

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie
Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. T. Eschenhagen

Engineered Heart Tissue **als transmuraler Herzwandersatz** **im heterotopen Transplantationsmodell der Ratte**

Dissertation

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

vorgelegt von:

Daniel Biermann
aus Hamburg

Hamburg 2015

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:
18.02.2016**

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

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:
Prof. Dr. Wolfram-Hubertus Zimmermann**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:
PD Dr. Alexander Schwörer**

Die vorliegende Arbeit widme ich meinen Eltern,
Margret und Peter Biermann,
ohne deren Liebe und Unterstützung mein Werdegang nicht möglich
gewesen wäre.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	7
2.1 Versuchstiere und Genehmigungen	7
2.2 Heterotope Herztransplantation	7
2.2.1 Herstellung kardiopleger Lösung	7
2.2.2 Narkose	8
2.2.3 Heterotope Herztransplantation nach Ono und Lindsey	8
2.2.4 Heterotope Herztransplantation nach Asfour und Kollegen	10
2.3 Herstellung von Gewebekonstrukten über Tissue Engineering	
Verfahren	12
2.3.1 Kardiomyozytenpräparation	12
2.3.2 Nicht-Kardiomyozytenpräparation	14
2.3.3 Präparation von mesenchymalen Stammzellen	15
2.3.4 Präparation von Kollagen Typ 1	15
2.3.5 Herstellung von Hühnerembryonenextrakt	16
2.3.6 Gewebeherstellung über Tissue Engineering Verfahren	17
2.3.6.1 Herstellung von Engineered Heart Tissue (EHT)	17
2.3.6.2 Herstellung von nicht-kontraktilen Kontrollgeweben	18
2.3.7 Gewebekultur	19
2.4 Wandersatz im heterotop transplantierten Herz	19
2.5 Medikation und Immunsuppression	21
2.6 Echokardiographie (Echo)	21

2.7 Positronen-Emissions-Tomographie (PET)	22
2.8 Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT)	23
2.9 Linksherzkatheterisierung	23
2.10 Mikroskopische Analysen	24
2.10.1 Durchlichtmikroskopie	25
2.10.1.1 Paraffineinbettung	25
2.10.1.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	26
2.10.2 Konfokale Laserscanningmikroskopie	28
2.11 Statistik	30
2.12 Substanzen, Hilfsmittel und Geräte	30
2.12.1 Substanzen	30
2.12.2 Hilfsmittel und Geräte	33
3. Ergebnisse	35
3.1 Heterotope Herztransplantation	35
3.1.1 Studiendesign	35
3.1.2 Mortalität und Morbidität	36
3.1.3 Histologie und Herzgewichte	37
3.1.4 Echokardiographischer Vergleich	39
3.1.5 Vergleich per MRT	43
3.1.6 Vergleich der Hämodynamik mittels Linksherzkatheterisierung	44
3.1.7 Analyse des Herzmetabolismus mittels PET	47
3.2 Wandersatzstudie	48
3.2.1 Herstellung von EHT und nicht-kontraktilen Gewebekonstrukten	48

3.2.2	Transmuraler Herzwandersatz mit EHT, ECT und EMT	50
3.2.2.1	Implantatmorphologie nach Explantation	51
3.2.2.2	Implantat-Vaskularisierung	54
4.	Diskussion	56
5.	Zusammenfassung	64
6.	Abkürzungsverzeichnis	66
7.	Literaturverzeichnis	70
8.	Danksagung	76
9.	Lebenslauf	78
10.	Erklärung	83

1. Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen zählen weltweit zu den häufigsten Todesursachen¹. In Deutschland wird die Mehrzahl von Todesfällen durch eine Erkrankung des Herz-Kreislaufsystems verursacht. Die Mortalität nach Herzinfarkt konnte in den letzten Jahren zwar deutlich gesenkt werden, infolge der besseren Überlebensrate stieg jedoch auch die Inzidenz und Prävalenz der chronischen Herzinsuffizienz. Diese erhebliche Krankheitsfolge generiert immense Kosten und ist ein gravierender sozioökonomischer Faktor².

Im Gegensatz zu einigen Spezies aus dem Tierreich wie Molchen³ und Zebrafischen⁴ ist die Schädigung des Herzmuskels beim Menschen irreversibel, da die humanen Herzzellen zum größten Teil postmitotisch sind, d.h. die Fähigkeit zur Teilung verloren haben⁵. Nach einem Herzinfarkt kommt es daher zu einer Defektheilung, wobei das nekrotische Infarktgewebe durch Narbengewebe ersetzt wird. Durch die chronische Überlastung des Restmyokards kommt es typischerweise zu pathologischen Umbauvorgängen und der Entwicklung einer Herzinsuffizienz⁶.

Bei Neugeborenen ist es nicht der Myokardinfarkt, sondern es sind strukturelle Fehlbildungen, die eine Herzmuskelschwäche bedingen können. Mit einer Häufigkeit von 1/100 Neugeborenen sind Herzmuskelfehlbildungen die am häufigsten vorkommenden kongenitalen Malformationen und die häufigste Todesursache im ersten Lebensjahr^{7,8}. Die meisten dieser angeborenen Herzfehler, wie beispielsweise der Ventrikel- oder der Vorhofseptumdefekt, sind typischerweise von geringer hämodynamischer Relevanz. Einige Vitien, wie beispielsweise das hypoplastische Linksherzsyndrom, sind jedoch schwerwiegend und haben trotz chirurgisch-rekonstruktiver Maßnahmen eine schlechte Prognose⁹. Bei Patienten mit singulärem Ventrikel, bei denen die Fontan-Prozedur zur Schaffung eines Einkammerkreislaufs durchgeführt wird, liegt die peri- und postoperative Sterblichkeit derzeit bei 20%¹⁰. Insgesamt konnte die Sterblichkeit von Kindern mit

singulärem Ventrikel durch verbesserte operative Verfahren und Modifikationen der Fontan-Zirkulation in den letzten Jahren glücklicherweise deutlich reduziert werden¹¹. Im Erwachsenenalter entwickeln diese Patienten dann dennoch eine Herzinsuffizienz¹². Dieses Patientenkollektiv nimmt ebenfalls durch die bessere frühkindliche Versorgung deutlich zu.

Neben konsequenter Einstellung der Risikofaktoren steht in der Behandlung der Herzinsuffizienz die Pharmakotherapie im Vordergrund. Diese besteht im Wesentlichen aus ACE-Hemmern, Angiotensin-Rezeptorblockern und Beta-Adrenorezeptor-Blockern, die den Prozess des pathologischen Remodellings verlangsamen, sowie das Myokard gegen schädliche neurohumorale Einflüsse abschirmen sollen. Letztlich kann die Pharmakotherapie die Entwicklung einer Herzinsuffizienz nur verzögern, jedoch nicht gänzlich aufhalten oder rückgängig machen.

Derzeit steht als kausale Therapie der terminalen Herzinsuffizienz mit refraktärer Symptomatik nur die Herztransplantation zur Verfügung. Mit 1-, 3-, und 5-Jahres Überlebensraten von 88%, 79% bzw. 73% ist sie der pharmakologischen Behandlung bei weitem überlegen, die eine 1 Jahres Überlebensrate von ca. 50 % aufweist^{13,14}. Diese Zahlen zeigen, dass eine Herztransplantation im terminalen Stadium einer Herzinsuffizienz meist die bevorzugte Therapieoption wäre, sofern keine Kontraindikationen vorliegen. Ein massiver Organspendermangel stellt hierbei jedoch eine Hürde dar, die kurz- bzw. mittelfristig auch mit erweiterten Spendereinschlusskriterien nicht überwunden werden kann. Daher wurden in den letzten Jahren eine ganze Reihe alternativer Behandlungsstrategien entwickelt und zum Teil klinisch erprobt, die eine Transplantation im günstigsten Fall überflüssig machen oder zumindest einen Aufschub der Transplantationsbedürftigkeit bewirken sollen:

(1) Die Verabreichung von inotropen Substanzen, um die Kontraktilität des vitalen Myokards zu erhöhen und eine temporäre Funktionsverbesserung zu erreichen. Hiermit wird allerdings nur eine kurzfristige Verbesserung der Herzfunktion erreicht, die außerhalb der Intensivstation mit Ausnahme des Kalziumsensitivierers Levosimendan kaum Relevanz hat⁶.

(2) Die Implantation von Systemen zur mechanischen Kreislaufunterstützung. Hierbei handelt es sich um Blutpumpen, die das insuffiziente Herz im kritisch kranken Patienten unterstützen sollen. Bei Patienten, die auf der Transplantationsliste stehen, jedoch bereits kardial dekomensieren bevor ein passendes Spenderherz zur Verfügung steht, werden sie zur Überbrückung der Zeit eingesetzt, bis ein geeignetes Organ zur Verfügung steht („*Bridge-to-Transplantation*“). Eine Langzeitbehandlung bis zum Tod des Patienten („*Destination Therapy*“) war vor einigen Jahren nur indiziert, wenn absolute Kontraindikationen gegen eine Transplantation vorlagen. Sie muss jedoch bei der Knappheit an Spenderorganen heutzutage vermehrt eingesetzt werden¹⁵. In jüngster Zeit mehren sich Hinweise, dass es bei einigen Patienten unter mechanischer Unterstützung zu einer Verbesserung der Herzfunktion kommen kann, die auch bei Abschalten des Unterstützungssystems erhalten bleibt und damit eine Herztransplantation nicht mehr erforderlich ist („*bridge-to-recovery*“). Bisher ist es nicht möglich vorherzusagen, welche Patienten nachhaltig von einer Entlastung profitieren¹⁶⁻¹⁸.

(3) Die chirurgische Remodellingtherapie umfasst Verfahren, welche auf die Optimierung der Ventrikelgeometrie abzielen. Diese Therapien machen sich das Gesetz von Laplace zu Nutze, welches den Wandstress und damit den myokardialen Sauerstoffverbrauch in Relation zum ventrikulären Druck, zum ventrikulären Radius und zur ventrikulären Wanddicke setzt. Die chirurgische ventrikuläre Wiederherstellung (Dor-Prozedur)¹⁹, die partielle linksventrikuläre Ektomie (Batista-Prozedur)²⁰ und die Schaffung eines bilobulären linken Ventrikel mittels Myosplint²¹ beruhen auf diesem Prinzip. Herzunterstützungssysteme wie das AcornCorCap²² oder das Umschlingen des Herzens mit zuvor freipräpariertem *Latissimus dorsi* Muskel²³ beeinflussen ebenfalls die Ventrikelgeometrie günstig. Bis auf die gelegentlich durchgeführte Dor-Plastik, bei der aneurysmatisch veränderte Anteile des linken Ventrikels entfernt werden, sind alle anderen Verfahren inzwischen obsolet oder nicht über das Stadium der frühen klinischen Testung hinausgekommen.

(4) Die moderate, temporäre Verbesserung der Ejektionsfraktion nach Injektion bzw. Infusion autologer, adulter Progenitorzellen wie skeletaler Myoblasten, mesenchymale Knochenmarksstammzellen und zirkulierende endotheliale Progenitorzellen beruht am ehesten auf parakrinen Mechanismen. Diese führen zu gesteigerter Angiogenese, Festigung des Narbengewebes und Zellprotektion^{24,25}. Eine direkte Differenzierung dieser Zellen zu Kardiomyozyten konnte bisher nicht eindeutig gezeigt werden.

Alle beschriebenen Verfahren stellen nach heutiger Datenlage keine epidemiologisch relevante Alternative zur Herztransplantation dar. Daher wird experimentell versucht, neue und potenziell bessere Behandlungsstrategien zu etablieren.

Die Anwendung von im Labor gezüchtetem Herzgewebe nach Herstellung durch das sogenannte *tissue engineering* könnte eine alternative Behandlungsoption darstellen^{26,27}. Im Wesentlichen lassen sich drei Strategien des myokardialen *tissue engineering* voneinander unterscheiden:

- (1) Das Einbringen von Kardiomyozyten in vorgeformte biologische oder synthetische Matrices²⁸⁻³².
- (2) Kultivierung gefolgt von Stapelung von Kardiomyozyten-Zellschichten³³.
- (3) Unterstützung der Neigung von Kardiomyozyten zur Bildung dreidimensionaler, kontraktile Aggregate durch Einschluss in Hydrogelen^{34,35}.

Unserer Arbeitsgruppe ist es gelungen, Herzgewebe (*Engineered Heart Tissue*, EHT) aus neonatalen Herzzellen und Kollagen Typ I mit strukturellen und funktionellen Eigenschaften von nativem Myokard herzustellen³⁶. Wir konnten zeigen, dass EHTs nach Implantation auf gesundes Myokard überleben und vaskularisiert werden³⁶. Weiterhin konnte eine Funktionsverbesserung von infarziertem Myokard durch EHT-Implantation auf die Infarktnarbe nachgewiesen werden³⁷. Ob sich EHTs auch als kompletter Ersatz von defektem Herzmuskelgewebe bzw. zur Rekonstruktion von fehlendem Herzgewebe eignen, war bisher unbekannt. Dies ist aber gerade für Patienten mit ausgeprägter Narbenbildung

des Myokards (z.B. nach Herzinfarkt) und bei Kindern mit komplexen Herzfehlbildungen (z.B. hypoplastisches Linksherzsyndrom) relevant.

Zur Überprüfung der Anwendung von EHTs als vollständiger myokardialer Wandersatz bietet sich das heterotope Herztransplantationsmodell der Ratte an³⁸. Dabei können allogene Transplantate ohne Notwendigkeit zur Nutzung einer Herz-Lungen-Maschine untersucht werden. Prinzipiell existieren zwei hämodynamisch verschiedene Verfahren der heterotopen Herztransplantation im Kleintiermodell. Das klassische Modell von Ono und Lindsey zeichnet sich durch den volumenunbelasteten Zustand des linken Ventrikels aus³⁸. In einer Vielzahl von Studien konnte gezeigt werden, dass dieses Modell geeignet ist, Teilaspekte der Volumenentlastung und die damit einhergehenden Veränderungen auf molekularer Ebene zu untersuchen³⁹⁻⁴¹. Ein entscheidender Nachteil der kompletten linksventrikulären Entlastung ist die myokardiale Atrophie aufgrund der unphysiologischen vollständigen Volumenentlastung⁴². Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren verschiedene Strategien zur Volumenladung im heterotopen Transplantationsmodell entwickelt: (1) Implantation isovolumetrischer Ballons in den linken Ventrikel⁴², (2) Zerstörung der Aortenklappe zur Schaffung einer hämodynamisch relevanten Aorteninsuffizienz⁴³, (3) Atrioseptektomie und Entfernung der Trikuspidalklappe zur Schaffung eines Rechts-Links-Shunts⁴⁴, (4) Anlage einer Anastomose zwischen linken Vorhof des Spenders und der ligierten inferioren V.cava des Empfängers ebenfalls zur Schaffung von antegradem Blutfluss über den linken Vorhof in die linke Herzkammer⁴⁵. Alle genannten Prozeduren führen zwar zu einer Vorlasterrhöhung der linksventrikulären Kardiomyozyten haben aber den Nachteil, dass kardiale Strukturen zerstört werden müssen. Im Gegensatz zu den genannten Modellen erreichten Asfour und Kollegen mit einer Anastomose der Pulmonalarterie mit dem linken Vorhof eine Umgehung des Lungenkreislaufs und über eine Anastomose der superioren V. cava des Spenders an die abdominelle V. cava des Empfängers eine Ladung sowohl des rechten und konsekutiv des linken Ventrikels ohne Kompromittierung kardialer Strukturen⁴⁶.

Das Ziel dieser Arbeit war es, unter Ausnutzung eines geeigneten heterotopen Herztransplanationsmodells die Anwendung von EHT als Herzwandersatz im allogenen Rattenmodell zu testen. Um die Rolle nicht-kontraktiler Effekte (z.B. durch parakrine Wirkung oder passiv mechanische Stabilisierung) ebenfalls zu bewerten, wurden nicht-kontraktile Gewebe aus kardialen Fibroblasten (sogenannte *Engineered Connective Tissues*, ECTs) und mesenchymalen Stammzellen (sogenannte *Engineered Mesenchymal Tissues*, EMTs) entwickelt.

Im Speziellen wurden folgende Hypothesen überprüft:

1. Das Volumen-geladene Modell von Asfour und Kollegen erhält die Morphologie und Funktion des heterotop transplantierten Herzens besser als das Modell von Ono und Lindsey.
2. EHTs können als Herzmuskelwandersatz im heterotopen Transplantationsmodell eingesetzt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Genehmigungen

Es wurden insgesamt 151 männliche Wistar Ratten (Körpergewicht 315 ± 3 g, Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland) für die *in vivo* Experimente eingesetzt. Die Versuchstiere wurden in Polycarbonat-Käfigen bei $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$, 55 % Luftfeuchtigkeit und zwölf Stunden Hell-Dunkel-Zyklus bei Standarddiät (Altromin, Lage, Deutschland) und Wasser *ad libitum* gehalten. Für die Herstellung von EHTs (s.u.) wurden 500 neonatale Wistar Ratten verwendet. Genehmigungen für die im Rahmen dieser Untersuchung durchgeführten Tierversuche (Nr. 621-2531.31-2100) und Organentnahmen (#TS-09/00, #TS-20/00, #TS-06/03) wurden durch die Freie- und Hansestadt Hamburg erteilt.

2.2 Heterotope Herztransplantation

Die Anwendung von EHT als Herzmuskelwandersatz sollte im heterotopen Herztransplantationsmodell der Ratte getestet werden. Als potentielle Modelle wurden die Verfahren nach Lindsey und Ono mit Herzentlastung³⁸ und Asfour mit Volumenbelastung des Herzens⁴⁶ zunächst etabliert und hinsichtlich der Herzfunktion nach heterotoper Transplantation validiert.

2.2.1 Herstellung kardiopleger Lösung

Für die heterotopen Herztransplantationen wurde kardioplege Lösung vom St. Thomas Hospital-Typ (STH) verwendet. Die Substanzen wurden mit bidestilliertem Wasser für zehn Minuten mit einem Magnetrührer vollständig gelöst. Danach wurde die Lösung mit 0,1 molarer NaOH auf einen pH von 7 titriert. Die Osmolarität der Lösung betrug

341 mosm/kg H₂O. Im Anschluss wurde die kardioplege STH-Lösung steril filtriert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

STH-Lösung (finale Elektrolytkonzentrationen): 129 mmol/l Na, 140 mmol/l Cl, 16 mmol/l K, 16 mmol/l Mg, 1,2 mmol/l Ca, 37 mmol/l HCO₃, 1,2 mmol/l SO₄, 1 mmol/l Procain

2.2.2 Narkose

Die Narkose der Versuchstiere wurden mit 3,5 Vol% Isofluran in 95% O₂ + 5%CO₂ (Carbogen) eingeleitet und dann nach Intubation mit 1,5-2 Vol% Isofluran in Carbogen aufrechtgehalten. Die heterotopen Transplantationen in den Bauchraum sowie echokardiographische, magnetresonanztomographische und positronenemmissionstomographische Untersuchungen wurden per Maskenbeatmung durchgeführt, wobei der Zylinder einer 10 ml Spritze als Maske diente. Der Gasfluss betrug 0,5 l/min. Für die Linksherzkatheteruntersuchungen wurden die Versuchstiere intubiert. Als Trachealtubus diente hierbei eine 16 G Venenverweilkanüle. Die Intubation erfolgte unter Sicht nach Darstellung der *Epiglottis*. Der korrekte Sitz des Tubus wurde durch Beobachtung eines regelmäßigen und beidseitigen Hebens und Senkens des Brustkorbs verifiziert. Die Beatmungsfrequenz betrug 50/min, der Gasvolumenfluss 0,3 l/min, der zeitliche Anteil der Inspiration 40% und der Beatmungsdruck bei der Katheteruntersuchungen 120 mbar.

