DAPI. (A) 400x (Maßstab 50 µm); (B) 100x (Maßstab 200 µm).



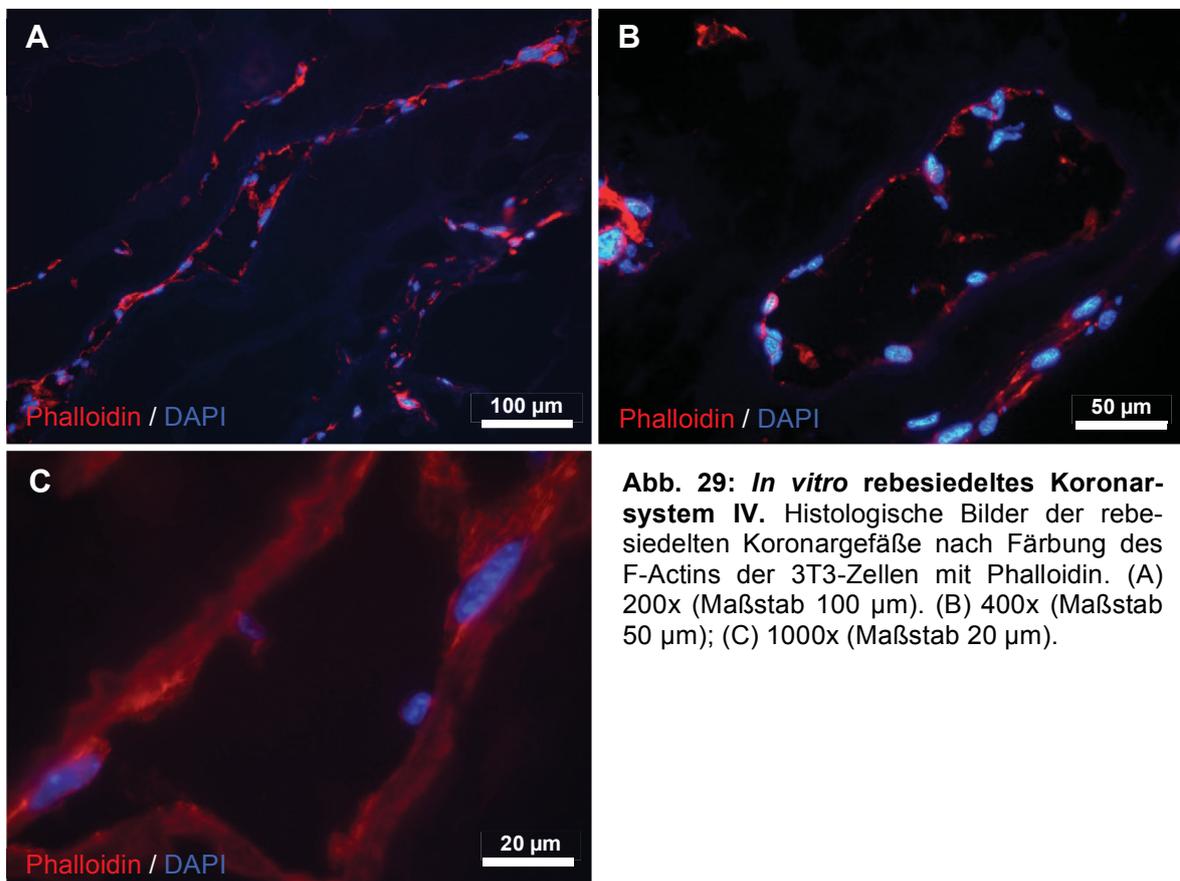
**Abb. 27: *In vitro* rebesiedeltes Koronarsystem II.** Repräsentative histologische Bilder der Koronargefäße nach Dezellularisierung und anschließender Rebesiedlung mit 3T3-Zellen. (A) und (B), Hämatoxylin-Eosin-Färbung. (A) 400x (Maßstab 50 µm); (B) 100x (Maßstab 200 µm).



**Abb. 28: *In vitro* rebesiedeltes Koronarsystem III.** Repräsentative histologische Bilder der Koronargefäße nach Dezellularisierung und anschließender Rebesiedlung mit 3T3 Zellen. (A) und (B), Movat's Pentachrom-Färbung. (A) 400x (Maßstab 50 µm); (B) 100x (Maßstab 200 µm).

Darüber hinaus ließen die histologischen Analysen der rebesiedelten Koronargefäße erkennen, dass deren Lumina auch nach erfolgter Rebesiedlung noch offen waren (Abb. 28). Eine Verlegung der Gefäße durch die darin angesiedelten und kultivierten Zellen konnte demnach nicht beobachtet werden.

Die Darstellung der Zelleiber durch Anfärbung des Zytoskeletts mittels Phalloidin ließ deutlich elongierte und konfluierende Zellkörper erkennen, deren Anordnung dem Verlauf von Gefäßstrukturen zu folgen schien. Darauf ließ sowohl die zirkuläre als auch die longitudinale Ausrichtung der rot fluoreszierenden Zellkörper schließen (Abb. 29 A und B). Die ausgestreckten Zelleiber, die in entsprechender Vergrößerung deutlich erkennbar waren, lieferten zudem einen indirekten Hinweis für eine ausgeprägte Gefäßwandadhärenz der Zellen (Abb. 29 C).



**Abb. 29: *In vitro* rebesiedeltes Koronarsystem IV.** Histologische Bilder der rebesiedelten Koronargefäße nach Färbung des F-Actins der 3T3-Zellen mit Phalloidin. (A) 200x (Maßstab 100 µm). (B) 400x (Maßstab 50 µm); (C) 1000x (Maßstab 20 µm).

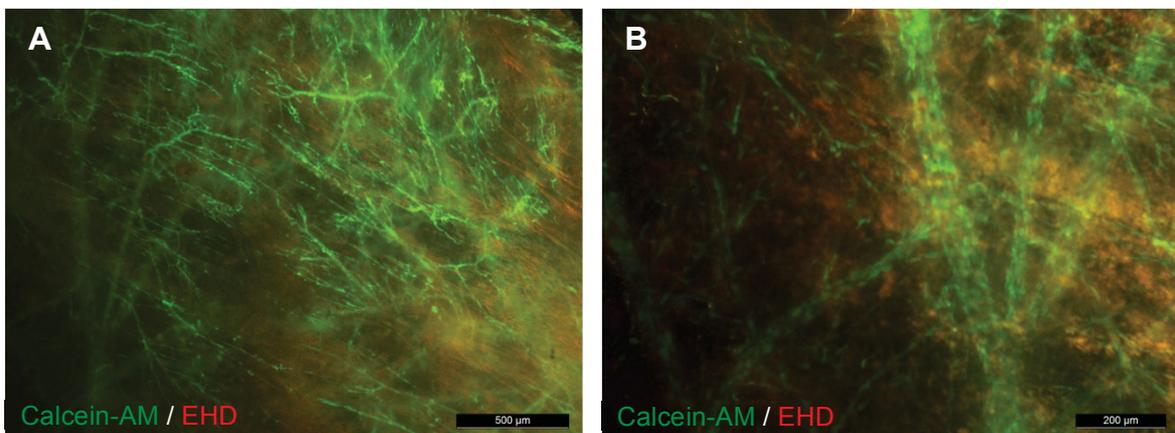
In der histologischen Analyse der rebesiedelten *tissue-flaps* zeigte sich folglich eine hochselektive, ausschließlich auf das Koronarsystem begrenzte Rebesiedlung der EZM. Weder eine direkte Besiedlung der perivaskulären Matrix noch eine Migration der Zellen aus den Gefäßlumina in das angrenzende Gewebe konnten beobachtet werden. Die intravasal angesiedelten Zellen präsentierten sich hingegen in Form einer gefäßwandadhärenten und konfluierenden Zellschicht,

welche die Gefäße der *tissue-flaps* auskleidete, ohne dabei deren Lumina zu verlegen.

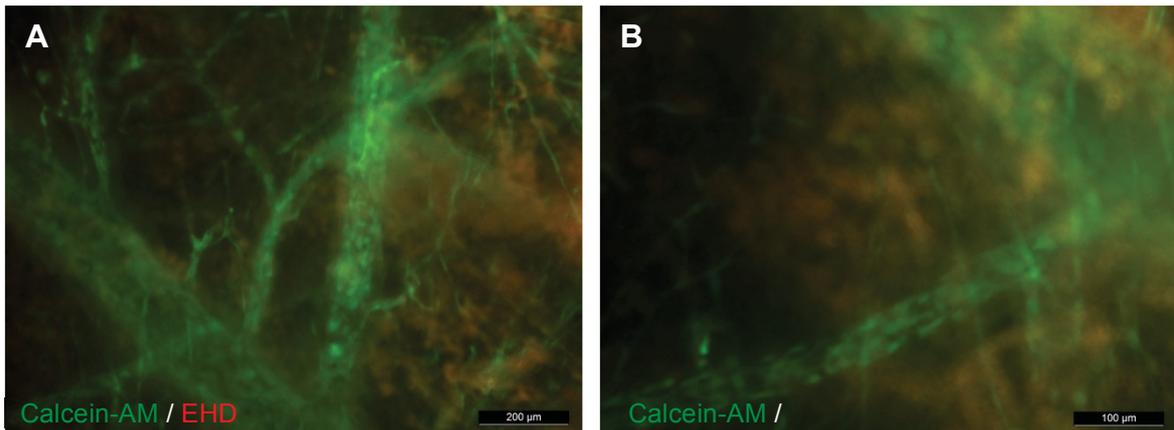
### 3.3.3 Vitalität der Zellen in den rebesiedelten *tissue-flaps*

Nach 5-tägiger Kultivierung der 3T3-Zellen innerhalb des Koronarsystems der *tissue-flaps* wurde deren Vitalität anhand zweier *Live-Dead-Assays* untersucht.

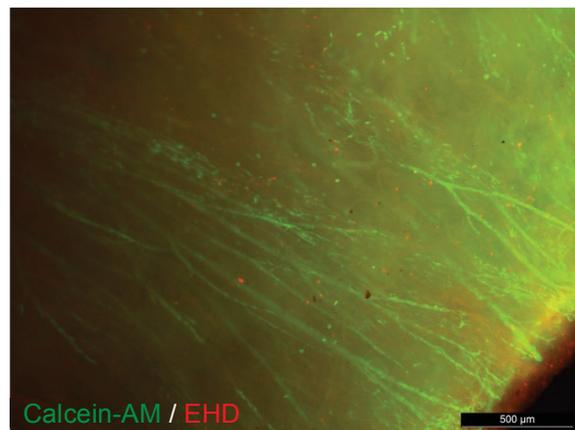
In den Vitalitäts-Analysen mittels Calcein-AM und Ethidium Homodimer zeigte sich ein dichtes Netzwerk grün fluoreszierender und damit vitaler Zellen, das sich im gesamten Koronarsystem der rechts- und auch linksventrikulären *tissue-flaps* ( $n=3$ ) ausbreitete (Abb. 30). Die 3T3-Zellen folgten dabei in ihrer Anordnung dem natürlichen Verlauf der Gefäßstrukturen und wiesen als gefäßwand-adhärenente Zellen deutlich elongierte Zelleiber auf (Abb 31). Selbst in größeren aortennahen Gefäßen zeigte sich eine dichte Rebesiedlung in Form einer konfluierenden Zellschicht (Abb. 31). Solch großkalibrige Gefäßstrukturen verfügten zum Teil über Durchmesser von bis zu 250  $\mu\text{m}$  (Abb. 31 A). Auch noch im Randbereich der *tissue-flaps* konnten zahlreiche mit vitalen Zellen rebesiedelte Gefäße beobachtet werden (Abb. 32). Nur sehr vereinzelt waren auch tote Zellen zu finden (Abb. 32).



**Abb. 30: Zell-Vitalitäts-Analyse mittels Calcein-AM und Ethidium Homodimer (EHD) I.** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Übersichtsaufnahmen der im Koronarsystem kultivierten 3T3-Zellen, die zur Vitalitäts-Analyse mittels Calcein-AM und Ethidium Homodimer (EHD) angefärbt wurden. (A) 50x (Maßstab 500  $\mu\text{m}$ ); (B) 100x (Maßstab 200  $\mu\text{m}$ ).



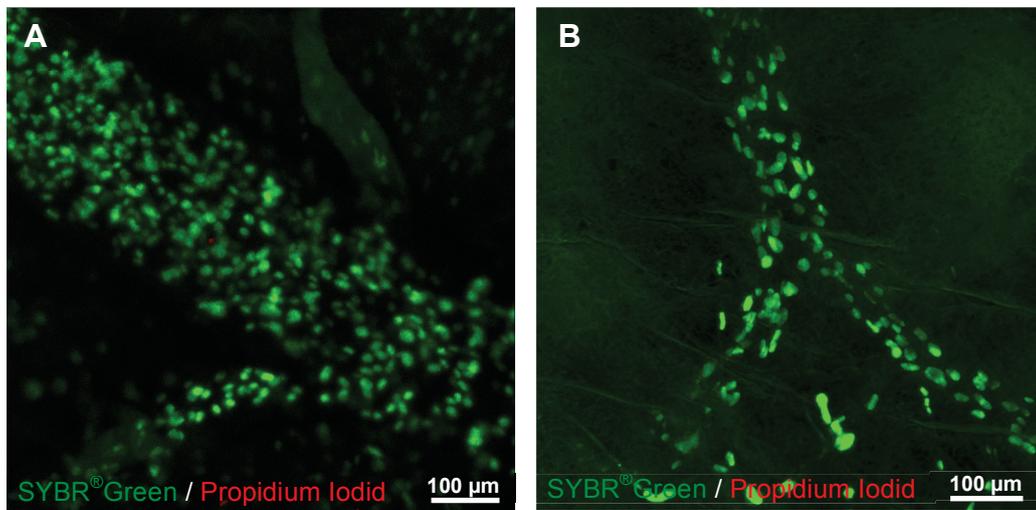
**Abb. 31: Zell-Vitalitäts-Analyse mittels Calcein-AM und Ethidium Homodimer (EHD) II.** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Detailaufnahmen der im Koronarsystem kultivierten 3T3-Zellen, die zur Vitalitäts-Analyse mittels Calcein-AM und Ethidium Homodimer (EHD) angefärbt wurden. (A) 100x (Maßstab 200 µm); (B) 200x (Maßstab 100 µm).



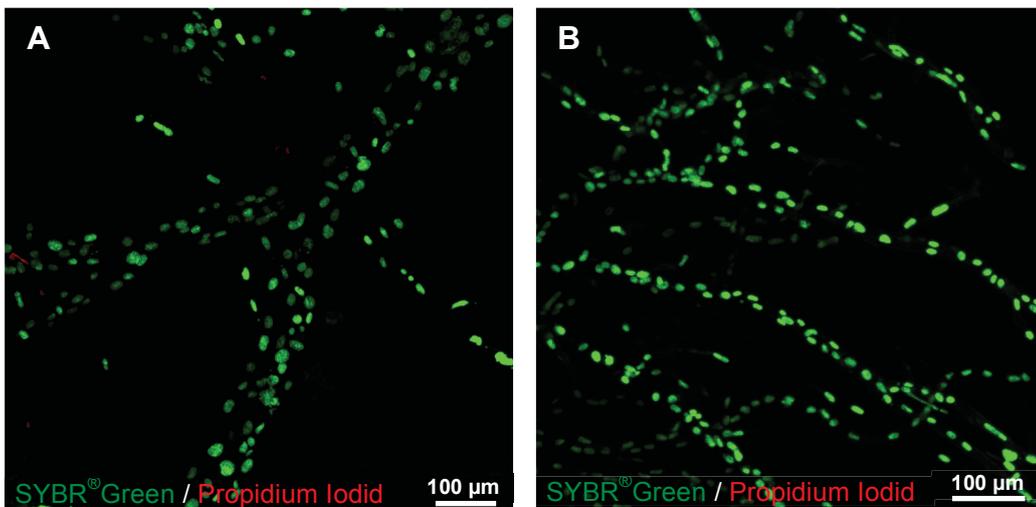
**Abb. 32: Zell-Vitalitäts-Analyse mittels Calcein-AM und Ethidium Homodimer (EHD) III.** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der im Randbereich der *tissue-flaps* intrakoronar kultivierten 3T3-Zellen, die zur Analyse der Zellvitalität mittels Calcein-AM und Ethidium Homodimer (EHD) angefärbt wurden. 50x (Maßstab 500 µm).

Auch im *Live-Dead-Assay* mit SYBR<sup>®</sup> Green und Propidium Iodid zeigten sich fast ausschließlich vitale Zellen innerhalb des Koronarsystems. Die hohe Dichte der intrakoronar angesiedelten und kultivierten Zellen ermöglichte es, den dreidimensionalen Verlauf der Koronargefäße genau nachzuvollziehen und mittels der Konfokalmikroskopie in Form sogenannter *Z-Stacks* abzubilden (Abb. 33 und 34). Die grün fluoreszierenden Zellkerne vitaler Zellen waren dabei in Gefäßen unterschiedlicher Kaliberstärke sowohl in oberflächlichen als auch in tiefer gelegenen Gewebeschichten zu finden. Auch in diesem Vitalitäts-Assay verfügten größere rebesiedelte Gefäße über Durchmesser von bis zu 250 µm (Abb. 33 A).

Im Bereich tiefer gelegenerer kleiner kapillarähnlicher Koronargefäße waren die Zellen strangförmig einzeln hintereinander aufgereiht angesiedelt (Abb. 34 B).



**Abb. 33: Zell-Vitalitäts-Analyse mittels SYBR<sup>®</sup> Green und Propidium Iodid I.** Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen der im Koronarsystem kultivierten 3T3-Zellen, die zur Vitalitäts-Analyse mittels SYBR<sup>®</sup> Green und Propidium Iodid angefärbt wurden. (A) und (B) Z-Stacks (z=60-120 µm), 100x (Maßstab 100 µm).



**Abb. 34: Zell-Vitalitäts-Analyse mittels SYBR<sup>®</sup> Green und Propidium Iodid II.** Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen der im Koronarsystem kultivierten 3T3-Zellen, die zur Vitalitäts-Analyse mittels SYBR<sup>®</sup> Green und Propidium Iodid angefärbt wurden. (A) und (B) Z-Stacks (z=60-120 µm), 100x (Maßstab 100 µm).

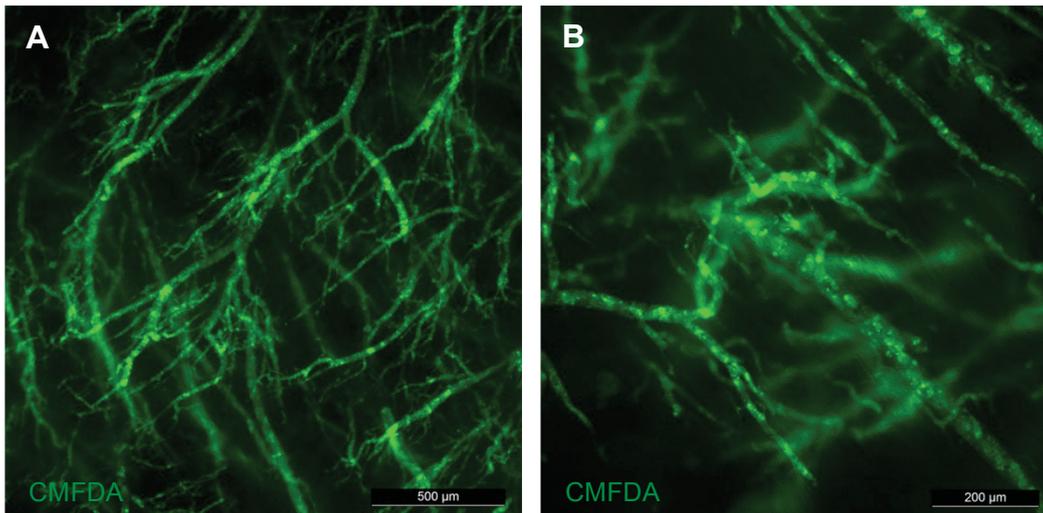
Anhand der Vitalitäts-Analysen konnte folglich gezeigt werden, dass es durch das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Rebesiedlungsverfahren möglich war, eine umfassende Repopulation nahezu des gesamten Koronarsystems zu erreichen. Darüberhinaus verdeutlichten beide *Live-Dead-Assays*, dass dieses Besiedlungsverfahren sowie die angewandte Kultivierungs-Methode es ermöglichten, die

Vitalität der weitaus meisten intrakoronar kultivierten Zellen zu erhalten. Dies bestätigte sich nicht nur für eine 24-stündige, sondern auch für eine 5 Tage andauernde Kultivierung der Zellen im Gefäßsystem der *tissue-flaps*.

