

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie

Direktor Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen

Development of a Biological Ventricular Assist Device: Preliminary Data From a Small Animal Model

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Yalin Yildirim aus Marburg

Hamburg 2013

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 09.09.2013**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. med. Ali Aydin

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. med. Hermann Reichensperner

Development of a Biological Ventricular Assist Device : Preliminary Data From a Small Animal Model

Yalin Yildirim, Hiroshi Naito, Michael Didié, Bijoy Chandapillai Karikkineth, Daniel Biermann, Thomas Eschenhagen and Wolfram-Hubertus Zimmermann

Circulation. 2007;116:I-16-I-23

doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.679688

Circulation is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231

Copyright © 2007 American Heart Association, Inc. All rights reserved.

Print ISSN: 0009-7322. Online ISSN: 1524-4539

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

http://circ.ahajournals.org/content/116/11_suppl/I-16

Data Supplement (unedited) at:

http://circ.ahajournals.org/content/suppl/2007/09/10/116.11_suppl.I-16.DC1.html

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Circulation* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

Reprints: Information about reprints can be found online at:

<http://www.lww.com/reprints>

Subscriptions: Information about subscribing to *Circulation* is online at:

<http://circ.ahajournals.org/subscriptions/>

Development of a Biological Ventricular Assist Device

Preliminary Data From a Small Animal Model

Yalin Yildirim, BS*; Hiroshi Naito, MD*; Michael Didié, MD; Bijoy Chandapillai Karikkineth, MD; Daniel Biermann, BS; Thomas Eschenhagen, MD; Wolfram-Hubertus Zimmermann, MD

Background—Engineered heart tissue (EHT) can be generated from cardiomyocytes and extracellular matrix proteins and used to repair local heart muscle defects in vivo. Here, we hypothesized that pouch-like heart muscle constructs can be generated by using a novel EHT-casting technology and applied as heart-embracing cardiac grafts in vivo.

Methods and Results—Pouch-like EHTs (inner/outer diameter: 10/12 mm) can be generated mainly from neonatal rat heart cells, collagen type I, and serum containing culture medium. They contain a dense network of connexin 43 interconnected cardiomyocytes and an endo-/epicardial surface lining composed of polyhydroxylase positive cells. Pouch-like EHTs beat spontaneously and show contractile properties of native heart muscle including positive inotropic responses to calcium and isoprenaline. First implantation studies indicate that pouch-like EHTs can be slipped over uninjured adult rat hearts to completely cover the left and right ventricles. Fourteen days after implantation, EHT-grafts stably covered the epicardial surface of the respective hearts. Engrafted EHTs were composed of matrix and differentiated cardiac muscle as well as newly formed vessels which were partly donor-derived.

Conclusions—Pouch-like EHTs can be generated with structural and functional properties of native myocardium. Implantation studies demonstrated their applicability as cardiac muscle grafts, setting the stage for an evaluation of EHT-pouches as biological ventricular assist devices in vivo. (*Circulation*. 2007;116[suppl I]:I-16–I-23.)

Key Words: tissue engineering ■ myocardium ■ cardiomyocyte ■ regeneration ■ transplantation

Repairing the damaged heart is one of the major challenges in modern medicine. To this end, cardiac tissue engineers attempt to develop technologies that may allow to refurbish failing myocardium with new muscle.^{1,2} Therapeutically applied artificial myocardium would have to fulfill at least 2 biological functions: (1) it must stabilize the failing heart to prevent further dilation and (2) it must add contractile elements to the heart to improve its systolic function. Passive ventricular restraint devices (eg, CorCap Cardiac Support Device; Acorn Cardiovascular Inc) have been applied to stop adverse left ventricular remodelling and dilation in failing hearts.³ Yet, the widespread use of CorCap Cardiac Support Devices (CSD) has recently been stopped by the US Food and Drug Administration (FDA) despite positive trials in Europe and North America because of safety concerns. Indeed, pericardial constriction may occur in patients with CSD devices necessitating reoperations that are technically challenging.⁴ Another caveat pertaining to the cardiac restraint approach is the lack of intrinsic contractility in the latter. Thus, development of a CSD that may not only offer restraint but also reintroduce contractile elements, ie, cardiomyocytes, into failing hearts may eventually lead to a novel therapeutic perspective in end-stage heart failure.

Several groups have generated heart muscle constructs with functional and morphological properties of native myocardium in vitro (see overview in Eschenhagen and Zimmermann, 2005).¹ Implantation studies in a rat model of myocardial infarction provided first proof-of-concept for a therapeutic application of engineered heart tissue (EHT) in vivo.⁵ Most tissue engineering studies have focused on the repair of regional myocardial defects, eg, after myocardial infarction, and not on offering passive (restraint) and active (contractility) support to the entire failing heart. We and others have recently reported modifications of established cardiac tissue engineering technologies to generate complex myocardial constructs with different geometries including contractile tubes and muscle networks to support failing hearts.^{6,7} Here, we propose a novel technology to generate EHT with a pouch-like geometry that may ultimately offer restraint and contractile support as biological ventricular assist device (BioVAD) in vivo. Consequently, our study had 2 objectives: (1) to develop a technology allowing the construction of myocardial pouches and (2) to investigate the applicability of these constructs as cardiac muscle grafts in adult rats.

From the Institute of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany.

*Y.Y. and H.N. contributed equally to this work.

Presented at the American Heart Association Scientific Sessions, Chicago, Ill, November 12–15, 2006.

Correspondence to Wolfram-Hubertus Zimmermann, MD, Institute of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20246 Hamburg, Germany. E-mail w.zimmermann@uke.uni-hamburg.de

© 2007 American Heart Association, Inc.

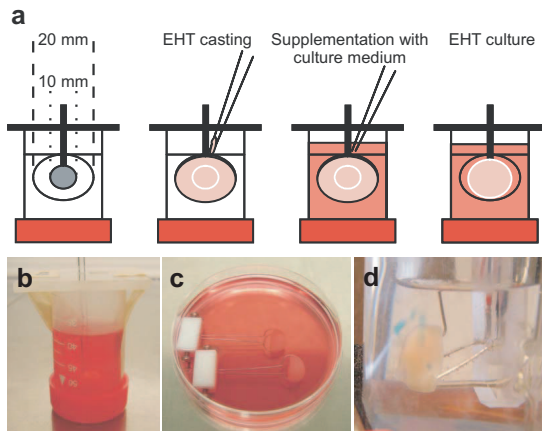


Figure 1. Assembly of a casting mold and culture of pouch-like EHT. a, Schematic drawing of a casting mold and the EHT casting procedure. b, Photograph of a culture medium-filled casting mold with an EHT on culture day 3. c, Pouch-like EHTs on resiliently based stretch devices to facilitate auxotonic contractions (culture days 7 to 12). d, Pouch-like EHT in an organ bath during force measurement (culture day 12).

Methods and Materials

All procedures were approved by the local animal protection authority (BWG of the Freie und Hansestadt Hamburg: #54/04) and conformed to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH publication 86–23, revised 1996).

Cell Isolation

Cardiomyocytes were isolated from neonatal Wistar rats (postnatal day 0 to 3) by a fractionated DNase/Trypsin digestion protocol as described earlier.⁸ The resulting cell population (50% cardiomyocytes/50% nonmyocytes⁶) was immediately subjected to EHT generation.

Construction of a Novel Casting Mold to Engineer Pouch-Like EHT

We developed a novel casting mold for the construction of pouch-like EHTs (Figure 1). Briefly, the pointed tip of a sterile 50 mL polypropylene tube with a screw cap (#62.547.004; Sarstedt) was cut off under sterile conditions. The tube was inverted to form the base for a casting mold. We subsequently filled the latter with sterile agarose (1% in 0.9% NaCl), inserted a spheric glass spacer (diameter: 20 mm; $\approx 4.200 \mu\text{L}$) connected to a shaft (diameter: 2 mm), and allowed the agarose to solidify around the spacer. Removal of the glass spacer created a ball-shaped recess inside the agarose block. We then inserted another spheric glass spacer (diameter: 10 mm; $\approx 520 \mu\text{L}$) with a shaft (diameter: 2 mm) into the recess to construct a casting mold with an outer diameter of 20 mm and an inner diameter of 10 mm. All steps were performed under sterile conditions.

Generation of Pouch-Like EHT

3.7 mL EHT reconstitution mixture containing 10×10^6 freshly isolated neonatal rat heart cells, solubilized collagen type I (0.8 mg/mL), Matrigel (10% v/v), and concentrated culture medium ($2 \times$ DMEM, 20% horse serum, 4% chick embryo extract, 200 U/mL penicillin, 200 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin) were cast into the spherical mold. EHTs were incubated for 1 hour at 37°C in a humidified cell culture incubator (10% CO_2 and 40% O_2 in room air) to facilitate hardening of the reconstitution mixture. Subsequently, culture medium (DMEM, 10% horse serum, 2% chick embryo extract, 100 U/mL penicillin, and 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin) was carefully added to not disturb the reconstitution mixture. The porous agarose mold facilitated free diffusion of culture medium enabling unrestricted

supply with nutrients and oxygen. EHTs condensed within 3 to 7 days around the central spacer and started to contract spontaneously. Beating EHTs were transferred onto flexible holders to facilitate auxotonic contractions on culture day 7. Morphological and contractile properties of pouch-like EHTs were studied after 12 to 14 culture days.

Force Measurements

Force of contraction (twitch tension [TT]), resting tension (RT), and relaxation time (T2: time to 50% relaxation) of pouch-like EHTs were analyzed under electrical stimulation (2 Hz) in thermostated (37°C) organ baths filled with Tyrode's solution (mM: NaCl 120, KCl 5.4, MgCl_2 1, CaCl_2 0.2 to 2.8, NaH_2PO_4 0.4, NaHCO_3 22.6, glucose 5, Na_2EDTA 0.05, ascorbic acid 0.3) as previously described.⁸ Inotropic and lusitropic responses to calcium (0.2 to 2.8 mmol/L), isoprenaline (0.1 to 1000 nmol/L), and carbachol (1 $\mu\text{mol/L}$ at maximal isoprenaline) were analyzed as described earlier.⁹

Morphological Evaluation of EHT

Formaldehyde-fixed EHTs were sectioned or processed as whole mounts for light or confocal laser scanning microscopy as described previously.⁹ Hematoxylin and eosin (H&E) staining was performed as described earlier.⁹ Pico sirius red staining was performed on deparaffinized sections in saturated picric acid for 1 hour. Dehydrated sections were mounted in Eukitt (Sigma) after washing in acidified water (5 mL/L acidic acid). Antibodies directed against α -sarcomeric actinin (1:1000; clone: EA-53, Sigma) and β -prolyl-4-hydroxylase (1:500; clone: 6-9H6, Chemicon) were used with appropriate secondary antibodies to identify cardiomyocytes and fibroblasts in EHTs, respectively. Phalloidin-Alexa 488 (3.3 U/mL; Sigma) and *Bandeiraea simplicifolia* lectin-TRITC (10 $\mu\text{g/mL}$; Sigma) were used to mark f-actin and endothelial cells, respectively. EHTs were labeled with DAPI (1 $\mu\text{g/mL}$; Molecular Probes) before implantation to facilitate donor cell identification as described previously.⁵ DRAQ5 (5 $\mu\text{mol/L}$; Alexis Biochemicals) was applied to label nuclei in EHT sections. Confocal laser scanning microscopy was performed with a Zeiss LSM 510 META system.

EHT Implantation

EHTs were implanted in male Wistar rats ($n=16$; 300 to 350 g; Charles River). Anesthesia was induced in an induction chamber filled with isoflurane (4%) and maintained after intubation and continuous ventilation with isoflurane (1%) supplemented room air throughout the surgery as described earlier.⁵ The thoracic cavity was opened through a left lateral thoracotomy. The hearts were exposed after excision of the pericardium. Pouch-like EHTs were slipped over the entire left and right ventricles from apex to the base of the hearts and fixed with 2 sutures (6–0 Prolene, Ethicon) at the anterior and lateral base of the beating hearts. Tardomyocel (12 500 IU penicillin/kg and 15.5 mg streptomycin/kg, intramuscular injection; Bayer) and buprenorphine hydrochloride (0.1 mg/kg, intraperitoneal injection) were applied during surgery. Cyclosporine A (5 mg/kg), azathioprine (2 mg/kg), and methylprednisolone (2 mg/kg) were administered daily by subcutaneous injection for immune suppression. Apparent signs of immune rejection or inflammatory responses were not observed.