2.2.3 Heterotope Herztransplantation nach Ono und Lindsey

Die Versuchstiere wurden unter Isoflurannarkose in Rückenlage positioniert und das Abdomen mit Enthaarungscreme enthaart. Das Abdomen des Spendertieres wurde mit einer Laparotomie entlang der *Linea alba* eröffnet und die großen abdominalen Gefäße dargestellt. Nach Injektion von 300 IU Heparin in die *Vena cava inferior* wurde der Brustkorb mittels medianer Sternotomie eröffnet. Zusätzlich wurden die Rippen wirbelsäulennah durchtrennt,

um das Herz optimal darzustellen. Durch Durchtrennung der Bauchaorta wurden die Versuchstiere exsanguiniert und dann unmittelbar über eine im *Truncus brachiocephalicus* platzierte 18 G Kanüle mit 1 ml eiskalter kardiopleger Lösung manuell perfundiert. Der Aortenbogen war dabei mit einer geraden 10,5 mm x 2,3 mm *Bulldog*-Klemme abgeklemmt; Abfluss der kardioplegen Lösung wurde über eine kleine Entlastungsinzision in den *Truncus pulmonalis* ermöglicht. Nach Eintreten des kardioplegen Herzstillstandes wurde mit der Organentnahme begonnen. Die rechte obere Hohlvene und die untere Hohlvene wurden möglichst herznah ligiert. Danach wurden linke obere Hohlvene und der linke Lungenlappen gemeinsam ligiert. Die vier rechten Lungenlappen wurden hilusnah ebenfalls gemeinsam ligiert. Im Anschluss wurde erneut 1 ml kardioplege Lösung manuell appliziert. Die Aorta wurde distal und die Gewebe unterhalb der Ligaturen für die Herzentnahme durchtrennt. Für alle Ligaturen wurden nichtresorbierbare 5-0 Nylonfäden verwendet. Die Herzen wurden dann sofort in eiskalte isotonische 0,9%ige Kochsalzlösung überführt und in einer Petrischale gelagert. Das Empfängertier wurde unter Isoflurannarkose median laparotomiert. Die Bauchorgane wurden in mit angewärmter (37°) isotonischer Kochsalzlösung benetzte Gazetücher gewickelt. *Aorta abdominalis* und *Vena cava inferior* wurden dargestellt und infrarenal bzw. suprailiakkal mit geraden 10,5 mm x 2,3 mm *Bulldog*-Klemmen abgeklemmt. Die lumbalen Gefäße im geklemmten Bereich wurden mittels Elektrokauter verschlossen. *Aorta abdominalis* und inferiore *Vena cava* wurden von Blut befreit, indem über eine Injektionkanüle (27 G) mit 0,9%iger Kochsalzlösung gespült wurde. Nun wurden Anastomosen zwischen Aorta des Spenders und Aorta des Empfängers, sowie *Truncus pulmonalis* des Spenders und inferiorer *Vena cava* des Empfängers mit 8-0 Nylonfaden genäht (Abb. 1A). Die *Bulldog*-Klemmen wurden entfernt, um die Reperfusion des transplantierten Herzens sicher zu stellen. Nach Kontrolle auf Bluttrockenheit wurden die Bauchorgane zurück in die ursprüngliche Position gebracht und das Abdomen zweischichtig (Muskel, Haut) mit resorbierbarem 4-0 Faden verschlossen.

Das Nähen aller beschriebenen Anastomosen fand unter einem Operationsmikroskop in 10-facher Vergrößerung statt.

2.2.4 Heterotope Herztransplantation nach Asfour und Kollegen

Die Organentnahme für das volumengeladene Modell erfolgte mit Modifikationen analog zu der oben beschriebenen Entnahmetechnik für das ungeladene Modell. Nach Eintreten des kardioplegen Herzstillstandes wurde mit der Organentnahme begonnen. Die rechte, obere Hohlvene wurde nun jedoch möglichst weit distal ligiert, um die spätere Anastomose an die *Vena cava inferior* des Empfängers zu ermöglichen. Zudem wurde am explantierten Herzen eine Anastomose zwischen der *Arteria pulmonalis* und dem linken Vorhof genäht. Danach wurde das Empfängertier erneut analog zu oben beschriebener Operation vorbereitet, bis Anastomosen zwischen Aorta des Spenders und Aorta des Empfängers genäht wurden. Nun wurde im Gegensatz zum ungeladenen Modell die rechte *Vena cava superior* des Spenders und *Vena cava inferior* des Empfängers mit 8-0 Nylonfaden verbunden (Abb. 1B). Die *Bulldog*-Klemmen wurden entfernt, bei kontinuierlicher Abklemmung der rechten *Vena cava superior* bis beide Ventrikel kräftige Kontraktionen zeigten, um eine akute Volumenüberladung des rechten, bzw. linken Ventrikels zu vermeiden. Der Wundverschluss erfolgte wie oben beschrieben zweischichtig nach Rückverlagerung der Bauchorgane in ihre ursprüngliche Position.

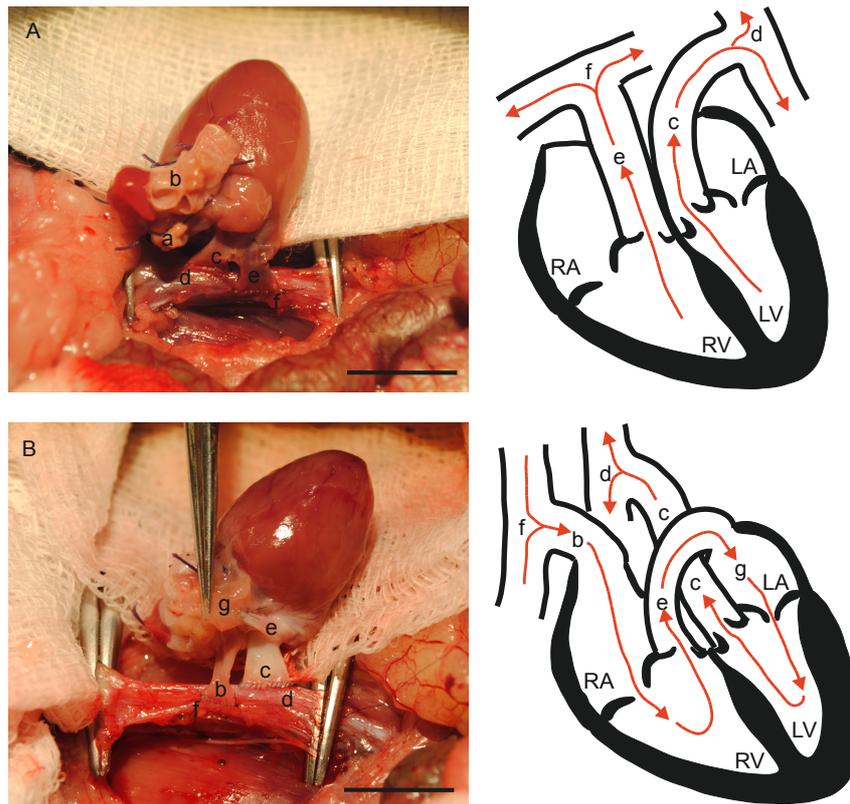


Abbildung 1: Heterotopie Herztransplantation in den Bauchraum von Ratten

A: Volumenungeladenes Modell (links: *in situ* Bild; rechts: schematisches Diagramm des Blutflusses (rote Pfeile) in den transplantierten Herzen). Vor Transplantation wurden rechte obere und untere Hohlvene (a) ligiert. Die linke obere Hohlvene und die Pulmonalhili (b) wurden im Anschluss *en-bloc* ligiert. Im Folgenden wurde die Spenderaorta (c) mit der abdominalen Aorta des Empfängers (d) anastomosiert, sodass die Perfusion der Koronararterien sichergestellt wurde. Blut, welches über den Koronarsinus den rechten Ventrikel erreichte, wurde über den Pulmonalarterienstamm (e) in die *V. cava inferior* des Empfängers (f) ausgeworfen. B: Volumengeladenes Modell (links: *in situ* Bild; rechts: schematisches Diagramm des Blutflusses (rote Pfeile) in den transplantierten Herzen). Blut erreicht den rechten Ventrikel über eine Anastomose zwischen der *V. cava inferior* des Empfängers (f) und der rechten *V.cava superior* des Spenders (b). Eine Verbindung zwischen linkem und rechtem Herzen wurde über eine Anastomose zwischen Pulmonalarterienstamm (e) und linkem Atrium (g) erreicht. Das Blutvolumen des linken Ventrikels wird gegen den systemischen Blutdruck über die ascendierende Spenderaorta (c) in die abdominelle Aorta des Empfängers (d) ausgeworfen. Maßstab: 1 cm.

2.3 Herstellung von Gewebekonstrukten über Tissue Engineering Verfahren

Die Herstellung von Gewebekonstrukten erfolgte in fünf Arbeitsschritten; der Zellisolation, der Herstellung von Kollagen Typ 1, der Herstellung von Hühnerembryonenextrakt, der Herstellung der Gewebekonstrukte und der Kultivierung der Konstrukte.

2.3.1 Kardiomyozytenpräparation

Neonatale Wistar-Ratten (1-3 Tage *post partum*) wurden dekapitiert und sternotomiert. Nach Entnahme des gesamten Herzens wurde dieses umgehend in sterilem, eisgekühltem Kalzium- und Bicarbonat-freiem Hanks Puffer mit [2-Hydroxyethyl]piperazin-N-[2-ethansulfonsäure]] (CBFHH) gelagert. Die Anzahl der Ratten pro Präparation variierte von 26 bis 120. Nach Säuberung der Herzen in CBFHH und Abtrennung der Vorhöfe und Gefäßstiele wurden die Herzen in eine neue Kulturschale mit CBFHH transferiert und in der Mitte zweigeteilt. Nach dreimaligem Spülen mit je 10 ml CBFHH wurden die Herzen mit einer gebogenen chirurgischen Präparationsschere zerkleinert. Mit einer mit CBFHH benetzten, weitlumigen Pipette wurden die Gewebestücke in ein 50 ml Sammelgefäß überführt. Nach erneutem dreimaligem Spülen mit je 10 ml CBFHH wurde ein enzymatischer Gewebeaufschluss mit Trypsin und DNase durchgeführt. Die zerkleinerten Gewebestücke wurden mit 10 ml (bei 60-70 Herzen) Trypsin/DNase-Arbeitslösung versetzt und für 10 min unter kontinuierlichem Schwenken auf einer Kippwippe (Neigungswinkel 15°, 60 Kippbewegungen/min) inkubiert. Der trübe Überstand dieses Vorverdaus wurde anschließend verworfen. Nach erneuter Resuspension der Gewebestücke in 10 ml Trypsin/DNase-Arbeitslösung für 10 Minuten unter fortwährendem Schwenken wurde der Überstand erstmalig in ein steriles 50 ml Sammelgefäß mit 2 ml Hitze-inaktiviertem fetalen Kälberserum (FKS) zur Inaktivierung des Trypsins überführt. Nach Inkubation der Gewebestücke mit DNase-Arbeitslösung (9 ml) und Triturierung (weitlumige Pipette, 25 mal)

wurde der Überstand ebenfalls in das Sammelgefäß überführt. Die Zeiten der weiteren Inkubationen mit Trypsin-Arbeitslösung wurden dem Maß der Trübung angepasst, wobei eine maximale Inkubationszeit von 5 Minuten nicht überschritten wurde. Dieser Wechsel von Protein/DNA-Verdau und reinem DNA-Verdau wurde unter Reduktion der Volumina in 0,5 ml Schritten auf 6 ml (Trypsin/DNase-Arbeitslösung) bzw. 5 ml (DNase-Arbeitslösung), jeweils nach Füllung eines 50 ml Sammelgefäßes, durchgeführt. Der komplette Verdau der Gewebestücke dauerte bei 60 – 70 Herzen im Mittel 4 Stunden, wobei durchschnittlich 7 Sammelgefäße gefüllt wurden. Gefüllte Sammelgefäße wurden in dieser Zeit auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Sammelgefäße in einem Schwenkbecherrotor zentrifugiert (60 g, 15 min, 4 °C). Nach Abnehmen des klaren Überstandes wurden die pelletierten Zellen in den Sammelgefäßen in jeweils 2 ml Nicht-Kardiomyozyten-Medium (NKM) aufgenommen und anschließend in einem einzigen Sammelgefäß (50 ml) zusammengeführt. Zusätzlich wurden die leeren Sammelgefäße mit 2 ml NKM gespült. Diese Volumina wurden ebenfalls in das Sammelgefäß gegeben. Zu dem Sammelvolumen wurde schließlich DNase-Stammlösung (0,8% des Gesamtvolumens) hinzupipettiert. Nach erneutem Triturieren und Pelletieren durch Zentrifugation (60 g, 15 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und darauf das Zellpellet in 32 ml NKM aufgenommen. Die Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb (Maschengröße: 250 µm) gegeben. Anschließend wurden das Sammelgefäß und das Sieb mit 10 ml NKM gespült. Nach Färbung mit Trypanblau (250 µl Trypanblau, 150 µl PBS, 100 µl Zellsuspension, 10 min Inkubationszeit, Raumtemperatur) wurde die Zahl der vitalen, in diesem Fall nicht gefärbten Zellen, in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Alternativ zur Zählkammer wurde ein elektronischer Zellzähler (Casy Counter) verwendet. Die Zellsuspension wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gekühlt gelagert.

PBS: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na₂HPO₄ (H₂O)₇, 0,2 g KH₂PO₄ in 1,0 l Aqua bidest; pH 7,4; zur Sterilisierung autoklavieren.

CBFHH: 137 mM NaCl, 5,36 mM KCl, 0,81 mM MgSO₄ (H₂O)₇, 5,55 mM Dextrose, 0,44 mM KH₂PO₄, 0,34 mM Na₂HPO₄ (H₂O)₇, 20 mM [2-Hydroxyethyl]piperazin-N-[2 ethansulfonsäure]] (HEPES) in destilliertem, deionisiertem und pyrogenfreiem Wasser (Aqua ad injectabilia), pH 7,5.

Trypsin-Stammlösung (50x): 6 g Trypsin in 6 ml CBFHH bei 4 °C über Nacht rotierend gelöst, vor Gebrauch durch 0,2 µm Filter steril filtrieren.

Trypsin-Arbeitslösung: 1,5 ml Trypsin-Stammlösung, 0,5 ml Penicillin/Streptomycin (P/S, 100x; Endkonzentration: 100 U/ml und 100 µg/ml) und 0,7 ml DNase (71x) mit CBFHH auf 50 ml auffüllen. Bis zur Verwendung auf Eis lagern.

DNase-Stammlösung (71x): 100 mg DNase in 50 ml 0,15 M NaCl-Lösung ansetzen. Durch 0,2 µm Filter steril filtrieren und bei -20 °C lagern.

DNase-Arbeitslösung: 0,5 ml P/S (100x), 0,7 ml DNase (71x) und 1,7 ml FKS (aktiv) mit CBFHH auf 50 ml auffüllen. Bis zur Verwendung auf Eis lagern.

NKM-Medium: DMEM, 10% FKS, 2 mM Glutamin, 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin.

2.3.2 Nicht-Kardiomyozytenpräparation

Parallel zur Isolation von kompletten Herzzellpopulationen wurden Nicht-Kardiomyozyten aufgereinigt. Dafür wurden Herzzellen direkt nach der Isolation auf 10 cm Kulturschalen (40-50 Millionen Zellen pro Schale) ausplattiert. Nach 60 Minuten (NKM-Medium, 37°C, 5% CO₂) wurde das Medium mit den nicht angewachsenen Zellen (v.a. Herzmuskelzellen) entfernt und verworfen. Die angehafteten Zellen wurden bis zu einer 70%-tigen Konfluenz kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen trypsiniert (0,25%/0,05% Trypsin/EDTA) und auf vier 10 cm Schalen zur weiteren Kultur verteilt. Das Kulturmedium wurde jeden zweiten Tag

erneuert. Die Zellen wurden für 3 bis 5 Passagen kultiviert. Ab der 2. Passage waren keine kontrahierenden Zellen mehr erkennbar.

2.3.3 Präparation von mesenchymalen Stammzellen

Zur Herstellung von nicht-kontraktilen Kontroll-Konstrukten wurden neben Nicht-Kardiomyozyten auch GFP-positive mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (MSC) von Wistar Ratten verwendet (ein Zellklon wurde uns dankenswerterweise von Frau PD Dr. Lange, Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg, zur Verfügung gestellt). Das Knochenmark wurde in Kulturflaschen mit DMEM/F12 Medium mit 20% FKS, 1% Penicillin/Streptokinase und Glutamin (2 mol/l) transferiert. Nach drei Tagen wurden die nicht-adhärenenten Zellen gewaschen und die Zellen nach sieben Passagen in Bezug auf den Phenotyp charakterisiert. MSCs waren CD45 negativ und positiv für CD90 und CD59. (Name des Klons: III B6 – GFP).

2.3.4 Präparation von Kollagen Typ 1

Rattenschwänze wurden von Kadavern abgetrennt und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Vor der Kollagenpräparation wurden die Rattenschwänze aufgetaut und mit Ethanol (70%) sterilisiert. Die Durchführung der gesamten Präparation erfolgte unter sterilen Bedingungen. Nach Abtrennung der Haut wurden die Kollagen Typ I-haltigen Sehnenfäden von den Wirbelknochen abgenommen, mit einer Schere zerkleinert und in PBS gewaschen. Anschließend wurde das Kollagen in 0,1% Essigsäure (50 ml pro Tier) unter kontinuierlichem Rühren bei 4°C gelöst. Durch eine Zentrifugation bei 20.000 g für 2 Stunden bei 4°C wurden nicht gelöste Gewebereste pelletiert. Die Überstände wurden gesammelt. Durch eine langsame Zugabe von eisgekühlter NaCl-Lösung (25% in 0,1% Essigsäure) wurde die

Salzkonzentration in der Suspension unter ständigem Rühren auf 4% zur Fällung des Kollagens eingestellt. Nach einer Inkubation bei 4°C über Nacht unter kontinuierlichem Rühren wurde die Suspension erneut zur Pelletierung des Kollagens zentrifugiert (10.000 g, 5 Minuten, 4°C). Die Überstände wurden verworfen. Das Pellet wurde in kalter Essigsäure (0,1%, 50 ml pro Tier) aufgenommen. Die Lösung der ausgefällten Proteine erfolgte wieder bei 4°C und Rühren über Nacht. Durch mehrmalige Dialyse gegen Essigsäure (0,1%) wurde der NaCl-Gehalt in der Kollagensuspension weiter reduziert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Sircol Kollagen Assay (Biocolor). Kommerziell erworbenes Kollagen (Upstate Biotechnology) diente dabei als Proteinstandard.

2.3.5 Herstellung von Hühnerembryonenextrakt

60 bebrütete Hühnereier (7. – 9. Bruttag) wurden mit 70% Ethanol desinfiziert und am runden Pol geöffnet. Die Hühnerembryonen wurden entnommen, dekapitiert und in eine autoklavierte Flasche mit PBS und 4% P/S überführt. Anschließend wurden die Hühnerembryonen auf Eis homogenisiert, mit PBS auf 300 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und zentrifugiert (60 g, 15 min, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet erneut homogenisiert und der zweite Überstand mit dem ersten gepoolt. Der Hühnerembryonenextrakt (CEE; *chick embryo extract*) wurde auf Kontamination mit Bakterien und Mykoplasmen geprüft. Die Lagerung des CEE erfolgte bei –20°C. Eine Präparation ergab im Mittel ein Gesamtvolumen von 180-230 ml CEE.