### 3.3.4 Selektive Re-Endothelialisierung

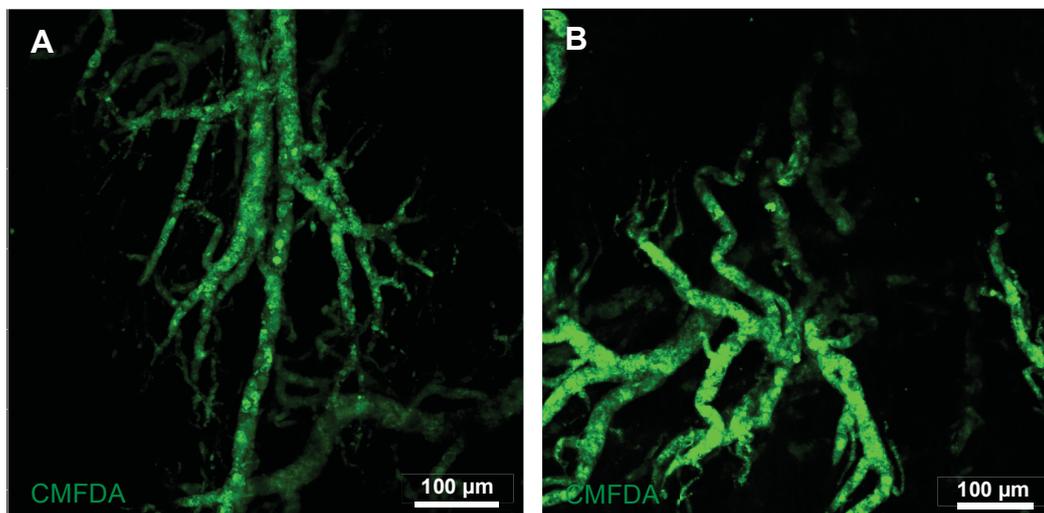
Nachdem die Methode zur selektiven Rebesiedlung des Koronarsystems unter Einsatz der 3T3-Zellen etabliert worden war, konnten die dezellularisierten Koronargefäße der *tissue-flaps*, im Sinne einer funktionellen Re-Endothelialisierung, mit humanen Endothelzellen (HUVECs) rebesiedelt werden. Die CMFDA-markierten HUVECs wurden dafür durch koronare Perfusion ( $5 \times 10^5$  Zellen/ml Zellsuspension) in den Gefäßgerüsten der *tissue-flaps* ( $n=4$ ) angesiedelt und dort für 24 Stunden kultiviert. Durch den grün fluoreszierenden Farbstoff CMFDA war es möglich, die Ausbreitung und Anordnung der HUVECs innerhalb des koronaren Gefäßsystems in Form eines *Live-Cell-Tracking* genau zu analysieren. Sowohl links- als auch rechtsventrikuläre *tissue-flaps* wurden dafür unmittelbar nach abgeschlossener Kultivierung sowohl fluoreszenz- als auch konfokalmikroskopisch untersucht.

In der Fluoreszenzmikroskopie zeigte sich bereits bei geringer Vergrößerung ein koronares Gefäßsystem, das zu großen Teilen mit HUVECs re-endothelialisiert war. Ein dichtes Netzwerk rebesiedelter Gefäße erstreckte sich dabei über große Teile der *tissue-flaps* (Abb. 35). Die Detailansicht dieser Gefäße brachte nahezu lückenlose, konfluente endotheliale Zellverbände in Gefäßen unterschiedlicher Kaliberstärke zur Darstellung (Abb. 35 B). Dies galt sowohl für rechts- als auch für linksventrikuläre *tissue-flaps*.

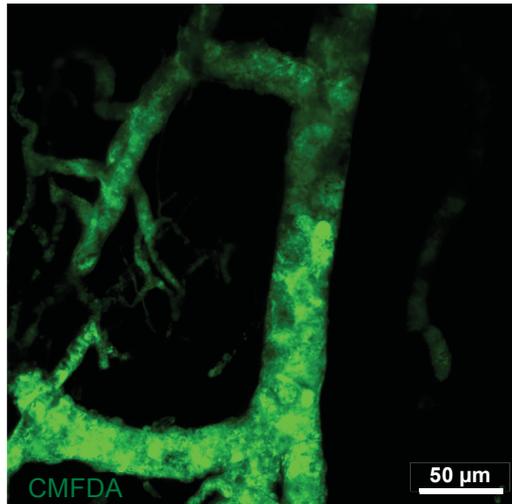


**Abb. 35: Selektive Re-Endothelialisierung des Koronarsystems I.** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der im Koronarsystem kultivierten HUVECs, die zur Realisierung eines *Live-Cell-Tracking* mittels CMFDA angefärbt wurden. (A) 50x (Maßstab 500 µm); (B) 100x (Maßstab 200 µm).

Die räumliche Anordnung und Verteilung der Endothelzellen in den Lumina der Koronargefäße sowie der Verlauf der re-endothelialisierten Gefäße innerhalb der *tissue-flaps* konnten mithilfe der Konfokalmikroskopie detailliert analysiert und in Form sogenannter *Z-Stacks* abgebildet werden (Abb. 36 und 37).



**Abb. 36: Selektive Re-Endothelialisierung des Koronarsystems II.** Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen der im Koronarsystem kultivierten HUVECs, die zur Realisierung eines *Live-Cell-Tracking* mittels CMFDA angefärbt wurden. (A) und (B) *Z-Stacks* ( $z=60-100$  µm), 100x (Maßstab 100 µm).



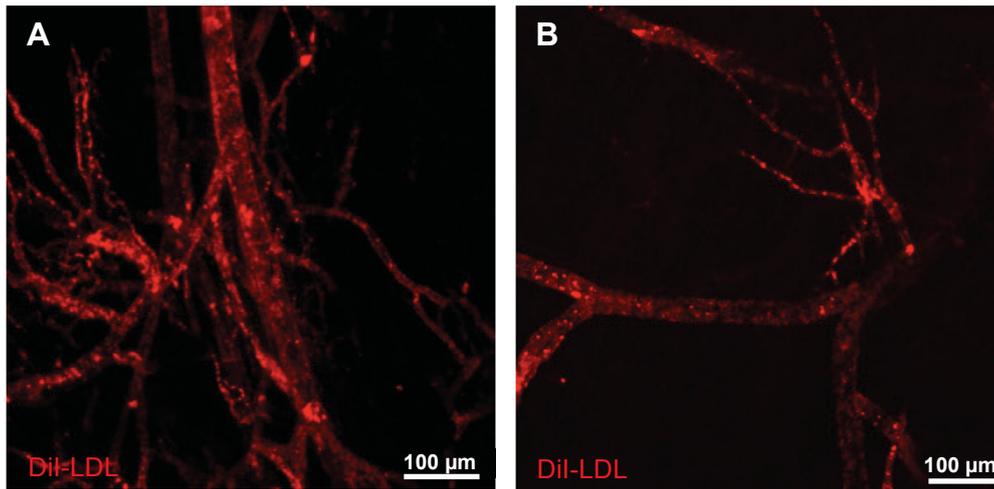
**Abb. 37: Selektive Re-Endothelialisierung des Koronarsystems III.** Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahme der im Koronarsystem kultivierten HUVECs, die zur Realisierung eines *Live-Cell-Tracking* mittels CMFDA angefärbt wurden. Z-Stack ( $z=60-100 \mu\text{m}$ ), 200x (Maßstab  $50 \mu\text{m}$ ).

Dabei war zu erkennen, dass die dreidimensionale Anordnung der Endothelzellen sowohl der Form als auch dem Verlauf der Gefäße über mehrere Ebenen des Gewebes hinweg folgte (Abb. 36). Darüber hinaus konnten einzelne Zelleiber zur Darstellung gebracht werden, die in direktem Kontakt zu benachbarten Zellen standen und dadurch in ihrer Gesamtheit einen dichten Endothelzellverband in den Lumina der Koronargefäße ausbildeten (Abb. 37).

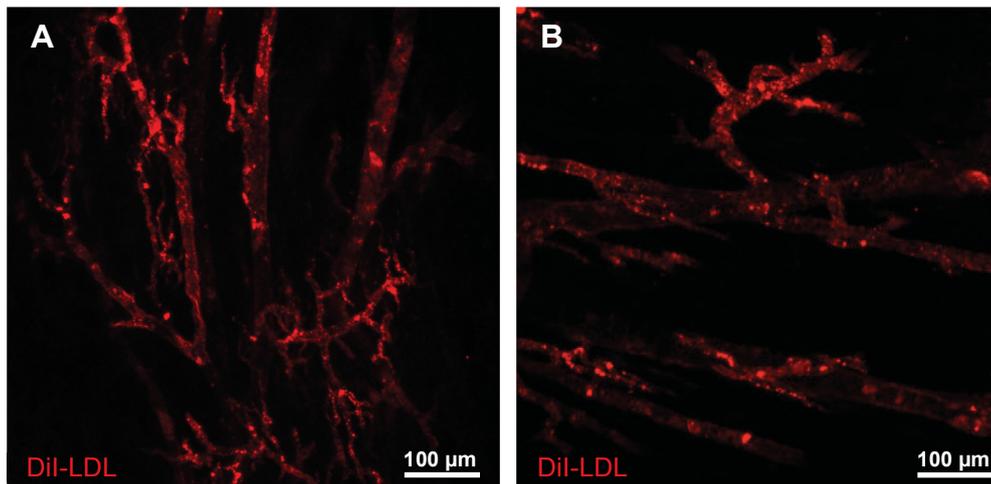
### 3.3.5 Metabolische Aktivität der Endothelzellen

Um die Funktionalität der im Koronarsystem angesiedelten Endothelzellen zu evaluieren, wurde mittels eines *Dil-AcLDL-Uptake-Assays* die metabolische Aktivität der Zellen untersucht. Dieses Assay ermöglichte es, die Aufnahme von acetyliertem LDL in die humanen Endothelzellen mikroskopisch darzustellen.

Hierbei zeigte sich zunächst sowohl innerhalb der rechts- als auch der linksventrikulären *tissue-flaps* ein dicht rebesiedeltes Koronarsystem (Abb. 38 und 39). Die intravasal kultivierten Endothelzellen wiesen eine deutliche zytoplasmatische Anreicherung des acetylierten LDL auf, das intrazellulär in Form rot fluoreszierender, vesikulärer Strukturen deutlich zu erkennen war (Abb. 38 und 39). Derart metabolisch aktive Zellen konnten sowohl in den großen Koronargefäßen (Abb. 38) als auch in den kleinen kapillarähnlichen Gefäßstrukturen beobachtet werden (Abb. 39).



**Abb. 38: Metabolische Aktivität intrakoronar kultivierter Endothelzellen I.** Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen großkalibriger, mit HUVECs rebesiedelter Koronargefäße nach Durchführung eines *DiI-LDL-Uptake-Assay*. (A) und (B) *Z-Stacks* ( $z=70-110\ \mu\text{m}$ ), 100x (Maßstab  $100\ \mu\text{m}$ ).



**Abb. 39: Metabolische Aktivität intrakoronar kultivierter Endothelzellen II.** Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen kleinkalibriger, mit HUVECs rebesiedelter Koronargefäße nach Durchführung eines *DiI-LDL-Uptake-Assay*. (A) und (B) *Z-Stacks* ( $z=60-90\ \mu\text{m}$ ), 100x (Maßstab  $100\ \mu\text{m}$ ).

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Rebesiedlungs- und Kultivierungstechniken ermöglichten es folglich, im Gefäßsystem der *tissue-flaps* ein umfassendes Netzwerk nicht nur vitaler, sondern auch metabolisch aktiver Endothelzellen auszubilden und zu kultivieren.

### 3.3.6 Blut-Perfusion der rebesiedelten Koronargefäße

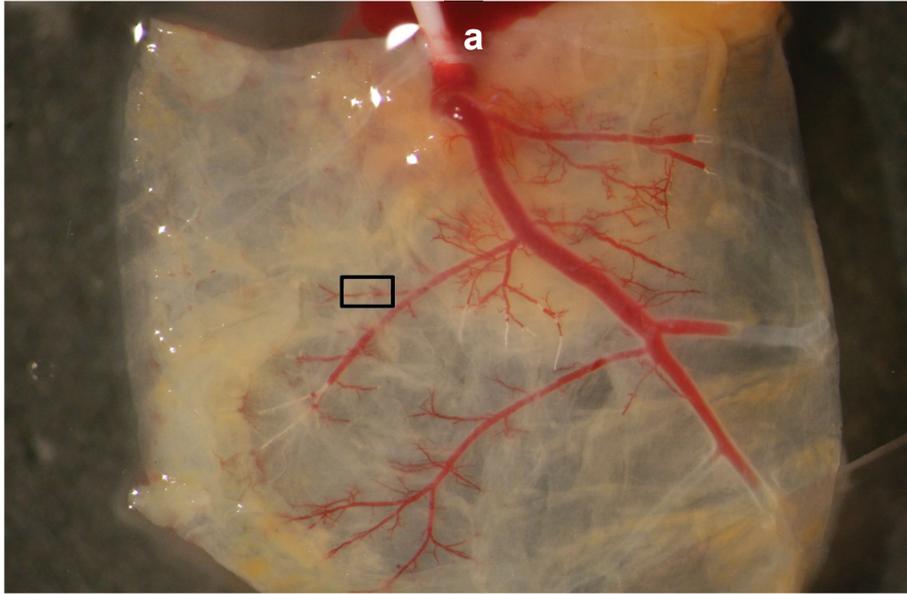
Um nicht nur die Hämokompatibilität azellulärer, sondern auch rebesiedelter Koronargefäße beurteilen zu können, wurde auch ein mit 3T3-Zellen rebesiedeltes

Koronarsystem mit humanem Citratblut perfundiert. Die 3T3-Zellen waren zuvor mit SYBR® Green und Propidium Jodid angefärbt worden. Während der laufenden Perfusion wurden die *tissue-flaps* sowohl licht- als auch fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Eine Übersichtsaufnahme eines gesamten perfundierten *tissue-flaps* wurde unter Verwendung eines Stereomikroskops und einer digitalen Spiegelreflexkamera angefertigt (Abb. 40).

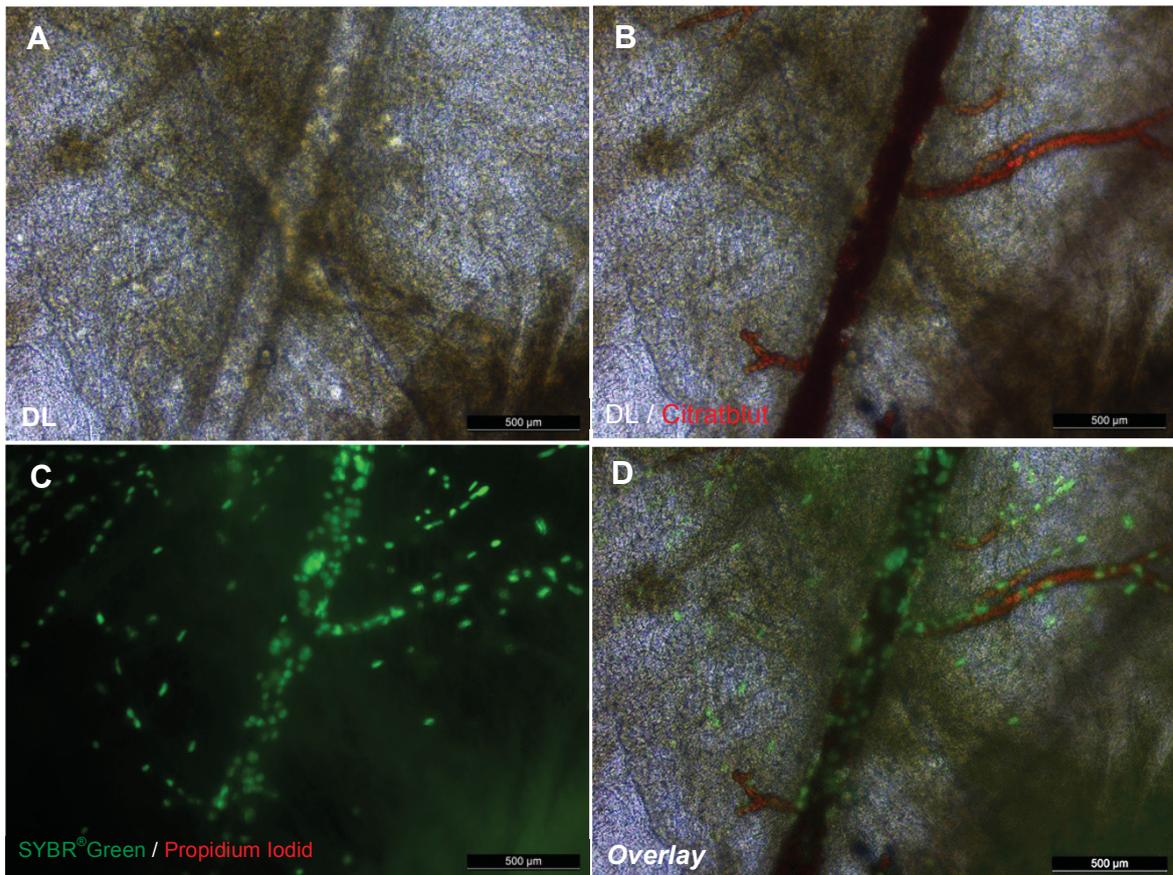
Trotz der intraluminalen Rebesiedlung konnte das Gefäßsystem der *tissue-flaps* bis hinein in kleine, kapillarähnliche Gefäßabschnitte mit Citratblut gefüllt werden (Abb. 40). Die intravasal kultivierten Zellen führten folglich nicht zu einer Verlegung der Gefäßlumina. An der lumenseitigen Gefäßwand adhärent ermöglichten sie einen freien Blutfluss durch das rebesiedelte Gefäßsystem der *tissue-flaps* (Abb. 41). Intraluminal gelegene Zellaggregate, die zu einem Verschluss einzelner Gefäßabschnitte hätten führen können, waren nicht zu beobachten. Wie schon bei der Perfusion azellulärer Koronargefäße beobachtet, zeigten sich auch hier keine größeren Extravasationen zellulärer Vollblutbestandteile. Durch die Fluoreszenz der 3T3-Zellen konnte jederzeit sichergestellt werden, dass es sich bei den untersuchten Gefäßen tatsächlich auch um rebesiedelte Abschnitte des Gefäßsystems handelte (Abb. 41). Anhand der Videoaufnahmen konnte zudem der zeitliche Verlauf der Perfusion über einem definierten Gefäßabschnitt festgehalten und genauer analysiert werden (Abb. 42). Auch hierbei zeigte sich ein ungehinderter Blutfluss durch das rebesiedelte Gefäßsystem. Außerdem konnte beobachtet werden, wie unter anhaltender Perfusion und manueller Steigerung des Perfusionsdruckes schließlich auch kleinste rebesiedelte Gefäßabschnitte von Blut durchströmt wurden (Abb. 42 C und D).

Die Hämokompatibilitätsanalysen an den rebesiedelten *tissue-flaps* verdeutlichten folglich, dass das Koronarsystem auch nach erfolgter Rebesiedlung weitestgehend unversehrt war und bis hinein in kleinste Gefäßabschnitte mit Blut perfundiert werden konnte. Eine Einschränkung des Blutflusses durch die intravasal kultivierten Zellen oder gar durch intraluminal gelegene Zellaggregate war bei keinem der untersuchten Gefäßabschnitte auszumachen.

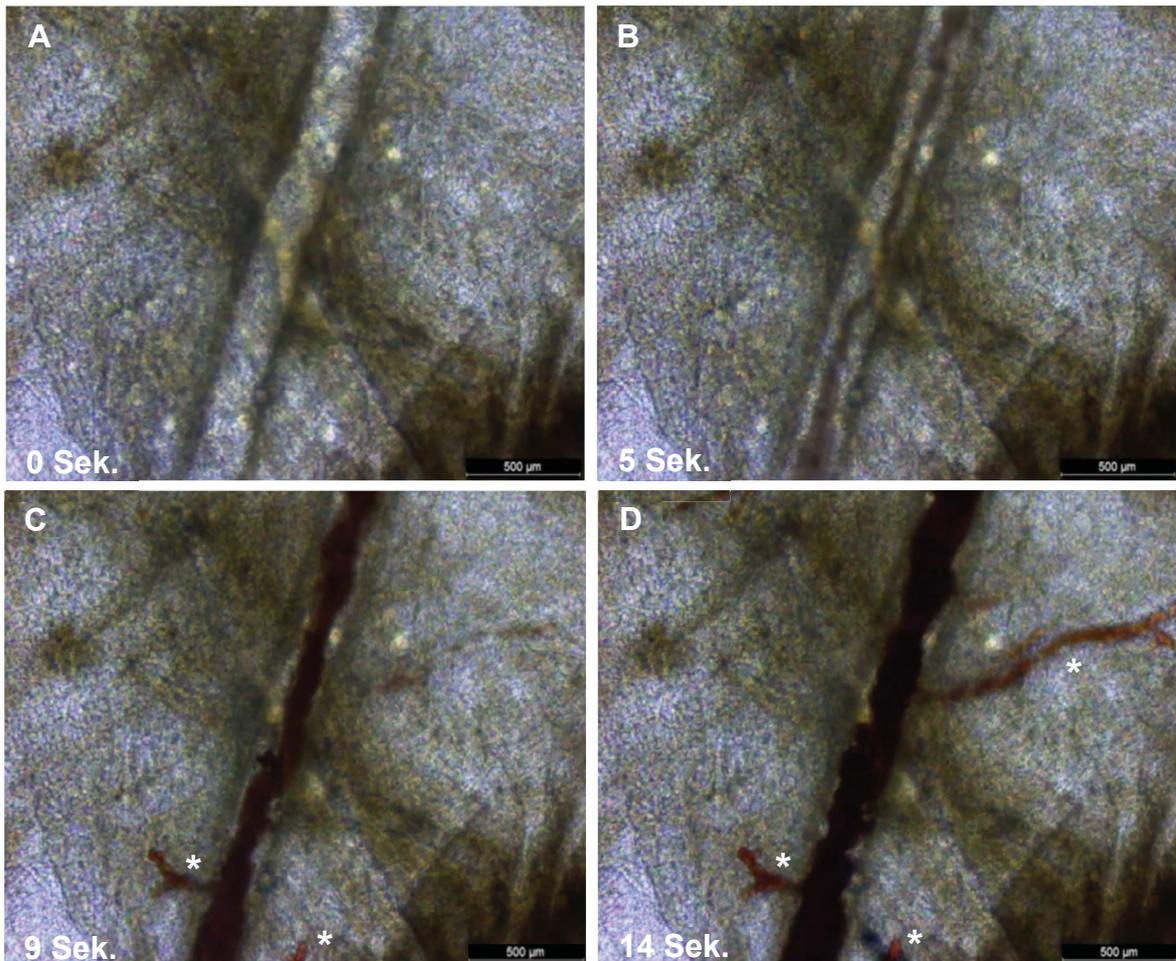
## Ergebnisse



**Abb. 40: Blut-Perfusion rebesiedelter *tissue-flaps* I.** Stereomikroskopische Übersichtsaufnahme eines rebesiedelten und mit Citratblut perfundierten *tissue-flaps*. a, 28G-Katheter zur selektiven Kanülierung des Koronarostiums; Schwarzes Rechteck, Markierung des Bildausschnittes, der in den Abbildungen 41 und 42 vergrößert und um 90° gedreht dargestellt ist.



