Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie

(Prof. Dr. med. W.-H. Zimmermann)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# Über die Herstellung von humanem Makro-Herzgewebe zur Therapie der Herzinsuffizienz

### **INAUGURAL** - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Paul Balfanz

aus

Pasewalk

Göttingen 2022

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück
I. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. med. WH. Zimmermann
II. Berichterstatter/in:	
III. Berichterstatter/in:	
Tag der mündlichen Prüfung:	

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel: "Über die Herstellung von humanem Makro-Herzgewebe zur Therapie der Herzinsuffizienz" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

(Paul Balfanz)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden [teilweise] publiziert:

- Tiburcy M, Hudson JE, Balfanz P, Schlick SF, Meyer T, Liao MLC, Levent E, Raad F, Zeidler S, Wingender E, et al. (2017): Defined Engineered Human Myocardium with Advanced Maturation for Applications in Heart Failure Modelling and Repair. Circulation, CIRCULATIONAHA.116.024145
- Jebran AF, Tiburcy M, Biermann D, Balfanz P, Didié M, Karikkineth BC, Schöndube F, Kutschka I, Zimmermann WH (2022): Transmural myocardial repair with engineered heart muscle in a rat model of heterotopic heart transplantation - A proof-of-concept study. J Mol Cell Cardiol <u>168</u>, 3-12

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis III		
TabellenverzeichnisV		
Abkürz	ungsverzeichnis	VI
1. Ein	leitung	1
1.1	Herzinsuffizienz und ihre Therapie	1
1.2	Künstliches Herzgewebe zur Herzreparatur	4
1.3	Biophysikalische Stimulation der Herzgewebe	7
1.4	Aufgabenstellung	10
2. Ma	terialien und Methoden	11
2.1	Herstellung der Engineered Heart Muscle (EHM)-Kulturschalen	11
2.2	Herstellung und Eigenschaften der EHM-Stempel	12
2.3	Desinfektion der Stempel	14
2.4	Herstellung der Makro-Herzgewebe	15
2.5	Videobasierte Funktions- und Morphologieanalyse	19
2.6	Biolumineszenz-Messung (Bioluminescence Imaging, BLI)	20
2.7	Detektion von Aktionspotenzialen	21
2.8	Ultraschall-gestützte Bildgebung der Herzgewebe	21
2.9	Triphenoltetrazoliumchlorid (TTC)-Färbung	21
2.10	Fixierung der Gewebe	22
2.11	Dissoziation der Makro-Herzgewebe	22
2.12	Immunhistochemische Anfärbung der Gewebe	23
2.13	Entwässerung des Gewebes und Erstellung von Paraffinschnitten	23
2.14	Hämotoxylin-Eosin-Färbung	24
2.15	Kontraktionskraftmessung	24
2.16	Statistik	25

	2.17	Substanzen	25
	2.18	Hilfsmittel und Geräte	30
3.	Erg	ebnisse	32
	3.1	Bestimmung der optimalen Zellzahl	32
	3.2	Bestimmung des optimalen Fibroblastenanteils	36
	3.3	Eigenschaften der künstlichen Makroherzgewebe	38
	3.4	Korrelation der Kraft von EHM-Ringen und EHM-Gewebepflastern	47
	3.5	Skalierung der EHM-Gewebepflaster für klinische Anwendung	48
	3.6	Veränderung der kontraktilen Eigenschaften durch Modifikation des	
	Stemp	peldesigns	56
4.	Dis	kussion	59
	4.1	Die Herstellung von intaktem und funktionellem Herzgewebe	59
	4.2	Die Messung der Funktionalität von EHM-Gewebepflastern	61
	4.3	Die Bedeutung von Kultivierungsdauer und elektrischer Stimulation	62
	4.4	Zellverteilung und -ausrichtung im EHM-Gewebepflaster	63
	4.5	Die Skalierung der Größe und Dicke von EHM-Gewebepflastern	64
	4.6	Ausblick	66
5.	Zus	ammenfassung	67
6.	Lite	eraturverzeichnis	68

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Herstellung der Gewebepflaster Kulturschalen	11
Abbildung 2: Strukturzeichnungen des Basis-Stempels	13
Abbildung 3: Dimensionen des skalierten Stempels	14
Abbildung 4: Kulturphasen der EHM-Gewebepflaster und -ringe	18
Abbildung 5: Videobasierte Messung der Gewebepflasterfunktion	20
Abbildung 6: Titration der Gesamtzellzahl für EHM-Makrogewebe	32
Abbildung 7: Grauwertmessung von Gewebepflastern mit unterschiedlichen	
Kardiomyozytenzahlen	33
Abbildung 8: Kontraktile Funktion der Gewebe mit unterschiedlichen	
Kardiomyozytenzahlen	34
Abbildung 9: Biolumineszenzaufnahmen von Geweben mit unterschiedlichen	
Kardiomyozytenzahlen	35
Abbildung 10: Titrationsreihe von Fibroblasten in EHM-Gewebepflastern	37
Abbildung 11: Horizontale und vertikale Zellverteilung eines EHM-Gewebepfla	sters
mit 10-prozentigem Fibroblastenzusatz	40
Abbildung 12: Dimensionen, Zellverteilung und Zellorganisation in EHM-	
Gewebepflastern	41
Abbildung 13: Kontraktionsparameter im Verlauf der Kultivierungszeit	42
Abbildung 14: Vergleich der Rhythmisierung und Kontraktilität in Geweben mit	und
ohne Fibroblastenzusatz	43
Abbildung 15: Auswirkung elektrischer Stimulation auf EHM-	
Gewebepflasterfunktion	44
Abbildung 16: Elektrische Erregungsausbreitung in EHM-Gewebepflastern	46
Abbildung 17: Korrelation der Kraft von EHM-Gewebepflaster und	
korrespondierenden EHM-Ringen	47
Abbildung 18: Skalierung der Gussformen und Stempel	49
Abbildung 19: Skalierte EHM-Gewebepflaster	50
Abbildung 20: Ultraschallaufnahmen skalierter Gewebe für Messungen des	
Querschnittsdurchmessers im Rand- und Innenbereich	51
Abbildung 21: FAC-Daten skalierter EHM-Gewebepflaster	51

Abbildung 22: Erhöhung der Gewebepflasterdicke	53
Abbildung 23: Grauwertmessung vom Gewebe mit einfachem und zweifachem	
Hydrogel	54
Abbildung 24: Erhöhung der Dicke von EHM Makro-Gewebe	55
Abbildung 25: Variation der Stabdicke und Aufbau eines Stempelgradienten	56
Abbildung 26: Kontraktionskraftparameter unter dem Einfluss eines vertikalen	
Stabgradienten	57

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mastermix für die unterschiedlichen EHM-Gewebe	17
Tabelle 2: Chemikalien und Zellkultursubstanzen	25
Tabelle 3: Zellkulturmedien und Puffer	28
Tabelle 4: Puffer für Kontraktionsmessung	29
Tabelle 5: Hilfsmittel und Geräte	30

\_\_\_\_

# Abkürzungsverzeichnis

3D	drei-dimensional
ACE	Angiotensin Converting Enzyme (Angiotensin-konvertierendes
	Enzym)
ASS	Acetylsalicylsäure
BMP4	Bone Morphogenetic Protein 4
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EHM	Engineered Heart Muscle (künstlicher Herzmuskel)
EHMM	Engineered Heart Muscle Medium
EHT	Engineered Heart Tissue (künstliches Herzgewebe)
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazellulärmatrix
FAC	Fractional Area Change (Flächenverkürzungsfraktion)
FCS	Fetal Calf Serum (Fetales Kälberserum)
FFR	Force-Frequency-Relationship (Kraft-Frequenz-Verhältnis)
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2 (Fibroblasten Wachstumsfaktor 2)
GMP	Good Manufacturing Practice (Gute Herstellungspraxis)
HFF	Human Foreskin Fibroblast (Humaner Vorhautfibroblast)
IGF1	Insulin-like Growth Factor 1 (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
	1)
IWP-4	Wnt/catenin-Inhibitor
КМ	Kardiomyozyt
MW	Medienwechsel
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PDMS	Polydimethylsiloxan
PFA	Paraformaldehyd
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RFP	Red Fluorescent Protein (Rot fluoreszierendes Protein)
ROCK	Rho-abhängige Kinase
rpm	Rotationen pro Minute

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SF	Serumfreies Recovery-Medium (Erholungsmedium)
SFBM	Serumfreies Basalmedium
Т3	Trijodthyronin
TGF-β1	Transforming Growth Factor Beta 1 (Transformierender Wachs-
	tumsfaktor beta 1)
TTC	Triphenoltetrazoliumchlorid
U	<i>Unit</i> (Einheit)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Vaskulärer endothelialer
	Wachstumsfaktor)

# 1. Einleitung

#### 1.1 Herzinsuffizienz und ihre Therapie

Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems gehören zu den häufigsten Todesursachen in Industrienationen. In der Bundesrepublik Deutschland verstarben im Jahr 2015 rund 38,5% der Bevölkerung an einer Erkrankung aus diesem Formenkreis. Die drei häufigsten Diagnosen, die dabei als Todesursache unabhängig vom jeweiligen Geschlecht angegeben wurden, waren in absteigender Reihenfolge die chronisch ischämische Herzerkrankung, der akute Myokardinfarkt und die chronische Herzinsuffizienz (Destatis 2017). Gründe für die hohe Prävalenz und Letalität dieser Erkrankungen sind zum einen der gesellschaftliche Lebenswandel in Industrienationen, die zunehmende Alterung der Bevölkerung und das verbesserte Überleben akuter kardialer Ereignisse wie dem Herzinfarkt, zum anderen - wie im Falle der chronischen Herzinsuffizienz - der Mangel an suffizienten Therapiemöglichkeiten (Metra und Teerlink 2017; Mosterd und Hoes 2007).

Besonders die Therapiemöglichkeiten der präterminalen Herzinsuffizienz und des damit einhergehenden Pumpversagens sind stark begrenzt. Medikamentöse Ansätze können bisher den Fortschritt der kardialen Dysfunktion lediglich verlangsamen, jedoch nicht stoppen oder die ursprüngliche Pumpfunktion des Herzens wiederherstellen. Somit bleibt neben dem Einsatz von apparativen Unterstützungen meist die Herztransplantation als erfolgversprechendste, letzte Therapie, die allerdings aufgrund einer geringen Anzahl von Spenderorganen und einem damit verbundenen Missverhältnis zwischen benötigten und vorhandenen Organen immer weniger eingesetzt werden kann (Gómez et al. 2014; Khush et al. 2020; Schulte et al. 2018; Zimmermann et al. 2006a). Diese Entwicklungen machen es notwendig, neue Therapiemöglichkeiten zur Regeneration der kardialen Pumpfunktion zu erforschen.

Ätiologisch betrachtet entsteht eine chronische Herzinsuffizienz in 54 – 70% der Fälle aufgrund koronarer Herzerkrankungen und demnach einer ischämischen Herzerkrankung. Dem gegenüber steht das Feld der nicht-ischämischen Herzerkrankungen – wie Hypertension (arteriell oder pulmonal), Kardiomyopathien, Herzklappenerkrankungen, Vorhofflimmern, kardiotoxische Substanzen und weitere – als Ursache für chronische Herzerkrankungen (Hoppe et al. 2005; Kötter et al. 2013; Mosterd und Hoes 2007). Allen gemein ist der zunehmende Verlust der Herzmuskelfunktion durch Dysfunktion und Verlust von Kardiomyozyten.

Das Herz besitzt nach heutigem wissenschaftlichem Standpunkt nur geringe Möglichkeit zur Regeneration, da die funktionsgebenden Kardiomyozyten (KM) im postmitotischen Zustand im Herzen vorliegen und somit nekrotisches Gewebe nicht durch Teilung der umliegenden Zellen ersetzt werden kann (Bergmann et al. 2009; Laflamme und Murry 2011). Vielmehr sind kardiale Fibroblasten nach einem Infarktereignis an der Wundheilung beteiligt, indem diese proliferieren und sich zu Myofibroblasten differenzieren. Ein Charakteristikum kardialer Fibroblasten ist die Produktion der extrazellulären Matrix. Das aus Myofibroblasten und Extrazellulärmatrix (EZM) bestehende, reife Narbengewebe besitzt durch seine Zusammensetzung eine geringere Elastizität als das gesunde Herzgewebe. Durch das Narbengewebe im Herzmuskelgewebe kann es zu einer Verzögerung der Erregungsfortleitung kommen und dadurch entstehende unterschiedliche Erregungszustände des Herzmuskelgewebes erhöhen die Vulnerabilität für Arrhythmien (Drenckhahn 2004; Thompson et al. 2011). Zudem gehen vom Narbengewebe verschiedene weitere Risiken aus. Darunter zählen die Gefahr der Aneurysmabildung, die linksventrikuläre Dilatation und ein Wandstress auf die intakten Grenzzonen (Drenckhahn 2004; Ye et al. 2013). Diese Risiken tragen zu einer fortschreitenden myokardialen Dysfunktion bei.

Die myokardiale Dysfunktion führt zu einer Aktivierung verschiedener neurohumoraler Systeme. Diese physiologische Gegenregulationsmechanismen dienen im Gesunden der Aufrechterhaltung der kardialen Auswurfleistung, sorgen jedoch zusätzlich für die fortschreitenden Veränderungen der Gewebestruktur des Herzens, die auch als *Remodelling* des Herzens beschrieben werden (McDonagh et al. 2021). Außerdem resultiert daraus eine periphere Vasokonstriktion, Flüssigkeitsretention, erhöhte Arrhythmieneigung und auch eine Verschlechterung der Symptomatik des Patienten (Hoppe et al. 2005). Die zunehmende mechanische Belastung des Herzens führt zudem zu transmuralem Stress, der ebenfalls einem *Remodelling*-Reiz entspricht (Liaw und Zimmermann 2016). Dieser Reiz verursacht eine Vergrößerung der Myokarddicke, Proliferation der Kardiomyozyten und – wie bereits erwähnt – der Fibroblasten, die für eine erhöhte Kollagenproduktion im Gewebe und damit einhergehend für die Entwicklung einer pathologischen Hypertrophie sorgen (Liaw und Zimmermann 2016; Tallquist und Molkentin 2017). Bei pathologischer Hypertrophie kann dabei auf Zellebene eine reduzierte anisotrope Kardiomyozyten- und Sarkomerausrichtung erhoben werden, die als typisches Zeichen für eine chronische Herzerkrankung gilt (Bian et al. 2014a; Kowalski et al. 2017; Laflamme und Murry 2011; Sahli Costabal et al. 2019; Shimizu und Minamino 2016; Zimmermann 2013). Zusammengenommen führt dies zu einer weiteren Verschlechterung der kardialen Funktion, einer daraus folgenden weiteren Aktivierung des neurohumoralen Systems und der Entstehung eines *Circulus vitiosus*.

Die Therapie der chronischen Herzinsuffizienz greift in die beschriebenen pathophysiologischen Vorgänge ein. Präparate wie ACE-Inhibitoren, sowie Aldosteronoder Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten hemmen das aktivierte neurohumorale Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und damit auch das *Remodelling* des Gewebes. Es wird versucht in den gebildeten *Circulus vitiosus* einzugreifen, um das Fortschreiten der myokardialen Dysfunktion zu verlangsamen. Zusätzlich werden Beta-Adrenozeptorantagonisten zur Inhibierung des aktivierten Sympathikus eingesetzt. Diese Medikamente sind Prognose verbessernd und können die Pumpfunktion des Herzens aufrechterhalten oder sogar verbessern (McDonagh et al. 2021). Ergänzend dazu werden symptomatisch wirkende Medikamente wie Diuretika und Digitalispräparate oder orale Antikoagulantien eingesetzt.

Ein weiterer Gewebeverlust oder eine weitere Veränderung des Myokards soll unbedingt verhindert werden. Die Sekundärprävention, bei der auf medikamentöse (z. B. Statine, ASS) und nicht-medikamentöse (z. B. Lebensstiländerung) Weise versucht wird die Risikofaktoren des Patienten zu minimieren, gilt in der Therapie der Herzinsuffizienz hierfür als erste Maßnahme. Zielführend ist ebenso – noch vor der Pharmakotherapie – die kausale Therapie der Herzinsuffizienz. Hierzu zählt zum Beispiel im Falle einer ischämischen Ursache die Myokardrevaskularisation mithilfe einer Bypassoperation oder Angioplastie (Hoppe et al. 2005). Trotz leitliniengerechter Therapie, die zudem in einem *Disease-Management*-Programm unterstützend evaluiert und angepasst werden kann (Kötter et al. 2013), kann zumeist das Fortschreiten der kardialen Dysfunktion nicht gestoppt werden, wodurch als endgültige Therapie eine Herztransplantation notwendig wird.

Aktuell werden unterschiedliche experimentelle Ansätze verfolgt, die das gemeinsame Ziel haben, verloren gegangene Kardiomyozyten des Herzens zu ersetzen, um eine Remuskularisierung des Herzens zu erreichen. Der Einsatz embryonaler Stammzellen und die Differenzierung dieser in verschiedene Zelltypen eröffnen dabei neue therapeutische Möglichkeiten. So wurden in verschiedenen Tierexperimenten humane pluripotente Stammzellen bzw. aus pluripotenten Stammzellen differenzierte Kardiomyozyten direkt in den Herzmuskel injiziert. Trotz massivem initialen Zellverlusts wurden robuste Bereiche mit neuer Muskulatur gefunden, die mit einer signifikanten Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion einherging (Liu et al. 2018). Eine Gewinnung der Stammzellen durch die Differenzierung induzierter pluripotenter Stammzellen aus Patienten-eigenem Gewebe kann das Problem der Notwendigkeit großer Zellmengen lösen und bietet zudem als autologe Transplantation den Vorteil eines verminderten Abstoßungsrisikos (Shiba et al. 2016; Stevens und Murry 2018).

Ein weiterer Ansatz liegt in der Herstellung und Transplantation ganzer künstlicher Gewebe, die aus pluripotenten Stammzellen-differenzierte Zellen beinhalten. Insbesondere künstlich hergestellte Herzgewebe können dabei in *proof-of-concept*-Studien zur Therapie der Herzinsuffizienz verwendet werden (Zimmermann et al. 2006a).

#### 1.2 Künstliches Herzgewebe zur Herzreparatur

*Tissue Engineering*, als Technologie zur Herstellung künstlicher Gewebe oder gar komplett künstlich erzeugter Organe außerhalb des Menschen, kann im Rahmen der Herzinsuffizienztherapie eine vielversprechende Therapieform darstellen. Diesbezüglich konnte bereits gezeigt werden, dass Gewebe, die unreife oder aus Stammzellen differenzierte Kardiomyozyten beinhalten, dazu fähig sind ein funktionelles Synzytium zu bilden, so dass sie den Vorteil einer Transplantation eines bestehenden Zellverband besitzen (Didié et al. 2013; Zimmermann et al. 2006a).

Die verschiedenen Komponenten des künstlichen Herzmuskels können auf unterschiedliche Weise zu einem intakten Gewebe assembliert werden. Dabei unterscheidet man Matrix-freie Ansätze von Ansätzen, die eine Matrix als Gerüst zur Unterstützung der Bildung eines funktionellen Synzytiums nutzen (Ye et al. 2013). Zu ersterem werden (1) die Matrix-freie Selbstformierung als Mikrogewebe und (2) die Stapelung einzelner Kardiomyozytenschichten zu mehrschichtigen 3D-Konstrukten gezählt (Shimizu 2014). Als Gerüst-basierte Ansätze gelten hingegen (1) die Assemblierung von Herzzellen auf vorgeformten polymeren Gerüsten (Bursac et al. 1999), (2) die Selbstformierung von Herzmuskulatur in Hydrogelen (Soong et al. 2012; Xiong et al. 2013; Zimmermann et al. 2000) und (3) die erneute Zellularisierung dezellularisierten Myokards (Ott et al. 2008).

Für diese Arbeit wurde die Verwendung von Hydrogelen zur Selbstformierung der künstlichen Gewebe gewählt. Dabei kommen unterschiedliche biologische Hydrogele (z. B. Kollagen und Fibrin) zur Unterstützung der Formierung eines Gewebeverbundes in Betracht (Elmowafy et al. 2019). Besonders nahe liegt der Gebrauch von Kollagen-Hydrogelen, da Kollagen der Hauptbestandteil der nativen Extrazellulärmatrix des Herzens ist und vermutlich eine entscheidende Rolle bei der Herzentwicklung spielt (Tiburcy et al. 2014).

Als Herzmuskelbildung unterstützender Zusatz wurde initial Matrigel<sup>®</sup> als Zusatz zu Kollagen-Hydrogelen eingeführt (Zimmermann et al. 2000). Matrigel<sup>®</sup> besteht hauptsächlich aus den Matrixbausteinen Laminin, Kollagen IV und Enactin und wird aus dem Engelbreth-Holm-Swarm Tumor aus Mäusen extrahiert. Durch seinen komplexen Aufbau bestehend aus Strukturproteinen, Wachstumsfaktoren und deren Bindeproteinen bildet es eine effiziente Grundlage für die Assemblierung verschiedener Zellen zu künstlichem Herzgewebe (Hansen et al. 2010; Hughes et al. 2010; Zimmermann et al. 2000). Alternativ zu Kollagen und zumeist in Kombination mit Matrigel findet Fibrin eine breite Anwendung im Herzmuskel *Tissue Engineering* (Bursac et al. 1999; Hansen et al. 2010; Radisic et al. 2004).

Bei der Herstellung von Engineered Heart Muscle (EHM), zuvor als Engineered Heart Tissue (EHT) eingeführt (Zimmermann et al. 2000), konnten während der Kultivierung in Kollagenhydrogelen zwei Phasen der Gewebeentwicklung beobachtet werden. In der ersten Woche (1. - 7. Tag der Kultivierung) nach Assemblierung der unterschiedlichen Zelltypen mit dem Kollagen-Hydrogel zum EHM spricht man von einer Konsolidierungsphase. Darauf folgt von Tag 7 bis Tag 12 der Kultivierung die Maturierungsphase (Zimmermann et al. 2002). Während der verschiedenen Phasen konnten unterschiedliche Prozesse beobachtet werden. Ein Merkmal der Konsolidierungsphase ist hierbei die erwähnte Bildung der Extrazellulärmatrix durch hinzugefügte Stromazellen, d.h. Fibroblasten (Zimmermann 2013). Auch konnten innerhalb der Konsolidierungsphase sowohl im 2D- als auch 3D-Gewebe hohe Apoptoseraten mit einhergehendem Zellverlust gezeigt werden (Naito et al. 2006; Tiburcy und Zimmermann 2014; Tiburcy et al. 2011). In EHM-Ringen konnte dabei eine Zellreduktion auf 30% der an Tag 0 der Kultivierung hinzugegebenen Zellen im Vergleich zu Tag 12 gezeigt werden, welche zum größten Teil auf eine Reduktion der Kardiomyozytenzahl zurückgeführt werden konnte (Tiburcy et al. 2011).

Der Zusatz von Wachstumsfaktoren (u. a. PDGF-BB) zum Kulturmedium konnte dieser anfänglich hohen Apoptoserate entgegenwirken und zugleich einen funktionell und strukturell stabilisierenden Effekt zeigen (Vantler et al. 2010). Die Kultivierung kann auf diese Weise unter serumfreien Bedingungen durchgeführt werden (Naito et al. 2006). Dazu zählt auch das Ersetzen von dem zuvor angewandten Matrigel durch den Zusatz von Insulin und Trijodthyronin (T3) in den ersten 24 Stunden der Kultivierung. T3 sorgt dabei nachweislich für die Expression der schweren Ketten von alpha-Myosin, die ihrerseits eine Rolle in der Ausbildung von Sarkomerstrukturen in isolierten Herzzellen spielen (Naito et al. 2006). Serumfreiheit sowohl von tierischem als auch menschlichen Ursprung kann für eine spätere klinische Anwendung die Gefahr einer Abstoßungsreaktion reduzieren und wird daher in allen Vorgängen der Gewebeherstellung angestrebt, die pharmazeutischen Standards entsprechen sollen. Einleitung

Zur Herstellung der EHM ist eine anfängliche Orientierung an nativem Herzgewebe bezüglich der Zellarten und Anteile sinnvoll. So besteht natives Herzgewebe aus Kardiomyozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Zellen des Immunsystems wie z. B. Makrophagen, wodurch die Annahme aufkam, dass diese Zellen auch essenziell für die Herstellung von Makroherzgeweben seien (Zimmermann et al. 2006a). Allerdings konnte zudem bereits demonstriert werden, dass (1) eine hohe Anzahl von Kardiomyozyten, (2) die Anwesenheit unterstützender Stromazellen, worunter hauptsächlich Fibroblasten fallen, und (3) das Vorhandensein einer Extrazellulärmatrix ausreichend für die Herstellung von Herzgeweben mit suffizienter Funktion sind (Soong et al. 2012; Tiburcy et al. 2017).

Für die Bereitstellung von Kardiomyozyten werden pluripotente Stammzellen benötigt, die auf unterschiedlicher Weise zur Verfügung gestellt werden können und deren Potential zur Ausbildung aller drei Keimblätter zur Differenzierung von Kardiomyozyten genutzt werden kann. Hierzu gehören z. B. die Gewinnung von humanen embryonalen Stammzellen aus Embryonen im Blastozystenstadium, die Reprogrammierung von somatischen Zellen in induzierte pluripotente Stammzellen oder die Verwendung von parthenogenetischen Stammzellen (Didié et al. 2013; Soong et al. 2012; Tiburcy und Zimmermann 2014).

Mit einem Anteil von 70% machen Nicht-Myozyten im kardialen Gewebe den überwiegenden Zelltyp aus. In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Nicht-Myozyten die Bildung funktionstüchtiger künstlicher Herzgewebe unterstützten (Naito et al. 2006; Tiburcy und Zimmermann 2014). Dabei spielen Fibroblasten eine besondere Rolle bei der Anpassung der viskoelastische Eigenschaften von EHM (Schlick et al. 2019) an die viskoelastischen Eigenschaften von nativem Herzgewebe.

#### 1.3 Biophysikalische Stimulation der Herzgewebe

Das menschliche Myokard ist aus Herzmuskelzellen aufgebaut, die zu Herzmuskelfasern verbunden sind, die wiederum in Faserbündeln angeordnet sind. Diese Faserbündel besitzen im Myokard verschiedene Ausrichtungen, die in zirkulären, schrägen und longitudinalen Richtungen verlaufen und somit konzentrische und longitudinale Kontraktionen ermöglichen (Drenckhahn 2004). Bei einem ischämischen Ereignis können verschieden große und unterschiedlich topographisch orientierte Areale betroffen sein. Die effizienteste Herzmuskelreparatur könnte die Implantation von Herzgewebe mit einer an die funktionelle Ausrichtung der untergegangenen Herzzellen angepasste Struktur sein.

Biophysikalische Stimuli können den Reifeprozess, u. a. als Stimuli zur Produktion von Extrazellulärmatrix oder zur Ausrichtung der Kardiomyozyten und Myofibrillen, unterstützen und demnach auch eine *in vivo* Anwendung vereinfachen (Zimmermann 2013). Die kardiale Reifung sowohl im nativem als auch im künstlichen Herzgewebe setzt sich aus folgenden unterschiedlichen Aspekten zusammen: (1) Strukturell betrachtet bestimmen die Ausbildung von Sarkomeren, die Mitochondrienverteilung, die T-Tubulusentwicklung (Bian et al. 2014b) und die Muskelstrangausrichtung den Reifestatus des Gewebes (Liaw und Zimmermann 2016; Tiburcy et al. 2011). (2) Funktionell sind die Kontraktionskraft, die elektrische Weiterleitung, die Abhängigkeit von extrazellulärem Calcium und das Antwortverhalten auf pharmakologische Interventionen bedeutend (Liaw und Zimmermann 2016). Zudem werden (3) die metabolischen und (4) molekularen Eigenschaften betrachtet. Bei letzterem ist hierzu ein charakteristischer Wechsel der Genexpression von fetalen zu adulten Isoformen der Transkription zu beobachten (Liaw und Zimmermann 2016).

Eine Form der biophysikalischen Stimulation und somit ein Schlüssel für die funktionelle und morphologische Formierung der Gewebe ist die mechanische Stimulation, die in der Gewebeherstellung auf unterschiedliche Weise (isometrisch, isotonisch, auxoton) eingesetzt werden kann (Liaw und Zimmermann 2016; Zimmermann et al. 2006b). Das Herz zeigt einen typischen auxotonen Kontraktionszyklus mit Phasen der isometrischen und isotonen Kontraktion sowie Relaxation unter variablen Vor- (diastolischer Kammerfüllungsdruck) und Nachlast (während der Systole überkommbarer systemischer Blutdruck). Durch den gezielten Einsatz der mechanischen Stimulation, zum Beispiel über den Einsatz einer gerichteten Vorspannung, kann sowohl in statischer als auch zyklischer Form eine Variation der Zellausrichtung und daher auch der Kraftausrichtung ermöglicht werden und zudem die DNA-Synthese und Hypertrophie kardialer Gewebe induziert werden (Eschenhagen et al. 2006; Fink et al. 2000; Zimmermann et al. 2000; Zimmermann et al. 2006b).

Weitere typische biophysikalische Eigenschaft des Herzens sind der Frank-Starling Mechanismus (Kraft-Längen-Beziehung) und das Bowditch-Phänomen (Kraft-Frequenz-Beziehung). In besonderem Maße für die Bewertung der Reife von Herzmuskelgewebe relevant ist das Bowditch-Phänomen (Zimmermann et al. 2000, Godier-Furnemont et al. 2015, Tiburcy et al. 2017). Mechanistisch wird dabei die Zunahme der Kontraktionskraft durch eine erhöhte Calcium-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum bei zunehmender Kontraktionsfrequenz angenommen (Bers 2002). Hieraus wurde geschlossen, dass eine gezielte elektrische Stimulation die funktionelle und morphologische Entwicklung der Gewebe verbessern kann (Radisic et al. 2004). Während die Arbeitsgruppen um Radisic und Vunjak-Novakovic elektrische Stimulation von bis zu 10 Hz nutzt (Tandon et al. 2009), konnten andere Arbeitsgruppen eine Förderung der Kontraktilität in künstlichem Herzgewebe der Ratte bis zu einer Frequenz von 2 – 3 Hz bestätigen (Godier-Furnémont et al. 2015). Dabei zeigte sich erstmalig, dass elektrisch stimuliertes Herzgewebe aus primären Rattenzellen eine positive Kraft-Frequenz-Beziehung im Sinne eines natürlichen Bowditch-Phänomens entwickeln kann. Im Menschen entwickelt sich das Bowditch-Phänomen erst postnatal (Wiegerinck et al. 2009). In künstlichem Herzgewebe aus menschlichen pluripotenten Stammzellen entwickelt sich allerdings auch ohne elektrische Stimulation eine positive Kraft-Frequenz-Beziehung, was auf einen fortgeschrittenen postnatalen Reifegrad in EHM hinweist (Tiburcy et al. 2017).

Für eine optimale elektromechanische Funktion von künstlichen Herzgeweben ist auch die elektrische Integration der Herzmuskelzellen von großer Bedeutung. Eine koordinierte kardiale Kontraktion ist abhängig, zum einen von einer schnellen elektrischen Weiterleitung, aber zum anderen auch von der Präsenz einer reifen elektrischen Kopplung einschließlich einem gut ausgebildeten T-Tubulussystem (Bian et al. 2014b). Unter anderem die Reinheit der hinzugefügten Kardiomyozyten determiniert hierbei womöglich die elektromechanischen Eigenschaften von künstlichen Geweben. So konnte demonstriert werden, dass die Ausbreitungsgeschwindigkeit in kardialen Geweben mit der Reinheit an Kardiomyozyten ansteigt (25,1 cm/s in Geweben mit einem 90-prozentigen Anteil an Kardiomyozyten). Dieser Effekt korrelierte jedoch nicht mit der Kontraktionskraft der Gewebe (Zhang et al. 2013). Die schnellste Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit, gemessen entlang kardialer Fibrillen, entsprach einem Wert von  $36,1 \pm 7,5$  cm/s und war ähnlich der Ausbreitungsgeschwindigkeit im adulten Rattenherzgewebe (Bian et al. 2014b).

## 1.4 Aufgabenstellung

Die klassisch für die Arzneimitteltestung im Institut für Pharmakologie und Toxikologie hergestellten ringförmige EHM (Tiburcy et al. 2011, Tiburcy et al. 2017) besitzen herzmuskeltypische Eigenschaften, sind aber aufgrund ihrer geringen Gewebemenge nicht ausreichend für eine Remuskularisierungstherapie im Menschen. Das Ziel dieser Arbeit war unter Anwendung und Modifikation der Erkenntnisse aus der Herstellung von EHM-Ringen eine effiziente Methode zur Herstellung von funktionellen humanen Herzgeweben für die klinische Anwendung als Herzpflaster zu etablieren.

Im Einzelnen sollten folgende Hypothesen überprüft werden

- 1) EHM kann in Form von kontraktilen Herzpflastern generiert werden.
- 2) EHM Herzpflaster können bis auf eine klinisch relevante Größe skaliert werden.
- Die funktionellen Eigenschaften der Herzpflaster können durch Anpassung der biophysikalischen Kulturbedingungen kontrolliert werden.

# 2. Materialien und Methoden

# 2.1 Herstellung der Engineered Heart Muscle (EHM)-

# Kulturschalen

Als Inkubationsgefäß in den ersten drei Tagen der Kultivierung der Herzgewebepflaster dienten Glaskulturschalen (Ø 6 cm) mit Deckel, die mit Polydimethylsiloxan-(PDMS)-Silikon (Sylgard 184, Dow Corning) ausgegossen wurden. Zur Formgebung der darin zu erstellenden Mulden wurden mit Hilfe des Connex350 (Stratasys) 3D-Druckers wabenförmige Formen mit einer Länge von 2,4 cm und einer Breite von 2,1 cm genutzt und das Silikon ungefähr 5 mm hoch um die Formen gegossen, sodass eine Gussform mit mind. 2 ml Fassungsvermögen entstand (Abbildung 1).

Für die Herstellung von EHM-Ringen wurden Schalen mit ringförmigen Gussformen benötigt. Hierfür wurden vier 1 mm dicke Silikonstäbe in die Schalen geklebt und nachdem diese mit Teflonzylindern versehen wurden, wurde ebenfalls 5 mm hoch Silikon in die Schalen gegossen. Die Teflonformen wurden durch Silikonschläuche ersetzt, wodurch vier ringförmige Mulden mit einem Innendurchmesser von 4 mm und einem Außendurchmesser von 10,6 mm entstanden, die ein Fassungsvermögen von ungefähr 450 µl besaßen (Soong et al. 2012).



Abbildung 1: Herstellung der Gewebepflaster Kulturschalen

(A) Aufblick auf wabenförmige Form (Abmessungen in mm). (B) Seitansicht der wabenfömigen Form (Formhöhe in mm). (C) Kulturschale mit gegossener, wabenförmiger Mulde in die der EHM Mastermix gegeben wird.

Nach Aushärten des Silikons wurden die Formen entfernt und beide Arten von Schalen vor der weiteren Verwendung in MilliQ Wasser ausgekocht und autoklaviert.

## 2.2 Herstellung und Eigenschaften der EHM-Stempel

Die EHM-Stempel, die dem Makroherzgewebe während der Kultivierung als Halteapparat und mechanischer Stimulus dienten, wurden im 3D-Design-Programm Creo 2.0 Parametric (PTC) konfiguriert. Die vorgefertigten Skizzen wurden durch einen Connex350 (Stratasys) 3D-Drucker umgesetzt. Dabei wurden für die zwei Komponenten der Stempel (eine Grundplatte, 14 Stäbe) unterschiedliche Stoffe verwendet, die sich hinsichtlich ihrer Elastizität unterschieden und so den verschiedenen Ansprüchen an das Gerüst entsprachen. Die feste Grundplatte aus dem Polymer MED610, mit einem Durchmesser von 21,8 mm und einer Dicke von 1 mm besaß 14 flexible Stäbe aus dem Polymer TangoBlack, die hexagonal und in gleichem Abstand zueinander (Außendurchmesser 6 mm) angeordnet waren. Der Abstand wurde anhand der bereits etablierten auxotonen Aufhängung für EHM Ringe festgelegt (Tiburcy et al. 2014). Die einzelnen 1 cm langen, runden Stäbe verjüngten sich zur Spitze hin konisch (Basis 1,3 mm, Mitte 1,1 mm, Spitze 0,9 mm) (Abbildung 2).



#### Abbildung 2: Strukturzeichnungen des Basis-Stempels

(A) Ansicht des Stempels in 35 Grad gedreht zu allen drei Hauptachsen des Raumes. (B) Stempel in Aufsicht; Entfernung der äußeren Stäbe (Abmessungen in mm). (C) Stempel in Aufsicht; Entfernung zwischen den Stäben (Abmessungen in mm). (D) Stempel in Aufsicht; Dicke der Stäbe an Spitze (links dargestellt) und Basis (rechts). (E) Stempel in Seitansicht; mittlere Dicke und Länge der Stäbe (Abmessungen in mm).

Der gleiche Ansatz wurde für die Herstellung in Fläche skalierter Stempel verwendet und ist in Abbildung 3 dargestellt.



#### Abbildung 3: Dimensionen des skalierten Stempels

(A) Skalierter Stempel in 35 Grad gedreht zu allen drei Hauptachsen des Raumes.
(B) Stempel in Aufsicht; Angaben in mm. (C) Stempel in Seitansicht, d.h. zur Aufsicht um 90 Grad in y-Achse rotiert; Abmessungen in mm.

Beim Druckvorgang verwendetes Unterstützungsmaterial wurde mithilfe eines Balco *Powerblast Waterjets* (Stratasys) entfernt.

## 2.3 Desinfektion der Stempel

Die Stempel wurden zuerst in einem Becherglas mit 70-prozentigem Ethanol (EtOH) für 2 Minuten desinfiziert. Unter einer sterilen Werkbank wurden diese daraufhin mit einer autoklavierten Pinzette in eine sterile Box transferiert, um das restliche EtOH evaporieren zu lassen. Die verschlossene Box mit den Stempeln wurde danach zu einem *Plasma Cleaner* (Diener Electronic) transportiert. Die Box wurde in die Kammer des *Plasma Cleaners* gestellt, geöffnet und die Kammer verschlossen. Nach Herstellung eines Vakuums in der Kammer (maximaler Druck 0,5 mbar) wurde für 2 min ein Plasma in der Kammer aufgebaut, das die Stempel reinigte. Sofort nach dem Öffnen des *Plasma Cleaners* wurde die Box mit den gereinigten Stempeln verschlossen und unter die sterile Werkbank zur weiteren Verwendung gestellt.

#### 2.4 Herstellung der Makro-Herzgewebe

# 2.4.1 Differenzierung von Kardiomyozyten aus humanen pluripotenten Stammzellen

Zur Gewinnung von humanen Kardiomyozyten wurden embryonale Stammzellen der Linie HES2 mit stabiler Expression des Luciferase-Enzyms aus Photinus pyralis (hergestellt durch S. Schrepfer, UKE Hamburg) oder Expression von Tandem-Dimer Red-Fluorescent Protein (tdRFP) (Irion et al. 2007) sowie die Linie H7 (WiCell Institute) verwendet. Die Verwendung von embryonalen Stammzellen wurde durch das Robert-Koch-Institut genehmigt (Aktenzeichen 1710-79-1-4-16). Die Stammzellen wurden auf mitotisch inaktivierten humanen Feeder-Zellen (HFF-1) in Stammzellmedium (siehe 2.17.2) kultiviert. Zur Differenzierung wurden die pluripotenten Stammzellen zu 5 x  $10^4 - 1 x 10^5$  Zellen pro cm<sup>2</sup> auf Matrigel beschichteten Platten (1:30 Matrigel in PBS) ausplattiert und in Knock-Out DMEM, 20% Knock-out Serumersatz, 2 mmol/L Glutamin, 1% nicht-essenzielle Aminosäuren, 100 U/ml Penicillin, und 100 µg/ml Streptomycin (alle Thermo Fisher Scientific) 1:1 gemischt mit bestrahlten humanen Fibroblasten-Medium (kommerzielles Stammzellmedium) mit 10 ng/ml FGF-2 kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit RPMI gewaschen und daraufhin für 3 Tage mit RPMI, 2% B-27, 200 µmol/l Ascorbinsäure-2-Phosphat-Sesquimagnesiumsalzhydrat (Sigma Aldrich), 9 ng/ml Activin A (R&D Systems), 5 ng/ml BMP-4 (R&D Systems), 1 µmol/l CHIR99021 (Stemgent), und 5 ng/ml FGF-2 (Miltenyi Biotech) versetzt. Nach erneutem Waschen mit RPMI wurden die Zellen dann für 4 – 13 Tage mit 5 µmol/l IWP-4 (Stemgent) gefolgt von RPMI, 2% B-27, 200 µmol/l Ascorbinsäure kultiviert. Die als Kardiomyozyten erkennbaren Zellen wurden danach durch Glukosedeprivation metabolisch selektiert in RPMI ohne Glukose und Glutamin (Biological Industries), 2,2 mmol/l Natriumlaktat (Sigma Aldrich), 100 µmol/l β-Mercaptoethanol (Sigma Aldrich), 100 U/ml Penicillin, und 100 µg/ml Streptomycin. Die differenzierten Kardiomyozyten wurden ab der 4. Woche nach Ausplattierung zur weiteren Verarbeitung abgelöst.

#### 2.4.2 Gewinnung ausplattierter Kardiomyozyten

Zum Ablösen der Kardiomyozyten wurde das Kulturmedium entfernt. Um restliche Mediumrückstände zu entfernen, wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen. Abhängig von der Größe der Kulturflaschen wurde Accutase-Lösung zu den Zellen hinzugegeben (0,08 ml/cm<sup>2</sup>, 6 ml für eine T-75 Kulturflasche). Bei 20-25°C wurden die Zellen zuerst für 10 min und anschließend im Inkubator (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) für 5 min inkubiert, bis sich die Kardiomyozyten vom Flaschenboden lösten. Anschließend wurde das gleiche Volumen serumfreien Mediums (SF), das 5 µmol/l ROCK-Inhibitor beinhaltete und dem gleichen Volumen entsprach wie die zuvor hinzugefügte Accutase-Lösung, hinzugegeben. Dabei wurden die Zellen durch wiederholtes Pipettieren separiert. Die Zellsuspension wurde daraufhin in ein 50 ml Zentrifugationsgefäß zur weiteren Verarbeitung transferiert.

#### 2.4.3 Gewinnung ausplattierter Fibroblasten

Primäre neonatale Vorhautfibroblasten (ATCC, HFF-1, SCRC-1041) wurden in DMEM mit 4,5 g/l Glukose, 15% fetalem Kälber Serum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (alle von Thermo Fisher Scientific) expandiert. Typischerweise wurden Zellen der Passage 20 - 25 für die Versuche verwendet. Zum Ablösen ausplattierter Fibroblasten wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen mit TrypLE Enzym-Lösung gewaschen (0,04 ml/cm<sup>2</sup>, 6 ml für eine T-125 Kulturflasche). Mit dem gleichen Volumen an TrypLE Enzym-Lösung wurden die Zellen daraufhin für 2 min bei 37 °C inkubiert. Durch Hinzugabe des doppelten Volumens serumfreien Mediums (SF) wurde die enzymatische Reaktion gestoppt. Die Zellen wurden vom Flaschenboden gelöst, vereinzelt und die Zellsuspension zur weiteren Verarbeitung in ein frisches 50 ml Zentrifugationsgefäß überführt.

#### 2.4.4 Gewinnung gefrorener Zellen

Die in Gefriergefäßen befindlichen Zellen wurden aus dem -152°C Gefrierschrank entnommen und sofort in 37°C warmen Wasser für 3 min aufgetaut. Dann wurde die Zellsuspension unter sterilen Bedingungen in ein Reaktionsgefäß transferiert. Zum Waschen des Gefriergefäßes wurde je 1 ml serumfreies Medium (SF für Fibroblasten, SF mit 5 µmol/l ROCK-Inhibitor für Kardiomyozyten) genutzt und dieses danach ebenfalls in ein Reaktionsgefäß überführt.

## 2.4.5 Gießen der Gewebe

Die Zellzahl der verschiedenen Zellsuspensionen wurde mithilfe eines CASY *Cell Counter* (Roche) bestimmt. Die jeweils benötigte Zellzahl wurde in ein neues Zentrifugationsgefäß gegeben und bei 300xg, 4°C und für 5 min zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Die Zellen wurden dann in einem festgelegten Volumen an serumfreien EHM-Medium (EHMM + TGF- $\beta$ 1) resuspendiert (siehe Tabelle 1 unter Zellsuspension). Anschließend wurde ein *Mastermix* erstellt, bei dem zu beachten war, dass alle Pipettierschritte in der gleichen Reihenfolge geschahen und auf Eis durchgeführt wurden, um ein frühzeitiges Gelieren des Kollagens zu verhindern. Bovines Kollagen wurde mit 2 x RPMI, Natronlauge (0,1 N) und der Zellsuspension sorgfältig durch mehrmaliges Pipettieren vermischt (entspricht *Mastermix*, siehe Tabelle 1) und in die vorgefertigten Gussformen gegossen (siehe 2.1).

#### Tabelle 1: Mastermix für die unterschiedlichen EHM-Gewebe

Mastermix-Angaben jeweils für die Herstellung von **(A)** einem EHM-Gewebepflaster in der Größe von 1,5 x 1,7 cm oder parallel produzierten 4 EHM-Ringen bzw. **(B)** einem EHM-Gewebepflaster in der Größe von 3,5 x 4,25 cm, alle Angaben in  $\mu$ l.

Herzpflastergröße	(A) 1,5x1,7 cm	(B) 3,5x4,25 cm
Bovines Kollagen (6,4 mg/ml)	292	1168
2 x RPMI	292	1168
NaOH 0,1 N	55	212
Volumen Zellsuspension in EHMM+TGF-β1	1462	5848
Zellzahl gesamt (10^6)	10	40
Gesamtvolumen	2101	8404

Für die Herstellung von EHM-Gewebepflastern wurde mit einer sterilen Pinzette ein EHM-Stempel (siehe 2.2) auf den Stäben stehend mittig in die Form gesetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C und Kondensation des Hydrogels wurde die Schale mit serumfreien EHM-Medium (+TGF-β1) aufgefüllt und weiter inkubiert.





#### Abbildung 4: Kulturphasen der EHM-Gewebepflaster und -ringe

(A) Kulturschale mit Stempel in Seitansicht. (B) Kulturschale mit Stempel in Aufsicht. (C) EHM-Patch auf gedrehtem Stempel in Aufsicht ab Tag 3 der Kultivierung (Maßstab: 6 mm). (D) EHM-Ring in runden Gussformen (1.25x10<sup>6</sup> Zellen/EHM, 10% Fibroblasten; Maßstab: 10 mm). (E) EHM-Ring auf dynamischen Stäben zur mechanischen Stimulation (Maßstab: 1 mm).

Am ersten Tag nach der Herstellung der Gewebe wurde das Medium (EHMM + TGF-β1) gewechselt. Am dritten Tag wurde das Medium durch serumfreies EHM-Medium ohne TGF-β1 (EHMM) ersetzt und im Folgenden alle 2 Tage ein Mediumwechsel durchgeführt. Zusätzlich wurde am dritten Tag im Falle der EHM-Gewebepflaster mit einer sterilen Pinzette der Stempel samt Gewebe gedreht, sodass die Grundplatte des Stempels nun die Basis bildete. Parallel generierte EHM-Ringe wurden ebenfalls an Tag 3 auf EHM-Stempel transferiert, indem sie zwischen zwei benachbarte Stäbe der 14 Stäbe gespannt wurden. In beiden Fällen wurden die Stempel anschließend in eine Kultivierungsplatte gestellt und die Kammer um den Stempel mit EHMM-Medium ohne TGF-β1 aufgefüllt (Abbildung 4).

#### 2.5 Videobasierte Funktions- und Morphologieanalyse

Die Funktion und Morphologie der kultivierten Gewebe wurden über 2-minütige Video- bzw. Bild-Aufnahmen analysiert. Hierfür wurden über eine 8-bitmonochrome Kamera (Basler acA2000) mit einer 35 mm Linse (Kowa) bei 37°C 50 Bilder in der Sekunde in einem ungefähren Abstand von 45 cm zum aufzunehmenden Objekt erstellt und anschließend in ein Videoformat überführt. Es wurden einmal pro Kultivierungswoche Gegenlicht-Aufnahmen des spontan schlagenden Gewebes auf den EHM-Stempeln erstellt. Zum Ende der Kultivierung der Gewebe wurden diese zudem - von den EHM-Stempeln gelöst - im Gegenlicht aufgenommen. Das Gegenlicht ermöglichte eine klare Abgrenzung des Gewebes zur Umgebung bzw. von den Stempeln. Durch diesen starken Kontrast konnten kleinste Bewegungen der spontan kontrahierenden Makroherzgewebe festgehalten und analysiert werden. Zur Analyse der Bewegung und davon ausgehenden Einschätzung der Funktion wurde die kleinste gemessene Fläche durch die größte gemessene Fläche des kontrahierenden Gewebes geteilt und der entstandene Parameter als Fractional Area Change (FAC, Flächenverkürzungsfraktion) definiert. Über ein Matlab-Skript (MathWorks) (Abbildung 5; erstellt von Dr. Tim Meyer) konnte zusätzlich die Flächenveränderung über die Zeit dargestellt werden und anhand dieser die Rhythmisierung des Gewebes beurteilt werden. Zusätzlich wurde durch die Durchleuchtung des Gewebes eine Charakterisierung der Morphologie und ein erster Eindruck der Zellverteilung im Gewebe dargeboten, indem über das Bildanalyseprogramme Image J (https://imagej.nih.gov/ij/) die Grauwerte der aufgenommenen Gewebe gemessen und verglichen wurden. Außerdem wurden Aufnahmen vom Gewebe unabhängig vom Grundgerüst der Stempel angefertigt und die unterschiedliche Flächenverkürzungsfraktion gemessen.



Abbildung 5: Videobasierte Messung der Gewebepflasterfunktion Benutzeroberfläche des Matlab-Skripts zur Berechnung des *Fractional Area Change* (FAC).

## 2.6 Biolumineszenz-Messung (Bioluminescence Imaging, BLI)

Um die Verteilung der Zellen im Gewebepflaster beurteilen zu können, wurden Kardiomyozyten genutzt, die stabil Luciferase exprimierten. Dies ist ein Enzym, das unter Anwesenheit von Sauerstoff die Oxidation von Luciferin katalysiert. Bei Ablauf der Reaktion entsteht Energie, die in Form von Licht emittiert wird. Die Substratlösung hierfür wurde unter Lösen von 30 mg/ml Luciferin (D-Luciferin Ultra, Perkin Elmer) auf eine Konzentration von 1 mg/ml in PBS erstellt. Anschließend wurde das künstliche Herzgewebe in die Substratlösung gegeben. Die jeweilige Probe wurde mithilfe der IVIS Bioimaging Plattform (Perkin Elmer) aufgenommen und über die IVIS Living Image Software analysiert. Hierfür wurde die Lichtabstrahlung des Gewebes mit Luciferase-positiven (Luc+) Zellen in der Einheit Photonen pro Sekunde pro cm<sup>2</sup> pro Steradianten an verschiedenen Zeitpunkten nach Hinzugabe der Substratlösung (30 Aufnahmen, 1 Bild pro Minute) gemessen. Die Einheit des Steradianten berücksichtigte dabei die Dreidimensionalität eines in kugelförmigen Photons. Die (Photoder Regel Signalintensität nen/s/cm<sup>2</sup>/Steradiant) wurde hier als mittlere Leuchtstärke betitelt.

#### 2.7 Detektion von Aktionspotenzialen

Zur Aufzeichnung der elektrischen Erregung und der Erregungsausbreitung in künstlichen Makroherzgeweben wurden mithilfe von di-4-ANEPPS elektrische Potenzialveränderungen über die Zeit gemessen. Dies geschah in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Translationale Kardiologie (M. Dura und S. Lehnart). Die Gewebe wurden dafür zuerst 10 Minuten in Tyrode's Lösung (siehe 2.17.1; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5,5 mM D-glucose), die 5 µM Blebbistatin enthielt, inkubiert. Blebbistatin führt als Inhibitor der Myosin-ATPase Aktivität zur mechanischen Entkopplung und Inhibition der spontanen Kontraktionen im Gewebe. Dann wurde das Gewebe mit Tyrode's Lösung, die 5 µM Blebbistatin und 5 µM Di-4-ANEPPS aufwies, versehen, um ein Beladen des Gewebes mit Di-4-ANEPPS zu bewirken. Nach 15-minütiger Inkubation wurde mit Tyrodes Lösung mit 5 µM Blebbistatin gewaschen und mit der Aufnahme der Gewebe begonnen. Für die Aufnahmen wurde ein SciMedia MiCAM Ultima Kamerasystem (siehe 2.18) genutzt. Die Auswertungen erfolgten mithilfe eines Matlab-Skripts (MathWorks; Arakel et al. 2014).

#### 2.8 Ultraschall-gestützte Bildgebung der Herzgewebe

Mithilfe eines Ultraschallgeräts (Vevo 2100, Fujifilm Visualsonics Inc.), das für die Darstellung von Kleintierorganen ausgelegt ist, wurden fixierte und in PBS gelagerte EHM-Gewebepflaster als 2D-Projektion dargestellt. Anhand dieser Aufnahmen wurde die Zellverteilung und Zelldichte der Patches dargestellt. Zudem wurden die Querschnittsdurchmesser der Gewebe in verschiedenen Regionen ermittelt und die Volumina der Makroherzgewebe bestimmt.

#### 2.9 Triphenoltetrazoliumchlorid (TTC)-Färbung

Für die Differenzierung von Arealen mit toten und lebendigen Zellen wurden die Gewebe mit 2,3,5-Triphenoltetrazoliumchlorid (TTC) gefärbt. Zur Lösung des in Pulverform vorliegenden TTCs und Herstellung der Färbelösung wurden zwei Phosphatpuffer angelegt. Für den ersten Phosphatpuffer wurden dabei 1,42 g Dinatriumhydrophosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) in Aqua dest. gelöst und steril filtriert. Gleiches

geschah für den zweiten der beiden Phosphatpuffer mit einer Menge von 1,2 g Natriumdihydrophosphat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Für die Herstellung von 10 ml der Färbelösung wurde daraufhin 400 mg TTC in 7,74 ml des ersten Phosphatpuffers und 2,26 ml des zweiten Phosphatpuffers gelöst. Für die Färbung wurde daraufhin das lebende Gewebe in die Färbelösung gegeben und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach diesem Färbedurchgang wurde das Gewebe fixiert (siehe 2.10) und zur Auswertung aufgenommen. Die Auswertung der Färbung erfolgte im Hinblick auf die Zellverteilung im Gewebe mittels Fotoaufnahmen (Sony 5000 alpha, Systemkamera). Hierfür wurden Fotos aus unterschiedlichen Perspektiven von in PBS gelagerten Geweben erstellt.

#### 2.10 Fixierung der Gewebe

Das vorhandene Medium wurde entfernt und das Gewebe durch Hinzugabe von PBS gewaschen. Dann wurde das Gewebe mit 4-prozentiger Formaldehydlösung (pH 7,4, Roti Histofix) bei 20-25°C (EHM-Ringe: 2 Stunden; EHM-Gewebepflaster: 4 Stunden, bzw. 16-20 Stunden bei 4°C) fixiert. Nach Ablauf der Zeit wurde das Gewebe erneut gewaschen und in PBS bei 4°C für weitere Auswertungen gelagert.

#### 2.11 Dissoziation der Makro-Herzgewebe

Zur Evaluation der Zellzahl und Zellzusammensetzung in den Gewebepflastern und Ringen wurden diese dissoziiert. Hierfür wurden die Gewebe für eine Stunde bei 37°C in Kollagenase-Lösung (siehe 2.17.1 und 2.17.2) inkubiert (Gewebepflaster: 4 ml, Ringe: 1 ml). Diese Lösung wurde danach in ein Reaktionsgefäß transferiert (Gewebepflaster: 50 ml, Ringe: 15 ml), das Gewebe mit dem gleichen Volumen an PBS gewaschen und dieses ebenfalls in das Reaktionsgefäß gegeben. In wiederum dem gleichen Volumen Accutase-Lösung (siehe 2.17.2) wurde das Gewebe nun weiter für 30 min bei RT inkubiert. Durch wiederholtes Pipettieren wurden die Zellen des Gewebes weiter dissoziiert und in Lösung gebracht. Die entstandene Zelllösung wurde zum Reaktionsgefäß hinzugegeben, die Kulturschale mit PBS/5% FCS gewaschen und ebenfalls zum Reaktionsgefäß hinzugefügt. Nach Zentrifugation der Lösung für 5 min bei 300xg und 4°C wurde diese in 1 ml PBS/5% FCS auf Eis resuspendiert. Die Suspension wurde durch 70 µm feine Zellsiebe filtriert und mit dem CASY *Counter* die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 2.1.3).

#### 2.12 Immunhistochemische Anfärbung der Gewebe

Zur Darstellung der Ausrichtung und Verteilung der Zellen im künstlichen Herzgewebe wurden die Gewebe mit Phalloidin Alexa Fluor 488 und HOECHST-33342 gefärbt. Phalloidin 488 färbt die Aktinfilamente der Zellen, wohingegen HOECHST-33342 die DNA des Zellkerns anfärbt. Anhand der Aktinfilamente wird die Ausrichtung der Zellen sichtbar, die Verteilung der Zellkerne lässt auf die Verteilung der Zellen im Gewebe schließen und lässt zusätzlich eine Zuordnung von Zellkernen zu Aktinfilamenten zu. Nach Waschen der fixierten Gewebe mit PBS und Blocklösung wurde das Gewebe in Blocklösung mit Phalloidin 488 (1:60) und HOECHST-33342 (10 µg/ml) über Nacht bei 4°C inkubiert. Zuletzt wurde das Gewebe zweimalig mit PBS gewaschen und die Färbung mit Hilfe eines Makrokonfokal-Mikroskops (Leica TCS LSI) und der dazugehörigen Aufnahme- und Analyseprogramm für Makrokonfokalaufnahmen TTC LSI (Leica Mikrosysteme) ausgewertet.

# 2.13 Entwässerung des Gewebes und Erstellung von Paraffinschnitten

Zur Einbettung von Geweben in Paraffin wurde dieses zuerst durch eine Ethanolreihe entwässert. Dazu wurde das Gewebe nach Fixierung in 4-prozentiger Formaldehydlösung zunächst für 3 Tage bei 4°C in 70-prozentiger Ethanollösung (EtOH) inkubiert. Alle weiteren Schritte der Ethanolreihe wurden bei 20-25°C durchgeführt. Für jeweils 30 min wurde das Gewebe in 80-prozentiger und 90prozentiger EtOH-lösung transferiert. Das Gewebe wurde daraufhin für eine Stunde in 96-prozentigem EtOH inkubiert, die Lösung gewechselt und die Inkubation für eine weitere halbe Stunde fortgeführt. Dies wurde gleichermaßen mit 100prozentigem EtOH durchgeführt. In einer Lösung, die aus gleichen Anteilen an Toluol und 100-prozentigem

EtOH bestand, wurde das Gewebe weiter für 30 min inkubiert. Zuletzt wurde das Gewebe für jeweils 30 min mit Toluol versehen. Abschließend inkubierte das Gewebe über Nacht bei 65°C in flüssigem Paraffin und wurde dann bei 4°C in einer geeigneten Form ebenfalls über Nacht in Paraffin eingebettet.

Aus dem ausgehärteten Paraffinblock wurden mit einem Mikrotom (Leica RM 2125 RT) 7 µm dicke Schnitte erstellt, wobei zwischen den Schnittebenen eine Spanne von 70 µm eingehalten wurde. Die Schnitte wurden daraufhin in einem 37°C warmen Wasserbad gestreckt und auf Objektträger gezogen.

#### 2.14 Hämotoxylin-Eosin-Färbung

Zuerst wurden die Gewebeschnitte zweimal jemals für 15 min in Roti-Histol entwachst. Über eine absteigende EtOH-Reihe wurden diese daraufhin rehydriert. Dafür wurden die Gewebe in folgender Reihenfolge in folgenden Reagenzien für jeweils 5 min inkubiert: zweimal 100% EtOH, zweimal 96% EtOH, 80% EtOH, 70% EtOH, Aqua dest., PBS. Für die Färbung wurde das Gewebe zunächst für 8 min in Mayers Hämalaunlösung inkubiert, um anschließend kurz in Aqua dest. gespült zu werden. Nun wurden die Gewebe 10 min mit fließendem Leitungswasser zum Bläuen der Färbung umspült. Nach einem erneuten Spülen mit Aqua dest. für 2 min wurde daraufhin innerhalb von 3 min in Eosinlösung (0,1% Eosin G) die zweite Komponente der Färbung hinzugefügt. Ein letztes kurzes Spülen mit Aqua dest. schloss die Färbung ab. Für die darauffolgende Dehydration wurde das Gewebe nun für jeweils 20 Sekunden in einer aufsteigenden EtOH-Reihe in folgenden Reagenzien inkubiert: 70% EtOH, 80% EtOH, 96% EtOH, 100% EtOH, Xylol. Nach Trocknen der Gewebe auf einem Objektträger wurden diese mit Roti-Histokit II und einem Deckgläschen bedeckt.

#### 2.15 Kontraktionskraftmessung

Nach einer vierwöchigen Kultivierung auf den beschriebenen Stempeln wurde die Kraftentwicklung der EHM-Ringe, die parallel zu EHM-Patches hergestellt wurden, in einer Kontraktionsmessung evaluiert. Hierfür wurden die Ringe in einem Organbad (Föhr Medical Instruments) zwischen einem statischen Haken und einem dynamischen, durch ein Rad justierbaren Haken mit Kraftaufnehmer aufgespannt. Vor jedem Durchlauf wurden die Kraftmesser bei einer Auslenkung von 0 und 0,5 mN kalibriert. Die in dem temperierten (37°C) Organbad befestigten Ringe befanden sich während der Messung in der 2,0 mmol/L Kalzium enthaltenen Tyrode's Lösung (siehe 2.17.1), bei der durch Begasung mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) ein neutraler pH von 7,4 eingestellt wurde. Die Ringe wurden bei 200 mA mit einer Stimulationsfrequenz von 2,0 Hz im Feld elektrisch stimuliert. Die maximale Kontraktionskraft wurde nach Vordehnung auf Lmax mithilfe der *Software* BMON (Jäckel) bestimmt.

## 2.16 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte unter Gebrauch des arithmetischen Mittelwertes ± Standardabweichung vom Mittelwert (SEM). N entsprach der Anzahl an EHM-Geweben oder Einzelversuchen. Zur statistischen Auswertung wurde dabei die *Software* Prism 7 (GraphPad) genutzt. Auf Signifikanz getestet wurde mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 5% (P-Wert < 0,05).

## 2.17 Substanzen

#### 2.17.1 Chemikalien und Zellkultursubstanzen

Name	Hersteller
Accutase	Thermo Fisher Scientific, Massa-
	chusetts, USA
Activin A	R&D Systems, Minneapolis, USA
Aminosäuren, nicht-essentiell	Thermo Fisher Scientific, Massa-
	chusetts, USA
Aqua dest.	Braun, Melsungen
Ascorbinsäure-2-Phosphat-	Sigma Aldrich, Darmstadt
Sesquimagnesiumsalzhydrat	
B-27 ohne Insulin (50x)	Thermo Fisher Scientific, Massa-
	chusetts, USA
B-27 Supplement	Thermo Fisher Scientific, Massa-
	chusetts, USA
Blebbistatin	Biomol, Hamburg
BMP-4	R&D Systems, Minneapolis, USA
Bovines Kollagen I	LLC Collagen Solutions, UK

#### Tabelle 2: Chemikalien und Zellkultursubstanzen
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma Al	drich, D	armstadt	
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Carl Roth	n, Karlsr	uhe	
CASY Ton	OLS OM	NI Life S	Science, Bre	men
CHIR99021	Stemger	it, Glasg	ow, UK	
Di-4-ANEPPS	Thermo	Fisher	Scientific,	Massa-
	chusetts	, USA		
Dinatriumhydrophosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Carl Roth	n, Karlsr	uhe	
DNase I	Thermo	Fisher	Scientific,	Massa-
	chusetts	, USA		
Eosin-G-Lösung, 0,5% wässrig	Carl Roth	n, Karlsr	uhe	
Ethanol, vergällt 99%	Carl Roth	n, Karlsr	uhe	
Fetales Kälberserum (FCS, Fetal Calf Se-	Thermo	Fisher	Scientific,	Massa-
rum)	chusetts	, USA		
Fibroblast Growth Factor (hFGF), rekombi-	PeproTe	ch, Ham	burg	
nant human				
Glutamin	Thermo	Fisher	Scientific,	Massa-
	chusetts	, USA		
Hämalaun-Lösung	Thermo	Fisher	Scientific,	Massa-
	chusetts	, USA		
HOECHST 33342	Thermo	Fisher	Scientific,	Massa-
	chusetts	, USA		
Insulin Growth Factor (IGF-I), rekombinant	PeproTe	ch, Ham	burg	
human				
Iscoves Flüssigmedium, mit stabilem Glu-	Biochron	n, UK		
tamin				
IWP-4	Stemger	it, Glasg	ow, UK	
Kaliumchlorid (KCI)	Carl Roth	n, Karlsr	uhe	
Knock-out DMEM	Thermo	Fisher	Scientific,	Massa-
	chusetts	, USA		
Knock-out Serumersatz	Thermo	Fisher	Scientific,	Massa-
	chusetts	, USA		
Kollagenase Typ I	Sigma Al	drich, D	armstadt	
L-Ascorbinsäure	Merck, N	lew Jers	ey, USA	

L-Glutamin 200 mmol/L	Thermo Fisher Scientific, Massa-
	chusetts, USA
Luciferin (D-Luciferin Ultra)	Perkin Elmer, Massachusetts, USA
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe
Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Darmstadt
MEM-NEAA (Non-essential amino acids)	Thermo Fisher Scientific, Massa-
	chusetts, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrophosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck Milipore, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumlaktat	Sigma Aldrich, Darmstadt
Paraformaldehydlösung (PFA, HistoFix 4%)	Carl Roth, Karlsruhe
PBS, Phosphate Buffered Saline	Thermo Fisher Scientific, Massa-
	chusetts, USA
Penicillin-Streptomycin (P/S) 100x (10.000	Thermo Fisher Scientific, Massa-
U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin)	chusetts, USA
Phalloidin Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific, Massa-
	chusetts, USA
Roti-Histokit II	Carl Roth, Karlsruhe
ROCK-Inhibitor (Y27632)	Stemgent, Glasgow, UK
RPMI 1640, mit GlutaMAX, Phenol Rot,	Thermo Fisher Scientific, Massa-
ohne HEPES	chusetts, USA
RPMI ohne Glukose und Glutamin	Biological Industries, Beit HaEmek,
	Israel
Natrium-Pyruvat	Thermo Fisher Scientific, Massa-
	chusetts, USA
Toluol	Carl Roth, Karlsruhe
Transforming Growth Factor beta 1 (TGF-	PeproTech, Hamburg
β1), rekombinant human	
2,3,5-Triphenoltetrazoliumchlorid (TTC)	Merck, New Jersey, USA
Triton X-100	Sigma Aldrich, Darmstadt
TrypLE Express Enzyme (1x), ohne Phenol	Thermo Fisher Scientific, Massa-
Rot	chusetts, USA

Trypsin 2,5	5%			Thermo	Fisher	Scientific,	Massa-
				chusetts	, USA		
Tyrodes' L	ösung			Sigma A	ldrich, D	armstadt	
Vascular	Endothelial	Growth	Factor	PeproTe	ch, Ham	burg	
(VEGF <sub>165</sub> ),	, rekombinant h	numan					
Xylol				Carl Rot	h, Karlsr	uhe	

## 2.17.2 Zellkulturmedien und Puffer

Name	Anteil	Komponenten
Stammzellmedium		KO-DMEM
	20%	KO-Serumersatz
	2 mM	L-Glutamin
	1%	MEM-NEAA
	10 ng/ml	bFGF
Accutase-Lösung	97 ml	Accutase
	1 ml	Trypsin 2,5%
	2 ml	DNase I
Kollagenase-Lösung		PBS (mit CaCl <sub>2</sub> , MgCl <sub>2</sub> )
	0,2%	Kollagenase Typ I
	20%	FCS
SFBM		Iscoves Flüssigmedium
	1%	P/S
	1%	MEM-NEAA
	300 µM	L-Ascorbinsäure
EHMM (+TGF-β1)		SFBM
	4%	B27 minus Insulin
	100 ng/ml	IGF-I
	10 ng/ml	hFGF
	5 ng/ml	VEGF <sub>165</sub>
	(5 ng/ml	TGF-β1)

## Tabelle 3: Zellkulturmedien und Puffer

1,04 g	RPMI Pulver
10 ml	Aqua dest.
2 ml	10xRPMI
0,8 ml	B27 minus Insulin
0,2 ml	P/S
7 ml	Aqua dest.
Me-	RPMI 1640, mit GlutaMAX,
	Phenol Rot, ohne HEPES
1%	P/S
1%	Sodium-Pyruvat
200 µM	L-Ascorbinsäure
2%	B27 Supplement (+Insulin)
	PBS
5%	FCS
1%	BSA
0,5%	Triton X-100
1,42 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
100 ml	Aqua dest.
1,20 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
100 ml	Aqua dest.
7,74 ml	Phosphatpuffer I
2,26 ml	Phosphatpuffer II
0,4 g	TTC Pulver
	1,04 g 10 ml 2 ml 0,8 ml 0,2 ml 7 ml Me- 1% 200 µM 2% 5% 1% 0,5% 1,42 g 100 ml 1,20 g 100 ml 1,20 g 100 ml 7,74 ml 2,26 ml 0,4 g

## 2.17.3 Puffer für die Kontraktionsmessung

## Tabelle 4: Puffer für Kontraktionsmessung

Name	Anteil	Komponenten
Stamm-I-Lösung	175 g	NaCl
	10 g	KCI
	20 ml	2,25 mol/l CaCl <sub>2</sub>
	25 ml	1,05 mol/l MgCl <sub>2</sub>

	ad 1000 ml	Aqua dest.
Stamm-II-Lösung	50 g	NaHCO <sub>3</sub>
	ad 1000 ml	Aqua dest.
Stamm-III-Lösung	5,8 g	NaH2PO <sub>4</sub>
	ad 1000 ml	Aqua dest.
CaCl <sub>2</sub> -Stamm	165,57 g	CaCl <sub>2</sub> x 2 H2O
	500 ml	Aqua dest.
MgCl <sub>2</sub> -Stamm	106,83 g	MgCl <sub>2</sub> x 6 H2O
	500 ml	Aqua dest.
Tyrode 1,8 mmol/l Ca <sup>2+</sup>	200 ml	Stamm-I-Lösung
	190 ml	Stamm-II-Lösung
	50 ml	Stamm-III-Lösung
	5 g	Glukose
	500 mg	Ascorbinsäure
	ad 5000 ml	Aqua dest.

# 2.18 Hilfsmittel und Geräte

### Tabelle 5: Hilfsmittel und Geräte

Gerät	Тур
3D-Drucker	Objet Connex 300, Stratasys
Autoklave	VX-150, Systec
Binokular-Mikroskop	M80, Leica
Biolumineszenz-Bildgebung	IVIS Lumina III, Perkin Elmer
Durchlichtmikroskope	Primo Star, Primo Vert, Zeiss
High-speed Videosystem, 8-bit-	acA2000, Basler
monochrome Kamera,	
Kamera, Systemkamera	Alpha 5000, Sony
Kamera zur Aufzeichung der Erre-	Thermo-Scientific MiCAM Ultima Ka-
gungsausbreitung	mera, SciMedia
Kulturflaschen	T25, T75, T175, Nunc
Kulturschalen	Multischalen, 6-well, 12-well, 24-well,

	Nunc
Makro-Konfokal-Mikroskop	TCS LSI, Leica
Mikroskop, invers	Axio Vert.A1, Zeiss
Mikrotom, manuell rotierend	RM 2235, Leica
Objektträger	Super Frost Plus, Epredia
PDMS basiertes Polymer	Poly(dimethylsiloxane) High-
	Performance, Sigma Aldrich
Petrischalen	60x20 mm, 100x20 mm, 150x20 mm,
	Sigma Aldrich
Pipetten	1000 μL, 200 μL, 100 μL, 10 μL, Ep-
	pendorf
Pipettenspitzen	10 μL, 200 μL, 100 μL, 1000 μL, Ep-
	pendorf
Plasma Cleaner	Diener Electronic
Reaktionsgefäße, Zentrifugierröhrchen	15 ml, 50 ml, Falcon
Serologische Pipetten	1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml,
	Sarstedt
Sterile Arbeitsbank	Safe 2020, Thermo Scientific
Ultraschallgerät	Vevo 2100, Fuji Visualsonics Inc.
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5804 R, Eppendorf
Waage	Cubis Präzisionswaage, Sartorius
Zellfilter	70 μm, Sartorius
Zellkultur-Inkubator	Heratherm Brutschrank, Thermo-
	Scientific
Zellzähl- und Zellanalyse-Gerät	CASY Counter TTC, Roche
Weiterer Laborbedarf	Pipettierhilfen, Pasteurpipetten, Sprit-
	zen, Einweghandschuhe, usw.

# 3. Ergebnisse

Zunächst wurde basierend auf bestehenden Protokollen zur Herstellung von EHM-Ringen getestet, ob grundsätzlich flächige Gewebepflaster hergestellt werden können. Dafür wurde eine wabenförmige Gussform mit den Maßen 1,5 x 1,7 cm und einer Fläche von 1,7 cm<sup>2</sup> gewählt. Diese wurde mit einem Volumen von 2 ml Zellsuspension gefüllt, das dem Volumen zur Herstellung von 4 EHM-Ringen entspricht.

# 3.1 Bestimmung der optimalen Zellzahl

Zur Optimierung der flächigen Gewebebildung wurde zunächst ausgehend von der Zelldichte der EHM-Ringe die optimale Gesamtzellzahl zum Erreichen einer homogenen Gewebedichte ermittelt. Es wurden drei Zellzahlen in einem Volumen von 2 ml getestet. Bei konstanter Kollagenmenge entstanden unter Hinzugabe von 5 Millionen, 10 Millionen und 20 Millionen Kardiomyozyten (KM) nach einer Kondensation spontan kontrahierende Gewebe. Bezüglich der Reinheit der Kardiomyozyten wurde bei den verwendeten Differenzierungen anhand von FACS-Analysen im Median ein Wert von 80% (Interquartilbereich von 76 bis 83%) gemessen.



5 x 10<sup>6</sup> KM



10 x 10<sup>6</sup> KM



20 x 10<sup>6</sup> KM

### Abbildung 6: Titration der Gesamtzellzahl für EHM-Makrogewebe

Gegenlichtaufnahme von EHM-Gewebepflastern, die mit Zugabe der jeweils angegebenen Gesamtzellzahl von Kardiomyozytenkulturen (KM) hergestellt wurden. Gegenlichtaufnahme; Maßstab: 1 cm. Die Zellverteilung und Homogenität der Gewebe mit verschiedenen Zelldichten wurden optisch mittels Gegenlichtaufnahmen analysiert. Grauwertunterschiede wurden dabei als Zelldichteunterschiede interpretiert. Gewebepflaster mit 5 Mio. und 10 Mio. Zellen besaßen jeweils eine homogene Innenfläche mit zelldichter erscheinenden Außenrändern. In Geweben mit 20 Mio. KM hingegen konnte eine inhomogene, Strang-ähnliche Formierung der Zellen beobachtet werden (Abbildung 6).

Aus den optischen Messungen der Grauwerte der drei Gewebepflaster-Zellzahlen wurden Grauwertprofile erstellt (Abbildung 7). In allen drei Profilen konnten erhöhte Grauwerte an den Rändern der Gewebe gemessen werden, entsprechend einer lokalen Anreicherung der Zellen. Das Grauwertprofil von Geweben mit 5 Mio. und 10 Mio. Zellen war insgesamt homogener, wohingegen sich das Profil der Gewebe mit 20 Mio. Zellen als inhomogen darstellte. Die durchschnittlich höchsten mittleren Grauwerte konnten in Geweben mit 10 Mio. Zellen gemessen werden (10 x  $10^6$  KM:  $126 \pm 3$ , n = 3). In Gewebepflastern mit 20 Mio. Zellen wurden insgesamt die niedrigsten Grauwerte beobachtet ( $20 \times 10^6$  KM:  $82 \pm 5$ , n = 3). Bei Geweben mit 5 Mio. Zellen konnte ein Grauwert von  $98 \pm 3$  (n = 3) erhoben werden.



# Abbildung 7: Grauwertmessung von Gewebepflastern mit unterschiedlichen Kardiomyozytenzahlen

Grauwertprofile am Beispiel der Gewebepflaster; Linie über Geweben stellt Messebene dar; Mittelwerte für jeweiliges Grauwertprofil angegeben. Funktionell wurden die unterschiedlichen Gewebe anhand von Video-basierten Kontraktionskraftanalysen verglichen. Als Kontraktionskraftparameter diente die Flächenverkürzungsfraktion (*Fractional Area Change*, FAC) der Gewebe. Hierfür wurde die Veränderung der Fläche über die Zeit gemessen und die dabei beobachtete kleinste Fläche (maximale Kontraktion: Systole) durch die größte beobachtete Fläche des Gewebes (maximale Relaxation: Diastole) geteilt.

Die Flächenverkürzungsfraktion war nicht signifikant unterschiedlich zeigte aber tendenziell bei 10 Mio. KM eine weniger variable Verteilung der gemessenen Werte (Abbildung 8).



### Abbildung 8: Kontraktile Funktion der Gewebe mit unterschiedlichen Kardiomyozytenzahlen

Darstellung der Flächenverkürzungsfraktion (*Fractional Area Change*; FAC) von Gewebepflastern mit 5, 10 und 20 Mio. Gesamtzellzahl (Mittelwert ± SEM, n = 4), Messung mit Stempel.

Dann wurde getestet, ob die Messung der Biolumineszenz in Gewebepflastern, die aus Kardiomyozyten einer Stammzelllinie, die stabil Luciferase exprimiert, hergestellt wurden, Aussagen über die Zellkonzentration und -verteilung ermöglicht. Dafür wurden Gewebe mit 5 Mio. und 10 Mio. Kardiomyozyten miteinander verglichen (Abbildung 9). Als Kontrolle diente ein EHM-Gewebepflaster mit 10 Mio. Kardiomyozyten, die nicht das Gen für die Expression von Luciferase besaßen und somit keine Photonenemission nach Zugabe von Luciferin zeigten. In Geweben mit 10 Mio. Zellen konnte nicht nur eine höhere Photonenemission, sondern auch eine schnellere Erhöhung der Emission im Vergleich zum Gewebe mit 5 Mio. Zellen beobachtet werden (Abbildung 9A). In quantitativen Messungen konnte eine rund doppelt so hohe mittlere Leuchtstärke (mittlere Signalintensität der Photonenemission) in Geweben mit 10 Mio. Zellen als in Geweben mit 5 Mio. Zellen gemessen werden (Abbildung 9B; ROI: 5 x  $10^6$ KM: 9,086 x  $10^6$  p/s/cm<sup>2</sup>/sr, 10 x  $10^6$  KM: 1,758 x  $10^7$  p/s/cm<sup>2</sup>/sr, n = 1). Dies ist ein erster Hinweis, dass die Biolumineszenzmethode gut zur nicht-invasiven Quantifizierung der Kardiomyozytenzahl in Gewebepflastern geeignet ist.





(A) Vergleich der Photonenemission über die Zeit in Geweben mit unterschiedlichen Zellzahlen (5 oder 10 Mio. KM, Maßstab: 1 cm). (B) Vergleich der unterschiedlichen Gewebe mit Messung der Photonenemission nach zehn Minuten (Angabe in Photonen pro ausgewählte Region, Maßstab: 1 cm).

Zusammengefasst ergab sich für eine Zellzahl von 10 Mio. Zellen die homogenste Gewebebildung, so dass die weiteren Experimente mit dieser Eingangszellzahl durchgeführt wurden.

## 3.2 Bestimmung des optimalen Fibroblastenanteils

Ein großer Anteil an Nicht-Kardiomyozyten des Herzgewebes wird von Fibroblasten eingenommen, die auch die Stabilität und die Kontraktionskraft von künstlichem, funktionellem Herzgewebe mitbestimmen. Im nächsten Schritt wurde daher der optimale Anteil von Fibroblasten titriert. Basierend auf Vorarbeiten, die für EHM Ringe einen optimalen Fibroblastenanteil von 30% der Eingangszellzahl definiert haben (Tiburcy et al. 2017) wurden nun Gewebepflaster mit unterschiedlichen Fibroblastenkonzentrationen (0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 50% zugesetzte Fibroblasten) bei einer Gesamteingangszellzahl von 10 Mio. hergestellt. Die Reinheit der Kardiomyozyten ergab bei Messungen der unterschiedlichen, genutzten Differenzierungen im Median einen ungefähren Wert von 82% (Interquartilbereich: 77 bis 86%).

Am dritten Tag der Kultivierung konnten unterschiedliche Kompaktierungsstadien der Makroherzgewebe festgestellt werden. Gewebepflaster mit einem Anteil von 0 oder 5% hinzugegeben Fibroblasten ergaben durch geringere Kompaktierung weniger dicht erscheinende Gewebe als Pflaster mit 10% Fibroblasten. Gewebepflaster mit einem hinzugegebenen Fibroblastenanteil über 10% zeigten eine starke Kompaktierung. Zusammengefasst nahm demnach mit steigender Fibroblastenzahl auch der Kompaktierungsgrad der Gewebe zu. Allerdings war die Kompaktierung mit höheren Anteilen an Fibroblasten so ausgeprägt, dass es zum Zerreißen der Gewebe kam. Dies wird in der ersten Woche der Kultivierung in den durchgeführten Gegenlichtaufnahmen deutlich (Abbildung 10A/B).

Hinsichtlich der Kraftentwicklung konnten ebenfalls Unterschiede zwischen den verschiedenen Geweben gemessen werden. Die Messung der FAC zeigte eine Verteilung der Werte mit einem Optimum bei 10 - 15% zugesetzter Fibroblasten

(Abbildung 10C). Die geringste FAC wurde dabei bei einem Fibroblastenanteil von 50% gemessen (FAC: 1%; n = 1). In Gewebepflastern mit einem Anteil von 15% Fibroblasten wurde die größte FAC gemessen (FAC: 2,3%  $\pm$  0,8%; n = 5), darauf folgten Gewebe mit 10% (FAC: 2,2%  $\pm$  1,0%; n = 8), 5% (FAC: 1,9%; n = 1), 0% (FAC: 1,6%; n = 1), 20% (FAC: 1,5%  $\pm$  0,3%; n = 5) und 30% Fibroblastenanteil (FAC: 1,2%  $\pm$  0,3%; n = 4).



### Abbildung 10: Titrationsreihe von Fibroblasten in EHM-Gewebepflastern Vergleich von Geweben mit verschiedenen Fibroblastenanteilen anhand ihrer In-

taktheit, Kontraktionskraft, Zellzahl und Photoemission.

(A) Gegenlichtaufnahmen von Geweben mit unterschiedlichen Fibroblastenanteilen. (B) Vergleich unterschiedlicher Fibroblastenanteile bezüglich der Unversehrtheit der Gewebe. (C) FAC von Gewebepflastern mit den angegeben Fibroblastenanteilen (Mittelwert ± SEM, n auf jeweiligen Balken angegeben), alle Messungen mit Stempel. **(D)** Gesamt-Zellzahl lebender Zellen nach Dissoziation bei verschiedenen Fibroblastenanteilen (Mittelwert ± SEM, n auf jeweiligen Balken angegeben). **(E)** Mittlere Leuchtstärke unversehrter Gewebe bei verschiedenen Fibroblastenanteilen (Mittelwert ± SEM, n auf jeweiligen Balken angegeben).

Nach vierwöchiger Kultur wurde in Biolumineszenz-Messungen die Photonenemission der Luciferase exprimierenden Kardiomyozyten gemessen und somit indirekt der Anteil an Kardiomyozyten evaluiert. Hier konnte eine vergleichbare Emission an Photonen pro Sekunde pro Quadratzentimeter pro Steradianten bei einem Fibroblastenanteil von 10, 15 und 20% festgestellt werden. Ein deutlicher Abfall der mittleren Leuchtstärke zeigte sich in Geweben mit einem Anteil von 30% Fibroblasten (Abbildung 10E).

Zur direkten Bestimmung der Zellzahl wurden die Gewebe zusätzlich enzymatisch dissoziiert (Abbildung 10D). EHM-Gewebepflaster mit einem Fibroblastenanteil von 10% und 15% zeigten dabei die größte Zellzahl nach Dissoziation (10% Fibroblastenanteil:  $7,4 \pm 1,0 \times 10^6$  Zellen nach Dissoziation, n = 10; 15% Fibroblastenanteil:  $8,5 \pm 2,0 \times 10^6$ ; n = 3). Das heißt, dass ca. 70-85% der Eingangszellen wiedergefunden wurden. Für einen Fibroblastenanteil von 20% oder 30% konnten nach Verdau lediglich ungefähr die Hälfte der beim Gießen verwendeten Zellen gemessen werden.

In Zusammenschau der erhobenen Messergebnisse und Beobachtungen wurden Gewebe mit einer Gesamtzellzahl von 10x10<sup>6</sup> Zellen und einem Fibroblastenanteil von 10 % als optimale Mischung für die robuste Herstellung von Gewebepflastern definiert. Bei einer Reinheit der verwendeten Herzmuskelzellpopulation von ~80% sowie einen darin vorhandenen v.a. aus Fibroblasten bestehenden Nicht-Herzmuskelzellanteil ergibt sich bei Zugabe von 10% ein Gesamt-Fibroblastenanteil von etwa 30%.

## 3.3 Eigenschaften der künstlichen Makroherzgewebe

### 3.3.1 Dimensionen und struktureller Aufbau der EHM-Gewebepflaster

Die optimierten EHM-Gewebepflaster mit einer Gesamtzellzahl von 10 Mio. Zellen und einem Fibroblasten-Zusatz von 10% der Gesamtzellzahl besaßen eine Länge

von 1,7 cm und eine Breite von 1,5 cm. Aufgrund der Rautenform ergibt sich eine theoretische Gesamtfläche von 1,7 cm<sup>2</sup>. Nach Abzug der durch die Haltestäbe bedingten Löcher (0,1 cm<sup>2</sup>) ergab sich eine Gesamtgewebefläche von 1,6 cm<sup>2</sup>. Dies entsprach einen Anteil an nicht durch Gewebe eingenommen Bereich, der hier benannten Porosität des Gewebes, von 6,5% und einer intakten Fläche von 1,6 cm<sup>2</sup>. Die Gewebe wogen zudem im Durchschnitt 152 ± 19 mg (n = 28).

In den Vorversuchen wurde zudem deutlich, dass Biolumineszenzmessungen geeignet sind, um nicht-destruktiv Informationen über Zellzahl und Zellverteilung im Gewebe zu liefern. Hierbei zeigte sich in der etablierten Konfiguration ein zellreicherer Gewebesaum mit einem überwiegend homogenen Innenfeld (Abbildung 11A).



Abbildung 11: Horizontale und vertikale Zellverteilung eines EHM-Gewebepflasters mit 10-prozentigem Fibroblastenzusatz

(A) Farbkodierte Darstellung der Photoemission eines Luciferase-positive Kardiomyozyten enthaltenden Gewebes nach Zugabe von Luciferin. (B) Fotoaufnahmen eines EHM-Gewebes nach TTC-Färbung von beiden Seiten (Maßstab: 1 cm).

Durch eine Triphenoltetrazoliumchlorid (TTC)-Färbung konnte auch die vertikale Zellverteilung visualisiert werden. Metabolisch aktives Gewebe wurde dabei rot gefärbt, wohingegen metabolisch inaktives bzw. zellfreies Gewebe weiß blieb. Dabei zeigte sich, dass der Hauptteil Zellen horizontal homogen verteilt, vertikal jedoch auf der zum Zeitpunkt des Gießens der Schwerkraft hin gerichteten Seite konzentriert sind (Abbildung 11B). Das Absinken der Zellen in frisch gegossenen EHM ist abhängig von der verwendeten Kollagenqualität und kann durch eine Anpassung der Kollagenkonzentration kontrolliert werden.

Zur weiteren Darstellung des strukturellen Aufbaus der EHM-Gewebepflaster und der Zellausrichtung im Gewebe wurden die Aktinfilamente der Zellen durch Phalloidin 488 fluoreszenzgefärbt und die Färbung durch ein Makrokonfokal-Mikroskop aufgenommen. Die Aktinfärbungen demonstrierten eine homogene Verteilung der Zellen im Gewebe mit einem zelldichteren Randbereich und bestätigten somit die Ergebnisse der Biolumineszenz-Aufnahmen. Besonders im Randbereich und um die Stäbe herum zeigt sich eine verstärkte gerichtete Anordnung der Zellen (Abbildung 12).



### Abbildung 12: Dimensionen, Zellverteilung und Zellorganisation in EHM-Gewebepflastern.

Fluoreszenzfärbung von F-Aktin (Phalloidin 488) des gesamten Gewebes; 3D-Projektionen (gestrichelte Linien) von überlagerten Bildern, rotiert um 90 Grad in xoder y-Achse, aufgenommen mit Makrokonfokal-Mikroskop (Leica TCS LSI); Maßstab: 5 mm; Ausschnitt 1,2: 1 mm.

Durch 3D-Projektionen der Fluoreszenz-Aufnahmen konnte zusätzlich zur Verteilung und Ausrichtung der Zellen die Dicke der erstellten Gewebe bestimmt werden. Diese betrug im Mittel 500  $\pm$  100  $\mu$ m (n = 5). Unter Verwendung der mittleren Dicke von 500  $\mu$ m und der errechneten Fläche von 1,6 cm<sup>2</sup> nahmen die Gewebe demnach ein Volumen von 0,08 cm<sup>3</sup> ein.

#### 3.3.2 Rhythmisierung von EHM-Gewebepflastern

Während der vierwöchigen Kultivierung der EHM-Gewebepflaster konnte ein Übergang von ungeordneten, arrhythmischen zu koordinierten, rhythmischen Kontraktionen beobachtet werden.

Mit zunehmender Kultivierungsdauer wurde visuell eine Zunahme der synchronisierten, rhythmischen Kontraktion der Gewebe von 20% der Gewebe (1 von 5) in Woche 1 auf 100% der Gewebe (8 von 8) in Woche 3 (Abbildung 13A, 14B) beobachtet. Nachdem ein stabiler koordinierter Rhythmus erreicht war, wurden auch mit längerer Kulturdauer im Beobachtungsintervall von 6 Wochen keine unkoordinierten Kontraktionen mehr detektiert. Zusammen mit der Rhythmisierung stieg auch die Anzahl der auswertbaren Kontraktionen der EHM-Gewebe mit 10% Fibroblastenanteil (Abbildung 13B).





Interessanterweise entwickelte die Mehrheit der Gewebe (12 von 15 in Woche 3) mit 100% Kardiomyozyten (= 0% zugesetzte Fibroblasten) keine koordinierten Kontraktionen was für eine unterstützende Wirkung der Fibroblasten bei der Entwicklung eines elektrisch gekoppelten Synzytiums spricht (Abbildung 13A, Abbildung 14A, C). Dagegen zeigten 100% (21 von 21) der Gewebe mit 10% Fibroblasten rhythmische Kontraktionen in Woche 3 (Abbildung 14C). Damit einher ging eine durchschnittlich höhere FAC (FAC von Geweben mit 0% vs. 10% Fibroblastenanteil: 1,0%  $\pm$  0,2% vs. 1,9%  $\pm$  0,8% FAC) (Abbildung 14D).



# Abbildung 14: Vergleich der Rhythmisierung und Kontraktilität in Geweben mit und ohne Fibroblastenzusatz

(A) Gegenlichtaufnahme und FAC-Messung, Gewebe ohne Fibroblastenzusatz, Messungen mit Stempel. (B) Gegenlichtaufnahme und FAC-Messung, Gewebe mit 10-prozentigem Fibroblastenanteil, alle Messungen mit Stempel. (C) Vergleich der Rhythmisierung zwischen Geweben ohne (n = 15) und mit (n = 21) Fibroblastenanteil nach 3 Wochen Kultivierung (\*p<0,05 mit Chi-Quadrat Test), alle Messungen mit Stempel. (D) Vergleich der FAC-Werte von Geweben ohne und mit 10prozentigem Fibroblastenanteil, dargestellt ist der Mittelwert ± SEM (n = 10), alle Messungen mit Stempel.

Zusätzlich zur mechanischen Stimulation bestand die Annahme, dass auch die elektrische Stimulation den Reifeprozess des Gewebes unterstütze und zur Rhythmisierung der EHM-Gewebepflaster beitragen könnte. In einem *proof-ofprinciple*-Experiment wurden Gewebe bei gleichen Zell- und Medienbedingungen wie zuvor ohne weitere Stimulation kultiviert oder mit einer Dauer von 5 Millisekunden, einer Spannung von 5 Volt und einer mit den Tagen der Kultivierung absteigenden Frequenz (Senkung der Frequenz um 0,5 Hz nach rund 48 Stunden) elektrisch stimuliert (Abbildung 15). Begonnen wurde dabei bei einer Frequenz von 3 Hz.

In darauffolgenden FAC-Messungen unterschieden sich die Gewebe hinsichtlich der Synchronisierung und Rhythmik von Kontraktionen, wie auch bezüglich ihrer erreichten FAC-Werte. So konnte in Geweben ohne elektrische Stimulation in frühen Phasen der Kultivierung keine koordinierten Flächenveränderungen gemessen werden, wohingegen Gewebe nach elektrischer Stimulation und zweiwöchiger Kultivierungszeit synchronisierte und rhythmische Kontraktionen ausführten und dadurch höhere FAC-Werte erreichten.



Abbildung 15: Auswirkung elektrischer Stimulation auf EHM-Gewebepflasterfunktion

(A) Darstellung der FAC-Messung des abgebildeten Gewebes nach 12 Kultivierungstagen ohne elektrische Stimulation des Gewebes während der Kultivierung, gemessen auf Stempel (a) und ohne Stempel (b). (B) Darstellung der FAC-Messung des abgebildeten Gewebes nach 12 Kultivierungstagen mitelektrischer Stimulation (Dauer: 5 ms, Spannung: 5 V, Frequenz: wie oben angegeben) des Gewebes ab Tag 5 der Kultivierung, gemessen auf (a) und ohne Stempel (b).

Zusammenfassend konnten Parameter für die Herstellung von EHM-Gewebepflastern (Zelldichte, Kultivierungszeit, Fibroblastenanteil) definiert werden. In einem *proof-of-principle*-Experiment konnten Hinweise auf eine mögliche Beschleunigung der EHM-Rhythmisierung durch elektrische Stimulation erhoben werden.

#### 3.3.3 Entwicklung eines elektrischen Synzytiums in EHM-Gewebepflastern

Die Befunde der zeitabhängigen Rhythmisierung warfen die Frage auf, wie die elektrische Erregung der Patches abläuft. Dafür wurden die Patches mit einem spannungsabhängigen Farbstoff (di-4-ANNEPS) beladen, um die elektrische Erregung sichtbar zu machen.

Es konnte dabei in koordiniert schlagenden Patches eine gleichmäßige und stabile elektrische Erregungsausbreitung mit einer mittleren Ausbreitungsgeschwindigkeit von 22 ± 1 cm/s (n = 3) dokumentiert werden (Abbildung 16A). Die an verschiedenen Stellen gemessenen Aktionspotenziale zeigten homogen eine ventrikuläre Kurvenform der Ableitung (Abbildung 16B). Bei der Aufzeichnung mehrerer spontaner Kontraktionen konnte in einigen biologischen Replikaten, die eine koordinierte Kontraktion aufwiesen, zuerst die Bildung unterschiedlicher Aktionspotenziale aufgezeichnet werden und daraus folgend auch eine fehlende Ortspermanenz bezüglich des Erregungszentrums gesehen werden. Somit war der Beginn einer Erregung nicht immer im selben Randbereich befindlich, sondern wechselte nach jeder Erregungsausbreitung seine Lokalisation, die dennoch immer im Randbereich der Gewebe zu finden war (Abbildung 16C). Zur Verifizierung der homogenen elektrischen Kopplung wurden Gewebe über eine externe Elektrode lokal elektrisch stimuliert. Dies führte zur homogenen Erregungsausbreitung vom Punkt der Stimulation aus mit vorgegebener Stimulationsfrequenz (Abbildung 16D).



Abbildung 16: Elektrische Erregungsausbreitung in EHM-Gewebepflastern (A) Farbkodierte Messung der Aktivierungszeit eines spontan kontrahierenden Gewebes im Verlauf der Zeit (Zeitraum: 1 s) und als summiertes Bild zur Darstellung der Erregungsausbreitung. (B) Darstellung der optischen Aktionspotenziale an verschiedenen Punkten im Gewebe nach zwei spontanen Erregungen. (C) Aktivierungszeit (in ms) als summiertes Bild nach verschiedenen spontanen Erregungen. (D) Aufzeichnung der Aktionspotenziale und Erregungsausbreitung unter elektrischer Punktstimulation durch eine Elektrode im Zentrum des EHM-Gewebepflasters.

Zusammenfassend zeigte sich in allen gemessen Herzpflastern eine gerichtete Erregungsausbreitung und ein homogenes elektrische Synzytium. Spontane Erregungen hatten ihren Ursprung immer im Randbereich des Gewebes wobei diese Aktivierungszentren auch wechseln konnten.

# 3.4 Korrelation der Kraft von EHM-Ringen und EHM-

# Gewebepflastern

Parallel zu EHM-Gewebepflastern wurden unter gleichen Bedingungen Gewebe in Ringform produziert. Hierfür wurden runde Gussformen mit einem Innendurchmesser von 4 mm und einem Außendurchmesser von 10,6 mm genutzt. Zur gleichen Zeit wie das Drehen der Stempel samt Gewebe auf die Grundplatte wurden die Ringe zwischen zwei Stäbe der Gewebepflaster-Stempel gespannt. Nach einer vierwöchigen Kultivierungszeit wurde zum einen die FAC der Gewebepflaster durch die beschriebene videobasierte Funktionsanalyse bestimmt. Zum anderen wurde in der Organapparatur die maximale isometrische Kontraktionskraft der Ringe nach Dehnung bis zum Erreichen einer stabilen Kraftauslenkung gemessen. Die jeweilige FAC wurde mit der jeweiligen Kontraktionskraft verglichen (n = 10) (Abbildung 17).



# Abbildung 17: Korrelation der Kraft von EHM-Gewebepflaster und korrespondierenden EHM-Ringen

(A) Kontraktionskraft von EHM-Ringen korreliert mit der FAC von EHM-Gewebepflastern (einfache lineare Regression, n = 10). (B) Isometrische Kontraktionskraftmessung eines EHM-Rings unter elektrischer Stimulation im mit Tyrode's Lösung gefüllten Organbad (Frequenz: 2 Hz; 2 mM Ca<sup>2+</sup>-Konzentration; Maßstab: 3 mm).

Der Vergleich ergab, dass je größer die Flächenverkürzungsfraktion eines Gewebes war, desto stärker war auch die Kontraktionskraft der parallel produzierten EHM-Ringe. Es wurde demnach eine positive Korrelation der Kraft von EHM-Ringen und EHM-Gewebepflaster festgestellt.

# 3.5 Skalierung der EHM-Gewebepflaster für klinische Anwendung

### 3.5.1 Skalierung der Gewebefläche

Bei Berechnung der Größe der hergestellten Gewebepflaster wurde unter Berücksichtigung des durch die Stäbe des Stempels eingegrenzten Bereichs (1,5 x 1,7 cm) und ohne Beachtung der durch die Stäbe eingenommenen Regionen eine Fläche von 1,7 cm<sup>2</sup> ermittelt.

Für eine spätere klinische Anwendung der Makroherzgewebe sollte getestet werden, ob die Gewebe auch in größerer Form oder größerer Dicke hergestellt werden können. Zur Skalierung der EHM-Gewebepflaster auf größere Gewebeflächen wurden zuerst größere Silikongussformen erstellt, die das 4-fache Fassungsvermögen der zuvor genutzten Mulden besaßen (Abbildung 18).

Ebenfalls wurden die Stempel zur mechanischen Stimulation auf die vierfache Fläche vergrößert. Dies geschah, indem eine größere Anzahl an Stäben (58 Stäbe) auf einer vierfach größeren Grundplatte in Wabenform positioniert wurde (Abbildung 3 und 18). Die Grundform und Dimensionen der Stäbe wurden dabei nicht verändert im Vergleich zu den Stäben der zuvor erstellten Stempel.



Abbildung 18: Skalierung der Gussformen und Stempel
(A) Kleine Gussform und Stempel mit Dimensionsangaben in mm und Fläche (A).
(B) Skalierte Gussform und skalierter Stempel mit Dimensionsangaben in mm und Fläche (A).

Zur Herstellung der größeren Gewebe wurde das Volumen des Mastermix vervierfacht. Demnach bestand die Zellsuspension aus einer Gesamtzellzahl von 40 Millionen Zellen und einem Fibroblastenanteil von 10% (36 x 10<sup>6</sup> KMs und 4 x 10<sup>6</sup> HFFs). Alle weiteren Schritte für die Herstellung von Makroherzgeweben wurden beibehalten. Es entstanden kompakte und homogene Gewebe, die ein Gewicht von 900 ± 300 mg (n = 6) besaßen. Die Fläche dieser Gewebe erreichte unter Zuhilfenahme der durch die Stempel vorgegebenen Fläche und nach Abzug der durch die 58 Stäbe verursachten zelllosen Flächen einen Wert von 9,1 cm<sup>2</sup>. In Biolumineszenz-Messungen konnte wie bereits im kleineren EHM-Gewebeformat eine größere Emission im Randbereich der Gewebe gemessen Innerhalb der restlichen Gewebebereiche werden. der skalierten EHM-Gewebepflaster konnte eine für die Intaktheit des Gewebes suffiziente Verteilung erhoben werden. Es stellen sich zusätzlich inhomogen verteilte, zellfreien Bereiche dar, die teilweise parallel zu den Außenrändern der Gewebepflaster verlaufen (Abbildung 19).





(A) Gegenlichtaufnahme eines skalierten Gewebepflasters auf Stempel (Maßstab: 1 cm). (B) Gegenlichtaufnahme eines skalierten Gewebepflasters ohne Stempel (Maßstab: 1 cm). (C) Biolumineszenz-Messung eines 3,5 x 4,25 cm großen Gewebepflasters mit einem zusätzlichen Fibroblastenanteil von 10% (Maßstab: 1 cm).

Es wurde eine Porosität von ungefähr 5% berechnet. Anhand von Ultraschallmessungen wurde bei in Kulturmedium aufgenommen, nicht fixierten Geweben ein mittlerer Querschnittsdurchmesser von 2.040 ± 640 µm (n = 4) gemessen (Abbildung 20). Das daraus errechnete und durch das Archimedische Prinzip bestätigte Volumen entsprach einem Wert von ungefähr 1,8 cm<sup>3</sup>.



Abbildung 20: Ultraschallaufnahmen skalierter Gewebe für Messungen des Querschnittsdurchmessers im Rand- und Innenbereich Farbige Markierungen stellen Messebene und Querschnittsdurchmesser da.

Bei Messungen der Kontraktionskraft wurde eine geringere FAC im Vergleich zu der erreichten FAC der kleineren Gewebe beobachtet (mittlere FAC auf Stempel:  $0,4 \pm 0,1\%$ ; n = 6; mittlere FAC ohne Stempel:  $1,1 \pm 1\%$ ; n = 5) (Abbildung 21). Die Gewebepflaster kontrahierten spontan in Wellen (2 der 5 Gewebepflaster) oder arrhythmisch (3 der 5 Gewebepflaster) mit damit korrelierenden unterschiedlichen FAC-Messungen.





Zusammenfassend zeigt sich eine gute Skalierbarkeit der Gewebe unter Anwendung der zuvor festgelegten Zellzahlen und -Anteile. Ein kontrahierendes Gewebepflaster in für eine klinische Anwendung relevanter Größe und Dicke konnte hergestellt werden.

### 3.5.2 Generierung größerer Gewebedicken durch zweifaches Gießen

Für eine klinische Anwendung kann es ebenso relevant sein, Gewebe mit einem stärkeren Querschnittsdurchmesser zu erzeugen, um der defekten Herzwand eine möglichst große Stabilisation zur Verfügung zu stellen. Daher wurde als *proof-of-concept* versucht eine größere Gewebedicke durch einen zweiten Gießschritt um die bereits kompaktierten Gewebepflaster zu erreichen (Abbildung 22).



### Abbildung 22: Erhöhung der Gewebepflasterdicke.

Gegenlichtaufnahmen von Geweben mit (A) einmaligem und (B) zweimaligem Gießen eines Hydrogels mit 10 Millionen Zellen (Maßstab: 1 cm).

Nach einer vierwöchigen Kultivierung wurden Gegenlichtaufnahmen von beiden Geweben erstellt. Bei identischen Lichtverhältnissen konnten quantitativ im Mittel höhere Grauwerte (1-fach Hydrogel: 67,5, n = 1; 2-fach Hydrogel: 92,6, n = 1) bei homogener Verteilung in dem zweifach gegossenen Gewebepflaster festgestellt

werden (Abbildung 23), die für eine größere Dicke des zweifach gegossen Patches sprechen.



#### Abbildung 23: Grauwertmessung vom Gewebe mit einfachem und zweifachem Hydrogel

Grauwertprofile am Beispiel der Gewebepflaster; Linie über Geweben stellt Messebene dar; Mittelwerte für jeweiliges Grauwertprofil angegeben.

Nach Fluoreszenzfärbung mit 3D-Rekonstruktion wurde eine Dicke von 500 µm in dem einfach gegossenen Gewebe und eine Dicke von 800 µm in dem zweifach gegossenen Gewebe gemessen. Der Unterschied der Dicke wurde durch HE-Färbungen bestätigt. Hier zeigte sich ein 2-fach dickeres Gewebe im Paraffinschnitt, bei insgesamt deutlicher Schrumpfung der Gewebe nach Paraffineinbettung. Im Gegensatz zum einfach gegossen Gewebe konnten im zweifach gegossenen Gewebe klar zwei zelldichte Schichten voneinander angegrenzt werden. Hinweise auf vermehrte Zellnekrose gab es nicht (Abbildung 24). Funktionell waren beide Gewebe vergleichbar mit einer FAC von 0,7% (einfach gegossen) und 0,5% (zweifach gegossen).

Die Daten zeigen, dass eine Verstärkung der Pflaster durch mehrfaches Gießen möglich ist.



### Abbildung 24: Erhöhung der Dicke von EHM Makro-Gewebe

(A) Gewebe mit einmaliger Zugabe von zehn Millionen Zellen (90% KM/10% Fibroblasten) im Hydrogel, H.E.-Färbung von Paraffinschnitten; Linie stellt Schnittebene dar (Maßstäbe: Übersichtsbild - 500  $\mu$ m, Vergrößerungen - 50  $\mu$ m). (B) Gewebe mit zeitversetzter, zweimaliger Zugabe von 10 Millionen Zellen (90% KM/10% Fibroblasten) im Hydrogel, H.E.-Färbung von Paraffinschnitten; Linie

stellt ebenfalls Schnittebene dar (Maßstäbe: Übersichtsbild - 500 µm, Vergrößerungen - 50 µm).

# 3.6 Veränderung der kontraktilen Eigenschaften durch Modifikation des Stempeldesigns



Abbildung 25: Variation der Stabdicke und Aufbau eines Stempelgradienten Skizzen von EHM-Stempel; 35 Grad rotiert in allen drei Raumachsen; Aufsicht der Stempel mit Angaben in mm; Gegenlichtaufnahmen von Geweben mit Gradienten der Stabdicke (von klein zu groß). (A) Kein Gradient. (B) Vertikaler Gradient. (C) Horizontaler Gradient.

Nach Skalierung der Gewebepflasterfläche und -dicke wurde im letzten Schritt getestet, ob die lokale kontraktile Funktion der Gewebepflaster modifiziert werden kann. Dazu sollten die mechanische Beladung von Teilen der Gewebepflaster variiert werden. Das wurde durch unterschiedliche Stabdicken innerhalb eines Stempels erreicht, unter der Annahme, dass Stäbe mit größerem Durchmesser eine größere Kraftaufbringung vom Gewebe abverlangten.

Im zuvor verwendeten Stempeldesign kamen Stäbe zum Einsatz, die - gemessen an der Spitze der Stäbe - einen Durchmesser von 0,9 mm einnahmen. Im Folgenden wurden Stempel entworfen, dessen Stabdurchmesser an der Spitze von einer Größe von 0,7 mm aufsteigend bis 1,1 mm entlang der langen oder kurzen Seite variierten und so einen Größegradienten entweder entlang der horizontalen oder vertikalen Verlaufsrichtung bildeten (Abbildung 25). Die Stäbe behielten dabei eine konische Form.

Die verschiedenen Einflüsse wurden abermals anhand der Flächenveränderung als definiertem Kraftparameter verglichen. Dafür wurden sowohl die kompletten Gewebe ausgewertet als auch die Gewebe in verschiedene Hälften unterteilt (obere und untere Hälfte, rechte und linke Hälfte) und deren spezifische Flächenveränderung gemessen.





Vergleich der Gesamt-FAC sowie der FAC der oberen Hälfte (schwarzer Anteil) und der unteren Hälfte (grauer Anteil) von Gewebepflastern ohne Gradienten und mit vertikalem Gradienten; (n = 3).

Im Vergleich zu Geweben ohne Gradienten zeigten Gewebe unter Einfluss des vertikalen Gradienten eine größere Gesamt-Flächenverkürzungsfraktion (FAC: 8  $\pm$  4%; n = 3), deren überwiegender Anteil auf die FAC der oberen Hälfte des Gewebes zurückzuführen ist (Abbildung 26). Bei Kultur der Gewebe in einem horizontalen Gradienten zeigte sich hingegen kein deutlicher Unterschied der linken und rechten Gewebehälfte bei insgesamt geringerer Gesamt-FAC (FAC: 2%; n = 2). Dies zeigt als *proof-of-principle*, dass zumindest bei Anlage eines vertikalen Gradienten des Stabdurchmessers die Funktion der resultierenden Gewebe beeinflusst werden kann.

# 4. Diskussion

Als übergeordnete Hypothese wurde im Rahmen dieser Dissertation geprüft, dass durch Modifikation verschiedener biophysikalischer Parameter funktionelle humane Makroherzgewebe in klinisch relevanter Größe hergestellt werden können.

Folgende Hauptergebnisse wurden erzielt:

- Die Herstellung von funktionalem und intaktem Herzgewebe einschließlich einer horizontal homogenen Zellverteilung auf einer Fläche von 1,7 cm<sup>2</sup> kann mit einer Zellzahl von insgesamt 10 Millionen Zellen und einem zusätzlichen Fibroblastenanteil von 10% (Gesamtgehalt ~30% Fibroblasten) erzielt werden.
- Die Flächenverkürzungsfraktion (FAC: *Fractional Area Change*) ist geeignet die Funktion von Gewebepflaster optisch zu bestimmen.
- Die FAC korreliert mit der Kontraktionskraft parallel gemessener EHM-Ringe.
- Die Dauer der Kultivierungszeit zeigt eine Relevanz für die Ausbildung von homogenen und elektrisch aktiven, rhythmisch kontrahierenden Geweben.
- Die Biolumineszenz-Messung kann als nicht-destruktive Analysemethode f
  ür den Nachweis der Zellverteilung in Gewebepflastern genutzt werden.
- EHM-Gewebepflaster können durch Skalierung an den klinischen Bedarf angepasst werden.
- Durch wiederholte Gie
  ßvorg
  änge kann die Dicke der EHM-Gewebepflaster erh
  öht werden.
- Durch Variation der mechanischen Stimulation kann die Kraftentwicklung der Gewebepflaster lokal modifiziert werden.
- Durch externe elektrische Stimulation kann die Ausbildung eines funktionellen Synzytiums in EHM-Gewebepflaster unterstützt werden.

# 4.1 Die Herstellung von intaktem und funktionellem Herzgewebe

Im Rahmen des Entwicklungsprozesses wurden in dieser Arbeit zunächst die Gesamtzellzahl pro Gewebepflaster, der Fibroblastengehalt, das Design der Stempel, sowie danach die Größe und Dicke der Gewebepflaster variiert. Zur Annäherung an die Herstellung reifer und klinisch anwendbarer, humaner Makroherzgewebe wurde dafür die Bildung eines funktionellen Synzytiums im Format von 1,5 x 1,7 cm nach Anwendung des für EHM-Ringe etablierten Protokolls gezeigt (Tiburcy et al. 2017). Wie bereits für die Gewebe in Ringform wurde dabei ein Kollagen-Hydrogel als Gerüst für die Selbstorganisation der Zellen genutzt und ein serum-freies Medium verwendet (Naito et al. 2006; Tiburcy et al. 2014; Tiburcy et al. 2017).

Im Ringformat wurde bei einer totalen Zellzahl von einer halben Millionen Zellen pro Ring ein Fibroblastenanteil von 30% eingearbeitet, um dadurch ein funktionell schlagendes, kompaktiertes und homogenes Gewebe zu erhalten (Tiburcy et al. 2017). Im Format der wabenförmigen Makroherzgewebe wurde ein optimaler Fibroblastenanteil durch Zugabe von 10% Fibroblasten (HFF) erreicht. Der Fibroblastenanteil ist kritisch für die Kompaktierung von EHM (Schlick et al. 2019) und muss bei Geometrieänderungen sowie bei Anwendung unterschiedlicher Nicht-Myozyten-Spezies mit Fibroblastenfunktion individuell angepasst werden. Sowohl bei zu wenig (EHM bleiben zu weich) als auch bei zu viel (EHM reißen aufgrund zu starker Kompaktierung) Fibroblasten wird die strukturelle Integrität von EHM negativ beeinflusst. Diese wird dabei vor allem durch eine zu geringe Extrazellu-lärmatrixproduktion oder eine zu starke Fibroblastenkontraktion kontrolliert (Naito et al. 2006; Schlick et al. 2019; Tiburcy et al. 2011; Zimmermann et al. 2006a; Zimmermann et al. 2002).

Nach Dissoziation der EHM-Gewebepflaster mit einem zusätzlich 10- und 15prozentigen Fibroblastenanteils konnten im Mittel 74% und 85% der initial hinzugegebenen Zellen wiedergefunden werden. Je größer der Fibroblastenanteil dabei war, desto ausgeprägter war die Zellreduktion nach der Dissoziation. Bei Einsatz von 30% hinzugegebenen Fibroblasten wurde eine Abnahme der Zellzahl auf ca. 50% der ursprünglich hinzugegebenen Zellen beobachtet. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Werten aus EHM-Ringen (Tiburcy et al. 2017). Zu berücksichtigen ist jedoch, dass eine EHM-Dissoziation bei höherem Fibroblastenanteil durch die gesteigerte Kompaktierung erschwert ist und so der tatsächliche Zellanteil bei hohem Fibroblastenanteil vermutlich unterschätzt wird.

### 4.2 Die Messung der Funktionalität von EHM-Gewebepflastern

Zur Messung der Funktionalität und als aussagekräftiger Kontraktionskraftparameter konnte hier die Flächenverkürzungsfraktion (FAC: *Fractional Area Change*) etabliert werden. Die FAC wird in der Echokardiographie zusammen mit dem *Fractional Shortening* (FS) in der klinischen Anwendung zur Funktionsbeschreibung der links- und rechtsventrikulären Pumpfunktion genutzt (Dutta und Aronow 2017).

Eine größere Veränderung der Gewebefläche entsprach in dieser Arbeit einer stärkeren Auslenkung der Stäbe, die während der Kultivierung der Gewebe für eine mechanische Stimulation essenziell waren. Am Ende der Kultivierung wurde auch die Flächenverkürzungsfraktion der Gewebe ohne EHM-Stempel gemessen. Hier zeigen sich im Mittel größere FAC-Werte im Vergleich zu Geweben, die auf den EHM-Stempeln befindlich waren. Dies macht die Auswirkung der mechanischen Stimulation auf die Gewebe ersichtlich.

Größere FAC-Werte wurden somit auch als eine höhere Funktionalität des erstellten Gewebes definiert. EHM-Gewebepflaster mit einem zusätzlichen 10- und 15prozentigen Fibroblastenanteil entwickelten eine hohe Kontraktionskraft und konnten so bezüglich ihrer Funktionalität den größeren Vorteil aufweisen. Bei Geweben mit höherem Fibroblastenanteil nahm mit steigender Funktionalität die Integrität der Gewebe ab, sodass eine Abwägung zwischen strukturellen und funktionellen Reifekriterien unabdingbar erscheint.

Durch die Darstellung einer positiven Korrelation des FAC von Gewebepflastern mit der bereits zuvor etablierten Kontraktionskraftmessung von parallel hergestellten EHM-Ringen konnte nicht nur das FAC als geeigneter Parameter für die Messung der Funktionalität der EHM-Gewebepflaster verifiziert werden, sondern auch eine mögliche Methode zur unabhängigen Funktionalitätstestung der EHM-Gewebepflaster durch parallel hergestellte EHM-Ringe demonstriert werden.
# 4.3 Die Bedeutung von Kultivierungsdauer und elektrischer Stimulation

Die Dauer der Kultivierungszeit mit mindestens 3 Wochen und die Anwesenheit von Fibroblasten konnte nicht nur eine Relevanz bezüglich der Integrität und Funktionalität der Gewebe, sondern auch einen teils signifikanten Effekt auf die elektrische Aktivierung und Rhythmisierung der Gewebepflaster verdeutlichen.

Es zeigt sich, dass Gewebe mit rhythmischer Kontraktion in allen erstellten Formaten eine größere Kontraktionskraft und demnach höhere FAC-Werte erreichten. Zusätzlich zur Kontraktionskraftsteigerung wurden hierbei unter Anwesenheit von Fibroblasten im Gewebe mit hundertprozentiger Wahrscheinlichkeit synchrone und rhythmisch definierte Kontraktionen aufgezeichnet. Es wird daher vermutet, dass Gewebe mit Fibroblastenanteil früher eine gewisse Maturierung erlangen können (Naito et al. 2006). Ferner zeigte sich ein großer Einfluss der Kultivierungszeit auf die Reife der Gewebe (Naito et al. 2006; Tiburcy et al. 2011; Zimmermann et al. 2002), da mit steigender Kultivierungszeit auch Gewebe der Kontrollgruppe rhythmische Kontraktionen ausbildeten und im Allgemeinen eine Zunahme der Kontraktionskraft und Frequenz demonstriert werden konnte.

Bei künstlichem Makroherzgewebe, das während der Kultivierung elektrisch stimuliert wurde, konnten in einem *proof-of-concept*-Experiment Hinweise auf eine sich zeitlich früher einstellende synchrone Flächenveränderung des Gewebes im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Dies gibt Anhalt auf eine Unterstützung der Maturierung des Gewebes durch externe elektrische Stimulation und kann so auch Ergebnisse vorheriger Arbeiten stützen (Godier-Furnémont et al. 2015; Liaw und Zimmermann 2016; Radisic et al. 2004).

Mittels unterschiedlicher Methoden wurde das funktionelle Reifekriterium der Rhythmisierung der EHM-Gewebepflaster weiter untersucht. Nach Detektion der Erregungszentren und Erregungsausbreitung ging der Beginn jeder Erregung vom Geweberand aus. Mit einer durchschnittlichen Erregungsausbreitung von 22 ± 1 cm/s konnte dabei eine zu vorherigen Versuchen vergleichbare Geschwindigkeit dokumentiert werden (25,1 cm/s bei 90% Kardiomyozytenanteil in der Arbeit von Zhang et al. (Zhang et al. 2013)). Zudem wurde ein in einigen Geweben ein Lokalisationswechsel des Erregungsbeginns zwischen den spontanen Kontraktionen erfasst, der dennoch immer im Randbereich des Gewebes zu finden war. Es kann vermutet werden, dass die Gewebespannung bzw. die Etablierung der mechanischen Stimulation der Grund für die Ausbildung von Schrittmacherregionen sind. Vorgänge, die zu einer solchen Spezialisierung von Kardiomyozyten führen, müssten wie in anderen Ansätzen zum besseren Verständnis von Kontraktionsentstehung und –Entwicklung genauer untersucht werden (Protze et al. 2017).

Die Entstehung eines gut integrierten, funktionellen Synzytiums konnte durch elektrische Punkstimulation im Zentrum des Gewebepflasters bestätigt werden. Ebenso zeigte sich eine gleichmäßige Erregungsweiterleitung in die Peripherie. Für eine klinische Anwendung wäre eine Synchronisation der Gewebepflaster von Vorteil, da diese eine gerichtete elektrische Erregungsüberleitung im Herzen unterstützen würde und ein mögliches Arrhythmierisiko senken könnte.

#### 4.4 Zellverteilung und -ausrichtung im EHM-Gewebepflaster

Über TTC-Färbungen, Biolumineszenzaufnahmen und immunhistochemischen Färbungen konnte eine weitestgehend homogene Zellverteilung in EHM mit optimiertem Zellanteil veranschaulicht werden. Die Biolumineszenzaufnahmen dienten darüber hinaus der Quantifizierung von Zellzahlunterschieden im Gewebe. Für die Auswertung dieser Messungen wurde davon ausgegangen, dass die ermittelte, mittlere Leuchtstärke mit der Kardiomyozytenzellzahl des Gewebes zunimmt (Conradi et al. 2011). Durch die positive Korrelation von mittlerer Leuchtstärke zu Kardiomyozytenzellzahl beim Gießen der Gewebe bzw. zu der Zellzahl nach Dissoziation konnte diese Annahme bestätigt werden, sodass die Biolumineszenz-Messung als nicht-destruktive Analysemethode der Gewebepflasterzellverteilung genutzt werden kann. Im Vergleich zu den erhobenen Dissoziationsdaten kam es dennoch zu Abweichungen, da die gezeigten Dissoziationsdaten größere Streubereiche besaßen. Dies kann durch die anspruchsvollere technische Umsetzung der Dissoziation begründet sein, da es in mehreren Schritten der Dissoziation durch die mechanischen oder enzymatischen Einflüsse zum Absterben lebendiger Zellen oder der Möglichkeit keiner vollständigen Isolierung der Zellen kommen kann und so falsch niedrige Werte gemessen werden. Zur vollständigen Etablierung der Evaluation der Zellzahl durch Biolumineszenzmessungen und damit der Alternative zur Dissoziation wird eine höhere Stichprobenzahl benötigt. Nach Erreichen suffizienter Biolumineszenzdaten für den hier entwickelten Ansatz künstlichen Herzgewebes kann wie in bereits durch Riegler et al. durchgeführten Experimenten die Biolumineszenzmessung *ex vivo* und *in vivo* effizient zum Monitoring des Zellüberlebens genutzt werden (Riegler et al. 2014; Riegler et al. 2015).

Durch die Färbung der Aktinfilamente mittels immunhistochemischer Färbungen konnte darüber hinaus für die horizontal Fläche eine spezifische, zirkuläre Zell-Formierung und –Ausrichtung im Randbereich und im Bereich der Stäbe gezeigt werden. Diese wiesen eine große Ähnlichkeit zu bereits früher berichteten Zellausrichtungen unter mechanischer Stimulation zurück (Zimmermann et al. 2000; Zimmermann et al. 2006b). Durch die Veränderungen der Stabdurchmesser im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnten darüber hinaus Last-Gradienten etabliert werden, die zu der Ausbildung von EHM mit gerichteter Kontraktilität geführt haben. Ob eine geordnete Zellausrichtung für eine spätere klinische Anwendung von Vorteil ist, muss im Tierexperiment überprüft werden.

Über TTC-Färbungen erfolgte der Nachweis metabolisch aktiver Zellen. Die Zellanreicherung im TTC-Experiment am unteren Ende der EHM lässt vermuten, dass die Herzmuskelzellen in dem Kollagen-Hydrogel in Richtung der Erdgravität abgesunken sind. Dies steht im Wiederspruch zu der histomorphologisch nachgewiesenen gleichmäßigen Zellverteilung in anderen Experimenten dieser Promotionsarbeit. Ursächlich war vermutlich die Anwendung unterschiedlicher Kollagenchargen mit einer unterschiedlichen Kollagenqualität. Folgeuntersuchungen müssen klären, ob zum Beispiel Unterschiede in den Kollagen-intrinsischen Polymerisierungseigenschaften zu Unterschieden in der Zellverteilung bei gleicher Kollagenkonzentration führen können.

# 4.5 Die Skalierung der Größe und Dicke von EHM-

#### Gewebepflastern

Es konnten in dieser Arbeit künstliche Makroherzgewebe mit einer Größe von 4,2 x 3,5 cm hergestellt werden, die bezüglich ihrer Homogenität und Integrität die zuvor erlangten Beobachtungen in Teilen reproduzieren konnten. Mit Quer-

schnittsdurchmessern von ~2 mm wurde eine große Dicke der Gewebe demonstriert. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Messungen anhand nicht fixierter und in Medium befindlicher, d.h. feuchter EHM-Gewebepflaster durchgeführt wurde und womöglich eine geringere Kompaktierung der Gewebe aufgrund der wässrigen Umgebung vorlag. Im Gegensatz dazu zeigten EHM-Pflaster in der Makro-Konfokalen Rekonstruktion eine Dicke von ~500 µm und im Paraffinschnitt eine Dicke von ~100 µm. Diese Befunde deuten insgesamt auf einen hohen Wasseranteil in EHM Präparaten hin.

Im Hinblick auf Kontraktionskraft und Rhythmisierung waren große EHM Präparate scheinbar weniger optimal ausgebildet als kleinere EHM Präparate. Eine Verlängerung der Kulturdauer, optimierte mechanische Beladung und elektrische Stimulation sollen gegebenenfalls optimiert werden, um die kontraktilen Eigenschaften weiter zu verbessern.

In Vorarbeiten wurde sowohl für Fibroblasten als auch für Endothelzellen ein positiver Einfluss auf die Reife von künstlichen Herzgeweben beschrieben (Hirt et al. 2014; Liau 2013; Naito et al. 2006; Tiburcy et al. 2017). Damit einher geht auch die Frage nach einer Prävaskularisierung von Makroherzgeweben. Die in der Literatur geschilderten Ergebnisse demonstrieren eine fehlende Hypoxie in künstlichen Geweben ohne Prävaskularisierung und eine allgemeine Dickelimitierung der Gewebe auf 500 µm unabhängig der Vaskularisierung, sodass es augenscheinlich keine Notwendigkeit der Prävaskularisierung gibt (Soong et al. 2012; Stevens et al. 2009; Tiburcy und Zimmermann 2014; Tiburcy et al. 2011; Zimmermann et al. 2006a). In dem hier gezeigten Ansatz wurde eine Dicke von 500  $\pm$  100  $\mu$ m ohne Prävaskularisierung erreicht. EHM mit einer Dicke von 5 mm wurden bereits in früheren Arbeiten durch Gewebefusion ohne Prävaskularisierung hergestellt (Zimmermann et al. 2006b). Durch wiederholtes Gießen der EHM Formulierungen konnte im Rahmen dieser Arbeit eine neue Methode der EHM Schichtung erprobt werden. Mit einer Dicke von ~800 µm bei Anwendung von zwei Schichten ohne Hinweise auf vermehrten Zelltod könnte sich dieses Verfahren zur Herstellung dicker EHM eignen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zusammenfassend eine Methode zur skalierbaren Herstellung künstlicher Makroherzgewebe etabliert werden. Fragen bezüglich der Intaktheit der Gewebe, der Kraftentwicklung und -anpassung, der Rhythmisierung und Skalierung in Fläche und Dicke der Gewebe konnten bereits anfänglich beantwortet werden. Aufbauend auf diesen Untersuchungen könnte die Skalierung von EHM je nach klinischem Bedarf gelingen.

#### 4.6 Ausblick

Die Dringlichkeit einer Alternativtherapie zu der bisher durchgeführten konservativen Therapie bei chronischer Herzinsuffizienz bei zugleich Mangel an Spenderherzen für die Herztransplantation motivieren die Suche nach Verfahren für die Herstellung biologischer Herzersatzgewebe. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist - auch im Vergleich zu bereits vorher angewandten Ansätzen (Riegler et al. 2015; Zhang et al. 2013; Zimmermann et al. 2006a) – ein funktionell schlagendes, kompaktes und homogenes Gewebe zu erstellen, das darüber hinaus leicht im Hinblick auf dessen Fläche und Dicke zu skalieren war. Während die Bedeutung von Fibroblasten für die Herstellung von EHM bestätigt werden konnte, bleibt die Frage offen, ob zukünftig auch weitere Zellspezies sowie adaptierte biophysikalische Stimulationsverfahren Anwendung finden sollten, um optimierte Herzgewebe für die Herzreparatur herzustellen.

## 5. Zusammenfassung

Die Prognose der chronischen Herzinsuffizienz bleibt trotz optimaler Therapie ungünstig. Kardiales Tissue Engineering wird als ein vielversprechender Ansatz für die Herzreparatur angesehen. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob humane *Engineered Heart Muscle* (EHM) in Form von funktionellem Gewebepflastern hergestellt werden können. EHM-Gewebepflaster wurden unter Verwendung von Kardiomyozyten, die zuvor aus humanen pluripotenten Stammzellen differenziert wurden, und primären neonatalen Fibroblasten in einem Hydrogel aus Kollagen unter serumfreien Kulturbedingungen hergestellt. Eine mechanische Stimulation wurde mittels neu entwickelter Haltevorrichtungen (Stempel) erzielt. Es wurde eine optimale Funktionalität der Gewebe einschließlich einer homogenen Zellverteilung auf einer Fläche von 1,7 cm<sup>2</sup> mit einer Zellzahl von insgesamt 10 Millionen Zellen und einer zusätzlichen Fibroblastenzugabe von 10 % erzielt (Gesamtfibroblastenanteil ~30%).

Zur Messung der Funktionalität und als aussagekräftiger Kontraktionskraftparameter konnte die Flächenverkürzungsfraktion (FAC: Fractional Area Change) etabliert werden. Dabei zeigte sich eine positive Korrelation der FAC von Gewebepflastern mit der etablierten Kontraktionskraftmessung unter isometrischen Bedingungen in parallel hergestellten EHM-Ringen. Als eine weitere nicht-destruktive Analysemethoden der Gewebepflaster und hier vor allem der Zellkonzentration im EHM konnte zudem die Biolumineszenz-Messung bestätigt werden. Unter Anwendung und Variation des gewonnenen Wissens konnten ein Skalierungsprozess zur Herstellung von großen Herzpflastern (4,2 x 3,5 cm) mit 40 Millionen Herzzellen umgesetzt werden. EHM aus 40 Millionen Herzzellen gemäß des in dieser Promotion dargelegten Herstellungsverfahrens werden aktuell als kleinste EHM-Dosiseinheit BioVAT-HF-DZHK20 klinisch in der Studie erprobt.

#### 6. Literaturverzeichnis

- Bergmann O, Bhardwaj R D, Bernard S, Zdunek S, Barnabé-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz B A, Druid H, et al. (2009): Evidence for Cardiomyocyte Renewal in Humans. Science <u>324</u>, 98-102
- Bers D M (2002): Cardiac excitation-contraction coupling. Nature 415, 198-205
- Bian W, Jackman C P, Bursac N (2014a): Controlling the structural and functional anisotropy of engineered cardiac tissues. Biofabrication <u>6</u>, 024109-024109
- Bian W, Badie N, Himel Iv H D, Bursac N (2014b): Robust T-tubulation and maturation of cardiomyocytes using tissue-engineered epicardial mimetics. Biomaterials <u>35</u>, 3819-3828
- Bursac N, Papadaki M, Cohen R J, Schoen F J, Eisenberg S R, Carrier R, Vunjak-Novakovic G, Freed L E (1999): Cardiac muscle tissue engineering: toward an in vitro model for electrophysiological studies. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology <u>277</u>, H433-H444
- Conradi L, Pahrmann C, Schmidt S, Deuse T, Hansen A, Eder A, Reichenspurner
   H, Robbins R C, Eschenhagen T, Schrepfer S (2011): Bioluminescence
   Imaging for Assessment of Immune Responses Following Implantation of
   Engineered Heart Tissue (EHT). Journal of Visualized Experiments
- Destatis (2017): Staat & Gesellschaft Todesursachen Die 10 häufigsten Todesursachen - Statistisches Bundesamt (Destatis).
- Didié M, Christalla P, Rubart M, Muppala V, Döker S, Unsöld B, El-Armouche A, Rau T, Eschenhagen T, Schwoerer A P, et al. (2013): Parthenogenetic stem cells for tissue-engineered heart repair. J Clin Invest <u>123</u>, 1285-1298

- Drenckhahn D: Anatomie, Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen.: Band 2: Herz-Kreislauf-System, Lymphatisches System, Endokrine Drüsen, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut; 16. Auflage; Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München u.a. 2004
- Dutta T, Aronow W S (2017): Echocardiographic evaluation of the right ventricle: Clinical implications. Clin Cardiol
- Elmowafy E M, Tiboni M, Soliman M E (2019): Biocompatibility, biodegradation and biomedical applications of poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) micro and nanoparticles. Journal of Pharmaceutical Investigation <u>49</u>, 347-380
- Eschenhagen T, Zimmermann W H, Kléber A G (2006): Electrical Coupling of Cardiac Myocyte Cell Sheets to the Heart. Circulation Research <u>98</u>, 573-575
- Fink C, Ergün S, Kralisch D, Remmers U, Weil J, Eschenhagen T (2000): Chronic stretch of engineered heart tissue induces hypertrophy and functional improvement. FASEB J <u>14</u>, 669-679
- Godier-Furnémont A F G, Tiburcy M, Wagner E, Dewenter M, Lämmle S, El-Armouche A, Lehnart S E, Vunjak-Novakovic G, Zimmermann W H (2015):
  Physiologic force-frequency response in engineered heart muscle by electromechanical stimulation. Biomaterials <u>60</u>, 82-91
- Gómez M P, Pérez B, Manyalich M (2014): International Registry in Organ Donation and Transplantation--2013. Transplant Proc <u>46</u>, 1044-1048
- Hansen A, Eder A, Bönstrup M, Flato M, Mewe M, Schaaf S, Aksehirlioglu B, Schwörer A, Uebeler J, Eschenhagen T (2010): Development of a Drug Screening Platform Based on Engineered Heart Tissue. Circulation Research <u>107</u>, 35-44
- Hirt M N, Hansen A, Eschenhagen T (2014): Cardiac Tissue Engineering. Circulation Research <u>114</u>, 354-367

- Hoppe U C, Böhm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer H K, Osterspey A, Schmaltz A
  A, Erdmann E (2005): Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. ZS Kardiologie <u>94</u>, 488-509
- Hughes C S, Postovit L M, Lajoie G A (2010): Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. Proteomics <u>10</u>, 1886-1890
- Irion S, Luche H, Gadue P, Fehling H J, Kennedy M, Keller G (2007): Identification and targeting of the ROSA26 locus in human embryonic stem cells. Nat Biotechnol <u>25</u>, 1477-1482
- Khush K K, Potena L, Cherikh W S, Chambers D C, Harhay M O, Hayes D, Jr., Hsich E, Sadavarte A, Singh T P, Zuckermann A, et al. (2020): The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 37th adult heart transplantation report-2020; focus on deceased donor characteristics. J Heart Lung Transplant <u>39</u>, 1003-1015
- Kötter T, Bartel C, Schramm S, Lange P, Höfer E, Hänsel M, Waffenschmidt S, Waldt S E, Hoffmann-Eßer W, Rüther A, et al. (2013): Versorgung der chronischen Herzinsuffizienz eine systematische Leitliniensynopse im Rahmen der geplanten DMP-Aktualisierung. Zeitschrift für Evidenz, Fortbildung und Qualität im Gesundheitswesen <u>107</u>, 490-499
- Kowalski W J, Yuan F, Nakane T, Masumoto H, Dwenger M, Ye F, Tinney J P, Keller B B (2017): Quantification of Cardiomyocyte Alignment from Three-Dimensional (3D) Confocal Microscopy of Engineered Tissue. Microscopy and Microanalysis <u>23</u>, 826-842

Laflamme M A, Murry C E (2011): Heart regeneration. Nature <u>473</u>, 326-335

Liau B (2013): Role of Non-myocytes in Engineering of Highly Functional Pluripotent Stem Cell-derived Cardiac Tissues.

- Liaw N Y, Zimmermann W H (2016): Mechanical stimulation in the engineering of heart muscle. Advanced Drug Delivery Reviews <u>96</u>, 156-160
- Liu Y-W, Chen B, Yang X, Fugate J A, Kalucki F A, Futakuchi-Tsuchida A, Couture L, Vogel K W, Astley C A, Baldessari A, et al. (2018): Human ESC-Derived Cardiomyocytes Restore Function in Infarcted Hearts of Non-Human Primates. Nat Biotechnol <u>36</u>, 597-605
- McDonagh T A, Metra M, Adamo M, Gardner R S, Baumbach A, Böhm M, Burri H, Butler J, Čelutkienė J, Chioncel O, et al. (2021): 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. Eur Heart J <u>42</u>, 3599-3726
- Metra M, Teerlink J R (2017): Heart failure. The Lancet 390, 1981-1995
- Mosterd A, Hoes A W (2007): Clinical epidemiology of heart failure. Heart <u>93</u>, 1137-1146
- Naito H, Melnychenko I, Didié M, Schneiderbanger K, Schubert P, Rosenkranz S, Eschenhagen T, Zimmermann W H (2006): Optimizing Engineered Heart Tissue for Therapeutic Applications as Surrogate Heart Muscle. Circulation <u>114</u>, I-72-I-78
- Ott H C, Matthiesen T S, Goh S-K, Black L D, Kren S M, Netoff T I, Taylor D A (2008): Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. Nat Med <u>14</u>, 213-221
- Protze S I, Liu J, Nussinovitch U, Ohana L, Backx P H, Gepstein L, Keller G M (2017): Sinoatrial node cardiomyocytes derived from human pluripotent cells function as a biological pacemaker. Nat Biotechnol <u>35</u>, 56-68
- Radisic M, Park H, Shing H, Consi T, Schoen F J, Langer R, Freed L E, Vunjak-Novakovic G (2004): Functional assembly of engineered myocardium by

electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds. Proc Natl Acad Sci U S A <u>101</u>, 18129-18134

- Riegler J, Gillich A, Shen Q, Gold J D, Wu J C (2014): Cardiac Tissue Slice Transplantation as a Model to Assess Tissue-Engineered Graft Thickness, Survival, and Function. Circulation <u>130</u>, S77-S86
- Riegler J, Tiburcy M, Ebert A, Tzatzalos E, Raaz U, Abilez O J, Shen Q, Kooreman N G, Neofytou E, Chen V C, et al. (2015): Human Engineered Heart Muscles
  Engraft and Survive Long-Term in a Rodent Myocardial Infarction Model.
  Circulation research <u>117</u>, 720-730
- Sahli Costabal F, Choy J S, Sack K L, Guccione J M, Kassab G S, Kuhl E (2019): Multiscale characterization of heart failure. Acta Biomaterialia
- Schlick S F, Spreckelsen F, Tiburcy M, Iyer L M, Meyer T, Zelarayan L C, Luther S, Parlitz U, Zimmermann W H, Rehfeldt F (2019): Agonistic and antagonistic roles of fibroblasts and cardiomyocytes on viscoelastic stiffening of engineered human myocardium. Prog Biophys Mol Biol <u>144</u>, 51-60
- Schulte K, Borzikowsky C, Rahmel A, Kolibay F, Polze N, Fr‰nkel P, Mikle S, Alders B, Kunzendorf U, Feldkamp T (2018): Rückgang der Organspenden in Deutschland. Dtsch Arztebl International <u>115</u>, 463-468
- Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T, Wada Y, Ichimura H, Tanaka Y, Ogasawara T, Okada K, Shiba N, Sakamoto K, et al. (2016): Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. Nature <u>538</u>, 388-391
- Shimizu I, Minamino T (2016): Physiological and pathological cardiac hypertrophy. Journal of Molecular and Cellular Cardiology <u>97</u>, 245-262
- Shimizu T (2014): Cell Sheet-Based Tissue Engineering for Fabricating 3-Dimensional Heart Tissues. Circulation Journal <u>78</u>, 2594-2603

- Soong P L, Tiburcy M, Zimmermann W H: Cardiac Differentiation of Human Embryonic Stem Cells and their Assembly into Engineered Heart Muscle. Current Protocols in Cell Biology. John Wiley & Sons, Inc. 2012
- Stevens K R, Murry C E (2018): Human pluripotent stem cell-derived engineered tissues: clinical considerations. Cell Stem Cell <u>22</u>, 294-297
- Stevens K R, Kreutziger K L, Dupras S K, Korte F S, Regnier M, Muskheli V, Nourse M B, Bendixen K, Reinecke H, Murry C E (2009): Physiological function and transplantation of scaffold-free and vascularized human cardiac muscle tissue. Proc Natl Acad Sci U S A <u>106</u>, 16568-16573
- Tallquist M D, Molkentin J D (2017): Redefining the identity of cardiac fibroblasts. Nat Rev Cardiol <u>14</u>, 484-491
- Tandon N, Cannizzaro C, Chao P H, Maidhof R, Marsano A, Au H T, Radisic M, Vunjak-Novakovic G (2009): Electrical stimulation systems for cardiac tissue engineering. Nat Protoc <u>4</u>, 155-173
- Thompson S A, Copeland C R, Reich D H, Tung L (2011): Mechanical Coupling Between Myofibroblasts and Cardiomyocytes Slows Electrical Conduction in Fibrotic Cell Monolayers. Circulation <u>123</u>, 2083-2093
- Tiburcy M, Zimmermann W H (2014): Modeling myocardial growth and hypertrophy in engineered heart muscle. Trends in Cardiovascular Medicine <u>24</u>, 7-13
- Tiburcy M, Meyer T, Soong P L, Zimmermann W H: Collagen-Based Engineered Heart Muscle. Springer Science+Business Media New York 2014
- Tiburcy M, Didie M, Boy O, Christalla P, Doker S, Naito H, Karikkineth B C, El-Armouche A, Grimm M, Nose M, et al. (2011): Terminal Differentiation,

Advanced Organotypic Maturation, and Modeling of Hypertrophic Growth in Engineered Heart Tissue. Circulation Research 109, 1105-1114

- Tiburcy M, Hudson J E, Balfanz P, Schlick S F, Meyer T, Liao M L C, Levent E, Raad F, Zeidler S, Wingender E, et al. (2017): Defined Engineered Human Myocardium with Advanced Maturation for Applications in Heart Failure Modelling and Repair. Circulation, CIRCULATIONAHA.116.024145
- Vantler M, Karikkineth B C, Naito H, Tiburcy M, Didié M, Nose M, Rosenkranz S, Zimmermann W H (2010): PDGF-BB protects cardiomyocytes from apoptosis and improves contractile function of engineered heart tissue. J Mol Cell Cardiol <u>48</u>, 1316-1323
- Wiegerinck R F, Cojoc A, Zeidenweber C M, Ding G, Shen M, Joyner R W, Fernandez J D, Kanter K R, Kirshbom P M, Kogon B E, et al. (2009): Force Frequency Relationship of the Human Ventricle Increases During Early Postnatal Development. Pediatr Res <u>65</u>, 414-419
- Xiong Q, Ye L, Zhang P, Lepley M, Tian J, Li J, Zhang L, Swingen C, Vaughan J T, Kaufman D S, et al. (2013): Functional consequences of human induced pluripotent stem cell therapy: myocardial ATP turnover rate in the in vivo swine heart with postinfarction remodeling. Circulation <u>127</u>, 997-1008
- Ye L, Zimmermann W H, Garry D J, Zhang J (2013): Patching the Heart. Circulation Research <u>113</u>, 922-932
- Zhang D, Shadrin I Y, Lam J, Xian H-Q, Snodgrass H R, Bursac N (2013): Tissueengineered cardiac patch for advanced functional maturation of human ESCderived cardiomyocytes. Biomaterials <u>34</u>, 5813-5820
- Zimmermann W H (2013): Biomechanical regulation of in vitro cardiogenesis for tissue-engineered heart repair. Stem Cell Res Ther <u>4</u>, 137

- Zimmermann W H, Fink C, Kralisch D, Remmers U, Weil J, Eschenhagen T (2000): Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes. Biotechnol. Bioeng. <u>68</u>, 106-114
- Zimmermann W H, Didie M, Doker S, Melnychenko I, Naito H, Rogge C, Tiburcy M, Eschenhagen T (2006a): Heart muscle engineering: An update on cardiac muscle replacement therapy. Cardiovasc Res <u>71</u>, 419-429
- Zimmermann W H, Didié M, Wasmeier G H, Nixdorff U, Hess A, Melnychenko I, Boy O, Neuhuber W L, Weyand M, Eschenhagen T (2002): Cardiac Grafting of Engineered Heart Tissue in Syngenic Rats. Circulation <u>106</u>, I-151-I-157
- Zimmermann W H, Melnychenko I, Wasmeier G, Didié M, Naito H, Nixdorff U, Hess A, Budinsky L, Brune K, Michaelis B, et al. (2006b): Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. Nat Med <u>12</u>, 452-458

# 7. Veröffentlichungen

## Originalarbeiten

**Balfanz P** (2015): Die Entwicklung von kontrahierenden "Herzpflastern" zur Therapie der Herzinsuffizienz. Pressemitteilung: Abdruck frei nur mit Quellenhinweis "Pressetext DGK 04/2015". https://dgk.org/daten/Balfanz-Herzpflaster.pdf; Zugriff am 10.01.2020

Jebran AF, Tiburcy M, **Balfanz P**, Fujita B, Biermann D, Didie M, et al. Engineered Heart Muscle from Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes for Transmural Myocardial Repair. Thorac Cardiovasc Surg. 2016;64(S 01):OP262.

Tiburcy M, Hudson JE, **Balfanz P**, Schlick SF, Meyer T, Liao M-LC, Levent E, Raad F, Zeidler S, Wingender E, et al. (2017): Defined Engineered Human Myocardium with Advanced Maturation for Applications in Heart Failure Modelling and Repair. Circulation CIRCULATIONAHA.116.024145

Jebran AF, Tiburcy M, Biermann D, **Balfanz P**, Didié M, Karikkineth BC, Schöndube F, Kutschka I, Zimmermann WH (2022): Transmural myocardial repair with engineered heart muscle in a rat model of heterotopic heart transplantation - A proof-of-concept study. J Mol Cell Cardiol <u>168</u>, 3-12

## Kongressbeiträge

**Balfanz P**, Tiburcy M, Fujita B, Meyer T, Riegler J, Gold J, Wu JC, Zimmermann WH. Development of Human Heart Macro-Tissue for Cardiac Repair. *Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK)*. Berlin, Deutschland, 2015. Tiburcy M, **Balfanz P**, Meyer T, Fujita B, Schlick S, Golat B, Riegler J, Gold J, Wu JC, Zimmermann WH. Defined Engineered Human Myocardium for Heart Repair. *1. DZHK Konferenz für Translationale Medizin.* Berlin, Deutschland, 2017.

## Danksagung

Zuallererst möchte ich Prof. Dr. med. Wolfram Zimmermann danken, da er mir überhaupt erst die Möglichkeit zum Anfertigen der Dissertation in seinem Institut und Labor gegeben hat. Darüber hinaus bin ich sehr dankbar für das regelmäßige, sehr produktive Feedback zu meiner Arbeit und meinen Ergebnissen, sowie für das Vernetzen zu anderen Arbeitsgruppen samt ihren unterschiedlichen Methoden, durch die ich die Dissertation weiter vertiefen und voranbringen konnte.

Ganz besonderer Dank geht an Dr. med. Malte Tiburcy für seine stets kompetente, produktive, kollegiale und freundschaftliche Betreuung. Obwohl es mich teilweise vor ungeahnte Herausforderungen gestellt hat, bin ich ihm zu äußersten Dank verpflichtet, dass er mir sein Wissen über die unterschiedlichen Methoden in der Zellkultur und besonders im Tissue Engineering vermittelt hat. Früh hat er mich als ebenbürtigen Wissenschaftler behandelt und mich dadurch in meiner Motivation enorm gestärkt.

Auch alle weiteren Kollegen und Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von Dr. Tiburcy und allen anderen Arbeitsgruppen im Institut von Prof. Zimmermann haben mich stets mit einer großen Professionalität und Freundlichkeit in meiner Arbeit unterstützt, wofür ich sehr dankbar bin.