Statistical Analysis

Data are presented as mean $\pm$ SE of the mean. Statistical differences were determined using a repeated ANOVA (concentration response curves) or 1-way ANOVA with Bonferroni post hoc testing (analysis of relaxation times). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Statement of Responsibility

The authors had full access to the data and take full responsibility for its integrity. All authors have read and agree to the manuscript as written.

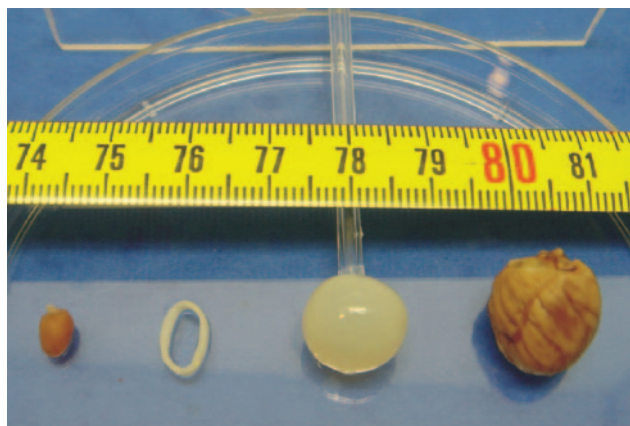


Figure 2. Dimensions of pouch-like EHT. Comparison of the dimensions of a neonatal rat heart, a standard circular EHT, a pouch-like EHT on a glass spacer, and an adult rat heart (from left to right). Scale in cm.

Results

Construction of Pouch-Like EHT

EHTs condensed within 3 to 7 days in the spherical casting molds around central glass spacers forming pouch-like constructs with an inner diameter of 10 and an outer diameter of 12 mm (corresponding to a “wall thickness” of ≈ 1 mm). We chose these dimensions to match the size of an adult rat heart (Figure 2). First visible spontaneous contractions of the pouch-like EHTs were noted as early as 2 to 3 days after casting. EHTs maintained their spontaneous contractions (1 to 2 Hz) for at least 14 days (see supplemental video, available online at <http://circ.ahajournals.org>).

Contractile Properties of Pouch-Like EHT

Pouch-like EHTs could be stimulated electrically in a pulsed field (50 to 100 mA, 2 Hz; Figure 3a) and demonstrated a baseline TT of 0.7 ± 0.2 mN at 0.2 mmol/L calcium ($n=4$). Increasing extracellular calcium to 2.8 mmol/L or addition of

1 $\mu\text{mol/L}$ isoprenaline increased TT to 1.2 ± 0.3 mN ($P<0.05$) and 0.9 ± 0.3 mN ($P<0.05$), respectively ($n=4$; Figure 3b and 3c). RT was 0.4 ± 0.1 mN ($n=4$) indicating good compliance (TT/RT ratio >1). T2 was 59 ± 4 ms at baseline calcium (0.2 mmol/L). Isoprenaline shortened T2 to 39 ± 3 ms ($P<0.05$). Addition of the muscarinic agonist carbachol (1 $\mu\text{mol/L}$) reversed the inotropic (data not shown) and lusitropic isoprenaline effects ($n=4$; Figure 3d).

Morphological Properties

Pouch-like EHTs contained a highly interconnected network of differentiated cardiomyocytes (Figure 4). Abundant detection of connexin 43 suggested the formation of an electrical syncytium within EHTs (Figure 4). Notably, the surface of the EHTs was covered by a dense epithelium consisting of prolythylase-positive cells suggesting that fibroblast-like cells formed a pseudoepi-/endocardium (Figure 5).

Implantation Studies

Pouch-like EHTs could be implanted into immune suppressed rats after mobilizing the heart through a left lateral thoracotomy (Figure 6). All animals survived this procedure ($n=16$). Fourteen days after implantation, we could clearly identify the engrafted EHTs on the hearts (Figure 7a). H&E (Figure 7b) and picrosirius red (Figure 7c) staining demonstrated the preservation of the grafts on the epicardial surface of the host hearts. Here, it is important to note that EHTs (in vitro and in vivo) consist of collagen (red stain in Figure 7c) and heart cells (yellow stain in Figure 7c). The latter formed clearly distinguishable muscle aggregates in close proximity to the host myocardium (Figure 7d). Confocal laser scanning analyses indicated that engrafted cardiomyocytes formed loose but differentiated muscle networks (Figure 7e). EHT grafts were mostly separated from the host heart by a cell free gap (≈ 50 to $200 \mu\text{m}$; Figure 7f). In addition, the already in vitro observed epithelial surface lining was still present in some areas (Figure 7g). Yet, H&E (Figure 7d) and confocal laser scanning analyses (Figure 7h) demonstrated that engrafted

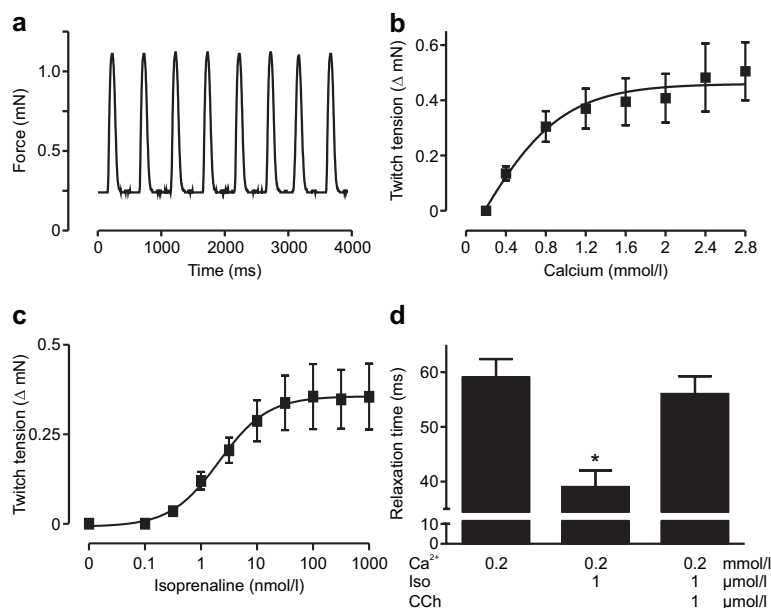


Figure 3. Contractile function of pouch-like EHT. a, Stimulated contractions at 2 Hz. b and c, Inotropic responses of pouch-like EHTs to increasing extracellular calcium (b; absolute TT at baseline: 0.7 ± 0.2 mN) and isoprenaline (c; absolute TT at baseline: 0.6 ± 0.2 mN) concentrations ($n=4$). d, Lusitropic responses of pouch-like EHTs to isoprenaline (Iso) and carbachol (CCh; $n=4$). * $P<0.05$ versus baseline (0.2 mmol/L Calcium).

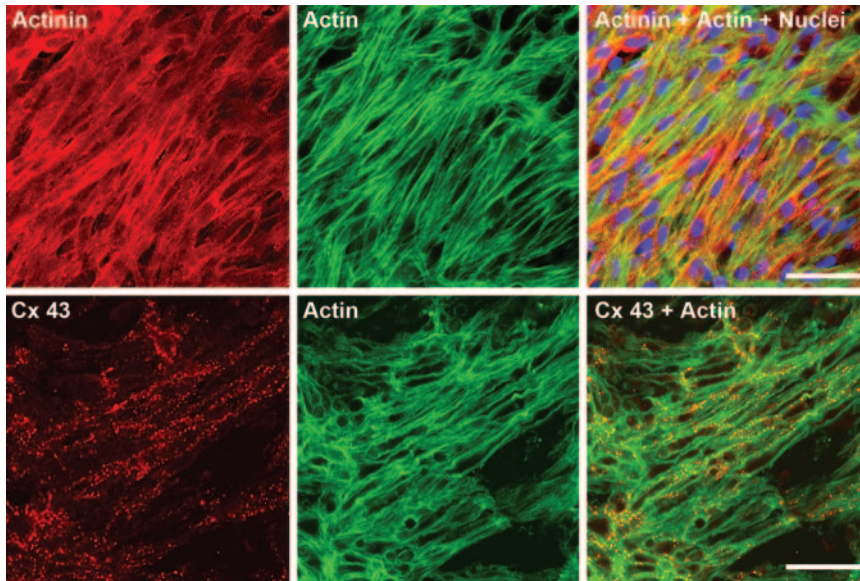


Figure 4. Organization of cardiomyocytes in pouch-like EHTs. Upper panels, Staining of α -sarcomeric actinin (green), f-actin (red), and nuclei (blue; DRAQ5) indicating the formation of a dense differentiated myocyte network in pouch-like EHTs in vitro. Lower panels, Staining of f-actin (green), demonstrating sarcomeric patterning in cardiomyocytes, and connexin 43 protein (Cx 43; red), indicating the formation of gap junctions between the cardiomyocytes in pouch-like EHTs. Bars=50 μ m

muscle also formed intimate contact to the host heart. However, connexin 43 (Cx43) appeared to be less abundant and structured in the border zone comprising host myocardium and graft tissue (Figure 7h) when compared with the remote myocardium (Figure 7i). Importantly, we observed vascularization of implanted EHTs. Many of the newly formed vessels were partially composed of donor cells (DAPI-label; Figure 8).

Discussion

The present study demonstrates (1) the development of pouch-like EHT with structural and functional properties of native myocardium and (2) its applicability as cardiac muscle graft in vivo. Implantation of stem cells or tissue-engineered myocardium are presently tested as new concepts for the treatment of otherwise fatal myocardial defects.^{1,2,10,11} Early studies clearly demonstrated that cardiomyocytes can survive after implantation and integrate into host myocardium.¹² In

contrast, skeletal myoblast, being the first clinically applied cell species in the heart,¹³ cannot electrically couple to host myocytes but still appear to provide some structural support.¹⁴ Recent studies suggested a therapeutic benefit after implantation of bone marrow-derived stem cells in patients with myocardial infarctions.¹⁵ However, these findings were challenged by others.¹⁶

Myocardial tissue engineering has not entered the clinical scene, but encouraging data have recently been derived from animal experiments.^{5,17} We anticipate that first clinical trials will be started once a scalable cell source has been identified that may be clinically applicable and, secondly, when myocardium can be engineered at a size and with functional properties that may offer significant support to failing hearts. Size certainly matters and clinically applicable myocardial grafts must not only be thick (≈ 1 to 10 mm) but also cover a large myocardial area to repair a local defect. Yet, many myocardial diseases do not present with a localized dysfunc-

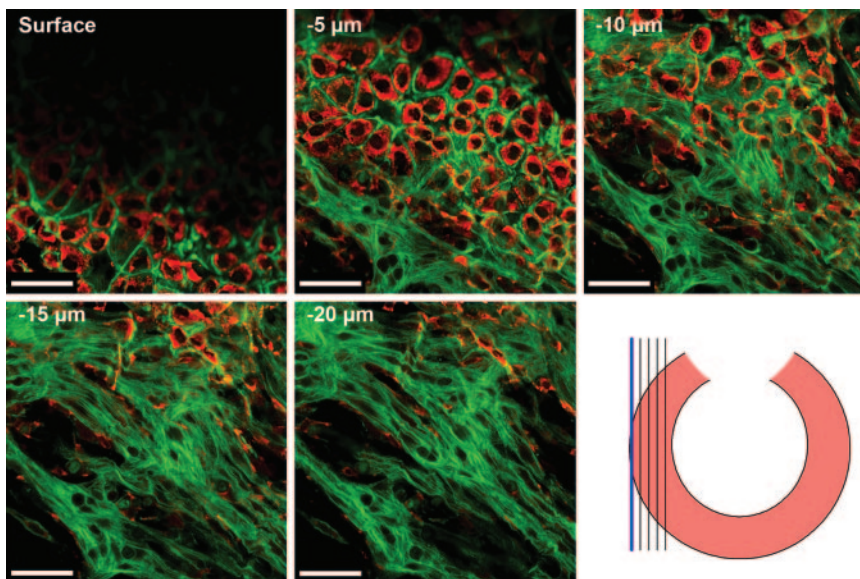


Figure 5. Whole-mount imaging of a pouch-like EHT by confocal laser scanning microscopy. Adjacent planes of a pouch-like EHT stained for f-actin (green) and prolyl-hydroxylase (red) indicated that EHTs were covered by a fibroblast epithelium mimicking an epi-/endocardium-like surface structure. Bars=50 μ m

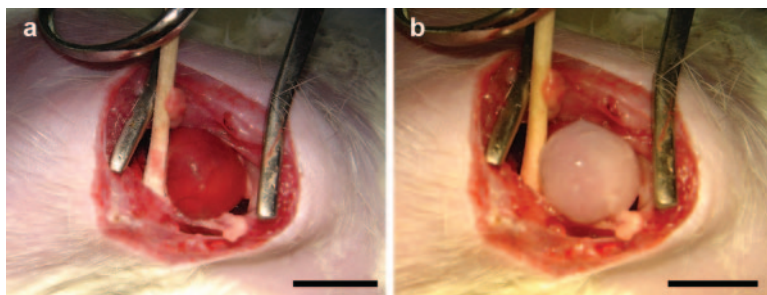


Figure 6. Implantation of a pouch-like EHT. a, Mobilization of an adult rat heart through a left lateral thoracotomy. b, Implantation of a pouch-like EHT onto the same heart. Bars=10 mm

tion but with global ventricular dilation and defects in ventricular systolic shortening. In these patients, implantation of an engineered myocardial pouch may not only stop ventricular enlargement but also offer contractile support to globally failing hearts. Cardiac restraint devices (eg, Acorn

CorCap Device) may prevent dilation but cannot offer active contractile support. In contrast, pouch-like EHTs develop contractile force and can be, although technically demanding, slipped over adult rat hearts to cover the entire ventricular myocardium as presented here. This procedure apparently did

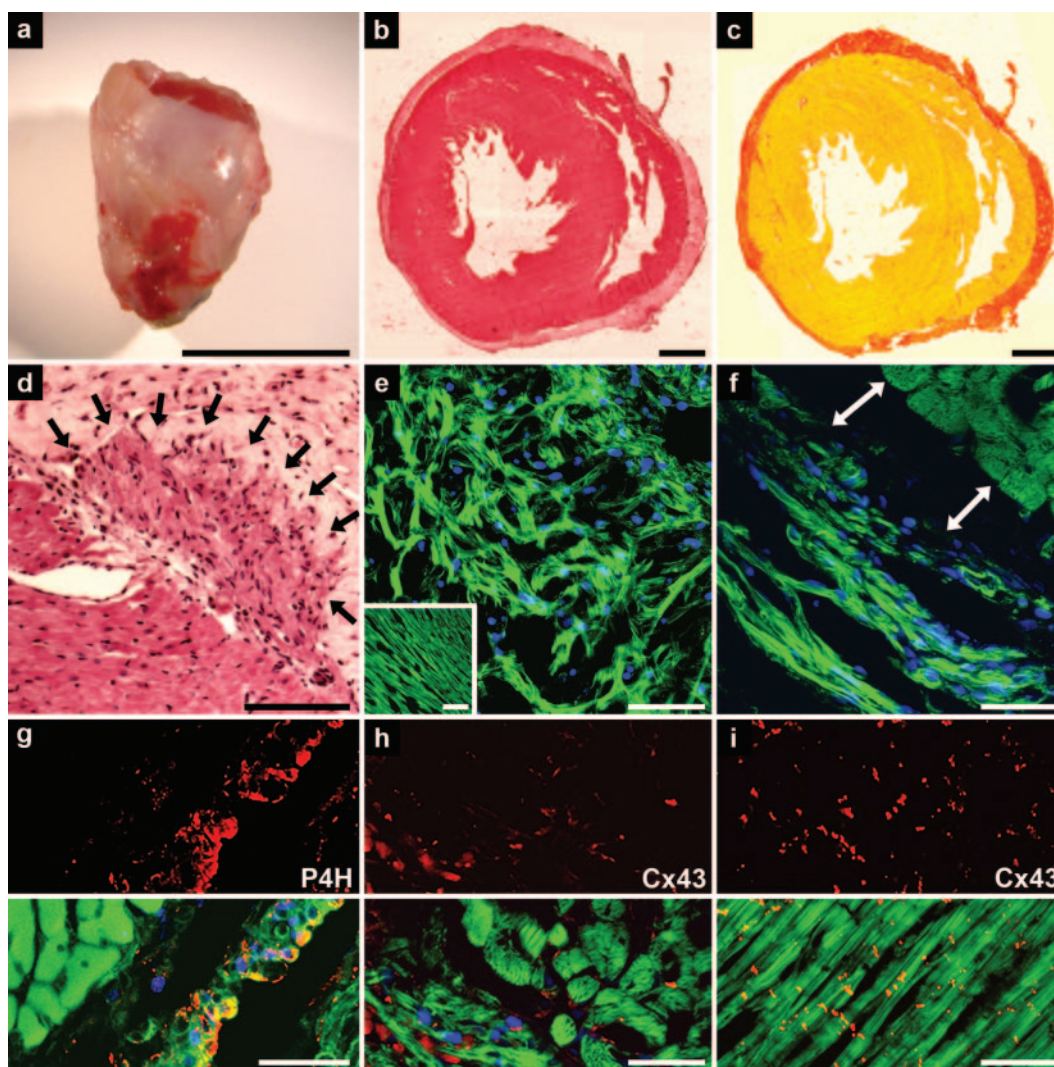


Figure 7. Structure of pouch-like EHTs 14 days after implantation. a, Explanted heart 14 days after implantation of a pouch-like EHT (note that the atria were removed). b, H&E staining of a short axis cross section of a heart with an EHT-graft (adjacent to section in b). c, Pico sirius red staining of a short axis cross section of a heart with an EHT-graft (adjacent to section in b). d, H&E staining of an EHT-graft/host-heart border zone; arrows highlight a cardiomyocyte aggregate within the EHT-graft. e, Cardiomyocyte networks within an engrafted EHT-pouch (actin: green). The DAPI-label (blue nuclei) indicates donor cell origin. DAPI labeled cells were not present in the recipient myocardium (inset). f, Gap (arrows) between EHT-graft and host heart. g, Prollyhydroxylase (P4H: red) positive surface linings of EHT-grafts were partially maintained in vivo. h and i, Connexin 43 (Cx43: red) in the EHT-graft/host heart border zone (h) and within the remote myocardium of the same heart (i). e through i, DAPI label (blue nuclei) indicates EHT-derived cells; f-actin labeled with phalloidin-Alexa 488 (green). Bars=(a) 10 mm, (b and c) 1 mm, (d and e) 100 μ m, (f through i) 50 μ m

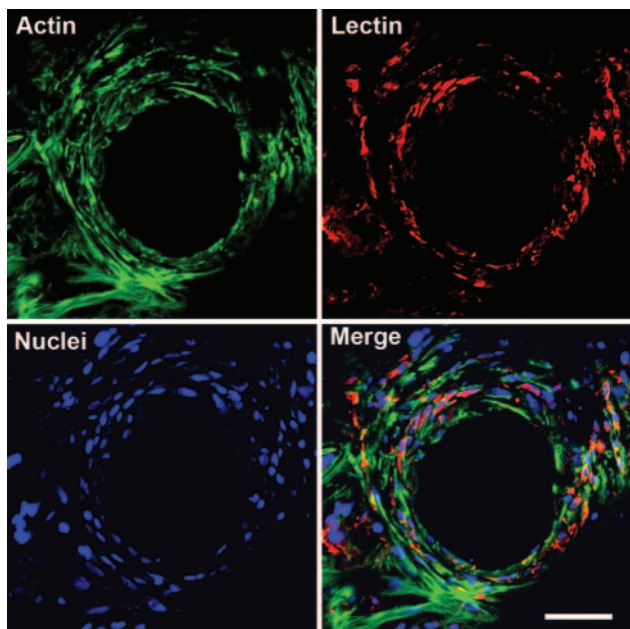


Figure 8. Vessel in pouch-like EHT. Identification of a large vessel in implanted EHT. Green: f-actin; red: lectin; blue: nuclei (DAPI-label indicates host origin of the respective cells). Bars: 50 μ m

not lead to pericardial constriction and was overall well tolerated (all animals survived the procedure and 14-day follow-up). Pouch-like EHTs did not lose their myocardial structure *in vivo* and became vascularized within the observation period (14 days). Vascularization was at least partially supported by donor cells (DAPI-label). This finding was not surprising given the presence of primitive capillaries in EHTs *in vitro*⁶ and the strong vascularization of EHT-grafts in a rat model of myocardial infarction.⁵ However, whether pouch-like EHTs can be applied on dilated ventricles with contractile dysfunction as BioVADs remains to be evaluated.

How do we envision overcoming problems of cell sourcing and graft dimensions? Human stem cells have recently been identified as a putative source for cardiomyocytes.^{18,19} Despite these exciting findings, the allocation of cardiomyocytes in a sufficient number to repair a large myocardial infarct (≈ 1 billion cardiomyocytes will be needed) in a reasonable period of time (days-weeks) remains a paramount task. Genetic selection, induction of cardiomyocyte differentiation by growth factors, and mass culture approaches using bioreactors may allow up-scaling of cardiomyocyte yield, but the feasibility of these approaches has yet to be demonstrated in human stem cell cultures.^{20,21} Moreover, it seems unlikely that cardiomyocytes alone will be sufficient to engineer optimal myocardial surrogate tissue *in vitro*. We have in fact recently demonstrated that EHTs, being equally composed of myocytes and nonmyocytes, are structurally and functionally superior to EHTs constructed from enriched cardiomyocyte populations.⁶ It is very likely that nonmyocytes are necessary for structural and paracrine support *in vitro* but also facilitate cell engraftment and elicit beneficial effects on the recipient myocardium *in vivo*. In contrast to cardiomyocytes, human nonmyocytes can be easily derived from cardiac biopsies or

other autologous cell sources (eg, bone marrow or fat tissue). Once human cells are available for myocardial tissue engineering, it will remain questionable whether they can be assembled to thick heart muscle. The present bottleneck of suboptimal diffusion in thick tissue structures in the absence of vascularization will have to be overcome. Pure muscle structures in tissue engineered myocardium *in vitro* generally do not become thicker than 200 μ m. However, sequential grafting of thin cell-sheets and implantation of star-shaped EHTs, being composed of a dense network of thin muscle strands, have been applied to generate vascularized myocardium with a diameter of up to 1 mm *in vivo*.^{5,22} Pouch-like EHTs were similarly vascularized and contained thick muscle aggregates *in vivo*. However, further improvement of muscle composition is likely to be necessary to confer a significant amount of myocardium to support a failing heart.

Electrical coupling of implanted engineered myocardium to the native myocardium is another important issue. We did previously observe anterograde and retrograde electrical coupling of EHT grafts to infarcted rat hearts.⁵ Whether BioVADs couple similarly well to native myocardium will have to be assessed in more detail in further studies. We regularly observed a cell-free gap of 50 to 200 μ m between EHT graft and native myocardium as well as a preservation of the nonmyocytes surface lining of the EHT pouches *in vivo*. Either finding argues against extensive EHT/host myocardium electrical coupling. However, we did also identify areas of intimate graft-host contacts (Figure 7d) which are likely to facilitate undelayed impulse propagation between host and donor myocardium if proper cell-to-cell contacts are established. The principle propensity of cardiomyocyte grafts to couple to native myocardium has been demonstrated by several groups.^{5,23–25} We could not unequivocally identify gap junction/connexin 43 contacts between EHT grafts and host myocardium. However, coupling through different connexin isoforms or even through electrotonic mechanisms involving myofibroblasts cannot be excluded.²⁶ Although integration of a tissue graft into the host heart appears to be ideal, it may also go along with conduction abnormalities (eg, ectopic beats, conduction delay leading to reentry tachycardia). This may be controllable by parallel application of antiarrhythmic drugs or cardioverter-defibrillators, as performed in patients with myoblast implants,¹⁴ at least until stable electrical contacts are established.^{5,23} Conversely, one might speculate that electrical integration of EHT pouches would not be desirable at all. Instead, EHTs, functioning as BioVADs, could be electrically stimulated through an integrated biological pacemaker or external stimulation to maintain an electrically separate but functionally synchronized entity. The general feasibility of external electrical stimulation of pouch-like EHT grafts has been demonstrated in the present study (contraction experiments).