**Abb. 41: Blut-Perfusion rebesiedelter *tissue-flaps* II.** Mikroskopische Aufnahmen eines rebesiedelten Gefäßabschnittes vor (A) und während (B) der Perfusion mit Citratblut. (C), Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme desselben Gefäßabschnittes. (D), *Overlay* aus (B) und (C). (A)-(D) 50x (Maßstab 500 µm).



**Abb. 42: Blut-Perfusion rebesiedelter *tissue-flaps* III.** Den Videoaufnahmen entnommene Bilderreihe zur Abbildung des zeitlichen Verlaufs der Blut-Perfusion rebesiedelter Koronargefäße. (A), Koronargefäße vor Perfusionsbeginn. (B)-(D), Koronargefäße 5, 9 und 14 Sekunden nach Perfusionsbeginn und kontinuierlicher Erhöhung des Perfusionsdruckes. \*, mit Blut perfundierte kleinkalibrige Gefäße. (A)-(D) 50x (Maßstab 500 μm).

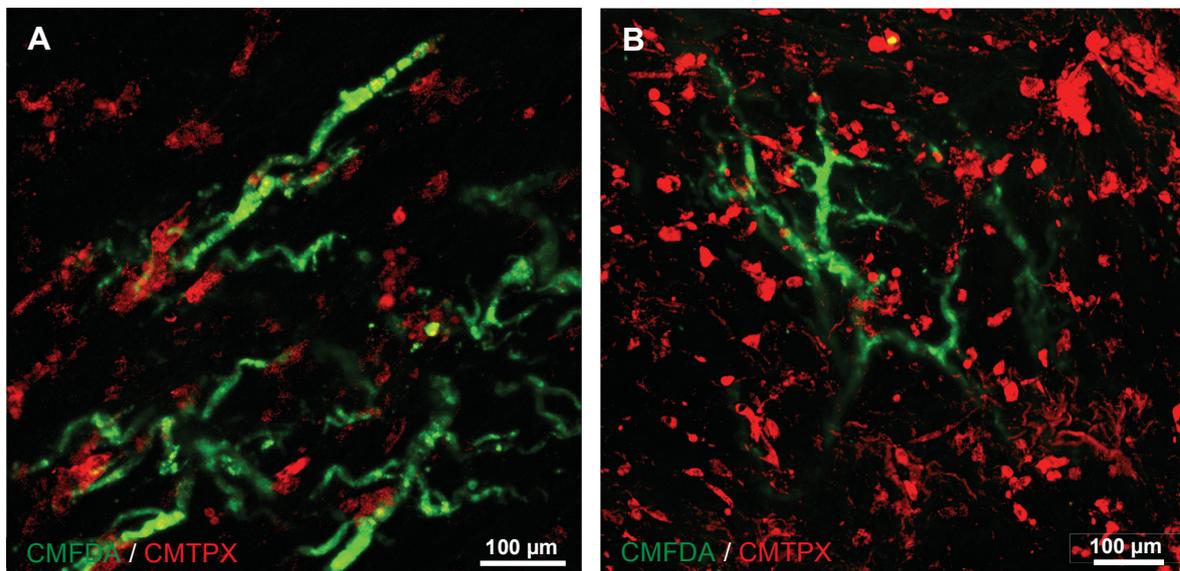
### 3.3.7 Erweiterung des Modellsystems mit kardialen Zellen

Um schließlich die prinzipielle Machbarkeit aufzuzeigen, durch gezielte *in vitro* Rebesiedlung einer natürlichen, vollständig dezellularisierten, kardialen EZM ein funktionelles CATFM herzustellen, wurde innerhalb der *tissue-flaps* eine kontrollierte Kokultur aus Endothelzellen und Kardiomyozyten etabliert. Hierzu erfolgte die selektive Rebesiedlung des Koronarsystems mit Endothelzellen (HUVECs,  $5 \times 10^5$  Zellen/ml Zellsuspension), während das perivaskuläre Gewebe über eine Oberflächenbesiedlung mit Kardiomyozyten (neonatale Rattenkardiomyozyten,  $2 \times 10^5$  Zellen/ml Kulturmedium) rebesiedelt wurde. Vor deren Verwendung wurden beide Zelltypen mittels verschiedenfarbiger *Cell-*

*Tracker* markiert. Im Zuge der konfokalmikroskopischen Analyse der Kokultur kamen die HUVECs demnach grün, die Kardiomyozyten hingegen rot fluoreszierend zur Darstellung. Dies ermöglichte die genaue Analyse der Anordnung und Verteilung der Zellen innerhalb der EZM. Außerdem erlaubte das *Cell-Tracking* eine sichere Unterscheidung der beiden Zelltypen.

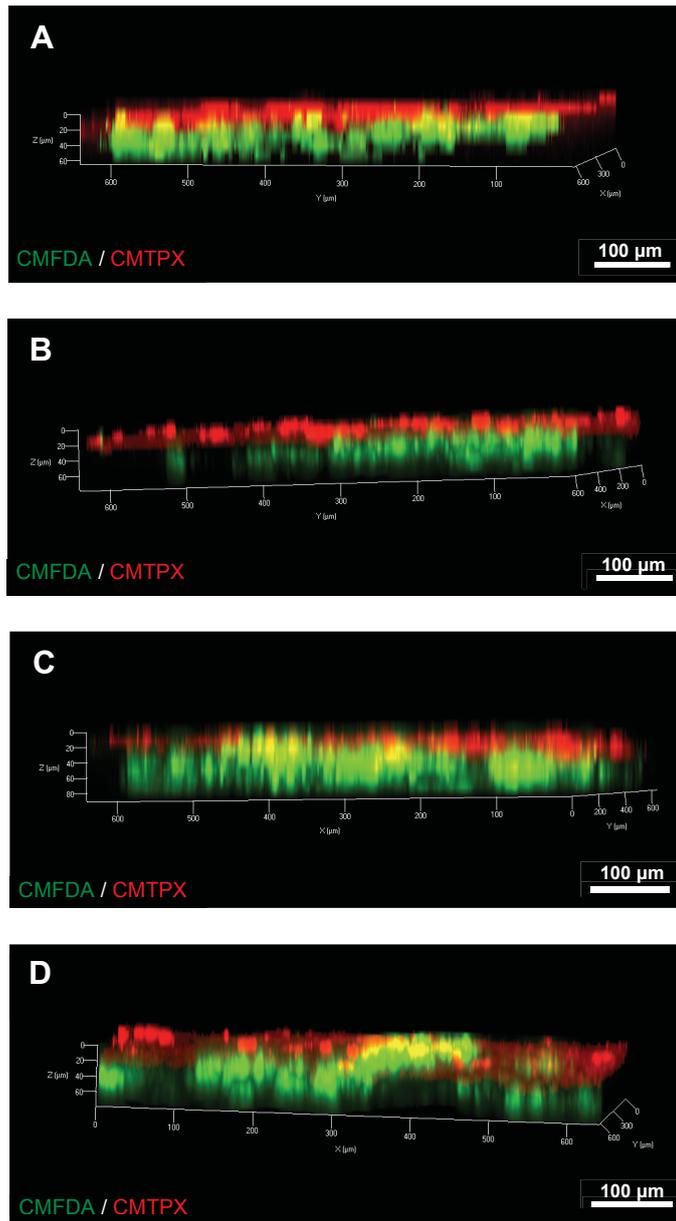
In der konfokalmikroskopischen Analyse der kontrollierten Kokultur zeigten sich schließlich *tissue-flaps*, die simultan von zwei unterschiedlichen Zelltypen besiedelt wurden. Die Endothelzellen waren dabei fast ausschließlich in den Lumina der Koronargefäße, die Kardiomyozyten hingegen auf der epikardialen Oberfläche der *tissue-flaps* zu finden (Abb. 43 und 44). Stellenweise waren die Kardiomyozyten in direkter Nachbarschaft zu den re-endothelialisierten Gefäßstrukturen gelegen (Abb. 43). Hierbei stellten die Wände der Koronargefäße eine Barriere dar, die Intra- und Extravasalraum und somit Endothelzellen und Kardiomyozyten streng voneinander trennte.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Methode zur Rebesiedlung der *tissue-flaps* war es folglich möglich, zwei verschiedene Kompartimente der kardialen EZM gezielt mit zwei unterschiedlichen Zelltypen zu besiedeln und diese für mindestens 24 Stunden in Kultur zu halten.



**Abb. 43: Kokultivierung von Endothelzellen und Kardiomyozyten I.** Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen der kontrollierten Kokultur aus intravasal kultivierten HUVECs und epikardial angesiedelten Kardiomyozyten. Vor Rebesiedlung der kardialen EZM wurden die HUVECs mit CMFDA (grüne Fluoreszenz), die Kardiomyozyten mit CMTPIX (rote Fluoreszenz) markiert. (A) und (B) *Z-Stacks* ( $z=60-100\ \mu\text{m}$ ), 100x (Maßstab  $100\ \mu\text{m}$ ).

## Ergebnisse



**Abb. 44: Kokultivierung von Endothelzellen und Kardiomyozyten II.** Repräsentative *konfokal-mikroskopische* Aufnahmen der kontrollierten Kokultur aus intravasal kultivierten HUVECs und epikardial angesiedelten Kardiomyozyten. (A)-(D) Z-Stacks ( $z=60-80\ \mu\text{m}$ ) in tangentialer Projektion, 100x (Maßstab  $100\ \mu\text{m}$ ).

## 4 Diskussion

Trotz der enormen Fortschritte, die in den letzten Jahren im Bereich der regenerativen Medizin und des *Tissue Engineerings* gemacht wurden, steht in den meisten Fällen eine breite klinische und kommerzielle Anwendung bioartifizieller Gewebekonstrukte noch aus. Während einzelne *tissue engineerete* Organe und Gewebe, wie zum Beispiel Harnblase [29], Herzklappen [28] oder auch Trachea [25], bereits erfolgreich klinisch erprobt werden konnten, befindet sich eine Vielzahl anderer vielversprechender Ansätze noch in der präklinischen Entwicklungsphase. Ein regelmäßiger und standardisierter Einsatz *tissue engineerter* Gewebe für die klinische Anwendung *in vivo* oder als *in vitro* Test- oder Modellsysteme lässt derzeit noch auf sich warten.

Als eine der Hauptursachen für den bisher nur begrenzten Einsatz bioartifizieller Gewebe kann deren fehlende funktionelle Vaskularisierung angesehen werden [50]. Die Herstellung eines vom Ausmaß her human-kompatiblen, komplexen sowie metabolisch aktiven Gewebes erfordert die Ausstattung mit einem funktionellen Gefäßnetzwerk. Angesichts der limitierten Diffusionsstrecke von Sauerstoff im Gewebe [54] ist eine ausreichende Vaskularisierung für die Vitalität gerade derjenigen Zellen, die sich im Inneren solcher Gewebe befinden, von elementarer Bedeutung. Allein ein funktionelles Gefäßnetzwerk kann eine ausreichende Versorgung dieser Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie den Abtransport metabolischer Abfallprodukte gewährleisten und die Vitalität des gesamten Gewebes somit nachhaltig sichern [51, 53, 97].

Angesichts dieser Situation bedarf es neuer Modellsysteme, die es ermöglichen, das native Gefäßsystem möglichst naturgetreu zu replizieren, um damit ein besseres Verständnis der Gefäßbiologie zu erlangen. Derartige Modellsysteme könnten einen entscheidenden Beitrag zur Evaluation und Optimierung gegenwärtiger Strategien für die Herstellung funktionell vaskularisierter Gewebe leisten.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein solches *in vitro* Modellsystem auf der Basis einer extrazellulären Matrix kardialer Herkunft zu entwickeln. Im Folgenden sollen nun die dafür verwendeten Methoden, die erzielten Ergebnisse sowie die Perspektive des in dieser Arbeit etablierten kardialen *in vitro* Modells, des sogenannten *Coronary Artery Tissue-Flap Model* (CATFM) diskutiert werden.

## 4.1 Eignung und Limitationen der angewandten Methoden

### 4.1.1 Perfusionsbasierte Rattenherz-Dezellularisierung

Bei der perfusionsbasierten Dezellularisierung nativer Gewebe handelt es sich um ein mittlerweile gängiges Verfahren, das bereits für eine Vielzahl von Organen und Geweben Anwendung fand. So konnte es bereits für die erfolgreiche Dezellularisierung von Herzen [38], Lungen [98], Lebern [99] oder auch Nieren [100] eingesetzt werden. Im Gegensatz zur rein diffusionsbasierten Dezellularisierung können mittels perfusionsbasierter Verfahren auch dickere Gewebe oder ganze Organe umfassend von allen zellulären Bestandteilen befreit werden. Durch die Perfusion des natürlichen Gefäßsystems ist es über das Netzwerk kleiner Kapillaren möglich, die jeweiligen Dezellularisierungsagenzien allen, und somit auch den tiefer liegenden Gewebeschichten, zuzuführen. Dort sorgen die meist detergenzienhaltigen und/oder enzymbasierten Lösungen für das Loslösen, die Lyse und den Verdau der zellulären Elemente des Gewebes [42, 101]. Der Abtransport der dabei anfallenden Zelldebris erfolgt schließlich durch die kontinuierliche Perfusion über das venöse Gefäßsystem. Zurück bleibt die EZM unter Erhalt klassischer Matrixkomponenten [42]. Hierzu gehören beispielsweise Kollagen, Laminin und Glykosaminoglykane [42]. Erhalten bleibt auch die mikrostrukturelle Architektur der EZM zum Beispiel in Form der Basalmembranen [42].

#### Langzeitperfusionssystem

Zur standardisierten Herstellung einer extrazellulären Matrix kardialer Herkunft wurde im Rahmen dieser Arbeit ein automatisches softwaregesteuertes Langzeitperfusionssystem verwendet, welches von der Arbeitsgruppe um Prof. Lichtenberg zur *in toto* Dezellularisierung ganzer Rattenherzen entwickelt wurde und bereits seit mehreren Jahren erfolgreich eingesetzt wird [93]. Mithilfe dieses Perfusionssystems wird durch retrograde Perfusion der Aorta ascendens eine umfassende Dezellularisierung des gesamten Organs erreicht. Das voll-automatische softwaregesteuerte System vermag dabei die chemisch und mechanisch verursachten Druckschwankungen, die durch den Dezellularisierungsprozess hervorgerufen werden, auszugleichen und somit während des

gesamten Zeitraumes der Dezellularisierung einen konstanten Perfusionsdruck aufrecht zu erhalten. Somit gewährleistet die Nutzung dieses Langzeitperfusions-systems einen gleichbleibenden Dezellularisierungsstandard. Denn die konstante Aufrechterhaltung eines ausreichend hohen Perfusionsdruckes ist für eine suffiziente Organ-Dezellularisierung von entscheidender Bedeutung.

Hierbei gilt es zu beachten, dass bei einem zu hohen Perfusionsdruck die umfassende Integrität der EZM nicht mehr ausreichend gewährleistet werden kann. Deshalb wurde für die *in toto* Herz-Dezellularisierung im Rahmen dieser Arbeit ein Perfusionsdruck von 77,5 mmHg gewählt, der sich bereits in Vorarbeiten bewährt hatte [93]. Dieser leicht infraphysiologische Druck [94] ermöglicht nicht nur eine suffiziente Organ-Dezellularisierung bei zugleich bestmöglicher Schonung der kardialen EZM, sondern sichert zudem die Reproduzierbarkeit und garantiert damit ein hohes Maß an Vergleichbarkeit für repetitive Versuche.

Um größere Ausfälle im Dezellularisierungsprozess durch eine Verlegung des Koronarsystems der Rattenherzen zu vermeiden, wurde das Koronarsystem unmittelbar nach erfolgter Organexplantation mit einer heparinisierten Lösung perfundiert und ein Spritzenvorsatzfilter sowie eine Blasenfalle in das Perfusionssystem zur Vermeidung von Embolisationen durch Zelldebris oder Luftblasen integriert. Da sich dadurch allerdings eine lokale Verlegung des Koronarsystems nicht immer vermeiden ließ, wurden Proben, die bereits makroskopisch erkennbare Gewebeareale unvollständiger Dezellularisierung aufwiesen, von einer weiteren Verwendung ausgeschlossen. Außerdem wurden auch Organe aus denjenigen Perfusionskreisläufen, die während des Dezellularisierungsprozesses unverhältnismäßig hohe Pumpendrehzahlen aufwiesen, nicht weiter verwendet. Sehr hohe Pumpendrehzahlen nämlich ließen auf eine im Verlauf aufgetretene Insuffizienz der Aortenklappe oder eine größere Gefäßperforation schließen.

Die Summe dieser Maßnahmen erlaubte die weitestgehende Standardisierung des Dezellularisierungs-Verfahrens, welches die Grundlage für alle weiteren Versuche darstellte.

#### Dezellularisierungsprotokoll

Bei dem im Rahmen dieser Arbeit angewandten Dezellularisierungsprotokoll handelt es sich um ein detergenzienbasiertes Protokoll, das in der Vergangenheit

bereits ausführlich charakterisiert und erfolgreich für die standardisierte *in toto* Dezellularisierung von Rattenherzen eingesetzt worden war [93].

Als nachteilig können jedoch die großen natriumazidhaltigen Perfusatvolumina, die bei der Verwendung dieses Protokolls anfielen, angesehen werden. Das toxische Natriumazid, das auch bereits in anderen Dezellularisierungsprotokollen Verwendung gefunden hatte [102, 103], bedurfte einer aufwändigen fachgerechten Entsorgung. Außerdem waren zur restlosen Auswaschung dieser zytotoxischen Substanz aus dem dezellulierten Gewebe ausgedehnte Waschschriffe mit PBS nötig. Durch die Anwendung von Natriumazid konnte allerdings eine Kontamination der Organe während des Dezellularisierungsprozesses effektiv verhindert werden. Die anschließende Spülung mit Penicillin/Streptomycin versetztem PBS ermöglichte die Konservierung und spätere Verwendung der EZM für nachfolgende Zellkulturversuche.

#### Wahl der Spenderspezies

Aufgrund der relativ einfachen Verfügbarkeit sowie der relativ niedrigen Anschaffungs- und Haltungskosten kamen bei der vorliegenden Arbeit ausschließlich Rattenherzen zum Einsatz. Darüber hinaus erwiesen sich die verhältnismäßig einfache Organentnahme sowie die handliche Organgröße als vorteilhaft. Zur Standardisierung und Reproduzierbarkeit der Experimente wurden stets Ratten des gleichen Stammes und Geschlechtes sowie einer einheitlichen Gewichtsklasse verwendet.

Obwohl das eingesetzte Langzeitperfusionssystem speziell für die Dezellularisierung von Rattenherzen entwickelt worden war, wäre es durchaus denkbar, dieses Perfusionssystem ohne einen bedeutenden Mehraufwand auch für die Dezellularisierung größerer Organe umzurüsten. Die generelle Machbarkeit einer vollständigen Dezellularisierung zum Beispiel porciner Herzen wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen aufgezeigt [104-106]. Damit besteht schon jetzt die Möglichkeit, Organgerüste in humankompatibler Größe herzustellen. Über die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Verfahren könnten somit in Zukunft auch Modellsysteme in humankompatibler Größe generiert werden, die als Vorläufer für die Herstellung eines *tissue engineered* Spenderherzens auf Basis einer xenogenen EZM dienen könnten.

### Epoxidharz-Perfusion und Mikro-Computertomographie

Zur Analyse der Integrität und Offenheit der dezellularisierten Koronargefäße wurde das Gefäßsystem der dezellularisierten Rattenherzen mit einem roten Epoxidharz-Härter-Gemisch perfundiert. Ähnliche Verfahren zur Visualisierung von Gefäßen nativer und dezellularisierter Gewebe wurden in der Literatur bereits mehrfach beschrieben. Hier wurden ebenso Epoxidharze [107, 108] oder auch Farbstoffe [101] verwendet.

Die lange intravaskuläre Verweildauer des Harzes ermöglichte die vollständige fotografische Abbildung und quantitative Auswertung des perfundierten Koronarsystems. Aufgrund der relativ hohen unphysiologischen Viskosität des Harzes konnte allerdings jeweils nur ein geringer Perfusionsdruck angewandt werden, um einen Übertritt der Lösung in den linken Ventrikel zu verhindern. Dieser eingeschränkte Perfusionsdruck wiederum dürfte, insbesondere in Kombination mit der hohen Viskosität des Epoxidharzes, wohl dazu geführt haben, dass sich kleinste Gefäße der Perfusion und damit auch der quantitativen Erfassung entzogen.

Die Beimengung eines jodhaltigen Röntgenkontrastmittels zum Epoxidharz-Gemisch erlaubte schließlich die mikro-computertomographische Darstellung größerer Koronargefäßäste. Auch eine überlagerungsfreie Abbildung der Aortenklappe sowie der Koronarostien wurde mithilfe dieses Verfahrens ermöglicht. Einschränkungen ergaben sich durch das ungenügende räumliche Auflösungsvermögen sowie durch Streuartefakte. Folglich war die Darstellung kleinerer Gefäße nur eingeschränkt möglich. Ungeachtet dieser Limitation leistete die Mikro-CT-Angiographie einen wichtigen Beitrag zur dreidimensionalen Abbildung der vaskulären sowie valvulären Anatomie der *in toto* dezellularisierten Rattenherzen.

Die Verwendung von nativem und mit Kontrastmittel versetztem Epoxidharz leistete demnach einen wertvollen Beitrag zur Untersuchung der Aorta ascendens, der Aortenklappe sowie der Koronargefäße *in toto* dezellularisierter Rattenherzen.

#### **4.1.2 Coronary Artery Tissue-Flap Model**

##### Präparationsverfahren zur Anfertigung des Coronary Artery Tissue-Flap Model

Mittels des mikrochirurgischen Präparationsverfahrens wurde aus *in toto* dezellularisierten Rattenherzen das CATFM erstellt. Durch die Etablierung standardisierter Präparationsschritte konnte ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit erreicht werden. Da sich jegliche Präparationsschritte an makroskopisch gut erkennbaren anatomischen Landmarken orientierten, war es möglich, während der Präparation auf optische Hilfsmittel zu verzichten. Dies wiederum vereinfachte die Anfertigung des CATFM unter streng sterilen Bedingungen an einer *Laminar-Flow*-Sicherheitswerkbank, was wiederum eine wichtige Voraussetzung für die spätere sterile Verwendung der kardialen EZM im Rahmen nachfolgender Zellkulturstudien darstellte.

Durch die softwaregesteuerte Dezellularisierung sowie die Entwicklung und konsequente Anwendung eines stets reproduzierbaren Präparationsverfahrens war es somit möglich, hochstandardisiert, technisch einfach und relativ kostengünstig eine große Anzahl an CATFM herzustellen.

##### Selektive Koronarostienkanülierung

Über das jeweilige Koronarostium konnten die *tissue-flaps* mittels eines 28G-Katheters kanüliert werden. Dies ermöglichte die selektive Perfusion des rechtsbeziehungsweise links-koronararteriellen Stromgebietes. Neben den in dieser Arbeit beschriebenen Perfusionsversuchen könnte die kontrollierte selektive Perfusion des re-endothelialisierten Koronargefäßsystems in Zukunft auch zur Analyse des spezifischen Verhaltens verschiedener endothelialer Zelltypen unter Perfusionsbedingungen herangezogen werden. In einigen vorangegangenen Arbeiten konnte bereits der Einfluss strömungsbedingter Scherkräfte unter anderem auf die Genexpression von Endothelzellen gezeigt werden [109, 110]. Das re-endothelialisierte *Coronary Artery Tissue-Flap Model* könnte mittels der beschriebenen Technik ebenfalls für derartige dynamische Kultivierungsbedingungen Verwendung finden. Damit wäre es möglich, den Einfluss variierender Strömungsverhältnisse auf das Verhalten verschiedener Endothel- oder endothelialer Vorläuferzellen in einer hochgradig naturgetreuen, kardialen Mikroumgebung *in vitro* zu analysieren.

### Protein-Diffusions-Analyse

Zur genaueren Analyse der Gefäße des CATFM wurde die in Kapitel 2.2.8 beschriebene Protein-Diffusions-Analyse durchgeführt. Ein ähnliches Verfahren war bereits im Jahr 2007 von Ling et al. beschrieben worden [111]. Auch diese Arbeitsgruppe analysierte das Fluss- und Diffusionsverhalten von fluoreszenzmarkiertem Albumin in einem System präformierter Mikrokanäle. Allerdings berichtete sie in ihrer Veröffentlichung von einem aus Agarose bestehenden System, das mithilfe lithographischer Techniken und Gussverfahren hergestellt worden war [111]. Bei den Mikrokanälen des CATFM hingegen handelt es sich um ein natives, reich verzweigtes Gefäßsystem mit Koronargefäßen unterschiedlicher Kaliberstärke, welches von einer natürlichen EZM umgeben ist. Die semi-quantitative Analyse des Diffusionsverhaltens der fluoreszierenden Albuminlösung beschränkte sich deshalb jeweils auf einen repräsentativen Gefäßabschnitt mittleren Kalibers. Mithilfe der Diffusionsanalysen war es möglich, repräsentative dezellularisierte Koronargefäße auf ihre Integrität und Offenheit hin zu untersuchen. Außerdem konnte das Diffusionsverhalten einer proteinhaltigen Lösung über die Gefäßwand de-endothelialisierter Koronargefäße analysiert werden. Die Protein-Diffusionsanalysen leisteten damit einen wichtigen Beitrag zur genaueren Charakterisierung der dezellularisierten Koronargefäße der *tissue-flaps*.

#### **4.1.3 *In vitro* Rebesiedlung des Coronary Artery Tissue-Flap Model**

##### Verfahren zur Rebesiedlung des Koronarsystems

Die Rebesiedlung dezellularisierter Gewebe und Organe *in vitro* ist ein mittlerweile sehr häufig angewandtes Verfahren. Es findet seinen Einsatz unter anderem im *Tissue Engineering* von Herzmuskel- [38], Lungen- [112], Leber- [113], Nieren- [65] und auch Pankreasgewebe [114]. Nicht selten wird dabei versucht, durch die Nutzung des präformierten Gefäßsystems eine möglichst umfassende Rebesiedlung der dezellularisierten Organe zu erreichen. Die Perfusion dieses Gefäßsystems mit einer Zellsuspension wird dabei nicht nur zur alleinigen Rebesiedlung der Gefäßstrukturen verwendet, sondern dient auch der Einbringung von Zellen in tiefer gelegene Organanteile [43]. Die perfusionsbasierte Rebesiedlung der perivaskulären EZM erfordert dabei die passive

Extravasation von Zellen in das umliegende Gewebe. Dieser Prozess, der möglicherweise hohe Perfusionsdrücke erfordert, wird allerdings als potentiell zellschädigend angesehen [43]. Zudem wird dadurch die Integrität des Gefäßsystems aufgehoben, was einer funktionellen Revaskularisierung im Wege stehen könnte. Im Falle dezellularisierter Lungen und Nieren stehen mit dem Bronchialsystem beziehungsweise den ableitenden Harnwegen neben dem Gefäßsystem dieser Organe weitere anatomische Strukturen zur Verfügung, die für eine Rebesiedlung mittels Perfusion herangezogen werden können [65, 112].

Die Re-Endothelialisierung der Koronargefäße erfolgte auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch ein perfusionsbasiertes Rebesiedlungsverfahren. Die optimale Effektivität der Re-Endothelialisierung der *tissue-flaps* wurde dabei durch die beschriebene zweistufige Vorgehensweise erreicht. Voraussetzung hierfür war die erhaltene anatomische Integrität der dezellularisierten Herzen, da die retrograde Aortenperfusion zur Besiedlung des Koronarsystems eine funktionell intakte Aortenklappe voraussetzt. Zusätzlich erwies sich der temporäre Verschluss der Aorta ascendens mittels eines Titan-Clips nach erfolgter retrograder Perfusion als hilfreich, um eine ausreichende Adhärenz und Retention der Zellen im Gefäßsystem sicherzustellen. Durch diese Maßnahmen konnte eine sehr hohe Rebesiedlungs-Effektivität erzielt werden, wie sie beispielweise auch in einer Arbeit zur Rebesiedlung dezellularisierten Lebergewebes beschrieben worden war [108].

Durch die in der vorliegenden Arbeit verwendete Zelldichte von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml konnte die Formation größerer Zellaggregate verhindert werden, die möglicherweise zu einer Verlegung von Koronargefäßen hätte führen können. Im Falle der oben genannten Rebesiedlung dezellularisierten Lebergewebes wurden derartige Gefäßverschlüsse bei der Verwendung großer Zellzahlen beobachtet, die zur einer Abnahme der Rebesiedlungs-Effektivität führten [108]. Um allerdings möglichst rasch die Ausbildung einer vollkommen konfluenten Endothelzellschicht innerhalb des Koronarsystems zu erzielen, bedarf es womöglich größerer Zellzahlen, wie sie vereinzelt bereits in anderen Arbeiten zur Anwendung kamen [38, 115]. Zur Auslotung der für die Re-Endothelialisierung des CATFM optimalen Anzahl an Zellen sind folglich weiterführende Untersuchungen erforderlich.

Durch das Anfärben der Zellen mit dem Farbstoff CMFDA war es möglich, deren Verteilung im Gefäßsystem unmittelbar nach erfolgter Rebesiedlung zu

analysieren. Da das CMFDA erst in Form einer von intrazellulären Esterasen katalysierten Reaktion umgesetzt werden muss, bevor es die angefärbten Zellkörper fluoreszieren lässt, kann die CMFDA-Färbung auch als Vitalitätsnachweis aufgefasst werden. Durch das *Cell-Tracking* mittels CMFDA konnte folglich auch die Vitalität der HUVECs beurteilt werden. Im Gegensatz zu den eigentlichen *Live/Dead-Assays* konnten hierbei allerdings nur die vitalen Zellen beurteilt werden, ohne dass zudem eine Aussage über die nicht-vitalen Zellen getroffen werden konnte.

Um Retention, Verteilung und Kultivierung der Zellen in einem zunächst azellulären Gefäßsystem zu optimieren, wurde in der Vergangenheit eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden angewandt. So berichtete die Arbeitsgruppe um Doris Taylor von der Möglichkeit, endotheliale Zellen nicht nur über das arterielle, sondern auch über das venöse Gefäßsystem in die Koronarien von Rattenherzen einzubringen [115]. Durch die Kombination beider Verfahren konnte eine umfassendere Re-Endothelialisierung als bei alleiniger Anwendung eines unidirektionalen Applikationsweges erzielt werden [115]. Auch scheint die repetitive Zellinfusion einer einmaligen überlegen zu sein, wenn es darum geht, einen möglichst ausgeprägten Rezellularisierungsgrad zu erreichen, wie es von Uygun et al. in einer Arbeit zur Rebesiedlung dezellularisierten Lebergewebes beschrieben wurde [108]. Zur Optimierung der Repopulation dezellularisierter Rattennieren verwendeten Song et al. spezielle Vakuumkammern [65]. Mithilfe dieser Vakuumkammern wurde zum Zeitpunkt der Rebesiedlung ein Druckgradient über der Nierenmatrix angelegt. Auf diese Weise ließen sich Zellretention und -verteilung innerhalb der EZM weiter optimieren [65].

All diese Arbeiten stellen bedeutende Fortschritte auf dem Gebiet des *Tissue Engineerings* dar. Wie auch die hier vorliegende Arbeit bedienen sie sich eines perfusionsbasierten Besiedlungsverfahrens zur Rezellularisierung azellulärer Organgerüste. Darüber hinaus beschreiben sie verschiedenartige Methoden, mit deren Anwendung sich eine Optimierung der Rezellularisierung von Geweben erreichen lässt. Die hier aufgezeigten Methoden zur Rebesiedlung des CATFM dienen allerdings der Rebesiedlung des nativen Gefäßnetzes und nicht des angrenzenden parenchymatösen Gewebes, weshalb die in der Literatur beschriebenen Verfahren hier nur begrenzt hätten angewendet werden können. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Zellzahl, die Besiedlungs- und

Kultivierungsmethode führten dennoch zu einer bemerkenswerten Zellverteilung und -retention im gesamten Koronarsystem. Auch wenn sich dies durch weitere Modifikationen der dargestellten Methoden womöglich optimieren ließe, wurde, um den Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht zu sprengen, in dieser ersten Pilotstudie bewusst hiervon abgesehen.

#### Zur Koronargefäßbesiedlung verwendete Zellarten

Zur initialen Evaluierung der Strategie zur Repopulation des azellulären Koronarsystems wurden eine murine Fibroblasten-Zelllinie verwendet. Diese sogenannten 3T3-Zellen wurden erstmals 1963 von Todaro und Green beschrieben und werden seither in zahlreichen Studien eingesetzt [116, 117]. Aufgrund der relativ einfachen Handhabung, Stabilität und der hohen Proliferationsrate eignete sich diese Zelllinie sehr gut zur ersten Etablierung der Koronarrepopulation. Eine funktionelle Re-Endothelialisierung im eigentlichen Sinne konnte mit dieser Zelllinie allerdings nicht erzielt werden. Deshalb blieb der Fokus beim Einsatz der 3T3-Zellen auf die Rebesiedlungs- und Kultivierungsmethode mit dem Ziel der selektiven Koronarrebesiedlung beschränkt.

Um schließlich einen wirklichen Endothelzellverband innerhalb des dezellularen Koronarsystems zu erzielen, wurden nach Abschluss der Etablierungsphase HUVECs eingesetzt. Als humane Nabelschnurendothelzellen verfügen sie über viele wichtige endothelzelltypische Eigenschaften. So exprimieren sie endotheliale Marker und Rezeptoren wie zum Beispiel den Von-Willebrand-Faktor (vWF) [118] oder den VEGF-Rezeptor [119]. Wichtige Erkenntnisse für ein besseres Verständnis der Arteriosklerose oder auch angiogenetischer Prozesse im Rahmen neoplastischer Erkrankungen können auf Versuche mit HUVECs zurückgeführt werden [120]. Auch in zahlreichen bedeutenden Arbeiten im Bereich des *Tissue Engineerings* lässt sich der Einsatz humaner Nabelschnurendothelzellen beobachten [65, 112, 121, 122]. Die Verwendung dieser Zellen schien daher auch zur Re-Endothelialisierung des CATFM gut geeignet zu sein. Anhand der HUVECs war es sogar möglich, nicht nur die Re-Endothelialisierungskapazität des CATFM zu analysieren, sondern auch erste Versuche zur Funktionalität des neu angesiedelten Endothels durchzuführen.

### Vitalitäts- und Stoffwechsel-Analysen

Die Untersuchung der Vitalität der im Koronarsystem angesiedelten Zellen erfolgte mithilfe zweier *Live/Dead-Assays*. Dabei handelt es sich um gängige, in der Literatur ausführlich beschriebene Methoden [93, 107]. Sie ermöglichten es, die kardiale EZM auf ihre Zytokompatibilität hin zu untersuchen. Diese Eigenschaft nämlich stellt eine elementare Voraussetzung für eine Verwendung der kardialen Matrix im Rahmen von Zellkultur- und möglicherweise auch künftigen *in vivo* Versuchen dar. Insbesondere sollte durch die Vitalitätsanalysen ein negativer Einfluss von potentiell zelltoxischen Restbestandteilen der Dezellularisierungslösung innerhalb der EZM ausgeschlossen werden. Zusätzlich konnte mithilfe dieser Untersuchungen festgestellt werden, dass durch die beschriebenen Kultivierungsbedingungen ein Überleben der intrakoronar angesiedelten Zellen auch über einen längeren Zeitraum sichergestellt werden konnte. Darüber hinaus ermöglichten es die *Live/Dead-Assays*, das angewandte Rebesiedlungsverfahren selbst im Hinblick auf eine möglicherweise zellschädigende Wirkung zu analysieren, da in der Vergangenheit im Zusammenhang mit perfusionsbasierten Rebesiedlungsverfahren ein negativer Einfluss vorherrschender Scherkräfte auf die Vitalität der verwendeten Zellen beschrieben worden war [43]. Außerdem eignete sich die durch die Vitalitäts-Assays hervorgerufene Fluoreszenz der Zellkörper zur Beurteilung der Verteilung sowie der Morphologie der Zellen im Gefäßsystem der *tissue-flaps*.

Um zusätzlich zur Vitalität auch die Funktionalität der im Koronarsystem angesiedelten Zellen zu analysieren, wurde ein *LDL-Uptake-Assay* durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein klassisches Verfahren zur Charakterisierung der biologischen Stoffwechselaktivität von Endothelzellen [123-125]. Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte dieses Assay erfolgreich zum Nachweis der endothelzelltypischen metabolischen Aktivität der intrakoronar angesiedelten HUVECs eingesetzt werden. Ein großer Vorteil dieses Verfahrens lag in seiner relativ einfachen Durchführbarkeit. Die Translumineszenz des dezellularisierten Gewebes erlaubte dabei die direkte qualitative mikroskopische Auswertung des Assays.

### Erweiterung des Modellsystems mit kardialen Zellen

Um das CATFM als funktionelles kardiales *in vitro* Modellsystem zu etablieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit HUVECs und neonatale Rattenkardiomyozyten zusammen innerhalb der *tissue-flaps* kultiviert. In der Vergangenheit konnten bereits zahlreiche Arbeiten den positiven wechselseitigen Einfluss zweier Zelllinien auf ihr gegenseitiges Wachstums- und Differenzierungsverhalten nachweisen [89-92]. Die Verwendung neonataler Rattenkardiomyozyten als kardiales *in vitro* Zellkulturmodell ist zudem ein weit verbreitetes Verfahren zur Untersuchung myokardialer Physio- und Pathophysiologie. In zahlreichen Studien, unter anderem zur Morphologie [126], zum Metabolismus [127], zum Ionenhaushalt [128] und zur Kontraktilität [129] von Herzmuskelzellen wurde diese Zellart bereits erfolgreich eingesetzt. Außerdem diente sie der Untersuchung potentiell kardiotoxischer Effekte verschiedener Medikamente [130] und Toxine [131]. Aufgrund dieses umfassenden Spektrums und der damit einhergehenden guten Charakterisierung, der relativ einfachen Verfügbarkeit sowie nicht zuletzt auch aufgrund deren Bedeutung im kardiovaskulären *Tissue Engineering* [32, 38, 132] wurden neonatalen Rattenkardiomyozyten hier als kardiale Modellzellen verwendet.

Mithilfe des angewandten Besiedlungsverfahrens war es möglich, die Kardiomyozyten auf der epikardialen Oberfläche der *tissue-flaps* anzusiedeln. Durch die Anfärbung mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff CMTPX konnte die Anordnung und Verteilung der epikardial angesiedelten Kardiomyozyten konfokalmikroskopisch analysiert werden. Die Verwendung von CMTPX erlaubte es zudem, eine sichere Differenzierung zwischen intravasal kultivierten Endothel- und epikardial angesiedelten Herzmuskelzellen vornehmen zu können. Während die intrakoronar befindlichen HUVECs durch die Anfärbung mit CMFDA grün fluoreszierten, kamen die Rattenkardiomyozyten rot zur Darstellung. Auf diese Weise konnte die Kultivierung der beiden Zellarten in verschiedenen Kompartimenten der *tissue-flaps* nachgewiesen werden.

Da es sich bei den Kokulturversuchen der vorliegenden Arbeit allerdings lediglich um eine erste Machbarkeitsstudie handelte, gilt es in Folgeversuchen die Besiedlungsstrategie für Kardiomyozyten sowie die Kokulturbedingungen im Allgemeinen weiter zu optimieren. Denkbar wäre hier zunächst die Verwendung einer größeren Anzahl an Kardiomyozyten, um die Dichte des Zellverbandes auf

der epikardialen Oberfläche der *tissue-flaps* zu vergrößern. Um eine Ausbreitung der Herzmuskelzellen nicht nur oberflächlich, sondern auch in tieferen Schichten der kardialen EZM zu ermöglichen, wäre es außerdem vorstellbar, die Rebesiedlungsstrategie um ein injektionsbasiertes Besiedlungsverfahren zu erweitern [133]. Ein solches Verfahren beruht auf der direkten Injektion einer Zellsuspension in das dezellularisierte Gewebe. Neben den perfusionsbasierten Strategien gilt diese Methode als ein weiteres häufig angewandtes Verfahren zur Rebesiedlung dezellularisierter Gewebe [43]. Als intramurale Injektion wurde diese Methode auch zur Ansiedlung von Zellen inmitten einer kardialen EZM bereits mehrfach erfolgreich eingesetzt [38, 133]. In der Regel sind dabei wiederholte Injektionen an unterschiedlichen Stellen erforderlich, um die Matrix mit einer ausreichend Menge an Zellen zu versehen. Außerdem ist zu beachten, dass eine hohe lokale Zellkonzentration im Bereich der Injektionsstellen zur Bildung von Zellaggregaten und zentralen Nekrosearealen führen kann [43]. Wie bereits erläutert, können sich dynamische Kultivierungsbedingungen positiv auf die Morphologie und Funktion myokardialer Gewebekonstrukte auswirken [37, 134]. Derartige Ansätze beschränken sich dabei nicht nur auf Hydrogel-Konstrukte, sondern auch auf rebesiedelte extrazelluläre Matrices. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sich durch biomechanische Stimulation *tissue engineerter* Gewebe eine funktionale Zellorganisation auch für eine rebesiedelte kardiale EZM erreichen lässt [133]. Von einem derartigen dynamischen Kultivierungsverfahren könnte demnach künftig auch das CATFM profitieren.

Trotz des noch verbleibenden Optimierungsbedarfs konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch die dargestellten Besiedlungsverfahren mit dem CATFM eine Plattform für Kokulturversuche in einem hochgradig naturgetreuen, dreidimensionalen kardialen Milieu geschaffen werden konnte.

#### 4.1.4 Hämokompatibilitätsanalysen

Das vorrangige Ziel aller Bestrebungen im Bereich des *Tissue Engineerings* liegt in einer breiten klinischen Anwendung artifiziell erzeugter biologischer Konstrukte, die in Zukunft als funktionelle Ersatzstrukturen für erkranktes Gewebe eingesetzt werden können. Eine derartige Anwendung *tissue engineerter* Gewebe *in vivo* bedingt deren unverzügliche Perfusion über ein idealerweise präformiertes,

funktionelles Gefäßnetzwerk. Um das CATFM als kardiales *in vitro* Testsystem zu etablieren und dessen Eignung als potenziell *in vivo* anwendbares kardiales Gewebekonstrukt zu testen, wurde die Hämokompatibilität der kardialen EZM evaluiert. Mithilfe der dafür angewandten koronaren Perfusion mittels Citratblut konnte die Hämokompatibilität sowohl de-endothelialisierter als auch rebesiedelter Koronargefäße analysiert werden. Die Blut-Perfusion erwies sich dabei als geeignete Methode, die Offenheit und Durchgängigkeit der Koronargefäße, insbesondere für zelluläre Vollblutbestandteile zu untersuchen.

In ihrer Pionierarbeit zur Dezellularisierung und Rebesiedlung von Rattenherzen gelang es bereits Ott et al. eine dezellularisierte Myokardmatrix einer kontrollierten Perfusion mit Blut zu unterziehen [38]. Diese Versuche beschränkten sich allerdings auf eine rein makroskopische Visualisierung der Blut-Perfusion heterotop in Ratten implantierter dezellularisierter Herzen. Robertson et al. berichteten 2014 von einer ebensolchen Implantation, allerdings eines zuvor *in vitro* re-endothelialisierten Rattenherzens [115]. In histologischen Untersuchungen konnte diese Arbeitsgruppe die reduzierte Thrombogenität rebesiedelter gegenüber azellulärer Koronargefäße aufzeigen. Mithilfe eines ebenfalls durchgeführten *in vitro* Thrombomodulin-Assays konnte diese Annahme weiter gestützt werden [115].

Die Verwendung einer Fibroblasten-Zelllinie sowie die kurzzeitige und zudem lediglich manuelle Perfusion des Gefäßsystems beschränken die Auswertung der Blut-Perfusions-Versuche auf die in dieser Arbeit angewandten Methoden. Dennoch legen die hier durchgeführten Hämokompatibilitätsanalysen nahe, dass das CATFM künftig ebenfalls für derartige *in vitro* Analysen zur Thrombogenität eines re-endothelialisierten Koronarsystems eingesetzt werden könnte. Dabei wäre es möglich, zusätzlich histologische und molekularbiologische Analyse-Methoden anzuwenden. Darüber hinaus wäre es denkbar, die besonderen Eigenschaften des CATFM für die direkte Visualisierung im Sinne eines *Live-Cell-Tracking* zu nutzen. Die in einer Ebene ausgerichteten translumineszenten *tissue-flaps* könnten beispielsweise für die Echtzeitanalysen der Thrombozytenaggregation und Thrombusformation herangezogen werden. Verschiedene Arbeiten beschreiben derartige Echtzeituntersuchungen mit fluoreszenzmarkierten Thrombozyten unter der Verwendung spezieller Flusskammern [135-137]. Im Gegensatz zu solchen Flusskammern könnte mit dem CATFM eine standardisierte

und dennoch hochgradig naturgetreue, kardiale Mikroumgebung für derartige *Live Imaging* Untersuchungen zur Verfügung gestellt werden.

Eine geregelte Koronargefäß-Perfusion wäre beispielsweise unter Verwendung einer automatischen Spritzenpumpe realisierbar. Die generelle Eignung einer solchen Pumpe zur Perfusion der *tissue-flaps* mit einer definierten Flussrate konnte im Zusammenhang mit den beschriebenen Protein-Diffusions-Versuchen bereits aufgezeigt werden. Das CATFM könnte somit künftig zur Evaluation verschiedener Vaskularisierungsstrategien eingesetzt werden. Mithilfe der Blut-Perfusion könnte insbesondere auch die Eignung dieser Strategien als Maßnahme zur Prävention thrombembolischer Ereignisse im Gefäßsystem eines *tissue engineeren* Gewebes beurteilt werden.

#### **4.1.5 Histologie**

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde zur primären Analyse sowohl der nativen als auch der rebesiedelten EZM eingesetzt. Sie erlaubte es, relativ rasch einen ersten Überblick über die Matrixbeschaffenheit und das Ausmaß der Rebesiedlung zu gewinnen. Genauere Aussagen zur Zusammensetzung der EZM konnten mithilfe dieser Färbemethode allerdings nicht gemacht werden. Als Standardverfahren eignete sich die Hämatoxylin-Eosin-Färbung hingegen gut, die EZM auf potentielle zelluläre, insbesondere nukleäre Restbestandteile hin zu untersuchen. Außerdem konnte mithilfe dieser Färbemethode eine erste Einschätzung bezüglich der Anordnung und Verteilung der neu angesiedelten Zellen vorgenommen werden.

Ein histologisches Verfahren, das eine genauere Beurteilung der EZM erlaubte, war die Movat's Pentachrom-Färbung. Mit deren Hilfe konnte eine feinere histologische Differenzierung einzelner Elemente der EZM vorgenommen werden [96], wofür diese Färbung bereits in der Vergangenheit mehrfach herangezogen worden war [93, 103, 105, 138]. Auch sie kann daher als ein histologisches Standardverfahren zur Analyse extrazellulärer Matrices angesehen werden. Im Rahmen dieser Arbeit diente sie vor allem der Identifizierung kleinkalibriger Gefäßstrukturen inmitten der kardialen EZM. Aufgrund der speziellen Zusammensetzung der Gefäßgerüste und ihrer Basalmembran konnten diese mithilfe der Movat's Pentachrom-Färbung als dunkle, ringförmige Strukturen

innerhalb der Matrix dargestellt werden. So machte es diese Färbemethode möglich, die Lage der angesiedelten Zellen relativ einfach als intra- oder extravasal zu qualifizieren.

Um nicht nur die Lage und Verteilung der Zellen im Gefäßsystem der dezellularisierten Herzen, sondern auch deren Morphologie beurteilen zu können, wurden die histologischen Schnitte der rebesiedelten EZM mit Phalloidin-Rhodamin gefärbt. Die hierdurch hervorgerufene Anfärbung von F-Actin erlaubt es, das Zytoskelett zu visualisieren. Auch in anderen Arbeiten wurde diese Färbung bereits eingesetzt, um die räumliche Ausrichtung sowie die Morphologie verschiedener Zellarten beurteilen zu können [48, 133, 139]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erwies sich die Phalloidin-Färbung ebenfalls als eine geeignete Methode, die Morphologie und Anordnung der intravasal angesiedelten 3T3-Zellen mikroskopisch zu analysieren. Das fluoreszierende Färbereagenz ließ das Zytoskelett der Fibroblasten deutlich erkennen. So war es möglich, Rückschlüsse auf die zelluläre Morphologie der intrakoronar kultivierten Zellen zu ziehen. Dabei wurde davon ausgegangen, dass mit der Beobachtung gefäßwandadhärenter, elongierter Zelleiber die Ausbildung einer hinreichenden Zell-Matrix-Adhärenz angenommen werden kann. Die definitive Verifizierung dieser Annahme würde allerdings weiterführende Untersuchungen zur Ausbildung von Zell-Matrix-Verbindungen erfordern. So wäre es denkbar, die Expression verschiedener Zell-Matrix- aber auch interzellulärer Adhäsionsproteine weiter zu untersuchen. Eine besondere Rolle spielen in diesem Zusammenhang unter anderem Proteine aus den Familien der Integrine, Cadherine und Immunglobuline [140-142]. Unter den beiden letztgenannten sind im Speziellen das sogenannte VE-Cadherin (*Vascular Endothelial Cadherin*) sowie das PECAM-1 (*Platelet endothelial cell adhesion molecule-1*) hervorzuheben. PECAM-1 ist auch unter der Bezeichnung CD31 (*cluster of differentiation 31*) bekannt [140]. Beide Proteine haben eine große Bedeutung als endotheliale Adhäsionsproteine und wurden deshalb bereits mehrfach zur genaueren Untersuchung von Endothelzellen eingesetzt [143-145]. Derartige Proteine sind für ein funktionelles und stabiles Endothel, das als dynamische Barriere zwischen Intra- und Extravasalraum wirkt, von elementarer Bedeutung [63]. Die Analyse der Expression und Verteilung derartiger Adhäsionsproteine könnte ergänzend dazu beitragen, den intrakoronar

angesiedelten Endothelzellverband morphologisch sowie funktionell weiter zu charakterisieren.

## **4.2 Bewertung der erzielten Ergebnisse**

### **4.2.1 Vaskularisierte EZM als biologische Gerüststruktur**

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung und Etablierung eines neuartigen, biologischen, kardialen Matrixmodells (CATFM) basierend auf einer vaskularisierten kardialen EZM, die durch ein standardisiertes Dezellularisierungs-Verfahren unmittelbar aus nativem Herzmuskelgewebe gewonnen wurde. Das CATFM verfügt daher über ein natives Koronarsystem, das von einer hochgradig erhaltenen EZM umgeben ist. Somit kann mit dem CATFM eine kardiale EZM genutzt werden, die nahezu allen Anforderungen an eine makro- und auch mikroskopisch erhaltene Organarchitektur genügt. Die Möglichkeit, wichtige EZM-Charakteristika durch die Anwendung eines standardisierten, perfusionsbasierten Dezellularisierungs-Verfahrens erhalten zu können, wie von Akhyari et al. bereits beschrieben [93], war die Voraussetzung für die Etablierung eines solchen Matrixmodells. Im Gegensatz zu vielen der rein zellbasierten Verfahren oder zu denjenigen, die auf die Verwendung von Hydrogelen oder synthetischen Materialien zurückgreifen, liegt der Vorteil des CATFM in seinem bereits vorhandenen nativen Gefäßsystem. Mit der komplexen räumlichen Anordnung sowie der vielfachen Aufzweigung der Gefäßstrukturen von großen epikardialen bis hin zu kleinen kapillären Gefäßen sind die Voraussetzungen für ein vaskularisiertes Gewebe bereits erfüllt. Diese komplexe Architektur des Gefäßsystems spielt nicht nur eine bedeutende Rolle für einen geregelten Stoffaustausch zwischen intra- und extravasalem Raum, sondern auch für den geordneten Ablauf vieler weiterer wichtiger physiologischer Funktionen [51-54].

Der Einsatz einer softwaregesteuerten Dezellularisierung durch Koronararterien-perfusion ermöglichte es, hochstandardisiert eine große Anzahl dezellularisierter Rattenherzen mit einheitlicher Matrixbeschaffenheit herzustellen. Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte mikrochirurgische Präparationsverfahren erlaubte es, aus diesen Rattenherzen ein standardisiertes *in vitro* Modellsystem, das CATFM, zu erstellen. Auf diese Weise konnte ein vaskularisiertes Matrixmodell geschaffen werden, das trotz seines biologischen Ursprungs und

seiner natürlichen Eigenschaften ein hohes Maß an Standardisierung und Reproduzierbarkeit gewährleisten konnte.

Die zahlreichen vielversprechenden Arbeiten der vergangenen Jahre zeigen die enormen Fortschritte auf dem Gebiet des kardiovaskulären *Tissue Engineerings* auf. Die große Mehrheit dieser Arbeiten zielte dabei auf die Nachbildung von kardialen Gewebe in möglichst naturgetreuer Form. Durch unterschiedliche Methoden ist es bereits gelungen, *tissue engineerter* myokardiale Gewebekonstrukte zu erzeugen, die über ein gewisses Maß an kontraktile Aktivität verfügen [32, 37, 38]. Der alleinige Fokus auf der Ausstattung artifizieller Gewebe mit der Fähigkeit zur Kontraktion erfüllt allerdings nur eine, wenn auch sehr bedeutende Anforderung an ein funktionelles Herzmuskelgewebe. Der Arbeitsgruppe um Doris Taylor war es bereits 2008 gelungen, ein dezellularisiertes Rattenherz nicht nur mit kontraktionsfähigen Kardiomyozyten, sondern auch mit endothelialen Zellen zu besiedeln [38]. Ein erster Schritt in Richtung eines funktionell vaskularisierten Herzmuskelgewebes war damit bereits getan. Die vollständige Ausstattung *tissue engineerter* Gewebe mit einem funktionierenden, gut ausgebildeten und stabilen Gefäßsystem stellt allerdings auch heute noch eine der zentralen Herausforderungen im *Tissue Engineering* dar [50, 81]. Die Re-Endothelialisierung des Koronarsystems ist nicht nur aufgrund der bedeutungsvollen Interaktion zwischen Endothelzellen und Kardiomyozyten eine wichtige Voraussetzung für die Herstellung eines funktionellen Myokards [57]. Auch ein künftiger *in vivo* Einsatz myokardialer Gewebekonstrukte verlangt deren Ausstattung mit einem gut ausgebildeten Gefäßsystem, um eine unverzügliche Blutversorgung des implantierten Gewebes gewährleisten und somit dessen Vitalität nachhaltig sicherstellen zu können.

Neben der potentiellen *in vivo* Anwendung von *tissue engineerter* Myokard gibt es zunehmend Bestrebungen, artifizielles Herzmuskelgewebe auch für pharmazeutische *in vitro* Studien und Untersuchungen zur Stammzellendifferenzierung nutzbar zu machen [146]. Für beide Anwendungen spielt die funktionelle Vaskularisierung des verwendeten Gewebes eine bedeutende Rolle. So stellt sie einerseits, wie bereits erwähnt, eine unabdingbare Voraussetzung für eine unmittelbare Blut-Perfusion des Gewebes nach dessen Implantation dar, während sie andererseits auch entscheidend dazu beiträgt, reell vorherrschende *in vivo* Bedingungen bestmöglich imitieren zu können.

Das CATFM erlaubt es, bestehende Strategien für eine derartige funktionelle Vaskularisierung myokardialer Gewebekonstrukte zu optimieren oder gar neue Ansätze zu entwickeln. Im Gegensatz zu bisher existierenden Modellen verfügt das CATFM über eine kardiale extrazelluläre Mikroumgebung, welche in dieser Form bisher von keinem synthetischen Material oder nicht-kardialen biologischen Modellen erreicht werden konnte [17].

Mit dem speziellen Aufbau des CATFM kann das Gefäßsystem nativer Herzen zu großen Teilen erhalten werden. Sowohl das links- als auch das rechts-koronararterielle Stromgebiet wird von je einem *tissue-flap* repräsentiert. In Verbindung mit der ebenfalls in dieser Arbeit aufgezeigten Zytokompatibilität der dezellularisierten kardialen EZM bietet das CATFM die Möglichkeit, die kardiale vaskuläre Biologie zu replizieren und in einer hochgradig naturgetreuen Umgebung zu analysieren.

#### **4.2.2 Rebesiedlungskapazität des *Coronary Artery Tissue-Flap Model***

Mithilfe histologischer Untersuchungen, Epoxidharzperfusion und Mikro-CT-Angiographie war es möglich, die Integrität und Offenheit des dezellularisierten Koronarsystems aufzuzeigen. Das angewandte perfusionsbasierte Dezellularisierungs-Verfahren erwies sich folglich als geeignete Methode, eine vollständige *in toto* Organdezellularisierung unter Erhalt eines nahezu unversehrten Koronarsystems zu erreichen. Die Ergebnisse dieser initialen Evaluierung der de-endothelialisierten Koronargefäße stellten die Grundlage für deren gezielte Rebesiedlung dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode etabliert, die es erlaubte, die Rebesiedlung dezellularisierter koronarer Gefäßgerüste auf einfache Art und Weise durchführen zu können. Mithilfe dieser Methode war es möglich, das Koronarsystem dezellularisierter Rattenherzen einer standardisierten und hochselektiven Rebesiedlung zu unterziehen. Sowohl der Einsatz von Fibroblasten als auch von humanen Nabelschnurendothelzellen führte zu einer fast vollständigen Rebesiedlung des gesamten koronaren Gefäßsystems. Dichte zelluläre Netzwerke erstreckten sich von großen epikardialen bis hinein in kleine kapilläre Gefäße.

Durch zusätzliche Besiedlung der kardialen EZM mit neonatalen Rattenkardiomyozyten gelang es, potentiell kontraktionsfähige Herzmuskelzellen in der

unmittelbaren Nachbarschaft re-endothelialisierter Koronargefäße anzusiedeln. Damit war es gelungen, eine gezielte simultane Rebesiedlung unterschiedlicher Matrixkompartimente zu erreichen. Die Besiedlungsmethoden dieser ersten Pilotstudie gilt es allerdings künftig weiter zu optimieren und auch den neugebildeten Endothelzellverband strukturell und funktionell näher zu charakterisieren. Dennoch verdeutlichen die Ergebnisse der Zellkulturstudien das biologische Potenzial des CATFM.

Auch andere Arbeiten berichteten bereits von einer erfolgreichen Re-Endothelialisierung dezellularisierter Gefäßsysteme. Das Spektrum verschiedenartiger Gewebe mit rebesiedelten Gefäßstrukturen reicht dabei von dezellularisiertem Myokard [115] über Lungen- [112], Leber- [108] bis hin zu Nierengewebe [65] und Dünndarmsegmenten [147]. Über die generelle Machbarkeit einer gezielten Re-Endothelialisierung azellulärer Gefäßsysteme hinausgehend ist es mittlerweile einigen Arbeitsgruppen gelungen, bestehende Vaskularisierungsansätze noch weiter zu verbessern. So berichteten Bär et al. von der Möglichkeit die Re-Endothelialisierung dezellularisierter Schweinedarmsegmente durch die Beschichtung des Gefäßsystems mit humanem rekombinanten CCN1 optimieren zu können [148]. CCN1 ist ein matrixassoziiertes Protein der CNN- (connective tissue growth factor, CYR61, nephroblastoma overexpressed) Familie [149]. Es spielt eine wichtige Rolle im Rahmen verschiedener komplexer Prozesse wie zum Beispiel der Angiogenese. CCN1 unterstützt dabei wichtige Vorgänge wie die Zelladhäsion, -proliferation, -differenzierung und -migration [150]. Auch im CATFM könnte durch die Einbindung von Adhäsionsproteinen und Wachstumsfaktoren das Endothelialisierungspotential gesteigert werden.

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte CATFM bietet die Möglichkeit, Re-Endothelialisierungs-Kapazität, Vitalität und Funktionalität verschiedener Spenderzellen in einem standardisierten, biologischen, kardialen *in vitro* Modell zu analysieren. Als Besonderheiten können hierbei die spezielle Architektur des CATFM sowie die ausgeprägte Translumineszenz der *tissue-flaps* angesehen werden. Diese speziellen Eigenschaften nämlich ermöglichen es, mit dem hier entwickelten Matrixmodell Zellkulturstudien in Form eines *Live-Cell-Tracking* durchzuführen. Im Gegensatz zu anderen Modellen, die über eine dichtere EZM verfügen, schaffen

die translumineszenten *tissue-flaps* optimale Voraussetzungen für eine einfache und direkte mikroskopische Visualisierung der intrakoronar angesiedelten Zellen [151].

#### **4.2.3 Perfusionsanalysen am *Coronary Artery Tissue-Flap Model***

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Versuche durchgeführt, die eine Perfusion des koronaren Gefäßsystems beinhalteten. Auf diese Weise war es möglich, die dezellularisierten Koronargefäße auf ihre Integrität und Offenheit hin zu untersuchen. Außerdem konnte speziell mithilfe der Blut-Perfusions-Versuche gezeigt werden, dass auch nach erfolgreicher Rebesiedlung die Unversehrtheit und Durchgängigkeit der Gefäß-EZM vollständig erhalten werden konnten. Hierbei stellt vor allem die Hämokompatibilität eine elementare Voraussetzung für eine potentielle *in vivo* Anwendung größerer *tissue engineerter* Gewebekonstrukte dar. Aber auch für einen künftigen Einsatz bioartifizieller Gewebe als *ex vivo* Testsysteme könnte eine derartige Blut-Perfusion von großer Bedeutung sein. Durch die Verwendung von Vollblut oder einzelnen Blutkomponenten könnten derartige Testsysteme realen *in vivo* Bedingungen näher gebracht werden. *In vitro* gewonnene Erkenntnisse könnten somit besser interpretiert und sicherer auf reale, *in vivo* vorherrschende Bedingungen übertragen werden.

In den Protein-Diffusions-Analysen konnte eine gerichtete Diffusion der fluoreszierenden Albuminlösung aus dem dezellularisierten Gefäßsystem in die angrenzende EZM beobachtet werden. Gefäßleckagen, die im Falle einer lokal überschießenden Extravasation des Perfusats hätten angenommen werden müssen, waren nicht auszumachen. Die quantitative Auswertung der Diffusions-Analysen ermöglichte es, die Fluoreszenzintensität im Gewebe in Abhängigkeit von Zeit beziehungsweise Gefäßabstand darzustellen. Dabei fielen größere Standardabweichungen als in einer vergleichbaren Studie auf, die das Diffusionsverhalten proteinhaltiger Lösungen in einem mit Mikrokanälen ausgestatteten Hydrogel-Modell untersucht hatte [111]. Im Gegensatz zu einer homogen strukturierten Hydrogel-Umgebung kann in einer natürlichen EZM, wie der des CATFM, allerdings von einer gewissen Unregelmäßigkeit und Variabilität der Matrix- und Gefäßarchitektur ausgegangen werden.

Alle Perfusions-Versuche der *tissue-flaps* profitierten von der in dieser Arbeit dargestellten Möglichkeit zur selektiven Kanülierung der Koronarostien. Ohne

große Perfusatverluste war es auf diese Weise möglich, sowohl das links- als auch rechtsventrikuläre Gefäßsystem einer gezielten Perfusion zu unterziehen. Im Gegensatz zu anderen vaskularisierten Matrixmodellen natürlichen Ursprungs, wie zum Beispiel dem einer dezellularisierten, intestinalen Submucosa, verfügt das *Coronary Artery Tissue-Flap Model* nicht über einen Gefäßabschnitt, der eine venöse Drainage gewährleisten könnte [152]. Im CATFM erfolgt die Perfusatdrainage aus den offenen Gefäßstümpfen an den Rändern der *tissue-flaps*. Das Fehlen eines venösen Abstromgebietes stellt insbesondere einen potentiellen *in vivo* Einsatz der *tissue-flaps* vor ein bisher ungelöstes Problem. Die umgehende funktionelle Anastomosierung eines *tissue engineered* Gewebes mit dem Gefäßsystem des Empfängerorganismus stellt eine Grundvoraussetzung für deren Überleben *in vivo* dar [147]. Am denkbar einfachsten wäre es, eine derartige Gefäßverbindung über chirurgisch zugängliche arterielle und venöse Gefäßpedikel des Implantates herzustellen. Das oben genannte Modell der dezellularisierten Submucosa eines porcinen Dünndarmsegments weist solch anastomosierbare Gefäßabschnitte auf [147]. Mertsching et al. nutzten diese mesenterialen Gefäßstümpfe, um einen dezellularisierten und anschließend rebesiedelten Dünndarmabschnitt durch End-zu-Seit-Anastomosierung mit der Arteria beziehungsweise Vena brachialis eines Probanden zu verbinden [153].

Auch wenn dem CATFM ein Gefäßpedikel zur venösen Drainage und Anastomosierung mit einem geschlossenen Gefäßsystem fehlt, ist es, wie in den hier durchgeführten Perfusionsversuchen gezeigt, möglich, dessen Gefäßsystem physiologischen Flussbedingungen auszusetzen. So könnte in Folgestudien der Einfluss verschiedener Strömungsprofile auf Struktur und Funktion des intrakoronar angesiedelten Endothelzellverbandes untersucht werden.

### **4.3 Perspektive des *Coronary Artery Tissue-Flap Model***

#### **4.3.1 Modellsystem für Vaskularisierungsstudien**

Das CATFM stellt ein biologisches und dennoch hochstandardisiertes kardiales Matrixmodell dar. Es verfügt über ein natürliches Gefäßsystem, das in seiner komplexen Architektur dem des nativen Herzmuskelgewebes gleicht und selektiv rebesiedelt werden kann. Damit bietet das CATFM die Möglichkeit zur Evaluation

und Optimierung bestehender und zur Entwicklung neuartiger Strategien für die Vaskularisierung *tissue engineerter* Gewebe. Auf diese Weise könnte es einen wichtigen Beitrag dazu leisten, eine der derzeit zentralen Herausforderungen im Bereich des *Tissue Engineerings*, die in der Ausstattung artifizierender Gewebe mit einem funktionellen Gefäßsystem liegt, zu meistern [50]. Mithilfe von *in vitro* Modellsystemen wie dem CATFM kann die Anatomie und Biologie der Koronargefäße und des Herzmuskelgewebes repliziert werden. Daraus könnten neue Erkenntnisse und ein fundierteres Verständnis der myokardialen und vaskulären Biologie erwachsen, die erheblich dazu beitragen würden, die aktuellen Hürden im Bereich des *Tissue Engineerings* zu überwinden.

#### **4.3.2 Kardiales *in vitro* Testsystem**

Die im Rahmen dieser Arbeit aufgezeigte Eigenschaft des CATFM, auch als kardiales Kokultur-Modell eingesetzt werden zu können, bietet die Möglichkeit, verschiedene Spender-Endothelzellen und deren Interaktion mit kardialen Zellen zu untersuchen. Besiedelt mit endothelialen und kardialen Zellen kann das CATFM künftig als ein dreidimensionales *in vitro* Testsystem für Untersuchungen zur Stammzellendifferenzierung sowie für pharmakologische und toxikologische Studien eingesetzt werden. Außerdem könnte es als kardiovaskuläres *in vitro* Krankheitsmodell dienen. Mit dessen Hilfe wäre es denkbar, durch Simulation pathophysiologischer Prozesse neue Einsichten in die Pathogenese verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen zu erlangen.

Ähnliche Ziele werden mit der Idee hinter den sogenannten *Organs-on-Chips* verfolgt [154, 155]. Bei diesen Organen im Mikrochip-Format handelt es sich um spezielle Vorrichtungen zur Kultivierung jeweils organspezifischer Zellen. Mittels überwiegend lithographischer Arbeitstechniken, wie sie in der Fabrikation von Mikrochips für die Computertechnik zum Einsatz kommen, kann der Aufbau dieser Kultivierungseinheiten der jeweiligen mikroskopischen Organanatomie annähernd nachempfunden werden. So ist es möglich, deren Oberflächenbeschaffenheit auch noch im Nanometerbereich gezielt zu modifizieren. Zusätzlich können mithilfe dieser Arbeitstechniken die Kultivierungsvorrichtungen mit mikroskopisch kleinen Kanälen ausgestattet werden, die eine kontinuierliche Perfusion der „Organstrukturen“ erlauben. Auf diese Weise kann zum Beispiel der Einfluss

verschiedener Strömungsprofile auf das Verhalten unterschiedlicher Zellarten untersucht werden. Aber auch anderen physikalischen oder chemischen Stimuli können diese Kulturvorrichtungen gezielt ausgesetzt werden. Dadurch ist es möglich, einerseits physiologische Organfunktionen zu imitieren, andererseits aber auch organ- oder gewebespezifische Reaktionen auf den Einfluss bestimmter Medikamente und Toxine *in vitro* zu analysieren. Die damit einhergehende hohe organspezifische Funktionalität kann bis dato allerdings mit zwei- oder dreidimensionalen Zellkulturmodellen noch nicht erreicht werden [155]. Die Idee der *Organs-on-Chips* als zellbasierte *in vitro* Modellsysteme stellt daher eine mögliche Alternative für gängige Studien am Zellkultur- oder auch Tiermodell dar [154]. Unter anderem als Replikat von Leber- [156], Nieren- [157], Lungen- [158] oder Herzmuskelgewebe [146] wurden derartige Organmodelle bereits entwickelt. Gegenüber diesen Modellsystemen verfügt das CATFM über eine natürliche EZM, die den kultivierten Zellen als Gerüststruktur dient. Um eine möglichst naturgetreue Mikroumgebung bereitstellen zu können, werden die Mikrochip-Organen mittels der oben genannten Techniken bearbeitet. Das CATFM hingegen verfügt von sich aus bereits über ein natürliches Mikromilieu mit weitgehend erhaltenen EZM-Charakteristika [93]. Es ist bekannt, dass die ultrastrukturellen Eigenschaften der EZM einen nicht unerheblichen Einfluss auf wichtige zellphysiologische Prozesse haben [43-45]. Diese Tatsache gilt es auch bei der Entwicklung eines *in vitro* Testsystems zu berücksichtigen. Nur so können letztlich bestmögliche Voraussetzungen geschaffen werden, um *in vitro* generierte Testergebnisse auf *in vivo* vorherrschende Verhältnisse möglichst sicher zu übertragen.

Neben der Perfusion des re-endothelialisierten Gefäßsystems wäre auch die Anwendung verschiedener physikochemischer Stimuli am CATFM denkbar. In erster Linie ist dabei an eine zyklische Dehnung des Gewebes oder die elektrische Stimulation der Kardiomyozyten zu denken. Das hochstandardisierte Herstellungsverfahren würde eine einfache und kostengünstige Produktion des CATFM in großer Stückzahl ermöglichen. Die Verwendung einer Trägersubstanz natürlichen Ursprungs ginge allerdings weiterhin mit der Organspende durch eine bestimmte Tierspezies einher. Durch die Möglichkeit jedoch, potentiell für mehrere Versuche genutzt werden zu können, könnte auch das CATFM zur Reduktion der Versuchstierzahlen unter anderem für pharmakologische Studien beitragen.

### 4.3.3 Myokardiales Ersatzgewebe

Als *tissue engineered*, vaskularisiertes Herzmuskelgewebe könnten die *tissue-flaps* des CATFM künftig auch in Form eines myokardialen *Patches* klinisch angewendet werden. Ein solcher Myokard-*Patch*, der morphologisch und funktionell einem nativen Herzmuskelgewebe gleicht, könnte zur Behandlung erkrankten Myokards eingesetzt werden. Die Entwicklung eines derartigen Gewebes als therapeutischer Ersatz für zum Beispiel infarktgeschädigtes Myokard stellt immer noch eines der großen Ziele des kardiovaskulären *Tissue Engineerings* dar [159]. Anstelle der bisher üblichen synthetischen *Patches* könnte ein solch bioartifizieller Myokard-*Patch* nicht nur als passiver Herzmuskelerersatz dienen [160, 161]. Idealerweise biomechanisch voll funktionell integriert, könnte ein derartiger Myokardersatz am kardialen Kontraktionszyklus teilnehmen. Damit wäre es theoretisch möglich, den Funktionsausfall begrenzter Myokardareale vollständig zu kompensieren. Die größten Herausforderungen bestehen dabei in der Herstellung eines solchen Ersatzgewebes, das neben einer funktionellen Vaskularisierung auch über das notwendige Potential verfügt, Zellvitalität und – differenzierung zu fördern, die Fortleitung elektrischer Erregung zu gewährleisten, mechanische Unterstützung zu garantieren und zudem eine suffiziente Kontraktionskraft aufzubringen [30, 159]. Wendel et al. gelang es, myokardiale *Patches* aus einem Kardiomyozyten-Fibrin-Gemisch herzustellen und damit die Funktion infarktgeschädigter Rattenherzen deutlich zu verbessern [162]. Allerdings bildete sich weder eine morphologische Verbindung noch eine elektrische Kopplung zwischen den *Patches* und dem Empfängermyokard aus. Die Autoren vermuteten daher in erster Linie parakrine Effekte hinter dem positiven Einfluss der *tissue engineered* Myokard-*Patches*.

Auch die rebesiedelten *tissue-flaps* könnten als prävaskularisierte, myokardiale *Patches* kardialer Herkunft in ähnlicher Form eingesetzt werden. Das ausgeprägte Potential des CATFM zur selektiven Rebesiedlung mit endothelialen und kardialen Zellen konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bereits aufgezeigt werden. Damit gelang es schon jetzt, mindestens zweien der oben genannten Herausforderungen erfolgreich zu begegnen.

In Kapitel 4.1.1 wurde bereits von der Möglichkeit berichtet, das Langzeitperfusionssystem ohne größeren Aufwand auch für die Dezellularisierung größerer

Organe umrüsten zu können. Damit wäre es möglich, künftig auch funktionelle *tissue-flaps* aus Organen humankompatibler Größe herzustellen, die damit auch für den klinischen Einsatz geeignet wären. Darüber hinaus wäre es denkbar, vaskularisierte und potentiell kontraktile *tissue-flaps* auch zur Behandlung von Kardiomyopathien, kongenitalen Fehlbildungen des Herzens und vielen weiteren Erkrankungen heranzuziehen, die zu einer eingeschränkten Pumpfunktion des Herzens führen. Insbesondere Kinder könnten von einem bioartifiziellen Herzmuskelgewebe zur Rekonstruktion angeborener Herzfehler erheblich profitieren. Ein mitwachsendes Myokard würde hierbei die derzeit noch unvermeidbaren Reoperationen überflüssig machen [163].

#### **4.3.4 Vollständig bioartifizielles Herz**

Im Jahre 2008 berichtete die Arbeitsgruppe um Doris Tylor erstmalig von der Dezellularisierung und anschließenden Rebesiedlung eines ganzen Rattenherzens [38]. Mit dieser bahnbrechenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, dem avitalen Organgerüst eines zellfreien Rattenherzens durch die Besiedlung mit kardialen und endothelialen Zellen wieder die Fähigkeit zur Kontraktion zu verleihen. Auch wenn das rebesiedelte Rattenherz nur über eine sehr gering ausgeprägte Kontraktionskraft verfügte, kann diese Arbeit als Meilenstein in der Entwicklung eines bioartifiziellen Herzens angesehen werden. Auch das CATFM wurde aus einer dezellularisierten Myokardmatrix erstellt. Als kardiales *in vitro* Modellsystem ermöglicht es die Entwicklung, Evaluation und Optimierung nicht nur von Vaskularisierungsstrategien, sondern auch von verschiedenartigen Ansätzen zur Rebesiedlung anderer EZM-Kompartimente. Die in diesem Zusammenhang gewonnenen Erkenntnisse könnten dabei helfen, nicht nur myokardiale Gewebekonstrukte, sondern eines Tages auch ein komplettes bioartifizielles Herz auf der Basis einer kardialen EZM zu erzeugen. Gleichwohl erscheint es aufgrund der höchst komplexen Anatomie des Herzens trotz aller Forschungserfolge durchaus fraglich, ob es jemals möglich sein wird, ein komplettes, voll funktionsfähiges, bioartifizielles Herz herzustellen.

Die volle Funktionalität erfordert das enge Zusammenspiel verschiedener Zellarten und Funktionseinheiten des Herzens. Die Entwicklung eines effizient arbeitenden Herzmuskels setzt eine organisierte räumliche Ausrichtung und elektrische Kopplung auf zellulärer Ebene sowie nicht zuletzt auch eine ausgeprägte

Vaskularisierung des Gewebes voraus. Außerdem muss auch ein bioartifizielles Herz in der Lage sein, auf jegliche Art neurohumoraler und mechanischer Stimuli adäquat reagieren zu können, um letztlich den Bedürfnissen eines lebenden Organismus gerecht zu werden.

Trotz dieser hohen Anforderungen lassen die aktuell rasanten und vielversprechenden Entwicklungen auf dem Gebiet des kardiovaskulären *Tissue Engineerings* weiterhin hoffen. Sollte es eines Tages tatsächlich gelingen, ein bioartifizielles Herz in humankompatibler Größe herzustellen, wäre dies ein epochaler Fortschritt auf dem Gebiet der regenerativen Medizin.

## Literaturverzeichnis

1. Mendis, S., Armstrong, T. et al., *Global status report on noncommunicable diseases 2014*. 2014: World Health Organization.
2. Mendis, S., *Global atlas in cardiovascular disease prevention and control*. 2011: World Health Organization.
3. Løgstrup, S. and O'Kelly, S., *European Cardiovascular Disease Statistics*. 2012: European Heart Network and European Society of Cardiology.
4. Nichols, M., Townsend, N. et al., *Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update*. Eur Heart J, 2014. 35(42): p. 2950-9.
5. Gaber, E. and Wildner, M., *Sterblichkeit, Todesursachen und regionale Unterschiede*. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2011(Heft 52).
6. Weil, J. and Schunkert, H., *Pathophysiology of chronic heart failure*. Clinical Research in Cardiology, 2006. 95 Suppl 4: p. 1-15.
7. Hunt, S.A., *ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure)*. J Am Coll Cardiol, 2005. 46(6): p. e1-82.
8. Neumann, T., Biermann, J. et al., *Heart failure: the commonest reason for hospital admission in Germany: medical and economic perspectives*. Deutsches Ärzteblatt, 2009. 106(16): p. 269-75.
9. Dickstein, K., Cohen-Solal, A. et al., *ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM)*. Eur Heart J, 2008. 29(19): p. 2388-442.
10. Lloyd-Jones, D.M., *Lifetime Risk for Developing Congestive Heart Failure: The Framingham Heart Study*. Circulation, 2002. 106(24): p. 3068-3072.
11. Levy, D., Kenchaiah, S. et al., *Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure*. N Engl J Med, 2002. 347(18): p. 1397-402.
12. Roger, V.L., Weston, S.A. et al., *TRends in heart failure incidence and survival in a community-based population*. JAMA, 2004. 292(3): p. 344-350.
13. Ammar, K.A., Jacobsen, S.J. et al., *Prevalence and prognostic significance of heart failure stages: application of the American College of*

- Cardiology/American Heart Association heart failure staging criteria in the community*. *Circulation*, 2007. 115(12): p. 1563-70.
14. Writing Committee, M., Yancy, C.W. et al., *2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines*. *Circulation*, 2013. 128(16): p. e240-327.
  15. Bergmann, O., Bhardwaj, R.D. et al., *Evidence for cardiomyocyte renewal in humans*. *Science*, 2009. 324(5923): p. 98-102.
  16. Kajstura, J., Urbanek, K. et al., *Cardiomyogenesis in the adult human heart*. *Circ Res*, 2010. 107(2): p. 305-15.
  17. Vunjak-Novakovic, G., Lui, K.O. et al., *Bioengineering heart muscle: a paradigm for regenerative medicine*. *Annu Rev Biomed Eng*, 2011. 13: p. 245-67.
  18. McMurray, J.J., Adamopoulos, S. et al., *ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. *Eur J Heart Fail*, 2012. 14(8): p. 803-69.
  19. Foundation, E.I., *Annual Report 2014*. 2014.
  20. Eschenhagen, T. and Zimmermann, W.H., *Engineering myocardial tissue*. *Circ Res*, 2005. 97(12): p. 1220-31.
  21. Langer, R. and Vacanti, J.P., *Tissue engineering*. *Science*, 1993. 260(5110): p. 920-6.
  22. Smit, F.E. and Dohmen, P.M., *Cardiovascular tissue engineering: where we come from and where are we now?* *Med Sci Monit Basic Res*, 2015. 20: p. 1-3.
  23. O'Brien, F.J., *Biomaterials and scaffolds for tissue engineering*. *Materials Today*, 2011. 14(3): p. 88-95.
  24. Polak, J.M. and Bishop, A.E., *Stem cells and tissue engineering: past, present, and future*. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. 1068: p. 352-66.
  25. Macchiarini, P., Jungebluth, P. et al., *Clinical transplantation of a tissue-engineered airway*. *Lancet*, 2008. 372(9655): p. 2023-30.
  26. Vogel, G. *Karolinska Institute has 'lost confidence' in Paolo Macchiarini, says it won't renew his contract*. 2016. DOI: 10.1126/science.aae0315, <http://www.sciencemag.org/news/2016/02/karolinska-institute-has-lost-confidence-paolo-macchiarini-says-it-wont-renew-his>, Zugriffsdatum 04.09.2016.

27. Cebotari, S., Lichtenberg, A. et al., *Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells*. *Circulation*, 2006. 114(1 Suppl): p. I132-7.
28. Shin'oka, T., Imai, Y., and Ikada, Y., *Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery*. *N Engl J Med*, 2001. 344(7): p. 532-3.
29. Atala, A., Bauer, S.B. et al., *Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty*. *Lancet*, 2006. 367(9518): p. 1241-6.
30. Vunjak-Novakovic, G., Tandon, N. et al., *Challenges in cardiac tissue engineering*. *Tissue Eng Part B Rev*, 2010. 16(2): p. 169-87.
31. Moscona, A.A., *Tissues from dissociated cells*. *Sci Am*, 1959. 200(5): p. 132-4 passim.
32. Shimizu, T., Yamato, M. et al., *Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces*. *Circ Res*, 2002. 90(3): p. e40.
33. Dawson, E., Mapili, G. et al., *Biomaterials for stem cell differentiation*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008. 60(2): p. 215-228.
34. Hughes, C.S., Postovit, L.M., and Lajoie, G.A., *Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture*. *PROTEOMICS*, 2010. 10(9): p. 1886-1890.
35. Vashist, A. and Ahmad, S., *Hydrogels in tissue engineering: scope and applications*. *Curr Pharm Biotechnol*, 2015. 16(7): p. 606-20.
36. Yildirim, Y., Naito, H. et al., *Development of a biological ventricular assist device: preliminary data from a small animal model*. *Circulation*, 2007. 116(11 Suppl): p. I16-23.
37. Zimmermann, W.H., Schneiderbanger, K. et al., *Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct*. *Circ Res*, 2002. 90(2): p. 223-30.
38. Ott, H.C., Matthiesen, T.S. et al., *Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart*. *Nat Med*, 2008. 14(2): p. 213-21.
39. Ungerleider, J.L., Johnson, T.D. et al., *Fabrication and characterization of injectable hydrogels derived from decellularized skeletal and cardiac muscle*. *Methods*, 2015.
40. Vukadinovic-Nikolic, Z., Andree, B. et al., *Generation of bioartificial heart tissue by combining a three-dimensional gel-based cardiac construct with decellularized small intestinal submucosa*. *Tissue Eng Part A*, 2014. 20(3-4): p. 799-809.

41. Wang, R.M. and Christman, K.L., *Decellularized myocardial matrix hydrogels: In basic research and preclinical studies*. Adv Drug Deliv Rev, 2015.
42. Tapias, L.F. and Ott, H.C., *Decellularized scaffolds as a platform for bioengineered organs*. Curr Opin Organ Transplant, 2014. 19(2): p. 145-52.
43. Badylak, S.F., Taylor, D., and Uygun, K., *Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds*. Annu Rev Biomed Eng, 2011. 13: p. 27-53.
44. Higuchi, S., Lin, Q. et al., *Heart extracellular matrix supports cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells*. J Biosci Bioeng, 2013. 115(3): p. 320-5.
45. Midwood, K.S., Williams, L.V., and Schwarzbauer, J.E., *Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. 36(6): p. 1031-7.
46. Galvez-Monton, C., Prat-Vidal, C. et al., *Update: Innovation in cardiology (IV). Cardiac tissue engineering and the bioartificial heart*. Rev Esp Cardiol (Engl Ed), 2013. 66(5): p. 391-9.
47. Radisic, M., Park, H. et al., *Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(52): p. 18129-34.
48. Aubin, H., Nichol, J.W. et al., *Directed 3D cell alignment and elongation in microengineered hydrogels*. Biomaterials, 2010. 31(27): p. 6941-6951.
49. Simpson, D.G., Terracio, L. et al., *Modulation of cardiac myocyte phenotype in vitro by the composition and orientation of the extracellular matrix*. J Cell Physiol, 1994. 161(1): p. 89-105.
50. Novosel, E.C., Kleinhan, C., and Kluger, P.J., *Vascularization is the key challenge in tissue engineering*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. 63(4-5): p. 300-11.
51. Jain, R.K., Au, P. et al., *Engineering vascularized tissue*. Nat Biotechnol, 2005. 23(7): p. 821-3.
52. Sun, X., Altalhi, W., and Nunes, S.S., *Vascularization strategies of engineered tissues and their application in cardiac regeneration*. Adv Drug Deliv Rev, 2015.
53. Lovett, M., Lee, K. et al., *Vascularization strategies for tissue engineering*. Tissue Eng Part B Rev, 2009. 15(3): p. 353-70.
54. Carmeliet, P. and Jain, R.K., *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature, 2000. 407(6801): p. 249-57.

55. Aird, W.C., *Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds*. Circ Res, 2007. 100(2): p. 174-90.
56. Yamada, T., Yang, J.J. et al., *Oxygen consumption of mammalian myocardial cells in culture: measurements in beating cells attached to the substrate of the culture dish*. Anal Biochem, 1985. 145(2): p. 302-7.
57. Hsieh, P.C., Davis, M.E. et al., *Endothelial-cardiomyocyte interactions in cardiac development and repair*. Annu Rev Physiol, 2006. 68: p. 51-66.
58. Turek, Z., Grandtner, M. et al., *Arterial blood gases, muscle fiber diameter and intercapillary distance in cardiac hypertrophy of rats with an old myocardial infarction*. Pflugers Arch, 1978. 376(3): p. 209-15.
59. Aird, W.C., *Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms*. Circ Res, 2007. 100(2): p. 158-73.
60. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nat Med, 2000. 6(4): p. 389-95.
61. Michiels, C., *Endothelial cell functions*. J Cell Physiol, 2003. 196(3): p. 430-43.
62. Muller, W., *Leukocyte-Endothelial Cell Interactions in the Inflammatory Response*. Laboratory Investigation, 2002. 82: p. 521-533.
63. Vandenbroucke, E., Mehta, D. et al., *Regulation of endothelial junctional permeability*. Ann N Y Acad Sci, 2008. 1123: p. 134-45.
64. Mertsching, H., Walles, T. et al., *Engineering of a vascularized scaffold for artificial tissue and organ generation*. Biomaterials, 2005. 26(33): p. 6610-7.
65. Song, J.J., Guyette, J.P. et al., *Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney*. Nat Med, 2013. 19(5): p. 646-51.
66. Yao, C., Markowicz, M. et al., *The effect of cross-linking of collagen matrices on their angiogenic capability*. Biomaterials, 2008. 29(1): p. 66-74.
67. Kluger, P.J., Wyrwa, R. et al., *Electrospun poly(D/L-lactide-co-L-lactide) hybrid matrix: a novel scaffold material for soft tissue engineering*. J Mater Sci Mater Med, 2010. 21(9): p. 2665-71.
68. Huang, G.Y., Zhou, L.H. et al., *Microfluidic hydrogels for tissue engineering*. Biofabrication, 2011. 3(1): p. 012001.
69. Choi, N.W., Cabodi, M. et al., *Microfluidic scaffolds for tissue engineering*. Nat Mater, 2007. 6(11): p. 908-15.
70. Bryant, S.J., Cuy, J.L. et al., *Photo-patterning of porous hydrogels for tissue engineering*. Biomaterials, 2007. 28(19): p. 2978-86.

71. Lee, W., Lee, V. et al., *On-demand three-dimensional freeform fabrication of multi-layered hydrogel scaffold with fluidic channels*. Biotechnol Bioeng, 2010. 105(6): p. 1178-86.
72. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. Nature, 1997. 386(6626): p. 671-4.
73. Risau, W. and Flamme, I., *Vasculogenesis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1995. 11: p. 73-91.
74. Laschke, M.W., Rucker, M. et al., *Improvement of vascularization of PLGA scaffolds by inosculation of in situ-preformed functional blood vessels with the host microvasculature*. Ann Surg, 2008. 248(6): p. 939-48.
75. Lokmic, Z., Stillaert, F. et al., *An arteriovenous loop in a protected space generates a permanent, highly vascular, tissue-engineered construct*. Faseb j, 2007. 21(2): p. 511-22.
76. Cassell, O.C., Morrison, W.A. et al., *The influence of extracellular matrix on the generation of vascularized, engineered, transplantable tissue*. Ann N Y Acad Sci, 2001. 944: p. 429-42.
77. Kneser, U., Polykandriotis, E. et al., *Engineering of vascularized transplantable bone tissues: induction of axial vascularization in an osteoconductive matrix using an arteriovenous loop*. Tissue Eng, 2006. 12(7): p. 1721-31.
78. Morritt, A.N., Bortolotto, S.K. et al., *Cardiac tissue engineering in an in vivo vascularized chamber*. Circulation, 2007. 115(3): p. 353-60.
79. Bach, A.D., Arkudas, A. et al., *A new approach to tissue engineering of vascularized skeletal muscle*. J Cell Mol Med, 2006. 10(3): p. 716-26.
80. Shimizu, T., Sekine, H. et al., *Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues*. Faseb j, 2006. 20(6): p. 708-10.
81. Rouwkema, J., Rivron, N.C., and van Blitterswijk, C.A., *Vascularization in tissue engineering*. Trends Biotechnol, 2008. 26(8): p. 434-41.
82. Hirschi, K.K., Skalak, T.C. et al., *Vascular assembly in natural and engineered tissues*. Ann N Y Acad Sci, 2002. 961: p. 223-42.
83. Richardson, T.P., Peters, M.C. et al., *Polymeric system for dual growth factor delivery*. Nat Biotechnol, 2001. 19(11): p. 1029-34.
84. Lee, M.K., Rich, M.H. et al., *A bio-inspired, microchanneled hydrogel with controlled spacing of cell adhesion ligands regulates 3D spatial organization of cells and tissue*. Biomaterials, 2015. 58: p. 26-34.

85. Pierschbacher, M.D. and Ruoslahti, E., *Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule*. Nature, 1984. 309(5963): p. 30-3.
86. Cooper, T.P. and Sefton, M.V., *Fibronectin coating of collagen modules increases in vivo HUVEC survival and vessel formation in SCID mice*. Acta Biomater, 2011. 7(3): p. 1072-83.
87. Vailhe, B., Vittet, D., and Feige, J.J., *In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis*. Lab Invest, 2001. 81(4): p. 439-52.
88. Kim, S. and von Recum, H., *Endothelial stem cells and precursors for tissue engineering: cell source, differentiation, selection and application*. Tissue Eng Part B Rev, 2008. 14(1): p. 133-47.
89. Borges, J., Muller, M.C. et al., *In vitro analysis of the interactions between preadipocytes and endothelial cells in a 3D fibrin matrix*. Minim Invasive Ther Allied Technol, 2007. 16(3): p. 141-8.
90. Hurley, J.R., Balaji, S., and Narmoneva, D.A., *Complex temporal regulation of capillary morphogenesis by fibroblasts*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. 299(2): p. C444-53.
91. Unger, R.E., Ghanaati, S. et al., *The rapid anastomosis between prevascularized networks on silk fibroin scaffolds generated in vitro with cocultures of human microvascular endothelial and osteoblast cells and the host vasculature*. Biomaterials, 2010. 31(27): p. 6959-67.
92. Montesano, R., Pepper, M.S., and Orci, L., *Paracrine induction of angiogenesis in vitro by Swiss 3T3 fibroblasts*. J Cell Sci, 1993. 105 ( Pt 4): p. 1013-24.
93. Akhyari, P., Aubin, H. et al., *The quest for an optimized protocol for whole-heart decellularization: a comparison of three popular and a novel decellularization technique and their diverse effects on crucial extracellular matrix qualities*. Tissue Eng Part C Methods, 2011. 17(9): p. 915-26.
94. Pavlov, A.N., Anisimov, A.A. et al., *Analysis of blood pressure dynamics in male and female rats using the continuous wavelet transform*. Physiol Meas, 2009. 30(7): p. 707-17.
95. Aubin, H., Kranz, A. et al., *Decellularized whole heart for bioartificial heart*. Methods Mol Biol, 2013. 1036: p. 163-78.
96. Movat, H.Z., *Demonstration of all connective tissue elements in a single section; pentachrome stains*. A.M.A. archives of pathology, 1955. 60(3): p. 289-95.
97. Naderi, H., Matin, M.M., and Bahrami, A.R., *Review paper: critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems*. J Biomater Appl, 2011. 26(4): p. 383-417.

98. Petersen, T.H., Calle, E.A. et al., *Tissue-engineered lungs for in vivo implantation*. Science, 2010. 329(5991): p. 538-41.
99. Shupe, T., Williams, M. et al., *Method for the decellularization of intact rat liver*. Organogenesis, 2010. 6(2): p. 134-6.
100. Ross, E.A., Williams, M.J. et al., *Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded into kidney scaffolds*. J Am Soc Nephrol, 2009. 20(11): p. 2338-47.
101. Crapo, P.M., Gilbert, T.W., and Badylak, S.F., *An overview of tissue and whole organ decellularization processes*. Biomaterials, 2011. 32(12): p. 3233-43.
102. Borschel, G.H., Dennis, R.G., and Kuzon, W.M., Jr., *Contractile skeletal muscle tissue-engineered on an acellular scaffold*. Plast Reconstr Surg, 2004. 113(2): p. 595-602; discussion 603-4.
103. Akhyari, P., Kamiya, H. et al., *In vivo functional performance and structural maturation of decellularised allogenic aortic valves in the subcoronary position*. Eur J Cardiothorac Surg, 2010. 38(5): p. 539-46.
104. Remlinger, N.T., Wearden, P.D., and Gilbert, T.W., *Procedure for decellularization of porcine heart by retrograde coronary perfusion*. J Vis Exp, 2012(70): p. e50059.
105. Wainwright, J.M., Czajka, C.A. et al., *Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart*. Tissue Eng Part C Methods, 2010. 16(3): p. 525-32.
106. Weymann, A., Patil, N.P. et al., *Bioartificial heart: a human-sized porcine model--the way ahead*. PLoS One, 2014. 9(11): p. e111591.
107. Schulte, J.B., Simionescu, A., and Simionescu, D.T., *The acellular myocardial flap: a novel extracellular matrix scaffold enriched with patent microvascular networks and biocompatible cell niches*. Tissue Eng Part C Methods, 2013. 19(7): p. 518-30.
108. Uygun, B.E., Soto-Gutierrez, A. et al., *Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix*. Nature medicine, 2010. 16(7): p. 814-820.
109. Ziegler, T., Bouzourene, K. et al., *Influence of oscillatory and unidirectional flow environments on the expression of endothelin and nitric oxide synthase in cultured endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. 18(5): p. 686-92.
110. Hattori, K., Munehira, Y. et al., *Microfluidic perfusion culture chip providing different strengths of shear stress for analysis of vascular endothelial function*. J Biosci Bioeng, 2014. 118(3): p. 327-32.

111. Ling, Y., Rubin, J. et al., *A cell-laden microfluidic hydrogel*. Lab Chip, 2007. 7(6): p. 756-62.
112. Ott, H.C., Clippinger, B. et al., *Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung*. Nat Med, 2010. 16(8): p. 927-33.
113. Uygun, B.E., Soto-Gutierrez, A. et al., *Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix*. Nat Med, 2010. 16(7): p. 814-20.
114. Goh, S.K., Bertera, S. et al., *Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering*. Biomaterials, 2013. 34(28): p. 6760-72.
115. Robertson, M.J., Dries-Devlin, J.L. et al., *Optimizing recellularization of whole decellularized heart extracellular matrix*. PLoS One, 2014. 9(2): p. e90406.
116. Todaro, G.J. and Green, H., *Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines*. The Journal of Cell Biology, 1963. 17(2): p. 299-313.
117. Leibiger, C., Kosyakova, N. et al., *First Molecular Cytogenetic High Resolution Characterization of the NIH 3T3 Cell Line by Murine Multicolor Banding*. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2013. 61(4): p. 306-312.
118. Gibling, J.P., Hewlett, L.J., and Hannah, M.J., *Basal secretion of von Willebrand factor from human endothelial cells*. Blood, 2008. 112(4): p. 957-64.
119. Imoukhuede, P.I. and Popel, A.S., *Expression of VEGF receptors on endothelial cells in mouse skeletal muscle*. PLoS One, 2012. 7(9): p. e44791.
120. Park, H.J., Zhang, Y. et al., *Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis*. Stem Cell Rev, 2006. 2(2): p. 93-102.
121. Sarig, U., Au-Yeung, G.C. et al., *Thick acellular heart extracellular matrix with inherent vasculature: a potential platform for myocardial tissue regeneration*. Tissue Eng Part A, 2012. 18(19-20): p. 2125-37.
122. Chung, B.G., Lee, K.H. et al., *Microfluidic fabrication of microengineered hydrogels and their application in tissue engineering*. Lab Chip, 2012. 12(1): p. 45-59.
123. Kusuma, S., Peijnenburg, E. et al., *Low oxygen tension enhances endothelial fate of human pluripotent stem cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. 34(4): p. 913-20.

124. Morawietz, H., Duerschmidt, N. et al., *Augmented endothelial uptake of oxidized low-density lipoprotein in response to endothelin-1*. Clin Sci (Lond), 2002. 103 Suppl 48: p. 9s-12s.
125. Scheller, K., Dally, I. et al., *Upcyte(R) microvascular endothelial cells repopulate decellularized scaffold*. Tissue Eng Part C Methods, 2013. 19(1): p. 57-67.
126. Matos, M.J., Post, J.A. et al., *Composition and organization of sarcolemmal fatty acids in cultured neonatal rat cardiomyocytes*. Cell Biol Int Rep, 1990. 14(4): p. 343-52.
127. Ross, P.D. and McCarl, R.L., *Oxidation of carbohydrates and palmitate by intact cultured neonatal rat heart cells*. Am J Physiol, 1984. 246(3 Pt 2): p. H389-97.
128. Hoffmann, P., Richards, D. et al., *Arachidonic acid disrupts calcium dynamics in neonatal rat cardiac myocytes*. Cardiovasc Res, 1995. 30(6): p. 889-98.
129. Galaris, D., Hoijer, B., and Rydstrom, J., *Improved methods for automatic monitoring of contracting heart cells in culture*. J Biochem Biophys Methods, 1980. 2(4): p. 213-25.
130. Estevez, M.D., Wolf, A., and Schramm, U., *Effect of PSC 833, verapamil and amiodarone on adriamycin toxicity in cultured rat cardiomyocytes*. Toxicol In Vitro, 2000. 14(1): p. 17-23.
131. Wenzel, D.G., Wheatley, J.W., and Byrd, G.D., *Effects of nicotine on cultured rat heart cells*. Toxicol Appl Pharmacol, 1970. 17(3): p. 774-85.
132. Zimmermann, W.H., Melnychenko, I. et al., *Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts*. Nat Med, 2006. 12(4): p. 452-8.
133. Hulsmann, J., Aubin, H. et al., *A novel customizable modular bioreactor system for whole-heart cultivation under controlled 3D biomechanical stimulation*. J Artif Organs, 2013. 16(3): p. 294-304.
134. Tulloch, N.L., Muskheli, V. et al., *Growth of engineered human myocardium with mechanical loading and vascular coculture*. Circ Res, 2011. 109(1): p. 47-59.
135. Balasubramanian, V., Grabowski, E. et al., *Platelets, circulating tissue factor, and fibrin colocalize in ex vivo thrombi: real-time fluorescence images of thrombus formation and propagation under defined flow conditions*. Blood, 2002. 100(8): p. 2787-92.
136. Alevriadou, B.R., Moake, J.L. et al., *Real-time analysis of shear-dependent thrombus formation and its blockade by inhibitors of von Willebrand factor binding to platelets*. Blood, 1993. 81(5): p. 1263-76.

137. Westein, E., de Witt, S. et al., *Monitoring in vitro thrombus formation with novel microfluidic devices*. Platelets, 2012. 23(7): p. 501-9.
138. Robinson, K.A., Li, J. et al., *Extracellular matrix scaffold for cardiac repair*. Circulation, 2005. 112(9 Suppl): p. I135-43.
139. Ensley, A.E., Nerem, R.M. et al., *Fluid shear stress alters the hemostatic properties of endothelial outgrowth cells*. Tissue Eng Part A, 2012. 18(1-2): p. 127-36.
140. Albelda, S.M. and Buck, C.A., *Integrins and other cell adhesion molecules*. Faseb j, 1990. 4(11): p. 2868-80.
141. Vestweber, D., *VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. 28(2): p. 223-32.
142. Vestweber, D., Winderlich, M. et al., *Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player*. Trends Cell Biol, 2009. 19(1): p. 8-15.
143. Khan, O.F. and Sefton, M.V., *Endothelial cell behaviour within a microfluidic mimic of the flow channels of a modular tissue engineered construct*. Biomed Microdevices, 2011. 13(1): p. 69-87.
144. Gibot, L., Galbraith, T. et al., *A preexisting microvascular network benefits in vivo revascularization of a microvascularized tissue-engineered skin substitute*. Tissue Eng Part A, 2010. 16(10): p. 3199-206.
145. Kang, T.Y., Hong, J.M. et al., *Enhanced endothelialization for developing artificial vascular networks with a natural vessel mimicking the luminal surface in scaffolds*. Acta Biomater, 2013. 9(1): p. 4716-25.
146. Grosberg, A., Alford, P.W. et al., *Ensembles of engineered cardiac tissues for physiological and pharmacological study: heart on a chip*. Lab Chip, 2011. 11(24): p. 4165-73.
147. Andree, B., Bela, K. et al., *Successful re-endothelialization of a perfusable biological vascularized matrix (BioVaM) for the generation of 3D artificial cardiac tissue*. Basic Res Cardiol, 2014. 109(6): p. 441.
148. Bär, A., Dorfman, S.E. et al., *The pro-angiogenic factor CCN1 enhances the re-endothelialization of biological vascularized matrices in vitro*. Cardiovasc Res, 2010. 85(4): p. 806-13.
149. Bork, P., *The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor*. FEBS Lett, 1993. 327(2): p. 125-30.
150. Chen, Y. and Du, X.Y., *Functional properties and intracellular signaling of CCN1/Cyr61*. J Cell Biochem, 2007. 100(6): p. 1337-45.

151. Gantenbein-Ritter, B., Sprecher, C.M. et al., *Confocal imaging protocols for live/dead staining in three-dimensional carriers*. Methods Mol Biol, 2011. 740: p. 127-40.
152. Andree, B., Bär, A. et al., *Small intestinal submucosa segments as matrix for tissue engineering: review*. Tissue Eng Part B Rev, 2013. 19(4): p. 279-91.
153. Mertsching, H., Schanz, J. et al., *Generation and transplantation of an autologous vascularized bioartificial human tissue*. Transplantation, 2009. 88(2): p. 203-10.
154. Huh, D., Torisawa, Y.S. et al., *Microengineered physiological biomimicry: organs-on-chips*. Lab Chip, 2012. 12(12): p. 2156-64.
155. Bhatia, S.N. and Ingber, D.E., *Microfluidic organs-on-chips*. Nat Biotech, 2014. 32(8): p. 760-772.
156. Nakao, Y., Kimura, H. et al., *Bile canaliculi formation by aligning rat primary hepatocytes in a microfluidic device*. Biomicrofluidics, 2011. 5(2): p. 22212.
157. Jang, K.J. and Suh, K.Y., *A multi-layer microfluidic device for efficient culture and analysis of renal tubular cells*. Lab Chip, 2010. 10(1): p. 36-42.
158. Huh, D., Leslie, D.C. et al., *A human disease model of drug toxicity-induced pulmonary edema in a lung-on-a-chip microdevice*. Sci Transl Med, 2012. 4(159): p. 159ra147.
159. Taylor, D.A., Sampaio, L.C., and Gobin, A., *Building new hearts: a review of trends in cardiac tissue engineering*. Am J Transplant, 2014. 14(11): p. 2448-59.
160. Athanasuleas, C.L., Buckberg, G.D. et al., *Surgical ventricular restoration in the treatment of congestive heart failure due to post-infarction ventricular dilation*. J Am Coll Cardiol, 2004. 44(7): p. 1439-45.
161. Dor, V., Sabatier, M. et al., *Endoventricular patch reconstruction of ischemic failing ventricle. a single center with 20 years experience. advantages of magnetic resonance imaging assessment*. Heart Fail Rev, 2004. 9(4): p. 269-86.
162. Wendel, J.S., Ye, L. et al., *Functional consequences of a tissue-engineered myocardial patch for cardiac repair in a rat infarct model*. Tissue Eng Part A, 2014. 20(7-8): p. 1325-35.
163. Avolio, E., Caputo, M. and Madeddu, P., *Stem cell therapy and tissue engineering for correction of congenital heart disease*. Front Cell Dev Biol, 2015. 3: p. 39.

## Anhang

Gefäßordnung	Anzahl perfundierter Koronargefäße							
	Herz 1		Herz 2		Herz 3		Herz 4	
	LV	RV	LV	RV	LV	RV	LV	RV
1	2	1	2	1	2	1	2	1
2	17	16	7	12	10	8	16	9
3	42	22	27	20	54	15	34	16
4	72	8	27	14	61	23	31	37

**Tabelle 3: Anzahl der mit Epoxidharz perfundierten Gefäße des links- und rechts-koronararteriellen Gefäßsystems.** LV, Linksventrikuläres Stromgebiet. RV, Rechtsventrikuläres Stromgebiet.

<b>Messung 1</b>							
Fluoreszenzintensität absolut (Rohdaten)							
Distanz	t0	t1 (10 min)	t2 (20 min)	t3 (30 min)	t4 (40 min)	t5 (50 min)	t6 (60 min)
550 µm	2.519	4.196	4.803	12.995	23.070	25.249	30.379
450 µm	2.306	4.058	5.105	11.226	21.646	24.420	29.708
350 µm	2.552	4.805	6.263	10.764	21.437	24.755	30.687
250 µm	2.900	6.383	8.409	11.555	23.143	26.957	33.534
150 µm	3.022	9.478	12.170	13.900	28.648	32.879	41.066
0 µm	2.772	23.129	27.063	19.393	39.405	44.416	52.568
-150 µm	2.502	11.225	16.687	18.810	24.547	30.320	36.523
-250 µm	2.064	5.916	9.721	12.028	16.065	20.095	24.503
-350 µm	1.947	4.500	7.375	9.596	13.020	16.339	20.082
-450 µm	1.897	3.773	5.904	7.989	10.730	13.430	16.627
-550 µm	1.910	3.397	4.714	6.559	8.610	10.748	13.004
Fluoreszenzintensität absolut (abzüglich Fluoreszenzwert t0)							
Distanz	t0	t1 (10 min)	t2 (20 min)	t3 (30 min)	t4 (40 min)	t5 (50 min)	t6 (60 min)
550 µm	0	1.677	2.284	10.476	20.551	22.730	27.860
450 µm	0	1.752	2.799	8.920	19.340	22.114	27.402
350 µm	0	2.253	3.711	8.212	18.885	22.203	28.135
250 µm	0	3.483	5.509	8.655	20.243	24.057	30.634
150 µm	0	6.456	9.148	10.878	25.626	29.857	38.044
0 µm	0	20.357	24.291	16.621	36.633	41.644	49.796
-150 µm	0	8.723	14.185	16.308	22.045	27.818	34.021
-250 µm	0	3.852	7.657	9.964	14.001	18.031	22.439
-350 µm	0	2.553	5.428	7.649	11.073	14.392	18.135
-450 µm	0	1.876	4.007	6.092	8.833	11.533	14.730
-550 µm	0	1.487	2.804	4.649	6.700	8.838	11.094
Fluoreszenzintensität relativ (bezogen auf Werte bei 0 µm)							
Distanz	t0	t1 (10 min)	t2 (20 min)	t3 (30 min)	t4 (40 min)	t5 (50 min)	t6 (60 min)
550 µm	-	0,08	0,09	0,63	0,56	0,55	0,56
450 µm	-	0,09	0,12	0,54	0,53	0,53	0,55
350 µm	-	0,11	0,15	0,49	0,52	0,53	0,57
250 µm	-	0,17	0,23	0,52	0,55	0,58	0,62
150 µm	-	0,32	0,38	0,65	0,70	0,72	0,76
0 µm	-	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
-150µm	-	0,43	0,58	0,98	0,60	0,67	0,68
-250µm	-	0,19	0,32	0,60	0,38	0,43	0,45
-350µm	-	0,13	0,22	0,46	0,30	0,35	0,36
-450µm	-	0,09	0,16	0,37	0,24	0,28	0,30
-550µm	-	0,07	0,12	0,28	0,18	0,21	0,22

**Tabelle 4: In Messung 1 (n=4) ermittelte absolute und relative Fluoreszenzintensitäten.** t0 entspricht Messzeitpunkt vor Beginn der Fluoreszenz-Perfusion. 0 µm entspricht dem Gefäßlumen.

Messung 2							
Fluoreszenzintensität absolut (Rohdaten)							
Distanz	t0	t1 (10 min)	t2 (20 min)	t3 (30 min)	t4 (40 min)	t5 (50 min)	t6 (60 min)
550 µm	0,640	20,546	50,620	65,586	86,618	113,144	123,413
450 µm	0,693	20,193	48,974	64,207	86,936	113,082	123,637
350 µm	0,691	19,240	45,418	59,839	82,916	106,950	117,302
250 µm	0,635	18,736	42,203	55,037	76,508	98,071	107,827
150 µm	0,636	17,829	39,460	50,797	70,034	90,089	99,082
0 µm	0,666	27,349	48,309	55,751	71,035	89,201	95,510
-150 µm	0,614	15,884	34,378	42,701	58,426	73,826	80,597
-250 µm	0,560	15,275	32,512	40,064	55,395	69,924	76,118
-350 µm	0,551	14,772	30,322	36,965	50,709	64,143	69,726
-450 µm	0,528	13,870	28,148	34,268	46,284	59,494	64,853
-550 µm	0,569	11,738	25,095	31,244	42,054	54,510	59,738
Fluoreszenzintensität absolut (abzüglich Fluoreszenzwert t0)							
Distanz	t0	t1 (10 min)	t2 (20 min)	t3 (30 min)	t4 (40 min)	t5 (50 min)	t6 (60 min)
550 µm	0	19,906	49,980	64,946	85,978	112,504	122,773
450 µm	0	19,500	48,281	63,514	86,243	112,389	122,944
350 µm	0	18,549	44,727	59,148	82,225	106,259	116,611
250 µm	0	18,101	41,568	54,402	75,873	97,436	107,192
150 µm	0	17,193	38,824	50,161	69,398	89,453	98,446
0 µm	0	26,683	47,643	55,085	70,369	88,535	94,844
-150 µm	0	15,270	33,764	42,087	57,812	73,212	79,983
-250 µm	0	14,715	31,952	39,504	54,835	69,364	75,558
-350 µm	0	14,221	29,771	36,414	50,158	63,592	69,175
-450 µm	0	13,342	27,620	33,740	45,756	58,966	64,325
-550 µm	0	11,169	24,526	30,675	41,485	53,941	59,169
Fluoreszenzintensität relativ (bezogen auf Werte bei 0 µm)							
Distanz	t0	t1 (10 min)	t2 (20 min)	t3 (30 min)	t4 (40 min)	t5 (50 min)	t6 (60 min)
550 µm	-	0,75	1,05	1,18	1,22	1,27	1,29
450 µm	-	0,73	1,01	1,15	1,23	1,27	1,30
350 µm	-	0,70	0,94	1,07	1,17	1,20	1,23
250 µm	-	0,68	0,87	0,99	1,08	1,10	1,13
150 µm	-	0,64	0,81	0,91	0,99	1,01	1,04
0 µm	-	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
-150 µm	-	0,57	0,71	0,76	0,82	0,83	0,84
-250 µm	-	0,55	0,67	0,72	0,78	0,78	0,80
-350 µm	-	0,53	0,62	0,66	0,71	0,72	0,73
-450 µm	-	0,50	0,58	0,61	0,65	0,67	0,68
-550 µm	-	0,42	0,51	0,56	0,59	0,61	0,62

**Tabelle 5: In Messung 2 (n=4) ermittelte absolute und relative Fluoreszenzintensitäten.** t0 entspricht Messzeitpunkt vor Beginn der Fluoreszenz-Perfusion. 0 µm entspricht dem Gefäßlumen.

Messung 3							
Fluoreszenzintensität absolut (Rohdaten)							
Distanz	t0	t1 (10 min)	t2 (20 min)	t3 (30 min)	t4 (40 min)	t5 (50 min)	t6 (60 min)
550 µm	0,509	0,609	70.889	47.471	67.900	78.993	77.451
450 µm	0,531	0,637	66.898	48.325	66.960	75.675	74.325
350 µm	0,546	0,690	64.352	48.395	64.789	70.857	63.624
250 µm	0,547	0,775	61.753	47.097	61.548	65.572	59.142
150 µm	0,730	1.164	66.917	47.460	62.738	67.435	63.710
0 µm	1.081	7.619	72.478	56.345	70.338	76.026	73.883
-150 µm	0,551	1.101	43.634	38.677	54.956	58.424	55.840
-250 µm	0,424	0,669	38.458	38.016	53.668	56.947	52.588
-350 µm	0,404	0,566	42.284	42.703	57.562	60.971	54.623
-450 µm	0,356	0,509	45.562	46.031	60.213	63.918	56.443
-550 µm	0,361	0,47	45.778	46.160	59.967	64.301	56.590
Fluoreszenzintensität absolut (abzüglich Fluoreszenzwert t0)							
Distanz	t0	t1 (10 min)	t2 (20 min)	t3 (30 min)	t4 (40 min)	t5 (50 min)	t6 (60 min)
550 µm	0	0,1	70,38	46,962	67,391	78,484	76,942
450 µm	0	0,106	66,367	47,794	66,429	75,144	73,794
350 µm	0	0,144	63,806	47,849	64,243	70,311	63,078
250 µm	0	0,228	61,206	46,55	61,001	65,025	58,595
150 µm	0	0,434	66,187	46,730	62,008	66,705	62,980
0 µm	0	6,538	71,397	55,264	69,257	74,945	72,802
-150 µm	0	0,55	43,083	38,126	54,405	57,873	55,289
-250 µm	0	0,245	38,034	37,592	53,244	56,523	52,164
-350 µm	0	0,162	41,88	42,299	57,158	60,567	54,219
-450 µm	0	0,153	45,206	45,675	59,857	63,562	56,087
-550 µm	0	0,109	45,417	45,799	59,606	63,94	56,229
Fluoreszenzintensität relativ (bezogen auf Werte bei 0 µm)							
Distanz	t0	t1 (10 min)	t2 (20 min)	t3 (30 min)	t4 (40 min)	t5 (50 min)	t6 (60 min)
550 µm	-	0,02	0,99	0,85	0,97	1,05	1,06
450 µm	-	0,02	0,93	0,86	0,96	1,00	1,01
350 µm	-	0,02	0,89	0,87	0,93	0,94	0,87
250 µm	-	0,03	0,86	0,84	0,88	0,87	0,80
150 µm	-	0,07	0,93	0,85	0,90	0,89	0,87
0 µm	-	1	1	1	1	1	1
-150 µm	-	0,08	0,60	0,69	0,79	0,77	0,76
-250 µm	-	0,04	0,53	0,68	0,77	0,75	0,72
-350 µm	-	0,02	0,59	0,77	0,83	0,81	0,74
-450 µm	-	0,02	0,63	0,83	0,86	0,85	0,77
-550 µm	-	0,02	0,64	0,83	0,86	0,85	0,77

**Tabelle 6: In Messung 3 (n=4) ermittelte absolute und relative Fluoreszenzintensitäten.** t0 entspricht Messzeitpunkt vor Beginn der Fluoreszenz-Perfusion. 0 µm entspricht dem Gefäßlumen.

Anhang

Messung 4							
Fluoreszenzintensität absolut (Rohdaten)							
Distanz	t0	t1 (10 min)	t2 (20 min)	t3 (30 min)	t4 (40 min)	t5 (50 min)	t6 (60 min)
550 µm	0.965	3.280	3.830	6.390	9.220	12.468	15.798
450 µm	1.052	3.891	4.340	7.094	10.112	13.389	17.038
350 µm	1.342	4.863	5.268	8.301	11.547	15.106	19.109
250 µm	1.470	5.506	6.086	9.107	12.218	16.286	20.449
150 µm	1.681	7.597	7.973	10.964	14.691	19.387	24.152
0 µm	1.940	11.349	10.769	13.988	17.130	21.691	26.915
-150 µm	2.267	9.080	9.312	13.494	18.141	24.363	31.683
-250 µm	2.220	7.015	7.704	11.833	17.148	23.597	31.164
-350 µm	2.343	6.344	7.318	11.730	17.627	25.178	33.582
-450 µm	2.296	5.342	6.454	11.278	17.687	26.067	35.343
-550 µm	2.494	5.291	6.582	11.689	19.368	29.111	39.601
Fluoreszenzintensität absolut (abzüglich Fluoreszenzwert t0)							
Distanz	t0	t1 (10 min)	t2 (20 min)	t3 (30 min)	t4 (40 min)	t5 (50 min)	t6 (60 min)
550 µm	0	2,315	2,865	5,425	8,255	11,503	14,833
450 µm	0	2,839	3,288	6,042	9,060	12,337	15,986
350 µm	0	3,521	3,926	6,959	10,205	13,764	17,767
250 µm	0	4,036	4,616	7,637	10,748	14,816	18,979
150 µm	0	5,916	6,292	9,283	13,010	17,706	22,471
0 µm	0	9,409	8,829	12,048	15,190	19,751	24,975
-150 µm	0	6,813	7,045	11,227	15,874	22,096	29,416
-250 µm	0	4,795	5,484	9,613	14,928	21,377	28,944
-350 µm	0	4,001	4,975	9,387	15,284	22,835	31,239
-450 µm	0	3,046	4,158	8,982	15,391	23,771	33,047
-550 µm	0	2,797	4,088	9,195	16,874	26,617	37,107
Fluoreszenzintensität relativ (bezogen auf Werte bei 0 µm)							
Distanz	t0	t1 (10 min)	t2 (20 min)	t3 (30 min)	t4 (40 min)	t5 (50 min)	t6 (60 min)
550 µm	-	0,25	0,32	0,45	0,54	0,58	0,59
450 µm	-	0,30	0,37	0,50	0,60	0,62	0,64
350 µm	-	0,37	0,44	0,58	0,67	0,70	0,71
250 µm	-	0,43	0,52	0,63	0,71	0,75	0,76
150 µm	-	0,63	0,71	0,77	0,86	0,90	0,90
0 µm	-	1	1	1	1	1	1
-150 µm	-	0,72	0,80	0,93	1,05	1,12	1,18
-250 µm	-	0,51	0,62	0,80	0,98	1,08	1,16
-350 µm	-	0,43	0,56	0,78	1,01	1,16	1,25
-450 µm	-	0,32	0,47	0,75	1,01	1,20	1,32
-550 µm	-	0,30	0,46	0,76	1,11	1,35	1,49

**Tabelle 7: In Messung 4 (n=4) ermittelte absolute und relative Fluoreszenzintensitäten.** t0 entspricht Messzeitpunkt vor Beginn der Fluoreszenz-Perfusion. 0 µm entspricht dem Gefäßlumen.

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich aufrichtig bei Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg bedanken, der mir dieses Dissertationsthema überlassen hat und mich als Doktorvater nicht nur während meiner aktiven Zeit als Doktorand, sondern auch weit darüberhinaus betreut und großzügig unterstützt hat.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich zudem meinem wissenschaftlichen Betreuer Dr. med. Hug Aubin. Seine engagierte und kompetente Hilfestellung durch eine strukturierte und zielführende Anleitung bei der Umsetzung eines klaren Forschungskonzeptes sowie durch richtungsweisende Ratschläge und intensive praktische Unterstützung bei der Arbeit im Labor haben das Gelingen der Arbeit in dieser Form erst möglich gemacht. Dafür und für seine freundschaftliche Unterstützung, die weit über den Rahmen dieser Doktorarbeit hinaus ging, möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Ebenso danke ich Prof. Dr. med. Payam Akhyari für die Aufnahme in seine Forschungsgruppe für experimentelle Chirurgie, für die zahlreichen motivierenden und zielführenden Diskussionen, Ratschläge und Anmerkungen sowie für die anhaltende Hilfestellung und großzügige Unterstützung sowohl inner- als auch außerhalb des Labors.

Des Weiteren gebührt mein herzlicher Dank dem gesamten Team des Institutes für experimentelle Chirurgie für die stets große Hilfsbereitschaft sowie für eine immer sehr angenehme und motivierende Arbeitsatmosphäre. Herrn Dipl.-Ing. Jörn Hülsmann danke ich für die Einarbeitung und fortwährende Hilfestellung insbesondere im Bereich der Organdezellularisierung, der Zellkulturstudien und der histologischen Analysen. Bei Dr. rer. nat. Mareike Barth möchte ich mich ganz besonders für ihre Hilfe bei wissenschaftlichen und methodischen Fragestellungen aller Art sowie für die Bereitstellung der 3T3-Zellen aus dem Institut für Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bedanken. Außerdem seien M. sc. Andrey Fomin und Dr. rer. nat. Antonio Pinto namentlich erwähnt, die durch ihre fachliche Unterstützung beide ebenfalls einen wichtigen Beitrag zum Zustandekommen dieser Arbeit geleistet haben. Der medizinisch technischen Assistentin Gisela Müller danke ich dafür, dass sie stets mit großer Umsicht für die permanente Verfügbarkeit und Funktionalität aller erforderlichen Arbeitsmaterialien

gesorgt und damit eine wichtige Grundlage für ein produktives Arbeiten im Labor geschaffen hat.

Mein spezieller Dank gilt auch meinen Mitdoktoranden. Sie haben durch ihre große und freundschaftliche Hilfsbereitschaft stets für ein angenehmes und konstruktives Zusammenarbeiten gesorgt, aus dem viele enge Freundschaften hervorgegangen sind. Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meiner Mitdoktorandin und Freundin Judith Bolzenius, die durch ihre wertvollen Ratschläge, ihr großes Verständnis, ihre unermüdliche Geduld und ihren liebevollen Rückhalt einen unschätzbar wichtigen Beitrag zum Zustandekommen dieser Arbeit geleistet hat.

Zu guter Letzt bedanke ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern. Sie haben mir durch ihre liebevolle, großzügige und bedingungslose Unterstützung nicht nur das Medizinstudium, sondern auch die Anfertigung dieser Dissertation überhaupt erst ermöglicht. In großer Dankbarkeit widme ich ihnen diese Arbeit.