



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 35 354 T2** 2007.08.02

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 985 028 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 35 354.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/CA98/00520**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 923 950.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/054301**

(86) PCT-Anmeldetag: **28.05.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **03.12.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **15.03.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **26.07.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.08.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 5/06** (2006.01)

A61K 35/34 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

863882 28.05.1997 US

(73) Patentinhaber:

Genzyme Corp., Cambridge, Mass., US

(74) Vertreter:

Schwabe, Sandmair, Marx, 81677 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**MICKLE, G., Donald A., Toronto, Ontario M5M 2X9,
CA; LI, Ren-Ke, Scarborough, Ontario M1V 1B4,
CA; Weisel, Richard D., Toronto, Ontario M4X 1S8,
CA**

(54) Bezeichnung: **TRANSPLANTATE FÜR MYOKARDIALE NARBEN, SOWIE METHODE UND ZELLULÄRE PRÄPARATIONEN DAFÜR**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**Gebiet der Erfindung**

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Zubereitung einer pharmazeutischen Zusammensetzung für Zelltransplantation in Narbengewebe im Herzen, um Herzfunktion zu verbessern, Angiogenese zu stimulieren und um Myokard zu retten. Ebenfalls hierin offenbart sind die Zubereitung und Kultivierung der gegenständlichen Zellen vor der Transplantation, ein Mechanismus für die Zufuhr von Gentherapie unter Verwendung solcher Transplantate und Transplantate, die solche Zellen umfassen.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Organtransplantation und chirurgische Resektion wurden verwendet, um erkranktes, nicht funktionelles Myokardgewebe zu ersetzen oder zu entfernen. Kürzlich wurde fötale zelluläre Transplantation verwendet, um neurologische Störungen, die bei Parkinson'scher Erkrankung gefunden werden, zu verbessern (Thompson L. et al., Science 257: 868-870, 1992). In einem ähnlichen Ansatz wurden normale Myoblasten in den Skelettmuskel von Patienten mit Duchenne'scher Muskelatrophie transplantiert (Gussoni; E. et al., Nature, 356: 435-438, 1992), wo die transplantierten Zellen Dystrophin exprimierten.

[0003] Fötale Ventrikulkardiomyozyten, Vorhoftumorzellen und Skelettmyoblasten wurden in normales Myokard transplantiert (Koh, G. Y. et al., Journal of Chemical Investigation, 290: 1548-54, 1993; Soonpaa M. H. et al., Science, 264: 98-101, 1994; US-Patent 5,602,301). In den in diesen Referenzen beschriebenen Studien wurden die Zellen in die mittlere und dickste Schicht des Herzens, zusammengesetzt aus Herzmuskel, welche eine ausgezeichnete Blutzufuhr hat, transplantiert. Transplantierte Vorhoftumorzellen bildeten interkalierte Disc-Junctions mit den Kardiomyozyten des Wirts. Myokardfunktion wurde nicht bewertet.

[0004] Herznarbengewebe wird gebildet, nachdem die Ventrikelwand des Herzens aufgrund von Schädigung nekrotisiert worden ist. Im Gegensatz zu Myokardgewebe enthält Herznarbengewebe keine Herzmuskelzellen. Stattdessen ist es aus Bindegewebezellen wie Fibroblasten und aus nicht zellulären Bestandteilen wie Collagen und Fibronektin zusammengesetzt. Herznarbengewebe ist nicht kontraktile und tritt deshalb mit der normalen Herzfunktion in Wechselwirkung. Von vollständig entwickeltem Narbengewebe wird gedacht, dass es ein inertes Gewebe mit einer beschränkten Blutversorgung ist. Demgemäß legt der Stand der Technik nahe, dass kultivierte Zellen nicht erfolgreich in vollständig entwickeltes Narbengewebe transplantiert werden könnten.

[0005] Narbengewebe ist viel dünner als normales Myokard. In dem durch Field im US-Patent 5,602,301 gelehrt Verfahren werden zelluläre Transplantate in das Myokard durch Injektion eingeführt. Dieses Verfahren würde jedoch, falls es auf viel dünneres Narbengewebe angewendet werden würde, in Gewebeaufblähung und in einer damit einhergehenden Zunahme im Druck in dem Bereich der Zellinjektion resultieren. Als ein Ergebnis würde das transplantierte zelluläre Material aus dem Punktionspunkt der Injektionsnadel nach dem Zurückziehen lecken und die Effizienz solcher Transplantate wäre reduziert.

[0006] Folglich gibt es einen Bedarf, eine zelluläre Allo- und Autotransplantationstechnik im Narbengewebe des erkrankten Myokards zu entwickeln, um die kontraktile Funktion zu verbessern, Myokardnachbildung zu minimieren, Angiogenese zu stimulieren, Gentherapie zuzuführen, das Herz wieder aufzubauen und beschädigte Kardiomyozyten zu retten. Die vorliegende Erfindung wendet sich diesen Bedürfnissen zu.

Zusammenfassung der Erfindung

[0007] Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, für die Zubereitung einer pharmazeutischen Zusammensetzung für Zelltransplantation für die Behandlung von Narbengewebe im Myokard zu sorgen, welche Mängel im Stand der Technik überwindet. Die vorliegende Offenbarung erläutert, dass Vorhofmyozyten, glatte Muskelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten in das Narbengewebe, das nach Ventrikelnekrose gebildet worden ist, und in Gewebemembranen und poröse synthetische Membranen erfolgreich transplantiert werden können. Die Zelltransplantate bildeten Gewebe, das die dreimonatige Dauer der Studie überlebte, Myokardfunktion verbesserte, Myokardmodellierung minimierte und Angiogenese stimulierte. Die Anwesenheit der Transplantate induzierte keine offenkundigen kardialen Arrhythmien. Wenn Autozelltransplantation geschah, geschah Immunabstoßung nicht.

[0008] Hierin offenbart ist ein Verfahren für die Bildung eines stabilen Myokardtransplantates in einem Säuger, umfassend das Transplantieren von Zellen in Myokardgewebe oder Narbengewebe im Herzen. Zellen

werden ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus adulten Kardiomyozyten, fötalen Kardiomyozyten, adulten Fibroblasten, fötalen Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Skelettmyoblasten.

[0009] In bevorzugten Beispielen dieses Verfahrens können die Zellen ausgewählt werden aus adulten oder fötalen glatten Muskelzellen und Fibroblasten, adulte Kardiomyozyten und Endothelzellen können co-transplantiert werden, adulte Kardiomyozyten können aus Vorhofgewebe gewonnen werden, das Transplantat kann aus Auto-, Allo- oder Xenotransplantation abgeleitet werden und das Transplantat kann adulte Kardiomyozyten, gewonnen aus Autotransplantation, wie zum Beispiel aus Vorhofgewebe abgeleitete Kardiomyozyten, umfassen.

[0010] In anderen Beispielen des Verfahrens können die Zellen direkt in das Myokardgewebe oder das Narbengewebe eingeführt werden, zum Beispiel durch Injektion, und die Injektionsstelle kann mit einem biologischen Klebstoff versiegelt werden, um Leckage der Zellen zu verhindern.

[0011] In anderen Beispielen können die Zellen auf einem bioabbaubaren oder nicht abbaubaren Gitter suspendiert sein oder können transfiziert sein, um rekombinante Moleküle an das Myokardgewebe oder das Narbengewebe zu liefern.

[0012] In noch anderen Beispielen des Verfahrens können die Zellen bei rekonstruktiver Myokardchirurgie verwendet werden und können an die äußere Oberfläche des Myokardgewebes oder des Narbengewebes mit einem biologischen Klebstoff angeheftet werden oder können nach entzündlicher Antwort im Myokardgewebe transplantiert werden. Zusätzlich können Wachstumsfaktoren mit den Zellen co-transplantiert werden. Wachstumsfaktoren werden ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus insulinähnlichen Wachstumsfaktoren I und II, transformierender Wachstumsfaktor $\beta 1$, thrombozytärer Wachstumsfaktor B, basischer Fibroblastenwachstumsfaktor und vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor.

[0013] In noch anderen Beispielen des Verfahrens werden die Zellen in Narbengewebe transplantiert und wenigstens 10 %, 20 % oder 30 % des Narbengewebes sind von transplantierten Zellen vier Wochen nach der Transplantation besetzt.

[0014] Ebenfalls offenbart hierin ist ein therapeutisches Transplantat für die Applikation in Säugermysokardgewebe oder Narbengewebe im Herzen, umfassend transplantierte Zellen, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus adulten Kardiomyozyten, fötalen Kardiomyozyten, adulten Fibroblasten, fötalen Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Endothelzellen, und Skelettmyoblasten.

[0015] Das Transplantat kann adulte Kardiomyozyten und Endothelzellen umfassen, die transplantierten Zellen können ausgewählt werden aus glatten Muskelzellen und fötalen Fibroblasten, die adulten Kardiomyozyten können aus Vorhofgewebe abgeleitet sein oder das Transplantat kann auch aus Auto-, Allo- oder Xenotransplantation abgeleitet sein. Das Transplantat kann adulte, aus Autotransplantation abgeleitete Kardiomyozyten umfassen, und die Kardiomyozyten können aus Vorhofgewebe abgeleitet sein. Die Zellen des Transplantates können in Myokardgewebe oder Narbengewebe durch Injektion eingeführt werden und die Zellen können transfiziert werden, um Myokardgewebe oder Narbengewebe rekombinante Moleküle zuzuführen. Das Transplantat kann weitere Wachstumsfaktoren umfassen, zum Beispiel insulinähnliche Wachstumsfaktoren I und II, transformierender Wachstumsfaktor $\beta 1$, thrombozytärer Wachstumsfaktor B, basischer Fibroblastenwachstumsfaktor und vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor. Zellen des Transplantates können auch auf einem bioabbaubaren Gitter suspendiert sein.

[0016] Ebenfalls hierin offenbart ist ein therapeutisches Transplantat für die Implantation in Säugermysokardgewebe oder Narbengewebe im Herzen, umfassend ein geeignetes bioabbaubares oder nicht bioabbaubares Gerüst mit darauf abgestützten Zellen. Die Zellen werden ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus adulten Kardiomyozyten, fötalen Kardiomyozyten, adulten Fibroblasten, fötalen Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Skelettmyoblasten.

[0017] In Beispielen dieses therapeutischen Transplantates können adulte Kardiomyozyten aus Vorhofgewebe gewonnen sein und das Transplantat kann adulte Kardiomyozyten und adulte Endothelzellen umfassen. Das Transplantat kann bei Kardiomyoblastie verwendet werden. Das Gerüst des Transplantates kann Dacron- oder Polyglycolsäurepolymere mit oder ohne Polymilchsäurepolymeren umfassen, das zelluläre Material kann aus Kardiomyozyten, glatten Muskelzellen oder Endothelzellen bestehen und das Transplantat kann weitere einen implantierbaren Schrittmacher einschließen.

[0018] Transplantate können zum Verschließen von kardialen Defekten und für rekonstruktive Myokardchirurgie verwendet werden.

[0019] Ebenfalls hierin offenbart ist ein Verfahren zum Kultivieren von Kardiomyozyten aus pädiatrischem Säugermiokardgewebe, umfassend: a) Zerkleinern dieses Myokardgewebes; b) Verdauen dieses Gewebes für 15 Minuten in einer Verdauungslösung, enthaltend 0,2 % Trypsin und 0,1 % Collagenase, gelöst in phosphatgepufferter Salzlösung, und Abtrennen der verdauten Gewebelösung von dem verbleibenden Myokardgewebe; c) Hinzufügen eines Kulturmediums, umfassend Iscoves modifiziertes Dulbeccos Medium (IMDM), 10 % fötales Rinderserum und 0,1 mM β -Mercaptoethanol, zu der verdauten Gewebelösung; wobei das Kulturmedium in einem Verhältnis von 20 Volumina Kulturmedium zu 1 Volumen Verdauungslösung hinzugefügt wird; d) Zentrifugieren der resultierenden Lösung bei $581 \times g$ für fünf Minuten und Verwerfen des Überstandes; e) Resuspendieren des Pellets in frischem Kulturmedium; f) Kultivieren der Suspension in 10 % fötalem Rinderserum und 0,1 mM β -Mercaptoethanol; und g) Isolieren von Kardiomyozyten aus der Kultur.

[0020] Beispiele des Verfahrens können weiter das Passagieren von Kardiomyozyten durch Subkultivieren mit einer Subkultivierungsenzymlösung, umfassend 0,01 % Trypsin, 0,02 % Glucose und 0,5 mM EDTA, einschließen. Das Verfahren des vierten Aspektes kann weiter das Lagern der Kardiomyozyten einschließen, durch a) Dissoziieren von kultivierten Kardiomyozyten von der Kulturplatte unter Verwendung von Subkultivierungsenzymlösung; b) Hinzufügen von Kulturmedium in einem Verhältnis von fünf Volumina Kulturmedium zu 1 Volumen Subkultivierungsenzymlösung; c) Zentrifugieren der Lösung bei $581 \times g$ für fünf Minuten; d) Verwerfen des Überstandes und Resuspendieren des Pellets in 1 ml IMDM, enthaltend 20 % fötales Rinderserum und 20 % Glycerol; und e) Einfrieren und Lagern der resultierenden Suspension in flüssigem Stickstoff. Das Verfahren kann weiter das Auftauen der gefrorenen Probe bei 37°C und das Kultivieren der Kardiomyozyten für drei bis fünf Tage in einer IMDM-Lösung, enthaltend 20 % fötales Rinderserum, einschließen.

[0021] Ebenfalls offenbart hierin ist ein Verfahren zum Kultivieren von Kardiomyozyten aus adultem Säugermiokardgewebe, umfassend: a) Zerkleinern dieses Myokardgewebes; b) Verdauen des Gewebes für 15 Minuten in Verdauungslösung, enthaltend 0,2 % Trypsin und 0,1 % Collagenase, gelöst in phosphatgepufferter Salzlösung; c) Abtrennen der verdauten Gewebelösung und Verdauen des verbleibenden Gewebes mit frischer Verdauungslösung für 10 Minuten; d) Vereinigen beider verdauter Gewebelösungen aus den Schritten b) und c) und Hinzufügen eines Kulturmediums, umfassend Iscoves modifiziertes Dulbeccos Medium (IMDM), enthaltend 10 % fötales Rinderserum und 0,1 mM β -Mercaptoethanol in einem Verhältnis von 20 Volumina Kulturmedium zu 1 Volumen dieser Verdauungslösung; e) Zentrifugieren der resultierenden Lösung bei $581 \times g$ für fünf Minuten und Verwerfen des Überstandes; f) Resuspendieren des Pellets in frischem Kulturmedium; g) Kultivieren der Suspension in 10 % fötalem Rinderserum und 0,1 % β -Mercaptoethanol; und h) Isolieren von Kardiomyozyten aus der Kultur.

[0022] Beispiele dieses Verfahrens können weiter das Passagieren der Kardiomyozyten unter Verwendung von Subkultivierungsenzymlösung, umfassend 0,01 % Trypsin, 0,02 % Glucose und 0,05 mM EDTA, einschließen.

[0023] Das Verfahren kann weiter das Lagern von Kardiomyozyten einschließen, durch a) Dissoziieren von kultivierten Kardiomyozyten von der Kulturplatte unter Verwendung von Subkultivierungsenzymlösung; b) Hinzufügen von Kulturmedium in einem Verhältnis von 5 Volumina Kulturmedium zu 1 Volumen Subkultivierungsenzymlösung; c) Zentrifugieren der Lösung bei $581 \times g$ für fünf Minuten; und d) Verwerfen des Überstands und Resuspendieren des Pellets in 1 ml IMDM, enthaltend 20 % fötales Rinderserum und 20 % Glycerol; und e) Einfrieren und Lagern der resultierenden Suspension in flüssigem Stickstoff.

[0024] In anderen Beispielen kann das Verfahren weiter das Auftauen der gefrorenen Probe bei 37°C einschließen und das Kultivieren der Kardiomyozyten für drei bis fünf Tage in einer IMDM-Lösung, enthaltend 20 % fötales Rinderserum.

[0025] Ebenfalls ist hierin offenbart ein Verfahren zur Behandlung von schadhaftem, beschädigtem oder vernarbtem Herzgewebe, umfassend das Transplantieren eines Transplantates aus Zellen, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus adulten Kardiomyozyten, fötalen Kardiomyozyten, adulten Fibroblasten, fötalen Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Skelettmyoblasten, in das Gewebe.

[0026] In Beispielen dieses Verfahrens können die adulten Kardiomyozyten aus Vorhofgewebe gewonnen sein, Zellen in dem Transplantat können adulte Kardiomyozyten und Endothelzellen sein, die Zellen können direkt in Herzgewebe eingeführt sein und das Transplantat kann ein Patch sein, umfassend auf einem biolo-

gisch annehmbaren, bioabbaubaren oder nicht bioabbaubaren Gerüst suspendierte Zellen.

[0027] In noch anderen Beispielen dieses Verfahrens werden die Zellen in Narbengewebe transplantiert und wenigstens 10 %, 20 % oder 30 % des Narbengewebes wird durch transplantierte Zellen vier Wochen nach Transplantation besetzt.

[0028] In anderen Beispielen kann das Verfahren die folgenden Schritte umfassen: a) chirurgisches Entfernen von beschädigtem Herzgewebe, wodurch eine Öffnung geschaffen wird; und b) Anheften des Transplantates an die Öffnung, um eine wasserdichte Versiegelung zu bilden.

[0029] Ebenfalls offenbart hierin sind isolierte Zellen für die Transplantation in Myokardnarbengewebe, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus adulten Kardiomyozyten, adulten Fibroblasten, fötalen Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Skelettmyoblasten, worin die Zellen in Myokardnarbengewebe nach Transplantation überleben und die Herzfunktion im Verhältnis zur Herzfunktion eines Herzens mit ähnlichem Myokardnarbengewebe, das nicht mit Zellen transplantiert worden ist, verbessern. Herzfunktion wird bewertet durch wenigstens eines der Kriterien in der Gruppe, bestehend aus den durch Narbengewebe besetzten Bereich, Vaskularisierung des Narbengewebes, Blutfluss zu Narbengewebe, entwickelter Druck, systolischer Druck, diastolischer Enddruck und dp/dt.

[0030] Die Zellen für die Transplantation können aus einer Kombination aus adulten Kardiomyozyten plus Endothelzellen bestehen.

[0031] Ebenfalls ist hierin offenbart ein Verfahren zum Testen eines pharmakologischen Mittels, von dem beabsichtigt wird, dass es Herzschädigung während Herzchirurgie verhindert oder verbessert. Das Verfahren umfasst das Aussetzen des pharmakologischen Mittels an isolierte Zellen, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus adulten Kardiomyozyten, adulten Fibroblasten, fötalen Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Skelettmyoblasten, worin die Zellen im Myokardnarbengewebe nach Transplantation überleben und Herzfunktion im Verhältnis zur Herzfunktion eines Herzens mit ähnlichem Myokardnarbengewebe, das nicht mit Zellen transplantiert worden ist, verbessern (Herzfunktion wird durch wenigstens eines der Kriterien in der Gruppe, bestehend aus den durch Narbengewebe besetzten Bereich, Vaskularisierung von Narbengewebe, Blutfluss zu Narbengewebe, entwickelter Druck, systolischer Druck, diastolischer Enddruck und dp/dt) bewertet, worin das pharmakologische Mittel, an das die Zellen ausgesetzt worden sind, Herzschädigung während Herzchirurgie verhindert oder verbessert, im Vergleich mit Zellen, die nicht an das pharmakologische Mittel ausgesetzt worden sind.

[0032] Basierend auf dieser Offenbarung sorgt die vorliegende Erfindung für die Verwendung von Zellen, umfassend adulte Kardiomyozyten, adulte Fibroblasten, adulte glatte Muskelzellen oder adulte Endothelzellen, bei der Zubereitung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zum Bilden eines therapeutischen Transplantates in einem vernarbten Säugerherzen. Bevorzugte Ausführungen der Erfindung sind hierin beschrieben und werden in den angehängten Ansprüchen dargelegt.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0033] Diese und andere Merkmale der vorliegenden Erfindung werden in der folgenden detaillierten Beschreibung ersichtlicher werden, worin Bezugnahmen auf die folgenden Figuren vorgenommen werden:

[0034] [Fig. 1](#) ist eine Graphik, die die Verbesserung der Myokardfunktion von vernarbten Herzen mit in die Narben transplantierten glatten Muskelzellen zeigt.

[0035] [Fig. 2](#) ist eine Graphik, die die Menge an Blutfluss (dargestellt als Mikrosphärenzahl) durch Kontrollnarbengewebe und mit Endothelzellen transplantiertes Narbengewebe zeigt.

[0036] [Fig. 3](#) ist eine Graphik, die den systolischen Druck von transplantierten und Kontrollherzen mit steigendem Ballonvolumen zeigt.

[0037] [Fig. 4](#) ist eine Graphik, die den entwickelten Druck von transplantierten und Kontrollherzen mit steigendem Ballonvolumen zeigt.

[0038] [Fig. 5](#) ist eine Graphik, die den Plan der kardialen Kryoverletzungs/Endothelzelltransplantationsexperimente zeigt. Ratten wurden 1, 2, 4 und 8 Wochen (wks) nach Kryoverletzung der linksventrikulären freien

Wand (LVFW) für die histologische Studie der Remodellierung des linken Ventrikels geschlachtet. Nach Kryoverletzung der LVFW wurden die Tiere zufällig in drei Gruppen (Gruppen 1, 2 und 3) aufgeteilt. In jeder Gruppe wurde die Hälfte der Tiere mit Kardiomyozyten (Transplantat) transplantiert und die Hälfte der Tiere wurde mit kultiviertem Medium (Kontrolle) transplantiert. Transplantation im Zentrum der LVFW-Narbe wurde unmittelbar (Gruppe 1), zwei Wochen (Gruppe 2) und vier Wochen (Gruppe 3) nach Myokardverletzung durchgeführt. Sämtliche Tiere wurden acht Wochen nach Kryoverletzung für histologischen und Funktionsuntersuchungen geschlachtet.

[0039] [Fig. 6](#)(A-D) zeigt Photomikrographien von mit Hämatoxylin und Eosin (H & E) gefärbter LVFW nach Kryoverletzung. A) unmittelbar nach Kryoverletzung (Vergrößerung = 200X) und B) eine Woche (Vergrößerung = 100X), C) zwei Wochen (Vergrößerung = 100X) und D) vier Wochen (Vergrößerung = 200X) nach Kryoverletzung. Das Myokard wird unmittelbar nach der Kryoverletzung fragmentiert. Nach einer Woche ist ein vorherrschend mononukleäres Infiltrat vorhanden und die meisten nekrotisierten Kardiomyozyten sind verschwunden. Nach zwei Wochen sind Fibroblasten und Collagen ersichtlich. Das inflammatorische Infiltrat ist annähernd weg. Nach vier Wochen hat sich eine transmurale Narbe gebildet.

[0040] Die [Fig. 7](#)(A-D) zeigen Photomikrographien von mit H & E gefärbten Herzschnitten (5X) A) eine, B) zwei, C) vier und D) acht Wochen nach Kryoverletzung an der LVFW. Die Größe des Narbengewebes (angegeben durch Pfeile) steigt mit der Zeit nach der Verletzung.

[0041] [Fig. 8](#) ist eine Graphik, die Prozentsätze an Narbengewebe in der LVFW eine Woche, zwei Wochen, vier Wochen und acht Wochen nach Kryoverletzung zeigt. Die Narbengewebegröße stieg mit der Zeit. Unausgefüllte Kreise stellen einzelne Narbengrößen dar und gefüllte Quadrate stellen mittlere Narbengrößen \pm SE dar (N = 7). ** $p \leq 0,01$.

[0042] [Fig. 9](#)(A-D) zeigt Photomikrographien von mit H & E gefärbten Herzschnitten (5X), acht Wochen nach Kryoverletzung der LVFW. Das Kontrollherz (A) wurde mit Kulturmedium transplantiert. Versuchsherzen wurden mit kultivierten fötalen Rattenkardiomyozyten unmittelbar (B), zwei Wochen (C) und vier Wochen (D) nach Myokardverletzung transplantiert. Transplantiertes Herzgewebe wurde in (A)- und (B)-Herzen nicht beobachtet. Transplantiertes Gewebe (angezeigt durch Pfeile) wurde in Myokardnarbengewebe in (C)- und (D)-Herzen gefunden. Wirtsmyokard war gewöhnlich unterhalb der Narbe vorhanden, wenn das Transplantat vorhanden war, aber niemals, wenn Transplantat fehlte. Wir schreiben die Anwesenheit von Wirtsmyokard dem Zelltransplantat zu, das die Narbenexpansion begrenzt, zu.

[0043] [Fig. 10](#) ist eine Graphik, die Prozentsätze von Narbengewebe und transplantiertem Herzgewebe in der LVFW acht Wochen nach Kryoverletzung zeigt. Fötale Rattenkardiomyozyten, zwei und vier Wochen nach Myokardverletzung transplantiert, bildeten Herzgewebe, welche 34 % bzw. 31 % des Gesamtnarbenbereichs besetzten. Das Herztransplantat begrenzte die Narbenexpansion. Ergebnisse sind ausgedrückt als Mittelwerte \pm SE. ** $< 0,01$.

[0044] [Fig. 11](#) zeigt eine Photomikrographie von fötalen Rattenkardiomyozyten sechs Wochen nach Transplantation (100X). Das transplantierte Gewebe färbte positiv (dunkelbraune Farbe) für schwere Kette von Myosin unter Verwendung der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplextchnik.

[0045] [Fig. 12](#) zeigt Graphiken von systolischen, diastolischen, entwickelten Ballondrücken und positiven dp/dt-Werten von Kontroll- und transplantierten Herzen mit gesteigerten Ballonvolumina. Fötale Rattenkardiomyozyten wurden unmittelbar nach Myokardverletzung transplantiert. Es gab keine Unterschiede in systolischen und entwickelten Drücken zwischen den transplantierten und Kontrollherzen. Ergebnisse sind ausgedrückt als Mittelwerte \pm SE (N = 8). Ausgefüllte Kreise stellen Kontrollherzen dar; leere Quadrate stellen transplantierte Herzen dar.

[0046] [Fig. 13](#) zeigt Graphiken von systolischen, diastolischen, entwickelten Ballondrücken und positive dp/dt-Werte von Kontroll- und transplantierten Herzen mit gesteigerten Ballonvolumina. Transplantation wurde zwei Wochen nach Myokardverletzung durchgeführt. Systolische und entwickelte Drücke der transplantierten Rattenherzen waren größer ($p < 0,01$) als jene der Kontrollherzen. Ergebnisse sind ausgedrückt als Mittelwerte \pm SE (N = 8). Ausgefüllte Kreise stellen Kontrollherzen dar; unausgefüllte Quadrate stellen transplantierte Herzen dar.

[0047] [Fig. 14](#) zeigt Graphiken der systolischen, diastolischen, entwickelten Ballondrücke und positive dp/dt-Werte von Kontroll- und transplantierten Herzen mit gesteigerten Ballonvolumina. Transplantation wurde

vier Wochen nach Myokardverletzung durchgeführt. Systolische und entwickelte Drücke der transplantierten Rattenherzen waren signifikant höher als jene der Kontrollherzen ($p < 0,01$). Ergebnisse werden ausgedrückt als Mittelwerte \pm SE ($N = 12$). Ausgefüllte Kreise stellen Kontrollherzen dar; leere Quadrate stellen transplantierte Herzen dar.

[0048] Fig. 15 ist eine Graphik, die entwickelte Drücke bei Ballonvolumina von 0,04, 0,1, 0,2 und 0,3 ml der mit fötalen Kardiomyozyten zwei und vier Wochen nach Myokardverletzung transplantierten Herzen zeigen. Die entwickelten Drücke von Herzen, die nach zwei Wochen transplantiert worden sind, waren signifikant höher als jene der nach vier Wochen transplantierten Herzen. Die Ergebnisse werden ausgedrückt als Mittelwert \pm SE. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

[0049] Fig. 16 ist eine Graphik, die den entwickelten Druck in kryoverletzten Herzen zeigt, welche transmurale Narben enthalten, transplantiert mit Medium (Kontrolle), adulten Kardiomyozyten (CM) oder adulten Kardiomyozyten plus vaskulären Endothelzellen (CM + EC).

Detaillierte Beschreibung der bevorzugten Ausführungen

[0050] Wir entdeckten Verfahren zur Verbesserung des Ausgangs von Patienten mit Myokardnarben. Unsere Entdeckung wurde gemacht, während die Verwendung von Transplantaten, umfassend zelluläre Transplantate, für die Behandlung von Narbengewebe im Herzen untersucht wurde. Wir transplantierten kultivierte Zellen in das Zentrum einer vollständig entwickelten Ventrikelnarbe, so dass es keinen Kontakt zwischen den transplantierten Zellen und den Wirtszellen gab. Solch einer Methodik wurde gefolgt, um bei der Identifikation des Transplantates zu helfen. Anfänglich war es überraschend, nach dem Transplantieren von fötalen Kardiomyozyten in die vollständig entwickelte Narbe, Stimulation von Angiogenese in dem betroffenen Gebiet und eine Verbesserung der Herzfunktion vorzufinden. Da wir zuvor beim Transplantieren von adulten ventrikulären Kardiomyozyten in Myokardnarbengewebe nicht erfolgreich waren, waren wir überrascht, dass adulte Vorhofkardiomyozyten erfolgreich in solches Narbengewebe transplantiert werden konnten. In weiteren Studien transplantierten wir glatte Auto- und Allomuskelzellen, Auto- und Allofibroblasten und Auto- und Alloendothelzellen in das Zentrum einer vollständig entwickelten Ventrikelnarbe. Wie bei unseren vorangegangenen Ergebnissen bildeten die Zelltransplantate stabile Transplantate in der Narbe, verbesserten die Myokardfunktion, reduzierten die Myokardremodellierung, stimulierten die Angiogenese, bewahrten das Myokard und stellten ein Mittel der Genzufuhr bereit. Auf der Basis dieser Studien erwarteten wir, dass ähnliche Ergebnisse bei der Verwendung von Skelettmyoblasten ebenso erhalten werden können.

[0051] Wir entwickelten auch ein neues Verfahren zum Kultivieren, Passagieren und Lagern von adulten menschlichen Ventrikelskardiomyozyten. Transplantation von kultivierten adulten Kardiomyozyten stellt einen Ansatz zum Wiederherstellen von Funktion und Blutfluss zu Bereichen des Herzens bereit, welche durch erworbene Herzerkrankung zerstört sind oder aufgrund von vererblicher Herzerkrankung fehlen. Das adulte Kardiomyozytenzellkulturverfahren stellt weiter ein Modell zum Testen einer Reihe von pharmakologischen oder anderen Ansätzen zum Verhindern oder Verbessern von kardialer Schädigung während Herzchirurgie bereit. Deshalb bietet dieses einzigartige Verfahren das Versprechen, Verletzung zu verhindern, ebenso wie Herzfunktion nach Herzverletzung wieder herzustellen.

[0052] Die folgenden Beispiele werden Fachleute dabei unterstützen, die Erfindung und ihre Prinzipien und Vorteile besser zu verstehen. Es wird beabsichtigt, dass diese Beispiele für die Erfindung erläuternd sind und ihren Umfang nicht beschränken.

[0053] Da sich jedoch die vorliegende Erfindung auf die Verwendung von adulten Kardiomyozyten, adulten Fibroblasten, adulten glatten Muskelzellen und adulten Endothelzellen bezieht, werden alle der folgenden Beispiele, die sich auf die Verabreichung von anderen Zelltypen in der Abwesenheit solcher Zellen beziehen, nicht als die Erfindung betreffend angesehen, sondern werden einzig als Vergleichsbeispiele bereitgestellt, die zum Verständnis der Erfindung nützlich sind.

Allgemeine Verfahren

A) Zellisolation, -kultur und -identifikation

[0054] Die folgenden Vorgehensweisen wurden durch das Experimentation Committee des Krankenhauses genehmigt.

1. Fötale Rattenkardiomyozytenkulturen:

[0055] Fötale Rattenkardiomyozyten wurden unter Verwendung eines enzymatischen Verdauungsverfahrens (Li, R. K. et al., Circulation Research 78: 283-288, 1996; Li R. K. et al., Annals of Thoracic Surgery 62: 654-661, 1996), aus 18 Tage alten Gestations-Sprague-Dawley-Rattenherzventrikeln (Charles River Canada Inc. Quebec, Kanada) isoliert. Fötale Ratten wurden mit einer intraperitonealen Injektion Natriumpentobarbital (30 mg/kg) anästhesiert und die Herzen wurden dann entfernt. Die Herzgewebe wurden mit phosphatgepufferter Salzlösung (NaCl 136,9 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, pH 7,3) gewaschen. Die Gewebe wurden zerkleinert und in 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung, enthaltend 0,2 % Trypsin, 0,1 % Collagenase und 0,02 % Glucose, für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Kardiomyozyten wurden dann durch wiederholtes Pipettieren des verdauten Myokardgewebes isoliert. Die Zellen in dem Überstand wurden in ein Röhrchen, enthaltend 20 ml Zellkulturmedium (Iscoves modifiziertes Dulbeccos Medium, enthaltend 10 % fötales Rinderserum, 0,1 mmol/l β-Mercaptoethanol, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin), überführt. Das Röhrchen wurde bei 600 × g für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und das Zellpellet wurde in dem Zellkulturmedium für die Aufreinigung durch Ausplattieren resuspendiert (siehe Abschnitt 10 unten).

2. Adulte Rattenventrikelkardiomyozytenkulturen:

[0056] Adulte Ratten (Charles River Canada Inc. Quebec, Kanada) wurden mit intramuskulärer Verabreichung von Ketaminhydrochlorid (22 mg/kg Körpergewicht), gefolgt von einer intraperitonealen Injektion von Natriumpentobarbital (30 mg/kg) anästhesiert und die Herzen wurden dann entfernt. Kardiomyozyten wurden durch enzymatische Verdauung, wie in Abschnitt 1 beschrieben, isoliert. Aus dem Operationssaal gewonnene adulte humane Ventrikelbiopsien wurden ähnlich enzymatisch verdaut.

3. Adulte Rattenvorhofkardiomyozytenkulturen:

[0057] Adulte Ratten, die 400 g wogen (Charles River Canada Inc. Quebec, Kanada), wurden wie in Abschnitt 2 oben anästhesiert. Die Herzohren wurden ligiert und entfernt (Ratten überleben diese Prozedur), wonach das Vorhofgewebe für Kardiomyozytenisolation, wie in Abschnitt 1 beschrieben, verwendet wurde. Adultes humanes Vorhofgewebe wurde aus dem Operationssaal gewonnen und ähnlich enzymatisch verdaut.

4. Fötale glatte Rattenmuskelzellen:

[0058] Fötale glatte Rattenmuskelzellen wurden aus 18 Tage alten Gestations-Sprague-Dawley-Rattenmägen durch enzymatische Verdauung isoliert (Li, R. K. et al., Journal of Tissue Culture and Methods 14: 93-100, 1992). Fötale Ratten (Charles River Canada Inc. Quebec, Kanada) wurden mit Pentobarbital (30 mg/kg Körpergewicht, intraperitoneal) anästhesiert und die Mägen wurden dann entnommen. Die Mägen wurden mit phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen, zerkleinert und in 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung, enthaltend 0,2 % Trypsin, 0,1 % Collagenase und 0,02 % Glucose, für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Glatte Muskelzellen wurden durch wiederholtes Pipettieren des verdauten Magengewebes isoliert. Die Zellen in dem Überstand wurden in ein Röhrchen, enthaltend 20 ml Zellkulturmedium (199-Medium, enthaltend 20 % fötales Rinderserum, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin), überführt und bei 600 × g für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, wonach die Zellen in dem Zellkulturmedium resuspendiert und kultiviert wurden.

5. Adulte glatte Rattenmuskelzellen:

[0059] Adulte weibliche Ratten (Charles River Canada Inc. Quebec, Kanada) wurden wie in Abschnitt 2 oben beschrieben anästhesiert. Uteri wurden nach Verschluss von Blutgefäßen entfernt und der Einschnitt wurde verschlossen. Glatte Muskelzellen wurden aus dem Uterus isoliert, wie in Abschnitt 4 beschrieben.

6. Fötale Rattenfibroblasten:

[0060] Fötale Rattenhautbiopsien wurden aus anästhesierten, 18 Tage alten Gestations-Sprague-Dawley-Ratten gewonnen und Fibroblasten aus fötaler Rattenhaut wurden isoliert, gereinigt und kultiviert wie kürzlich beschrieben (Mickle et al., Journal of Molecular and Cell Cardiology 22: 1297-1304, 1990). Kurz, das Gewebe wurde mit phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen, zerkleinert und für 30 Minuten bei 37 °C in 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung, enthaltend 0,2 % Trypsin, 0,1 % Collagenase und 0,02 % Glucose, verdaut. Fibroblasten wurden durch wiederholtes Pipettieren des verdauten Hautgewebes isoliert. Die Zellen in dem

Überstand wurden in ein Röhrchen übertragen, das 20 ml Zellkulturmedium enthielt (Dulbeccos modifiziertes Minimalmedium, enthaltend 10 % fötales Rinderserum, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin), übertragen und bei $600 \times g$ für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, wonach die Zellen in dem Zellkulturmedium resuspendiert und kultiviert worden sind.

7. Adulte Rattenfibroblasten:

[0061] Hautbiopsien wurden aus anästhesierten adulten Sprague-Dawley-Ratten gewonnen. Fibroblasten wurden wie in Abschnitt 6 beschrieben isoliert und kultiviert.

8. Adulte Rattenendothelzellen:

[0062] Adulte Rattengefäßendothelzellen wurden aus Sprague-Dawley-Rattenaorta durch enzymatische Verdauung isoliert (Mickle et al., Journal of Molecular and Cell Cardiology 22: 1297-1304, 1990). Adulte Ratten (Charles River Canada Inc. Quebec, Kanada) wurden wie in Abschnitt 2 beschrieben anästhesiert. Aorten wurden entfernt, mit phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen, für 30 Minuten bei 37 °C in 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung, enthaltend 0,2 % Trypsin, 0,1 % Collagenase und 0,02 % Glucose, inkubiert und mit Zellkulturmedium (199-Medium, enthaltend 20 % fötales Rinderserum, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) gewaschen, wonach die isolierten Endothelzellen kultiviert worden sind.

9. Humane Zellisolation, Kultivierung und Lagerung:

[0063] Humane Kardiomyozyten wurden aus Herzohren und Ventrikelmuskulaturbiopsien, gewonnen aus Patienten, die eine korrigierende Herzchirurgie durchmachten, isoliert. Humanes Myokard wurde präpariert, um Bindegewebe zu entfernen, und dann auf Stücke mit weniger als 1 mm³ in der Größe zerkleinert.

9(a). Pädiatrische Kardiomyozyten:

[0064] Pädiatrisches Gewebe wurde für 15 Minuten in einer enzymatischen Verdauungslösung, enthaltend 0,2 % Trypsin, 0,1 % Collagenase, gelöst in phosphatgepufferter Salzlösung (es wurde kein Calcium oder EDTA hinzugefügt), verdaut. Kulturmedium, enthaltend Iscoves modifiziertes Dulbeccos Medium (IMDM), 10 % fötales Rinderserum und 0,1 mM β -Mercaptoethanol, wurde in einem Verhältnis von 20 Volumina Kulturmedium zu 1 Volumen enzymatischer Verdauungslösung hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde bei 581 g für fünf Minuten zentrifugiert, wonach der Überstand verworfen wurde. Das Zell- und Gewebepellet wurde im Kulturmedium resuspendiert, wonach die isolierten Zellen auf einer Schale für fünf bis acht Tage kultiviert wurden. Kardiomyozyten, welche aus dieser Kultur migrierten, wurden mit einer Pasteurpipette aufgenommen und noch einmal kultiviert.

9(b). Adulte Kardiomyozyten:

[0065] Im Gegensatz zu pädiatrischer Myokardverdauung wurde adultes humanes Myokard zweimal verdaut. Die zweite Verdauung war bei dem adulten Gewebe aufgrund der gesteigerten Menge an Bindegewebe notwendig. Nach der ersten Verdauung (wie in Abschnitt 9(a) beschrieben) wurde die Zellsuspension aufgenommen, wonach das Gewebe für zehn Minuten erneut verdaut wurde und die zweite Zellsuspension wurde aufgenommen. Die beiden aufgenommenen Suspensionen wurden vereinigt und zentrifugiert, wonach die Zellen resuspendiert und kultiviert wurden. Die verdauten Gewebefragmente in dem Pellet wurden gesammelt und für nicht länger als zwei Tage kultiviert (um Zellzerstörung zu vermeiden) und es wurde eine weitere enzymatische Verdauung an dem verbleibenden unverdauten Gewebe durchgeführt, falls in den Suspensionen nicht ausreichend Zellen gefunden worden sind. Zusätzlich wurden Kardiomyozyten, welche aus den kultivierten Gewebefragmenten migrierten, isoliert und rekultiviert.

9(c). Passagieren von Kulturen:

[0066] Die Kardiomyozyten wurden in einem Medium, enthaltend IMDM, 10 % fötales Rinderserum und 0,1 mM β -Mercaptoethanol, kultiviert. Die Subkultivierungsenzymlösung für Zelldissoziation enthielt 0,01 % Trypsin, 0,02 % Glucose und 0,5 mM EDTA. Die Zellen wurden subkultiviert, wenn die Kultur Konfluenz erreichte (d. h. wenn die Zellkultur die Schalenoberfläche bedeckte und die Zellen einander zu kontaktieren begannen). Zellen, welche vor Erreichen der Konfluenz subkultiviert worden sind, wurden dedifferenziert. Solche dedifferenzierten Zellen können nicht erfolgreich transplantiert werden. Falls den Zellen erlaubt wurde überkonfluent zu werden, ergab enzymatische Verdauung Zellklumpen, welche nicht dissoziieren würden. Kardiomyozyten

in Zellklumpen teilten sich in Kultur nicht.

9(d). Lagerung von kultivierten Zellen:

[0067] Primäre Kulturen aus humanen Kardiomyozyten wurden aus Kulturplatten unter Verwendung von Subkultivierungsenzymverdauungslösung dissoziiert, wonach Kulturmedium in einem Verhältnis von 5 Volumen Kulturmedium zu 1 Volumen Verdauungslösung hinzugefügt wurde, und die Zellsuspension wurde bei 581 g für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet wurde sanft in 1 ml IMDM, enthaltend 20 % fötales Rinderserum und 20 % Glycerol, resuspendiert, in ein steriles Kryogefäß übertragen und in einen Nalgene-Gefrierbehälter, enthaltend Isopropanol in seiner Basis, gegeben. Kryogefäße wurden in einem -80°C -Gefrierbehälter für einen Zeitraum gelagert, der (a) sicherstellte, dass die Zellen -80°C erreichten, und (b) Überoxidation der Zellen verhinderte. In dem vorliegenden Beispiel wurden Kryogefäße für mindestens vier Stunden und nicht länger als acht Stunden gelagert. Die Zellen enthaltenden Kryogefäße wurden in flüssigem Stickstoff zur Langzeitlagerung gegeben.

9(e). Auftauen von Kulturen:

[0068] Wenn die gelagerten Zellen kultiviert werden sollten, wurden die Gefäße dem flüssigen Stickstoff entnommen und bei 37°C erwärmt. Obwohl 37°C bevorzugt wurden, wurden Zellen ebenfalls bei anderen Temperaturen aufgetaut, welche für ein schnelles, jedoch nicht zerstörendes Aufwärmen sorgten. Das anfängliche Ausplattieren der Zellen wurde in 10 ml IMDM-Medium, enthaltend 20 % fötales Rinderserum (Erwärmungsmedium), gemacht. Zellen wurden in Erwärmungsmedium für drei bis fünf Tage gehalten, um den Zellen zu erlauben, fest an die Kulturschale anzuheften, bevor auf das übliche Kulturmedium gewechselt wurde. Das Erwärmungsmedium muss IMDM und 20 % fötales Rinderserum enthalten. Falls das Erwärmungsmedium zum Beispiel 10 % anstelle von 20 % fötalem Rinderserum enthält, werden sich die humanen Kardiomyozyten nicht teilen und werden dedifferenzieren. Dedifferenzierte Kardiomyozyten können für die Transplantation nicht verwendet werden.

[0069] Kardiomyozyten, welche kryogefroren waren und wie beschrieben erwärmt worden waren, wurden erfolgreich subkultiviert und waren morphologisch identisch mit Zellen, welche nicht gefroren gewesen sind. Zellen, welche gefroren gewesen sind, und Zellen, welche nicht gefroren worden sind, wurden für Mitochondrienintegrität bei jeder Passage über sieben Passagen analysiert (über den Verlauf von einem Monat Subkultur nach Auftauen und Ausplattieren). Das mitochondriale Enzym Cytochrom C Oxidase zeigte keinen Unterschied in der Aktivität zwischen gefrorenen und ungefrorenen Kardiomyozyten bei jeder Passage. Unsere Feststellung, dass primäre humane Kardiomyozyten gefroren gelagert werden können und später wiederbelebt werden können, erlaubt es, dass ihre „Lebenszeit“ verlängert werden kann, wodurch folglich die Nützlichkeit solcher Zellen gesteigert wird.

9(f). Endothelzellen:

[0070] Humane Gefäßendothelzellen wurden wie in Abschnitt 8 beschrieben aus Saphenavene und Aorta, gewonnen aus Patienten, die koronare Bypasschirurgie durchmachten, isoliert.

9(g). Glatte Muskelzellen:

[0071] Humane glatte Muskelzellen wurden aus Saphenavene nach Endothelzellisolierung isoliert. Nachdem Endothelzellen aus Venen wie in Abschnitt 8 beschrieben gesammelt worden sind, wurde das Gewebe zerkleinert und in 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung, enthaltend 0,2 % Trypsin, 0,1 % Collagenase und 0,02 % Glucose, für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die glatten Muskelzellen wurden durch wiederholtes Pipettieren des verdauten Gewebes isoliert. Die Zellen in dem Überstand wurden in ein Röhrchen, enthaltend 20 ml Zellkulturmedium (199-Medium, enthaltend 20 % fötales Rinderserum, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin), übertragen, bei $600 \times g$ für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, im Zellkulturmedium resuspendiert und kultiviert.

9(h). Humane Fibroblasten:

[0072] Humane Fibroblasten wurden aus Hautbiopsien wie in Abschnitt 6 beschrieben isoliert.

10. Rattenzellaufreinigung:

[0073] Isolierte Rattenkardiomyozyten, glatte Muskelzellen aus Ratten, Rattengefäßendothelzellen wurden durch eine Preplating-Technik (Simpson et al., Circulation Research 51: 787-801; 1982) aufgereinigt, welche einen Vorteil aus der Erkenntnis zieht, dass diese Zellen eine längere Zeit erfordern, bis sie an eine Zellkulturschale anheften, als es Fibroblastenzellen tun. Frisch isolierte Zellen wurden auf Schalen ausplattiert und für zwei Stunden bei 37 °C kultiviert, wonach das Kulturmedium, das die suspendierten Zellen (ohne die Fibroblasten) enthält, in eine andere Schale für die weitere Kultivierung übertragen wurde.

[0074] Die andere für die Kulturaufreinigung verwendete Technik war die klonale Verdünnungstechnik. Wenn die Zellen in niedriger Dichte für das Kultivieren ausgesät werden, bilden lebensfähige Zellen einzelne Kolonien. Jede Zelle, die nicht vom gewünschten Typ ist und welche sich benachbart einer Kolonie von Interesse befindet, wird mit einer sterilen Nadel abgetötet. Gewünschte Kolonien werden dann unter Verwendung einer sterilen Pasteurpipette aufgenommen und in neue Kulturschalen für das Kultivieren und Passagieren übertragen.

[0075] Humane Kardiomyozyten wurden ohne einen Aufreinigungsschritt verwendet.

11. Zellidentifikation:

Kardiomyozyten:

[0076] Die Reinheit von primären Kulturen an Kardiomyozyten wurde bewertet durch Immunfluoreszenzfärbung für die schwere Kette von kardialem Myosin (Rougier Bio-Tech Ltd., Quebec) (Li, R. K. et al., Cardiovascular Research 32: 362-73, 1996). Die kultivierten Zellen wurden mit Methanol bei -20 °C für 15 Minuten fixiert, mit phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen, mit einem monoklonalen Antikörper gegen die schwere Kette von kardialem Myosin für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert, dreimal mit phosphatgepufferter Salzlösung für jeweils fünf Minuten bei Raumtemperatur gewaschen und dann mit Anti-Maus-IgG aus Ratten, konjugiert mit Fluoresceinisothiocyanat, für 45 Minuten bei 37 °C unter feuchten und dunklen Bedingungen inkubiert. Die Zellen wurden mit phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen, eingebettet und unter Verwendung eines Licht- und UV-Mikroskops fotografiert. Die Reinheit der Kardiomyozytenkulturen wurde bestimmt durch Auszählen der Prozentsätze gefärbter Zellen in acht zufälligen Feldern/Schale. Acht Schalen an Kardiomyozytenkulturen wurden bei jeder Kardiomyozytenzubereitung verwendet.

Glatte Muskelzellen:

[0077] Die Reinheit von glatten Muskelzellkulturen wurde bestimmt durch Immunfluoreszenzfärbung für Actin aus glatten Muskelzellen (Sigma), wie in dem vorangegangenen Absatz beschrieben.

Vaskuläre Endothelzellen:

[0078] Die Reinheit von Endothelzellkulturen wurde bestimmt durch Immunfluoreszenzfärbung für Faktor VIII, wie in dem Kardiomyozytenabschnitt oben beschrieben.

Fibroblasten:

[0079] Die Reinheit von Fibroblastenzellkulturen wurde bestimmt durch Untersuchen der Zellmorphologie mit einem Mikroskop.

B) Zelltransplantation

[0080] Die Versuchstiere wurden in drei Kategorien gruppiert: Schein, Kontrolle und Transplantation. Die Kriterien für solche Gruppierung waren wie folgt:

Gruppe	Chirurgische Freilegung	Narbenerzeugung	Zelltransplantation
Schein	X		
Kontrolle	X	X	
Transplantation	X	X	X

1. Chirurgische Freilegung:

[0081] Sprague-Dawley-Ratten (500 Gramm) wurden mit Ketamin (22 mg/kg Körpergewicht, intramuskulär) anästhesiert, gefolgt von einer intraperitonealen Injektion mit Pentobarbital (30 mg/kg Körpergewicht). Wenn sie erst einmal anästhesiert waren, wurden Ratten intubiert und Überdruckbeatmung wurde mit einem Harvard-Ventilator (Modell 683, USA) aufrechterhalten. Die Respirationsrate wurde auf 60 Zyklen/Minute eingestellt, mit einem Atemvolumen von 2 ml. Tiere wurden mit sauerstoffergänzter Raumluft beatmet. Das Herz wurde durch eine 2 cm große linkslaterale Brustkorberöffnung freigelegt. Die Muskelschicht und Hautschnitt wurden chirurgisch mit 5-0-Vicrylfäden verschlossen.

2. Myokardverletzung und Myokardnarbenerzeugung:

[0082] Die Herzen der adulten Ratten wurden wie in dem vorangegangenen Absatz freigelegt. Eine auf -190°C für zwei Minuten abgekühlte Metallsonde mit 5 mm Durchmesser wurde an die linksventrikuläre freie Wand des Herzens für 20 Sekunden gehalten. Dieses Vorgehen wurde achtmal wiederholt. Die Muskelschicht und der Hautschnitt wurden dann chirurgisch mit 5-0-Vicrylfäden verschlossen.

[0083] Die Tiere erholten sich von der Operation in einer warmen Umgebung, wo sie für vier Stunden postoperativ überwacht wurden und es wurde ihnen dann Penlog XL (Benzathin-Penicillin G 150.000 U/ml und Procain-Penicillin G 150.000 U/ml) intramuskulär (0,25 ml/Ratte) alle drei Tage und Buprenorphin (0,01-0,05 mg/kg Körpergewicht) subkutan 8-12 Stunden für die ersten 48 Stunden nach Operation gegeben.

3. Transfektion der kultivierten Kardiomyozyten:

[0084] Frisch isolierte oder kultivierte Zellen wurden durch Calciumphosphatcopräzipitation (Chi Q. W. et al., Journal of Molecular and Cell Cardiology 24: 1221-1229, 1992) mit einem das β -Galactosidasegen enthaltenden Plasmid transfiziert. Plasmid-DNA (20 μg), gelöst in 450 μl sterilem Wasser und 50 μl 2,5 M CaCl_2 , wurde langsam zu 500 μl belüfteter, mit 2X HEPES gepufferter Salzlösung (0,284 M NaCl, 0,050 M HEPES-Säure und 1,48 mM Na_2HPO_4 , pH 7,05) hinzugefügt. Nach 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Lösung zu einer Kardiomyozytensuspension ($1,0 \times 10^6$ Zellen/6 ml Kulturmedium) hinzugefügt. In den Kontrollgruppen wurde dasselbe Vorgehen durchgeführt, entweder ohne Plasmid-DNA oder mit pREP4 (ein Plasmid, dem ein β -Galactosidasegen fehlt; Invitrogen, USA; Plasmidkontrolle). Die Zellen wurden bei 37°C , 5 % CO_2 und 95 % Luft für 24 Stunden kultiviert.

[0085] Um die Effizienz der Zelltransfektion zu bestimmen, wurden Zellen, die für entweder 24 Stunden oder vier Wochen kultiviert worden sind, dreimal mit phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen, in 2 % Formaldehyd und 2 % Glutaraldehyd in Phosphatpuffer (0,15 M NaCl und 0,015 M NaH_2PO_4 , pH 7,2) bei 4°C für fünf Minuten fixiert, mit Phosphatpuffer, enthaltend 2,0 mM MgCl_2 , gewaschen und über Nacht bei 37°C in einer Lösung, enthaltend 1 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-beta-galactopyranosidose (X-Gal), 5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0,2 mM MgCl_2 in Phosphatpuffer (pH 7,2), gefärbt. Die gefärbten und ungefärbten Zellen in acht zufälligen Feldern/Schale (sechs Schalen aus sechs Zubereitungen) wurden unter dem Mikroskop gezählt, um den Prozentsatz an Zellen, der β -Galactosidaseaktivität enthält, zu bestimmen. Zwei Schalen aus jedem Transplantationsexperiment wurden für eine Zelltransfektionseffizienzstudie verwendet (N (Anzahl von Tieren) = 6).

4. Zellzubereitung und Transplantation:

[0086] Kultivierte Zellen wurden dreimal mit phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen, um tote Zellen zu entfernen, und wurden dann von der Zellkulturschale und voneinander mit 0,05 % Trypsin in phosphatgepufferter Salzlösung für drei Minuten gelöst. Nach Hinzufügen von 10 ml kultiviertem Medium wurde die Zellsus-

pension bei $580 \times g$ für drei Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im Kulturmedium bei einer Konzentration von 4×10^6 Zellen/ml Kulturmedium resuspendiert. Das Zellsuspensionsvolumen betrug 0,25 ml für jede Zelltransplantation.

[0087] Am Tag 14 oder 30 nach Myokardnarbenerzeugung (Abschnitt 2) wurden die Tiere (welche nun vollständig ausgebildete transmurale Narben in ihren Ventrikeln hatten) wie in Abschnitt 1 beschrieben anästhesiert. Das Narbengewebe im Herzen wurde durch eine Sternotomie entlang der Mittellinie freigelegt. Die Zellsuspension (0,25 ml) wurde in das Narbengewebe der Tiere der Transplantatgruppe unter Verwendung einer Tuberkulinspritze injiziert. Kontrolltiere wurden ähnlich mit 0,25 ml Kulturmedium (ohne Zellen) injiziert. Die Ratten in der Scheingruppe durchliefen das chirurgische Prozedere ohne Injektion. Kryopräzipitat (Fibrinklebstoff) wurde auf die Injektionsstellen gegeben, um Leckage der injizierten Zellen zu verhindern. Die Brust wurde mit 5-0-Vicrylfäden verschlossen. Antibiotika und Analgetika wurden wie in Abschnitt 1 beschrieben gegeben. Cyclosporin A wurde mit einer Dosis von 5 mg/kg Körpergewicht/Tag subkutan in Tiere sämtlicher drei Gruppen verabreicht. Die Ratten wurden in Käfigen mit Filterdeckeln gehalten.

C) Messung der Herzfunktion

[0088] Acht Wochen nach Myokardverletzung wurde die Herzfunktion von Schein-, Kontroll- und transplantierten Tieren unter Verwendung einer Langendorff-Präparation (Stephen S. E., et al., Annals of Thoracic Surgery 59: 1127-1133, 1995) gemessen. Die Ratten wurden anästhesiert und Heparin (200 Einheiten) wurde intravenös verabreicht. Die Herzen wurden schnell aus den Ratten isoliert und in einem Langendorff-Gerät mit filtriertem Krebs-Heinseleit-Puffer (mmol/l: NaCl 118, KCl 4,7, KH_2PO_4 1,2, CaCl_2 2,5, MgSO_4 1,2, NaHCO_3 25, Glucose 11; pH 7,4), äquilibriert mit 5 % CO_2 und 95 % O_2 , perfundiert. Ein Latexballon wurde in den linken Ventrikel durch die Mitralklappe geführt und mit einem Druckwandler (Modell p10EZ, Viggo-Spectramed, CA) und Wandlerverstärker und Differentiatorverstärker (Modell 11-G4113-01, Gould Instrument System Inc., Ohio) verbunden. Nach 30 Minuten Stabilisierung wurde der Koronarfluss in dem Herzen dreifach gemessen durch zeitlich abgestimmtes Sammeln in dem entleerenden Schlagzustand. Die Ballongröße wurde durch die Zugabe von Salzlösung in Schritten mit 0,02 ml von 0,04 auf 0,8 ml oder das Volumen, bei welchem der diastolische Enddruck 30 mm Hg erreichte, oder welcher Zustand zuerst erreicht wurde, gesteigert. Die systolischen und diastolischen Drücke wurden bei jedem Ballonvolumen aufgenommen und der entwickelte Druck wurde berechnet als die Differenz zwischen den systolischen und diastolischen Drücken.

[0089] Herzen wurden gewogen und ihre Größen wurden durch Wasserverdrängung gemessen.

D) Messung von linksventrikulärer Remodellierung

[0090] Die Epikard- und Endokardoberflächen des normalen und Narbengewebes in der freien linksventrikulären Wand (LVFW) wurden durch die Techniken von Pfeffer et al. (Pfeffer J. M., et al., American Journal of Physiology 260: H1406-14, 1991) und Jugdutt und Khan (Jugdutt B. I., et al., Circulation 89: 2297-307, 1994) gemessen. Kurz, die Herzen wurden im Zustand der Distension (30 mm Hg) mit 10 % phosphatgepufferter Formalinlösung fixiert und dann in 3 mm dicke Schnitte geschnitten. Für jeden Schnitt wurde der Bereich des normalen Gewebes, Narbengewebes und transplantierten Gewebes in der linksventrikulären freien Wand auf einem Diapositiv abgegrenzt und unter Verwendung von Computerplanimetrie (Jandal Scientific Sigma Scan, USA) quantifiziert, wie beschrieben von Wu et al. (Wu T. W., et al., Cardiovascular Research 27: 726-39, 1993). Die Längen der linksventrikulären freien Wand und des Narbengewebes sowohl auf den endokardialen als auch den epikardialen Oberflächen jedes Schnittes wurden gemessen. Die Oberflächen des epikardialen und endokardialen Narbengewebes und der linksventrikulären freien Wand wurden wie folgt gemessen:

(Endokardlänge + Epikardlänge) \times Schnittdicke (3 mm).

[0091] Die Prozentsätze der Fläche an Narbengewebe in der linksventrikulären freien Wand (LVFW) wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{(\text{Epikardnabengröße} + \text{Endokardnabengröße})}{(\text{Endokard-LVFW1} + \text{Epikard-LVFW})} \times 100$$

[0092] Um den Prozentsatz der Fläche in dem Narbengewebe zu berechnen, der von dem transplantierten Gewebe besetzt wird, wurde die folgende Gleichung verwendet:

(Herzgewebelänge in dem Narbengewebe jedes Schnittes) x (Schnittdicke (3 mm))

x 100

(Gesamtnarbenfläche)

E) Histologie und Elektronenmikroskopie von transplantierten Zellen

[0093] Am Tage 30 oder 45 nach der Transplantation wurden die Tiere wie in Beispiel 1 anästhesiert und Transplantat-, Kontroll- und Scheinherzen wurden durch eine Mittelliniensternotomie freigelegt und schnell entnommen. Die Tiere wurden durch Entblutung unter Vollnarkose euthanasiert.

[0094] Um das durch transplantierte Zellen gebildete Gewebe zu lokalisieren, wurden die transplantierten und Kontrollmyokardnarbengewebe in 5 % Eisessig in Methanol fixiert. Das Gewebe wurde in Paraffin eingebettet und in 10 µm dicke Schnitte geschnitten. Nach Entfernen des Paraffins durch Eintauchen der Schnitte für drei Minuten in Xylen und dann für jeweils drei Minuten in 100, 95, 90, 85 und 70 % Ethanol wurden die Proben mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt, wie beschrieben durch den Hersteller (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO) und fotografiert.

[0095] Um für β -Galactosidaseaktivität in den transplantierten Kardiomyozyten zu färben, wurden die Herzschnitte bei 4 °C für 12 Stunden in 2 % Formaldehyd und 2 % Glutaraldehyd in Phosphatpuffer (0,15 M NaCl und 0,015 M NaH_2PO_4 , pH 7,2) fixiert. Die transplantierten Kardiomyozyten wurden durch Färbung für β -Galactosidaseaktivität, wie früher in Beispiel 2 beschrieben, lokalisiert. Das gefärbte Gewebe wurde in Paraffin eingebettet und in 10 µm dicke Schnitte geschnitten, welche mit Hämatoxylin und Eosin wie in dem letzten Abschnitt beschrieben gefärbt wurden.

[0096] Um kultivierte ventrikuläre und atriale Kardiomyozytentransplantate zu identifizieren, wurde das transplantierte Herzgewebe immunfluoreszenzgefärbt für die schwere Kette von kardialem Myosin. Kurz, Gewebeschnitte wurden dreimal mit phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen und mit 2 ml 100 % kaltem Methanol bei -20 °C für 15 Minuten fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit phosphatgepufferter Salzlösung und Trocknen durch Entwässern wurden die Gewebeschnitte für 45 Minuten bei 37 °C an monoklonale Antikörper gegen die schwere Kette von kardialem Myosin (Rougie Bio-Tech, Montreal, Kanada), verdünnt 1:20 mit Salzlösung, ausgesetzt. Kontrollgewebe wurden unter denselben Bedingungen mit phosphatgepufferter Salzlösung inkubiert. Die Gewebe wurden dreimal mit phosphatgepufferter Salzlösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter sanftem Schütteln gewaschen, wonach der sekundäre Antikörper, Kaninchen-anti-Maus-IgG, konjugiert mit Fluoresceinisothiocyanat, bei einer Konzentration mit 1:32-Verdünnung mit phosphatgepufferter Salzlösung, hinzugefügt wurde. Die Schnitte wurden mit dem zweiten Antikörper unter dunklen und feuchten Bedingungen für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Waschen mit phosphatgepufferter Salzlösung wurden die Zellen in den transplantierten Kontrollgeweben unter Ultraviolettlicht unter Verwendung eines Epimikroskopes mit einem Blaufilter sichtbar gemacht.

[0097] Die glatten Muskelzelltransplantate wurden durch immunfluoreszierendes Färben unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers für α -Aktin aus glattem Muskel als der primäre Antikörper identifiziert. Endothelzelltransplantate wurden durch Immunfluoreszenzfärbung für Faktor VIII identifiziert, wie im nächsten Abschnitt beschrieben.

[0098] Fibroblastentransplantate wurden durch die Anwesenheit einer lokalisierten Immunabstoßung innerhalb der Ventrikelnarbe identifiziert.

F) Histologische und elektronenmikroskopische Studien von Angiogenese in dem Transplantat

[0099] Für die immunzytochemische Färbung von mit Faktor VIII im Zusammenhang stehendem Antigen in den vaskulären Endothelzellen wurden wie in Abschnitt E) oben vorbereitete Gewebeschnitte mit Xylen zweimal für jeweils fünf Minuten, mit 100 % Ethanol zweimal für jeweils zwei Minuten und dann mit 70 % Ethanol zweimal für jeweils eine Minute inkubiert. Die Schnitte wurden mit Kaninchen-IgG gegen mit Faktor VIII im Zusammenhang stehendes Antigen (Faktor VIII related Antigen) (Dimension Lab. Inc., Ontario) inkubiert. Die Kontrollproben wurden mit phosphatgepufferter Salzlösung unter denselben Bedingungen inkubiert. Die Test- und Kontrollproben wurden mit Anti-Kaninchen-IgG aus Ziege, konjugiert mit Peroxidase, inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Proben mit phosphatgepufferter Salzlösung nach Färbung mit sekundärem Antikörper

wurden die Proben in Diaminobenzidin- H_2O_2 - (2 mg/ml Diaminobenzidin, 0,03 % H_2O_2 in 0,02 M Phosphatpuffer) Lösung für 15 Minuten eingetaucht. Die Proben wurden mit phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen. Die gefärbten vaskulären Endothelzellen in den Transplantaten (N=17) und Kontrollgruppen (N=14) wurden unter Verwendung eines Lichtmikroskops bei 200-facher Vergrößerung ausgezählt. Das Ergebnis wurde als Anzahl an Blutgefäßen/Feldbereich ($0,08 \text{ mm}^2$) ausgedrückt.

[0100] Für elektronenmikroskopische Studien wurden Herzen in 1 % Glutaraldehyd in Phosphatpuffer fixiert, mit 1 % Osmiumtetroxid nachfixiert, in Ethanolgradient (50, 70, 90 und 100 %) dehydriert, in Propylenoxid bei 60 °C über Nacht polymerisiert, geschnitten und unter Verwendung eines JEOL-1200-TEM-Elektronenmikroskops untersucht (Li R. K., et al., Cardiovascular Research 32: 362-73, 1996).

G) Zelltransplantate

[0101] Kultivierte Kardiomyozyten, glatte Muskelzellen, Endothelzellen und/oder Fibroblasten wurden auf biologischem Netz, wie zum Beispiel Collagenmembran, und auf nicht biologischen Membranen, wie zum Beispiel nicht abbaubare Membranen (Dacron) oder abbaubare Membranen (Polyglycolsäurepolymere), ausgesät und das Netz und die Zellen wurden im Zellkulturmedium kultiviert. Sieben Tage nach Kultur wurde das zellenthaltende Netz in 2 % Formaldehyd und 2 % Glutaraldehyd in Phosphatpuffer (0,15 M NaCl und 0,015 M NaH_2O_4 , pH 7,2) bei 4 °C für 12 Stunden fixiert, in Paraffin eingebettet und in 10 μm dicke Schnitte geschnitten, welche mit Hämatoxylin und Eosin wie in Abschnitt E beschrieben gefärbt wurden, und fotografiert.

H) Zellklebetechnik für Zelltransplantation

[0102] Um beim Verhindern von Versagen von infarktiertem Herzen erfolgreich zu sein, müssen ausreichend Kardiomyozyten in das infarktierte Myokard implantiert werden. Obwohl dies durch mehrfache Spritzeninjektionen gemacht werden kann, begrenzt das Injizieren der Zellen unglücklicherweise die Anzahl an Zellen, welche in Myokardnarbengewebe transplantiert werden können. Wir untersuchten eine andere Technik, um eine große Anzahl von Zellen in das infarktierte Myokard zu applizieren. Thrombin und Kryopräzipitat (Fibrinklebstoff), welche aus humanem Blut gewonnen worden sind, verklumpen schnell. Unsere In-vitro-Ergebnisse zeigten das Überleben und die Kontraktion von Kardiomyozyten in Fibrinverklumpungen. Wir verwendeten diesen Fibrinklebstoff für Zelltransplantation.

1. Klebstoffinjektionsstelle, um transplantierte Zelleckage zu verhindern:

[0103] Der biologische Klebstoff wird auf die Injektionsstelle aufgetragen, während sich die Injektionsnadel immer noch an Ort und Stelle befindet. Die Nadel wird herausgezogen, nachdem der Klebstoff verklumpt ist. Auf solch eine Weise wird Leckage transplanterter Zellen, wie zuvor diskutiert, verhindert.

2. Verkleben der Zellen auf dem Myokardnarbengewebe um Injektionsschädigung Zu verhindern:

[0104] Wir entfernten das Epikard über der Narbe und dem beschädigten Myokard. Die transplantierten Zellen wurden in Thrombin suspendiert und die Thrombin/Zellsuspension wurde auf das Myokardnarbengewebe mit Kryopräzipitat (Fibrinklebstoff) aufgetragen. Der Klebstoff brachte die Zellsuspension dazu, an der Oberfläche von sowohl vernarbtem als auch normalem Myokard anzuhaften, wonach das Perikard auf die Fibrinverklumpung geklebt wurde. Zellverlust wurde verhindert. Wir fanden heraus, dass verklebte Kardiomyozyten auf dem Myokardnarbengewebe überleben können und es erlaubt wird, dass eine große Anzahl an Zellen transplantiert wird. Diese Technik verbesserte die Herzfunktion besser als nur das Injizieren der Zellen. Die direkt auf das Myokard ohne Epikard verklebten Kardiomyozyten können sich mit Wirtskardiomyozyten und Kardiomyozyten verbinden, um synchron mit dem Wirtsmysokard zu kontrahieren.

3. Verkleben des zellulären Netzes auf dem Myokardnarbengewebe um seine Ausbreitung zu verhindern:

[0105] Zelltransplantate, umfassend biologisches oder nicht biologisches Gitter mit darauf suspendierten Zellen (wie in Beispiel 7 beschrieben), wurden auf das Narbengewebe geklebt. Das Perikard wurde wiederum auf die Oberfläche des Gitters geklebt.

I) Datenanalyse

[0106] Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung ausgedrückt. Es wurde die Software Statistical Analysis System für sämtliche Analysen verwendet (SAS Institute, Cary, NC). Vergleiche von kontinuierlichen

Variablen zwischen mehr als zwei Gruppen wurden durch eine Einweg-Analyse der Varianz durchgeführt. Falls das F-Verhältnis aus der Varianzanalyse signifikant war, wurde ein multipler Duncan-t-Rangtest genutzt, um Unterschiede zwischen den Gruppen zu spezifizieren. Alpha wurde für diese Analysen auf $p < 0,05$ gesetzt.

[0107] Funktionsdaten wurden für die Schein-, Kontroll- und Transplantatgruppen durch eine Analyse der Kovarianz unter Verwendung des intrakavitären Ballonvolumens als die Covariable und die systolischen, diastolischen und entwickelten Drücke als die abhängigen Variablen, bewertet. Hauptwirkungen waren Gruppe, Volumen und die Wechselwirkung zwischen Gruppe \times Volumen. Falls es einen Gesamtunterschied in der Kovarianzanalyse gab, wurden mehrere paarweise Vergleiche durchgeführt, um zu spezifizieren, welche Gruppen unterschiedlich waren. Da es mehrere paarweise Vergleiche gab, wurde eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt und die kritische alpha-Schwelle wurde auf 0,01 für die Analyse der Kovarianz gesetzt.

J) Verwendung von Wachstumsfaktoren bei der Behandlung von idiopathischer hypertropher Kardiomyopathie (HCM)

[0108] Idiopathische hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) ist eine primäre kardiale Anomalie, gekennzeichnet durch regionale asymmetrische Myokardhypertrophie. Das hypertrophe Myokard kann in Verstopfung des linksventrikulären Ausstoßes, ebenso wie systolischer und diastolischer Dysfunktion und Myokardischämie resultieren. Auf medizinische Therapie nicht ansprechende Symptome können eine Operation notwendig machen.

[0109] HCM wird größtenteils als eine heterogene Erkrankung der Sarkomere beschrieben. Es wurden wenigstens 34 Unsinnmutationen in dem Gen der schweren Kette von β -Myosin beschrieben und sieben Mutationen existieren auch in Kandidatengenorten. Familienstudien legen jedoch nahe, dass das autosomal dominante Merkmal nur zu 50 % der HCM-Patienten beiträgt. Die verbleibenden HCM-Patienten zeigen keine familiäre Transmission und die Erkrankung tritt sporadisch auf. Myokardcalciumkinetiken und sympathische Stimulation wurden untersucht wegen diastolischer funktionaler Anomalien. Keines der Ergebnisse erklärt jedoch die regionale Myokardhypertrophie (Kardiomyozytenhypertrophie und Überproduktion von extrazellulären Matrixproteinen), die bei den meisten HCM-Patienten beobachtet wird. Die Ätiologie dieser Erkrankung bleibt unbekannt. Es wird gedacht, dass Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle bei der Kardiomyozytenproliferation, Zellhypertrophie und der Überproduktion von extrazellulärer Matrix spielen könnten.

[0110] Um den Einfluss von Wachstumsfaktoren bei Myokardhypertrophie in HCM-Patienten zu untersuchen, beurteilten wir die Genexpression und zelluläre Lokalisation des transformierenden Wachstumsfaktors $\beta 1$ (TGF $\beta 1$), des insulinähnlichen Wachstumsfaktors (IGF-I, II) und des thrombozytären Wachstumsfaktors B (PDGF-B) in ventrikulären Biopsien, gewonnen aus Patienten mit HCM (N = 8), Aortastenosen (AS, N = 8), stabiler Angina (SA, N = 8) und explantierten Herzen mit ischämischer Kardiomyopathie (TM, N = 7).

Methoden:

[0111] Spiegel an TGF $\beta 1$ -, IGF-I, IGF-II- und PDGF-B-Transkripten wurden unter Verwendung von Multiplex-RT-PCR quantifiziert. Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (G3PDH) wurde als ein innerer Standard verwendet. Antikörper gegen TGF $\beta 1$ und IGF-I wurden verwendet, um ihre Peptide innerhalb des Myokards zu lokalisieren. Gegensinn- und Sinn-(Kontroll-) cRNA-Sonden für TGF $\beta 1$ und IGF-I, markiert mit Digoxigenin, wurden verwendet, um die Wachstumsfaktortranskripte durch In-situ-Hybridisierung zu lokalisieren.

Ergebnisse:

[0112] mRNA-Spiegel (densitometrisches Verhältnis von GF/G3PDH) von TGF $\beta 1$ und IGF-I in HCM-Myokard ($0,75 \pm 0,05$, $0,85 \pm 0,15$, Mittelwert ± 1 SE) waren signifikant ($p < 0,01$ für sämtliche Gruppen), erhoben im Vergleich mit Nicht-HCM-Myokard (AS: $0,38 \pm 0,07$, $0,29 \pm 0,06$; SA: $0,32 \pm 0,04$, $0,18 \pm 0,05$; TM: $0,25 \pm 0,03$, $0,15 \pm 0,03$). mRNA-Spiegel von TGF $\beta 1$ und IGF-I in dem hypertrophen AS-Myokard waren höher ($p = 0,02$, $p = 0,05$) als jene in dem explantierten Myokard (TM). Immunhistochemische und In-situ-Hybridisierungsstudien zeigten eine gesteigerte Expression von TGF $\beta 1$ und IGF-I in den HCM-Kardiomyozyten.

Schlussfolgerung:

[0113] Genexpression von TGF $\beta 1$ und IGF-I war bei idiopathischer Hypertrophie gesteigert und kann mit ihrer Entwicklung in Zusammenhang gebracht werden.

Ergebnisse

1. Ventrikuläre und atriale Kardiomyozyten:

[0114] Fötale und adulte Säugerventrikulkardiomyozyten und adulte Säugervorhofkardiomyozyten wurden isoliert unter Verwendung von enzymatischer Verdauung, wie oben in den Abschnitten 1-3, Beispiel I beschrieben. Nach Reinigung war die Reinheit der kultivierten ventrikulären und atrialen Kardiomyozyten höher als 94 % (N = 8), wie bestimmt durch den Prozentsatz an Zellen, der für die schwere Kette von kardialen Myosin färbte. Die in vitro gewachsenen Kardiomyozyten verbanden sich miteinander und bildeten ein Gewebemuster nach sechs Kulturtagen. Das fötale, herzähnliche Gewebe kontrahierte regulär und spontan in Kultur. Die adulten Kardiomyozyten kontrahierten nicht in Kultur.

2. Glatte Muskelzellen:

[0115] Fötale und adulte glatte Muskelzellen wurden erfolgreich kultiviert. Die Zellen proliferierten in der Kultur. Die kultivierten Zellen wurden stark mit Antikörper gegen Aktin von glattem Muskel gefärbt.

3. Vaskuläre Endothelzellen:

[0116] Endothelzellen wurden aus Blutgefäß isoliert und kultiviert. Färbung mit Antikörper gegen Faktor VIII zeigte, dass mehr als 95 % Zellen in der Kulturschale Endothelzellen waren.

4. Fibroblasten:

[0117] Fötale und adulte Hautfibroblasten wurden isoliert und kultiviert. Die Zellen proliferierten unter der Kulturbedingung. Wenn die Kultur Konfluenz erreichte, bildeten die Zellen ein typisches Fibroblastenmuster: spindelförmige Zellen in einem Wellenmuster.

5. Zelltransfektion:

[0118] 24 Stunden nach Transfektion von frisch isolierten Zellen war der Prozentsatz der transfizierten Zellen mit β -Galactosidase $18,2 \pm 5,2$ % (N = 6). Es färbten keine Zellen in den Kontrollgruppen mit Plasmid pREP4 (N = 6) und ohne ein Plasmid (N = 6) positiv. Nach Kultivieren für vier Wochen färbten $5,4 \pm 3,1$ % (N = 6) der transfizierten Zellen für β -Galactosidaseaktivität positiv.

6. Myokardnarbengewebe:

[0119] Unmittelbar nach Myokardverletzung wurden 25 ± 3 % der linksventrikulären freien Wand (LVFW) transmural beschädigt. Die Kardiomyozyten wurden fragmentiert. Nach einer Woche waren die meisten der nekrotisierten Kardiomyozyten weg und in dem betroffenen Gebiet war ein überwiegend mononukleär inflammatorisches Infiltrat vorhanden. Nach zwei Wochen war das inflammatorische Infiltrat weitgehend verschwunden und Fibroblasten und Collagenablagerung waren ersichtlich. Nach vier und acht Wochen bestand die Narbe aus fibrotischem Gewebe. Das Gewebe war weniger zellulär und Lymphozyten wurden nicht beobachtet. Keine kardialen Muskelzellen wurden in irgendwelchem Narbengewebe beobachtet.

[0120] Die Myokardnarbe des linken Ventrikels nahm in der Größe über die achtwöchige Studienzeitdauer in den Kontrollherzen zu. Obwohl die Narbengrößen nach 1 und 2 Wochen (13 ± 6 % und 21 ± 4 % der linksventrikulären freien Wand) statistisch nicht unterschiedlich waren, war die Narbengröße nach vier Wochen (39 ± 5 % der linksventrikulären freien Wand) größer ($p < 0,01$). Nach acht Wochen gab es eine weitere Zunahme ($p < 0,01$) in der Narbengröße (55 ± 3 % der linksventrikulären freien Wand).

7. Optimale Zeit für Zelltransplantation:

[0121] Die in Myokardgewebe unmittelbar nach Myokardschädigung transplantierten fötalen Rattenkardiomyozyten überlebten in dem betroffenen Gebiet nicht. Der Narbenbereich (53 ± 5 %) transplanteder Herzen war ähnlich wie jener der Kontrollgruppe (55 ± 3 % der linksventrikulären freien Wand). Zwei Wochen nach Myokardschädigung transplantierte Kardiomyozyten bildeten kardiales Gewebe, das 34 % des Gesamtnarbengebiets besetzte (11 ± 3 % der linksventrikulären freien Wand). Ähnlich besetzten nach vier Wochen transplantierte Kardiomyozyten 32 % des Gesamtnarbengebiets (14 ± 4 % der linksventrikulären freien Wand). Die Narbengrößen in den Herzen, welche Transplantate zwei Wochen und vier Wochen nach Myokardschädigung er-

hielten, waren kleiner ($p < 0,01$) als die Narbengröße der Kontrollherzen. Die Narbengröße der Herzen, die Transplantate zwei Wochen nach Myokardschädigung empfangen hatten, war kleiner ($p < 0,01$) als jene der Herzen, welche Transplantate vier Wochen nach Myokardschädigung erhalten hatten.

8. Transplantierte Zellen in Myokardnarbengewebe:

[0122] Zellen wurden in transmurale Narben zwei und vier Wochen nach Kryonarbeninduktion transplantiert. Sechs Wochen oder vier Wochen nach ventrikulärer Kardiomyozytentransplantation (d. h. acht Wochen nach Narbeninduktion in allen Tieren) hatte sich nur fötales Kardiomyozytengewebe ($N = 17$) in dem Myokardnarbengewebe gebildet. Die Zellen waren miteinander verbunden und bildeten ein kardiales Gewebemuster. Das Gewebe aller drei Tiere, transplantiert mit Kardiomyozyten, die mit dem β -Galactosidasegen transfiziert worden sind, enthielt β -Galactosidaseaktivität. Die transplantierten Kardiomyozyten enthielten Sarkomere und waren durch Verbindungen, zusammengesetzt aus Desmosomen und Fascia adhaerens (Streifendesmosomen), verbunden, welche in den Kardiomyozyten unmittelbar vor der Transplantation nicht vorhanden waren. Lymphozyteninfiltration umgab das Herzgewebe, gebildet durch transplantierte fötale Kardiomyozyten. In den Kontrolltieren ($N = 14$) wurden Herzgewebe, Lymphozyteninfiltration und β -Galactosidaseaktivität in der Narbe nicht beobachtet. Die acht Wochen alte Narbe war weniger zellulär als das vier Wochen alte Narbengewebe.

[0123] Adulte Rattenatriumkardiomyozyten wurden in das Narbengewebe derselben Ratte autotransplantiert. Sechs Wochen nach der Transplantation wurden die transplantierten Zellen in dem Myokardnarbengewebe durch Färbung mit einem Antikörper gegen die schwere Kette von kardialem Myosin detektiert. Es gab keine Lymphozyteninfiltration. Es wurde kein Herzgewebe in dem Narbengewebe von Kontrollratten gefunden.

[0124] Sechs Wochen nach Transplantation enthielten Narben, die mit entweder glatten Allo- oder Automuskelzellen transplantiert worden sind, glattes Muskelgewebe, das positiv färbte für Aktin von glatten Muskeln. Die Allotransplantate wurden mit Lymphozyten infiltriert, was für Immunabstoßung anzeigend ist. Im Gegensatz dazu gab es kein Lymphozyteninfiltrat oder Anzeichen von Immunabstoßung in dem glatten Automuskelzelltransplantat.

[0125] [Fig. 1](#) zeigt die verbesserte Herzfunktion von vernarbten Herzen, die mit glatten Muskelzellen transplantiert worden sind. Herzen wurden kryoverletzt, wonach das vollständig ausgebildete Narbengewebe mit allogenen glatten Muskelzellen transplantiert wurde. Funktionsmessungen wurden vier Wochen nach Transplantation gemacht. Die Graphik zeigt die entwickelten Ballondrücke von Schein-(obere Linie, keine Kryoverletzung, keine Transplantation), Kontroll-(untere Linie, Kryoverletzung, keine Transplantation) und transplantierten (mittlere Linie) Herzen mit gesteigerten Ballonvolumina. Entwickelte Drücke von transplantierten Herzen waren signifikant höher als Kontrollherzen ($p = 0,0001$), aber niedriger als jener Schein von Scheinherzen ($0 = 0,0001$).

[0126] Sechs Wochen nach Transplantation proliferierten die transplantierten Fibroblasten in dem Myokardnarbengewebe. Die Zellen sezernierten extrazelluläre Matrix, welche die Dicke des Narbengewebes steigerte. Die transplantierten Zellen stimulierten auch Angiogenese (siehe unten), welche beschädigtes Myokardgewebe in dem Narbengewebe überlebte. Es gab keine kardialen Muskelzellen in dem Narbengewebe in Kontrolltieren. Das Narbengewebe bei der linksventrikulären freien Wand von Kontrollherzen erweiterte sich während der Systole, wohingegen Narbengewebe, das transplantierte Zellen enthielt, unbeweglich war. Obwohl die Oberfläche von transplantiertem Narbengewebe ($22,9 \pm 6,2 \text{ mm}^2$) ähnlich war wie jene von Kontrollnarbengewebe ($23,8 \pm 6,5 \text{ mm}^2$), war die Narbendicke ($1,9 \pm 0,9 \text{ mm}$, $N = 12$) in transplantierte Zellen enthaltenden Herzen doppelt so groß ($p < 0,01$) wie jene der Kontrollherzen ($1,0 \pm 0,4 \text{ mm}$, $N = 10$). In Übereinstimmung mit den obigen Ergebnissen war das linksventrikuläre Volumen der transplantierten Herzen $275 \pm 48 \text{ mm}^3$ ($N = 12$), was weniger war ($p < 0,01$) als das Volumen der Kontrollherzen ($N = 10$) mit $360 \pm 94 \text{ mm}^3$.

[0127] Obwohl eine detaillierte Beobachtung von transplantierten Endothelzellen nicht gemacht wurde, enthielt das Färben mit dem Antikörper gegen Faktor VIII, dass mehr Zellen in Narbengewebe, das mit Endothelzellen transplantiert worden ist, positiv färbten, als in dem Kontrollnarbengewebe.

9. Angiogenese in Myokardnarbengewebe nach Zelltransplantation:

[0128] Vier bis sechs Wochen nach Transplantation zeigte die Untersuchung durch Histologie und Elektronenmikroskopie, dass Angiogenese in dem transplantierten fötalen ventrikulären Kardiomyozytentransplantat geschah. Signifikant mehr Arteriolen und Venolen wurden gefunden ($p < 0,01$) in den Kardiomyozytentransplantaten ($1,2 \pm 0,6$ Gefäße/ $0,8 \text{ mm}^2$, $N = 14$) als in dem Kontrollmyokardnarbengewebe ($0,1 \pm 0,1$ Gefäße/ $0,8$

mm², N = 14).

[0129] Ähnlich geschah Angiogenese in den Atriumzell-, Endothelzell-, glatten Muskelzell- und Fibroblastenzelltransplantaten.

10. Transplantierte Zellen begrenzten die Narbenexpansion:

[0130] Vier bis sechs Wochen nach Transplantation der Zellen unterschieden sich Herzrate und Koronarfluss nicht zwischen den Schein-, Kontroll- und transplantierten Tieren. Die Kontrollmyokardwand an der Verletzungsstelle war dünner geworden und bestand aus Fasergewebe und einigen wenigen Blutgefäßen. Keine Herzmuskel oder Lymphozyten waren vorhanden. Die Kontroll- und transplantierten Herzen waren größer ($p < 0,01$) als die Scheinherzen (unbeschädigt). Vier Wochen nach Kryoverletzung wurden $36,4 \pm 4,4$ % (Mittelwert ± 1 SE, N = 5) der linksventrikulären freien Wand in den Prätransplantattieren mit einer transmuralen Narbe ersetzt. Nach acht Wochen expandierte das Narbengewebe ($p < 0,01$) in der Kontrollgruppe auf $54,6 \pm 2,9$ % (N = 5) der freien Wand für die fötalen Kardiomyozyten. Das Narbengewebe in den transplantierten Tieren war $43,4 \pm 1,8$ % (N = 5) der linksventrikulären freien Wand. Dies unterschied sich nicht signifikant von den prätransplantierten Tieren vier Wochen nach Kryoverletzung und war weniger ($p < 0,05$) als die Kontrollherzen acht Wochen nach Kryoverletzung. Die transplantierten Kardiomyozyten bildeten Herzgewebe, welches $36,5 \pm 3,5$ % (N = 5) des Narbengewebes besetzte. Das transplantierte Gewebe kontrahierte sichtlich. Wir waren nicht erfolgreich beim Messen seiner Kontraktilität aufgrund der Kontraktionen des Herzens. Nach Entfernen des Herzens und Absondern des Narbenbereichs fuhr die transplantierte Region fort zu kontrahieren, wenn sie stimuliert wurde.

[0131] Ähnlich beschränkten die Atriumzell-, glatten Muskelzell- und Fibroblastentransplantate die Narbenexpansion.

11. Verbesserung der Herzfunktion durch transplantierte Zellen:

[0132] Ventrikelfunktion von Herzen, in welche Zellen unmittelbar nach Myokardverletzung transplantiert worden sind, war ähnlich wie jene von Kontrollherzen. Analyse der Kovarianz zeigte keine Wechselwirkung zwischen Ballonvolumen und Behandlungsgruppe für entwickelte Drücke. Ventrikelfunktion der transplantierten und der Kontrollherzen, wenn die Kardiomyozyten zwei Wochen nach Myokardverletzung transplantiert worden waren, war unterschiedlich, weil eine Analyse der Kovarianz eine signifikante ($p < 0,05$) Wechselwirkung zwischen Ballonvolumen und Behandlungsgruppe für entwickelte Drücke zeigte. Die transplantierten Herzen hatten eine bessere ($p < 0,05$) Funktion als die Kontrollherzen. Ähnlich verbesserten ($p < 0,05$) vier Wochen nach Myokardnekrose transplantierte Zellen Myokardfunktion. Die nach zwei Wochen transplantierten Herzen hatten höhere ($p < 0,05$, $p < 0,05$, $p < 0,05$) entwickelte Drücke bei Ballonvolumina von 0,1, 0,2 bzw. 0,3 ml als nach vier Wochen transplantierte Herzen.

[0133] Bei den Messungen der ventrikulären Funktion in den scheinoperierten, transplantierten und Kontrollherzen zeigte eine Analyse der Kovarianz eine signifikante ($p < 0,05$) Wechselwirkung zwischen Ballonvolumen und Behandlungsgruppe für systolische, diastolische und entwickelte Drücke. Paarweise Vergleiche zeigten eine signifikante ($p < 0,05$) Abnahme in systolischen und entwickelten Drücken in Kontrolltieren, im Vergleich mit den scheinoperierten normalen Herzen. Die transplantierten Herzen hatten eine bessere ($p < 0,05$) Funktion als die Kontrollherzen, obwohl sowohl systolischer Druck als auch entwickelter Druck niedriger waren ($p < 0,05$) als bei scheinoperierten normalen Herzen. Diastolische Drücke waren sowohl bei den kryoverletzten Kontrollen als auch bei den transplantierten Herzen signifikant niedriger als in den scheinoperierten normalen Herzen, bei höheren Ballonvolumina aufgrund der markanten Dilatation, die aus Myokardnarbenexpansion resultiert.

12. Gewebeveränderte Transplantate:

[0134] Kardiomyozyten, glatte Muskelzellen, Fibroblasten und Endothelzellen wurden in dem Gitter der Transplantate beobachtet. Das Gewebe, das sich in dem Gitter bildete, färbte stark mit Hämatoxylin und Eosin.

Zusammenfassung

[0135] Aus den obigen Ergebnissen kann gesehen werden, dass wir erfolgreich Muskel- und Nicht-Muskelzellen in kardiales Narbengewebe transplantierten. Diese Zellen bildeten lebensfähiges Gewebe, änderten die Struktur der Narbe, verbesserten die Herzfunktion, stimulierten Angiogenese und exprimierten ein Gen, das

der Narbe fremd ist. Aus diesen Ergebnissen werden die folgenden Schlussfolgerungen gezogen:

1. Kultivierte adulte atriale Kardiomyozyten konnten erfolgreich in die Narbe transplantiert werden. Das atriale Gewebe konnte verdaut werden und die atrialen Zellen konnten unmittelbar transplantiert werden oder das atriale Gewebe konnte verdaut, kultiviert und bis zu fünfmal passagiert und dann transplantiert werden. Auto- und Allotransplantation von kultivierten adulten atrialen Kardiomyozyten bildeten Gewebe in der Narbe. Die Herzfunktion verbesserte sich. Angiogenese geschah. Es geschah keine Immunabstoßung durch Autotransplantation von adulten atrialen Kardiomyozyten.
2. Glatte Muskelzellen können erfolgreich in die Narben auto- oder allotransplantiert werden. Glattes Muskelgewebe bildete sich innerhalb der Narbe. Es geschah keine Immunabstoßung bei der Autotransplantation. Angiogenese geschah. Herzfunktion verbesserte sich. Die Zellen können vor dem Transplantieren frisch isoliert oder kultiviert und passagiert werden.
3. Fibroblasten können erfolgreich in Narbengewebe transplantiert werden. Die Narbendicke nahm zu. Die Herzfunktion verbesserte sich. Angiogenese geschah. Wirtskardiomyozyten überlebten in der Narbe. Die Zellen können vor dem Transplantieren frisch isoliert oder kultiviert und passagiert werden.
4. Die Zugabe von Kryopräzipitat zu der Injektionsstelle verhinderte Leckage der transplantierten Zellen aus der Narbe.
5. Ein Plasmid, das ein für das Narbengewebe und Herzgewebe fremdes Gen enthielt, wurde in die kultivierten, zu transplantierenden Zellen transfiziert. Die Zellen wurden erfolgreich in das Narbengewebe transplantiert und exprimierten das Fremdgen.
6. Kardiomyozyten, glatte Muskelzellen, Skelettmuskelzellen, Fibroblasten und Endothelzellen können erfolgreich in fibröse Membranen und nicht abbaubare oder bioabbaubare Polymere transplantiert werden, um Gewebe zu bilden. Das Produkt solch eines Prozesses wäre ein Patch, welches zahlreiche klinische und therapeutische Verwendungen haben kann. Solche Membranen können aus Dacron oder bioabbaubaren Folien wie Polyglycolsäurepolymeren mit oder ohne Polymilchsäurepolymere gemacht werden. Solch ein Patch kann mit einem Schrittmacher verbunden sein und kann nahe einem kardialen Defekt implantiert werden, wodurch ein Mittel an schrittmacherstimulierter Kardiomyoplastie bereitgestellt wird.
7. Zellkombinationen konnten erfolgreich transplantiert werden, um Gewebe in einer Narbe zu bilden, um die Funktion zu verbessern, Angiogenese zu stimulieren und Gewebe zu bilden.
8. Die optimale Zeit für die Transplantation ist unmittelbar nachdem die akute inflammatorische Antwort auf die Myokardverletzung verschwunden ist.
9. Adulte atriale und ventrikuläre Säuger-kardiomyozyten können erfolgreich aus humanem Myokard isoliert, kultiviert, passagiert und gelagert werden, unter Verwendung des für humane Kardiomyozyten beschriebenen Zellkulturverfahrens, beschrieben in dem Abschnitt „Humane Zellisolation, Kultivierung und Lagerung“. Humane Kardiomyozyten können für Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff zubereitet werden und können für die Kultivierung aufgetaut werden, wie beschrieben. Solche kultivierten Zellen können dann beim Bilden von Transplantaten verwendet werden, wie oben diskutiert.
10. Die biologische Klebetechnik, die bei dem Zelltransplantationsvorgehen verwendet worden ist, steigerte die Anzahl an Zellen, die in dem Myokardnarbengewebe transplantiert worden sind. Diese Erfindung steigerte die Transplantationserfolgsrate und maximierte die Verbesserung der Herzfunktion. Co-Transplantation von Wachstumsfaktoren wie IGF-I, IGF-II, TGF- β 1 und PDGF-B erhöht das Überleben von transplantierten Zellen, induziert transplantierte Muskelhypertrophie und stimuliert Angiogenese. Basierend auf diesen Ergebnissen sind die Verwendung von anderen Wachstumsfaktoren wie Fibroblastenwachstumsfaktor und vaskulärer Endothelwachstumsfaktor ebenfalls möglich. Solche Wachstumsfaktoren können entweder alleine oder in Kombination co-transplantiert werden. Diese Techniken können die transplantierte Muskelgröße und das Überleben in Myokardnarbengewebe und beschädigtem Narbengewebe steigern.
11. Kultivierte Zellen können genutzt werden, um regionale Herzfunktion und Blutfluss zu Regionen in dem Herzen, die durch erworbene Erkrankungsvorgänge beschädigt sind oder aufgrund von vererblichen Defekten fehlen, wiederherzustellen. Während rekonstruktiver Chirurgie wird der defekte Teil des Herzens entfernt und durch inerte Materialien ersetzt, um eine wasserdichte Versiegelung sicherzustellen. Das Anheften eines kontrahierenden Gewebes von Myozyten an den Rekonstruktionspatch wird die Rückkehr der Funktion zu der zerstörten Region erlauben. Implantation einer Sammlung von Zellen könnte die Funktion wiederherstellen und die Lebensqualität der Patienten, die rekonstruktive Chirurgie durchmachten, verbessern.
12. Die meisten erworbenen oder vererblichen Herzdefekte werden mit inerten Materialien verschlossen, von denen beabsichtigt wird, dass sie eine wasserdichte Versiegelung bereitstellen. Anstelle eines inerten Materials kann ein Transplantat, bestehend aus einem bioabbaubaren oder nicht bioabbaubaren Gerüst, das kultivierte Zellen trägt, genutzt werden, um solche kardialen Defekte zu verschließen. Das Transplantat würde Myozyten nutzen, die mit Genen verstärkt sind, um Perfusion und Kontraktilität zu steigern (durch Steigern der Größe und Anzahl von Myozyten). Zusätzlich können die Endothelzellen auf die Blutoberfläche

des Transplantates aufgelegt sein, um intravaskuläre Klumpenbildung in dem Herzen zu verhindern. Die Endothelzellen könnten genetisch verändert sein, so dass sie Proteine produzieren, welche Klumpenbildung auf den Blutoberflächen verhindern. Die zellulären Transplantate werden das Verschließen von erworbenen und kongenitalen kardialen Defekten mit funktionierendem Gewebe, welches die Herzfunktion verbessern kann, erlauben.

13. Herzchirurgen entfernen häufig Abschnitte des Herzens, welche beschädigt worden sind oder aufgrund von vererblichen Anomalien defekt sind. Ein zelluläres Transplantat bietet eine Gelegenheit, Funktion in Bereichen wiederherzustellen, welche gewöhnlich mit inerten Materialien verschlossen werden. Das Transplantat kann aus Myozyten bestehen, die auf einem bioabbaubaren Gerüst wachsen gelassen worden sind. Endothelzellen können auf der Blutzwischenschicht wachsen gelassen werden. Die Zellen werden ein funktionierendes Transplantat schaffen, welches die zum Zeitpunkt der Chirurgie entfernte Region ersetzen wird. Das funktionierende Myokardtransplantat könnte die Funktion für Patienten wiederherstellen, welche einen Myokardinfarkt erlitten haben und das Entfernen der zerstörten Regionen notwendig machen. Das funktionierende Transplantat könnte die systemische und/oder pulmonäre Zirkulation bei Patienten mit ausgedehnten vererblichen Defekten, die rekonstruktive Chirurgie durchmachen, wiederherstellen. Ein funktionierendes Myokardtransplantat bietet behinderten Individuen das Versprechen der Wiederherstellung einer verbesserten Lebensqualität.

Wirkung des Donoralters auf die Kontraktilität von transplantierten Rattenkardiomyozyten

[0136] Die Unfähigkeit von Herzmuskel, nach Myokardnekrose zu regenerieren, ist ein wichtiges klinisches Problem. Unsere frühere Forschung zeigte Überleben und Kontraktilität von transplantierten fötalen Rattenkardiomyozyten (CMs) in adultem Rattenskelettmuskel. Die vorliegende Studie ist auf die Wirkung des Donoralters auf die Kontraktilität von transplantierten CMs fokussiert.

Methoden:

[0137] CMs wurden aus Sprague-Dawley-Rattenherzen 18 Tage nach der Gestation und aus 5, 22, 32 und 62 Tage alten Sprague-Dawley-Rattenherzen isoliert und für einen Tag kultiviert. 2 bis 5×10^6 Zellen in Salzlösung wurden in den Skelettmuskel eines Beins einer adulten Ratte injiziert. Das andere Bein (Kontrolle) wurde mit Salzlösung alleine injiziert. Zelllebensfähigkeit und -funktion wurden visuell und durch Ultraschall und Elektrokardiographie (EKG) bewertet.

Ergebnisse:

[0138] In den Gruppen mit transplantierten fötalen (N = 12) und neonatalen (N = 4) CMs wurden rhythmische Kontraktionen (73 ± 12 Schläge/min. (N = 11) und 43 ± 21 Schläge/min. (N = 3)) nur in dem transplantierten Bereich gefunden. Diese Kontraktionen wurden in den Kontrollbeinen nicht beobachtet. Kontraktionen wurden nicht beobachtet an Stellen, die mit CMs aus 22, 32 und 62 Tage alten Donortieren transplantiert worden sind (N = 4 für sämtliche Gruppen).

Schlussfolgerung:

[0139] Das Donoralter ist wichtig, um die Kontraktilität von CMs nach Transplantation in Skelettmuskel zu bewahren.

Induktion von Angiogenese durch Endothelzellen, die in myokardiale transmurale Narben transplantiert worden sind, verbesserte Herzfunktion in infarktierten Herzen nicht.

[0140] Wir spekulierten, dass die künstliche Induktion von Angiogenese die Perfusion verbessern, Angina erleichtern und Herzfunktion wiederherstellen könnte, in Fällen, wo Revaskularisierung spontan nach Myokardinfarkt nicht geschieht (z. B. in Narbengewebe). Die vorliegende Studie beurteilte, ob in Myokardnarbengewebe transplantierte allogene und syngene Endothelzellen neue Blutgefäßbildung induzieren und ob durch transplantierte Zellen induzierte Angiogenese (falls vorhanden) die Funktion des vernarbten Herzens beeinflusst. Die Wirkung von transplantierten Zellen auf Blutgefäßbildung in Myokardnarbengewebe war zuvor noch nicht studiert worden.

Methoden und Ergebnisse:

[0141] Transmurale Narben wurden an der linksventrikulären freien Wand von adulten Rattenherzen durch

Kryoverletzung erzeugt. Zwei Wochen später wurden kultivierte adulte Rattenaortaendothelzellen (transplantierte Gruppe) oder Kulturmedien (Kontrollgruppe) in die Myokardnarben von Ratten, die mit Cyclosporin A (25 mg/kg/Tag) immunsupprimiert waren, injiziert. Transplantierte Zellen wurden an transplantierten Stellen am Tage 1 und 7, aber nicht am Tag 14 (N = 2), beobachtet. Sechs Wochen nach Transplantation war die Anzahl von Kapillaren in den Narben der transplantierten Gruppe ($3,4 \pm 2,0$, N = 10) höher ($p < 0,01$) als jene in der Kontrollgruppe ($1,0 \pm 0,6$, N = 9). Durch mit radioaktivem ^{57}Co markierten Mikrosphären gemessener Blutfluss war höher ($p < 0,01$) in der transplantierten Gruppe ($6,85 \pm 2,27$ %, N = 9) als in der Kontrollgruppe ($3,78 \pm 0,99$ %, N = 8). Es gab keinen Unterschied in der Narbengröße und Herzfunktion zwischen zwei Gruppen, gemessen durch Planimetrie und Langendorf-Präparation.

Schlussfolgerung:

[0142] Angiogenese wurde in dem Narbengewebe durch Endothelzelltransplantation induziert. Da in der Narbe keine Myozyten vorhanden waren, verbesserte sich die Funktion nicht. Endothelzelltransplantation in Patienten mit unvollständigem Infarkt kann die Perfusion wiederherstellen, Angina erleichtern und Funktion wiederherstellen.

Methoden

[0143] Versuchstiere: Sämtliche an Tieren durchgeführten Vorgänge waren von dem Animal Care Committee des The Toronto Hospital zugelassen. Experimente wurden gemäß dem „Guide to the Care and Use of Experimental Animals“, veröffentlicht von den National Institutes of Health (NIH-Publikation 85-23, revidiert 1985), durchgeführt. Sprague-Dawley-Ratten (Charles River Canada Inc., Quebec, Kanada) wurden für allogene Transplantation verwendet. Männliche Ratten, 330-360 Gramm wiegend, wurden als Empfänger und Donoren von Endothelzellen verwendet. Syngene Lewis-Ratten (männlich, 250-300 g, Charles River Canada Inc., Quebec, Kanada) wurden für autologe Transplantation verwendet.

[0144] Zellisolation und -kultur: Endothelzellen aus Rattenaorta wurden isoliert und kultiviert wie zuvor beschrieben (Mickle et al, J. Mol. Cell. Cardiol. 22: 1297-1304, 1990). Kurz, absteigende Thoraxaortasegmente wurden aus Ratten unter Vollnarkose gewonnen, wie in dem nächsten Abschnitt beschrieben. Die Blutgefäße wurden mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS; Zusammensetzung in mmol/l: NaCl 136,9, KCl 2,7, Na_2HPO_4 8,1, KH_2PO_4 1,5, pH 7,3) gewaschen und Bindegewebe wurde entfernt. Der Aortaabschnitt wurde dann mit Enzymlösung (0,1 % Collagenase und 0,2 % Trypsin in PBS) gespült und mit der Enzymlösung für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden Endothelzellen durch drei- bis fünfmaliges Spülen der Innenseite der Aortaabschnitte mit Kulturmedium (Medium 199, enthaltend 20 % fötales Rinderserum, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 0,5 % Heparinsalz) isoliert. Die isolierten Zellen wurden bei 37 °C in 5 % CO_2 und 95 % Luft in Kulturmedium kultiviert.

[0145] Zellidentifikation: Die Reinheit von Endothelzellkulturen wurde durch eine immunhistochemische Färbung unter Verwendung von Antikörpern gegen mit Faktor VIII in Zusammenhang stehendes Antigen, wie zuvor beschrieben (Mickle et al., J. Mol. Cell. Cardiol. 22: 1297-1304, 1990), bestätigt. Kurz, die kultivierten Endothelzellen wurden in Methanol für 15 Minuten bei -20 °C fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Rattenimmunglobulin G gegen mit Faktor VIII in Zusammenhang stehendes Antigen (Dimension Laboratory, Inc.) bei 37 °C für 45 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal gewaschen (15 Minuten pro Waschung) mit PBS, dann mit Anti-Kaninchen-Immunglobulin G aus Ziegen, konjugiert mit Peroxidase, bei 37 °C für 45 Minuten inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen (15 Minuten pro Waschung) und in Diaminobenzidin- H_2O_2 -Lösung (2 mg/ml Diaminobenzidin, 0,03 % H_2O_2 in 0,02 ml/l Phosphatpuffer) für 15 Minuten eingetaucht. Nach einem letzten Waschschrift in PBS wurden die Proben fotografiert.

[0146] Quantifikation von VEGF-Proteinspiegeln in kultivierten Endothelzellen und sezerniert durch kultivierte Zellen: Gereinigte Endothelzellen wurden in Zellkulturmedium für drei Tage kultiviert. Die Überstände (N = 5) wurden gesammelt, zentrifugiert bei 14.000 g für 10 Minuten, um Zelltrümmer zu entfernen, und wurden für Proteinquantifikation aufbewahrt. Die kultivierten Zellen (N = 5) wurden dreimal mit PBS gewaschen und durch Abkratzen mit einem Zellkratzer gesammelt. Nach Zentrifugation bei 580 g für drei Minuten wurden die Zellpellets in 1 ml PBS resuspendiert und für 1 min beschallt. Die Proben wurden bei 14.000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden für Proteinquantifizierung gesammelt. Die Proteinkonzentration wurde unter Verwendung des Bio-Rad-Proteintests (Bio-Rad, Richmond, CA) gemessen. VEGF-Proteinspiegel in Kulturmedium und Endothelzellen wurden durch Chemilumineszenz-Slot-Blot-Analyse quantifiziert. Ohne Zellen inkubiertes Kulturmedium wurde als eine Kontrolle verwendet. 40 mg Protein aus Kulturmedium oder aus kultivierten Endothelzellen wurden auf eine 0,2µm-Nitracellulosemembran (Schleicher & Schnell Inc., Keene, NH)

unter Verwendung des Blotting-Systems Minifold II Slot Blotting System (Schleicher & Schnell Inc., Keene, NH) geladen. Standards von VEGF (2, 5, 10, 25 ng) (Sigma, Mississauga, ONT) wurden auf dieselbe Membran geladen. Nach Trocknen bei Raumtemperatur für 10 Minuten wurde die Membran zweimal in TTBS-Puffer (50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4 und 0,1 % Tween-20) für zweimal 5 Minuten gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 60 Minuten mit Blocking-Puffer behandelt (Boehringer Mannheim, GmbH, Deutschland). Monoklonale Antikörper gegen VEGF (Sigma, Mississauga, ONT) (1:3000, verdünnt mit 0,5 × Blocking-Puffer) wurden hinzugefügt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit TTBS für jeweils fünf Minuten wurde die Membran mit HRP-konjugiertem Ziegen-anti-Maus-Antikörper (1:3000-Verdünnung) (Bio-Rad Laboratories Hercules, CA) für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde wiederum zweimal mit TTBS für zweimal 10 Minuten gewaschen. VEGF-Proteine wurden durch Chemilumineszenz unter Verwendung des Detektionskits von Boehringer Mannheim (Quebec, Kanada) detektiert. Eine densitometrische Analyse der Standard- und Probenbanden wurde mit einem Bildanalysesystem von Bio-Rad (Bio-Rad Lab. Hercules, CA) durchgeführt. Standardkurven von VEGF wurden erzeugt und die VEGF-Menge in Kulturmedium und kultivierten Endothelzellen wurde berechnet, basierend auf der Standardkurve. Die Ergebnisse (Mittelwert ± SD) sind als ng VEGF/mg Protein ausgedrückt.

[0147] Zubereitung von Zellen für die Transplantation: Kultivierte Endothelzellen wurden zweimal vor der Transplantation passagiert, um die Anzahl von Zellen zu steigern. Vor der Transplantation wurden die kultivierten Endothelzellen von der Kulturschale mit 0,05 % Trypsin in PBS abgelöst. Nach Zentrifugation bei 580 g für drei Minuten wurden die Zellpellets in Kulturmedium bei einer Konzentration von $1,0 \times 10^6$ Zellen/10 µl resuspendiert. Es wurde eine 60µl-Zellsuspension für jede Transplantation verwendet.

[0148] Myokardnarbenbildung: Ratten wurden durch intramuskuläre Injektion von Ketaminhydrochlorid (20 mg/kg Körpergewicht), gefolgt von intraperitonealer Injektion von Natriumpentobarbital (30 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert. Die anästhesierten Ratten wurden intubiert und Überdruckventilation wurde mit Raumluft, ergänzt mit Sauerstoff und Isofluran (0,2-1,0 %), unter Verwendung eines Harvardventilators durchgeführt. Das Elektrokardiogramm wurde während der Operation überwacht.

[0149] Das Herz wurde durch einen 2-3 cm langen linkslateralen Thorakotomieschnitt offengelegt. Kryoverletzung wurde in der linksventrikulären freien Wand (LVFW) mit einer Metallsonde (8 × 10 mm Durchmesser), abgekühlt auf -190 °C durch Eintauchen in flüssigem Stickstoff, erzeugt. Sie wurde an die LVFW für eine Minute gehalten und dieses Vorgehen wurde zehnmal wiederholt. Muskel und Haut wurden mit 3-0-Seidenfäden verschlossen. Penlong XL (Benzathinpenicillin G 150.000 U/ml und Procainpenicillin G 150.000 U/ml) wurden intramuskulär gegeben (1 ml/kg) und Buprenorphinhydrochlorid (0,01 mg/kg) wurde nach jeder Operation verabreicht. Die kryoverletzten Ratten wurden zufällig in zwei Gruppen eingeteilt: Transplantation und Kontrolle.

[0150] Endothelzelltransplantation: Zwei Wochen nach Kryoverletzung wurde Zelltransplantation durchgeführt. Unter Vollnarkose wurde das Herz durch eine Mittelliniensternotomie freigelegt. Endothelzellsuspension (60 µl, 6×10^6 Zellen) wurde in das Zentrum des Narbengewebes in der Transplantationsgruppe unter Verwendung einer Tuberkulinspritze injiziert und dieselbe Menge an Kulturmedium wurde in die Narbe in der Kontrollgruppe injiziert. Die Brust wurde mit 3-0-Seidenfäden verschlossen. Antibiotika und Analgetika wurden wie zuvor beschrieben gegeben. Cyclosporin A (25 mg/kg/Tag) wurde subkutan sowohl an die transplantierte als auch an die Kontrollgruppe verabreicht.

[0151] Identifikation von transplantierten Endothelzellen: Die transplantierten Zellen wurden auf zwei Wegen identifiziert.

(1) Am Tage 1, 7 und 14 nach der Transplantation wurden zwei Ratten aus der transplantierten Gruppe und der Kontrollgruppe durch Ausblutung unter Vollnarkose geschlachtet. Die Herzen wurden in mit 10 % phosphatgepufferter Formalinlösung für zwei Tage fixiert und in 3 mm dicke Schnitte geschnitten. Die Schnitte wurden in 5 % Eisessig in Methanol fixiert, in Paraffin eingebettet und geschnitten, um 10 µm zu ergeben, welche mit Hämatoxylin und Eosin wie durch den Hersteller beschrieben (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO) gefärbt wurden.

(2) Die transplantierten Zellen wurden auch identifiziert durch Detektion von grünem fluoreszierendem Protein, exprimiert durch die transplantierten Zellen. Zwei Tage vor der Transplantation wurden kultivierte Endothelzellen mit einem Plasmid, das grünes fluoreszierendes Protein kodiert, unter Verwendung von Lipofectamin transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden kultiviert, geerntet und wie zuvor beschrieben transplantiert. Am Ende der Studie wurden monoklonale Antikörper gegen grünes fluoreszierendes Protein verwendet, um die transplantierten Endothelzellen durch die Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplextchnik (Hsu, S. M. Am. J. Pathol., 75: 816-821, 1981) zu lokalisieren. Kurz, Schnitte wurden mit einer Lösung aus 3 % H₂O₂ in 70 % Methanol für 30 Minuten inkubiert, um endogene Myokardperoxidase zu inhibieren. Unspezi-

fische Proteinbindung wurde mit 2 % normalem Ziegenserum in 0,05 M Tris-Puffer (pH 7,4) für 15 Minuten geblockt, primäre Antikörper gegen grünes fluoreszierendes Protein (Cedarlane Lab., Hornby, Ontario) wurden hinzugefügt und die Proben wurden bei 37 °C für 30 Minuten, gefolgt von einer Über-Nacht-Inkubation bei 4 °C, inkubiert. Negative Kontrollproben wurden in PBS (ohne die primären Antikörper) unter denselben Bedingungen inkubiert. Nach Waschen mit PBS (dreimal für jeweils fünf Minuten) wurde ein biotinmarkierter sekundärer Antikörper (1:250, Vektor Lab. Inc. Burlingame, CA) hinzugefügt und die Proben wurden bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Die Proben wurden dreimal für jeweils fünf Minuten in frischer PBS gespült und mit einem Avidin-Biotin-Komplex, konjugiert mit Peroxidase, bei Raumtemperatur für 45 Minuten zur Reaktion gebracht. Sichtbarmachung wurde mit einer Diaminobenzidinlösung (0,25 mg/ml in 0,05 M Tris-HCl-Puffer, enthaltend 0,02 % H₂O₂) für 10 Minuten durchgeführt. Die Proben wurden dann mit Kristallobjektträgern abgedeckt und fotografiert.

[0152] Blutflussmessung mit radionuklidmarkierten Mikrosphären: Sechs Wochen nach Transplantation wurde der Blutfluss zu dem normalen und Narbengewebe in den transplantierten (n = 9) und Kontrollgruppen (n = 8) unter Verwendung von radionuklidmarkierten Mikrosphären (Pang, C. Y. *Plastic and Reconstructive Surgery* 74 (4): 513-521, 1984) gemessen. Ratten wurden anästhesiert und Heparin-Natrium (200 Einheiten) wurde dann intravenös verabreicht. Herzen wurden entnommen und in einem Langendorf-Gerät mit 0,9 % Salzlösung perfundiert, um sämtliche Blutreste in dem Koronargefäßbett auszuwaschen. Zehn ml einer 20 mEq KCl-Lösung wurden durch die Koronararterien injiziert, um das Herz vollständig anzuhalten, und das Herz wurde mit 0,9 % Salzlösung für zehn Minuten perfundiert.

[0153] Mit ⁵⁷Co-markierten Mikrokugeln (5 µCi, New England Nuclear, Boston, MA) wurden in 2 ml einer 0,9 % Salzlösung, enthaltend 5 % Saccharose und 0,05 % Tween 80, suspendiert. Die Suspension wurde kräftig für zwei Minuten unmittelbar vor der Injektion verwirbelt. Die Mikrosphären wurden über einen Zeitraum von fünf Sekunden durch eine Nadel, die mit der aufsteigenden Aortawurzel verbunden war, infundiert.

[0154] Ventrikel wurden in normales Gewebe, Narbengewebe und Gewebe im Grenzbereich aufgeteilt. Jeder Abschnitt wurde gewogen und die Radioaktivität wurde dann bestimmt unter Verwendung eines Gammazählers bei einer Fenstereinstellung von 110 bis 138 KeV. Die Daten wurden als Zählimpulse pro Minute (Counts pro Minute; cpm)/mg Gewebe ausgedrückt. Das Verhältnis von cpm/mg in Narbe und Grenzgewebe zu normalem Gewebe wurde berechnet, als Prozentsatz ausgedrückt und zwischen transplantierten und Kontrollherzen verglichen.

[0155] Herzfunktionsmessung: Sechs Wochen nach Transplantation wurde die Herzfunktion in transplantierten (n = 10) und Kontrollgruppen (n = 9) unter Verwendung einer Langendorf-Präparation gemessen (Stephen, S. E. *Annals of Thoracic Surgery* 59: 1127-1133, 1995). Ratten wurden anästhesiert und Heparin-Natrium (200 Einheiten) wurde intravenös verabreicht. Herzen wurden schnell isoliert und bei 37 °C in einem Langendorf-Gerät mit filtriertem Krebs-Hanseleit-Puffer (mmol/l: NaCl 118, KCl 4,7, KH₂PO₄ 1,2, CaCl₂ 2,5, MgSO₄ 1,2, NaHCO₃ 25, Glukose 11, pH 7,4), äquilibriert mit 5 % Kohlendioxid und 95 % Sauerstoff bei einem Druck von 100 cm H₂O, perfundiert. Ein Latexballon wurde in den linken Ventrikel durch die Mitralklappe eingeführt und mit einem Druckwandler (Modell p10EZ; Viggo-Spectramed, Oxnard CA) und einem Wandlervverstärker und Differenzialverstärker (Modell 11-G4113-01; Gould Instrument System Inc., Valley View OH) verbunden.

[0156] Nach 20 Minuten der Stabilisierung wurde der Koronarfluss durch die zeitlich abgestimmte Sammlung in dem Entleerungsschlagzustand gemessen. Die Ballongröße wurde in 0,02ml-Schritten von 0,04 bis 0,6 ml durch die Zugabe von Salzlösung erhöht. Der systolische Druck und der diastolische Enddruck und maximal und minimal dp/dt wurden bei jedem Ballonvolumen aufgenommen. Der entwickelte Druck wurde berechnet als der Unterschied zwischen dem systolischen Druck und dem diastolischen Enddruck.

[0157] Messung von linksventrikulärer Remodellierung: Die epikardialen und endokardialen Oberflächen des normalen und Narbengewebes in der LVFW wurden durch die Technik von Pfeffer (Pfeffer *Am J Physiol* 1991; 260: H1406-14) und Jugdutt und Khan (*Circulation* 1994; 89: 2297-307) gemessen. Kurz, die Herzen wurden im Zustand der Distension (30 mm Hg) mit 10 % phosphatgepufferter Formalinlösung für zwei Tage fixiert. Die Atrien wurden ausgeschnitten, Ventrikelgewicht und die Größe der Narbe auf der Epikardoberfläche wurden gemessen und das Ventrikelvolumen wurde durch Wasserverdrängung gemessen. Danach wurden die Herzen in Schnitte mit einer Dicke von 3 mm geschnitten. Für jeden Schnitt wurde der Bereich von normalem und Narbengewebe in der LVFW auf einem Diapositiv abgegrenzt und unter Verwendung von Computerplanimetrie (Jandel Scientific Sigma-Scan, Corte Madera, CA) quantifiziert. Die Längen der VFW und des Narbengewebes sowohl auf dem endokardialen als auch dem epikardialen Narbengewebe und der LVFW wurden als die Summe der Endokardlängenzzeit und Epikardlängenzzeiten und der Schnittdicke (3 mm) gemessen. Der Prozentsatz

der Oberfläche von Narbengewebe in der LVFW wurde wie folgt berechnet: $(\text{Endokardnabengröße} + \text{Epikardnabengröße}) / (\text{Endokard-LVFW} + \text{Epikard-LVFW}) \times 100$.

[0158] Messung von Kapillaren in Narbengewebe: Die Herzschnitte wurden verwendet für immunhistochemische Färbung von Endothelzellen. Die Schnitte wurden mit Xylen zweimal für jeweils fünf Minuten, mit 100 % Ethanol zweimal für jeweils zwei Minuten und dann mit 70 % Ethanol zweimal für jeweils 1 Minute inkubiert. Die Schnitte wurden mit Kaninchenimmunglobulin G gegen mit Faktor VIII im Zusammenhang stehendes Antigen inkubiert und Endothelzellen wurden wie beschrieben in dem Abschnitt Zellidentifikation oben identifiziert. Die gefärbten vaskuloendothelialen Zellen in den transplantierten und Kontrollgruppen wurden unter Verwendung eines Lichtmikroskops bei einer 400-fachen Vergrößerung ausgezählt. Das Ergebnis wurde als die Anzahl von Kapillargefäßen/Feld ausgedrückt.

[0159] Syngene Endothelzelltransplantation: Um durch transplantierte Endothelzellen in der Abwesenheit einer Entzündungsreaktion induzierte Angiogenese zu bewerten, wurden aus adulter Lewis-Rattenaorta isolierte Endothelzellen transfiziert und in Myokardnabengewebe von syngen Rattenherzen ($n = 5$) zwei Wochen nach dem Vernarbungsvorgehen transplantiert. Die transplantierten Zellen wurden in dem Narbengewebe sechs Wochen nach Transplantation durch immunhistochemische Färbung identifiziert. Die Anzahl an Kapillaren in den Narbenbereichen von transplantierten und Kontrollherzen wurde gezählt und verglichen. Sämtliche der an diesen Tieren durchgeführten Vorgänge waren dieselben wie oben beschrieben, mit der Ausnahme, dass Cyclosporin nach Zelltransplantation nicht verabreicht worden ist.

[0160] Statistische Analyse: Daten wurden als der Mittelwert \pm Standardabweichung ausgedrückt. Die Software Statistical Analysis System wurde für alle Analysen verwendet (SAS Institute, Cary, NC). Student's t-Test wurde für den Vergleich der Ergebnisse verwendet. Herzfunktionsdaten wurden für die Transplantations- und Kontrollgruppen unter Verwendung von intrakavitären Volumen als der Variantenfaktor und systolischem, diastolischem End- und entwickeltem Druck als abhängige Variablen bewertet.

Ergebnisse

[0161] Kultivierte Endothelzellen wurden von Fibroblasten und vaskulären glatten Muskelzellen durch morphologische Kriterien und Wachstumseigenschaften unterschieden. Die Endothelzellen waren oval geformt, im Gegensatz zu der Spindelform von kultivierten Fibroblasten und vaskulären glatten Muskelzellen. Kultivierte Endothelzellen wuchsen in einem „Kopfsteinpflaster“-Muster, wohingegen Fibroblasten in einem „Wirbel“-Muster wuchsen und vaskuläre glatte Muskelzellen wuchsen in einem „Berg-und-Tal“-Muster. Zusätzlich färbten kultivierte Endothelzellen positiv für mit Faktor VIII im Zusammenhang stehendes Antigen. Die Reinheit der zu transplantierenden Kultur betrug mehr als 95 %.

[0162] Wir fanden heraus, dass kultivierte vaskuläre Endothelzellen VEGF enthielten (0,007 und 0,005 ng/ μ g Zellprotein, $N = 2$). Die VEGF-Moleküle in den kultivierten Zellen wurden in Kulturmedium sezerniert: VEGF-Proteinspiegel (0,331 und 0,229 ng/50 μ l, $N = 2$) in konditioniertem Medium (d. h. in welchem Zellen kultiviert worden sind) waren höher als in Medium, das nicht an Endothelzellen ausgesetzt gewesen ist (0,143 ng/50 μ l, $N = 1$).

[0163] Einen Tag nach der Transplantation wurden zwei Ratten in der transplantierten Gruppe geschlachtet, um transplantierte Zellen zu identifizieren. Es wurde ein großes Endothelzellcluster in jeder Narbe beobachtet. Es gab im Vergleich mit Kontrollratten kein erhöhtes Kapillarnetzwerk um die Zellcluster herum.

[0164] Eine Woche nach Transplantation gab es einige Kapillaren um das transplantierte Endothelzellcluster in jeder Narbe herum. Die Größe des Endothelzellclusters war jedoch viel kleiner als jenes, das einen Tag nach Transplantation beobachtet wurde.

[0165] Zwei Wochen nach Transplantation gab es mehr Kapillaren in der Narbe, aber das Endothelzellcluster war nicht länger vorhanden.

[0166] Sechs Wochen nach Transplantation war die Anzahl an Blutgefäßen in dem Narbengewebe der transplantierten Gruppe ($3,4 \pm 2,0$ Gefäße/0,8 mm², $N = 8$) signifikant höher ($p < 0,01$) als in Kontrollnarben (nicht transplantiert) ($1,0 \pm 0,6$, $N = 9$). Die meisten Blutgefäße sind Kapillaren ohne glatte Muskelbestandteile. In Übereinstimmung mit der Anzahl an Blutgefäßen war die Blutperfusion (repräsentiert als Mikrosphärenzahl) in dem Narbengewebe von transplantierten Herzen ($6,5 \pm 2,27$ % des normalen Myokards) höher ($p < 0,01$) als jene von Kontrollherzen ($3,78 \pm 0,99$ %) ([Fig. 2](#)).

[0167] Bei syngener Zelltransplantation induzierten die transplantierten Zellen auch Angiogenese in dem Myokardnarbengewebe. Die Dichte an Kapillaren in dem Narbengewebe der transplantierten Gruppe war $2,6 \pm 1,5$ Gefäße/ $0,8 \text{ mm}^2$, was signifikant ($p < 0,01$) höher war als jene in der Kontrollgruppe ($1,1 \pm 0,6$). Transplantierte Endothelzellen wurden in Kapillaren an der Transplantatstelle inkorporiert.

[0168] In morphologischen Studien der Herzen gab es keinen Unterschied in den Gewichten des Herzens, linken Ventrikels, Narbengewebes und Tierkörpers zwischen transplantierten und Kontrollgruppen (Tabelle 1). Das Ventrikelvolumen in transplantierten Herzen war ähnlich wie jenes von Kontrollherzen. Die Größe des Narbengewebes in der transplantierten Gruppe war ebenfalls nicht von jener der Kontrollgruppe unterschiedlich.

[0169] Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede in den systolischen und entwickelten Drücken zwischen transplantierten und Kontrollherzen ([Fig. 3](#) und [Fig. 4](#)) und keine Unterschiede im Koronarfluss und der Herzrate (Tabelle 1).

Tabelle 1: Hämodynamik und Herzdimensionen in Transplantations- und Kontrollgruppen^(a,b)

Gruppe	Koronarfluss (ml/min)	Herzrate (bpm)	Ventrikelgewicht (g)	Ventrikelvolumen (ml)	Narbengröße (mm ²)
Transplantat	20,9 +/- 4,36	279 +/-	1160 +/- 168	1,86 +/- 0,27	109 +/- 19
Kontrolle	21,9 +/- 3,82	15 289 +/- 19	1150 +/- 137	1,79 +/- 0,21	110 +/- 19

^a Daten sind als der Mittelwert +/- Standardabweichung gezeigt

^b Es gab keine signifikanten Unterschiede in sämtlichen Parametern zwischen beiden Gruppen

[0170] Die transplantierten Endothelzellen stimulieren Angiogenese, was durch eine Zunahme in der Anzahl von Kapillaren in dem Narbengewebe und eine gesteigerte Blutperfusion im Narbengewebe, wie dargestellt durch Mikrosphärenperfusionsstudien, gezeigt wird. Die induzierte Angiogenese in transmuralen Narbengewebe verbesserte jedoch nicht die infarktierte Herzfunktion.

[0171] Es gibt drei mögliche Mechanismen der gesteigerten Angiogenese durch Endothelzelltransplantation: (1) Bildung von Blutgefäßen durch transplantierte Endothelzellen; (2) Angiogenese, stimuliert durch Wachstumsfaktoren, sezerniert durch transplantierte Endothelzellen; (3) Angiogenese, stimuliert durch eine entzündliche Reaktion, induziert durch transplantierte Endothelzellen.

[0172] Endothelzellen sind der wichtigste Bestandteil für Blutgefäßbildung. Unsere In-vivo-Studie zeigte, dass transplantierte Endothelzellen Teil von neugebildeten Kapillaren bei der syngenen Zelltransplantation werden. Diese Daten legen nahe, dass transplantierte Endothelzellen in die Blutgefäßbildung verwickelt sind. Die aus der allogenen Endothelzelltransplantation gewonnenen Daten legen jedoch nahe, dass neu gebildete Kapillaren in dem Narbengewebe aus Empfängerherzendothelzellen wuchsen. Wir fanden transplantierte Zellen an den Tagen 1 und 7 nach der Transplantation, beobachteten aber keine transplantierten Zellen 14 Tage nach der Transplantation. Ein zusätzliches Anzeichen dieser Schlussfolgerung ist, dass es keine immunologische Reaktion um Kapillargefäße in der Narbe herum gab. Falls die transplantierten allogenen Endothelzellen Teil der neu gebildeten Kapillaren werden, sollte Lymphozyteninfiltration um das Blutgefäß herum beobachtet werden. Diese Daten zeigen, dass transplantierte Endothelzellen in die neue Blutgefäßbildung verwickelt sind und auch Angiogenese stimulieren. Bei der letzteren Situation können angiogene Faktoren, die durch transplantierte Zellen sezerniert werden, eine wichtige Rolle bei diesem Vorgang spielen.

[0173] Angiogenese in unserem Tiermodell könnte auch durch entzündliche Reaktionen stimuliert sein. Obwohl von syngener Endothelzelltransplantation gezeigt worden ist, dass Angiogenese ohne entzündliche Reaktion geschieht, könnten durch Entzündungszellen freigesetzte Faktoren eine Rolle bei der Blutgefäßbildung, induziert durch allogene Endothelzelltransplantation, spielen. Die Kapillardichte in Narbengewebe, das an allogene Zelltransplantation ausgesetzt war, war 1,3-mal höher als jenes, das syngener Zelltransplantation ausgesetzt war. Dieser Unterschied in der Kapillardichte kann an Lymphozyteninfiltration liegen.

[0174] Obwohl der Blutfluss durch Endothelzelltransplantation in unserem experimentellen Modell gesteigert war, hatte der gesteigerte Blutfluss keine Wirkungen auf die Remodellierung und Funktion des linken Ventrikels. Wir fanden Muskelzellen in dem Narbengewebe von wenigen Herzen, aber die Anzahl der Muskelzellen mag nicht ausreichend sein, um die Herzfunktion zu verbessern. Es gab keine Unterschiede im Herzvolumen, Herzgewicht und der Narbengröße zwischen transplantierten und Kontrollherzen. Bei der Funktionsanalyse gab es keine Unterschiede in der Herzrate, im Koronarfluss, in systolischem und entwickeltem Druck zwischen zwei Gruppen.

[0175] Wir beobachteten, dass die zwei Wochen alte Narbe weniger vollständig ausgebildet war und mehr Blutgefäße und Fibroblasten enthielt als die vier Wochen alte Narbe, welche festes Bindegewebe war. Zusätzlich fanden wir heraus, dass Kardiomyozytentransplantation am erfolgreichsten war, nachdem sich die entzündliche Reaktion aufgelöst hatte und bevor eine signifikante Narbenexpansion und ventrikuläre Dilatation geschah.

[0176] Das Ergebnis der gesteigerten Angiogenese in transmuralen Narben, induziert durch Endothelzelltransplantation, bedingt eine neue Technik für die Induktion von Angiogenese. Wir beobachteten eine gesteigerte Anzahl an Kapillargefäßen in den Narben von Rattenherzen, welche mit Endothelzellen transplantiert worden sind. Im Gegensatz dazu beobachteten wir eine gesteigerte Anzahl von Arteriolen und Venolen in Narben, die mit fötalen Kardiomyozyten transplantiert worden sind. Falls Endothelzellen und Kardiomyozyten in Myokardnarben co-transplantiert werden, erhöhen Endothelzellen den Blutfluss in den transplantierten Bereich, wodurch das Überleben und die Funktion von transplantierten Kardiomyozyten gesteigert sein könnte. Es wäre möglich, ventrikuläre Kardiomyozyten aus transvenöser Endomyokardbiopsie und Endothelzellen aus der Saphenavene oder Omentumfett zu gewinnen und jene Zellen für die nachfolgende Auto-Co-Transplantation zu kultivieren.

[0177] Zusätzlich zu morphologischen Anzeichen einer gesteigerten Angiogenese zeigten wir, dass Blutfluss zu Narbengewebe gesteigert war. Da es eine ungewöhnliche Adhäsion zwischen dem Narbenbereich und der Brustwand von den vorangegangenen zwei Operationen (Vernarben und Transplantation) gab, könnte der Blutfluss zu dem Narbenbereich aus zwei Quellen resultieren, eine aus Koronararterien und die andere aus der Brustwand durch nicht-koronare Kollateralgefäße, erzeugt durch Adhäsion. Falls Blutfluss aus Brustwandadhäsion mit Blutfluss aus Koronararterie zusammengezählt wird, verdeckt es die Wirkung der Angiogenese an sich auf den Blutfluss zu dem Narbenbereich. Deshalb injizierten wir Mikrosphären in isolierte Herzzubereitungen, obwohl für die Abschätzung des tatsächlichen Blutflusses die Injektion von Mikrokugeln in das linke Atrium oder den rechten Ventrikel in vivo physiologischer sein mag. Da es Gebiete mit einem nicht-transmuralen Infarkt in der Peripherie der kryoverletzten Läsionen gab, wurde die linksventrikuläre freie Wand in drei Bereiche eingeteilt: normaler Bereich, transmuraler Infarktbereich und Grenzbereich. Der Blutfluss zu den Grenzbereichen lag immer zwischen jenem des normalen und des vollständigen transmuralen Infarktbereichs.

Optimale Zeit für Kardiomyozytentransplantation, um Myokardfunktion nach linksventrikulärer Nekrose zu maximieren

[0178] Nach Myokardinfarkt macht beschädigtes Myokard sowohl akute als auch chronische entzündliche Reaktionen durch. Während dieses Vorgangs werden die nekrotisierten Herzzellen durch Fasergewebe ersetzt und ventrikuläre Remodellierung schreitet fort. Ventrikulärer Druck streckt den Heilbereich und macht ihn dünn und ventrikuläre Dilatation geschieht. Ein ventrikuläres Aneurysma kann sich bilden und Stauungsinsuffizienz kann resultieren. Die Begrenzung der ventrikulären Remodellierung nach dem Infarkt ist wichtig, um Expansion und Dünnwerden der Infarktregion und Dünnwerden und Fortschreiten von ventrikulärer Dilatation zu verhindern, was in Stauungsinsuffizienz resultiert. Die Zugabe von Herzgewebe, um das Narbengewebe zu ersetzen, kann Infarktdünnwerden verhindern und Kammergröße und Ventrikelfunktion bewahren. Wir zeigten, dass fötale Kardiomyozyten, die in eine LVFW-Narbe transplantiert worden sind, Herzgewebe bildeten und Myokardfunktion verbesserten. Transplantation wurde zufällig vier Wochen nach Kryonekrose der LVFW durchgeführt, wenn ventrikuläre Dilatation bereits vorhanden war. Die optimale Zeit für Kardiomyozytentransplantation, um die beste Ventrikelfunktion bereitzustellen, ist jedoch wichtig. Die akute entzündliche Reaktion könnte die transplantierten Kardiomyozyten, welche zu früh nach Myokardinfarkt eingeführt worden sind, zerstören. Auf der anderen Seite mag Kardiomyozytentransplantation nach einer signifikanten Narbenexpansion von begrenztem Wert sein. Deshalb untersuchte die vorliegende Studie die optimale Zeit für Zelltransplantation nach Myokardverletzung.

Zusammenfassung

Methoden:

- (1) Narbenexpansionsstudien: Die Ratten wurden 0, 1, 2, 4 und 8 Wochen nach Kryoverletzung geschlachtet und der Narbenbereich wurde durch Planimetrie gemessen (jeweils N = 7).
- (2) Transplantationsstudien: Fötale Rattenkardiomyozyten (Transplantat) oder Kulturmedium (Kontrolle) wurden sofort (jeweils N = 8), 2 Wochen (jeweils N = 8) und vier Wochen (jeweils N = 12) nach Kryoverletzung transplantiert. Acht Wochen nach Kryoverletzung wurde die Herzfunktion unter Verwendung einer Langendorf-Präparation bewertet. Narben und transplantierte Kardiomyozyten wurden histologisch bewertet.

Ergebnisse:

- (1) Eine transmurale Verletzung geschah unmittelbar nach Kryoverletzung. Eine entzündliche Reaktion war nach einer Woche stärker ersichtlich als nach zwei Wochen. Obwohl sich die Narbengröße nicht signifikant zwischen Woche 1 und 2 änderte, expandierte sie nach vier und acht Wochen ($p < 0,01$).
- (2) Acht Wochen nach Myokardverletzung wurden unmittelbar nach Myokardverletzung transplantierte Kardiomyozyten in dem Myokardnarbengewebe nicht gefunden. Narbengröße und Myokardfunktion waren ähnlich wie jene der Kontrollherzen. Nach zwei und vier Wochen transplantierte Kardiomyozyten bildeten Herzgewebe, welches 34 % bzw. 31 % des Gesamtnarbengebiets besetzte, und begrenzte ($p < 0,01$) Narbenausdehnung im Vergleich mit Kontrollherzen. Beide transplantierten Gruppen hatten eine bessere ($p < 0,001$, $< 0,001$) Herzfunktion als die Kontrollgruppe. Der entwickelte Druck war höher ($p < 0,01$) in den herztransplantierten Zellen nach zwei Wochen als nach vier Wochen.

Schlussfolgerung:

[0179] Kardiomyozytentransplantation war am erfolgreichsten, nachdem sich die entzündliche Reaktion aufgelöst hatte und bevor eine signifikante Narbenexpansion und ventrikuläre Dilatation geschah.

Material und Methoden

[0180] Versuchstiere: Sämtliche an Tieren durchgeführten Vorgänge waren von dem Animal Care Committee des The Toronto Hospital genehmigt. Die verwendeten Versuchstiere waren männliche Sprague-Dawley-Ratten (Lewis, Charles River Canada Inc., Quebec, Kanada), die 450 Gramm wogen. Aus Rattenherzen 18 Tage nach der Gestation gewonnene Kardiomyozyten wurden vor der Transplantation kultiviert. Sämtliche Experimente wurden durchgeführt gemäß „A Guide to the Care and Use of Experimental Animals“ des Canadian Council on Animal Care und des „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“, NIH-Publikation 85-23, revidiert 1985.

[0181] Myokardnarbenerzeugung und -bewertung: Myokardnarbengewebe wurde wie in Beispiel I oben erzeugt. Kurz, Ratten wurden mit Ketamin (22 mg/kg Körpergewicht, intramuskulär) anästhesiert, gefolgt von einer intraperitonealen Injektion von Pentobarbital (30 mg/kg Körpergewicht). Die anästhesierten Ratten wurden intubiert und Überdruckventilation wurde mit Raumluft, ergänzt mit Sauerstoff (6 l/min), unter Verwendung eines Harvard-Ventilators (Modell 683, South Natick, MA, USA) aufrechterhalten. Das Rattenherz wurde durch eine 2 cm lange linkslaterale Thorakotomie freigelegt. Kryoverletzung wurde an der linksventrikulären freien Wand (LVFW) mit einer flüssigen Stickstoffsonde erzeugt. Die Muskelschicht und Haut wurden mit 5-0-Vicrylfäden verschlossen. Die Ratten wurden vier Stunden postoperativ überwacht. Penlog XL (Benzathinpenicillin G 150.000 U/ml und Procainpenicillin G 150.000 U/ml) wurden intramuskulär (0,25 ml/Ratte) alle drei Tage für eine Woche nach Operation gegeben und Buprenorphin (0,01-0,05 mg/kg Körpergewicht) wurde subkutan alle 8 bis 12 Stunden für die ersten 48 Stunden nach Operation verabreicht.

[0182] Die LVFWs von 35 Tieren wurden kryoverletzt. Unmittelbar nach Kryoverletzung und 1, 2, 4 und 8 Wochen nach Verletzung wurden sieben zufällig ausgewählte Tiere unter Vollnarkose geschlachtet (siehe [Fig. 5](#) für ein schematisches Diagramm des Versuchsdesigns). Die Herzen wurden dann im Zustand der Distension (30 mm Hg) mit 10 % phosphatgepufferter Formalinlösung für 24 bis 48 Stunden fixiert und dann in 3 mm dicke Schnitte geschnitten. Alle Schnitte wurden für die Bewertung von Myokard- und Narbengrößen verwendet. Für jeden Schnitt wurde der Bereich des Narbengewebes in der LVFW auf einem Diapositiv abgegrenzt und quantifiziert unter Verwendung von Computerplanimetrie (Jandal Scientific Sigma Scan, Fairfield, CT., USA). Narbenlänge wurde berechnet als der Durchschnitt an endokardialer Narbenlänge und epikardialer Narbenlänge.

Narbengebiet wurde berechnet als die Narbenlänge \times Schnittdicke (3 mm). Das gesamte Narbengebiet in der Größe wurde berechnet als die Summe der Narbengebiete für sämtliche der Gewebeschnitte, die Narben zeigen. Die LVWF-Myokardgröße wurde berechnet unter Verwendung derselben Gleichung. Der Prozentsatz der LVFW, die durch die Narbe besetzt ist, wurde berechnet als $\text{Narbengröße/LVWF-Größe} \times 100$.

[0183] Histologische Studien: Die fixierten Herzschnitte wurden in Paraffin eingebettet und geschnitten, um 10 μm dicke Schnitte zu ergeben. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin, wie durch den Hersteller beschrieben (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO), gefärbt.

[0184] Zellkultur und Zubereitung für die Transplantation: Kardiomyozyten aus fötalen Rattenherzen wurden isoliert, gereinigt und kultiviert wie kürzlich beschrieben (Li, R. K. et al., J. Tissue Culture Methods 14: 93-100, 1992). Kurz, die Zellen wurden für 24 Stunden in Iscoves modifiziertes Dulbeccos Medium, enthaltend 10 % fötales Rinderserum, 100 U/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin bei 37 °C, 5 % CO_2 und 95 % Luft kultiviert. Die kultivierten Kardiomyozyten wurden von der Zellkulturschale mit 0,05 % Trypsin in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) abgelöst. Nach Zentrifugation bei $580 \times g$ für drei Minuten wurde das Zellpellet in Kulturmedium bei einer Konzentration von 16×10^6 Zellen/ml resuspendiert. Eine 0,25ml-Zellsuspension wurde für jede Transplantation verwendet.

[0185] Kardiomyozytentransplantation: Die LVFW von 56 adulten Rattenherzen wurden kryoverletzt wie oben beschrieben. Die Tiere wurden zufällig in drei Gruppen eingeteilt (siehe [Fig. 5](#), unten). In Gruppe 1 wurden acht Tiere mit kultivierten Kardiomyozyten transplantiert (Transplantat) und acht Tiere wurden mit Kulturmedium (Kontrolle) unmittelbar nach Myokardverletzung transplantiert. In Gruppe 2 wurden Tiere mit Zellen und Kulturmedium (jeweils N = 8) zwei Wochen nach Myokardverletzung transplantiert. In Gruppe 3 wurden Kontroll- und transplantierte Tiere (jeweils N = 12) vier Wochen nach Myokardverletzung transplantiert. Sämtliche Tiere wurden acht Wochen nach dem Transplantationsvorgehen gehalten. Unter Vollnarkose wurden die Herzen durch eine Mittelliniensternotomie freigelegt. Eine fötale Rattenkardiomyozytensuspension (0,25 ml, 4×10^6 Zellen) oder Kulturmedium (0,25 ml) wurde einmal in das Zentrum des Narbengewebes der transplantierten bzw. Kontrolltiere injiziert, unter Verwendung einer Tuberkulinspritze. Die Brust wurde mit 5-0-Vicrylfäden verschlossen. Antibiotika und Analgetika wurden gegeben, wie beschrieben in dem Abschnitt „Myokardnarbenerzeugung und -bewertung“ unten. Cyclosporin A wurde mit einer Dosis von 5 mg/kg Körpergewicht/Tag subkutan an die Kontroll- und transplantierten Ratten gegeben. Die Ratten wurden in Käfigen mit Filterdeckeln gehalten.

[0186] Myokardfunktionsstudien. Acht Wochen nach Myokardverletzung wurde die Herzfunktion von Kontroll- und transplantierten Tieren, die 0, 2 und 4 Wochen nach Myokardverletzung transplantiert worden sind, unter Verwendung einer Langendorf-Präparation (Stephen, S. E. Annals of Thoracic Surgery 59: 1127-1133, 1995) gemessen. Die Ratten wurden anästhesiert und Heparin (200 Einheiten) wurde intravenös verabreicht. Die Herzen wurden aus den Ratten schnell isoliert und in einer Langendorf-Apparatur mit gefiltertem Krebs-Heinseleit-Puffer (mmol/l: NaCl 118, KCl 4,7, KH_2PO_4 1,2, CaCl_2 2,5, MgSO_4 1,2, NaHCO_3 25, Glucose 11, pH 7,4), äquilibriert mit 5 % CO_2 und 95 % O_2 , perfundiert. Ein Latexballon wurde in das linke Ventrikel durch die Mitralklappe geführt und mit einem Druckwandler (Modell p10EZ, Viggo-Spectramed, CA) und Wandlervverstärker und Differenzialverstärker (Modell 11-G4113-01, Gould Instrument System Inc., Ohio) angeschlossen. Nach 30 Minuten der Stabilisierung wurde die Ballongröße durch die Zugabe von Salzlösung in Schritten mit 0,02 ml von 0,04 auf ein Volumen gesteigert, an dessen Ende der diastolische Druck 30 mm Hg oder mehr war. Die systolischen und diastolischen Drücke wurden bei jedem Ballonvolumen aufgenommen und der entwickelte Druck wurde als die Differenz zwischen den systolischen und diastolischen Drücken berechnet.

[0187] Messung der Remodellierung der freien Wand des linken Ventrikels: Nach Funktionsmessungen wurden die Herzen fixiert, geschnitten und auf einem Diapositiv abgegrenzt. LVFW und Narbengrößen wurden unter Verwendung von Computerplanimetrie quantifiziert, wie beschrieben in dem Abschnitt „Myokardnarbenerzeugung und -bewertung“. Die transplantierte Gewebegröße als Prozentsatz der Narbengröße wurde ähnlich berechnet.

[0188] Histologische Identifizierung von transplantierten Muskelzellen in dem Narbengewebe: Fixierte Herzschnitte wurden in Paraffin eingebettet und in 10 μm dicke Schnitte geschnitten. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt, wie in dem Abschnitt „Histologische Studien“ oben beschrieben.

[0189] Transplantierte Zellen enthaltende Herzschnitte wurden auch für die schwere Kette von Myosin (myosin heavy chain; MHC) (Rougier Bio-Tech, Montreal) gefärbt. Nach Paraffinentfernung und Rehydrierung wurden Proben für 30 Minuten mit einer Lösung aus 3 % H_2O_2 in 70 % Methanol inkubiert, um endogene Myokardperoxidase zu inhibieren. Triton X-100 (0,2 %) wurde verwendet, um die Proben 10 Minuten zu behandeln, um

Zellpermeabilität zu steigern. Nachdem unspezifische Proteinbindung mit 2 % normalem Ziegsenserum in 0,05 M Tris-Puffer (pH 7,4) für 15 Minuten gehemmt worden ist, wurden primäre Antikörper gegen HCM (1:1000) hinzugefügt und die Proben wurden bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert, gefolgt von einer Über-Nacht-Inkubation bei 4 °C. Negative Kontrollproben wurden in PBS unter denselben Bedingungen inkubiert. Nachdem Proben mit PBS gewaschen worden sind, wurde ein biotinmarkierter sekundärer Antikörper (1:250) hinzugefügt und die Proben wurden bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Nach Spülen mit PBS wurden die Proben an einen mit Peroxidase konjugierten Avidin-Biotin-Komplex bei Raumtemperatur für 45 Minuten ausgesetzt. Sichtbarmachung wurde mit einer Diaminobenzidinlösung (0,25 mg/ml in 0,05 Tris-HCl-Puffer, enthaltend 0,02 % H_2O_2) für 10 Minuten durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin für eine Minute gegengefärbt. Die Proben wurden abgedeckt und fotografiert.

[0190] Datenanalyse: Daten sind als der Mittelwert \pm Standardabweichung ausgedrückt. Die Software Statistical Analysis System wurde für sämtliche Analysen verwendet (SAS Institute, Cary, NC). Vergleiche von kontinuierlichen Variablen zwischen mehr als zwei Gruppen wurden durch eine Einweg-Analyse der Varianz durchgeführt. Falls das F-Verhältnis aus der ANOVA signifikant war, wurde ein multipler Duncan-t-Rangtest genutzt, um Unterschiede zwischen den Gruppen zu spezifizieren. Die kritische alpha-Schwelle für diese Analysen wurde auf $p < 0,05$ gesetzt.

[0191] Funktionelle Daten wurden für die Kontroll- und transplantierten Gruppen durch eine Analyse der Kovarianz (ANCOVA) unter Verwendung von intrakavitärem Ballonvolumen als die Covariante und systolischem, diastolischem und entwickeltem Druck als abhängige Variablen bewertet. Hauptwirkungen waren Gruppe, Volumen und die Wechselwirkung zwischen Gruppe und Volumen.

Ergebnisse

Histologische und morphologische Änderungen der Herzen nach Myokardverletzung

[0192] Unmittelbar nach Kryoverletzung waren 25 ± 3 % der Größe der LVFW transmural beschädigt. Die Kardiomyozyten waren fragmentiert (**Fig. 6A**). Nach einer Woche waren die meisten der nekrotisierten Kardiomyozyten verschwunden und es war ein überwiegend mononukleäres inflammatorisches Infiltrat in dem betroffenen Gebiet vorhanden (**Fig. 6B**). Nach zwei Wochen war das inflammatorische Infiltrat annähernd verschwunden und Fibroblasten und Collagenablagerung waren ersichtlich (**Fig. 6C**). Nach vier und acht Wochen bestand die Narbe aus fibrotischem Gewebe (**Fig. 6D**). Das Gewebe war weniger zellulär und Lymphozyten wurden nicht beobachtet.

[0193] Die Myokardnarbengröße des linken Ventrikels dehnte sich über den achtwöchigen Studienzeitraum in den beschädigten Herzen aus (**Fig. 7** und **Fig. 8**). Obwohl die Narbengrößen nach 1 und 2 Wochen (13 ± 6 % und 21 ± 4 % der LVFW) statistisch nicht unterschiedlich waren, war die Größe von vier Wochen alten Narben (39 ± 5 % der LVFW) größer ($p < 0,01$). Nach acht Wochen gab es eine weitere Zunahme ($p < 0,01$) in der Narbengröße (55 ± 3 % der LVFW).

[0194] Obwohl histologische Studien zeigten, dass die Beschädigung an neu verletztem Myokard transmural war, wurde etwas Myokard (12 ± 5 % des Gesamtnarbenbereichs) an dem Endokard eine Woche nach Myokardverletzung beobachtet (**Fig. 6** und **Fig. 7**). Lymphozyten umgaben das Myokard zu diesem Zeitpunkt. Nach zwei und vier Wochen nahm Muskelgewebe in dem Narbengebiet (3 ± 2 % und $2 \pm 1,5$ % des Gesamtnarbenbereichs) dramatisch in der Größe ab ($p < 0,01$). Nach acht Wochen wurde die Myokardnarbe transmural und es gab kein Myokard in dem Narbengewebe.

[0195] Wirkung von transplantierten Zellen auf die Narbengröße: Die in das Myokard unmittelbar nach Myokardverletzung transplantieren fötalen Rattenkardiomyozyten überlebten in dem transplantieren Gebiet nicht (**Fig. 9** und **Fig. 10**). Das Narbengebiet (53 ± 5 %) von transplantierten Herzen war ähnlich wie jenes der Kontrollgruppen, 55 ± 3 % der LVFW. Es gab kein Herzgewebe im Endokardbereich. Zwei Wochen nach Myokardbeschädigung transplantierte Kardiomyozyten bildeten Herzgewebe, welches für die schwere Kette von Myosin positiv färbte (**Fig. 11**). Das neu gebildete Herzgewebe besetzte 34 % des Gesamtnarbenbereichs (11 ± 3 % der LVFW). Ähnlich besetzten nach vier Wochen transplantierte Kardiomyozyten 31 % des Gesamtnarbenbereichs (12 ± 2 % der LVFW). Zusätzlich zu dem durch transplantierte Kardiomyozyten gebildeten kardialen Gewebe wurde Empfängermyokard auch im Endokard in beiden transplantierten Gruppen gefunden. Die Narbengrößen für sowohl die nach zwei als auch nach vier Wochen mit Zellen transplantieren Herzen waren kleiner ($p < 0,01$) als die Narbengrößen der Kontrollherzen (nicht transplantierbare Herzen). Die Narbengröße der nach zwei Wochen transplantierten Herzen (32 ± 5 %) war kleiner ($p < 0,01$) als jene der nach vier Wochen

transplantierten Herzen ($42 \pm 2 \%$) ([Fig. 10](#)).

[0196] Wirkung von transplantierten Zellen auf die Herzfunktion: Wenn Kardiomyozyten unmittelbar nach Myokardverletzung transplantiert worden sind, war die ventrikuläre Funktion der mit Zellen transplantierten Herzen ähnlich wie jene von Kontrollherzen (nicht transplantierte Herzen) ([Fig. 12](#)). Eine Analyse der Kovarianz zeigte für entwickelte Drücke keine Beziehung zwischen der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe. Wenn die Kardiomyozyten zwei Wochen nach Myokardverletzung transplantiert worden sind, hatten die transplantierten Herzen eine bessere ($p = 0,001$) ventrikuläre Funktion als die Kontrollherzen ([Fig. 13](#)). Ähnliche diastolische und entwickelte Drücke wurden bei geringeren Ballonvolumina in der transplantierten Gruppe gefunden.

[0197] Vier Wochen nach Myokardverletzung transplantierte Kardiomyozyten verbesserten ebenfalls ($p < 0,001$) die Myokardfunktion ([Fig. 14](#)). [Fig. 15](#) zeigt, dass nach zwei Wochen transplantierte Herzen höhere entwickelte Drücke bei Ballonvolumina von 0,1 ml ($p < 0,05$), 0,2 ml ($p < 0,01$) und 0,3 ml ($p < 0,01$) hatten als nach vier Wochen transplantierte Herzen.

[0198] Das transplantierte Gewebe kontrahierte sichtbar, jedoch mit anderen Raten als es das Wirtsmyokard tat. Die Kontraktion des transplantierten Gewebes hielt nach Dissezieren des Empfängerherzens an, aber seine Kontraktionsgeschwindigkeit war weiter anders.

[0199] In der Ratte geschieht der Verlust an nekrotisiertem Ventrikelgewebe zwei Tage nach Kryoverletzung des Myokards. Zu diesem Zeitpunkt gibt es eine akute entzündliche Reaktion mit Neutrophilen, die sich zuerst in der Peripherie akkumulieren und später im Zentrum der nekrotischen Region. Eine chronisch entzündliche Reaktion, die Makrophagen und Lymphozyten involviert, folgt auf die akute Reaktion.

[0200] Eine Woche nach Kryoverletzung waren mehr als 80 % der nekrotischen Muskelfasern verschwunden. Die verbleibenden Muskelfasern waren von Lymphozyten umgeben.

[0201] Die entzündliche Reaktion ist weniger intensiv zwei Wochen nach Kryoverletzung (und fehlt nach drei Wochen): Zwei Wochen nach Kryoverletzung zeigten die Narben der Kontrolltierherzen eine minimale oder gar keine entzündliche Reaktion. Zwei Wochen alte Narben waren weniger vollständig ausgebildet und enthielten mehr Blutgefäße und Fibroblasten als vier Wochen alte Narben, welche festes Bindegewebe umfassten. Im Vergleich mit einer Woche alten Narben gab es weniger kardiales Gewebe in älteren Narben. Es ist möglich, dass eine fortschreitende Entzündung und das Fehlen von Sauerstoff und Nährstoffversorgung das Myokardgewebe mit der Zeit reduzierte.

[0202] Die unmittelbar nach Kryoverletzung transplantierten Kardiomyozyten überlebten in keinem der untersuchten Tiere. Wir nehmen an, dass die aktivierten Neutrophilen und Makrophagen in dem entzündeten Narbengebiet die transplantierten Zellen verletzten. Nach acht Wochen war die linksventrikuläre Kammer der zum Zeitpunkt der Kryoverletzung transplantierten Tiere ähnlich wie jene der Kontrollnarbe. Die Kammer war aufgrund von Dünnerwerden der Narbe erweitert. Der verbleibende lebensfähige Muskel des linken Ventrikels war hypertrophiert. Es wurde keine entzündliche Reaktion beobachtet. Die Funktion dieser transplantierten Herzen war ähnlich wie jene der Kontrollherzen.

[0203] Sämtliche der mit den fötalen Kardiomyozyten nach zwei und vier Wochen transplantierten Tiere bildeten kardiales Gewebe innerhalb des Narbengewebes; deshalb ist Transplantation sowohl in der unvollständig als auch in der vollständig ausgebildeten Narbe möglich. Histologische Studien der LVFW der transplantierten Herzen zeigten, dass das Wirtsmyokard gewöhnlich unterhalb der Narbe vorhanden war, wenn das Transplantat vorhanden war. Dies geschah nicht, wenn das Transplantat fehlte.

[0204] Kontrollnarbenstudien zeigten, dass die Narben immer transmural waren und keine Wirtskardiomyozyten unterhalb hatten. Narbengrößen und die Größen der linken Ventrikelkammer der nach zwei Wochen transplantierten Herzen waren kleiner als jene der nach vier Wochen transplantierten Herzen. Narbengrößen und linksventrikuläre Kammergrößen der nach vier Wochen transplantierten Herzen waren wiederum kleiner als jene der Kontrollherzen. In Übereinstimmung mit diesen histologischen Ergebnissen war die Myokardfunktion der nach zwei Wochen transplantierten Herzen besser als jene der nach vier Wochen transplantierten Herzen. Wir führten die verbesserte Myokardfunktion auf eine geringere ventrikuläre Dilatation und Narbendünnerwerden zurück. Im Vergleich mit den scheinoperierten Tieren in unserer vorangegangenen Studie war die kontraktile Funktion der nach zwei Wochen transplantierten Herzen weniger effizient. Transplantation, sobald als möglich, nachdem die akute inflammatorische Reaktion in dem infarktierten Myokard verschwunden ist, sollte

ventrikuläres Remodellieren minimieren und Myokardfunktion optimieren.

[0205] Obwohl der Mechanismus der verbesserten Herzfunktion unbekannt ist, bildet ein Kardiomyozyten-transplantat das Äquivalent eines lebensfähigen Epikardrands und verhindert ventrikuläre Dilatation und Überstreckung der Kardiomyozyten während der Systole. Mit Überstrecken der Kardiomyozyten wird die kardiale Funktion vermindert (Frank-Starling-Gesetz). Die elastischen Eigenschaften des kontraktile Apparates der transplantierten Kardiomyozyten mag Wirtsfibroblasten- und Kardiomyozytenstreckung und ventrikuläre Vergrößerung verhindern.

[0206] Im Verlauf des Ausbildens von Herzgewebe aus transplantierten Kardiomyozyten geschah Angiogenese. Angiogenese ist am wahrscheinlichsten notwendig, um die Lebensfähigkeit der transplantierten Muskelzellen aufrechtzuerhalten. Eine gesteigerte Blutzufuhr in die Narbe könnte jedoch auch Fibroblastenumsatz und Stärkung der Narbe in Antwort auf die Streckung der linksventrikulären freien Wand erleichtern.

[0207] Mit dem Auftreten von Thrombolyse und perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (PTCA) wird die Häufigkeit von fleckweiser, nicht transmuraler Infarzierung häufiger und transmurale Infarzierung mit Aneurysmabildung wird weniger üblich. Falls der Blutfluss zu den lebensfähigen Kardiomyozyten innerhalb der ventrikulären Narbe für die kontraktile Funktion nicht ausreichend ist, wird Stimulation von Angiogenese in dem Narbengewebe wichtig. Mit adäquatem Blutfluss sollte die normale kontraktile Funktion zu den hibernierenden Kardiomyozyten innerhalb der Narbe zurückkehren. Transplantation von fötalen Kardiomyozyten könnte Patienten mit einer fleckweisen Infarzierung signifikanten Nutzen bieten. Angiogenese würde in der Narbe stimuliert, der Blutfluss würde gesteigert und die normale kontraktile Funktion der hibernierenden Kardiomyozyten des Wirts wiederhergestellt. Die transplantierten Kardiomyozyten sollten ebenfalls die kontraktile Kapazität des Narbengewebes steigern und die kontraktile Erfordernisse des nicht angegriffenen Wirtsmyokards reduzieren. Patienten mit Angina, welche durch Bypasschirurgie nicht korrigiert werden kann, könnten aus zu Kardiomyozytentransplantation sekundärer Angiogenese einen Nutzen ziehen. Zusätzlich könnte es nützlich sein, Angiogenese mit Wachstumsfaktoren vor der Autotransplantation zu stimulieren.

[0208] Zusammenfassend bildet die Transplantation von fötalen Kardiomyozyten Herzgewebe in Narbengewebe, was ventrikuläre Dilatation und Narbenverdünnung beschränkt. Die optimale Zeit für die Transplantation für eine verbesserte Myokardfunktion ist nach der akuten entzündlichen Reaktion und bevor signifikante ventrikuläre Dilatation geschehen ist.

Co-Implantation von Endothelzellen mit adulten Kardiomyozyten verbessert die Funktion von infarktierten Herzen

[0209] Kardiale transmurale Narben wurden durch Kryoverletzung in der linksventrikulären freien Wand (LV-FW) von Sprague-Dawley-Rattenherzen induziert, wie in den vorangegangenen Beispielen beschrieben. Drei Wochen nach Kryoverletzung wurden die Ratten in drei Gruppen eingeteilt (acht Ratten pro Gruppe) und kardiale transmurale Narben wurden mit entweder Medium (keine Zellen), adulten Kardiomyozyten alleine oder adulten Kardiomyozyten plus Endothelzellen transplantiert. Herzfunktion wurde bewertet unter Verwendung einer Langendorf-Präparation fünf Wochen nach Zelltransplantation (Stephen et al., Annals of Thoracic Surgery 59: 1127-1133, 1995).

[0210] [Fig. 16](#) zeigt eine Graphik des entwickelten Drucks in infarktierten Rattenherzen, injiziert mit entweder Medium (Negativkontrolle), adulten Kardiomyozyten alleine (CM) oder adulten Kardiomyozyten plus Endothelzellen (CM + EC). Adulte Kardiomyozyten, alleine injiziert, bildeten Gewebe innerhalb der ventrikulären Narbe, verbesserten aber nicht die Herzfunktion, im Vergleich mit Herzen, die mit Medium alleine injiziert worden sind. Im Gegensatz dazu verbesserte die Injektion von adulten Kardiomyozyten plus Endothelzellen signifikant die Herzfunktion ($p < 0,01$), im Vergleich mit Herzen, die mit Medium oder Kardiomyozyten alleine injiziert worden sind. Co-Injektion von Endothelzellen stimuliert wahrscheinlich Angiogenese, was das Überleben von adulten Kardiomyozyten verbessert.

Patentansprüche

1. Verwendung von Zellen, umfassend adulte Kardiomyozyten, adulte Fibroblasten, adulte glatte Muskelzellen oder adulte Endothelzellen, für die Zubereitung einer pharmazeutischen Zusammensetzung für die Bildung eines therapeutischen Transplantates in einem vernarbten Säugerherz.

2. Verwendung nach Anspruch 1, worin diese pharmazeutische Zusammensetzung eine Kombination die-

ser Zellen umfasst.

3. Verwendung nach Anspruch 2, worin diese pharmazeutische Zusammensetzung adulte Kardiomyozyten und Endothelzellen umfasst.

4. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, worin diese Zellen ein stabiles kardiales Transplantat in diesem Säugerherz bilden.

5. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, worin diese pharmazeutische Zusammensetzung die Herzfunktion verbessert.

6. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, worin eine oder mehrere dieser Zellen transfiziert oder genetisch verändert sind, um rekombinante Moleküle an Myokardgewebe zuzuführen.

7. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, worin eine oder mehrere dieser Zellen transfiziert oder genetisch verändert sind, um rekombinante Moleküle an Narbengewebe zuzuführen.

8. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, worin diese Zellen aus Auto-, Allo- oder Xenotransplantation erhalten werden.

9. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, worin diese pharmazeutische Zusammensetzung weiter einen oder mehrere Wachstumsfaktoren umfasst.

10. Verwendung nach Anspruch 9, worin dieser Wachstumsfaktor insulinähnlicher Wachstumsfaktor I, Insulinwachstumsfaktor II, transformierender Wachstumsfaktor-1, thrombozytärer Wachstumsfaktor-B, basischer Fibroblastenwachstumsfaktor oder vaskulärer Endothelwachstumsfaktor ist.

11. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, worin diese Zellen auf einem bioabbaubaren oder nicht bioabbaubaren Netz suspendiert sind.

12. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, worin diese Zellen durch direkte Injektion eingeführt werden.

13. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, worin diese pharmazeutische Zusammensetzung bei der rekonstruktiven Myokardchirurgie verwendet wird.

14. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, worin diese Applikation weiter die Verwendung eines biologischen Klebers zum Anheften der Zellen an Myokardgewebe umfasst.

15. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, worin diese Zellen ein stabiles kardiales Transplantat in diesem Säugerherz bilden und worin diese pharmazeutische Zusammensetzung die Herzfunktion verbessert.

16. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, worin diese Zellen auf einem bioabbaubaren oder nicht bioabbaubaren Netz suspendiert sind und worin diese pharmazeutische Zusammensetzung die Herzfunktion verbessert.

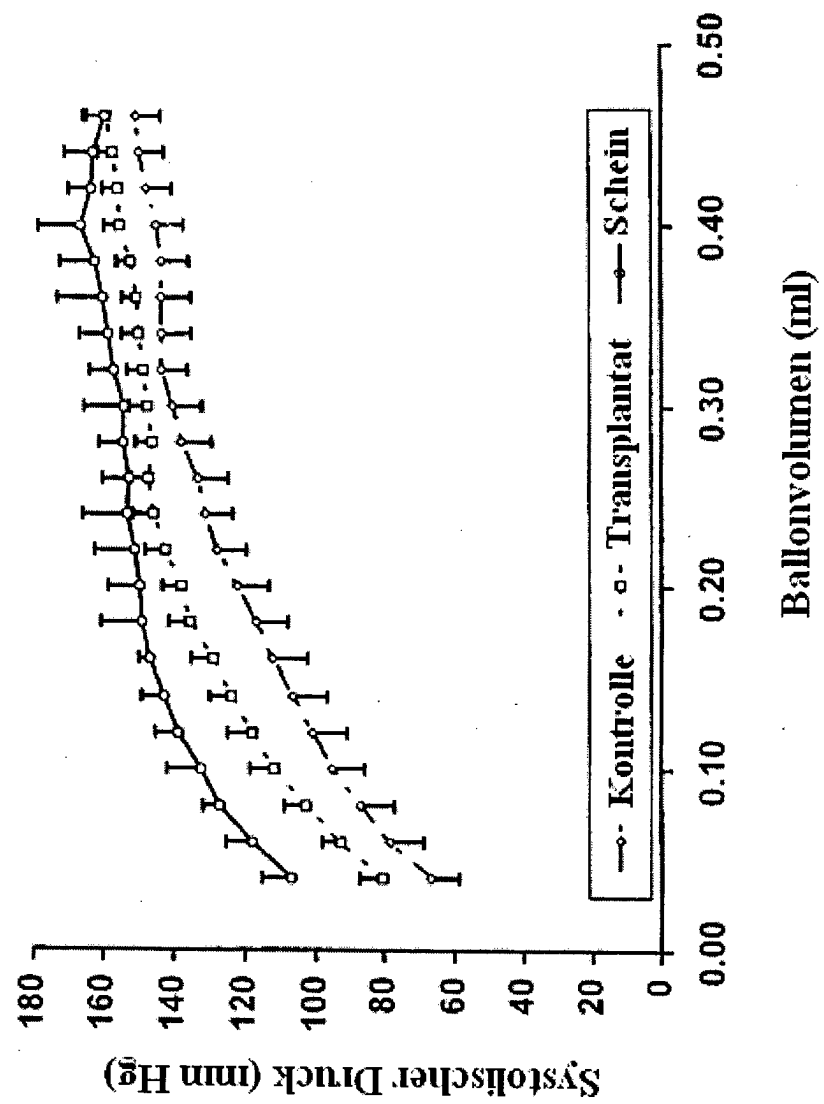
17. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, worin eine oder mehrere dieser Zellen transfiziert oder genetisch verändert worden sind, um rekombinante Moleküle zuzuführen, und worin diese Zellen ein stabiles kardiales Transplantat in diesem Säugerherz bilden.

18. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, worin eine oder mehrere dieser Zellen transfiziert oder genetisch verändert worden sind, um rekombinante Moleküle zuzuführen, und worin diese pharmazeutische Zusammensetzung die Herzfunktion verbessert.

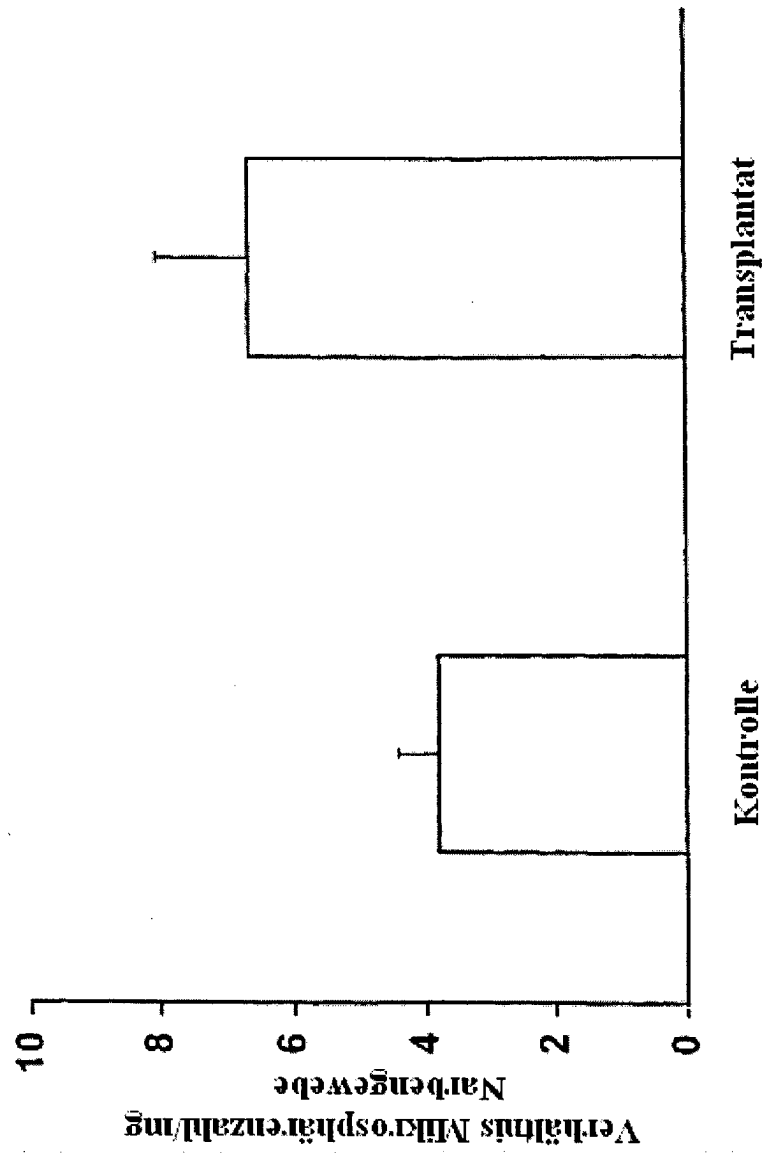
19. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, worin diese Zellen aus Autotransplantation gewonnen werden und worin diese pharmazeutische Zusammensetzung die Herzfunktion verbessert.

Es folgen 16 Blatt Zeichnungen

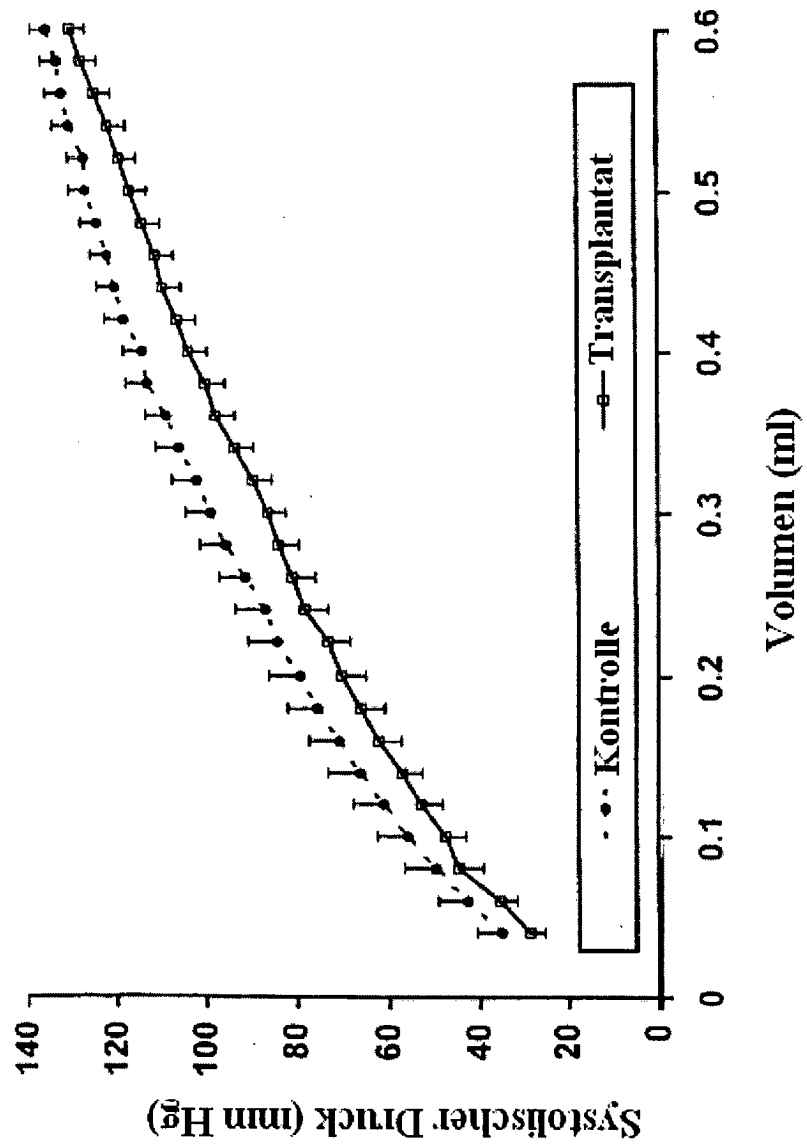
Anhängende Zeichnungen



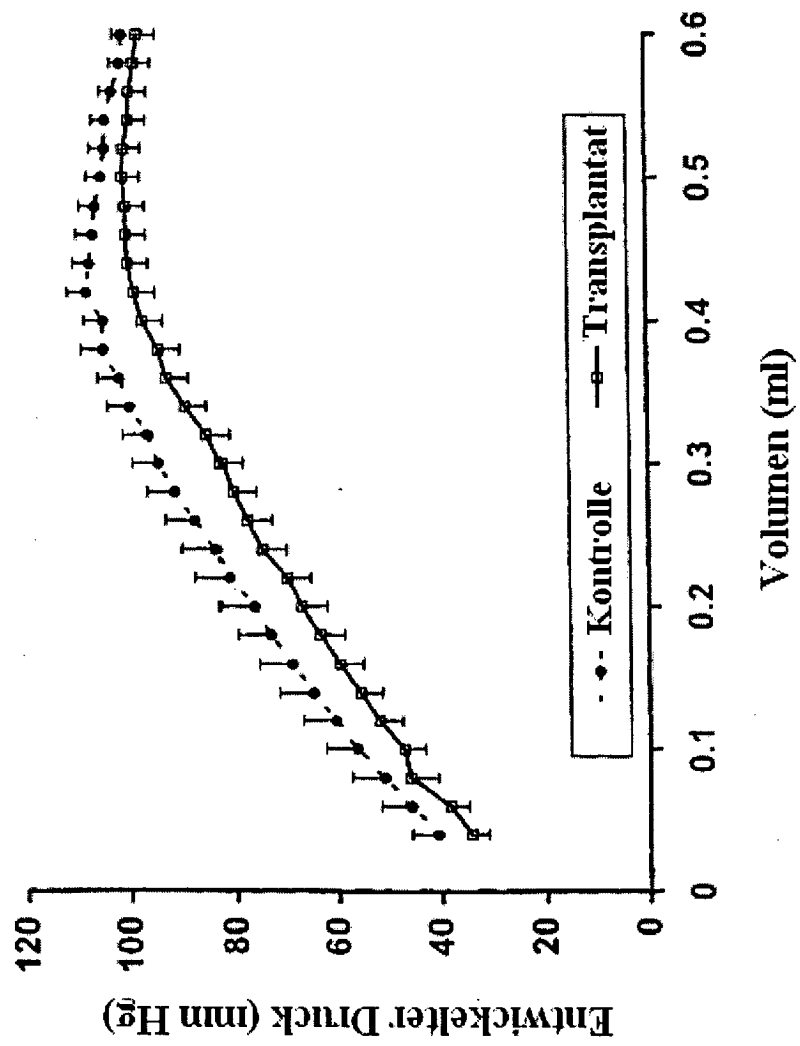
Figur 1



Figur 2

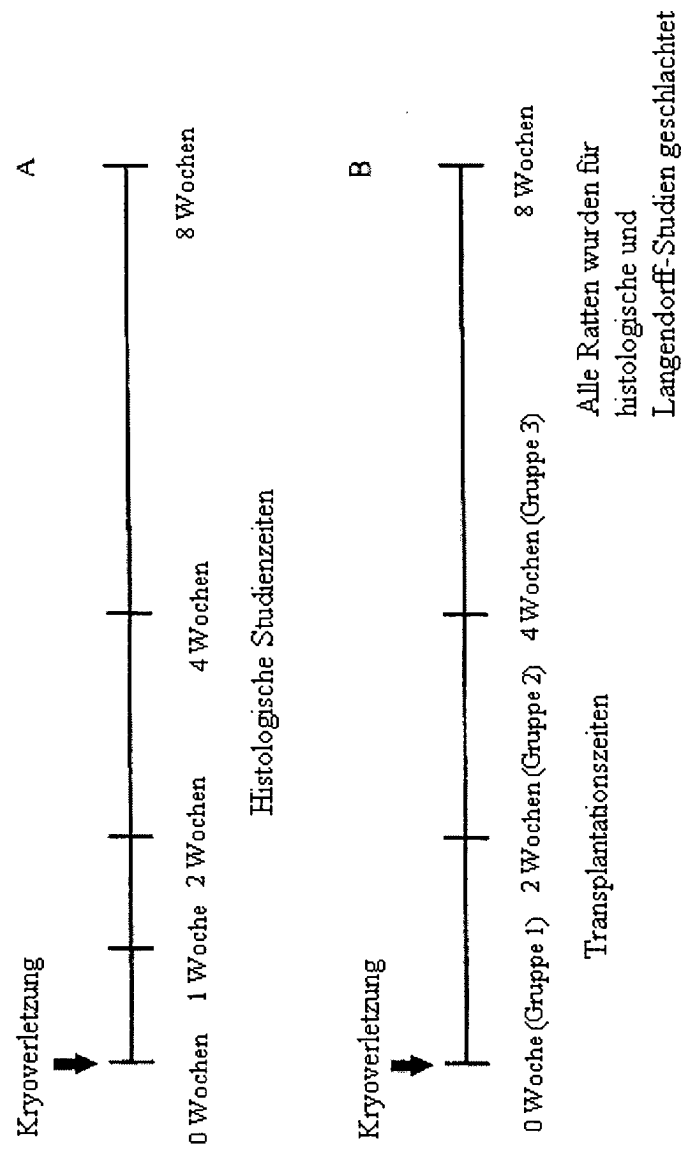


Figur 3

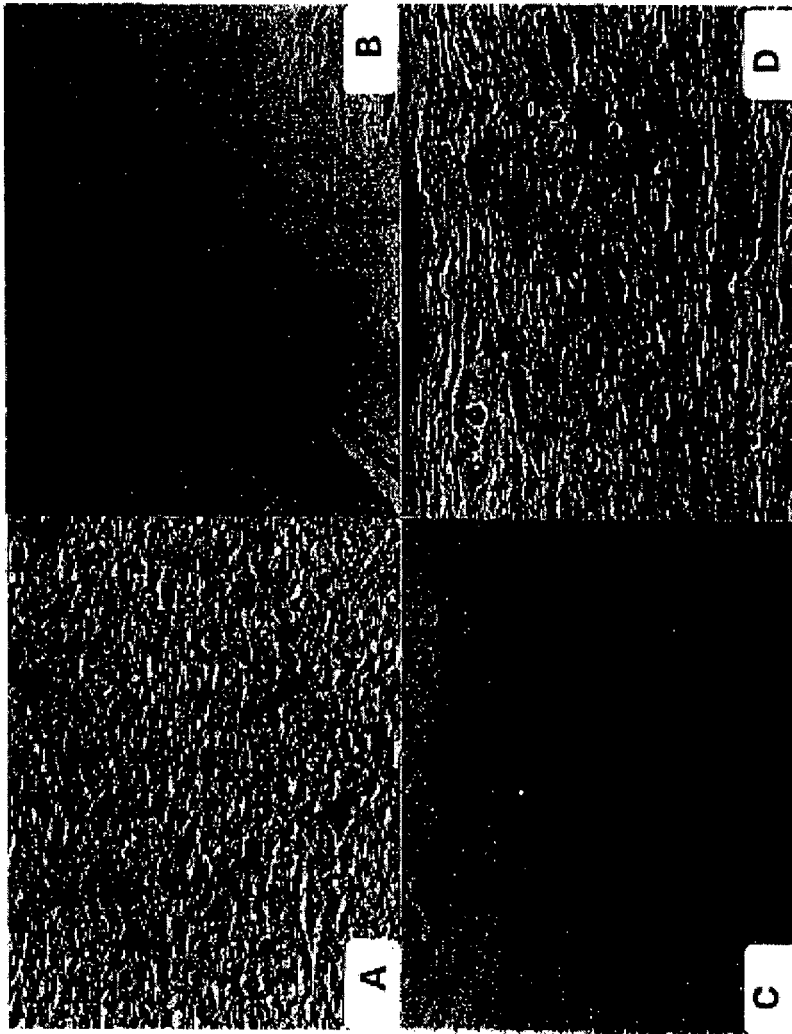


Figur 4

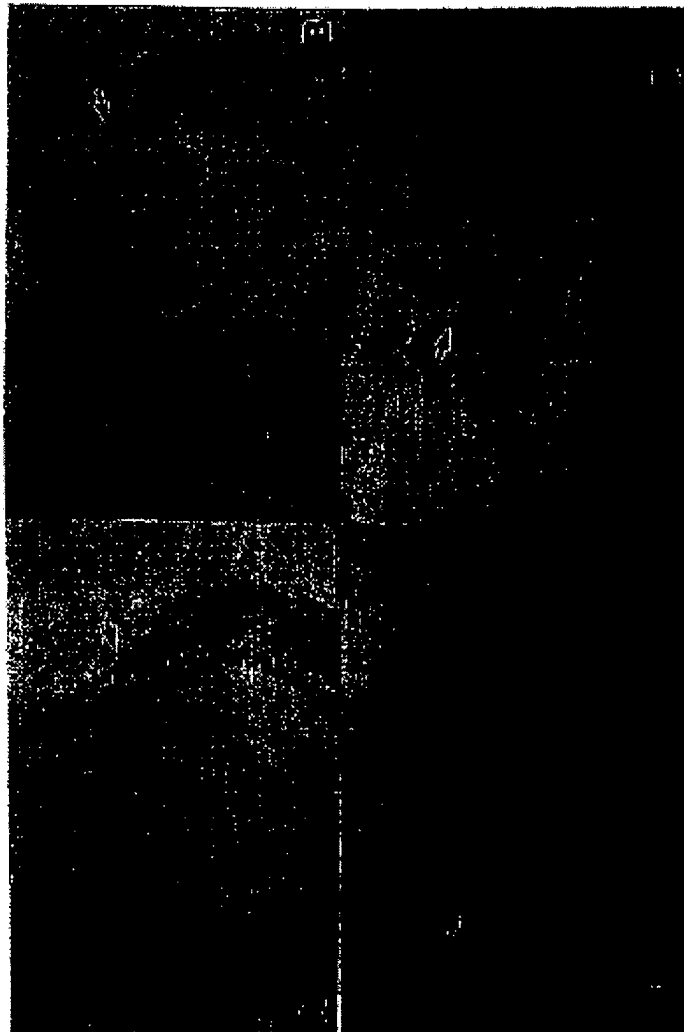
Ausführung des Experiments:



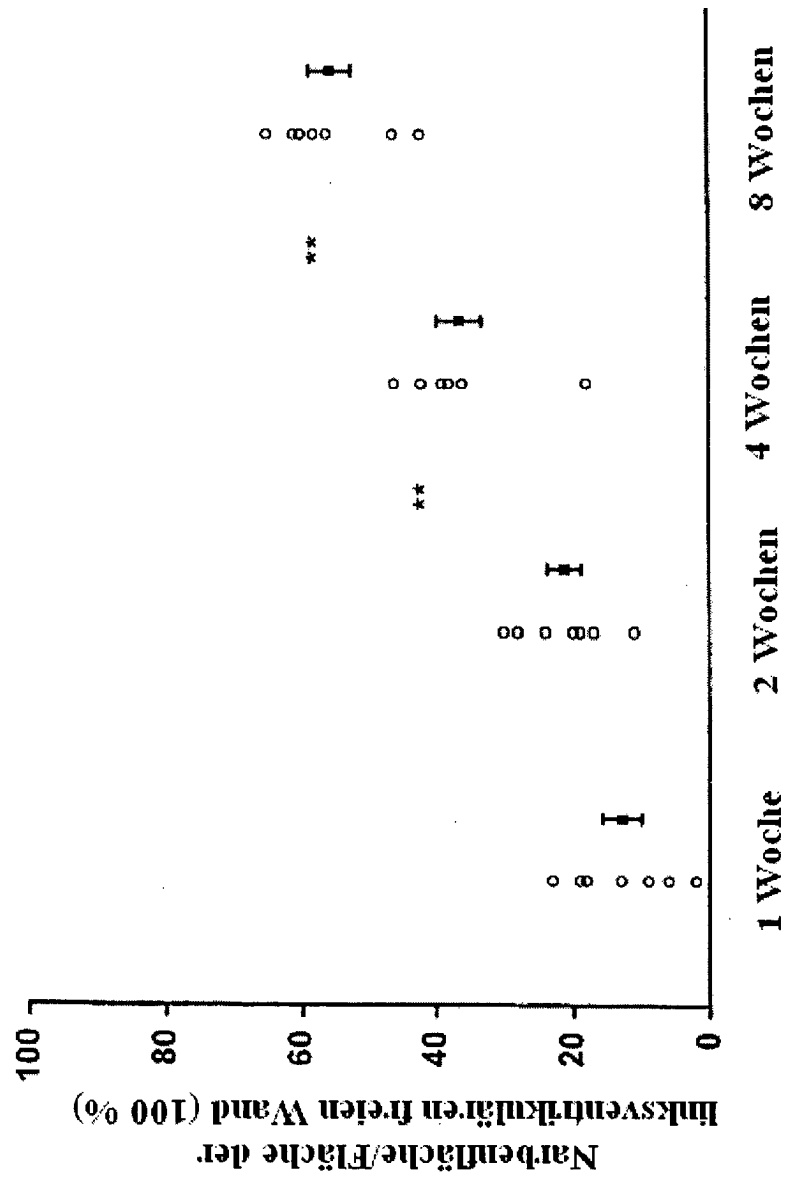
Figur 5



Figur 6



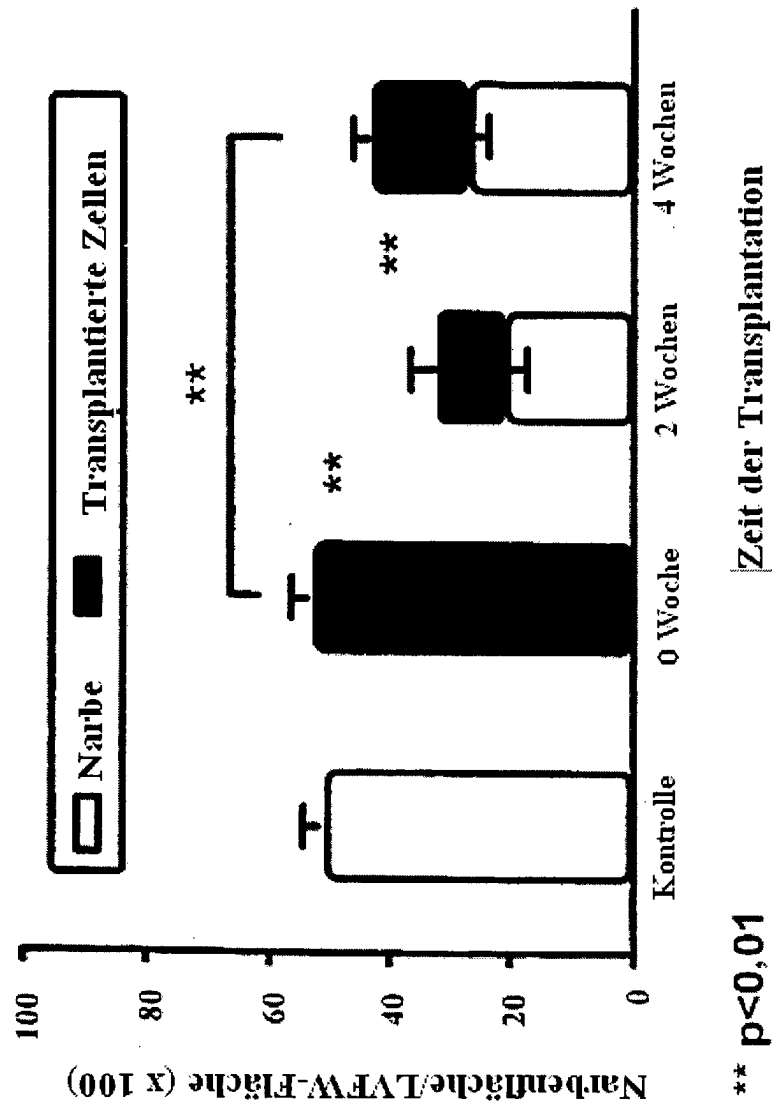
Figur 7



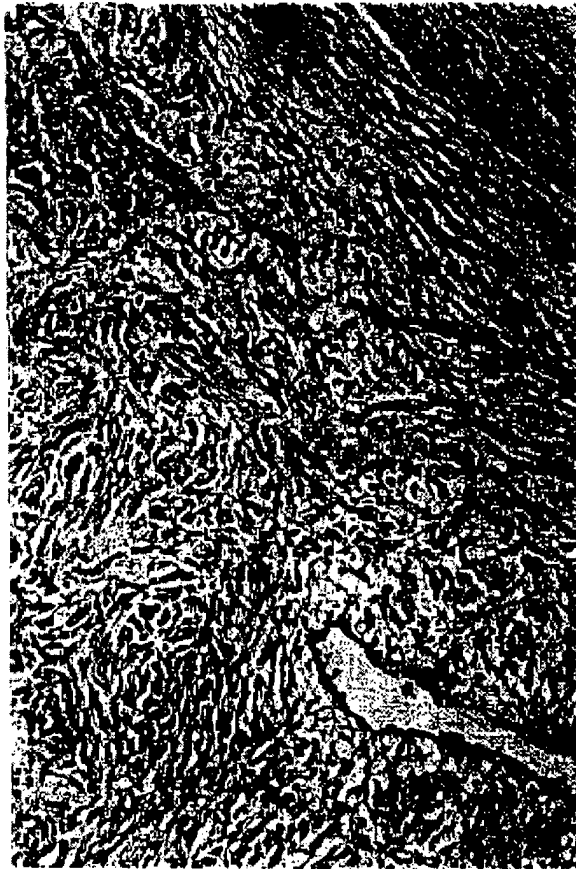
Figur 8



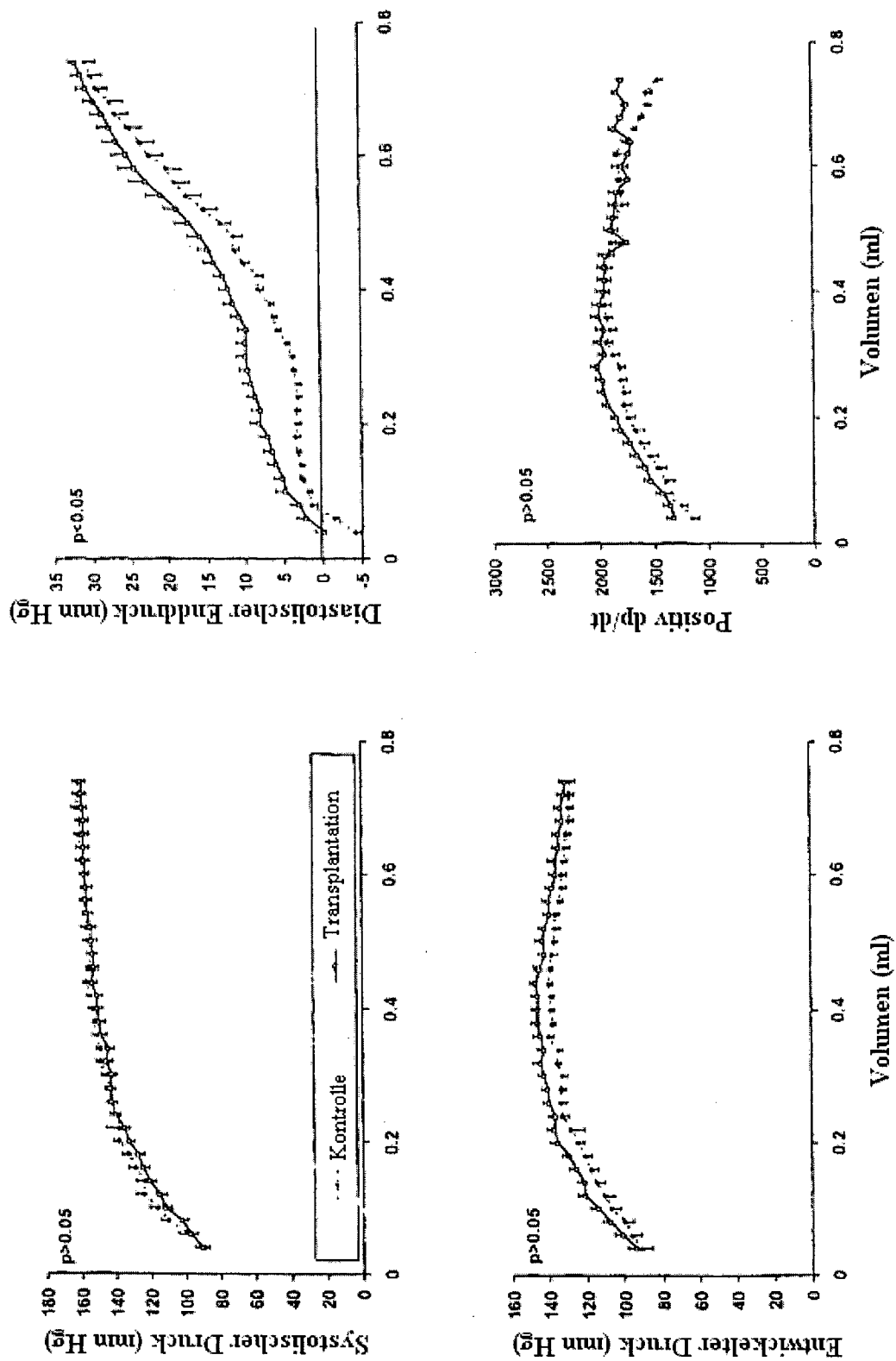
Figur 9



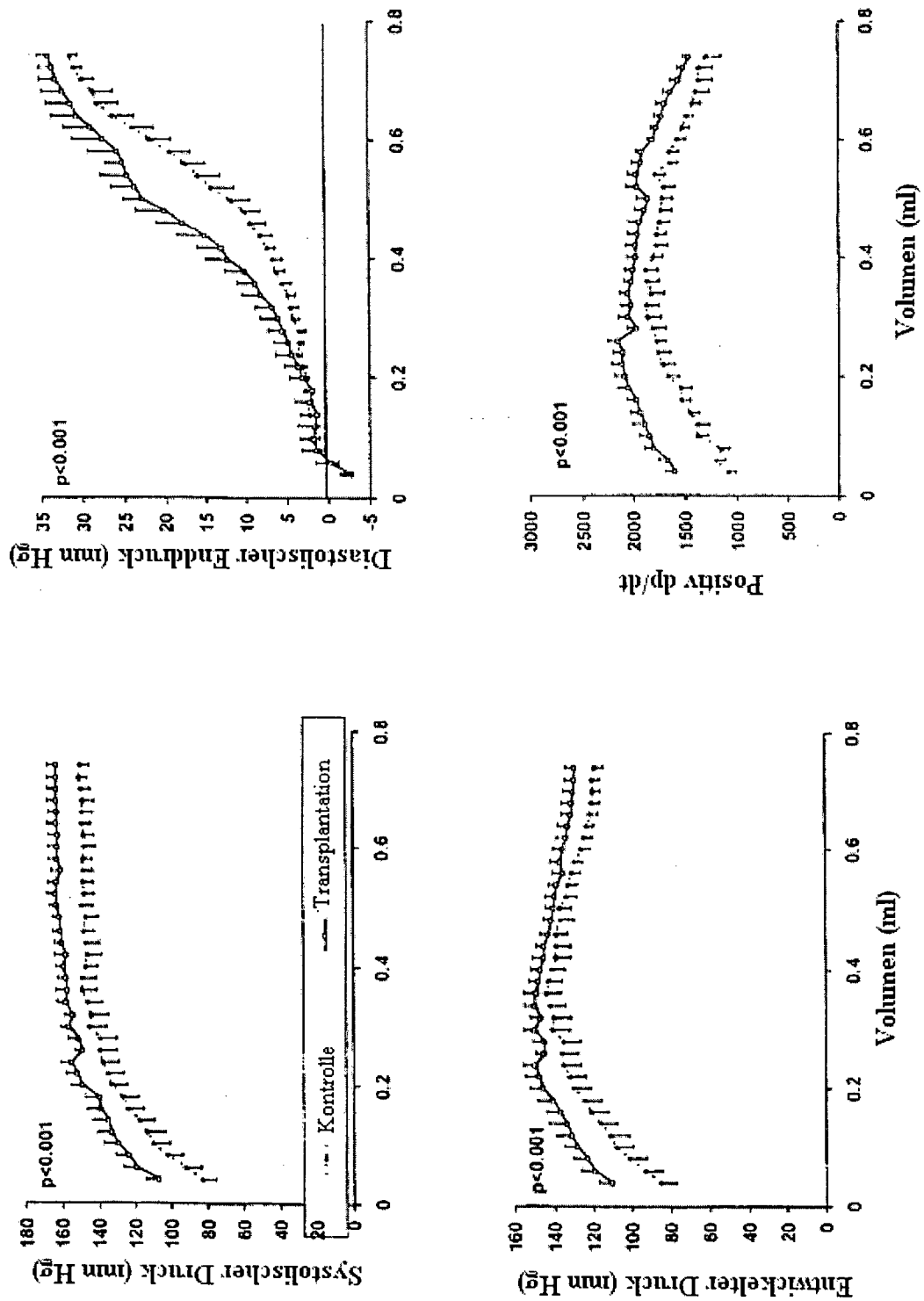
Figur 10



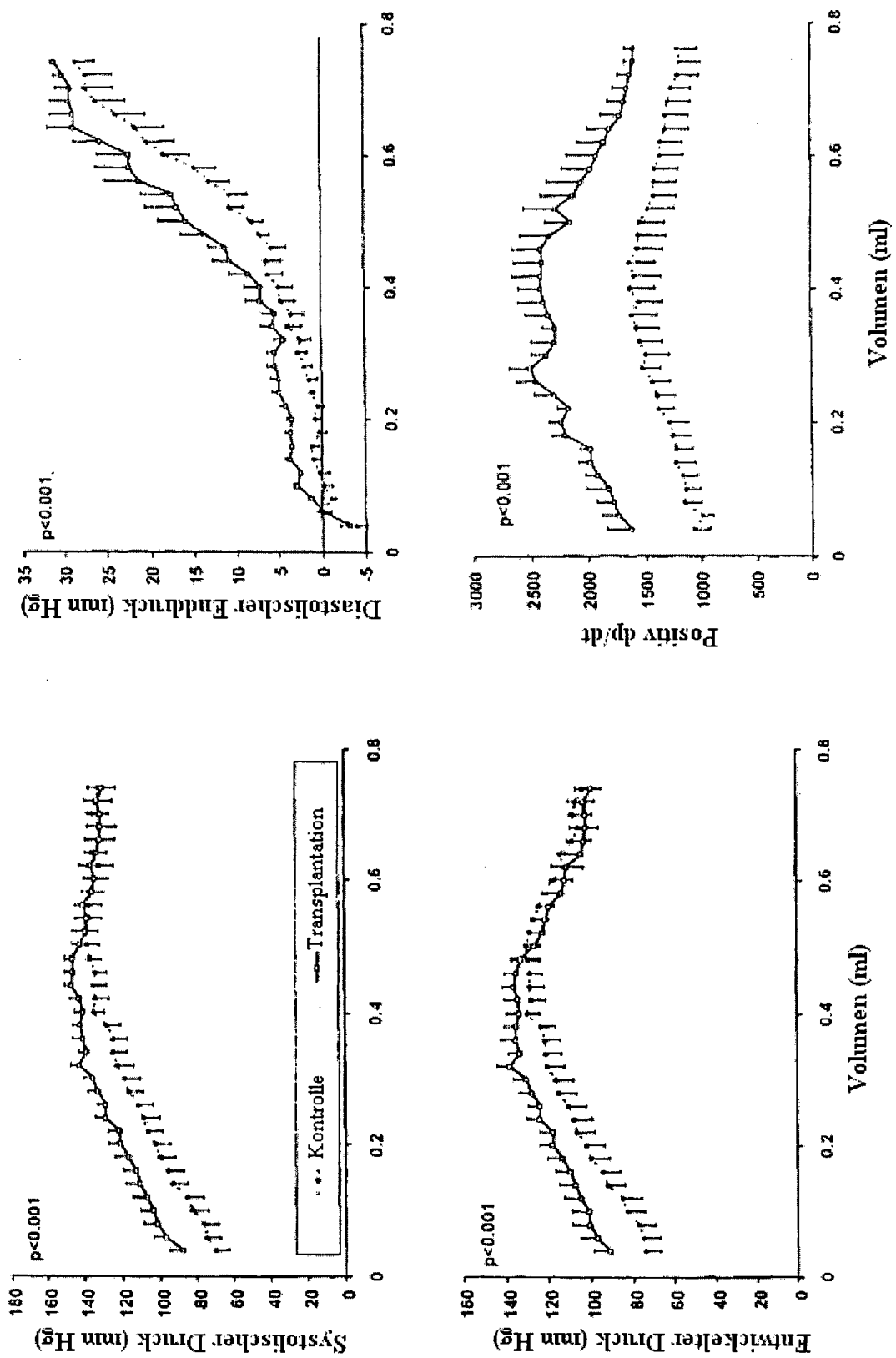
Figur 11



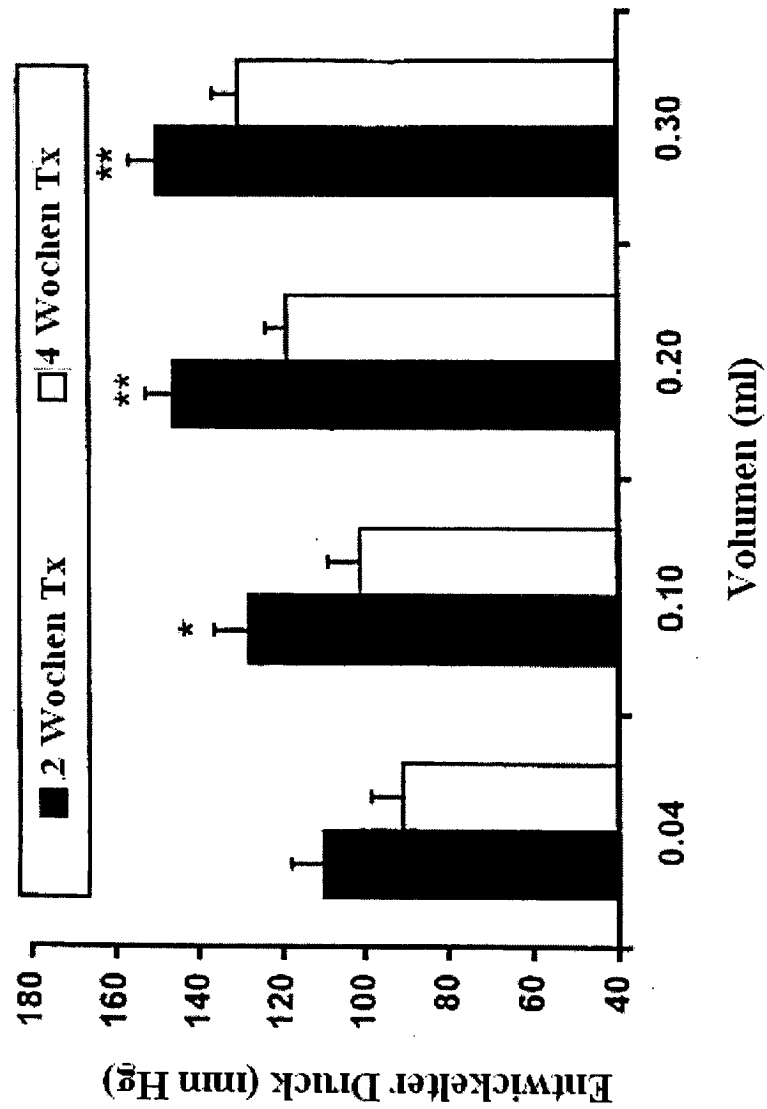
Figur 12



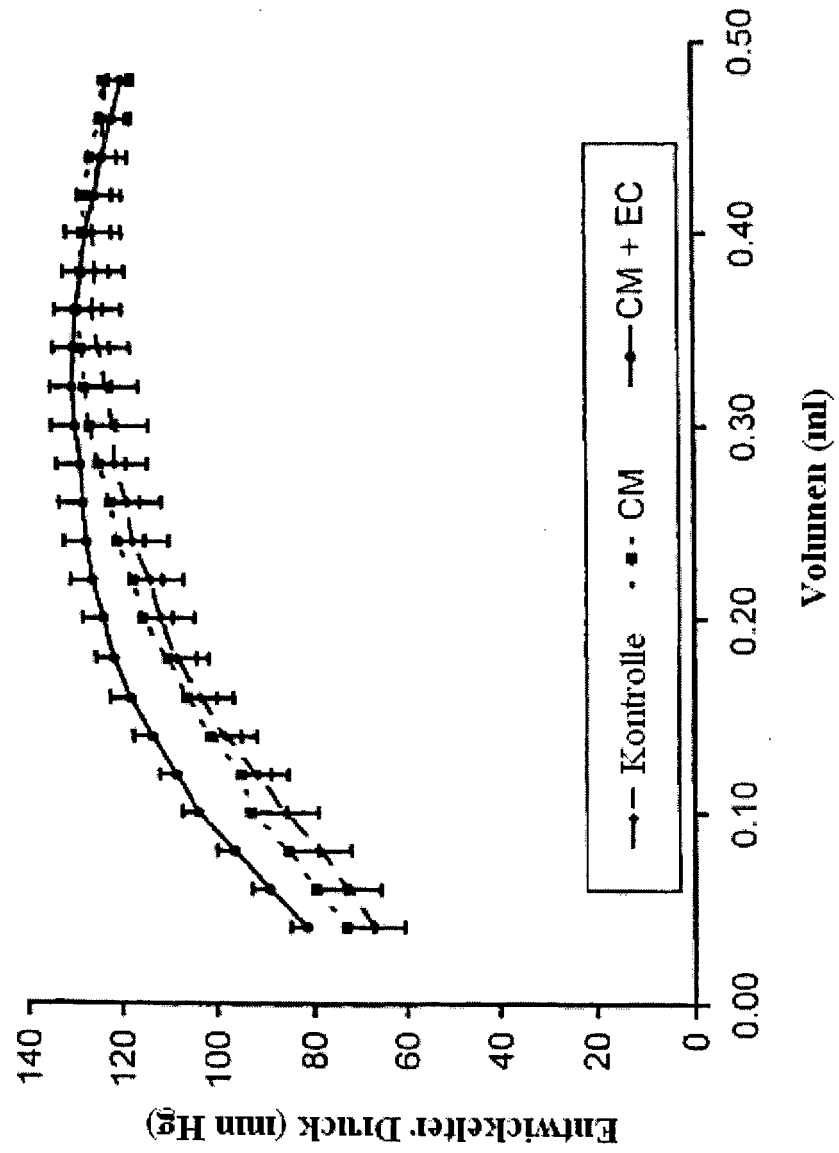
Figur 13



Figur 14



Figur 15



Figur 16