2.3.6 Gewebeherstellung über Tissue Engineering Verfahren

2.3.6.1 Herstellung von Engineered Heart Tissue (EHT)

In autoklavierbare Kulturschalen (Durchmesser 6 cm, Glas) wurden je zwei Silikondochte (Durchmesser 2 mm, 80% der Schalenhöhe) eingeklebt. Anschließend wurden Teflonscheiben (Durchmesser 16 mm) über diese Dochte gestülpt und die Schalen bis zu 1/3 ihrer Höhe mit Silikon ausgegossen. Nach Aushärten des Silikons wurden die Teflonscheiben zur Herstellung von definierten Gussformen entfernt. Vor der Verwendung als Gussform wurden Zylinder aus Teflon (Durchmesser 8 mm) auf die Dochte aufgebracht, so dass 2 ringförmige Mulden (Innendurchmesser 8 mm, Außendurchmesser 16 mm) mit einem Fassungsvermögen von je ~750 µl entstanden. Die Kulturschalen wurden schließlich vor Benutzung intensiv ausgekocht und autoklaviert. Alle zur Herstellung der EHTs notwendigen Pipettierschritte wurden auf Eis mit vorgekühlten Reaktionsgefäßen, Pipetten, Substanzen und Lösungen durchgeführt. Zunächst wurde Kollagen Typ I vorgelegt und volumengleich mit zweifach konzentriertem EHT-Medium vermischt. Der zu diesem Zeitpunkt saure pH-Wert des Gemischs wurde mit NaOH (0,1 N) neutralisiert. Die Zugabe von Exsudat des Engelbreth-Holm-Swarm Tumors der Maus (Matrigel) erfolgte vor der Vermengung mit der Zellsuspension ($2,5 \times 10^6$ Zellen pro EHT). Nach wiederholtem Triturieren des Matrix-Zell-Gemischs wurde je 900 µl zügig in die Gussformen pipettiert. Trotz des geringeren Fassungsvermögens der Gussformen (~750 µl) konnte der Volumenüberschuss (150 µl) durch die hohe Viskosität des Matrix-Zell-Gemischs auf die ausgegossene Gussform aufgeschichtet werden. Anschließend wurden die Kulturschalen für 1 Std. bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, um eine leichte Aushärtung des Matrix-Zell-Gemischs zu erreichen. Darauf wurden die EHTs vorsichtig mit 6 ml EHT-Medium pro Kulturschale (je 2 EHTs) überschichtet.

Standard-Pipettierschema zur Herstellung von 4 EHTs:

Kollagen (5,5 mg/ml)	640 µl
2x EHT-Medium	779 µl
NaOH 0,1 N	139 µl
Extrazelluläre Matrix	400 µl
Zellsuspension ($4,5 \times 10^6$ Zellen/ml)	2442 µl

EHT-Medium: *Dulbeccos Minimal Essential Medium* (DMEM), 10% Pferdeserum (HS), 2% CEE, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (P/S).

2x EHT Medium: 5 ml 10x DMEM, 5 ml HS, 1 ml CEE und 0,5 ml P/S (100x) auf 25 ml mit Aqua ad iniectabilia auffüllen. Lagerung bei 4 °C maximal 1 Woche.

2.3.6.2 Herstellung von nicht-kontraktilen Kontrollgeweben

Nicht-kontraktile Gewebekonstrukte wurden analog zu dem unter 2.3.6.1 beschriebenen Protokoll zur Herstellung von EHTs generiert und kultiviert. Anstelle von Kardiomyozyten wurden dabei $1,7 \times 10^6$ Nicht-Kardiomyozyten bzw. 2×10^6 mesenchymale Stammzellen pro Gewebekonstrukt zur Herstellung von *Engineered Connective Tissue* (ECT) bzw. *Engineered Mesenchymal Tissue* (EMT) eingesetzt. Im Gegensatz zu EHTs wurden ECTs und EMTs ohne Matrigel hergestellt; dabei wurde das Matrigel Volumen durch NKM-Medium ersetzt.

2.3.7 Gewebekultur

Das EHT-Medium wurde am ersten Tag nach Herstellung und anschließend jeden zweiten Tag bis zur weiteren Verwendung gewechselt. Die gesamte Kulturdauer der EHTs betrug 12 Tage bei 37°C in 5% CO₂. Nach 7 Kulturtagen wurden jeweils fünf Einzelringe auf isometrische Dehnapparaturen überführt und für weitere 5 Tage kultiviert. Nach 12 Tagen entstanden so zusammenhängende, kontraktile Gewebeverbände. Für die nicht-kontraktilen Zellen musste die Kulturdauer auf den Dehnapparaturen auf den Zeitraum von 3 Tagen begrenzt werden, da es ansonsten durch die im Gegensatz zu EHTs deutlich raschere Kondensierung zu Brüchen der Einzelringe gekommen wäre. Der DNA interkalierende Farbstoff 4',6-Diamino-2-phenylindol (DAPI; 1 µg/ml) wurde am Kulturtag 12 in das EHT-Medium pipettiert. Nach einer Stunde wurde das EHT-Medium 4-fach gewechselt um nichtgebundenes DAPI auszuwaschen.

2.4 Wandersatz im heterotop transplantierten Herz

Für die Wandersatzstudie wurde ausschließlich das volumengeladene Modell nach Asfour und Kollegen verwendet. Die Operation wurde wie unter 2.2.4 beschrieben durchgeführt. Zusätzlich wurde nach der Organentnahme mit Hilfe einer Biopsiestanze (Abb. 2A) ein 6 mm großes, transmurales Loch in die freie Wand des linken Ventrikels gestanzt (Abb. 2B). Dabei wurden die Papillarmuskeln und der *Ramus interventricularis anterior* ausgespart, um eine Mitralklappeninsuffizienz bzw. eine myokardiale Ischämie zu vermeiden. In den transmuralen Defekt wurde danach endokardial ein dem Spender entnommenes, kreisrundes *Aortenfragment* mit 5 mm Durchmesser eingenäht, der ebenfalls mit einer Biopsiestanze aus dem Aortenbogenbereich ausgeschnitten wurde (Abb. 2B). Dieser wurde durch eine fortlaufende Naht mit 8-0 Nylonfaden befestigt (Abb. 2C). Blutungen im Bereich des transmuralen Defekts wurden durch Tamponade mit autologem Fettgewebe oder durch Elektrokauterisierung gestoppt (Abb. 2D). Nach Fertigstellung der Anastomosen wurde ein

Implantat (EHT, ECT oder EMT) über den transmuralen Defekt implantiert und mit sechs Einzelknopfnähten am unbeschädigten Myokard befestigt. Dabei wurden jeweils der obere und untere Pol des sternförmigen *Patches* mit jeweils einem Knoten befestigt und im Anschluss die Pole zweier freier Ringe mit jeweils einer gemeinsamen Naht befestigt (Abb. 2E).

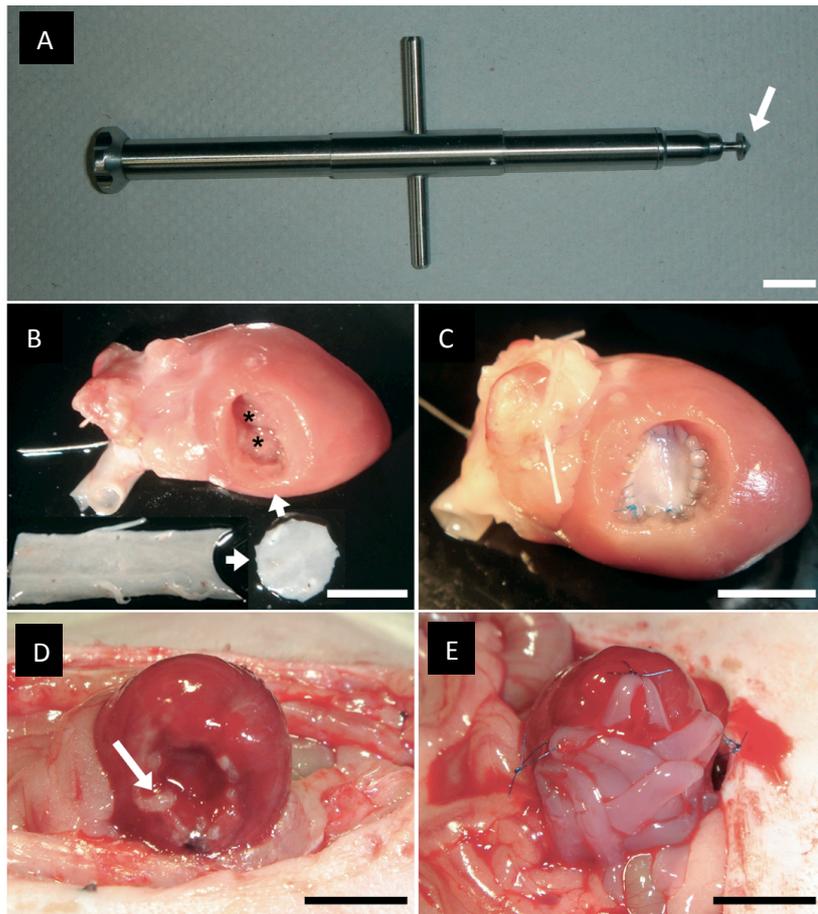


Abbildung 2: Transmurales Wandersatz eines Ventrikeldefektes mittels *in vitro* gezüchteter Gewebekonstrukte

A: Biopsie-Stanze zur Schaffung eines 6 mm großen transmuralen Herzwanddefekts. B: Linksventrikulärer Defekt nach Ausstanzen des Myokard (die Sternchen markieren die unverletzten Papillarmuskeln) und Modellieren eines Aortenfragments (links unten: eröffnete Aorta, rechts unten: zurechtgeschnittenes Aortenfragment) zum endokardialen Verschluss des Defekts. C: Transmurales Herzwanddefekt mit eingenähtem Aortenfragment. D: Transplantation des Herzens mit transmuralen Defekt und implantiertem Aortenfragment in

den Bauchraum des Empfängertiers. Der Pfeil markiert abdominelles Fettgewebe zur Hämostase. E: EHT-Implantation auf den linksventrikulären Herzwanddefekt. Maßstäbe: 10 mm (A); 5 mm (B-E).

2.5 Medikation und Immunsuppression

Alle Tiere erhielten eine tägliche Immunsuppression bestehend aus 5 mg/kg KG Ciclosporin A und 2 mg/kg KG Methylprednisolon. Zusätzlich wurden postoperativ und täglich bis drei Tage nach OP 2000 mg/kg KG Amoxicillin und 0,1 mg/kg KG Buprenorphin verabreicht. Darüberhinaus wurde für die Dauer von 14 Tagen 1 mg/kg KG Enoxaparin verabreicht, um eine Thrombusbildung in den transplantierten Herzen zu vermeiden. Die Substanzen wurden kurz vor der Operation und dann täglich mit einer 1 ml Insulinspritze (Braun, Deutschland) und 1:10 mit physiologischer, steriler Kochsalzlösung verdünnt subkutan unter kurzer CO₂ - Narkose injiziert.

2.6 Echokardiographie (Echo)

Für die echokardiographischen Untersuchungen wurde ein Kleintier-Ultraschallgerät (Vevo 770, VisualSonics, Toronto, Kanada) mit einem 30 MHz Schallkopf verwendet. Die Versuchstiere wurden in Rückenlage auf einem beheizten Untersuchungstisch gelagert und der Brustkorb enthaart. Während der gesamten Untersuchung wurde ein Oberflächen-EKG über die Pfoten abgeleitet. Sowohl in den orthotopen als auch in den heterotopen Herzen wurde zunächst eine lange Achse, definiert durch die Aortenklappe und einen maximalen Abstand zwischen Aortenklappe und Apex, eingestellt. Die Einstellung der kurzen Achse erfolgte anschließend durch Drehung des Schallkopfes um 90° und Aufsuchen der mittleren Ebene der Papillarmuskeln. Es erfolgte die Speicherung von B-Mode Aufnahmen der kurzen und langen Achse sowie von M-Mode-Aufnahmen durch das Zentrum des linken Ventrikels

in der kurzen Achse. Weiterhin wurde in den heterotopen Herzen der Blutfluß über der Aortenklappe in der langen Achse mittels *pulsed wave* Doppler aufgezeichnet.

Folgende Parameter wurden in der langen Achse bestimmt: maximaler linksventrikulärer Längendurchmesser in der Systole (Ls). Folgende Parameter wurden in der kurzen Achse bestimmt: Dicke der Vorderwand in der Systole (AWThs), Dicke der Vorderwand in der Diastole (AWThd), linksventrikulärer Durchmesser in der Systole (LVIDs), linksventrikulärer Durchmesser in der Diastole (LVIDd), Fläche die durch das Endokard begrenzt wird in der Systole (Areas), Fläche die durch das Endokard begrenzt wird in der Diastole (Aread), Fläche die durch das Epikard begrenzt wird in der Systole (Epi). Die Herzfrequenz wurde mittels EKG bzw. im M-Mode bestimmt. Die folgenden Parameter wurden berechnet:

Flächenverkürzungsfraction: $FAS = ((Aread - Areas) / Aread) \times 100\%$

Vorderwandverkürzungsfraction: $AWThF = ((AWThs - AWThd) / AWThs) \times 100\%$

Linksventrikuläres Gewicht: $LVW = 1,05 \text{ g/cm}^3 \times (5/6) \times (((Ls + AWThs) \times Epi) - (Ls \times Areas))$

2.7 Positronen-Emissions-Tomographie (PET)

In Zusammenarbeit mit Dr. Buchert aus der Nuklearmedizin des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf wurden positronenemissionstomographische (PET) Untersuchungen durchgeführt. Hierfür wurde ein MOSAIC Kleintier PET System (Phillips) verwendet. Das System basiert auf 14.456 Gadolinium Oxyorthosilicat Kristallen mit Dimensionen von 2 x 2 x 10 mm. Das Sichtfeld hat einen transversalen Durchmesser von 12,8 cm und eine axialen Ausdehnung von 12 cm. Der Scanner läuft ausschließlich im 3D Modus. Es wurde frisch hergestellte F-18-fluorodeoxyglucose (FDG) über die Schwanzvene injiziert. Das injizierte Volumen lag stets unter 0,2 ml. Zudem wurde der Blutzuckerspiegel der Tiere gemessen und durch i.p. Injektion von 20% Glucose über 130 mg/dl gehalten. Der Aufnahmemodus wurde

innerhalb von 60 Minuten nach FDG Applikation gestartet. Die Auswertung erfolgte mithilfe der ImageJ-Software. Es wurden die mittlere Signalintensität der orthotopen und heterotopen Herzen nach Markierung der Organgrenzen in einer transversalen Aufnahme ermittelt und das Verhältnis der Werte aus dem heterotopen Herzen zum orthotopen Herzen des selben Tieres ermittelt.

2.8 Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT)

In Zusammenarbeit mit Dr. Hess aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg wurden MRT-Untersuchungen durchgeführt. Hierfür wurde ein Bruker 4.7T BioSpec System für Kleintiere mit einer Fast Low Angle Shot (FLASH) Gradient Echosequenz verwendet. Das verwendete „*self-gated*“ Protokoll für kardiale Fragestellungen erlaubt getrennte CINE-MRT Aufnahmen von orthotopen und heterotopen Herzen. Mit der FLASH-Sequenz wurden 15-16 Bilder pro Herzzyklus der kurzen Achse (1.08 mm Schichtdicke) in einem Sichtfeld von 6x6 cm aufgenommen. Die Echozeit (TE) betrug 5,5 ms und die Wiederholungszeit (TR) 8,9 ms. Initial wurden zur Orientierung longitudinale Aufnahmen gemacht. Anschließend wurden die Daten durch manuelle Segmentierung der Herzkonturen ausgewertet.

2.9 Linksherzkatheterisierung

Für die Aufnahme von Druck-Volumen-Kurven wurde ein Millar 2 F Conductance-Katheter (Modell SPR-838) mit Anschluss an eine Aria/PowerLab Datenaquisitions-Einheit (Millar/Powerlab) verwendet. Die Volumenkalibrierung erfolgte in heparinisiertem Rattenblut in einem Plexiglasblock mit volumendefinierten Bohrlöchern. Die Druckkalibrierung erfolgte mithilfe eines Manometers. Die Versuchstiere wurden intubiert und in Rückenlage auf einer beheizten Wärmeplatte gelagert. Darauf wurde die rechte *A. carotis* nach einem 2 cm langen

Hautschnitt stumpf freipräpariert und der Druck-Volumen-Katheter über die *A. carotis* in den linken Ventrikel des orthotopen Herzens eingeführt. Die korrekte Lage wurde durch die charakteristische linksventrikuläre Druck-Volumen-Kurve verifiziert. Aufzeichnungen von Druck-Volumen-Kurven wurde ca. 10 min nach Beginn der Aufzeichnung bei ausgeschalteter Beatmung durchgeführt. Anschließend wurde die *A. carotis communis* ligiert, um eine Untersuchung des heterotopen Herzens im Bauchraum zu ermöglichen. Es erfolgte eine mediane Laparatomie und das heterotope Herz wurde schonend von Verwachsungen befreit. Der Apex wurde anschließend mit einer 27 G Kanüle punktiert, der Katheter unmittelbar danach durch den Punktionskanal in den linken Ventrikel eingeführt und die Druck-Volumen-Kurven aufgezeichnet. Die Daten wurden nach den Messungen mithilfe der PVAN 3.2 (Millar) Software analysiert.

2.10 Mikroskopische Analysen

Die Explantation der Herzen (orthotop und heterotop) erfolgte 28 Tage nach heterotoper Herztransplantation. Dafür wurden die Versuchstiere einer erneuten tiefen Isoflurannarkose unterzogen. Implantate im Bauchraum wurden großzügig mit den umliegenden Verwachsungen entnommen. Die Tötung erfolgte durch Exsanguination nach Eröffnung der abdominalen Aorta. Bei Entnahme der Herzen wurde der Gefäßstil durchtrennt. Die Explantate wurden kurz in PBS gewaschen und zur weiteren histologischen Aufarbeitung in 4% Formalin in PBS (4°C, über Nacht) fixiert und anschließend in PBS bei 4°C gelagert.

2.10.1 Durchlichtmikroskopie

2.10.1.1 Paraffineinbettung

Gewebeproben wurden in einer aufsteigenden Isopropylalkohol-Reihe entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet (Tabelle 1). Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden in einem 42-44 °C warmen Wasserbad gestreckt und daraufhin auf poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgezogen.

1.	70% Isopropanol	2 – 3 Stunden (oder über Nacht)	Raumtemperatur
2.	80% Isopropanol	2 – 3 Stunden	Raumtemperatur
3.	96% Isopropanol I	2 – 3 Stunden	Raumtemperatur
4.	96% Isopropanol II	2 – 3 Stunden	Raumtemperatur
5.	100% Isopropanol I	2 – 3 Stunden	Raumtemperatur
6.	100% Isopropanol II	2 – 3 Stunden (oder über Nacht)	Raumtemperatur
7.	100% Isopropanol III	1 Stunde	60°C
8.	Paraffin/Isopropanol 1:1	1 Stunde	60°C
9.	Paraffin I	2 Stunden	60°C
10.	Paraffin II	2 Stunden	60°C

11.	Paraffin III	2 Stunden (oder über Nacht)	60°C
12.	Ausgießen mit Paraffin		60°C

Tabelle 1: Protokoll der Paraffineinbettung

2.10.1.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Paraffinschnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (Tabelle 2).

1.	Xylol I	15 min
2.	Xylol II	15 min
3.	100% Ethanol I	5 min
4.	100% Ethanol II	5 min
5.	96% Ethanol I	5 min
6.	96% Ethanol II	5 min
7.	80% Ethanol	5 min
8.	70% Ethanol	5 min
9.	Aqua dest.	5 min
10.	Hämalaunlösung	20 min
11.	Leitungswasser, fließend	10 min
12.	Aqua dest.	Spülen

13.	Eosinlösung	10 min
14.	Aqua dest.	Spülen
15.	96% Ethanol I	Spülen
16.	96% Ethanol II	Spülen
17.	100% Ethanol I	Spülen
18.	100% Ethanol II	Spülen
19.	Xylol	3 – 5 min
20.	Eindeckeln mit Eukitt®	

Tabelle 2: Protokoll der HE-Färbung

Poly-L-Lysin-Beschichtung: Objektträger mit Aceton reinigen, in *aqua dest.* waschen, für 30 Minuten bei Raumtemperatur in poly-L-Lysin (1 mg/ml) inkubieren, in aqua dest waschen, über Nacht bei 60°C trocknen, Lagerung bei 4°C für maximal 2 Wochen.

Eosinlösung (0,1 %): 0,5 g Eosin gelblich in 500 ml aqua dest lösen, dunkel lagern.

Hämalaunlösung nach Mayer: 1 g Hämatoxylin in 1000 ml aqua dest lösen, 0,2 g NaIO₃ und 50 g KAl(SO₄)₂ einrühren bis die Lösung eine blauviolette Farbe annimmt, 50 g Chloralhydrat und 1 g Zitronensäure einrühren bis die Lösung eine rotviolette Farbe annimmt, vor Gebrauch filtrieren.

2.10.2 Konfokale Laserscanningmikroskopie

Die Formalin-fixierten Präparate wurden über Nacht einer Kryoprotektion mit 10% Sucrose/PBS-Lösung unterzogen und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Präparate bei -20°C in Tissue Tec® eingebettet. Auf einem Kryotom wurden Schnitte von 20 µm Dicke bei -20°C angefertigt und auf poly-L-Lysinbeschichtete Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 30 min getrocknet. Es wurde folgendes Protokoll zur Immunfluoreszenzfärbung verwendet:

1.	TBS	Raumtemperatur	5 Minuten
2.	4% Formalin	Raumtemperatur	10 Minuten
3.	TBS	Raumtemperatur	5 Minuten
4.	Blocklösung	Raumtemperatur	1 Stunde
5.	TBS	Raumtemperatur	5 Minuten
6.	Primärer Antikörper	4°C	Über Nacht in Feuchtkammer
7.	TBS	Raumtemperatur	4x10 Minuten
8.	Sekundärer Antikörper	Raumtemperatur	2 Stunden in Feuchtkammer
9.	TBS	Raumtemperatur	4x10 Minuten

10.	Eindeckeln mit Mowiol 4-88	Bei 4°C im Dunkeln lagern	
-----	----------------------------	---------------------------	--

Tabelle 3: Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung

10x TBS: Trishydroxymethylaminmethan ultra pure 121,14 g, NaCl 180 g in 2000 ml aqua dest., mit HCl auf pH 7,4 eingestellt.

Blocklösung: 10% FKS, 1% Rinderserumalbumin, 0,5% Triton X, 0,05% Thimerosal in TBS.

Antikörperlösung: 1% Rinderserumalbumin, 0,5% Triton X, 0,05% Thimerosal in TBS.

Mowiol 4-88: 12 g Mowiol 4-88 in 30 ml H₂O einrühren, 60 ml 0,2 M Tris-Puffer (pH 8,5) einrühren, über Nacht bei Raumtemperatur rühren, auf 90°C für 45 min erhitzen, auf 50°C abkühlen lassen, 30 g fluoreszenzfreies Glycerin einrühren, pH 8,5 einstellen, Aliquots bei –20°C lagern. Vor Gebrauch 7,5% 1,4-Diazabicyclo(2,2,2)octane (DABCO, Ausbleichschutz, Sigma) zufügen.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden folgende primäre Antikörper in den angegebenen Konzentrationen verwendet:

Antikörper	Spezies	Antikörpertyp	Verdünnung	Hersteller
Anti-β-Prolyl-4-Hydroxylase	Maus	IgG1/k	1:500	Chemicon
Anti-alpha-sarkomerisches Aktinin	Maus	IgG1	1:1000	Sigma

Tabelle 4: Primäre Antikörper

Phalloidin-Alexa 488 bzw. Phalloidin-Alexa 546 (10 μ M, Sigma) wurde verwendet, um f-Aktin zu färben. *Bandeiraea simplicifolia* lectin-TRITC (10 μ g/ml, Sigma) wurde verwendet, um Endothelzellen zu markieren. DRAQ5 (5 μ M, Alexis Biochemicals) wurde verwendet, um Zellkerne zu markieren.

Folgende sekundäre Antikörper wurden verwendet:

Antikörper	Spezies	Label	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus IgG	Ziege	Alexa 488 bzw. Alexa 546	1:800	Molecular Probes

Tabelle 5: Sekundäre Antikörper

2.11 Statistik

Alle dargestellten Werte sind arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) und wurden mit dem Computerprogramm Excel berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mit dem 2-seitigen Student t-Test für verbundene bzw. unverbundene Stichproben und bei mehr als 2 Versuchsgruppen per ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test ermittelt. Signifikanzen zwischen Überlebenskurven wurden mit dem Gehan-Breslow-Wilcoxon Test ermittelt. Ein P-Wert niedriger als 0,05 wurde als signifikant angenommen.

2.12 Substanzen, Hilfsmittel und Geräte

2.12.1 Substanzen

- [2-Hydroxyethyl]piperazin-N-[2-ethanesulfonsäure]] (HEPES), Sigma Chemical, St. Louis, USA
- Amoxicillin, Ratiopharm, Ulm, Deutschland

- *Aqua ad injectabilia* (bidestilliert, deionisiert, pyrogenfrei), Pharmacia & Upjohn, Erlangen, Deutschland
- Ascorbinsäure, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Bovines Serumalbumin(BSA), Sigma Chemical, St. Louis, USA
- Buprenorphin, Temgesic Injektionslösung®, Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland
- Carbogengas (95% O₂, 5% CO₂), Linde, Höllriegelskreuth, Deutschland
- Ciclosporin A, Sandimmun®, Novartis, Nürnberg, Deutschland
- Chlorid, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
- DMEM, Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland
- DNase II, Sigma Chemie, Deisenhofen, Deutschland
- DNase Typ V aus boviner Milz, Sigma Chemical, St. Louis, USA
- Eisessig, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Eosin G, gelblich, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Enoxaparin, Sanofi- Aventis, Paris, Frankreich
- Ethanol, Apotheke Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (Na₂EDTA; Titriplex® III), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Fetales Kälberserum (FKS), 0,1 µm sterilfiltriert, Mycoplasma frei, Gibco, Eggenstein, Deutschland
- Formaldehyd, säurefrei mindestens 37%, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Glucose, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Glutamin (100x=200 mM), Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland
- Hämatoxylin, Sigma Chemical, St. Louis, USA
- Harbor Extracellular Matrix (Matrigel), TEBU, Frankfurt a.M., Deutschland
- HCO₃, Sigma Chemie, Deisenhofen, Deutschland
- Heparin, Liquemin®, Roche, Basel, Schweiz
- Hydrogenchlorid (HCl), Merck, Darmstadt, Deutschland

- Isofluran, Baxter International, Deerfield, USA
- (±)-Isoprenalin-HCl, Sigma Chemical, St. Louis, USA
- Isopropanolol, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Kaliumchlorid (KCl), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Kaliumhydrogenphosphat (KH₂PO₄), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Kalziumchlorid (CaCl₂), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Magnesiumchlorid (MgCl₂), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Magnesiumsulfat (MgSO₄), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Methylprednisolon, Solu-Decortin®, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Mowiol 4-88, Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
- Natriumchlorid (NaCl), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumhydroxid (NaOH), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Penicillin/Streptomycin (100x; P/S), Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland
- Pferdeserum (HS), Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland
- Procain, Sigma Chemical, St. Louis, USA
- SO₄, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
- Thimerosal, Sigma Chemical Co, St. Louis, USA
- Tissue freezing medium (Tissue Tec®), Leica, Bensheim, Deutschland
- Trishydroxymethylaminmethan (Tris), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Triton-X 100, Fluka, Steinheim, Deutschland
- Trypsin-EDTA, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
- Xylol, Roth, Karlsruhe, Deutschland

Alle verwendeten Substanzen hatten den höchsten im Handel erhältlichen Reinheitsgrad.

2.12.2 Hilfsmittel und Geräte

- Aortenstanze, 6mm, Geister, Tuttlingen, Deutschland
- Autoklav, Wesarg, Medizintechnik, Hamburg, Deutschland
- Beatmungsgerät, Föhr Medical Instruments, Seeheim, Deutschland
- Brückenverstärker, Föhr Medical Instruments, Egelsbach, Deutschland
- *Bulldog*-Klemmen, Serrefine, FineScienceTools, Deutschland
- Brutschrank, Funktion Line, Heraeus Instruments, Hannover, Deutschland
- Chirurgisches Nahtmaterial, Prolene und Vicryl, Ethicon, Norderstedt, Deutschland
- Christ-Zentrifuge, Render + Hobein, München, Deutschland
- Deckgläschen, Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
- Druck-Volumen-Katheter, 2 F, SPR-838, Millar Instruments, USA
- Echokardiographie, Vevo 770 mit 30 MHz Schallkopf, VisualSonics, Toronto, Kanada
- Einwegspritzen, Injekt, B.Braun, Melsungen, Deutschland
- Elektrokauter, Storz, Tuttlingen, Deutschland
- Eppendorf Safe Lock Reaktionsgefäße, Hamburg, Deutschland
- Feinanalysewaage, H51, Mettner, Giessen, Deutschland
- Gazetücher, Hartmann, Wiener Neudorf, Österreich
- Gewebekulturröhrchen, Cellstar, Greiner Laborbedarf, Frickenhausen, Deutschland
- Heizplatte, FMI EHE-3501, Föhr Medical Instruments, Seeheim, Deutschland
- Isofluranverdampfer, Isofluran Vapor 19.3, Dräger, Lübeck, Deutschland
- Kleintier PET System, MOSAIC, Philips Medical Systems, Best, Niederlande
- Kleintier MRT System, 4.7 BioSpec 47/40 System, Bruker, Billerica, USA
- Konfokales Laser Scanning Mikroskop, LSM 510 auf Axiovert 100, Zeiss, Jena, Deutschland
- Kryotom, CM 3050S, Leica Mikrosysteme, Bensheim, Deutschland
- Kulturschalen, Falcon Tissue Dish, steril, Becton Dickinson Labware, Plymouth, England

- Kleintierlinksherzkather, Millar Instruments, Houston, USA
- Neubauer-Zählkammer, Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim/Rhön, Deutschland
- Objektträger, Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
- Operationsmikroskop, Carl Zeiss, Heidenheim, Deutschland
- Operationsbesteck, Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
- Parafilm, American National, Greenwich, USA
- Pasteur Pipetten, Brand, Wertheim, Deutschland
- pH-Meter, Knick, Biberach, Deutschland
- Pipetten, 10 ml , wide tip with plug, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
- Pipetten, 10 ml (serological), Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
- Pipettierhilfe, pipettus-akku, Hirschmann Laborgeräte, Deutschland
- Reaktionsgefäß, 2070 Blue Max 50ml Conical Tube, Becton Dickinson Labware, Plymouth, England
- Schlittenmikrotom, Leica SM 2000 R, Leica, Bensheim, Deutschland
- Silikon, Dow Corning, Wiesbaden, Deutschland
- Sircol Kollagen Assay, Biocolor, Carrickfergus, England
- Skalpell, sterile Skalpellklinge, Bayha, Deutschland
- Sterilbank, Lamin Air HB 2448, Heraeus Instruments, Hannover, Deutschland
- Sterilfilter (0,22 µm), Steritop, Vakuumfilter, Millipore, Bedford, USA
- Venenverweilkanüle, Vasofix, Braun, Deutschland
- Waage, OHAUS GT410, Florham Peak, USA
- Waage, PM 480 Delta Range, Mettler Instruments, Giessen, Deutschland
- Wasserbad, GfL, Hannover-Vienhorst, Deutschland
- Zellsieb, 60 mesh (250 µm), CD-1 Sieb, Sigma Chemical, St. Louis, USA

3. Ergebnisse

3.1 Heterotope Herztransplantation

Zunächst wurde der Erhalt von Herzmorphologie sowie Herzfunktion in heterotopen Herztransplantationsmodellen ohne³⁸ und mit⁴⁶ hämodynamischer Belastung des linken Ventrikels untersucht (Abb. 1). Diese Untersuchungen dienten als Vorbereitung für die Erprobung der Anwendung von EHT als Herzwandersatz; beabsichtigt war die Erprobung in einem Modell mit optimalem Erhalt der Herzstruktur und Herzfunktion.

3.1.1 Studiendesign

Herzen von 40 adulten Wistar Ratten wurden explantiert. 14 dieser Herzen wurden unter ungeladenen³⁸ und 26 unter volumengeladenen Bedingungen⁴⁶ transplantiert. Spender und Empfänger wurden einen Tag vor Transplantation, sowie 1, 3, 7 und 14 Tage nach der Operation echokardiographisch untersucht. 28 Tage nach Transplantation wurden an einem Teil der Versuchstiere MRT-, PET- und Linksherzkatheteruntersuchungen durchgeführt (Abb. 3).

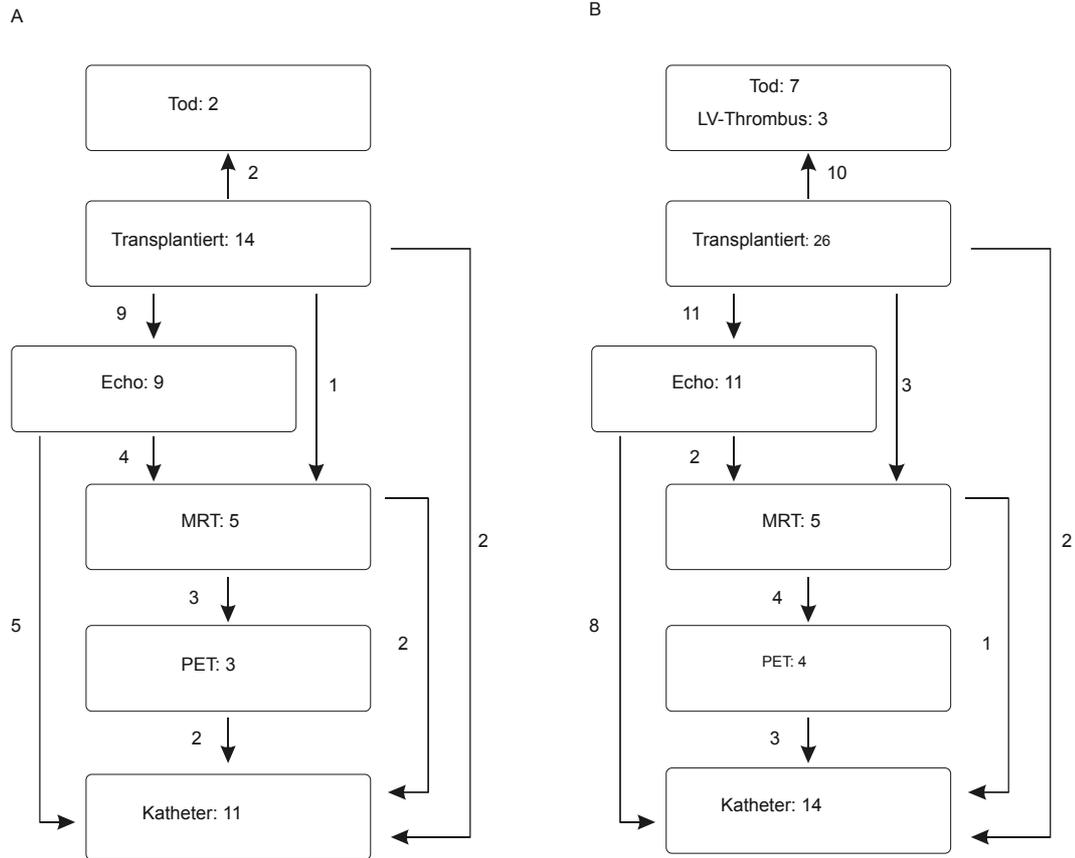


Abbildung 3: Flussdiagramm des Studienprotokolls

A: Gruppe mit ungeladenen, heterotop transplantierten Herzen. B: Gruppe mit volumengeladenen, heterotop transplantierten Herzen.

3.1.2 Mortalität und Morbidität

Insgesamt wurden für die vorliegende Studie 40 Tiere transplantiert. Sieben Tiere in der VL- und zwei Tiere in der NL-Gruppe starben in der ersten Woche nach der heterotopen Transplantation und drei Herzen in der VL-Gruppe zeigten trotz Thromboseprophylaxe große intrakardiale Thromben innerhalb der ersten 24 Stunden nach Implantation und wurden aus der Studie ausgeschlossen (Abb. 3).

3.1.3 Histologie und Herzgewichte

Die Hämatoxylin und Eosin Färbungen beider Gruppen zeigten Zeichen von Atrophie im Vergleich zu den orthotopen Herzen, wobei diese bei den volumengeladenen Herzen histologisch weniger betont war. In beiden Gruppen konnten keine größeren Areale mit Vernarbungen oder chronische Zeichen der Ischämie nachgewiesen werden. Insbesondere eine Dilatation der Herzhöhlen in VL war in der vorliegenden Arbeit nicht zu beobachten. Zudem zeigten sich keine Infiltrationen immunologisch kompetenter Zellen die für eine Abstoßung der Transplantate sprechen würde. Die Gewichte der transplantierten Herzen unterschieden sich vor Transplantation nicht (VL: $1,21 \pm 0,03$ g, NL: $1,17 \pm 0,04$ g). Während vier Wochen nach Transplantation die Gewichte der orthotopen Herzen gleich waren (VL: $1,04 \pm 0,03$ g, NL: $1,05 \pm 0,05$ g), zeigten die heterotopen Herzen in NL ein im Vergleich zu VL signifikant geringeres Gewicht (VL: $0,78 \pm 0,05$ g, NL: $0,61 \pm 0,04$ g; Abb.4A+B).

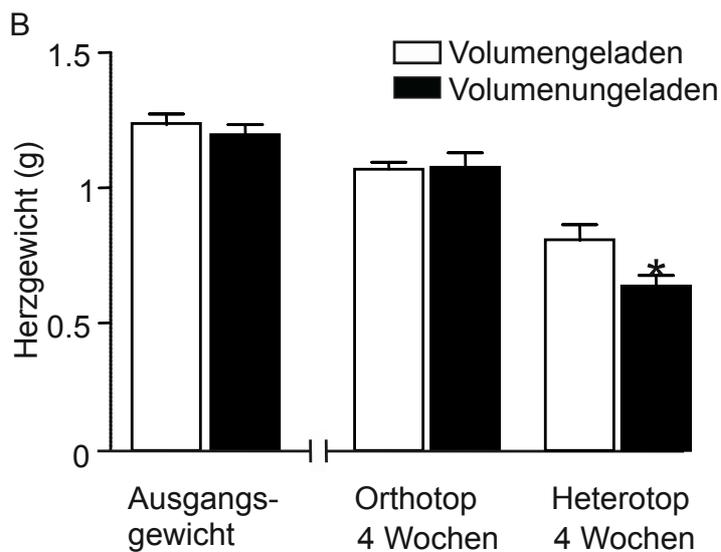
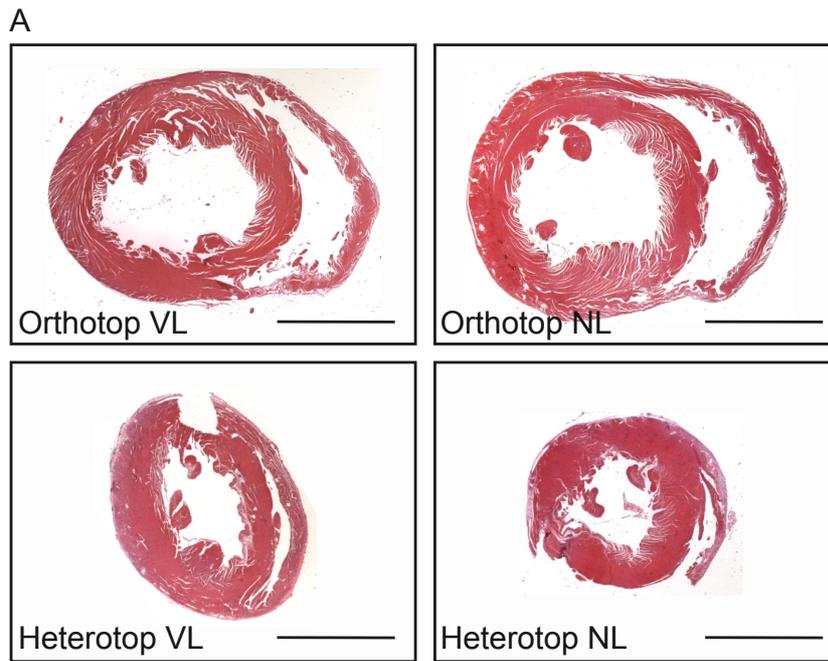


Abbildung 4: Vergleich der Morphologie und des Gewichts zwischen heterotop transplantierten und orthotopen Herzen

A: Repräsentative Hämatoxylin und Eosin gefärbte Paraffinschnitte durch die kurze Achse von orthotopen und heterotopen VL- und NL-Herzen vier Wochen nach Transplantation. B: Herzgewichte von heterotopen Herzen vor Transplantation (Ausgangsgewicht) und von orthotopen und heterotopen Herzen bei Explantation vier Wochen nach Transplantation. n = 11-17/Gruppe. * $p < 0,05$ volumen-ungeladen vs.volumengeladen; zweiseitiger, ungepaarter t-Test. Maßstab: 5 mm.

3.1.4 Echokardiographischer Vergleich

Zur Analyse der funktionellen und morphologischen Veränderungen der transplantierten Herzen wurden über den Zeitraum von vier Wochen longitudinale echokardiographische Untersuchungen an den Tieren durchgeführt (Abb. 5A). Die anteriore Wanddicke in der Systole (AWThs) von NL nahm bereits einen Tag nach Transplantation signifikant ab. Dieser Prozess setzte sich während des kompletten Untersuchungszeitraums weiter fort. Im Gegensatz dazu war die Abnahme der AWThs in VL (1.9 ± 0.1 vs. 1.2 ± 0.1 mm; $p < 0.05$) deutlich verzögert, d.h. erst nach vier Wochen zeigte sich eine signifikante Abnahme im Vergleich zu den orthotopen Herzen (Abb. 5B). Die anteriore Wanddicke in der Diastole (AWThd) war besonders in VL, aber auch in NL im Vergleich zu den orthotopen Herzen akut (bis 1-7 Tage nach Transplantation) erhöht. Langfristig zeigte sich eine ähnliche Abnahme der AWThd wie auch bei der AWThs beobachtet. (Abb. 5C). Der linksventrikuläre Durchmesser in der Systole stieg in der NL Gruppe als Zeichen einer akuten systolischen Kontraktionsschwäche an (Tag 1 nach Transplantation; Abb. 5D). Im Verlauf zeigte sich eine Normalisierung auf das Niveau der orthotopen Herzen; die VL Gruppe zeigte keine Unterschiede im Vergleich zu den orthotop transplantierten Herzen (Abb. 5D). Im Gegensatz dazu nahm der innere linksventrikuläre Durchmesser von NL und VL in der Diastole gleichermaßen bis Tag 7 nach Transplantation ab; in der Folge zeigte sich ein Trend in Richtung Normalisierung des diastolischen Durchmessers v.a. in der VL Gruppe (Abb. 5E). FAS (VL: 33 ± 5 , NL: $18 \pm 4\%$) und anteriore Wandverdickungsfraction (VL: 22 ± 3 , NL: $8 \pm 4\%$) waren im Sinne einer akuten systolischen Dysfunktion mit stärkerer Ausprägung in der NL-Gruppe bereits an Tag 1 nach Transplantation akut vermindert (Abb. 5F+G). Im weiteren Verlauf kam es zu einer leichten Normalisierung auf einem im Vergleich zu den orthotopen Herzen deutlich reduziertem Niveau, wobei die VL-Gruppe eine deutlich bessere systolische Funktion zeigte als die NL-Gruppe. Das echokardiographisch kalkulierte linksventrikuläre Herzgewicht von NL und VL zeigten analog zu den Endpunktmessungen des Herzgewichts (Abb. 4 A) eine kontinuierliche Abnahme mit einer weniger ausgeprägten Atrophie in der VL-

Gruppe (VL: $0,35 \pm 0,03$ g, NL: $0,2 \pm 0,03$ g; Abb. 5H). Am ehesten aufgrund der Denervierung und damit fehlender sympathischer Kontrolle der transplantierten Herzen kam es nach Transplantation in VL und NL zu einem gleich stark ausgeprägtem Abfall der Herzfrequenz auf ~270 Schlägen pro Minute (VL: $270 \pm 16,3$ bpm, NL: $267 \pm 13,26$ bpm). Während die Kontraktionsfrequenz der Herzen in der NL-Gruppe im Studienverlauf unverändert blieb, zeigte sich eine Trend in Richtung Normalisierung in der VL-Gruppe (VL: $314 \pm 18,4$ bpm, NL: $271 \pm 12,1$ bpm, Abb. 5I).

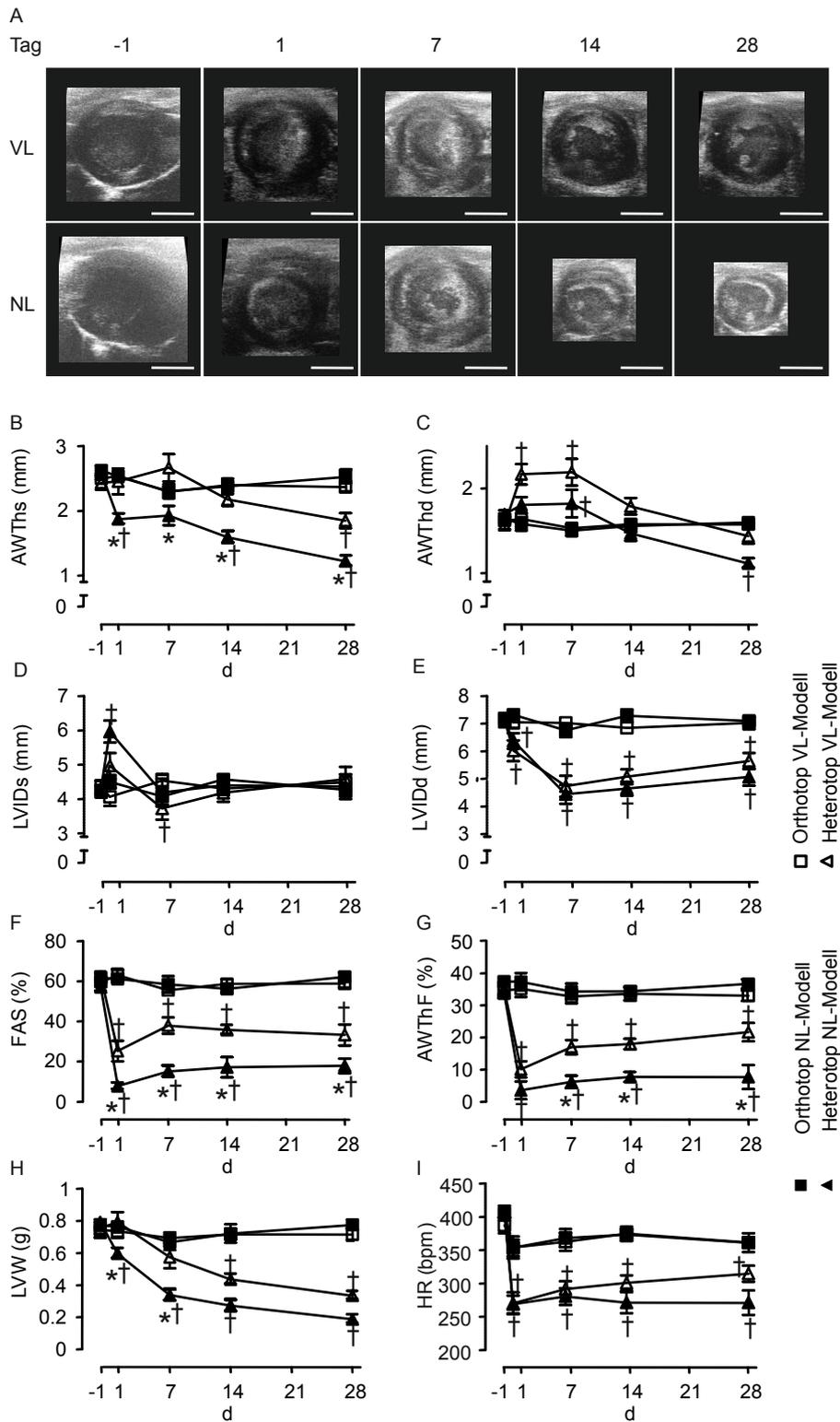


Abbildung 5: Akute und chronische Änderungen der heterotopen Herzfunktion

A: Representative echokardiographische B-mode Bilder von partiell geladenen (VL) und

ungeladenen (NL) Herzen. Longitudinale Veränderungen der anterioren Wanddicke in der Systole (AWThs, B) und in der Diastole (AWThd, C), der linksventrikulären inneren Durchmessers in Systole (LVIDs, D) und Diastole (LVIDd, E), der Flächenverkürzungsfraction (FAS, F), der anterioren Wandverdickungsfraction (AWThF, G), des echokardiographisch kalkulierten Herzgewichts (HW, H), und der Herzfrequenz (HF, I). n = 9-11/Gruppe. * $p < 0,05$ vs. heterotop, † $p < 0,05$ vs. orthotop; zweiseitiger, ungepaarter t-Test. Maßstab: 5 mm.

3.1.5 Vergleich per MRT

28 Tage nach Implantation führten wir zusätzliche MRT-Untersuchungen der orthotopen und heterotopen Herzen durch (Abb. 6A). Hierbei konnten die echokardiographischen Befunde im Wesentlichen bestätigt werden. Während die AWThF-Werte ermittelt durch Echokardiographie und MRT quantitativ ähnlich waren, zeigte sich eine im Vergleich zu den orthotopen Herzen unveränderte FAS ($61,5 \pm 12,7\%$) in der VL-Gruppe, bei einer stark eingeschränkten FAS ($24,2 \pm 6,9\%$) in der NL-Gruppe (Abb. 6B).

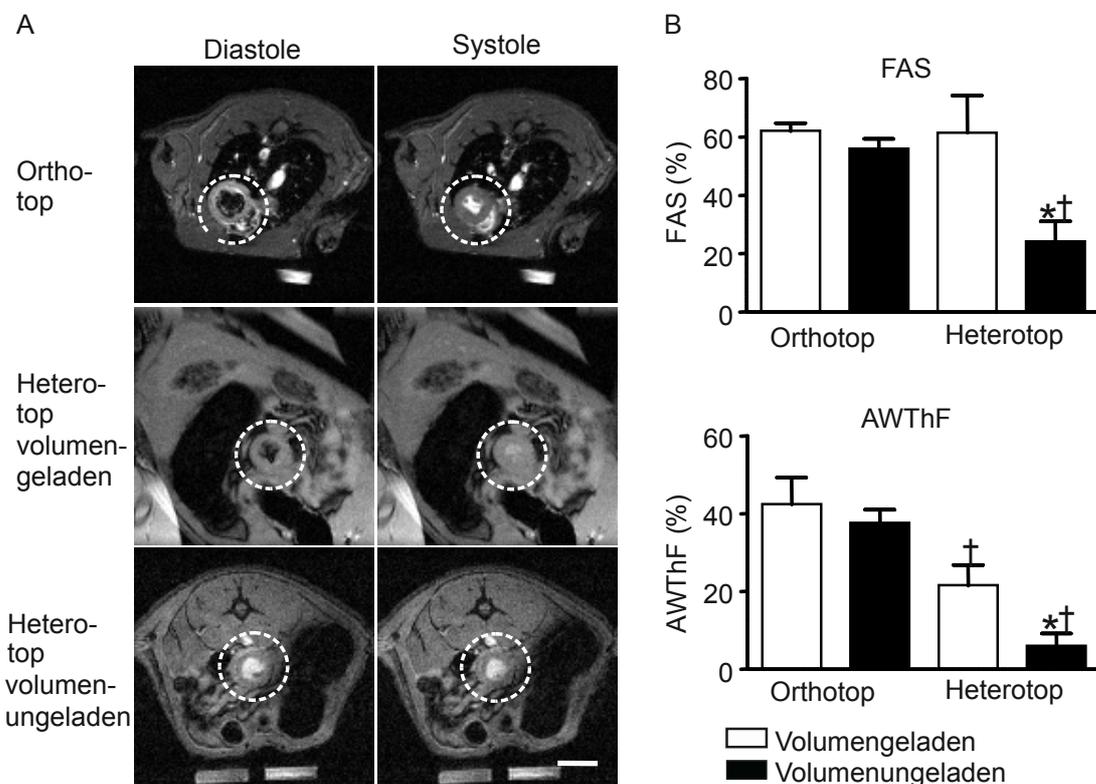


Abbildung 6: Besser erhaltene systolische Funktion in der VL-Gruppe

A: Repräsentative Abbildung der linksventrikulären kurzen Achse auf mittpapillärer Höhe in Diastole (linke Seite) und Systole (rechte Seite). Die Herzregion ist durch weiße Kreise gekennzeichnet. Maßstab: 1 cm. B: Flächenverkürzungsfraction (FAS) und anteriore Wandverdickungsfraction (AWThF) in orthotopen und heterotopen Herzen. n = 5/Gruppe. * $p < 0,05$ VL vs. NL, † $p < 0,05$ heterotop vs. orthotop; zweiseitiger, ungepaarter t-Test.

3.1.6 Vergleich der Hämodynamik mittels Linksherzkatheterisierung

Zum Abschluss des vierwöchigen Untersuchungszeitraums führten wir hämodynamische Untersuchungen mittels Linksherzkatheter durch (Abb. 7A). Das maximale Schlagvolumen bestätigte die Funktionalität des partiell geladenen Modells (VL orthotop: $335 \pm 17 \mu\text{l}$, NL orthotop: $296 \pm 21 \mu\text{l}$, VL heterotop: $136 \pm 20 \mu\text{l}$). Interessanterweise ergab sich auch bei Messungen von NL ein maximales Schlagvolumen von $53 \pm 9 \mu\text{l}$ (Abb. 7B), am ehesten ist dies mit einer in NL-Transplantaten vorliegenden Aorteninsuffizienz zu erklären, die in VL nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 7A). Der systolische linksventrikuläre Druck in VL war vergleichbar mit dem der orthotopen Herzen (VL orthotop: $97 \pm 4 \text{ mmHg}$, VL heterotop: 87 ± 8) während er in NL signifikant niedriger war (NL orthotop: $94 \pm 6 \text{ mmHg}$, NL heterotop: $61 \pm 6 \text{ mmHg}$; Abb. 7C). Die diastolischen Drücke unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (Abb. 7D). Desweiteren konnte in VL im Vergleich zu NL sowohl eine höhere maximalen Zunahme (VL: $2.986 \pm 252 \text{ mmHg/s}$, NL: $2.032 \pm 193 \text{ mmHg/s}$; Abb. 7E) als auch eine höhere maximalen Abnahme (VL: $2.107 \pm 241 \text{ mmHg/s}$, NL: $1.367 \pm 160 \text{ mmHg/s}$; Abb. 7F) des intrakardialen Drucks als Indikatoren für unterschiedliche linksventrikuläre Kontraktions- bzw. Relaxationskinetiken nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den orthotopen Herzen waren diese jedoch in beiden Modellen erheblich verlangsamt; bei der Interpretation dieser Daten müssen allerdings die deutlichen Unterschiede der Herzfrequenz berücksichtigt werden (negatives Bowditch Phänomen).

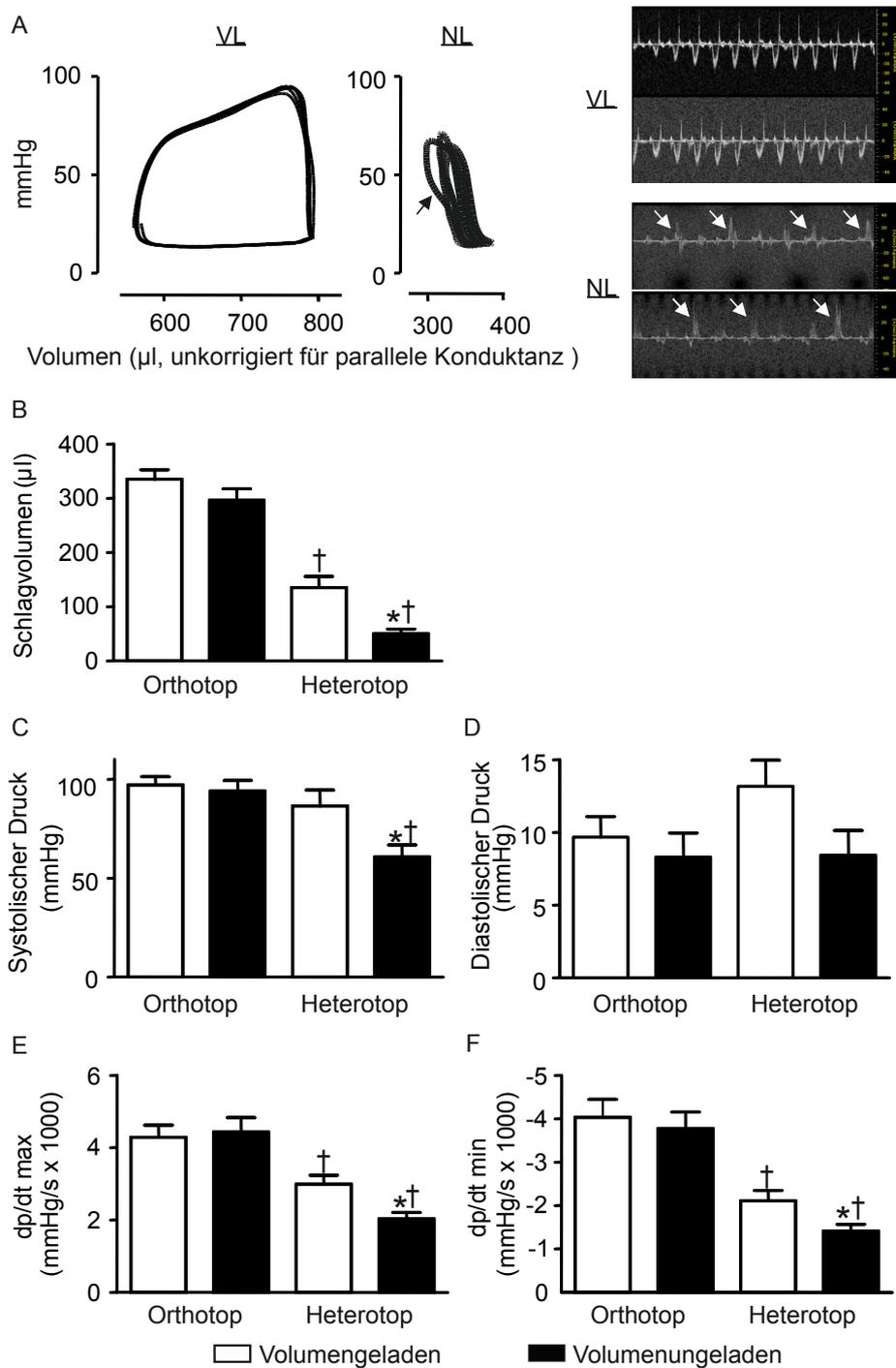


Abbildung 7: Einschränkung der hämodynamischen Funktion in heterotop transplantierten Herzen

A: Repräsentative Druck-Volumenkurven in VL- und NL-Herzen. In den Herzen der NL Gruppe konnte in einem Teil der Tiere eine Aorteninsuffizienz sowohl durch den diastolischen Anstieg des linksventrikulären Volumens (Pfeil, mitte) als auch durch einen diastolischen Rückfluss über die Aortenklappe (*pulsed-wave*-Doppler-Aufnahmen, rechts, diastolischer Rückfluss durch Pfeile markiert) nachgewiesen werden. Der Volumennullpunkt auf den Abszissen ist nicht hinsichtlich paralleler Leitfähigkeit korrigiert. B: Schlagvolumen,

C: systolischer Druck, D: diastolischer Druck, E: maximaler linksventrikulärer Druckanstieg (dp/dt max), F: maximaler linksventrikulärer Druckabfall (dp/dt min) wurden analysiert. n = 8-14/Gruppe. * $p < 0,05$ VL vs. NL, † $p < 0,05$ heterotop vs. orthotop; zweiseitiger, ungepaarter t-Test.

3.1.7 Analyse des Herzmetabolismus mittels PET

Zur Evaluation des Metabolismus in VL- und NL-Herzen untersuchten wir die Glukoseaufnahme mittels micro-Positron Emissions-Tomographie (μ PET; Abb. 8A). Die durchschnittliche Signalintensität der heterotopen Herzen wurde jeweils mit der Signalstärke des orthotopen Herzens desselben Tieres korreliert, um für interindividuelle Unterschiede in der FDG-Dosis und der grundsätzlichen kardialen Glukoseaufnahme (Insulin-abhängig) zu korrigieren. Während die Pixelintensität im Vergleich der heterotopen Herzen im Vergleich zu den orthotopen Herzen deutlich reduziert war, zeigte sich zwischen den VL- und NL-Herzen kein Unterschied in der FDG-Aufnahme (Abb. 8B).

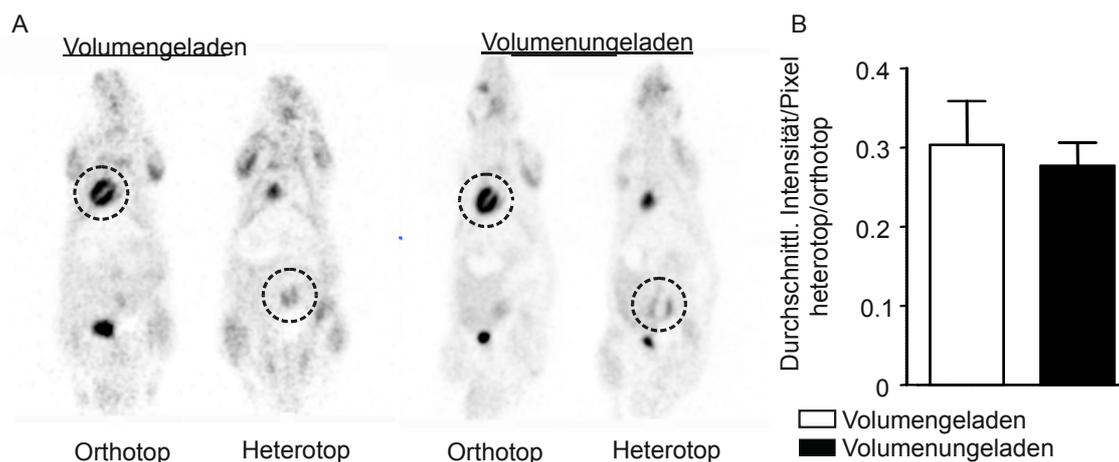


Abbildung 8: Reduzierte Glukoseaufnahme in heterotop transplantierten Herzen

A: Repräsentative Abbildungen auf Ebenen der langen kardialen Achse von orthotopen und heterotopen Herzen desselben Tieres der jeweiligen Gruppe (bei der verwendeten Schichtdicke waren die Schnittebenen der orthotopen und heterotopen Herzen nicht deckungsgleich). B: Verhältnis der durchschnittlichen Signalintensität von heterotopen zu orthotopen Herzen. n = 3-4/Gruppe.

3.2 Wandersatzstudie

3.2.1 Herstellung von EHT und nicht-kontraktilen Gewebekonstrukten

Neben EHTs wurden nicht-kontraktile Kontrollgewebe aus Fibroblasten (ECT) bzw. mesenchymalen Stammzellen (EMT) generiert (Abb. 9A-C). Die ringförmigen EHTs kondensierten im Verlauf des dritten bis siebten Kulturtag. ECTs und EMTs kondensierten innerhalb von 2-3 Tagen und nach weiteren fünf Tagen formten sich mechanisch robuste, nichtkontraktile Gewebekonstrukte. ECTs waren am Ende der Zellkultur deutlich dünner im Vergleich zu EHTs und EMTs (Abb. 9D). Nach weiteren 5 Tagen Kokultur von fünf einzelnen EHT-, ECT- bzw. EMT-Ringen auf gefederten Dehnapparaturen kam es zu festen Verbindungen zwischen den zuvor einzelnen Geweberingen (Abb. 9E). Synchrone Kontraktionen konnten nur in EHTs beobachtet werden. In EHTs bildeten sich Muskelbündel aus quergestreiften Kardiomyozyten aus, während in ECTs und EMTs dichte Zellverbände aus Fibroblasten bzw. mesenchymalen Zellen zu finden waren (Abb. 9F-H).

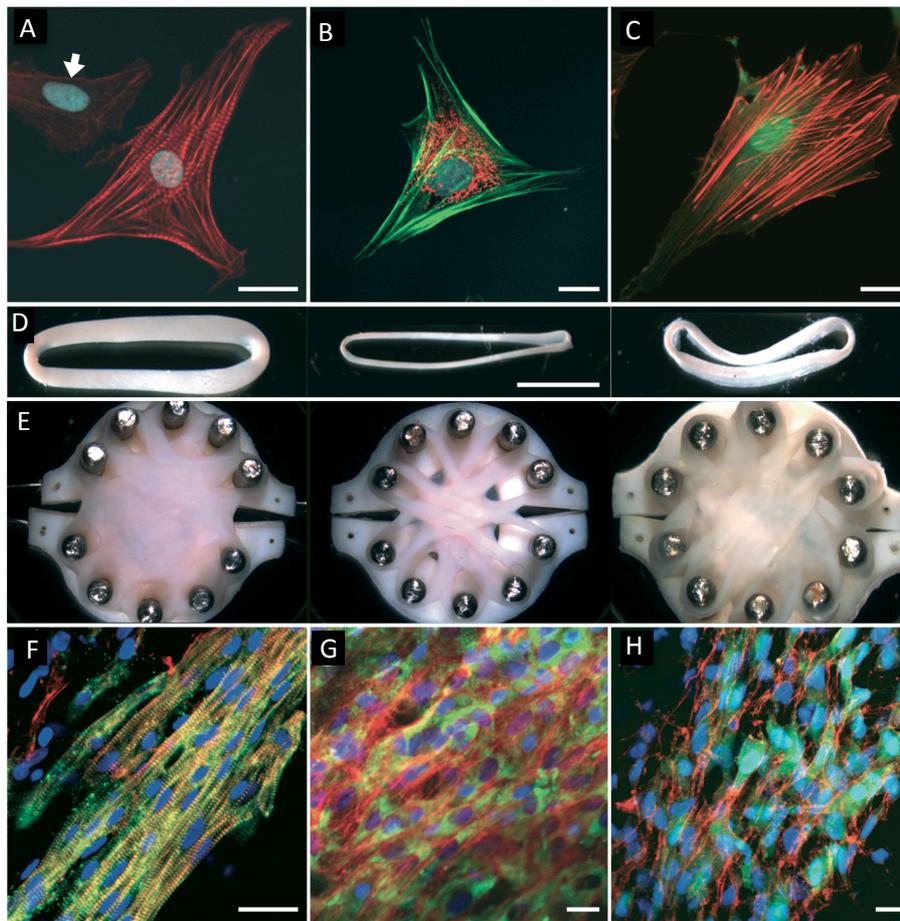


Abbildung 9: EHT und nicht-kontraktile Kontrollgewebe

A-C: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Herzzellen (A; Rot: f-Aktin; Blau: Zellkerne; der Pfeil markiert eine nicht-Kardiomyozyte im Gesichtsfeld) und kardialen Fibroblasten (B; Rot: Prolyl-4-Hydroxylase; Grün: f-Aktin; Blau: Zellkern) aus neonatalen Ratten sowie mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark adulter Ratten (C; Rot: f-Aktin; Grün: GFP; Blau: Zellkern). D: Einzelring EHT-, ECT- und EMT-Einheiten (von links nach rechts) an Kulturtag 12, 8, und 8. E: Sternförmiges EHT, ECT und EMT auf Dehnapparaturen (von links nach rechts) an Kulturtag 12, 8, und 8. F-H: Immunfluoreszenzfärbungen von Kardiomyozyten in EHTs (F; Rot: f-Aktin; Grün: α -sarkomerisches Aktinin; Blau: Zellkerne), Fibroblasten in ECTs (G; Rot: f-Aktin; Grün: Prolyl-4-Hydroxylase; Blau: Zellkerne), und mesenchymale Stammzellen in EMTs (H; Rot: f-Aktin; Grün: GFP; Blau: Zellkerne). Maßstäbe: 20 μ m (A-C), 5 mm (D), 20 μ m (F-H).

3.2.2 Transmuraler Herzwandersatz mit EHT, ECT und EMT

EHTs, ECTs und EMTs wurden in einen transmuralen Herzmuskeldefekt (Durchmesser: 6 mm) *ex vivo* eingenäht. Anschließend wurden die Herzen heterotop unter VL-Bedingungen transplantiert. Als weitere Kontrollgruppe dienten Versuchstiere mit transmuralen Wanddefekt und endokardial implantiertem Aortenpatch jedoch ohne Gewebekonstrukt. Periprozedural (innerhalb von 24 Stunden nach heterotoper Herztransplantation) verstarben 23% der Tiere mit Gewebekonstrukt und 47% der Kontrolltiere ohne Gewebeimplantat. Ab 6 Tage nach Transplantation verstarben keine Tiere mehr (Abb. 10). Die Überlebenskurven zwischen der EHT-, ECT- und EMT-Gruppe unterschieden sich innerhalb des vierwöchigen Beobachtungszeitraums nicht signifikant voneinander, jedoch war die Mortalität in der Sham-Gruppe im Vergleich zu EHT und ECT deutlich erhöht (Abb. 10B-D).

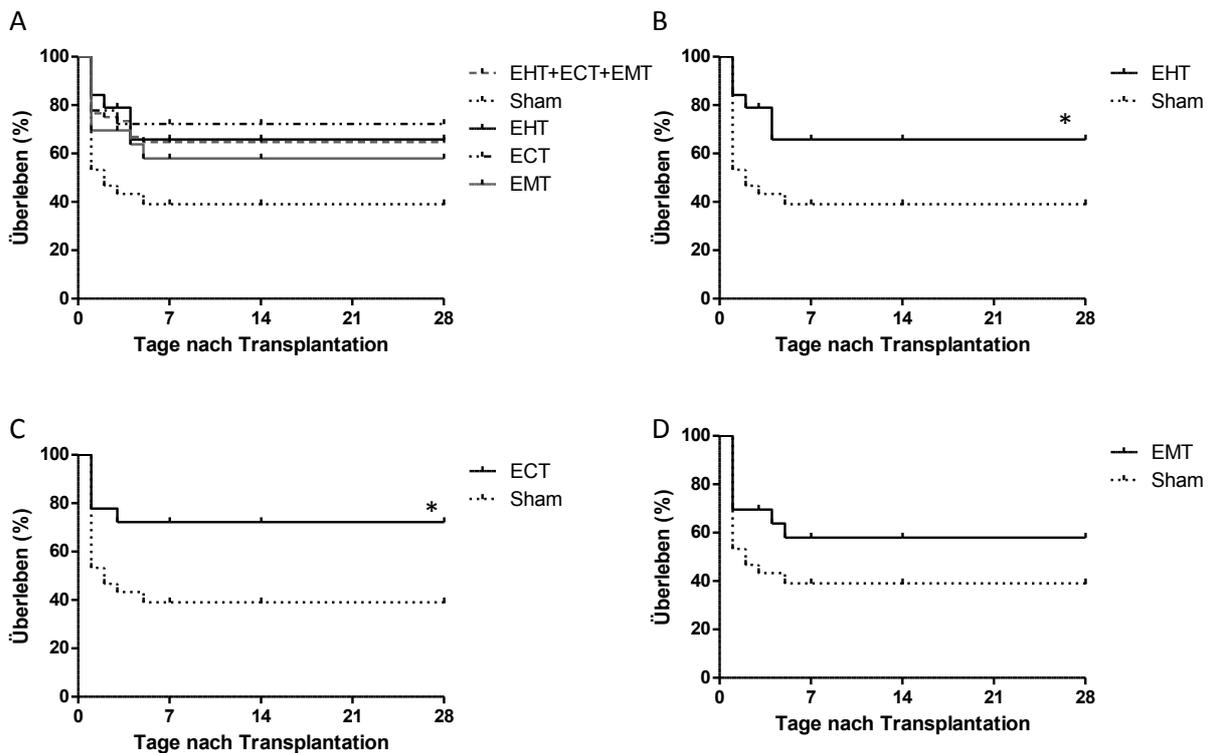


Abbildung 10: Kaplan-Meier Überlebenskurve mit einem direkten Vergleich der Versuchsgruppen

Versuchstierzahlen an Tag 0: EHT 19, ECT 18, EMT 23, ohne bioartifiziellen Patch (Sham)

30. 3-4 Tiere wurden jeweils nach 3,7,14 und 28 Tagen für weitere Untersuchungen getötet.
* $p < 0,05$ EHT/ECT vs. Sham, Gehan-Breslow-Wilcoxon Test.

3.2.2.1 Implantatmorphologie nach Explantation

28 Tage nach Implantation wurden die Versuchstiere getötet, sowohl die orthotopen als auch die heterotopen Herzen entnommen und histologisch aufgearbeitet. Auch 4 Wochen nach Implantation waren die EHT-, ECT- und EMT-Implantate makroskopisch eindeutig zu identifizieren. Die EHT-Konstrukte zeigten bei Explantation spontane Kontraktionen. Es zeigten sich zudem dichte Gefäßeinsprossungen in allen Implantaten (Abb. 11A-D). Zur besseren mikroskopischen Identifikation der EHT-Implantate wurden diese vor Implantation mit DAPI markiert. Dieser Fluoreszenzfarbstoff bindet stabil an AT-reiche DNA-Regionen und führt somit zu einer langfristigen Markierung der implantierten Zellen. Vier Wochen nach Implantation war die DAPI-Markierung noch gut erkennbar (Abb. 12). Nach zusätzlicher Immunfluoreszenzmarkierung mit kardialem alpha-sarkomerischen Aktin zeigten sich dichte Bündel aus implantierten Herzmuskelzellen im Bereich des Muskeldefektes und in direkter Nähe des implantierten Aortenpatches (Abb. 12).

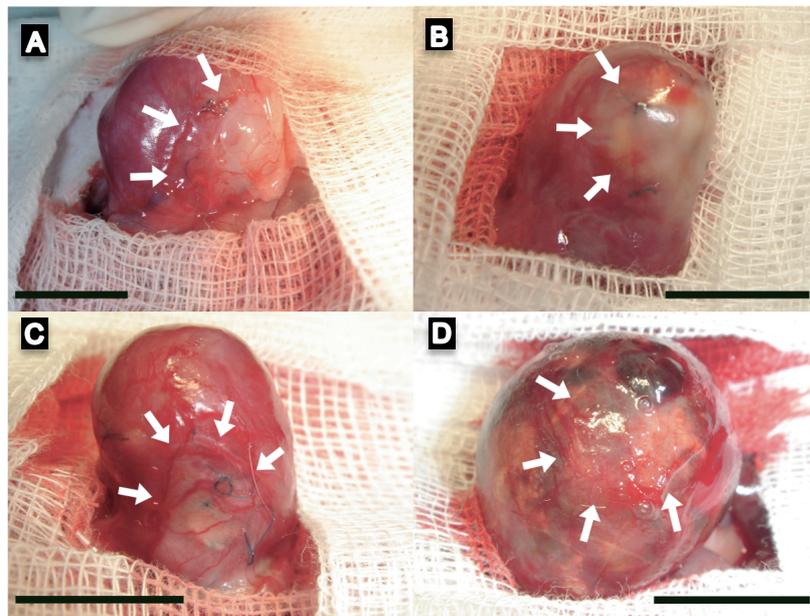


Abbildung 11: Makroskopische Identifikation von EHTs, ECTs und EMTs 28 Tage nach Implantation

Herzen mit EHT- (A), ECT- (B) und EMT- (C) Implantat. Die Implantate sind mit Pfeilen gekennzeichnet. D: Ohne Gewebeimplantat transplantiertes heterotopes Herz; Pfeile markieren das unter Verwachsungen liegende Aortenfragment. Maßstäbe: 10 mm.

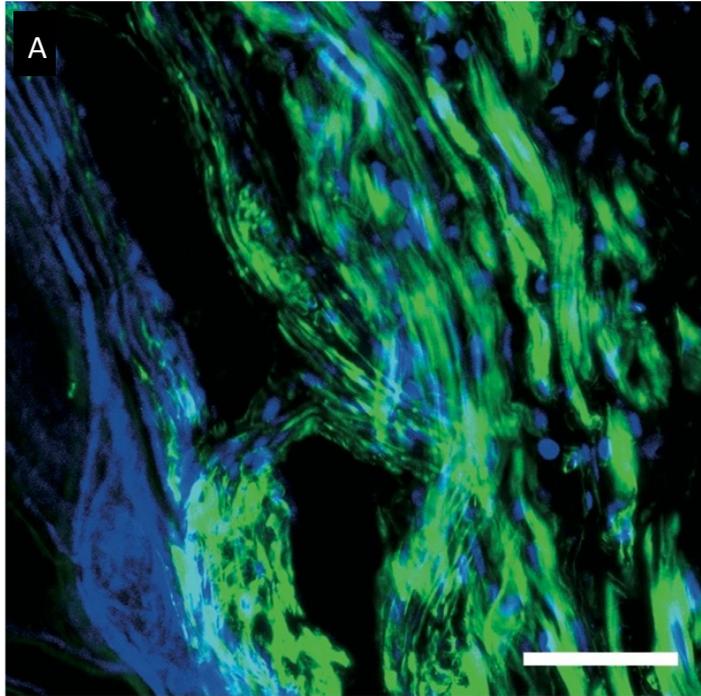


Abbildung 12: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse eines EHT-Wandersatzes 28 Tage nach heterotoper Herztransplantation

Zellen im EHT wurden vor Transplantation mit dem Kernfarbstoff DAPI markiert (Grün: f-actin; Blau: Zellkerne der implantierten Kardiomyozyten); links im Bild bläulich zu sehen das stark autofluoreszierende endokardial eingenähte Aortenfragment. Maßstab 50 μm .

3.2.2.2 Implantat-Vaskularisierung

28 Tage nach Transplantation wurde die Gefäßeinsprossung in die implantierten Gewebekonstrukte mittels Immunfluoreszenzmarkierung mit Lectin analysiert. In allen Implantatgruppen zeigten sich Lectin-positive Strukturen mit einer kapillartypischen Morphologie. Interessanterweise waren die Zellkerne dieser Kapillaren zum Teil DAPI-positiv und entstammten somit implantierten Zellen (Abb. 13A-C). Das Vorhandensein von Erythrozyten in diesen Gefäßen weist darauf hin, dass diese an den Blutkreislauf angeschlossen waren. Die Kapillardichte in den EHT-, ECT- und EMT-Implantaten wurde 28 Tage nach Transplantation quantifiziert. Der Kapillardurchmesser in EHT-Implantaten ($6\pm 0.1\ \mu\text{m}$) war deutlich weniger variabel und im Mittel geringer als in ECT- ($12\pm 1\ \mu\text{m}$) und EMT-Implantaten ($21\pm 1\ \mu\text{m}$; Abb. 14D). Kapillare mit einem Durchmesser über $20\ \mu\text{m}$ konnten nur in ECTs (7% von allen Kapillaren/Gefäßstrukturen) und EMTs (35% von allen Kapillaren) nachgewiesen werden. Auffällig war eine besonders ausgeprägte Kapillardichte in EHT-Implantaten (Kapillaren/ mm^2 : EHT: 425 ± 43 , ECT: 87 ± 11 , EMT: 181 ± 33 ; Abb. 13E).

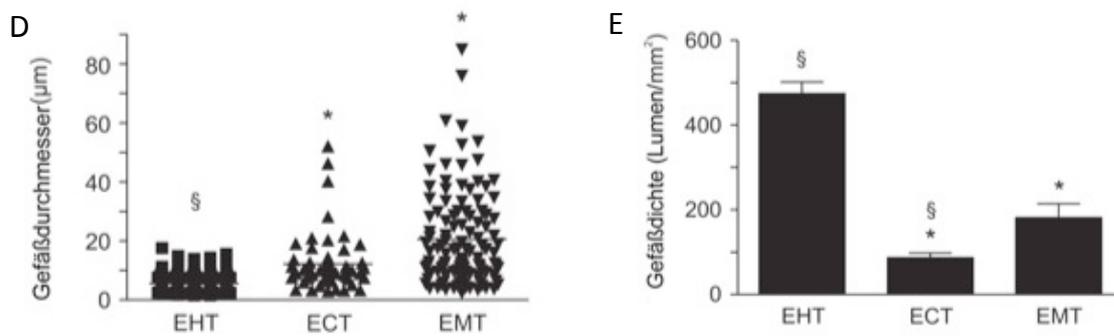
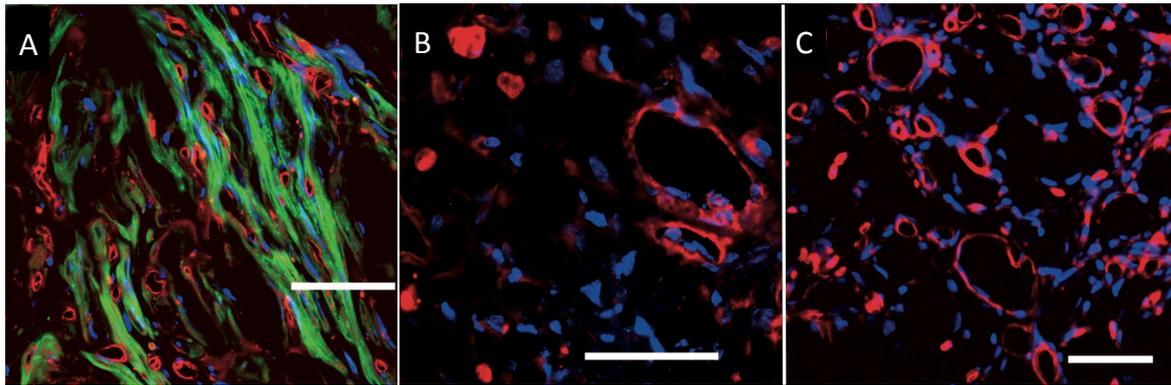


Abbildung 13: Ausgeprägte Vaskularisierung von EHT Implantaten

Die Kapillarisation von EHT- (A), ECT- (B) und EMT- (C) Implantaten wurde 28 Tage nach Transplantation mittels Lectinfärbung analysiert (rot - Lectin; grün - f-Actin; blau - Zellkerne im jeweiligen Implantat). D: Kapillardichte. E: Kapillardurchmesser. * $p < 0,05$ vs. EHT; § $p < 0,05$ vs. EMT; ANOVA gefolgt von Bonferroni post-hoc Test; Maßstäbe: 50 µm.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein experimentelles Modell für die Testung von EHT als Herzmuskelwandersatz erprobt. Da eine Manipulation des orthotopen Herzens im Kleintiermodell bisher nicht möglich war, wurden zunächst zwei klassische heterotope Herztransplantationsmodelle mit⁴⁶ und ohne³⁸ Volumenbeladung etabliert und hinsichtlich des Erhalts der Herzmuskelmorphologie und Herzfunktion über einen Zeitraum von 4 Wochen untersucht. Darauffolgend sollte der Wandersatz mittels EHT Implantation im Modell mit einer optimalen Herzmuskelfunktion überprüft werden.

Im Einzelnen wurden folgende Hypothesen untersucht:

- 1) Unter Volumenbeladung bleibt die Herzmorphologie und Herzmuskelfunktion im heterotopen Transplantationsmodell besser erhalten als unter Volumenentlastung.
- 2) Es ist möglich ein Herzwanddefektmodell im heterotopen Herztransplantationsmodell zu etablieren.
- 3) EHTs wachsen nach Implantation in einen transmuralen Herzmuskeldefekt ein, überleben und werden vaskularisiert.

Zusammenfassend wurden folgende Hauptbefunde erhoben:

- 1) Heterotop transplantierte Herzen zeigen eine eingeschränkte systolische Funktion.
- 2) Kontraktionsfrequenz, Schlagvolumen und Glukosemetabolismus heterotop transplantiertes Herzen sind im Vergleich zu orthotopen Herzen deutlich vermindert.

- 3) VL-Herzen zeigen im Gegensatz zu NL-Herzen eine bessere globale (FAS, SV, LVESP) und lokale (AWThF) systolische Funktion sowie eine weniger stark ausgeprägte Herzatrophie.
- 4) Erhebliche transmurale Gewebedefekte können experimentell im heterotopen Herztransplantationsmodell induziert werden; wobei eine primäre endokardiale Deckung des Gewebedefektes mit einem Aortenpatch vor Transplantation nötig ist.
- 5) EHT und nicht-kontraktile Kontrollgewebe (ECT und EMT) können stabil in einen transmuralen Herzmuskeldefekt implantiert werden.
- 6) Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Überleben nach Implantation von EHT, ECT oder EMT; allerdings ist die Mortalität ohne Wandersatz (Sham) deutlich erhöht.
- 7) EHT Implantate als transmuraler Wandersatz bleiben kontraktile und werden vaskularisiert.
- 8) Quantitativ (Kapillardichte) und qualitativ (Kapillardurchmesser) zeigte sich ein erheblicher Unterschied zwischen EHT-, ECT- und EMT-Implantaten mit der höchsten Kapillardichte und dem kleinsten Kapillardurchmesser in EHT Implantaten.

Es ist bekannt, dass die Ladung des Herzens entscheidenden Einfluss auf die Regulation von Herzgröße, Wachstum und kardiale Funktion hat⁴⁷. Zudem mehren sich die Hinweise, dass auch die Art der Ladung (Druck vs. Volumen) einen entscheidenden Einfluss auf den kardialen Phänotyp zu haben scheint^{48,49}. Vor diesem Hintergrund ist es umso wichtiger, adäquate Tiermodelle zu definieren, die sowohl eine Manipulation am offenen Herzen erlauben als auch eine möglichst physiologische Hämodynamik gewährleisten. Durch eine einfache Modifikation des klassischen ungeladenen, heterotopen Transplantationsmodells analog zu Asfour und Kollegen ist es möglich ein volumen- und druckgeladenes

Versuchsmodell zu erzeugen, welches vor Transplantation Eingriffe am offenen Herzen auch im Kleintiermodell erlaubt. Dabei konnte hier mittels Linksherzkatheter gezeigt werden, dass trotz nur teilweiser Volumenbelastung das heterotope Herz physiologische Blutdrücke generieren kann. Somit kann davon ausgegangen werden, dass das hier gewählte Versuchsmodell geeignet ist, die mechanische Stabilität eines transmuralen Wandersatzes in vivo zu testen. Allerdings wiesen Asfour und Kollegen in ihrer Publikation zur partiellen Ladung des linken Ventrikel niedrigere systolische Drücke nach als in dieser Arbeit. Dies könnte mit der kürzeren Studiendauer (zwei vs. vier Wochen) oder der Nutzung verschiedener Rattenstämme (Lewis vs. Wistar) zusammenhängen. Interessanterweise gab es im Linksherzkatheter Hinweise darauf, dass die NL-Hezen eine Aorteninsuffizienz aufwiesen, die zum einen eine gewisse Vorlast für den linken Ventrikel bedeutete und zum anderen auch am ehesten für die nachweisbare, im Vergleich zu VL jedoch deutlich geringere Ventrikelfüllung verantwortlich war.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit mittels Echokardiographie eine reduzierte Atrophie im volumengeladenen Modell nachgewiesen werden. So war die anteriore Wanddicke in VL 28 Tage nach Transplantation im Vergleich zu NL stabil. Im Gegensatz dazu zeigte die systolische anteriore Wanddicke in NL bereits früh nach Transplantation deutliche Hinweise auf Atrophie. Die anteriore Wanddicke in der Diastole stieg, am ehesten durch die akute postoperative Abnahme der Vorlast und damit einer geringeren diastolischen linksventrikulären Füllung, initial bei beiden Modellen an, um dann im 28-Tage Verlauf bei NL wieder deutlich abzufallen. Bei VL blieb die Wandstärke der Vorderwand in Diastole über den Untersuchungszeitraum stabil, auch dies ein Hinweis auf eine geringere Atrophie im volumengeladenen Modell. Indikatoren für die globale und regionale Herzfunktion wie FAS und AWThF nahmen auch in VL ab, allerdings mit einer deutlich abgeschwächten Dynamik. Wir validierten die echokardiographischen Daten durch Untersuchungen mittels MRT, da dies zurzeit als Goldstandard der kardialen Bildgebungsdiagnostik gilt. Hierbei zeigte sich eine weitgehende Korrelation der Ergebnisse in beiden Untersuchungsmethoden. Hier sei

darauf hingewiesen, dass bei 3 der 5 VL-Versuchstiere und 1 der 5 NL-Versuchstiere in der MRT-Gruppe keine echokardiographische Untersuchung durchgeführt wurde. Dazu kommen methodische Unterschiede, die keine Synchronisation der echokardiographischen Aufnahmen mit dem Herzzyklus erlauben, während durch das verwendete „self-gating“ Protokoll möglicherweise eine bessere Aufnahmequalität in der Systole per MRT möglich war, wobei dabei auch die AWT_HF beeinflusst sein sollte. Trotz dieser Abweichungen zeigen die echokardiographischen und MRT-Befunde kollektiv eine besser erhaltene systolische Funktion in der VL-Gruppe.

Normalerweise geht zunehmende Herzarbeit mit einem gesteigerten Glukosestoffwechsel einher^{50,51}. In den von uns durchgeführten PET-Analysen ließen sich diese Effekte trotz höherer Schlagvolumina und systolischer Drücke in den volumengeladenen Herzen nicht zeigen. Wir minimalisierten mögliche Messfehler durch interindividuelle Unterschiede in der Aufnahme der verabreichten FDG-Dosis und Insulin-vermittelter zellulärer Glukoseaufnahme durch Nutzung des orthotopen Herzens als „internen Standard“. Typischerweise nimmt die Glukoseaufnahme nach längeren ischämischen Phasen ab⁵². Wir konnten jedoch im Gegensatz zu einer kürzlich durchgeführten Studie⁵³ in den unter volumengeladenen Bedingungen transplantierten Herzen keine Hinweise auf Ischämie, wie beispielsweise ventrikuläre Dilatation, nachweisen. Um zu verhindern, dass relevante Volumina an desoxygeniertem Blut aus dem linken Ventrikel des heterotopen Herzens, der aus der Vena cava des Spendertiers gespeist wird, in die Koronarien gelangen, wurde der Aortenstumpf des Spenderherzens möglichst kurz gehalten. Im Einklang mit unseren Befunden konnte in einer anderen Studie mit volumengeladenen heterotop transplantierten Herzen ebenfalls keine Effekte auf den kardialen Energiemetabolismus nachgewiesen werden⁴⁵. Vermutlich spielt hier die Denervierung der heterotop transplantierten Herzen eine Rolle.

Diese Arbeit zeigt, dass die komplette Entlastung des Herzens im Gegensatz zur partiellen Volumenentlastung nachteilige Effekte auf die Funktion und die Morphologie hat. Ob dieser Effekt auch in Patienten mit mechanischen linksventrikulären Unterstützungssystemen zum

tragen kommt, muss in klinisch orientierten Studien evaluiert werden. Aufgrund der Tatsache, dass in unserer Studie nur nicht-vorgeschädigte Herzen verwendet wurden, ist eine direkte Übertragung unserer Ergebnisse auf das klinische Szenario nicht möglich. Bisher sind ausschließlich Studien durchgeführt worden, bei denen das Bild der ischämischen Kardiomyopathie mittels LAD-Ligatur im Tiermodell reproduziert wurde und die im Anschluss unter volumenunbelasteten Bedingungen im heterotopen Transplantationsmodell getestet wurden^{54,55}. Ein partiell geladenes heterotopes Transplantationsmodell ischämischer Herzen hätte den Reiz, zum einen das *remodelling* der ischämischen Herzen unter partiell geladenen Bedingungen untersuchen zu können, zum anderen könnten aber auch die funktionellen und morphologischen Effekte von bioartifiziellen Herzgeweben realitätsnah getestet werden.

Nachdem im ersten Teil der Arbeit gezeigt werden konnte, dass das geladene Transplantationsmodell dem ungeladenen hinsichtlich Morphologie und Funktion überlegen ist, wurde das Konzept des transmuralen Herzwandersatzes im volumengeladenen Modell getestet. Dazu wurde das im ersten Teil der Arbeit charakterisierte volumengeladene Transplantationsmodell um den Aspekt eines 6 mm großen Wanddefektes im Bereich der linksventrikulären freien Wand erweitert. Dies war nach initialer Lernkurve mit akzeptablem Überleben (ca. 75%) der Empfängertiere und ausreichender Funktion der Transplantate möglich. Entscheidend für den Erfolg der Methode waren die Schonung der Koronarien sowie der Papillarmuskel bei der Erzeugung des transmuralen Defekts.

Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark wurden in einer Vielzahl klinischer Studien zur Behandlung ischämischer Herzerkrankungen eingesetzt. Der in einigen Studien beobachtete positive Effekt ist am ehesten auf parakrine Faktoren zurückzuführen, da der eindeutige Beweis einer Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Kardiomyozyten bisher nicht erbracht werden konnte⁵⁶. Um zwischen Effekten der Einbringung kontraktile Elemente und parakrinen Effekten zu unterscheiden, verwendeten

wir deshalb neben EHTs aus kontraktile Herzmuskelzellen ebenfalls Gewebekonstrukte aus kardialen Nichtmyozyten (zum größten Teil Fibroblasten) und mesenchymalen Stammzellen zur Reparatur des transmuralen Wanddefekts.

28 Tage nach Implantation konnten quergestreifte Kardiomyozyten nur in den transmuralen Defekten der EHT-behandelten Tiere nachgewiesen werden. Die nichtkontraktilen Implantate zeigten, im Gegensatz zu EHT-Implantaten, auch *in vivo* keine makroskopisch sichtbaren, aktive Kontraktionen, sodass sich auch in dieser Arbeit kein Hinweis auf eine kardiogene Transdifferentiation von kardialen Fibroblasten und mesenchymalen Stammzellen zu Herzmuskelzellen unter den gegebenen Untersuchungsbedingungen ergab. Allerdings könnten die Gewebekonstrukte unabhängig von ihrer Zellquelle eine Rolle für die mechanische Stabilisierung der insuffizienten Herzen gespielt haben. So zeigten Tiere mit Implantat eine niedrigere Mortalität als Sham-operierte Tiere mit Wanddefekt aber ohne Implantat. Eine weitere Erklärung des besseren Überlebens der Tiere mit Implantat könnte eine vermehrte Blutung aus dem Myokard der SHAM-Tiere sein, da die Blutung aus dem transmuralen Wanddefekt perioperativ nur transient mit abdominellen Fettgewebe tamponiert wurde, und die Gewebeimplantate einen großen Anteil an prokoagulatorischem Kollagen enthalten. Der funktionelle Nutzen einer Behandlung von insuffizienten Herzen mit EHTs wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht und wird in laufenden Arbeiten unserer Gruppe evaluiert.

Überraschenderweise war die Vaskularisierung der drei getesteten Gruppen nach vier Wochen sehr unterschiedlich. EHTs zeigten eine hohe Dichte an Kapillaren mit homogenem Durchmesser. ECT und EMT zeigten deutlich weniger Gefäßeinsprossung mit Gefäßen unterschiedlicher Diameter. Diese Erkenntnisse könnten Hinweis darauf geben, dass die unterschiedlichen Gewebe variable Mengen angiogener bzw. antiangiogener Faktoren sezernieren. In diesem Zusammenhang konnte unsere Gruppe bereits eine hohe Expression von VEGF-A in EHTs nachweisen, zudem weisen EHTs bereits *in vitro* primitive Kapillaren auf ^{57,58}. An dieser Stelle sind detaillierte Studien notwendig, um die entscheidenden

Faktoren bei der Vaskularisation von EHT-, ECT-, and EMT-Implantaten zu identifizieren. Dies könnte Erklärungen für die in dieser Studie gezeigten quantitativen und qualitativen Unterschiede geben. Ein dichtes Netzwerk von funktionalen Gefäßen ist eine unverzichtbare Voraussetzung für eine ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung von großen Gewebekonstrukten, die bei der Behandlung myokardialer Schäden bei Großtieren und im humanen Anwendungsbereich notwendig wären. Die richtige Kombination aus Kardiomyozyten und gefäßbildender Nichtkardiomyozyten könnte die Herstellung von größeren *in vitro* gezüchtetem Herzgewebe erleichtern.

Ausblick

Diese Arbeit evaluierte ein Modell der volumengeladenen heterotopen Herztransplantation im Vergleich zum volumenungeladenen Modell und entwickelt daraus ein neues Modell zur Testung eines transmuralen Wandersatzes mit künstlichen Herzgeweben *in vivo*. Eine Grundvoraussetzung für eine funktionell relevante Unterstützung von geschädigtem Myokard durch künstliches Herzgewebe ist die elektrische Integration des Implantats. Sowohl dies als auch die Veränderungen der Pumpfunktion von Herzen durch einen transmuralen Wandersatz müssen in weitergehenden Studien untersucht werden.

In Zukunft könnten künstliche Herzgewebe für Patienten mit terminaler chronischer Herzinsuffizienz und für einen Teil der Kinder mit angeborenen Herzfehlern eine Behandlungsoption sein. Bei beiden Beispielen handelt es sich um Erkrankungen bei denen die alleinige Zellimplantation wenig therapeutischen Nutzen haben dürfte und neben der Herztransplantation nur unzureichende Therapieoptionen bestehen. Hierzu ist es allerdings notwendig, deutlich größere Herzgewebe mit einer besseren Nähr- und Sauerstoffversorgung als bisher zu generieren. Ein ermutigendes Ergebnis aus dieser Arbeit auf dem Weg dahin ist die rasche und dichte Kapillarisation der Gewebe *in vivo*.

Auf der anderen Seite könnten nichtkontraktile Implantate unter bestimmten Bedingungen nützlich sein, um insuffiziente Herzen mechanisch zu stabilisieren und die Dilatation der

Ventrikel zumindest zu verlangsamen. Letztgenannter Anwendungsbereich steht eventuell sogar näher an der klinischen Erprobung, da nichtkontraktile Zellen selbst unter klinischen Voraussetzungen in ausreichender Zahl zur Verfügung stehen würden und Kollagen in Hydrogelen bereits klinisch eingesetzt wird, um Gewebedefekte zu reparieren. Es wäre demnach eventuell bald möglich Kollagen zu nutzen welches von der FDA bereits zugelassen ist und autologe Fibroblasten oder Stammzellen des Knochenmarks zu nutzen, um nichtkontraktile humane Implantate zu generieren, die dann z.B. bei dilatativer Kardiomyopathie zum Einsatz kommen könnten. Bevor dieses Konzept Einzug in die Klinik hält sind Studien am Großtier jedoch unumgänglich.

5. Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind immer noch die häufigste Todesursache weltweit. Trotz einer deutlichen Verbesserung der akuten Mortalität nach Herzinfarkt ist die terminale Herzinsuffizienz ein Problem für welches, mit Ausnahme der Herztransplantation, kein kausaler Therapieansatz zur Verfügung steht. Zudem ist der massive Organspendermangel Grund dafür, warum dringend neue Therapien zur Behandlung der terminalen Herzinsuffizienz entwickelt werden müssen. Beim myokardialen *Tissue Engineering* wird künstliches Herzgewebe in Form von *Engineered Heart Tissue* (EHT) im Labor gezüchtet und als Ersatz für defektes Myokard eingesetzt. Das sich EHTs prinzipiell für den Einsatz nach Myokardinfarkt eignen, konnte in einer Studie ohne transmurale Anwendung bereits gezeigt werden. Gerade dies wäre jedoch für den klinischen Anwendungsbereich besonders wünschenswert. Zur präklinischen Testung von EHTs eignet sich das Rattenmodell besonders, da hier bereits Modelle zur heterotopen Herztransplantation etabliert sind, die es potentiell erlauben ex vivo und ohne Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine einen transmuralen Defekt zu setzen. Da sich diese Modelle hinsichtlich ihrer Physiologie jedoch deutlich unterscheiden, wurden die zwei vielversprechendsten Modelle (Ono&Lindsey vs. Asfour) miteinander im Hinblick auf Erhalt der linksventrikulären Morphologie und Funktion verglichen. Im Anschluss wurde das überlegene Asfour-Modell um den Aspekt eines 6 mm messenden transmuralen Defekts ergänzt und untersucht, ob sich EHTs als Herzwandersatz eignen. Im ersten Teil der Studie konnte gezeigt werden, dass das Modell von Asfour und Kollegen bessere globale und lokale Funktionsparameter aufzuweisen hatte. Bei beiden untersuchten Modellen waren Kontraktionsfrequenz, Schlagvolumen und Glukosemetabolismus im Vergleich zu den orthotopen Herzen jedoch deutlich vermindert. Das Modell von Asfour konnte mit akzeptablem Überleben, um einen großen (6mm) transmuralen Defekt ergänzt werden. Im Anschluss wurden künstliche Gewebe aus Kardiomyozyten, mesenchymalen Stammzellen und kardialen Fibroblasten nach entsprechender Kultur in den Defekt genäht. Das Überleben nach Setzen eines transmuralen

Defekts war in den Implantatgruppen gleich, jedoch zeigte sich eine deutlich erhöhte Mortalität in der Gruppe der scheinoperierten Tiere ohne Wandersatz. Ausschließlich EHT-Implantate waren am Ende der Studie kontraktile. Qualitativ und quantitativ gab es hinsichtlich der Vaskularisierung der Implantate erhebliche Unterschiede zwischen den Gruppen. Zukünftige Studien müssen die elektrische Integration, sowie den funktionellen Nutzen einer transmuralen EHT-Implantation weiter beleuchten.

6. **Abkürzungsverzeichnis**

AWThd	anteriore Wanddicke in der Diastole
AWThF	Vorderwandverkürzungsfraction
AWThs	anteriore Wanddicke in der Systole
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CEE	<i>chick embryo extract</i> , Hühnerembryonenextrakt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbeccos Minimal Essential Medium
Echo	Echokardiographie
ECT	Engineered Connective Tissue
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHT	Engineered Heart Tissue
EMT	Engineered Mesenchymal Tissue
FAS	Flächenverkürzungsfraction
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HE	Hämatoxylin-Eosin

HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HS	<i>horse serum</i> , Pferdeserum
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
l	Liter
LVAd	diastolische linksventrikuläre Fläche
LVA _s	systolische linksventrikuläre Fläche
LVAW _d	diastolische linksventrikuläre anteriore Wanddicke
LVAW _s	systolische linksventrikuläre anteriore Wanddicke
LVID _d	diastolischer linker intraventrikulärer Diameter
LVID _s	systolischer linker intraventrikulärer Diamete
LVPW _d	diastolische linksventrikuläre Hinterwanddicke
LVPW _s	systolische linksventrikuläre Hinterwanddicke
M	Mol/Liter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol/l	Mikromol/l

µm	Mikrometer
MEM	Minimal Essential Medium
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol/l	Millimol/l
N	mol/l H ₂ O
n	Anzahl
nmol/l	Nanomol/l
NL	Non-loaded, nicht-volumen geladenes Herz
p	Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration
P/S	Penicillin/Streptomycin
s.c.	subkutan
sec	Sekunden
SEM	Standardfehler
TBS	tris buffered saline
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

U	Unit (Enzymeinheit)
VL	volume loaded, volumengeladenes Herz
v/v	volume/volume
w/w	weight/weight

7. **Literaturverzeichnis**

1. <http://www.who.int>.
2. <http://www.rki.de>.
3. Bettencourt-Dias, M., Mittnacht, S. & Brockes, J.P. Heterogeneous proliferative potential in regenerative adult newt cardiomyocytes. *J Cell Sci* 116, 4001-4009 (2003).
4. Poss, K.D., Wilson, L.G. & Keating, M.T. Heart regeneration in zebrafish. *Science* 298, 2188-2190 (2002).
5. Bergmann, O., *et al.* Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 324, 98-102 (2009).
6. Mann, D.L. & Bristow, M.R. Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. *Circulation* 111, 2837-2849 (2005).
7. Vunjak-Novakovic, G., *et al.* Challenges in cardiac tissue engineering. *Tissue engineering. Part B, Reviews* 16, 169-187 (2010).
8. Go, A.S., *et al.* Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 127, e6-e245 (2013).
9. Zimmermann, W.H. & Cesnjevar, R. Cardiac tissue engineering: implications for pediatric heart surgery. *Pediatric cardiology* 30, 716-723 (2009).
10. Jacobs, J.P., *et al.* Variation in outcomes for benchmark operations: an analysis of the Society of Thoracic Surgeons Congenital Heart Surgery Database. *Ann Thorac Surg* 92, 2184-2191; discussion 2191-2182 (2011).
11. Khairy, P., *et al.* Long-term survival, modes of death, and predictors of mortality in patients with Fontan surgery. *Circulation* 117, 85-92 (2008).
12. Nieminen, H.P., Jokinen, E.V. & Sairanen, H.I. Causes of late deaths after pediatric cardiac surgery: a population-based study. *Journal of the American College of Cardiology* 50, 1263-1271 (2007).
13. <http://www.heart.org>.

14. <http://www.ishtl.org>.
15. Kirklin, J.K., *et al.* Third INTERMACS Annual Report: the evolution of destination therapy in the United States. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 30, 115-123 (2011).
16. Muller, J., *et al.* Weaning from mechanical cardiac support in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 96, 542-549 (1997).
17. Klotz, S., *et al.* Mechanical unloading during left ventricular assist device support increases left ventricular collagen cross-linking and myocardial stiffness. *Circulation* 112, 364-374 (2005).
18. Simon, M.A., *et al.* Myocardial recovery using ventricular assist devices: prevalence, clinical characteristics, and outcomes. *Circulation* 112, 132-36 (2005).
19. Dor, V., Saab, M., Coste, P., Kornaszewska, M. & Montiglio, F. Left ventricular aneurysm: a new surgical approach. *Thorac Cardiovasc Surg* 37, 11-19 (1989).
20. Batista, R.J., *et al.* Partial left ventriculectomy to treat end-stage heart disease. *Ann Thorac Surg* 64, 634-638 (1997).
21. Schenk, S., *et al.* Myosplint implant and shape-change procedure: intra- and peri-operative safety and feasibility. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 21, 680-686 (2002).
22. Bredin, F. & Franco-Cereceda, A. Midterm results of passive containment surgery using the acorn Cor Cap cardiac support device in dilated cardiomyopathy. *J Card Surg* 25, 107-112 (2010).
23. Carpentier, A. & Chachques, J.C. Myocardial substitution with a stimulated skeletal muscle: first successful clinical case. *Lancet* 1, 1267 (1985).
24. Gnechi, M., Zhang, Z., Ni, A. & Dzau, V.J. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circulation research* 103, 1204-1219 (2008).

25. van den Akker, F., Deddens, J.C., Doevendans, P.A. & Sluijter, J.P. Cardiac stem cell therapy to modulate inflammation upon myocardial infarction. *Biochimica et biophysica acta* 1830, 2449-2458 (2013).
26. Ye, L., Zimmermann, W.H., Garry, D.J. & Zhang, J. Patching the heart: cardiac repair from within and outside. *Circulation research* 113, 922-932 (2013).
27. Karikkineth, B.C. & Zimmermann, W.H. Myocardial tissue engineering and heart muscle repair. *Current pharmaceutical biotechnology* 14, 4-11 (2013).
28. Bursac, N., *et al.* Cardiac muscle tissue engineering: toward an in vitro model for electrophysiological studies. *The American journal of physiology* 277, H433-444 (1999).
29. Kofidis, T., *et al.* In vitro engineering of heart muscle: artificial myocardial tissue. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 124, 63-69 (2002).
30. van Luyn, M.J., *et al.* Cardiac tissue engineering: characteristics of in unison contracting two- and three-dimensional neonatal rat ventricle cell (co)-cultures. *Biomaterials* 23, 4793-4801 (2002).
31. Carrier, R.L., *et al.* Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization. *Biotechnol Bioeng* 64, 580-589 (1999).
32. Li, R.K., *et al.* Survival and function of bioengineered cardiac grafts. *Circulation* 100, II63-69 (1999).
33. Shimizu, T., *et al.* Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circulation research* 90, e40 (2002).
34. Eschenhagen, T., *et al.* Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 11, 683-694 (1997).

35. Duedahl-Olesen, L., Larsen, K.L. & Zimmermann, W. Rapid detection of malto-oligosaccharide-forming bacterial amylases by high performance anion-exchange chromatography. *Lett Appl Microbiol* 30, 312-316 (2000).
36. Zimmermann, W.H., *et al.* Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats. *Circulation* 106, 1151-157 (2002).
37. Zimmermann, W.H., *et al.* Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nature medicine* 12, 452-458 (2006).
38. Ono, K. & Lindsey, E.S. Improved technique of heart transplantation in rats. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 57, 225-229 (1969).
39. Depre, C., *et al.* Unloaded heart in vivo replicates fetal gene expression of cardiac hypertrophy. *Nature medicine* 4, 1269-1275 (1998).
40. El-Armouche, A., *et al.* Common microRNA signatures in cardiac hypertrophic and atrophic remodeling induced by changes in hemodynamic load. *PLoS one* 5, e14263 (2010).
41. Ibrahim, M., *et al.* Prolonged mechanical unloading affects cardiomyocyte excitation-contraction coupling, transverse-tubule structure, and the cell surface. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24, 3321-3329 (2010).
42. Klein, I., Hong, C. & Schreiber, S.S. Isovolumic loading prevents atrophy of the heterotopically transplanted rat heart. *Circulation research* 69, 1421-1425 (1991).
43. Korecky, B. & Masika, M. Direct effect of increased hemodynamic load on cardiac mass. *Circulation research* 68, 1174-1178 (1991).
44. Yokoyama, H., *et al.* Proposal of a working left heart model with a heterotopic transplantation technique in rats. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 14, 706-712 (1995).

45. Galinanes, M., Zhai, X. & Hearse, D.J. The effect of load on atrophy, myosin isoform shifts and contractile function: studies in a novel rat heart transplant preparation. *Journal of molecular and cellular cardiology* 27, 407-417 (1995).
46. Asfour, B., *et al.* A simple new model of physiologically working heterotopic rat heart transplantation provides hemodynamic performance equivalent to that of an orthotopic heart. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 18, 927-936 (1999).
47. Grossman, W., Jones, D. & McLaurin, L.P. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *The Journal of clinical investigation* 56, 56-64 (1975).
48. Opie, L.H., Commerford, P.J., Gersh, B.J. & Pfeffer, M.A. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet* 367, 356-367 (2006).
49. Toischer, K., *et al.* Differential cardiac remodeling in preload versus afterload. *Circulation* 122, 993-1003 (2010).
50. Taegtmeyer, H. Carbohydrate interconversions and energy production. *Circulation* 72, IV1-8 (1985).
51. Collins-Nakai, R.L., Noseworthy, D. & Lopaschuk, G.D. Epinephrine increases ATP production in hearts by preferentially increasing glucose metabolism. *The American journal of physiology* 267, H1862-1871 (1994).
52. Bricknell, O.L., Daries, P.S. & Opie, L.H. A relationship between adenosine triphosphate, glycolysis and ischaemic contracture in the isolated rat heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* 13, 941-945 (1981).
53. Tang-Quan, K.R., *et al.* Non-volume-loaded heart provides a more relevant heterotopic transplantation model. *Transplant immunology* 23, 65-70 (2010).
54. Oriyanhan, W., *et al.* Determination of optimal duration of mechanical unloading for failing hearts to achieve bridge to recovery in a rat heterotopic heart transplantation model. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 26, 16-23 (2007).

55. Navaratnarajah, M., *et al.* Influence of ivabradine on reverse remodelling during mechanical unloading. *Cardiovascular research* 97, 230-239 (2013).
56. Sanganalmath, S.K. & Bolli, R. Cell therapy for heart failure: a comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions. *Circulation research* 113, 810-834 (2013).
57. Naito, H., *et al.* Optimizing engineered heart tissue for therapeutic applications as surrogate heart muscle. *Circulation* 114, 172-78 (2006).
58. Tiburcy, M., *et al.* Terminal differentiation, advanced organotypic maturation, and modeling of hypertrophic growth in engineered heart tissue. *Circulation research* 109, 1105-1114 (2011).

8. Danksagung

Meinen herzlichsten Dank möchte ich Prof. Dr. med. W.-H. Zimmermann und Prof. Dr. med. T. Eschenhagen sagen, die mich seit Vergabe der Promotionsarbeit in allen Schritten meiner wissenschaftlichen Arbeit hervorragend unterstützt und in schweren Phasen auch immer wieder motiviert haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Freund Dr. med. M. Didié, ohne dessen geduldige Einweisung in die verschiedenen Bereiche der täglichen Arbeit ein Vorankommen und eine Fertigstellung der Arbeit undenkbar gewesen wäre.

Prof. Dr. Dr. med. H. Reichenspurner danke ich für die langjährige Unterstützung und Inspiration in klinischen und wissenschaftlichen Fragen.

Zudem möchte ich mich bei der gesamten Mitarbeiterschaft im Institut für Experimentelle Pharmakologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf herzlich für die Unterstützung und Einweisung bedanken. Birgit Geertz danke ich im Besonderen für die angenehme Gesellschaft in und außerhalb des Tier-OPs. Dr. rer. nat. Stephan Döker danke ich für die Hilfe bei der Histologie.

Mein Dank gilt desweiteren den Kollaboratoren des Projekts:

MRT: PD Dr. rer. nat. Andreas Hess, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie, Friedrich- Alexander- Universität Erlangen- Nürnberg

μ-PET: Dr. rer. nat. R. Buchert, Klinik für Nuklearmedizin, Charité- Universitätsmedizin Berlin.

Der Werner-Otto-Stiftung gilt herzlichster Dank für die großzügige Vergabe des „Werner Otto Stipendium zur Förderung des medizinisch-wissenschaftlichen Nachwuchses an der Universität Hamburg“.

Posthum danke ich Dr. med. Ivan Melnychenko, der mir in Bezug auf die zukünftige kinderherzchirurgische Anwendung von *Engineered Heart Tissue* Inspiration vermittelt hat, die mir mein Leben lang wissenschaftlicher Antrieb sein wird.

Meiner Ehefrau, Marie Biermann, möchte ich für die ständige und nicht immer selbstverständliche Liebe zu mir danken. Ich bin dankbar für jeden Tag und freue mich auf die Zukunft mit dir und den Kindern.

9. Lebenslauf

Name: Daniel Biermann
Geburtsdatum: 14.03.1979
Geburtsort: Hamburg
Familienstand: verheiratet
Wohnadresse: Grindelallee 79, 20146 Hamburg
Geschäftsadresse: Martinistr. 52, Haus O70, 20246 Hamburg
Telefon: 0152-22816504
Email: d.biermann@uke.de

Studium

2002-2009: Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
2008-2009: Praktisches Jahr in Kapstadt, Südafrika
1.Trimester: Innere Medizin im Tygerberg Hospital,
Department of Medicine, University Stellenbosch, Leitung: Prof.
Moosa
2.Trimester: Chirurgie im Tygerberg Hospital,
Department of Surgical Science, University Stellenbosch,
Leitung: Prof. Warren
3.Trimester: Wahlfach Herzchirurgie im Groote Schuur Hospital,
Chris Barnard Division of Cardiothoracic Surgery, University of
Cape Town, Leitung: Prof. Zilla

Tätigkeiten

1999-2002: Rettungsdienst bei der Berufsfeuerwehr Hamburg und privaten
Unternehmen, Abschluss: Rettungsassistent
2006-2009: Doktorand im Institut für Experimentelle Pharmakologie und

Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf , Leitung:
Prof. Dr. Eschenhagen

2010-heute: Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Klinik und Poliklinik für
Herz-und Gefäßchirurgie am Universitärem Herzzentrum
Hamburg, Leitung: Prof. Dr. Dr. Reichenspurner

Stipendium

2007 - 2009: Werner Otto Stiftung, "Werner Otto Stipendium zur Förderung
des medizinisch-wissenschaftlichen Nachwuchses an der
Universität Hamburg"

Auszeichnung

2014: Wissenschaftspreis der Deutschen Gesellschaft für
Pädiatrische Kardiologie

Publikationen

Yildirim Y, Naito H, Didié M, Karikkineth BC, Biermann D, Eschenhagen T, Zimmermann
WH.

Development of a biological ventricular assist device: preliminary data from a small animal
model.

Circulation. 2007 Sep 11;116(11 Suppl):I16-23.

Ei-Armouche A, Schwoerer AP, Neuber C, Emmons J, Biermann D, Christalla T, Grundhoff
A, Eschenhagen T, Zimmermann WH, Ehmke H.

Common microRNA signatures in cardiac hypertrophic and atrophic remodeling induced by
changes in hemodynamic load.

PLoS One. 2010 Dec 9;5(12):e14263.

Biermann D, Schönebeck J, Rebel M, Weil J, Dodge-Khatami A.

Left coronary artery occlusion after percutaneous pulmonary valve implantation.

Ann Thorac Surg. 2012 Jul;94(1):e7-9.

Biermann D, Heilmann A, Didié M, Schlossarek S, Wahab A, Grimm M, Römer M, Reichenspurner H, Sultan KR, Steenpass A, Ergün S, Donzelli S, Carrier L, Ehmke H, Zimmermann WH, Hein L, Böger RH, Benndorf RA.

Impact of AT2 receptor deficiency on postnatal cardiovascular development.

PLoS One. 2012;7(10):e47916.

Löser B, Tank S, Hillebrand G, Goldmann B, Diehl W, Biermann D, Schirmer J, Reuter DA.

Peripartum cardiomyopathy: interdisciplinary challenge.

Anaesthesist. 2013 May;62(5):343-54.

Schwoerer AP, Neef S, Broichhausen I, Jacubeit J, Tiburcy M, Wagner M, Biermann D, Didié M, Vettel C, Maier LS, Zimmermann WH, Carrier L, Eschenhagen T, Volk T, El-Armouche A, Ehmke H.

Enhanced Ca(2+) influx through cardiac L-type Ca(2+) channels maintains the systolic Ca(2+) transient in early cardiac atrophy induced by mechanical unloading.

Pflugers Arch. 2013 Dec;465(12):1763-73.

Didié M, Biermann D, Buchert R, Hess A, Wittköpper K, Christalla P, Döker S, Jebran F, Schöndube F, Reichenspurner H, El-Armouche A, Zimmermann WH.

Preservation of left ventricular function and morphology in volume-loaded versus volume-unloaded heterotopic heart transplants.

(Didié and Biermann contributed equally)

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2013 Aug 15;305(4):H533-41.

Kongressvorträge und Poster

Forschungstag am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf 2007:

Poster: Engineered Heart Tissue als linksventrikulärer Wandersatz in einem volumengeladenen heterotopen Transplantationsmodell

Scientific Sessions 2007, American Heart Association, Orlando, USA:

Vortrag: Transmural myocardial repair with Engineered Heart Tissue grafts

Gemeinsame Tagung der deutschen, österreichischen und schweizerischen Gesellschaften für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie (D-A-CH) 2008, Innsbruck, Österreich:

Vortrag: Left ventricular wall replacement with Engineered Heart Tissue in heterotopically transplanted rat hearts

Jahrestagung der DGTHG 2009, Stuttgart:

Vortrag: Angiotensin II subtype 2 receptors in postnatal cardiac development

Jahrestagung der DGTHG 2011, Stuttgart

1. Vortrag: Partial loading of heterotopic heart transplants results in preserved left ventricular function and morphology

2. Vortrag: Pathophysiological role of the AT2 receptor in cardiovascular remodeling after myocardial infarction in mice

Jahrestagung der DGTHG 2012, Freiburg:

Poster: Left coronary artery occlusion after percutaneous pulmonary valve implantation

Jahrestagung der DGK 2012, Mannheim:

Poster: Preservation of left ventricular morphology and function in volume-loaded vs. non-loaded heterotopic heart transplants, Auswahl zum besten Poster der Session

Jahrestagung der DGTHG 2013, Freiburg

1. Vortrag: Impact of AT₂-receptor deficiency on postnatal cardiovascular development
2. Vortrag: Heterotopic heart transplantation in rats: Left ventricular function and morphology in loaded vs. Non-loaded transplants

Jahrestagung der DGTHG 2014, Freiburg

1. Vortrag: An exceedingly rare coronary anomaly - right coronary artery take-off from the left ventricular outflow tract
2. Vortrag: Mechanical unloading: Enhanced Ca²⁺ influx through cardiac L-type Ca²⁺ channels maintains the systolic Ca²⁺ transient in early cardiac atrophy

Jahrestagung der DGTHG 2015, Freiburg

1. Vortrag: Dynamic electrocardiographic changes in non-loaded heterotopically transplanted rat hearts
2. Vortrag: Failing Fontan: Towards a subpulmonary neo-ventricle from Engineered Heart Tissue

10. 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: