

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

# Vaskuläre und interstitielle simultane konsekutive kombinierte in-vitro Co-Re- Besiedlung und Re-Kultivierung von zuvor dezellularisierten Ratten-Herzen

Dissertation

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

vorgelegt von

**Alexander Wehrmann**

**2023**

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

**Dekan:** Herr Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

**Erstgutachter:** Herr Prof. Dr. med. Hug Aubin

**Zweitgutachter:** Herr Prof. Dr. med. Stephan Sixt

***Meinen Eltern Ottilie und Wolfgang***

## Publikationsliste

(Stand März 2023)

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

HÜLSMANN, J., AUBIN, H., WEHRMANN, A., JENKE, A., LICHTENBERG, A. & AKHYARI, P. 2016. Whole-Heart Construct Cultivation Under 3D Mechanical Stimulation of the Left Ventricle. *Methods Mol Biol*, 1502, 181-94.

HÜLSMANN, J., AUBIN, H., WEHRMANN, A., LICHTENBERG, A. & AKHYARI, P. 2017. The impact of left ventricular stretching in model cultivations with neonatal cardiomyocytes in a whole-heart bioreactor. *Biotechnol Bioeng*, 114, 1107-1117.

## Zusammenfassung

Die Regenerative Medizin stellt einen der größten Hoffnungsträger dar, in Zukunft wesentliche Erkrankungen der Menschheit verbessern und heilen zu können. Besonders im Fachgebiet der Kardiovaskulären Chirurgie betrifft dies Herzerkrankungen wie die Herzinsuffizienz, deren Inzidenz weltweit immer weiter steigt. Das Tissue Engineering ist ein weiterhin aufstrebendes Gebiet, welches das Hauptziel verfolgt, Teile von menschlichen Organen und komplette menschliche Organe ersetzen zu können durch bioartifiziell hergestellte Organe. Dabei spielen drei wesentliche Bereiche eine wesentliche Rolle: Die Träger-Matrix, die Re-Besiedlung mit Zellen, und wachstumsbegünstigende Faktoren im Rahmen der Re-Kultivierung.

Das Ziel dieser Arbeit war, diese Bereiche weiter zu untersuchen, vor allem die Re-Besiedlung und Re-Kultivierung von zuvor dezellularisierten Ratten-Herzen. Hierbei wurden unterschiedliche Methoden der Re-Besiedlung verwendet, vaskulär, interstitiell und kombiniert. Bei der Re-Kultivierung wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet, statisch und perfundiert. Dabei sollte die eine neue Methode der Re-Besiedlung etabliert und werden, welche Re-Kultivierungsart erfolgreicher ist, statisch oder perfundiert.

Dazu wurden in den Hauptversuchen 12 ganze Ratten-Herzen mittels eines etablierten standardisierten Protokolls mittels aortaler automatisierter Langzeit-Perfusion dezellularisiert und anschließend re-besiedelt auf zwei unterschiedliche Arten mit zwei unterschiedlichen Zellarten einzeln und kombiniert: vaskulär mit Endothelzellen (Human umbilical vein cells), interstitiell mit neonatalen Kardiomyozyten und kombiniert. In einem weiteren Schritt wurden diese re-besiedelten Herzen auf zwei unterschiedliche Arten re-kultiviert, statisch mittels Mediumwechsel nach 2 Tagen und perfundiert mittels Mediumwechsel und retrograder aortaler Perfusion nach 2 Tagen. Nach 4 Tagen Kultivierung wurden die Herzen qualitativ und quantitativ histologisch, immunhistologisch und mit der Methode des Live-Dead-Assays im Hinblick auf Besiedlungserfolg, Zellzahl, Zelldichte und Zellvitalität analysiert.

Insgesamt konnte dabei festgestellt werden, dass die neue Methode der Co-Re-Besiedlung mit zwei unterschiedlichen Zellarten, die für die Herzbesiedlung essenziell sind, und deren Re-Kultivierung erfolgreich war. Zudem konnte gezeigt werden, dass die perfundierte Re-Kultivierungsmethode der statischen deutlich überlegen ist hinsichtlich Zellzahl, Zelldichte und Zellvitalität. Dies zeigt, dass die angewandten Co-Re-Besiedlungs- und die perfundierte Re-Kultivierungs-Methode ein gut geeignetes Modell und eine Basis für weitere Versuche darstellt.

In der Zukunft bleibt weiterhin ein großer Bedarf an Forschung in den Bereichen Trägermatrix und Zell-Re-Besiedlung, aber vor allem in den Bereichen Zellkultivierung und Zellwachstum. Auch wenn die Forschung rasante Fortschritte zu verzeichnen hat, wird es im Bereich des kardialen Tissue Engineering aufgrund der komplexen dynamischen Biomechanik noch einige Zeit dauern, bis das Ziel eines vollständigen und vor allem funktionsfähigem kardialen Organersatz erreicht werden kann. Allerdings scheint dies eher nur eine Frage der Zeit zu sein.

## Summary

The regenerative medicine is one of most promising fields, giving hope to be able to improve or even heal major diseases of humankind. Especially in the field of cardiology and cardiovascular surgery this concerns heart diseases like heart failure which incidence is continuously increasing worldwide. Tissue engineering is a rising field, which aims to replace parts or even whole organs by using bioartificially built organs. Hereby there are three major aspects playing an important role: the matrix, re-cellularization and factors favoring cell growth.

The aim of this work was to further examine those aspects, with special focus on re-cellularization and re-cultivation of previously decellularized rat hearts. In this there were used two different methods of re-cellularization, vascular, interstitial and vascular interstitial simultaneous consecutive combined co-re-cellularization. In terms of re-cultivation there were used two different methods, static and perfused. In this work this new method of re-cellularization should be established and it should be shown which method of re-cultivation is better suited for further trials.

For this purpose, in the main experiments, 12 rat hearts were decellularized via aortal perfusion following an established standard protocol und after that re-cellularized using two different methods with two different cell types: vascular re-cellularization with endothelial cells (Human umbilical vein cells), interstitial neonatal cardiomyocytes and vascular interstitial simultaneously consecutively combined. In further step these re-cellularized hearts were re-cultivated by using two different methods, static via change of medium after two days, and perfused via change of medium in combination with retrograde aortal perfusion after two days. After 4 days of re-culturing, the hearts were examined qualitatively and quantitatively histologically, immune-histologically and with the method of live-dead-assay in terms of success of re-cellularization, cell count, cell density and cell vitality. After all it could be recognized that the new method of co-re-cellularization with two different cell which are essential for heart re-cellularization was successful. In addition, it could be shown that the method of perfused re-cultivation was superior to static re-cultivation in terms of cell count, cell density and cell vitality. This shows that the new applied method of re-cellularization and perfused re-cultivation proved to be a suited concept and a base for further trials.

However, in the future, there will be a big need for science in the fields of carrier matrix and re-cellularization and especially of re-culturing and cell growth. Even if science in tissue engineering is rapidly proceeding, it will take more time in the field of cardiac tissue engineering, because of the complex biomechanics, in order to reach the aim of a complete and especially functional cardiac whole organ replacement. Nevertheless, it seems to be rather a matter of time.

## Abkürzungsverzeichnis

|                   |                                                |             |                                          |
|-------------------|------------------------------------------------|-------------|------------------------------------------|
| <b>3T3</b>        | 3T3-Zellen (Fibroblasten)                      | <b>IF</b>   | Immunfluoreszenz                         |
| <b>Abb.</b>       | Abbildung                                      | <b>iPSC</b> | Induzierte pluripotente Stammzellen      |
| <b>AHA</b>        | American Heart Association                     | <b>KHK</b>  | Koronare Herzkrankheit                   |
| <b>AmphB</b>      | Amphotericin B                                 | <b>LVAD</b> | Left-ventricle-Assistent Device          |
| <b>Aqua dest.</b> | Destilliertes Wasser                           | <b>LVEF</b> | Linksventrikuläre Ejektionsfraktion      |
| <b>CMCs</b>       | Kardiomyozyten                                 | <b>NaN3</b> | Natrium Niacid                           |
| <b>DCA</b>        | Desoxycholsäure                                | <b>NYHA</b> | New York Heart Association               |
| <b>dECM</b>       | Dezellularisierte Extrazelluläre Matrix        | <b>PBS</b>  | Phosphat-buffered-saline                 |
| <b>DMEM</b>       | Dulbecco's Modified Eagles Medium              | <b>PCR</b>  | Polymerase-Chain-Reaction                |
| <b>DNA</b>        | Desoxyribo-nucleinsäure                        | <b>PS</b>   | Penicillin-Streptomycin                  |
| <b>ECGM</b>       | Endothelial Cell Growth Medium                 | <b>RNA</b>  | Ribo-nucleinsäure                        |
| <b>ECM</b>        | Extrazelluläre Matrix                          | <b>SDS</b>  | Sodium-Dodecyl-Sulfat                    |
| <b>FCS</b>        | Fetal calf serum                               | <b>Tab.</b> | Tabelle                                  |
| <b>HE</b>         | Hämatoxylin-Eosin                              | <b>TX</b>   | Triton-X-100                             |
| <b>HFmEF</b>      | Heart middle with reduced Ejection Fraction    | <b>VEGF</b> | Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor |
| <b>HFpEF</b>      | Heart failure with preserved Ejection Fraction | <b>vWF</b>  | Von-Willebrand-Faktor                    |
| <b>HFrfEF</b>     | Heart failure with reduced Ejection Fraction   | <b>WHO</b>  | World Health Organization                |
| <b>HUVECs</b>     | Human endothelial vein cells                   |             |                                          |

## Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                                                                                                                                                           |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Abb. 1: speziell modulierte Perfusionsflasche mit Spezialdeckel und Ventil und Filter .....</b>                                                                                                                                        | <b>28</b> |
| <b>Abb. 2: vollautomatisierte, standardisierte, druck-kontrollierte Dezellularisierungs-Anlage in Original-Aufbau.....</b>                                                                                                                | <b>28</b> |
| <b>Abb. 3: Messgeräte für Druckerfassung und Steuerung .....</b>                                                                                                                                                                          | <b>28</b> |
| <b>Abb. 4: Screenshot des Laptops (Acer) zur Steuerung der Perfusion-Dezellularisierungs-Anlage mit Software .....</b>                                                                                                                    | <b>29</b> |
| <b>Abb. 5: Darstellung einer 2L großen Glasflasche von Schott zur Wiederauffüllung der Dezellularisierungs-Lösung.....</b>                                                                                                                | <b>29</b> |
| <b>Abb. 6: Ratten-Herz innerhalb der Perfusionsflasche während der Langzeit-Perfusions-Dezellularisierung .....</b>                                                                                                                       | <b>29</b> |
| <b>Abb. 7: Exemplarische Darstellung einer standardisierten modulierten Perfusionsflasche</b>                                                                                                                                             | <b>29</b> |
| <b>Abb. 8: Schemazeichnung der Dezellularisierungs-Anlage mit den essentiellen Komponenten .....</b>                                                                                                                                      | <b>30</b> |
| <b>Abb. 9: Setting und Vorbereitung der Materialien und dezellularisierten Ratten-Herzen für die vaskuläre Re-Besiedlung.....</b>                                                                                                         | <b>42</b> |
| <b>Abb. 10: Setting und Vorbereitung der Materialien für die Co-Re-Besiedlung unter der Lamina Air Flow Bench .....</b>                                                                                                                   | <b>49</b> |
| <b>Abb. 11: dezellularisierte Ratten-Herzen in Lagerung in 50ml Falcons in DMEM vor Co-Re-Besiedlung.....</b>                                                                                                                             | <b>49</b> |
| <b>Abb. 12: Exemplarische Darstellung von statischer und perfundierter Re-Kultiveierung von zuvor dezellularisierten und anschließend vaskulär und interstitiell kombiniert simultan konsekutiv co-re-besiedelten Ratten-Herzen .....</b> | <b>53</b> |
| <b>Abb. 13: Darstellung eines exemplarischen dezellularisierten linken Ventrikel-Flaps hier liegend auf einem Six-Well .....</b>                                                                                                          | <b>53</b> |
| <b>Abb. 14: vollautomatisierte standardisierte Code-basierte quantitative Bildanalyse mit der Software Fiji ImageJ .....</b>                                                                                                              | <b>65</b> |
| <b>Abb. 15: vollautomatisierte standardisierte Code-basierte quantitative Bildanalyse mit der Software Fiji ImageJ - Teil 2 .....</b>                                                                                                     | <b>66</b> |
| <b>Abb. 16: HE-Färbung eines rechten Ventrikels einer perfundierten Co-Re-Besiedlung .....</b>                                                                                                                                            | <b>80</b> |
| <b>Abb. 17: HE-Färbungen eines rechten Ventrikels eines perfundierten Co-Re-Besiedlungen .....</b>                                                                                                                                        | <b>81</b> |
| <b>Abb. 18: HE-Färbungen eines rechten Ventrikels einer perfundierten Co-Re-Besiedlung ...</b>                                                                                                                                            | <b>82</b> |
| <b>Abb. 19: HE-Färbungen eines rechten Ventrikels und eines Apex von perfundierten Co-Re-Besiedlungen.....</b>                                                                                                                            | <b>83</b> |
| <b>Abb. 20: HE-Färbung eines rechten Ventrikels einer statischen Co-Re-Besiedlung.....</b>                                                                                                                                                | <b>84</b> |

|                                                                                                                                                                         |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abb. 21: HE-Färbungen eines linken Ventrikels und eines Septums von statischen Co-Re-Besiedlungen.....                                                                  | 85  |
| Abb. 22: DAPI Immunfluoreszenz-Färbung eines linken Ventrikels einer perfundierten Co-Re-Besiedlung.....                                                                | 87  |
| Abb. 23: DAPI Immunfluoreszenz-Färbung eines linken Ventrikels einer perfundierten Co-Re-Besiedlung.....                                                                | 87  |
| Abb. 24: von-Willebrand-Faktor Immunfluoreszenz-Färbung eines rechten Ventrikels einer perfundierten Co-Re-Besiedlung.....                                              | 88  |
| Abb. 25: von-Willebrand-Faktor Immunfluoreszenz-Färbung eines rechten Ventrikels einer perfundierten Co-Re-Besiedlung.....                                              | 89  |
| Abb. 26: von-Willebrand-Faktor Immunfluoreszenz-Färbung eines rechten und linken Ventrikels von perfundierten Co-Re-Besiedlungen.....                                   | 89  |
| Abb. 27: Troponin Immunfluoreszenz-Färbung eines rechten und linken Ventrikels von perfundierten Co-Re-Besiedlungen.....                                                | 90  |
| Abb. 28: Troponin Immunfluoreszenz-Färbung eines rechten und linken Ventrikels von perfundierten Co-Re-Besiedlungen.....                                                | 90  |
| Abb. 29: Myosin Immunfluoreszenz-Färbung eines rechten und linken Ventrikels von perfundierten Co-Re-Besiedlungen.....                                                  | 91  |
| Abb. 30: Myosin Immunfluoreszenz-Färbung eines rechten und linken Ventrikels von perfundierten Co-Re-Besiedlungen.....                                                  | 91  |
| Abb. 31: Doppelfärbung von-Willebrand-Faktor und Cardiac Actinin Immunfluoreszenz-Färbung eines rechten und linken Ventrikels von perfundierten Co-Re-Besiedlungen..... | 92  |
| Abb. 32: Doppel-Immunfärbung von-Willebrand-Faktor und Cardiac Actinin Immunfluoreszenz-Färbung eines linken Ventrikels einer perfundierten Co-Re-Besiedlung.....       | 93  |
| Abb. 33: Doppel-Immunfärbung von-Willebrand-Faktor und Myosin Immunfluoreszenz-Färbung eines linken Ventrikels einer perfundierten Co-Re-Besiedlungen.....              | 93  |
| Abb. 34: Doppel-Immunfärbung von-Willebrand-Faktor und Myosin Immunfluoreszenz-Färbung eines linken Ventrikels einer perfundierten Co-Re-Besiedlung.....                | 94  |
| Abb. 35: Vergleich Herz 1 (perfundierte) und Herz 3 (statisch).....                                                                                                     | 98  |
| Abb. 36: Vergleich Herz 2 (perfundierte) und Herz 4 (statisch).....                                                                                                     | 101 |
| Abb. 37: Vergleich Herz 5 (perfundierte) und Herz 7 (statisch).....                                                                                                     | 102 |
| Abb. 38: Vergleich Herz 6 (perfundierte) und Herz 8 (statisch).....                                                                                                     | 104 |
| Abb. 39: Vergleich Herz 9 (perfundierte) und Herz 11 (statisch).....                                                                                                    | 105 |
| Abb. 40: Vergleich Herz 10 (perfundierte) und Herz 12 (statisch).....                                                                                                   | 107 |
| Abb. 41: Gesamt-Vergleich aller Herzen perfundierte vs. alle Herzen statisch.....                                                                                       | 108 |
| Abb. 42: Live-Dead-Assay Cell Tracker Doppelfärbung mit CMFDA und CMPTX einer perfundierten Co-Re-Besiedlung, Co-Zellvitalität HUVECs und CMCs.....                     | 114 |

|                                                                                                                                                                                       |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Abb. 43: Live-Dead-Assay Cell Tracker Doppelfärbung mit CMFDA und CMPTX einer perfundierten Co-Re-Besiedlung mit Re-Endothelialisierung in Nahaufnahme, 3D-Gefäßsystem .....</b>   | <b>116</b> |
| <b>Abb. 44: Live-Dead-Assay mit CMFDA und CMPTX einer Co-Re-Besiedlung mit Re-Endothelialisierung in Übersichtsaufnahme, 3D-Gefäßsystem .....</b>                                     | <b>117</b> |
| <b>Abb. 45: Live-Dead-Assay Cell Tracker Doppelfärbung mit CMFDA und CMPTX und DAPI-Färbung einer perfundierten Co-Re-Besiedlung, Darstellung des kardialen 3D-Gefäßsystems .....</b> | <b>119</b> |

## Tabellenverzeichnis

|                                                                                                                                         |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Tabelle 1: Technisches Equipment .....</b>                                                                                           | <b>18</b>  |
| <b>Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien .....</b>                                                                                           | <b>20</b>  |
| <b>Tabelle 3: Chemikalien, Reagenzien .....</b>                                                                                         | <b>22</b>  |
| <b>Tabelle 4: Antikörper .....</b>                                                                                                      | <b>23</b>  |
| <b>Tabelle 5: Protokoll Explantation Ratten-Herzen .....</b>                                                                            | <b>25</b>  |
| <b>Tabelle 6: Protokoll Dezellularisierung Ganz-Herzen von Ratten .....</b>                                                             | <b>33</b>  |
| <b>Tabelle 7: Protokoll Dezellularisierung Ganz-Herzen von Ratten + Aufbau der<br/>Dezellularisierungs-Anlage .....</b>                 | <b>34</b>  |
| <b>Tabelle 8: Zellkultur und Zellmedien.....</b>                                                                                        | <b>37</b>  |
| <b>Tabelle 9: Protokoll Zellkultur (Mediumwechsel, Zellen auftauen) .....</b>                                                           | <b>38</b>  |
| <b>Tabelle 10: Protokoll vaskuläre Re-Besiedlung .....</b>                                                                              | <b>42</b>  |
| <b>Tabelle 11: Übersicht Co-Re-Besiedlung Parameter Technik.....</b>                                                                    | <b>45</b>  |
| <b>Tabelle 12: Übersicht Co-Re-Besiedlung Parameter Zellen.....</b>                                                                     | <b>45</b>  |
| <b>Tabelle 13: Protokoll vaskuläre und interstitielle simultan konsekutive Co-Re-Besiedlung<br/>(Vorbereitung).....</b>                 | <b>46</b>  |
| <b>Tabelle 14: Protokoll vaskuläre und interstitielle simultan konsekutive Co-Re-Besiedlung<br/>(Durchführung).....</b>                 | <b>48</b>  |
| <b>Tabelle 15: Protokoll Statische Kultivierung.....</b>                                                                                | <b>51</b>  |
| <b>Tabelle 16: Protokoll Perfundierte Kultivierung.....</b>                                                                             | <b>52</b>  |
| <b>Tabelle 17: Protokoll Herzen präparieren.....</b>                                                                                    | <b>53</b>  |
| <b>Tabelle 18: Protokoll HE-Färbung.....</b>                                                                                            | <b>55</b>  |
| <b>Tabelle 19: Protokoll Immunhistologie.....</b>                                                                                       | <b>59</b>  |
| <b>Tabelle 20: Prokoll Live-Dead-Assay Cell-Tracking .....</b>                                                                          | <b>61</b>  |
| <b>Tabelle 21: Original-Daten der automatisierten Bildanalyse ermittelt mit Fiji ImageJ und<br/>verarbeitet mit Excel und SPSS.....</b> | <b>112</b> |

# Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                                       |             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Publikationsliste .....</b>                                                                                        | <b>IV</b>   |
| <b>Zusammenfassung .....</b>                                                                                          | <b>V</b>    |
| <b>Summary.....</b>                                                                                                   | <b>VI</b>   |
| <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>                                                                                    | <b>VII</b>  |
| <b>Abbildungsverzeichnis .....</b>                                                                                    | <b>VIII</b> |
| <b>Tabellenverzeichnis .....</b>                                                                                      | <b>VIII</b> |
| <b>1    Einleitung.....</b>                                                                                           | <b>1</b>    |
| 1.1 <i>Medizinische Relevanz.....</i>                                                                                 | <i>1</i>    |
| 1.1.1    Herzinsuffizienz .....                                                                                       | 1           |
| 1.1.2    Chronische Herzinsuffizienz .....                                                                            | 1           |
| 1.1.3    Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen .....                                                           | 2           |
| 1.1.4    Begleiterkrankungen bei Herzinsuffizienz .....                                                               | 4           |
| 1.1.5    Medikamentöse Therapie.....                                                                                  | 5           |
| 1.1.6    Lebensstiländerung .....                                                                                     | 5           |
| 1.1.7    Herzschrittleiter, CRT und ICD.....                                                                          | 6           |
| 1.1.8    Bypass und Klappen Operationen .....                                                                         | 7           |
| 1.1.9    Kunstherz und Herztransplantation .....                                                                      | 7           |
| 1.2 <i>Regenerative Medizin.....</i>                                                                                  | <i>10</i>   |
| 1.2.1    Tissue engineering.....                                                                                      | 10          |
| 1.2.2    Historie und Entwicklung des Tissue engineering.....                                                         | 10          |
| 1.2.3    Ganz-Organ-Tissue-Engineering.....                                                                           | 13          |
| 1.3 <i>Zielsetzung dieser Arbeit .....</i>                                                                            | <i>16</i>   |
| <b>2    Material und Methoden .....</b>                                                                               | <b>18</b>   |
| 2.1 <i>Material.....</i>                                                                                              | <i>18</i>   |
| 2.1.1 <i>Technisches Equipment.....</i>                                                                               | <i>18</i>   |
| 2.1.2    Verbrauchsmaterial .....                                                                                     | 19          |
| 2.1.3    Chemikalien, Reagenzien.....                                                                                 | 21          |
| 2.1.4    Antikörper .....                                                                                             | 23          |
| 2.2 <i>Methoden .....</i>                                                                                             | <i>24</i>   |
| 2.2.1    Gewinnung von Ratten-Herzen.....                                                                             | 24          |
| 2.2.2    Dezellularisierung von Ganz-Herzen (Ratte).....                                                              | 26          |
| 2.2.3    Zellkultur .....                                                                                             | 35          |
| 2.2.4    Re-Besiedlung der dezellularisierten Ratten-Herzen .....                                                     | 39          |
| 2.2.5    Co-Re-Besiedlung der dezellularisierten Ratten-Herzen (simultan konsekutiv vaskulär und interstitiell) ..... | 43          |
| 2.2.6    Re-Kultivierung der dezellularisierten und re-besiedelten Herzen .....                                       | 50          |
| 2.2.7    Histologie .....                                                                                             | 54          |

|          |                                                                                                                   |            |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2.2.8    | Immunhistologie .....                                                                                             | 56         |
| 2.2.9    | Live-Dead-Assay – Cell Tracking .....                                                                             | 60         |
| 2.2.10   | Automatisierte code-basierte quantitative Bildanalyse mittels Fiji ImageJ .....                                   | 62         |
| 2.2.11   | Statistik .....                                                                                                   | 70         |
| 2.2.12   | Versuchsaufbau .....                                                                                              | 73         |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse.....</b>                                                                                            | <b>75</b>  |
| 3.1      | Übersicht der Ergebnisse .....                                                                                    | 75         |
| 3.2      | Qualitative Ergebnisse.....                                                                                       | 79         |
| 3.2.1    | Histologie – HE-Färbung .....                                                                                     | 79         |
| 3.2.2    | Immunhistologie .....                                                                                             | 86         |
| 3.2.3    | DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) Färbung.....                                                                  | 87         |
| 3.2.4    | Von-Willebrand-Faktor Immunfärbung.....                                                                           | 88         |
| 3.2.5    | Troponin Immunfärbung .....                                                                                       | 90         |
| 3.2.6    | Myosin Immunfärbung .....                                                                                         | 91         |
| 3.2.7    | Doppel-Immunfärbung Von-Willebrand-Faktor + Cardiac Actinin .....                                                 | 92         |
| 3.2.8    | Doppel-Immunfärbung Von-Willebrand-Faktor + Myosin .....                                                          | 93         |
| 3.3      | Quantitative Ergebnisse .....                                                                                     | 95         |
| 3.3.1    | Übersicht der quantitativen Ergebnisse .....                                                                      | 95         |
| 3.3.2    | Vergleich Herz 1 (perfundiert) und Herz 3 (statisch) .....                                                        | 98         |
| 3.3.3    | Vergleich Herz 2 (perfundiert) und Herz 4 (statisch) .....                                                        | 101        |
| 3.3.4    | Vergleich Herz 5 (perfundiert) und Herz 7 (statisch) .....                                                        | 102        |
| 3.3.5    | Vergleich Herz 6 (perfundiert) und Herz 8 (statisch) .....                                                        | 104        |
| 3.3.6    | Vergleich Herz 9 (perfundiert) und Herz 11 (statisch) .....                                                       | 105        |
| 3.3.7    | Vergleich Herz 10 (perfundiert) und Herz 12 (statisch) .....                                                      | 107        |
| 3.3.8    | Gesamt-Vergleich Herzen (perfundiert) und Herzen (statisch) .....                                                 | 108        |
| 3.3.9    | Original-Daten der automatisierten Bildanalyse ermittelt mit Fiji ImageJ und verarbeitet mit Excel und SPSS ..... | 110        |
| 3.4      | Weitere Ergebnisse – Live-Dead-Assay .....                                                                        | 113        |
| 3.4.1    | Überblick der Live-Dead-Assay Ergebnisse.....                                                                     | 113        |
| 3.4.2    | Doppelfärbung mit CMFDA und CMPTX.....                                                                            | 114        |
| 3.4.3    | Re-Endothelialisierung - Nahaufnahmen .....                                                                       | 115        |
| 3.4.4    | Re-Endothelialisierung – Übersichtsaufnahmen .....                                                                | 117        |
| 3.4.5    | Doppelfärbung CMFDA und CMPTX + DAPI.....                                                                         | 119        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion.....</b>                                                                                            | <b>121</b> |
| 4.1      | Übersicht der Diskussion .....                                                                                    | 121        |
| 4.2      | Vorteile und Limitationen der angewendeten Methoden.....                                                          | 124        |
| 4.2.1    | Methoden dieser Arbeit .....                                                                                      | 124        |
| 4.2.2    | Dezellularisierung (ECM-Gerüst).....                                                                              | 127        |
| 4.2.3    | Zell-Re-Besiedlung eines dezellularisierten Herzen .....                                                          | 132        |
| 4.2.4    | Art der Zell-Re-Besiedlung (vaskulär, interstitiell) .....                                                        | 133        |
| 4.2.5    | Art der verwendeten Zellpopulation.....                                                                           | 136        |
| 4.2.6    | Zell-Re-Besiedlung einer zuvor dezellularisierten Ganz-Organ-ECM .....                                            | 139        |
| 4.2.7    | Zell-Re-Kultivierung und Zellwachstum eines re-besiedelten Herzen .....                                           | 144        |

|       |                                                                                    |     |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.2.8 | Auswertung.....                                                                    | 148 |
| 4.3   | <i>Interpretation der Ergebnisse</i> .....                                         | 150 |
| 4.3.1 | Fragestellungen.....                                                               | 152 |
| 4.3.2 | Einordnung der Ergebnisse hinsichtlich der Fragestellungen .....                   | 153 |
| 4.4   | <i>Zukunft</i> .....                                                               | 155 |
| 4.4.1 | Re-Implantation .....                                                              | 155 |
| 4.4.2 | Hochskalieren.....                                                                 | 155 |
| 4.4.3 | Klassische etablierte Methoden des myokardialen Tissue engineering .....           | 156 |
| 4.4.4 | Alternativen des myokardialen Ganz-Organ Tissue engineerings .....                 | 157 |
| 4.4.5 | 3D-Bioprinting („Elektrizität“ oder „Wasserstoff“ der Regenerativen Medizin) ..... | 157 |
| 4.4.6 | Herzklappen .....                                                                  | 161 |
| 4.4.7 | Zellwachstum .....                                                                 | 161 |
| 4.4.8 | Gentechnik.....                                                                    | 162 |
| 4.4.9 | Zusammenfassung.....                                                               | 163 |
| 5     | <b>Literaturverzeichnis</b> .....                                                  | 164 |
| 6     | <b>Anlage</b> .....                                                                | 174 |
|       | <b>Danksagung</b> .....                                                            | 177 |

# 1 Einleitung

## 1.1 Medizinische Relevanz

### 1.1.1 Herzinsuffizienz

Herz-Kreislauf-Erkrankungen belegen in der Rangliste der häufigsten Todesursachen die Nummer 1 in den Industrie-Staaten. Im Jahre 2016 waren es weltweit 17,9 Millionen Menschen und damit 31% aller globalen Todesfälle (WHO, AHA). Über 75% dieser Fälle fanden in Niedrig- und Mittel-Einkommen Ländern statt. Auch wenn eine große Zahl dieser Fälle durch Vermeidung von definierten Risikofaktoren verhindert oder zumindest verzögert werden könnte, bliebe immer noch eine sehr große Zahl an altersbedingten oder genetischen Risikofaktoren, die sich durch eine Lebensstiländerung nicht erfassen lassen. Zu den klassischen Risikofaktoren zählen in erster Linie Tabakkonsum, Alkohol, Übergewicht, Diabetes, Hypertonie, Ernährung. Dabei spielt die chronische Herzinsuffizienz eine wesentliche Rolle. Zu den kardiovaskulären Erkrankungen werden vor allem die Koronare Herzkrankheit (KHK), Schlaganfall, Herzklappen-Erkrankungen, Herzinfarkt, Thrombosen, Lungenembolie, periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), rheumatische und angeborene Herzerkrankungen gerechnet. Fast alle dieser Erkrankungen können im Verlauf zu akuter oder chronischer Herzinsuffizienz führen. Die im Folgenden dargestellten Inhalte zur chronischen Herzinsuffizienz und deren weitreichenden Folgen entsprechen der Nationalen Versorgungsleitlinie „Chronische Herzinsuffizienz“ der Arbeitsgruppe der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften aus dem Jahr 2019 mit Update im Jahre 2021 (AWMF, 2019).

### 1.1.2 Chronische Herzinsuffizienz

Die Nationale Versorgungsleitlinie „Chronische Herzinsuffizienz“ definiert die Herzinsuffizienz folgendermaßen: „Das Herz ist dabei nicht mehr in der Lage, den Körper mit ausreichend Blut und Sauerstoff zu versorgen. Die ursprüngliche Definition beinhaltete vor allem die Hämodynamik der Herzinsuffizienz und wurde um die Kompensation des Körpers z.B. durch Sympathikus-Gegenregulierung ergänzt.“ (AWMF, 2019). Die klinische Definition umfasst vor allem Symptome wie Dyspnoe und Leistungsminderung, sowie Ödem-Einlagerungen. Grundsätzlich kann zwischen akuter und chronischer Herzinsuffizienz unterschieden werden. Dabei stellt die akute Herzinsuffizienz einen klaren Notfall dar, der unverzüglich zu behandeln

ist. Die chronische Herzinsuffizienz stellt eine Art fortschreitende Schädigung der kardialen Pumpfunktion dar, die die unterschiedlichsten Ursachen haben kann. Grundsätzlich kann hier eine Einteilung nach Ort des Auftretens, zum Beispiel Linksherzinsuffizienz, nach dem Faktor Zeit oder auch nach der zugrundeliegenden Ursache unterschieden werden. Zusätzlich wird noch unterschieden, ob die Pumpfunktion, die Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) betroffen ist. Danach wird zwischen reduzierter, leicht reduzierter und erhaltener Linksventrikulärer Ejektionsfraktion unterschieden: HFrEF (Heart failure with reduced Ejection Fraction), mit einer reduzierten LVEF kleiner 40%, einer leicht reduzierten HFmEF, mit einer LVEF zwischen 40 und 49, und HFpEF, mit einer LVEF größer 40% unterschieden. Bei der HFrEF liegt eine reduzierte Auswurfleistung vor, bei der HFpEF liegt stattdessen eine reduzierte diastolische Füllungsleistung vor. Insgesamt sind die Ursachen unterschiedlich. Eine der häufigsten Ursachen der chronischen Herzinsuffizienz stellt die chronische Koronare Herzkrankheit dar. Hierbei spielen arterielle Hypertonie und Myokardinfarkt eine Rolle. Eher seltenere Ursachen umfassen beispielsweise nicht-ischämische Kardiomyopathien, Arrhythmien, wie Vorhofflimmern, Tachykardie, Bradykardie, aber auch Herzklappenerkrankungen, dabei angeborene und erworbene, Perikarderkrankungen und High Output Failure Erkrankungen.

Insgesamt können fast alle Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu einer akuten oder chronischen Herzinsuffizienz führen, und damit auch zum Herzversagen.

Pathophysiologisch spielen vor allem folgende Faktoren eine Rolle: die Schädigung des Myokards durch Druckbelastung, Volumenbelastung oder Gewebeuntergang. Daraus folgt eine reduzierte Funktion der Pumpleistung des linken Ventrikels. Dies wiederum führt zu Gegenregulationsmechanismen, die die Herzleistung zwar kurzfristig kompensieren können, aber langfristig dem Herzen schaden können. Deshalb steht im Fokus der Therapie eine Verringerung der Folgen einer reduzierten Pumpleistung des linken Ventrikels und damit der Gegenregulationsmechanismen, insbesondere des RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System).

### 1.1.3 Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen

Die Prävention setzt in erster Linie auf eine Vermeidung der Risikofaktoren beziehungsweise eine entsprechende Anpassung des Lebensstils. Eine wesentliche Rolle spielen hierbei das Vermeiden von Rauchen, regelmäßigem Alkoholkonsum, Übergewicht beziehungsweise Adipositas, Ernährung und körperliche Aktivität.

Auch auf staatlicher Ebene finden weltweit Programme und Interventionen zur Prävention von Kardiovaskulären Erkrankungen statt: Dazu zählen vor allem Tabakkonsum-Kontroll-Mechanismen (zum Beispiel das Tabak-Werbungsverbot beziehungsweise Gesundheitswarnungen bei Tabakwerbung) (WHO), erhöhte Besteuerung von Tabak, Alkohol und Nahrungsmitteln, die die Gefahr für Übergewicht und Adipositas stark erhöhen (zum Beispiel Besteuerung von Zucker, Salz, und Fett), Bewegungsinitiativen zur Förderung der körperlichen Aktivität (zum Beispiel Deutschland bewegt sich, eine Initiative der Krankenkassen). Auf globaler Ebene geht die Weltgesundheitsorganisation mit einem speziellen globalen Aktionsplan zur Vermeidung und Prävention von nicht-übertragbaren Krankheiten, der von 194 Ländern der Welt unterzeichnet wurde (WHO). Dieser beinhaltet eine Reduktion um 25% der vermeidbaren Todesfälle durch nicht-übertragbare Krankheiten bis 2025. Dabei werden 9 wesentliche Ziele genannt, von denen 2 unmittelbar die Reduktion von kardiovaskulären Erkrankungen betreffen. Dies sind Ziel 6, eine Reduktion der Prävalenz von Bluthochdruck, und Ziel 8, eine Implementierung von Medizinischer Therapie bei zumindest 50% der dafür bedürftigen Menschen. Dies unterstreicht die immense Bedeutung von kardiovaskulären Erkrankungen nicht nur medizinisch, sondern auch politisch weltweit.

Auf individueller Ebene wird zwischen Primär-, und Sekundärprävention unterschieden. Bei der Primärprävention wird auf die oben genannten Verhaltensrisikofaktoren gesetzt. Bei der Sekundärprävention ist bereits eine medikamentöse Intervention notwendig. Dazu zählen im Allgemeinen zum Beispiel Aspirin, Beta-Blocker, ACE-Hemmer, Sartane et cetera. Im weiteren Verlauf der Erkrankungen können auch operative Interventionen notwendig werden, wie zum Beispiel Stent-Implantationen, Bypass-Operation, Klappenersatz-Operationen, bis hin zu Herztransplantationen.

Trotz aller Bemühungen und Anstrengungen auf nationaler und internationaler Ebene, in Organisationen, Politik, Krankenhäusern, Praxen und im Arzt-Patienten Kontakt, kann damit gerechnet werden, dass sich die Zahl der Kardiovaskulären Erkrankungen weltweit noch weiter erhöhen wird, auf Grund des immer noch zunehmenden Wachstums und des Wohlstandes der Weltbevölkerung.

Trotz der stetigen Entwicklung in Diagnostik und Therapie der Kardiovaskulären Erkrankungen und einer immer besser werdenden gesundheitlichen Versorgung von immer mehr Menschen, wird auch mit einer erhöhten Zahl an Herzinsuffizienzen und damit auch an chronischen Herzinsuffizienzen im Endstadium zu rechnen sein, zumindest in den Industrienationen.

## Organersatz

Während bei einer chronischen Herzinsuffizienz in den Anfangsstadien noch einige Therapien zur Kontrolle oder zumindest Verzögerung zur Verfügung stehen, bleibt im Endstadium der Herzinsuffizienz häufig nur noch die Herztransplantation als Ultima ratio bestehen. Dies erhöht den Bedarf an menschlichem Organersatz immens. Da aber nur eine begrenzte, geringe Anzahl an Spendern zur Verfügung steht, besteht ein großes Missverhältnis zwischen Angebot und Nachfrage. Im Jahr 2021 wurden in Deutschland 329 Herztransplantationen durchgeführt und es kamen 522 Anmeldungen auf die Warteliste hierfür (Organspende). Dies weckt den Bedarf an alternativen Möglichkeiten, zum Beispiel biologisch-künstlicher Organersatz. Die Regenerative Medizin beziehungsweise das myokardiale Tissue Engineering zielt genau auf einen solchen bioartifiziellen Organersatz, und die Hoffnung liegt darauf, eines Tages ein vollkommen biologisch-künstlich erstelltes Herz zu erschaffen. Gelänge es, dieses Ziel zu erreichen, könnten Organe wie ganze Herzen nahezu in unbegrenzter Menge erstellt werden, und somit das Missverhältnis zwischen Angebot und Nachfrage komplett ausgeglichen werden. Optimaler Weise könnten Organe sogar individuell speziell auf den entsprechenden Empfänger angepasst werden.

In Deutschland leiden ca. 2 Mio. Menschen an chronischer Herzinsuffizienz. Mit Betrachtung der altersspezifischen Subgruppen betrifft dies ca. 50% der über 80 Jährigen, und immerhin ca. 30 % der über 70 Jährigen.

### 1.1.4 Begleiterkrankungen bei Herzinsuffizienz

Vorhofflimmern stellt eine häufige Begleiterkrankung bei chronischer Herzinsuffizienz dar, die die Prognose verschlechtert. Je höher das NYHA-Stadium, desto wahrscheinlicher ein Vorhofflimmern. Eine der gefürchtetsten Begleiterkrankungen ist der plötzliche Herztod, der mitunter durch einen implantierten Cardioverter-Defibrillator verhindert werden kann. Ebenfalls häufig treten Atemwegserkrankungen wie COPD und Asthma in Begleitung einer Herzinsuffizienz auf. Von einer Therapie der chronischen Herzinsuffizienz, ob symptomatisch oder kurativ, können auch Begleiterkrankungen in der Regel positiv beeinflusst werden.

Ziel der Therapie der chronischen Herzinsuffizienz ist stets die Verbesserung der Symptomatik und das Senken des Morbiditäts- und Mortalitätsrisikos.

### 1.1.5 Medikamentöse Therapie

Die medikamentöse Therapie der chronischen Herzinsuffizienz richtet sich im Wesentlichen nach der pathophysiologischen Form der Herzinsuffizienz, also ob eine Reduzierung der Pumpfunktion des linken Ventrikel vorliegt (HFrEF). Dabei stehen in erster Linie zwei Faktoren der Therapie zur Verfügung. Zum einen die direkten Folgen der Herzinsuffizienz und die Reduzierung der Folgen der Gegenregulationsmechanismen der Herzinsuffizienz. Dies beinhaltet eine Hemmung des Renin-Angiotensin-Systems (RAAS) und eine Hemmung des Sympathikus durch Betablocker. Zur Basistherapie können folgende Medikamente angewendet werden: ACE-Hemmer (Angiotensin-Converting-Enzym), Betablocker und Aldosteron-Antagonisten (Mineralokortikoid-Rezeptor-Blocker). Dabei wird stufenweise nach NYHA-Klassen bei reduzierter LVEF vorgegangen. Ergänzend empfiehlt sich bei Flüssigkeitsretention die Anwendung von Diuretika. Bestehen weiterhin Symptome können Angiotensin-Typ-1-Inhibitoren (Sartane) statt ACE-Hemmern angewendet werden. Bei Niereninsuffizienz sollten ebenfalls Sartane statt ACE-Hemmern angewendet werden (AWMF, 2019).

Zur erweiterten Therapie können Angiotensin-Rezeptor-Neprilysin-Inhibitor (ARNI) bei HFrEF oder Ivabradin bei Betablockerintoleranz oder einer Herzfrequenz >75 pro Minute eingesetzt werden. Bei Symptompersistenz können Sacubitril, Valsartan als ACE-Hemmer-Ersatz oder SGLT2-Inhibitoren eingesetzt werden (AWMF Update 2021).

Des Weiteren ist bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz auf einen vollständigen Impfschutz entsprechend der STIKO-Empfehlungen zu achten, vor allem auf einen Influenza- und Pneumokokken Impfschutz.

### 1.1.6 Lebensstiländerung

Die klassische Lebensstiländerung oder Lebensstilverbesserung definiert sich analog den zuvor genannten Risikofaktoren. Dies beinhaltet das Vermeiden von Tabak, Alkohol, die Reduzierung von Übergewicht beziehungsweise Adipositas, eine konsequente Therapie bei Diabetes, Arterieller Hypertonie, oder Hyperlipidämie, gesunde Ernährung und regelmäßige Bewegung. Es wird keine spezielle Ernährung oder Diät empfohlen, sondern eher eine ausgeglichene und Nährstoff-ausbalancierte Ernährung entsprechend der WHO-Empfehlung, ähnlich der mediterranen Ernährung, mit wenig Zucker und gesättigten Fettsäuren, Obst, Gemüse, Ballaststoffreich, wenig Fleisch und salz arm. Diese Ernährungsweise ähnelt ebenfalls der Ernährungsempfehlung für Dialyse Patienten beziehungsweise mit chronischer Niereninsuffizienz. Regelmäßige Körperliche Aktivität definiert sich über ein dem Patienten-

angepassten regelmäßigem Bewegungsausmaß. Zudem wird ein Monitoring des Gewichts und des Flüssigkeitshaushalts empfohlen. Bei zu schneller Gewichtszunahme besteht die Gefahr einer Flüssigkeitsretention und einer Verschlechterung der Herzinsuffizienz.

#### 1.1.7 Herzschrittmacher, CRT und ICD

Bei Vorliegen einer chronischen Herzinsuffizienz mit dilatierten Kammern und einer reduzierten LVEF gemäß NYHA-Stadium 3-4, kann es bei etwa einem Drittel zusätzlich zu Dyssynchronien kommen, wie einem Linksschenkelblock, wobei eine gleichmäßige, regelmäßige Pumpleistung der Kammern nicht mehr gewährleistet werden kann. Dabei ist auch das Mortalitätsrisiko erhöht. Unter bestimmten Voraussetzungen ist eine Kardiale Resynchronisationstherapie (CRT) indiziert. Dies ist die Implantation eines Herzschrittmachers, der die Ventrikel wieder synchron schlagen lassen soll. Die Voraussetzungen hierfür sind das Vorliegen eines Sinusrhythmus, eines verbreiteten QRS-Komplexes und eines Linksschenkelblockes. Die CRT kann bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz mit reduzierter LVEF die Mortalität, Hospitalisierungsrate, Symptomatik generell senken und Lebensqualität verbessern, verglichen mit einer alleinigen medikamentösen Therapie. Das Verbesserungsausmaß ist abhängig von bestimmten Faktoren, wie etwa Geschlecht und Ursache, aber nicht vom Alter der Patienten. Die CRT ist insgesamt nur bei ca. 5-10% der chronischen Herzinsuffizienz Patienten indiziert, was allerdings absolut betrachtet eine immer noch sehr hohe Zahl darstellt, da die Prävalenz und Inzidenz von Herzinsuffizienzen insgesamt sehr hoch sind. Bei Patienten bei denen die Voraussetzung, und stattdessen ein Vorhofflimmern vorliegt, wird nur in Ausnahmefällen empfohlen. Bei Patienten die nach konventioneller Schrittmacher Therapie oder implantierbaren Kardioverter-Defibrillator-(ICD)-Implantation keine Verbesserung, sondern eher eine weitere Verschlechterung der Symptomatik zeigen, kann eine CRT erwogen werden, zumindest bei hoher rechtsventrikulärer Stimulation.

Bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz und einer LVEF von unter 40% ist eine spezielle Herzschrittmacher-Implantation indiziert, die Implantation eines implantierbaren Kardioverter-Defibrillator (ICD). Dieser kann auch mit einer CRT kombiniert werden. Er dient in erster Linie der Verhinderung eines plötzlichen Herztodes, der in Folge einer ventrikulären Tachyarrhythmie auftreten kann. Er gilt als gefürchtete Komplikation der Herzinsuffizienz und zählt zu den häufigsten Todesursachen bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz. Der ICD soll diese Komplikation verhindern, verhindert allerdings nicht das Fortschreiten der Herzinsuffizienz. Dabei ist zu beachten, dass er bei schwerer Symptomatik nicht unbedingt indiziert ist, und bei einem Wechsel die Indikation neu geprüft wird. ICDs werden als Primärprävention und als Sekundärprävention eingesetzt. Bei der Primärprävention sind

Voraussetzungen, NYHA-Stadium 2-3, eine LVEF <35% unter optimaler medikamentöser Therapie über 3 Monate, eine Lebenserwartung von über einem Jahr, ein guter allgemeiner Status. Bei der Sekundärprävention sind Voraussetzungen, ein überlebter plötzlicher Herztod oder hämodynamisch wirksame Kammertachykardien. ICDs gibt es als Einkammer-Systeme und Zweikammer-Systeme, wobei in den meisten Fällen ein Einkammersystem eher ausreichend ist. Bei Einkammer-Systemen wird eine Elektrode im rechten Ventrikel platziert, bei Zweikammer-Systemen zusätzlich noch im rechten Vorhof. Bei entsprechender Herzschrittmacher Indikation, kann auch ein Zweikammersystem eingesetzt werden, das auch Herzschrittmacher Eigenschaften erfüllt, jedoch auch eher mehr mögliche Komplikationen aufweisen kann. In Einzelfällen kann ein CRT-Herzschrittmacher auch mit einem ICD kombiniert werden, wenn die Voraussetzungen und Indikationen für beide Systeme erfüllt sind.

#### 1.1.8 Bypass und Klappen Operationen

Auch bei Patienten mit einer LVEF < 35% und Mehrgefäß-KHK kann eine Bypassoperation indiziert sein. Entscheidend für die Indikationsstellung einer Myokardrevaskularisierung und damit einer Bypass-Operation ist das Vorhandensein und die Ausprägung einer Myokardischämie und die daraus resultierenden Symptomatik, und nicht direkt der Schweregrad der Herzinsuffizienz. Die Entscheidung für einen Eingriff wird immer individuell abhängig vom Risiko-Nutzen-Verhältnis zusammen mit dem Patienten getroffen. Für eine perkutane Koronarintervention ist dieses Verhältnis noch unklar.

Auch Herzklappenerkrankungen werden unabhängig vom Schweregrad der Herzinsuffizienz nach Leitlinie therapiert. Hierbei wird unterschieden, ob eine primäre Klappenerkrankung vorliegt, die ihrerseits zu einer Herzinsuffizienz führen kann, oder ob es sich um eine sekundäre Klappenerkrankung handelt, die die Herzinsuffizienz bedingt. Dabei steht vor allem die interventionelle oder operative Therapie einer sekundären Mitralklappeninsuffizienz im Vordergrund.

#### 1.1.9 Kunstherz und Herztransplantation

Ist die Herzinsuffizienz schon so weit fortgeschritten, dass trotz optimaler medikamentöser Therapie weiterhin eine Symptomatik besteht, dann kann ein Herzunterstützungssystem oder als Ultima ratio eine Herztransplantation eine Option sein. Zu den Herzunterstützungssystemen zählen ventrikuläre Unterstützungssysteme (VAD, ventrikular assistant device), am häufigsten linksventrikuläre (LVAD), aber auch rechtsventrikuläre (RVAD) oder beidseits ventrikuläre (BVAD), sowie totale Kunstherzen (TAH, total artificial heart). Die

Indikation für Herzunterstützungssysteme kann für Patienten mit Herzinsuffizienz im terminalen Stadium gestellt werden, speziell für Patienten, die für eine Herztransplantation nicht in Frage kommen. Grundsätzlich können Herzunterstützungssysteme für eine Überbrückung zur Herztransplantation (Bridge to Transplantation, eine Überbrückung bis zur Erholung (Bridge to Recovery) oder zur Überbrückung bis zur Transplantationsfähigkeit (Bridge to Candidacy) oder auch in zunehmendem Maße als Dauertherapie (Destination Therapie) eingesetzt werden. Voraussetzungen sind eine schwere Symptomatik von länger als zwei Monaten und mindestens zwei der folgenden Kriterien: eine LVEF <20% und VO<sub>2</sub>peak <12ml/kg/min, oder mehr als zwei Hospitalisierungen pro Jahr, oder eine notwendige i.v. inotrope Therapie, fortschreitende durchblutungsbedingte End-Organ-Dysfunktion von Niere, Leber oder eine schwere Rechts Herzinsuffizienz mit schwerer Trikuspidalklappeninsuffizienz. Eine Indikation für Herzunterstützungssysteme oder auch Kunsterzen sollte auch hier nur an speziellen Herzzentren gestellt werden, mit gründlicher Abwägung des individuellen Risiko-Nutzen-Profiles und in enger gemeinsamer Entscheidungsfindung des Patienten.

Weitere operative Eingriffe stellen zum Beispiel die Ventrikelrekonstruktion und die Aneurysmektomie dar. Die Wiederherstellung des Ventrikels beinhaltet die Entfernung von vernarbten Arealen des Myokards, um das normale Ventrikelvolumen wiederherzustellen oder sich diesem anzunähern. Eine der bisher größten Studien zur Ventrikelrekonstruktion ist die Studie STICH-2, in der bei Patienten mit Herzinsuffizienz, die eine Bypassoperation bekamen, zusätzlich eine Ventrikelrekonstruktion durchgeführt wurde (n=501). Die Kontrollgruppe ohne Ventrikelrekonstruktion betrug n=499. Dazu wurde allerdings in Subanalysen der STICH-2 Studie festgestellt, dass nur eine größere Reduktion des Ventrikelvolumens (LVESVI < 60ml/m<sup>2</sup>) die Gesamt-Überlebenszeit signifikant verlängert. Daher lautet das entsprechende Leitlinien-Statement zur Ventrikelrekonstruktion: schwache Empfehlung.

Trotz umfassender Therapiemöglichkeiten der chronischen Herzinsuffizienz, bleiben die meisten Therapien symptomatisch. Ausgenommen einiger operativer Eingriffe, wie Bypass-Operationen, bleibt die einzige Option einer kurativen Therapie eine Herztransplantation. Bei Patienten mit Herzinsuffizienz im terminalen Stadium, und NYHA-Stadium 3-4, bei denen trotz optimaler medikamentöser Therapie und trotz in Frage kommender operativer Therapie immer noch eine schwere Symptomatik vorliegt, kommt eine Herztransplantation in Frage. Die klassische Indikationsstellung erfolgt auch hier an speziellen Herzzentren. Für Patienten mit Indikation ist die Herztransplantation eine erhöhte Überlebensrate und eine Verbesserung der Lebensqualität. Trotz modernster Medizin ist das Verhältnis zwischen Angebot und Nachfrage verfügbarer Spenderorgane das Nadelöhr bei der Herztransplantation. 2016 betrug

die Zahl der Herztransplantationen in Deutschland 256, während die Zahl der wartenden Patienten 725 betrug.

Trotz immer neuer Entwicklungen in der Transplantationsmedizin bleiben die klassischen limitierenden möglichen Nebenwirkungen von Transplantatabstoßungsreaktionen und Effekte der Immunsuppression wie Infektionen, erhöhte Tumorbildung und Niereninsuffizienzen. Auch die Grunderkrankung und weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren kann durch die Immunsuppression verstärkt werden und ihrerseits das Transplantat gefährden.

Ab einer gewissen Stufe der chronischen Herzinsuffizienz bei der alle Möglichkeiten der Lebensstiländerung und der Medikamentösen Therapie ausgeschöpft wurden und trotzdem eine Symptomatik fort besteht, kommen als Ultima ratio nur noch Herzersatzverfahren in Betracht. Diese beinhalten zum einen ein mögliches Kunstherz und die Herztransplantation.

Eine ganze Reihe an neuen Medikamenten befinden sich aktuell in Zulassungsstudien. Ansatzpunkte sind hierbei die verminderte Bildung von NO, ein neuer Mineralokortikoid-Rezeptor. Alternative Methoden, die eher auf Regeneration und erneutes Wachstum zielen, sind zum Beispiel miRNA-Pflaster, Anti-Sense-RNA-Medikamente oder miRNA-Blocker, die Veränderungen von Kardiomyozyten entgegenwirken sollen oder Zell-Pflaster aus in vitro induzierten Kardiomyozyten (Abplanalp et al., 2020). Während der Herzinsuffizienz kommt es zu einem relativen Energiedefizit bedingt durch dysfunktionale Mitochondrien. Eine weitere Rolle könnte hierbei die vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen spielen. Dies ist ein Ansatzpunkt einer neuen medikamentösen Therapie (Karaa et al., 2018) mittels eines Wirkstoffs, der diese vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen vermindern soll und somit das Fortschreiten einer Herzinsuffizienz verlangsamen soll.

## 1.2 Regenerative Medizin

### 1.2.1 Tissue engineering

Innerhalb der Medizin und ihren Fachgebieten gewinnt das Gebiet der Regenerativen Medizin immer mehr an Bedeutung. Das Ziel der Regenerativen Medizin beziehungsweise des Tissue Engineerings besteht in der Erschaffung von neuem Gewebeersatz entweder in Teilen von Organen oder sogar ganzen Organen. Diese sollen dann zur Wiederherstellung von Organen dienen. Der Untergang von Zellgewebe oder kompletten Organen und der Mangel an passendem Gewebeersatz ist eine der herausforderndsten Aufgaben, die es in der modernen Medizin zu bewältigen gibt. Das Tissue Engineering ist bestrebt, funktionellen Gewebeersatz zu erschaffen. Der als Gründer des Tissue Engineerings bezeichnete Prof. Robert Langer definierte 1993 ein damals neues Gebiet als Tissue Engineering und als „interdisziplinäres Feld, das die Prinzipien und des Engineering und Life Science anwendet bis hin zur Entwicklung von biologischem Ersatz, der die Gewebefunktion wiederherstellt, erhält oder verbessert“ (Langer and Vacanti, 1993). Dieser grundlegende Artikel wurde über 5200 mal zitiert und im Bereich des Tissue Engineerings sind über 100 Firmen aktiv mit mehr als 14.000 Mitarbeitern, was die Bedeutung dieses Gebietes unterstreicht (Jaklenec et al., 2012).

#### *Die drei Bereiche des Tissue engineering*

Dabei legt Langer den Fokus auf drei grundlegende Bereiche. Zum einen auf die Herstellung und Verwendung einer 3D-Trägermatrix (extrazellulären Matrix = ECM), die sowohl biologische als auch mechanische Eigenschaften des zu ersetzenden Organs besitzt. Zum zweiten auf eine Zellpopulation, die nach Re-Besiedlung dem zu ersetzenden Organ möglichst ähnlich ist. Und zum Dritten auf Faktoren, die das Wachstum eines solchen re-besiedelten Konstrukts optimal fördern.

### 1.2.2 Historie und Entwicklung des Tissue engineering

Bereits 1987 veröffentlichte Langer einen Artikel namens „selektive Zelltransplantation, die bioabsorbierende künstliche Matrices benutzt“ (Vacanti et al., 1988). Darin beschreibt er grundlegende Erkenntnisse und Hoffnungen des Tissue Engineering, mit anfänglichem Fokus auf Organen wie Leber, Pankreas, und Darm. Dabei wurden ausdifferenzierte Ratten- und Mäuse Zellen der Leber, des Pankreas und des Darms gewonnen, mittels Zellkultur vermehrt und anschließend auf bioaktive Matrices „besiedelt“. Dabei wurden insgesamt 115 Matrices

in 70 Empfänger implantiert. Zellüberleben sogar geringes Zellwachstum konnte bei drei Implantationen mit Leberzellen und bei drei Implantationen mit Darmzellen beobachtet werden. Diese Ergebnisse bedeuteten nicht nur ein Erfolg dieser Arbeit, sondern bewiesen vielmehr die Möglichkeit, ein bisher theoretisches Konzept in die Realität umsetzen zu können. Diese Arbeit stellte gewissermaßen die Grundlagen und die Anfänge des heutigen Tissue engineering dar.

In den 1990er Jahren fanden aufbauend auf dem oben zitierten Paper viele weitere Grundlagen untersuchende Experimente und Studien statt. Im Besonderen wurden die Organe Leber (Uygun et al., 2010), Pankreas, Darm, Blutgefäße, Blase, Niere (Allen et al., 2010, Nakayama et al., 2010), glatte Muskulatur, Ösophagus berücksichtigt.

Im Bereich des Organs Leber untersuchte zum Beispiel eine gemeinsame Arbeitsgruppe um Langer und Vacanti das Massenwachstum von implantierten Leberzellen. Dazu wurden Hepatozyten auf Schichten aus Polyglykolsäure besiedelt die anschließend 26 Ratten implantiert wurden. Dabei zeigte sich das Wachstum von Hepatozyten, die zum Teil Bilirubin produzierten.

Des weiteren untersuchte die Arbeitsgruppe 4 Dalmatiner Hunde, denen zuvor Hepatozyten mittels spezieller Schwämme auf das Mesenterium implantiert wurden. Da Dalmatiner Hunde einen Harnstoff-Stoffwechsel-Abbau-Defekt haben, konnte hier anhand fallender Harnstoff-Werte der Erfolg einer Hepatozyten-Besiedlung gezeigt werden.

Diese Ansätze beruhten allerdings auf dem Vorhandensein einer vaskularisierten Basis, die die implantierten Zellen ernährt. Um diese Abhängigkeit zu umgehen, wurde bei nächsten Ansätzen versucht, eine Vaskularisierung direkt mit in die 3D-Trägermatrix einzubauen. Das vaskuläre Netz wurde auf Silicon Vorlagen gebracht und anschließend mit Hepatozyten und Endothelzellen besiedelt. Diese zeigten in-vitro Wachstum und Differenzierung und die Hepatozyten eine weitere Produktion von Albumin. Diese Vorlagen wurden danach gefaltet zu 3D-Vorlagen, und stellen so eine 3D-Trägermatrix dar. Quasi zeitgleich wurden erste 3D-printing Methoden entwickelt, wie zum Beispiel ein Prototyp 3D-Drucker, mit dem vaskuläre Netze gedruckt werden könnten. In den 2000 er Jahren wurden diese Techniken weiterentwickelt, bis hin zu 3D-Bioprinting Methoden, bei denen Zellen in Hydrogele gedruckt werden können.

Alternative Methoden zur Herstellung oder Gewinnung einer 3D-Trägermatrix beinhalten die Methode der Dezellularisierung von Organen mit speziellen Wasch-Detergenzien-Lösungen. Grundsätzlich gibt es drei Möglichkeiten der Dezellularisierung: physikalisch (zum Beispiel durch Einfrier- und Aufbau Methoden), enzymatisch (zum Beispiel durch Enzyme wie Trypsin).

Dabei wird sich der originale 3D-Aufbau eines biologischen Organs zu Nutze gemacht. Ein tierisches Organ wird somit mit der Dezellularisierungslösung dezellularisiert und somit der Großteil der DNA-haltigen Zellen ausgewaschen. Übrig bleibt eine drei-dimensionale Trägermatrix, im Wesentlichen bestehend aus Proteinen, wie zum Beispiel Kollagen und Elastin. Durch die Entfernung von DNA-haltigen Zellen wird eine mögliche Abstoßungsreaktion stark reduziert. Diese 3D-Vorlage wird anschließend mit Zellen re-besiedelt. Zur Dezellularisierung bestehen im Allgemeinen zwei weit verbreitete Methoden: die Methode der vaskulären Dezellularisierung und die, der Immersions-Dezellularisierung bzw. der Diffusions-Dezellularisierung. Die vaskuläre Dezellularisierung macht sich das bereits vorhandene vaskuläre Netz der 3D-Trägermatrix zu Nutze. Dabei wird die Aorta retrograd kanüliert und retrograd perfundiert. Bei der Immersions-Dezellularisierung werden die Organe in eine Lösung eingelegt.

Dies ist prinzipiell für alle Organe möglich und hat den großen Vorteil, dass die zu dezellularisierenden Organe von tierischen Spendern unter Artgerechten Bedingungen gewonnen werden können und damit in quasi unbegrenzter Zahl zur Verfügung stehen. Dies wurde nahezu an fast allen Organen in Versuchen getestet und durchgeführt. Beispiele für markante Arbeiten und Erfolge im Verlauf der Entwicklung des Tissue Engineering im Bereich der Ganz-Organ-Dezellularisierung stellen folgende Arbeiten dar: im Bereich der Harnblase: dezellularisierte Harnblase gewonnen aus Schweine-Harnblasen, reimplantiert in Hasen (Chen et al., 1999). Im Bereich der Gefäße: dezellularisierte Arterien gewonnen aus Schweine-Karotiden (Dahl et al., 2003) bzw. aus Ratten-Aorta (Uchimura et al., 2003), im Bereich der Herzklappen: mit dem chemischen Detergens Triton-X oder dem enzymatischen Stoff Trypsin dezellularisierte Aorten-Klappen gewonnen aus Schweine-Aortenklappen. (Bader et al., 1998) (Grauss et al., 2005). In der Arbeit von der Gruppe um Simon wurden chemische mit enzymatischen Methoden der Dezellularisierung verglichen, und kamen zu dem Schluss, dass die chemische Methode mit Triton-X am besten geeignet sei, um die Ziele einer guten Dezellularisierung und einer azellulären Matrix zu erreichen, nämlich konsequentes Entfernen von DNA-haltigen Zellen und möglichst guter Erhaltung der Extrazellulären Matrix (Kasimir et al., 2003). In der Arbeit von der Gruppe um Prof. Lichtenberg wurden ebenfalls chemische Methoden mit enzymatischen Methoden verglichen (Cebotari et al., 2010). Dazu wurden dezellularisierte Pulmonalklappen verwendet, gewonnen aus Schweine Pulmonalklappen. Auch hier stellte sich eine Überlegenheit der chemischen Methode heraus.

### 1.2.3 Ganz-Organ-Tissue-Engineering

Eine ambitionierte Herausforderung in der regenerativen Medizin stellt die Erschaffung eines geeigneten Gewebeersatzes von Teilorganen. Eine noch ambitionierte Herausforderung ist allerdings der Gewebeersatz eines kompletten Organs.

Einer der wichtigsten Arbeiten im Bereich des modernen Whole-Organ-Tissue engineering stellt unumstritten die Arbeit von Ott in der Gruppe um Taylor dar (Ott et al., 2008). Hierbei wurde ein komplettes Ratten-Herz dezellularisiert und anschließend mit Zellen wieder besiedelt.

#### *Leber*

Im Bereich der Leber zeigten Uygun et al. die Dezellularisierung mittels Perfusion anhand von Ratten-Lebern die anschließend wieder re-zellularisiert und re-implantiert wurden (Uygun et al., 2010). Dabei zeigte sich ein Erhalt der Matrix-Komponenten, sowie der kompletten Gefäßstruktur. Zusätzlich konnten die re-implantierten Lebern klassische organspezifische Aufgaben übernehmen, wie die Albumin- und Urin-Produktion.

Die Tatsache, dass das Prinzip der Ganz-Organ-Dezellularisierung mit anschließender Re-Besiedlung erfolgreich bereits an einigen Organsystemen durchgeführt werden konnte, erhärtet die Annahme, dass dies ein führendes Konzept im Ganz-Organ-Tissue-Engineering darstellt. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache, fiel die Entscheidung bei der Wahl der geeigneten Methode dieser Arbeit auf die Ganz-Organ-Dezellularisierung und die anschließende Re-Besiedlung mit Zellen und Re-Kultivierung.

#### *Blutgefäße*

Im Bereich Blutgefäße wurden ebenfalls im Laufe der Jahre umfassende Ansätze erprobt. Hierbei entwickelte eine Gruppe um Langer biologisch künstliche kleine Arterien, die in vitro mit Hilfe eines Bioreaktorsystems erstellt werden. Dazu wurden Endothelzellen und glatte Muskelzellen auf biologisch abbaubare Kunststoff Vorlagen aus Polymer gebracht. Die Zellen wurden unter anderem von Rinder-Aorta und Schweine-Karotiden gewonnen, wie beschrieben re-besiedelt und in-vitro in einem Bioreaktor kultiviert. Danach wurden sie Miniatschweinen in die Vena saphena magna implantiert und nach 24 Tagen re-beurteilt mittels Doppler und Computer-Tomographie (CT). Die Ergebnisse waren vielversprechend, da die Transplantate auch nach dieser Zeit durchgängig waren und nach Re-Explantation

weiterhin auf den Gefäßdilator Prostaglandin 2Fa reagierten. Auf diesem Versuch aufbauend lieferten Langer et al. Ansätze, die Endothelzellen aus embryonalen Stammzellen entstehen ließen. Dazu zählen auch Versuche, das Wachstum von embryonalen Stammzellen zu kontrollieren.

Weitere Versuche wurden in den Bereichen der Organe Herz, Blase, Darm, Ösophagus, Knochen, Knorpel, Sehnen, Muskeln durchgeführt.

### *Optimales System*

Bei allen Ansätzen stellt sich die entscheidende Frage in jedem der drei von Langer beschriebenen Bereiche des Tissue engineering: Welches System oder welcher Ansatz ist der im entsprechenden Punkt vielversprechendste? Diese Frage ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht abschließend zu beantworten. Ein möglicher Lösungsweg beginnt aber prinzipiell mit dem immer gleichen Vorgehen: Dazu sollten die gängigsten bisher erprobten Ansätze dargestellt werden, kategorisiert nach den drei Punkten: Herstellung und Benutzung einer 3D-Trägermatrix, Eigenschaften einer Zell-Re-Besiedlung, und Wachstumsbedingungen- und Faktoren.

Hinsichtlich einer 3D-Trägermatrix gibt es die Möglichkeiten einer biologisch-hergestellten Matrix, einer synthetisch-hergestellten Matrix und einer natürlich-hergestellten Trägermatrix. Biologisch hergestellte Matrices beinhalten Ansätze die jeweils bestimmte Proteine als wesentliche Bestandteile vorweisen. Dazu zählen beispielsweise Kollagene, Fibrine, aber auch Gelatine, Hyaluronsäure. Beispiele für Inhaltstoffe von synthetisch hergestellten Matrices sind Polyurethane und Polyester. Die natürliche Matrix wird mittels Dezellularisierung hergestellt. Grade seit Ende der 2000er Jahre, spätestens mit Beginn eines Ganz-Organ-Dezellularisierungs- und Re-Besiedlungs-Versuches, stellt sich die Methode der natürlichen 3D-Trägermatrix-Gewinnung mittels Dezellularisierung als zunehmend führend dar (Badylak, 2004, Gilbert et al., 2006, Badylak, 2007) (Crapo et al., 2011) (Tang-Quan et al., 2018).

Hinsichtlich der Zell-Re-Besiedlung eines Konstrukts gibt es eine Reihe an Möglichkeiten, die wiederum von verschiedenen Variablen abhängen. Dazu zählen im Wesentlichen die Art der Zellpopulation, entsprechend der benötigten Aufgabe innerhalb des Konstrukts, die Zellzahl, die Art der Zellbesiedlung und die Zelllokalisierung innerhalb der Trägermatrix (Morrissey et al., 2022). Die Zellpopulation wird anhand des benötigten Gewebes organentsprechend gewählt. Dies umfasst Parenchymzellen sowie Bindegewebszellen. Bezogen auf das Beispiel entspräche dies der Verwendung von Hepatozyten und Endothelzellen. Die Zellzahl richtet sich ebenfalls nach dem benötigten Gewebe und ist meistens zu niedrig, da sie durch die klassische Zellkultur

Methoden limitiert ist. Daher gilt grundsätzlich, höher die Zellzahl desto besser. Beachtung sollte jedoch ebenfalls das Verhältnis von Zellarten untereinander finden. Die Art der Zell-Re-Besiedlung ist ein kritischer Punkt. Die Methode ist abhängig von der verwendeten Zellart und beeinflusst die Zelllokalisierung. Zum Beispiel ist für eine Re-besiedlung des vaskulären Netzes eines Organs mit Endothelzellen eine entsprechend vaskuläre Re-Besiedlungsmethode geeignet (Badylak et al., 2011).

### *Kardiales Tissue engineering*

Im Bereich des kardialen Tissue-engineering stellt die Arbeit von Ott 2008 von der Gruppe um Taylor stellt unumstritten einen Meilenstein, wenn nicht eine Revolution, des modernen Ganz-Organ-Tissue-engineering. In diesem Projekt ist es das erste Mal gelungen, ein Ganz-Herz vollständig zu dezellularisieren und anschließend zu re-zellularisieren und re-kultivieren. Dabei wurden Ratten-Herzen mittels Perfusions-Dezellularisierung dezellularisiert und danach mit Endothelzellen mittels Perfusions-Re-Besiedlung re-besiedelt. Die rezellularisierten Ganz-Herzen wiesen nicht nur ein Überleben der Zellen nach 4 Tagen, sondern auch die kardiale Grundfunktion von einer Ejektionsfraktion auf.

In aller erster Linie zeigt dies, dass es generell möglich ist, mit diesem Ansatz, ein gesamtes biologisches Herz zu erschaffen. Trotz der im Tissue Engineering bekannten Limitation, vor allem der limitierenden Zellzahl, bestätigt diese Arbeit die Annahme, dass auch das kardiale Ganz-Organ-Tissue Engineering prinzipiell möglich ist. Diese Arbeit legte viel Hoffnung in die angewandten Methoden, die geeignetste in einem Breiten Feld möglicher Methoden zu sein. Nichtsdestotrotz zeigte diese Arbeit jedoch auch den immensen Bedarf an weiteren Arbeiten und Experimenten, zur weiteren Erforschung der Methoden, mit dem Ziel diese zu optimieren, und bekannte Limitationen überwinden zu können.

Wie Badylak, Taylor und Uygun in ihrem Übersichtsartikel beschreiben, scheint die Methode der 3D-Trägermatrix-Gewinnung mittels Dezellularisierung ganzer Organe das vielversprechendste Konzept im Bereich des Ganz-Organ-Tissue engineering zu sein, da es die wichtigsten Ziele einer 3D-Trägermatrix am ehesten erfüllt (Badylak et al., 2011). Möglichst geringe DNA-haltige Zellen, möglichst guter Erhalt der Matrix, und einfach und quasi unbegrenzt in der Herstellung. Allerdings könnte dieses Konzept in naher oder mittlerer Zukunft, durch ein Konzept mittels 3D-Bioprinting beziehungsweise 4D-Bioprinting ergänzt werden, oder irgendwann gegebenenfalls von diesem ersetzt werden. In jedem Fall scheint folgende Hypothese zu gelten: Auch wenn weiterhin ein Mangel an Spenderorganen vorliegt, so scheint zumindest kein Mangel an Ansätzen oder möglichen Innovationen für die Lösung eines solchen Problems vorzuliegen. Betrachtet man die rasante Entwicklung, den Fortschritt,

die Innovationen, den gemeinsamen Ehrgeiz und das gemeinsame Bestreben aller beteiligten Parteien dem Schritt eines Ganz-Organ Tissue Engineering Organs näher zu kommen, so kann dies nur berechtigt Anlass zur Hoffnung geben, dieses Ziel möglichst bald zu erreichen.

### 1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Eines der Hauptziele des Tissue Engineering ist die Erschaffung eines teilweisen und vor allem eines vollständigen Organ-Ersatzes. Dabei postulierten Langer und Vacanti drei wesentliche Bereiche des Tissue Engineering: das Zell-Matrix-Gerüst, die Re-Besiedlung mit Zellen und das Zellwachstum beeinflussende Faktoren (wie z.B. Wachstumsfaktoren). In dieser Arbeit wird der Fokus besonders auf das Zell-Matrix-Gerüst, die Re-Zellularisierung und die Re-Kultivierung gelegt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, grundlegend die Re-Besiedlung und die Re-Kultivierung von zuvor dezellularisierten Ratten-Herzen weiter zu erforschen.

Hierbei sollte eine neue Methode der Re-Besiedlung, die vaskuläre und interstitielle simultane konsekutive Re-Besiedlung mit zwei unterschiedlichen Zellarten, mit Endothelzellen (Human umbilical vein cells = HUVECs) und mit neonatalen Kardiomyozyten (CMCs), mit anschließender Re-Kultivierung auf zwei unterschiedliche Arten, statisch und perfundiert. Zudem soll gezeigt werden, welche dieser beiden Re-Kultivierungsarten überlegen ist.

Die Fragestellungen beinhalten die Etablierung der neuen Re-Besiedlungsmethode und den Vergleich der beiden Re-Kultivierungs-Methoden.

Die Auswertung erfolgte nach Weiterverarbeitung der dezellularisierten, co-re-besiedelten und re-kultivierten Herzen in vier verschiedene Bereiche (Linker Ventrikel, rechter Ventrikel, Septum und Apex) histologisch, immunhistologisch und mittels Live-Dead-Assay. Dies geschah sowohl qualitativ, als auch quantitativ anhand von Zellzahl und Zelldichte, die mittels automatisierter Zellzählung mit Fiji ImageJ bestimmt wurden.

Die Zielsetzungen dieser Arbeit beruhen auf Fragestellungen, an denen sich der Versuchsaufbau und die Methodik orientieren, und für deren Beantwortung die Ergebnisse dienen. Im Kapitel „Übersicht“ der Diskussion werden diese Fragestellungen wieder aufgegriffen. Im Folgenden sind die Fragestellungen in einer Übersicht dargestellt.

Folgende Fragestellungen sollen bearbeitet werden:

1. Etablierung einer neuen Co-Re-Besiedlungsmethode

- a) Funktioniert die neue Art der vaskulären und interstitiellen simultan konsekutiven Co-Re-Besiedlung?

Beurteilung qualitativ anhand von Vorhandensein von beiden Zellarten, HUVECs und CMCs innerhalb der Matrix nach 4 Tagen Re-Kultivierung

- b) Ist die neue Art der Co-Re-Besiedlung geeignet für weitere Versuche?

Beurteilung anhand von qualitativer Einschätzung der Co-Re-Besiedlung hinsichtlich Zellzahl und Zellverteilung innerhalb der re-besiedelten Matrix

2. Vergleich zweier unterschiedlicher Re-Kultivierungsmethoden perfundiert vs. statisch

- a) Funktionieren die beiden Re-Kultivierungsarten nach Co-Re-Beurteilung?

Beurteilung qualitativ anhand von Kriterium von 1a

- b) Welche der beiden Re-Kultivierungsarten, perfundiert vs. statisch, ist besser für eine Re-Kultivierung geeignet?

Beurteilung qualitativ und quantitativ anhand von automatisierter Bild-Analyse und Vergleich der beiden Versuchsgruppen, perfundiert vs. statisch, hinsichtlich Zellzahl und Zelldichte der einzelnen histologischen Schnitte der co-re-besiedelten

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Technisches Equipment

| Produkt                      | Hersteller                             | Referenznummer |
|------------------------------|----------------------------------------|----------------|
| Application Suite V.3.7      | Leica, Wetzlar                         |                |
| Autoklav                     | Systec, Wetztenberg                    | VX-95          |
| Brutschrank, HERA Cell       | Thermo Fisher Scientific, Braunschweig | 240i           |
| Durchlicht Mikroskop         | Leica, Wetzlar                         | DM2000         |
| Fluoreszenzlampe DFC425C     | Leica, Wetzlar                         |                |
| HeraSafeKS 18, Sterilbank    | Thermo Scientific, Braunschweig        | 51022712       |
| Konfokalmikroskop            | Carl Zeiss, Jena Reichert-Jung,        | LSM 700        |
| Mikroskop DMIL LED           | Leica, Wetzlar                         |                |
| Mikrotom / Kryostat          | Leica, Wetzlar                         | CM1950         |
| Mini-Zentrifuge              | Carl Roth, Karlsruhe                   |                |
| Pipettierhelfer Accu Jet     | Brand, Wertheim                        |                |
| Saugpumpe Laboport           | KNF Lab, New Jersey, USA               |                |
| Waage BP                     | Sartorius, Göttingen                   | 110 S          |
| Wärmebad                     | GFL, Hannover                          | 1092           |
| Zentrifuge                   | Eppendorf, Hamburg                     | 5804 R         |
| Zentrifuge Labofuge          | Thermo Scientific, Braunschweig        | 300            |
| Zentrifuge, Heraeus Sepatech | Thermo Scientific, Braunschweig        | Megafuge 10    |
| Zentrifugen                  | Hettich, Tuttlingen                    | Universal 16   |

Tabelle 1: Technisches Equipment

### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

| Produkt                                               | Hersteller                               | Referenznummer |
|-------------------------------------------------------|------------------------------------------|----------------|
| 0,45µl Minisart Filter                                | Sartorius, Göttingen                     | 16555          |
| 10 ml Spritze                                         | B. Braun SE, Melsungen                   | 4606108V       |
| 1ml Spritze                                           | B. Braun SE, Melsungen                   |                |
| 20 ml Spritze                                         | B. Braun SE, Melsungen                   | 4606205V       |
| 2ml Spritze                                           | B. Braun SE, Melsungen                   |                |
| 5 ml Spritze                                          | B. Braun SE, Melsungen                   | 4606051V       |
| 50 ml Falcon CellStar Tubes,                          | Greiner Bio One,<br>Frickenhausen        | 227261         |
| 50 ml Falcon Tubes,                                   | Sarstedt, Nümbrecht                      | 62559001       |
| 50 ml Spritze                                         | B. Braun SE, Melsungen                   | 8728852F       |
| 5ml Spritze                                           | B. Braun SE, Melsungen                   |                |
| 6-Well Plate, CytoOne                                 | Starlab, Hamburg                         | CC7672         |
| Aqua dest., Ecotainer                                 | B. Braun SE, Melsungen                   | 0082479E       |
| Bevelled Filter Tip (Sterile),<br>100 µl              | Star Lab, Hamburg                        | S1120          |
| Bevelled Filter Tip, 20 µl                            | Star Lab, Hamburg                        | NS1120         |
| Chirurgisches Besteck                                 | Aesculap                                 |                |
| Chirurgisches Nahtmaterial,<br>3-0 Prolene monofil    | Ethicon, Norderstedt                     | Eh7694H        |
| Chirurgisches Nahtmaterial,<br>4-0 Prolene monofil    | Ethicon, Norderstedt                     | Eh7411         |
| Chirurgisches Nahtmaterial,<br>5-0 PDS II monofil     | Ethicon, Norderstedt                     | Z863           |
| Cryotubes, 2,0 ml Stripetten<br>5 ml Stripetten 10 ml | VWR, Darmstadt                           | 479            |
| DPBS 500 ml                                           | Gibco by Life Technologies,<br>Darmstadt | 14190          |
| Falcon Tube 15ml                                      | Sarstedt, Nümbrecht                      | 62559001       |
| Falcon Tube 50ml                                      | Greiner Bio One,<br>Frickenhausen        | 227261         |
| Filter Tip (Sterile), 1000 µl                         | Star Lab, Hamburg                        | S1120          |
| Graduated Filter Tip (Sterile),<br>200 µl             | Star Lab, Hamburg                        | S1123          |

|                                                     |                                        |             |
|-----------------------------------------------------|----------------------------------------|-------------|
| Graduated, Filter Tip, TipOne, 10 µl                | Star Lab, Hamburg                      | S1121       |
| Handschuhe                                          | Ansell Healthcare                      | 92-600      |
| Infusionslösung Jonosteril 500 ml                   | Fresenius Kabi, Bad Homburg            | 61002850000 |
| Kanüle 30 G                                         | B. Braun SE, Melsungen                 | 4656300     |
| Mikroskop Deckgläser                                | Engelbrecht, Edermünde                 | k12450      |
| Mikroskop Objektträger                              | Marienfeld, Lauda Königshofen          | 08 100 00   |
| OP-Abdecktuch                                       | L&R, Rengsdorf                         | 33010       |
| OP-Abdecktuch                                       | L&R, Rengsdorf                         | 33010       |
| Petrischale, CytoOne, 100 x 20 mm                   | Starlab, Hamburg                       | CC7672      |
| Semper Med Nitra-Tex Handschuhe, Micro Touch        | Ansell, München                        | 700113      |
| Sterile Latex Handschuhe                            | Semperit, Wien                         | 822751721   |
| Steritopfilter                                      | Millipore Corp., Merck, Darmstadt Art. | SCGPT05RE   |
| Stripette 10 ml                                     | Corning, Massachusetts                 | 4488        |
| Stripette 25 ml                                     | Corning, Massachusetts                 | 4489        |
| Stripette 5 ml                                      | Corning, Massachusetts                 | 4487        |
| Zellkulturflasche (T-225cm <sup>2</sup> ), Cellstar | Greiner Bio One, Frickenhausen         | 353139      |
| Zellkulturflasche (T-75cm <sup>2</sup> ), Cellstar  | Greiner Bio One, Frickenhausen         | 658175      |
| Zellkulturflaschen (groß) (175cm <sup>2</sup> )     | Greiner Bio One, Frickenhausen         | 660160      |
| Zellkulturflaschen (klein) (25cm <sup>2</sup> )     | Greiner Bio One, Frickenhausen         | 690160      |
| Zellkulturflaschen (mittel) (75cm <sup>2</sup> )    | Greiner Bio One, Frickenhausen         | 658170      |
| Zentrifugengefäß 1,5 ml                             | Kisker Biotech, Steinfurt              | G052BP      |
| Zentrifugengefäß, 2,0 ml                            | Kisker Biotech, Steinfurt              | G053BP      |

**Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien**

### 2.1.3 Chemikalien, Reagenzien

| Produkt                                           | Hersteller                               | Referenznummer |
|---------------------------------------------------|------------------------------------------|----------------|
| <b>Gewinnung von Ratten-Herzen</b>                |                                          |                |
| Chirurgisches Nahtmaterial<br>Prolene monofil 3-0 | Ethicon, Norderstedt                     | Eh7694H        |
| Heparin                                           | Ratiopharm, Ulm                          | 5394.02.00     |
| Ketamin                                           | Bayer, Leverkusen                        | 61879260000    |
| Perfusor Spritze 50 ml                            | Braun, Melsungen                         | 8728852F       |
| Xylazin 2 %                                       | Bayer, Leverkusen                        | 62938410000    |
| <b>Dezellularisierung</b>                         |                                          |                |
| 1 Liter Vorratsflasche, Schott<br>Duran           | Schott, Mainz                            | 801 54 5       |
| 2 Liter Vorratsflasche, Schott<br>Duran           | Schott, Mainz                            | 801 63 5       |
| Betasisadon, Povidon-Iod                          | Mundipharma, Limburg                     |                |
| Desoxycholsäure, DCA                              | Merck, Darmstadt, Art.-Nr.:              | 106504         |
| L-Glutamine 200 mM 100 ml                         | Gibco by Life Technologies,<br>Darmstadt | 25030024       |
| Natriumazid                                       | Carl Roth, Karlsruhe                     | K305.2         |
| Penicillin/Streptomycin 100ml                     | Gibco by Life Technologies,<br>Darmstadt | 15140122       |
| pVK Vasofix 17G                                   | Braun, Melsungen                         | 4268156S-01    |
| Sodiumdodecylsulfate, SDS                         | Carl Roth, Karlsruhe                     | CN-30.4        |
| Triton X                                          | Sigma Aldrich, München                   | T9284-500ML    |
| Trypsin-EDTA 100 ml (0,25%)                       | Gibco by Life Technologies,<br>Darmstadt | 25200056       |
| <b>Zellkultur</b>                                 |                                          |                |
| DMEM                                              | Sigma Aldrich, München                   | D5030          |

|                                    |                                        |            |
|------------------------------------|----------------------------------------|------------|
| ECGM (Endothel Cell Growth Medium) | Promo Cell, Heidelberg                 | C-22010    |
| FCS (Kalbserum)                    | Sigma Aldrich, München                 | 12133C     |
| Gelatine                           | Sigma Aldrich, München                 | G9391      |
| Medium Supplement Mix              | Promo Cell, Heidelberg                 | C-39215    |
| PBS                                | Gibco by Life Technologies, Darmstadt  | 14190144   |
| Penicillin/ Streptomycin           | Thermo Fisher Scientific, Braunschweig | 11548876   |
|                                    |                                        |            |
| <b>Histologie</b>                  |                                        |            |
|                                    |                                        |            |
| CryoCompound Frozen Tissue Medium  | Klinipath, Duiven, Niederlande         | 1620C      |
| DAKO-Pen                           | DAKO, Agilent, USA                     | S2002      |
| DAPI                               | Vector Labs                            | H1200-10   |
| Deckgläser                         | Engelbrecht, Edermünde                 | k12450     |
| Einbettschalen                     | Medite, Burgdorf                       | 48-6302-00 |
| Eindeckmedium Roti HistoKitt       | Carl Roth, Karlsruhe                   | 6638.1     |
| Eosin G                            | Carl Roth, Karlsruhe                   | 7089.1     |
| Essigsäure                         | Carl Roth, Karlsruhe                   | 3738.1     |
| Essigsäure 100 %                   | Merck, Darmstadt                       | 100066     |
| Essigsäure 96 %                    | Merck, Darmstadt                       | 100058     |
| Ethanol 70%                        | Carl Roth, Karlsruhe                   | T913.3     |
| Ethanol 99,9%                      | Carl Roth, Karlsruhe                   | K928.4     |
| Formaldehyd 4%                     | Carl Roth, Karlsruhe                   | HT501128   |
| Hämatoxylin                        | Sigma Aldrich, München                 | H3136- 25G |
| Objektträger                       | Marienfeld, Lauda Königshofen          | 08 100 00  |
| Objektträger Super Frost Plus      | R. Langenbrink, Emmendingen            | 03-0060    |
| Xylol                              | VWR Chemicals, Braunschweig            | 28975      |

**Tabelle 3: Chemikalien, Reagenzien**

#### 2.1.4 Antikörper

| Produkt                                                      | Hersteller                               | Konzentration |
|--------------------------------------------------------------|------------------------------------------|---------------|
| Alexa-Fluor-488 goat anti-mouse                              | Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt | 1:200 µl      |
| Alexa-Fluor-555 anti-rabbit                                  | Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt | 1:200 µl      |
| Anti-alphaSMA anti-mouse (Fibroblasten)                      | Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt | 1:300 µl      |
| Anti-Crdiac-Actinin-Antikörper (Kardiomyozten)               | Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt | 1:300 µl      |
| Anti-Human-von-Willebrand-Faktor-Antikörper (Endothelzellen) | Dako, Glostrup, Dänemark                 | 1:300 µl      |
| Anti-Myosin-anti-rat-Antikörper (Kardiomyozten)              | Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt | 1:300 µl      |
| Anti-Troponin-anti-rat-Antikörper (Kardiomyozten)            | Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt | 1:300 µl      |
| Anti-Vimentin-anti-mouse-Antikörper (Fibroblasten)           | Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt | 1:300 µl      |
| Anti-Connexin-anti-mouse-Antikörper (Fibroblasten)           | Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt | 1:300 µl      |
| Cell Tracker CMFDA                                           | Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt | C2925         |
| Cell Tracker CMPTX                                           | Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt | C34552        |
| Live/Dead-Assay Viability/Cytotoxicity Kit                   | Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt | L3224         |

**Tabelle 4: Antikörper**

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Gewinnung von Ratten-Herzen

#### *Fachkundenachweis und Tierversuchsgenehmigung*

Für alle Versuche dieser Arbeit mit Spendertieren liegt ein gültiger Fachkundenachweis für die Tierversuchskunde (§9 Tierschutzgesetz) vor, der mittels Teilnahme an einem Kurs für Versuchstierkunde (40 Stunden) an der Tierversuchsanlage der HHU Düsseldorf erworben. Für alle Entnahmen von Organen bzw. Herzen wurden durch das LANUV NRW (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen) genehmigt (Aktenzeichen-Nummer: O89/12) und sind entsprechend den Vorgaben erfolgt.

#### *Tiermodell*

Für die Gewinnung von Ratten-Herzen für die nachfolgende Ganz-Herz-Dezellularisierung wurden als Spendertiere männliche gesunde Wistar-Ratten mit einem Lebendgewicht von 350 g bis 450 g verwendet und wurden über die Tierversuchsanlage der HHU Düsseldorf bezogen.

#### *Ort der Entnahme*

Die Entnahme der Ratten-Herzen erfolgten im Operationssaal für Kleintiere im Labor des Instituts für experimentelle Chirurgie der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie des Universitätsklinikum Düsseldorf. Die Entnahmen erfolgten anhand eines standardisierten Protokolls, welches im Folgenden aufgeführt ist (Tabelle 5).

#### *Protokoll für die Entnahme von Rattenherzen*

| Nr. | Schritt                                                                                                      |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1   | Narkose mit Isofluran-Gas und Beatmung mit einer Mischung aus Sauerstoff und Isofluran                       |
| 2   | Analgesie mittels intraperitonealer Gabe von 0,4ml Ketanest und 0,2ml Xylazin                                |
| 3   | Chirurgische Eröffnung des Abdomen mittels zentralem Vertikalschnitt und Präparation der Aorta und Vena cava |

|           |                                                                                                                                                                                                      |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>4</b>  | Antikoagulation mittels intra-cavaler Gabe von Heparin-Natrium 0,2ml 5000IE/ml = 1000IE                                                                                                              |
| <b>5</b>  | Euthanasie der Ratte mittels Inzision der Aorta und Vena cava nach Einwirkzeit der Heparin-Natrium-Lösung von ca. 5 Minuten.                                                                         |
| <b>6</b>  | Mediale Sternotomie und Präparation des Ratten-Herzens                                                                                                                                               |
| <b>7</b>  | Explantation des Ratten-Herzens                                                                                                                                                                      |
| <b>8</b>  | Zwischenlagerung der Herzen in Falcons mit PBS                                                                                                                                                       |
| <b>9</b>  | Narkose mit Isofluran-Gas und Beatmung mit einer Mischung aus Sauerstoff und Isofluran                                                                                                               |
| <b>10</b> | Analgesie mittels intraperitonealer Gabe von 0,4ml Ketanest und 0,2ml Xylazin                                                                                                                        |
| <b>11</b> | Chirurgische Eröffnung des Abdomen mittels zentralem Vertikalschnitt und Präparation der Aorta und Vena cava                                                                                         |
| <b>12</b> | Antikoagulation mittels intra-cavaler Gabe von Heparin-Natrium 0,2ml 5000IE/ml = 1000IE                                                                                                              |
| <b>13</b> | Euthanasie der Ratte mittels Inzision der Aorta und Vena cava nach Einwirkzeit der Heparin-Natrium-Lösung von ca. 5 Minuten.                                                                         |
| <b>14</b> | Mediale Sternotomie und Präparation des Ratten-Herzens                                                                                                                                               |
| <b>15</b> | Explantation des Ratten-Herzens                                                                                                                                                                      |
| <b>16</b> | Kanülierung des Herzens mittels Kanülierung der Aorta ascendens mit 17G-Kanüle bis vor die Aortenklappe, jedoch distal davon, Fixierung der Kanüle am Ratten-Herz auf Höhe der supraaortalen Abgänge |
| <b>17</b> | Spülung des Herzens mit Heparin-Natrium-Lösung (10.000 IE mit 40ml) zur Vermeidung von Koagulation und Testung der erhaltenen Perfusion-Fähigkeit des Ratten-Herzens                                 |
| <b>18</b> | Zwischenlagerung der Herzen in Falcons mit PBS                                                                                                                                                       |

**Tabelle 5: Protokoll Explantation Ratten-Herzen**

Der gesamte Prozess der Explantation wurde möglichst zügig und kontinuierlich, ohne Zeitverzögerung durchgeführt. Es wurde stets dem Tierschutzgesetz entsprechend verfahren.

### 2.2.2 Dezellularisierung von Ganz-Herzen (Ratte)

#### *Gewinnung einer 3-dimensionalen extrazellulären Matrix*

Die Dezellularisierung ist eine biologische Methode zur Gewinnung einer extrazellulären Matrix eines Organs. Dabei werden jegliche DNA-haltige Zellstrukturen aus dem jeweiligen Organ entfernt mittels einer speziell hierfür entwickelten Dezellularisierungs-Lösung. Übrig bleibt die weißliche, fast durchsichtige ECM (extrazelluläre Matrix) des Organs, bestehend aus einer großen Anzahl von Proteinen wie Kollagen Typ 1, Fibrin, Elastin, Laminin und Zucker wie Glycosaminoglykane. Diese ECM entsteht ursprünglich während der Organentwicklung und wird von den sie umgebenden spezifischen Zellen produziert und verändert sich im Laufe der Zeit leicht. Sie stellt im Wesentlichen das Grundgerüst eines jeden Organs dar und bestimmt dessen Form und Struktur. Dabei ist die Zusammensetzung von kritischer Bedeutung, da sie auch eine wichtige Rolle für das Zellwachstum spielt und mit Zellen interagiert. Der große Vorteil der Dezellularisierung im Gegensatz zu alternativen Methoden besteht im Erhalt der nativen ECM eines Organs. Im Bereich des kardialen Tissue engineering ist dies besonders wichtig, da sie so den Erhalt des komplexen Gefäßsystems und der komplexen biomechanischen Struktur des Herzens ermöglicht. Gleichzeitig ist sie in der Lage die Zellen des Spenders zu entfernen, um möglichen Immunabstoßungsreaktionen des Empfängers vorzubeugen. Es existieren verschiedenen Varianten der Dezellularisierung: chemisch, enzymatisch und physikalisch. Zudem kann sie Perfusions-basiert oder Diffusions-basiert erfolgen. In dieser Arbeit wurde die chemische Detergenzien-basierte Perfusions-basierte Dezellularisierung angewandt.

In dieser Arbeit wurde diese Methode verwendet, um die Zellen aus dem zuvor explantierten Ratten-Herz zu entfernen und ein ECM-Gerüst zu erhalten, welches dann mit neuen Zellen re-besiedelt werden kann. Hierzu wird das Ratten-Herz nach entsprechender Präparation in einer sterilen speziell hierfür entwickelten Dezellularisierungs-Anlage mit der Dezellularisierungs-Lösung über insgesamt eine Woche aortal re-perfundiert. Es wurde nach einem speziell hierfür entwickelten Protokoll vorgegangen, welches bis zu diesem Zeitpunkt entsprechend den Anforderungen einer Ratten-Herz-Dezellularisierung stetig weiter entwickelt wurde (Aubin et al., 2013a).

#### *Dezellularisierungs-Lösung*

Für die Dezellularisierung im kardialen Tissue engineering ist der Erhalt der Matrix und der Gefäßstruktur besonders wichtig. Daher besteht bei der Auswahl der geeigneten

Dezellularisierungs-Lösung immer eine Abwägung zwischen effizientem Auswaschen der DANN-haltigen Strukturen und dem Erhalt der Matrix.

Die Dezellularisierungs-Lösung besteht aus folgenden Inhaltsstoffen: Triton-X-100 (TX100), Natriumacid ( $\text{NaN}_3$ ), Penicillin-Streptomycin (PS), Phosphat-buffered saline (PBS), Aqua-Dest. ( $\text{H}_2\text{O}$ ).

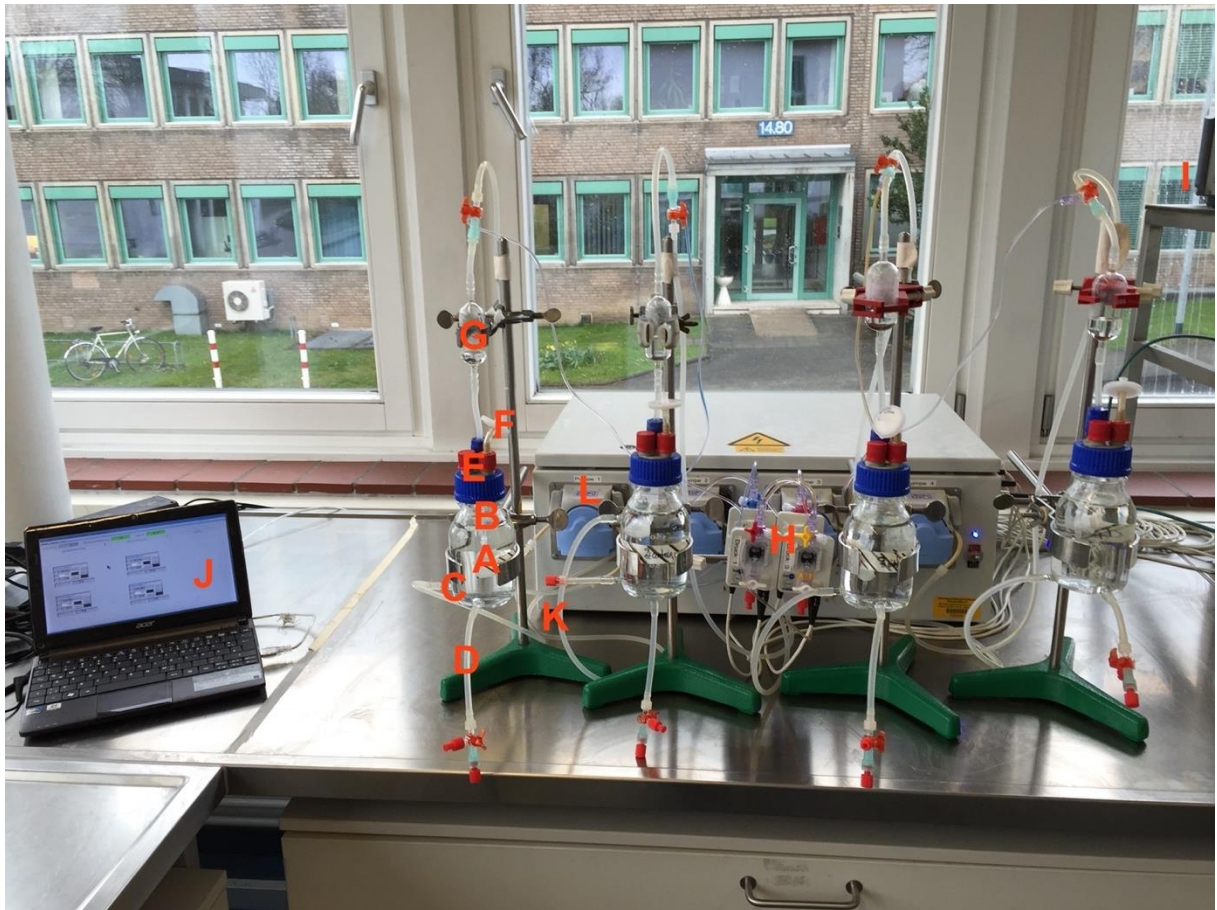
Das unter dem Handelsnamen bekannte Triton-X-100 ( $\text{C}_{33}\text{H}_{60}\text{O}_{10}$ ) ist ein nicht-ionisches Tensid aus der Gruppe der Octylphenoethoxydate. Der Wirkstoff ist Octoxinol-9. Es ist in der Lage, das DNA-Schmelzverhalten zu verändern und relativ schonend DNA-haltige Strukturen aus der extrazellulären Matrix zu lösen, ohne dabei Proteine zu denaturieren.

Der Inhaltsstoff Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) fungiert als Salz der Stickstoffwasserstoffsäure als Biozid und antimikrobieller Wirkstoff. In den Versuchen soll es so dem Wachstum von Mikroben entgegenwirken.

Penicillin ist ein Beta-Lactam-Antibiotikum und eines der wichtigsten Antibiotika in der Medizin. Streptomycin ist ein Aminoglykosid-Antibiotikum weist eine größere Breite des Bakteriellen Spektrums auf. Zusammen in dieser Kombination wurden diese beiden Antibiotika verwendet, um eine anti-bakterielle Wirkung zu erzielen.

Phosphat-buffered-saline (PBS) dient als Puffer-Substanz, in der Penicillin-Streptomycin gelöst werden.

Aqua dest. Ist destilliertes Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ), welches zur Zwischenspülung verwendet wurde.



**Abb. 2: vollautomatisierte, standardisierte, druck-kontrollierte Dezellularisierungs-Anlage in Original-Aufbau**

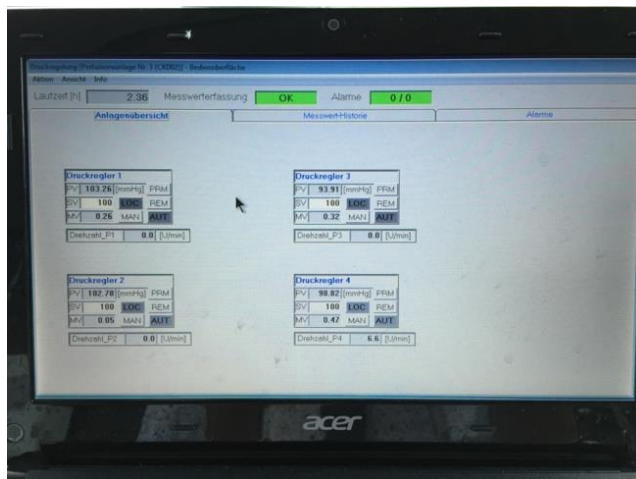
A: Ratte-Herz für Perfusion; B: Verbindung von Kanüle und Konnektor; C: zirkulierende Perfusionsflüssigkeit = Dezellularisierungslösung; D: eine untere Öffnung der Perfusionsflasche für Lösungswechsel; E: Spezialdeckel der Perfusionsflasche; F: Filter für Druckausgleich im Spezialdeckel; G: Luftglasflasche für Vermeidung von Blasenbildung; H: Druckmessgerät innerhalb des Systems; I: Modul zur Erfassung der Messwerte und Steuerung; J: Laptop mit Steuerungssoftware; L: Rollerpumpensystem; K: Schlauchsystem



**Abb. 1: speziell modulierte Perfusionsflasche mit Spezialdeckel und Ventil und Filter**



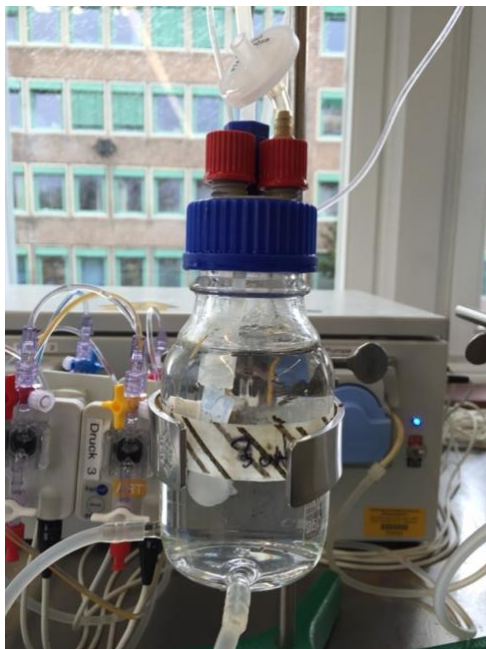
**Abb. 3: Messgeräte für Druckerfassung und Steuerung**



**Abb. 4: Screenshot des Laptops (Acer) zur Steuerung der Perfusion-Dezellarisierungs-Anlage mit Software**



**Abb. 5: Darstellung einer 2L großen Glasflasche von Schott zur Wiederauffüllung der Dezellarisierungs-Lösung**



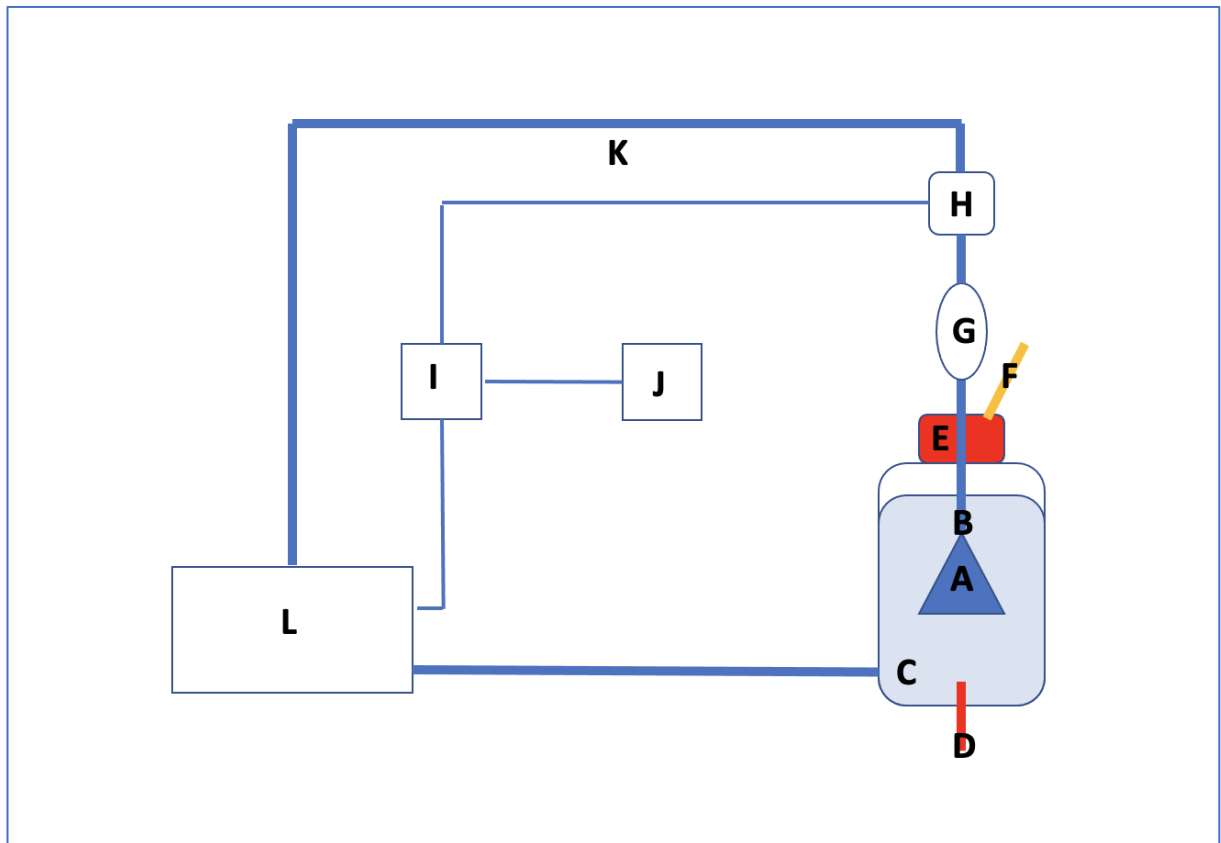
**Abb. 7: Exemplarische Darstellung einer standardisierten modulierten Perfusionsflasche**



**Abb. 6: Ratten-Herz innerhalb der Perfusionsflasche während der Langzeit-Perfusions-Dezellarisierung**

mit aortaler Kanüle befestigt am Luer-Lock-Konnektor innerhalb der speziell modulierten Perfusionsflasche

### Dezellularisierungs-Anlage (Schemazeichnung)



**Abb. 8: Schemazeichnung der Dezellularisierungs-Anlage mit den essentiellen Komponenten**

A: Ratte-Herz für Perfusion; B: Verbindung von Kanüle und Konnektor; C: zirkulierende Perfusionsflüssigkeit = Dezellularisierungslösung; D: eine untere Öffnung der Perfusionsflasche für Lösungswechsel; E: Spezialdeckel der Perfusionsflasche; F: Filter für Druckausgleich im Spezialdeckel; G: Luftglasflasche für Vermeidung von Blasenbildung; H: Druckmessgerät innerhalb des Systems; I: Modul zur Erfassung der Messwerte und Steuerung; J: Laptop mit Steuerungssoftware; L: Rollerpumpensystem; K: Schlauchsystem

### Dezellularisierungs-System

Für die Dezellularisierung eines Ganz-Herzen nach dem verwendeten Protokoll ist es notwendig, dass die retrograde aortale Perfusion dauerhaft über ca. 4 Tage statt findet. Hierfür wurde eine von der Arbeitsgruppe um Prof. Lichtenberg, Prof. Akhyari und PD. Dr. Aubin entwickelte automatisierte Perfusions-Dezellularisierungs-System, welches eine standardisierte automatisierte Langzeitperfusion von bis zu 2x 4 Ratten-Herzen ermöglicht. Diese speziell für den Zweck der kardialen Ganz-Organ Langzeit-Perfusions-Dezellularisierung konzipierte Anlage inklusive der hier genannten Hard- und Software Komponenten wurde von

der Arbeitsgruppe zusammen mit der engineo GmbH (Gustavsburg) entwickelt und etabliert. Der Aufbau dieser Perfusionsanlage ist im Folgenden beschrieben.

Die Perfusionsanlage besteht aus folgenden Bestandteilen: Flaschensystem bestehend aus vier Perfusionsflaschen, Schlauchsystem (Abb. 8, K) bestehend aus sterilen Schläuchen, Pumpsystem (Abb. 8, L) bestehend aus vier kreisförmigen Pumpen, einem Modul zur Messwerterfassung und Steuerung (Abb. 8, I) und einer Computersteuerung (Abb. 8, J) bestehend aus einem Laptop und einer speziellen Software. Hierbei wird ein steriler standardisierter, automatisierter, druck-kontrollierter und computer-gesteuerter Pumpkreislauf erzeugt, der die Ratten-Herzen dauerhaft perfundiert.

Das Flaschensystem besteht aus 4 speziell modulierten Perfusionsflaschen in der Größe 250 ml von der Firma Schott. (Abb. 8, rechte untere Schemaartige Flasche) (Abb. 5) In diese Perfusionsflasche kann das Ratten-Herz (Abb. 8, A) (Abb. 4) steril eingebracht und anschließend perfundiert werden. Die Perfusionsflasche weist drei Öffnungen auf, eine an der Oberseite (Abb. 8, E), zwei an der unteren Vorderseite. Über die Öffnung an der Oberseite besteht durch einen speziellen Flaschendeckel (Abb. 8, E) (Abb. 3) hindurch eine Verbindung zum Schlauchsystem (Abb. 8, K), welches wiederum durch das Pumpsystem (Abb. 8, L) verläuft. Diese Verbindung durch den Flaschendeckel enthält an der Unterseite einen Anschluss (Luer-Lock-Anschluss) (Abb. 8, B), an den der periphere Verweilkatheter des explantierten Herzens befestigt werden kann. Die eine Öffnung an der unteren Vorderseite der Perfusionsflasche wird genutzt, um eine Wiedereinspeisung der perfundierten Dezellularisierungs-Lösung zu ermöglichen. Über die zweite Öffnung an der unteren Vorderseite (Abb. 8, D) kann Lösung im Rahmen eines Lösungswechsels abgelassen werden. Bei Start der Perfusion sollte die Dezellularisierungs-Lösung (ca. 120 ml) (Abb. 8, C) die Flasche fast komplett ausfüllen, damit das Ratten-Herz vollständig davon bedeckt ist. Um einen Druckausgleich zu gewährleisten, befindet sich am Flaschendeckel ein Druckausgleichs-Ventil (Abb. 8, F). Dieses enthält zudem einen Filter (25  $\mu$ m), um die zirkulierende Luft steril zu halten. Oberhalb der Perfusionsflasche enthält das Schlauchsystem eine kleine Aussackung aus Glas (Abb. 8, G), welches der Bildung von Luftblasen entgegenwirken soll.

Die Dezellularisierungs-Lösung wird in sterile zuvor autoklavierte 2L große Glasflaschen (Abb. 7) gefüllt und von dort aus über die Öffnung an der unteren Vorderseite der Perfusionsflasche in diese und damit in das gesamte Schlauchsystem gebracht. Auch diese Flaschen haben einen speziellen Flaschendeckel, der ein Ventil mit Filter enthält.

Das Schlauchsystem (Abb. 8, K) besteht aus einer Reihe von Silikon-Schläuchen, die durch die Pumpen und die Perfusionsflaschen verlaufen, um einen Kreislauf der Dezellularisierungs-Lösung herzustellen. Dabei verlaufen die Schläuche halbkreisförmig jeweils um eine von den

vier kreisförmigen Pumpen, die so den notwendigen Perfusionsdruck für das System aufbauen zu können. Zur Überwachung des Perfusionsdruckes ist ein Druckmessgerät (Abb. 8, H) (Abb. 2) innerhalb des Schlauchsystems vorhanden, welches mittels 3-Wege-Hahn mit diesem verbunden ist.

Das Pumpsystem (Abb. 8, L) besteht aus vier kreisförmigen, flachen Rollpumpen, die in einem gesicherten Kasten eingelassen sind. Um jede dieser vier Pumpen verläuft jeweils Schlauch des Schlauchsystems halbkreisförmig. Die Pumpe ist in der Lage, durch Drehung und Zusammendrücken des Schlauches einen Fluss der Dezellularisierungs-Lösung mit entsprechendem Perfusions-Druck zu erzeugen.

Das Computersystem besteht aus einem Laptop (Acer) (Abb. 6) mit dem Betriebssystem Windows XP von Microsoft und einer speziell entwickelten Perfusions-Software (engineo GmbH). Es dient der Kontrolle und Steuerung des Pumpsystems. Die Software ermöglicht einen automatisierten und standardisierten Dezellularisierungs-Prozess, in dem es die Parameter Flussgeschwindigkeit und Perfusionsdruck festlegt und überwacht. Dies geschieht mit Hilfe des oben erwähnten Drucksensors, der die notwendigen Daten an das Computersystem liefert.

#### *Prozess der kardialen Perfusions-Dezellularisierung*

Nach Explantation und Spülung der Ratten-Herzen werden diese in die Perfusionsflaschen der Dezellularisierungs-Anlage steril überführt, in dem die Kanüle des Herzens an den Anschluss der Perfusionsflasche (Luer-Lock-Verbindung) befestigt wird. Nach Aufbau der vollständig sterilen und autoklavierten Dezellularisierungs-Anlage, der wie oben beschrieben durchgeführt wird, wird die kardiale Dezellularisierung nach Dezellularisierungs-Protokoll mittels des Computersystems gestartet.

Der Perfusionsdruck wurde zuvor festgelegt auf 77,5 mmHg und vom Computersystem über die gesamte Dauer des Prozesses aufrechterhalten. Dies geschah mit Hilfe einer automatisierten Anpassung der Flussgeschwindigkeit über Steuerung der Pumpen. Jegliche Daten zur Dezellularisierung werden in der Software aufgezeichnet.

Der gesamte Prozess dauert ca. 4 Tage nach standardisiertem unten aufgeführten Protokoll. Am ersten Tag wird die Anlage aufgebaut und die Dezellularisierungs-Lösung angesetzt, nach Protokoll in Tabelle 6. Danach wird die Anlage gestartet und läuft bis zum 5. Tag. Am 2. Tag werden vier Lösungswechsel durchgeführt: Aqua Dest. 3,5h; Aqua Dest. 30min; Triton-X 30min-1h; PBS+NaN<sub>3</sub>. Am 3. Und 4. Tag finden jeweils weitere Lösungswechsel statt, mit

PBS+PS. Am letzten Tag wird die Anlage gestoppt und die Herzen werden steril entnommen. Nach Entnahme fand die Lagerung in PBS + PS in 50 ml Flacons im Kühlschrank bei einer Temperatur von 4° C gelagert (Tabelle 6) (Tabelle 7).

*Protokoll Dezellularisierung Ganz-Herzen von Ratten*

| Nr. | Schritt                                  |
|-----|------------------------------------------|
|     | <b><u>Mo</u></b>                         |
| 1   | Aufbau (3h)                              |
| 2   | Lösungen ansetzen (0,5h)                 |
| 3   | Anlage starten                           |
|     |                                          |
|     | <b><u>Di</u></b>                         |
| 4   | Aqua Dest (15min) (3,5h)                 |
| 5   | Aqua Dest (30min)                        |
| 6   | Triton-X (30min-1h)                      |
| 7   | PBS + NaN <sub>3</sub> (über Nacht, 12h) |
|     |                                          |
|     | <b><u>Mi</u></b>                         |
| 8   | PBS + PS (1h)                            |
| 9   | PBS + PS (über Nacht, 12h)               |
|     |                                          |
|     | <b><u>Do</u></b>                         |
| 10  | PBS + PS (über Nacht) (0,5h)             |
|     |                                          |
|     | <b><u>Fr</u></b>                         |
| 11  | Herzen entnehmen                         |
| 12  | Abbau (2h)                               |

**Tabelle 6: Protokoll Dezellularisierung Ganz-Herzen von Ratten**

*Protokoll Dezellularisierung Ganz-Herzen von Ratten + Aufbau Dezellularisierungs-Anlage*

| Nr. | Schritt                                                                              |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------|
|     | <b><u>Mo</u></b>                                                                     |
| 1   | Lösungen ansetzen                                                                    |
| 2   | 2x Aqua Dest (2l Aqua Dest)                                                          |
| 3   | Triton-X (1,9l Aqua Dest + 20ml Triton-X)                                            |
| 4   | PBS + NaN <sub>3</sub> (1,9l Aqua Dest + 1g NaN <sub>3</sub> )                       |
| 5   | 3x PBS + PS (1,9l PBS + 20ml PS)                                                     |
| 6   | ◇ Flaschen autoklavieren (Programm: Flüssigkeiten 8)                                 |
|     |                                                                                      |
|     | <b><u>Di</u></b>                                                                     |
| 7   | Aqua Dest (15min)                                                                    |
| 8   | Aqua Dest (30min)                                                                    |
| 9   | Triton-X (30min-1h)                                                                  |
| 10  | PBS + NaN <sub>3</sub> (über Nacht) (NaN <sub>3</sub> erst kurz vorher hinzufügen)   |
|     |                                                                                      |
|     | <b><u>Mi</u></b>                                                                     |
| 11  | PBS + PS (PS erst kurz vorher hinzufügen, 20ml = 2 Falcons pro Flasche)              |
| 12  | PBS + PS (über Nacht) (PS erst kurz vorher hinzufügen, 20ml = 2 Falcons pro Flasche) |
|     |                                                                                      |
|     | <b><u>Do</u></b>                                                                     |
| 13  | PBS + PS (über Nacht) (PS erst kurz vorher hinzufügen, 20ml = 2 Falcons pro Flasche) |
|     |                                                                                      |
|     | <b><u>Fr</u></b>                                                                     |
| 14  | Abbau (Schlauchsystem abbauen, Herzen umsiedeln, Anlage spülen)                      |
| 15  | Anlage spülen und autoklavierbereit machen                                           |
| 16  | Mit Aqua Dest spülen                                                                 |
| 17  | Mit Ethanol spülen                                                                   |
| 18  | Flaschen mit Autoklavierband bekleben                                                |
| 19  | Flaschen in Autoklavierkorb stellen und ein Viertel aufdrehen                        |
| 20  | ◇ Flaschen autoklavieren (Programm: Festkörper 3)                                    |

**Tabelle 7: Protokoll Dezellularisierung Ganz-Herzen von Ratten + Aufbau der Dezellularisierungs-Anlage**

### 2.2.3 Zellkultur

Alle Zellkultur-Versuche wurden unter einer sterilen Zellkulturbank (Laminar Airflow) mit sterilen Instrumenten durchgeführt. Die anschließende Inkubation erfolgte in einem standardisierten Inkubator bei 37° Grad Celsius, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% und einer Luftfeuchtigkeit von 100%. Für die Zellkultur wurden standardisierte Zellkultur-Flaschen der Größe 75 cm<sup>2</sup> und 225 cm<sup>2</sup> verwendet. Die verwendeten Nährmedien für die jeweilige Zellart umfassten Endothelzellmedium (ECM, Promo-Cell, Heidelberg), Kardiomyozyten-Medium und Fibroblasten-Medium (DMEM, Sigma Aldrich, München) (Tabelle 8).

In den Versuchen wurden folgende drei Zellarten verwendet:

- Endothelzellen vom Menschen: Human umbilical vein cells (HUVECs)
- Herzmuskelzellen von der Ratte: neonatale Kardiomyozyten (CMCs)
- Bindegewebszellen von der Maus: Fibroblasten (3T3-Zellen)

Im Folgenden sind mit den Abkürzungen, HUVECs, CMCs und 3T3-Zellen die oben beschriebenen Zellarten gemeint.

#### *Zellherkunft*

Die Endothelzellen (HUVECs) sind humaner Herkunft und wurden netterweise vom Institut für Transplantationsmedizin (ITZ) bereit gestellt. Sie stammen aus der neonatalen humanen kindlichen Nabelschnur (Umbilikalvene) und werden intrapartal gewonnen.

Die Kardiomyozyten (CMCs) stammen von neonatalen Ratten-Herzen aus der Tierversuchsanlage der HHU Düsseldorf. Sie wurden neonatal von 3-4 Tage alten männlichen gesunden Wistar-Ratten nach standardisiertem Protokoll gewonnen. Nach Euthanisierung der Ratten und Explantation der Ratten-Herzen wurden diese zuerst gemörsert und anschließend die neonatalen Kardiomyozyten extrahiert. Danach wurden sie in Zellkulturflaschen T-225 cm<sup>2</sup> überführt und es fand eine kurze Begutachtung der Vitalität und Kontraktionsfähigkeit der Zellen unter dem Durchlichtmikroskop statt. Anschließend wurden sie unter standardisierten Bedingungen inkubiert und weiter kultiviert.

## *Zellkultur drei unterschiedlicher Zelllinien*

### *Zellkultur von Endothelzellen (HUVECs)*

Die Zellkultur der HUVECs wurde für ca. 2-3 Wochen angelegt. Dabei wurden die Zellen zuerst aufgetaut (undifferenziert, niedrige Passage) und im Inkubator bei 37° Celsius in zuvor mit 1% Gelatine beschichteten, großen T-225 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit ca. 25ml Endothelzellmedium, Endothelial-Cell-Growth-Medium (ECGM von PromoCell, Heidelberg), inkubiert. Das Nährmedium wurde durchschnittlich alle 3 Tage gewechselt. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:2 in neue Zellkulturflaschen gegeben bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 65-70%. Das Überführen der Zellen geschah nach standardisiertem Protokoll. Zuerst fand eine Spülung der Zellen mit PBS statt und anschließend ein mikroskopisch-kontrolliertes Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche mittels 0,05% Trypsin und 0,53 mM EDTA. Bei mittlerer einstelliger Zellpassage (7-8) wurden die Zellen weiterverwendet.

### *Zellkultur von Kardiomyozyten (CMCs)*

Die Zellkultur der Kardiomyozyten wurde für ca. 1-2 Wochen angelegt. Dabei wurden die Zellen im Inkubator bei 37° Celsius in großen T-225 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen inkubiert. Es wurde Zellmedium für Kardiomyozyten, Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM von Sigma Aldrich, München) verwendet. Der Wechsel des Nährmediums, das Überführen in neue Zellkulturflaschen und die Weiterverwendung erfolgte wie bei den HUVECs- Das Nährmedium wurden durchschnittlich alle 3 Tage gewechselt.

### *Zellkultur von Fibroblasten (3T3-Zellen)*

Die Zellkultur von Bindegewebszellen bzw. Fibroblasten wurde für 2 Wochen angelegt. Dabei wurden die Zellen im Inkubator bei 37° Celsius in großen Zellkulturflaschen inkubiert. Es wurde das Zellmedium für Fibroblasten, Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM von Sigma Aldrich, München) verwendet. Das Nährmedium wurden durchschnittlich alle 3 Tage gewechselt. Das Überführen in neue Zellkulturflaschen fand im Verhältnis 1:3 statt. Es wurde folgendes Zellmedium verwendet.

## Zellkultur

| Zellarten      | Zellbezeichnung | Medium                                   |
|----------------|-----------------|------------------------------------------|
| Endothelzellen | HUVECs          | Endothelial-Cell-Growth-Medium (ECGM)    |
| Fibroblasten   | 3T3             | Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) |
| Kardiomyozyten | CMC             | Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) |

Tabelle 8: Zellkultur und Zellmedien

### Protokoll Zellkultur (Mediumwechsel, Zellen auftauen)

| Nr. | Schritt                                                                                                                   |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     | Vorbereitung:                                                                                                             |
|     |                                                                                                                           |
|     | Frisches Medium in Falcon aus Kühlschrank in Wärmebad stellen                                                             |
|     |                                                                                                                           |
|     | Durchführung:                                                                                                             |
|     |                                                                                                                           |
| 1   | Zellkulturflasche aus Inkubator nehmen und unter Bench stellen                                                            |
| 2   | Frisches Medium aus Wärmebad nehmen und unter Bench stellen                                                               |
| 3   | Zellkulturflasche öffnen                                                                                                  |
| 4   | Zellkulturflasche im senkrecht und leicht schräg halten, damit Medium sich in einer der unteren Ecken der Flasche sammelt |
| 5   | Medium aus Flasche heraus pipettieren und verwerfen                                                                       |
| 6   | Neues EC/3T3/CMC Medium mittels Pipette hinzugeben                                                                        |
| 7   | Zellkulturflasche zu machen                                                                                               |
| 8   | Zellkulturflasche in Inkubator legen                                                                                      |
|     |                                                                                                                           |
|     |                                                                                                                           |
|     | Protokoll Zellen auftauen:                                                                                                |
|     |                                                                                                                           |
|     | Vorbereitung:                                                                                                             |
|     |                                                                                                                           |
|     | Durchführung:                                                                                                             |

|          |                                                                                                                                         |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|          |                                                                                                                                         |
| <b>1</b> | Leere Zellkulturflasche mit Gelatine befüllen und durch Schwenken gleichmäßig in Flasche verteilen                                      |
| <b>2</b> | Zellkulturflasche danach in Inkubator stellen und anwärmen lassen                                                                       |
| <b>3</b> | Zellflasche aus Stickstoff Tank (-70°C) nehmen und unter Bench stellen                                                                  |
| <b>4</b> | Zellen langsam auftauen lassen und Zellmedium hinzugeben und langsam vermischen                                                         |
| <b>5</b> | Zellsuspension langsam heraus pipettieren und in Zellkulturflasche mit Gelatine geben, durch Schwenken gleichmäßig in Flasche verteilen |

**Tabelle 9: Protokoll Zellkultur (Mediumwechsel, Zellen auftauen)**

#### 2.2.4 Re-Besiedlung der dezellularisierten Ratten-Herzen

Das Re-Besiedeln der zuvor dezellularisierten kardialen ECM (dECM), also der Herzgerüste, mit Zellen erfolgte mit Hilfe von verschiedenen im folgenden aufgeführten Methoden. Hierzu wurden drei verschiedene Zellarten verwendet und drei verschiedene Besiedlungsmethoden.

In den Versuchen wurden folgende drei Re-Besiedlungsmethoden verwendet:

- Vaskuläre Re-Besiedlung (Re-Endothelialisierung, Re-Vaskularisierung) mit HUVECs mittels Perfusions-Re-Besiedlung
- Interstitielle Re-Besiedlung mit CMCs oder 3T3-Zellen mittels intra-ventrikulärer Injektions-Re-Besiedlung
- Kombinierte simultane konsekutive vaskuläre und interstitielle Re-Besiedlung mit HUVECs und CMCs, oder HUVECs und 3T3-Zellen mittels Kombination aus vaskulär und interstitiell

##### *Vaskuläre Re-Besiedlung (Re-Besiedlung der dezellularisierten Herzen mit HUVECs)*

Um das Gefäßsystem wieder zu besiedeln, wurden humane Endothelzellen von kindlichen Nabelschnur (HUVECs) verwendet. Das Herz wurde unter sterilen Bedingungen mit einer sterilen Pinzette (Abb. 7, C) aus dem Falcon genommen und über eine sterile normal große Petri Schale (Abb. 7, B) gehalten. Die Wiederbesiedlung erfolgte nun durch manuelle retrograde aortale Re-Perfusion mittels einer 2 ml Spritze. (Abb. 9, A) Die Spritze wurde hierzu mit der aortalen Kanüle des Ratten-Herzens verbunden. Dazu wurde das Herz zuerst mittels einer 2 ml Spritze mit PBS Lösung vorsichtig gespült. Anschließend wurde das Herz mittels einer 2 ml Spritze langsam, tröpfchenweise mit Zellmedium perfundiert. Danach wurde das Herz wieder mittels steriler Pinzette (Abb. 9, C) in den Falcon zurücküberführt (Tabelle 10).

##### *Interstitielle Re-Besiedlung (Re-Besiedlung der dezellularisierten Herzen mit CMCs oder 3T3-Zellen)*

Um das Kammersystem des Herzens wieder zu besiedeln, wurden Fibroblasten (3T3), für die Vorversuche und Kardiomyozyten (CMCs) für die Hauptversuche verwendet. Das Herz wurde unter sterilen Bedingungen mit einer sterilen Pinzette aus dem Falcon genommen und über eine sterile normal große Petri Schale gehalten. Die Wiederbesiedlung erfolgte durch schrittweise manuelle intramuskuläre Injektion mittels einer 1 ml Spritze. Dabei wurden

immer 0,1ml je Injektionsstelle injiziert, mit insgesamt 10 Injektionsstellen pro Herz. Dabei wurde die 1ml Spritze mit der Zellsuspension aufgezogen. Anschließend wurde eine feine, sterile Nadel auf die Spritze aufgesetzt. Danach wurde die Herzwand punktiert, und die Lösung langsam appliziert. Die Wiederbesiedlung mit den zwei verschiedenen Zelllinien wurde unabhängig von einander durchgeführt.

*Kombinierte simultane konsekutive vaskuläre und interstitielle Re-Besiedlung (Re-Besiedlung der dezellularisierten Herzen mit HUVECs und CMCs, oder HUVECs und 3T3-Zellen)*

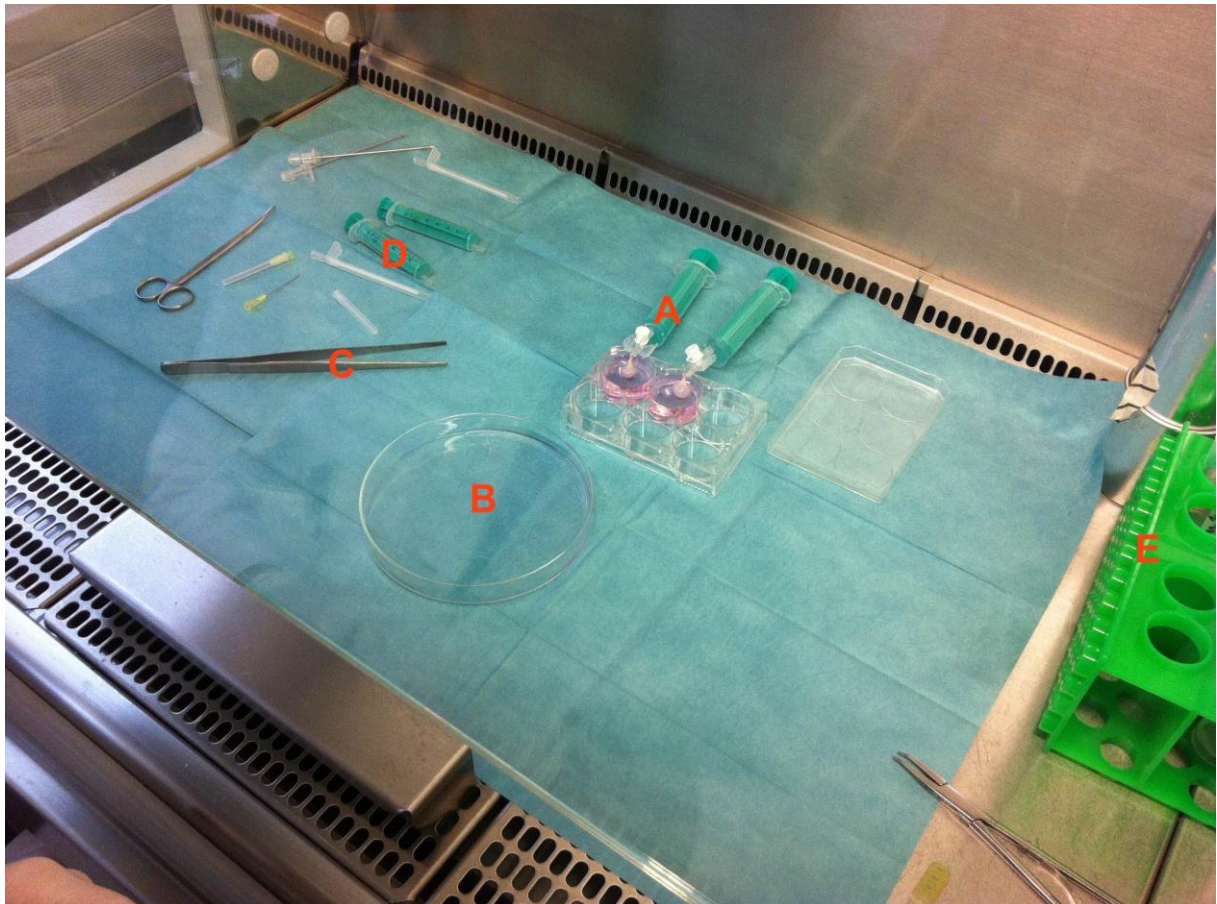
Die Co-Re-Besiedlung wird im nächsten Kapitel aufgeführt.

*Protokoll vaskuläre Re-Besiedlung*

| Nr. | Schritt                                                                                                                                                                                               |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     | <b><u>Vorbereitung:</u></b>                                                                                                                                                                           |
|     | Steriles Tuch                                                                                                                                                                                         |
|     | Petri Schale / Six-Well                                                                                                                                                                               |
|     | Spritzen (5ml + 2ml)                                                                                                                                                                                  |
|     | Kanülen (x2)                                                                                                                                                                                          |
|     | Sterile Handschuhe                                                                                                                                                                                    |
|     | Combi-Stopper                                                                                                                                                                                         |
|     |                                                                                                                                                                                                       |
|     | Steriles Besteck (vorzugsweise zwei stumpfe Pinzetten) (Muss vorher autoklaviert sein!)                                                                                                               |
|     |                                                                                                                                                                                                       |
|     | Medium                                                                                                                                                                                                |
|     | PBS                                                                                                                                                                                                   |
|     | Herzen und Zellen (2,5 Mio pro Herz = 500.000/ml x 5ml pro Herz)                                                                                                                                      |
|     | <b><u>Durchführung:</u></b>                                                                                                                                                                           |
| 1   | Bench in sterilen und semi-sterilen Bereich unterteilen (z.B. mit Falcon-Ständer)                                                                                                                     |
| 2   | Steriles Tuch hinlegen, Besteck und steriles Material hinlegen                                                                                                                                        |
| 3   | Herzen aus Inkubator holen und Falcon öffnen                                                                                                                                                          |
| 4   | Medium und PBS aus Wärmebad nehmen und PBS ins Six-Well pipettieren                                                                                                                                   |
|     |                                                                                                                                                                                                       |
| 5   | Sterile Handschuhe anziehen und Besteck und Material auf sterilem Tuch ordnen                                                                                                                         |
| 6   | Herzen mit Pinzetten entnehmen (an Viggo festhalten) und in Six-Well mit PBS legen, generell Herzen immer so schonend wie möglich behandeln                                                           |
| 7   | Spritzen (2ml) mit Medium aufziehen, absolut blasenfrei, es darf keine Luft ins Herz gelangen                                                                                                         |
| 8   | Spritzen (5ml) mit 5ml Zellsuspension aufziehen und Kanüle abnehmen                                                                                                                                   |
| 9   | Herzen mit Pinzette aus Six-Well nehmen (dabei Pinzette mit linker Hand halten und Herz an Viggo festhalten) und über Falcon halten                                                                   |
| 10  | Herzen mit etwas Medium vorfüllen aus 2ml Spritze, so dass keine Luft mehr in Viggo ist, Medium in Falcon auffangen                                                                                   |
| 11  | Herzen mit 5ml Zellsuspension (aus 5ml Spritze) perfundieren, langsam und tröpfchenweise, dabei auf Widerstand des Gefäßsystems achten (Lässt sich das Herz leicht, normal oder schwer perfundieren?) |
| 12  | Nach Perfusion Spritze abdrehen und mit kleiner Spritze (2ml) wieder etwas Medium in Viggo geben, so dass keine Luft mehr in Viggo ist                                                                |

|           |                                                                                                                                                                                                                           |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>13</b> | Combi-Stopper auf Viggo drehen (am besten mit Pinzette, falls nicht möglich, auch mit sterilen Handschuhen), Butterfly von Viggo gerade richten, so dass das Herz gut im Falcon gehalten wird und nicht den Boden berührt |
| <b>14</b> | Herz in Falcon ablegen                                                                                                                                                                                                    |
| <b>15</b> | 10ml Medium in Falcon geben (auf insgesamt 15ml)                                                                                                                                                                          |

**Tabelle 10: Protokoll vaskuläre Re-Besiedlung**



**Abb. 9: Setting und Vorbereitung der Materialien und dezellulisierten Ratten-Herzen für die vaskuläre Re-Besiedlung**

A: dezellularisierte Ratten-Herzen, mit aortaler Kanüle befestigt an den 2ml Perfusion-Spritzen, in Endothelial Cell Growth Medium in Six-Well, vor vaskulärer Re-Besiedlung

B: Petri-Schale zum Auffangen von Perfusions-Suspension

C: Pinzette zum Führen der Kanüle

D: Weitere Instrumente

E: Falcon-Ständer mit 50ml Falcons für die Lagerung der Ratten-Herzen nach vaskulärer Re-Besiedlung

### 2.2.5 Co-Re-Besiedlung der dezellularisierten Ratten-Herzen (simultan konsekutiv vaskulär und interstitiell)

Die Re-Besiedlung der zuvor dezellularisierten Ratten-Herzen mit für das Herzwachstum essenziellen Zelltypen stellt einen der zentralen Punkte dieser Arbeit dar. Die Co-Re-Besiedlung umfasst zwei Besiedlungsmethoden gleichzeitig: Die vaskuläre Re-Besiedlung (Gefäß-Re-Besiedlung) und die interstitielle Besiedlung (Interstitium-Re-Besiedlung).

#### *Re-Besiedlung einzeln und Co-Re-Besiedlung*

Bei der Gefäß-Besiedlung wurden menschliche Endothelzellen (gewonnen aus der Nabelschnur von Neugeborenen: Human umbilical vein cells = HUVECs) per Perfundierung in das Gefäßsystem Herzens gebracht. Dabei wird die HUVEC-Zellsuspension mittels einer Spritze über die aortaler Re-Perfusion in das Herz gespritzt. Diese Perfundierung findet langsam und tröpfchenweise statt (Abb. 9, A).

Bei der interstitiellen Besiedlung wurden 3T3-Zellen (Fibroblasten) von Mäusen (für die Vorversuche) bzw. neonatale Kardiomyozyten von Ratten (für die Hauptversuche) verwendet. Diese werden per Injektion in die muskulären Strukturen (Ventrikel, Septum, Apex) des Herzens gespritzt. Dazu wird eine 1ml, Gauge Spritze verwendet. Es werden insgesamt 1 ml von 3T3-Zellsuspension bzw. CMC-Zellsuspension Schritt für Schritt an insgesamt 10 Stellen, 0,1 ml pro Injektionsstelle, in Linker Ventrikel, Rechter Ventrikel, Septum und Apex LV, RV, S, A in die interstitielle Matrix injiziert.

Die Co-Besiedlung ist eine Kombination aus diesen Besiedlungsmethoden. Die interstitielle Besiedlung wird dabei zuerst durchgeführt und danach die Gefäß-Besiedlung. Dazu gibt es die Möglichkeiten der simultanen und der konsekutiven Co-Besiedlung. Die Co-Re-Besiedlungen waren in dieser Form bisher noch nicht etabliert. (Abb. 10, Abb. 11).

#### *Entwicklung eines optimalen Protokolls für die Co-Re-Besiedlung*

Die gesamte Co-Re-Besiedlung wurde nach einem standardisierten Protokoll durchgeführt, welches nach zahlreichen Konzepten, Planungen und Vorversuchen neu entwickelt wurde. Dieses Protokoll hatte zum Ziel eine möglichst große Zellvitalität und Zellüberleben nach Re-Besiedlung und anschließender Re-Kultivierung zu ermöglichen.

Bei dieser neuen Methode soll deren Benennung, simultane konsekutive Co-Re-Besiedlung, folgende Tatsachen beschrieben. Simultan steht für gleichzeitig in einem Schritt stattfindend. Konsekutiv steht für direkt hintereinander statt findend. Die Kombination aus simultan konsekutiv bedeutet, dass zuerst die interstitielle Re-Besiedlung durchgeführt wird und im gleichen Schritt direkt danach die vaskuläre Re-Besiedlung.

#### *Verschiedene Varianten der simultanen konsekutiven Co-Re-Besiedlung*

In Vorversuchen wurde als Alternative folgende Variante getestet. Zuerst wurde die vaskuläre Re-Besiedlung bis zur Hälfte, also mit 50% der Dosis der Zellsuspension, durchgeführt, dann die interstitielle Re-Besiedlung, und danach die zweite Hälfte der vaskulären Re-Besiedlung. Für die Hauptversuche wurde jedoch die erst genannte Variante verwendet. Hierfür wurde zuerst die interstitielle Re-Besiedlung durchgeführt, und im gleichen Schritt direkt danach die vaskuläre Re-Besiedlung (Tabelle 13) (Tabelle 14).

#### *Parameter der simultanen konsekutiven Co-Re-Besiedlung*

Für die Hauptversuche wurden folgende Parameter für die simultane konsekutive Co-Re-Besiedlung verwendet (Tabelle 11) (Tabelle 12).

- Zuerst interstitielle Re-Besiedlung mit CMCs  
mittels intra-muskulärer Injektion in Linker Ventrikel, rechter Ventrikel, Septum, Apex  
mit insgesamt 5 Mio. Zellen pro Herz  
(Dosis: 1 ml, Konzentration: 5 Mio. pro 1 ml)  
(Hinweise: insgesamt 10 Injektionsstellen, pro Stelle immer 0,1 ml, mit 1 ml Spritze)
  
- Dann vaskuläre Re-besiedlung mit HUVECs  
mittels Perfusion-Re-Besiedlung in vaskuläres System mittels retrograder aortaler Re-Perfusion  
mit insgesamt 2,5 Mio. Zellen pro Herz  
(insgesamte Dosis: 5 ml, Konzentration: 500.000 Zellen pro 1 ml)  
(Hinweise: insgesamt ein Perfusions-Prozess, immer tröpfchenweise und langsam)

### Co-Re-Besiedlung Parameter Technik

| Art der Besiedlung | Zielgewebe                  | Technik                      | Hinweise                                                         |
|--------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Vaskulär           | Gefäßsystem                 | retrograde aortale Perfusion | immer tröpfchenweise und langsam                                 |
| Interstitiell      | Interstitium (LV, RV, S, A) | intramuskuläre Injektion     | immer 0,1ml pro Injektionsstelle, insgesamt 10 Injektionsstellen |

Tabelle 11: Übersicht Co-Re-Besiedlung Parameter Technik

### Co-Re-Besiedlung Parameter Zellen

| Art der Besiedlung | Zellen | Zellzahl pro Herz | Menge | Konzentration |
|--------------------|--------|-------------------|-------|---------------|
| Vaskulär           | HUVECs | 2,5 Mio.          | 5 ml  | 500.000/ml    |
| Interstitiell      | CMCs   | 5 Mio.            | 1 ml  | 1 Mio./ml     |

Tabelle 12: Übersicht Co-Re-Besiedlung Parameter Zellen

*Protokoll vaskuläre und interstitielle simultane konsekutive kombinierte Co-Re-Besiedlung:*

*Vorbereitung:*

| Nr. | Schritt                                                                                          |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                                                                  |
| 1   | Steriles Tuch, Sterile Handschuhe                                                                |
| 2   | Petri-Schale / Six-Well / Falcon                                                                 |
| 3   | Spritzen (4x 5ml, 2x 2ml, 2x 1ml)                                                                |
| 4   | Kanülen (6x gelbe Kanülen, 2x 1ml Kanülen)                                                       |
| 5   | Combi-Stopper (2x)                                                                               |
| 6   | Steriles Besteck (vorzugsweise zwei stumpfe Pinzetten) (vorher autoklaviert)                     |
| 7   | Zellkultur-Material: PBS, CMC-Medium = DMEM, EC-Medium                                           |
| 8   | Zellen: HUVECs (2x (2,5 Mio./pro Herz in 5ml)) und CMCs (2x (5 Mio./pro Herz in 1ml))            |
| 9   | (HUVEC Konzentration: 500.000/ml x 5ml, pro Herz) (CMC Konzentration: 5 Mio./ml x 1ml, pro Herz) |
| 10  | Herzen: 2 dezellularisierte Rattenherzen                                                         |

**Tabelle 13: Protokoll vaskuläre und interstitielle simultan konsekutive Co-Re-Besiedlung (Vorbereitung)**

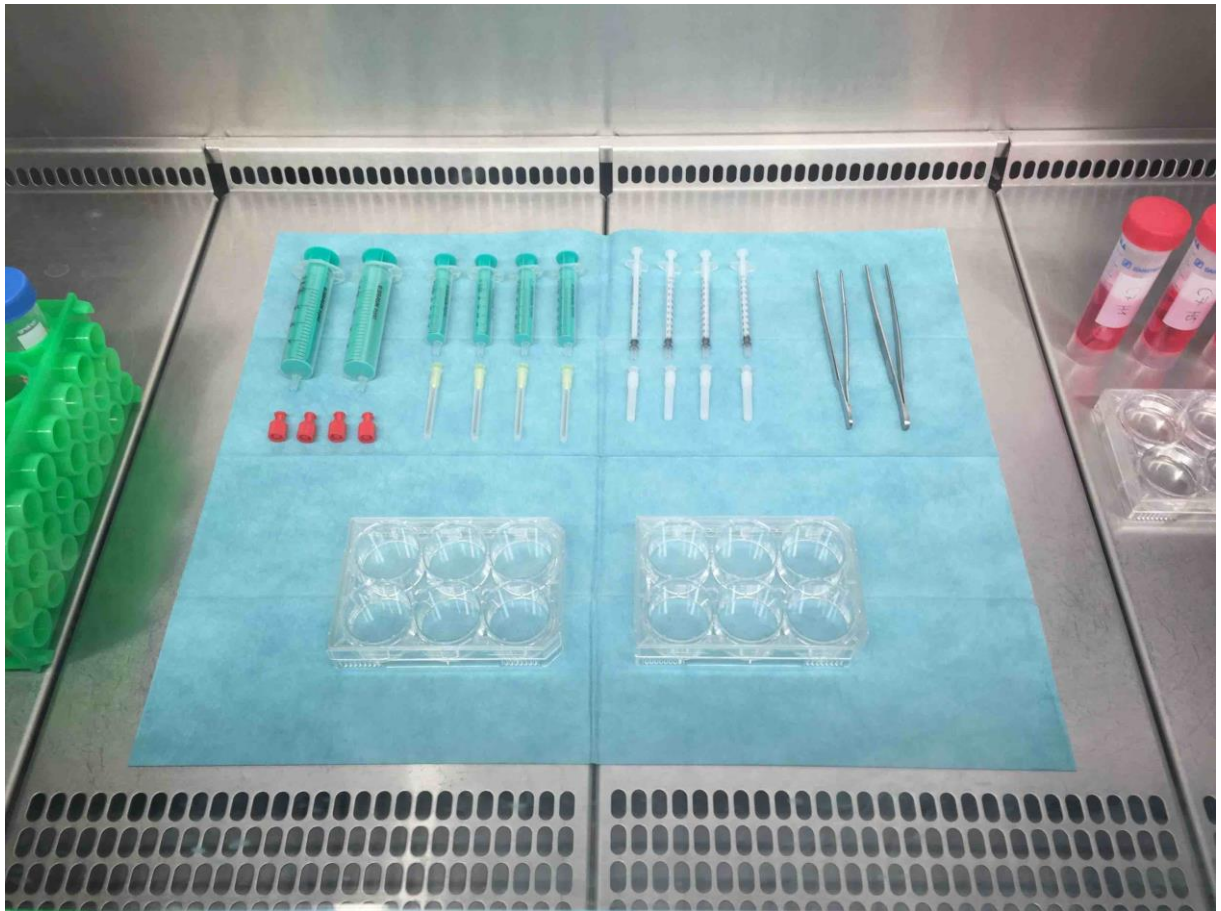
*Durchführung:*

| Nr. | Schritt                                                                                                                                  |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                                                                                                          |
| 1   | Bench in sterilen und semi-sterilen Bereich unterteilen (z.B. mit Falcon-Ständer)                                                        |
| 2   | Steriles Tuch hinlegen, steriles Material und Besteck hinlegen                                                                           |
| 3   | Herzen aus Inkubator holen und Falcons öffnen                                                                                            |
| 4   | HUVECs und CMC-Zellen aus Wärmebad/Inkubator nehmen                                                                                      |
| 5   | EC-Medium, CMC-Medium und PBS aus Wärmebad nehmen: PBS ins Six-Well pipettieren und Falcons mit EC-Medium und CMC-Medium öffnen          |
|     | <i>Ab hier steriles Arbeiten:</i>                                                                                                        |
| 6   | Sterile Handschuhe anziehen und Besteck und Material auf sterilem Tuch ordnen                                                            |
| 7   | Herzen mit Pinzetten entnehmen (an Viggo greifen) und in Six-Well mit PBS legen, generell Herzen immer so schonend wie möglich behandeln |
| 8   | 2 Spritzen (je ca. 5ml) mit DMEM aufziehen und Kanüle abnehmen (zum Vorspülen)                                                           |
| 9   | 2 Spritzen (je 2ml) mit EC-Medium aufziehen, absolut blasenfrei, es darf keine Luft ins Herz gelangen                                    |

|                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10                                                                                             | 2 Spritzen (je 5ml) mit 5ml HUVECs-Zellsuspension aufziehen und Kanüle abnehmen                                                                                                                                                                                                                      |
| 11                                                                                             | 2 Spritzen (je 1ml) mit 1ml CMC-Zellsuspension aufziehen und Kanüle dran lassen                                                                                                                                                                                                                      |
|                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 12                                                                                             | Herzen mit Pinzette aus PBS Six-Well nehmen (dabei Pinzette mit linker Hand halten und Herz an Viggo festhalten) und über Six-Well halten                                                                                                                                                            |
|                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 13                                                                                             | Herzen mit DMEM (ca. 5ml) vorspülen (aus 5ml Spritze)                                                                                                                                                                                                                                                |
| 14                                                                                             | Herzen über Falcon halten                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>◇ Ab hier entweder Co-Besiedlung (simultan alternativ) oder Co-Besiedlung (konsekutiv):</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|                                                                                                | <b>Co-Besiedlung (simultan alternativ):</b>                                                                                                                                                                                                                                                          |
|                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 15a                                                                                            | Herzen mit etwas EC-Medium vorfüllen (aus 2ml Spritze), so dass keine Luft mehr in Viggo ist, EC-Medium in Falcon auffangen                                                                                                                                                                          |
|                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|                                                                                                | <b>1. Teil Gefäß-Besiedlung:</b>                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 16a                                                                                            | ◇ Herzen mit <b>2,5ml HUVECs-Zellsuspension (=2,5Mio Zellen pro Herz)</b> (aus 5ml Spritze), also zur Hälfte, perfundieren                                                                                                                                                                           |
| 17a                                                                                            | (Langsam und tröpfchenweise, dabei auf Widerstand des Gefäßsystems achten (Lässt sich das Herz leicht, normal oder schwer perfundieren?))                                                                                                                                                            |
|                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|                                                                                                | <b>Interstitielle Besiedlung:</b>                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 18a                                                                                            | ◇ Herzen mit <b>1ml CMC-Zellsuspension (=5Mio Zellen pro Herz)</b> (aus 1ml Spritze) „spritzen“, also simultan zur Gefäß-Besiedlung, dabei ins Interstitium (=intraventrikulär) spritzen, an mehrere Stellen: LV, RV, S, A (Darauf achten, dass man nicht durch die Ventrikel Wand hindurch sticht!) |
|                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|                                                                                                | <b>2. Teil Gefäß-Besiedlung:</b>                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 19a                                                                                            | ◇ Herzen mit den restlichen <b>2,5ml HUVECs-Zellsuspension</b> (aus 5ml Spritze) perfundieren                                                                                                                                                                                                        |
|                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 20a                                                                                            | Nach Perfundierung Spritze abdrehen und mit kleiner Spritze (2ml) wieder etwas EC-Medium in Viggo geben, so dass keine Luft mehr in Viggo ist                                                                                                                                                        |
|                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|                                                                                                | <b>Co-Besiedlung (simultan konsekutiv):</b>                                                                                                                                                                                                                                                          |

|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <b>15b</b> | Zusatzschritt: Herzen mit PBS perfundieren bzw. ballonieren, um Herzen komplett farblos zu bekommen (nur hier möglich, da vorher keine Gefäß-Besiedlung)                                                                                                                                                              |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|            | <b>Interstitielle Besiedlung:</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>16b</b> | ◇ Herzen mit <b>1ml CMC-Zellsuspension (=5Mio/ml x 1ml, pro Herz)</b> (aus 1ml Spritze) „spritzen“, also vor der Gefäß-Besiedlung, dabei ins Interstitium (=intraventrikulär) spritzen, Schritt für Schritt immer 0,1ml pro Injektionsstelle (Darauf achten, dass man nicht durch die Ventrikelwand hindurch sticht!) |
|            | (Diese Besiedlung über Six-Well)                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <b>17b</b> | Herzen mit etwas EC-Medium vorfüllen (aus 2ml Spritze), so dass keine Luft mehr in Viggo ist, EC-Medium in Falcon auffangen                                                                                                                                                                                           |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|            | <b>Gefäß-Besiedlung:</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <b>18b</b> | ◇ Herzen mit <b>5ml HUVECs-Zellsuspension (2,5 Mio. Zellen pro Herz, 500.000/ml x 5ml, pro Herz)</b> (aus 5ml Spritze), perfundieren                                                                                                                                                                                  |
| <b>19b</b> | (Langsam und tröpfchenweise, dabei auf Widerstand des Gefäßsystems achten (Lässt sich das Herz leicht, normal oder schwer perfundieren?))                                                                                                                                                                             |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <b>20b</b> | Nach Perfundierung Spritze abdrehen und mit kleiner Spritze (2ml) wieder etwas EC-Medium in Viggo geben, so dass keine Luft mehr in Viggo ist                                                                                                                                                                         |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|            | ◇ <i>Ab hier wieder gemeinsames Protokoll:</i>                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|            | <b>Evtl.: Mit PBS waschen</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|            | Combi-Stopper auf Viggo drehen (am besten mit Pinzette), Butterfly von Viggo gerade richten, so dass das Herz gut im Falcon gehalten wird und nicht den Boden berührt                                                                                                                                                 |
|            | Herz in Falcon ablegen                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|            | 10ml EC-Medium in Falcon geben (auf insgesamt 15ml auffüllen)                                                                                                                                                                                                                                                         |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|            | Herzen in Inkubator stellen                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|            | Herzen auswerten am LSM                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

**Tabelle 14: Protokoll vaskuläre und interstitielle simultan konsekutive Co-Re-Besiedlung (Durchführung)**



**Abb. 10: Setting und Vorbereitung der Materialien für die Co-Re-Besiedlung unter der Lamina Air Flow Bench**

A: 5ml Spritzen

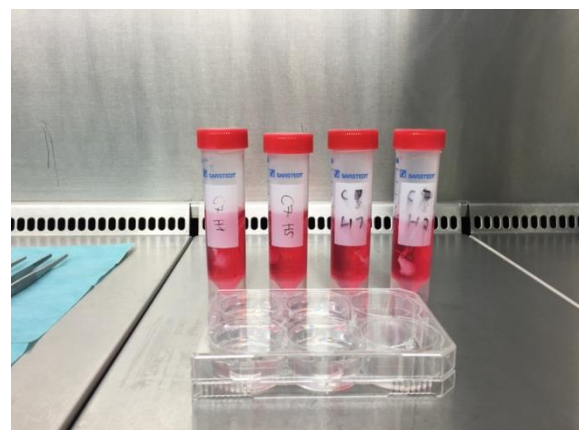
B: 2ml Spritzen für vaskuläre Re-Besiedlung mittels retrograder aortaler Perfusion

C: 1ml Spritzen für interstitielle Re-Besiedlung mittels intraventrikulärer Injektion

D: Pinzetten

E: Six-Wells zum Auffangen der Re-Besiedlungs-Suspension

F: 50ml Falcons mit dezellularisierten Ratten-Herzen



**Abb. 11: dezellularisierte Ratten-Herzen in Lagerung in 50ml Falcons in DMEM vor Co-Re-Besiedlung**

## 2.2.6 Re-Kultivierung der dezellularisierten und re-besiedelten Herzen

Die Re-Kultivierung der dezellularisierten und re-besiedelten Herzen stellt den zweiten zentralen Punkt dieser Arbeit dar. Zur Re-Kultivierung der wiederbesiedelten Herzen wurden diese in einem 50 ml Falcon mit entsprechendem Nährmedium für 4 Tage im Inkubator bei 37°Celsius gelagert (Abb. 12). Dabei wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet, die wiederbesiedelten Herzen zu kultivieren: Statisch und Perfundiert. Diese werden im Folgenden erläutert. Es wurde das Nährmedium Endothelial Cell Growth Medium von PromoCell (Heidelberg) verwendet.

### *Statische Kultivierung (=statisch)*

Dies bedeutet: klassischer Mediumwechsel (siehe Protokoll: Statische Kultivierung = Mediumwechsel (Herz))

Bei der statischen Kultivierung wurde das Nährmedium im Falcon nach 2 Tagen gewechselt. Das Herz wurde dabei unberührt gelassen. Der Mediumwechsel fand nach Protokoll unter sterilen Bedingungen statt. Das Herz wurde dabei mit einer sterilen Pinzette in ein neues 50ml Falcon mit frischem Nährmedium überführt (Tabelle 15).

### *Perfundierte Kultivierung (=perfundiert)*

Dies bedeutet: klassischer Mediumwechsel + manuelle retrograde aortale Perfusion (siehe Protokoll: Perfusions-Kultivierung = Mediumwechsel + Perfusion (Herz) )

Bei der perfundierten Kultivierung wurde das Nährmedium im Falcon nach 2 Tagen gewechselt und das Herz wurde erneut mittels vaskulärer Perfusion mit Nährmedium tröpfchenweise perfundiert. Anschließend wurde das Herz in ein neues 50ml Falcon mit frischem Nährmedium überführt (Tabelle 16).

### *Herzen präparieren*

Nach 4 Tagen wurden die perfundierten bzw. statisch kultivierten Herzen aus dem Inkubator genommen. Zur weiteren Auswertung wurden die Herzen unter sterilen Bedingungen in folgende Bereiche präpariert: Linker Ventrikel (Abb. 13), rechter Ventrikel, Septum und Apex. (Tabelle 17).

*Protokoll Statische Kultivierung (= Mediumwechsel (Herz) )*

| Nr. | Schritt                                                                                                                                  |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     | <b><u>Vorbereitung:</u></b>                                                                                                              |
|     | Petri-Schale / Six-Well / Falcon                                                                                                         |
|     | OP-Besteck (Pinzette)                                                                                                                    |
|     | Zellkultur-Material: PBS, EC-Medium                                                                                                      |
|     | <b><u>Durchführung:</u></b>                                                                                                              |
| 1   | Herzen aus Inkubator holen und Falcons öffnen                                                                                            |
| 2   | EC-Medium und PBS aus Wärmebad nehmen: PBS ins Six-Well pipettieren und Falcons mit EC-Medium öffnen                                     |
| 3   | Herzen mit Pinzetten entnehmen (an Viggo greifen) und in Six-Well mit PBS legen, generell Herzen immer so schonend wie möglich behandeln |
| 4   | Neues Falcon öffnen und mit EC-Medium (15ml) befüllen                                                                                    |
| 5   | Herzen mit Pinzette aus PBS Six-Well nehmen (dabei Pinzette mit linker Hand halten und Herz an Viggo festhalten)                         |
| 6   | Herzen in neues Falcon legen                                                                                                             |
| 7   | Herzen in Inkubator stellen                                                                                                              |

**Tabelle 15: Protokoll Statische Kultivierung**

*Protokoll Perfusions-Kultivierung (= Mediumwechsel + Perfusion (Herz))*

| Nr. | Schritt                                                                                                                                  |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     | <b><u>Vorbereitung:</u></b>                                                                                                              |
|     | Petri-Schale / Six-Well / Falcon                                                                                                         |
|     | Spritzen (2x 5ml, 2x 2ml)                                                                                                                |
|     | Kanülen (4x gelbe Kanülen)                                                                                                               |
|     | Combi-Stopper (2x)                                                                                                                       |
|     | OP-Besteck (Pinzette)                                                                                                                    |
|     | Zellkultur-Material: PBS, EC-Medium                                                                                                      |
|     | <b><u>Durchführung:</u></b>                                                                                                              |
| 1   | Herzen aus Inkubator holen und Falcons öffnen                                                                                            |
| 2   | EC-Medium und PBS aus Wärmebad nehmen: PBS ins Six-Well pipettieren und Falcons mit EC-Medium öffnen                                     |
| 3   | Herzen mit Pinzetten entnehmen (an Viggo greifen) und in Six-Well mit PBS legen, generell Herzen immer so schonend wie möglich behandeln |

|    |                                                                                                                                                                       |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 4  | 2 Spritzen (je 2ml) mit EC-Medium aufziehen, absolut blasenfrei, es darf keine Luft ins Herz gelangen                                                                 |
| 5  | Herzen mit Pinzette aus PBS Six-Well nehmen (dabei Pinzette mit linker Hand halten und Herz an Viggo festhalten)                                                      |
| 6  | Herzen über Falcon halten                                                                                                                                             |
| 7  | Herzen mit etwas EC-Medium vorfüllen (aus 2ml Spritze), so dass keine Luft mehr in Viggo ist, EC-Medium in Falcon auffangen                                           |
|    |                                                                                                                                                                       |
| 8  | Herzen mit EC-Medium perfundieren (ca. 5ml) (aus 5ml Spritze)                                                                                                         |
|    |                                                                                                                                                                       |
| 9  | Nach Perfundierung Spritze abdrehen und mit kleiner Spritze (2ml) wieder etwas EC-Medium in Viggo geben, so dass keine Luft mehr in Viggo ist                         |
|    | Wichtig: Nach Perfundierung (mit 5ml) Herzen 2x in PBS waschen (um Zellen, die während der Perfundierung von außen ans Myokard gekommen sind, abzuwaschen)            |
| 10 | Combi-Stopper auf Viggo drehen (am besten mit Pinzette), Butterfly von Viggo gerade richten, so dass das Herz gut im Falcon gehalten wird und nicht den Boden berührt |
| 11 | Herz in Falcon ablegen                                                                                                                                                |
| 12 | 10ml EC-Medium in Falcon geben (auf insgesamt 15ml auffüllen)                                                                                                         |
|    |                                                                                                                                                                       |
| 13 | Herzen in Inkubator stellen                                                                                                                                           |

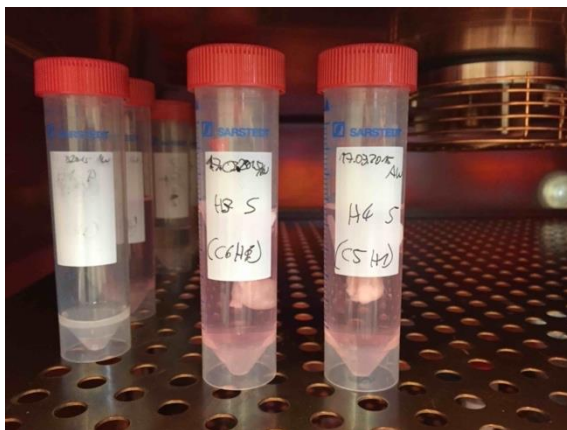
**Tabelle 16: Protokoll Perfundierte Kultivierung**

#### *Protokoll Herzen schneiden*

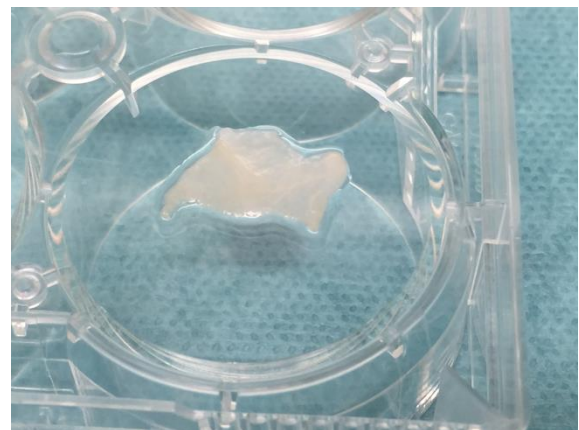
| Nr. | Schritt                                                                                                              |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     | <b><u>Vorbereitung:</u></b>                                                                                          |
|     | Steriles Tuch                                                                                                        |
|     | Große Petri-Schale (steril)                                                                                          |
|     | Six-Well (x2)                                                                                                        |
|     | Sterile Handschuhe                                                                                                   |
|     |                                                                                                                      |
|     | Steriles Besteck (vorzugsweise zwei lange Pinzetten (golden) und eine feine Schere) (Muss vorher autoklaviert sein!) |
|     |                                                                                                                      |
|     | Medium                                                                                                               |

|  |                                                                                                                                            |
|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | PBS                                                                                                                                        |
|  | <b><u>Durchführung:</u></b>                                                                                                                |
|  | Sterilen Bereich auf der Bench einrichten und steriles Tuch hinlegen                                                                       |
|  | Steriles Besteck und steriles Material auf Tuch legen                                                                                      |
|  | Ein Six-Well neben das Tuch (semi-steril) legen, öffnen und etwas PBS hinein pipettieren                                                   |
|  | Herzen aus Inkubator holen und Falcon öffnen                                                                                               |
|  |                                                                                                                                            |
|  | Sterile Handschuhe anziehen                                                                                                                |
|  | Besteck und Material ordnen                                                                                                                |
|  |                                                                                                                                            |
|  | Herzen mit Pinzette entnehmen und in Six-Well mit PBS legen                                                                                |
|  | Herzen mit Pinzette nehmen und in große Petri-Schale legen                                                                                 |
|  | LV suchen und mit einer Pinzette öffnen                                                                                                    |
|  | RV suchen und mit der zweiten Pinzette öffnen                                                                                              |
|  | LV mit Schere abtrennen und in Six-Well legen                                                                                              |
|  | RV mit Schere abtrennen und in anderes Well vom Six-Well legen                                                                             |
|  | Septum einbetten (Einbett-Plastik-Form holen und Septum hinein legen, danach Tissue Tag darauf füllen und in -80er Kühlschrank einfrieren) |
|  |                                                                                                                                            |
|  | Medium in Six-Well (je 3ml pro Well) pipettieren (damit Zellen des besiedelten Herzen noch Medium bekommen)                                |
|  | Six-Well schließen und in Inkubator stellen                                                                                                |

**Tabelle 17: Protokoll Herzen präparieren**



**Abb. 13: Exemplarische Darstellung von statischer und perfundierter Re-Kultivierung von zuvor dezellularisierten und anschließend vaskulär und interstitiell kombiniert simultan konsekutiv co-re-besiedelten Ratten-Herzen**



**Abb. 12: Darstellung eines exemplarischen dezellularisierten linken Ventrikel-Flaps hier liegend auf einem Six-Well**

### 2.2.7 Histologie

Für die Auswertung mittels Histologie und Immunhistologie wurden die re-zellularisieren und rekultivierten Herzen verwendet. Die Analyse erfolgte bezogen auf die einzelnen Bereiche der Herzen: linker Ventrikel, rechter Ventrikel, Septum, Apex. Die Gewebe wurden kryohistologisch aufbereitet. Für die Darstellung wurde das Durchlichtmikroskop DM 2000 von Leica verwendet (DM 2000, Leica Microsystems, Wetzlar).

#### *Aufbereitung der Gewebe*

Zur Aufbereitung wurden diese am Ende der Rekultivierung direkt weiterverarbeitet nach folgendem Protokoll: Zuerst wurden sie geschnitten in die zuvor genannten Bereiche und in PBS-Lösung gewaschen. Anschließend wurden sie eingebettet in folgendes Medium, Frozen Tissue Medium, CryoCompound. Das Einfrieren und die Lagerung erfolgten in flüssigem Stickstoff.

#### *Schneiden der histologischen Präparate*

Vor Verwendung wurden die Blöcke mit Hilfe eines Mikrotoms, von Leica, geschnitten mit einer Dicke von 5 µm und auf Objektträger überführt. Die anschließende Lagerung erfolgte bei Temperatur von -20° Celsius. Vor dem Färben wurden die Schnitte auf den Objektträgern aufgetaut.

#### *Hämatoxylin-Eosin-Färbung*

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine Standardfärbung der Histologie. Dabei wird der saure Farbstoff Hämatoxylin/Hämalaun verwendet, der basophile Bestandteile der Zelle färbt, wie etwa DNA und Ribosomen blau färbt. Eine roten Gegenfärbung mit dem Farbstoff Eosin färbt alle, acidophilen Bestandteile, wie die Matrix bestehend aus Proteinen.

Die Durchführung der Färbung existiert in vielen Varianten, hier wurde folgende Methode verwendet. Zuerst wurde die Hämatoxylin-Färbung angewendet für 1 min. Dabei färben sich die Strukturen braun. Danach wurden die Schnitte mit Aqua Dest. für 1 min. gespült und hydriert. Danach wurden sie 1 min. mit Eisessigwasser 5% behandelt und nochmals gespült mit Aqua dest. für 1 min. Im nächsten Schritt fand die Bläuung mit fließendem Wasser für 2x 1 min. statt. Daraufhin wurde Alkohol 70% für 1 min. und die Eosin-Färbung angewendet für 5 min. Anschließend wurden sie mit Hilfe einer Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) für je 1 min. Danach fand eine Behandlung mit Xylol für 1 min. statt. Nach Färben fand ein Trocknen und

anschließendes Eindecken der Schnitte statt, mit folgendem Medium: Roti HistoKitt von Carl Roth.

### *Mikroskopie und digitale Fotoaufnahmen*

Für die Aufnahmen der Histologischen Schnitte wurde ein Durchlichtmikroskop Leica verwendet (DM 2000, Leica Microsystems, Wetzlar). Die Aufnahmen wurden überwiegend mit 5x (Übersichtsaufnahme), 10x und 20x (Detailaufnahme) Vergrößerung angefertigt.

Zur Begutachtung wurden Bereiche in den Präparaten gesucht, bei denen Zellverbände ansässig waren. Dazu wurden die Präparate in einem ersten Screening-Schritt chronologisch von einer Seite zur anderen durchgeschaut. Präparate, dessen Bereiche eine übermäßige Anzahl von Zellverbänden aufgewiesen, wurden vorgemerkt. Anschließend wurden diese Bereiche dargestellt und digitale Fotoaufnahmen angefertigt. Dies ist für alle vier Bereiche, Linker Ventrikel, rechter Ventrikel, Septum, Apex erfolgt.

Die HE-Färbung wurde nach einem HE-Färbungs-Standard-Protokoll angefertigt, welches im Folgenden aufgeführt.

### *Protokoll HE-Färbung*

| Nr. | Schritt                         |
|-----|---------------------------------|
| 1   | Hämatoxylin 1min                |
| 2   | Aqua dest 1min                  |
| 3   | Eisessigwasser 5% 1min          |
| 4   | Aqua dest. 1 min                |
| 5   | Essigsäure 5% 1min              |
| 6   | Bläuung mit Leitungswasser 1min |
| 7   | Essigsäure 5% 1min              |
| 8   | Bläuung mit Leitungswasser 1min |
| 9   | Alkohol 70% 1 min               |
| 10  | Eosin 5 min                     |
| 11  | Alkohol 70% 1 min               |
| 12  | Alkohol 96% 1 min               |
| 13  | Alkohol 100% 1 min              |
| 14  | Xylol 1min                      |

**Tabelle 18: Protokoll HE-Färbung**

### 2.2.8 Immunhistologie

Die Immunhistologie wird angewendet, um spezifische Zellarten zu detektieren und darzustellen. Dies geschieht mittels Anti-Körper, die spezifisch ihr zu bindendes Antigen binden. Dies geschieht mittels eines standardisierten Protokolls. Es wird auf den histologischen Schnitt ein 1. Anti-Körper angewendet, der spezifisch sein Antigen, das nachgewiesen werden soll bindet. Anschließend wird ein 2. Anti-Körper verwendet, der wiederum an den 1. Anti-Körper bindet, und bei Bindung reagiert. Bei der Immunfluoreszenz geschieht dies mittels eines spezifischen Farb-Signals, z.B. grün oder rot. Dieses Farb-Signal kann dann unter einem Fluoreszenz-Mikroskop erkannt werden

In dieser Arbeit wurde die Immunfluoreszenz angewendet, um folgende Zellarten spezifisch darzustellen: Endothelzellen (HUVECs), neonatale Kardiomyozyten von der Ratte (CMCs), und Fibroblasten von der Maus (3T3-Zellen)

#### *Mikroskopische Darstellung und Fotoaufnahme*

Für die Darstellung der immun-gefärbten Schnitte wurde ein Durchlichtmikroskop, DM 2000 von Leica mit Fluoreszenz Lampe verwendet, DFC425C von Leica. Für digitale Fotoaufnahmen wurde eine integrierte Mikroskop-Kamera von Leica verwendet und mittels dem Programm Leica Application Suite gespeichert.

#### *Antigene*

Um diese unterschiedlichen Zellarten darstellen zu können, wurden folgende Antigene ausgewählt:

- Von-Willebrand-Faktor (HUVECs),
- Troponin (CMC),
- Myosin (CMC),
- Cardiac-Actinin (CMC),
- alphaSMA (FB),
- Vimentin (FB),
- Connexin (FB)

Für die Darstellung dieser Antigene wurden folgende Antikörper verwendet: Anti-Von-Willebrand-Faktor (HUVECs), Anti-Troponin (CMC), Anti-Myosin (CMC), Anti-Cardiac-Actinin (CMC), Anti-alphaSMA (FB), Anti-Vimentin (FB). Zudem wurde die Zellkernfärbung mit DAPI angewendet.

#### *DAPI Färbung*

Die DAPI Färbung wurde genutzt und jegliche Art von Zellen mittels Färbung der Zellkerne und deren DANN darzustellen. Dabei wurden ca. 2 Tropfen von der Färbelösung DAPI Vectashield (Vector Laboratories, USA) auf den histologischen Schnitt gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und anschließend mittels Aluminium Folie UV-sicher bedeckt. Nach einer Einwirkzeit von ca. 15 min wurde der Schnitt unter dem Mikroskop begutachtet.

#### *Von-Willebrand-Faktor Immunfärbung*

Um Endothelzellen (HUVECs) spezifisch darzustellen, wurde als Antigen der von-Willebrand-Faktor genutzt, der von Endothelzellen exprimiert wird und als ein typischen Endothelzellmarker fungiert. Als Antikörper wurde der Anti-Von-Willebrand-Faktor-Antikörper verwendet. Der 1. Antikörper war Anti-Human-Von-Willebrand-Faktor-Antikörper (DAKO, Agilent, USA), in Konzentration 1:300  $\mu$ l. Der 2. Antikörper, der zur Darstellung des 1. Antikörper dient, war Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (Invitrogen), in Konzentration 1:200  $\mu$ l.

#### *Troponin Immunfärbung, Myosin Immunfärbung, Cardiac Actinin Immunfärbung*

Für die selektive Darstellung von Kardiomyozyten (CMCs) wurden die Antikörper Anti-Troponin rabbit anti-rat (Invitrogen), Anti-Myosin rabbit anti-rat (Invitrogen), anti-Cardiac-actinin rabbit anti-rat (Invitrogen) verwendet. Der 1. Antikörper wurde je in Konzentration 1:300  $\mu$ l verwendet. Der 2. Antikörper war Alexa Fluor 555 Anti-Rabbit Antikörper, in Konzentration 1:200  $\mu$ l.

#### *Alpha-SMA Immunfärbung, Connexin Immunfärbung, Vimentin Immunfärbung*

Für die spezifische Darstellung von Fibroblasten (3T3) wurden die Antikörper Anti-alpha-sma rabbit anti-rat, Anti-Connexin rabbit anti-rat, und Anti-Vimentin rabbit anti-rat verwendet. Die

Konzentration der 1. Antikörper war jeweils 1:300  $\mu$ l. Der 2. Antikörper war Alexa Fluor 555 Anti-Rabbit Antikörper, in Konzentration 1:200  $\mu$ l.

### *Aufbereitung der Gewebe*

Die für die Immunhistologie verwendeten Gewebe wurden gleichermaßen aufbereitet, wie die für die Histologie verwendeten Gewebe. Auch hierfür wurden Gewebe von rezellularisierten und rekultivierten Herzen verwendet, die nach folgenden Bereichen analysiert wurden: linker Ventrikel, rechter Ventrikel, Septum, Apex.

### *Immunfluoreszenz Färbung*

Nach dem Auftauen der Schnitte auf den Objektträgern wurden die Schnitte folgendermaßen weiterverarbeitet (Tabelle 19).

Für die spätere Färbung und das gezielte Anwendung des Antikörpers wurden die Schnitte mit einem Markierstift, DAKO Pen von DAKO Agilent, umrandet, damit die Antikörper-Färbeflüssigkeit auf dem Gewebe auf dem Objektträger konzentriert verbleibt.

Daraufhin wurden die Schnitte Formaldehyd 4% fixiert und anschließend fand dreimal eine Spülung mit PBS statt. IM Folgenden wurde Triton-X-100 1 min angewendet und anschließend wieder dreimal eine Spülung mit PBS.

Im Anschluss wurden die Schnitte mit einer Blockierlösung, BSA (Bovines-Serum-Albumin) 5% und Tween in PBS 0,5% behandelt und kamen in eine Feuchtkammer für 3 min in den Inkubator bei 37°.

Danach erfolgte die Behandlung mit dem 1. Antikörper in der Lösung BSA 1% und Tween-20 0,1% mit insgesamt 100  $\mu$ l und daraufhin eine Inkubation bei 37° für 1h. Danach erfolgte eine dreimalige Spülung über je 5 min mit Tween-20 0,1% in PBS.

Im Anschluss wurde der 2. Antikörper angewendet, in Lösung BSA 1% und Tween-20 0,1% mit insgesamt 100  $\mu$ l und daraufhin eine Inkubation bei 37° für 45 min. Daraufhin fand eine erneute dreimalige Spülung mit Tween-20 0,1% in PBS für je 5 min statt.

Als letztes erfolgte bei Bedarf eine Zellkernfärbung mittels DAPI Vectashield, Vector Laboratories, USA, und das Eindecken.

Danach erfolgten die Darstellung, Begutachtung und Fotoaufnahmen am Mikroskop.

### Protokoll Immunhistologie

| Nr. | Schritt                                                                                                                                                                        |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1   | Fettstift DAKO Pen Umrandung der Schnitte auf Objektträgern                                                                                                                    |
| 2   | Formaldehyd 4% + dreimal Spülung mit PBS                                                                                                                                       |
| 3   | Triton-X-100 1 min + dreimal Spülung mit PBS                                                                                                                                   |
| 4   | Blockieren mit BSA (Bovines-Serum-Albumin) 5% 200 µl 3 min Inkubat                                                                                                             |
| 5   | Lösung mit 1. Antikörper in BSA 1% und Tween 0,1% 100 µl 1h in Feuchtkammer in Inkubator (nur Positiv Schnitt) (Negativ Kontrolle in PBS)                                      |
| 6   | Spülung mit Tween-20 0,1% in PBS, 3x für je 5 Minuten                                                                                                                          |
| 7   | Lösung mit 2. Antikörper in BSA 1% und Tween 0,1% 100 µl 45 min in Feuchtkammer in Inkubator (nur Positiv Schnitt) (Negativ Kontrolle in PBS)                                  |
| 8   | Spülung mit Tween-20 0,1% in PBS, 3x für je 5 Minuten                                                                                                                          |
| 9   | Zellkernfärbung mittels DAPI Vectashield, ca. 2 Tropfen auf Schnitt geben, Objektträger in Aluminium-Folie eingewickelt und einwickeln und für ca. 15 Minuten einwirken lassen |
| 12  | Darstellung unter dem Fluoreszenz-Miskroskop                                                                                                                                   |

Tabelle 19: Protokoll Immunhistologie

## 2.2.9 Live-Dead-Assay – Cell Tracking

Der Live-Dead-Assay bzw. Das Cell-Tracking der Darstellung von lebenden Zellen und damit dem Nachweis der Zellvitalität. Hierbei werden unterschiedliche Cell-Tracker-Farbstoffe eingesetzt, um die Zellen anschließend innerhalb der extrazellulären Matrix an einem Laser-Mikroskop darzustellen. Die verwendeten Farbstoffe weisen eine geringe Zelltoxizität auf.

In dieser Arbeit wurden hierfür die für die vaskulär und interstitiell kombiniert simultan konsekutiv Co-Re-Besiedlung und statisch und perfundiert re-Kultivierung verwendeten Endothelzellen (HUVECs) und Kardiomyozyten (CMCs) kurz vor der Co-Re-Besiedlung mit den Cell-Tracker-Farbstoffen CMFDA (5-Chlormethylfluoresceindiacetat) und CMPTX (Chloromethyl-phenyl-carbonyl-amino-octamethyl-dihydro-pyrano-diquinolin-iumyl-benzoate) (LifeTechnologies) gefärbt. Nach der Re-Kultivierung und Weiterverarbeitung der Herzen in die vier Herzbereiche (Linker Ventrikel, rechter Ventrikel, Septum und Apex) wurden diese mittels eines Konfokal-Laser-Mikroskops (LSM 700 von Carl Zeiss, Jena) analysiert und die lebenden HUVECs und CMCs dargestellt.

Ziel hierbei war es, die vaskuläre und interstitielle einzeln und auch kombiniert darzustellen. Bei der vaskulären Re-Besiedlung mit HUVECs steht die Darstellung der Re-Endothelisierung und Re-Vaskularisierung im Vordergrund. Dabei sollten möglichst zahlreiche Gefäße und Gefäßbäume mit ihren Verzweigungen und Gefäßästen dargestellt werden. Bezüglich der interstitiellen Re-Besiedlung sollten einzelne und auch Haufenweise-angeordnete Kardiomyozyten innerhalb der Matrix dargestellt werden. Bei der Co-Re-Besiedlung sollten beide Re-Besiedlungs-Arten gleichzeitig dargestellt werden, mit Herzbereichen der kardialen ECM, die sowohl HUVECs als auch CMCs in unmittelbarer Nähe zu einander zeigen.

Im Folgenden ist das Protokoll aufgeführt, welches für das Cell-Tracking und die Live-Färbung mit CMFDA und CMPTX, verwendet wurde (Tabelle 20).

### *Protokoll Live-Dead-Assay - Cell Tracking*

| Nr. | Schritt                                                        |
|-----|----------------------------------------------------------------|
|     |                                                                |
|     | <b><u>Vorbereitung:</u></b>                                    |
|     | Farbstoffe: CMFDA und CMPTX                                    |
|     | Zellen: HUVECs und CMCs                                        |
|     | Zellkultur-Material: Serumfreies Medium, EC-Medium, CMC-Medium |

|          |                                                                                                                                                                               |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|          | <b><u>Durchführung:</u></b>                                                                                                                                                   |
| <b>1</b> | Berechnen des benötigten Volumen an Farbstoff anhand der gewünschten Konzentration (z.B. 2,5µM) (sowohl von CMFDA, als auch von CMPTX)                                        |
| <b>2</b> | Herstellen der Arbeitslösung: Pipettieren des Farbstoffes in bestimmte Menge serumfreies Medium (Falcons mit Arbeitslösung und Zellsuspensionen stets in Alufolie einwickeln) |
|          |                                                                                                                                                                               |
|          | <i>Färben der Zellen</i>                                                                                                                                                      |
| <b>3</b> | Falcons mit Zellen (HUVECs und 3T3-Zellen) aus Wärmebad/Inkubator holen                                                                                                       |
| <b>4</b> | Zentrifugieren, Absaugen, Resuspendieren mit errechnetem Volumen an Arbeitslösung                                                                                             |
| <b>5</b> | <b>Inkubator: 30min</b> (da Zellen mittleren bis hohen Stoffwechsel haben)                                                                                                    |
|          |                                                                                                                                                                               |
|          | <i>Ersetzen der Arbeitslösung mit Growth-Medium</i>                                                                                                                           |
| <b>6</b> | Zentrifugieren, Absaugen, Resuspendieren mit berechnetem Volumen (diesmal mit zell-spezifischem Growth Medium ◇ HUVECs: EC-Medium, CMC-Zellen: CMC-Medium)                    |
| <b>7</b> | <b>Inkubator: 30min</b>                                                                                                                                                       |
|          | <b><u>Ziel:</u></b>                                                                                                                                                           |
|          | Bei Co-Besiedlung:                                                                                                                                                            |
|          | bisher: Ansicht von oben und Gefäßzellen (Endothelzellen) und Herzzellen (Primäre Kardiakale Zellen) in unterschiedlicher Ebene (da oberflächlich besiedelt)                  |
|          | demnächst: Ansicht von der Seite: Gefäßzellen und Herzzellen in einer Ebene (durch interstitielle Besiedlung)                                                                 |
| <b>8</b> | Dann weiter mit Protokoll Co-Re-Besiedlung und Re-Kultivierung                                                                                                                |
| <b>9</b> | Auswerten am Laser-Mikroskop                                                                                                                                                  |

**Tabelle 20: Prokoll Live-Dead-Assay Cell-Tracking**

## 2.2.10 Automatisierte code-basierte quantitative Bildanalyse mittels Fiji ImageJ

Zur quantitativen histologischen Auswertung der vaskulären und interstitiellen kombinierten simultanen konsekutiven Co-Re-Besiedlung und Re-Kultivierung und zur Bestimmung der Zellzahl und Zelldichte pro histologischem Schnitt wurde das Open Source Programm Fiji ImageJ in Version 2.9.0 / 1.53t verwendet. Zur Automatisierung und standardisierten Ausführung dieses Prozesses wurde ein eigener entwickelter und programmierter Code (Quelltext) verwendet. Dieser ist nachfolgend aufgeführt und wird mittels MacroEditor in Fiji Image J angewendet.

### *Neu entwickelter Code für vollautomatisierte standardisierte code-basierte quantitative Zellzahlanalyse*

Die hier verwendete Methode der quantitativen Bildanalyse mit der Open Source Software Fiji ImageJ wurde speziell für die Analyse von HE-Färbungen von ECM re-zellularisierten histologischen Schnitten maßgeschneitert, speziell hierfür neu entwickelt und etabliert. Es ist eine vollautomatisierte standardisierte code-basierte Methode zur quantitativen Zellzahlanalyse von histologischen Schnitten. Der Code wurde mit Hilfe des im Kurs 224.20 „wissenschaftliche Bildbearbeitung und Analyse“ mit Fiji ImageJ der MedicalResearchSchool der Heinrich-Heine-Universität erworbenen Knowhows entworfen.

### *Konzept des Codes zur Bildanalyse*

Diese Methode basiert auf folgendem Konzept. Zuerst wird das Bild vorbereitet, in RGB, 8-Bit in Graustufen umgewandelt. Dann finden folgende Schritte statt, die alle dazu dienen insgesamt den Kontrast zwischen Zellen und Umgebungsstraße zu erhöhen. Dabei wird zuerst ein Filter angewendet, also der Farb-Kontrast erhöht, und anschließend in den zahlreichen Schritten der Schwarz-Weiß-Kontrast erhöht. Danach findet der eigentliche Schritt zur Unterscheidung der Zellen von ECM statt. Daraufhin folgt eine leichte Feinjustierung und der Schritt zur Zellzählung.

Dieses Prinzip kann prinzipiell bei jeglicher Art von histologischen Schnitten und Färbungen angewendet werden. Von entscheidender Bedeutung ist jedoch die individuelle Anpassung für den jeweiligen Use Case, also in diesem Fall die HE-Färbung. Da die HE-Färbung Zellkerne bläulich locker färbt und Matrix eher rötlich wurde hier ein Filter gewählt, der in der Lage ist, blau Töne hervorzuheben. Dies ist z.B. der hier verwendete CMYK-Filter (Cyan Magenta Gelb Schwarz). Die Schwarz-Weiß Kontrastierung ist weitestgehend ähnlich. Zusätzlich von

Bedeutung ist die eigentliche Unterscheidung von Zellen und Matrix mit Hilfe der AutoThreshold Funktion. Hierfür wird ein spezieller Schwellenwert festgelegt, der bestimmt wie stark die Zellen von der Matrix kontrastiert werden. Um diesen Schwellenwert möglichst gut wählen zu können, wurde anhand von repräsentativen HE-Schnitten mit Zell-Re-Besiedlung justiert und kalibriert. In der Folge kann diese Funktion für alle He Schnitte gleichermaßen angewendet werden. Dies ist wichtig, um standardisierte und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

### *Standardisierung der Zellzahlanalyse*

Die gleiche Anwendung des gleichen Codes ermöglicht eine individuelle Anpassung für jeden Schnitt und zugleich eine absolute Standardisierung, da immer dieser Prozess durchgeführt wird.

### *Automatisierung*

Die Automatisierung dieses Prozesses ermöglicht die sichere und schnelle Bildanalyse von einer hohen Anzahl von Bildern und histologischen Schnitten. Die Ergebnisse sind vergleichbar und unterliegen keinem individuell humanen Prozessfehler. Ein weiterer Vorteil der Automatisierung besteht in der Möglichkeit nicht nur ein Bild einzeln, sondern zahlreiche Bilder hintereinander und gleichzeitig analysieren zu lassen, was eine enorme Zeitersparnis darstellt.

### *Analyse der absoluten Zellzahl eines Schnittes:*

Dabei werden folgende Schritte in Image J ausgeführt:

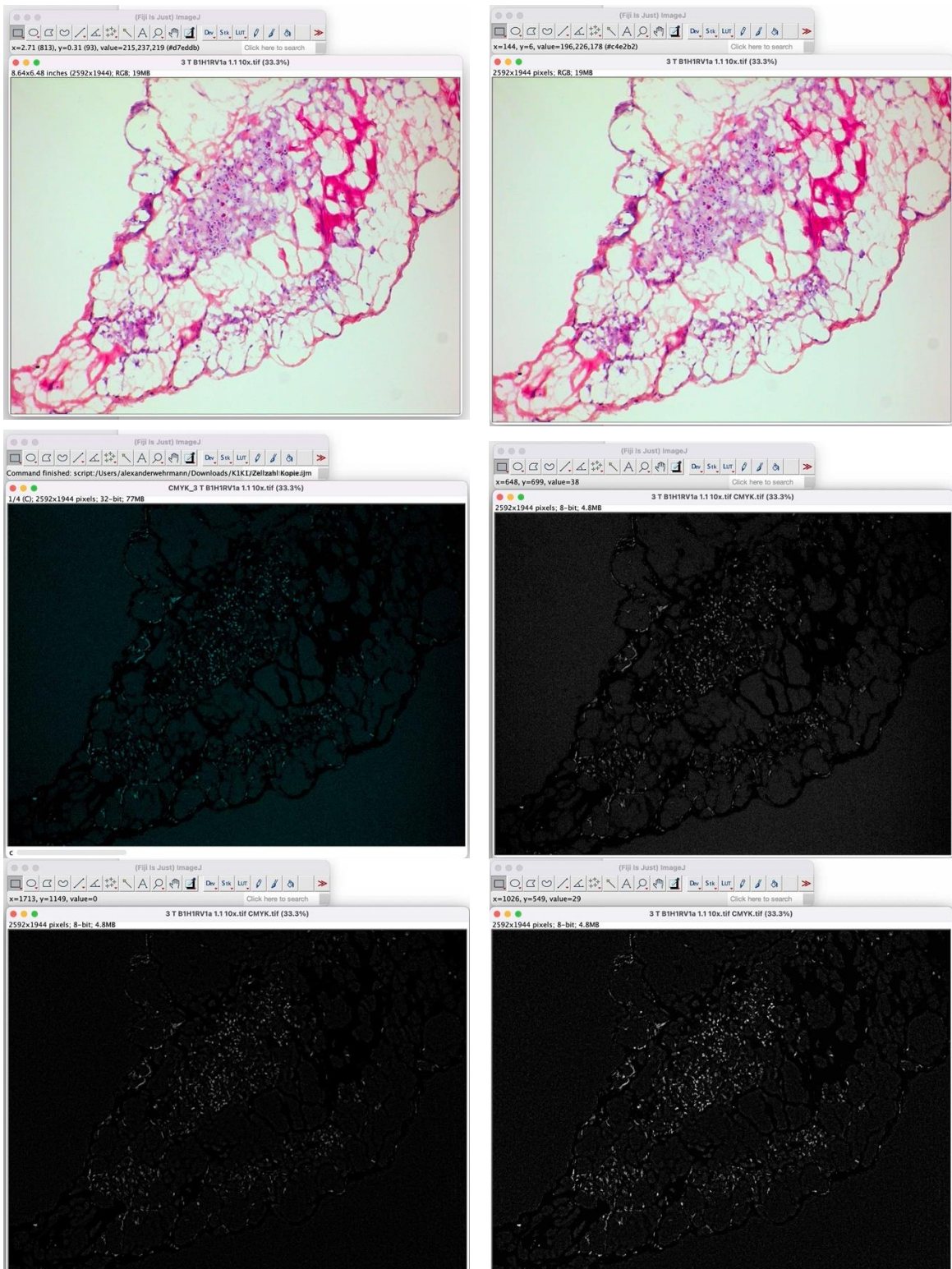
1. Öffnen des Bildes in Fiji ImageJ (Abb. 14, oben links)
2. Umwandeln der Datei in RGB (Abb. 14, oben rechts)
3. Anwenden des **CMYK-Filters**, um Farbtöne in besserem Kontrast darzustellen (Abb. 14, mitte links)
4. Umwandeln der Datei in **8-bit** und **Graustufen** (Abb. 14, mitte rechts)
5. Anwenden der Funktion **Convolved Background Subtraction**, (Abb. 14, unten links), um Hintergrund Strukturen, in diesem Fall Hintergrund Matrix auszublenden.
6. **Enhance Contrast**, um Kontrast weiter zu erhöhen (Abb. 14, unten rechts)

7. Anwenden der Funktion **AutoThreshold** mit der Methode **MaxEntropy white**, dem Schwellenwert, der die Unterscheidung zwischen Schwarz und Weiß festlegt, und damit die Unterscheidung zwischen Zelle und Matrix. (Abb. 15, oben links)
8. Anwenden der Funktion **Watershed** um Bild in Schwarz-Weiß darzustellen (Abb. 15, oben rechts)
9. Anwenden der Funktion **Analyze Particles** (Abb. 15 unten links)
10. Deaktivieren der Funktion **Label im ROI-Manager** (Abb. 15, unten rechts), um Zellen nicht als Zahlen darzustellen
11. Darstellen des Ergebnisses im Tabellen-Fenster und ROI-Manager
12. Speichern der Ergebnisse in festgelegtem Ordner

Anschließend wurden die Ergebnisse zur Weiterverarbeitung in Excel überführt.

Diese Ergebnisse und Original-Daten der automatisierten Bildanalyse sind im Excel-Format in einer Tabelle am Ende des Kapitels Ergebnisse dargestellt.

Im Folgenden ist der Bildanalyse Prozess mit Fiji ImageJ exemplarisch anhand eines HE-Schnittes einer perfundierten Co-Re-Besiedlung dargestellt (Abb. 14, Abb. 15).



**Abb. 14:** vollautomatisierte standardisierte Code-basierte quantitative Bildanalyse mit der Software Fiji ImageJ

oben links: Öffnen des Bildes mit Fiji ImageJ

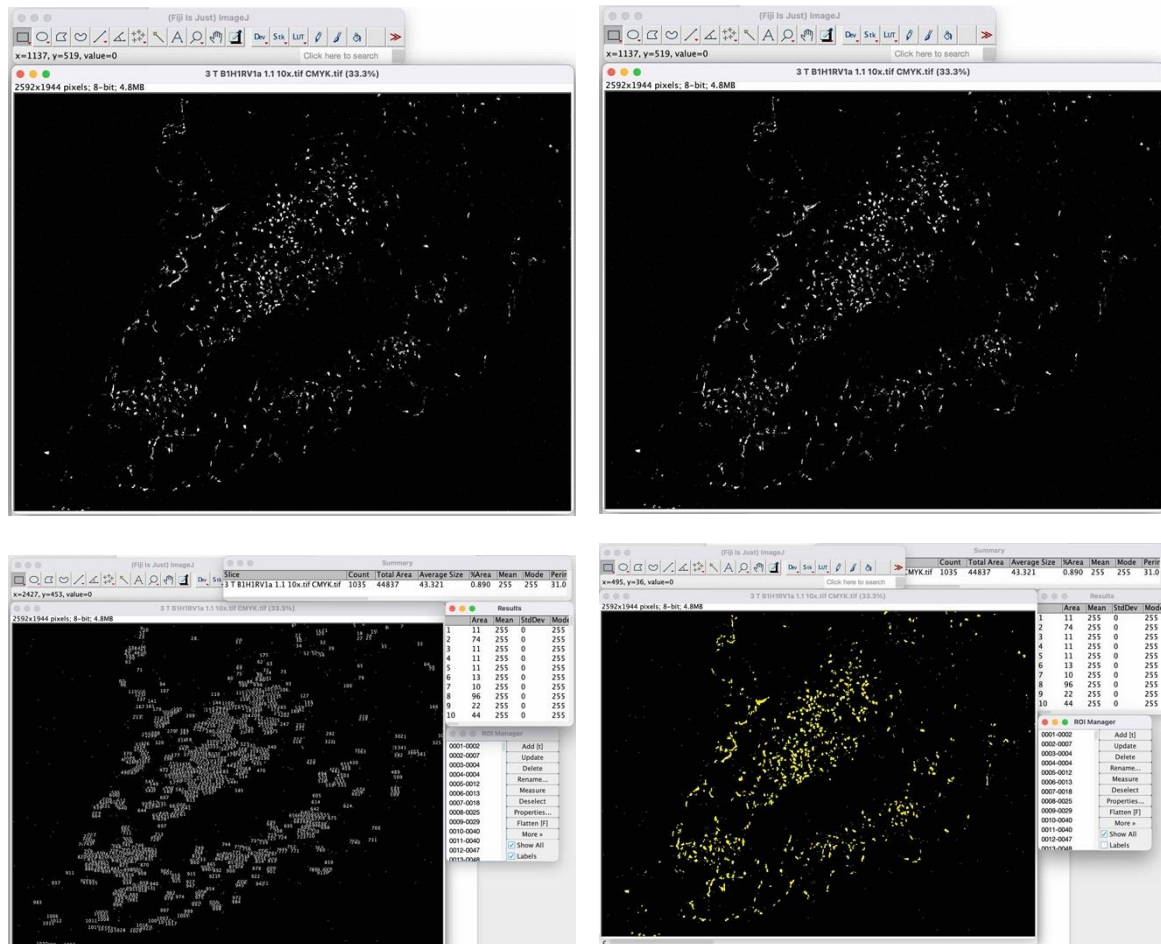
oben rechts: Umwandeln des Bildes in RGB

Mitte links: Anwenden des CMYK-Filters (Cyan Magenta Gelb Schwarz)

Mitte rechts: Umwandeln des Bildes in 8-bit und Graustufen

unten links: Anwenden der Funktion Convolved Background Subtraction, mit Median radius = 25

unten rechts: Anwenden der Funktion Enhance Contrast, mit Sättigung 0,01 normalisiert



**Abb. 15: vollautomatisierte standardisierte Code-basierte quantitative Bildanalyse mit der Software Fiji ImageJ - Teil 2**

oben links: Anwenden der Funktion AutoThreshold mit der Methode MaxEntropy white

oben rechts: Anwenden der Funktion Watershed

unten links: Anwenden der Funktion Analyze Particles, mit der Größe 10-500

unten rechts: Anzeigen der analysierten Partikel als Punkte in der Farbe gelb

### *Code (Quelltext) der automatisierten Bildanalyse mit Fiji ImageJ*

Dieser an einem Bild exemplarisch dargestellte Bildanalyse Prozess wird mittels eines Codes automatisiert durchgeführt. Nachfolgend ist der entsprechende Code hierfür aufgeführt.

Folgender Code führt die automatisierte Bildanalyse mit Fiji ImageJ durch. Dazu wird der Code im Makro Editor geöffnet und auf den Button „Play“ gedrückt. Zuvor wird noch das zu analysierende Bild oder die Bilder in Fiji ImageJ geöffnet.

```
x=getTitle();

for (i = 0; i < 10; ) {
run("RGB Color");
y=getTitle();

if (indexOf(y, ".thb") == true) {
close(y);
close()
i = 0;}
else {
i = 15; }}

run("Set Scale...", "distance=0 known=0 unit=pixel");
saveAs("/Users/alexanderwehrmann/Downloads/Fiji/RGB/" + y);

run("RGB to CMYK");
z=getTitle();

run("Duplicate...", " ");
rename(x + " CMYK.tif");
a=getTitle();
setOption("ScaleConversions", true);
run("8-bit");
run("Grays");
run("Convolved Background Subtraction", "convolution=Median radius=25");
run("Enhance Contrast...", "saturated=0.01 normalize");
run("Auto Threshold", "method=MaxEntropy white");
run("Watershed");
run("Analyze Particles...", "size=10-500 display clear summarize add");

roiManager("Show All without labels");
roiManager("Save", "/Users/alexanderwehrmann/Downloads/Fiji/Analysed/" + a + " RoiSet.zip");

selectWindow("Results");
```

```
saveAs("Results", "/Users/alexanderwehrmann/Downloads/Fiji/Analysed/" + a + " Results.tsv");
run("Close");
```

```
selectWindow(a);
saveAs("/Users/alexanderwehrmann/Downloads/Fiji/Analysed/" + a);
close();
```

```
selectWindow(y);
roiManager("Show None");
roiManager("Show All");
saveAs("/Users/alexanderwehrmann/Downloads/Fiji/Analysed/" + y);
```

```
selectWindow(z);
close();
```

```
selectWindow(x);
close();
```

```
selectWindow(y);
close();
```

```
runMacro("/Users/alexanderwehrmann/Downloads/Fiji/Neuer Ordner 3/Macro111 Kopie1.ijm.ijm.ijm
Kopie1.ijm");
```

### *Analyse der Fläche eines Schnittes:*

Zudem wurde mit einem zweiten Code die Schnittfläche eines Bildes analysiert, die von Matrix und Zellen bedeckt ist. Daraus konnte anschließend die Zelldichte berechnet werden mit folgender Formel: Zellzahl (absolut) / Schnittfläche (in Pixel) \* 1000.

### *Analyse der Schnittfläche eines Schnittes (= Anteil der Matrix am Gesamt-Schnitt):*

```
x=getTitle
run("RGB Color");
y=getTitle
run("Set Scale...", "distance=0 known=0 unit=pixel");
saveAs("/Users/alexanderwehrmann/Downloads/Fiji/RGB1/" + y)
y1=getTitle();
run("Duplicate...", " ");
z=getTitle

run("Enhance Contrast...", "saturated=0.04");
```

```

run("8-bit");
run("Grays");
run("Auto Threshold", "method=Intermodes");
run("Create Selection");
run("ROI Manager...");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 0);

run("Set Measurements...", "area mean standard modal min centroid center perimeter bounding fit shape feret's
integrated median skewness kurtosis area_fraction stack redirect=None decimal=3");
roiManager("Measure");
roiManager("Show All");

roiManager("Save", "/Users/alexanderwehrmann/Downloads/Fiji/Analysed F/" + z + "RoiSet.zip");
roiManager("Delete");

selectWindow("Results");
saveAs("Results", "/Users/alexanderwehrmann/Downloads/Fiji/Analysed F/" + z + "Results.tsv");

selectWindow(z);
saveAs("/Users/alexanderwehrmann/Downloads/Fiji/Analysed F/" + z)
close();

selectWindow(y1);
roiManager("Show None");
roiManager("Show All");
saveAs("/Users/alexanderwehrmann/Downloads/Fiji/Analysed F/" + y1)
close();

runMacro("/Users/alexanderwehrmann/Downloads/Fiji/Analysed F/Macro F.ijm");

```

### 2.2.11 Statistik

Die Daten wurden mit dem Statistik-Programm SPSS Version 27 von IBM ausgewertet.

Zur Aufbereitung und Sortierung der Daten wurden sie vorher in Microsoft Excel Version 2023 bearbeitet. Zur Erstellung der Diagramme wurde ein eigener Code verwendet, der nachfolgend aufgeführt ist. Der Code beinhaltet folgende Schritte: Gruppierungsvariablen anlegen, passende Selektion auswählen, Diagramm erstellen.

Im Folgenden ist der exemplarisch dargestellte Code:

*\* Encoding: UTF-8.*

*\* Herz 1+3*

GGGRAPH

```
/GRAPHDATASET NAME="graphdataset" VARIABLES=DateiFoto Zellzahl gh MISSING=LISTWISE  
REPORTMISSING=NO DATAFILTER=gh(VALUE=1 UNLABELED=EXCLUDE)  
/GRAPHSPEC SOURCE=INLINE.
```

BEGIN GPL

```
GUIDE: axis(dim(1), label("Herz"))  
GUIDE: axis(dim(2), label("Zellzahl"))  
GUIDE: text.title(label("Vergleich Zellzahl: Herz 1 (perfundiert) und Herz 3 (statisch)"))  
SCALE: linear(dim(2), include(0))  
ELEMENT: interval(position(DateiFoto*Zellzahl), shape.interior(shape.square))  
END GPL.
```

GGGRAPH

```
/GRAPHDATASET NAME="graphdataset" VARIABLES=DateiFoto Zelldichte gh MISSING=LISTWISE  
REPORTMISSING=NO DATAFILTER=gh(VALUE=1 UNLABELED=EXCLUDE)  
/GRAPHSPEC SOURCE=INLINE.
```

BEGIN GPL

```
GUIDE: axis(dim(1), label("Herz"))  
GUIDE: axis(dim(2), label("Zelldichte (Zellzahl / Schnittfläche * 1000)"))  
GUIDE: text.title(label("Vergleich Zelldichte: Herz 1 (perfundiert) und Herz 3 (statisch)"))  
SCALE: linear(dim(2), include(0))  
ELEMENT: interval(position(DateiFoto*Zelldichte), shape.interior(shape.square))  
END GPL.
```

GGGRAPH

```

/GRAPHDATASET NAME="graphdataset" VARIABLES=DateiFoto Zellzahl gh MISSING=LISTWISE
REPORTMISSING=NO DATAFILTER=gh(VALUES=7 UNLABELED=EXCLUDE)
/GRAPHSPEC SOURCE=INLINE.
BEGIN GPL
GUIDE: axis(dim(1), label("Herz"))
GUIDE: axis(dim(2), label("Zellzahl"))
GUIDE: text.title(label("Vergleich Zellzahl: Herz 1 (perfundiert) nach Bereichen"))
SCALE: linear(dim(2), include(0))
ELEMENT: interval(position(DateiFoto*Zellzahl), shape.interior(shape.square))
END GPL.

GGRAPH
/GRAPHDATASET NAME="graphdataset" VARIABLES=DateiFoto Zelldichte gh MISSING=LISTWISE
REPORTMISSING=NO DATAFILTER=gh(VALUES=7 UNLABELED=EXCLUDE)
/GRAPHSPEC SOURCE=INLINE.
BEGIN GPL
GUIDE: axis(dim(1), label("Herz"))
GUIDE: axis(dim(2), label("Zelldichte (Zellzahl / Schnittfläche * 1000)"))
GUIDE: text.title(label("Vergleich Zelldichte: Herz 1 (perfundiert) nach Bereichen"))
SCALE: linear(dim(2), include(0))
ELEMENT: interval(position(DateiFoto*Zelldichte), shape.interior(shape.square))
END GPL.

GGRAPH
/GRAPHDATASET NAME="graphdataset" VARIABLES=DateiFoto Zellzahl gh MISSING=LISTWISE
REPORTMISSING=NO DATAFILTER=gh(VALUES=8 UNLABELED=EXCLUDE)
/GRAPHSPEC SOURCE=INLINE.
BEGIN GPL
GUIDE: axis(dim(1), label("Herz"))
GUIDE: axis(dim(2), label("Zellzahl"))
GUIDE: text.title(label("Vergleich Zellzahl: Herz 3 (statisch) nach Bereichen"))
SCALE: linear(dim(2), include(0))
ELEMENT: interval(position(DateiFoto*Zellzahl), shape.interior(shape.square))
END GPL.

GGRAPH
/GRAPHDATASET NAME="graphdataset" VARIABLES=DateiFoto Zelldichte gh MISSING=LISTWISE
REPORTMISSING=NO DATAFILTER=gh(VALUES=8 UNLABELED=EXCLUDE)
/GRAPHSPEC SOURCE=INLINE.
BEGIN GPL
GUIDE: axis(dim(1), label("Herz"))
GUIDE: axis(dim(2), label("Zelldichte (Zellzahl / Schnittfläche * 1000)"))
GUIDE: text.title(label("Vergleich Zelldichte: Herz 3 (statisch) nach Bereichen"))

```

*SCALE: linear(dim(2), include(0))*

*ELEMENT: interval(position(DateiFoto\*Zelldichte), shape.interior(shape.square))*

## 2.2.12 Versuchsaufbau

### *Überblick*

In Vor- und Hauptversuchen wurden insgesamt mehr als 20 Ratten-Herzen mittels automatisierter Langzeit-Perfusion dezellularisiert, anschließend vaskulär, interstitiell oder vaskulär interstitiell simultan konsekutiv kombiniert co-Re-Besiedelt mit HUVECs und CMCs oder 3T3-Zellen, und schließlich statisch und perfundiert re-kultiviert. Zur Auswertung wurden die Histologie, Immunhistologie und der Live-Dead-Assay genutzt. Hierbei wurden verschiedene histologische und immunhistochemische Methoden getestet, und schließlich insgesamt ca. 6000 HE-Schnitte angefertigt. Bei der Immunhistologie wurden 9 verschiedene Immunfluoreszenz Antikörper verwendet, die DAPI-Färbung und für Doppel-Immunfärbung Kombinationen aus diesen. Für den Live-Dead-Assay und das Cell Tracking wurden 2 Farbstoffe, CMFDA und CMPTX, und DAPI verwendet. Die automatisierte Bildanalyse fand mit Fiji ImageJ statt.

### *Vorversuche*

Es wurden eine Reihe Vorversuche zur Etablierung der Methoden durchgeführt. Dabei wurde die vaskuläre, interstitielle und Co-Re-Besiedlung angewendet, jeweils mit HUVECs und 3T3-Zellen (Fibroblasten) und jeweils mit HUVECs und CMCs.

Neben kleineren Einzel Re-Besiedlungen wurden insgesamt 10 Vorversuche bzw. Besiedlungen durchgeführt, die in der Anlage dargestellt sind.

### *Hauptversuche*

Die Hauptversuche umfassen insgesamt 3 Besiedlungsreihen, die wiederum je 4 Re-Besiedlungen beinhalten. Insgesamt fanden 12 Co-Re-Besiedlungen (n=12) statt, davon 6 mit statischer Re-Kultivierung und 6 mit perfundierter Re-Kultivierung. Die Nomenklatur der 3 Besiedlungsreihen lautet: B1 (Besiedlung 1), H1 (Herz 1), LV (Linker Ventrikel), 1 (Schnitt 1)

Die finale Gesamt-Nomenklatur ist der Gesamt-Anzahl von Herzen, also 12 angepasst, und lautet dementsprechend: H1-H12

Die Re-Besiedlung fand vaskulär und interstitiell simultan konsekutiv statt, entsprechend dem angegebenen Protokoll. Dies bedeutet, es fand zuerst die interstitielle Re-Besiedlung mit Kardiomyozyten (CMCs) mittels intra-ventrikulärer Injektion statt, und anschließend im gleichen Schritt direkt darauffolgend die vaskuläre Re-Besiedlung mit Endothelzellen (HUVECs) mittels retrograder aortaler Re-Perfusion.

Nach der Co-Re-Besiedlung fand die Re-Kultivierung der Herzen auf zwei unterschiedliche Re-Kultivierungsarten statt, perfundiert und statisch, jeweils über 4 Tage. Bei der statischen Re-Kultivierung fand ein Mediumwechsel nach oben beschriebenem Protokoll am 2. Tag nach der Re-Besiedlung statt. Bei der perfundierten Re-Kultivierung fand ein Mediumwechsel und eine erneute retrograde aortale Re-Perfusion mit dem entsprechenden Nährmedium statt, nach standardisiertem Protokoll. Nach der Re-Kultivierung wurden die Herzen weiterverarbeitet und präpariert in vier Bereiche: Linker Ventrikel, rechter Ventrikel, Septum und Apex.

### *Auswertung*

Die Auswertung dieser Herzbereiche erfolgte histologisch, immunologisch und mittels weiterer Methoden (Live-Dead-Assay und molekularbiologisch mittels PCR). Die Histologie erfolgte weitestgehend mittels HE-Färbung zum Screening der Schnitte auf in der Matrix vorhandene Zellen und zur Darstellung der Co-Re-Besiedlung. Die Immunhistologie beinhaltet die Anwendung spezifischer Anti-Körper zur spezifischen Darstellung der HUVECs und CMCs, jeweils einzeln sowie kombiniert. Der Live-Dead-Assay diente zur Darstellung von lebenden Zellen beider Zellarten.

Die Auswertung erfolgte hierbei sowohl qualitativ bezogen auf Erfolg der Co-Re-Besiedlung und Re-Kultivierung hinsichtlich Vorhandenseins und Überleben der beiden Zellarten innerhalb der extrazellulären Matrix, und quantitativ hinsichtlich absoluter Zellzahl und relativer Zelldichte mit Fiji ImageJ.

Die Ergebnisse und die Diskussion folgen in den nächsten beiden Abschnitten dieser Arbeit.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Übersicht der Ergebnisse

Insgesamt wurden in den Hauptversuchen 12 Ratten-Herzen dezellularisiert nach dem im Methoden-Teil beschriebenen Protokoll. Anschließend wurden sie vaskulär und interstitiell simultan konsekutiv Co-Re-Besiedelt mit HUVECs und CMCs nach dem beschriebenen Protokoll. Im Anschluss wurden sie re-kultiviert auf zwei Arten: perfundiert und statisch.

Die Ergebnisse sollten folgende Fragestellungen beantworten:

- a) Ist eine simultane konsekutive vaskuläre und interstitielle Co-Re-Besiedlung mit HUVECs und CMCs grundsätzlich erfolgreich mit einem Zellüberleben über mindestens 4 Tage. Dies sollte anhand repräsentativer Histologie und Immunhistologie gezeigt werden.
- b) Welche Re-Kultivierungsart, perfundiert vs. Statisch ist besser geeignet, um nach einer erfolgreichen Co-Re-Besiedlung eine erfolgreiche Re-Kultivierung durchzuführen hinsichtlich Zellwachstum gemessen an Zellzahl und Zelldichte.

Für die Auswertung wurden die histologischen Präparate zum einen qualitativ repräsentativ dargestellt, sowie quantitativ ausgewertet und miteinander verglichen. Hierfür wurde eine automatisierte Zellzählung mit Fiji ImageJ verwendet, nach oben beschriebenem Protokoll. Die Ergebnis-Daten sind in einer Excel-Tabelle dargestellt und bilden die Grundlage für die in SPSS erstellten Diagramme.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass

- a) eine Co-Re-Besiedlung nach diesem neuen Protokoll möglich und gut geeignet ist mit einem Zellüberleben von mindestens 4 Tag und dass
- b) eine perfundierte Re-Kultivierung besser geeignet ist, als die statische Re-Kultivierung, qualitativ und auch quantitativ, gemessen an Zellzahl und Zelldichte.

## Überblick

Die Ergebnisse sind nach den hierfür verwendeten Methoden sortiert. Dabei werden zuerst die qualitativen Ergebnisse mittels Histologie und Immunhistologie dargestellt, und anschließend die quantitativen Ergebnisse. Im Folgenden ist ein kurzer Überblick aufgeführt.

### 1. Qualitative Ergebnisse

- a) Histologie – HE-Färbung
  - i. Perfundiert
  - ii. Statisch
- b) Immunhistologie – Immunfluoreszenz
- c) DAPI Färbung
- d) Von-Willebrand-Faktor Immunfärbung
- e) Troponin Immunfärbung
- f) Myosin Immunfärbung
- g) Doppel-Immunfärbung von-Willebrand-Faktor und Cardiac Actinin
- h) Doppel-Immunfärbung von-Willebrand-Faktor und Myosin

### 2. Qualitative Ergebnisse

- a) Automatisierte Bildanalyse mit Fiji ImageJ ermittelt und weiterverarbeitet mit Excel und SPSS zur Diagrammerstellung, Perfundiert vs. statisch

### 3. Weitere Ergebnisse – Live-Dead-Assay

- a) Doppelfärbung CMFDA und CMPTX
- b) Re-Endothelialisierung – Nahaufnahme
- c) Re-Endothelialisierung – Übersichtsaufnahme
- d) Doppelfärbung CMFDA und CMPTX

## *Untersuchungsgruppen: Perfundierte vs. Statische Re-Kultivierung*

### *Perfundierte Herzen:*

Herz 1 (perfundiert) je LV, RV, S, A  
Herz 2 (perfundiert) je LV, RV, S, A  
Herz 5 (perfundiert) je LV, RV, S, A  
Herz 6 (perfundiert) je LV, RV, S, A  
Herz 9 (perfundiert) je LV, RV, S, A  
Herz 10 (perfundiert) je LV, RV, S, A

### *Statische Herzen:*

Herz 3 (statisch) je LV, RV, S, A  
Herz 4 (statisch) je LV, RV, S, A  
Herz 7 (statisch) je LV, RV, S, A  
Herz 8 (statisch) je LV, RV, S, A  
Herz 11 (statisch) je LV, RV, S, A  
Herz 12 (statisch) je LV, RV, S, A

### *Konzept der Vergleiche*

Es wurden Vergleichspaare gebildet, in denen die jeweiligen Bereiche der Herzen miteinander verglichen wurden. Also z.B. Herz 1 (perfundiert) LV wird verglichen mit Herz 3 (statisch) LV. Es gibt insgesamt 24 Vergleichspaare: 6 Herzen perfundiert je LV, RV, S

### *Vergleichspaare 1-24:*

Vergleichspaar 1: Herz 1 LV mit Herz 3 LV  
Vergleichspaar 2: Herz 1 RV mit Herz 3 RV  
Vergleichspaar 3: Herz 1 S mit Herz 3 S  
Vergleichspaar 4: Herz 1 A mit Herz 3 A  
Vergleichspaar 5: Herz 2 LV mit Herz 4 LV  
Vergleichspaar 6: Herz 2 RV mit Herz 4 RV  
Vergleichspaar 7: Herz 2 S mit Herz 4 S  
Vergleichspaar 8: Herz 2 A mit Herz 4 A  
Vergleichspaar 9: Herz 5 LV mit Herz 7 LV

Vergleichspaar 10: Herz 5 RV mit Herz 7 RV  
Vergleichspaar 11: Herz 5 S mit Herz 7 S  
Vergleichspaar 12: Herz 5 A mit Herz 7 A  
Vergleichspaar 13: Herz 6 LV mit Herz 8 LV  
Vergleichspaar 14: Herz 6 RV mit Herz 8 RV  
Vergleichspaar 15: Herz 6 S mit Herz 8 S  
Vergleichspaar 16: Herz 6 A mit Herz 8 A  
Vergleichspaar 17: Herz 9 LV mit Herz 11 LV  
Vergleichspaar 18: Herz 9 RV mit Herz 11 RV  
Vergleichspaar 19: Herz 9 S mit Herz 11 S  
Vergleichspaar 20: Herz 9 A mit Herz 11 A  
Vergleichspaar 21: Herz 10 LV mit Herz 12 LV  
Vergleichspaar 22: Herz 10 RV mit Herz 12 RV  
Vergleichspaar 23: Herz 10 S mit Herz 12 S  
Vergleichspaar 24: Herz 10 A mit Herz 12 A

In den quantitativen Ergebnissen dargestellt sind die Auswertungen der einzelnen Herzen und der Gruppenvergleich aller Herzen perfundiert vs. statisch.

## 3.2 Qualitative Ergebnisse

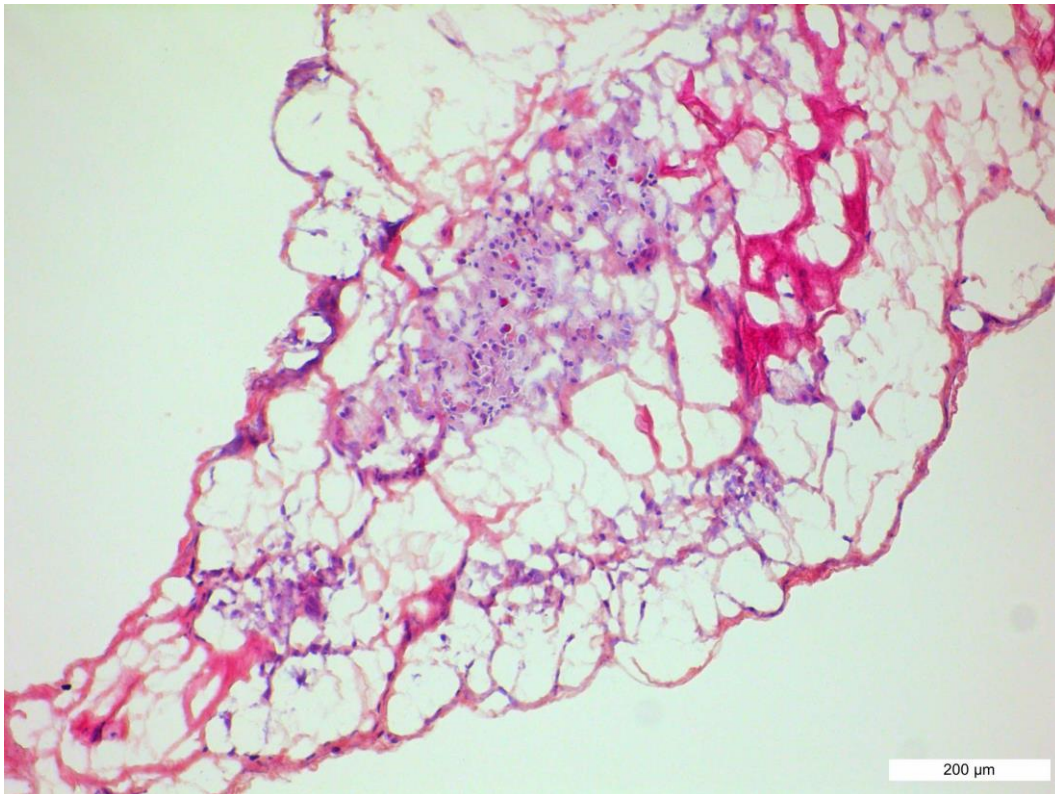
### 3.2.1 Histologie – HE-Färbung

#### *Übersicht*

Für die histologische Auswertung wurden insgesamt ca. 6000 Schnitte angefertigt und mittels HE-Färbung gefärbt. Nach Präparation der zuvor dezellularisierten und anschließend re-besiedelten und re-kultivierten Herzen in vier Bereiche (bestehend aus linkem Ventrikel, rechter Ventrikel, Septum und Apex) wurden diese im Abstand von 200µm am Kryostat geschnitten und danach HE-gefärbt. Die hohe Anzahl der Schnitte diente als erster Screening-Schritt mit dem Ziel, Schnitte mit re-besiedelten Zellen zu finden und darzustellen. Im nächsten Schritt wurden alle Schnitte mit re-besiedelten Zellen bestimmt und anschließend die Schnitte mit der jeweils höchsten Zellzahl pro Bereich (LV, RV, S, A) bestimmt. Hierfür wurden zwei Gruppen nach Art der verwendeten Re-Kultivierungsmethode gebildet: perfundiert und statisch.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der HE-Färbungen dargestellt, sortiert nach den Re-Kultivierungsarten perfundiert und statisch.

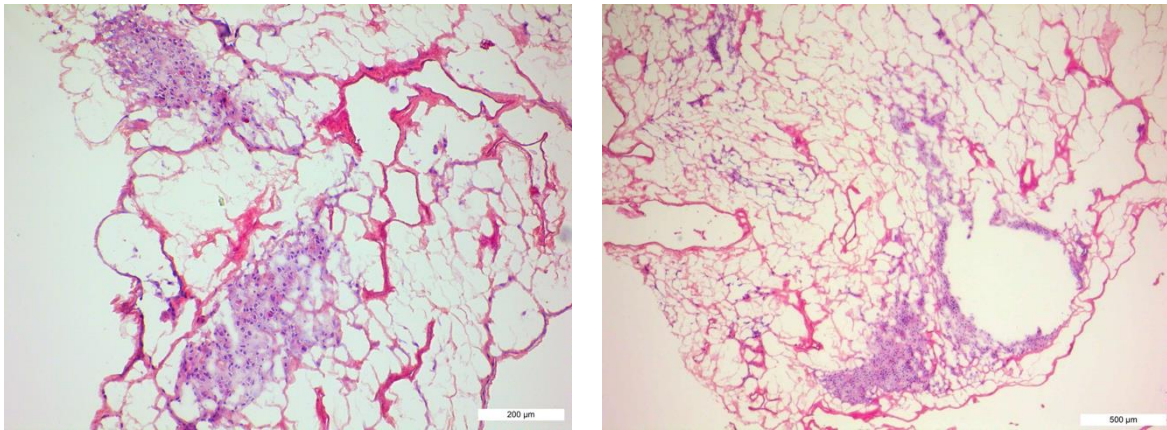
## Perfundiert



**Abb. 16: HE-Färbung eines rechten Ventrikels einer perfundierten Co-Re-Besiedlung**

Repräsentativer HE-Schnitt einer Co-Re-Besiedlung mit Endothelzellen (HUVECs) und Kardiomyozyten (CMCs), Maßstab 200µm, Vergrößerung 10x. B1H1RV1a 1.1 10x

In Abb. 16 ist ein repräsentativer HE-Schnitt einer Co-Re-Besiedlung eines rechten Ventrikels mit Endothelzellen und Kardiomyozyten (CMCs) dargestellt. Die HE-Färbung lässt die Zellkerne lila erscheinen. Zu erkennen ist ein großer Zellverbund von Kardiomyozyten (CMCs) und einige kleinere Zellen in direkter Umgebung. Die Zellen haften haufenweise zusammen und zeigen zudem Wachstum in benachbarte kleiner und größere Matrix-Stränge. Dabei befinden sie sich sowohl im Verbund als auch in kleinen Grüppchen und auch einzeln. Etwas oberhalb leicht links des Zentrums des Schnittes sind in größeren Matrixbereichen auch Endothelzellen zu erkennen, die sich eher länglich darstellen und die Gefäße des Herzens von innen auskleiden. Die HE-Färbung dient allerdings primär dem Screening von re-besiedelten Bereichen und der Darstellung von erfolgreich re-besiedelten Herzbereichen. Zur spezifischen Unterscheidung der beiden Zelltypen HUVECs und CMCs wurden im Verlauf Antikörper im Rahmen der Immunhistologie verwendet.



**Abb. 17: HE-Färbungen eines rechten Ventrikels eines perfundierten Co-Re-Besiedlungen**

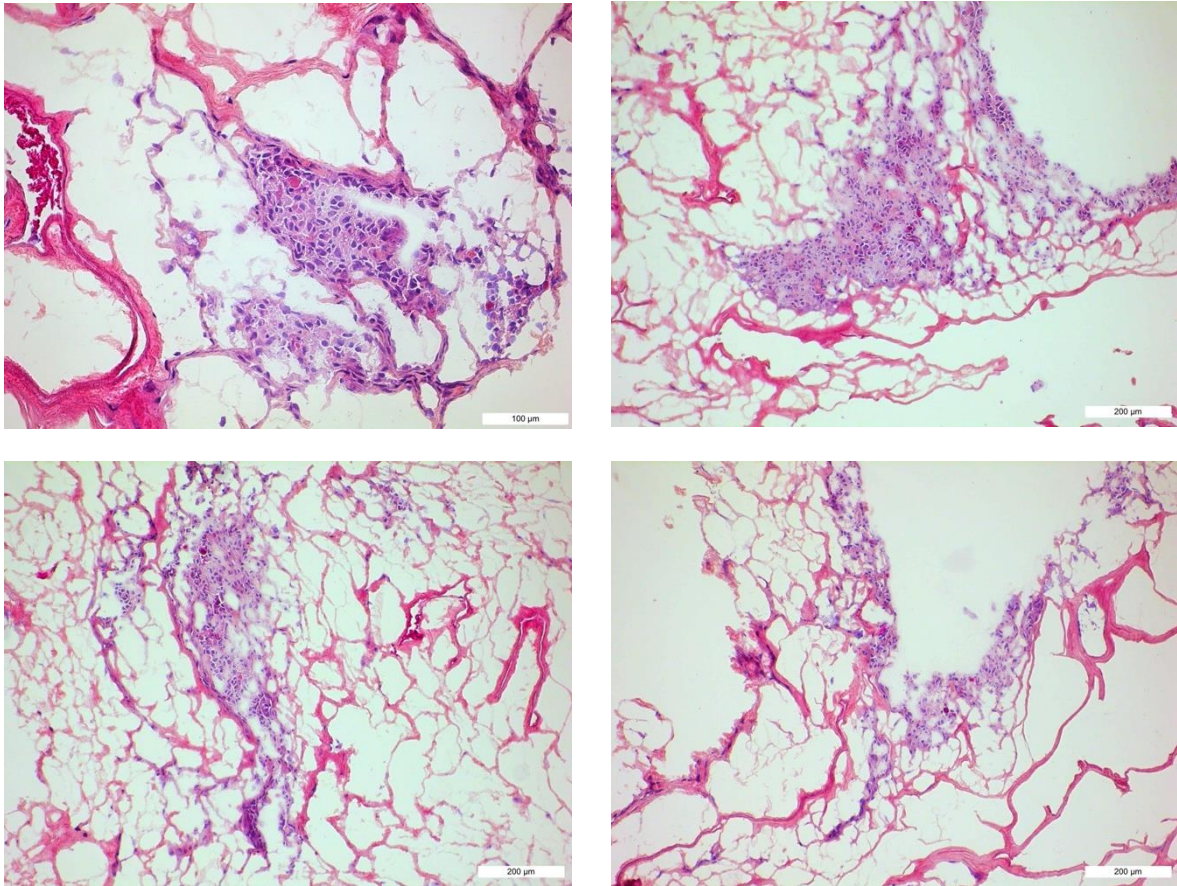
Repräsentative HE-Schnitte einer perfundierten Co-Re-Besiedlung mit humanen Endothelzellen (HUVECs) und neonatalen Kardiomyozyten (CMCs)

oben links: B1H1RV1a 2.10x, Maßstab 200µm, Vergrößerung 10x.

unten rechts: B1H1RV3a 1.1 5x, Maßstab 500µm, Vergrößerung 5x.

In diesem HE-Schnitt co-re-besiedelten rechten Ventrikels (Abb. 17, oben links) sind zwei voneinander unabhängige Konglomerate von CMCs dargestellt, die haufenweise angeordnet sind und weiter lokal in die benachbarte Matrix wachsen. Die Zellen haften sowohl im Haufen als auch an einzelnen kleinen sowie großen Matrixsträngen. Auffällig ist auch die weite Verteilung einzelner Zellen innerhalb des gesamten Schnittes.

Auf diesem Bild (Abb. 17, oben rechts) sind sowohl ein Konglomerat als auch eine rundliche Anordnung von re-besiedelten CMCs zu erkennen, die an unterschiedlichen Bereichen der Matrix haften. Hier ist ein relativ guter Matrixerhalt gewährleistet. Das Wachstum der CMCs erfolgt zudem entlang der Matrixstränge. Auffällig ist auf die weite Verbreitung von CMCs innerhalb dieses Schnittes, wobei das Re-Besiedlungszentrum den unteren rechten Bereich des Schnittes betrifft.

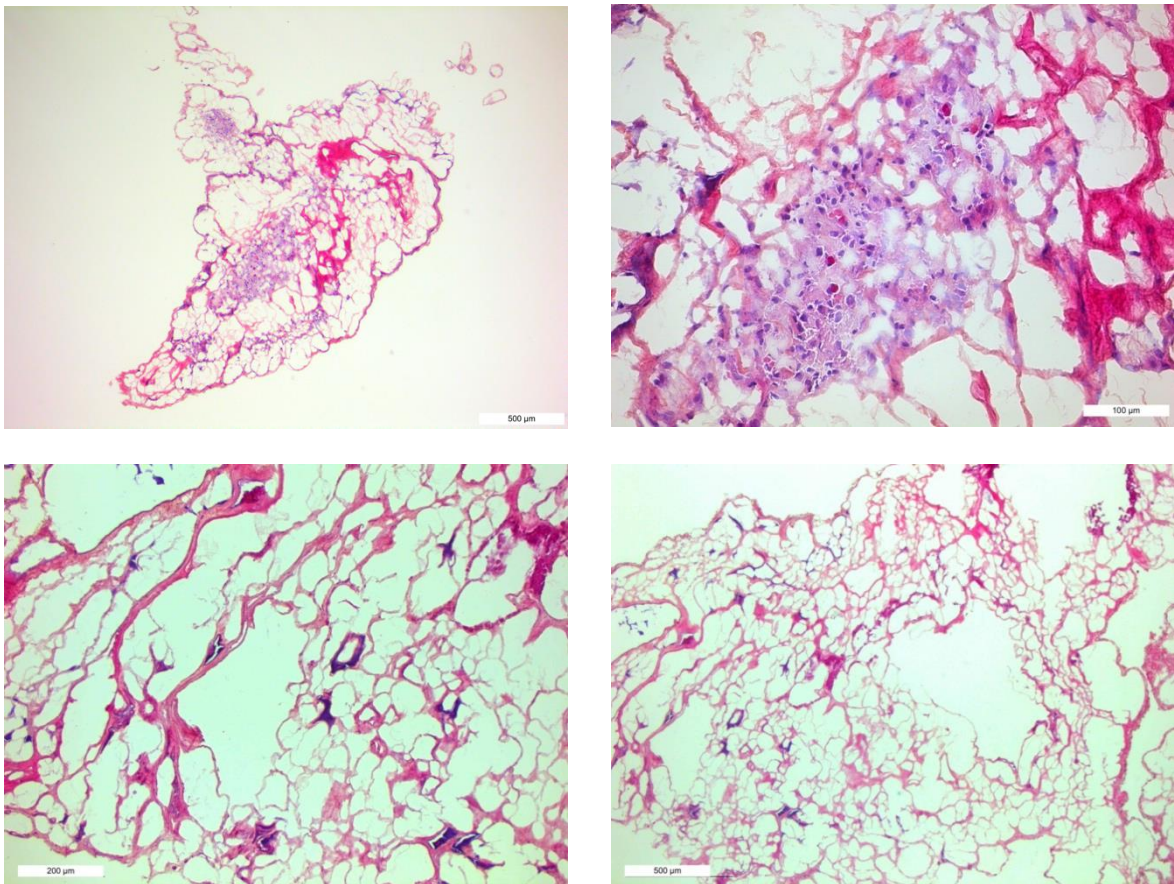


**Abb. 18: HE-Färbungen eines rechten Ventrikels einer perfundierten Co-Re-Besiedlung**

Repräsentative HE-Schnitte eines rechten Ventrikels einer perfundierten Co-Re-Besiedlung mit humanen Endothelzellen (HUVECs) und neonatalen Kardiomyozyten (CMCs), Maßstab 100µm und 200µm, Vergrößerung 20x und 10x.

oben links: B1H1RV2a 1.6 20x, Maßstab 100µm, Vergrößerung 10x  
 oben rechts: B1H1RV3a 1.2 10x, Maßstab 200µm, Vergrößerung 20x  
 unten links: B1H1RV3a 1.3 10x, Maßstab 200µm, Vergrößerung 20x  
 unten rechts: B1H1RV2a 1.2 10x, Maßstab 200µm, Vergrößerung 20x

In Abb. 18 ist eine Co-Re-Besiedlung eines rechten Ventrikels in HE-Färbung dargestellt, welches perfundiert kultiviert wurde. Auch hier sind die Zellkerne livide lila und die Matrix rötlich. Oben links ist eine Nahaufnahme (Vergrößerung 20x, Maßstab 100 µm) abgebildet, die sehr gut den engen Zellverbund von interstitiell re-besiedelten CMCs zeigt. Die Zellen benötigen sowohl die extrazelluläre Matrix als auch ihre eigene Nachbarschaft. Die Anordnung innerhalb des Zellverbundes ist relativ gleichmäßig mit gleichen Abständen zueinander, analog zu einer biologisch nativen Zellentwicklung eines Herzens. Oben rechts, unten links und unten rechts sind weitere Konglomerate von Kardiomyozyten dargestellt, jeweils in unterschiedlichen Ausbreitungsformen. Auch hier wird der enge Verbund untereinander deutlich sowie die Verteilung innerhalb der Matrix. Dabei scheint sich das Zellwachstum insgesamt an großen Matrixsträngen zu orientieren.



**Abb. 19: HE-Färbungen eines rechten Ventrikels und eines Apex von perfundierten Co-Re-Besiedlungen**

Repräsentative HE-Schnitte eines rechten Ventrikels und eines Apex von perfundierten Co-Re-Besiedlungen mit humanen Endothelzellen (HUVECs) und neonatalen Kardiomyozyten (CMCs), Maßstab 100 µm und 200 µm und 500 µm, Vergrößerung 20x und 10x und 5x

oben links: B1H1RV1a 1.3 5x, Maßstab 500 µm, Vergrößerung 5x

oben rechts: B1H1RV1a 1.4 20x, Maßstab 100 µm, Vergrößerung 20x

unten links: B3H2A3a 1 10x, Maßstab 200 µm, Vergrößerung 10x

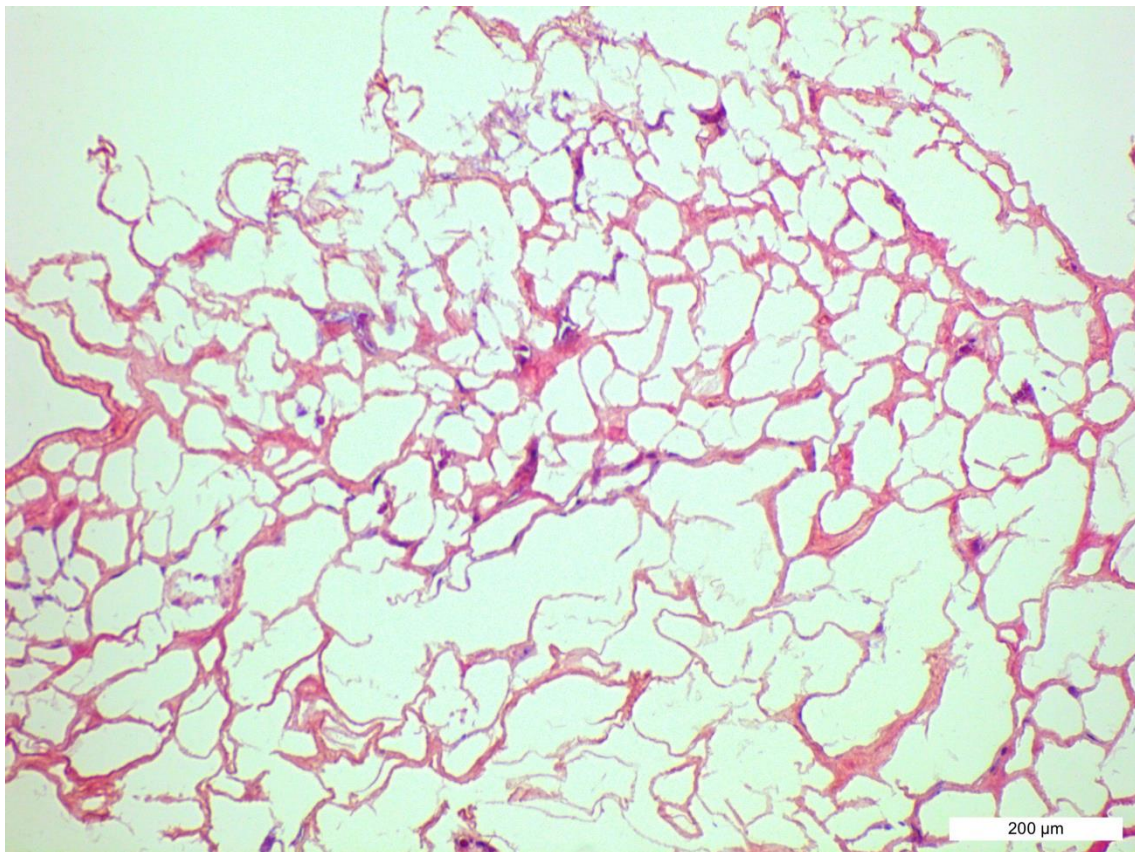
unten rechts: B3H2A3a 1 5x 6, Maßstab 500 µm, Vergrößerung 5x

Abb. 19 zeigt repräsentative Aufnahmen von HE-gefärbten Schnitten eines rechten Ventrikels und eines Apex von perfundierten Co-Re-Besiedlungen. Das obere linke Bild stellt eine Übersichtsaufnahme des rechten Ventrikels mit guter qualitativer und quantitativer interstitieller Re-Besiedlung mit Kardiomyozyten. Sie füllen fast die gesamte Schnittfläche der Matrix aus. Das obere rechte Bild ist eine Nahaufnahme in 20x Vergrößerung dieses Ventrikels und zeigt die dichte Konfiguration der Kardiomyozyten innerhalb der Matrix.

Auf den unteren beiden Schnitten (Abb. 19) sind vor allem die re-besiedelten Endothelzellen (HUVECs) innerhalb rundlichen Matrixbereichen dargestellt, die Gefäßen entsprechen. Sie haften von innen an den Gefäßwänden und kleiden diese fast vollständig aus, ähnlich wie bei

nativen Gefäßentwicklung. Unten links ist eine Normalaufnahme (Vergrößerung 10x, Maßstab 200 µm) mit zahlreichen Gefäßen abgebildet, unten rechts eine Übersichtsaufnahme (Vergrößerung 5x, Maßstab 500 µm), die zeigt, dass die gesamte Matrix von Endothelzellen durchzogen ist.

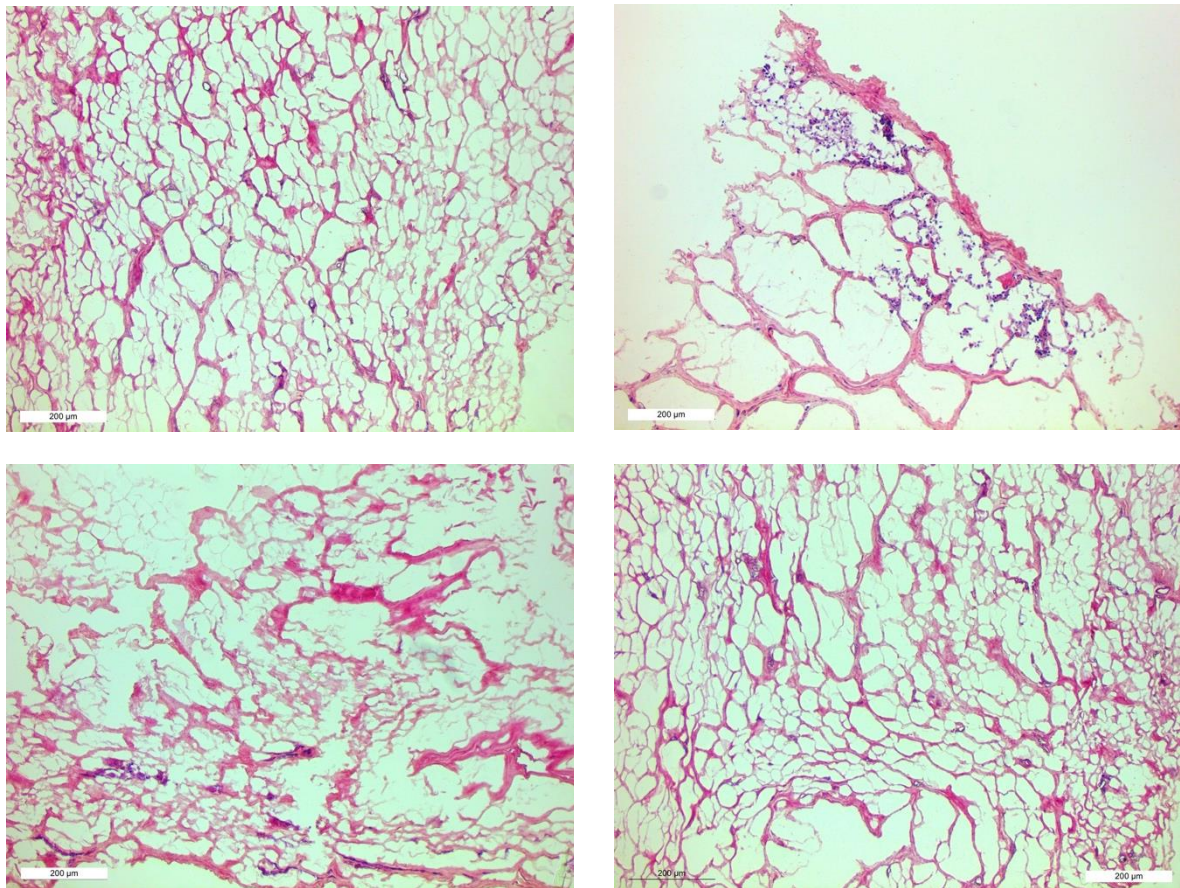
### **Statisch**



**Abb. 20: HE-Färbung eines rechten Ventrikels einer statischen Co-Re-Besiedlung**

Repräsentativer HE-Schnitt eines rechten Ventrikels einer statischen Co-Re-Besiedlung mit humanen Endothelzellen (HUVECs) und neonatalen Kardiomyozyten (CMCs), B1H1 LV1a 1 10x 1. Maßstab 200µm, Vergrößerung 10x.

Dargestellt in Abb. 20 ist repräsentatives HE-Bild eines linken Ventrikels einer Co-Re-Besiedlung mit HUVECs und CMCs. In diesem Schnitt sind vor allem die Endothelzellen in den Gefäßen der Matrix. Vereinzelt sind auch Kardiomyozyten in den Matrixsträngen in dichter Umgebung zu erkennen. Die HUVECs, hier mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung bläulich livide gefärbt, sind weit verteilt und kleiden kleinere sowie größere Gefäßwände aus.



**Abb. 21: HE-Färbungen eines linken Ventrikels und eines Septums von statischen Co-Re-Besiedlungen**

Repräsentative HE-Schnitte eines linken Ventrikels und eines Septums von statischen Co-Re-Besiedlungen mit humanen Endothelzellen (HUVECs) und neonatalen Kardiomyozyten (CMCs), Maßstab 200µm, Vergrößerung 10x.

oben links: B3H4S2a 2 10x 2, Maßstab 200µm, Vergrößerung 10x.

oben rechts: B3H4LV5a 2 10x 3, Maßstab 200µm, Vergrößerung 10x.

unten links: B2H4LV5a 1 10x 6, Maßstab 200µm, Vergrößerung 10x.

In Abb. 21 sind HE-Färbungen eines linken Ventrikels und eines Septums von statischen Co-Re-Besiedlungen mit HUVECs und CMCs dargestellt. Es sind HUVECs und CMCs zu erkennen, allerdings in Verteilung, Zellzahl und Zelldichte begrenzt. Auf dem oberen linken Bild sind HUVECs innerhalb von Gefäßstrukturen der dichten Matrix zu erkennen. Auf dem oberen linken Bild sind vereinzelte und kleinen Haufen vorkommende Kardiomyozyten zu erkennen. Im unteren Bild sind nur sehr vereinzelt HUVECs am unteren linken Bildrand dargestellt. Das untere rechte Bild eines Septums zeigt weitere HUVECs weit verteilt, aber überschaubar in Quantität. Insgesamt sind verglichen mit der relativ dichten extrazellulären Matrix verhältnismäßig wenige Zellen zu finden.

### 3.2.2 Immunhistologie

#### *Übersicht*

Für die Immunhistologie wurden ebenfalls die im Kapitel Methoden beschriebenen histologischen Schnitte verwendet. Für die Färbungen wurden insgesamt 8 Anti-Körper verwendet: Anti-vWF (Endothelzellen, HUVECs), Anti-Troponin, Anti-Cardiac-Actinin, Anti-Myosin (jeweils für Kardiomyozyten, CMCs), und Connexin, Vimentin (jeweils für Fibroblasten, 3T3-Zellen für die Vorversuche).

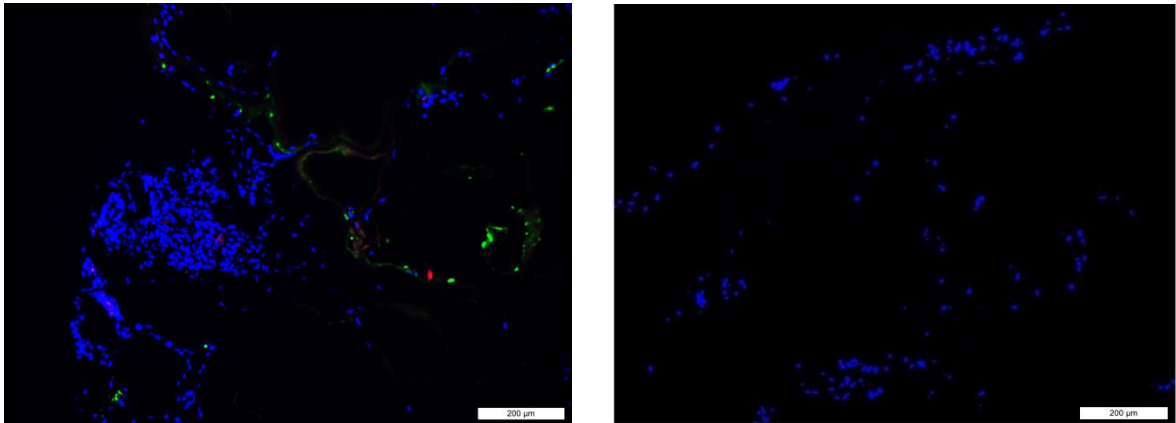
Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz Färbungen sind im Folgenden dargestellt, sortiert nach Färbung, und je Färbung nach Re-Kultivierungsart perfundiert und statisch.

#### Immunfluoreszenz Färbungen (Anti-Gene)

- DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)
- von-Willebrand-Faktor (vWF)
- Troponin
- Myosin
- Doppelfärbung von-Willebrand-Faktor + Cardiac Actinin
- Doppelfärbung von-Willebrand-Faktor + Myosin

### 3.2.3 DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) Färbung

#### perfundiert

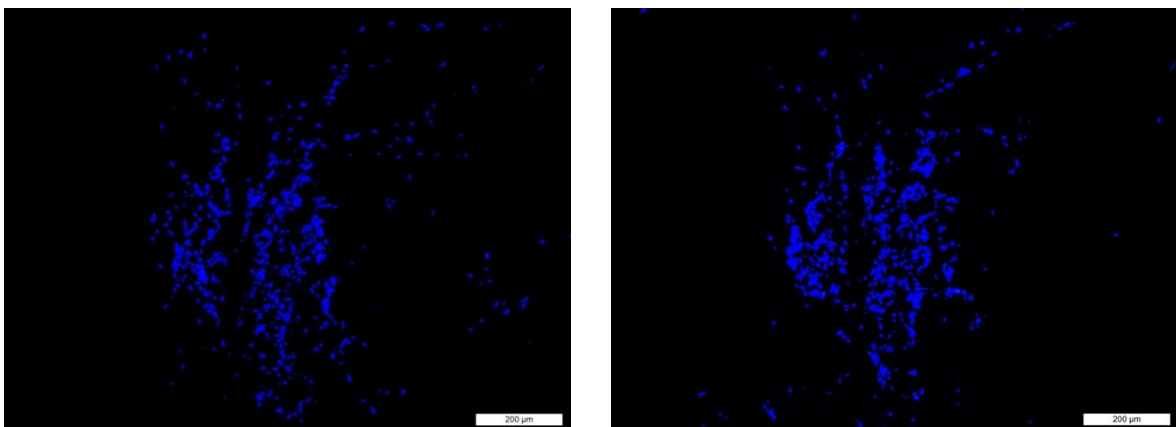


**Abb. 22: DAPI Immunfluoreszenz-Färbung eines linken Ventrikels einer perfundierten Co-Re-Besiedlung**

Repräsentative Schnitte eines linken Ventrikels einer perfundierten Co-Re-Besiedlung mit HUVECs und CMCs mit Immunfluoreszenz Färbung mit DAPI, links: B3H4LVa 1 10x 1, Maßstab 200 µm, Vergrößerung 10x, rechts: B3H4LV5a 1 10x 3, Maßstab 200 µm, Vergrößerung 10x

In Abb. 22 sind repräsentative Schnitte einer perfundierten Co-Re-Besiedlung mit HUVECs und CMCs zu erkennen. Die DAPI-Färbung (4',6-Diamidino-2-phenylindol) stellt die Zellkerne dar, jedoch nicht den spezifischen Zelltyp. Hier ging es in erster Linie darum, die Anwesenheit von Zellen darzustellen, um den prinzipiellen Erfolg der Re-Besiedlung zu zeigen. Auf dem linken Bild ist ein Konglomerat von Kardiomyozyten dargestellt, welches man an der haufenweise Anordnung erkennt. Im rechten Bild ist die Verteilung von Zellen etwas breit gestreuter, jedoch auch haufenweise, was ebenfalls auf CMCs hindeutet.

#### statisch

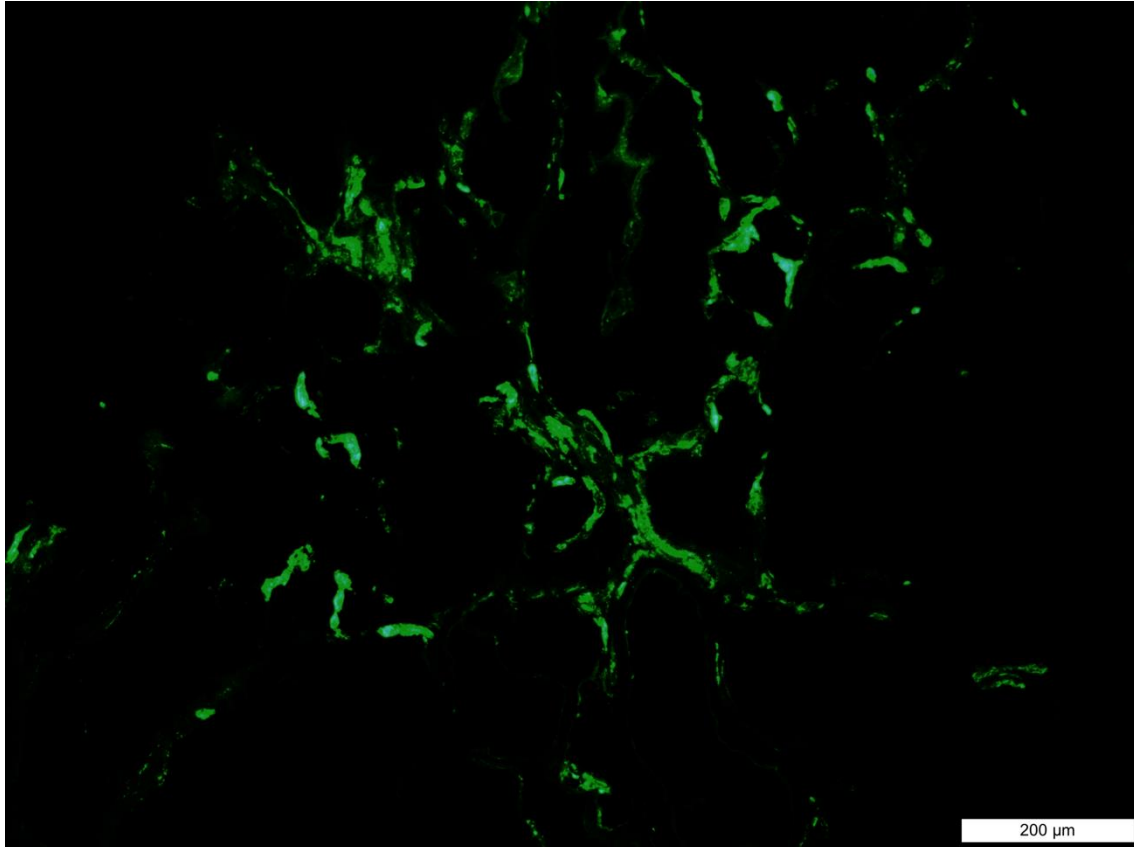


**Abb. 23: DAPI Immunfluoreszenz-Färbung eines linken Ventrikels einer perfundierten Co-Re-Besiedlung**

Repräsentative Schnitte eines linken Ventrikels einer perfundierten Co-Re-Besiedlung mit HUVECs und CMCs mit Immunfluoreszenz Färbung mit DAPI, links: B3H4LVa 1 10x 1, Maßstab 200 µm, Vergrößerung 10x, rechts: B3H4LV5a 1 10x 3, Maßstab 200 µm, Vergrößerung 10x

### 3.2.4 Von-Willebrand-Faktor Immunfärbung

#### perfundiert

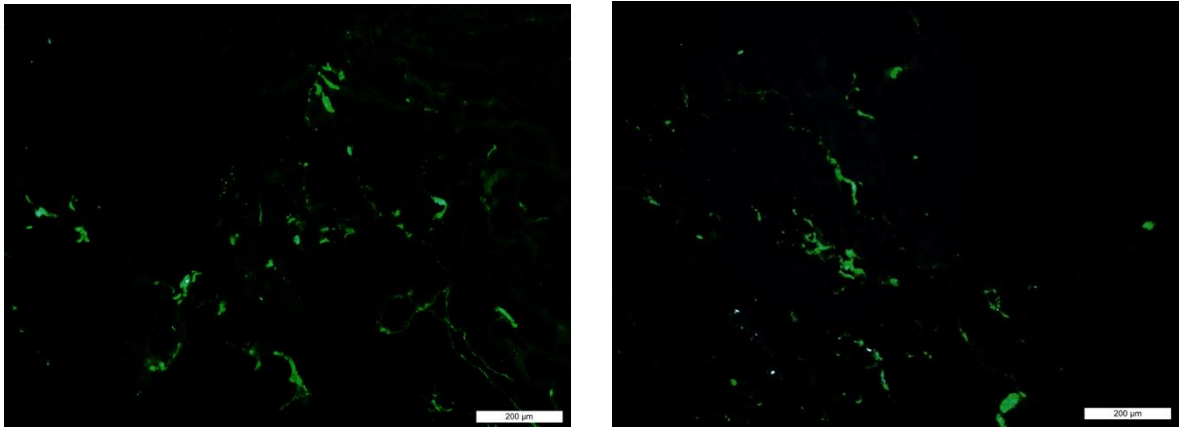


**Abb. 24: von-Willebrand-Faktor Immunfluoreszenz-Färbung eines rechten Ventrikels einer perfundierten Co-Re-Besiedlung**

Repräsentativer Schnitt eines mit HUVECs vaskulär re-besiedelten rechten Ventrikels mit Immunfluoreszenz-Antikörper Anti-von-Willebrand-Faktor, B3H2RV3cb 10, Maßstab 200 µm, Vergrößerung 10x.

Abb. 24 zeigt eine erfolgreiche vaskuläre Re-Besiedlung mit Endothelzellen. Zu erkennen sind die Endothelzellen HUVECs, die mittels Immunfluoreszenz mit dem Antikörper Anti-von-Willebrand-Faktor spezifisch in grün dargestellt werden. Die Endothelzellen haben sich an die Gefäßwände geheftet und kleiden diese von innen aus. Durch die vaskuläre Re-Besiedlung sind die HUVECs im gesamten Herzen zu finden, da dieses von komplett von Gefäßen durchzogen ist, in Form von Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venolen und Venen. Leicht unterhalb des Zentrums dieses Schnittes ist ein Wüschelruten-artiger y-förmiger Gefäßbaum zu erkennen. Die weite Verteilung der HUVECs im gesamten vaskulären System des re-besiedelten Herzens ist essentiell für eine spätere Funktionsfähigkeit des Herzens.

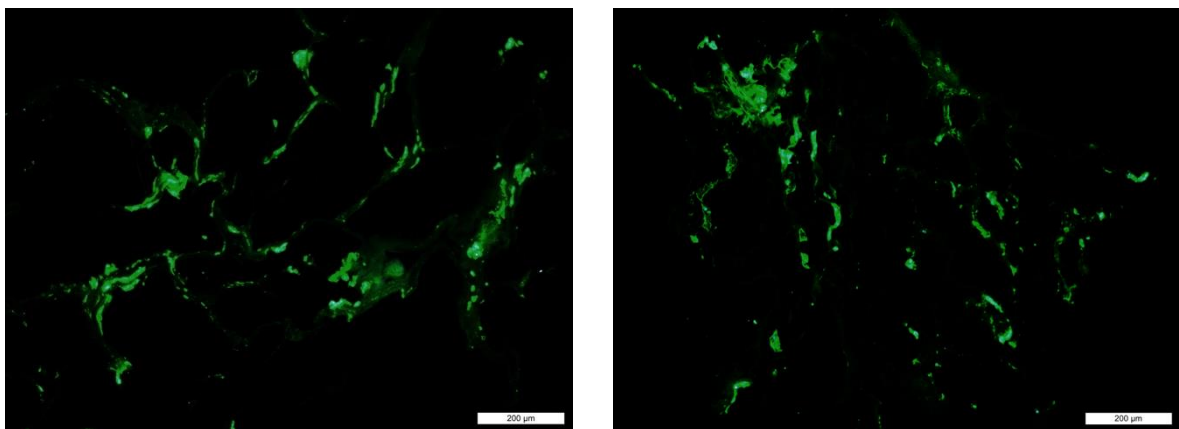
**perfundiert**



**Abb. 25: von-Willebrand-Faktor Immunfluoreszenz-Färbung eines rechten Ventrikels einer perfundierten Co-Re-Besiedlung**

Repräsentative Schnitte einer Co-Re-Besiedlung mit HUVECs und CMCs mit Immunfluoreszenz Färbung mit dem Anti-Körper Anti-von-Willebrand-Faktor, links: B31H1RV3b 1 10x 7, Maßstab 200 µm, Vergrößerung 10x, rechts: B31H1RV3b 1 10x 16, Maßstab 200 µm, Vergrößerung 10x.

In Abb. 25 und Abb. 26 ist eine perfundierte Co-Re-Besiedlung mit unterschiedlichen Bereichen eines rechten Ventrikels dargestellt, bei denen ebenfalls die Endothelzellen mit Anti-vWF gefärbt wurden. Sie zeigen unterschiedliche Verteilungsmuster innerhalb der Bereiche, jedoch dass die gezeigten Bereiche alle von HUVECs erreicht wurden und damit insgesamt einen Erfolg der Besiedlung mit anschließender Perfusion und eine erhebliche Zellzahl.

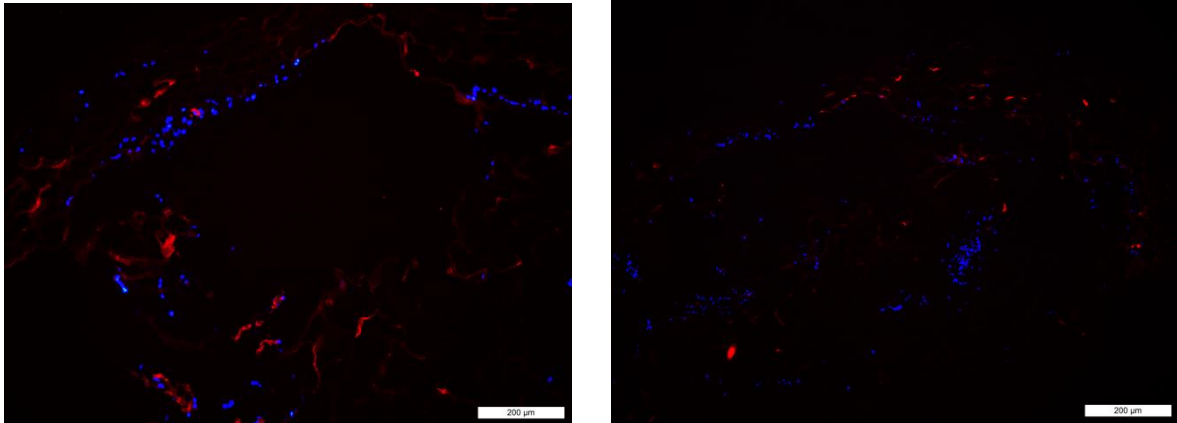


**Abb. 26: von-Willebrand-Faktor Immunfluoreszenz-Färbung eines rechten und linken Ventrikels von perfundierten Co-Re-Besiedlungen**

Repräsentative Schnitte einer Co-Re-Besiedlung mit HUVECs und CMCs mit Immunfluoreszenz Färbung mit dem Antikörper Anti-von-Willebrand  
links: B31H1RV3b 1 10x 4, Maßstab 200 µm, Vergrößerung 10x.  
rechts: B31H1LV3b 1 10x 41, Maßstab 200 µm, Vergrößerung 10x.

### 3.2.5 Troponin Immunfärbung

#### perfundierte

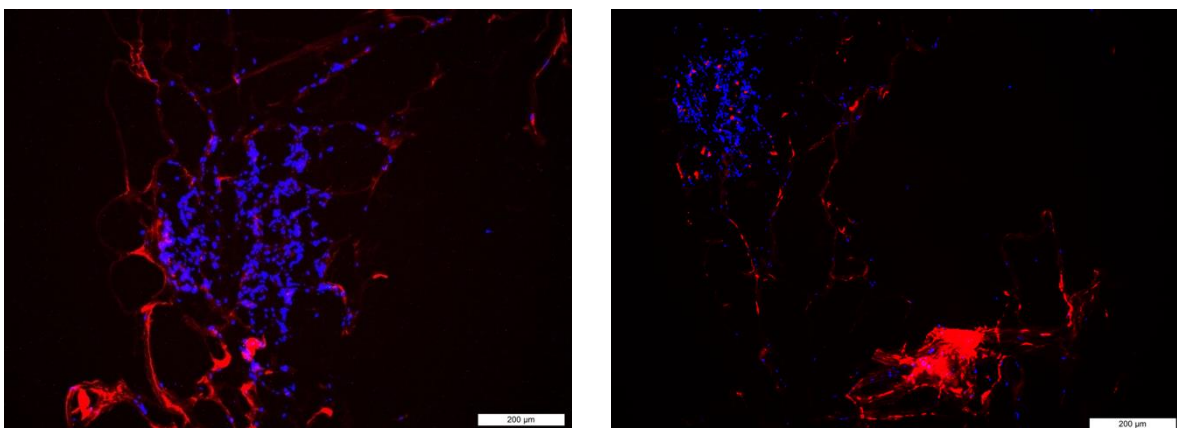


**Abb. 27: Troponin Immunfluoreszenz-Färbung eines rechten und linken Ventrikels von perfundierten Co-Re-Besiedlungen**

Repräsentative Schnitte einer Co-Re-Besiedlung mit HUVECs und CMCs mit Immunfluoreszenz Färbung mit dem Antikörper Troponin, links: B1H1A4 1 10x 1, Maßstab 200 µm, Vergrößerung 10x, rechts: B3H4LVa 1 10x 3, , Maßstab 200 µm, Vergrößerung 10x

Abb. 27 und Abb. 28 zeigen Co-Re-Besiedlungen mit HUVECs und CMCs, bei denen mittels des Antikörpers Anti-Troponin und DAPI die CMCs dargestellt wurden. In Abb. 27 ist ein Apex und ein linker Ventrikel dargestellt, mit jeweils einer weiten Ausbreitung der CMCs. In Abb. 28 ist ein statischer linker Ventrikel gezeigt, der ebenfalls CMCs aufweist. Hier sind diese jedoch eher in größeren Haufen angesiedelt. Insgesamt zeigt sich eine erfolgreiche interstitielle Re-Besiedlung mit Kardiomyozyten.

#### statisch

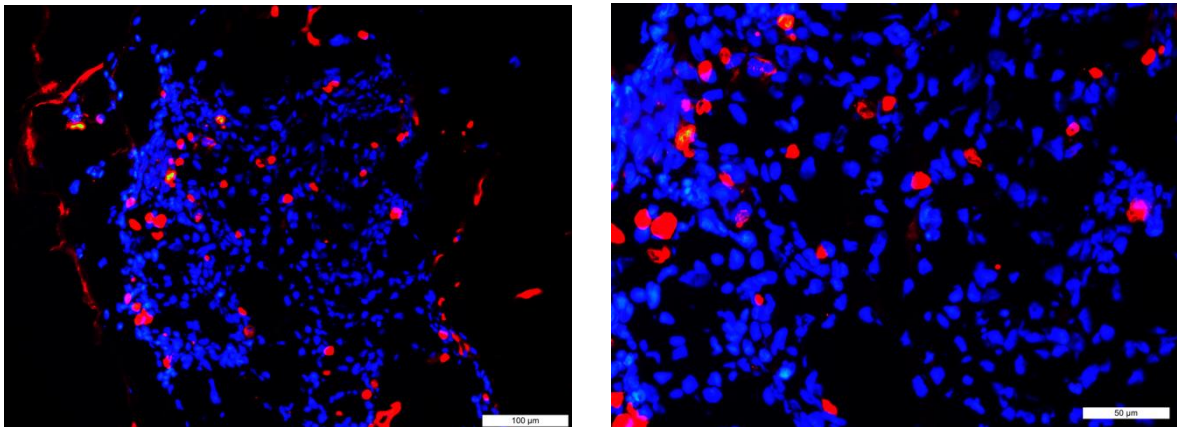


**Abb. 28: Troponin Immunfluoreszenz-Färbung eines rechten und linken Ventrikels von perfundierten Co-Re-Besiedlungen**

Repräsentative Schnitte einer Co-Re-Besiedlung mit HUVECs und CMCs mit Immunfluoreszenz Färbung mit dem Antikörper Troponin, links: B3H4LVa 1 10x 1, Maßstab 200 µm, Vergrößerung 10x, rechts: B3H4LV5a 1 10x 3, , Maßstab 200 µm, Vergrößerung 10x

### 3.2.6 Myosin Immunfärbung

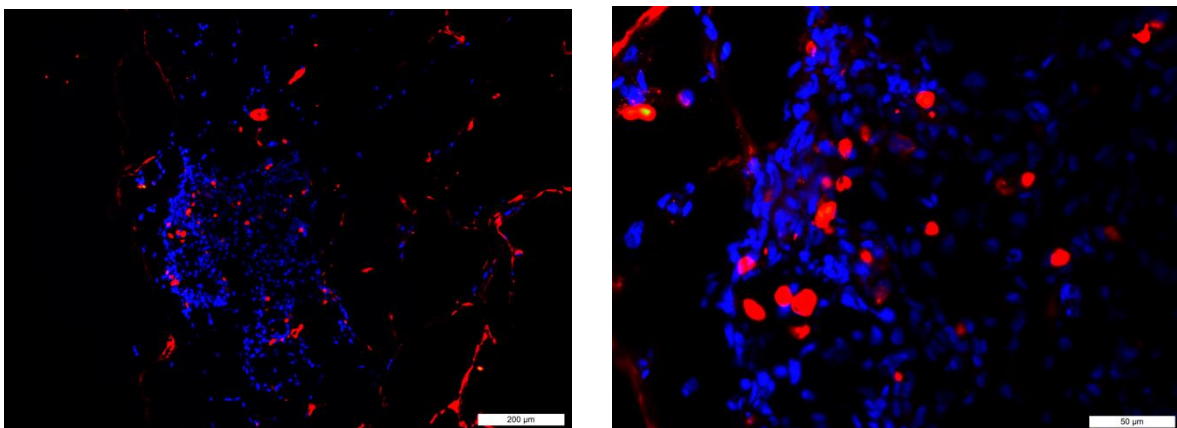
#### statisch



**Abb. 29: Myosin Immunfluoreszenz-Färbung eines rechten und linken Ventrikels von perfundierten Co-Re-Besiedlungen**

Repräsentative Schnitte einer Co-Re-Besiedlung mit HUVECs und CMCs mit Immunfluoreszenz Färbung mit dem Antikörper Myosin, links: B3H4A3a 2 40x 1, Maßstab 50 µm, Vergrößerung 40x, rechts: B3H4LV5a 1 20x 1, Maßstab 100 µm, Vergrößerung 20x

Die Myosin-Färbung mit dem Anti-Körper Anti-Myosin scheint ebenfalls sehr gut geeignet zu sein, für die Darstellung von re-besiedelten Kardiomyozyten innerhalb einer Co-Re-Besiedlung. Deshalb sie auch im Verlauf als Doppelfärbung mit Anti-vWF gewählt. In Abb. 29 und Abb. 30 sind jeweils ein Schnitt eines Apex und eines linken Ventrikels dargestellt, in unterschiedlichen Vergrößerungen, 40x und 20x. Sie zeigen eine Konglomerat von CMCs, welches durch seine hohe Dichte auffällt. Dies bildet ein wichtiges Kriterium für ein weiteres erfolgreiches Wachstum innerhalb der Matrix.

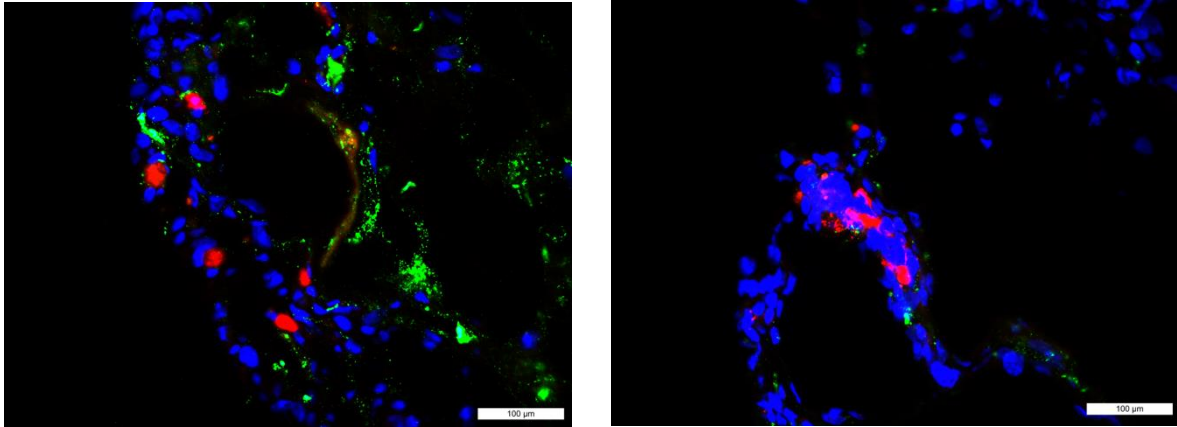


**Abb. 30: Myosin Immunfluoreszenz-Färbung eines rechten und linken Ventrikels von perfundierten Co-Re-Besiedlungen**

Repräsentative Schnitte einer Co-Re-Besiedlung mit HUVECs und CMCs mit Immunfluoreszenz Färbung mit dem Antikörper Myosin, links: B3H4A3a 2 40x 1, Maßstab 50 µm, Vergrößerung 40x, rechts: B3H4LV5a 1 20x 1, Maßstab 100 µm, Vergrößerung 20x

### 3.2.7 Doppel-Immunfärbung Von-Willebrand-Faktor + Cardiac Actinin

#### perfundiert



**Abb. 31: Doppelfärbung von-Willebrand-Faktor und Cardiac Actinin Immunfluoreszenz-Färbung eines rechten und linken Ventrikels von perfundierten Co-Re-Besiedlungen**

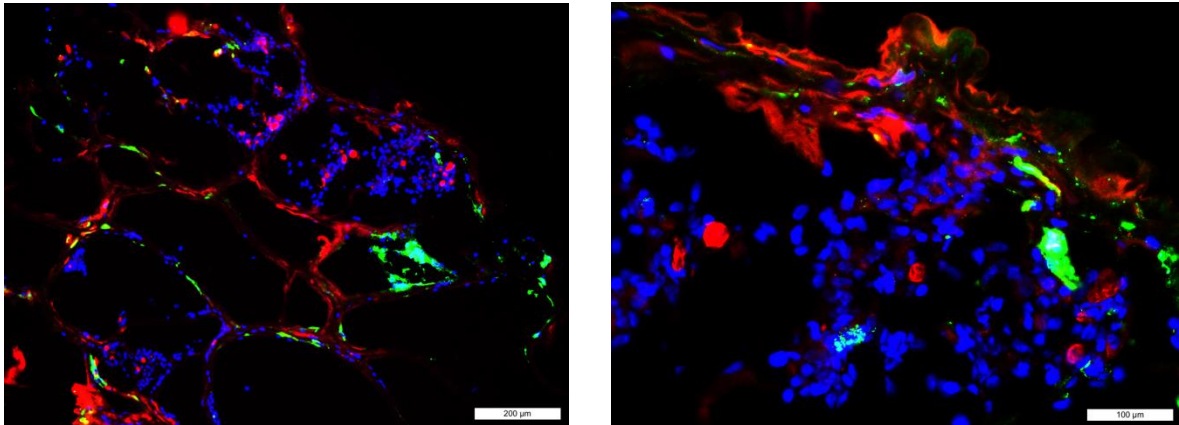
Repräsentative Schnitte eines rechten und linken Ventrikels von Co-Re-Besiedlung mit HUVECs und CMCs mit Immunfluoreszenz Doppel-Färbung mit den Antikörpern Anti-von-Willebrand-Faktor + Anti-Cardiac-Actinin,

links: B1H1RV2a 2 40x 1, Maßstab 50 µm, Vergrößerung 40x,  
rechts: B3H4LV5a 1 20x 1, Maßstab 100 µm, Vergrößerung 20x

Abb. 31 zeigt repräsentativ eine Co-Re-Besiedlung mit HUVECs und CMCs eines rechten Ventrikels (links) und eines linken Ventrikels (rechts). Es wurde eine Doppelfärbung verwendet, mit den Anti-Körpern Anti-vWF für die spezifische Darstellung der HUVECs und Anti-Cardiac-Actinin für die spezifische Darstellung von CMCs. Das Vorhandensein von beiden Zelltypen, spezifisch markiert mit den jeweiligen Anti-Körpern bestätigt den Erfolg dieser Besiedlungsmethode und der perfundierten Re-Kultivierungsmethode.

In Abb. 32 sind ebenfalls Schnitte einer erfolgreichen Co-Re-Besiedlung mit beiden Zelltypen in gleicher Färbung zu erkennen, was auch hier den Erfolg der statischen Re-Kultivierungsmethode bestätigt. Auf dem linken Schnitt ist in 10x Vergrößerung die parallele Anwesenheit von HUVECs und CMCs in unmittelbarer Nähe zu beobachten.

### statisch



**Abb. 32: Doppel-Immunfärbung von-Willebrand-Faktor und Cardiac Actinin Immunfluoreszenz-Färbung eines linken Ventrikels einer perfundierten Co-Re-Besiedlung**

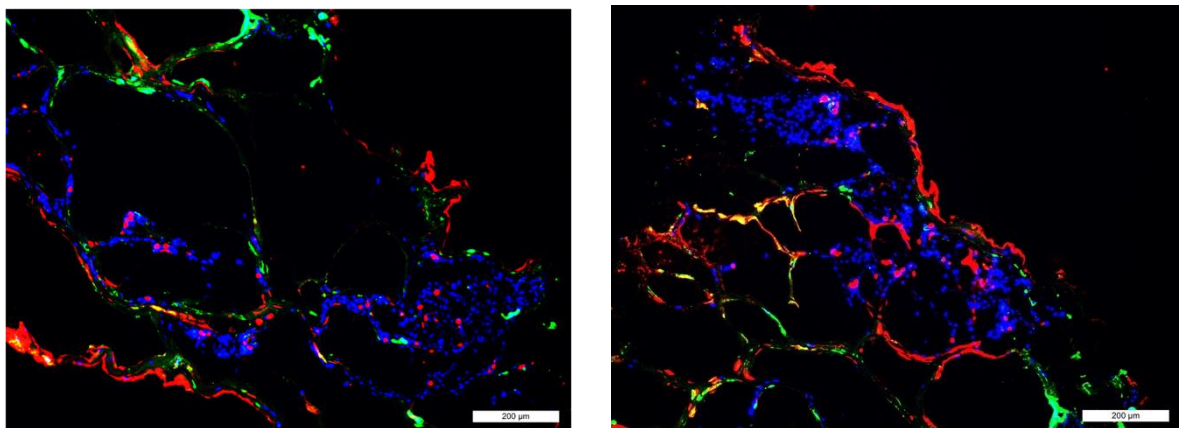
Repräsentative Schnitte einer Co-Re-Besiedlung mit HUVECs und CMCs mit Immunfluoreszenz Färbung mit den Antikörpern Anti-von-Willebrand-Faktor + Anti-Cardiac-Actinin

links: B3H4LV5a 1 10x 1, Maßstab 200 µm, Vergrößerung 10x

rechts: B3H4LV5a 1 40x 1, Maßstab 50 µm, Vergrößerung 40x

### 3.2.8 Doppel-Immunfärbung Von-Willebrand-Faktor + Myosin

### statisch



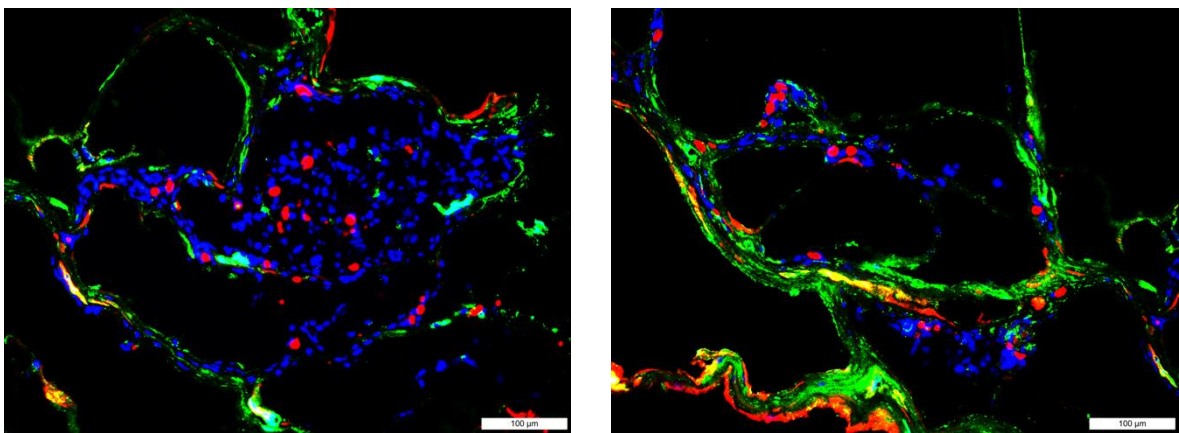
**Abb. 33: Doppel-Immunfärbung von-Willebrand-Faktor und Myosin Immunfluoreszenz-Färbung eines linken Ventrikels einer perfundierten Co-Re-Besiedlungen**

Repräsentative Schnitte einer Co-Re-Besiedlung mit HUVECs und CMCs mit Immunfluoreszenz Färbung mit den Antikörpern Anti-von-Willebrand-Faktor + Anti-Myosin

links: B3H4LVa 1 10x 2, Maßstab 200 µm, Vergrößerung 10x

rechts: B3H4LV5a 1 10x 1, Maßstab 200 µm, Vergrößerung 10x

In Abb. 33 und Abb. 34 ist eine weitere Doppelfärbung mit Anti-vWF (HUVECs) und mit Anti-Myosin (CMCs), begleitet von DAPI, von Bereichen eines linken Ventrikels eines co-re-besiedelten Ratten-Herzen dargestellt. Der Erfolg der Co-Re-Besiedlung lässt sich auch hier durch die Anwesenheit beider Zelltypen, spezifisch dargestellt mit den jeweiligen Anti-Körpern, bemessen. In Abb. 33 links ist ein Übersichtsschnitt gezeigt, der eine gute Verteilung von HUVECs und CMCs über eine große Strecke entlang der Herz-Matrix aufweist. Auf dem rechten Schnitt ist ein weiterer Bereich dargestellt, auf dem sowohl Gefäße ausgekleidet von HUVECs (grün), als auch Interstitium, re-besiedelt mit CMCs (rot) zu erkennen sind. In Abb. 34 wird die unmittelbare Nachbarschaft von HUVECs und CMCs in einer 3D-Matrix deutlich.



**Abb. 34: Doppel-Immunfärbung von-Willebrand-Faktor und Myosin Immunfluoreszenz-Färbung eines linken Ventrikels einer perfundierten Co-Re-Besiedlung**

Repräsentative Schnitte einer Co-Re-Besiedlung mit HUVECs und CMCs mit Immunfluoreszenz Färbung mit den Antikörpern Anti-von-Willebrand-Faktor + Anti-Myosin

links: B3H4LVa 1 10x 1, Maßstab 200 µm, Vergrößerung 10x

rechts: B3H4LV5a 1 10x 3, Maßstab 200 µm, Vergrößerung 10x

### 3.3 Quantitative Ergebnisse

#### 3.3.1 Übersicht der quantitativen Ergebnisse

Die quantitativen Ergebnisse beinhalten die absolute Zellzahl eines Schnittes und die relative Zelldichte standardisiert an der Fläche eines Schnittes. Diese Werte wurden mittels Zellzahl-Analyse und Schnittflächen-Analyse mit Hilfe des Programms Fiji ImageJ mit einem standardisierten Protokoll bestimmt. Die histologischen HE-gefärbten Schnitte dienten hierbei als Basis. Es wurden 48 HE-Schnitte analysiert und jeweils paarweise perfundiert vs. Statisch miteinander verglichen. Es wurden jeweils die einzelnen Herzbereiche miteinander verglichen: LV, RV, S, A. Anschließend wurde die Gesamt-Zellzahl und Gesamt Zelldichte eines Herzens bestimmt (bestehend aus LV, RV, S, A) und jeweils ein Herz aus der perfundierten Gruppe mit einem Herzen aus der statischen Gruppe verglichen. Zudem wurde die Gesamt-Zellzahl und die Gesamt-Zelldichte aller perfundierten Herzen und aller statischen Herzen miteinander verglichen. Die in Fiji ImageJ ermittelten Werte wurden in einer Excel-Tabelle zusammengefasst und es wurden Diagramme mit dem Programm SPSS erstellt. Diese Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

#### *Aufbau der Diagramme:*

Die Diagramme sind nach folgendem Schema aufgebaut bzw. angeordnet: Auf der X-Achse sind die Schnitte (x.tif) und die Herzen (Hx) dargestellt. Die Bezeichnung entspricht der im Material und Methoden beschriebenen Nomenklatur: z.B. B1H1LV1a, B1 (Besiedlung 1), H1 (Herz 1), LV (Linker Ventrikel), 1a (1. Schnitt des LV), .tif (Endung der Datei)

Auf der y-Achse ist die Zellzahl (absolut) bzw. die Zelldichte (Zellzahl / Schnittfläche \* 1000) der einzelnen HE-Schnitte oder der gesamten Herzen oder der gesamten Gruppe dargestellt.

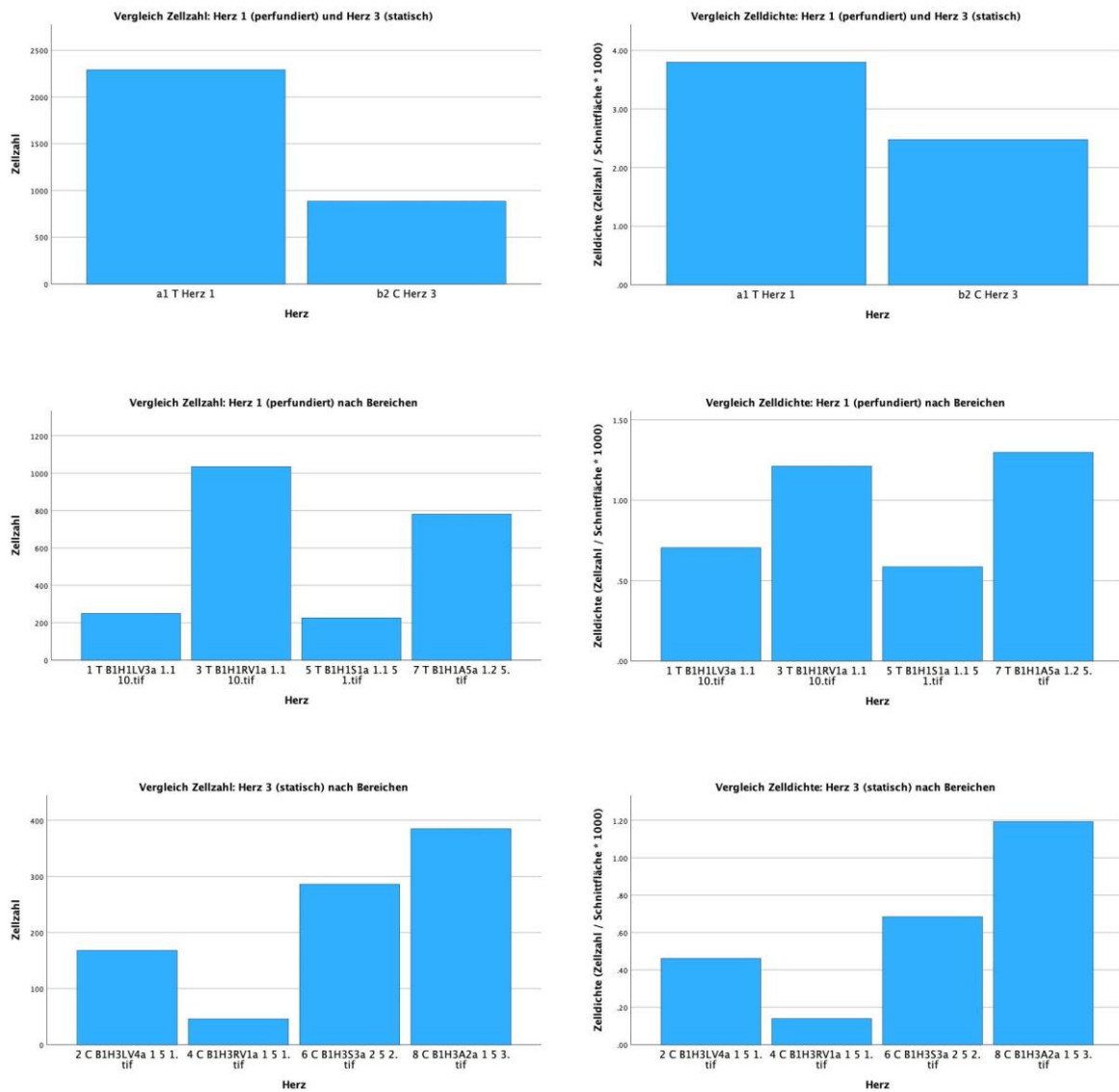
Die Zellzahl ist absolut als Dezimalzahl angegeben. Die Zelldichte ist als Quotient der Zellzahl / Schnittfläche \* 1000 angegeben. Der Faktor 1000 wurde hier gewählt und einen vergleichbaren Quotienten ohne zahlreiche Dezimalstellen nach dem Komma zu erhalten. Die Schnittfläche ist definiert als die Fläche die insgesamt im gesamten histologischen Bild von Matrix und Zellen bedeckt ist.

Das Prinzip der Diagramme wird anhand der nachfolgenden Abbildung (Abb. 35) exemplarisch erklärt. Sie entspricht dem ersten Herzvergleich des Herzens Nr. 1, welches perfundiert re-kultiviert wurde, und des Herzens Nr. 3, welches statisch re-kultiviert wurde.



Folgende Herzvergleiche wurden durchgeführt:

### 3.3.2 Vergleich Herz 1 (perfundiert) und Herz 3 (statisch)



**Abb. 35: Vergleich Herz 1 (perfundiert) und Herz 3 (statisch)**

links oben: Vergleich Zellzahl H1 (p) und H3 (s)

rechts oben: Vergleich Zelldichte H1 (p) und H3 (s)

links Mitte: Vergleich Zellzahl H1 (p) nach Bereichen (LV, RV, S, A)

rechts Mitte: Vergleich Zelldichte H1 (p) nach Bereichen (LV, RV, S, A)

links unten: Vergleich Zellzahl H3 (s) nach Bereichen (LV, RV, S, A)

rechts unten: Vergleich Zelldichte H3 (s) nach Bereichen (LV, RV, S, A)

*Exemplarische Auswertung Herzvergleich Nr. 1 (Herz 1 (perfundiert) und Herz 3 (statisch) ) anhand Abbildung 35 (Abb. 35):*

Abb. 35 zeigt die quantitative Auswertung der histologischen Schnitte der mit HUVECs und CMCs co-re-besiedelten und re-kultivierten Herzen hinsichtlich Zellzahl und Zelldichte im Vergleich bezogen auf die beiden Versuchsgruppen der Re-Kultivierungsart statisch vs. Perfundiert.

In der oberen Reihe sind die Gesamt-Zellzahl (oben links) und Gesamt-Zelldichte (oben rechts) der beiden Herzen H1 (perfundiert) und H3 (statisch) dargestellt. In mittlere Reihe zeigt Zellzahl und Zelldichte des Herzen 1 (perfundiert) bezogen auf die Bereiche LV, RV, S, A. In der unteren Reihe sind Zellzahl und Zelldichte des Herzen 3 (statisch) nach Bereichen LV, RV, S, A dargestellt.

Hierbei können folgende Aspekte beurteilt werden: Zellzahl pro Herz und Herzbereich, Zelldichte pro Herz und Herzbereich, Zellverteilung auf die Herzbereiche innerhalb eines Herzens und im Herzvergleich untereinander bezogen auf Zellzahl und Zelldichte pro Herzbereich (Linker Ventrikel, rechter Ventrikel, Septum, Apex).

Die Nomenklatur wurde wie bereits in der Übersicht beschrieben folgendermaßen gewählt: Vor dem Wort „Herz“ steht jeweils ein T oder ein C, für Test-group und Control-group. Der Buchstabe und die Ziffer davor, „a1“, wurde aus SPSS-technischen Darstellungsgründen gewählt und hat keine weitere Bedeutung.

In diesem Vergleich zwischen H1 (perfundiert) und H3 (statisch) (Abb. 35, oben links) ist die Zellzahl von H1 ungefähr doppelt so hoch wie bei H3. Die Zelldichte ist ebenfalls höher mit ca. 25% (Abb. 35, oben rechts) Bei Betrachtung der Verteilung der re-besiedelten Zellen von H1 fällt auf, dass hier vor allem der rechte Ventrikel und der Apex zur Gesamt-Zahl der Zellen in diesem Herzen beitragen. (Abb. 35, Mitte links) Dies spiegelt sich auch bei Betrachtung der Verteilung der Zelldichte wieder. (Abb. 35, Mitte rechts)

Bei H3 fällt auf, dass vor allem der linke Ventrikel, das Septum und der Apex gut re-besiedelt sind hinsichtlich Zellzahl und Zelldichte (Abb. 35, unten links) (Abb. 35, unten rechts).

Insgesamt kann gezeigt werden, dass das Herz 1, welches perfundiert re-kultiviert wurde, eine deutlich höhere Zellzahl und Zelldichte aufweist als das Herz 3, welches statisch kultiviert wurde (Abb. 35, oben links).

Im Folgenden werden die Auswertungen mit den wichtigsten Aussagen pro Herzvergleich kurz zusammengefasst.

#### *Herzvergleich Herz 1 (perfundiert) und Herz 3 (statisch):*

In diesem Vergleich (Abb. 35) zwischen H2 (perfundiert) und H4 (statisch) können folgende Aussagen getroffen werden:

Zellzahl:  $H1 > H3$  (Abb. 35, oben links)

Zelldichte:  $H1 > H3$  (Abb. 35, oben rechts)

Zellverteilung Zellzahl H1:  $RV > S > LV > A$  (Abb. 35, Mitte links)

Zellverteilung Zelldichte H1:  $S > RV > LV > A$  (Abb. 35, Mitte rechts)

Zellverteilung Zellzahl H3:  $A > S > LV > RV$  (Abb. 35, unten links)

Zellverteilung Zelldichte H3:  $A > S > LV > RV$  (Abb. 35, unten links)

Hinsichtlich Zellzahl ist 1 deutlich H3 überlegen, hinsichtlich Zelldichte auch. Insgesamt wurden bei H1 die Herzbereiche RV und S mit der höchsten Zellzahl und Zelldichte re-besiedelt, bei H3 waren es die Bereiche A und S.

#### *Herzvergleich Herz 2 (perfundiert) und Herz 4 (statisch):*

In diesem Vergleich (Abb. 36) zwischen H2 (perfundiert) und H4 (statisch) können folgende Aussagen getroffen werden:

Zellzahl:  $H4 > H2$  (Abb. 36, oben links)

Zelldichte:  $H4 > H2$  (Abb. 36, oben rechts)

Zellverteilung Zellzahl H2:  $S > LV > RV > A$  (Abb. 36, Mitte links)

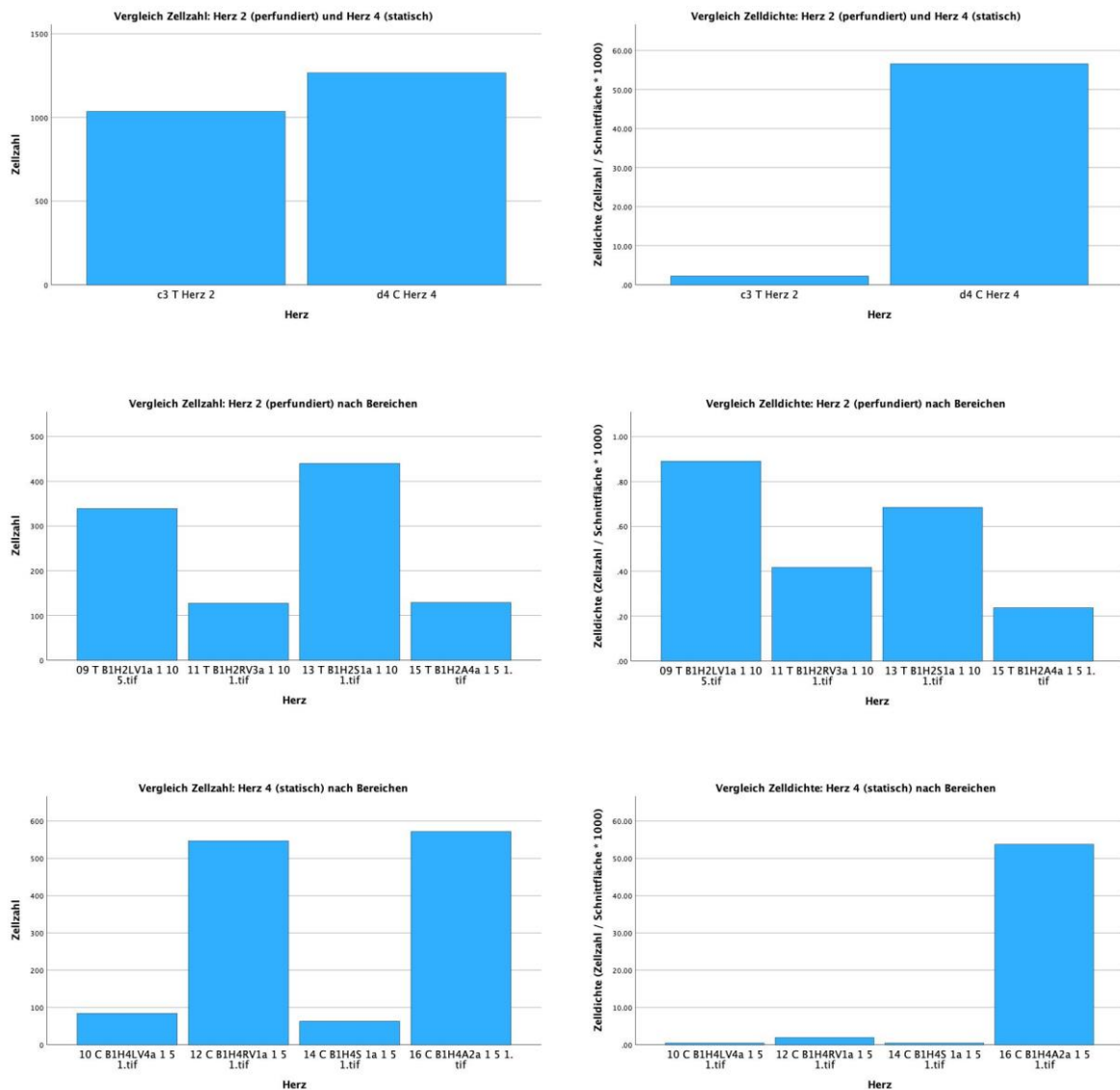
Zellverteilung Zelldichte H2:  $LV > S > RV > A$  (Abb. 36, Mitte rechts)

Zellverteilung Zellzahl H4:  $A > RV > LV > S$  (Abb. 36, unten links)

Zellverteilung Zelldichte H4:  $S > RV > LV > S$  (Abb. 36, unten links)

Hinsichtlich Zellzahl ist H4 knapp H2 überlegen, hinsichtlich Zelldichte deutlich. Insgesamt wurden bei H2 die Herzbereiche LV und S mit der höchsten Zellzahl und Zelldichte re-besiedelt, bei H4 waren es die Bereiche RV, A und S.

### 3.3.3 Vergleich Herz 2 (perfundiert) und Herz 4 (statisch)



**Abb. 36: Vergleich Herz 2 (perfundiert) und Herz 4 (statisch)**

links oben: Vergleich Zellzahl H2 (p) und H4 (s)

rechts oben: Vergleich Zelldichte H2 (p) und H4 (s)

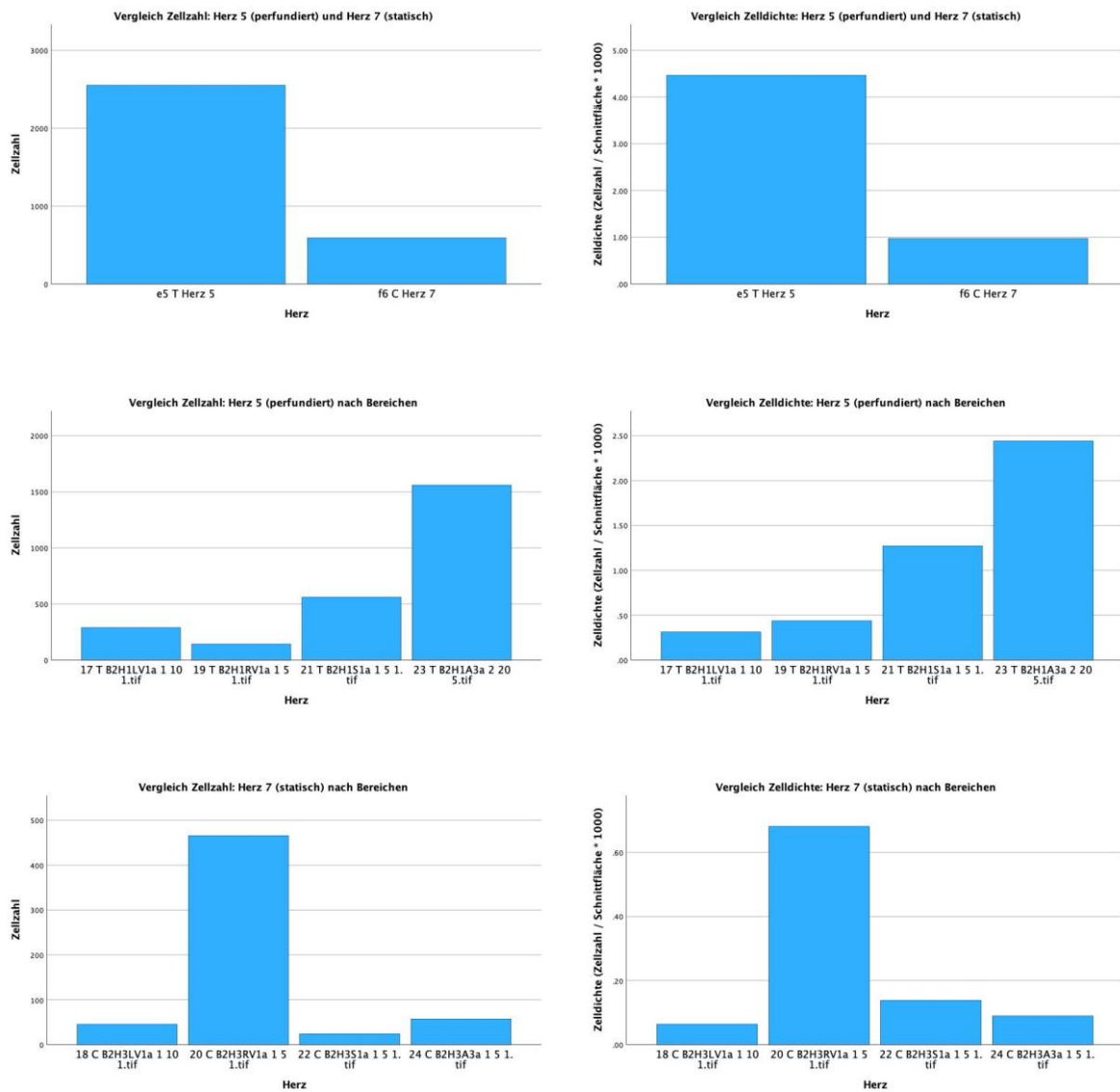
links Mitte: Vergleich Zellzahl H2 (p) nach Bereichen (LV, RV, S, A)

rechts Mitte: Vergleich Zelldichte H2 (p) nach Bereichen (LV, RV, S, A)

links unten: Vergleich Zellzahl H4 (s) nach Bereichen (LV, RV, S, A)

rechts unten: Vergleich Zelldichte H4 (s) nach Bereichen (LV, RV, S, A)

### 3.3.4 Vergleich Herz 5 (perfundierte) und Herz 7 (statisch)



**Abb. 37: Vergleich Herz 5 (perfundierte) und Herz 7 (statisch)**

links oben: Vergleich Zellzahl H5 (p) und H7 (s)

rechts oben: Vergleich Zelldichte H5 (p) und H7 (s)

links Mitte: Vergleich Zellzahl H5 (p) nach Bereichen (LV, RV, S, A)

rechts Mitte: Vergleich Zelldichte H5 (p) nach Bereichen (LV, RV, S, A)

links unten: Vergleich Zellzahl H7 (s) nach Bereichen (LV, RV, S, A)

rechts unten: Vergleich Zelldichte H7 (s) nach Bereichen (LV, RV, S, A)

#### *Herzvergleich Herz 5 (perfundiert) und Herz 7 (statisch):*

In diesem Vergleich (Abb. 37) zwischen H5 (perfundiert) und H7 (statisch) können folgende Aussagen getroffen werden:

Zellzahl:  $H5 > H7$  (Abb. 37, oben links)

Zelldichte:  $H5 > H7$  (Abb. 37, oben rechts)

Zellverteilung Zellzahl H5:  $A > S > LV > RV$  (Abb. 37, Mitte links)

Zellverteilung Zelldichte H5:  $A > S > RV > L$  (Abb. 37, Mitte rechts)

Zellverteilung Zellzahl H7:  $RV > A > LV > S$  (Abb. 37, unten links)

Zellverteilung Zelldichte H7:  $RV > S > A > LV$  (Abb. 37, unten links)

Hinsichtlich Zellzahl ist H5 deutlich H7 überlegen, hinsichtlich Zelldichte ebenfalls deutlich. Insgesamt wurden bei H5 die Herzbereiche A und S mit der höchsten Zellzahl und Zelldichte re-besiedelt, bei H7 waren es die Bereiche RV, A und S.

#### *Herzvergleich Herz 6 (perfundiert) und Herz 8 (statisch):*

Bei diesem Vergleich (Abb. 38) zwischen H6 (perfundiert) und H8 (statisch) können folgende Aussagen getroffen werden:

Zellzahl:  $H6 > H8$  (Abb. 38, oben links)

Zelldichte:  $H6 > H8$  (Abb. 38, oben rechts)

Zellverteilung Zellzahl H6:  $RV > S > LV > A$  (Abb. 38, Mitte links)

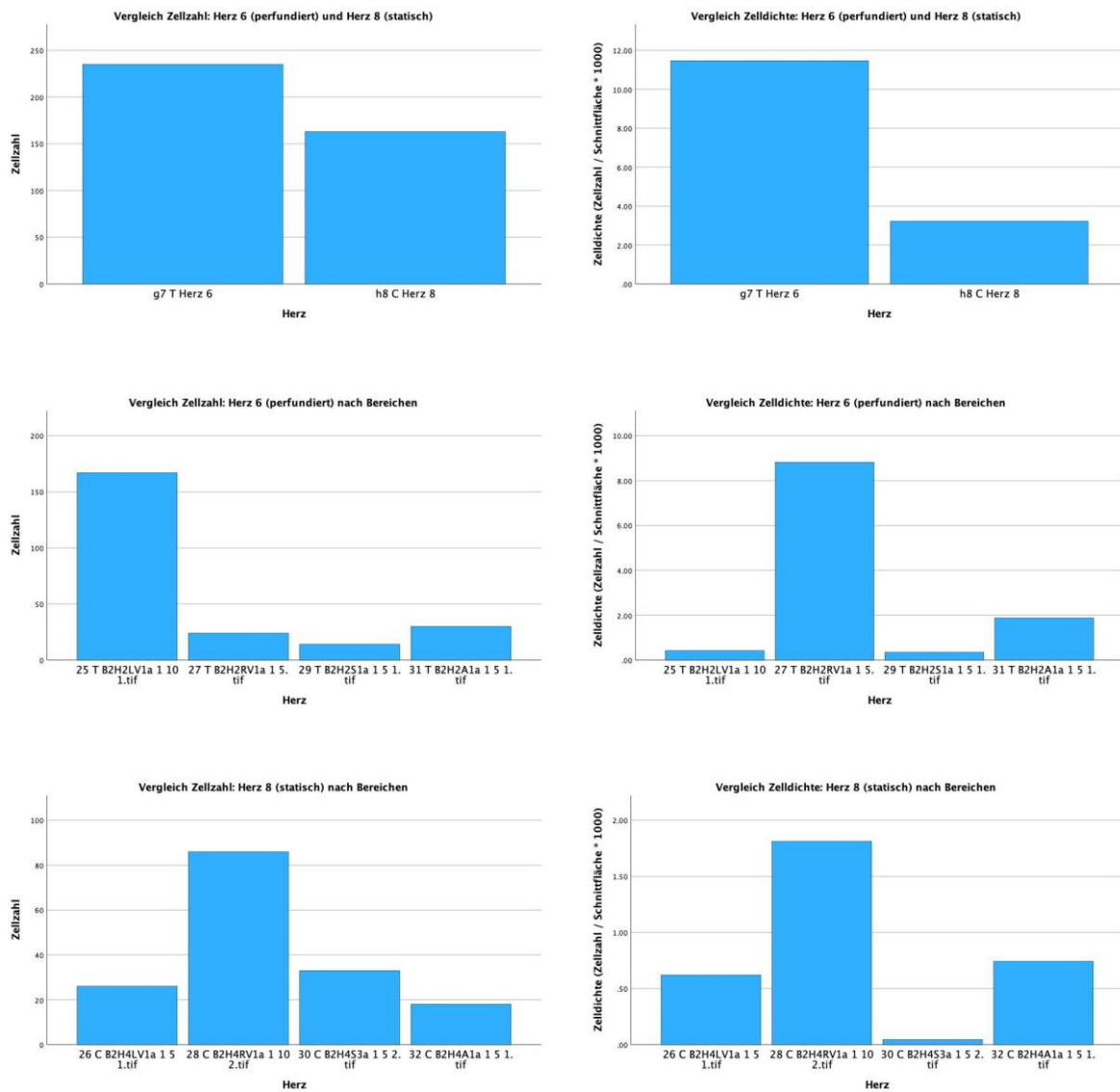
Zellverteilung Zelldichte H6:  $A > RV > LV > S$  (Abb. 38, Mitte rechts)

Zellverteilung Zellzahl H8:  $A > S > LV > RV$  (Abb. 38, unten links)

Zellverteilung Zelldichte H8:  $A > S > LV > RV$  (Abb. 38, unten links)

Hinsichtlich Zellzahl ist H6 deutlich H8 überlegen, hinsichtlich Zelldichte ebenfalls. Insgesamt wurden bei H6 die Herzbereiche RV, S und A mit der höchsten Zellzahl und Zelldichte re-besiedelt, bei H8 waren es die Bereiche A und S.

### 3.3.5 Vergleich Herz 6 (perfundiert) und Herz 8 (statisch)



**Abb. 38: Vergleich Herz 6 (perfundiert) und Herz 8 (statisch)**

links oben: Vergleich Zellzahl H6 (p) und H8 (s)

rechts oben: Vergleich Zelldichte H6 (p) und H8 (s)

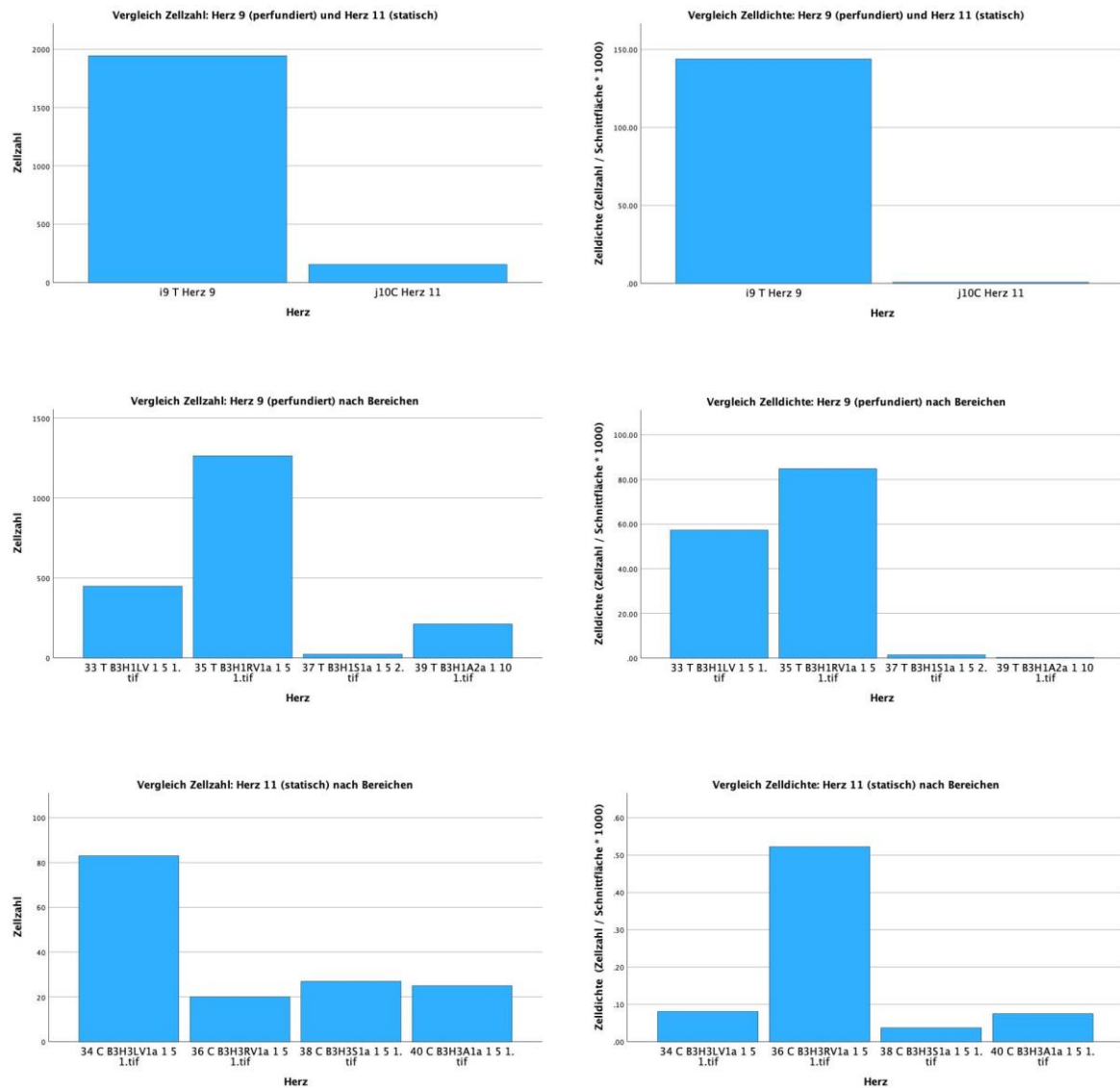
links Mitte: Vergleich Zellzahl H6 (p) nach Bereichen (LV, RV, S, A)

rechts Mitte: Vergleich Zelldichte H6 (p) nach Bereichen (LV, RV, S, A)

links unten: Vergleich Zellzahl H8 (s) nach Bereichen (LV, RV, S, A)

rechts unten: Vergleich Zelldichte H8 (s) nach Bereichen (LV, RV, S, A)

### 3.3.6 Vergleich Herz 9 (perfundiert) und Herz 11 (statisch)



**Abb. 39: Vergleich Herz 9 (perfundiert) und Herz 11 (statisch)**

links oben: Vergleich Zellzahl H9 (p) und H11 (s)  
 rechts oben: Vergleich Zelldichte H9 (p) und H11 (s)  
 links Mitte: Vergleich Zellzahl H9 (p) nach Bereichen (LV, RV, S, A)  
 rechts Mitte: Vergleich Zelldichte H9 (p) nach Bereichen (LV, RV, S, A)  
 links unten: Vergleich Zellzahl H11 (s) nach Bereichen (LV, RV, S, A)  
 rechts unten: Vergleich Zelldichte H11 (s) nach Bereichen (LV, RV, S, A)

#### *Herzvergleich Herz 9 (perfundiert) und Herz 11 (statisch):*

Bei diesem Vergleich (Abb. 39) zwischen H9 (perfundiert) und H11 (statisch) können folgende Aussagen getroffen werden:

Zellzahl:  $H9 > H11$  (Abb. 39, oben links)

Zelldichte:  $H9 > H11$  (Abb. 39, oben rechts)

Zellverteilung Zellzahl H9:  $RV > LV > A > S$  (Abb. 39, Mitte links)

Zellverteilung Zelldichte H9:  $RV > LV > S > A$  (Abb. 39, Mitte rechts)

Zellverteilung Zellzahl H11:  $LV > S > A > RV$  (Abb. 39, unten links)

Zellverteilung Zelldichte H11:  $RV > LV > A > S$  (Abb. 39, unten links)

Hinsichtlich Zellzahl ist H9 sehr deutlich H11 überlegen, hinsichtlich Zelldichte ebenfalls. Insgesamt wurden bei H9 die Herzbereiche RV und LV mit der höchsten Zellzahl und Zelldichte re-besiedelt, bei H11 waren es die Bereiche LV, S und RV.

#### *Herzvergleich Herz 10 (perfundiert) und Herz 12 (statisch):*

Bei diesem Vergleich (Abb. 40) zwischen H10 (perfundiert) und H12 (statisch) können folgende Aussagen getroffen werden:

Zellzahl:  $H10 > H12$  (Abb. 40, oben links)

Zelldichte:  $H10 > H12$  (Abb. 40, oben rechts)

Zellverteilung Zellzahl H10:  $S > A > RV > LV$  (Abb. 40, Mitte links)

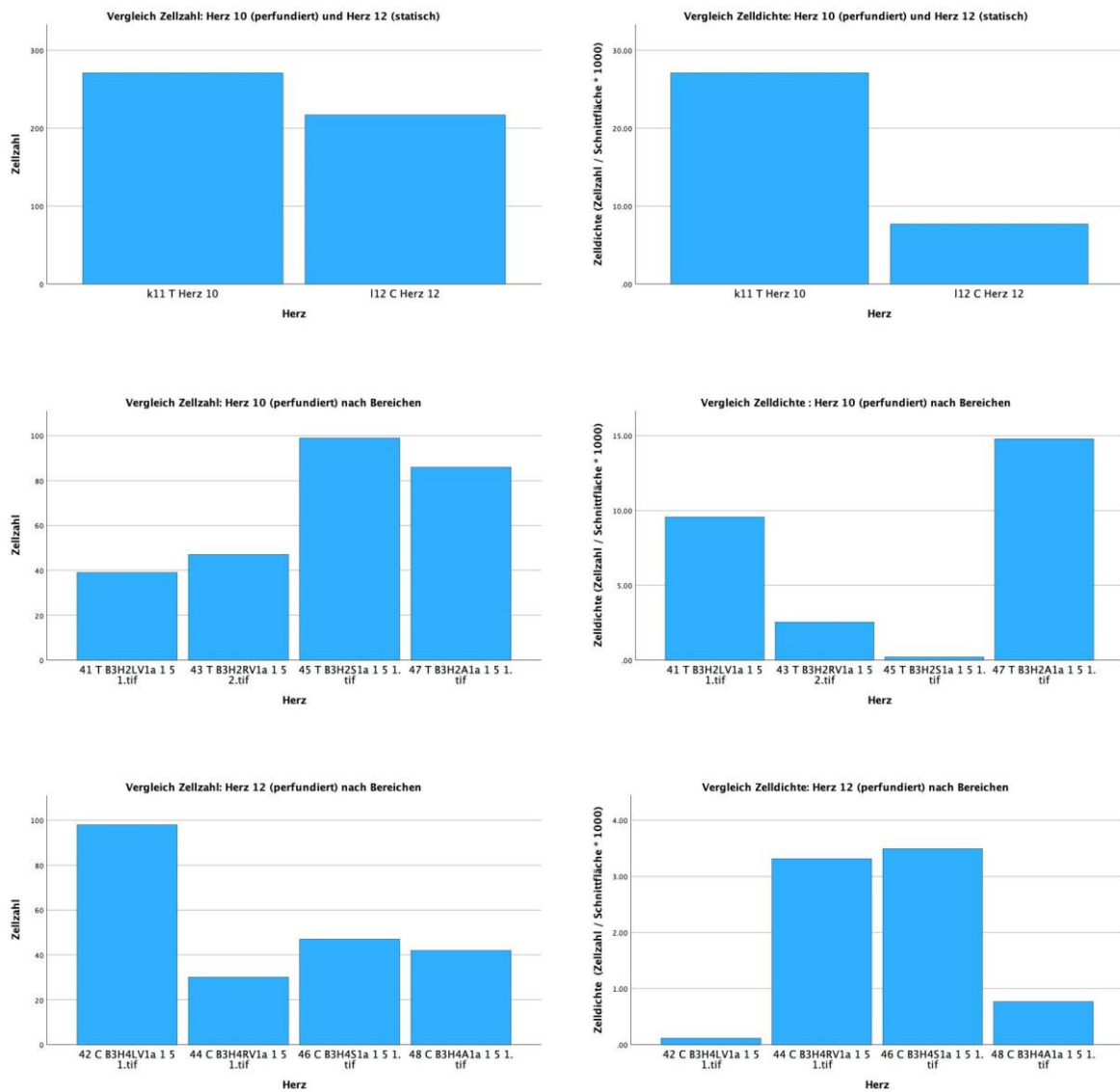
Zellverteilung Zelldichte H10:  $S > LV > RV > A$  (Abb. 40, Mitte rechts)

Zellverteilung Zellzahl H12:  $LV > S > A > RV$  (Abb. 40, unten links)

Zellverteilung Zelldichte H12:  $S > RV > A > LV$  (Abb. 40, unten links)

Hinsichtlich Zellzahl ist H10 knapp H12 überlegen, hinsichtlich Zelldichte deutlich. Insgesamt wurden bei H10 die Herzbereiche S, A und LV mit der höchsten Zellzahl und Zelldichte re-besiedelt, bei H12 waren es die Bereiche S, LV und RV.

### 3.3.7 Vergleich Herz 10 (perfundiert) und Herz 12 (statisch)



**Abb. 40: Vergleich Herz 10 (perfundiert) und Herz 12 (statisch)**

links oben: Vergleich Zellzahl H10 (p) und H12 (s)

rechts oben: Vergleich Zelldichte H10 (p) und H12 (s)

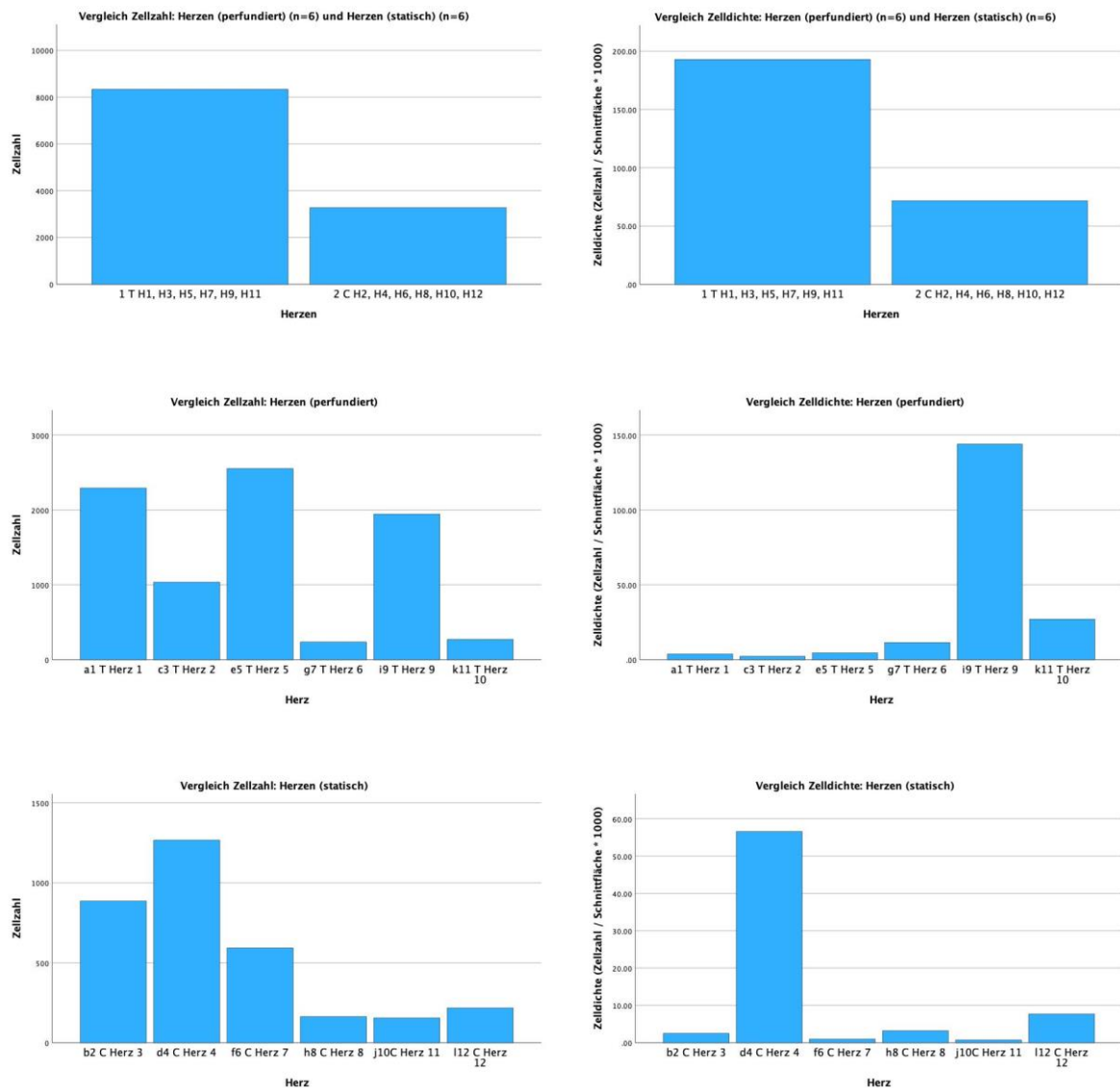
links Mitte: Vergleich Zellzahl H10 (p) nach Bereichen (LV, RV, S, A)

rechts Mitte: Vergleich Zelldichte H10 (p) nach Bereichen (LV, RV, S, A)

links unten: Vergleich Zellzahl H12 (s) nach Bereichen (LV, RV, S, A)

rechts unten: Vergleich Zelldichte H12 (s) nach Bereichen (LV, RV, S, A)

### 3.3.8 Gesamt-Vergleich Herzen (perfundiert) und Herzen (statisch)



**Abb. 41: Gesamt-Vergleich aller Herzen perfundiert vs. alle Herzen statisch**

links oben: Vergleich Zellzahl Herzen (p) und Herzen (s)  
 rechts oben: Vergleich Zelldichte Herzen (p) und Herzen (s)  
 links Mitte: Vergleich Zellzahl Herzen (p) nach Herzen (H1, H2, H5, H6, H9, H10)  
 rechts Mitte: Vergleich Zelldichte H(p) nach Bereichen (LV, RV, S, A)  
 links unten: Vergleich Zellzahl H3 (s) nach Bereichen (LV, RV, S, A)  
 rechts unten: Vergleich Zelldichte H3 (s) nach Bereichen (LV, RV, S, A)

### *Gesamt-Vergleich perfundierte Herzen (n=6) vs. statische Herzen (n=6)*

Abb. 41 zeigt den Gesamt-Vergleich aller Herzen der beiden Versuchsgruppen perfundiert (T = Test group, n=6) vs. statisch (C = Control group, n=6) hinsichtlich Zellzahl und Zelldichte aller ausgewerteten Schnitte. Hierbei zeigt die obere Reihe links die absolute Zellzahl und die obere Reihe rechts die relative Zelldichte bezogen auf die Schnittfläche, die mit Matrix ausgefüllt ist.

Die mittlere Reihe zeigt alle Herzen der beiden Gruppen hinsichtlich Zellzahl und Zelldichte bezogen auf jedes einzelne Herz. Mitte links sind die einzelnen perfundierten Herzen abgebildet, Mitte rechts die einzelnen statischen Herzen. Zu beachten ist der unterschiedliche Maßstab der y-Achse bezüglich der absoluten Zellzahl und der relativen Zelldichte, so dass die Säulendiagramme der perfundierten Herzen nicht direkt mit den statischen Herzen verglichen werden können bezüglich dieser beiden Parameter. Diese Darstellung dient eher der Verteilung der Zellzahl pro Herz innerhalb der jeweiligen Gruppe.

Die untere Reihe zeigt die Verteilung der Zellen innerhalb des jeweiligen Herzens hinsichtlich der vier Herzbereiche Linker Ventrikel, rechter Ventrikel, Septum, Apex. Links sind die perfundierten Herzen abgebildet (absolute Zellzahl), rechts die statischen.

### *Auswertung des Gesamt-Vergleichs perfundierte vs. statische Herzen:*

Insgesamt im Gesamt-Vergleich aller co-re-besiedelten und re-kultivierten Herzen, kann gezeigt werden, dass die Herzen der perfundierten Re-Kultivierung den Herzen der statischen Re-Kultivierung deutlich mit über 50% überlegen sind, hinsichtlich absoluter Zellzahl und relativer Zelldichte.

Bezogen auf die einzelnen Herzen innerhalb der beiden Gruppen, weisen bei der perfundierten Herzen die Herzen 1, 5, 9 und bei den statischen Herzen die Herzen 3, 4 und 7 die höchste Zellzahl auf.

Bezüglich Zelldichte weisen die perfundierten Herzen 9 und 10 die höchste Zelldichte auf, und die statischen Herzen 4 und 12.

### *Zusammenfassung der quantitativen Ergebnisse:*

Zusammengefasst weisen die perfundierten Herzen mit 8330 Zellen mehr als doppelt so viele Zellen auf, als die statischen Herzen mit 3278 Zellen. Die relative Zelldichte ist bei den perfundierten Herzen mit dem Wert 192,9 ebenfalls doppelt so hoch wie bei den statischen Herzen mit dem Wert 71,6 (Tabelle 21).

### 3.3.9 Original-Daten der automatisierten Bildanalyse ermittelt mit Fiji ImageJ und verarbeitet mit Excel und SPSS

In diesem Unterkapitel sind die mit der Software Fiji ImageJ mittels der beschriebenen Bildanalyse von Zellzahl und Zelldichte ermittelten Original-Daten dargestellt. Für jeden der 48 Schnitte der vaskulären und interstitiellen kombinierten simultanen und konsekutiven Co-Re-Besiedlungen und Re-Kultivierung sind die absolute Zellzahl und relative Zelldichte (= Zellzahl pro Schnittfläche \* 1000, g für die Vergleichspaare der Herzbereiche) und die hierfür erforderlichen Parameter (Schnittfläche in Pixel, Schnittfläche Gesamt in Pixel, prozentualer Anteil der Schnittfläche am Gesamtbild) analysiert worden. Bei der Bezeichnung der Schnitte (= Datei Foto) wurde die gleiche Nomenklatur verwendet, wie im Überblick beschrieben. Auch hier steht „T“ für „Test group“ (= perfundierte Herzen), und „C“ für „Control group“ (= statische Herzen). Im unteren Bereich der Tabelle sind die Werte für die ganzen Herzen (LV, RV, S, A) dargestellt. Aus diesen Werten wurden die Diagramme erstellt.

| Fallnummer | Datei (Foto) =<br>Schnitt   | Zellzahl | Fläche<br>Schnitt<br>(Pixel) | Fläche<br>Gesamt<br>(Pixel) | Fläche %    | Zelldichte (= Zellzahl / Fläche<br>Schnitt) | Zelldichte (= Zellzahl / Fläche<br>Schnitt) x 1000 | g  |
|------------|-----------------------------|----------|------------------------------|-----------------------------|-------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------------|----|
| 1          | 1 T B1H1LV3a 1.1<br>10.tif  | 250      | 354889                       | 5.038.848                   | 0,070430583 | 0,000704446                                 | 0,704445615                                        | 1  |
| 2          | 2 C B1H3LV4a 1 5<br>1.tif   | 168      | 363926                       | 5.038.848                   | 0,072224048 | 0,000461632                                 | 0,46163231                                         | 1  |
| 3          | 3 T B1H1RV1a 1.1<br>10.tif  | 1035     | 854293                       | 5.038.848                   | 0,169541332 | 0,001211528                                 | 1,211528129                                        | 2  |
| 4          | 4 C B1H3RV1a 1 5<br>1.tif   | 46       | 329220                       | 5.038.848                   | 0,065336363 | 0,000139724                                 | 0,139724197                                        | 2  |
| 5          | 5 T B1H1S1a 1.1 5<br>1.tif  | 226      | 385338                       | 5.038.848                   | 0,076473432 | 0,000586498                                 | 0,586498087                                        | 3  |
| 6          | 6 C B1H3S3a 2 5<br>2.tif    | 286      | 417454                       | 5.038.848                   | 0,082847111 | 0,000685105                                 | 0,685105425                                        | 3  |
| 7          | 7 T B1H1A5a 1.2<br>5.tif    | 781      | 601822                       | 5.038.848                   | 0,119436427 | 0,001297726                                 | 1,297725906                                        | 4  |
| 8          | 8 C B1H3A2a 1 5<br>3.tif    | 385      | 322738                       | 5.038.848                   | 0,064049957 | 0,001192918                                 | 1,192918095                                        | 4  |
| 9          | 9 T B1H2LV1a 1 10<br>5.tif  | 339      | 380513                       | 5.038.848                   | 0,075515872 | 0,000890903                                 | 0,890902545                                        | 5  |
| 10         | 10 C B1H4LV4a 1<br>5 1.tif  | 84       | 187184                       | 5.038.848                   | 0,037148174 | 0,000448756                                 | 0,448756304                                        | 5  |
| 11         | 11 T B1H2RV3a 1<br>10 1.tif | 127      | 304410                       | 5.038.848                   | 0,060412618 | 0,0004172                                   | 0,417200486                                        | 6  |
| 12         | 12 C B1H4RV1a 1<br>5 1.tif  | 547      | 286467                       | 5.038.848                   | 0,056851685 | 0,00190947                                  | 1,909469503                                        | 6  |
| 13         | 13 T B1H2S1a 1 10<br>1.tif  | 440      | 642580                       | 5.038.848                   | 0,12752518  | 0,00068474                                  | 0,684739643                                        | 7  |
| 14         | 14 C B1H4S 1a 1 5<br>1.tif  | 63       | 139473                       | 5.038.848                   | 0,027679541 | 0,0004517                                   | 0,451700329                                        | 7  |
| 15         | 15 T B1H2A4a 1 5<br>1.tif   | 129      | 545008                       | 5.038.848                   | 0,108161231 | 0,000236694                                 | 0,236693773                                        | 8  |
| 16         | 16 C B1H4A2a 1 5<br>1.tif   | 572      | 10637                        | 5.038.848                   | 0,002110998 | 0,05377456                                  | 53,7745605                                         | 8  |
| 17         | 17 T B2H1LV1a 1<br>10 1.tif | 289      | 925236                       | 5.038.848                   | 0,183620542 | 0,000312353                                 | 0,31235274                                         | 9  |
| 18         | 18 C B2H3LV1a 1<br>10 1.tif | 45       | 707654                       | 5.038.848                   | 0,14043964  | 6,35904E-05                                 | 0,063590399                                        | 9  |
| 19         | 19 T B2H1RV1a 1<br>5 1.tif  | 143      | 326280                       | 5.038.848                   | 0,064752896 | 0,000438274                                 | 0,438273875                                        | 10 |

|     |                             |      |         |           |             |             |             |    |
|-----|-----------------------------|------|---------|-----------|-------------|-------------|-------------|----|
| 20  | 20 C B2H3RV1a 1<br>5 1.tif  | 466  | 684203  | 5.038.848 | 0,1357856   | 0,000681084 | 0,681084415 | 10 |
| 21  | 21 T B2H1S1a 1 5<br>1.tif   | 560  | 439907  | 5.038.848 | 0,08730309  | 0,001272996 | 1,272996338 | 11 |
| 22  | 22 C B2H3S1a 1 5<br>1.tif   | 24   | 173685  | 5.038.848 | 0,034469188 | 0,000138181 | 0,13818119  | 11 |
| 23. | 23 T B2H1A3a 2<br>20 5.tif  | 1560 | 639160  | 5.038.848 | 0,126846454 | 0,002440703 | 2,440703423 | 12 |
| 24  | 24 C B2H3A3a 1 5<br>1.tif   | 57   | 638080  | 5.038.848 | 0,126632119 | 8,93305E-05 | 0,089330491 | 12 |
| 25  | 25 T B2H2LV1a 1<br>10 1.tif | 167  | 398058  | 5.038.848 | 0,078997819 | 0,000419537 | 0,419536851 | 13 |
| 26  | 26 C B2H4LV1a 1<br>5 1.tif  | 26   | 41869   | 5.038.848 | 0,008309241 | 0,000620984 | 0,620984499 | 13 |
| 27  | 27 T B2H2RV1a 1<br>5.tif    | 24   | 2722    | 5.038.848 | 0,000540203 | 0,008817046 | 8,817046289 | 14 |
| 28  | 28 C B2H4RV1a 1<br>10 2.tif | 86   | 47442   | 5.038.848 | 0,009415247 | 0,00181274  | 1,812739766 | 14 |
| 29  | 29 T B2H2S1a 1 5<br>1.tif   | 14   | 40166   | 5.038.848 | 0,007971266 | 0,000348554 | 0,348553503 | 15 |
| 30  | 30 C B2H4S3a 1 5<br>2.tif   | 33   | 734942  | 5.038.848 | 0,145855164 | 4,49015E-05 | 0,044901502 | 15 |
| 31  | 31 T B2H2A1a 1 5<br>1.tif   | 30   | 15983   | 5.038.848 | 0,003171955 | 0,001876994 | 1,876994306 | 16 |
| 32  | 32 C B2H4A1a 1 5<br>1.tif   | 18   | 24248   | 5.038.848 | 0,004812211 | 0,000742329 | 0,742329264 | 16 |
| 33  | 33 T B3H1LV 1 5<br>1.tif    | 448  | 7816    | 5.038.848 | 0,001551148 | 0,057318321 | 57,31832139 | 17 |
| 34  | 34 C B3H3LV1a 1<br>5 1.tif  | 83   | 1022846 | 5.038.848 | 0,202992033 | 8,11461E-05 | 0,081146135 | 17 |
| 35  | 35 T B3H1RV1a 1<br>5 1.tif  | 1264 | 14898   | 5.038.848 | 0,002956628 | 0,084843603 | 84,84360317 | 18 |
| 36  | 36 C B3H3RV1a 1<br>5 1.tif  | 20   | 38267   | 5.038.848 | 0,007594395 | 0,000522644 | 0,522643531 | 18 |
| 37  | 37 T B3H1S1a 1 5<br>2.tif   | 22   | 15501   | 5.038.848 | 0,003076298 | 0,001419263 | 1,419263273 | 19 |
| 38  | 38 C B3H3S1a 1 5<br>1.tif   | 27   | 729770  | 5.038.848 | 0,144828739 | 3,6998E-05  | 0,036997958 | 19 |
| 39  | 39 T B3H1A2a 1<br>10 1.tif  | 211  | 726528  | 5.038.848 | 0,144185338 | 0,000290422 | 0,290422393 | 20 |
| 40  | 40 C B3H3A1a 1 5<br>1.tif   | 25   | 334687  | 5.038.848 | 0,066421333 | 7,46967E-05 | 0,074696657 | 20 |
| 41  | 41 T B3H2LV1a 1 5<br>1.tif  | 39   | 4076    | 5.038.848 | 0,000808915 | 0,009568204 | 9,568204122 | 21 |
| 42  | 42 C B3H4LV1a 1<br>5 1.tif  | 98   | 850731  | 5.038.848 | 0,168834424 | 0,000115195 | 0,11519505  | 21 |
| 43  | 43 T B3H2RV1a 1<br>5 2.tif  | 47   | 18494   | 5.038.848 | 0,003670283 | 0,002541365 | 2,541364767 | 22 |
| 44  | 44 C B3H4RV1a 1<br>5 1.tif  | 30   | 9048    | 5.038.848 | 0,001795649 | 0,00331565  | 3,315649867 | 22 |
| 45  | 45 T B3H2S1a 1 5<br>1.tif   | 99   | 496669  | 5.038.848 | 0,098567966 | 0,000199328 | 0,199327923 | 23 |
| 46  | 46 C B3H4S1a 1 5<br>1.tif   | 47   | 13452   | 5.038.848 | 0,002669658 | 0,003493904 | 3,493904252 | 23 |
| 47  | 47 T B3H2A1a 1 5<br>1.tif   | 86   | 5813    | 5.038.848 | 0,001153637 | 0,014794426 | 14,79442629 | 24 |
| 48  | 48 C B3H4A1a 1 5<br>1.tif   | 42   | 54815   | 5.038.848 | 0,010878479 | 0,000766214 | 0,766213628 | 24 |
|     |                             |      |         |           |             |             |             |    |
|     |                             |      |         |           |             |             |             |    |
|     |                             |      |         |           |             |             |             |    |
|     | Statistik                   |      |         |           |             |             |             |    |
|     |                             |      |         |           |             |             |             |    |
|     | Herz-Statistik              |      |         |           |             |             |             |    |
| B1  | T H1                        | 2292 | 2196342 |           | 0,001043553 | 0,003800198 | 3,800197738 |    |

|    |                                 |      |         |  |             |             |             |  |
|----|---------------------------------|------|---------|--|-------------|-------------|-------------|--|
| B1 | C H3                            | 885  | 1433338 |  | 0,00061744  | 0,00247938  | 2,479380026 |  |
| B1 | T H2                            | 1035 | 1872511 |  | 0,000552734 | 0,002229536 | 2,229536448 |  |
| B1 | C H4                            | 1266 | 623761  |  | 0,002029624 | 0,056584487 | 56,58448663 |  |
| B2 | T H5                            | 2552 | 2330583 |  | 0,001095005 | 0,004464326 | 4,464326377 |  |
| B2 | C H7                            | 592  | 2203622 |  | 0,000268649 | 0,000972186 | 0,972186495 |  |
| B2 | T H6                            | 235  | 456929  |  | 0,000514303 | 0,011462131 | 11,46213095 |  |
| B2 | C H8                            | 163  | 848501  |  | 0,000192103 | 0,003220955 | 3,220955032 |  |
| B3 | T H9                            | 1945 | 764743  |  | 0,002543338 | 0,14387161  | 143,8716102 |  |
| B3 | C H11                           | 155  | 2125570 |  | 7,29216E-05 | 0,000715484 | 0,715484282 |  |
| B3 | T H10                           | 271  | 525052  |  | 0,000516139 | 0,027103323 | 27,1033231  |  |
| B3 | C H12                           | 217  | 928046  |  | 0,000233825 | 0,007690963 | 7,690962797 |  |
|    |                                 |      |         |  |             |             |             |  |
|    |                                 |      |         |  |             |             |             |  |
|    | <b>Gesamt-Statistik</b>         |      |         |  |             |             |             |  |
|    | T H1, H3, H5, H7, H9, H11       | 8330 | 8146160 |  | 0,001022568 | 0,192931125 | 192,9311248 |  |
|    | C H2, H4, H6, H8, H10, H12      | 3278 | 8162838 |  | 0,000401576 | 0,071663455 | 71,66345526 |  |
|    |                                 |      |         |  |             |             |             |  |
|    | T = test group =<br>perfundiert |      |         |  |             |             |             |  |
|    | C = control group<br>= statisch |      |         |  |             |             |             |  |

**Tabelle 21: Original-Daten der automatisierten Bildanalyse ermittelt mit Fiji ImageJ und verarbeitet mit Excel und SPSS**

### 3.4 Weitere Ergebnisse – Live-Dead-Assay

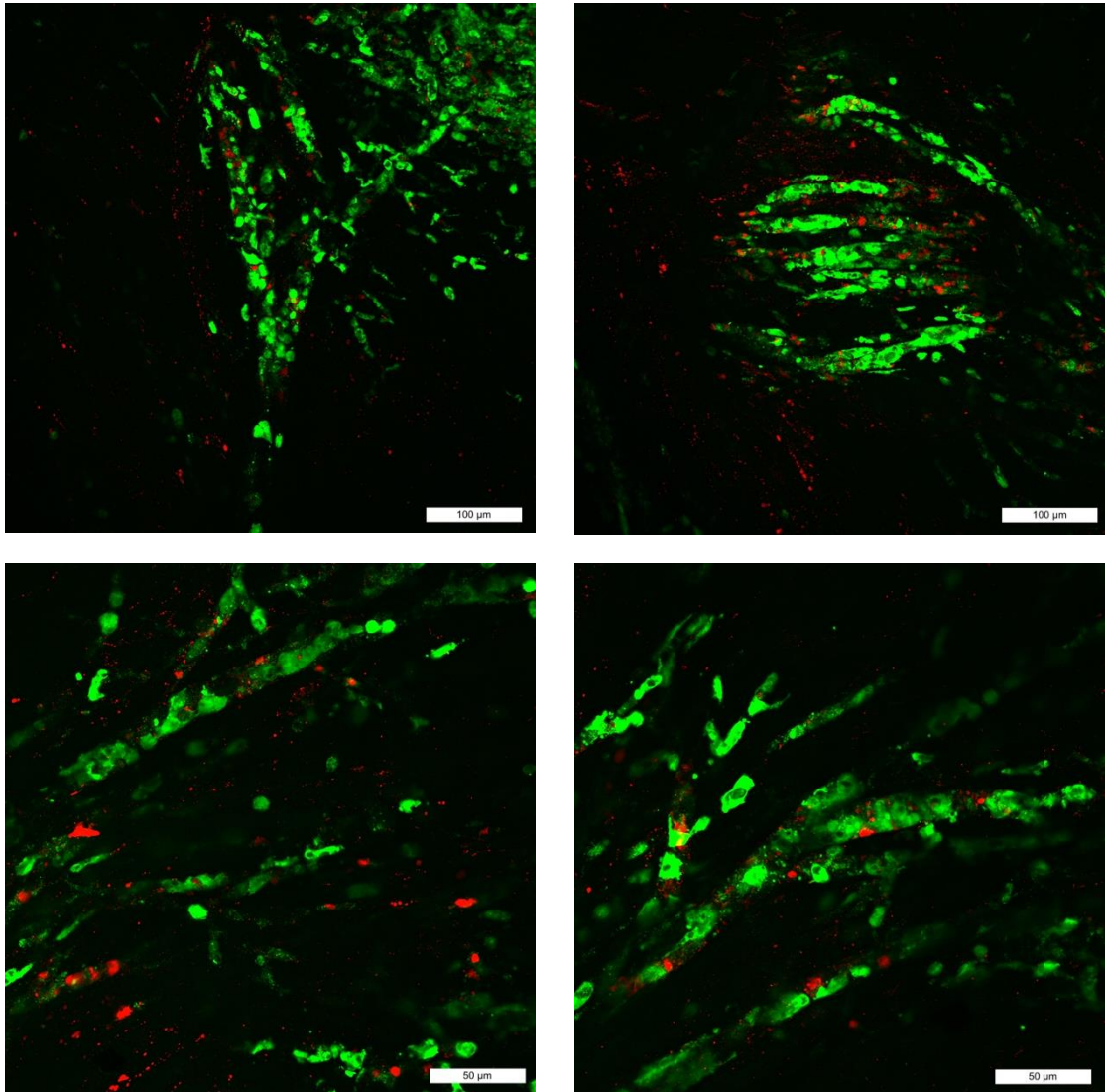
#### 3.4.1 Überblick der Live-Dead-Assay Ergebnisse

In diesem Kapitel sind weitere Ergebnisse, die mit Hilfe des Live-Dead-Assays erzielt wurden, aufgeführt. Die dargestellten Bilder zeigen Laser-mikroskopische Aufnahmen von zuvor dezellularisierten und mit HUVECs und CMCs vaskulär und interstitiell co-re-besiedelten und perfundiert re-kultivierten Ratten-Herzen. Die Aufnahmen sind repräsentativ für die jeweiligen Herzen und Herzbereiche und sollen den Erfolg der Co-Re-Besiedlung hinsichtlich von Vorhandensein der Zellen und Zellüberleben innerhalb der dECM nach 4 Tagen Re-Kultivierung darstellen. IM Folgenden sind eine Auswahl von Bildern aufgeführt, die sowohl vaskuläre und interstitielle Re-Besiedlung im Einzelnen, als auch die simultan konsekutive Co-Re-Besiedlung abbilden.

Folgende Aspekte wurden dargestellt:

- Doppelfärbung CMFDA und CMPTX
- Re-Endothelialisierung – Nahaufnahme
- Re-Endothelialisierung – Übersichtsaufnahme
- Doppelfärbung CMFDA und CMPTX + DAPI

### 3.4.2 Doppelfärbung mit CMFDA und CMPTX



**Abb. 42: Live-Dead-Assay Cell Tracker Doppelfärbung mit CMFDA und CMPTX einer perfundierten Co-Re-Besiedlung, Co-Zellvitalität HUVECs und CMCs**

vaskuläre und interstitielle kombinierte simultan konsekutive perfundierte Co-Re-Besiedlung mit HUVECs und CMCs mit Cell Tracker-Farbstoffen CMFDA und CMPTX. Grünes Signal: HUVECs, und rotes Signal: CMCs.

oben links: B2H1RV16, Maßstab: 100 µm, Vergrößerung 200x,

oben rechts: B2H1RV17, Maßstab: 100 µm, Vergrößerung 200x,

unten links: B2H1RV29, Maßstab: 50 µm, Vergrößerung 400x,

In Abb. 42 sind die im Live-Dead-Assay erzielten 3D-Bilder eines rechten Ventrikels eines zuerst dezellularisierten, daraufhin mit HUVECs und CMCs simultan konsekutiv co-re-

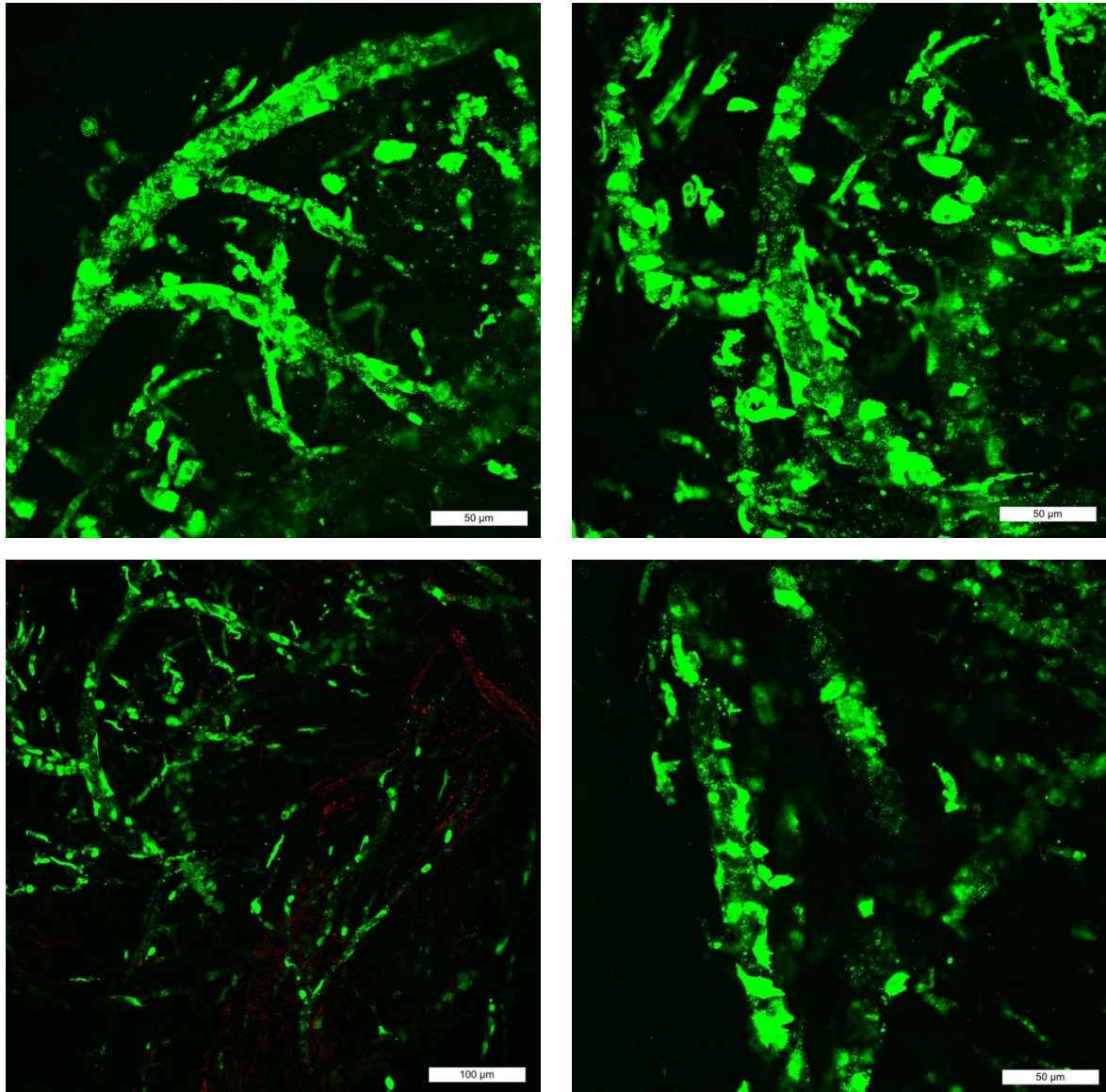
besiedelten und anschließend perfundierten re-kultivierten Herzens dargestellt. Die lebenden Zellen wurden nach Ernte unmittelbar vor der Co-Re-Besiedlung mit den für die jeweiligen Zellarten spezifischen Lebendfarbstoffe CMFDA und CMPTX gefärbt. Die HUVECs wurden mit CMFDA gefärbt, die CMCs mit CMPTX. Die Aufnahmen zeigen eine erfolgreiche Co-Re-Besiedlung mit einem funktionellen Zellüberleben beider Zellarten HUVECs und CMCs in unmittelbarer Nähe zueinander. Hierbei kleiden die HUVECs die Gefäße des vaskulären Systems des Herzens aus, während sich die Kardiomyozyten im interstitiellen Raum der extrazellulären Matrix dazwischen, in unmittelbarer Nähe der Gefäße, befinden.

### 3.4.3 Re-Endothelialisierung - Nahaufnahmen

In Abb. 43 sind vier Bilder von co-re-besiedelten und perfundiert re-kultivierten Ratten-Herzen dargestellt, die laser-mikroskopisch aufgenommen wurden.

Im oberen linken Bild ist ein Gefäßbaum mit seinen großen und immer kleiner werdenden Gefäßästen zu erkennen. Hier zeigt sich die dichte Re-Endothelialisierung der Innenseite der Gefäßwände lebenden Human umbilical vein cells (HUVECs). Die Endothelzellen wurden hier mit dem Live-Tracking-Farbstoff CMFDA kurz vor der Re-Besiedlung in die dezellularisierte Extrazelluläre Matrix gefärbt und erscheinen hier grün.

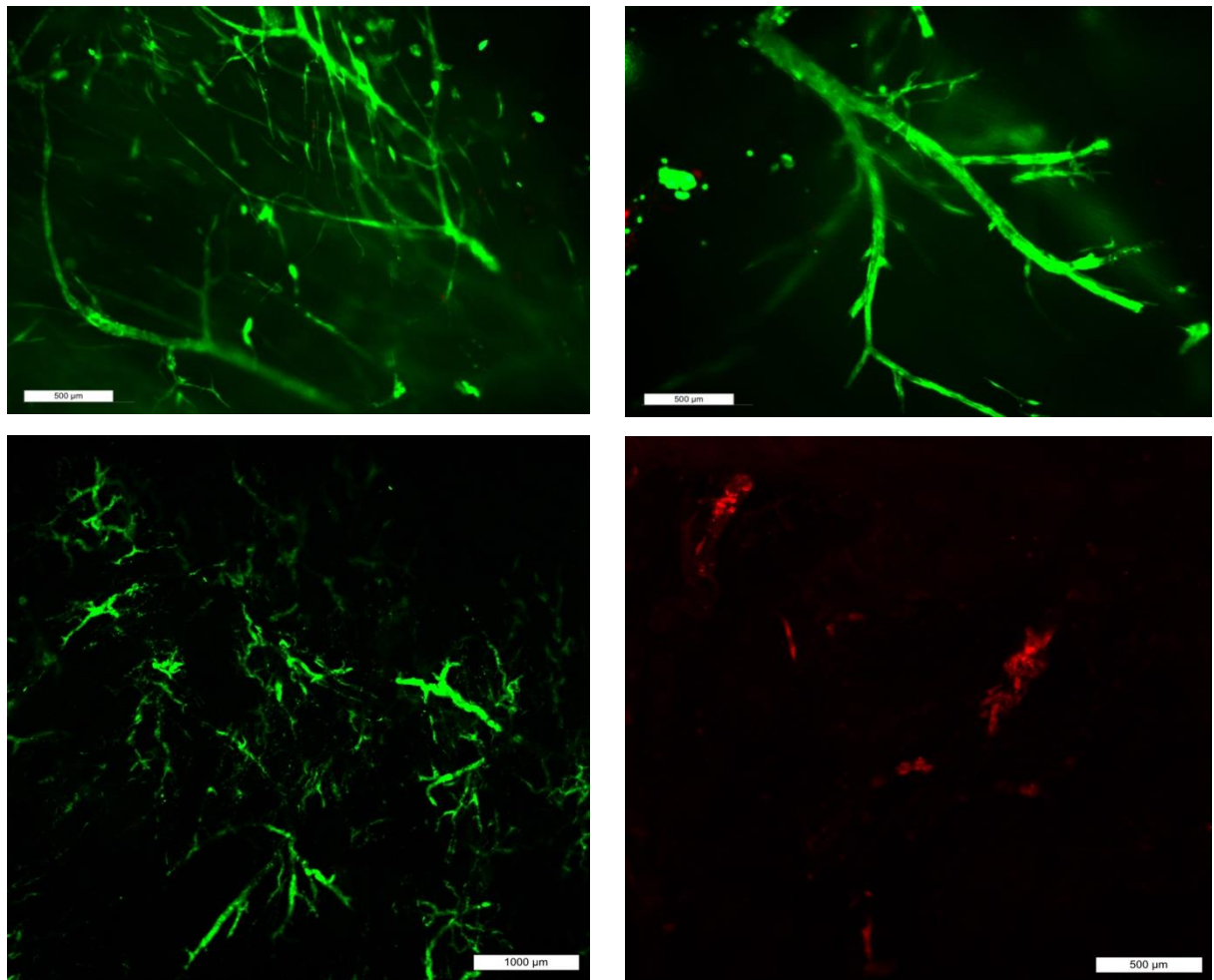
Auf dem unteren linken Bild ist ein noch verzweigter Gefäßbaum abgebildet, der die Ausbreitung der HUVECs sowohl in große Gefäßabschnitte, als auch kleinere Kapillaren zeigt. Des weiteren sind ubiquitär im Hintergrund zwischen den HUVECs zahlreich und weit verteilte Kardiomyozyten (CMCs) zu erkennen, die hier mit dem Live-Tracker-Farbstoff CMPTX gefärbt sind.



**Abb. 43: Live-Dead-Assay Cell Tracker Doppelfärbung mit CMFDA und CMPTX einer perfundierten Co-Re-Besiedlung mit Re-Endothelialisierung in Nahaufnahme, 3D-Gefäßsystem**

vaskuläre und interstitielle kombinierte simultan konsekutive perfundierte Co-Re-Besiedlung mit HUVECs und CMCs mit Cell Tracker-Farbstoffen CMFDA und CMPTX. Grünes Signal: HUVECs, und rotes Signal: CMCs.  
 oben links: B2H2LV8, Maßstab: 50 µm, Vergrößerung 400x,  
 oben rechts: B2H2LV5, Maßstab: 50 µm, Vergrößerung 400x,  
 unten links: B2H2LV1, Maßstab: 100 µm, Vergrößerung 200x,  
 unten rechts: B2H1RV24, Maßstab: 50 µm, Vergrößerung 400x.

### 3.4.4 Re-Endothelialisierung – Übersichtsaufnahmen



**Abb. 44: Live-Dead-Assay mit CMFDA und CMPTX einer Co-Re-Besiedlung mit Re-Endothelialisierung in Übersichtsaufnahme, 3D-Gefäßsystem**

vaskuläre und interstitielle kombinierte simultan konsekutive perfundierte Co-Re-Besiedlung mit HUVECs und CMCs mit Cell Tracker-Farbstoffen CMFDA und CMPTX. Grünes Signal: HUVECs, und rotes Signal: CMCs.

oben links: H2LV7, Maßstab: 500 µm, Vergrößerung 40x,

oben rechts: H2RV1, Maßstab: 500 µm, Vergrößerung 40x,

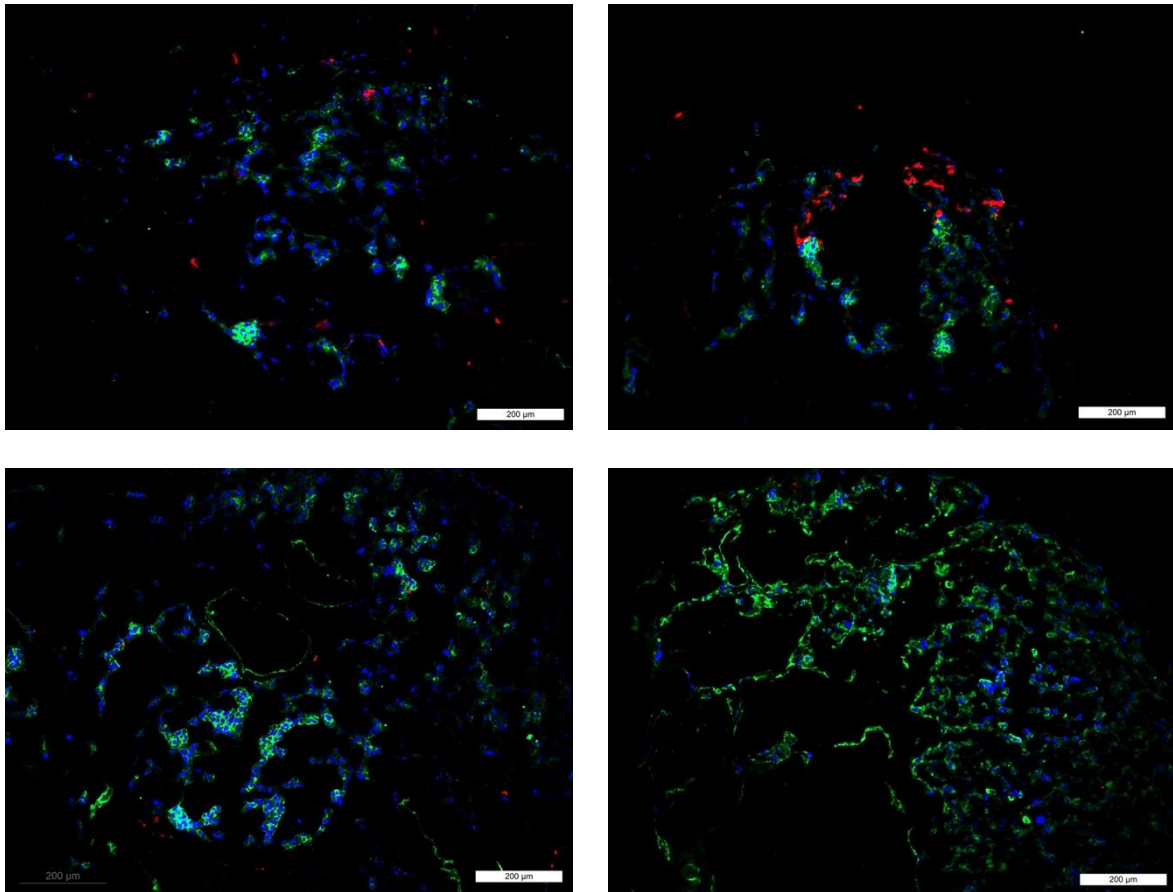
unten links: H1LV1, Maßstab: 1000 µm, Vergrößerung 20x,

unten rechts: H1RV1, Maßstab: 500 µm, Vergrößerung 40x.

In Abb. 44 sind Übersichtsaufnahmen von re-endothelialisierten Herzen dargestellt. Hier ist sind die Gefäßsysteme der Herzen gut zu erkennen, mit führenden großen Gefäßen mit ihren zahlreichen immer kleiner werdenden Verzweigungen von Gefäßästen. Im oberen linken Bild (Abb. 40, oben links) wird vor allem die Länge der Gefäße und die dichte Re-Besiedlung mit HUVECs deutlich. Im oberen rechten Bild (Abb. 40, oben rechts) ist ein einzelner Gefäß Ast

dargestellt, bei dem die dichte Re-Endothelialisierung über die gesamte Länge und bis in die kleinsten Verästelungen deutlich wird. Die untere linke Aufnahme (Abb. 40, unten links) zeigt die weite Verteilung und Tiefe der Endothelzellen innerhalb des kardialen vaskulären Systems. Das untere rechte Bild (Abb. 40, unten rechts) zeigt interstitiell re-besiedelte Kardiomyozyten mit dem Farbstoff CMPTX in rot gefärbt, die cluster-artig angeordnet sind.

### 3.4.5 Doppelfärbung CMFDA und CMPTX + DAPI



**Abb. 45: Live-Dead-Assay Cell Tracker Doppelfärbung mit CMFDA und CMPTX und DAPI-Färbung einer perfundierten Co-Re-Besiedlung, Darstellung des kardialen 3D-Gefäßsystems**

vaskuläre und interstitielle kombinierte simultan konsekutive Co-Re-Besiedlung mit HUVECs und CMCs mit Cell Tracker-Farbstoffen CMFDA und CMPTX- Grünes Signal: HUVECs, und rotes Signal: CMCs. Blaues Signal: DAPI: Zellkerne

oben links: H1LV1, Maßstab: 200 μm, Vergrößerung 100x,  
oben rechts: H1LV2, Maßstab: 200 μm, Vergrößerung 100x,  
unten links: H1RV1 Maßstab: 200 μm, Vergrößerung 100x,  
unten rechts: H1RV2, Maßstab: 200 μm, Vergrößerung 100x.

Abb. 45 zeigt vor allem die gute und weit verbreitete Re-Endothelialisierung aller Gefäßbäume und Gefäßkaliber mit lebenden Endothelzellen (HUVECs und mit einzelnen lebenden Kardiomyozyten (CMCs) im Interstitium. Die HUVECs sind hier in grün mit Cell Tracker Lebendfarbstoff CMFDA, die Kardiomyozyten in rot mit Cell Tracker Lebendfarbstoff CMPTX

dargestellt. Zudem sind beide Zellarten mit der Zellkernfärbung DAPI gefärbt. Im oberen linken und rechten Bild sind beide Zelltypen in direkter Nähe zueinander zu erkennen. Sowohl das Interstitium als auch die Gefäße konnten re-besiedelt werden. Im unteren linken Bild ist die hohe Zellzahl und Zelldichte innerhalb der Re-Endothelialisierung innerhalb der Gefäße und Gefäßverläufe. Das rechte untere Bild zeigt die weite Verteilung innerhalb der kardialen extrazellulären Matrix und ein gut re-besiedeltes drei-dimensionales vaskuläres System.

## 4 Diskussion

### 4.1 Übersicht der Diskussion

In diesem Abschnitt sollen die verwendeten Methoden hinsichtlich Vor- und Nachteilen und die erzielten Ergebnisse und deren Bedeutung diskutiert werden und abschließend ein Blick in die Zukunft gegeben werden. Dabei werden die verwendeten Methoden und deren Alternativen dargestellt und diskutiert und die Ergebnisse mit Blick auf zukünftige Versuche eingeordnet.

Es folgt eine erneute kurze Einführung in das Thema des Tissue engineering mit medizinischer Relevanz, Entwicklung und aktuellem Stand.

Im Anschluss folgt ein Kurz-Überblick über die bearbeiteten Fragestellungen, die an die Ausführungen im Kapitel „Ziel dieser Arbeit“ der Einleitung anknüpfen sollen.

#### *Tissue Engineering*

Herzerkrankungen sind die häufigste Todesursache weltweit. Dabei spielt die Herzinsuffizienz eine entscheidende Rolle. Die Therapie der terminalen Herzinsuffizienz ist weiterhin eine Herztransplantation. Dies erfordert weiterhin Spenderorgane. Dabei übersteigt die Nachfrage an Spende-Organen bei weitem das Angebot. Eine Alternative zu Spenderorganen wären künstlich bzw. bio-künstlich erstellte Organe, dies ist eines der Hauptziele des kardialen Tissue engineering.

Seit den 90er Jahren entwickelte sich das Tissue Engineering in allen Bereichen immer schneller weiter. Vor allem in den Bereichen Leber, Niere, Lunge, Herz, Haut. Erhebliche Fortschritte sind bereits im Bereich und des Reparierens von Teilen des Herzens gemacht worden. Allen voran sicherlich die große Bedeutung der biologischen Herzklappen. Dies gilt es nun auf das ganze Herz anzuwenden.

Ein Meilenstein im Bereich des kardialen Tissue Engineering war die erstmalige Dezellularisierung eines ganzen Ratten-Herzens von der Gruppe Ott, Taylor 2008 (Ott et al., 2008). Dabei wurden Ratten-Herzen dezellularisiert und anschließend mit Kardiomyozyten (CMCs) von Ratten re-besiedelt. Dieses re-besiedelte Konstrukt wurde in einem Bioreaktor kultiviert. Es konnte eine kardiale Pumpfunktion von 2% der adulten Pumpfunktion erzielt werden. Dies war eine Zäsur und beschleunigte das kardiale Tissue Engineering erneut. Es

folgten weitere Studien, vor allem im Hinblick auf ein optimales ECM-Herzgerüst (Akhyari et al., 2011). Die Arbeit von Aubin stellte einen weiteren großen Fortschritt dar, auf der Suche nach einem bestmöglich geeigneten Herzmodell. Hierbei wurde ein Protokoll gefunden, welches sehr viel versprechend ist. Dabei wurden die zuvor gewonnen Ratten-Herzen dezellularisiert, die DNA zum größten Teil entfernt, bei Erhalt der wichtigen, notwendigen ECM-Struktur.

Daraufhin folgten weitere Studien über der Re-Besiedlung. In einer Nachfolge Studie wurde speziell die vaskuläre Re-Besiedlung bei zuvor dezellularisierten Ratten Herzen untersucht (Aubin et al., 2013b).

Die Regenerative Medizin bzw. das Tissue Engineering haben es sich zum Ziel gesetzt, Teile von Organen und sogar komplette Organe durch biokünstliche Erschaffung wiederherzustellen. Dabei wird, wie vom Gründer des Tissue Engineering Prof. Robert Langer beschrieben, vor allem der Fokus auf drei Bereiche gelegt (Langer and Vacanti, 1993). Zum einen auf die Herstellung und Verwendung einer 3D-Trägermatrix (ECM), die sowohl biologische als auch mechanische Eigenschaften des zu ersetzenden Organs besitzen. Zum zweiten eine Zellpopulation, die nach Re-Besiedlung dem zu ersetzenden Organ möglichst ähnlich ist. Und zum Dritten Faktoren, die das Wachstum eines solchen re-besiedelten Konstrukts optimal fördern.

#### *Diese Arbeit*

In dieser Arbeit wurden in den Hauptversuchen 12 ganze Ratten-Herzen zuerst dezellularisiert, im Anschluss mit zwei unterschiedlichen Zellarten, Endothelzellen (HUVECs) und Kardiomyozyten (CMCs), vaskulär und interstitiell simultan konsekutiv co-re-besiedelt und schließlich auf zwei unterschiedliche Arten re-kultiviert, perfundiert und statisch. Danach wurden die Herzen nach Bereichen (linker Ventrikel, rechter Ventrikel, Septum, Apex) histologisch, immunhistologisch und molekularbiologisch ausgewertet und analysiert hinsichtlich Zellzahl und Zelldichte der re-besiedelten Zellen innerhalb der Matrix. Dies geschah qualitativ repräsentativ und quantitativ mittels automatisierter standardisierter Zellzählung mittels mit Fiji ImageJ und weiterer Darstellung mit SPSS.

Hierbei wurden folgende Fragestellungen bearbeitet: 1 a) Funktioniert die neue Art der Co-Re-Besiedlung? b) Ist diese Methode für weitere Versuche geeignet? 2 a) Funktionieren die beiden Re-Kultivierungsarten, perfundiert und statisch? B) Welche der beiden Re-Kultivierungsarten ist besser geeignet für zukünftige Versuche hinsichtlich Zellzahl und zelldichte.

Die ausführlichen Fragestellungen und die zu ihrer Beantwortung notwendigen Kriterien sind im Folgenden aufgeführt und sollen an die im Kapitel „Zielsetzung dieser Abschnitt“ im Abschnitt Einleitung dargestellten Aspekte anknüpfen.

### *Fragestellungen dieser Arbeit*

Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

#### 1. Etablierung einer neuen Co-Re-Besiedlungsmethode

- a) Funktioniert die neue Art der vaskulären und interstitiellen simultan konsekutiven Co-Re-Besiedlung?

Beurteilung qualitativ anhand von Vorhandensein von beiden Zellarten, HUVECs und CMCs innerhalb der Matrix nach 4 Tagen Re-Kultivierung

- b) Ist die neue Art der Co-Re-Besiedlung geeignet für weitere Versuche?

Beurteilung anhand von qualitativer Einschätzung der Co-Re-Besiedlung hinsichtlich Zellzahl und Zellverteilung innerhalb der re-besiedelten Matrix

#### 2. Vergleich zweier unterschiedlicher Re-Kultivierungsmethoden perfundiert vs. Statisch

- a) Funktionieren die beiden Re-Kultivierungsarten nach Co-Re-Beurteilung?

Beurteilung qualitativ anhand von Kriterium von 1a

- b) Welche der beiden Re-Kultivierungsarten, perfundiert vs. Statisch, ist besser für eine Re-Kultivierung geeignet?

Beurteilung qualitativ und quantitativ anhand von automatisierter Bild-Analyse und Vergleich der beiden Versuchsgruppen, perfundiert vs. statisch, hinsichtlich Zellzahl und Zelldichte der einzelnen histologischen Schnitte der co-re-besiedelten

## 4.2 Vorteile und Limitationen der angewendeten Methoden

In diesem Abschnitt dieser Arbeit soll eine Diskussion über mögliche Methoden und verwendete Methoden stattfinden. Orientiert wird sich dabei an den von Langer et al (Langer and Vacanti, 1993) definierten großen Bereichen des Tissue engineering, die zu gleich einer inhaltlichen Logik, wie auch einer chronologischen Reihenfolge folgen. Die Bereiche sind definiert als: erstens Gewinnung einer geeigneten 3D-Trägermatrix, die als Gerüst für eine Re-Besiedlung dient. Zweitens die Re-Zellularisierung dieser 3D-Trägermatrix mit geeigneten organ-spezifischen Zellen des gewünschten Organs. Und die Re-Kultivierung eines solchen re-zellularisierten Konstrukts. Bei jedem dieser Punkte gibt es im Verlauf der Entwicklung des Tissue engineering unterschiedliche Methoden, die jeweils Vor- und Nachteile mit sich bringen.

### 4.2.1 Methoden dieser Arbeit

#### *ECM-Gerüst*

Für diese Arbeit wurde als Methode zur Gewinnung einer 3D-Matrix eines Ganz—Herzens die Dezellularisierung gewählt. Als Tiermodell wurde die Ratte ausgewählt, da das Ratten-Herz als Kleinherz die Möglichkeit bietet, der Herausforderung der enorm hohen benötigten Zellzahl zur Re-Besiedlung und Re-Kultivierung entgegenzuwirken. Die Dezellularisierung stellt eine geeignete Methode dar, ein Grundgerüst eines Herzens zu erhalten. Im Vergleich zu anderen Methoden zur Gewinnung einer Trägermatrix hat sie den Vorteil des kompletten Erhalts der 3D-Struktur des Herzens und gleichzeitiger Entfernung aller DANN-haltigen Bestandteile und Zellen. Dies ist für den späteren klinischen Einsatz unabdingbar, um Immunreaktionen des Empfängers gegen Zellstrukturen zu vermeiden. Um ein optimales Ergebnis hinsichtlich der Dezellularisierung zu erhalten, wurde das etablierte Protokoll von Aubin et al. angewendet.

#### *Re-Besiedlung des dezellularisierten Herzen mit Zellen*

Für die Re-Besiedlung wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet mit jeweils unterschiedlichen Zellarten: die vaskuläre Re-Besiedlung mit Endothelzellen (HUVECs) und die interstitielle Re-Besiedlung mit neonatalen Kardiomyozyten (CMCs). Diese Re-Besiedlungsarten wurden einzeln und anschließend in den Hauptversuchen kombiniert angewendet. Die Art der vaskulären Re-Besiedlung war bereits etabliert, die Art der interstitiellen Re-Besiedlung in dieser Form noch nicht. Die Kombination dieser beiden Re-

Besiedlungsarten in dieser Form gleichzeitig und konsekutiv war so bereits noch nicht etabliert.

Die vaskulären Re-Besiedlung fand mittels aortaler Re-Perfusion statt. Diese birgt die Vorteile alle für die Besiedlung mit Endothelzellen relevanten Gefäße zu erreichen und gleichzeitig die Zellen so in eine komplexen Gefäßsystem positionieren zu können, wie es die Natur vorgegeben hat. Dabei sind Scherkräfte und Diskusion vorteilhaft. Die Komplexität des Gefäßsystems stellt auch in der Re-Besiedlung eine der größten Herausforderungen dar, um alle relevanten Bereiche des Herzens proportional einheitlich zu erreichen.

Für die interstitielle Re-Besiedlung wurde eine Methode mittels intra-ventrikulärer Injektion gewählt. Diese stellt eine geeignete Möglichkeit dar, die Wandschichten der Ventrikel und anderen Herzbereiche zu erreichen. Im Gegensatz zur vaskulären Re-Besiedlung steht hier nicht die Verbreitung im Gefäßsystem im Vordergrund, sondern eine möglichst präzise und kontrollierte Re-Besiedlung des Interstitiums.

Für die kombinierte Co-Re-Besiedlung wurde eine Kombination aus beschriebener vaskulärer und interstitieller Re-Besiedlung verwendet und neu etabliert. Hierbei wurde eine gleichzeitige konsekutive Art verwendet, bei der das Herz zuerst interstitiell und im gleichen Schritt vaskulär re-besiedelten verwendet. Eine alternative Methode hierzu wäre die umgekehrte Reihenfolge, also zuerst eine vaskuläre und dann eine interstitielle Re-Besiedlung. Eine weitere Alternative wäre eine unmittelbar gleichzeitige Re-Besiedlung, bei zuerst zur Hälfte vaskulär, dann interstitiell und dann wieder vaskulär re-besiedelt wird. Diese Methode wurde in Etablierungsversuchen durchgeführt, jedoch schien die Methode der gleichzeitig konsekutiven, also zuerst vaskulären und dann interstitiellen Re-Besiedlung vielversprechender. Die Argumente hierfür werden im Folgenden erläutert.

Hierbei ist der Vorteil, dass die Ventrikel Wände und anderen Herzstrukturen durchsichtig sichtbar bleiben, was einen wichtigen Punkt für die interstitielle Re-Besiedlung mittels Injektion darstellt. Dies ist erforderlich, um die Lokalisation der Injektion zu kontrollieren mittels makroskopischer Prüfung der Verteilung des CMC-Mediums. Würde das Herz zuerst mit HUVECs in EC-Medium re-besiedelt, wäre es entsprechend dem EC-Medium rötlich gefärbt. So könnte die interstitielle Re-Besiedlung nicht anhand der Ausbreitung des CMC-Medium kontrolliert werden, was die Qualität der Besiedlung einschränken könnte.

Ein mögliches Gegenargument stellt die Tatsache dar, dass durch die anschließende vaskuläre Re-Besiedlung die re-besiedelten Kardiomyozyten wieder ausgewaschen werden könnten. Dies konnte anhand der Ergebnisse widerlegt werden, da sowohl Endothelzellen, als auch Kardiomyozyten nach 4 Tagen Re-Kultivierung an Ihrer jeweiligen Position lokalisiert waren

und überlebten. Dies könnte durch die Tatsache erklärt werden, dass eine Adhäsion und Haftung der Zellen unmittelbar bei Re-Besiedlung stattfindet und dass der Druck der Diffusion der vaskulären Re-Besiedlung mit zunehmendem Abstand von den Gefäßen abnimmt und somit auch ein mögliches Auswaschen unwahrscheinlicher wird.

#### *Re-Kultivierung des re-besiedelten Herzens*

Für die Re-Kultivierung wurden zwei unterschiedliche Re-Kultivierungsarten verwendet, eine statische Re-Kultivierung mittels einmaligem Mediumwechsel nach 2 Tagen, und eine perfundierte Re-Kultivierung mittels äußerem Mediumwechsel und erneuter aortalen Re-Perfusion mit Nährmedium nach 2 Tagen. Die Vor- und Nachteile der jeweiligen Re-Kultivierungsart werden im Folgenden diskutiert.

Die statische Re-Kultivierung zwar insgesamt auch erfolgreich mit Zellüberleben nach 4 Tagen, jedoch in Zellzahl und Zelldichte der perfundierten Re-Kultivierung unterlegen. Der wahrscheinlichste Faktor hierfür scheint die Versorgung des Herzens mit Nährmedium zu sein, der bei der perfundierten Re-Kultivierung deutlich besser zu sein scheint. Hierbei gelangt das Nährmedium nicht nur äußerlich, sondern vor allem durch das vorhandene Gefäßsystem an die re-besiedelten Zellen. Diese Methode imitiert zudem die Biomechanik und Nährstoffversorgung der Natur bestmöglich, da bei der embryonalen Entwicklung und auch späteren Versorgung des Herzens mit Nährstoffen dies immer vaskulär im Körper erfolgt. Bei der statischen Re-Kultivierung findet zwar ebenfalls eine Nährstoffversorgung mittels Diffusion statt. Es scheint jedoch, als reiche diese nicht aus, um mit der vaskulären Verbreitung und Versorgung mithalten zu können.

Ein mögliches Gegenargument stellt hier die Tatsache dar, dass bereits re-besiedelte Zellen durch die perfundierte Re-Kultivierung, also eine erneute aortale Re-Perfusion, ausgewaschen werden könnten. Dies konnte anhand der Ergebnisse nicht bestätigt werden. Im Gegenteil besteht sogar Grund zu der Annahme, dass die erreichten Scherkräfte während der Re-Perfusion dazu führen, dass das Zellwachstum der re-besiedelten Zellen beschleunigt und insgesamt verbessert werden kann.

Hinsichtlich der angewendeten Auswertungsmethoden qualitativ anhand der gefärbten Histologie und Immunhistologie Schnitte und quantitativ mittels Bild- und Zellzahlanalyse mit Fiji ImageJ bestehen ebenfalls Vor- bzw. Nachteile der angewendeten Methoden, die am Ende dieses Unterkapitels aufgeführt sind.

Im Folgenden sind alle angewendeten Methoden ausführlich dargestellt und dessen Vor- und Nachteile, sowie mögliche Alternativmethoden beschrieben und diskutiert.

#### 4.2.2 Dezellularisierung (ECM-Gerüst)

In den von Langer et al. (Vacanti et al., 1988) definierten großen Bereichen des Tissue engineering spielt der erste Bereich, die Gewinnung einer 3D-Trägermatrix, eine kritische Rolle. Die Antwort auf diese Frage legt den Grundstein einer erfolgreichen Re-Besiedlung und Re-Kultivierung und bestimmt den weiteren Verlauf des Re-Besiedlungs-Projekts maßgeblich. Daher ist die Wahl einer geeigneten Methode zur Gewinnung der Trägermatrix von enormer Bedeutung. Dazu ist es wichtig, einen groben Überblick über die unterschiedlichen Möglichkeiten zu gewinnen.

Die extrazelluläre Matrix dient als Grundgerüst für ein Gewebe oder Organ und für dessen organ-spezifische Zellen. Dabei stellt sie den grundsätzlichen Aufbau des Organs und dessen Struktur dar. Badylak et al. (Badylak et al., 2009) beschreiben diese Matrix als „eine Mischung aus funktionellen und strukturellen Moleküle, die eine Breite an Zellaktivitäten beeinflussen und in einer individuellen, gewebe-spezifischen, dreidimensionalen Ultrastruktur. Die natürliche ECM wird unter anderem durch die organ-spezifischen Zellen hergestellt. Des Weiteren beschreibt er, dass diese ECM sich fortwährend leicht anpasst entsprechend dem Stoffwechsel des jeweiligen Organs, und mit den entsprechenden organ-spezifischen Zellen interagiert. Dies stellt einen wesentlichen Vorteil gegenüber synthetischen Stoffen dar. Obwohl die Spezifität von Organen hinsichtlich der ECM und der Zellen, eine große Rolle spielt, so bestehen doch die meisten ECMs unterschiedlichen Organen aus ähnlichen Inhaltsstoffen. Dazu zählen im Wesentlichen Proteine wie Kollagen Typ 1, Fibrin, Elastin, Laminin und Zucker wie Glycosaminoglykane (GAG). Zusätzlich zur Ultrastruktur der ECM spielt auch die makroskopische Struktur, die Architektur eine große Rolle. Zudem beeinflusst die Matrix die Zellmigration und Zelldifferenzierung entscheidend

Grundsätzlich werden die folgenden Möglichkeiten unterschieden: biologische Gewinnung, synthetische Gewinnung, und die natürliche Gewinnung mittels Dezellularisierung.

##### *Synthetische Gewinnung*

Bei der synthetischen Gewinnung werden vor allem Kunststoffe als Materialien verwendet. Hierzu zählen vor allem Polyurethane, Polyester, etc. Diese bieten den Vorteil, dass sie keinerlei DNA-haltige Bestandteile, die zu einer Abstoßungsreaktion führen könnten. Dadurch besitzen sie eine verhältnismäßig geringe Immunogenität. Zudem können sie sehr gut exakt und in unbegrenzter Menge reproduziert werden, da sie keiner Limitation hinsichtlich von begrenzter Verfügbarkeit von Spender-Organen unterliegen.

Zugleich sind die rein künstlichen Bestandteile auch ein Nachteil, da sie als ECM nicht die klassischen Vorteile einer biologischen ECM mit sich bringen, vor allem die Zellinteraktion, die Zellen positiv beeinflussen.

Die synthetische Gewinnung oder Produktion von ECM spielt eher im Gewebe-Tissue-engineering eine Rolle als im Ganz-Organ-Tissue-engineering. Dabei ist es schon schwierig einigermaßen 2D- 3D-Struktur zu erstellen. Diese dann so komplex zu formen, dass aus einer kleinen 3D-Struktur eine noch komplexere 3D-Organ-Struktur wird, inklusive einem anatomisch korrekten Gefäß-Netz, ist schwierig. Eine weitere elementare Hürde, ist die Schwierigkeit, ein solches Konstrukt hoch zu skalieren auf die Größe eines humanen Organs.

Im Bereich des Gewebe-Tissue-engineering gibt es allerdings gute Ansätze und zum Teil Anwendungsmöglichkeiten für synthetische ECM-Materialien.

#### *Natürliche biologische Gewinnung*

Für die natürliche Gewinnung sind Spender-Organen notwendig. Diese können jedoch auch vom Tier stammen. Um einer Abstoßungsreaktion vorzubeugen, sollten alle DNA-haltigen Bestandteile aus dem Spender-Organ entfernt werden. Übrig bleibt ein Gerüst, welches aus natürlich biologischer ECM, und damit vor allem aus Proteinen und Wachstumsfaktoren besteht. Um wie beschrieben, möglichst alle DNA-haltigen Zellbestandteile aus diesem Gerüst zu entfernen, werden bestimmte Dezellularisierungs-Methode angewendet.

#### *Dezellularisierung*

Die Methode der Dezellularisierung ist mittlerweile Jahrzehnte bekannt und etabliert. Es wird zwischen Gewebe- und Ganz-Organ-Dezellularisierung unterschieden. Bei der Ganz-Organ-Dezellularisierung gibt es die Immersions- und Diffusions-Dezellularisierung mittels Perfusion. Bei der Immersions-Dezellularisierung werden Gewebe oder Organe in eine dezellularisierende Lösung eingelegt, die die Matrix durchdringt. Bei der Diffusions-Dezellularisierung wird das Organ mit der dezellularisierenden Lösung perfundiert. Im Bereich der Ganz-Organ-Dezellularisierung hat sich diese Perfusion-Dezellularisierung durchgesetzt. In den letzten Dekaden wurde diese Methode immer weiter verbessert und feinjustiert. Die Perfusions-Dezellularisierung werden folgende Methoden unterschieden: chemisch, enzymatisch, physikalisch (Gilbert et al., 2006). Bei der chemischen Dezellularisierung wird vor allem Detergenzien verwendet, um DNA-haltiges Material aus dem Gerüst zu entfernen, z.B.

mit Triton-X oder SDS. Dabei gilt es, die bestmögliche Balance zu finden, zwischen maximalem Entfernen von Zellkomponenten und maximalem Erhalt der ECM. Bei der physikalischen Dezellularisierung wird das Gefrieren verwendet. Bei enzymatischen Dezellularisierung werden Enzyme verwendet, um Zellbestandteile zu entfernen. Das übergeordnete Ziel der Dezellularisierung als Methode der Matrix-Gewinnung, ist es, eine 3D-Trägermatrix zu gewinnen, die möglichst wenig Zellbestandteile enthält, bei gleichzeitig optimalem Erhalt von Aufbau und Struktur der ECM.

Beispiele für durch Dezellularisierung gewonnene ECMs von Geweben oder Organen sind Herz (Ott et al., 2008), Lunge (Petersen et al., 2010) (Ott et al., 2010), Leber (Uygun et al., 2010) (Lin et al., 2004) (Sabetkish et al., 2015), Niere (Song et al., 2013) (Allen et al., 2010) (Nakayama et al., 2010) , Darm (Badylak et al., 1989) (Badylak et al., 1995) (Kropp et al., 1995), Harnblase (Atala et al., 2006) (Chen et al., 1999), Pankreas (Goh et al., 2013), Trachea, Ösophagus, Haut (Chen et al., 2004), Knochen, Knorpel und Sehnen (Cartmell and Dunn, 2000), Bänder (Woods and Gratzer, 2005), Nerven, Gefäße (Conklin et al., 2002) (Schmidt and Baier, 2000, Uchimura et al., 2003)(Conklin 2002) Muskel (Borschel et al., 2004), Herzklappen (Cebotari et al., 2010) (Bader et al., 1998) (Booth et al., 2002) (Grauss et al., 2005) (Kasimir et al., 2003) (Korossis et al., 2002) (Rieder et al., 2004) .

Im Bereich des kardialen Tissue engineering wurden die Perfusions-Dezellularisierung ebenfalls immer weiterentwickelt. Dazu wurden die Dezellularisierungs-Protokolle, hinsichtlich der Zusammensetzung der Lösungsbestandteile, die Perfusions-Dauer und die Perfusions-Eigenschaften, wie Druck und Fluss, verbessert und angepasst, in Richtung folgenden Ziels: Best mögliche Entfernung von DNA-haltigem Zellbestandteilen, bei bestmöglichem Erhalt des Aufbaus, der Ultrastruktur und Zusammensetzen der ECM. Dazu gibt eine Reihe an Arbeiten, die verschiedene Dezellularisierungs-Protokolle miteinander vergleichen, auf der Suche nach einem optimal justierten Protokoll.

Ein weiterer Aspekt der Verbesserung der Perfusions-Dezellularisierung ist die Entwicklung einer Standardisierung. Dazu ist es wichtig, die entsprechenden mechanischen Dezellularisierungs-Parameter zu kontrollieren, von denen der Dezellularisierungs-Prozess am stärksten beeinflusst wird. Dies sind der Perfusions-Druck und der Perfusions-Fluss. Um diese Eigenschaften zu beeinflussen bzw. zu kontrollieren und standardisieren, wurde von der Gruppe ein spezielles Verfahren entwickelt, eine vollautomatisierte, Computer-gesteuerte druck- und fluss-kontrollierte Dezellularisierungs-Anlage. Dies ermöglicht eine optimal standardisierte und reproduzierbare Dezellularisierung von Ganz-Herzen.

Während Triton-X eher geeignet ist, die ECM zu erhalten, sind SDS und Trypsin stärker im Entfernen von Bestandteilen. Dies birgt allerdings den Nachteil, dass auch die Ultrastruktur

und Zusammensetzung der ECM weniger erhalten bleiben kann. Ein leichter Vorsprung im Entfernen von Zellmaterial kann zumindest teilweise durch eine erhöhte Perfusion-Dauer ausgeglichen werden.

Der Vorteil der Methode der Dezellularisierung im Vergleich zu anderen Methoden der Matrix-Gewinnung, besteht in einem effektiven Entfernen von Zellmaterial bei gleichzeitigem Erhalt der Matrix.

Durch Dezellularisierung gewonnene Matrix, erhält die natürlichen biologischen Ultrastruktur und Architektur eines Organs. Dies ist sehr vorteilhaft für die Zellmigration, das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung. Ein weiterer Vorteil besteht in der verhältnismäßig leichten standardisierten Reproduzierbarkeit.

Der Vorteil der Perfusion-Dezellularisierung besteht in einer optimalen Entfernung aller DNA-haltigen Strukturen aus der ECM, bei gleichzeitigem Erhalt des Aufbaus und der Ultrastruktur der ECM und des Gefäß-Netztes der ECM. Dies ermöglicht das Erschaffen eines biologisch aktiven Gerüsts. Dies stellt optimale Re-Besiedlung-Bedingungen dar. Deshalb könnte man die Perfusions-Dezellularisierung als „State of the Art“ Methode zur Gewinnung einer biologisch aktiven 3D-Trägermatrix bezeichnen. Daher wurde sich in dieser Arbeit für die Methode der Perfusions-Dezellularisierung entschieden.

Auf Grund der zuvor genannten Vorteilen, wurde in diesem Projekt die Perfusion-Dezellularisierung als Methode der 3D-Trägermatrix-Gewinnung verwendet. Um eine Standardisierung und Sicherheit in der Produktion zu gewährleisten, wurde ein spezielles Verfahren der Perfusion-Dezellularisierung von der Arbeitsgruppe um Prof. Lichtenberg, Prof. Akhyari und PD. Dr. Aubin (Akhyari et al., 2011) verwendet.

#### *Reproduzierbarkeit in unbegrenzter Menge*

Ein zusätzlicher Genereller Vorteil von künstlichen Organen gegenüber Spender Organen ist die Vermeidung von möglichen Transplantationsabstoßungen.

#### *Vergleich biologische und synthetische Matrix*

Ein entscheidender Vorteil einer biologisch gewonnenen ECM im Gegensatz zu einer synthetisch erstellten birgt die Tatsache, dass die ECM in der Lage ist, nicht nur eine statische Struktur für die Zellen zu bilden, sondern mit diesen zu interagieren. (Bowers et al., 2010)

(Lundgren et al., 1985). Des Weiteren agiert sie dynamisch und verändert ihre Struktur im Laufe der Zeit (Martin and Kleinman, 1985). Diese Interaktion von ECM und Zellen wird im Detail von Badylak und Taylor beschrieben (Taylor et al., 2018, Badylak et al., 2011).

Ein weiterer Vorteil ist der Erhalt des sehr komplexen Aufbaus des Herzens, insbesondere der Erhalt folgender Herzbestandteile: Gefäßsystem, Aufbau der muskulären Wände, Pumpfunktion, Elektrische Funktion.

Zudem ist der Fein-Struktureller Aufbau des Herzens entscheidend, hierbei insbesondere folgende Faktoren: Faser-Orientierung, Mikro- und Makroarchitektur, biologische Moleküle die Wachstumsfördern und unterstützend auf Zellen wirken, Zelleinwanderung, Wachstum und Differenzierung, Einfluss der ECM auf Zellen (Taylor, 2019).

#### 4.2.3 Zell-Re-Besiedlung eines dezellularisierten Herzen

Dieses Kapitel „Zell-Re-Besiedlung des dezellularisierten Herzen“ soll einen Überblick über die verwendeten und alternative Re-Besiedlungsmethoden geben, jeweils Beispiele für angewandte Methoden in Form von exemplarischen Arbeiten zur Re-Besiedlung liefern, und deren Vor- und Nachteile diskutieren.

Konkret sollen hier folgende Themen bezüglich der Zell-Re-Besiedlung behandelt werden: Art der Zellen (HUVECs, CMCs), Art der Re-Besiedlung (vaskulär, interstitiell, kombiniert), Reihenfolge der Zell-Re-Besiedlungs-Art (vaskulär-interstitiell, interstitiell-vaskulär), verwendete Zellpopulation (autologe und allogene Zellen, differenzierte Zellen, Stamm- und Vorläuferzellen).

##### *Re-Besiedlung*

Die Re-Besiedlung oder Re-Zellularisierung entspricht dem nächsten Schritt des Ganz-Organ-Tissue-engineerings, wie von Langer (Langer and Vacanti, 1993) beschrieben. Dazu wird das zuvor im ersten Schritt gewonnene Gerüst aus ECM mit Zellen re-besiedelt. Um die aus Proteinen, Zucker und Wachstumsfaktoren bestehende, zellfreie ECM zu re-zellularisieren, müssen die Zellen in Form einer Zellsuspension innerhalb der ECM re-plaziert werden. Dazu gibt es verschiedene Ansätze, die bisweilen unterschiedlich gut erforscht sind (Scarritt et al., 2015). Eine Reihe von Variablen spielen hierbei eine wichtige Rolle. Die folgenden Darlegungen beziehen sich in erster Linie auf das kardiale Tissue engineering.

##### *Art der Zellen (HUVECs, Kardiomyozyten, Fibroblasten)*

Für die Re-Besiedlung einer Trägermatrix scheinen vor allem zwei Faktoren von zentraler Bedeutung zu sein: Die Art der Re-Besiedlung, das heißt z.B. vaskulär oder interstitiell, und die verwendete Zellpopulation, z.B. Endothelzellen, Kardiomyozyten etc.

Die Art der Re-Besiedlung bestimmt vor allem das Lokalisieren der Zellen innerhalb der Trägermatrix. Dabei gibt es die vaskuläre Besiedlung, bei der umliegendes Gewebe durch Gefäße ernährt wird, und die intramurale Besiedlung.

#### 4.2.4 Art der Zell-Re-Besiedlung (vaskulär, interstitiell)

Grundsätzlich gibt es viele mögliche Re-Besiedlungstechniken, die alle das Ziel verfolgen, die jeweiligen Zellarten, an den entsprechende Lokalisation innerhalb der Trägermatrix zu befördern. Die mitunter am häufigsten angewendeten Methoden bestehen sicherlich in der vaskulären und interstitiellen Re-Besiedlungstechnik.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Re-Besiedlungstechniken miteinander kombiniert und simultan angewendet. Dazu wurden 12 Ratten-Herzen jeweils gleichzeitig mit neonatalen Kardiomyozyten und Humanen Endothelzellen mit unterschiedlichen Techniken besiedelt.

##### *Vaskuläre Re-Besiedlung*

Zum einen wurde die Technik der vaskulären Re-Besiedlung via Perfusion der Aorta angewendet. Dazu wird das bereits bei der ECM vorhandene, gut erhaltene Gefäßsystem benutzt, so ähnlich wie schon beim Dezellularisierungs-Vorgang. Dazu wurde eine gewisse Menge Zellsuspension mit den enthaltenen menschlichen, aus der Nabelschnur gewonnen, Endothelzellen verwendet und mittels Spritze über den bestehen peripheren Venenverweilkatheter in die Aorta bzw. das gesamte Gefäßsystem der ECM appliziert. Hierbei sind folgende Faktoren wichtig: Der Druck, der mit der Spritze während der Besiedlung aufgebaut wird, und die Geschwindigkeit, mit der die Zellsuspension gespritzt wird. Um einen standardisierten vaskulären Re-Besiedlungsvorgang zu ermöglichen, wurden beide Parameter während der Besiedlung stets konstant gehalten. Diese tröpfchenweise Perfusion konnte somit gut anhand der am Apex des Ratten-Herzens austretenden Tröpfchen kontrolliert werden. Aufgrund der Zusammensetzung einer jeden dezellularisierten ECM, und der konstanten Re-Besiedlungstechnik, stellt die vaskuläre Re-Besiedlung eine standardisierte Methode dar.

Ein kritischer Punkt bei der vaskulären Re-Besiedlung ist der Moment der Zelladhäsion. Dabei sollten die Zellen genügend Zeit haben, sich intravasal an die ECM anzuheften. Bei einer zu frühen oder starken Re-perfusion könnte die Gefahr bestehen, dass die Zellen ausgewaschen werden können. Dann wären per se deutlich mehr Zellen erforderlich, um dieses Problem ansatzweise zu equalisieren. Ein großer Vorteil der vaskulären Re-Besiedlung besteht im Nutzen des bereits vorhandenen, komplexen, biologischen Gefäßnetzes, ähnlich wie bei der Perfusions-Dezellularisierung.

Mögliche, nicht abschließend geklärte Punkte sind Folgende: Spülen der ECM vor der Re-Besiedlung mit wachstumsförderndem Medium. Geschwindigkeit der Perfusions-Besiedlung.

Druck und Fluss der Perfusions-Besiedlung. Hierbei scheint ein eher langsames Vorgehen überlegen.

### *Interstitielle Re-Besiedlung*

Zum anderen wurde in diesem Projekt die Technik der interstitiellen Re-Besiedlung via intramurale Injektion angewendet. Dabei wird die Zellsuspension, der zuvor gewonnenen und kultivierten neonatalen Kardiomyozyten mittels einer 1ml-Spritze in das Myokard injiziert. Auf hier wird sehr langsam vorgegangen. Anhand der aufgrund des Zellmediums rot gefärbten Zellsuspension kann die Ausbreitung der Zellen sehr gut makroskopisch verfolgt werden. Wie bei der vaskulären Re-Besiedlung spielen auch hier die beiden Faktoren Druck und Geschwindigkeit eine Rolle. Der Druck bzw. die Geschwindigkeit, die innerhalb der Spritze während der Re-Besiedlung erreicht wird. Eine zusätzliche wesentliche Rolle spielt die Lokalisation innerhalb der Trägermatrix. Um ein einigermaßen standardisiertes Vorgehen zu ermöglichen, wurden 4 Bereiche innerhalb des Herzens gewählt: Linker Ventrikel, Rechter Ventrikel, Septum und Apex. Diese wurden später unabhängig voneinander ausgewertet. Trotz dieser Einteilung besteht eine Herausforderung in der exakten Platzierung der Injektionen.

Ein möglicher Nachteil dieser Re-Besiedlungsmethode könnte die Verletzung der Integrität der ECM durch die Nadel während der Injektion darstellen. Entlang des Stichkanals wird die ECM zumindest in kleinerem Ausmaß beschädigt. Angesichts der Dünne der Injektionsnadel und der guten Regenerationsfähigkeit der kardialen ECM, speziell eines muskulären Gewebes, und damit auch einer muskulär geprägten ECM, erscheint dieser Effekt eher minimal.

Ein Vorteil der interstitiellen Re-Besiedlung mittels Injektion ist die exakte manuelle Platzierungsmöglichkeit. Dies stellt jedoch gleichzeitig einen Nachteil dar, da durch die manuelle Platzierung trotz Bemühungen die Standardisierung deutlich erschwert ist. Auch wenn bestimmte Bereiche für Injektionen definiert werden, so ist die Zellverteilung dennoch individuell pro Injektion. Aber auch wenn es scheint, als sei dies eher eine mehr oder weniger rein zufällige Flickenteppich Verteilung, so kann dieses Problem mit Erhöhung der Injektionszahl reduziert werden. Dafür wird allerdings eine erhöhte Zellzahl benötigt, was eine grundsätzliche Hürde im Tissue engineering darstellt.

### *Kombinierte vaskuläre und interstitielle Co-Re-Besiedlung*

Die Kombination aus sowohl vaskulärer und interstitieller Re-Besiedlung ein weiterer Schritt in Richtung einer vollständigen Re-Zellularisierung. Dabei werden beide Einzel-Besiedlungs-Arten, vaskuläre Re-Besiedlung mittels Perfusion durch das bestehende natürliche Gefäßnetz, und interstitielle Re-Besiedlung mittels Injektion in das Parenchym, kombiniert. Entscheidende Parameter hierbei scheint vor allem die Reihenfolge der Einzel-Besiedlungen zu sein.

Dabei werden die Vorteile der Einzel-Besiedlungs-Arten genutzt, sowie Vorteile der Wechselwirkungen der Einzel-Besiedlungen untereinander. Dazu zählen vor allem, die positive Beeinflussung von Endothelzellen gegenüber Parenchym-Zellen, wie z.B. Kardiomyozyten. Dabei spielen folgende Annahmen eine Rolle:

In diesem Projekt wurden in Testläufen sowohl die Einzel-Besiedlungen, vaskulär und interstitielle, als auch in den Hauptreihen die kombinierte vaskuläre und interstitielle Re-Besiedlung genutzt. Dabei wurde die kombinierte Re-Besiedlung simultan durchgeführt. Dazu wurde das Herz in einer Kombi-Besiedlung zuerst interstitiell und direkt danach vaskulär besiedelt.

### *Reihenfolge der Re-Besiedlung während der Co-Re-Besiedlung*

Vor der Re-Besiedlung wird das Herz mit PBS gespült und bleibt ECM-farben, das heißt weißgelblich. Wenn nun die interstitielle Re-Besiedlung angewendet wird, kann die Ausbreitung der roten Zellsuspension nachvollzogen werden. Wenn die vaskuläre Re-Besiedlung mittels Perfusion zuerst angewendet wird, färbt sich das Herz bereits in der Zellsuspensionsfarbe der Endothelzellen, das heißt pink. Danach ist die Ausbreitung der Zellsuspension der interstitiellen Re-Besiedlung nicht mehr so gut nachvollziehbar. Der Grund für diese Reihenfolge lag in der Annahme, dass die Injektions-Besiedlung deutlich einfacher und standardisierter besser durchzuführen und zu kontrollieren ist, wenn die Ausbreitung des roten Zellmediums während der Injektion nachvollziehbar ist. Diese Annahme hat sich während der Versuche bestätigt. Ob die umgekehrte Reihenfolge während einer Simultan-Besiedlung andere Vorteile mit sich bringt, ist nicht geklärt. Allerdings sind weder Vor- noch Nachteile durch eine veränderte Reihenfolge, während der Simultan-Besiedlung zu erwarten, da sie unmittelbar im gleichen Zeitfenster stattfindet. Hingegen von großer Bedeutung scheint die Reihenfolge zu sein, bei einer Nicht-simultanen Re-Besiedlung, also einer konsekutiven Re-Besiedlung zu sein. Dies ist mit den zuvor genannten Vorteilen der positiven Beeinflussung von Endothelzellen gegenüber Parenchymzellen zu begründen.

#### 4.2.5 Art der verwendeten Zellpopulation

Für die komplette Re-Besiedlung eines Herzens werden die unterschiedlichsten Zellarten benötigt. Zellen und ECM interagieren miteinander und haben eine enge Beziehung. Daher ist die Auswahl der Zellpopulation kritisch. Die verwendeten Zellen sollten eine Reihe von Anforderungen erfüllen. Zum einen sollten sie in der Lage sein, die funktionellen Anforderungen des Organs zu erfüllen, also alle benötigten Gewebestrukturen abbilden. Zum anderen sollten sie gut verfügbar und reproduzierbar sein.

Um diesen Ansprüchen zu begegnen, kommt die grundsätzliche Fragestellung der Entwicklungsstufe der verwendeten Zellen auf. Dabei kommen grundsätzlich ausdifferenzierte Zellen oder Stamm- und Vorläuferzellen in Frage. Die Antwort darauf scheint in Abhängigkeit bestimmter Faktoren zu stehen. Ein wesentlicher Faktor ist der Typ des Organs und die benötigte Zellzahl (Morrissey et al., 2022).

Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, eignen sich am ehesten Stamm oder Vorläuferzellen. Für einzelne spezielle Indikationen können auch ausdifferenzierte Zellen sinnvoll sein. Diese werden dann gewonnen und in vitro vermehrt.

##### *Autologe und allogene Zellen*

Eine weitere grundsätzliche Frage besteht darin, ob autologe oder allogene Zellen verwendet werden.

Autologe Zellen kommen vom gleichen Organismus, dem sie zugeführt werden. Der Vorteil von autologen Zellen liegt in der geringeren Immunogenität darin, dass sie weniger wahrscheinlich eine immunologische Abstoßungsreaktion des empfangenen Organismus verursachen. Zudem reduziert sich das Risiko für toxische Reaktionen und Entartung. Außerdem wird die Gefahr für übertragbare Infektionskrankheiten quasi beseitigt. Deshalb liegen die regulatorischen Anforderungen verhältnismäßig gering.

Der Nachteil von autologen Zellen liegt in der schwierigen Gewinnung und Vermehrung. Gerade Organe wie Herz, Lunge, Leber, Pankreas liefern zu wenig gewinnbare Zellen.

Allogene Zellen kommen von einem anderen Organismus und sind dadurch weitaus größer verfügbar. Zellgewinnung und Zellvermehrung sind deutlich leichter. Dadurch sind sie in deutlich größerer Zahl verfügbar und leichter aufzubewahren. Zudem können sie gesünderen und jüngeren Spendern entstammen

All die oben aufgezählten Faktoren spielen eine wichtige Rolle bei der Auswahl der Zellpopulation. Sie ist jedoch sehr stark abhängig von

Sowohl autologe als auch allogene Zellen unterliegen einer starken Kontrolle durch Aufsichtsbehörden, was die Gewinnung, Verwendung und Forschung von und mit den Zellen hinsichtlich bürokratischer Hürden anspruchsvoller macht.

### *Differenzierte Zellen*

Die ausdifferenzierten Zellen sind die Zellen, die bei vollständiger Funktionsfähigkeit des Organs bestehenden Zellen. Hierzu zählen im kardialen Tissue engineering eine große Bandbreite an Zellen, vor allem Endothelzellen, Kardiomyozyten, Fibroblasten, im Detail, Endokardzellen, Epikardzellen, Herzklappenzellen, Herzschrittmacherzellen, Lymphatische Zellen, etc. All diese Zellarten in ihrer unterschiedlichen Differenziertheit zu gewinnen und zu re-besiedeln ist sehr schwierig. Eine zusätzliche Hürde, ist die hohe benötigte Zellzahl, die durch rein-enddifferenzierte Zellen quasi kaum erreicht. Der Grund hierfür liegt vor allem in der anspruchsvollen Gewinnung von ausdifferenzierten Zellen, grade hinsichtlich des Organs Herz.

### *Stammzellen und Vorläuferzellen*

Das Gebiet der Stammzellforschung ist auch im Bereich der regenerativen Medizin ein großer Hoffnungsträger. In den letzten 15 Jahren gab es in der Stammzellforschung rasante Entwicklung. Insbesondere die Entdeckung der iPSC und die Entwicklungsmöglichkeit dieser Stammzellen zu allen möglichen Gewebetypen stellt einen Meilenstein dar (Guyette et al., 2016).

Grundsätzlich gibt es verschiedene Arten von Stammzellen, embryonale Stammzellen, adulte Stammzellen und Vorläuferzellen. Die embryonalen Stammzellen sind alle gleich und in der Lage sich zu jedem beliebigen Gewebe zu differenzieren, z.B. in alle drei Keimblätter, Endoderm, Mesoderm, Ektoderm. Danach können sie in jedem Organsystem die entsprechende Zell Art darstellen, zum Beispiel Herz, oder Lungengewebe. Sie haben eine sehr hohe Teilungsrate, allerdings auch ein eher hohes Entartungsrisiko.

### *Adulte Stammzellen und Vorläuferzellen*

Adulte Stammzellen und Vorläuferzellen haben ebenfalls die Eigenschaft, eines schnellen Wachstums, sind jedoch bereits auf ihr Zielorgansystem festgelegt. Sie können allerdings immer noch zurück differenzieren. Zudem weisen sie ein deutlich geringeres Entartungsrisiko auf.

Grade bei einer möglichen Transplantation zum Empfänger, spielt das Entartungsrisiko eine wesentliche Rolle. Aufgrund dieser vorteilhaften Eigenschaft werden zur Transplantation bevorzugt Vorläuferzellen verwendet.

### *Embryonale Stammzellen*

Wie bereits beschrieben, stellen die embryonalen den Ursprung des zellulären Gewebes dar, und haben die besondere Eigenschaft, sich in jede beliebige Zelllinie und damit in jedes beliebige Gewebe und schlussendlich in jedes beliebige Organ differenzieren zu können. Dabei weisen sie eine extreme Zellteilungsrate auf und werden dabei stark von ihrer Umwelt bzw. ihrem umgebenden Gewebe, insbesondere der ECM beeinflusst. Sie bergen allerdings auch ein hohes Entartungsrisiko und ihre Differenzierung ist nicht leicht zu kontrollieren.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Verfügbarkeit und Gewinnung von embryonalen Stammzellen, die gesetzlich sehr stark reguliert ist.

Die Gewinnung von embryonalen Stammzellen ist ein ethisch, politisch, kulturelles, religiöses, gesetzlich und gesellschaftlich sehr umstrittenes Thema. Kern der Diskussion ist nicht nur die Weiterverwendung von Stammzellen, sondern vor allem deren Gewinnung. Dabei spielt die Definition von Leben die entscheidende Rolle. Der deutsche Gesetzgeber, sowie die deutsche Bischofskonferenz, definieren Leben ab der befruchteten Eizelle. Damit gilt auch der Artikel 1 des deutschen Grundgesetzes, die Würde des Menschen ist unantastbar. Eine manipulierte Weiterverwendung, ein Klonen oder Zerstören ab diesem Zeitpunkt sind somit verboten, zumindest für in Deutschland gewonnene Zellen. Für importierte Zellen gibt es bis 2007 eine Ausnahmeregelung International gibt es durchaus Länder wie die USA und England, in denen die Forschung an embryonalen Stammzellen nicht nur erlaubt ist, sondern sogar gefördert wird. Nichtsdestotrotz gibt es zum Beispiel auch in den USA aktive Diskussionen über mögliche Einschränkungen. Unter Präsident Bush waren diese zunächst noch aktiv, wurden von Präsident Obama jedoch wieder aufgehoben.

#### 4.2.6 Zell-Re-Besiedlung einer zuvor dezellularisierten Ganz-Organ-ECM

##### *Re-Besiedlungen einer Ganz-Organ-ECM*

Beispiele für Arbeiten, in denen eine zuvor dezellularisierten ECM mit Zellen re-besiedelt und re-kultiviert wurde, gibt es eine Reihe. Diese umfassen folgende Organe: Herz, (Ott et al., 2008), Lunge (Petersen et al., 2010) (Gilpin et al., 2014), (Ohata and Ott, 2020), Leber (Uygun et al., 2011), Niere (Song et al., 2013), (Nakayama et al., 2010) (Ross et al., 2009), Nebenniere (Allen et al., 2010), Darm (Badylak 1989) (Badylak 1995) (Badylak 1995), Harnblase (Atala 2006) (Atala 1999), Trachea, Ösophagus, Haut, Muskel, Knochen, Knorpel, Bänder (Woods 2005), Sehnen (Cartmell 2000). Einige der wichtigen Arbeiten sind im Folgenden nach Organ aufgeführt.

In der Arbeit von Ott von der Gruppe um Vacanti wurden Ratten-Lungen mittels Perfusions-Dezellularisierung mittels dem Detergens SDS dezellularisiert und anschließend mit Endothelzellen HUVECs und fetalen Ratten-zellen re-besiedelt. (Song et al., 2011)(Ott 2011). Nach 9 Tagen zeigten die re-besiedelten Ratten-Lungen Gasaustausch, der mit der nativer Ratten-Lungen in vivo vergleichbar war. Nach orthotopischer Re-Implantation in Ratten wurden die bioartifiziellen Lungen regelrecht vom Blutkreislauf der Ratten versorgt und zeigten zumindest für 6 Stunden Gasaustausch.

Zu Dezellularisierungs-Experimenten wurden auch vergleichende Studien durchgeführt, die die Methode der Perfusions-Dezellularisierung als sehr geeignet bestätigten.

Um auch im Bereich der Lunge von Ratten-Größe auf Menschen-Größe der Organe hoch zu skalieren wurden Experimente mit dezellularisierten Schweine-Lungen durchgeführt. Auch hier besteht eine wesentliche Limitation in der hohen Anzahl benötigter Zellen, der man mit Verwendung von Stammzellen begegnen könnte.

##### *Re-Besiedlungen einer kardialer Ganz-Organ ECM*

Im kardialen Tissue engineering nimmt hier die schon beschriebene Arbeit von Ott von der Gruppe um Taylor 2008 eine herausragende Stellung und Bedeutung ein. (Ott et al., 2008). Sie stellt eine Präzedenz dar, für ein erstmalig komplett perfusions-dezellularisiertes Herz, mit anschließender Re-Besiedlung und Re-Kultivierung, die nach mehreren Tagen zu einer kardialen Teil-Funktionalität in Form von gemessener Ejektionsfraktion führte.

Dabei wurden dezellularisierte Ratten-Herzen mit Endothelzellen (HUVECs) via Perfusion und später neonatale Ratten-Kardiomyozyten via Injektion, und Fibroblasten glatte Muskelzellen zur Re-Besiedlung verwendet. Die Perfusion fand retrograd über die Aorta statt, die Injektion

mittels 27 Gauge Nadel, an 5 Stellen in der Wand des linken Ventrikels. Die Gesamt-Anzahl der Zellen betrug bis zu 75 Millionen. Während die Perfusion-Re-Besiedlung mit HUVECs zuerst stattfand, folgte während der Re-Perfusion die Re-Besiedlung mittels Des weiteren wurden Ratten-Aorta-Endothelzellen mittels Perfusion in die Aorta re-besiedelt. Die Anzahl hierbei betrug insgesamt 20 Millionen. Im Anschluss wurde das Herz für 45 min nicht perfundiert und danach wieder für 7 Tage perfundiert. Nach Tag 7 wurde eine relativ gute Zelldichte für die Oberfläche des Endokards festgestellt mit zunehmendem Abfall in Richtung vaskuläres Netz.

### *Hochskalieren*

In der Arbeit von Weymann et al. wurden Schweine-Herzen mittels Perfusions-Dezellularisierung dezellularisiert und mit Endothelzellen (HUVECs) und neonatalen Ratten-Kardiomyozyten re-besiedelt und re-kultiviert (Weymann et al., 2014). Die Re-Besiedlung mit Endothelzellen erfolgte mittels retrograder Perfusion der Aorta und mit Ratten-Kardiomyozyten mittels 5 Injektionsstellen in die Wand des linken Ventrikels- Die Anzahl der HUVECs betrug bis zu 6 Millionen, die der Ratten-Kardiomyozyten bis zu 9 Millionen. Insgesamt wurden die Konstrukte bis zu 3 Wochen perfundiert. Nach 10 Tagen waren die Regionen um die Injektionsstellen mit bis zu über 50 % immer noch besiedelt. Diese Arbeit zeigte, dass ein Hochskalieren auf annähernd humane Größe des Organs prinzipiell möglich ist, mit den bisher als Standard betrachteten Methoden.

### *Verschiedene Zellarten zur Re-Besiedlung einer kardialen ECM*

Die Arbeit von Lu von der Gruppe um Yang verwendete dezellularisierte Mäuse Herzen, um sie mit Stammzellen zu re-besiedeln und zu re-kultivieren (Lu et al., 2013). Die Re-Besiedlung erfolgte mittels retrograder Perfusions-Re-Besiedlung der Aorta mit ca. 10 Millionen Stammzelle bzw. kardiale Vorläuferzellen. Diese entwickelten sich dann in vitro zu Endothelzellen, differenzierten Kardiomyozyten und glatten Muskelzellen. Zudem wurden dezellularisierte Mäuse Herzen auch mit humanen ES Zellen re-besiedelt. Nach 20 Tagen konnte leichte Kontraktionen sowie leichte Muskelkraft und ein Ansprechen auf Medikamentengabe festgestellt werden.

Zusätzlich konnte diese Arbeit zeigen, wie die Differenzierung von iPCs in vitro durch exogene Wachstumsfaktoren erfolgt bzw. teilweise gesteuert werden kann. Dabei entstanden embryonischen Körpern zu einem gewissen Anteil Endothelzellen, differenzierte Kardiomyozyten und glatte Muskelzellen, in Abhängigkeit von der Menge bestimmter exogenen Wachstumsfaktoren, wie z.B. VEGF, DKK1 oder bFGF. Überwiegt der Anteil von

VEGF entstanden mehr Endothelzellen, überwiegt der Anteil von Kardiomyozyten. Diese Steuerbarkeit des Wachstums- und Differenzierungsprozesses bietet große Möglichkeiten hinsichtlich des Ziels des Erreichens einer hohen Zellzahl und des Ziels des Erreichens einer ausgeglichenen und Original getreuen Zusammensetzung der Zellarten.

Eine weitere Arbeit ist die Arbeit von Ng et al. bei der dezellularisierte Mäuse Herzen mit Stamm- und Progenitorzellen re-besiedelt wurden (Ng et al., 2011). Dabei wurden ca. 3 Millionen humane Stammzellen (hESCs) und (hMECs) verwendet. Diese wurden ausschließlich mit der Injektions-Besiedlungstechnik mittels Kanüle besiedelt. Im Fokus stand hierbei die Zelldifferenzierungs-Fähigkeit von Stamm- und Vorläuferzellen innerhalb einer ECM. Dabei war es möglich, die Differenzierung in eine kardiale Zelllinie zu erreichen, sowie die spezifische Produktion kardialer Marker, allerdings nur in begrenztem Umfang und ohne Kontraktilität. Da dies aber auch nicht der primäre Endpunkt des Versuchs war, zeigte diese Arbeit durchaus die Differenzierungsfähigkeit von frühen Stammzellen innerhalb eines ECM-Konstrukts unter statischen Kulturbedingungen. Aufgrund der limitierten Ergebnisse in statischer Kultur, wurden zudem einige der Konstrukte in Mäuse re-implantiert, die anschließend verbesserte Ergebnisse zeigten.

In der Arbeit von Robertson et al. von der Gruppe um Taylor Wurden dezellularisierte Ratten-Herzen mit Endothelzellen aus der Ratten-Aorta re-besiedelt. (Robertson et al., 2014). Die Gesamt-Zellzahl betrug dabei ca. 120 Millionen. Die Re-Besiedlung erfolgte mittels Perfusions-Besiedlung, wobei für die Infusion die Vena cava inferior (IVC) und die Arteria brachiocephalica (BA) Infusion genutzt wurden, jeweils einzeln und in Kombination. Die Kulturmethode war eine dauerhafte Perfusion über 7 Tage mit steigender Flussrate. Beide Zugangswege zeigten einzeln und in Kombination eine erfolgreiche Re-Besiedlung Alle Bereiche des Herzens wurden gut mit Endothelzellen erreicht. Zudem wurden die Herzen anschließend zusätzlich mit neonatalen Kardiomyozyten re-besiedelt, um die Perfusions-Gruppen hinsichtlich des Kardiomyozyten Wachstums zu vergleichen. Damit wurden die besten Ergebnisse durch die Kombinations-Perfusion von IVC und BA erzielt, während die beiden Einzel-Gruppen auch gut abschnitten. Dies war die erste Studie, bei der eine kombinierte Arterio-Venöse Perfusions-Methode zur Re-Besiedlung angewendet wurde. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine vorherige Pre-Endothelialisierung das Ergebnis einer Kardiomyozyten Re-Besiedlung verbessert hinsichtlich der Kontraktilität.

Um den Anforderungen eines Whole-Heart Tissue Ansatzes gerecht zu werden, werden alle Zellen eines Herzens benötigt. Dies sind vor allem Endothelzellen, Herzmuskelzellen und Herzklappenzellen.

Da die Gewinnung der zuvor genannten Herzzellen extrem schwierig ist, ist es nahezu unmöglich all diese Zellen in differenzierter Form zu verwenden. Eine sehr gute Alternative stellen Stamm- und Vorläuferzellen dar, die dann entweder in-vitro oder in vivo zu den gewünschten ausdifferenzierten Zellen heranwachsen. Bei der Auswahl von Stamm- und Progenitorzellen gibt es grundsätzlich einige Aspekte zu beachten.

Bei diesem Projekt wurden Vorläuferzellen verwendet. Für die endotheliale Re-Besiedlung wurden Human Endothelial Vein Cells verwendet, also menschliche Endothelzellen aus der Nabelschnur Vene, die frisch während der Geburt gewonnen werden. Für die interstitielle Re-Besiedlung wurden neonatale Kardiomyozyten von Ratten verwendet. Diese beiden Vorläuferzellarten bringen die klassischen oben genannten Vorteile einer Vorläuferzelle mit. Sie sind zwar bereits auf ein Zielgewebe festgelegt, zu dem sie sich differenzieren, zeigen jedoch ein immer noch verhältnismäßig hohes Wachstum. Zudem ist die Entartungswahrscheinlichkeit sehr gering. Herausforderungen bestehen in der Gewinnung und Vermehrung vor allem der neonatalen Kardiomyozyten. Hinsichtlich Aufbaus und Funktion kommen die verwendeten Zelltypen denen einer physiologischen Herzentwicklung sehr nahe.

#### *Hohe Anzahl an benötigten Zellen*

Ein weiterer wichtiger Faktor für eine erfolgreiche Re-Besiedlung einer dECM ist die Zellzahl beziehungsweise die entsprechende Zellkonzentration innerhalb der Zellsuspension, die für eine Re-Besiedlung verwendet wird. Diese hängt natürlicherweise in erster Linie sehr stark vom zu re-besiedelnden Organtyp ab. Im Bereich des kardialen Tissue engineering: Die rein medizinisch kausale Annahme orientiert sich wie aus den übrigen Tissue engineering Bereichen auch, an der Zellzahl und Zellkonzentration eines natürlichen Herzens in der zu re-besiedelnden Größe der verwendeten Spezies. Im Falle der Ratte entspräche dies der Zellzahl eines ausgewachsenen Ratten-Herzens. In den meisten Re-Besiedlungs-Experimenten im kardialen Tissue engineering liegen die Zellzahlen maximal im Millionenbereich, während Zellzahlen im Billionenbereich benötigt werden. Obwohl bei allen bekannten Versuchen und Experimenten im Bereich des kardialen Ganz-Organ-Tissue engineering angestrebt wird, eine möglichst hohe Zellzahl zu erreichen, reicht diese trotz der Bemühungen nicht aus. Daher scheint die größte Hürde in erster Linie einfach die fehlende Quantität bzw. Masse von Zellen zu sein. Gründe hierfür liegen vor allem in der Verfügbarkeit der benötigten Zellen und dem hohen Aufwand der Vermehrung beziehungsweise Produktion solch hoher Zellzahlen.

### *Zellverlust während der Re-Besiedlung*

Auch während des Re-Besiedlungs-Prozesses können Zellen verloren gehen bzw. zerstört werden, und erst gar nicht an den entsprechenden Platz der dECM befördert werden. Dieser Re-Besiedlungs-Technik abhängige Effekt ist nicht zu unterschätzen, jedoch allenfalls ein zusätzlicher Effekt. Bei optimierten Re-Besiedlungs-Techniken ließen sich somit natürlich Zellen einsparen bzw. die zu Beginn erforderliche Höhe der Zellzahl senken. Dies würde allerdings weiterhin keine Lösung für das grundsätzliche Problem der hohen benötigten Zellzahl im Organ-Tissue-engineering darstellen. Erst bei Erreichen der organ-spezifisch benötigten Zellzahl und nach Überwinden dieser Hürde, könnten andere Faktoren, wie die exakte Zusammensetzung bzw. das exakte Zellverhältnis der verschiedenen Zelltypen untereinander eine wichtigere Rolle spielen.

### *Zelldichte und Verteilung innerhalb der ECM*

Ein weiterer Faktor ist die Zelldichte. Abhängig von der Re-Besiedlungs-Technik ist sie unterschiedlich stark. Bei der vaskulären Besiedlung ist sie innerhalb der Gefäße am höchsten, aber auch nicht gleich verteilt. Da die Zellen die Gefäßwände auch durchdringen, finden sie sich auch im Parenchym. Allerdings nimmt auch hier die Zelldichte mit zunehmender Entfernung vom Gefäßnetz ab. Bei der interstitiellen Re-Besiedlung ist dieser Effekt ebenfalls erkennbar, sogar noch stärker. Hier ist die Zelldichte an der punktierten Stelle am höchsten und nimmt sehr stark mit steigender Entfernung ab. Dies schränkt die mögliche Ausbreitungsfähigkeit der Zellen innerhalb der ECM nach der Re-Besiedlung stark ein. Deshalb ist das Erreichen einer gleichmäßig guten und gleich verteilten Zelldichte eine weitere große Hürde. Diese hängt allerdings nur mittelbar mit der reinen Zellzahl zusammen, als viel mehr mit der Transport-Technik der Zellen in die dECM, ergo Re-Besiedlungstechnik.

#### 4.2.7 Zell-Re-Kultivierung und Zellwachstum eines re-besiedelten Herzen

Das Zellwachstum, insbesondere die Zellmigration, Zelldifferenzierung, Zellwachstum und die Zellreifung entsprechen dem dritten Schritt von Langers beschriebenen Bereichen des Tissue Engineering (Langer and Vacanti, 1993). Das Hauptziel hierbei ist es, das re-zellularisierte Konstrukt so zu entwickeln, dass es einem nativen humanen Organ möglichst ähnlich ist. Dabei wird besonderer Fokus auf die Entwicklung der verwendeten Zellen gelegt. Im Bereich des kardialen Tissue engineering stehen vor allem der Aufbau und die Struktur der ECM, inklusive eines intakten vaskulären Systems, die Zellmigration, Zelldifferenzierung und Zellreifung, und die funktionellen Eigenschaften, wie elektrische Aktivität und Biomechanik im Vordergrund. Um diese Ziele zu erreichen, spielen eine große Anzahl von Faktoren im Rahmen der Herzentwicklung eine Rolle. Diese Faktoren hängen natürlich auch von den ersten beiden Bereichen des Tissue engineerings ab, einer geeigneten ECM und einer geeigneten Re-Zellularisierung, aber auch von der Zellentwicklung und Zellreifung und entsprechenden Umgebungsbedingungen und Wachstumsfaktoren.

Um diese Ziele der Zellentwicklung und des Zellwachstums erreichen zu können, ist ein Kultivierungs-System notwendig, welches die biomechanischen, thermischen Umgebungs- und Wachstumsbedingungen eines Embryos bzw. Fetus optimal mimt. Wichtige Umgebungs- und Wachstumsbedingungen sind physikalische, chemische und biologische Bedingungen, wie etwa biomechanische, thermische, enzymatische, Zell-spezifische Faktoren. Hierfür wurden spezielle Kultivierungs-Systeme, wie etwa entwickelt. Diese sind in der Lage für das re-besiedelte Organ möglichst vorteilhafte und nativ-ähnliche Bedingungen zu schaffen. Hinsichtlich des Aufbaus haben alle diese Systeme grundsätzlich gemeinsam, dass sie sich in einem Inkubator oder Inkubator-ähnlichem Gerät befinden, um so optimale thermische und sterile Bedingungen garantieren zu können. Meistens wird die Nähr- und Sauerstoffversorgung ebenfalls mittels Perfusion umgesetzt.

##### *Nährmedium via Perfusion*

Die Wahl des Nährmediums hängt im Wesentlichen von der verwendeten Zellpopulation ab. Dabei ist ein Nährmedium zu wählen, welches den Anforderungen möglichst vieler oder idealerweise aller verwendeten Zelltypen entspricht.

### *Nährstoff- und Sauerstoffversorgung via Perfusion nicht nur Diffusion*

Ähnlich wie bei der Art der Re-Besiedlungstechnik spielt bei den Wachstumsbedingungen auch die Perfusion eine entscheidende Rolle. Während ein einfacher Mediumwechsel von außen oder per Injektion nur das Prinzip der Diffusion zur Versorgung nutzt, erlaubt die Methode der Perfusion, intermittierend oder dauerhaft, eine vaskuläre Versorgung. Bei Nutzung der biologisch gewonnenen ECM bleibt das vaskuläre Netz im Wesentlichen erhalten und stellt so die ideale Versorgungsstruktur dar.

Bei der Nährstoff- und Sauerstoffversorgung des re-besiedelten ECM-Konstrukts spielen eine Reihe von Variablen eine wichtige Rolle, vor allem mechanisch technische Faktoren, wie Perfusionsdruck und Perfusionsfluss, ähnlich wie bei der

### *Kultivierungsarten*

#### *Statische Kultivierung*

Die statische Kultivierung ist definiert als Kultivierung mit Nähr- und Sauerstoffversorgung mittels Mediumwechsel der Umgebungssuspension. Bei der klassischen statischen Kultivierung findet zur Nähr- und Sauerstoffversorgung nur ein regelmäßiger Mediumwechsel der Umgebungssuspension statt, ohne Beeinflussung des re-besiedelten Konstrukts. Mögliche Vorteile dieser Kultivierungsart könnte darin liegen, dass der Prozess der Zelladhäsion innerhalb der ECM, vor allem in den ersten Stunden nach Re-besiedlung, aber auch längerfristig, möglichst unbeeinflusst bleibt. Gleichzeitig birgt es den möglichen Nachteil dass das versorgende Medium von außen via Diffusion nicht optimal in tiefere Bereiche des ECM-Konstrukts vordringen kann.

#### *Perfusions-Kultivierung*

Bei der Perfusions-Kultivierung wird das Konstrukt mittels Perfusion über ein zuführendes Hauptgefäß perfundiert. Dies kann grundsätzlich regelmäßig intermittierend oder permanent erfolgen. Im Gegensatz zur statischen Kultivierung besteht ein wesentlicher Vorteil der Perfusions-Kultivierung in der besseren räumlichen Erreichbarkeit der Zellen innerhalb des 3D-ECM-Gerüsts mittels Perfusion und Diffusion. Des Weiteren könnten Vorteile der Perfusions-Kultivierung in der positiven Beeinflussung der Zelladhäsion durch mechanische Dehnungskräfte liegen. Dies könnte zugleich jedoch auch einen gewissen Nachteil in Form

eines Zellverlustes darstellen, da durch diese Dehnungskräfte die Zelladhäsion behindert oder aufgehoben werden könnte, und damit Zellen herausgespült werden könnten. Insgesamt, in Zusammenschau dieser genannten Vor- und Nachteile, scheinen jedoch die positiven Beeinflussungen hinsichtlich der Zellentwicklung zu überwiegen.

In dieser Arbeit wurden sowohl die statische Kultivierung als auch die Perfusions-Kultivierung zur Nähr- und Sauerstoffversorgung der re-zellularisierten ECM-Konstrukte verwendet, unter Berücksichtigung der zuvor genannten Vor- und Nachteile dieser Kultivierungsarten. Dabei stand im Vordergrund, welche der beiden Kultivierungsarten grundsätzlich besser geeignet sein könnte, um eine gute Zellentwicklung und Zellwachstum zu fördern.

#### *Intermittierende Perfusions-Kultivierung*

Bei der intermittierenden Perfusions-Kultivierung wird die statische mit einer zeitweisen Perfusion kombiniert. Dabei wird das Herz zu bestimmten Zeitpunkten intermittierend manuell mittels Kanüle perfundiert. Hier besteht ein möglicher Vorteil in der Kombination der positiven Effekte von statischer und zeitweiser Perfusion, vor allem hinsichtlich der Zelladhäsion. Dabei soll vermieden werden, dass die Zellen durch eine dauerhafte Perfusion ausgewaschen werden, und trotzdem die Vorteile der mechanischen Dehnung der Perfusion in Bezug auf die Zelladhäsion genutzt werden.

#### *Abwechselnde statische und dauerhafte Perfusion*

Eine weitere Subkategorie der Perfusions-Kultivierung ist die Perfusions-Kultivierung. Hierbei wird in regelmäßigen Intervallen dauerhaft perfundiert, so dass sich Zeitbereiche der statischen Kultivierung und Zeitbereiche der dauerhaften Kultivierung abwechseln. Ein möglicher Vorteil bei dieser Kultivierungsart könnte die Kombination der positiven Effekte der statischen Kultivierung und der permanenten Kultivierung sein. Die möglichen Vorteile besseren Zelladhäsion durch Nicht-Perfusion während der statischen Kultivierung, könnten so um die möglichen Vorteile der dauerhaften Perfusion, wie etwa eine positive mechanische Beeinflussung durch Dehnungskräfte ergänzt werden. Dies gilt jedoch nur zeitbegrenzt und ebenso vice-versa für die möglichen Nachteile. Ein weiterer Vorteil liegen in der Ersparnis von Perfusionsmedium im Gegensatz zur dauerhaften Perfusion, sowie ein geringeres Kontaminationsrisiko.

### *Biomechanische Beeinflussung*

Bei einer Imitation der echten in vivo biomechanischen Beeinflussung spielen vor allem das Perfusionsvolumen und der Perfusionsdruck eine entscheidende Rolle. Diese Parameter sollten in etwa den eines realen Herzens entsprechen. Zusätzliche Imitationen stellen auch physikalisch mechanische Beeinflussungsfaktoren, wie etwa eine Dehnung, dar (Akhyari et al., 2002).

### *Biomechanik*

Die kardiale Biomechanik ist extrem komplex und das Erreichen einer biomechanischen Herzfunktion eine der größten Herausforderungen des kardialen Ganz-Organ-Tissue-engineering. Für eine gute Biomechanik ist der Aufbau und die Ultrastruktur der ECM entscheidend. Die Zusammensetzung der ECM beeinflussen wichtige biomechanische Eigenschaften, wie etwa Festigkeit und Dehnbarkeit des Konstrukts. Außer der Zusammensetzung der ECM spielt der drei-dimensionale Aufbau eine entscheidende Rolle.

#### 4.2.8 Auswertung

##### *Statistik*

Die größte Limitation einer experimentellen Arbeit mit Tierversuchen und aufwendiger Vorbereitungs- und Durchführungsmethodik liegt häufig in der geringen Stichprobenzahl bzw. n-Zahl. Dies ist durch den hohen methodischen Aufwand, inklusive Supply Chain (Spender-Tiere, Zellgewinnung), Vorbereitungsmethoden, Dezellularisierungs-Prozess ca. 1 Woche, Zellkultur ca. 2-4 Wochen, Re-Besiedlung und Re-Kultivierung ca. 1 Woche, hohe Anforderungen an Sterilität, und hohen Aufwand an Auswertungsmethoden, vor allem quantitativ, aber auch qualitativ begründet. Hinsichtlich dieser Argumente ist eine n-Zahl von <30 bei solchen experimentellen Arbeiten üblich.

Bei einer n-Zahl von <30 ist die Arbeit aus statistischer Perspektive eher als repräsentativ anzusehen, und ebenfalls die statistische Signifikanz. Nichtsdestotrotz bleiben die Ergebnisse bei entsprechender Effektstärke inhaltlich wie statisch aussagekräftig. Daher sollten weitere Experimentelle Arbeiten zu diesem Thema mit erhöhten n-Zahlen durchgeführt werden. Daher können sie durchaus wichtige Hinweise, Indizien und Erkenntnisse für weitere Experimente oder Studien liefern.

##### *Hämatoxylin-Eosin-Färbung*

Die HE-Färbung eignet sich sehr gut für einen Screening-Prozess, um überhaupt die Bereiche der dezellularisierten und re-besiedelten Herzen zu identifizieren. In einem zweiten Schritt können dann die am besten geeigneten und repräsentativsten Schnitte ausgewählt werden. Trotz der möglichen Gefahr eines Selektionsbias durch den Auswerter, können somit die optimal re-besiedelten Bereiche und Schnitte des jeweiligen Herzens identifiziert und miteinander verglichen werden.

##### *Immunfluoreszenz-Färbung*

Die IF-Färbung diene in erster Linie der repräsentativen Darstellung des Erfolgs einer simultanen kombinierten Re-Besiedlung mit Endothelzellen und Kardiomyozyten. In zweiter Linie der Identifizierung der einzelnen Zellarten. Da die Auswertung primär qualitativ, als quantitativ, erfolgte, beinhaltet sie auch kein Ausmessen der Signalstärke der Antikörperfluoreszenz. Sämtliche Vergleiche der IF-Bilder sind daher rein qualitativer Natur.

### *Bildanalyse mittels Fiji ImageJ*

Die Analyse mittels ImageJ erlaubt es, den Prozess der Zellzählung zu automatisieren und zu standardisieren. Hierbei ist der entscheidende Vorteil die Vermeidung des weit schwankenden, individuellen, humanen Messfehlers, hier Fehler im Zählprozess. Auch bei der automatisierten Auszählung kommt es zu einer sehr geringen, zu erwartenden Fehlerquote. Der entscheidende Vorteil ist jedoch die Konstanz dieses zu erwartenden unumgänglichen Fehlers. Dies birgt ebenfalls den großen Vorteil der besseren Standardisierbarkeit der Ergebnisse, gegenüber einem manuellen Auszählprozess.

### *Vergleichbarkeit mit anderen experimentellen Arbeiten und anderer Arbeiten untereinander hinsichtlich der Möglichkeit einer Meta-Analyse*

Die Vergleichbarkeit mit anderen experimentellen Arbeiten ist prinzipiell eher groß, da die angewendeten Methoden zum größten Teil etabliert sind und eine zumindest annähernd große Evidenz für deren Anwendbarkeit besteht. Aufgrund der hohen Anforderungen und der großen Anzahl an Variablen in einem Projekt, ist es jedoch enorm schwierig große n-Zahlen zu erzielen und auch generell eine große Anzahl von Projekten zu erreichen, die sich im Kern mit ähnlichen Fragestellungen befassen. Dies ist jedoch ein bekannter Aspekt der Grundlagenforschung. Daher ist die rein statistische Vergleichbarkeit durch eher niedrige Anzahl von Projekten und deren n-Zahlen eher limitiert. Grundlegend ist jedoch die inhaltliche Aussagekraft der Grundlagenforschung Projekte, der rein statistischen Aussagekraft überlegen und damit gut verwertbar. Dennoch werden weitere zahlreiche Projekte notwendig sein, die die hier vorgestellten Methoden beinhalten, um auch statistische Aussagekraft zu erlangen.

### 4.3 Interpretation der Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, die simultane vaskuläre und interstitielle Re-Besiedlung und die Re-Kultivierung von zuvor dezellularisierten Ratten-Herzen zu untersuchen. Zudem wurden zwei unterschiedliche Methoden der Re-Kultivierung miteinander verglichen.

Insgesamt hat sich gezeigt, dass eine simultane vaskuläre und interstitielle Re-Besiedlung mit zwei unterschiedlichen Progenitorzelltypen und deren Re-Kultivierung möglich ist.

Diese Arbeit hat gezeigt, dass das Konzept der Ganz-Organ-Dezellularisierung mit anschließender manueller Re-Zellularisierung und Re-Kultivierung, unter Berücksichtigung der gewählten manuellen Re-Besiedlungstechniken und der gewählten Zellpopulationen, erfolgreich ist. Der Erfolg lässt sich qualitativ am lokalen Persistieren der Zellen innerhalb der Matrix und am Überleben der Zellen, und quantitativ anhand der entsprechenden Zellzahl zeigen. Dabei scheint die Dezellularisierung als Methode der Matrix-Gewinnung führend zu sein. Die beiden verwendeten Re-Besiedlungstechniken der vaskulären und der interstitiellen Art scheinen ebenfalls gut geeignet, um ein Organ wie das Herz mit seinen entsprechenden organ-spezifischen Zellarten zu re-zellularisieren. Trotz der klassischen, Branchen bekannten Limitationen, angeführt von der zu niedrigen möglich Anzahl von Zellen, scheint dies der richtige Weg der Re-Zellularisierung zu sein.

Ob dies in Zukunft von einer komplett digitalisierten 3D- oder 4D-Bioprinting inklusive Zellbedruckung überholt werden kann, bleibt nach aktuellem Stand ungewiss, aber nicht utopisch. Nichtsdestotrotz bleibt es weiterhin von Nöten, ein solides, klassisches Konzept zu haben, um weiteren Fortschritt

Des Weiteren hat dieses Projekt gezeigt, dass die Methode der perfundierten Re-Kultivierung von re-besiedelten 3D-Trägermatrix Konstrukten einer statischen Re-Kultivierung überlegen ist. Auch wenn dies bereits zu erwarten war, konnte es nun in dieser Methoden-Konstellation bestätigt werden.

#### *Re-Besiedlung*

Im Hinblick auf die Re-Besiedlung hat sich gezeigt, dass sowohl die verwendeten humanen Endothelzellen, als auch die neonatalen Kardiomyozyten innerhalb der 3D-Trägermatrix platziert werden konnten, und ein Wachstum dieser Zellen über 4 Tage gezeigt werden konnte.

### *Re-Kultivierung*

Grundsätzlich hat dies bei beiden Re-Kultivierungsmethoden, also der statischen und perfundieren, funktioniert. Dabei zeigte sich jedoch anhand der nach der Auswertung gemessenen Zellzahl eine Überlegenheit der perfundieren Re-Kultivierungsmethode.

### *Histologie*

Die ca. 5000 ausgewerteten HE-gefärbten Schnitte zeigten insgesamt eine führende Re-Besiedlung im Bereich des Linken Ventrikels. Danach kommen der Rechte Ventrikel, gefolgt von Septum und Apex.

### *Immunhistologie*

In der Immunfluoreszenz konnte repräsentativ gezeigt werden, dass die Re-Besiedlung mit beiden verwendeten Zelltypen gelang. Sowohl die verwendeten human Endothelzellen, als auch die neonatalen Kardiomyozyten blieben innerhalb der 3D-Trägermatrix haften und verweilten dort 4 Tage

#### 4.3.1 Fragestellungen

In diesem Abschnitt der Arbeit sollen die Ergebnisse bewertet und die Bedeutung dieser diskutiert werden. Dabei wird sich an den bereits im letzten Kapitel der Einleitung beschriebenen Punkte und Fragestellungen orientiert.

Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

##### 1. Etablierung einer neuen Co-Re-Besiedlungsmethode

- a) Funktioniert die neue Art der vaskulären und interstitiellen simultan konsekutiven Co-Re-Besiedlung?

Beurteilung qualitativ anhand von Vorhandensein von beiden Zellarten, HUVECs und CMCs innerhalb der Matrix nach 4 Tagen Re-Kultivierung

- b) Ist die neue Art der Co-Re-Besiedlung geeignet für weitere Versuche?

Beurteilung anhand von qualitativer Einschätzung der Co-Re-Besiedlung hinsichtlich Zellzahl und Zellverteilung innerhalb der re-besiedelten Matrix

##### 2. Vergleich zweier unterschiedlicher Re-Kultivierungsmethoden perfundiert vs. Statisch

- a) Funktionieren die beiden Re-Kultivierungsarten nach Co-Re-Beurteilung?

Beurteilung qualitativ anhand von Kriterium von 1a

- b) Welche der beiden Re-Kultivierungsarten, perfundiert vs. Statisch, ist besser für eine Re-Kultivierung geeignet?

Beurteilung qualitativ und quantitativ anhand von automatisierter Bild-Analyse und Vergleich der beiden Versuchsgruppen, perfundiert vs. statisch, hinsichtlich Zellzahl und Zelldichte der einzelnen histologischen Schnitte der co-re-besiedelten Herzen.

#### 4.3.2 Einordnung der Ergebnisse hinsichtlich der Fragestellungen

##### 1. Etablierung der neuen Co-Re-Besiedlungsmethode

- a) Die Auswertung der Ergebnisse (histologisch und immunhistologisch) konnten qualitativ zeigen, dass die neue simultan konsekutive Co-Re-Besiedlungsmethode in Kombination mit der anschließenden Re-Kultivierung prinzipiell funktioniert hinsichtlich Zellvorhandensein und Zellüberleben der beiden re-besiedelten Zellarten, HUVECs und CMCs, nach 4 Tagen Re-Kultivierung. Dies konnte anhand der histologischen und spezifisch immunhistologischen Färbungen der einzelnen Schnitte für alle Bereiche der co-re-besiedelten Herzen repräsentativ qualitativ gezeigt werden. Auch die weite Verteilung und Ausbreitung innerhalb der Matrix spricht für eine gute Re-Besiedlung.

Bedeutung: Dies bedeutet, dass die technische Methode der simultan konsekutiven Co-Re-Besiedlung mit folgender Re-Kultivierung prinzipiell gut geeignet ist, um ein zuvor dezellularisiertes Ratten-Herz zu re-besiedeln. Dies erspart Zeit und Aufwand im Gegensatz zu einer rein konsekutiven Co-Re-Besiedlung, die z.B. an mehreren Tagen erfolgt. Die Zellen scheinen nebeneinander auf engem Raum zu koexistieren ohne Negativ-Beeinflussung. Eine mögliche positive Beeinflussung der Zellarten untereinander ist anzunehmend, gilt es jedoch in weiteren Versuchen zu beweisen.

- b) Die Auswertung der histologischen und immunhistologischen Ergebnisse konnten qualitativ zeigen, dass die neu etablierte Co-Re-Besiedlungsmethode nicht nur funktioniert, sondern auch insgesamt gut geeignet ist für weitere Re-Besiedlungs-Versuche mit mehreren Zellarten. Dies konnte anhand der qualitativ beobachteten hohen Zellzahl und Zelldichte, sowohl von HUVECs und auch CMCs, in allen Herzbereichen, LV, RV, S, A, gezeigt werden. Dies konnte mittels HE-Färbungen und Immunhistologie mit für die beiden Zellarten spezifischen Anti-Körpern und der DAPI-Färbung dargestellt werden

Bedeutung: Dies bedeutet, dass die neue Co-Re-Besiedlungsmethode insgesamt auch qualitativ gut geeignet ist für weitere Versuche, die eine Co-Re-Besiedlung mehrerer Zellarten beinhalten. Speziell für Endothelzellen und Kardiomyozyten scheinen diese Techniken im Einzelnen, sowie in der Kombination erfolgsversprechend zu sein. Die vaskuläre Re-Besiedlung mittels re-aortaler Perfusion konnte erneut bestätigt werden. Die interstitielle Re-Besiedlung mittels intra-ventrikulärer Injektion konnte in dieser Form neu etabliert werden. Die vaskuläre und interstitielle simultane konsekutive Re-Besiedlung konnte in dieser

Form ebenfalls neu etabliert werden und kann für weitere Versuche und Experimente mit verschiedenen Zellarten verwendet werden.

2. Re-Kultivierungs-Methoden perfundiert und statisch, Etablierung und Vergleich

- a) Die Auswertung der Ergebnisse konnte zeigen, dass die beiden verwendeten Re-Kultivierungs-Arten, perfundiert und statisch, prinzipiell funktionieren hinsichtlich Zellvorhandensein und Zellüberleben von HUVECs und CMCs nach 4 Tagen Re-Kultivierung im Anschluss an Dezellularisierung und Co-Re-Besiedlung. Dies konnte anhand von Zellvorhandensein und Zellüberleben von HUVECs und CMCs in den histologischen und immunhistologischen Schnitten repräsentativ gezeigt werden.

Bedeutung: Dies bedeutet, dass diese in dieser Form neu verwendeten beiden Re-Kultivierungsarten, perfundiert und statisch, gut geeignet sind, ein zuvor dezellularisiertes und re-besiedeltes Herz zu re-kultivieren.

- b) Die Auswertungen der Ergebnisse der quantitativen Bild-Analyse mit Fiji ImageJ von den co-re-besiedelten und re-kultivierten Herzen konnte zeigen, dass die technische Methode der perfundierten Re-Kultivierung der statischen überlegen ist, hinsichtlich Zellzahl und Zelldichte. Dies konnte mit Hilfe der automatisierten Zellzählung und Zelldichte (Zellzahl in Relation zur Fläche des jeweiligen histologischen Schnittes) analysiert werden. Dies konnte insgesamt für die Einzelschnitte, als auch für die Ganz-Heizen, als auch für die gesamte Versuchsgruppe, perfundierte Herzen und statische Herzen gezeigt werden.

Bedeutung: Dies bedeutet, dass die perfundierte Re-Kultivierung besser geeignet ist, als die statische Re-Kultivierung, gemessen an Zellzahl und Zelldichte. Auch wenn die statische Re-Kultivierung ebenfalls funktioniert, scheint die perfundierte Re-Kultivierung für zukünftige Versuche im Bereich des kardialen Tissue engineering besser geeignet zu sein. Dennoch fiel ein weiterer Aspekt auf: Die Tatsache, dass die statische Re-Kultivierung auch ohne Perfusion insgesamt funktioniert hat und ein Zellvorhandensein und Zellüberleben innerhalb der Matrix ermöglicht, spricht für die große Widerstandsfähigkeit der beiden re-besiedelten Zellarten innerhalb einer für sie optimalen Matrix. Auch ohne Perfundierung konnten die re-besiedelten Zellen persistieren, wenn auch nicht in Zahl und Dichte, wie bei der perfundierten Re-Kultivierung. Dies könnte als Indiz dafür gewertet werden, dass die Wahl der verwendeten Methoden (chemische Dezellularisierung, vaskuläre und interstitielle Co-Re-Besiedlung, Re-Kultivierung) insgesamt ein gutes Gesamt-Konzept für die Re-Zellularisierung eines Ganz-Organes darstellt.

## 4.4 Zukunft

### 4.4.1 Re-Implantation

Der vierte Schritt nach einer erfolgreichen in vitro Dezellularisierung und Re-Besiedlung und Re-Kultivierung der 3D-Träger-Matrix wäre die Re-implantation in einen Empfänger-Organismus. Eine wesentliche Voraussetzung hierfür ist die Funktionsfähigkeit des zu re-implantierenden bioartifizell erstellten Organs, welche die organ-spezifischen biomechanischen Eigenschaften und funktionellen Eigenschaften beinhalten. Dazu zählen z.B. Pumpleistung des Herzens, Elektrophysiologische Eigenschaften des Herzens, Hormonproduktion oder Proteinproduktion von anderen Organen, wie z.B. der Leber, oder Urin-Produktion der Niere. Dafür ist ein Minimum an Funktionsfähigkeit nötig, besser noch eine dem Ursprungsorgan vergleichbare Funktionsfähigkeit. Zumindest ein Minimum dieser Funktionsfähigkeit zu erreichen, ist einigen Gruppen in ihren Arbeiten im Ganz-Organ-Tissue engineering gelungen. Dazu zählen z.B. Herz, Lunge, Leber, Niere, Darm, Harnblase. Beim eigentlichen Prozess der Re-Implantation stehen chirurgische Kenntnisse und Eigenschaften im Vordergrund. Dabei ähnelt das Vorgehen jedoch einer Transplantation. Im Bereich des kardialen Tissue engineering ist hinsichtlich dieser Funktionsfähigkeit eine wegweisende und bahnbrechende Pioniers-Arbeit sicherlich die zuvor genannte Arbeit von Ott von der Gruppe um Taylor 2008. Hierbei ist es gelungen, mit Methoden des Tissue Engineering die Bestrebungen um einen funktionellen Gewebeersatz auch auf Organebene ausgeweitet. Zugleich bestätigt und untermauert diese Arbeit die in ihr angewendeten Methoden, insbesondere die Perfusions-Dezellularisierungs-Techniken.

### 4.4.2 Hochskalieren

Ein weiterer wichtiger Aspekt des Ganz-Organ-Tissue-engineerings ist die Anwendbarkeit der Modelle und Experimente auf die Größe eines humanen Organs, in diesem Fall dem Herzen. Auch wenn es einmal gelingen sollte, ein vollständig funktionsfähiges ganzes Herz in Größe eines Ratten-Herzens bioartifizell herzustellen, ließe sich dies nur bedingt auf die Größe eines humanen Herzens anwenden. Dazu wurden bereits einige Arbeiten durchgeführt, vornehmlich an Schweine-Herzen, da diese der Anatomie eines humanen Herzens sehr ähnlich sind. Eine der größten Herausforderungen beim Hochskalieren auf die Größe eines humanen Herzens stellt, wie bekanntlich, die immens hohe Zellzahl dar, die benötigt wird, um ein Herz derartiger Größe flächendeckend, dreidimensional, in gleicher Dichte und einheitlich zu besiedelt. Doch auf Grund neuester Entwicklungen in Zell- und Gentechnik könnte auch diese

Hürde mit zunehmender Geschwindigkeit der Forschung in diesem Bereich in Zukunft gemeistert werden.

#### 4.4.3 Klassische etablierte Methoden des myokardialen Tissue engineering

Die Zukunft des myokardialen Tissue Engineering scheint trotz der rasanten Entwicklung in der Forschung und trotz immer neuer Innovationen zumindest kurz- bis mittelfristig erst einmal weiterhin auch in der Hand klassischer bereits etablierter Methoden zu liegen. Die zuvor genannte Arbeit von Ott 2008, die unstrittig ein Checkpoint im modernen Tissue-engineerings beinhaltet bereits wesentliche dieser Methoden. Hinsichtlich der Gewinnung der ECM scheint die Methode der Perfusions-Dezellularisierung am optimalsten zu sein. Diese Arbeit stellte gewissermaßen den Ausgangspunkt und das Fundament für die meisten Folgearbeiten im kardialen Ganz-Organ-Tissue-engineering dar, das auf der einen Seite die Bestätigung der angewandten Methoden bedeutet und auf der anderen Seite eine Inspiration für zukünftige Forschung in diesem Gebiet bedeutet.

Hinsichtlich der Re-Zellularisierung und der Wahl der Zellpopulation scheinen grundsätzlich sowohl ausdifferenzierte Zellen als auch Stammzellen geeignet zu sein. Während der Einsatz von differenzierten Zellen häufiger angewendet wurde und durchaus dazu in der Lage ist, die gewünschte Organfunktion teilweise zu erfüllen, trifft dies auch auf Stammzellen zu. Die direkte Re-Besiedlung von Stammzellen und anschließende in vivo Differenzierung bringt Vorteile, birgt jedoch auch einige Risiken. Einer der größten Vorteile der Stammzellen ist die Möglichkeit sich quasi in jedes beliebige Zellart und damit jedes beliebige Gewebe differenzieren zu können. Dies ist gleichzeitig auch der größte Nachteil, da das Entartungsrisiko bei einer in vivo Differenzierung deutlich erhöht zu sein scheint. Des weiteren ist die Kontrolle des Differenzierungsprozesses in vivo alles andere als trivial. Die Lösung zur Überwindung dieser Hürden scheint auch hier in der Kombination zu liegen. Ein mögliches Erfolgsmodell könnte demnach in der in vitro Re-Besiedlung einer dECM mit Stamm- und Vorläuferzellen und anschließenden in vitro Re-Kultivierung und Differenzierung dieser Zellen liegen, und erst eine anschließende Re-Implantation dieser in vitro differenzierten Zellen. Damit könnte auch der wesentlichen Limitation der zu niedrigen Zellzahl begegnet werden, da das hohe Wachstums- und Differenzierungsmöglichkeit der Stammzellen in vitro genutzt werden könnte, um eine hohe Zellzahl und Zelldichte zu erreichen, im Rahmen eines kontrollierten in vitro Differenzierungsprozesses.

#### 4.4.4 Alternativen des myokardialen Ganz-Organ Tissue engineerings

Trotz des großen Fortschritts im Bereich der Dezellularisierung, scheint es, als dass alternative ECMs auch in Zukunft relevant bleiben, vor allem im Gewebe-Tissue-Engineering. Während sie im Ganz-Organ-Tissue-engineering nicht von herausragender Bedeutung sind, so sind sie im Gewebe-Tissue-engineering durchaus wertvoll. Da ihr Ziel nicht das Ersetzen eines ganzen Organes, sondern nur der Ersatz von Teilen von Organen oder lokalen Bereichen, sind die Anforderungen und auch die Hürden nicht ganz so groß. Ein Beispiel hierfür sind ECM-Hydrogele (Aubin et al., 2010) (Camci-Unal et al., 2010) (Khademhosseini et al., 2007). Weitere Beispiele sind die biologischen Herzklappen oder andere kardiale Teilkonstrukte, wie etwa Aorten Conduits (Assmann et al., 2012) (Assmann et al., 2013). Damit liegt auch die praktische Umsetzung deutlich näher als beim Ganz-Organ-Tissue-engineering.

#### 4.4.5 3D-Bioprinting („Elektrizität“ oder „Wasserstoff“ der Regenerativen Medizin)

Das 3D-Bioprinting hat im letzten Jahrzehnt deutlich an Bedeutung gewonnen und die Forschung und Weiterentwicklung deutlich zu genommen. Das 3D-Bioprinting kombiniert im Kern die beiden ersten von Langer beschriebenen Punkten des Tissue engineering: Die Erstellung einer 3D-Trägermatrix und deren Re-Besiedlung mit Zellen. Die Vorteile des 3D-Bioprinting gegenüber den konventionellen Methoden sind die Unabhängigkeit von Spender Organen und die damit verbunden Möglichkeit der Erstellung in prinzipiell unbegrenzter Anzahl von 3D-Trägermatrices. Ein weiterer großer Vorteil ist die exakte Standardisierbarkeit der Produktion und Erstellen der Matrices, aufgrund von digital gesteuerten und kontrollierbaren Produktionsverfahren. Dies ermöglicht die Erstellung exakt gleicher, unbegrenzter Matrices. Des Weiteren wäre es sogar möglich, den Schritt der Re-Besiedlung direkt mit ein zu beziehen, und damit ein komplett re-besiedeltes Konstrukt als Produkt zu erhalten.

Grundsätzlich gibt es verschiedene Ansätze bzw. Modelle des 3D-Bioprinting: Biomimikri, Autonome Zusammensetzung und Mini-Gewebe. (Murphy et al., 2013). Der Ansatz des Biomimikri hat zum Ziel gesetzt, komplette 3D-Trägermatrices und darin enthaltene Zellen zu drucken. Die Autonome Zusammensetzung druckt Vorstufen, die sich dann später zum vollständigen Gewebe bzw. Organ entwickeln, ähnlich dem Prinzip der Embryonalentwicklung. Der Ansatz der Mini-Gewebe beruht im Kern auf der Erstellung von Teil-Gewebe-Einheiten, die anschließend zu einem Organ zusammengesetzt werden können. Unabhängig vom gewählten Ansatz gibt es eine Reihe an Faktoren, die eine bedeutende Rolle bei der Erstellung der biologischen Konstrukte spielen. Dies sind unter anderem folgende Faktoren: das vorbereitende Modell und dessen Design mittels Bildgebung, die Auswahl der

verwendeten Materialien wie z.B. ECM-Komponenten und Zellen, und die zu verwendende Druck-Technik.

### *Druck-Techniken*

Grundsätzlich gibt es verschiedene Druck-Technik. Die verbreitetsten Verfahren sind folgende: Tintenstrahl-Drucker, Mikroextrusion, und Licht-assistierte Verfahren, wie Laser-assistierte Verfahren.

#### *Tintenstrahl-Drucker*

Das Tintenstrahl-Drucker-Verfahren ist das am bisher weitesten verbreitete und etablierteste Verfahren im Bereich des 2D- und 3D-Bioprinting. Die wesentlichen Vorteile bestehen in der großen Verfügbarkeit, den geringen Kosten, dem schnellen Druckprozess und der langjährigen Erfahrung mit Tintenstrahl-Druckern. Im Kern stellen sie eine Weiterentwicklung der handelsüblichen 2D-Office-Drucker dar. Es gibt verschiedene Verfahren der Tintenstrahl-Drucker, vor allem Wärme-Tintenstrahldrucker (Cui 2012) und Piezoelektrische Drucker. Wärmestrahldrucker funktionieren nach folgendem Prinzip: Der Drucker-Kopf wird durch elektrische Wärme erhitzt und dadurch die zu druckenden Materialien in Form von Flüssigkeit durch die Düse des Druckerkopfes gedrückt. Mögliche Nachteile sind die Hitze und der Druck, die auf die Materialien während des Druckprozesses am erhitzten Druckerkopf ausgeübt werden. Dabei könnten die zu druckenden Materialien zumindest leicht beeinflusst oder sogar geschädigt werden. Auch wenn einzelne Studien von bestimmten Zelllinien des thermalen Druckprozesses dessen Unversehrtheit aufzeigen, so bleiben die physischen Kräfte der Hitze und des mechanischen Druckes eine Einschränkung im Hinblick auf die große Bandbreite an zu druckenden Materialien, die jeweils unterschiedlich darauf reagieren könnten. Eine weitere Einschränkung ist die mandatorische Galenik der zu druckenden Materialien, die in Form von Flüssigkeit oder zumindest Gel vorliegen müssen, um durch den Druckerkopf zu passen und damit gedruckt werden können. Dies erschwert die Bildung einer 3D-Formation, da die Flüssigkeit während des Druck-Prozesses in eine 3D-Form gebracht werden müssen. Hierfür wurden zwar spezielle Materialien entwickelt, die nach dem Druck-Prozess miteinander vernetzt werden können, dies führt jedoch zu einer erheblichen Verlangsamung des gesamten Druck-Prozess.

Zu weiteren Einschränkungen zählen die Tatsache, dass die Tropfen nicht in eine bestimmte Richtung gedruckt werden können und keine exakte Standardisierung bezüglich der Größe der Tropfen möglich ist. Zudem ist die regelmäßige Verstopfung der Düse nach einer bestimmten Anzahl von Druckprozessen ein Problem, welches jedoch sicherlich technischen

Verbesserungen zugänglich wäre. Diese Einschränkung führen dazu, dass es schwer bis unmöglich ist, eine gewisse hohe Zelldichte und damit eine bestimmte notwendige Anzahl an Zellen zu erreichen.

### *Mikro-Extrusions-Drucker*

Das Mikro-Extrusions-Drucker-Verfahren stellt eine wesentliche Alternative zum klassischen Tintenstrahl-Drucker-Verfahren dar. Hierbei wird das zu druckende Material mittels physikalischer Methoden ausgeworfen und mittels eines Mikro-Extrusions-Druckerkopfes auf einem Substrat platziert. Dabei werden statt einzelner Tropfen, ganze zusammenhängende Materialschnüre gedruckt. Zuerst wird das Material 2D gedruckt und anschließend aufeinander aufbauen 3D gedruckt (Cohen et al., 2006) (Iwami et al., 2010) (Shor et al., 2009). Grundsätzlich gibt es unterschiedliche Auswurf-Systeme. Die wichtigsten Methoden sind die pneumatische Methode und die mechanische Methode mittels Kolben oder Schraube. Bei der pneumatischen Methode werden die zu druckenden Materialien mittels Luftdruck ausgeworfen. Bei der mechanischen Methode drückt ein Kolben oder eine Schraube die Materialien auf das Substrat. Vorteile der pneumatischen Methode liegen bei der erhöhten Kraft, die durch den Luftdruck aufgebaut werden kann. Ein möglicher Nachteil könnte jedoch in der geringeren Steuerbarkeit des Auswurfprozesses liegen, da es durch die Verwendung von Luftdruck zu leichten Verzögerungen kommen kann. Die mechanischen Methoden erlauben grundsätzlich eher mehr Kontrolle über die Anordnung im 3D-Raum der auszuwerfenden Materialien bei allerdings leicht reduzierter Kraft.

Ein großer Vorteil der Mikro-Extrusions-Drucker-Verfahrens gegenüber dem Tintenstrahl-Drucker-Verfahren, dass nicht nur Flüssigkeiten als zu druckende Materialien benutzt werden können, sondern deutlich mehr Materialien unterschiedlicher Galenik, vor allem auch visköserer Materialien. Während visköserer Materialien als geeignet für Struktur und Aufbau des zu druckenden Konstrukts scheinen, tragen weniger visköserer Materialien eher zur geeigneten Zellwachstums Umgebung bei. Ein weiterer großer Vorteil ist die Möglichkeit auch höhere Zelldichten und damit höhere Anzahl an Zellen auszuwerfen und zu drucken. Außerdem besteht die Möglichkeit einer deutlich höheren Auflösung zu drucken, was die Erstellung von komplexen Strukturen und unterschiedlichsten Zellarten ermöglicht. Ein möglicher Nachteil ist jedoch die Tatsache, dass das Zellüberleben durchschnittlich geringer ist, als bei Tintenstrahl-Drucker-Verfahren. Dies könnte an den erhöhten physikalischen Kräften liegen, die während des Druckprozesses auf die Zellen ausgeübt werden, hierbei in erster Linie an der erhöhten Scherkraft. Diese wiederum scheint am ehesten durch den erhöhten mechanischen Druck beeinflusst zu sein. Um dieser Problematik entgegenzuwirken, kann der Auswurf-Druck verringert und die Düsendgröße erhöht werden. Dies führt allerdings

zu den bekannten Einschränkungen des Mikro-Extrusions-Verfahrens: Eine niedrigere Druck-Auflösung und eine niedrigere Druck-Geschwindigkeit. Jedoch wurden auch für diese Einschränkungen bereits technische Gegenmaßnahmen entwickelt.

Beispiele für erfolgreiche Mikro-Extrusions-Drucker-Verfahren sind unter anderem Gefäße und Aortenklappen. Bei allen Methoden können eine Reihe von zu druckenden Materialien als Ausgangssubstanz verwendet werden, unter anderem Hydrogele und Kunststoffe.

### *Laser-assistierte-Drucker*

Beim Laser-assistierten-Drucker-Verfahren wird die Lichtenergie eines Lasers genutzt, um über eine Transport-Oberfläche, bestehend aus Glas, einer Absorptionsoberfläche und einer biologischen Schicht, Kraft zu erzeugen, die wiederum die zu druckenden Materialien auf ein Substrat bewegt (Barron et al., 2004) (Guillotin et al., 2010).

Wichtige Faktoren hinsichtlich der Verwendung von 3D-Bio-Laser-Druckern sind im Kern die Auswahl und Eigenschaften der zu druckenden Materialien und Zellen. Dabei spielen folgende Faktoren eine große Rolle: generelle Druckbarkeit, biologische Verwendbarkeit, mechanische Eigenschaften, biomimetische Eigenschaften, und eine gewisse den Druckprozess tolerierende Widerstandsfähigkeit.

### *Anwendungen von 3D-Biodruckern*

In einigen Bereichen der Regenerativen Medizin ist die Anwendung von 3D-Biodruckern bereits fortgeschrittener als in anderen Bereichen. Beispiele für eine erfolgreiche Anwendung von Tintenstrahl-3D-Biodruckern gibt es unter anderem in den Organsystemen Haut oder Knorpel.

### *Vorteile des 3D-Bioprinting*

Insgesamt wäre eine bessere und genauere Lokalisierung innerhalb der ECM möglich. Ein weiterer Vorteil stellt die Möglichkeit der exakten Reproduzierbarkeit eines ECM-Gerüsts und einer re-besiedelten ECM-Matrix dar.

Zudem wäre eine individuelle Anpassung auf unterschiedliche nach Bedarf ausgerichtete Größen möglich, zum Beispiel nach Geschlecht, Alter et cetera.

#### 4.4.6 Herzklappen

Im Bereich des Gewebe-Tissue-Engineerings gibt es eine Reihe an Arbeiten, in denen die Gewebe oder Teile von Organen dezellularisiert und anschließend re-besiedelt und re-kultiviert wurden. Einige dieser Arbeiten führten im Endeffekt auch zu klinischen Anwendungen, und Produkten.

Im Bereich des kardialen Tissue Engineerings sind die durch Dezellularisierung und Re-Zellularisierung bioartifiziell erstellten Herzklappen sicherlich einer der größten Erfolge (Cebotari et al., 2011) (Cebotari et al., 2006). Grundsätzlich wird zwischen mechanischen und biologischen Herzklappen unterschieden. Dabei gibt es bioprothetische Herzklappen. Diese sind Rinder- oder Schweine-Herzklappen, die sterilisiert und mittels Glutaraldehyds fixiert werden. Vorteile der bioprothetischen Klappen gegenüber den mechanischen ist die biologische Interaktion der Herzklappe mit der humanen Umgebung und die Vermeidung von Antikoagulanzen. Ein Nachteil hingegen ist z.B. die erhöhte Tendenz zur Kalzifizierung der Klappen und die leicht erhöhte Tendenz zur Abstoßungsreaktion durch den Empfänger. Eine andere Art der biologischen Herzklappen stellen die Tissue engineering mittels Dezellularisierung und Re-Zellularisierung gewonnenen Herzklappen dar (Akhyari et al., 2010). Diese stammen ebenfalls vom Rind- oder Schwein, werden dezellularisiert und anschließend re-zellularisiert, in vitro re-kultiviert (Mironov et al., 2006) und letztendlich re-implantiert.

#### 4.4.7 Zellwachstum

Die etablierten Methoden hinsichtlich des Zellwachstums- und der Zelldifferenzierung während der Kultivierung sind zwar schon umfangreich, müssen jedoch noch weiterentwickelt und weiter erforscht werden. Ein Punkt, der bisher weniger im Fokus stand, aber in der Zukunft eine Rolle spielen könnte, ist, nicht nur das Erschaffen einer geeigneten Umgebung für die Kultivierung von kardialen Konstrukten hinsichtlich der Temperatur und Perfusion, sondern ebenfalls das Erschaffen einer in-vivo ähnlichen externen Umgebung hinsichtlich der natürlichen Herzentwicklung eines Fetus in der Gebärmutter. Einen kompletten Organismus biomimetisch nachzubauen wäre nahezu unmöglich, aber ein einem solchen Organismus ähnlichen Umgebungskonstrukt wäre ggf. möglich.

Eine weitere Variante der möglichen Re-Besiedlung könnte die in-vivo Re-Besiedlung darstellen. Dies wurde bereits an Schweinen getestet und dort gezeigt, dass nach der

Reimplantation von zuvor dezellularisierte Herzen, neue Zellbildung und Migration im Transplantat stattfindet.

#### 4.4.8 Gentechnik

Ein nicht zu unterschätzender Aspekt sind die Bemühungen und Fortschritte auf einem ganz neuen Gebiet der Forschung, welches gerade dabei ist, nicht nur einen bestimmten Bereich der Medizinischen Forschung, sondern die gesamte Medizin, deren Forschung und Klinischen Anwendung auf eine Weise zu revolutionieren, die so bisher noch nicht bekannt ist. Das Gebiet der Gentechnik ist schon länger im Fokus der gesamten medizinischen Forschung, doch kam es erst kürzlich zu einem nennenswerten Durchbruch im Bereich der klinischen Medizin. Zolgensma, ein Medikament, das mit Hilfe der Genschere CRISPR in der Lage ist, ein fehlerhaftes bzw. mutiertes Gen in der menschlichen DNA, nicht nur zu entfernen, sondern durch eine funktionsfähige Variante des Gens zu ersetzen. Eine Anwendung eines weiteren Medikamentes auf Basis dieser Gentechnik ist ein Gel, welches bei Patienten mit der genetischen Hauterkrankung Epidermolysis bullosa eingesetzt werden kann. Es führt dazu, dass das fehlerhafte Gen COL7A durch ein funktionsfähiges ersetzt wird. Damit ist die Erkrankung im Bereich der. Mit diesem Ansatz steigt die Hoffnung in Zukunft jegliche Generkrankungen oder Gen-assoziierten Erkrankungen nicht nur zu kontrollieren, sondern sogar vollständig zu therapieren. Der Erfolg der Methode ist ebenso beeindruckend wie ihr molekularbiologischer Ansatz. Ein Großteil aller medizinischen Probleme und Krankheiten hat ihren Ursprung in der DNA, sei es genetisch vererbt oder durch spontane Mutation. Eine Methode wie die Gentechnik, die genau hier, also am Ursprung, ist eine Methode, die die eigentliche Ursache behebt. Damit birgt die Gentechnik ein enormes Potenzial. Gelingen es mit dieser Technik, auch das Wachstum und die Konfiguration von Zellen kontrolliert zu beeinflussen, wäre dies ein völlig neuer Ansatz und damit könnte diese Technik auch im Bereich der Regenerativen Medizin und des kardialen Tissue engineering Bedeutung erlangen. Auch wenn es sicherlich noch Jahrzehnte dauern wird, lassen die rasante Entwicklung und der Fortschritt im Bereich der Regenerativen Medizin und insbesondere im Bereich des myokardialen Tissue Engineering und die Einführung neuer innovativer Technologien wie z.B. das 3D- und 4D-Drucken, ein komplett bioartifizell erstelltes Herz nicht mehr nur als reine Utopie, sondern vielmehr nur noch als eine Frage der Zeit erscheinen.

#### 4.4.9 Zusammenfassung

Diese Arbeit konnte zeigen, dass eine vaskuläre und eine interstitielle funktionelle in-vitro Re-Besiedlung von zuvor dezellularisierten Ratten-Herzen sowohl einzeln als auch in der Kombination als kombinierte simultan konsekutive vaskuläre und interstitielle Co-Re-Besiedlung mit HUVECs und CMCs prinzipiell möglich und erfolgreich ist hinsichtlich Zellvorhandensein und Zellvitalität innerhalb einer kardinalen dezellularisierten Extrazellulären Matrix. Des Weiteren konnte diese neue Methode der Co-Re-Besiedlung etabliert werden und festgestellt werden, dass sie als Modell für weitere Re-Zellularisierungs- und Re-Kultivierungs-Versuche geeignet ist.

Zudem konnte gezeigt werden, dass sowohl die statische als auch die perfundierte Re-Kultivierungsmethode mit einer Kultivierungszeit von 4 Tagen prinzipiell funktionieren. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die perfundierte Re-Kultivierung qualitativ als auch quantitativ der statischen Kultivierung deutlich überlegen ist hinsichtlich Zellzahl und Zelldichte innerhalb der kardialen dECM.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass die neue Art der Co-Re-Besiedlung mit anschließender perfundierte Re-Kultivierung ein gut geeignetes Modell für zukünftige Versuche im Bereich des kardinalen Tissue engineerings darstellt.

Herausforderungen denen in der Zukunft zu begegnen sein wird, bestehen in der enorm hohen Zellzahl, die benötigt wird, um ein kardinales re-zellularisiertes ECM-Konstrukt komplett und vor allem funktionell funktionsfähig zu re-besiedeln.

Weitere Versuche könnten die molekularbiologische Analyse von Zellmarkern und Antigenen sein, die den Erfolg dieses Modells belegen, sowie die Erweiterung des Modells mit folgenden Faktoren: Re-Kultivierung mit einem Bioreaktor, Re-Besiedlung mit Vorläufer- und Stammzellen und in ferner Zukunft die Anwendung von 4D-Printing und Gentechnik.

Auch wenn der Weg ein langer ist, scheint es doch nur eine Frage der Zeit zu sein, bis das Ziel eines voll funktionsfähigen bioartifiziellen kardinalen ECM Konstrukts erreicht werden kann.

## 5 Literaturverzeichnis

- ABPLANALP, W. T., FISCHER, A., JOHN, D., ZEHER, A. M., GOSGNACH, W., DARVILLE, H., MONTGOMERY, R., PESTANO, L., ALLÉE, G., PATY, I., FOUGEROUSSE, F. & DIMMELER, S. 2020. Efficiency and Target Derepression of Anti-miR-92a: Results of a First in Human Study. *Nucleic Acid Ther*, 30, 335-345.
- AHA American Heart Association Annual report 2021-2022.
- AKHYARI, P., AUBIN, H., GWANMESIA, P., BARTH, M., HOFFMANN, S., HUELSMANN, J., PREUSS, K. & LICHTENBERG, A. 2011. 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*, 17, 915-26.
- AKHYARI, P., FEDAK, P. W., WEISEL, R. D., LEE, T. Y., VERMA, S., MICKLE, D. A. & LI, R. K. 2002. Mechanical stretch regimen enhances the formation of bioengineered autologous cardiac muscle grafts. *Circulation*, 106, 1137-42.
- AKHYARI, P., KAMIYA, H., GWANMESIA, P., AUBIN, H., TSCHIERSCHE, R., HOFFMANN, S., KARCK, M. & LICHTENBERG, A. 2010. In vivo functional performance and structural maturation of decellularised allogenic aortic valves in the subcoronary position. *Eur J Cardiothorac Surg*, 38, 539-46.
- ALLEN, R. A., SELTZ, L. M., JIANG, H., KASICK, R. T., SELLARO, T. L., BADYLAK, S. F. & OGILVIE, J. B. 2010. Adrenal extracellular matrix scaffolds support adrenocortical cell proliferation and function in vitro. *Tissue Eng Part A*, 16, 3363-74.
- ASSMANN, A., AKHYARI, P., DELFS, C., FLÖGEL, U., JACOBY, C., KAMIYA, H. & LICHTENBERG, A. 2012. Development of a growing rat model for the in vivo assessment of engineered aortic conduits. *J Surg Res*, 176, 367-75.
- ASSMANN, A., DELFS, C., MUNAKATA, H., SCHIFFER, F., HORSTKÖTTER, K., HUYNH, K., BARTH, M., STOLDT, V. R., KAMIYA, H., BOEKEN, U., LICHTENBERG, A. & AKHYARI, P. 2013.

- Acceleration of autologous in vivo recellularization of decellularized aortic conduits by fibronectin surface coating. *Biomaterials*, 34, 6015-26.
- ATALA, A., BAUER, S. B., SOKER, S., YOO, J. J. & RETIK, A. B. 2006. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet*, 367, 1241-6.
- AUBIN, H., KRANZ, A., HÜLSMANN, J., LICHTENBERG, A. & AKHYARI, P. 2013a. Decellularized whole heart for bioartificial heart. *Methods Mol Biol*, 1036, 163-78.
- AUBIN, H., KRANZ, A., HÜLSMANN, J., PINTO, A., BARTH, M., FOMIN, A., LICHTENBERG, A. & AKHYARI, P. 2013b. A novel native derived coronary artery tissue-flap model. *Tissue Eng Part C Methods*, 19, 970-80.
- AUBIN, H., NICHOL, J. W., HUTSON, C. B., BAE, H., SIEMINSKI, A. L., CROPEK, D. M., AKHYARI, P. & KHADEMHOSEINI, A. 2010. Directed 3D cell alignment and elongation in microengineered hydrogels. *Biomaterials*, 31, 6941-6951.
- AWMF 2019. Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische Herzinsuffizienz – Langfassung, 3. Auflage. Version 3. 2019 [cited: YYYY-MM-DD]. DOI: 10.6101/AZQ/000482. .
- BADER, A., SCHILLING, T., TEEBKEN, O. E., BRANDES, G., HERDEN, T., STEINHOFF, G. & HAVERICH, A. 1998. Tissue engineering of heart valves--human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. *Eur J Cardiothorac Surg*, 14, 279-84.
- BADYLAK, S. F. 2004. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transpl Immunol*, 12, 367-77.
- BADYLAK, S. F. 2007. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials*, 28, 3587-93.
- BADYLAK, S. F., FREYTES, D. O. & GILBERT, T. W. 2009. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomater*, 5, 1-13.

- BADYLAK, S. F., LANTZ, G. C., COFFEY, A. & GEDDES, L. A. 1989. Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog. *J Surg Res*, 47, 74-80.
- BADYLAK, S. F., TAYLOR, D. & UYGUN, K. 2011. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annu Rev Biomed Eng*, 13, 27-53.
- BADYLAK, S. F., TULLIUS, R., KOKINI, K., SHELBOURNE, K. D., KLOOTWYK, T., VOYTIK, S. L., KRAINE, M. R. & SIMMONS, C. 1995. The use of xenogeneic small intestinal submucosa as a biomaterial for Achilles tendon repair in a dog model. *J Biomed Mater Res*, 29, 977-85.
- BARRON, J. A., WU, P., LADOUCEUR, H. D. & RINGEISEN, B. R. 2004. Biological laser printing: a novel technique for creating heterogeneous 3-dimensional cell patterns. *Biomed Microdevices*, 6, 139-47.
- BOOTH, C., KOROSSIS, S. A., WILCOX, H. E., WATTERSON, K. G., KEARNEY, J. N., FISHER, J. & INGHAM, E. 2002. Tissue engineering of cardiac valve prostheses I: development and histological characterization of an acellular porcine scaffold. *J Heart Valve Dis*, 11, 457-62.
- BORSCHEL, G. H., DENNIS, R. G. & KUZON, W. M., JR. 2004. Contractile skeletal muscle tissue-engineered on an acellular scaffold. *Plast Reconstr Surg*, 113, 595-602; discussion 603-4.
- BOWERS, S. L., BANERJEE, I. & BAUDINO, T. A. 2010. The extracellular matrix: at the center of it all. *J Mol Cell Cardiol*, 48, 474-82.
- CAMCI-UNAL, G., AUBIN, H., AHARI, A. F., BAE, H., NICHOL, J. W. & KHADEMHOSEINI, A. 2010. Surface-modified hyaluronic acid hydrogels to capture endothelial progenitor cells. *Soft Matter*, 6, 5120-5126.
- CARTMELL, J. S. & DUNN, M. G. 2000. Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties. *J Biomed Mater Res*, 49, 134-40.

- CEBOTARI, S., LICHTENBERG, A., TUDORACHE, I., HILFIKER, A., MERTSCHING, H., LEYH, R., BREYMAN, T., KALLENBACH, K., MANIUC, L., BATRINAC, A., REPIN, O., MALIGA, O., CIUBOTARU, A. & HAVERICH, A. 2006. Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells. *Circulation*, 114, 1132-7.
- CEBOTARI, S., TUDORACHE, I., CIUBOTARU, A., BOETHIG, D., SARIKOUCH, S., GOERLER, A., LICHTENBERG, A., CHEPTANARU, E., BARNACIUC, S., CAZACU, A., MALIGA, O., REPIN, O., MANIUC, L., BREYMAN, T. & HAVERICH, A. 2011. Use of fresh decellularized allografts for pulmonary valve replacement may reduce the reoperation rate in children and young adults: early report. *Circulation*, 124, S115-23.
- CEBOTARI, S., TUDORACHE, I., JAEKEL, T., HILFIKER, A., DORFMAN, S., TERNES, W., HAVERICH, A. & LICHTENBERG, A. 2010. Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. *Artif Organs*, 34, 206-10.
- CHEN, F., YOO, J. J. & ATALA, A. 1999. Acellular collagen matrix as a possible "off the shelf" biomaterial for urethral repair. *Urology*, 54, 407-10.
- CHEN, R. N., HO, H. O., TSAI, Y. T. & SHEU, M. T. 2004. Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications. *Biomaterials*, 25, 2679-86.
- COHEN, D. L., MALONE, E., LIPSON, H. & BONASSAR, L. J. 2006. Direct freeform fabrication of seeded hydrogels in arbitrary geometries. *Tissue Eng*, 12, 1325-35.
- CONKLIN, B. S., RICHTER, E. R., KREUTZIGER, K. L., ZHONG, D. S. & CHEN, C. 2002. Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft. *Med Eng Phys*, 24, 173-83.
- CRAPO, P. M., GILBERT, T. W. & BADYLAK, S. F. 2011. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, 32, 3233-43.
- DAHL, S. L., KOH, J., PRABHAKAR, V. & NIKLASON, L. E. 2003. Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation. *Cell Transplant*, 12, 659-66.

- GILBERT, T. W., SELLARO, T. L. & BADYLAK, S. F. 2006. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, 27, 3675-83.
- GILPIN, S. E., REN, X., OKAMOTO, T., GUYETTE, J. P., MOU, H., RAJAGOPAL, J., MATHISEN, D. J., VACANTI, J. P. & OTT, H. C. 2014. Enhanced lung epithelial specification of human induced pluripotent stem cells on decellularized lung matrix. *Ann Thorac Surg*, 98, 1721-9; discussion 1729.
- GOH, S. K., BERTERA, S., OLSEN, P., CANDIELLO, J. E., HALFTER, W., UECHI, G., BALASUBRAMANI, M., JOHNSON, S. A., SICARI, B. M., KOLLAR, E., BADYLAK, S. F. & BANERJEE, I. 2013. Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering. *Biomaterials*, 34, 6760-72.
- GRAUSS, R. W., HAZEKAMP, M. G., OPPENHUIZEN, F., VAN MUNSTEREN, C. J., GITTEMBERGER-DE GROOT, A. C. & DERUITER, M. C. 2005. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. *Eur J Cardiothorac Surg*, 27, 566-71.
- GUILLOTIN, B., SOUQUET, A., CATROS, S., DUOCASTELLA, M., PIPPENGER, B., BELLANCE, S., BAREILLE, R., RÉMY, M., BORDENAVE, L., AMÉDÉE, J. & GUILLEMOT, F. 2010. Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization. *Biomaterials*, 31, 7250-6.
- GUYETTE, J. P., CHAREST, J. M., MILLS, R. W., JANK, B. J., MOSER, P. T., GILPIN, S. E., GERSHLAK, J. R., OKAMOTO, T., GONZALEZ, G., MILAN, D. J., GAUDETTE, G. R. & OTT, H. C. 2016. Bioengineering Human Myocardium on Native Extracellular Matrix. *Circ Res*, 118, 56-72.
- IWAMI, K., NODA, T., ISHIDA, K., MORISHIMA, K., NAKAMURA, M. & UMEDA, N. 2010. Bio rapid prototyping by extruding/aspirating/refilling thermoreversible hydrogel. *Biofabrication*, 2, 014108.
- JAKLENEC, A., STAMP, A., DEWEERD, E., SHERWIN, A. & LANGER, R. 2012. Progress in the tissue engineering and stem cell industry "are we there yet?". *Tissue Eng Part B Rev*, 18, 155-66.

- KARAA, A., HAAS, R., GOLDSTEIN, A., VOCKLEY, J., WEAVER, W. D. & COHEN, B. H. 2018. Randomized dose-escalation trial of elamipretide in adults with primary mitochondrial myopathy. *Neurology*, 90, e1212-e1221.
- KASIMIR, M. T., RIEDER, E., SEEBACHER, G., SILBERHUMER, G., WOLNER, E., WEIGEL, G. & SIMON, P. 2003. Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. *Int J Artif Organs*, 26, 421-7.
- KHADEMHOSEINI, A., ENG, G., YEH, J., KUCHARCZYK, P. A., LANGER, R., VUNJAK-NOVAKOVIC, G. & RADISIC, M. 2007. Microfluidic patterning for fabrication of contractile cardiac organoids. *Biomed Microdevices*, 9, 149-57.
- KOROSSIS, S. A., BOOTH, C., WILCOX, H. E., WATTERSON, K. G., KEARNEY, J. N., FISHER, J. & INGHAM, E. 2002. Tissue engineering of cardiac valve prostheses II: biomechanical characterization of decellularized porcine aortic heart valves. *J Heart Valve Dis*, 11, 463-71.
- KROPP, B. P., EPPLEY, B. L., PREVEL, C. D., RIPPY, M. K., HARRUFF, R. C., BADYLAK, S. F., ADAMS, M. C., RINK, R. C. & KEATING, M. A. 1995. Experimental assessment of small intestinal submucosa as a bladder wall substitute. *Urology*, 46, 396-400.
- LANGER, R. & VACANTI, J. P. 1993. Tissue engineering. *Science*, 260, 920-6.
- LIN, P., CHAN, W. C., BADYLAK, S. F. & BHATIA, S. N. 2004. Assessing porcine liver-derived biomatrix for hepatic tissue engineering. *Tissue Eng*, 10, 1046-53.
- LU, T. Y., LIN, B., KIM, J., SULLIVAN, M., TOBITA, K., SALAMA, G. & YANG, L. 2013. Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells. *Nat Commun*, 4, 2307.
- LUNDGREN, E., TERRACIO, L., MÅRDH, S. & BORG, T. K. 1985. Extracellular matrix components influence the survival of adult cardiac myocytes in vitro. *Exp Cell Res*, 158, 371-81.
- MARTIN, G. R. & KLEINMAN, H. K. 1985. The extracellular matrix in development and in disease. *Semin Liver Dis*, 5, 147-56.

- MIRONOV, V., KASYANOV, V. A., YOST, M. J., VISCONTI, R., TWAL, W., TRUSK, T., WEN, X., OZOLANTA, I., KADISHS, A., PRESTWICH, G. D., TERRACIO, L. & MARKWALD, R. R. 2006. Cardiovascular tissue engineering I. Perfusion bioreactors: a review. *J Long Term Eff Med Implants*, 16, 111-30.
- MORRISSEY, J., MESQUITA, F. C. P., HOCHMAN-MENDEZ, C. & TAYLOR, D. A. 2022. Whole Heart Engineering: Advances and Challenges. *Cells Tissues Organs*, 211, 395-405.
- MURPHY, S. V., SKARDAL, A. & ATALA, A. 2013. Evaluation of hydrogels for bio-printing applications. *J Biomed Mater Res A*, 101, 272-84.
- NAKAYAMA, K. H., BATCHELDER, C. A., LEE, C. I. & TARANTAL, A. F. 2010. Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering. *Tissue Eng Part A*, 16, 2207-16.
- NG, S. L., NARAYANAN, K., GAO, S. & WAN, A. C. 2011. Lineage restricted progenitors for the repopulation of decellularized heart. *Biomaterials*, 32, 7571-80.
- OHATA, K. & OTT, H. C. 2020. Human-scale lung regeneration based on decellularized matrix scaffolds as a biologic platform. *Surg Today*, 50, 633-643.
- ORGANSPENDE, D. S. Jahresbericht Organspende und Transplantationen, Seite 82, 2021.
- OTT, H. C., CLIPPINGER, B., CONRAD, C., SCHUETZ, C., POMERANTSEVA, I., IKONOMOU, L., KOTTON, D. & VACANTI, J. P. 2010. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat Med*, 16, 927-33.
- OTT, H. C., MATTHIESEN, T. S., GOH, S. K., BLACK, L. D., KREN, S. M., NETOFF, T. I. & TAYLOR, D. A. 2008. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med*, 14, 213-21.
- PETERSEN, T. H., CALLE, E. A., ZHAO, L., LEE, E. J., GUI, L., RAREDON, M. B., GAVRILOV, K., YI, T., ZHUANG, Z. W., BREUER, C., HERZOG, E. & NIKLASON, L. E. 2010. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science*, 329, 538-41.

- RIEDER, E., KASIMIR, M. T., SILBERHUMER, G., SEEBACHER, G., WOLNER, E., SIMON, P. & WEIGEL, G. 2004. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 127, 399-405.
- ROBERTSON, M. J., DRIES-DEVLIN, J. L., KREN, S. M., BURCHFIELD, J. S. & TAYLOR, D. A. 2014. Optimizing recellularization of whole decellularized heart extracellular matrix. *PLoS One*, 9, e90406.
- ROSS, E. A., WILLIAMS, M. J., HAMAZAKI, T., TERADA, N., CLAPP, W. L., ADIN, C., ELLISON, G. W., JORGENSEN, M. & BATICH, C. D. 2009. Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded into kidney scaffolds. *J Am Soc Nephrol*, 20, 2338-47.
- SABETKISH, S., KAJBAFZADEH, A. M., SABETKISH, N., KHORRAMIROUZ, R., AKBARZADEH, A., SEYEDIAN, S. L., PASALAR, P., ORANGIAN, S., BEIGI, R. S., ARYAN, Z., AKBARI, H. & TAVANGAR, S. M. 2015. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix liver scaffolds. *J Biomed Mater Res A*, 103, 1498-508.
- SCARRITT, M. E., PASHOS, N. C. & BUNNELL, B. A. 2015. A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs. *Front Bioeng Biotechnol*, 3, 43.
- SCHMIDT, C. E. & BAIER, J. M. 2000. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials*, 21, 2215-31.
- SHOR, L., GÜÇERİ, S., CHANG, R., GORDON, J., KANG, Q., HARTSOCK, L., AN, Y. & SUN, W. 2009. Precision extruding deposition (PED) fabrication of polycaprolactone (PCL) scaffolds for bone tissue engineering. *Biofabrication*, 1, 015003.
- SONG, J. J., GUYETTE, J. P., GILPIN, S. E., GONZALEZ, G., VACANTI, J. P. & OTT, H. C. 2013. Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney. *Nat Med*, 19, 646-51.
- SONG, J. J., KIM, S. S., LIU, Z., MADSEN, J. C., MATHISEN, D. J., VACANTI, J. P. & OTT, H. C. 2011. Enhanced in vivo function of bioartificial lungs in rats. *Ann Thorac Surg*, 92, 998-1005; discussion 1005-6.

- TANG-QUAN, K. R., MEHTA, N. A., SAMPAIO, L. C. & TAYLOR, D. A. 2018. Whole Cardiac Tissue Bioscaffolds. *Adv Exp Med Biol*, 1098, 85-114.
- TAYLOR, D. A. 2019. The Future of Tissue Engineering in Heart Transplantation. *Tex Heart Inst J*, 46, 73-74.
- TAYLOR, D. A., FRAZIER, O. H., ELGALAD, A., HOCHMAN-MENDEZ, C. & SAMPAIO, L. C. 2018. Building a Total Bioartificial Heart: Harnessing Nature to Overcome the Current Hurdles. *Artif Organs*, 42, 970-982.
- UCHIMURA, E., SAWA, Y., TAKETANI, S., YAMANAKA, Y., HARA, M., MATSUDA, H. & MIYAKE, J. 2003. Novel method of preparing acellular cardiovascular grafts by decellularization with poly(ethylene glycol). *J Biomed Mater Res A*, 67, 834-7.
- UYGUN, B. E., PRICE, G., SAEDI, N., IZAMIS, M. L., BERENDSEN, T., YARMUSH, M. & UYGUN, K. 2011. Decellularization and recellularization of whole livers. *J Vis Exp*.
- UYGUN, B. E., SOTO-GUTIERREZ, A., YAGI, H., IZAMIS, M. L., GUZZARDI, M. A., SHULMAN, C., MILWID, J., KOBAYASHI, N., TILLES, A., BERTHIAUME, F., HERTL, M., NAHMIAS, Y., YARMUSH, M. L. & UYGUN, K. 2010. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med*, 16, 814-20.
- VACANTI, J. P., MORSE, M. A., SALTZMAN, W. M., DOMB, A. J., PEREZ-ATAYDE, A. & LANGER, R. 1988. Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J Pediatr Surg*, 23, 3-9.
- WEYMANN, A., PATIL, N. P., SABASHNIKOV, A., JUNGEBLUTH, P., KORKMAZ, S., LI, S., VERES, G., SOOS, P., ISHTOK, R., CHAIMOW, N., PÄTZOLD, I., CZERNY, N., SCHIES, C., SCHMACK, B., POPOV, A. F., SIMON, A. R., KARCK, M. & SZABO, G. 2014. Bioartificial heart: a human-sized porcine model--the way ahead. *PLoS One*, 9, e111591.
- WHO Cardiovascular diseases (CVDs) 2021. *Annual report 2021*.
- WHO WHO Framework Convention on Tobacco Control.

WHO WHO Global NCD Action Plan 2013-2020. *resolution (WHA66.10)*.

WOODS, T. & GRATZER, P. F. 2005. Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft. *Biomaterials*, 26, 7339-49.

## 6 Anlage

### *Übersicht*

- Gesamt-Übersicht Hauptversuche (n=12)
- Exemplarische Übersicht Vorversuche

## Gesamt-Übersicht Hauptversuche (n=12)

| Besiedlungen                                    | Zellen        | Herzen | Kultivierung | Zellen   |          | Proben         | Histologie | PCR | Live/Dead-Assay |
|-------------------------------------------------|---------------|--------|--------------|----------|----------|----------------|------------|-----|-----------------|
|                                                 |               |        |              |          |          |                |            |     |                 |
|                                                 |               |        |              | HUVECs   | CMCs     |                |            |     |                 |
| 1. Co-Besiedlung                                | HUVECs + CMCs | H1     | Perfundiert  | 2,5 Mio. | > 5 Mio. | B1H1 LV/RV/S/A | ja         | ja  | ja (RV)         |
|                                                 |               | H2     | Perfundiert  | 2,5 Mio. | > 5 Mio. | B1H2 LV/RV/S/A | ja         | ja  | ja (RV)         |
|                                                 |               | H3     | Statisch     | 2,5 Mio. | > 5 Mio. | B1H3 LV/RV/S/A | ja         | ja  | ja (RV)         |
|                                                 |               | H4     | Statisch     | 2,5 Mio. | > 5 Mio. | B1H4 LV/RV/S/A | ja         | ja  | ja (RV)         |
|                                                 |               |        |              |          |          |                |            |     |                 |
| 2. Co-Besiedlung                                | HUVECs + CMCs | H1     | Perfundiert  | 2,5 Mio. | > 5 Mio. | B2H1 LV/RV/S/A | ja         | ja  | ja (LV)         |
|                                                 |               | H2     | Perfundiert  | 2,5 Mio. | > 5 Mio. | B2H2 LV/RV/S/A | ja         | ja  | ja (RV)         |
|                                                 |               | H3     | Statisch     | 2,5 Mio. | > 5 Mio. | B2H3 LV/RV/S/A | ja         | ja  | ja (RV)         |
|                                                 |               | H4     | Statisch     | 2,5 Mio. | > 5 Mio. | B2H4 LV/RV/S/A | ja         | ja  | ja (LV)         |
|                                                 |               |        |              |          |          |                |            |     |                 |
| 3. Co-Besiedlung                                | HUVECs + CMCs | H1     | Perfundiert  | 2,5 Mio. | > 5 Mio. | B3H1 LV/RV/S/A | ja         | ja  | ja (LV)         |
|                                                 |               | H2     | Perfundiert  | 2,5 Mio. | > 5 Mio. | B3H2 LV/RV/S/A | ja         | ja  | ja (LV)         |
|                                                 |               | H3     | Statisch     | 2,5 Mio. | > 5 Mio. | B3H3 LV/RV/S/A | ja         | ja  | ja (LV)         |
|                                                 |               | H4     | Statisch     | 2,5 Mio. | > 5 Mio. | B3H4 LV/RV/S/A | ja         | ja  | ja (LV)         |
|                                                 |               |        |              |          |          |                |            |     |                 |
| HUVECs = Human Umbilical Vein Endothelial Cells |               |        |              |          |          |                |            |     |                 |
| CMCs = Cardiomyocytes                           |               |        |              |          |          |                |            |     |                 |
| B1 = Besiedlung 1                               |               |        |              |          |          |                |            |     |                 |
| H1 = Herz 1                                     |               |        |              |          |          |                |            |     |                 |
| LV = Linker Ventrikel                           |               |        |              |          |          |                |            |     |                 |
| RV = Rechter Ventrikel                          |               |        |              |          |          |                |            |     |                 |
| S = Septum                                      |               |        |              |          |          |                |            |     |                 |
| A = Apex                                        |               |        |              |          |          |                |            |     |                 |

## Exemplarische Übersicht Vorversuche

| Besiedlung                           | Woche | Art der Besiedlung | Zellen       | Zellen Konzentration                | Kultivierung | Dauer  | LD-Assay          | Histo     |
|--------------------------------------|-------|--------------------|--------------|-------------------------------------|--------------|--------|-------------------|-----------|
|                                      |       |                    |              |                                     |              |        |                   |           |
| 1. Besiedlung (V1 H1+2)              | 3     | Gefäß              | HUVECs       | 500.000/ml x 5ml                    | Nur MW       | 7 Tage | ok (nach 8 Tagen) | ok (S)    |
| 2. Besiedlung (V2 H1+2)              | 4     | Gefäß              | HUVECs       | 500.000/ml x 5ml                    | Perfusion    | 6 Tage | ok (nach 7 Tagen) | ok (S)    |
| 3. Besiedlung (V3 H1+2)              | 5     | Gefäß              | 3T3          | 500.000/ml x 5ml                    | Perfusion    | 5 Tage | ok (nach 5 Tagen) | /         |
| 4. Besiedlung (V4 H1-4)              | 6     | Gefäß              | 3T3          | 500.000/ml x 5ml                    | Perfusion    | 8 Tage | ok (nach 8 Tagen) | Cryoblock |
| 5. Besiedlung (V5 H1+2)              | 6     | Interstitiell      | 3T3          | 5 Mio/ml x 1ml                      | Perfusion    | 4 Tage | ok (nach 4 Tagen) | Cryoblock |
| 6. Besiedlung (V6 H1+2)              | 8     | Co-Kultur          | HUVECs + 3T3 | 500.000/ml x 5ml + 5 Mio/ml x 1ml   | Perfusion    | 2 Tage |                   |           |
| 7. Besiedlung (V7 H1+2)              | 9     | Co-Kultur          | HUVECs + 3T3 | 500.000/ml x 5ml + 500.000/ml x 5ml | MW           | 1 Tag  | /                 | /         |
| 8. Besiedlung (V8 H1+2)              | 10    | Co-Kultur          | HUVECs + 3T3 | 500.000/ml x 5ml + 5 Mio/ml x 1ml   | MW           | 2 Tag  | geplant Fr        | geplant   |
| Besiedlungs-Variablen:               |       |                    |              |                                     |              |        |                   |           |
| Konzentration                        |       |                    |              |                                     |              |        |                   |           |
| Medium (EC oder 3T3 oder beides?)    |       |                    |              |                                     |              |        |                   |           |
| Dauer der Betreuung (Perfundierung?) |       |                    |              |                                     |              |        |                   |           |

## Danksagung

Zunächst möchte ich Univ.-Prof. Dr. med. Lichtenberg, Direktor der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie, danken für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit durchführen zu können, für die Unterstützung und das rege Interesse an dieser Forschungsarbeit.

Ganz besonders möchte ich meinem Doktorvater und wissenschaftlichem Betreuer PD Dr. med. Hug Aubin danken, für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung des Dissertationsthemas, das Forschungskonzept, die Möglichkeit diese Arbeit durchführen zu können und nur mit dessen Hilfe diese Arbeit möglich war. Von ganzem Herzen möchte ich danken für die immer fortwährende Unterstützung und Geduld, die intensive Betreuung, die wertvollen Ratschläge, den Weitblick, die Inspiration, die Freiräume und das freundschaftliche und vor allem wertschätzende Verhältnis.

Besonders möchte ich mich auch bei Univ.-Prof. Dr. med. Payam Akhyari bedanken, der mir als Laborleiter und Leiter der Forschungsgruppe für Experimentelle Chirurgie die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und diese Arbeit ermöglicht hat. Ich möchte mich bedanken für die ständige Unterstützung, die Hilfestellungen, zahlreichen Ratschläge und Diskussionen.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors der Experimentellen Chirurgie bedanken, insbesondere bei Dr. rer. nat. Jörn Hülsmann für die umfassende Einarbeitung in zahlreiche der Arbeit zu Grunde liegenden Methoden, insbesondere der Dezellularisierung, Dr. rer. nat. Jessica Selig für die Einarbeitung in der Zellkultur und Gisela Müller für die Unterstützung als medizinisch-technische Assistentin.

Zudem möchte ich allen Mitdoktoranden im Labor der Experimentellen Chirurgie für die Hilfsbereitschaft und die kurzweiligen Stunden danken, insbesondere Dr. med. Nicolas Schütterle für die uneigennützige umfassende Einarbeitung in das Thema und die Zeit, die Methoden weiterzugeben, Dr. med. Lenard Rath für die Vermittlung dieser Arbeit, Dr. med. Moritz Immohr, Dr. med. Felix Burghard, Dr. med. Karina Baier und Meike Steinbrink.

Zu guter Letzt und von ganzem Herzen möchte ich meiner Familie Prof. Dr. Wolfgang Wehrmann, Dr. Ottilie Rödder-Wehrmann und Dr. Julian Wehrmann für ihre unermüdliche Unterstützung und unendliche Liebe danken.