Contractile performance of pouch-like EHTs was assessed by contraction experiments in the present study. Similar experiments have been conducted previously with circular EHTs and atrial or papillary heart muscle. We have also performed pressure measurements after inserting a Millar-tip catheter through the aperture of an EHT pouch (data not shown). This was principally feasible but unreliable because

of technical difficulties (measurement necessitates closure of the EHT aperture around the catheter which was difficult to achieve). Collectively, circular and pouch-like EHTs as well as native myocardium display similar contractile properties (eg, positive inotropic response to increasing concentrations of extracellular calcium; positive inotropic and lusitropic responses to isoprenaline). In fact, contractile force per EHT muscle cell cross-sectional area ($\approx 12\%$ to 30% of 1 mm^2 total EHT cross section) was 4 to 10 mN/mm^2 under maximal inotropic stimulation in the present study. This is a bit lower than maximal forces of optimal circular EHT cultures (20 to 40 mN/mm^2 ; unpublished data, 2006). Yet, the difference may stem from the uniform organization of muscle bundles in the same plane in circular EHTs versus the more random organization of muscle in pouch-like EHTs. Importantly, maximal force values in EHTs closely resemble optimal forces of papillary muscle preparations.²⁷ However, calcium sensitivity in EHTs is markedly higher when compared with papillary muscle. This may be a consequence of an immature calcium handling machinery in EHTs in vitro. Interestingly, Morritt et al demonstrated recently that in vivo conditioned engineered cardiac muscle, being composed mainly of neonatal rat heart cells and Matrigel, apparently regain physiological calcium handling properties.²⁸ These findings support our own observation that in vitro engineered myocardium is capable of terminal differentiation once the right “growth milieu” is offered.²⁹

Conclusion

The present study provides a new technology to generate pouch-like EHTs that may eventually be applied as BioVADs in vivo. Structure and function of pouch-like EHTs simulate respective properties in naïve myocardium. Implantation studies demonstrate the applicability of pouch-like EHTs in vivo. However, several important issues will have to be addressed before pouch-like EHTs can be considered as a clinically applicable BioVADs concept. These encompass: (1) providing unequivocal evidence for a therapeutic effect of pouch-like EHTs in a clinically relevant heart failure model; (2) identification of a scalable cardiomyocyte source and allocation of cardiomyocytes as well as nonmyocytes to BioVAD engineering; (3) achieving muscle tissue dimensions that may offer significant support to large failing ventricles; and (4) providing solutions to safety concerns (eg, arrhythmia induction, unwanted growth, immunologic incompatibilities).

Sources of Funding

This study was supported by the German Ministry for Education and Research (01GN 0520), the Deutsche Stiftung für Herzforschung (F29/03), the European Union (EUGeneHeart), the Novartis Foundation, and the LeDucq Foundation. Y.Y. was supported by the Werner Otto Stiftung.

Disclosures

The University Medical Center Hamburg-Eppendorf has filed a patent application concerning the BioVAD-technology.

References

- Eschenhagen T, Zimmermann WH. Engineering myocardial tissue. *Circ Res*. 2005;97:1220–1231.
- Zimmermann WH, Didie M, Doker S, Melnychenko I, Naito H, Rogge C, Tiburecy M, Eschenhagen T. Heart muscle engineering: an update on cardiac muscle replacement therapy. *Cardiovasc Res*. 2006;71:419–429.
- Blom AS, Mukherjee R, Pilla JJ, Lowry AS, Yarbrough WM, Mingoia JT, Hendrick JW, Stroud RE, McLean JE, Affuso J, Gorman RC, Gorman JH 3rd, Acker MA, Spinale FG. Cardiac support device modifies left ventricular geometry and myocardial structure after myocardial infarction. *Circulation*. 2005;112:1274–1283.
- Schroder JN, Lima B, Rogers JG, Milano CA. Cardiac transplantation following ACORN CorCap device implantation. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2006;29:848–850.
- Zimmermann WH, Melnychenko I, Wasmeier G, Didie M, Naito H, Nixdorff U, Hess A, Budinsky L, Brune K, Michaelis B, Dhein S, Schwoerer A, Ehmke H, Eschenhagen T. Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nat Med*. 2006;12:452–458.
- Naito H, Melnychenko I, Didie M, Schneiderbanger K, Schubert P, Rosenkranz S, Eschenhagen T, Zimmermann WH. Optimizing engineered heart tissue for therapeutic applications as surrogate heart muscle. *Circulation*. 2006;114:172–178.
- Sekine H, Shimizu T, Yang J, Kobayashi E, Okano T. Pulsatile myocardial tubes fabricated with cell sheet engineering. *Circulation*. 2006;114:187–193.
- Zimmermann WH, Fink C, Kralisch D, Remmers U, Weil J, Eschenhagen T. Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes. *Biotechnol Bioeng*. 2000;68:106–114.
- Zimmermann WH, Schneiderbanger K, Schubert P, Didie M, Munzel F, Heubach JF, Kostin S, Neuhuber WL, Eschenhagen T. Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ Res*. 2002;90:223–230.
- Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest*. 2005;115:572–583.
- Murry CE, Field LJ, Menasche P. Cell-based cardiac repair: reflections at the 10-year point. *Circulation*. 2005;112:3174–3183.
- Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG, Field LJ. Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science*. 1994;264:98–101.
- Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*. 2001;357:279–280.
- Hagege AA, Marolleau JP, Vilquin JT, Alheritiere A, Peyrard S, Duboc D, Abergel E, Messas E, Mousseaux E, Schwartz K, Desnos M, Menasche P. Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: long-term follow-up of the first phase I cohort of patients. *Circulation*. 2006;114:1108–1113.
- Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006;355:1210–1221.
- Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilekke A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Groggaard HK, Bjørnerheim R, Brekke M, Müller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE, Forfang K. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006;355:1199–1209.
- Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S, Mori H. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med*. 2006;12:459–465.
- Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest*. 2001;108:407–414.
- Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, Salio M, Battaglia M, Latronico MV, Coletta M, Vivarelli E, Frati L, Cossu G, Giacomello A. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*. 2004;95:911–921.
- Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest*. 1996;98:216–224.
- Schroeder M, Niebruegge S, Werner A, Willbold E, Burg M, Ruediger M, Field LJ, Lehmann J, Zweigerdt R. Differentiation and lineage selection

- of mouse embryonic stem cells in a stirred bench scale bioreactor with automated process control. *Biotechnol Bioeng*. 2005;92:920–933.
22. Shimizu T, Sekine H, Yang J, Isoi Y, Yamato M, Kikuchi A, Kobayashi E, Okano T. Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues. *Faseb J*. 2006;20:708–710.
 23. Furuta A, Miyoshi S, Itabashi Y, Shimizu T, Kira S, Hayakawa K, Nishiyama N, Tanimoto K, Hagiwara Y, Satoh T, Fukuda K, Okano T, Ogawa S. Pulsatile cardiac tissue grafts using a novel three-dimensional cell sheet manipulation technique functionally integrates with the host heart, in vivo. *Circ Res*. 2006;98:705–712.
 24. Rubart M, Pasumarthi KB, Nakajima H, Soonpaa MH, Nakajima HO, Field LJ. Physiological coupling of donor and host cardiomyocytes after cellular transplantation. *Circ Res*. 2003;92:1217–1224.
 25. Reinecke H, Zhang M, Bartosek T, Murry CE. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts. *Circulation*. 1999;100:193–202.
 26. Gaudesius G, Miragoli M, Thomas SP, Rohr S. Coupling of cardiac electrical activity over extended distances by fibroblasts of cardiac origin. *Circ Res*. 2003;93:421–428.
 27. Hasenfuss G, Mulieri LA, Blanchard EM, Holubarsch C, Leavitt BJ, Ittleman F, Alpert NR. Energetics of isometric force development in control and volume-overload human myocardium: comparison with animal species. *Circ Res*. 1991;68:836–846.
 28. Morritt AN, Bortolotto SK, Dilley RJ, Han X, Kompa AR, McCombe D, Wright CE, Itescu S, Angus JA, Morrison WA. Cardiac tissue engineering in an in vivo vascularized chamber. *Circulation*. 2007;115:353–360.
 29. Zimmermann WH, Didie M, Wasmeier GH, Nixdorff U, Hess A, Melnychenko I, Boy O, Neuhuber WL, Weyand M, Eschenhagen T. Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats. *Circulation*. 2002;106:1151–1157.

Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen. Auch in Zukunft ist trotz einer Verbesserung pharmakologischer, interventioneller und chirurgischer Therapiemaßnahmen nicht mit einer Abnahme der Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen zu rechnen. Ganz im Gegenteil wird es mit den Mitteln der modernen Medizin durch neue Diagnostik- und Therapiestrategien immer mehr Patienten ermöglicht einen Myokardinfarkt zu überleben. Gleichzeitig steigt hiermit auch die Anzahl jener Patienten, welche an einer Herzinsuffizienz erkrankt sind. Medikamentöse Therapien können den Verlauf einer Herzinsuffizienz abschwächen, stellen jedoch keinen kurativen Therapieansatz dar. Eine weitere Option zur symptomatischen Behandlung einer Herzinsuffizienz sind sogenannte mechanische Herzunterstützungssysteme. In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl von verschiedenen Systemen mit pulsatilen- oder kontinuierlichen Pumpensystemen entwickelt, welche sich heutzutage im klinischen Einsatz befinden. Allerdings zeigten diese Systeme in den bisher veröffentlichten Studien hohe Komplikationsraten. Es wurden Schlaganfälle, Infektionen oder Pumpenthrombosen beschrieben, welche im schlimmsten Fall sogar zum Tode führen können. Desweiteren stellen all diese Herzunterstützungssysteme ebenso wie die medikamentöse Herzinsuffizienztherapie keine kurative Behandlungsmöglichkeit dar. Hier bleibt die Herztransplantation die einzige Option. Aufgrund der immer größer werdenden Nachfrage an Organen und dem bestehenden Organspendermangel bleibt die Herztransplantation nur einer limitierten Anzahl an Patienten vorbehalten. Neue Therapieoptionen werden deshalb dringend benötigt.

Ein potentiell alternatives und von Organspenden unabhängiges Behandlungskonzept der Herzinsuffizienz ist die Zell-/Gewebeersatztherapie. Dabei wird das Ziel verfolgt, defektes Myokard mit Zellen oder in vitro konstruiertem künstlichem Herzgewebe zu ergänzen bzw. zu ersetzen [1,2]. Eine in unserem Institut etablierte Methode besteht in der Konstruktion von

künstlichem Herzgewebe (*engineered heart tissue*, EHT) aus Herzzellen verschiedener Spezies, die in eine Hydrogelmatrix eingebettet werden. EHTs sind dreidimensionale, spontan kontrahierende und krafterzeugende Konstrukte, die Eigenschaften von nativem Myokardgewebe besitzen. Erste Implantationsstudien im Infarktmodell der Ratte zeigten die prinzipielle therapeutische Anwendbarkeit von EHTs in vivo [3]. In den bisher veröffentlichten Studien zur Gewebeersatztherapie wurde der Fokus auf die Therapie von regionalen Myokarddefekten (z.B. nach Myokardinfarkt) gelegt und nicht auf passive und aktive globale ventrikuläre Unterstützung.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neuartige Technik zur Herstellung von taschenförmigen bzw. sphäroidalen EHTs zur passiven und aktiven Unterstützung der Herzfunktion im Sinne eines biologischen Ventrikel Unterstützungssystems (*biological ventricular assist device*, BioVAD) entwickelt. Dieses künstlich erzeugte Myokardgewebe sollte zwei Funktionen erfüllen: Zum einen sollte eine weitergehende Dilatation des Herzens verhindert werden, zum anderen sollte es kontraktile Eigenschaften besitzen, um die systolische Pumpfunktion zu steigern. Bereits existierende Apparaturen zur passiven Einschränkung der kardialen Dilatation wie z.B. das CorCap Cardiac Support Device (Acorn Cardiovascular Inc) können zwar die Ausdehnung der Ventrikel verhindern, aber zur keiner aktiven Kontraktion beitragen [4]. Darüber hinaus wurde bei der Anwendung über große technische Schwierigkeiten bei Re-Operationen durch extrem starke perikardiale Verwachsungen, die durch das großflächig eingebrachte Fremdmaterial verursacht wurde, berichtet [5]. Einige Studien berichteten über positive Effekte beim Einsatz des CorCap Cardiac Support Device wie die Reduktion der enddiastolischen Wandspannung durch Verringerung des enddiastolischen Volumens und eine Verbesserung der Lebensqualität der herzinsuffizienten Patienten [6]. Durch das Einbringen von kontraktile Elementen könnten diese positiven Effekte verbessert werden. Eine Konstruktion von künstlichem Myokard in verschiedenen geometrischen Formen konnte zwar bereits durch unsere und andere Forschungsgruppen gezeigt werden [7,8]. Eine der größten Herausforderungen bleibt aber

die Herstellung von genügend großen Konstrukten für eine Evaluierung im Großtiermodell und schließlich für einen möglichen klinischen Einsatz unerlässlich.

Dementsprechend hatte diese Studie folgende Ziele:

- 1) Die Entwicklung einer geometrischen Form zur globalen Herzunterstützung
- 2) Die Entwicklung einer Herstellungsmethode für diese geometrische Form
- 3) Die Untersuchung der Anwendbarkeit dieser Konstrukte im adulten Rattenmodell

Material und Methoden

Organentnahme und Zellpräparation

Herzzellen wurden aus neonatalen Wistarratten (postnatal 0.-3. Tag) isoliert. Dazu wurden die Tiere dekapitiert und sternotomiert. Nach zügiger Entnahme der Herzen wurden diese umgehend in gekühlte Calcium- und bikarbonatfreie Hanks-Balanced-Salt-Solution mit HEPES (CBFHH) transferiert. Nach Abtrennung der Vorhöfe und Gefäße wurden die Ventrikel in CBFHH gespült und in eine neue Kulturschale mit eisgekühltem calcium- und bicarbonatfreiem Hanks Puffer mit [2-Hydroxyethyl]piperazin-N-[2-ethansulfonsäure]] (CBFHH) transferiert und in der Mitte zweigeteilt. Nach dreimaligem Spülen mit je 10 ml CBFHH wurden die Herzen mit einer gebogenen chirurgischen Präparationsschere bis auf eine Größe von kleiner als 1 mm³ zerkleinert. Mit einer mit CBFHH benetzten Pipette (10 ml; *wide-tip*) erfolgte die Überführung der Gewebestücke entweder in ein 50 ml bzw. in zwei 10 ml Sammelgefäße, in denen anschließend der enzymatische Gewebeaufschluss mit Trypsin bzw. Kollagenase oder Dispase durchgeführt wurde.

Trypsin-DNase-Verdau

Der Trypsin-DNase-Verdau wurde nach einer modifizierten Methode von Webster et al. (1993) durchgeführt. Die zerkleinerten Gewebestücke wurden erneut mit 10 ml CBFHH

gespült. Anschließend wurde der trübe Überstand verworfen und durch 10 ml Trypsin-Arbeitslösung ersetzt. Die Inkubation der Gewebestücke wurde für 20 min bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Schwenken auf einer Kippwippe (Neigungswinkel 15°, 60 Kippbewegungen/min) durchgeführt. Anschließend wurde der trübe Überstand verworfen. Die durch Zellverletzungen freigesetzte DNA erschwerte in den meisten Fällen die Abnahme des Überstandes. Erst die enzymatische Aufspaltung extrazellulärer DNA durch eine systematische Anwendung von DNase erlaubte die komplette Entfernung des Überstandes. Dazu wurden die Gewebestücke mit 9 ml DNase-Arbeitslösung inkubiert und trituriert (25x; 10 ml *wide-tip* Pipette). Der trübe Überstand wurde anschließend ebenfalls verworfen. Nach der Resuspension der Gewebestücke in 10 ml Trypsin-Arbeitslösung und einer Inkubation (15 min) unter fortwährendem Schwenken wurde der Überstand erstmalig in einem sterilen 50 ml Sammelgefäßen mit 2 ml nicht inaktiviertem fetalem Kälberserum (FKS), zur Inaktivierung des Trypsins, überführt. Nach erneuter Inkubation der Gewebestücke mit DNase-Arbeitslösung (9 ml) und Triturierung (25x; 10 ml *wide-tip* Pipette) wurde der Überstand ebenfalls gesammelt. Dieser Wechsel von Protein- und DNA-Verdau wurde unter langsamer Reduktion der Volumina in 0,5 ml Schritten auf 7,5 ml (Trypsin-Arbeitslösung) bzw. 6,5 ml (DNase-Arbeitslösung) durchgeführt. Der komplette Verdau der Gewebestücke dauerte bei 40 Herzen im Mittel 3,5 h. Gefüllte Sammelgefäße wurden in der Zeit auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Sammelgefäße in einer Beckman Zentrifuge (J-6B) mit Schwenkbecherrotor (5200) zentrifugiert (12 g, 10 min, 4 °C). Nach Aspiration des klaren Überstandes mit einer an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Pasteur-Pipette wurden die pelletierten Zellen in den Sammelgefäßen in jeweils 2 ml Primär-Kultur-Medium (PKM) aufgenommen und in einem Sammelgefäß (50 ml) gepoolt. Zusätzlich wurden die leeren Sammelgefäße mit 2 ml PKM gespült und auch diese Volumina zusammen mit dem Rest gepoolt. Zu dem Sammelvolumen wurde schließlich DNase-Stammlösung (1/100 des Gesamtvolumens) hinzupipettiert. Nach Triturierung (25x) wurden die Sammelgefäße erneut zentrifugiert (Beckman Zentrifuge J-6B mit Schwenkbecherrotor 5200; 12 g, 10 min, 4 °C). Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in 32 ml PKM aufgenommen. Jeweils

8 ml dieser Zellsuspension wurden durch ein Zellsieb auf 4 Kulturschalen (Ø 10 cm) verteilt. Das Sammelgefäß und das Sieb wurden anschließend mit 11 ml PKM gespült. Nach gleichmäßiger Verteilung der 11 ml auf die Kulturschalen wurden die Zellen mindestens 1 h bei 37 °C und 5% CO₂ im Zellkulturschrank inkubiert. Nach Ablauf der Stunde wurden die Überstände abpipettiert, und die Kulturschalenoberflächen zweimal damit abgespült. Anschließend wurde alle Überstände in ein Sammelgefäß (50 ml) überführt. Schließlich wurden die Kulturschalen mit jeweils 2 ml frischem PKM überschichtet und darauf 8-mal kräftig auf den Sterilbankboden geschlagen. Dabei sollten sich vor allem vereinzelt noch vorhandene Kardiomyozyten vom Kulturschalenboden lösen. Fibroblasten sollten sich demgegenüber nicht mehr ablösen, so dass hier eine grobe Selektionierung von Zelltypen durchgeführt wurde. Die insgesamt 8 ml Überstand wurden ebenfalls, wie auch die anschließend zum seriellen Spülen der Kulturschalen verwendeten 5 ml PKM, gesammelt. Nach erneuter Zentrifugation (Beckman Zentrifuge J-6B mit Schwenkbecherrotor 5200; 12 g, 10 min, 4 °C) wurden die Überstände verworfen, die Zellen in PKM resuspendiert und anschließend in einem sterilen Sammelröhrchen gepoolt. Die Zellzählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer, nachdem durch erneutes Triturieren eine gleichmäßige Durchmischung der Zellsuspension sichergestellt worden war [9].

Konstruktion einer neuartigen Gussform zur Herstellung sphäroidaler EHTs

Wir entwickelten eine neuartige Gussform zur Herstellung sphäroidaler EHTs. Unter sterilen Bedingungen wurde die Spitze eines 50 ml Polypropylen Röhrchens mit Schraubverschluss abgeschnitten. Das invertierte Röhrchen wurde als Basis der Gussform genutzt. Die Gussform wurde mit steriler flüssiger Agarose (50° C, 1%ig mit 0,9% NaCl Lösung) aufgefüllt und in diese eine sphäroidale Glasform (Diameter 20 mm: ca. 4,2 ml) mit Schaft (Diameter 2 mm) eingebracht. Nach dem Abkühlen und Erhärten der Agarose wurde der sphäroidale Platzhalter entfernt. In die nun entstandene Hohlform wurde eine kleinere sphäroidale

Glasform (Diameter 10 mm; ca. 0,52 ml) mit Schaft (Diameter 2 mm) zentriert. Hierdurch entstand im Zwischenraum zwischen äußerer Agarose Form und innerer Glasform die gewünschte Gussform mit einem inneren Durchmesser von 10 mm und einem äußeren Durchmesser von 20 mm (=Wanddicke 10 mm).

Herstellung von sphäroidalen EHTs

Zur Herstellung der sphäroidalen EHTs wurden 3,7 ml des oben beschriebenen EHT-Herstellungs-Mixes mit 10×10^6 frisch isolierten Herzzellen (ca. 50% Kardiomyozyten, 50% nicht Kardiomyozyten) [7], Kollagen Typ 1 (0,8 mg/ml), Matrigel (10% v/v) und konzentriertem Kulturmedium (2x DMEM, 20% Pferdeserum, 4% Hühner Embryonen Extrakt, 100 U/ml Penicillin, 0,2 mg/ml) in die Gussform pipetiert. Die EHTs wurden für eine Stunde bei 37°C in einen Zellkulturinkubator (10% CO₂, 40% O₂ in Raumluft) gestellt. Im Anschluss wurde Kulturmedium (DMEM, 10% Pferdeserum, 2% Hühner Embryonen Extrakt, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin) vorsichtig in die Gussform hinzugefügt. Durch die porösen Eigenschaften der Agarose wurde die Zufuhr von Medium und Sauerstoff in die Gussform gewährleistet. Nach ca. 3 bis 7 Tagen kam es zur Verfestigung der EHT Mischung um die innere Glasform herum. Das künstlich hergestellte Herzgewebe zeigte ab dem dritten Tag spontane Kontraktion. Die schlagenden EHTs wurden am siebten Kulturtag auf flexible Halterungen, die eine auxotone Kontraktion ermöglichen, überführt. Die Halterungen wurden aus einem Teflon Quader (10x10x20 mm) in die zentral zwei Stahldrähte (Stärke 0,5 mm, Gesamtlänge 60 mm) mit halbkreisförmigen Enden (8 mm Durchmesser) in entsprechende Bohrungen eingebracht wurden hergestellt. Die offenen Seiten der Halbkreise liegen zueinander zugewandt und waagrecht. Nach verschieben der Drähte in der Teflon Halterung konnten durch den entsprechenden Hebel die auxotone Kontraktion der EHTs ermöglicht werden. Die morphologischen und kontraktilen Eigenschaften der sphäroidalen EHTs wurden nach 12-14 Tagen untersucht.

Kraftmessungen

Unter elektrischer Stimulation (2 Hz) wurden die Kontraktionskraft (twich tension TT), Ruhespannung (RT) und Relaxationszeit (T2 Zeit bis zur 50%igen Relaxation) der sphäroidalen EHTs im Organbad mit Tyrode Lösung gemessen [9]. Es wurden die inotropen und lusitropen Effekte unter Calcium (0,2-0,8 mmol/L), Isoprenalin (0,1-1000 mmol/L) und Carbachol untersucht [10].

Morphologische Untersuchungen der EHTs

Formaldehyd-fixierte EHTs wurden geschnitten oder als whole mount Präparate mittels Licht- bzw. konfokaler Lasermikroskopie untersucht [10]. Haematoxilin und Eosin Färbungen erfolgten in üblicher Weise [10]. Die entparaffinierten Schnitte wurden für eine Stunde in Pikrinsäure aufgesättigt. Die dehydrierten Schnitte wurden in eine Essigsäurelösung eingetaucht und danach in Eukitt (Sigma) eingebettet. Die Darstellung der Kardiomyozyten und Fibroblasten im EHT erfolgte über Antikörperfärbungen gegen alpha 1 sarkomerisches Aktinin, f-Aktin und Beta-Prolyl-Hydroxylase. Phalloidin-Alexa 488 und Bandeiraea simplicifolia lectin TRITC wurden zur Darstellung von f-Aktin bzw. Endothelzellen. Die Zellkerne der EHTs wurden zur Identifikation der Spenderherzzellen vor Implantation mittels DAPI markiert [3]. DRAQ5 wurde verwendet um die Zellkerne in den EHTs darzustellen.

EHT Implantation

Die EHTs wurden in männliche Wistar Ratten (n=16; 300 bis 350g) implantiert. Die Narkoseeinleitung erfolgte in einer Induktionskammer mit Isofluran 4%. Nach Intubation erfolgte die kontinuierliche Beatmung mit einem Gemisch aus Isofluran 1% und Raumluft. Die Eröffnung der Thoraxhöhle erfolgte über eine linkslaterale Thorakotomie. Nach Eröffnung des Perikards wurden die sphäroidalen EHTs über den kompletten linken und rechten

Ventrikel vom Apex bis zur Basis gezogen und mittels 2 Nähten (6-0 Prolene, Ethicon) an der anterioren und lateralen Basis des schlagenden Herzens fixiert. Cyclosporin A (5 mg/kg), Azathioprin (2 mg/kg) und Methylprednisolon (2 mg/kg) wurden täglich subkutan zur Immunsuppression verabreicht. Im Untersuchungszeitraum traten keine Abstoßungs- oder Entzündungsreaktionen auf.

Statistische Analyse

Die Daten wurden als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung erfasst. Statistische Unterschiede wurden mittels wiederholter Varianzanalyse (Konzentrations-Wirkungskurve) oder als einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni Korrektur (Analyse der Relaxationszeit) ermittelt. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

Resultate

Konstruktion sphäroidaler EHTs

Die EHTs kondensierten an Tag 3-7 der Kulturzeit an der inneren Glaskugel mit einem Innendurchmesser von 10 mm und einem Außendurchmesser von 11 mm, welches einer Wanddicke von 1 mm entsprach. Diese Dimensionen wurden gewählt, um die Implantation der sphäroidalen EHTs auf ein adultes Rattenherz zu ermöglichen. Die ersten spontanen Kontraktionen der sphäroidalen EHTs konnten frühestens am 2. bis 3. Tag beobachtet werden und hielten zumindest bis zum 14. Tag an.

Kontraktile Eigenschaften der sphäroidalen EHTs

Sphäroidale EHTs konnten elektrisch stimuliert werden (50-100 mA, 2 Hertz) und zeigten eine basale Kontraktionskraft (Kontraktionsspannung) von $0,7 \pm 0,2$ mN bei 0,2 mmol/l

Calciumkonzentration (n=4). Die Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration auf 2,7 mmol/l oder die Zugabe von 1 µmol/l Isoprenalin steigerten die Kontraktionskraft auf 1,2 +/- 2,3 mN (p<0,05) bzw. 0,9 +/- 0,3 mN (p<0,05). Die Ruhespannung betrug 0,4 +/- 0,1 mN (n=4). Das Verhältnis von Ruhespannung zu Kontraktionsspannung war somit <1 (n=4) welches ein Hinweis für eine gute Compliance der sphäroidalen EHTs war. Die Relaxationszeit (T2) betrug 59 +/- 4 ms bei einer Calciumkonzentration von 0,2 mmol/L. Die Zugabe von Isoprenalin verkürzte die Relaxationszeit (T2) auf 39 +/- 3 ms. Die muskarinerge Stimulation mit Carbachol 1 µmol/L führte zur Umkehr der inotropen und lusitropen Isoprenalinwirkung (n=4).

Morphologische Eigenschaften

In den histologischen Analysen konnte ein hochverknüpftes und dichtes Netzwerk an differenzierten Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Der ausgeprägte Nachweis von Connexin 43 wies auf die Formation eines elektrischen Synzytiums innerhalb des EHTs hin. Die Oberfläche der EHTs war durch eine dichte Epithelschicht von Prolylhydroxylase positiven Zellen bekleidet.

Implantationsstudien

Nach linkslateraler Thorakotomie konnten die sphäroidalen EHTs auf die Rattenherzen implantiert werden. Alle Tiere überlebten die Prozedur (n=16). 14 Tage nach Operation konnten die implantierten EHTs auf den Empfängerherzen aufgefunden werden. HE und Pico Siriusrot Färbung zeigten eine weitgehende Unversehrtheit der EHTs auf der epikardialen Oberfläche der Rattenherzen. Sowohl lichtmikroskopisch als auch mit der konfokalen Lasermikroskopie zeigte ich, dass das Implantat vom Empfänger regelhaft durch einen 50-100 µm dicken zellarmen Spalt getrennt war. Nur an einigen Stellen kam es zu einem direkten engen Kontakt zwischen Implantat und Empfängermyokard. In diesen

Regionen war im Empfängermyokard die an sich typische Lokalisation der Connexin-43-positiven gap junctions an den Glanzstreifen aufgehoben und ersetzt durch eine eher lateralisierte Ausbildung. Gefäßstrukturen, welche auf eine Vaskularisierung schließen lassen, konnten ebenfalls in den sphäroidalen EHTs aufgefunden werden. Viele der neuformierten Gefäße bestanden teilweise aus implantierten Zellen, welche durch die vorherige Markierung mittels DAPI identifiziert werden konnten.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neues EHT-Modell entwickelt und funktionell und morphologisch charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass das künstliche Herzgewebe auch in der neuen Kugelform wichtige strukturelle und funktionelle Eigenschaften von nativem Myokard aufweist. Implantationsversuche in immunsupprimierten Ratten weisen auf die Eignung als Herzmuskeltransplantat im Sinne eines biologischen Ventrikel Unterstützungssystems hin.

Künstliches Herzgewebe wird prinzipiell in vier verschiedenen Verfahren hergestellt. Die in unserem Institut entwickelte Methode basiert auf der Zusammensetzung von Herzzellen verschiedener Spezies in einer Hydrogelmatrix, dass in eine Gussform eingebracht wird. Dabei muss in die Gussform eine Verankerung (bei sphäroidalen EHTs die innere Glasskugel) zur Positionierung und zum Spannungsaufbau für das sich entwickelnde EHT integriert sein. Als Hydrogelmatrix wird Kollagen, Fibrin und Matrigel bzw. deren Kombinationen verwendet. Die Zellen werden durch die Gelatineform der Matrix von einer Sedimentation aufgehalten und zusätzlich wird das Aussprossen der Herzzellen und eine interzelluläre Verknüpfung gefördert. Nach dieser Methode wurde erstmalig erfolgreich künstliches Myokard hervorgebracht [11].

Die Besiedelung einer bereits vorgefertigten Matrix z.B. aus Polyglykolsäure (PGS), Alginat, Kollagen und Gelatine Schwämmen mit Herzzellen ist eine weitere Technik des kardialen Tissue Engineerings [12-15]. Der Vorteil dieses Verfahrens ist die Steigerung der mechanischen Belastbarkeit des Gewebes, das aber mit einer Reduktion der Kraftentwicklung einhergeht bei gesteigerter Rigidität der Matrix. Die vorgefertigten Matrices erschweren auch das Einbringen der Herzzellen in die poröse Struktur und behindern die zelluläre Verknüpfung. Ein Grund dafür ist sicherlich im Gegensatz zur Hydrogelmatrix, dass die Herzzellen hier von außen auf die Matrix aufgebracht werden und nicht komplett eingebettet sind.

Eine sehr elegante Methode zur Herstellung von künstlichem Myokard ist das cell sheet Verfahren. Eine Temperatur sensible Beschichtung ermöglicht das Ablösen einer zweidimensionalen Kardiomyozyten Schicht von der Kulturplatte. Anschließend werden die Einzelschichten aufeinander gestapelt und so ein dreidimensionales Gewebe geformt [16]. Mit dieser Matrix freien Methode wurden bereits erste ambitionierte klinische Anwendungen auf einer autologen Myoblasten Basis initiiert [17].

Das vierte Verfahren beruht auf der Dezellularisierung des Herzens in einer Langendorff Perfusion mit anionischen Tensiden (Natriumdodecylsulfat, Octoxinol 9) und erneuter Besiedelung mit Herzzellen [18]. Diese Methode belässt alle Gefäßstrukturen und erlaubt damit die Perfusion des angebundenen Gewebes. Allerdings ist auch hier die Wiederbesiedelung der Bindegewebsmatrix erschwert und die Herzzellen können nicht die gleiche Dichte wie im nativen Myokard aufbauen.

Die Implantation von Stammzellen oder künstlichem Herzgewebe ist ein innovatives Konzept zur Behandlung von Myokarddefekten [1,2,19,20]. In früheren Studien konnte demonstriert werden, dass Kardiomyozyten nach Transplantation überlebten und sich ins Empfängergewebe integrierten [21]. Es erscheint zunächst sehr verblüffend, dass

implantierte Kardiomyozyten mit ihrem bekannt hohen Sauerstoff Bedarf und ohne einen Anschluss an den Blutkreislauf die Implantation Überleben können. Eine Erklärung ist der noch sehr unreife Zustand der neonatalen Ratten und die Hypoxietoleranz, die ein Überlebensvorteil der neugeborenen Ratten darstellt. Neonatale Kardiomyozyten können ihren Stoffwechsel drastisch herunter regulieren und über anaerobe Glykolyse einige Zeit überleben. Darüber hinaus erfolgt bereits eine Selektion von widerstandsfähigen Zellen während der Zellisolierung und in der in vitro Kultur. Das Vorhandensein von primitiven Gefäßnetzen [7] in den EHTs und die recht schnelle Vaskularisierung (1-2 Tage nach Implantation [22]) sichern das Überleben der Kardiomyozyten.

In der überwiegenden Anzahl der Studien, wie auch in der Vorliegenden Arbeit, wurden neonatale Kardiomyozyten der Ratte zur Konstruktion der EHTs genutzt. Für eine Übertragung ins humane Modell und den allgemeinen Einsatz in der Regenerativen Medizin muss eine Zellquelle ausgemacht werden. Skelettale Myoblasten waren die erste Zellspezies, die klinisch angewandt wurde [23]. Allerdings scheinen diese nicht in der Lage zu sein, eine elektrische Koppelung mit dem Empfängermyokard einzugehen [24]. Einige Studien signalisierten den therapeutischen Nutzen von implantierten Knochenmarks Stammzellen bei Patienten nach einem Herzinfarkt [25]. Allerdings wurden diese Ergebnissen von anderen Forschungsgruppen in Frage gestellt [26].

Embryonale Stammzellen (ES) erscheinen für das kardiale Tissue Engineering als eine aussichtsreiche Zellquelle. Durch das sichere Differenzierungspotential und die Optimierung der Kulturbedingung konnten genügend Kardiomyozyten zur Herstellung von künstlichem Myokard gewonnen werden. Im Infarktmodell der Ratte konnte durch die Implantation von künstlichem Herzgewebe aus humanen ES eine Verbesserung der Herzfunktion festgestellt werden [27, 28]. Als problematisch erweist sich allerdings die Bildung von Teratomen und die Abstoßung des heterologen Gewebes. Nicht zu vergessen ist vor allem auch die ethische Brisanz in der Nutzung von humanen embryonalen Stammzellen.

Eine sehr neue und vielversprechende Zellquelle für den klinischen Einsatz in der Regenerativen Medizin sind induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) [29]. Ausdifferenzierte Zellen (z.B. Fibroblasten) werden durch die Expression von Transkriptionsfaktoren (Oct-4, SOX2, c-Myc, Klf-4 bzw. Nanog, Lin-28) in pluripotente Stammzellen reprogrammiert und anschließend wieder in somatische Zellen wie Kardiomyozyten differenziert. Durch die Herstellung aus somatischen Zellen scheint es auch keine größeren ethischen Probleme bei der Anwendung der iPS zu geben. Dieses Verfahren hat im Gegensatz zu Embryonalen Stammzellen insbesondere auch den Vorteil, dass die gewonnen autologen Zellen Patienten spezifisch sind und keine Immunreaktion auslösen. Dieser Aspekt wurde allerdings durch einige Forschungsgruppen in Frage gestellt und die Entstehung einer Immunreaktion durch die Überexpression von Tumorantigenen, die möglicherweise durch eine falsche Verknüpfung während des Reprogrammierungs Vorganges erworben wurden, aufgeworfen [30]. Andere Arbeitsgruppen konnten wiederum das Auslösen einer Immunreaktion nicht nachweisen [31] und gehen weiterhin von einem großen klinischen Anwendungspotenzial aus. Diesbezüglich konnten bereits beachtliche Fortschritte wie die Behandlung der Sichelzellenanemie im Mausmodell [32] und das Herstellen von humanen iPS [33-35] erbracht werden. Gleichwohl müssen noch Antworten auf Fragen der Sicherheit wie das Ausbilden von Teratomen und zum Herstellungsprozess (relevanten Anzahl von Zellen in einer absehbaren Zeit) gegeben werden. Aus Sicherheitsgründen werden drei Punkte bei der Generierung von iPS hervorgehoben: (1) die Nutzung autologer Zellen, die keine Abstoßungsreaktion zeigen sollten, (2) die Expression der Transkriptionsfaktoren ohne die Hilfe von Retroviren, da diese möglicherweise selber onkogene Funktionen triggern können und (3) auf den Gebrauch von Protoonkogenen wie c-Myc, dass zwar die Effizienz zur Herstellung von iPS steigert aber nicht unbedingt notwendig ist, zu verzichten [34]. Darüber hinaus gelang es ebenfalls pluripotente Stammzellen durch Einschleusen der rekombinierten Proteine herzustellen [36]. Doch scheinen die angegebenen Punkte vor allem hinsichtlich des Herstellungsprozesses kritisch zu sein. Beim aktuellen Stand der Technik würde die Etablierung einer autologen Zelllinie, deren Propagierung und Differenzierung in den

gewünschten Zelltyp und Testung auf Malignität insgesamt circa zwei Jahre dauern, zudem mit einem großen finanziellen Aufwand verbunden sein. Daher erscheinen humane IPS kurz bis mittelfristig für eine klinische Anwendung vorerst nicht zur Verfügung zu stehen, bleiben aber weiterhin eine hoffnungsvolle Option der regenerativen Medizin.

Veröffentlichte tierexperimentelle Daten [3,37] und ein erster klinischer Einsatz von künstlichem Herzgewebe [17], haben die Anwendbarkeit stark unterstützt. Eine weitere Bedingung ist die Herstellung von künstlichem Herzgewebe in einer signifikanten Größe und funktionellen Eigenschaften zur Unterstützung von Myokarddefekten. Die Größe des künstlichen Myokards müsste für eine klinische Anwendung nicht nur eine bestimmte Dicke (ca. 1 mm bis 10 mm) haben, sondern auch eine relevante Fläche zur Deckung von größeren Defektarealen aufweisen. Durch die *in vitro* Kultivierung sind den Herstellungsdimensionen, da die Versorgung der Zellen über Diffusion gewährleistet wird, natürliche Grenzen gesetzt. Eine Möglichkeit zur Überwindung dieser Hürde wäre das Einbringen von perfundierten Gefäßen. Ein interessanter Ansatz wurde durch die *in vivo* Herstellung von künstlichem Herzgewebe im Empfänger verfolgt [38]. Hierzu wurde im Rattenmodell über eine hergestellte Aterio- Venöse Fistel der A. epigastrica und das Einbringen von Kardiomyozyten eine Vaskularisierung durch das Empfängertier im entstehenden künstlichen Myokard gewährleistet. Im zweiten Schritt konnten die Konstrukte über den arteriellen Zufluss und den venösen Abfluss an anderer Stelle an die Zirkulation anastomosiert werden. Für ein Verfahren zur *in vitro* Generierung perfundierbarer Gefäßsysteme wurde ein arteriovenöses Conduit aus dem Femoral Bereich einer Ratte entnommen. Über eine Pumpe erfolgte die Zirkulation mit Kulturmedium. In einem zweiten Schritt wurden im cell sheet Verfahren Einzellagen von Kardiomyozyten, die durch Endothelzellen angereichert wurden auf das arteriovenöses Conduit aufgeschichtet. Im künstlichen Herzgewebe kam es zur Formierung von Kapillarstrukturen, die mit dem perfundiertem Conduit fusionierten [39]. Allerdings scheinen diese innovativen Methoden nur schwer in einen klinischen Prozess übertragbar zu sein.

Als Folge vieler Herzerkrankungen kommt es zu einer reduzierten Ventrikelkontraktilität einhergehend mit einer globalen Ventrikeldilatation. In diesem Patientenkontext könnte die Implantation von sphäroidalen EHTs nicht nur die ventrikuläre Dilatation aufhalten, sondern auch für eine kontraktile Unterstützung der global insuffizienten Herzen sorgen. Bereits existierende Apparaturen zur Einschränkung der kardialen Dilatation wie z.B. das Acorn CorCap Device könnten zwar eventuell die Ausdehnung der Ventrikel verhindern, aber zu keiner aktiven Kontraktion beitragen. Im Gegensatz dazu entwickeln sphäroidale EHTs eine kontraktile Kraft und können, wie dargestellt, über die Herzen von adulten Ratten gezogen werden. Diese Prozedur führte nicht zu einer Perikard Konstriktion und wurde von den Tieren insgesamt gut toleriert (alle Tiere überlebten die Prozedur und den Beobachtungszeitraum von 14 Tagen). Die Implantate behielten ihre Myokardstruktur und wiesen bereits im Beobachtungszeitraum eine Vaskularisierung auf. Die Vaskularisierung wurde teilweise durch die eingebrachten Zellen unterstützt, die vor der Implantation durch die Markierung der Zellkerne mit DAPI identifiziert werden konnten. Ähnliche Daten zeigten bereits das Vorhandensein von primitiven Kapillarnetzen in den EHTs in vitro [7] und eine starke Vaskularisierung der EHT Transplantate im Infarktmodell der Ratte [3]. Nichts desto trotz müssen sphäroidale EHTs in weiteren Studien zur Überprüfung ihrer Anwendbarkeit bei dilatierten Ventrikeln und kontraktile Dysfunktion evaluiert werden.

Humane Stammzellen (adulte Stammzellen, embryonale Stammzellen und induzierte pluripotente Stammzellen) wurden bereits als eine mögliche Ressource für Kardiomyozyten entdeckt [40-43]. Trotz dieser interessanten Entdeckung, erscheint zurzeit die Allokation von Kardiomyozyten zur Reparatur nach einem Infarkt in einer relevanten Zahl (ca. 1 Milliarde Zellen) und Zeitraum (Tage-Wochen) noch unmöglich. Der Einsatz von genetischer Selektion, Induktion der Kardiomyozendifferenzierung durch Wachstumsfaktoren und die Massenkultur in Bioreaktoren haben zwar die Anzahl der gewonnenen Herzmuskelzellen erhöht, aber eine Nutzbarkeit bei menschlichen Stammzellkulturen muss noch demonstriert

werden [44,45]. Darüber hinaus erscheint es unwahrscheinlich, dass Kardiomyozyten als einzige Zellkomponente zur in vitro Herstellung von suffizientem Kunstherzgewebe ausreichen könnten. Tatsächlich konnten wir zeigen, dass EHTs, die zu etwa gleichen Teilen aus Kardiomyozyten und nicht-Kardiomyozyten bestehen, EHTs aus hoch angereicherten Kardiomyozyten funktionell und strukturell überlegen sind [7]. Es erscheint sehr wahrscheinlich, dass die nicht-Kardiomyozyten eine große Bedeutung bei der strukturellen und parakrinen Unterstützung in der in vitro Kultivierung haben, und darüber hinaus die Transplantation des Gewebes und vorteilhafte Effekte auf das Empfänger Myokard gewährleisten. Auch gelang es nicht künstliches Myokard aus induzierten pluripotenten Stammzellen mit einer aufgereinigten Kardiomyozyten Zellpopulation herzustellen. Erst nach hinzufügen von Fibroblasten konnte ein dreidimensionales Gewebe erzeugt werden [46]. Im Gegensatz zu Kardiomyozyten können humane nicht-Kardiomyozyten sehr leicht aus Herzbiopsien oder aus anderen autologen Quellen (Knochenmark, Fettgewebe) gewonnen werden. Wenn humane Zellen einmal zur Verfügung stehen, bleibt es weiterhin fraglich, ob sie zu dicken Muskelbündeln konstruiert werden können. Die suboptimalen Diffusionsbedingungen von dicken Muskelkonstrukten im Rahmen der in vitro Kultur bzw. kurz nach der Transplantation bei abwesender Vaskularisierung müssen noch überwunden werden. Reine Muskelbündel in in vitro kreiertem künstlichem Herzgewebe werden nicht dicker als 200 µm. Durch sequentielle Implantation von Zellplatten (cell-sheets) und auch durch Fusionierung von Ring-EHTs zu sternförmigen Patches konnte vaskularisiertes Myokard mit einem Durchmesser von 1 mm in vivo erzeugt werden [3,16]. Sphäroidale EHTs werden nach Implantation ähnlich vaskularisiert und beinhalten dicke Muskelbündel. Nichtsdestotrotz müsste eine weitergehende Verbesserung der Myokardkonstruktion erfolgen, um eine signifikante Unterstützung von insuffizienten Herzen zu gewährleisten.

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Transplantation von künstlichem Herzgewebe ist der elektrische Anschluss ans native Myokard. Die kontinuierliche elektrische Stimulation fördert die Qualität kardialer Konstrukte während der in vitro Kultur [14]. Durch das Einbringen von

Nanodrähten aus Gold in eine auf Alginat basierten Matrix konnten stärkere, dickere und besser orientierte Konstrukte hergestellt werden [47]. Eine gesteigerte elektrische Interaktion der Kardiomyozyten kann durch eine synchrone Kontraktion eine größere Kraftübertragung der Konstrukte auf das Empfängerherz ausüben. In vorherigen Studien konnten wir bereits die anterograde und retrograde elektrische Koppelung der EHTs bei infarzierten Rattenherzen beobachten [3]. Eine ähnliche elektrische Koppelung ist bei den sphäroidalen EHTs anzunehmen. In der histologischen Aufarbeitung wurden viele Areale identifiziert, die keinen direkten Kontakt der Transplantate mit dem Herzen zeigten. Eine elektrische Koppelung in diesen Bereichen erscheint deutlich erschwert bzw. unmöglich. Allerdings konnten auch Transplantat-Empfänger-Areale mit sehr starker Kontaktfläche beobachtet werden, so dass diese durchaus bei guter Zell zu Zell Verbindung die elektrische Impulsüberleitung gewährleisten können. Eine prinzipielle Möglichkeit einer elektrischen Koppelung der eingebrachten Kardiomyozyten mit dem Empfängermyokard wurde von verschiedenen Forschungsgruppen demonstriert [3,48-51]. Natürlich könnten durch diese elektrischen Kontakte auch anormale Erregungen wie z.B. ventrikuläre Extrasystolen und ventrikuläre Tachykardien von den EHTs übertragen werden. Was im einzelnen nach der Transplantation überwiegt, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht genau beurteilbar. Vermehrte Arrhythmien waren zumindest in den hier dargestellten Versuchen nicht zu beobachten. Zur Nutzung der sphäroidalen EHTs im Sinne eines BioVADs könnte eine Synchronisierung der elektromechanischen Funktion durch die Implantation eines Schrittmachers gewährleistet werden. Die prinzipielle, externe Stimulierbarkeit der sphäroidalen EHTs konnte bereits in dieser Studie in den Kontraktionsexperimenten demonstriert werden.

Zusammenfassung

Die vorliegende Studie konnte eine neuartige Technik zur Generierung von sphäroidalen EHTs, die möglicherweise als BioVADs in vivo fungieren könnten, entwickeln. Strukturelle und funktionelle Eigenschaften der sphäroidalen EHTs sind denen von nativem Myokard

ähnlich und es konnte in ersten Implantationsstudien die prinzipielle Anwendbarkeit in vivo demonstriert werden. Allerdings müssen noch einige problematische Punkte vor einer möglichen klinischen Anwendung geklärt werden: (1) Der Nachweis eines therapeutischen Effektes in einem klinisch relevanten Herzinsuffizienzmodell, (2) die Identifizierung einer ausreichenden Kardiomyozyten und nicht-Kardiomyozyten Quelle, (3) die Konstruktion von ausreichend großem bzw. dickem Muskelgewebe zur relevanten Unterstützung von insuffizienten Herzen (4) und Lösungsansätze für Sicherheitsaspekte (Induktion von Arrhythmien, unerwünschtes Wachstum, immunologische Inkompatibilität).

Literaturverzeichnis

1. Eschenhagen T, Zimmermann WH. Engineering myocardial tissue. *Circ Res*. 2005;97:1220–1231.
2. Zimmermann WH, Didie M, Doker S, Melnychenko I, Naito H, Rogge C, Tiburcy M, Eschenhagen T. Heart muscle engineering: an update on cardiac muscle replacement therapy. *Cardiovasc Res*. 2006;71:419–429.
3. Zimmermann WH, Melnychenko I, Wasmeier G, Didie M, Naito H, Nixdorff U, Hess A, Budinsky L, Brune K, Michaelis B, Dhein S, Schwoerer A, Ehmke H, Eschenhagen T. Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nat Med*. 2006;12:452–458.
4. Blom AS, Mukherjee R, Pilla JJ, Lowry AS, Yarbrough WM, Mingoia JT, Hendrick JW, Stroud RE, McLean JE, Affuso J, Gorman RC, Gorman JH 3rd, Acker MA, Spinale FG. Cardiac support device modifies left ventricular geometry and myocardial structure after myocardial infarction. *Circulation*. 2005;112:1274–1283.
5. Schroder JN, Lima B, Rogers JG, Milano CA. Cardiac transplantation following ACORN CorCap device implantation. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2006;29:848–850.
6. Douglas L. Mann, Spencer H. Kubo, Hani N. Sabbah, Randall C. Starling, Mariell Jessup, Jae K. Oh, Michael A. Acker. Beneficial effects of the CorCap cardiac support device: five-year results from the Acorn Trial. *Journal of Cardiovascular Surgery*. 2012, 143:1036-1042.
7. Naito H, Melnychenko I, Didie M, Schneiderbanger K, Schubert P, Rosenkranz S, Eschenhagen T, Zimmermann WH. Optimizing engineered heart tissue for therapeutic applications as surrogate heart muscle. *Circulation*. 2006;114:172–178.

8. Sekine H, Shimizu T, Yang J, Kobayashi E, Okano T. Pulsatile myocardial tubes fabricated with cell sheet engineering. *Circulation*. 2006; 114:187–193.
9. Zimmermann WH, Fink C, Kralisch D, Remmers U, Weil J, Eschenhagen T. Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes. *Biotechnol Bioeng*. 2000;68:106 –114.
10. Zimmermann WH, Schneiderbanger K, Schubert P, Didie M, Munzel F, Heubach JF, Kostin S, Neuhuber WL, Eschenhagen T. Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ Res*. 2002;90:223–230.
11. Eschenhagen T, Wakatsuki T, Elson EL. A new method to measure isometric force of contraction in embryonic cardiac myocytes. Report No. 95-17 on Second International Conference on Cellular Engineering, LaJolla August 19-22 (Abstract). 1995
12. Chen QZ, Ishii H, Thouas GA, Lyon AR, Wright JS, Blaker JJ, Chrzanowski W, Boccaccini AR, Ali NN, Knowles JC, Harding SE. An elastomeric patch derived from poly(glycerol sebacate) for delivery of embryonic stem cell to the heart. *Biomaterials*. 2010;31:3885-3893
13. Leor J, Aboulafia-Etzion S, Dar A, Shapiro L, Barbash IM, Battler A, Granot Y, Cohen S. Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation*. 2000;102:III56-61
14. Radisic M, Park H, Shing H, Consi T, Schoen FJ, Bursac N, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of

cardiac myocytes cultured on scaffolds. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101:18129-18134

15. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DA, Choi A, Yau TM. Survival and function of bioengineered cardiac grafts. *Circulation*. 1999;100:II63-69

16. Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Akutsu T, Setomaru T, Abe K, Kikuchi A, Umezu M, Okano T. Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res*. 2002;90:e40

17. Sawa Y, Miyagawa S, Sakaguchi T, Fujita T, Matsuyama A, Saito A, Shimizu T, Okano T. Tissue engineering myoblast sheets improved cardiac function sufficiently to discontinue LVAS in patient with DCM: report of a case. *Surgery today*. 2012;42:181-184

18. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, Taylor DA. Perfusion-decellularized matrix: Using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature medicine*. 2008;14:213-221

19. Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest*. 2005;115:572–583.

20. Murry CE, Field LJ, Menasche P. Cell-based cardiac repair: reflections at the 10-year point. *Circulation*. 2005;112:3174 –3183.

21. Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG, Field LJ. Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science*. 1994;264:98 –101.

22. Shimizu T, Sekine H, Yang J, Isoi Y, Yamato M, Kikuchi A, Kobayashi E, Okano T. Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues. *Faseb J*. 2006;20:708-710
23. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*. 2001;357:279 –280.
24. Hagege AA, Marolleau JP, Vilquin JT, Alheritiere A, Peyrard S, Duboc D, Abergel E, Messas E, Mousseaux E, Schwartz K, Desnos M, Menasche P. Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: long-term follow-up of the first phase I cohort of patients. *Circulation*. 2006;114:1108 –1113.
25. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Intracoronary bone marrowderived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006;355:1210 –1221.
26. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilebakk A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Groggaard HK, Bjornerheim R, Brekke M, Muller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE, Forfang K. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006; 355:1199 –1209.
27. Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, Reinecke H, Xu C, Hassanipour M, Police S, O'Sullivan C, Collins L, Chen Y, Minami E, Gill EA, Ueno S, Yuan C, Gold J, Murry CE. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol*. 2007; 25(9):1015–1024

28. Caspi O, Huber I, Kehat I, Habib M, Arbel G, Gepstein A, Yankelson L, Aronson D, Beyar R, Gepstein L. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 50(19):1884–1893
29. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126:663–676
30. Zhao T, Zhang Z-N, Rong Z, Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2011; 474(7350):212–215
31. Guha P, Morgan JW, Mostoslavsky G, Rodrigues NP, Boyd AS. Lack of Immune Response to Differentiated Cells Derived from Syngeneic Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell.* 2013; 12(4):407-412
32. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Bread C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science.* 2007; 318(5858):1920-1923
33. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007;131(5):861-872
34. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 2007;318(5858):1917-1920

35. Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*. 2008;451(7175):141-146
36. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*. 2008;322(5903):945-949
37. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S, Mori H. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med*. 2006;12:459–465.
38. Morritt AN, Bortolotto SK, Dilley RJ, Han X, Kompa AR, McCombe D, Wright CE, Itescu S, Angus JA, Morrison WA. Cardiac tissue engineering in an in vivo vascularized chamber. *Circulation*. 2007;115:353-360
39. Sekine H, Shimizu T, Sakaguchi K, Dobashi I, Wada M, Yamato M, Kobayashi E, Umezu M, Okano T. In vitro fabrication of functional three-dimensional tissues with perfusable blood vessels. *Nature communications*. 2013;4:1399
40. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest*. 2001;108:407– 414.
41. Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, Salio M, Battaglia M, Latronico MV, Coletta M, Vivarelli E, Frati L, Cossu G, Giacomello A. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*. 2004;95:911–921.

42. Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, Koonce CH, Yu J, Palecek SP, Thomson JA, Kamp TJ. Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res*. 2009;104:e30–41.
43. Schaaf S, Shibamiya A, Mewe M, Eder A, Stohr A, Hirt MN, Rau T, Zimmermann WH, Conradi L, Eschenhagen T, Hansen A. Human engineered heart tissue as a versatile tool in basic research and preclinical toxicology. *PLoS One*. 2011;6:e26397
44. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest*. 1996;98:216–224.
45. Schroeder M, Niebruegge S, Werner A, Willbold E, Burg M, Ruediger M, Field LJ, Lehmann J, Zweigerdt R. Differentiation and lineage selection of mouse embryonic stem cells in a stirred bench scale bioreactor with automated process control. *Biotechnol Bioeng*. 2005;92:920–933.
46. Kensah G, Roa Lara A, Dahlmann J, Zweigerdt R, Schwanke K, Hegermann J, Skvorc D, Gawol A, Azizian A, Wagner S, Maier LS, Krause A, Drager G, Ochs M, Haverich A, Gruh I, Martin U. Murine and human pluripotent stem cell-derived cardiac bodies form contractile myocardial tissue in vitro. *Eur Heart J*. 2013;34:1134-1146
47. Dvir T, Timko BP, Brigham MD, Naik SR, Karajanagi SS, Levy O, Jin H, Parker KK, Langer R, Kohane DS. Nanowired three-dimensional cardiac patches. *Nat Nanotechnol*. 2011;6:720-725

48. Furuta A, Miyoshi S, Itabashi Y, Shimizu T, Kira S, Hayakawa K, Nishiyama N, Tanimoto K, Hagiwara Y, Satoh T, Fukuda K, Okano T, Ogawa S. Pulsatile cardiac tissue grafts using a novel three-dimensional cell sheet manipulation technique functionally integrates with the host heart, in vivo. *Circ Res*. 2006;98:705–712.
49. Rubart M, Pasumarthi KB, Nakajima H, Soonpaa MH, Nakajima HO, Field LJ. Physiological coupling of donor and host cardiomyocytes after cellular transplantation. *Circ Res*. 2003;92:1217–1224.
50. Reinecke H, Zhang M, Bartosek T, Murry CE. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts. *Circulation*. 1999;100:193–202.
51. Gaudesius G, Miragoli M, Thomas SP, Rohr S. Coupling of cardiac electrical activity over extended distances by fibroblasts of cardiac origin. *Circ Res*. 2003;93:421–428.

Danksagung

Mein spezieller Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Thomas Eschenhagen für die Vergabe der Promotionsarbeit sowie die Begeisterungsfähigkeit und große Unterstützung bei der Ausarbeitung der Promotion wie auch von wissenschaftlichen Beiträgen für Kongresse auf nationaler und internationaler Ebene.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Professor Dr. med. Wolfram Zimmermann für die Überlassung meines Promotionsthemas bedanken, dass mich bis zum heutigen Tage fasziniert, und mir den Anstoß für weitere wissenschaftliche Arbeit gegeben hat. Besonders die freundschaftliche Betreuung, die hervorragende Anleitung zum selbstständigen wissenschaftlichen Arbeiten sowie seine ständige Bereitschaft zur Diskussion haben die Promotionszeit zu einer besonders schönen Phase meiner Ausbildung gemacht.

Ebenso danke ich vor allem Herrn Dr. med. Hiroshi Natio der nicht nur durch seine gewissenhafte Hilfe bei den Zellkulturarbeiten, Kontraktions- und Implantationsexperimenten sich ausgezeichnet hat, sondern auch für seine außergewöhnliche Freundschaft über die Arbeit hinaus.

Herrn Dr. med. Michael Didie danke ich für die Unterstützung bei der Aufarbeitung der histologischen Proben und die Einweisung in die allgemeinen Labortätigkeiten.

Meinem Freund Herrn Dr. med. Bijoy Chandapillai Karikkineth danke ich für die Zellisolationen. Herrn Daniel Biermann danke ich für die Hilfe bei den Implantationsstudien.

Ein spezieller Dank gilt meinem Freund und guten Berater Dr. med. Ivan Melnychenko. Frau Monika Nose danke ich für die ständige Bereitschaft mir im und außerhalb des Labors mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester, die mich immer liebevoll unterstützt haben, und nicht zuletzt dadurch einen großen Anteil an meiner persönlichen und beruflichen Entwicklung haben.

Die Experimente wurden mit finanzieller Unterstützung des Bundesministerium für Bildung und Forschung (01GN 0520), der Deutschen Stiftung für Herzforschung (F29/03), der Europäischen Union (EUGeneHeart), der Novartis Stiftung, der LeDucq Stiftung und der Promotionsförderung der Werner Otto Stiftung durchgeführt.

10. Erklärung des Eigenanteils an der Publikation

Yalin Yildirim entwickelte die neue sphäroidale EHT Form zur globalen Herzunterstützung. Er kreierte die Grußformen und entwickelte die neue Technik zur Rekonstruktion der sphäroidalen EHTs; führte Arbeiten in der Zellkultur durch, half bei der Zellisolation, führte Implantationsexperimente durch, gestaltete die histologischen Untersuchungen und half beim Schreiben des Manuskripts.

Hiroshi Naito half bei der Erhebung der Daten der Kontraktionsexperimente, führte Implantationsexperimente durch, half bei der täglichen Immunsuppression der Tiere und führte Arbeiten in der Zellkultur und Zellisolation durch. Er half beim Schreiben des Manuskripts.

Michael Didie half bei der Aufarbeitung der histologischen Proben und trug zur Datenerhebung bei.

Bijoy Chandapillai Karikkineth führte die Herzzellisolationen durch und half bei der Immunsuppression der Tiere.

Daniel Biermann half bei der Implantation der sphäroidalen EHTs.

Thomas Eschenhagen führte die Supervision der Studie durch und half bei der Gestaltung des Projektes.

Wolfram Zimmermann führte die Supervision der Studie durch, gestaltete das Gesamtprojekt und half bei der Auswertung der Daten. Er half bei der Gestaltung der Abbildungen und schrieb das Manuskript.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Yildirim, Yalin
Geburtsdatum -und Ort: 13. Dezember 1978 in Marburg
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch-türkisch
Anschrift: Veilchenweg 26b
22529 Hamburg
Telefon und Handy: +49-40-38630203
Email: yaliny@gmx.de

Schulischer Werdegang

August 1985-Juni 1989: Grundschule II Stadtallendorf
August 1989-Juni 1995: Realschulzweig der Georg-Büchner Gesamtschule, Stadtallendorf
September 1995: Fachoberstufe der Beruflichen Schulen Kirchhain (Bereich: Wirtschaft und Verwaltung)
März 1996: Wechsel auf das Gymnasium Martin-Luther-Schule, Marburg
Juni 1999: Abitur: Allgemeine Hochschulreife

Universitäre Ausbildung

Oktober 2000: Universität Hamburg, Humanmedizin
Oktober 2002: Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
August 2003: Erstes Staatsexamen
März 2006: Zweites Staatsexamen
Juni 2007: Drittes Staatsexamen

Wissenschaftliche Tätigkeit

Juli 2005: Dissertation im Institut für Klinische und Experimentelle Pharmakologie, Prof. Dr. Wolfram Zimmermann, Prof. Dr. Thomas Eschenhagen, UKE Hamburg
Thema: Development of a Biological Ventricular Assist Device: Preliminary Data From a Small Animal Model

Praktisches Jahr

April 2006-August 2006: Medizinische Notaufnahme, Universitätsklinikum Hamburg
Kardiologie, Universitätsklinikum Hamburg
August 2006-Dezember 2006: Allgemein Chirurgie, Universitätsklinikum Hamburg
Neurochirurgie, Upper GI, Royal North Shore Hospital Sydney, Australien
Dezember 2006-März 2007: Neurochirurgie, Universitätsklinikum Hamburg

Assistenzarzt

Oktober 2007 Juni 2013: Herzchirurgie, Universitäres Herzzentrum Hamburg

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: