

Universitätsklinikum Ulm

Zentrum für Chirurgie

Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie

der Universität Ulm

(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Liebold)

**Verbesserung der Cardiac-Patch-Therapie
mittels Zellbesiedelung durch
laserinduzierten Vorwärtstransfer nach
Herzinfarkt an der Ratte**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Vorgelegt von Jun Liu

geboren in Guangzhou V.R.China

2018

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. A. Liebold

2. Berichterstatter: Prof. Dr. N. Ma

Tag der Promotion: 24.05.2019

Teile dieser Promotion sind 2011 veröffentlicht worden unter:

Gaebel R., Ma N., Liu J., Guan J., Koch L., Klopsch C., Gruene M., Toelk A., Wang W., Mark P., Wang F., Chichkov B., Li W., and Steinhoff G., *Patterning human stem cells and endothelial cells with laser printing for cardiac regeneration*. *Biomaterials*. 32(35): p. 9218-9230. 2011.

PMID: 21911255. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.071

Die Verwendung ist gemäß Autorenvertrag mit freundlicher Genehmigung und Copyright © 2011 Elsevier, für nicht kommerzielle Zwecke, gegeben.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung.....	5
1.1 Pathophysiologie des Myokardinfarkts.....	5
1.2 Therapie der Herzkrankheit und Herzinsuffizienz.....	5
1.3 Hintergrund und Technik.....	6
1.3.1 Pathophysiologische Hintergründe.....	6
1.3.2 Technologischer Hintergrund	8
1.3.3 Stand der Stammzellenforschung.....	9
1.4 Zielsetzung	11
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Zellgewinnung.....	13
2.1.1 Humane Endothelzellen aus der Nabelschnur (<i>Human umbilical vein endothelial cells</i> - HUVEC)	13
2.1.1.1 Isolierung von HUVEC	13
2.1.1.2 Kultivierung von HUVEC.....	13
2.1.2 Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC).....	14
2.1.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen (MNC) aus humanem Knochenmark ...	14
2.1.2.2 Kultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSC).....	15
2.1.3 Immunphänotypische Analyse mittels Durchflußzytometrie	15
2.2 LIFT-Technologie.....	16
2.2.1 Prinzip des Laserinduzierten Vorwärtstransfers (LIFT)	16
2.2.2 Herstellung der Zellsuspensionsschicht auf der Donor-Slide	17

2.2.3 Cardiac-Patch-Besiedlung	18
2.2.4 Zellbesiedlung nach acht Tagen <i>in vitro</i>	19
2.3 Tiermodell und <i>in vivo</i> Experimente	21
2.3.1 Experimentelle Grundlagen des Tiermodells	21
2.3.2 Vorbereitung und Durchführung der Operation.....	22
2.4 Hämodynamische Funktionsmessung.....	23
2.4.1 Katheterisierung und Aufnahme von Druck-Volumen-Kurven.....	23
2.4.2 Aufarbeitung der Rattenherzen nach Explantation.....	24
2.4.2.1 Zielbestimmung der funktionellen Perfusion mittels Tomato Lectin	24
2.4.2.2 Aufarbeitung der Rattenherzen.....	25
2.4.3 Histologische Untersuchungen.....	25
2.4.3.1 Bestimmung der Infarkt wanddicke	25
2.4.3.2 Fibrosebestimmung	27
2.4.3.3 Kapillardichtebestimmung	27
2.4.3.4 Identifikation humaner Zellen im Rattengewebe	28
3 Ergebnisse.....	30
3.1 Phänotypische Charakterisierung von HUVEC und hMSC	30
3.2 Zellbesiedlung <i>in vitro</i>	32
3.3 Herzfunktion acht Wochen nach Myokardinfarkt.....	34
3.4 Wanddickenbestimmung nach permanenter RIVA-Ligation	36
3.5 Fibrosebestimmung	38
3.6 Kapillardichtebestimmung	40
3.7 Zellinfiltration im PEUU-Cardiac-Patch	42

4 Diskussion	45
4.1 Intraoperative und postoperative Mortalität nach Myokardinfarkt..	45
4.2 Regionale Kontraktilität und Herzfunktion.....	46
4.3 Kapillardichte und Ursprung.....	47
4.4 Kritik der Methode	49
4.4.1 Operative Induktion des Myokardinfarkts/Herzinsuffizienz.....	49
4.4.2 Zellapplikationsmethode	50
4.5 Apoptose und Zellmigration.....	51
5 Zusammenfassung	52
6 Literaturverzeichnis	54
Anhang	V
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VIII
Danksagung	IX
Lebenslauf.....	XI

Abkürzungsverzeichnis

ASS	Acetylsalicylsäure
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BSA	Bovine Serum Albumin; Rinder Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
dPmax	Maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit
ECFC	Endothelial Colony Forming Cells
EF	Ejection Fraction
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	Et alteri, und andere (Mitarbeiter)
FACS	Durchflusszytometrie
FCF	freier Zahlungsmittelfluss
HEPES	N-(-2-Hydroxyethyl) -piperazin-N-ethansulfonsäure
Hg	Quecksilber
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
HPF	High Power Field
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
KHK	Koronare Herzerkrankung
KCl	Kochsalzlösung
LIFT	Laser Induced Forward Transfer
LIFT-Gruppe	Myokardinfarkt Gruppe mit <i>Cardiac-Patch</i> -Behandlung und geordneter Zellbesiedelung durch LIFT
mm	Millimeter
MI	Myokardinfarkt
MIC-Gruppe	Unbehandelte Myokardinfarkt Gruppe
MIP-Gruppe	Myokardinfarkt Gruppe mit <i>Cardiac-Patch</i> -Behandlung ohne Zellbesiedelung
MIX-Gruppe	Myokardinfarkt Gruppe mit <i>Cardiac-Patch</i> -Behandlung und ungeordneter Zellbesiedelung
MNC	Der mononukleären Zellen des Knochenmarks
MSC	Mesenchymal Stem Cells
MSCGM	Mesenchymal Stem Cells selektiven Expansionsmedium
PBS-	Phosphate Buffered Saline ohne Kalzium und Magnesium
PBS+	Phosphate Buffered Saline mit Kalzium und Magnesium
PDS	Polydioxanon
PECVD	Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition
PEUU	biodegradable polyester urethane urea
PCR	Polymerase Chain Reaction; Polymerase-Kettenreaktion

RNU-Ratte	Thymusaplastische Ratte
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reversed Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyd
RIVA	Ramus interventricularis anterior
s.c	Subkutan
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des arithmetischen Mittels
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vWF	von Willebrand-Faktor
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)
WM/F12	Waymouth's / Ham's F12 Nutrient Mixture
xM	arithmetisches Mittel

1 Einleitung

1.1 Pathophysiologie des Myokardinfarkts

Die koronare Herzerkrankung (KHK) gehört in den industrialisierten Ländern zu den häufigsten Ursachen einer Hospitalisierung und trägt in großem Ausmaß zur Morbidität und Mortalität bei [11]. 2011 starben in Deutschland etwa 60.000 Menschen an den Folgen eines akuten Myokardinfarktes (MI). Damit steht diese Erkrankung in der Statistik der Todesursachen in Deutschland an zweiter Stelle [6].

Die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren, welche die Entwicklung einer Arteriosklerose und damit eines Herzinfarkts begünstigen, sind arterielle Hypertonie, Hyperlipoproteinämie, *Diabetes mellitus*, familiäre Disposition, *Nikotinabusus* und *Adipositas* [31]. Der MI und die daraus resultierende Nekrosezone leiten eine postinfarzielle Entzündungsreaktion ein. Diese pathologischen, strukturellen Myokardumbauprozesse werden als Remodeling bezeichnet und von einem massiven Verlust des elastischen und kontraktiven Myokardgewebes begleitet. Die konsekutive Entwicklung einer Reparationsfibrose durch Aktivierung von Reparationsvorgängen [37, 42] bildet das Endstadium der Erkrankung. Trotz der restlichen hypertrophen Kardiomyozyten führt nach einem Herzinfarkt der Verlust an Myokard durch Druck- und Volumenbelastung anschließend zu einer zunehmenden Störung der biventrikulären Pumpfunktion. Am Ende dieser Entwicklung steht die chronische Herzinsuffizienz.

1.2 Therapie der Herzkrankheit und Herzinsuffizienz

Die medikamentöse Therapie zur Optimierung der Herzpumpfunktion umfasst Beta-Blocker, ACE-Hemmer, Diuretika, eine lebenslange prophylaktische Thrombozytenaggregationshemmung mittels ASS und eine Sekundärprophylaxe mit

lipidsenkenden und antiinflammatorischen Statinmedikationen zur Stabilisierung der atherosklerotischen Plaques. Grundsätzlich ist die medikamentöse Therapie eine symptomatische Behandlung bzw. Minimierung der kardiovaskulären Risikofaktoren [38]. Zur Wiederherstellung der Myokardperfusion im Infarktbereich können entweder interventionelle (Ballondilatation oder Stentimplantation durch eine perkutane koronare Intervention) oder operative Myokardrevaskularisation (durch aortokoronare Bypassoperation) angewandt werden. Im Endstadium einer koronaren Herzkrankheit mit dilatativer Kardiomyopathie besteht das Risiko eines plötzlichen Herztods mit ventrikulärer Tachykardie. Gegebenenfalls ist die primäre prophylaktische Implantation des implantierbaren Kardioverter-Defibrillators notwendig. Als *ultima ratio* wird eine Herztransplantation vorgenommen.

1.3 Hintergrund und Technik

1.3.1 Pathophysiologische Hintergründe

Bei einem Herzinfarkt entsteht ein hypoxisches Gewebeareal, in die zusätzlichen Entzündungszellen rekrutiert werden. Diese aggressiven Zellen verändern zum einen das gesamte Milieu einschließlich des pH-Werts und damit die Funktion aller Funktions- bzw. Strukturproteine. Zum anderen räumen sie auch das geschädigte Gewebe ab und induzieren die Bildung von Narbengewebe. Unbehandelt führt dies zu schweren Folgeschäden, wie Herzrhythmusstörungen, Kontraktilitäts- und Elastizitätsverlusten und möglicherweise Dilatation und Herzversagen [30].

Während der letzten Jahre wurden zahlreiche Studien zur Erforschung der Potenz von Stammzellen durchgeführt. Dabei wurde in erster Linie hypoxisches Gewebe untersucht und durch den Einsatz von Stammzellen versucht, ein Absterben der Zellen zu verhindern bzw. die Regeneration des abgestorbenen Gewebes zu fördern. Eine Möglichkeit ist die direkte intramyokardiale Injektion von Stammzellen, wobei diese jedoch lediglich in den Infarkttrandbereich appliziert werden können. Es ist möglich

durch Verwendung von *Cardiac Patches* [14] den Infarktbereich durch eine künstliche Matrix zu stabilisieren, wobei das Polymergerüst als Wiederbesiedelungssubstrat dient. Fujimoto *et al.* [13] konnten so eine Verbesserung der Herzfunktion und des kardialen Remodelings in Ratten zeigen (Abbildung 1).

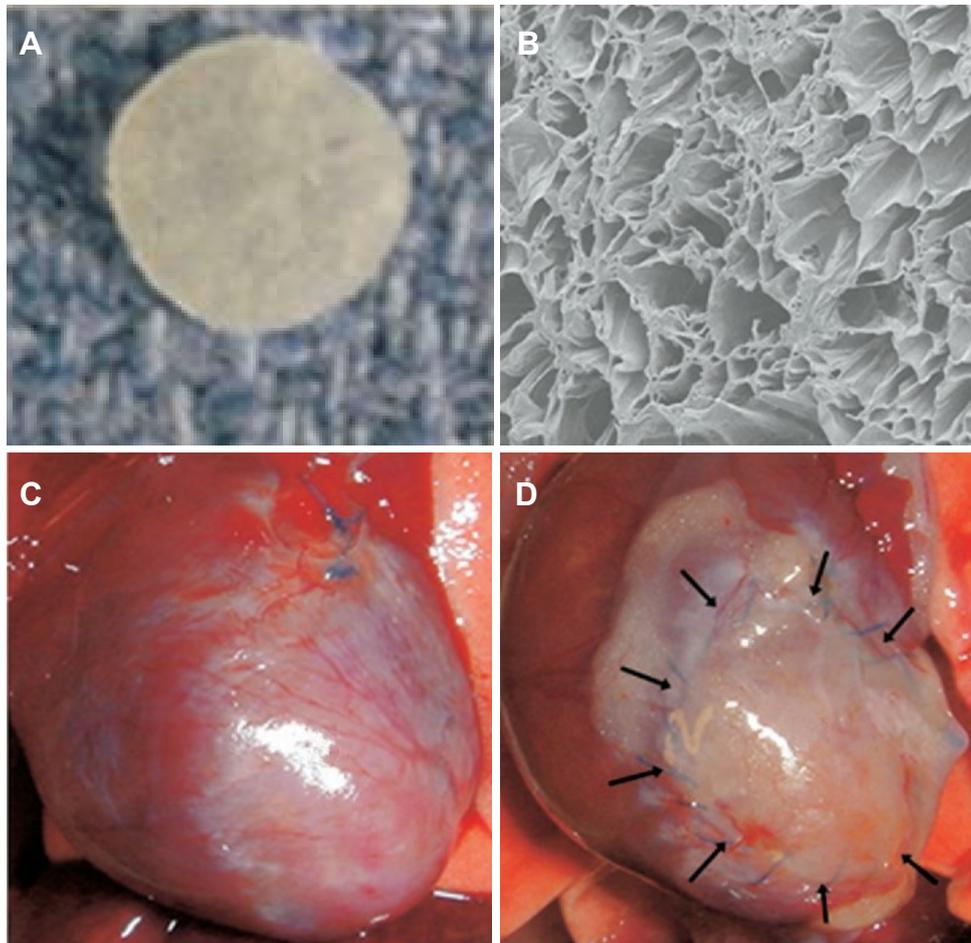


Abbildung 1: Polyesterurethanharnstoff (PEUU)-Cardiac-Patch-Therapie nach MI im Rattenmodell. PEUU-Patch Dimensionen: 6 mm Durchmesser \times 300 μ m Wandstärke (A), PEUU-Oberflächenstruktur im Rasterelektronenmikroskop (B), Myokardinfarkt-Narbe ohne (C) und mit Patch-Implantat (D) 8 Wochen nach MI in der Ratte.

Der Begriff Polyurethane umfasst als Oberbegriff eine heterogene Klasse von Polymeren. Je nach Zusammensetzung einzelner Komponenten und je nach Herstellungsart reagieren die Polyurethane sehr unterschiedlich und passen sich flexibel an ihre Umgebung an. So sind Polyurethane in der Lage für ein großes Anwendungsspektrum geeignet zu sein [39]. Polyesterurethanharnstoff (PEUU) als

eine Form der Polyurethane eignet sich als Material für die LIFT Technologie besonders gut aufgrund ihrer kristallinen Überstruktur.

Trotzdem bleibt das Problem der fehlenden Blutgefäßversorgung bestehen. Zahlreiche Studien beschäftigen sich mit der Implantation endothelialer Progenitorzellen, um die Bildung eines sekundären Blutgefäßnetzwerkes zu forcieren. So fanden Reinisch *et al.* [36] ein komplexes Netzwerk fünf Wochen nach subkutaner Implantation einer Mischpopulation humaner *Endothelial Colony Forming Cells* (ECFC) und *Mesenchymal Stem Cells* (MSC) in Nud-Mäusen. Bei Implantation einer reinen ECFC-Population hingegen war der Organisationsgrad der gebildeten Gefäße deutlich geringer. Interessanterweise konnte diese Studie funktionierende Verbindungen zwischen dem Kapillarsystem der Maus und dem sekundären humanen Gefäßsystem nachweisen. Entscheidend für das Überleben neu angesiedelter Zellen im Ischämiegebiet ist also nach wie vor die Bildungsgeschwindigkeit eines funktionierenden sekundären Kapillarnetzwerkes.

1.3.2 Technologischer Hintergrund

Die größten Probleme in der Herstellung von komplexen Gewebestrukturen mittels Tissue Engineering liegen in den nur beschränkten Möglichkeiten, Zellen in einer dreidimensionalen Matrix anzuordnen, den erwünschten Zelltyp in einem hohen Reinheitsgrad ohne Kontaminationen (besonders durch unerwünschte Zelltypen) anzusiedeln und der Mangel der Zellen an Energiesubstraten durch die unzureichenden Blutgefäßversorgung nach der Implantation des Gewebekonstruktes. Letzteres ist ebenfalls ein limitierender Faktor in der Stammzelltherapie[9].

Durch die Modifikation des sogenannten *Laser Induced Forward Transfer* (LIFT), einer Technologie aus der industriellen Elektrofertigung, können biologische Wirkstoffe jeglicher Art, einschließlich vitaler Zellen, mit hoher Reinheit selektiert und

mit hoher Präzision dreidimensional in einer Empfängermatrix angeordnet werden [17, 26]. Diese Technologie ist in der Lage, die Anforderungen durch gewebsspezifische

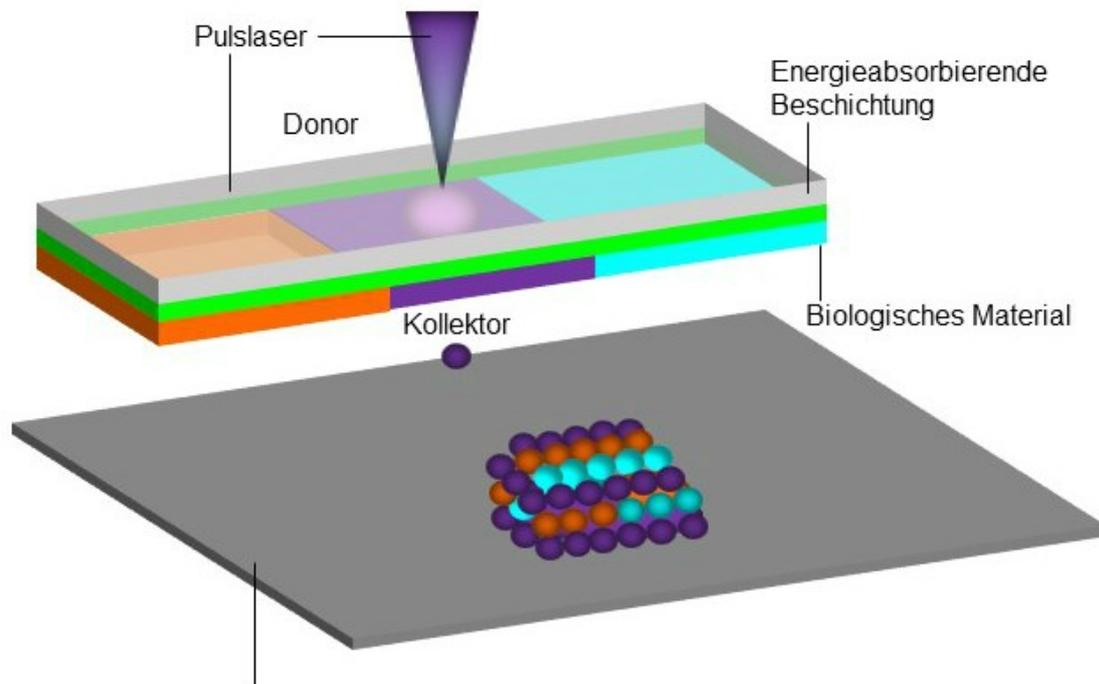


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Prinzips des Tissue Engineering von Ersatzgewebe mittels Laserinduziertem Vorwärtstransfer. Durch den Puls-Laser wird zielgenau von der Donorschicht unterschiedliches biologisches Material auf den Kollektor gebracht in der gewünschten Anordnung.

Strukturen zu berücksichtigen und erlaubt damit die Herstellung von hochkomplexen Gewebekonstrukten (Abbildung 2). Zunächst konnte in einer ersten Studie die prinzipielle Methodik des laserinduzierten Vorwärtstransfers vitaler Zellen (u. a. Progenitor- und Stammzellen) etabliert werden. Darüber hinaus soll das Differenzierungsverhalten der transferierten Zellen im Zusammenspiel mit dem Einfluss der Matriceinbettung untersucht und charakterisiert werden.

1.3.3 Stand der Stammzellenforschung

Stammzellen sind Ursprungszellen des Körpers, welche noch nicht ausdifferenziert sind und sich in verschiedene Arten von Zellen einschließlich neuer Stammzellen teilen

können. Im Bereich der kardiovaskulären Forschung gelang es, vor allem durch die Anwendung der Stammzelltherapie das pathologische Remodeling zu reduzieren vermeiden und die Verbesserung der myokardialen Durchblutung und der Herzkontraktilität zu erreichen [29]. Hierbei wurden nach einem Herzinfarkt verschiedene Progenitorzellen u. a. Knochenmarkzellen und kardiale Stammzellen, während der Regenerationsvorgänge des Myokards in das geschädigte Herz transplantiert. Andere klinische und tierexperimentelle Studien [23, 24] zeigten, dass nach einer Stammzelltherapie die Neubildung der Kardiomyozyten im Rahmen der Myogenese und Neoangiogenese, sowohl eine Verbesserung der Pumpfunktion, als auch eine Reduzierung des Remodelings bewirken können.

MSC stellen eine Population von Stammzellen dar, die sich aus adulten Geweben isolieren, expandieren und in eine Vielzahl nicht-hämatopoetischer Linien differenzieren lassen [22, 34]. Verschiedene *in vitro* Experimente belegen diese Potenz der MSC durch Ausdifferenzierung in Osteozyten, Chondrozyten, Adipozyten, Tendozyten, Astrozyten, Stromazellen bei der Hämatopoese, Endothelzellen [22] und sogar in Myozyten [5] und in Kardiomyozyten [28].

Zahlreiche Forschungen deuten darauf hin, dass MSC vorteilhaft für die Zelltherapie zu sein scheinen. In *vivo* Experimenten wurden MSC in die unbeschädigte Herzumgebung transplantiert und es wurde gezeigt, dass diese muskelspezifische Proteine exprimieren (Desmin, Troponin T, Phospholamban) und sich zu muskelähnlichen Zellen differenzieren [41], [40], [7]. In Langzeitexperimenten konnte sogar die Bildung der Glanzstreifen beobachtet werden. In Experimenten am Myokard mit künstlich herbeigeführtem Vorderwandinfarkt wurde beobachtet, dass MSC die Angiogenese durch Differenzierung zu Angioblasten und Expression von vascular endothelial growth factor (VEGF) und basic fibroblast growth factor (bFGF) fördern. Forschungsergebnisse zeigen, dass nach einem Herzinfarkt die Transplantation verschiedener Zellarten, z. B. Knochenmarkzellen oder kardiale Stammzellen, in das

geschädigte Herz, die Regenerationsvorgänge des Myokards und die Organfunktion verbessern können [29].

Eine kürzlich veröffentlichte Studie im Jahr 2015 von Fu und Srivastava [12] konnten im Mausmodell erste Ergebnisse nachweisen, dass geschädigte kardiale Fibroblasten über eine Signalkaskade in MSCs reprogrammiert wurden. Kardiale Fibroblasten induzieren im Mausmodell die Proliferation von MSCs und sind deshalb für die Regeneration in der Remodellingphase nach dem Herzinfarkt zentral. Obwohl bisher nur wenige Erkenntnisse gesichert sind, konnte ein Unterschied in der Reprogrammierung von humanen zu Maus-Stammzellen, die gendefizienten markierten Mäusen implantiert wurden, beobachtet werden. Die Reprogrammierung von humanen Zellen dauerte länger im 4 bis 12 Wochen Vergleich als die der Mauszellen und auch nach 16 Wochen wurden keine vollständig reprogrammierten humanen Zellen detektiert. Dennoch lässt die Analyse der orthologischen Genexpression darauf schließen, dass die Reprogrammierung in vitro von humanen und Maus-MSCs auf demselben Niveau stattfindet.

Ebenso scheint die Bildung von Endothel- und glatten Muskelzellen im Rahmen der Angiogenese und die damit folglich erhöhte Gefäßdichte des Myokards verantwortlich zu sein für die Verbesserung der Herzfunktion (systolische Verbesserung mit Erhöhung der Ejektionsfraktion und Wandstärke; diastolische Verbesserung mit verbesserter Elastizität), für die Verhinderung der linksventrikulären Dilatation und für das Überleben unterversorgter Kardiomyozyten nach dem Herzinfarkt [10].

1.4 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Vereinigung experimenteller Fortschritte im Einsatz eines *Cardiac-Patch*-Implantats und der Stammzelltherapie. Auf der Basis des derzeitigen Kenntnisstands aus Tiermodellen wurde eine Polyurethanharstoff

(PEUU)- Matrix verwendet, die für eine Besiedelung durch adhärente und nicht-adhärente Zellen geeignet ist, und die sowohl eine hohe mechanische Stabilität aufweist als auch resorbierbar ist. Folglich könnte die gezielte Besiedlung einer Patch-Matrix mit Endothel- und Stammzellen in einer kapillarnetzähnlichen Gitterstruktur mittels LIFT die Bildungsgeschwindigkeit von sekundären Gefäßstrukturen erhöhen. In dieser Arbeit soll untersucht werden, inwieweit dieser Effekt zu einer verbesserten Infarktheilung führt.

2 Material und Methoden

2.1 Zellgewinnung

2.1.1 Humane Endothelzellen aus der Nabelschnur (*Human umbilical vein endothelial cells* - HUVEC)

2.1.1.1 Isolierung von HUVEC

Die HUVEC wurden aus der Nabelschnur nach der modifizierten Methode von Jaffe *et al.* (1973) [20] mittels Kollagenase isoliert. Unmittelbar nach der Entbindung wurden die Nabelschnüre mit 0,2- μ m-gefiltertem Nabelschnurpuffer (140 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 11 mM Glukose, 10 mM HEPES [pH 7,4]) gespült und danach mit 0,2- μ m-gefiltertem Nabelschnurpuffer perfusioniert, welcher zusätzlich 1 % Rinderserumalbumin (Sigma-Aldrich, USA) enthielt. Unter sterilen Bedingungen wurden die Umbilikalvenen entnommen und mit HEPES Puffers gespült. 0,05 % Chlostridium Histolyticum Kollagenase (Sigma-Aldrich, USA) in HEPES Puffer wurde dann für 13 min bei 37 °C in der präparierten Vene appliziert. Die Reaktion wurde beendet, indem 30 μ l HEPES Puffer in die Vene gegeben und die Endothelzellen mit 20 % fetalem Kälberserum (FCS; inaktiviert 20-30 min bei 56 °C; PAN Biotech, Deutschland) aufgefangen wurden.

2.1.1.2 Kultivierung von HUVEC

Die HUVEC wurden nach Zentrifugation bei $400 \times g$ resuspendiert und $2,5 \times 10^6$ Zellen/cm² bei 37 °C und 5 %-CO₂-haltiger, befeuchteter Atmosphäre in RPMI 1640-Medium (Lonza, USA) kultiviert, das 20 % fötales Kälberserum (FCS; inaktivierte 20-30 min bei 56 °C ; PAN Biotech, Deutschland), 5 % endotheliales Mitogen (Biomedical Technologies, USA), 100 U/ml Penicillin, 14 mM HEPES (pH 7,4) und 2 mM L-Glutamin erhält. Bei Erreichen einer Zellkonfluenz von 90 % erfolgte die Passagierung

der Zellen. Eine mikroskopische Kontrolle auf Infektion und Zelldichte erfolgte täglich. Alle 2 bis 3 Tage wurden die Zellen durch Mediumwechsel gefüttert. Beim Mediumwechsel wurden die adhären Zellen vorsichtig mit PBS gespült, und anschließend 5×10^3 Zellen/cm² in Endothelzellen-Medium (EGM-2; Lonza, USA) für die weitere Passage replattiert. Das Volumen des gegebenen EGM-2-Mediums betrug 1 ml / Loch für 24-Loch-Platten, 5 ml / T25-Flasche und 25 ml / T175-Flasche. Nach dreimaliger Passagierung wurden die HUVEC für die anschließenden *in vitro* und *in vivo* Experimente verwendet.

2.1.2 Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC)

2.1.2.1 Isolierung mononukleärer Zellen (MNC) aus humanem Knochenmark

Im Rahmen elektiver Herzoperationen werden nach vorheriger schriftlicher Aufklärung und Einwilligung des Bypass-Patienten (mittleres Alter: 70 Jahre) Knochenmarkproben entnommen und spätestens 24 h nach der Punktion verarbeitet. 10 ml des mit Gerinnungshemmer Liquemin versetzte Knochenmark wurden mit PBS und RPMI (E 15-840) in Verhältnis 1:2 sowie 175 µl Collagenase B und 175 µl DNase in ein neues 50 ml Röhrchen gemischt, ausgewaschen und für 30-40 min inkubiert. Zur Separation der MNC von den übrigen Bestandteilen der Knochenmarksuspension wurde eine Dichtegradientenzentrifugation LSM (PAA, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden in 50 ml Proberöhrchen 15 ml Biocoll Separating Solution (Biochrom, Deutschland) mit 30 ml Knochenmarksuspension überschichtet und bei $400 \times g$ für 35 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Bei dieser Art der Dichtegradientenzentrifugation sammeln sich die MNC in der Interphase an, während Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte am Boden des Röhrchens sedimentieren. Die MNC wurden anschließend aus der Interphase abgesaugt und mit PBS gewaschen. Dazu wurden die Zellen der Interphase 50 ml PBS verdünnt und bei $400 \times g$ für 10 min weiter zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 5 ml PBS resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit Türks Lösung

(Merck, Deutschland) 1:10 verdünnt und in einer Neubauerkammer ausgezählt.

2.1.2.2 Kultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSC)

Die Isolation von hMSC beruhte auf der Selektion durch Plastikadhärenz in einem für MSC selektiven Expansionsmedium (MSCGM; Lonza, Walkersville, MD USA). Dieses Medium ermöglicht eine Expansion der Zellen unter Bedingungen, die keine Differenzierung der Zellen induzieren. MNC aus frischem Knochenmark wurden in MSCGM suspendiert und bei 37 °C und 5 % CO₂-haltige Atmosphäre in MSCGM kultiviert. Bei Erreichen einer Zellkonfluenz von 70-80 % erfolgte die Passagierung der Zellen. Eine mikroskopische Kontrolle auf Infektion und Zelldichte erfolgte täglich. Alle 2 bis 3 Tage wurden die Zellen durch Mediumwechsel gefüttert. Beim Mediumwechsel wurden die adhärennten Zellen vorsichtig mit PBS gespült und anschließend 3×10^3 Zellen/cm² in MSCGM für die weitere Passage replattiert. Das Volumen des gegebenen Mediums betrug 5 ml / T25-Flasche und 25 ml / T175-Flasche. Nach dreimaliger Passagierung wurden die hMSC für die anschließenden *in vitro* und *in vivo* Experimente verwendet.

2.1.3 Immunphänotypische Analyse mittels Durchflußzytometrie

Zuerst wurde mikroskopisch die Morphologie der (adhärennten) hMSC und HUVEC in Kulturflaschen täglich untersucht. Die Phänotypisierung von HUVEC und hMSC erfolgte mit Zellen der dritten Passage. Als Verfahren wurde die Durchflußzytometrie für die immunphänotypische Charakterisierung von markierten Antigenen verwendet. Hierbei sind die Antikörper mit einem Farbstoff konjugiert. Bei der Durchflußzytometrie handelt es sich um ein bildgebendes Verfahren, welches Verlaufsdaten aufzeichnet, zu deren Auswertung die entsprechende Software notwendig ist.

Humane MSC wurden mittels CD29-APC, CD31, CD34, CD44-PerCP-Cy5.5, CD45-V500, CD73-PE (Becton Dickinson, Deutschland) und CD105-Alexa-Fluor®488 (AbD Serotec, UK) Antikörper immunphänotypisch charakterisiert. Zur Charakterisierung der HUVEC dienten CD31, CD34 und CD45-V500 Antikörper. Zellen, die mit Isotyp-Antikörpern markiert wurden, dienten der Kontrolle 1×10^6 Zellen wurden präpariert und bei $1000 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes und Resuspension in Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) wurden 5 μ l des sekundären Antikörpers beigemischt und danach für 10 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 10 min bei $300 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in PBS resuspendiert. Anschließend wurden 1,5 μ l des Antikörpers beigemischt für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren Waschvorgängen wurde das Zellpellet in 300 μ l PBS resuspendiert und mit 100 μ l 4 % Paraformaldehyd (PFA) zur Aufbewahrung versetzt. Zuletzt wurden die Proben in einem FACS-Röhrchen (Becton Dickinson, Deutschland) bei 4 °C für die Durchflußzytometrie vorbereitet. FACS-Röhrchen mit 5×10^4 unmarkierten Zellen dienten als Negativkontrollgruppe. Insgesamt 20 FACS-Röhrchen mit Antikörper markierten Zellen wurden mit Hilfe eines Flow cytometer (LSRII) und CellQuest-Software (Becton Dickinson) erfasst und analysiert.

2.2 LIFT-Technologie

2.2.1 Prinzip des Laserinduzierten Vorwärtstransfers (LIFT)

Das Schema für LIFT wird in Abbildung 3 (Kap. 1.3.2) dargestellt. Zwei koplanare Glasobjektträger wurden verwendet. Der obere Glasobjektträger, der sogenannte Donor, wurde mit einer laserabsorbierenden Goldschicht und anschließend einer zu übertragenden zellhaltigen Schicht bedeckt. Im Brennpunkt des Lasers verdampft die Goldschicht, wobei der entstehende Gasdruck das darunterliegende zellhaltige Material in Richtung des unteren Glasobjektträgers (Kollektor) schleudert. Alle Experimente der Materialübertragung in dieser Studie wurden unter normalem Raumklima durchgeführt.

Der angewandte Laser ist ein Nd:YAG-Laser mit einer Wellenlänge von 1064 nm, Impulsdauer von 10 ns und einer Frequenz von 20 Hz. Die Laserpulse wurden mit einer 60 μm Achromat-Linse fokussiert, die einen Abtragungsdurchmesser von 40 μm erzeugt. Für die Zellsuspension mit einer Schichtdicke von ca. 65 μm wurde die Laserfluenz auf 2.0 J/cm² eingestellt und während des Übertragungsprozesses laufend gemessen. Der Kollektor wurde auf einem beweglichen Objektisch montiert, um die Positionierung bezüglich des Spenders zu kontrollieren. Der Abstand zwischen Donor und Kollektor wurde auf 500 +/- 5 μm festgesetzt und mit einer Kamera kontinuierlich gemessen [26].

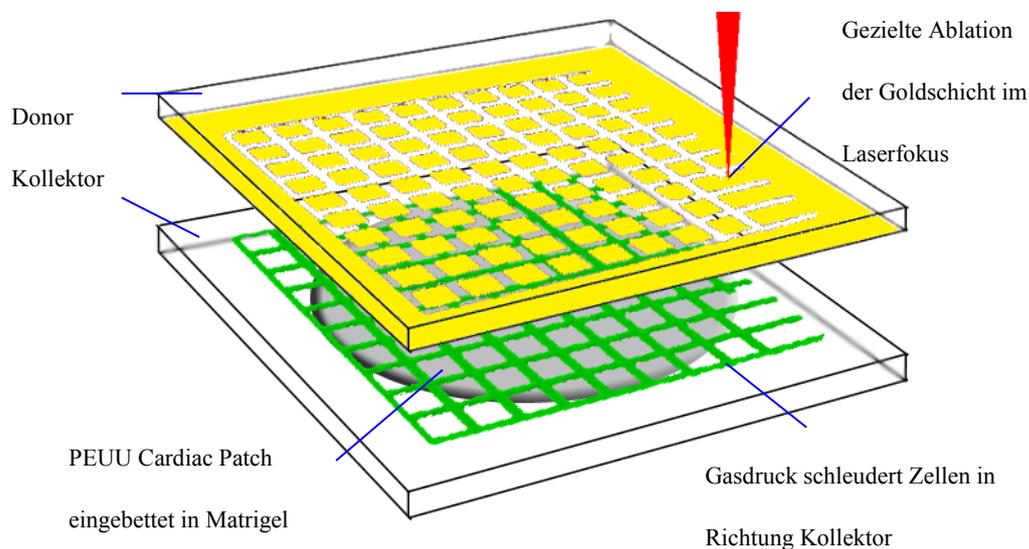


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Laserinduzierten Vorwärtstransfers (LIFT). Mit dem Laser (roter Pfeil) wird die Gitterstruktur durch die Goldschicht auf den PEUU Cardiac Patch gebracht (14).
Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Elsevier (Copyright © 2011 Elsevier)

2.2.2 Herstellung der Zellsuspensionsschicht auf der Donor-Slide

Zellpellets von 4×10^6 HUVEC und 2×10^6 hMSC wurden getrennt in 45 μl EGM-2 resuspendiert. Die gewonnenen Zellsuspensionen wurden auf den mit Gold

beschichteten Donorobjektträgern pipettiert. Diese quadratischen Glasplatten mit einer Größe von 26x26 mm² und einer Dicke von 1 mm wurden mit einer Goldschicht von 50 bis 60 nm mit Hilfe der plasmagestützten, chemischen Gasphasen-abscheidung (PECVD) überzogen. Die Zellsuspensionen wurden mit einem Klingenstrich auf der Goldschicht verteilt, um eine homogene Schicht von 65 µm Schichtdicke zu erzeugen. Anschließend wurde der mit Zellen beschichtete Donor in einem Metallrahmen fixiert und umgekehrt auf dem Versuchsaufbau befestigt (Abbildung 3).

2.2.3 Cardiac-Patch-Besiedlung

Als Besiedlungssubstrat diente eine Polyurethanharnstoff (PEUU)-Matrix [18], welche von Fujimoto und Kollegen (2007) [13] erfolgreich als *Cardiac Patch* verwendet wurde. Der Patch besitzt 91 % Porosität und 91 µm Porengröße. Mechanisch betrachtet ist der Patch elastisch und hat eine Zugfestigkeit von 0,78 MPa sowie eine Elongation von 157 % [13]. Das PEUU-Material mit 300 µm Dicke wurde in kreisförmige Scheiben mit 8 mm Durchmesser geschnitten. Um die Zellen in oben beschriebener Form aufzudrucken, wurden HUVEC und hMSC in zwei Schritten übertragen.

Die HUVEC wurden in zwei Lagen und in einem orthogonalen Raster mit 900 µm Rasterabstand gedruckt. Anschließend wurden die hMSC in zwei Lagen als Quadrate mit 600 µm Seitenlänge zwischen den HUVEC-Rasterlinien gedruckt. Entsprechend wurden die hMSC ebenfalls in zwei Schichten als Quadrate von 600 µm Seitenlänge zwischen die HUVEC Linien gedruckt. Die HUVEC Gitterlinien wurden durch die hMSC Linien eingefasst mit einem Abstand von je 150 µm auf beiden Seiten.

Der *Cardiac Patch* und der Kollektor wurden in Ethanol sterilisiert und mit PBS gereinigt. Danach wurde der Patch in einer Lösung aus BD MatrigelTM Matrix (BD Biosciences USA) / EGM-2 (Verhältnis 2:1) bei 4 °C eingetaucht und auf dem Kollektor positioniert. Dieser wurde anschließend in einem Metallrahmen fixiert und umgekehrt

auf dem Versuchsaufbau in unmittelbarer Nähe des Donors (500 μm) befestigt. Nun wurden zum einen 13.5×10^4 HUVEC und 4.5×10^4 hMSC pro cm^2 (Verhältnis 3:1) mittels LIFT in einer strukturierten Anordnung übertragen (LIFT-Gruppe). Zum anderen wurde in einer Vergleichsgruppe dieselbe Menge an Zellen in einer ungeordneten Kokultur ausgesät (MIX-Gruppe).

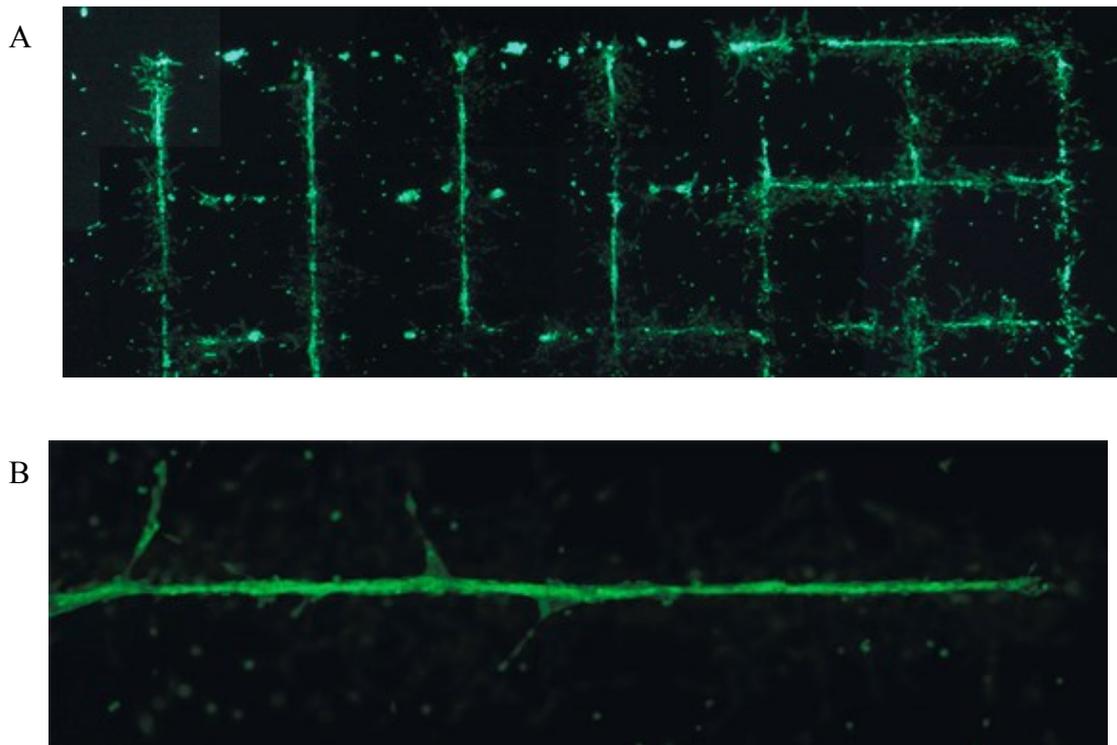


Abbildung 4: Cardiac-Patch-Besiedlung mittels LIFT: Anordnung der HUVEC in einer kapillarnetzähnlichen Gitterstruktur auf einer mit Matrigel beschichteten PEUU-Patch-Matrix.

A: Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von HUVEC/ hMSC- Kokultur auf PEUU-Patch bedeckt mit Matrigel aus dem *in vitro* Experiment acht Tage nach Zellaussaat. B: Durch LIFT überführte bzw. angeordnete Zellen nach 24 h. Beginnende Gefäßformierung in den simulierten Gitterstrukturmustern.

2.2.4 Zellbesiedlung nach acht Tagen *in vitro*

Für die Zellen auf dem *Cardiac Patch* erfolgte täglich ein Mediumwechsel. Nach acht Tagen wurden sie mit PFA fixiert und anschließend mit polyklonalem goat-anti-Pecam-1 primären Antikörper inkubiert, gefolgt von anti-goat Alexa-Fluor®488 sekundären Antikörpern für 20 min bei Raumtemperatur. Die Zellkerne wurden mittels TO-PRO®-

3-Iodid gefärbt und die Proben mit Hilfe eines LSM 780 konfokalen Mikroskops analysiert (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: TO-PRO®-3-Iodid Färbeprotokoll

	CD31 _(sc-1506) - TO-PRO®-3
1	Die Proben durch Abdecken mit 100 µl PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur waschen.
2	Die Zellen werden mit 4% Paraformaldehyd (PFA) für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und mit dem Objektträger abgedeckt.
3	Die Proben werden mit 100 µl PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur nochmals gewaschen.
4	Füge einen Tropfen Peroxidase Blocking (DAKO) auf Objektträger hinzu, bis alle Zellen bedeckt sind. Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur.
5	Die Proben durch Abdecken mit 100 µl PBS zweimal jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur waschen.
6	Füge einen Tropfen Protein Blocking (DAKO) auf Objektträger hinzu, bis alle Zellen bedeckt sind. Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur.
7	Vorbereitung der Goat-Anti-CD31-Verdünnung: Goat-Anti-CD31 2 µl in Antikörperverdünnungsmittel (DAKO) 38 µl verdünnt.
8	Entfernen der Flüssigkeit aus den Proben und beträufeln mit Goat-Anti-CD31 Verdünnung und Inkubieren für 4 Stunden bei Raumtemperatur.
9	Die Proben durch spülen mit 100 µl PBS fünfmal jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur waschen.
10	Vorbereitung der Alexa Flour 568 Anti-Goat-Verdünnung: Alexa Flour 568 Anti Goat 2 µl in PBS 700 µl verdünnt.
11	Die Proben durch Abdecken mit Alexa Flour 568 Anti-Goat-Verdünnung für 2 Stunden bei 37 ° C behandeln.
12	Die Proben durch spülen mit 100 µl PBS fünfmal jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur waschen.

13	Vorbereitung der TO-PRO [®] -3-Verdünnung: TO-PRO [®] -3 2 µl in PBS 400 µl verdünnt.
14	Die Proben durch Abdecken mit TO-PRO [®] -3-Verdünnung für 30 Minuten bei Raumtemperatur behandeln.
15	Die Proben durch spülen mit 100 µl PBS zweimal jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur waschen.
16	Die Proben durch Abdecken mit 10 µl FSR bei 4 ° C dauerhaft trocknen lassen.

2.3 Tiermodell und in vivo Experimente

2.3.1 Experimentelle Grundlagen des Tiermodells

Gearbeitet wurde mit männlichen RNU-Ratten (CrI: NIH-Foxn1rnu, Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland). Dieses Projekt wurde am 21.01.2010 beim Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern eingereicht und am 02.02.2010 vor der Tierschutzkommission unter den Aktenzeichen: LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-043/09 genehmigt.

Die Tiere hatten ein Gewicht von 300 ± 25 g bei einem durchschnittlichen Alter von etwa 10 Wochen und wurden in Käfigen zu je 2-3 Ratten bei Raumtemperatur und einem 12-Stunden Tag-/Nachtzyklus unter konstanten Luftfeuchtigkeits- und Luftdruckverhältnissen bis zur Operation unter Gabe von Futter und Wasser gehalten. Die Ratten wurden in fünf Gruppen unterteilt: Scheinoperation (Sham, n=5), unbehandelter MI (MIC, n=5), MI mit *Cardiac-Patch*-Behandlung ohne Zellbesiedelung (MIP, n=10), MI mit *Cardiac-Patch*-Behandlung und ungeordneter Zellbesiedelung (MIX, n=10), sowie MI mit *Cardiac-Patch*-Behandlung und geordneter Zellbesiedelung (LIFT, n=10). Acht Wochen nach der Erstoperation wurden an den Ratten eine histologische Evaluation und eine Herzfunktionsmessung durch Druck-Volumen-Kurven im linken Ventrikel durchgeführt.

2.3.2 Vorbereitung und Durchführung der Operation

Vor Beginn der Operation wurde den Ratten eine Ketamin- (60 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin- (10 mg/kg Körpergewicht) Natrium-Injektion intraperitoneal verabreicht. Nach Einleitung der Narkose wurden die Tiere bei 37 C° auf dem Rücken liegend fixiert und intubiert. Die Tiere wurden danach mittels eines speziellen Kleintierbeatmungsgerätes druckkontrolliert (bei 14 cm H₂O) mit reinem Sauerstoff im Verhältnis von 1:2 (Inspiration/Expiration) beatmet. Die Atemfrequenz betrug 90/min. Die Operation begann mit der Rasur in der linken oberen Thoraxhälfte. Nach der linken anterolateralen Inzision in Höhe des 4./5. Interkostalraum erfolgte die Eröffnung der Muskelfaszie und Isolierung sowie Durchtrennung der Mm. Pectoralis.

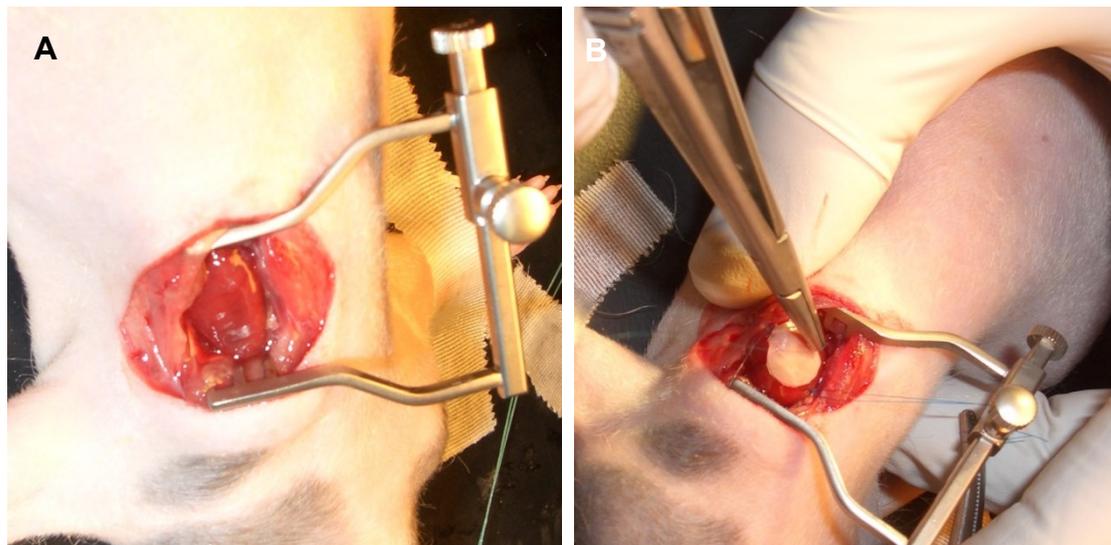


Abbildung 5: Cardiac Patch Therapie nach induziertem Myokardinfarkt in der RNU-Ratte. Ligatur(A) des Koronargefäßes-Ramus interventricularis anterior. Platzierung des Cardiac-Patch-Implantats auf dem infarzierten Areal des linken Ventrikels(B).

Der Thorax wurde eröffnet durch den Einsatz eines Wundsperrers, das Perikard eröffnet und das Herz durch leichten Druck aus dem Thorax herausluxiert. Der Ramus interventricularis anterior (RIVA) wurde ca. 2 mm mit einem 6-0 Prolene Faden unter Anwendung einer atraumatischen Nadel umschlungen und distal des Abgangs aus der linken Koronararterie permanent ligiert. Durch lokale linksventrikuläre Hypokinesie sowie Zyanose wurde die erfolgreiche Induktion des MI visuell diagnostiziert.

Innerhalb der ersten 10 min nach der RIVA-Ligation erhielten die Tiere in den entsprechenden Gruppen *Cardiac Patches*, die mittels einer 8-0 Prolene Naht auf dem Epikard fixiert wurden (Abbildung 5).

Um Effekte allein durch den operativen Eingriff auszuschließen, wurden die Ratten der Sham-Gruppe mit der gleichen Prozedur bis auf die Ligatur des RIVA scheinoperiert. Dabei wurde der Faden unter dem Gefäß an gleicher Position hindurchgezogen und danach sofort entfernt. Anschließend wurde die Pleurahöhle durch Überdruckbeatmung der Lungenflügel entlüftet und der Thorax mit einer 4-0 PDS Naht geschlossen. Die Muskulatur und die Haut wurden mit 5-0 Safil unter konstantem Vorgehen vernäht. Nach Beendigung der Operation wurden die Ratten vom Beatmungsgerät entwöhnt und bei einsetzender Spontanatmung extubiert und erhielten eine s.c Substitution der Buprenorphin (0,05 mg/kg). Während der ersten sieben Tage erhielten die Tiere zusätzlich 10 Tropfen Metamizol ins Trinkwasser (300 ml).

2.4 Hämodynamische Funktionsmessung

2.4.1 Katheterisierung und Aufnahme von Druck-Volumen-Kurven

Unter Verwendung des Protokolls von CardioDynamics BV (CD Leycom, Zoetermeer, Niederlande) wurde die Herzfunktionsmessung durchgeführt. Acht Wochen nach der Erstoperation wurden die Ratten erneut für eine Operation vorbereitet. Nach Einleitung der Narkose wurden die Tiere bei 37 C° am Arbeitsplatz auf dem Rücken liegend fixiert und intubiert. Mithilfe eines Kleintierbeatmungsgerätes erfolgte sowohl die Kontrolle (bei 14 cm H₂O) der Tiere als auch die Beatmung mit reinem Sauerstoff im Verhältnis von 1:2 (Inspiration/Expiration). Die Atemfrequenz betrug 90/min. Nach einem transversalen Hautschnitt auf Höhe der Schilddrüse wurde zunächst die Vena jugularis externa isoliert und zur Prophylaxe der Thrombosierung wurde Heparin (500 IE/kg Körpergewicht) intravenös appliziert. Die Kalibrierung des Druck-Volumen-

Übersetzers erfolgte über die Angleichung von festgelegten minimalen und maximalen Spannungswerten des Messsystems mit minimalen 0 mmHg und maximalen 100 mmHg Druckwerten unter Blutvolumen der Venenzirkulation. Danach wurde die A. carotis communis unter dem M. sternocleidomastoideus freipräpariert. Die folgenden Schritte erfolgten unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskopes mit einer 16-100 fachen Vergrößerung. Die Arterien wurden zur Vermeidung der Blutung nach proximal mit einem 4-0 nicht resorbierbaren Supramid Faden permanent ligiert. Nach distal wurde die Durchblutung temporär unterbrochen, die Arterie inzidiert, ein Druck-Volumen-Katheter eingeführt und retrograd in den Linksventrikel vorgeschoben. Das Volumensignal wurde danach durch Feststellung des Parallelvolumens nach intravenöser Gabe hypertoner Kochsalzlösung (5 % KCl) korrigiert. Die Aufnahme der Druck-Volumen-Kurven erfolgte einerseits unter Normalbedingungen (Baseline) und andererseits unter einer Stresssituation durch intravenöse Gabe von Dobutamin (10 µg/kg/min Körpergewicht, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) jeweils über einen Zeitraum von 5 min mit einer entsprechenden Herzfunktionsaufnahmesoftware (IOX Version 1.8.3.20, emka Technologies). Danach wurde der Druck-Volumen-Katheter entfernt. Die Tiere wurden dann durch eine intravenöse Applikation hypertoner Kaliumchlorid Lösung (5 % KCl) getötet. Es folgte die komplette Öffnung des Thorax mittels einer chirurgischen Schere. Das Herz wurde zum Schluss entfernt.

2.4.2 Aufarbeitung der Rattenherzen nach Explantation

2.4.2.1 Zielbestimmung der funktionellen Perfusion mittels Tomato Lectin

Die Tötung der Ratten erfolgte am Ende des achtwöchigen Beobachtungszeitraums nach Myokardinduktion direkt nach Beendigung der Herzfunktionsmessung. Das Herz wurde exzidiert und die Aorta kanüliert, um eine anterograde Perfusion des Herzens zu ermöglichen. Mit dieser Technik, die Oskar Langendorf 1895 entwickelte, wurde es möglich am isolierten Organ Funktionsparameter zu messen, da die Aorta nach Spülung mit Perfusionsflüssigkeit in entgegengesetzter natürlicher Flussrichtung anfängt,

wieder im eigenen Rhythmus zu schlagen [4]. Das Herz wurde an die Langendorff-Apparatur angeschlossen und mit 20 ml Krebs-Henseleit Perfusionslösung (117 mmol/l NaCl, 24 mmol/l NaHCO₃, 11.5 mmol/l D-[+]-glucose, 3.3 mmol/l KCl, 1.25 mmol/l CaCl₂, 1.2 mmol/l MgSO₄, 1.2 mmol/l KH₂PO₄) und Fluorescein Lycopersicon esculentum (Tomato) Lectin (7.5 µg/ml, LINARIS; Wertheim- Bettingen, Deutschland) perfundiert.

2.4.2.2 Aufarbeitung der Rattenherzen

Nach der Perfusion wurden die Herzen in O.C.T.TM Compound (Tissue-Tek®; Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Aus den gefrorenen Herzen wurden aus fünf horizontalen Ebenen 5-µm-Gefrierschnitte am Kryostat CM 1900 (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) angefertigt und auf einen Objektträger überführt.

2.4.3 Histologische Untersuchungen

2.4.3.1 Bestimmung der Infarkt wanddicke

Die visuelle Darstellung des Infarktgewebes und fibrotischer Erscheinungen erfolgte durch eine histologische Färbung der Gewebeschnitte mit Sirius Red (Division Chroma, Münster, Deutschland) und Fast Green FCF (Sigma-Aldrich). Die Färbungen wurden nach den Angaben der Hersteller durchgeführt. Hierbei färbt Sirius Red die Kollagenfasern und Fast Green FCF das intakte Myokard. Das Färbeprotokoll wird in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Sirius Red und Fast Green FCF Färbeprotokoll

1	Vorbereitung der 10% Formalinverdünnung: Formalin 37% 50 ml in Destilliertem Wasser 135 ml verdünnt.
2	Fixieren der Proben durch Eintauchen in 10% Formalinverdünnung für 10 Minuten bei Raumtemperatur.
3	Die Proben werden mit destilliertem Wasser zweimal jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen.
4	Vorbereitung der 1% Colour-Stock Verdünnung: Colour Povder 1 g in Picric Acid 100 ml gemixt
5	Vorbereitung der 0,1% Colour-Stock Verdünnung: 1% Colour-Stock Verdünnung 10 ml und 100 % Acetic Acid 50 µl in Picric Acid 90 ml verdünnt.
6	Färben der Proben durch Eintauchen in 0,1% Siriusred(Colour)-Stock Verdünnung für 3 Minuten bei Raumtemperatur.
7	Waschen der Proben in destilliertem Wasser, bis das Wasser klar wird.
8	Färben der Proben durch Eintauchen in 0,1% Fast Green (Colour)-Stock Verdünnung für 10 Minuten bei Raumtemperatur.
9	Waschen der Proben in destilliertem Wasser, bis das Wasser klar wird.
10	Vorbereitung der 70 % Ethanol Verdünnung: 95% Ethanol 70 ml in destilliertem Wasser 26 ml verdünnt.
11	Eintauchen der Proben in 70 % Ethanol Verdünnung für 1 Minute bei Raumtemperatur.
12	Vorbereitung der 80 % Ethanol Verdünnung: 95% Ethanol 80 ml in destilliertem Wasser 16 ml verdünnt.
13	Eintauchen der Proben in 80 % Ethanol Verdünnung für 1 Minute bei Raumtemperatur.
14	Vorbereitung der 80 % Ethanol Verdünnung: 95% Ethanol 90 ml in destilliertem Wasser 6 ml verdünnt.

15	Eintauchen der Proben in 90 % Ethanol Verdünnung für 2 Minuten bei Raumtemperatur.
16	Eintauchen der Proben in 100 % Ethanol für 6 Minuten bei Raumtemperatur.
17	Eintauchen der Proben in 1. Xylol für 5 Minuten bei Raumtemperatur.
18	Eintauchen der Proben in 2. Xylol für 5 Minuten bei Raumtemperatur.
19	Fixieren die Proben mit 10 µl Pertex auf Objektträger mit Deckglas.

2.4.3.2 Fibrosebestimmung

Die Kryogewebeschnitte wurde zur Quantifizierung des Fibrosegrades verwendet. Zur Auswertung der Fibrosierung erfolgte wie bereits beschrieben eine histologische Färbung mittels Sirius Red und Fast Green. Am Lichtmikroskop lassen sich einheitliche Bereiche querschnittener Muskelfasern als High Power Field (HPF) visuell erfassen und speichern. Der Anteil rot gefärbter Kollagenmatrizen pro HPF als Ausdruck des Fibrosierungsgrades ist dadurch quantitativ messbar und lässt sich zwischen den Gruppen vergleichen. Der Fibrosierungsgrad wurde unabhängig voneinander einerseits im Infarktgrenzbereich und andererseits im Nichtinfarktbereich (Remote Area) analysiert. Pro Schnitt wurden zehn HPF aufgenommen (ein Schnitt pro Ebene) und unter 400-facher Vergrößerung mit Hilfe digitaler Computer-Planimetrie ausgewertet.

2.4.3.3 Kapillardichtebestimmung

Lectine sind von Pflanzen oder Mikroorganismen produzierte Glykoproteine, die endständige Zucker von Kohlenhydratstrukturen der Zellmembran binden. Tomato Lectin bindet spezifisch an N-Acetylglucosamin-Oligomere auf der Endothelzellmembran. Durch extrakorporale Reperfusion nach der Herzfunktionsmessung lagert sich Tomato Lectin in den funktionellen Gefäßen an die Endothelzellmembran an. Für die Auszählung der durch Tomato Lectin markierten Kapillaren wurden zwei benachbarte Ebenen festgelegt, deren relative Infarktgrößen

die Infarktgröße des Gesamtherzens am besten repräsentieren. Am Fluoreszenzmikroskop lassen sich einheitliche Bereiche querschnittener Muskelfasern als High Power Field (HPF) visuell erfassen und speichern. Die Kapillardichte wurde unabhängig voneinander einerseits im Infarktgrenzbereich und andererseits im Nichtinfarktbereich analysiert. Pro Schnitt wurden zehn HPF aufgenommen (ein Schnitt pro Ebene) und unter 400-facher Vergrößerung mit Hilfe digitaler Computer-Planimetrie ausgewertet.

2.4.3.4 Identifikation humaner Zellen im Rattengewebe

Die Gewebeschnitte wurden mit 100 µl 2 % PFA für 10 min bei Raumtemperatur fixiert, anschließend mit PBS für 5 min gewaschen und luftgetrocknet. Mit einem Dako Cytomationsstift wurden die Gitterlinien umrandet, um sie so zu präparieren, dass sie wasserabweisend sind und sie wurden anschließend 2 min getrocknet. Die Schnitte wurden mit 50 µl 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach zwei Waschgängen mit PBS wurde ein Tropfen Protein Blocking Lösung (DAKO) aufgetragen und für 10 min inkubiert. Die Proben wurden mit einer Lösung aus 38 µl Antibody Diluent (DAKO) und 2 µl anti-human-nuclei über Nacht bei 4 °C behandelt. Die Proben wurden 2 Mal mit 100 µl PBS gewaschen und 3 Mal in die Lösung für 5 min bei RT eingetaucht. Nach Waschen wurden die Proben mit 2 µl anti-mouse-Alexa-Fluor®594 in 700 µl für 2 h bei 37 °C eingefärbt. Nach einem weiteren Waschvorgang mit PBS wurden die Schnitte mit 2 µl TO-PRO®-3-Iodid in 400 µl PBS für 30 min bei Raumtemperatur behandelt. Die Proben wurden erneut mit PBS gewaschen und auf einen Objektträger zur anschließenden fluoreszenzmikroskopischen Analyse bei 630-facher Vergrößerung überführt. Hierfür wurde auf die Proben 10 µl FSR aufgetragen und mit einem Deckglas verschlossen. Die Proben wurden mit Nagellack versiegelt, der bei 4 °C trocknete und die Proben so dauerhaft schützte.

2.5 Statistische Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm „SPSS 22.0G for Windows“ (SPSS ist die Abkürzung für „Statistical Package for the Social Sciences“). Für deskriptive Darstellungen der Phänotypische Charakterisierung mittels Durchflußzytometrie und Herzpumpfunktionsmessung, Infarkt wanddick, und Kapillardichte sowie Fibrosierungsgrad 8 Wochen nach Myokardinfarkt wurden Häufigkeitsangaben (Mittelwert, Standardabweichung und Range) errechnet. Unterschiede zwischen Gruppen bei Herzpumpfunktionsmessung und Kapillardichte 8 Wochen nach Myokardinfarkt wurden für kontinuierliche Variablen mit dem unverbundenen T-Test (bei Normalverteilung) auf statistische Signifikanz getestet. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde der Kruskal-Wallis Test verwendet. Der p-Wert für statistische Signifikanz (α -Level) war 0,05.

3 Ergebnisse

3.1 Phänotypische Charakterisierung von HUVEC und hMSC

Isolierung, Expansion, Charakterisierung und Differenzierung der hMSC wurden nach Wagner *et al.* (2005) [43] etabliert. Morphologisch zeigten sich die hMSC als bipolare, spindelförmige Zellen, die in der Kulturflasche adhärente Populationen bildeten. Die Zellen wurden mittels Durchflußzytometrie analysiert, wobei Zellgröße, Granularität und Fluoreszenzintensität erfasst und klassifiziert wurden.

Die FACS (Durchflußzytometrie)-Analyse zeigte, dass die hMSC negativ für den Oberflächenmarker CD45 und positiv für CD29, CD44, CD73 und CD105 sind, welche bisher als Marker für hMSC beschrieben und zur Phänotypisierung verwendet wurden. HUVEC hingegen sind negativ für die Oberflächenmarker CD34 und CD45 und positiv für den endothelialen Marker CD31 (Abbildung 6 und Tabelle 3).

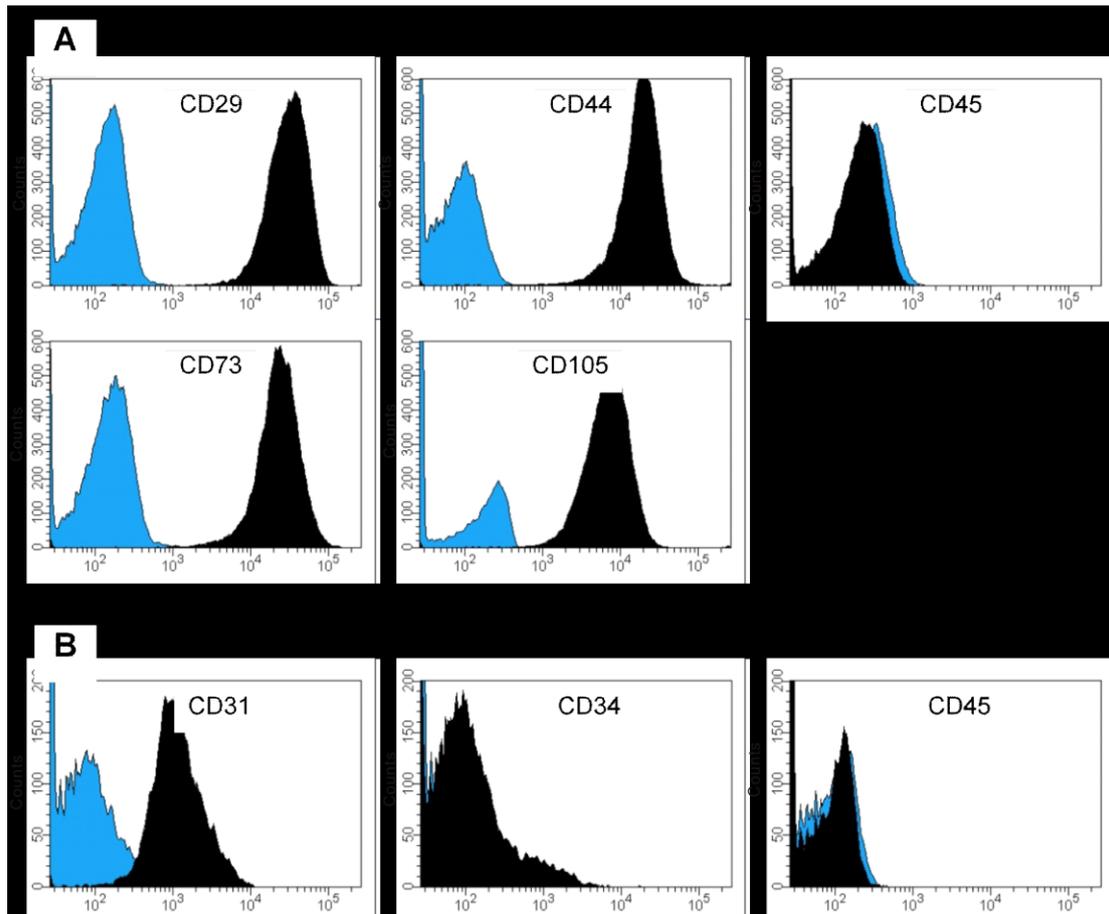


Abbildung 6: Phänotypische Charakterisierung mittels Durchflußzytometrie (14). Histogramme (Antikörper-Signal – schwarz; Isotyp-Kontrolle – blau) typischer Antigene für hMSC (A) und HUVEC (B). Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Elsevier (Copyright © 2011 Elsevier)

Tabelle 3: Immunphänotypische Analyse

Antikörper	hMSC	Antikörper	HUVEC
CD29	97.5 ± 1.4	CD31	81.3 ± 1.3
CD44	97.2 ± 1.4	CD34	31.1 ± 1.4
CD45	0.3 ± 0.1	CD45	0.3 ± 0.0
CD73	98.1 ± 0.8		
CD105	97.8 ± 0.5		

n=4; Mittelwert [%] ± SE

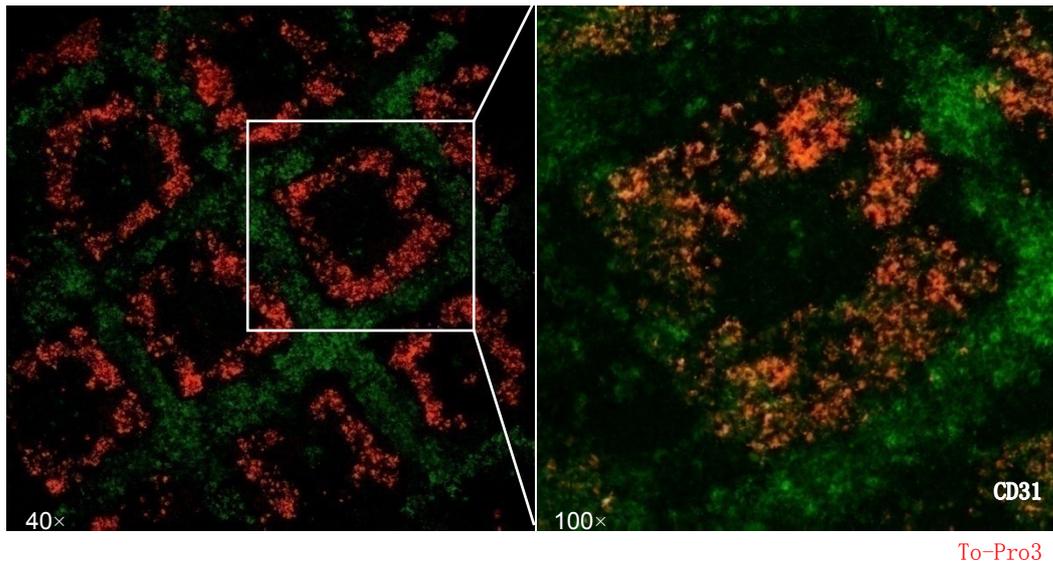


Abbildung 7: Repräsentative Immunfluoreszenz-Mikroskopie-Aufnahme (14) 24 Stunden nach LIFT. HUVEC (grün) und hMSC (rot) sind in einer kapillarähnlichen Gitterstruktur angeordnet. Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Elsevier (Copyright © 2011 Elsevier)

3.2 Zellbesiedlung *in vitro*

HUVEC und hMSC wurden mittels LIFT erfolgreich auf einen PEUU-*Cardiac-patch* überführt. Die Abbildung 7 stellt eine repräsentative Immunfluoreszenz-Mikroskopieaufnahme dar, in der die Anordnung der HUVEC (grün **CD31**) und hMSC [3] in einem kapillarähnlichen Muster erkennbar ist. Die Aufnahme zeigt, dass es möglich ist, spezifische Gefäßstrukturen aus verschiedenen Zellarten herzustellen und diese Zellen durch das LIFT-Verfahren präzise anzuordnen. Ein großer Teil der HUVEC scheint nach achttägiger Kultivierung in dem vordefinierten Muster miteinander verbunden zu sein. Im Gegensatz dazu ist keine Bildung eines Netzwerks auf den Patches erkennbar, auf denen die Zellen zufällig ausgesät wurden (Abbildung 8 B).

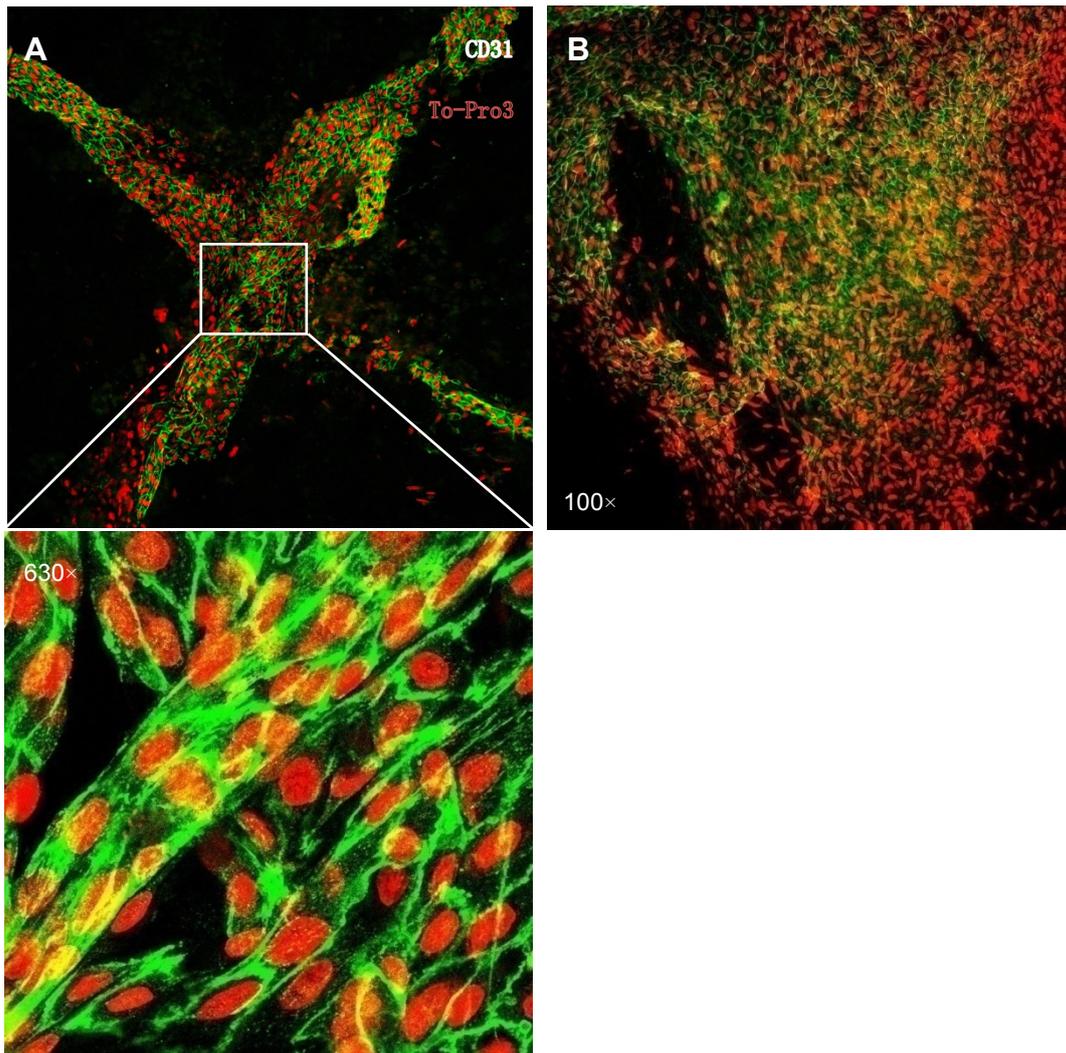


Abbildung 8: Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der HUVEC/hMSC-cokulturen 8 Tage nach Zellaussaat mit Vergrößerung von A nach C. Beginnende Gefäßformierung in der simulierten Gitterstruktur nach LIFT-Besiedlung. (A), Ohne LIFT proliferieren die Zellen, zeigen jedoch noch keine Gefäßformierung (B). Rot=Zellkerne, Grün=Muskelfaser (14). Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Elsevier (Copyright © 2011 Elsevier)

Zunächst wurden hMSC mit PKH26 (SIGMA-Aldrich, St. Louis, USA) vorgefärbt und die Patches mit polyklonalem goat-anti-Pecam-1 (Santa Cruz Biotechnology) 24 Stunden nach LIFT angefärbt, um sie von den HUVEC unterscheiden zu können, welche gitternetzähnlich angeordnet sind.

3.3 Herzfunktion acht Wochen nach Myokardinfarkt

Die Druckanstiegsgeschwindigkeit dp_{max} in der LIFT-Gruppe war mit 6144 mmHg/s signifikant größer als die der Vergleichsgruppe MIP, welche Werte von 4333 mmHg/s erreichten. Dieser relative Unterschied blieb auch unter Stressbedingungen bei allgemein erhöhten absoluten Werten bestehen. In der vorliegenden Arbeit stieg auch die Auswurffraktion der LIFT-Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen, die mit einem *Cardiac-Patch* behandelt wurden, sowohl unter Normalbedingung als auch unter Stressbedingung (hier allerdings bei allgemein erhöhten absoluten Werten). Die Relaxationszeit τ war in der LIFT-Gruppe im Vergleich zu allen anderen Vergleichsgruppen unter Normal- und unter Stressbedingungen verkürzt. Im Vergleich mit der MIC-Gruppe betrug diese Verkürzung in beiden Fällen 11% bis 13 %. Die im linken Ventrikel gemessene Kontraktilität war in der LIFT-Gruppe zwar im Vergleich zu der MIP Gruppe statistisch signifikant erhöht, aber nicht zu den anderen Gruppen mit *Cardiac-Patch*. Diese Ergebnisse deuten auf eine signifikante Verbesserung der Herzfunktion in der LIFT-Gruppe im Vergleich zu der MIP Gruppe, aber nicht für die anderen Gruppen hin (Abbildung 8).

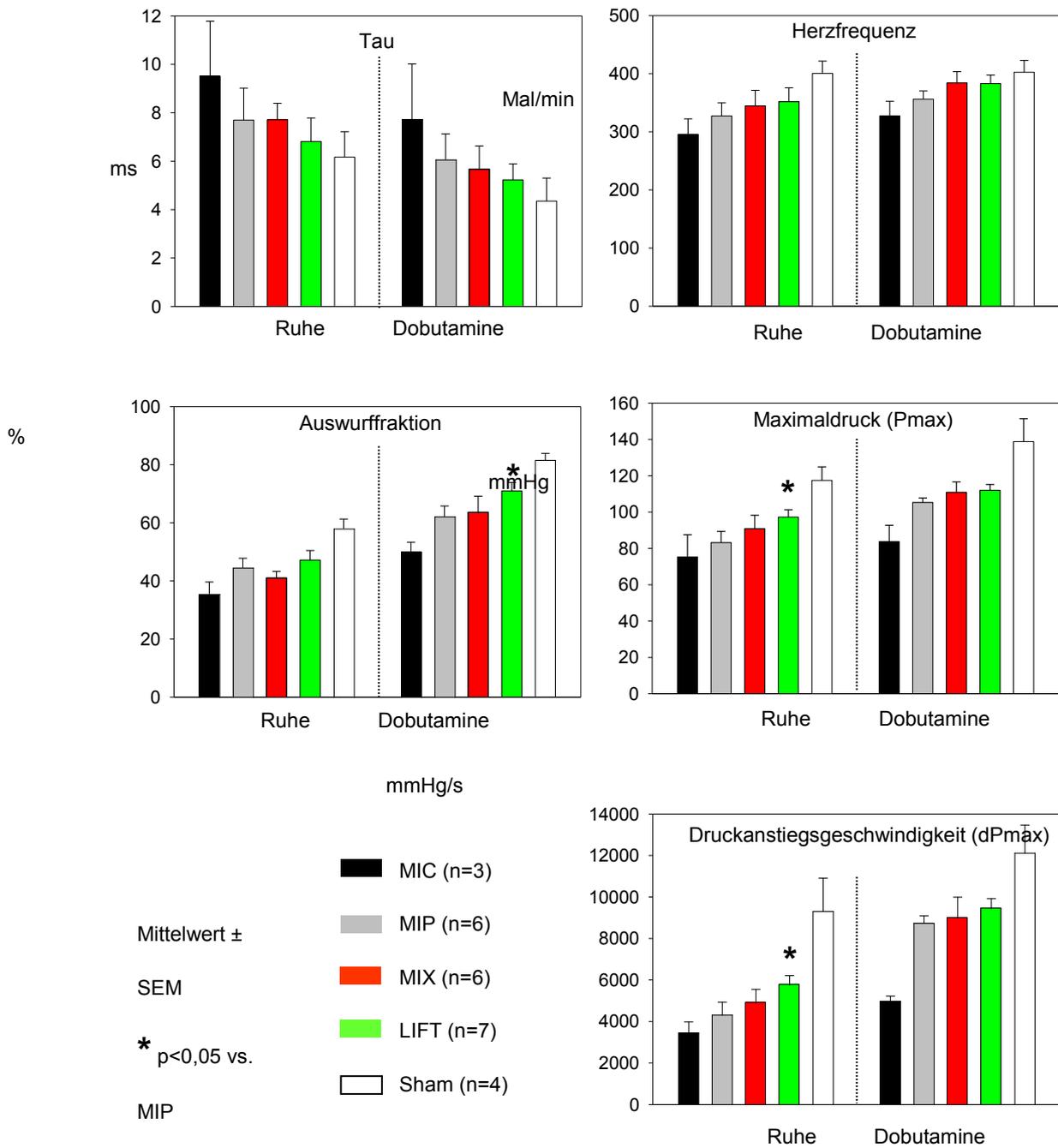


Abbildung 9: Herzpumpfunktionsmessung 8 Wochen nach MI. Die im linken Ventrikel gemessene Kontraktilität ist für verschiedene Funktionsparameter bei einer Cardiac-Patch-Behandlung mit LIFT-Besiedlung teilweise signifikant verbessert im Vergleich zur Therapie mittels unbesiedelter Patch-Matrix (MIP) (14). Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Elsevier (Copyright © 2011 Elsevier)

3.4 Wanddickenbestimmung nach permanenter RIVA-Ligation

Die Auswertung der horizontalen Sirius Red / Fast Green gefärbten Gewebeschnitte wurde mittels digitaler Computer-Planimetrie durchgeführt. Im Sirius Red positiven Bereich handelte es sich um das Infarktareal; im Fast Green positiven Bereich um das überlebende Myokard. Dabei konnte eine Zunahme der Fläche des Narbengewebes ermittelt werden. Die permanente RIVA-Ligatur führte in allen Vergleichsgruppen zu einem transmuralen MI. Die mittlere Infarkt wanddicke zeigte zwischen der MIP-Gruppe (Zunahme von 93 %) und den beiden Gruppen, die *Cardiac Patches* mit Stammzellen (MIX und LIFT) erhielten (Zunahme von 115 % und 116 %), keine signifikante Zunahme. Zwischen der MIX- und der LIFT-Gruppe konnte keine signifikante Veränderung nachgewiesen werden (Abbildung 10).

Zwischen den Gruppen mit Patch-Therapie ist kein signifikanter Unterschied in der Wanddicke des Infarktbereichs zu erkennen. In der LIFT/MIX-Gruppe hat die Wanddicke im Vergleich zur MIP-Gruppe statistisch nicht signifikant zugenommen.

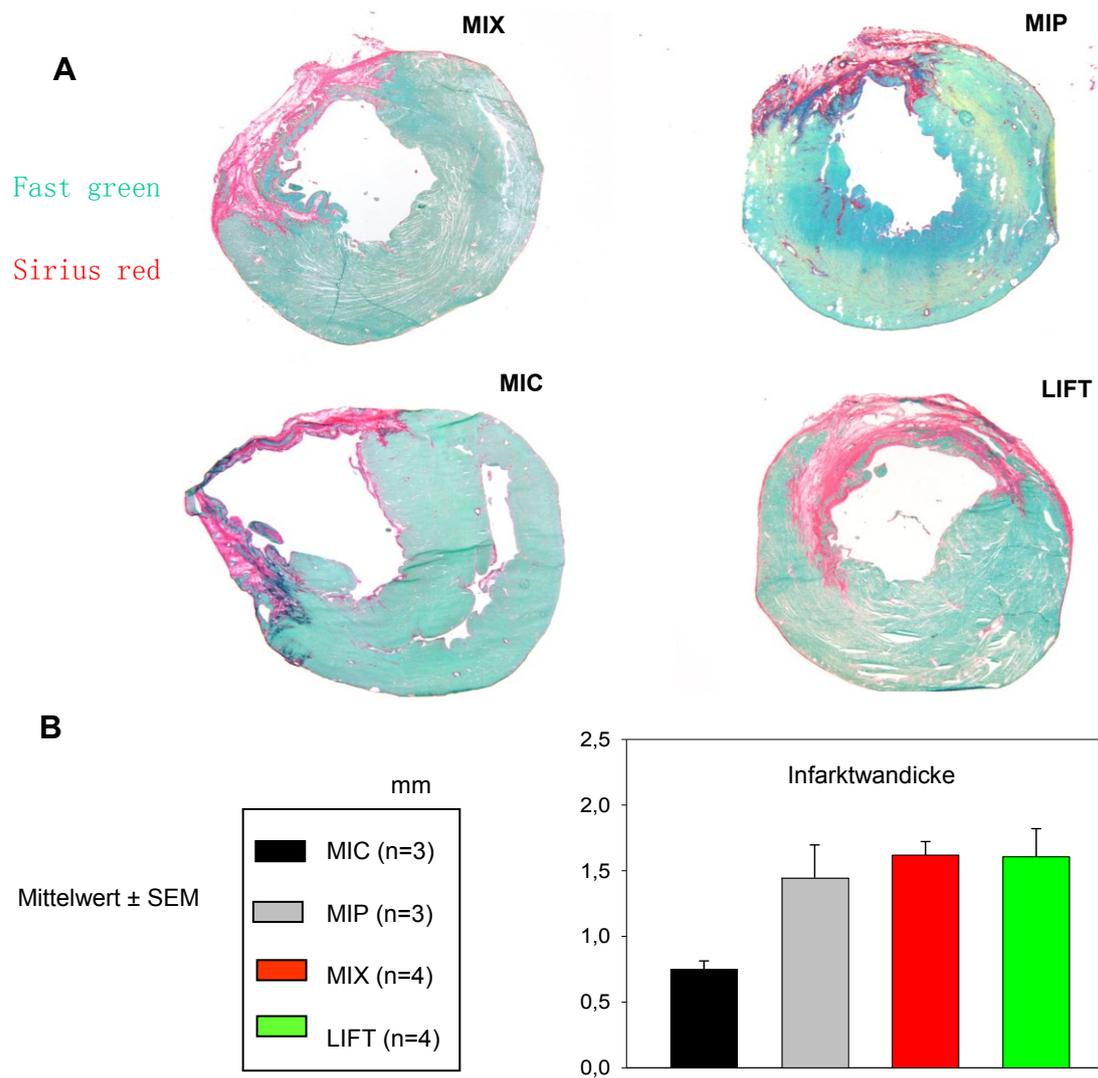


Abbildung 10: Infarkt wanddicke 8 Wochen nach MI. Vitale Myokardiozyten in Fast Green Färbung und Sirius-Red-Färbung die Kollagenablagerung in Myokardinfarktgebiete bei Querschnitten am Rattenherz zeigen (A). Die Auswertung der Zunahme der Wanddicke a Wochen nach MI zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den LIFT und MIP Therapiegruppen (B) (14). Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Elsevier (Copyright © 2011 Elsevier)

3.5 Fibrosebestimmung

Der akute MI des Linksventrikels führt zu einem massiven plötzlichen Gewebeausfall aufgrund von Zellverlust durch Nekrose und Apoptose und kann nur unzureichend durch Granulationsgewebe und Narbenbildung kompensiert werden. Die Reparationsphase führt zur Narbenbildung (Kollagenetzwerk) in dem durch die Ischämie betroffenen Areal, das unter Druck/Volumen-Belastung und infolge eines massiven Myokardverlustes progressiv verdünnt wird [37]. Das überlebende kontrahierende Herzgewebe im Nichtinfarktbereich ist gezwungen, die Arbeit des ausgefallenen, nicht kontrahierenden, absterbenden Gewebes mitzuleisten. In der späten Remodelingsphase kommt es zu einer exzessiven Ablagerung von Kollagen im kardialen Interstitium. Diese kompensatorischen Mechanismen bedingen die Dilatation des Ventrikels, Myokardhypertrophie und kontinuierliche Ausbreitung des Infarktareals und führen schließlich zur chronischen Herzinsuffizienz. Das kardiale Remodeling ist ein Zusammenspiel von Myokardfibrose mit Entzündungsprozessen und Hypertrophie, sowie Apoptose von Myokardzellen. Die Auswertungen der horizontalen Sirius Red / Fast Green gefärbten Gewebeschnitten wurde wie schon bei der Analyse der Wanddicke mittels digitaler Computer-Planimetrie im Infarktgrenzbereich durchgeführt. Zwischen den MIP-, MIX- und LIFT-Gruppen konnte keine signifikante Veränderung der Kollagenablagerung im Infarktgrenzbereich festgestellt werden (Abbildung 11).

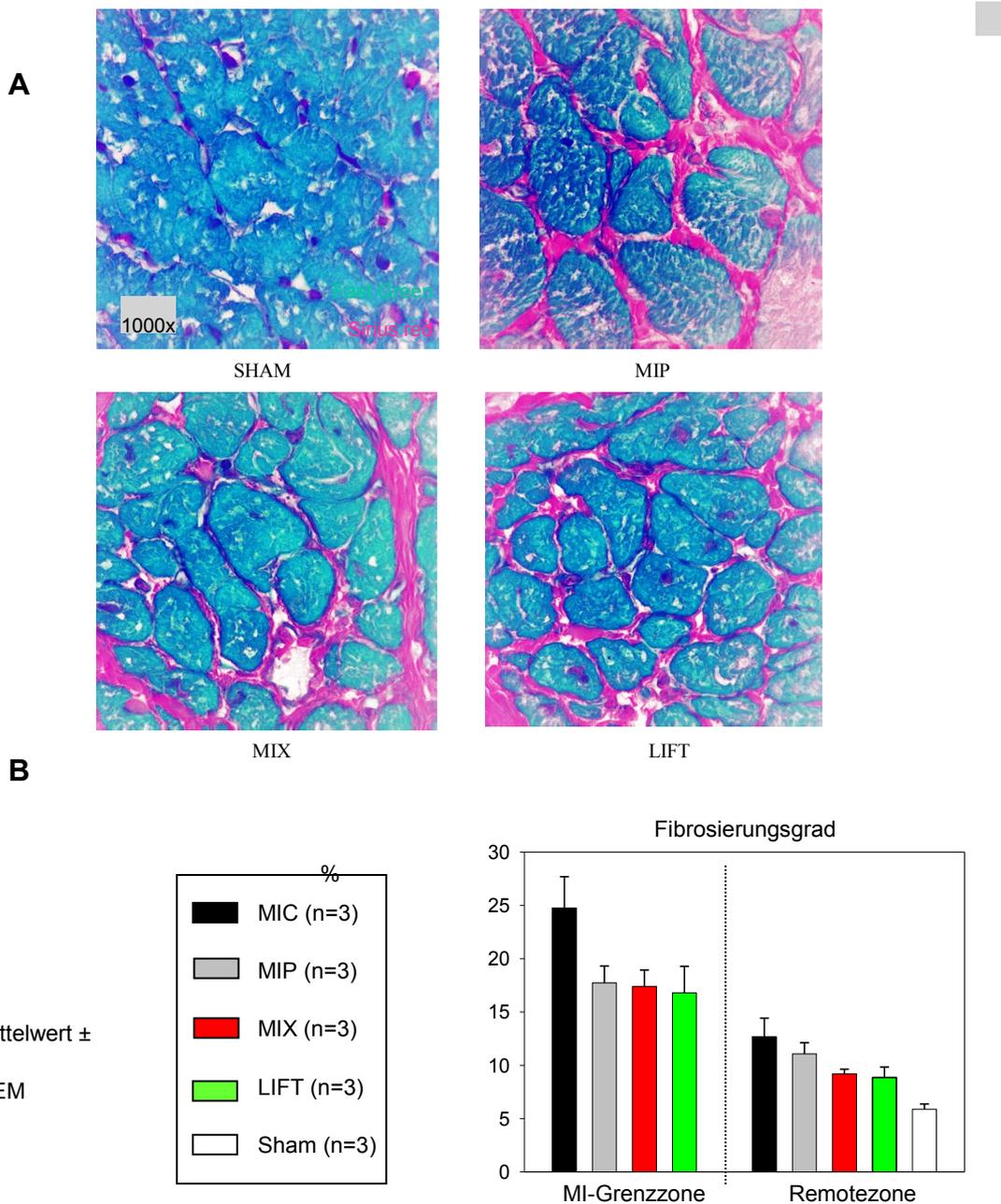


Abbildung 11: Fibrosierungsgrad 8 Wochen nach MI. Vitale Myokardiozyten in der Fast green Färbung und Kollagenablagerung als Sirius-Red-Färbungen im Infarktgrenzbereich (A). Die Auswertung der Abnahme der Kollagenablagerung nach Patch-Implantation zeigt acht Wochen nach MI keinen signifikanten Unterschied zwischen den Therapiegruppen (B) (14). Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Elsevier (Copyright © 2011 Elsevier)

3.6 Kapillardichtebestimmung

Während der extrakorporalen Perfusion des Herzens mit Krebs-Henseleit Puffer-Lösung konnten Kontraktionen des Gewebes beobachtet werden, die unter der Perfusion mit Ca^{2+} -freier Krebs-Henseleit Puffer-Lösung sistierten. Da Tomato Lectin spezifisch an N-acetylglucosamine-Oligomere auf der Oberfläche von Endothelzellen bindet [8], können dadurch im verbundenen Gefäßsystem Endothelzellmembranen markiert werden. Die Gewebeschnitte wurden fluoreszenzmikroskopisch bei 630-facher Vergrößerung analysiert. Tomato Lectin markierte Kapillaren im Infarktgrenzbereich wurden ausgezählt und die Anzahl der Kapillaren pro Hochleistungsfeld (HPF) dokumentiert. In der LIFT-Gruppe war die Kapillardichte im Infarktgrenzbereich ($21,23 \pm 1,52$ Kapillare pro HPF) signifikant höher, als in der MIP-Gruppe ($15,75 \pm 2,07$ Kapillare pro HPF) (Abbildung 12).

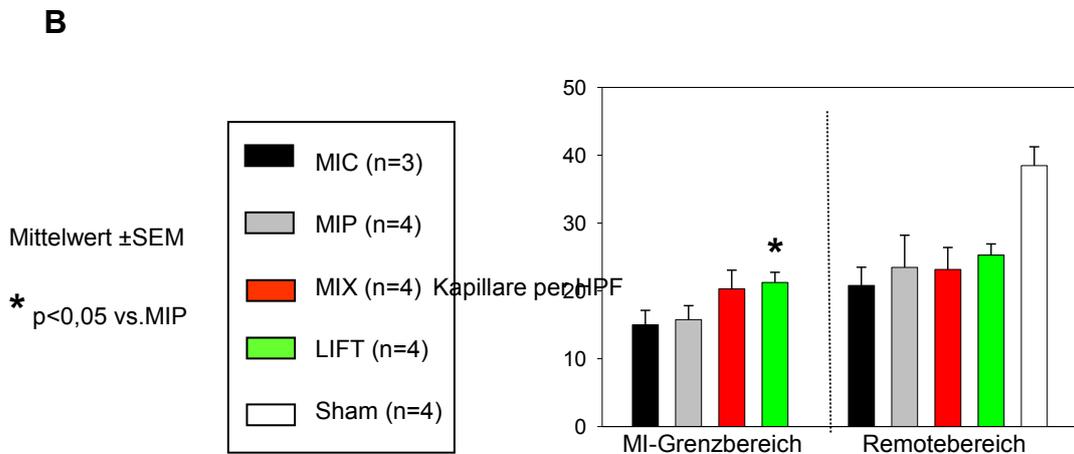
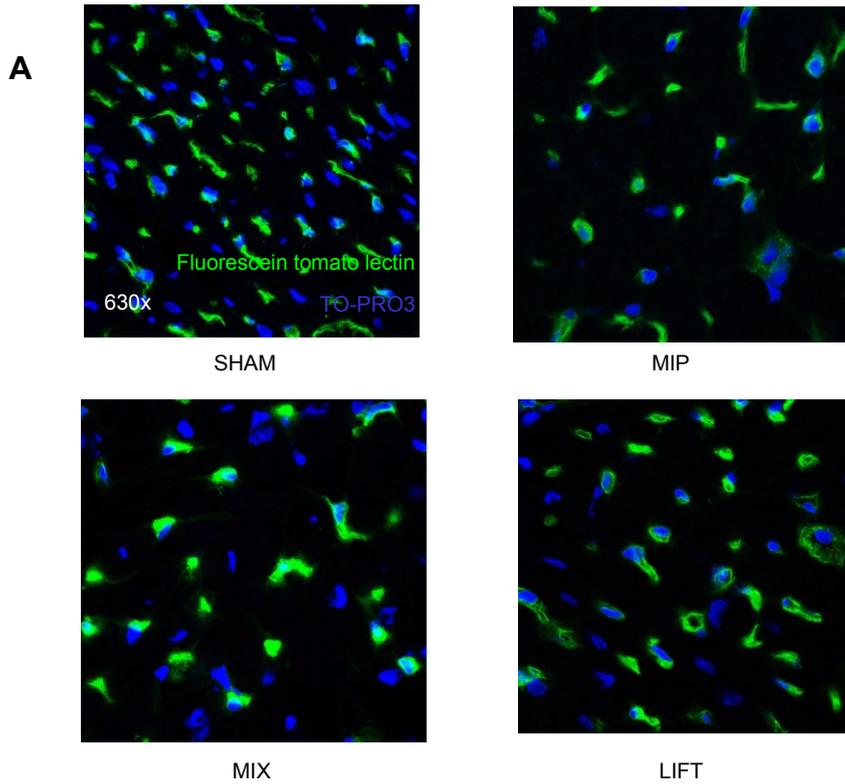


Abbildung 12: Kapillardichte 8 Wochen nach MI. Repräsentative Fluorescein Tomato Lectin-Färbungen (grün) sowie To-Pro3 Färbungen (blau) im Mykardinfarktgrenzbereich (A). Signifikant höhere Kapillardichte im Mykardinfarktgrenzbereich nach Implantation einer LIFT-besiedelten Patch-Matrix 8 Wochen nach MI im Vergleich zur Therapie mittels unbesiedeltem Patch (B) (14). Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Elsevier (Copyright © 2011 Elsevier)

3.7 Zellinfiltration im PEUU-Cardiac-Patch

Durch Fluoreszenzfärbung des humanen nukleären Antigens konnte eine Infiltration von Zellen (hMSC und HUVEC) im Myokardinfarktgrenzbereich der LIFT- und der MIX-Gruppe zwischen der Patch-Innenseite und dem Epimyokard acht Wochen nach MI gezeigt werden (Abbildung 12). In der LIFT-Gruppe gelang der Nachweis sogar in den funktionellen Kapillargefäßsystemen, was auf eine Besiedlung des *Cardiac Patch* im Infarktbereich schließen lässt (Abbildung 13 und 14).

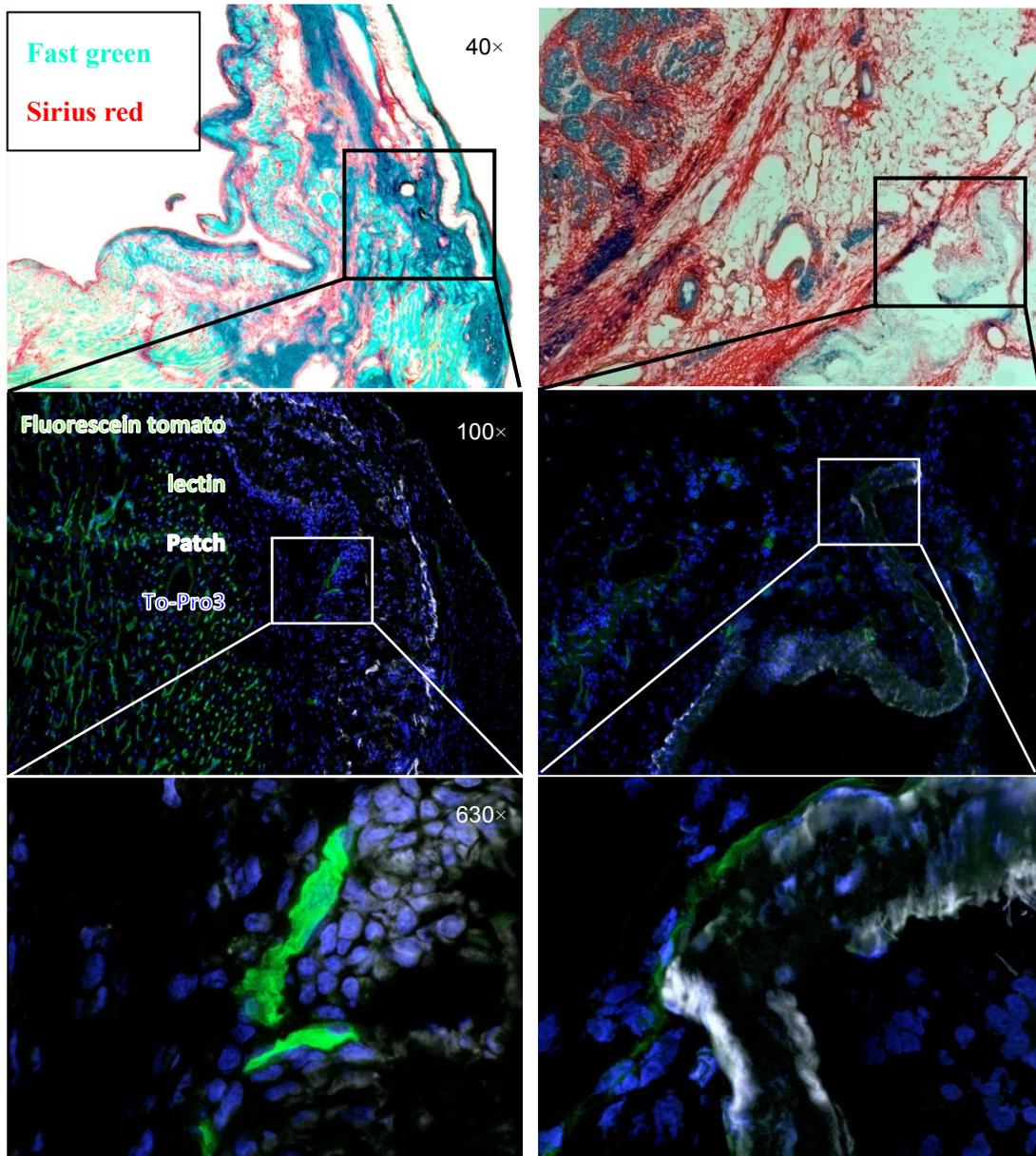


Abbildung 13: Zell-Infiltration der Cardiac-Patch-Matrix. Repräsentative Färbungen der Infarkt Narbe zeigen infiltrierte Zellen mit To-Pro 3 Färbungen(blau) sowie Blutgefäße mit Fluorescein Tomato Lectin Färbungen (grün) in der Patch-Matrix (weiß) acht Wochen nach MI (14). Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Elsevier (Copyright © 2011 Elsevier)

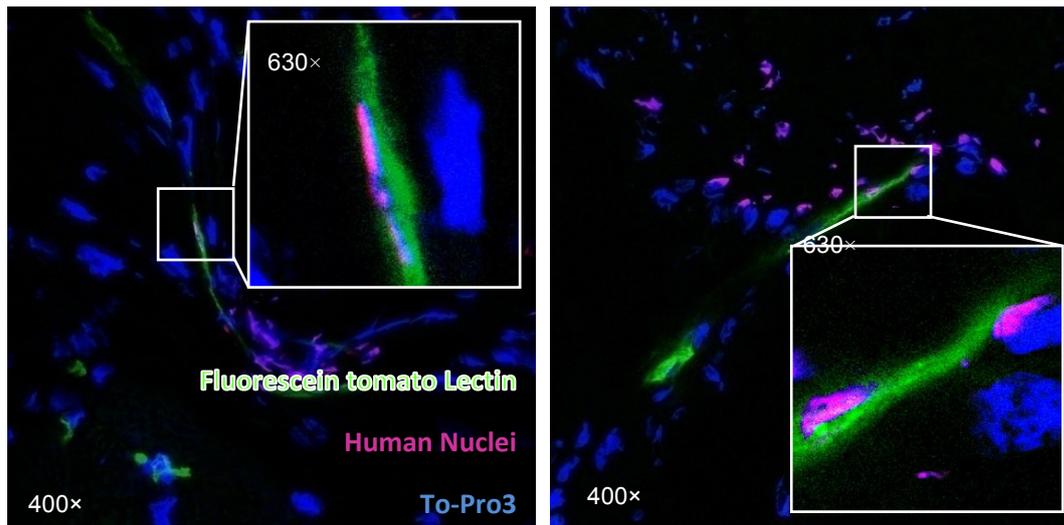


Abbildung 14: Humane Zellen unter immunohistochemischer Färbung für CD 31 (lila) in Co-Lokalisation mit funktionellen Blutgefäßen. Repräsentative Fluorescein Tomato Lectin Färbungen in grün im Infarktbereich zeigen nach Implantation einer LIFT-besiedelten Patch-Matrix 8 Wochen nach MI die Co-Lokalisation von humanen Zellen und infiltrierten Blutgefäßen der Ratte, was für eine direkte Beteiligung humaner Zellen an der Neovaskularisation nach MI spricht (14). Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Elsevier (Copyright © 2011 Elsevier)

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass unter Zuhilfenahme des LIFT-Verfahrens sich HUVEC und hMSC in einer definierten Anordnung auf einem *Cardiac Patch* ansiedelten. HUVEC und hMSC wurden aus peripherem Blut und Knochenmark isoliert, kultiviert und danach in einem präzisen Gittermuster auf einem *Cardiac Patch* aus PEUU transferiert. Als experimentelle Grundlage zur Anwendung dieser Methode diente die operative Induktion eines MI am Tiermodell der RNU-Ratte. Hierbei konnte der *Cardiac Patch* mit vitalen, implantierten Zellen die Remodelierung im Linksventrikel und die Dysfunktion des Herzens nach MI deutlich beeinflussen und die Regeneration verbessern. Die humanen Stammzellen und die Endothelzellen im präzise angeordneten Schachbrettmuster konnten die Angiogenese an der Borderzone, die der Infarktzone angrenzt, erhöhen und funktionelle neovaskuläre Verbindungen im Patch ausbilden.

4.1 Intraoperative und postoperative Mortalität nach Myokardinfarkt

Es wurden insgesamt 49 RNU-Ratten operiert, wovon 14 Tiere vor Studienende verstarben. 35 Tiere (71,4 %) wurden in die Statistik aufgenommen. Die während der Operation waren intraoperative, ventrikuläre Tachykardien und Blutungen aufgrund der Koronarruptur, sowie Überdosierung der Narkose. In der vorliegenden Arbeit betrug die Mortalität der Tiere 28,6 %. Von den Ratten überlebten 79 % zwei Wochen und 71,5 % acht Wochen nach dem Infarkt. Andere Studien zeigten eine ähnliche Mortalität von 28 % bei Mäusen zwei Wochen nach MI [3]. Akute Herzinsuffizienz oder Koronarruptur als Ursache für den postoperativen Tod ist unwahrscheinlich. Die vermutliche Todesursache dürften iatrogene Keime sein, die intraoperativ am Thorax bzw. postoperativ durch die Wunden übertragen wurden und bei den immungeschwächten Ratten eine septische Entzündungsreaktion ausgelöst haben

könnten. In allen Rattenherzen der Versuchsgruppen, die mit einem Patch behandelt wurden, konnte zum Auswertungszeitpunkt ausgeheilte Infarktstellen im transmuralen Linksventrikel gefunden werden. Makroskopisch konnte in den Herzen keine weiteren, eindeutig pathologischen Veränderungen gefunden werden. Die Biokompatibilität des PEUU-Cardiac-Patch konnte, wie in der Literatur beschrieben, bestätigt werden [13]

4.2 Regionale Kontraktilität und Herzfunktion

Das Herzpumpen lässt sich in zwei Phasen unterteilen, die systolische und diastolische Phase. Die Systole ist die Kontraktions- und Auswurfsphase, während die Diastole die Relaxations- und Füllungsphase darstellt. Die für diese Arbeit relevanten hämodynamischen Parameter des Herzes wurden in beiden Phasen gemessen. Die Werte dp_{max} stellen die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit während der Kontraktionsphase dar. In der vorliegenden Arbeit betrug die Geschwindigkeit des Druckanstiegs in der LIFT-Gruppe etwa 6144 mmHg und war signifikant größer als die der Vergleichsgruppen MIP mit *Cardiac Patch*, aber nicht der Vergleichsgruppen MIX, welche Werte im Bereich von 4333 bis 4922 mmHg erreichten. Auch unter Stressbedingungen (durch Dobutamin induziert) blieb dieser relative Unterschied bestehen, wobei in diesem Fall die absoluten Werte allgemein erhöht waren. Die Werte der Ejection Fraction (EF) geben die Auswurffraktion in der Ejektionsphase an. In der LIFT-Gruppe war dieser Wert im Vergleich zur MIX/MIP/MIC Gruppen unter Normal- und Stressbedingung am höchsten. Gleichzeitig war unter beiden Bedingungen die Relaxationszeit τ am niedrigsten (siehe Abbildung 9).

Mit Ausnahme der Relaxationszeit waren die Werte für die Druckanstiegsgeschwindigkeit, Kontraktilität und Auswurffraktion in der LIFT-Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen teilweise signifikant verbessert. Die lokale Anwendung eines *Cardiac Patch*, der mit Stammzellen unter Verwendung der LIFT-Technologie präpariert wurde, verbesserte offenbar die systolische als auch diastolische

Funktion des linken Ventrikels unter Normal- und Stressbedingung.

Die Infarkt wanddicke wurde acht Wochen nach permanenter RIVA-Ligation mittels digitaler Computer-Planimetrie von Sirius Red und Fast Green gefärbten Gewebeschnitten ausgewertet. Die Zunahme der mittlere Wanddicke des linken Ventrikels war bei der MIX- und der LIFT-Gruppe ähnlich und betrug ca. 116 % (siehe Abbildung 9); bei der MIP-Gruppe lag dieser Wert bei etwa 93 %. In einer analogen Studie wurde am Mausmodell eine Veränderung der Infarkt wanddicke in der ähnlichen Größenordnung (etwa 2,5 bis 2,8 mm) sechs Wochen nach permanenter Ligation beobachtet [25]. Nach Ablauf des gesamten achtwöchigen Versuchszeitraums konnten keine Unterschiede in der Infarkt wanddicke weder zwischen den beiden Gruppen mit Stammzellen (MIX und LIFT) und ohne Stammzellen (MIP) festgestellt werden, noch zwischen der MIX- und der LIFT-Gruppe selbst. Auch konnte im Vergleich zur Placebo-Gruppe in keinem Fall eine signifikante Zunahme gezeigt werden [13]. Eine Erklärung ist, dass nicht nur die applizierten Stammzellen (z.B. HUVEC und hMSC), sondern auch der *Cardiac Patch* selbst eine Rolle spielt. Dies kann durch eine Studie in Ratten belegt werden, in denen ebenfalls ein solches Polymergerüst als Wiederbesiedelungs substrat eingesetzt wurde und eine Verbesserung der Herzfunktion und des kardialen Remodelings nach MI gezeigt werden konnte [10].

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass ein mit HUVEC und hMSC bedruckter PEUU-Cardiac-Patch nicht nur eine Trägerstruktur bietet, die den Zellen erlaubt in das geschädigte Herzgewebe hineinzuwachsen, sondern auch die Angiogenese fördert, welche die verbesserte myokardiale Durchblutung und Herzfunktion bedingt.

4.3 Kapillardichte und Ursprung

In dieser Arbeit wurde mit dem LIFT-Verfahren eine neue Methode zur gemeinsamen, definierten Anordnung von Endothel- und Stammzellen zur Herstellung

funktionsfähiger PEUU-Cardiac-Patches vorgestellt. Fujimotor *et al.* (2007) [13] zeigten, dass dieser Patch in Versuchen an Ratten als kardiale Therapie nach MI hilfreich sein kann. Eine wesentliche Herausforderung hierbei ist allerdings, ein stabiles Gefäßsystem zu konstruieren bzw. zu etablieren. Eine Vielzahl von Studien beschäftigte sich mit der Frage, wie und ob Neoangiogenese aus Progenitorzellen möglich ist. Normalerweise ist das neu entstandene Gefäßsystem unreif und instabil [21]. Es konnte gezeigt werden, dass die Koimplantation von vaskulären Endothelialzellen und mesenchymalen Vorläuferzellen die Stabilität der Neovaskularisation verstärkt [43]. Um das Transplantat einwachsen lassen zu können und um eine funktionsfähige Neovaskularisation sicherzustellen, wurde die Co-Printing-Strategie zur Förderung der Vaskularisation verwendet. Hierbei wurden HUVEC und hMSC isoliert, kultiviert und im Verhältnis von 3:1 in einem definierten Schachbrettmuster auf einem PEUU-Cardiac-Patch gedruckt. *In vitro* Vorversuche zeigten, dass die durch das LIFT-Verfahren in Schachbrettmuster angeordneten Endothelzellen (Abbildung 4A) nach wenigen Tagen kapillarnetzähnliche Strukturen ausbilden und damit die Gefäßformierung beschleunigen (Abbildung 4B). Die mit HUVEC und hMSC bedruckten *Cardiac Patches* wurden nach RIVA-Ligatur in das Myokardium des Versuchstiers implantiert.

In dieser Arbeit wurde in der LIFT-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollgruppen ein Kapillardichteanstieg in der Infarktgrenzzone und der Nichtinfarktzone gemessen. In diesen funktionellen Kapillaren konnten humane Zellen über die Expression des humanen Oberflächenmarkers CD31 identifiziert werden und weisen somit auf einen möglichen humanen Ursprung dieser Gefäße hin.

Wie in Abbildung 12 zu sehen, betrug die Anzahl an Kapillaren pro Flächeneinheit in der Sham-Gruppe ca. 38. In den Gruppen mit behandeltem MI im Vergleich mit der Placebo-Gruppe nahm die Kapillardichte in der Infarktgrenzzone und der Nichtinfarktzone um etwa 35-45 % ab und war damit statistisch signifikant geringer.

Das lässt sich dadurch erklären, dass größere MIs einen stärkeren Rückgang der Kapillardichte verursachen als kleinere Infarkte [1].

In der vorliegenden Arbeit betrug die Kapillardichte in der LIFT-Gruppe $21,23 \pm 1,52$ in der Infarktgrenzzone und etwa 25 in der Nichtinfarktzone, während in den anderen Gruppen die Werte bei $15,75 \pm 2,07$ Kapillaren pro HPF lagen. Weiterhin fanden wir in den Herzen der LIFT-Gruppe eine signifikant erhöhte Angiogenese bzw. funktionsfähige Neovaskularisation. Diese Beobachtung könnte darauf zurückzuführen sein, dass HUVEC und hMSC durch den Einsatz des LIFT-Verfahrens so angeordnet wurden, dass eine enge Zellinteraktion untereinander gewährleistet wird. Gegenüber anderen Zellapplikationen bietet LIFT zudem auch noch weitere Vorteile, wie eine Verbesserung der Vitalität, Funktionalität und Ausdifferenzierungskapazität.

4.4 Kritik der Methode

4.4.1 Operative Induktion des Myokardinfarkts/Herzinsuffizienz

Das Herz der Ratte wird wie das des Menschen durch zwei Koronararterien versorgt, die der ersten Verzweigung der Aorta ascendens entspringen. Die linke Koronararterie der Ratte (die dem RIVA des Menschen entspricht) läuft auf der linken Seite des Herzens bis Herzspitze entlang. Bei den meisten Ratten wird der linke Ventrikel durch die linke Koronararterie versorgt, bei einem geringeren Anteil übernimmt die rechte Arterie diese Aufgabe.

Durch die Ligatur der linken Koronararterie in ca. 2-3 mm Entfernung zum linken Vorhof wurde ein Infarkt im linken Ventrikel der Ratte induziert, wie er auch häufig beim Menschen vorkommt. Eine Okklusion der Koronararterien führte zu einem großen, transmuralen Infarkt in den anterolateralen, posterioren und apikalen Bereichen des linken Ventrikels [27], [19].

4.4.2 Zellapplikationsmethode

Aus herzchirurgischer Sicht ist eine intramyokardiale oder perikardiale Applikation von Zellen im Rahmen einer Bypassoperation die bevorzugte Methode. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Applikationsmethode etabliert, in der weltweit zum ersten Mal mit Hilfe des LIFT-Verfahrens vitale Zellen auf einen Cardiac-Patch übertragen und dieser in der Ratte zur Behandlung eines MI verwendet wurde. Es wurde nicht nur die Machbarkeit und Sicherheit, sondern auch die Zuverlässigkeit dieser Methode gezeigt.

In den letzten Jahren ist die Anwendung der Stammzelltherapie zur Regeneration nach einem MI in den Fokus der Forschung geraten. Verschiedene tierexperimentelle Studien mit unterschiedlichen Applikationsmethoden wurden weiterentwickelt, bis die heutzutage klinisch angewandte Form der intramyokardialen Injektion und intravenösen bzw. intrakoronaren Applikation erreicht wurde. Damit konnten Zellen in genügend großer Anzahl in das vorgeschädigte Myokard zur Regeneration transferiert werden [16], [44].

Bei Balsam *et al.*, 2004 [2] konnten beispielsweise zehn Tage nach einer intramyokardialer Stammzellinjektion lediglich vereinzelt injizierte Zellen nachgewiesen werden. In einer ähnlichen Studie von Ciulla *et al.*, 2007 [8] konnten sieben Tage nach intravenöser Gabe nur acht Zellen in Gewebeschnitten des Myokard aus dem Infarktbereich gefunden werden. Die Studien von Orlic *et al.*, 2001 [33] und Murry *et al.*, 2004 [32] könnte eine Erklärung hierfür liefern. Zellinjektionen in das vorgeschädigte Myokard bei einem kleinen Tierherz mit dünner Wanddicke des Linksventrikels am Infarkttrand und einer Tierherzfrequenz von ca. 450 Schlägen pro Minute könnten eine gleichmäßige Zellverteilung erlauben. In der Studie von Gao *et al.*, 2001 [15] konnten Zellen nach intravaskulärer Applikation hoher Mengen in Lunge und Niere trotz des Homing-Effekts nachgewiesen werden.

4.5 Apoptose und Zellmigration

Endothelzellen spielen in der hämatopoetischen Nische eine wichtige Rolle und haben die Eigenschaft, mit Stammzellen zu interagieren und darüber hinaus in vivo weiter auszudifferenzieren und zu proliferieren. Wie in vielen vorangegangenen Studien beschrieben, konnten expandierte Endothelialzellen in den bisherigen Zelltransplantationsverfahren nur ungenügend angewendet werden [45], [35].

In dieser Arbeit wurden zuerst expandierte HUVEC und hMSC über die Zellmorphologie und mittels Durchflusszytometrie identifiziert bzw. isoliert und anschließend im Tierversuch verwendet. Es wurde in vivo untersucht, ob eine Kokultur von HUVEC und hMSC als Grundlage zur Verbesserung der Überlebensrate und der Neoangiogenese verwendet werden kann. Es wurde durch die vorliegende Untersuchung gezeigt, dass Endothelzellen, wenn sie mit Stammzellen kokultiviert werden, die zelluläre Überlebensrate verbessern können. Außerdem könnten hMSC große Menge an Mediatoren in die extrazelluläre Matrix abgeben, in welcher der *Cardiac Patch* integriert ist, wodurch das Überleben der schachbrettartig angeordneten, strukturgebenden HUVEC und damit des naszierenden Herzgewebes verbessert würde.

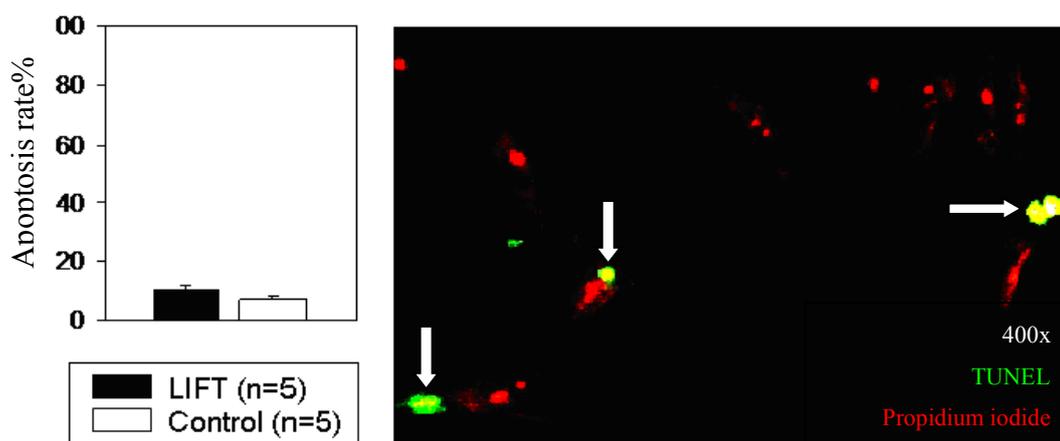


Abbildung 15: Tunel Färbung (Immunhistochemisch) apoptotischer Zellkerne in grün dargestellt mit Kennzeichnung durch weiße Pfeile. In Rot dargestellt sind vitale Zellkerne. Die Apoptosisrate ist in der Untersuchungs- und Kontrollgruppe identisch

5 Zusammenfassung

Die Laser Induced Forward Transfer Technologie (LIFT) hat sich sowohl für Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) als auch für humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) Zellen in einer ersten Phase bewährt. Die Überlebensrate der transferierten Zellen lag bei ca. 90 % und die Proliferationsrate hatte eine gute Präsenz. Das in dieser Studie verwendete biologisch abbaubare Trägermaterial Polyurethanharnstoff (PEUU) erzielt im Tierversuch gute Ergebnisse, dennoch stehen derzeit verschiedene Trägermaterialien auf dem Prüfstand. Hierzu gehören Polyester carbonate urethane Urea und Polycarbonate urethane Urea, welches sich sehr langsam im Organismus abbaut. Ebenfalls sind erste Entwicklungsschritte zu einem *Cardiac Patch* auf der Basis einer Kollagen Typ I Matrix als azelluläres Implantat gemacht worden, andere Verfahren sind Collagen Cell Carrier der Firma oder Collagen Sponge. Bisher konnte kein Material/Verfahren als Goldstandard etabliert werden. Die Vor- und Nachteile ergeben sich für die Kriterien enddiastolisches Volumen, Kapillardichte, hämodynamische Funktionsbestimmung, Infarkt wanddicke, Fibrosebestimmung. Ein weiteres Kriterium für die erfolgreiche Migration ist der Grad der Elastizität des Materials. Die PEUU *Cardiac Patches* haben die größte Steifigkeit, was die Migrationszeit der Stammzellen und den Umbau- bzw. Regenerationsprozess möglicherweise verlangsamt. In der vorliegenden Studie wurde die in der Literatur beschriebene biologische Absorbierung der PEUU-Matrix nicht bestätigt. Die Einbringung des *Cardiac Patches* kann auf unterschiedliche Weise geschehen, wobei eine Fixierung mittels Naht mögliche zusätzliche ungünstige Entzündungen induziert kann, wohingegen die Fixierung mittels Fibringels günstigere Prognosen aufweisen. Außerdem ist das Problem der Herstellung von 3-D Konstruktionen trotz einiger erfolgsversprechender Anfänge noch nicht gelöst. Hierzu kann die LIFT Technologie einen Beitrag leisten. Die in der vorliegenden Studie gewählte Kombination von Endothelzellen und Stammzellen führte zu einer positive Neoangiogenese. Parakrine Mechanismen und Membran-Interaktionen begünstigen bei beiden Zellarten die

Proliferation, wenn sie zusammen kultiviert werden und verbessern so die zelluläre Überlebensrate auf dem Patch bis zu 90 %. Weitere Zellkombinationen wie z.B. Human embryonic und induzierte pluripotent Stammzellen stehen hinsichtlich ihrer gemeinsamen Differenzierungskapazität auf dem Prüfstand. Weitere Studien sind notwendig, das Zell-Verhältnis auf dem Cardiac Patch und die Auswirkungen der Applikationsmethode sowohl auf die Hämodynamik als auch auf den Homing Effekt in der physiologischen Umgebung nach dem MI mit Ischämie und Hypoxie zu evaluieren. Ein Hindernis für den Remodelingprozess besteht in der natürlichen Kontraktionsbewegung des Herzmuskels, welche die Patchanbindung verzögert. Eine Limitation besteht in der Art des Tiermodells, da die Herzfrequenz der Ratte ca. 260 bis 450 Schläge pro Minute hat und der menschliche Organismus im Vergleich hierzu nur ca. 60/Minute. Abgesehen von diesen Herausforderungen, bietet diese Technologie eine große Bandbreite von Anwendungsmöglichkeiten für den klinischen Alltag, die vor allem auch dadurch begünstigt werden, dass die Gewinnung von HUVEC Zellen aus der Nabelschnur von Neugeborenen einfach und kostengünstig zu realisieren ist. Die andere Herausforderung besteht bei dem sich erweiternden Feld des Tissue Engineering darin, reine, also nicht kontaminierte Zellen zu extrahieren, um diese weiterverarbeiten zu können. Hierbei gilt es vor allem Nebenwirkungen zu vermeiden, die z.B. durch Kontamination zur Endokarditis/Perikarditis oder Thrombus Embolisation führen können. Die jetzige Forschung des Tissue Engineerings steckt noch in seinen Kinderschuhen und so ist es bisher unklar wie lange *Cardiac Patches* unabhängig vom Trägermaterial im Körper verbleiben können, da bis noch keine Langzeitstudien vorliegen. Unklar ist in welchen Zeitabständen eine Nachuntersuchung notwendig ist und im klinischen Alltag müsste ein sensibles Monitoring Verfahren entwickelt werden. Jenseits des Laboratoriums wird wahrscheinlich die weitere Forschung die Aufbewahrung von HUVECs in den Fokus nehmen. Ebenso wird die Rolle der autologen Endothelzellen als Therapeutikum als wichtiger Faktor untersucht werden. Diese Therapie könnte vor allem bei Neugeborenen mit einem angeborenen Herzfehler eine entscheidende Rolle spielen.

6 Literaturverzeichnis

1. Anversa P., Palackal T., Sonnenblick E.H., Olivetti G., Meggs L.G., and Capasso J.M., *Myocyte cell loss and myocyte cellular hyperplasia in the hypertrophied aging rat heart*. Circ Res. **67**(4): p. 871-885. 1990.
2. Balsam L.B., Wagers A.J., Christensen J.L., Kofidis T., Weissman I.L., and Robbins R.C., *Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium*. Nature. **428**(6983): p. 668-673. 2004.
3. Bayat H., Swaney J.S., Ander A.N., Dalton N., Kennedy B.P., Hammond H.K., and Roth D.M., *Progressive heart failure after myocardial infarction in mice*. Basic Res Cardiol. **97**(3): p. 206-213. 2002.
4. Bell R.M., Mocanu M.M., and Yellon D.M., *Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion*. J Mol Cell Cardiol. **50**(6): p. 940-950. 2011.
5. Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., and Robey P.G., *Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications*. Stem Cells. **19**(3): p. 180-192. 2001.
6. Bundesamt für Statistik (Statistisches Bundesamt) *Todesursachen*. 2014. <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>. Download 2016
7. Cashman T.J., Gouon-Evans V., and Costa K.D., *Mesenchymal stem cells for cardiac therapy: practical challenges and potential mechanisms*. Stem Cell Rev. **9**(3): p. 254-265. 2013.
8. Ciulla M.M., Ferrero S., Gianelli U., Paliotti R., Magrini F., and Braidotti P., *Direct visualization of neo-vessel formation following peripheral injection of bone marrow derived CD34+ cells in experimental myocardial damage*. Micron. **38**(3): p. 321-322. 2007.
9. Cochain C., Channon K.M., and Silvestre J.S., *Angiogenesis in the infarcted myocardium*. Antioxid Redox Signal. **18**(9): p. 1100-1113. 2013.
10. Davani S., Marandin A., Mersin N., Royer B., Kantelip B., Herve P., Etievent J.P., and Kantelip J.P., *Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model*. Circulation. **108 Suppl 1**: p. II253-258. 2003.
11. Finegold J.A., Asaria P., and Francis D.P., *Mortality from ischaemic heart disease by country, region, and age: statistics from World Health Organisation and United Nations*. Int J Cardiol. **168**(2): p. 934-945. 2013.
12. Fu J.D. and Srivastava D., *Direct reprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes for cardiac regenerative medicine*. Circ J. **79**(2): p. 245-254. 2015.
13. Fujimoto K.L., Tobita K., Merryman W.D., Guan J., Momoi N., Stolz D.B., Sacks M.S., Keller B.B., and Wagner W.R., *An elastic, biodegradable cardiac*

- patch induces contractile smooth muscle and improves cardiac remodeling and function in subacute myocardial infarction.* J Am Coll Cardiol. **49**(23): p. 2292-2300. 2007.
14. Gaebel R., Ma N., Liu J., Guan J., Koch L., Klopsch C., Gruene M., Toelk A., Wang W., Mark P., Wang F., Chichkov B., Li W., and Steinhoff G., *Patterning human stem cells and endothelial cells with laser printing for cardiac regeneration.* Biomaterials. **32**(35): p. 9218-9230. 2011.
 15. Gao J., Dennis J.E., Muzic R.F., Lundberg M., and Caplan A.I., *The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion.* Cells Tissues Organs. **169**(1): p. 12-20. 2001.
 16. Ghodsizad A., Ruhparwar A., Bordel V., Mirsaidighazi E., Klein H.M., Koerner M.M., Karck M., and El-Banayosy A., *Clinical application of adult stem cells for therapy for cardiac disease.* Cardiovasc Ther. **31**(6): p. 323-334. 2013.
 17. Gruene M., Pflaum M., Hess C., Diamantouros S., Schlie S., Deiwick A., Koch L., Wilhelmi M., Jockenhoevel S., Haverich A., and Chichkov B., *Laser printing of three-dimensional multicellular arrays for studies of cell-cell and cell-environment interactions.* Tissue Eng Part C Methods. **17**(10): p. 973-982. 2011.
 18. Guan J., Fujimoto K.L., Sacks M.S., and Wagner W.R., *Preparation and characterization of highly porous, biodegradable polyurethane scaffolds for soft tissue applications.* Biomaterials. **26**(18): p. 3961-3971. 2005.
 19. Icardo J.M. and Colvee E., *Origin and course of the coronary arteries in normal mice and in iv/iv mice.* J Anat. **199**(Pt 4): p. 473-482. 2001.
 20. Jaffe E.A., Nachman R.L., Becker C.G., and Minick C.R., *Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria.* J Clin Invest. **52**(11): p. 2745-2756. 1973.
 21. Jain R.K., *Molecular regulation of vessel maturation.* Nat Med. **9**(6): p. 685-693. 2003.
 22. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., Largaespada D.A., and Verfaillie C.M., *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow.* Nature. **418**(6893): p. 41-49. 2002.
 23. Kawamoto A., Gwon H.C., Iwaguro H., Yamaguchi J.I., Uchida S., Masuda H., Silver M., Ma H., Kearney M., Isner J.M., and Asahara T., *Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia.* Circulation. **103**(5): p. 634-637. 2001.
 24. Kessler P.D. and Byrne B.J., *Myoblast cell grafting into heart muscle: cellular biology and potential applications.* Annu Rev Physiol. **61**: p. 243-282. 1999.
 25. Klopsch C., Furlani D., Gabel R., Li W., Pittermann E., Ugurlucan M., Kundt G., Zingler C., Titze U., Wang W., Ong L.L., Wagner K., Li R.K., Ma N., and Steinhoff G., *Intracardiac injection of erythropoietin induces stem cell recruitment and improves cardiac functions in a rat myocardial infarction model.* J Cell Mol Med. **13**(4): p. 664-679. 2009.

26. Koch L., Kuhn S., Sorg H., Gruene M., Schlie S., Gaebel R., Polchow B., Reimers K., Stoelting S., Ma N., Vogt P.M., Steinhoff G., and Chichkov B., *Laser printing of skin cells and human stem cells*. Tissue Eng Part C Methods. **16**(5): p. 847-854. 2010.
27. Kumar D., Hacker T.A., Buck J., Whitesell L.F., Kaji E.H., Douglas P.S., and Kamp T.J., *Distinct mouse coronary anatomy and myocardial infarction consequent to ligation*. Coron Artery Dis. **16**(1): p. 41-44. 2005.
28. Makino S., Fukuda K., Miyoshi S., Konishi F., Kodama H., Pan J., Sano M., Takahashi T., Hori S., Abe H., Hata J., Umezawa A., and Ogawa S., *Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro*. J Clin Invest. **103**(5): p. 697-705. 1999.
29. Matar A.A. and Chong J.J., *Stem cell therapy for cardiac dysfunction*. Springerplus. **3**: p. 440. 2014.
30. Michiels C., *Physiological and pathological responses to hypoxia*. Am J Pathol. **164**(6): p. 1875-1882. 2004.
31. Mozaffarian D., Wilson P.W., and Kannel W.B., *Beyond established and novel risk factors: lifestyle risk factors for cardiovascular disease*. Circulation. **117**(23): p. 3031-3038. 2008.
32. Murry C.E., Soonpaa M.H., Reinecke H., Nakajima H., Nakajima H.O., Rubart M., Pasumarthi K.B., Virag J.I., Bartelmez S.H., Poppa V., Bradford G., Dowell J.D., Williams D.A., and Field L.J., *Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts*. Nature. **428**(6983): p. 664-668. 2004.
33. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S.M., Li B., Pickel J., McKay R., Nadal-Ginard B., Bodine D.M., Leri A., and Anversa P., *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium*. Nature. **410**(6829): p. 701-705. 2001.
34. Phinney D.G., *Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: implications for cell therapy*. J Cell Biochem. **113**(9): p. 2806-2812. 2012.
35. Radisic M. and Christman K.L., *Materials science and tissue engineering: repairing the heart*. Mayo Clin Proc. **88**(8): p. 884-898. 2013.
36. Reinisch A., Hofmann N.A., Obenauf A.C., Kashofer K., Rohde E., Schallmoser K., Flicker K., Lanzer G., Linkesch W., Speicher M.R., and Strunk D., *Humanized large-scale expanded endothelial colony-forming cells function in vitro and in vivo*. Blood. **113**(26): p. 6716-6725. 2009.
37. Ren G., Michael L.H., Entman M.L., and Frangogiannis N.G., *Morphological characteristics of the microvasculature in healing myocardial infarcts*. J Histochem Cytochem. **50**(1): p. 71-79. 2002.
38. Saurbier B. and Bode C., *[Anticoagulant and thrombolytic agents in acute coronary syndrome]*. Hamostaseologie. **25**(4): p. 333-344. 2005.
39. Scheffner L., *Mechanische und FT-IR Untersuchungen von Mechanische und FT-IR Untersuchungen von Polyurethanharnstoffelastomeren Polyurethanharnstoffelastomeren bei variablen Temperaturen bei variablen Temperaturen*, in *Fachbereich Chemie*, Universität Duisburg-Essen: Essen.

- 2007.
40. Shake J.G., Gruber P.J., Baumgartner W.A., Senechal G., Meyers J., Redmond J.M., Pittenger M.F., and Martin B.J., *Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects*. *Ann Thorac Surg*. **73**(6): p. 1919-1925; discussion 1926. 2002.
 41. Tomita S., Li R.K., Weisel R.D., Mickle D.A., Kim E.J., Sakai T., and Jia Z.Q., *Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function*. *Circulation*. **100**(19 Suppl): p. II247-256. 1999.
 42. Treibel T.A., White S.K., and Moon J.C., *Myocardial Tissue Characterization: Histological and Pathophysiological Correlation*. *Curr Cardiovasc Imaging Rep*. **7**(3): p. 9254. 2014.
 43. Wagner W., Wein F., Seckinger A., Frankhauser M., Wirkner U., Krause U., Blake J., Schwager C., Eckstein V., Ansorge W., and Ho A.D., *Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood*. *Exp Hematol*. **33**(11): p. 1402-1416. 2005.
 44. Watanabe Y., Hayashida K., Lefevre T., Chevalier B., Hovasse T., Romano M., Garot P., Farge A., Donzeau-Gouge P., Bouvier E., Cormier B., and Morice M.C., *Is EuroSCORE II better than EuroSCORE in predicting mortality after transcatheter aortic valve implantation?* *Catheter Cardiovasc Interv*. **81**(6): p. 1053-1060. 2013.
 45. Zhang L. and Xu Q., *Stem/Progenitor cells in vascular regeneration*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **34**(6): p. 1114-1119. 2014.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Polyesterurethanharnstoff (PEUU)-Cardiac-Patch-Therapie nach MI im Rattenmodell. PEUU-Patch Dimensionen: 6 mm Durchmesser × 300 µm Wandstärke (A), PEUU-Oberflächenstruktur im Rasterelektronenmikroskop (B), Myokardinfarkt Narbe ohne (C) und mit Patch-Implantat (D) 8 Wochen nach MI in der Ratte. 7
- Abbildung 2: Schematische Darstellung des Prinzips des Tissue Engineering von Ersatzgeweben mittels Laserinduziertem Vorwärtstransfer. Durch den Pulslaser wird zielgenau von der Donorschicht unterschiedliches biologisches Material auf den Kollektor gebracht in der gewünschten Anordnung. 9
- Abbildung 3: Schematische Darstellung des Laserinduzierten Vorwärtstransfers (LIFT). Mit dem Laser (roter Pfeil) wird die Gitterstruktur durch die Goldschicht auf den PEUU Cardiac Patch gebracht (14). Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Elsevier (Copyright © 2011 Elsevier) 17
- Abbildung 4: Cardiac-Patch-Besiedlung mittels LIFT: Anordnung der HUVEC in einer kapillarnetzähnlichen Gitterstruktur auf einer mit Matrigel beschichteten PEUU-Patch-Matrix. 19
- Abbildung 5: Cardiac Patch Therapie nach induziertem Myokardinfarkt in der RNU-Ratte. Ligatur(A) des Koronargefäßeses-Ramus interventricularis anterior. Platzierung des Cardiac-Patch-Implantats auf dem infarzierten Areal des linken Ventrikels(B)..... 22
- Abbildung 6: Phänotypische Charakterisierung mittels Durchflußzytometrie (14). Histogramme (Antikörper-Signal – schwarz; Isotyp-Kontrolle – blau) typischer Antigene für hMSC (A) und HUVEC (B). Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Elsevier (Copyright © 2011 Elsevier) 31
- Abbildung 7: Repräsentative Immunfluoreszenz-Mikroskopie-Aufnahme (14) 24

Stunden nach LIFT. HUVEC (grün) und hMSC (rot) sind in einer kapillarähnlichen Gitterstruktur angeordnet. Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Elsevier (Copyright © 2011 Elsevier).....	32
Abbildung 8: Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen der HUVEC/hMSC-cokulturen 8 Tage nach Zellaussaat mit Vergrößerung von A nach C. Beginnende Gefäßformierung in der simulierten Gitterstruktur nach LIFT-Besiedlung. (A), Ohne LIFT proliferieren die Zellen, zeigen jedoch noch keine Gefäßformierung (B). Rot=Zellkerne, Grün=Muskelfaser (14). Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Elsevier (Copyright © 2011 Elsevier).....	33
Abbildung 9: Herzpumpfunktionsmessung 8 Wochen nach MI. Die im linken Ventrikel gemessene Kontraktilität ist für verschiedene Funktionsparameter bei einer Cardiac-Patch-Behandlung mit LIFT-Besiedlung teilweise signifikant verbessert im Vergleich zur Therapie mittels unbesiedelter Patch-Matrix (MIP) (14). Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Elsevier (Copyright © 2011 Elsevier).....	35
Abbildung 10: Infarkt wanddicke 8 Wochen nach MI. Vitale Myokardiozyten in Fast Green Färbung und Sirius-Red-Färbung die Kollagenablagerung in Myokardinfarktgebiete bei Querschnitten am Rattenherz zeigen (A). Die Auswertung der Zunahme der Wanddicke a Wochen nach MI zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den LIFT und MIP Therapiegruppen (B) (14). Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Elsevier (Copyright © 2011 Elsevier)	37
Abbildung 11: Fibrosierungsgrad 8 Wochen nach MI. Vitale Myokardiozyten in der Fast green Färbung und Kollagenablagerung als Sirius-Red-Färbungen im Infarktgrenzbereich (A). Die Auswertung der Abnahme der Kollagenablagerung nach Patch-Implantation zeigt acht Wochen nach MI keinen signifikanten Unterschied zwischen den Therapiegruppen (B) (14). Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Elsevier (Copyright © 2011	

Elsevier).....	39
Abbildung 12: Kapillardichte 8 Wochen nach MI. Repräsentative Fluorescein Tomato Lectin-Färbungen (grün) sowie To-Pro3 Färbungen (blau) im Mykardinfarktgrenzbereich (A). Signifikant höhere Kapillardichte im Mykardinfarktgrenzbereich nach Implantation einer LIFT-besiedelten Patch-Matrix 8 Wochen nach MI im Vergleich zur Therapie mittels unbesiedeltem Patch (B) (14). Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Elsevier (Copyright © 2011 Elsevier).....	41
Abbildung 13: Zell-Infiltration der Cardiac-Patch-Matrix. Repräsentative Färbungen der Infarktnarbe zeigen infiltrierte Zellen mit To-Pro 3 Färbungen(blau) sowie Blutgefäße mit Fluorescein Tomato Lectin Färbungen (grün) in der Patch-Matrix (weiß) acht Wochen nach MI (14). Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Elsevier (Copyright © 2011 Elsevier).....	43
Abbildung 14: Humane Zellen unter immunhistochemischer Färbung für CD 31 (lila) in Co-Lokalisation mit funktionellen Blutgefäßen. Repräsentative Fluorescein Tomato Lectin Färbungen in grün im Infarktbereich zeigen nach Implantation einer LIFT-besiedelten Patch-Matrix 8 Wochen nach MI die Co-Lokalisation von humanen Zellen und infiltrierten Blutgefäßen der Ratte, was für eine direkte Beteiligung humaner Zellen an der Neovaskularisation nach MI spricht (14). Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Elsevier (Copyright © 2011 Elsevier).....	43
Abbildung 15: Tunel Färbung (Immunhistochemisch) apoptotischer Zellkerne in grün dargestellt mit Kennzeichnung durch weiße Pfeile. In Rot dargestellt sind vitale Zellkerne. Die Apoptosisrate ist in der Untersuchungs und Kontrollgruppe identisch	51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TO-PRO®-3-Iodid Färbeprotokoll	20
Tabelle 2: Sirius Red und Fast Green FCF Färbeprotokoll.....	26
Tabelle 3: Immunphänotypische Analyse	31

Danksagung

Die Experimente der vorliegenden Dissertation wurden in der Klinik für Herzchirurgie der Universität Rostock (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. G. Steinhoff) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte in der Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Universitätsklinik Ulm (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. A. Liebold).

Herrn Prof. Dr. med. G. Steinhoff danke ich für die Überlassung des Themas und die uneingeschränkte Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med A. Liebold danke ich für die kontinuierliche Unterstützung und das Freiräumen der nötigen Zeit zur Erstellung dieser Arbeit parallel zur klinischen Tätigkeit.

Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. W. Z. Li und Frau Prof. Dr. rer. Nat. N.Ma danke ich für die hervorragende Betreuung während der gesamten Anfertigung der Dissertation, für die vielen wertvollen Anregungen und das rege Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Dr. med. R. Emini gebührt ein ganz besonderer Dank für seine anhaltende Motivation und Unterstützung, die maßgeblich zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen. Außerdem danke ich ihm für die aufmerksame und schnelle Durchsicht und Korrektur des Manuskripts.

Ebenso möchte ich Herrn Dr. med. H. Gorki für seine wertvollen Vorschläge und Anmerkungen zu dieser Arbeit danken.

Besonders herzlich danke ich Herrn Dr. rer. Nat. R. Gäbel für die freundliche Anleitung beim Erlernen der Arbeitstechniken, für ihre unermüdliche und tatkräftige Unterstützung und das sehr freundschaftliche und angenehme Arbeitsklima. Seine

zahlreichen Hilfeleistungen waren für diese Arbeit und die Durchführung der Experimente von grundlegender Bedeutung.

Abschließend danke ich von ganzem Herzen meiner Familie, deren ideelle und materielle Unterstützung wesentlich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere bedanke ich mich für Ihre Geduld und ihr Verständnis bis zur Vollendung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Jun Liu

geboren 1976 in Guangzhou, China
Staatsangehörigkeit China

09/1992 – 09/1995 Gymnasium Guangzhou, China
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

09/1995– 09/1999 Guangzhou Medical University
Studienrichtung Medizin
Bis 9.Semester

09/1999 – 10/2000 Akademie Klausenhof
Sprachkurs „Deutsch als Fremdsprache“
Grundstufe I bis Mittelstufe II
Abschluss: Mittelstufe II

10/2000 – 09/2001 TU Braunschweig und FH Braunschweig/Wolfenbüttel
Vorbereitungskurs von den Deutschen Sprachprüfung für den Hochschulzugang (DSH)
Abschluss: DSH Prüfung

10/2001 – 06/2009 Universität Rostock
Studienrichtung Medizin
Abschluss: Staatexamen
Hammerexamen (Note: befriedigend)

06/2009 – 03/2011 Promotion in Forschungslabor der Herzchirurgie (**FKGO**)

06/2011 – Jetzt als Assistenzarzt in Herzchirurgie Uniklinik Ulm