

Aus dem Zentrum Physiologie und Pathophysiologie der Universität zu Köln
Institut für Neurophysiologie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h. c. J. Hescheler

**Verkapselung von Zellen in
Poly(N-Isopropylacrylamid)
zur skalierbaren Generierung von Mikrogeweben**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Philipp Alexander Jahn
aus Troisdorf

promoviert am 08.05.2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2023

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Professor Dr. rer. medic. K. P. Pfannkuche
2. Gutachter: Professor Dr. rer. nat. G. F. Sengle
3. Gutachter: Professor Dr. med. R. Wakili

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Herr Priv.-Doz. Dr. Pfannkuche

Herr Dr. Hamad

Herr Dr. Peinkofer

Frau Karger

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Das verwendete Polymer wurde in der Arbeitsgruppe unter Leitung von Frau Prof. Dr. Schmidt von Frau Dr. Pieroth und Herrn Lu hergestellt. Die beschriebenen elektrophysiologischen Untersuchungen wurden von Herrn Dr. Peinkofer vorgenommen und ausgewertet. Die dreidimensionale Oberflächenrekonstruktion am konfokalen Mikroskop wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Jüngst durchgeführt, die elektronenmikroskopische Darstellung von Herrn Dr. Nitsche. Frau Karger führte die Versuche zur Verkapselung mit verschiedenen Polymerkonzentrationen und Flussraten sowie die Versuche zum Verbleib des Polymers in den Zellaggregaten durch und wertete diese aus.

Die verbleibenden, in dieser Arbeit angegebenen Experimente und Auswertungen sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Priv.-Doz. Dr. Pfannkuche, Herrn Dr. Hamad und Herrn Dr. Sahito von mir selbst durchgeführt worden.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 05.07.2023

Unterschrift:.....

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Hescheler, Leiter des Instituts für Physiologie und Pathophysiologie der Universität zu Köln, bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit im Institut für Neurophysiologie durchzuführen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Kurt Pfannkuche danke ich besonders für die Themenstellung, die hervorragende Betreuung und seine ständige Hilfsbereitschaft. Seine Ideengebung war stets eine Bereicherung und unsere Diskussionen immer ein erfreulicher und angenehmer Austausch.

Mein Dank gebührt des Weiteren Frau Prof. Dr. Annette Schmidt und ihrer Arbeitsgruppe für die Herstellung des Polymers und die Hilfestellungen zu seiner optimalen Anwendung.

Dem Team der wissenschaftlichen Werkstatt der Universität zu Köln danke ich für die technische Beratung und die Anfertigung vieler hochwertiger Bauteile.

Besonderer Dank gebührt auch der gesamten Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, viele wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meiner Verlobten und meiner Familie möchte ich mich besonders herzlich bedanken für die uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung während des gesamten Studiums und im Konkreten für die vielseitige Hilfe während der Durchführung dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abkürzungsverzeichnis | 6 |
| 1. Zusammenfassung | 7 |
| 2. Einleitung | 8 |
| 2.1. Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz | 8 |
| 2.2. Therapie der Herzinsuffizienz | 9 |
| 2.3. Stammzellbasiertes kardiales Tissue Engineering | 10 |
| 2.4. Polymere im kardialen Tissue Engineering | 13 |
| 2.5. Poly(N-Isopropylacrylamid) | 13 |
| 2.6. Mikrofluidiksegmenttechnik | 14 |
| 2.7. Zielsetzung | 15 |
| 3. Publikation | 16 |
| 4. Diskussion | 37 |
| 4.1. Fazit | 43 |
| 5. Literaturverzeichnis | 44 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|--|
| 3D | dreidimensional |
| APs | Aktionspotenziale |
| CMs | Kardiomyozyten |
| hESCs | humane embryonale Stammzellen |
| HF | Herzinsuffizienz |
| HFrEF | Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion |
| HGF | hepatocyte growth factor |
| hiPSCs | humane induziert-pluripotente Stammzellen |
| hPSCs | humane pluripotente Stammzellen |
| ICD | International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems |
| iPSCs | induziert-pluripotente Stammzellen |
| KHK | koronare Herzkrankheit |
| LCST | lower critical solution temperature |
| MHC | Haupthistokompatibilitätskomplex |
| MSCs | mesenchymale Stammzellen |
| MTs | micro tissues |
| NYHA | New York Heart Association |
| PEG | Polyethylenglycol |
| PNIPAAm | Poly(N-Isopropylacrylamid) |
| VEGF | vascular endothelial growth factor |

1. Zusammenfassung

Multizelluläre Mikrogewebe in Form von unregelmäßig geformten oder kugelförmigen Clustern können Zell-Zell-Interaktionen abbilden und gewinnen in verschiedenen Bereichen, darunter auch in der Herz-Kreislauf-Forschung, zunehmend an Bedeutung. Kardiale Mikrogewebe entwickeln sich zu hervorragenden Modellsystemen für die Arzneimittelprüfung *in vitro* („organ-on-a-chip“), werden als Gewebebausteine in 3D-Druckverfahren verwendet und ebnen den Weg für verbesserte Zellersatztherapien *in vivo*. Mikrogewebe werden zum Beispiel im hängenden Tropfen oder speziellen Mikrotiterplatten kultiviert. Wirklich skalierbare Methoden zur Herstellung von Mikrogeweben sind bisher nicht verfügbar.

In dieser Studie wird eine neue Methode zur Verkapselung von Zellen in Sphäroiden aus Poly(N-Isopropylacrylamid) (PNIPAAm) vorgestellt. PNIPAAm fällt oberhalb seiner unteren kritischen Lösetemperatur (LCST) zu einem wasserunlöslichen, physikalisch verknüpften Gel aus und schrumpft durch den Ausstoß von Wasser. Aus murinen induziert pluripotenten Stammzellen gewonnene Kardiomyozyten und aus murinem Knochenmark gewonnene mesenchymale Stammzellen wurden in einem Mikrofluidiksystem in PNIPAAm verkapselt. Indem die Temperatur über die LCST von 32°C erhöht wurde, wurden die Zellen in einem kollabierenden Polymernetzwerk eingeschlossen und die Zelldichte in den Polymerkapseln um den Faktor 2,7 erhöht. Innerhalb von 24 Stunden wuchsen die Zellen zunächst zu stabilen Herzmikrogeweben zusammen. Durch Auswaschen des PNIPAAm bei Temperaturen unterhalb der LCST konnten sie aus ihrer Polymerhülle gelöst werden. Diese rhythmisch kontrahierenden Mikrogewebe zeigten eine homogene Zellverteilung, eine altersgerechte Sarkomerorganisation und eine spontane Erzeugung von Aktionspotenzialen.

Der neuartige Ansatz ist für die Bildung vitaler Mikrogewebe homogener Eigenschaften geeignet. Außerdem können verschiedene Zelltypen durch das Polymer in ein Gewebe zusammengeführt werden. Das ermöglicht eine Steigerung der Vielfalt der modellierbaren Gewebe. In Zukunft kann die entwickelte Technik in skalierbare Arbeitsabläufe integriert werden.

2. Einleitung

2.1. Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz

Weltweit gilt die koronare Herzkrankheit (KHK) seit vielen Jahren als eine der führenden Todesursachen. Des Weiteren führt sie zu einem großen Verlust von Lebensqualität. Dabei umfasst die Definition der KHK sowohl das akute Ereignis eines Myokardinfarkts als auch die chronische Minderperfusion des Myokards. Diese kann sich in Form eines chronischen Koronarsyndroms zeigen oder auch einen asymptomatischen Verlauf nehmen.¹

Auch in Deutschland ist die KHK ein weitverbreitetes Krankheitsbild. So lag 2013 die Lebenszeitprävalenz der KHK in der Altersgruppe von 40 bis 79 Jahren bei 9,3%.²

Die Kurzzeitmortalität nach einem Myokardinfarkt in entwickelten Ländern nahm über die letzten Jahrzehnte ab³⁻⁶. Es ist jedoch weiterhin häufig, dass sich als Folge des akuten Myokardinfarkts eine Herzinsuffizienz (englisch „heart failure“, HF) entwickelt. Dabei beschreibt die Herzinsuffizienz den Umstand, dass das Herz kein ausreichendes Herzzeitvolumen generiert, um das Körpergewebe mit einer ausreichenden Menge von Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen.⁷

In Dänemark konnte im Zeitraum von 2000 bis 2009 sogar eine Zunahme der ambulant diagnostizierten Herzinsuffizienzfälle nach einem stationären Aufenthalt wegen eines Myokardinfarkts gezeigt werden⁸. Im Vereinigten Königreich war eine solche Herzinsuffizienz in 80 bis 90% der Fälle über den stationären Aufenthalt hinaus dauerhaft⁹.

Ursächlich für die Entstehung einer Herzinsuffizienz nach einem überlebtem Myokardinfarkt ist zunächst der Gewebsuntergang im infarzierten Gebiet¹⁰. Da das Herz eine vernachlässigbar geringe Regenerationsfähigkeit hat¹¹, folgt auf den Gewebsuntergang ein fibrotischer Umbau der Infarktregion¹². Das führt zu einem erhöhtem transmuralen Druck in gesunden Gebieten des Myokards¹⁰. Des Weiteren ändert sich das parakrine¹³ und hormonelle¹⁴ Gleichgewicht. In der Konsequenz kann es zur Ventrikeldilatation, Ventrikelhypertrophie und Herzrhythmusstörungen kommen. All diese Faktoren münden ins klinische Bild der Herzinsuffizienz mit Dyspnoe, Ödemen und Fatigue.¹⁵

Deutschlandweit war die Herzinsuffizienz (ICD-Code I50) 2021 die im Rahmen stationärer Aufnahmen am häufigsten gestellte Hauptdiagnose¹⁶. Die jährlichen Gesundheitskosten von HF-Patient:innen sind gegenüber der Grundgesamtheit dreifach erhöht¹⁷, sodass die hohe Prävalenz der Herzinsuffizienz auch eine nennenswerte volkswirtschaftliche Bedeutung hat.

Für die einzelnen Patient:innen bedeutet die Diagnose einer Herzinsuffizienz eine schlechte Prognose. Das 5-Jahres-Überleben von über 65-jährigen US-Amerikaner:innen nach stationärem Aufenthalt wegen einer Herzinsuffizienz lag 2017 unter 25%¹⁸.

2.2. Therapie der Herzinsuffizienz

Bisher gibt es neben der Herztransplantation keine kurative Therapie der Herzinsuffizienz. Weltweit gibt es jedoch eine wesentliche Diskrepanz zwischen der Notwendigkeit von Transplantationen und der Zahl verfügbarer Spenderorgane. Allein in Europa standen Ende des Jahres 2022 1044 Menschen auf der Warteliste für ein Spenderherz¹⁹.

Daher stellt die leitliniengerechte Pharmakotherapie der Herzinsuffizienz in allen NYHA-Stadien den Standard dar. Bei reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF) umfasst sie demnach vor allem Inhibitoren des *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE-Hemmer), Inhibitoren des *Sodium Glucose co-Transporters 2* (SGLT2-Hemmer) sowie β -Adrenorezeptorantagonisten und Aldosteronrezeptorantagonisten. Ergänzt wird die pharmakologische Therapie gegebenenfalls durch die Implantation eines Devices zur kardialen Resynchronisationstherapie. In der Behandlung der Herzinsuffizienz im NYHA-Stadium IV können unter Umständen Systeme der mechanischen Kreislaufunterstützung wie Left Ventricular Assist Devices als Bridging-Therapie bis zur Transplantation oder als Destination-Therapie bis zum Tod notwendig werden.²⁰

Die stadienadaptierte medikamentöse Therapie der Herzinsuffizienz führt zu einer Prognoseverbesserung²¹⁻²³. Insgesamt bleibt jedoch sowohl die Lebensqualität^{24,25} als auch die Lebenserwartung^{18,26} von HF-Patienten eingeschränkt.

In den vergangenen Jahrzehnten wurden daher viele verschiedene Ansätze zur Entwicklung einer kurativen HF-Therapie verfolgt. Unter den wichtigsten Strategien finden sich Xenotransplantationen, Gentherapien und stammzellbasierte Therapien:

Seit den 1960er-Jahren werden bereits tierische Herzklappen zur Therapie von hochgradigen Vitien transplantiert²⁷. Inspiriert von diesen Erfolgen und konfrontiert mit dem Mangel an menschlichen Spenderorganen, wird in präklinischen Studien schon lange die Möglichkeit der Transplantation artfremder Organe im Ganzen untersucht^{28,29}. Im Fokus dieser Untersuchungen stehen vor allem anatomische, physiologische und genetische Unterschiede zwischen Menschen und anderen Arten, die eine Xenotransplantation zu einem chirurgisch und immunologisch komplizierten Unterfangen machen. Auch ethische Implikationen sind Gegenstand anhaltender Debatten³⁰⁻³². Aus anatomischen und physiologischen Gründen scheinen sich Schweineherzen besonders gut für eine Transplantation zu eignen³³.

Anfang 2022 gelang es erstmals, einen Patienten durch eine Herz-Xenotransplantation zwei

Monate am Leben zu halten. Mit Hilfe genetischer Manipulation des Schweins und unter einer neuartigen immunsuppressiven Therapie konnte eine akute Abstoßungsreaktion bei diesem Patienten mit terminaler HF unterdrückt werden.³⁴

Eine andere Strategie der HF-Therapie ist die Gentherapie. Im Rahmen einer Gentherapie soll mit Hilfe eines Vektors ein therapeutisches Gen in das geschädigte Organ eingebracht werden.

Die Gentherapie ist für einige Krankheiten wie beispielsweise die spinale Muskelatrophie³⁵, irresektable maligne Melanome³⁶ oder die periphere arterielle Verschlusskrankheit mit kritischer Extremitätenischämie³⁷ in verschiedenen Ländern bereits eine zugelassene Behandlungsoption.

Währenddessen befindet sich die Gentherapie zur Behandlung der HF noch in der klinischen Erprobung. Mit Hilfe einer kardialen Gentherapie sollen vor allem schädliche Veränderungen im Rahmen des postinfarziellen Remodelings korrigiert werden. Daher wurden in den vergangenen Jahrzehnten insbesondere die Calcium-Homöostase^{38,39} und die Angiogenese⁴⁰ als vielversprechende Ziele der HF-Gentherapie identifiziert und untersucht. Die Ergebnisse zum Effekt einer Gentherapie variierten zwischen den Studien deutlich. Diese Diskrepanzen sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass in den Studien nicht nur unterschiedliche Gene modifiziert wurden, sondern auch verschiedene Vektoren wie Plasmide⁴¹ oder Adeno-assoziierte-Viren³⁸ sowie unterschiedliche Applikationsformen (intrakoronare³⁸ oder endomyokardiale⁴¹ Injektionen) verwendet wurden.

Auch stammzellbasierte Ansätze der HF-Therapie werden⁴² und wurden⁴³⁻⁴⁵ bereits klinisch getestet und werden im Folgenden beschrieben.

2.3. Stammzellbasiertes kardiales Tissue Engineering

Seit den 1990er-Jahren gibt es Bestrebungen, die mangelnde Regenerationsfähigkeit des Myokards durch das Einbringen neuer Zellen zu kompensieren und so eine Herzinsuffizienz zu verhindern. Die sogenannte Zelltherapie zielt darauf ab, vereinzelte Zellen in das infarktgeschädigte Herz zu injizieren. Eine andere Strategie versucht, künstliches Herzgewebe zur Transplantation herzustellen.

Diese zweite Strategie wird auch als kardiales Tissue Engineering bezeichnet⁴⁶. Im Rahmen des kardialen Tissue Engineerings gibt es Ansätze, vitales und kontraktiles Herzgewebe *in vitro* herzustellen. Dabei ist grundsätzlich zu unterscheiden zwischen der Produktion von mikroskopischen und makroskopischen Gewebestücken. Während makroskopisches Gewebe beispielsweise zum Übernähen von Infarktdefekten genutzt werden kann, wird mikroskopisches Gewebe (englisch „Micro Tissues“, MTs) zumeist injiziert.

Weitere Ansätze im Tissue Engineering verfolgen unter anderem die Entwicklung von künstlichen Herzen auf der Basis von dezellularisierten Organen⁴⁷ oder die Entwicklung von biologischen Herzunterstützungssystemen⁴⁸. Tissue Engineering *in situ* beschäftigt sich vor allem mit der Möglichkeit, die biologische Nische durch die Injektion biomimetischer Gerüste^{49,50} zu manipulieren.

Erhebliche Fortschritte, sowohl in der Zelltherapie als auch im Tissue Engineering, wurden mit der Entdeckung von humanen embryonalen (hESCs)⁵¹ und induziert-pluripotenten Stammzellen (hiPSCs)⁵² möglich. Diese Stammzellen können als Quelle humaner Kardiomyozyten genutzt werden.

Die Differenzierung von Kardiomyozyten (CMs) aus hiPSCs gelingt heute mit großer Reinheit in einem großen Maßstab⁵³. hiPSCs bieten als Ausgangsmaterial für die Differenzierung außerdem den Vorteil, dass sie perspektivisch aus somatischen Zellen von Patient:innen oder Proband:innen gewonnen werden könnten. So wäre es nicht notwendig, menschliche Embryonen für die HF-Therapie zu opfern. Des Weiteren ist zu erwarten, dass die Immunantwort auf autolog transplantierte oder nach Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) homozygote, dem Empfänger-MHC-Typ entsprechende, Zellen oder MTs geringer ausfällt als ohne entsprechendes Matching⁵⁴.

Werden aus iPSCs differenzierte Kardiomyozyten (iPSC-CMs) als Einzelzellsuspension ins Myokard injiziert, wachsen diese nach der Injektion nur schlecht am nativen Gewebe an⁵⁵. Obwohl das Problem der geringen Zellretention nach der Injektion einzelner Zellen bis heute ungelöst ist, zeigen präklinische Studien einen positiven Effekt injizierter ESC- oder iPSC-CMs auf infarzierte Herzen⁵⁶⁻⁵⁸.

Um das Anwachsen transplantierte CMs zu verbessern und ihre Überlebensrate zu erhöhen, werden aktuell diverse Ansätze verfolgt.

Darunter findet sich beispielsweise die Kotransplantation weiterer Zelltypen wie Fibroblasten⁵⁹ oder mesenchymale Stammzellen (MSCs)^{60,61}. Daneben gibt es Versuche, mit kardialen MTs auch Strukturen wie Mikrogefäße⁶² zu transplantieren. Auch das unterstützende Einbringen magnetischer⁶³ oder organischer⁶⁴ Mikropartikel wird erforscht.

Werden mesenchymale Stammzellen mit CMs in geschädigtes Myokard injiziert, beeinflussen sie die mechanische und elektrische Integration von CMs positiv⁶⁵. Im Rattenmodell lässt sich neben einem verbesserten Anwachsen der CMs auch eine gegenüber einer reinen CM-Injektion gesteigerte linksventrikuläre Ejektionsfraktion und Kontraktilität nachweisen⁶⁰. Die Immunantwort auf transplantierte Zellen in einem murinen Modell fällt bei Kotransplantation von CMs und MSCs ebenfalls geringer aus⁶¹.

Als Ursache für diese positiven Synergien werden vor allem parakrine Effekte beschrieben: MSCs sezernieren unter anderem *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *hepatocyte growth factor* (HGF) und verstärken so die Angiogenese⁶⁶. Daneben sind auch über Metalloproteinasen vermittelte antifibrotische^{67,68} Wirkungen beschrieben. Von MSCs parakrin sezernierte Faktoren wirken unter hypoxischen Bedingungen immunmodulatorisch⁶⁹, zytoprotektiv⁷⁰ sowie antiapoptotisch⁷¹.

Es gibt Hinweise darauf, dass sich die unterstützenden Effekte von MSCs verstärken, wenn Cluster aus CMs und MSCs anstelle einzelner Zellen injiziert werden:

In einem murinen Modell konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Injektion von zweidimensionalen Zellclustern aus CMs und MSCs die Zahl der nach 24 Stunden im Herzen verbliebener Zellen gegenüber der Injektion einer Einzelzellsuspension verzehnfacht⁷². Monsanto et al. generierten dreidimensionale Zellcluster aus MSCs sowie kardialen und endothelialen Progenitorzellen. Im murinen Modell verblieben diese über einen Zeitraum von 24 Wochen nicht nur in großen Teilen an der Injektionsstelle, sondern verbesserten auch Marker der Herzinsuffizienz. So verringerte sich beispielsweise die Größe der Narbenfläche, während die linksventrikuläre Ejektionsfraktion stieg.⁷³

Kardiale MTs stellen auch abseits von *in vivo*-Versuchen ein aktuelles Forschungsthema dar: Dreidimensionale (3D-) Zellcluster können als Modelle zur Untersuchung neuer Pharmakotherapien *in vitro* dienen. Des Weiteren werden MTs als Ausgangsmaterial für neue dreidimensionale Druckverfahren untersucht^{74,75}.

Bisher werden vor allem zwei Methoden für die Kultur dreidimensionaler Zellcluster genutzt: Die Kultur in sogenannten hängenden Tropfen (englisch „hanging drops“)⁷⁶ und die Kultur in spitz zulaufenden Vertiefungen (sogenannten V-Boden-Platten)⁷⁷. Beide Methoden ermöglichen eine gute Steuerung der Zellzahl und Zusammensetzung der resultierenden MTs⁷⁶⁻⁷⁸.

Bisher gibt es jedoch kein geeignetes Verfahren, um kardiale MTs auf skalierbare Weise herzustellen. Die Möglichkeit, Zellcluster einer definierten Größe und Zusammensetzung in großem Maßstab herstellen zu können, scheint für die Entwicklung und klinische Testung stammzellbasierter Therapien trotzdem unabdingbar. So wären zum Beispiel schätzungsweise 10^9 bis 10^{10} Zellen für eine experimentelle Therapie des infarzierten Schweineherzens als klinisch relevantes Großtiermodell nötig.

2.4. Polymere im kardialen Tissue Engineering

Die Kultur von Zellen in einer 3D-Matrix bietet Vorteile: Im nativen Herzgewebe sind die Zellen des Myokards spezifischen mechanischen Reizen ausgesetzt. Diese resultieren zum einen aus den dynamischen Veränderungen im Rahmen der Pumpfunktion des Herzens und zum anderen aus dem dreidimensionalen Gefüge benachbarter Zellen und extrazellulärer Matrix⁷⁹. Diese Reize können in 3D-Zellkulturen zumindest teilweise abgebildet werden. Dafür können Zellen in ein bestehendes Gerüst (englisch „scaffold“)^{80,81} eingebracht oder in einem Hydrogel verkapselt und kultiviert⁸² werden.

Die Verkapselung von Zellen ist eine Möglichkeit, das Problem der Skalierbarkeit in der MT-Kultur zu adressieren. So kann eine definierte Zellzahl verkapselt und zu einem späteren Zeitpunkt wieder freigesetzt werden. Bei geeigneter Auswahl des Materials zur Verkapselung können die Zellen in der Hydrogelkapsel auch proliferieren und ein dreidimensionales MT formen.

Unter den bisher verwendeten Matrizen für die 3D-Zellkultur finden sich natürliche Polymere wie beispielsweise Kollagen, Gelatine, Hyaluronsäure oder Alginat⁸³. Da diese natürlichen Materialien jedoch Immunreaktionen hervorrufen können⁸⁴ und je nach Quelle variierende Eigenschaften zeigen⁸⁵, werden auch synthetische Polymere als Matrizen in Betracht gezogen. Diese lassen sich zusätzlich chemisch modifizieren, sodass gezielt bestimmte Eigenschaften erzeugt werden können. Einige Beispiele für bisher im Tissue Engineering verwendete synthetische Polymere sind Polylactid-co-Glycolid, Polyethylenglycol (PEG) und Poly(N-Isopropylacrylamid)⁸⁶. Durch chemische Modifikation und Herstellung von Copolymeren verschiedener Ausgangsstoffe können die Eigenschaften der Polymere an die Erfordernisse der Zellkultur angepasst werden.

Bisher ist es nicht möglich, kardiale MTs verschiedener Zelltypen durch Zellverkapselung in einem skalierbaren Maßstab zu generieren.

Alginat hat sich beispielsweise als geeignet erwiesen, um präformiertem kardialen Gewebe eine passende Mikroumgebung zu bieten. Wurden jedoch Einzelzellen (CMs, MSCs und endotheliale Zellen) verkapselt, konnten keine MTs *de novo* generiert werden.⁸⁷

2.5. Poly(N-Isopropylacrylamid)

Poly(N-Isopropylacrylamid) (PNIPAAm) gehört zu den sogenannten „smarten“ oder „intelligenten“ Polymeren. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie auf physikalische Reize hin ihre Eigenschaften verändern.

PNIPAAm ist ein thermoresponsives, makromolekulares Polymer. Unterhalb seiner *lower critical solution temperature* (LCST) von 32°C sind die hydrophoben Isopropylgruppen der Polymerketten von einer Hydrathülle umgeben. So kann das Polymer bei Raumtemperatur in Wasser gelöst werden.

Bei Erwärmung über 32°C brechen die Wasserstoffbrückenbindungen der Hydrathüllen auf und die hydrophoben Anteile der Polymerketten lagern sich zusammen. Dadurch wird das Wasser der Lösung in großen Teilen verdrängt und das Polymer schlägt sich als intransparentes Hydrogel nieder.⁸⁸

Die sogenannte „coil-globule transition“ des Polymers beruht also auf intermolekularen Wechselwirkungen. Da diese vollkommen reversibel sind, kann das Hydrogel durch Abkühlen unter die LCST wieder in eine wässrige Lösung der Polymerketten überführt werden.

In vitro wurden bei der Kultur humaner Karzinomzellen keine zytotoxischen Effekte durch PNIPAAm beschrieben^{89,90}. In Vorversuchen zu dieser Arbeit zeigte sich auch in der Kultur muriner MSCs keine Zytotoxizität des Polymers.

In einem Rattenmodell zeigte sich nach der Injektion eines PNIPAAm-basierten Polymers zwar eine lokale Entzündungsreaktion, die jedoch kurzfristig abklang⁹¹.

Da seine LCST nahe an der menschlichen Körpertemperatur liegt, ist PNIPAAm eines der am besten erforschten thermoresponsiven Polymere⁹². Es haben sich bereits viele biomedizinische Anwendungsbereiche ergeben. So wird es beispielsweise in medizintechnischen Anlagen als Thermosensor^{93,94} verwendet und als Bestandteil von Drug Delivery-Systemen⁹⁵⁻⁹⁷ erprobt.

Auch in der Zellkultur wird PNIPAAm verwendet. Mit UpCell[®] existieren bereits kommerzielle PNIPAAm-beschichtete Kulturschalen. Diese erlauben eine enzymfreie Zellernte und vermeiden auf diesem Weg proteolytische Zellschäden.

Zuletzt zeigten Ekerdt et al. eine PNIPAAm-basierte 3D-Zellkulturplattform für humane pluripotente Stammzellen (hPSCs). In einem Copolymer aus PNIPAAm und Hyaluronat konnten hPSCs überleben und proliferieren. Über die Dauer der Kultur im Copolymer behielten sie ihre Pluripotenz und konnten als Aggregate zusammenwachsen.⁹⁸

2.6. Mikrofluidiksegmenttechnik

Um in ihrer Form und Größe kontrollierbare Polymerpartikel herzustellen bedient sich die physikalische Chemie des Prinzips der Mikrofluidiksegmenttechnik⁹⁹.

Dieses Prinzip basiert auf dem Zusammenfließen zweier nicht mischbarer Phasen. In einem flussfokussierenden Chip fließen die meist hydrophobe Trägerphase und die entsprechend

wässrige Dispersionsphase in einen gemeinsamen Kanal zusammen. Dabei wird der Strom der wässrigen Phase in regelmäßigen Abständen unterbrochen. Auf diese Weise entsteht eine Dispersion gleichmäßig großer Tropfen der wässrigen Phase, getrennt durch Abschnitte der hydrophoben Trägerflüssigkeit.

Die Größe der Tropfen wird dabei maßgeblich von drei Faktoren beeinflusst:

- Eigenschaften der beiden Phasen: Entscheidend sind hier die Viskosität und die Dichte der Flüssigkeiten sowie die resultierende Grenzflächenspannung.¹⁰⁰
- Verhältnis zwischen den Flussgeschwindigkeiten der beiden Phasen¹⁰⁰
- Geometrie des Chips: Wenn in einem Chip die Ströme der Flüssigkeiten in einen gemeinsamen Kanal fokussiert werden, sind vor allem die Maße der zuführenden Kanäle sowie des abführenden Kanals relevant.¹⁰¹

Dabei darf die absolute Flussgeschwindigkeit der wässrigen Phase nicht zu hoch liegen, um die Bildung von Flüssigkeits-Jets bei hohen Geschwindigkeiten zu vermeiden.

Mit der Mikrofluidiksegmenttechnik lassen sich uniforme Tropfen eines Polymers herstellen. In diesen Polymertropfen können Zellen verkapselt werden. Da die entstehenden Tropfen getrennt vorliegen, kann jeder einzelne als eine eigene Reaktionskammer betrachtet werden. So können zellbeladene Polymere leicht analysiert werden. In der Literatur sind bereits entsprechende Untersuchungen beschrieben. Darunter finden sich Medikamententests an einzelnen verkapselten Zellen¹⁰² oder die Messung von Zellatmungsraten¹⁰³. Werden die Zellen in Polymeren mit definierten rheologischen Eigenschaften verkapselt und diese mit Zytokinen versetzt, lassen sich auch komplexe Mikroumgebungen simulieren¹⁰⁴.

Mithilfe der Mikrofluidiksegmenttechnik lassen sich in kurzer Zeit viele zellbeladenen Tropfen mit homogenen Eigenschaften herstellen. So können beispielsweise sehr ähnliche Zellpopulationen ohne großen Aufwand unter verschiedenen Kulturbedingungen beobachtet werden. Dies ermöglicht eine deutliche Effizienzsteigerung der beschriebenen Analysen.

2.7. Zielsetzung

In dieser Arbeit soll eine Methode zur reproduzierbaren und skalierbaren Herstellung von dreidimensionalen kardialen Mikrogeweben etabliert werden.

Biofabrication



PAPER

OPEN ACCESS

RECEIVED
27 July 2021

REVISED
5 March 2022

ACCEPTED FOR PUBLICATION
26 May 2022

PUBLISHED
10 June 2022

Original content from this work may be used under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 licence](#).

Any further distribution of this work must maintain attribution to the author(s) and the title of the work, journal citation and DOI.



Engineering of cardiac microtissues by microfluidic cell encapsulation in thermoshrinking non-crosslinked PNIPAAm gels

Philipp Jahn¹, Rebecca Katharina Karger¹, Shahab Soso Khalaf¹, Sarkawt Hamad^{1,2}, Gabriel Peinkofer¹, Raja Ghazanfar Ali Sahito¹, Stephanie Pieroth³, Frank Nitsche¹, Junqi Lu³, Daniel Derichsweiler¹, Konrad Brockmeier⁵, Jürgen Hescheler¹, Annette M Schmidt^{3,*} and Kurt Pfannkuche^{1,5,6,7,*}

¹ Center for Physiology and Pathophysiology, Institute for Neurophysiology, University of Cologne, Medical Faculty, Cologne, Germany

² Biology Department, Faculty of Science, Soran University, Soran, Kurdistan Region, Iraq

³ Department of Chemistry, Physical Chemistry, University of Cologne, Cologne, Germany

⁴ Cologne Biocenter, Institute of Zoology, General Ecology, University of Cologne, Cologne, Germany

⁵ Department of Pediatric Cardiology, University Hospital of Cologne, Cologne, Germany

⁶ Marga-and-Walter-Boll Laboratory for Cardiac Tissue Engineering, University of Cologne, Cologne, Germany

⁷ Center for Molecular Medicine Cologne (CMMC), University of Cologne, Cologne, Germany

* Authors to whom any correspondence should be addressed.

E-mail: annette.schmidt@uni-koeln.de and Kurt.Pfannkuche@uni-koeln.de

Keywords: microfluidic, microtissue, organoid, cardiac tissue engineering

Supplementary material for this article is available [online](#)

Abstract

Multicellular agglomerates in form of irregularly shaped or spherical clusters can recapitulate cell–cell interactions and are referred to as microtissues. Microtissues gain increasing attention in several fields including cardiovascular research. Cardiac microtissues are evolving as excellent model systems for drug testing *in vitro* (organ-on-a-chip), are used as tissue bricks in 3D printing processes and pave the way for improved cell replacement therapies *in vivo*. Microtissues are formed for example in hanging drop culture or specialized microwell plates; truly scalable methods are not yet available. In this study, a novel method of encapsulation of cells in *poly-N-isopropylacrylamid* (PNIPAAm) spheres is introduced. Murine induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes and bone marrow-derived mesenchymal stem cells were encapsulated in PNIPAAm by raising the temperature of droplets formed in a microfluidics setup above the lower critical solute temperature (LCST) of 32 °C. PNIPAAm precipitates to a water-insoluble physically linked gel above the LCST and shrinks by the expulsion of water, thereby trapping the cells in a collapsing polymer network and increasing the cell density by one order of magnitude. Within 24 h, stable cardiac microtissues were first formed and later released from their polymer shell by washout of PNIPAAm at temperatures below the LCST. Rhythmically contracting microtissues showed homogenous cell distribution, age-dependent sarcomere organizations and action potential generation. The novel approach is applicable for microtissue formation from various cell types and can be implemented into scalable workflows.

1. Introduction

Mouse and human pluripotent stem cells (PSCs) serve as model systems to study cell development and a source of organotypic cells for various applications worldwide. Particularly, the discovery of induced pluripotent stem cells (iPSCs) has increased the chance to obtain and use human pluripotent cells from healthy and diseased donors. Scientists work

on refined protocols to generate various organotypic cells from iPSCs. In order to initiate differentiation, PSCs are traditionally cultivated in spheroids called embryoid bodies (EBs) that spontaneously form when PSCs are cultivated in suspension cultures or hanging drop cultures or on non-adhesive cell culture wells [1]. The spontaneous differentiation of PSCs in EBs gives rise to descendants of all three germ layers including cardiomyocytes (CMs). The CMs can be

purified by antibiotic lineage selection approaches to yield pure cells for downstream assays [2].

The spontaneous differentiation approach using EBs has been replaced by 2D differentiation protocols in most applications with human iPSCs [3–6]. The advancing knowledge of differentiation pathways has paved the way for shaping the differentiation process to generate the desired cell types at high efficiencies. The traditional EB approach in combination with growth factor induction was further implemented in 3D bioreactor cultures [7]. In the light of the high quality of 2D differentiation methods, bioreactor-based methods tend to be restricted to applications where massive scales of differentiation are required. These developments have shifted the approach of PSC differentiation from a 3D culture to a 2D based culture in many laboratories.

Although 2D cultures can be used to address uncounted scientific questions the interaction of cells in a 3D environment opens new avenues in many applications. In cardiac cell therapy, it was shown early that single PSC-derived CMs (PSC-CMs) hardly engraft in the diseased murine tissue while the addition of connective tissue cells substantially enhances the cell engraftment *in vitro* and *in vivo* [2, 8, 9]. Based on such findings, we have developed a simple method of generating microtissues from mesenchymal stem cells (MSCs) and murine iPSC-CMs (miPSC-CMs) resulting in >10-fold enhanced early engraftment of PSC-CMs. The idea of generating microtissues for cardiac cell therapy was further explored by Monsanto *et al* demonstrating that a triple combination of c-Kit⁺ cardiac interstitial cells, endothelial progenitors and MSCs, referred to as ‘CardioClusters’, not only engrafts efficiently into the infarcted rodent heart but also helps to restore cardiac function [10]. Another popular application of multi-cellular clusters involving CMs is the establishment of *in vitro* models for screening pharmaceuticals. Recently, a multicellular model of spherical cardiac microtissues, including CMs, endothelial cells and cardiac fibroblasts, was found to successfully recapitulate human arrhythmogenic cardiomyopathy *in vitro* [11]. Finally, the use of cell spheroids is not limited to the establishment of cell therapies *in vivo* or drug screening *in vitro*. Spheroidal microtissues are also utilized as tissue bricks in novel 3D bioprinting approaches to assemble bioartificial tissue from intact microtissues instead of single cells [12, 13] (for a review see [14]).

The above-mentioned applications have in common that microtissues are mainly generated by non-scalable methods. A simple but rather uncontrolled method is the generation of cell patches composed of one or multiple cell types from thermo-responsive polymer surfaces [8]. More defined methods use hanging drop cultures to combine cells in individual drops of cell suspension hanging at the lid of a petri dish for one to two days. During the culture period, cells cluster in the tip of the drop and form spheroids

[15]. An advanced technology based on hanging drops is the ‘cardiac spheroid’ approach described by Polonchuk *et al* [16]. This technology combines the three most abundant cells of the human heart, namely CMs, endothelial cells and cardiac fibroblasts, at exactly defined ratios into functional microtissues [16]. Figtree *et al* applied a similar strategy of generating cardiac microtissues in hanging drops and demonstrated formation of vessel-like structures [17]. Moreover, the vascularized cardiac microtissues responded to inducers of cardiac fibrosis and recapitulated the cardiotoxic effects described for cardiac tissue *in vivo*. These studies underline the significance of cardiac microtissues as model systems to study cardiac physiology and even recapitulate pathophysiological settings *in vitro*.

Another possibility to generate cell spheroids under defined conditions is the use of microwell plates with bottoms shaped like an inverted pyramid to collect the cells at the tip of the well and support their assembly into spherical microtissues [18]. Using hanging drop cultures or suitable microwell plates results in the generation of homogenous cell spheroids with defined cell number and composition.

Microtissues can be produced by combining matrix protein gels and cells: Thavandiran employed collagen I gel as a matrix for the generation of cardiac microtissues that were successfully used as an *in vitro* model for tachycardia related arrhythmia [19]. The use of matrix proteins and casting molds for the generation of bioartificial cardiac tissue is not only applicable in the field of microtissue production, but allows fabrication of engineered cardiac tissue with macroscopic dimensions used for disease modeling *in vitro* and therapeutically applications *in vivo* as well [20, 21]. Such engineered tissues show a high degree of complexity at the cost of limited scalability of the production process. In order to generate vascular microtissues Annamalaia *et al* developed a water in oil emulsion technology to produce fibrin based spheroidal microtissues in a scalable workflow [22].

Hanging drop protocols usually capture 500–1000 cells per 20 μ l drop as the number of cells is limited by the low medium volume of the drop. As an example of downstream application, it is estimated that cardiac cell therapy in a porcine model of cardiac infarction can be successful when using 10^9 – 10^{10} PSC-CMs for intramyocardial injection. To combine the cells into microtissues, 10^6 – 10^7 hanging drops on ten thousand of petri dishes would be required to produce the proper amount of microtissues. Further cells such as endothelial cells and connective tissue cells were not included in the calculation. The scalability of microwell-based methods is comparable low. From this simple example it can be deduced that novel methods need to be evolved to produce microtissues for various applications in 3D printing, drug screening and cell replacement therapy in a scalable fashion.

One such approach of scalable microtissues generation is the coencapsulation of a defined number of cells, and controlled release of the cell preparation at a later stage. Alginate is commonly used as a basis for cell encapsulation and it allows easy, reproducible and reversible encapsulation of various cell types as has been shown in many scientific reports (for a review see [23]). Alginate converts from a solution into a gel by ionic crosslinking with divalent cations such as Ca^{++} and Ba^{++} . The process is reversed by chelating agents such as Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA). The method has been implemented into countless applications in life science, such as encapsulation of pharmaceutically active substances and different types of cells. Chayosumrit *et al* used alginate to encapsulate human PSCs and induced endodermal differentiation [24]. Analysis of the encapsulated cell for more than a week indicates the formation of individual and separated clusters of proliferating stem cells inside the alginate capsules.

Encapsulation of neonatal rat CMs in alginate revealed that pure preparation of CMs were not viable inside the capsules [25]. To solve the problem, alginate was modified with collagen to allow the cells attachment to the capsule material, resulting in the formation of cell islet within three days and dense multilayer clusters within two months [25]. In a recent approach, alginate capsules were used to culture cardiac microtissues *in vitro* [26]. When loaded with preformed cardiac cell spheroids and a suspension of endothelial cells, an increase in metabolic activity of encapsulated cells was observed within 15 days. Loading of the capsules with a combined single-cell suspension of CMs, endothelial cells and MSC did not produce compact microtissues of these three cell types inside the capsules. In conclusion, the alginate encapsulation method is suitable to generate microenvironments for cardiac microtissues. However, alginate encapsulation is not the method of choice to generate cardiac microtissues from cell suspensions *de novo*.

Here we report a method for a microtissue generation that can be implemented into scalable workflows. The thermoresponsive polymer *poly-N-isopropylacrylamid* (PNIPAAm) is used to encapsulate miPSC-CMs and bone-marrow derived MSCs in a microfluidic approach. PNIPAAm is water-soluble below 32 °C and nontoxic. Above a critical temperature of 32 °C, PNIPAAm molecules undergo a coil-to-globule phase transition and become essentially water-insoluble. During the phase transition, the physically entangled PNIPAAm gel shows substantial thermoshrinkage. This shrinkage can be explained by the expulsion of water from hydrophilic groups due to entropic reasons [27]. We speculate that non-crosslinked thermoshrinking PNIPAAm gels entrap cells in a dense network of contracting strings of polymer, thereby fostering the generation of spherical microtissues in a short time. The concept is proven by

the encapsulation of miPSC-CMs and MSCs and subsequent harvesting of functional cardiac microtissues.

2. Material and methods

2.1. PNIPAAm synthesis

The synthesis was carried out at room temperature. In an evacuated, and subsequently, N_2 flooded 250 ml round bottom flask with magnetic stirrer, 150 ml deionized water and 10 g (88 mmol) N-isopropylacrylamide were added. After dissolving the solid monomer while stirring, 120 mg (0.53 mmol) ammonium peroxodisulfate was added. After homogenization, 61.5 mg (0.53 mmol) Tetramethylethylenediamine (TEMED) was added, and the reaction was carried out for 2 h while stirring. After reaction time, the viscosity of the reaction solution was increased, and the product was precipitated in deionized water at 60 °C. The precipitate was vacuum filtered through a Büchner funnel with standard filter paper, washed with 80 °C hot deionized water and freeze-dried for further use.

2.2. PNIPAAm solution

The freeze-dried polymer was weighed and then sterilized by supercritical carbon dioxide in presence of peracetic acid. Freeze-dried PNIPAAm was added to a 100 ml Erlenmeyer flask and the flask was packed into a Tyvek sterilization bag and sealed. For sterilization, a Novagenesis bench top device (Novasterilis, NY) with 1.0 l vessel was used. A sterilizing supplement containing peracetic acid (NovaKill™, Novasterilis, NY) was added according to the manufacturer's instructions. A Tyvek sealed flask with PNIPAAm was placed in the vessel. The vessel was filled with liquid carbon dioxide and a booster pump was used to raise the vessel pressure to 1500 PSI. The temperature was set to 35 °C, and the magnetic stirrer was activated. Sterilization was performed for 90 min. The pressure was released slowly, and remaining traces of NovaKill™ were removed under vacuum. Dulbecco's phosphate buffered solution without calcium and magnesium (DPBS -/-, Gibco) was then added to create a PNIPAAm solution at a concentration of 1.8 wt/vol%. PNIPAAm was left on a magnetic stirrer at 50 rounds per minute (rpm) for 24 h to allow the freeze-dried PNIPAAm to solve.

2.3. Microfluidic setup

A microfluidics chip was generated at the workshop of the medical faculty, University of Cologne. The exact dimensions of the chip are illustrated by the technical drawing in figure 1. The chip was connected to the tubing system via Luer-Lock Connectors (Carl Roth, Karlsruhe, Germany). To create a constant flow at preset rates, two infusion pumps (Landgraf Labor-systeme HLL GmbH, Langenhagen, Germany) were used. Pump 1 was loaded with two 20 ml syringes, both containing rapeseed oil. Rapeseed oil is used

because it is environmentally friendly; furthermore, it easily separates from the aqueous phase due to lower density. From these syringes, fluorinated ethylene propylene (FEP) inflow tubes with an inner diameter of 1.58 mm ran to the Y-shaped side port channels of a flow-focusing microfluidic chip. The exact dimensions of the chip are provided in figure 1(A).

The central channel was connected to a 20 ml syringe mounted on pump 2 and used to inject PNIPAAm solutions or PNIPAAm enriched cell suspension into the microfluidic chip. Homogenous droplets of the PNIPAAm containing solution (water phase) are generated as oil flows into the chip through the side ports. The resulting PNIPAAm containing droplets were transported in a continuous oil flow and enter a tube that is heated to 37 °C by a counter-streaming tube heater (see figure 1 for illustrations). After 40 cm in the heated tube, the gelled PNIPAAm spheroids left the tubing system under a sterile hood heated to 39 °C and were transferred to a 37 °C humidified cell culture incubator with 5% CO₂.

2.4. Sterilization of microfluidics parts

Parts of the microfluidics system were sterilized for 30 min in hydrogen peroxide vapor followed by low-pressure oxygen plasma treatment for 30 min. Briefly, the dry parts of the microfluidic were sealed in Tyvek pouches and brought into the plasma chamber. A -20 °C cold aliquot of 30% H₂O₂ was opened and placed in the chamber. The device was rapidly evacuated to 0.15 mbar and the pump was stopped to allow H₂O₂ to evaporate. After 30 min, the chamber was again evacuated to 0.2 mbar. Oxygen was automatically injected to keep the working pressure at 0.2 mbar. Plasma was ignited and samples were sterilized in plasma for 30 min. The process was performed in a Plasma Flecto 30 (Plasma Technologies, Germany).

2.5. Production of PNIPAAm beads

To produce cell-free polymer beads, the middle inflow tube of the microfluidic setup was connected to a 20 ml syringe containing PNIPAAm solution. This solution was created by mixing the 1.8 wt/vol% solution of PNIPAAm in DPBS -/- and Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) containing 4.5 g glucose l⁻¹ (Thermo Fisher Scientific, Germany) at room temperature (20 °C–22 °C) at 50/50 ratio to obtain a cell suspension containing a final PNIPAAm concentration of 0.9 wt/vol%. The syringes connected to the outer inflow tubes contained rapeseed oil.

The PNIPAAm beads were produced by setting the flow rate of the PNIPAAm solution to 0.025 ml min⁻¹ and the flow rates of the oil to 0.1 ml min⁻¹. The beads were collected in a 10 cm cell culture dish (Sarstedt Laborbedarf, Nümbrecht, Germany) containing rapeseed oil pre-warmed to 39 °C.

The beads were measured with light microscopy and NIS-Elements software (Nikon Europe, Amsterdam, Netherlands). To visualize the beads'

surface, the sample was mounted on a heated stage on an upright light microscope (Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH) equipped with dipping objectives and Orca Flash 4.0 V2 camera (Hamamatsu Photonics Deutschland, Herrsching am Ammersee, Germany). The sample was illuminated from the side by two gooseneck LED lights to allow visualization of the surface.

2.6. Cell culture and generation of miPS cell-derived CMs

Human renal carcinoma cells (cell line 786-O) engineered to express an enhanced green fluorescent protein (eGFP) were used for the initial establishment of the methods. The unmodified cell line was kindly provided by the Clinic II for Internal Medicine, University Hospital of Cologne. The cells were transfected by nucleofection with the eGFP control plasmid (pmaxGFPTM) provided by Lonza (Lonza Group Ltd, Basel, Switzerland) along with the nucleofector kit. Stably transfected green fluorescent cells were enriched by limiting dilution and selection of GFP positive colonies. The cells were cultured in complete DMEM (4.5 g) glucose l⁻¹ with 15% fetal calf serum (FCS) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany). MSCs were prepared as described previously [8] and cultured in complete DMEM containing (1 g) glucose l⁻¹ (Thermo Fisher Scientific) and 15% FCS. For a generation of miPS-CMs, TαP4 [28] cultivated on mitomycin inactivated embryonic feeder cells in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) supplemented with 15% FCS and 1000 units ml⁻¹ leukemia inhibitory factor (ORF Genetics, Reykjavik, Iceland). Start of differentiation was counted as day 0. On day 0 miPSCs were dissociated into single cells by 0.05% trypsin/EDTA (Gibco by Thermo Fisher Scientific) and 10⁶ cells were re-suspended in 12 ml IMDM with 20% FCS and 200 μg ml⁻¹ L-ascorbic acid phosphate magnesium salt n-hydrate (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germany). The cell suspension was transferred to a 10 cm bacteriological petri dish (Sarstedt Laborbedarf, Nümbrecht, Germany) and cultured in a humidified incubator on a rocking table at 40 rpm for two days. In suspension, miPSC form cell spheroids and/or clusters, referred to as EBs. On day 2, EBs were collected and diluted to 800 EBs per 10 cm bacteriological petri dish in 14 ml IMDM with 20% FCS and 50 μg ml⁻¹ ascorbic acid. Plates were left on a rocking table inside the cell culture incubator. On day 7, EBs from two plates were collected to one plate and the medium was changed to IMDM with 5% FCS. On day 8, EBs from two plates were pooled to one plate and the medium was changed (IMDM 5% FCS). Puromycin (InvivoGen, Toulouse, France) was added to a final concentration of 10 μg ml⁻¹ to eliminate all non-CMs. Steps from day 8 were repeated on day 9. The medium was changed daily with IMDM plus 5% FCS and 10 μg ml⁻¹ puromycin. On weekends IMDM with

20% FCS was used instead to maintain cells without medium change.

Puromycin-selected iPSC cell-derived CMs (iPSC-CMs) were dissociated on day 12. The day before dissociation, 10 cm cell culture dishes were coated with $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ fibronectin in PBS overnight at 4°C . One plate per $10\text{--}15 \times 10^6$ CMs was prepared. Dissociation was performed on the shaker at 37°C for 30–35 min. Trypsin was blocked with undiluted FCS and cells were dissociated by gentle pipetting (10–15 repetitions). (Note: Rigorous pipetting destroys the CMs.) miPSC-CMs were spun down at 180 g and resuspended in PBS. The cells were filtered through a $40 \mu\text{m}$ cell sieve to obtain a single-cell suspension. miPSC-CMs were counted in a Neubauer counting chamber, spun down at 180 g for 5 min, and resuspended in IMDM with 10% FCS supplementation.

2.7. Cluster formation

On day 13 of differentiation, miPSC-CMs were harvested by trypsinization and viable cells were counted after trypan blue (Gibco by Thermo Fisher) staining. For further processing, the cells were re-suspended in IMDM supplemented with 10% FCS and chilled on ice. MSCs and 786-0 were treated the same way but resuspended in their respective culture medium.

For the encapsulation of cells, a cell suspension with a total absolute cell count of 2×10^6 cells was prepared. If miPSC-CMs and MSCs were encapsulated together, their suspensions were combined to a cell ratio of 4:1 (miPSC-CMs:MSCs). After centrifugation of the cell suspension, the supernatant was discarded carefully. The cells were resuspended in $100 \mu\text{l}$ of cell culture medium and $100 \mu\text{l}$ PNIPAAm 1.8 wt/vol%. This polymer-cell suspension was then transferred to a 1 ml syringe (BD, Heidelberg, Germany). The cell suspension in PNIPAAm solution was injected into the middle inflow tube manually. (Hence, after loading the microfluidic system the cell suspension is now in place in the tube connected to the middle port of the chip. Next, the encapsulation suspension is transported forward into the chip for cell encapsulation.) Flow rates were set at 0.1 ml min^{-1} for the lateral inflow tubes and $0.425 \text{ ml min}^{-1}$ for the middle inflow tube. For the middle channel, the oil is used to push forward the PNIPAAm containing cell suspension. Once the PNIPAAm-cell suspension reached the microfluidic chip, the flow rate of the middle inflow tube was reduced to $0.025 \text{ ml min}^{-1}$. The recurrent flow tube heater was operated at 37°C . Polymer beads leaving the tube heater in their hydrogel phase were collected in 10 cm culture dishes with pre-warmed IMDM 10% FCS inside a heated sterile cabinet. For handling and transport of the spheres, caution was taken to keep temperature of the medium above the critical temperature of 32°C . After 24 h of incubation at 37°C and 5% CO_2 , the polymer beads were cooled to room temperature by letting them stand under a sterile

hood for 15 min. The culture medium was carefully discarded and replaced by DPBS -/- at room temperature. This process was repeated twice for washing the cell aggregates with DPBS -/- and removing the PNIPAAm which had been solved in the culture medium.

2.8. Hanging drop culture

A cell suspension with a density of 250 cells μl^{-1} was prepared. The cell suspension contained 80% miPSC-CMs and 20% MSCs. Five square shaped polystyrene plates were prepared by adding 15 ml DPBS per plate. With a multichannel pipette, the cell suspension was dispersed in droplets of $20 \mu\text{l}$ each onto the lids of the square plates. The lids were carefully placed back on the plates and the hanging drops were incubated for 24 h in a humidified incubator at 37°C , 5% CO_2 . During this incubation time cell spheroids formed at the tips of the hanging drop. For harvesting of the spheroids the lids were flushed with cell culture medium and spheroids were transferred to a non-adhesive 10 cm dish. The dishes were further cultured on a rocking table inside a cell culture incubator.

2.9. Spheroid cell counting

For cell counting, a single cluster in $30 \mu\text{l}$ DPBS -/- was transferred to a well of a 96-well plate (Greiner bio-one) manually by a microliter pipette. Then, $70 \mu\text{l}$ 0.05% trypsin/EDTA were added. After 2 min of incubation at 37°C , the cells were separated mechanically by repeated pipetting with a $200 \mu\text{l}$ pipette with a 'yellow tip'. After 2 more minutes of incubation at 37°C , the obtained single cells were counted by trypan blue staining using a hemacytometer.

2.10. Cell staining

A live-dead cell assay kit based on calcein AM and ethidiumhomodimer-1 (Thermo Fisher Life Technologies, Germany) was used according to the manufacturer's instructions. Cell aggregates in $200 \mu\text{l}$ IMDM were incubated with $200 \mu\text{l}$ staining solution containing calcein AM 1:1000, ethidium homodimer-1 1:500, and $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ Hoechst dye for 30 min. Staining was evaluated immediately after the incubation by fluorescence microscopy. For detection of apoptosis in sections of microtissues a Click-iT Plus TUNEL assay conjugated with Alexa Fluor 488 (Invitrogen, #C10617) was used.

For immunofluorescence staining, cell aggregates were unleashed from the PNIPAAm hydrogel, the aggregates were fixed and permeabilized with 100% methanol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) at -20°C for 10 min. The aggregates were washed with DPBS -/- and then incubated with 3% bovine serum albumine (BSA) (Sigma-Aldrich) for 1 h at room temperature. After washing with DPBS -/- once more, the cell aggregates were incubated with primary anti- α -actinin monoclonal IgG (Sigma-Aldrich, clone EA-53, isotype IgG1) in 3% BSA for 16 h at 4°C . For

staining of MSCs monoclonal anti-vimentin antibodies produced in mouse (Sigma-Aldrich, clone LN-6, isotype IgM) were used. After a further washing step, secondary detection was performed by goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 647 and goat anti-mouse IgM Alexa Fluor 555 (both from Thermo Fisher Scientific). Conjugated monoclonal anti-CD29 IgG (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) was used to stain total cells. About 1 μg Hoechst 33342 dye (Sigma-Aldrich) in 3% BSA were added to the aggregates in order to stain nuclear DNA. Samples were incubated for 60 min in the dark at room temperature. After multiple washing steps, the stained aggregates were analyzed with a fluorescence microscope (Axiovert 200, Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH) using AxioVision 4.5 software as well as by an SP8 confocal microscope (Leica Microsystems).

2.11. Action potential (AP) measurement

Intracellular AP measurements with sharp glass microelectrodes (20–50 $\text{M}\Omega$ resistance when filled with 3 mol l^{-1} KCl; World Precision Instrument, Sarasota, USA) have been performed as described previously [29, 30]. APs of T α P derived CMs were measured in cell cluster containing CMs and MSCs. Recordings were performed at two different time points, 24 h (directly after removal of PNIPAAm) and 72 h (24 h in PNIPAAm plus 48 h in culture) after preparing the cell cluster. APs of iPSC-CM were measured without external stimulation. The recording electrode was connected to an SEC-10LX amplifier (npi electronic, Tamm, Germany), and the signal was acquired with the Pulse software (HEKA, Lambrecht/Pfalz, Germany). Data were analyzed with Mini Analysis (Synaptosoft, Fort Lee, USA). All data from AP measurements are presented as mean \pm SEM. Differences of AP parameters were tested for statistical significance by Student's *t*-test. A two-sided *p*-value < 0.05 was considered statistically significant. GraphPad Prism version 8 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) was used for all calculations and creating AP graphs.

2.12. Statistical analysis

Differences between the experimental groups were determined by using one-way analysis of variance. An unpaired and Bonferroni corrected *t*-test was used as post-hoc test. A difference was considered significant when *p* < 0.05 . All values are presented as mean \pm standard deviation (mean \pm SD). Statistical analysis and graphing were performed using Microsoft Excel.

2.13. Preparation of mMSC-PNIPAAm beads for scanning electron microscopy

The microfluidic method was used to encapsulate murine mesenchymal stromal cells (MMSCs) inside PNIPAAm beads. Therefore, a total number of 2.0×10^6 mMSCs was resuspended in 100 μl DMEM

with 15% FCS mixed with 100 μl 1.8% PNIPAAm suspension and injected into the system for cell encapsulation. When the mMSC-PNIPAAm beads left the heated tubing system, they were dropped into liquid nitrogen, transferred as frozen beads to a centrifuge tube inside a -20 $^{\circ}\text{C}$ pre-chilled aluminum block and transferred to an ultralow freezer at -80 $^{\circ}\text{C}$ until further processing. Next, the mMSC-PNIPAAm beads were freeze dried for 24 h. To remove the remaining rapeseed oil, 20 ml of dry ethanol were added to the tube with the mMSC-PNIPAAm beads, mixed gently, and agitated on a shaker at room temperature for 4 h at 300 rpm. Beads were separated from ethanol by gravity. To remove residual ethanol, the samples were kept in a vacuum desiccator for 2 h. Because of some remaining oil, the washing step with the absolute ethanol was repeated. For the second washing step, the samples were incubated with 2 ml dry ethanol overnight on a shaker and vacuum dried in a desiccator. Samples were mounted on a stub using a double sided adhesive carbon tape and sputter coated with a 12 nm gold layer. Examination was done by a FEI Quantus 250 scanning electron microscope.

2.14. Synthesis of PNIPAAm-co-rhodamin

The synthesis was carried out at room temperature. In an evacuated and subsequently, N_2 flooded 50 ml round bottom flask with magnetic stirrer, 2 g (18 mmol) N-isopropylacrylamide and 30 ml deionized water were added. Then 20 mg acryloxyethyl thiocarbonyl rhodamine B was added. After dissolving the solid monomer under stirring, 24 mg (0.1 mmol) ammonium peroxodisulfate were added. Following homogenization, 12.3 mg (0.1 mmol) TEMED was added, and the reaction was carried out for 2 h while stirring. With the increasing reaction time, the viscosity of the reaction solution increases, and the product was precipitated in deionized water at 60 $^{\circ}\text{C}$. The precipitate was vacuum filtered through a Büchner funnel with standard filter paper, washed with 80 $^{\circ}\text{C}$ hot deionized water and dried overnight in the vacuum drying oven at 40 $^{\circ}\text{C}$.

2.15. PNIPAAm-co-rhodamin washout

For the experiment 1.8% PNIPAAm-co-rhodamine solution was diluted with 1.8% unlabeled PNIPAAm solution in a ratio of 1:10. This solution is referred to as 'Rhodamine-PNIPAAm'. Rhodamine-PNIPAAm was used to encapsulate mMSC with the microfluidic method. Therefore 2.0×10^6 cells in total were resuspended in 100 μl of DMEM with 15% FCS and mixed with 100 μl of the rhodamine-PNIPAAm before injected into the system. After the mMSC-PNIPAAm beads were generated and collected in 10 cm dishes filled with 15% DMEM. Beads were incubated for 24 h at 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 before the rhodamine-PNIPAAm was washed out. To remove the rhodamine-PNIPAAm capsule, the

cell-PNIPAAm beads were incubated in a petri dish with 10 ml DPBS at room temperature. The plate was gently swirled. PBS was removed as complete as possible and replaced by fresh PBS (room temperature). This step was repeated in total six times to remove dissolved PNIPAAm and rapeseed oil. The washing procedures took about 10 min in total. For further analysis, the washed cell spheroids were transferred to a petri dish filled with fresh cell culture medium and incubated on a rocking table inside a cell culture incubator for 24 h. Spheroids were stained with Hoechst dye and analyzed under a fluorescent microscope.

3. Results

3.1. Production of PNIPAAm beads

In order to produce PNIPAAm spheroids, a microfluidics chip was designed (figure 1(A)). The chip is equipped with two ports that transport the hydrophobic phase (rapeseed oil) at an angle of 60° to the central channel. A central port is used to inject the PNIPAAm containing an aqueous phase into the oil stream (figure 1(B)). At the tip of the cannula, a spherical droplet is formed and buds off once the forces produced by the flow of the hydrophobic phase exceed the retraction forces at the interphase of the hydrophobic phase and aqueous solution (figure 1(C)). Using a flow of $25 \mu\text{l min}^{-1}$ for the aqueous phase, a production rate of 28 droplets per minute was estimated. Droplets moved forward to the exit of the chip and entered a tube with a heated mantle inside a heated sterile cabinet (figures 1(D) and (E)). Heating the droplets to above the lower critical solute temperature (LCST) of 32°C resulted in the phase change of the PNIPAAm and precipitation of solid and hydrophobic PNIPAAm. The droplets turned from fully transparent liquid drops to opaque hydrogel spheres at this stage. A schematic drawing of the setup is provided in figure 1(F).

For a demonstration of the change in transparency, droplets were imaged in a non-heated (room temperature) tube (figure 2(A)) and collected in a multiwell plate filled with 37°C warm medium (figure 2(B)). For the further experiments, the setup outlined in figure 1(F) was used and operated with cell-free PNIPAAm solution. The resulting transmission light microscopy revealed that a spherical shape of the PNIPAAm beads was generated by this setup (figure 2(C)). Dark field microscopy showed that the polymer had formed 3D interwoven meshes at the surface of the spheroids (figure 2(D)). When PNIPAAm solution without cells was injected into the system, round beads with a mean diameter of $718 \pm 28 \mu\text{m}$ ($n = 115$) formed (figure 2(E)). After 4 h of incubation above the LCST spheroids reduced in size to a mean diameter of $516 \pm 25 \mu\text{m}$ ($n = 35$) (figure 2(F)).

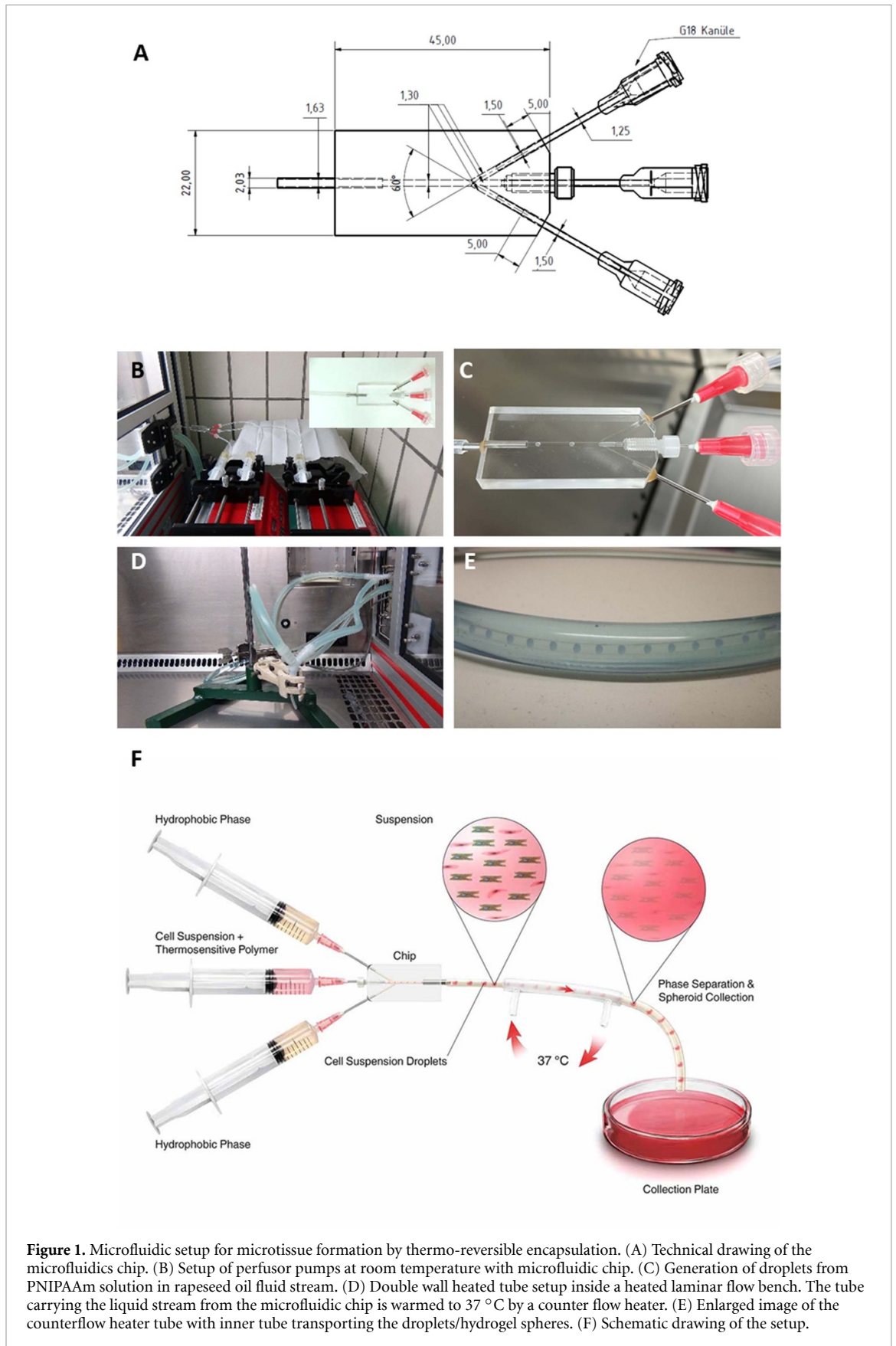
3.2. Generation of cell aggregates with renal carcinoma cells

In the next step, the ability of PNIPAAm to encapsulate cells and promote the formation of cell aggregates was tested. Initial experiments were conducted with eGFP expressing 786-0 renal carcinoma cells. First, we experimented to check whether incubation of the cells within the hydrogel capsule is necessary to form cell aggregates. 786-0 cells were encapsulated and the PNIPAAm capsules were transferred to room temperature shortly after they had been collected at the outlet of the production unit. Directly after transfer to room temperature, capsules appeared non-transparent to light (figure 3(A)). After 2 min at room temperature, the hydrogel started to become transparent (figure 3(B)). After 4 min at room temperature, the capsules dissolved as PNIPAAm underwent phase transition, and encapsulated cells were released (figure 3(C)). No formation of aggregates was observed at this stage. Therefore, an incubation of the cells inside the hydrogel shell was necessary to form aggregates. The number of cells released per capsule when dissolved immediately after encapsulation was estimated as 3636 ± 1575 single cells ($n = 22$).

After 24 h of incubation in PNIPAAm, cell aggregates formed and showed a round, spheroid-like shape (figures 3(D) and (E)). Cell aggregates were obtained 24 h after encapsulation by washing out the hydrogel shell and showed a mean diameter of $525 \pm 116 \mu\text{m}$ ($n = 20$) (figure 3(F)). These aggregates contained 6346 ± 1753 cells ($n = 26$) (figure 3(G)). That is 1.7-fold more than directly after the encapsulation, pointing to cell proliferation in the first 24 h. Incubation of the cells inside the hydrogel shell for 48 or 72 h instead, resulted in a significantly ($p < 0.001$) reduced cell count of 3932 ± 1209 ($n = 22$) and 4467 ± 1932 ($n = 30$), respectively. In line with this observation, the clusters obtained after 48 and 72 h of incubation had a significantly ($p < 0.001$ and $p = 0.01$) smaller diameter of $407 \pm 82 \mu\text{m}$ ($n = 26$) and $445 \pm 97 \mu\text{m}$ ($n = 30$), respectively, as compared to cell clusters released after 24 h.

3.3. Generation of aggregates using different PNIPAAm concentrations and oil flow rates

Encapsulation experiments in this work were performed using a 1.8% PNIPAAm stock solution. The PNIPAAm stock solution is diluted 1 + 1 with the cell suspension to result in a final PNIPAAm concentration of 0.9% in the microfluidics. In order to test if an increase of the PNIPAAm concentration reduces the time for microtissue formation PNIPAAm stock solutions of 1.8%, 2.4% and 3.0% were tested for encapsulation of MSCs (supplementary figure 1 (available online at stacks.iop.org/BF/14/035017/mmedia)). When 1.8% PNIPAAm solution was used, no compact microtissues were formed after 4 h. In contrast, 24 h were sufficient for microtissue formation. About



2.4% and 3.0% PNIPAAm facilitated microtissue formation within 4 h. To further reduce the duration of encapsulation, MSCs were encapsulated in 2.4% for 1 or 3 h, respectively. While 1 h did not

result in compact microtissues, encapsulation for 3 h produced microtissues that appear less compact as compared to approaches with longer encapsulation times. An increase of the PNIPAAm stock solution

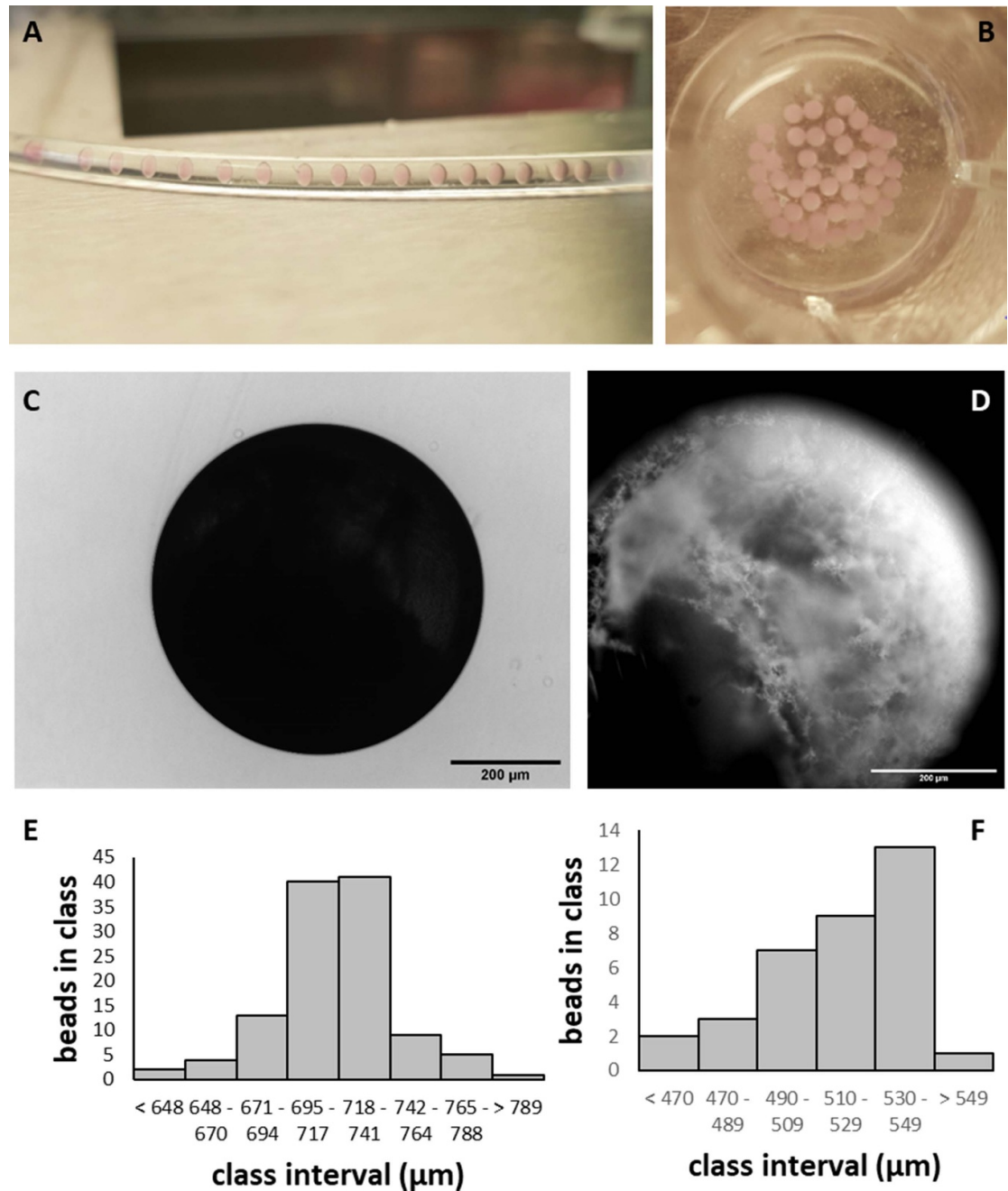


Figure 2. Characterization of cell-free PNIPAAm hydrogel spheroids. (A) Cell-free PNIPAAm solution droplets in a non-heated tube. (B) Collected droplets heated to 37 °C and converted into PNIPAAm hydrogel spheroids. (C) Transmission light image of PNIPAAm spheroid generated in the microfluidic system and warmed to 37 °C. (D) Darkfield image of PNIPAAm spheroid illustrating the surface structure. (E) Size distribution of PNIPAAm hydrogel spheroids soon after phase transition. (F) Size distribution of PNIPAAm hydrogel spheroids 4 h after phase transition.

to 3.6% did not produce microtissues in either 1 or 3 h.

In some applications it could be necessary to fine tune not only the cellular composition of the microtissues but also its absolute size. To address the relation between flow parameters and final size of microtissues, we varied the flow rate of rapeseed oil while keeping the flow rate of the cell suspension constant. It was found that an increase of the hydrophobic phase flow rate results in a decrease in the diameter of the resulting microtissues (supplementary figure 2).

3.4. Generation of microtissues from miPSC-CMs and MSCs

In a proof-of-concept approach to generate functional cardiac microtissues, purified miPSC-CMs and MSCs were used. When miPSC-CMs were encapsulated together with MSCs at a 4:1 ratio, the diameter of the microtissues that were released after 24 h in the hydrogel shell had an average diameter of $341 \pm 31 \mu\text{m}$ ($n = 20$) (figure 4(A)). If the aggregates were recovered from the hydrogel after 48 or 72 h, they showed an increased diameter of $363 \pm 74 \mu\text{m}$ ($n = 39$) and $391 \pm 51 \mu\text{m}$ ($n = 73$) respectively.

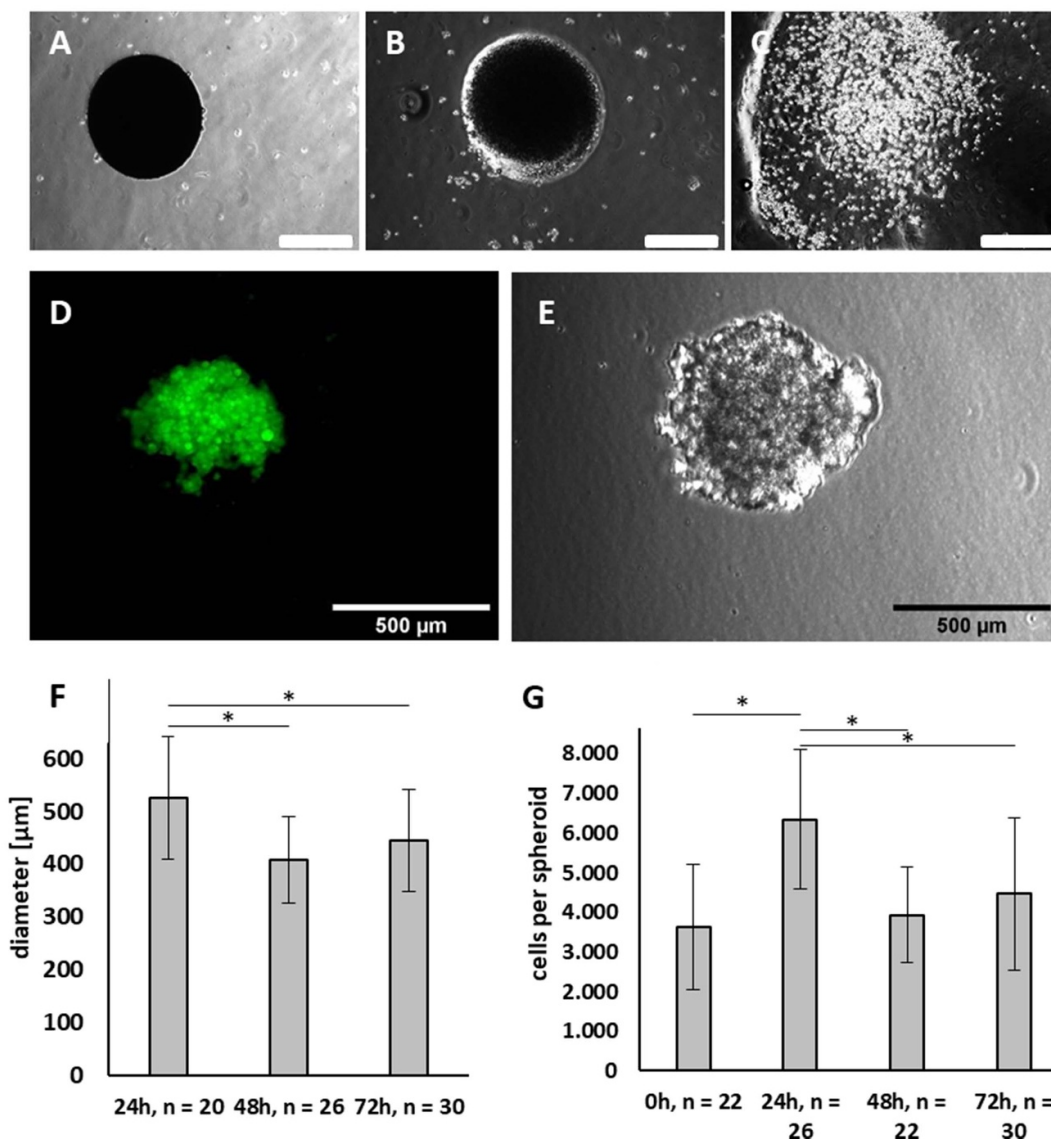
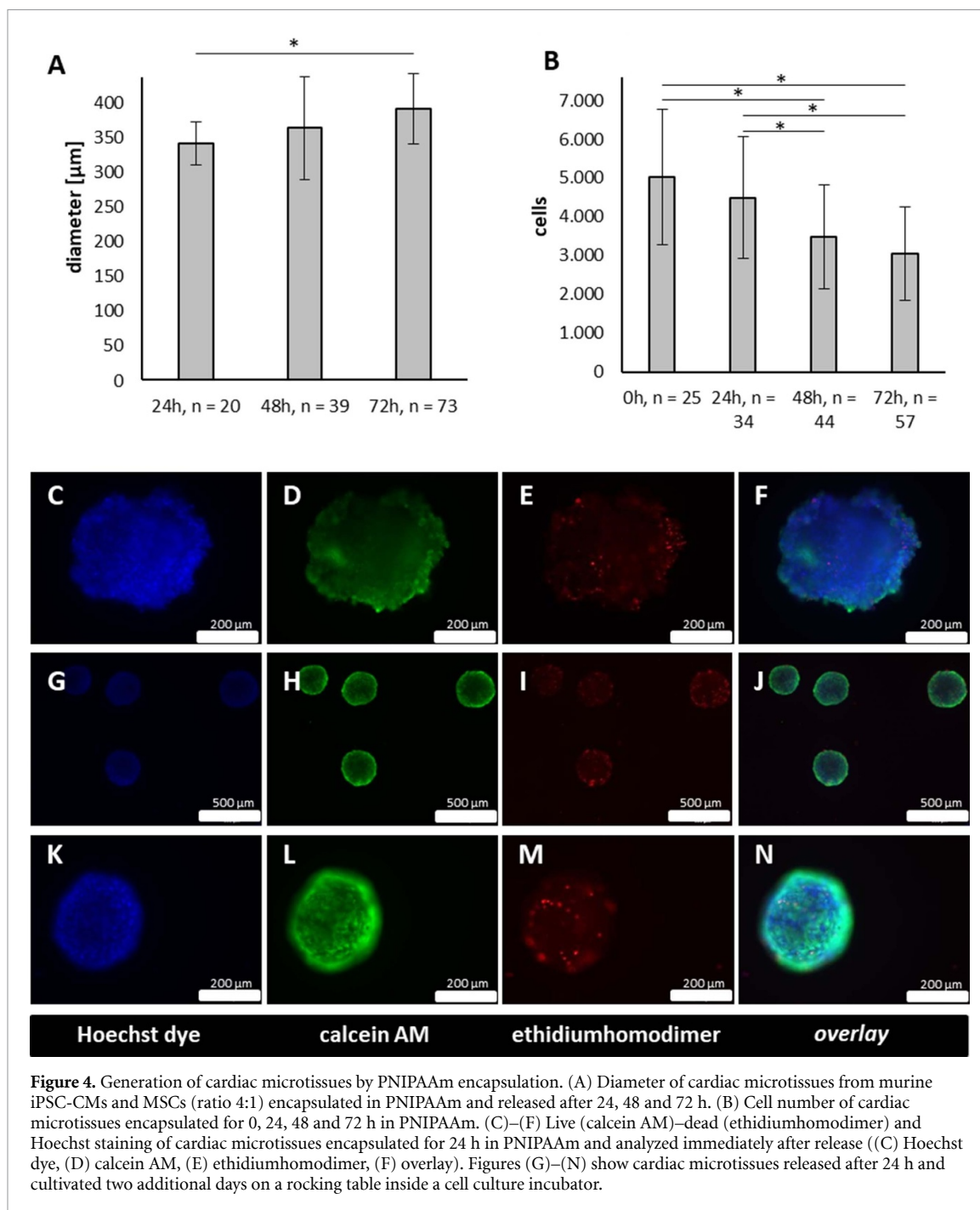


Figure 3. Characterization of renal carcinoma cell aggregates generated by PNIPAAm encapsulation. PNIPAAm capsule loaded with 768-0 tumor cells and transferred to room temperature directly after the encapsulation process without further incubation period at 37 °C. (A) Immediately after transfer to room temperature, (B) 2 min after transfer to room temperature, (C) 4 min after transfer to room temperature. Note that the spheroid dissolved after 4 min and released its content in form of single cells. (D) Green fluorescent protein expressing 768-0 tumor cells encapsulated and cultivated for 24 h prior to release. (E) 768-0 tumor cells encapsulated and cultivated for 24 h prior to release in transmission light. (F) Size of 768-0 tumor cell clusters encapsulated for 24, 48 and 72 h in PNIPAAm. (G) Cell number of 768-0 tumor cells released directly (0) or 24, 48 or 72 h after encapsulation. (A)–(E) Scale bars: 500 μm.

When microtissues were released from PNIPAAm after 24 h and further cultivated for 24 h (video 1) or 48 h (video 2) they retained their spherical shape and were found to contract autonomously and regularly.

Hydrogel beads dissolved directly after the encapsulation of iPSC-CMs and MSCs contained 5020 ± 1741 cells per microtissue ($n = 25$) (figure 4(B)). After 24 h of incubation in the hydrogel shell, the clusters contained 4485 ± 1574 cells ($n = 34$). While this decrease in cell number was not significant ($p = 0.23$), aggregates obtained after 48 and 72 h of incubation in the polymer showed significant ($p < 0.001$) cell count decreases to 3477 ± 1331 ($n = 44$) and 3044 ± 1211 ($n = 57$) cells per aggregate.

Staining of live cells with calcein dye (green) and dead cells with ethidiumhomodimer (red) was performed and qualitatively analyzed. All nuclei were stained with Hoechst dye (blue). After release of cardiac microtissues from the hydrogel shell the majority of cells were found to be alive and only a few nuclei positive for ethidiumhomodimer were identified (figures 4(C)–(F)). To exclude that cell death occurs with delay another fraction of the microtissues were released from the polymer shell after 24 h and cultured for two days on a rocking table inside a cell culture incubator. Live-dead staining again revealed only single dead cells as indicated by ethidiumhomodimer positive nuclei (figures 4(G)–(N)).



3.5. Characterization of cardiac microtissues—confocal microscopy

As the aggregates obtained after 24 h of incubation in PNIPAAm contained the highest cell counts, further analysis focused on this group. Once released from the polymer shell, the cardiac microtissues showed spontaneous contractions. Directly following release from the hydrogel shell, microtissues were labeled with antibodies against the cardiac protein α -actinin and the common surface marker CD29 (β 1-integrin) known to be highly expressed by MSCs and imaged by confocal microscopy (figures 5(A)–(D)). It was noted that the surface presented itself as rough with cells standing out above the general surface level. As

yet, tunnels or canals reaching into the interior of the spheroids, which could result from the removal of PNIPAAm, could not be observed. This description of the surface is in line with the impression gained by transmission light microscopy. As far as the antibodies reached into the microtissues, the different cell types appeared to be homogeneously intermingled.

At the time point of release from the polymer, the miPSC-CMs were at day 14 of differentiation. Confocal imaging of z-disc protein α -actinin revealed nascent striation of their sarcomeres (figure 5(E)). To further investigate the CMs' fate within the spheroids, PNIPAAm was washed out of some microtissues after 24 h of incubation. These microtissues were

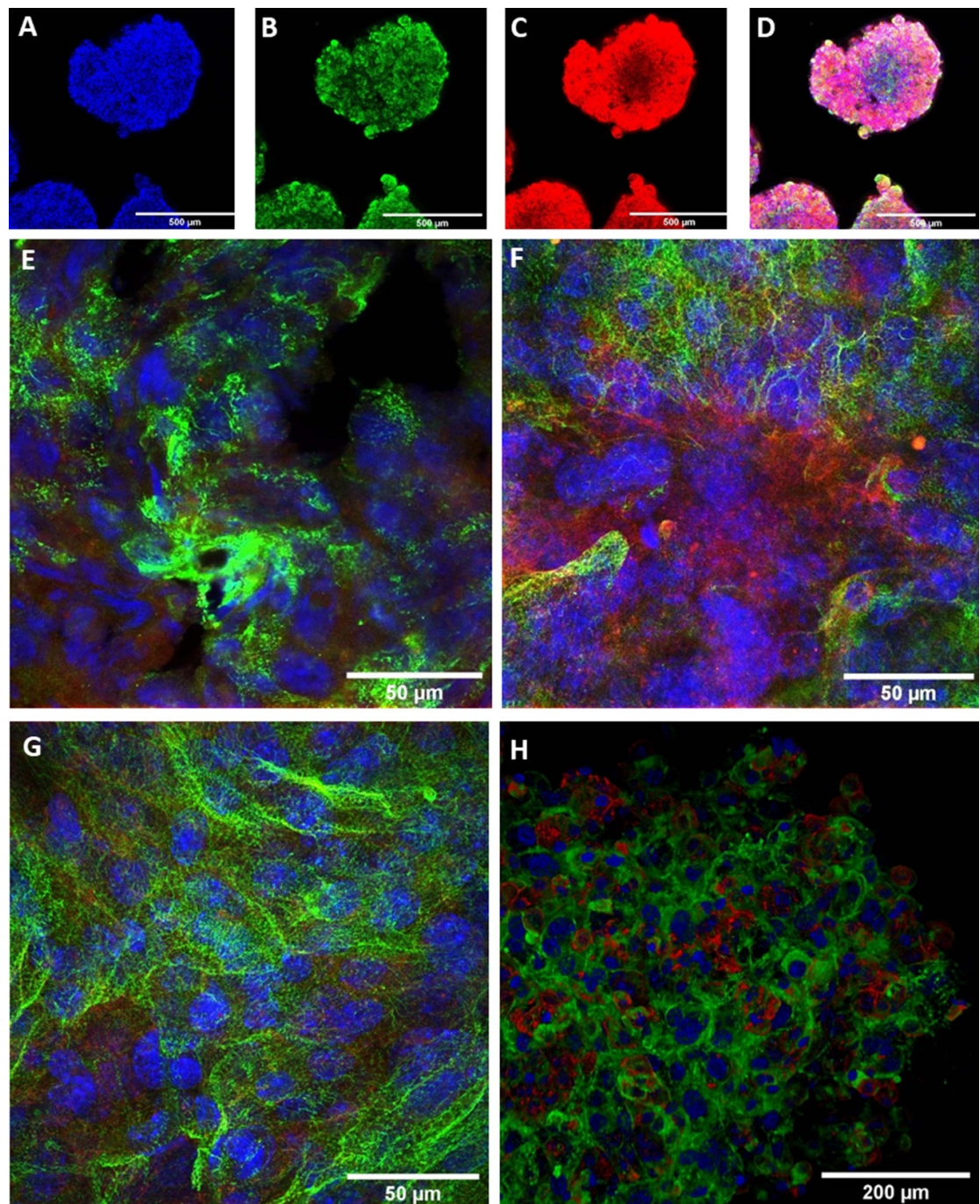
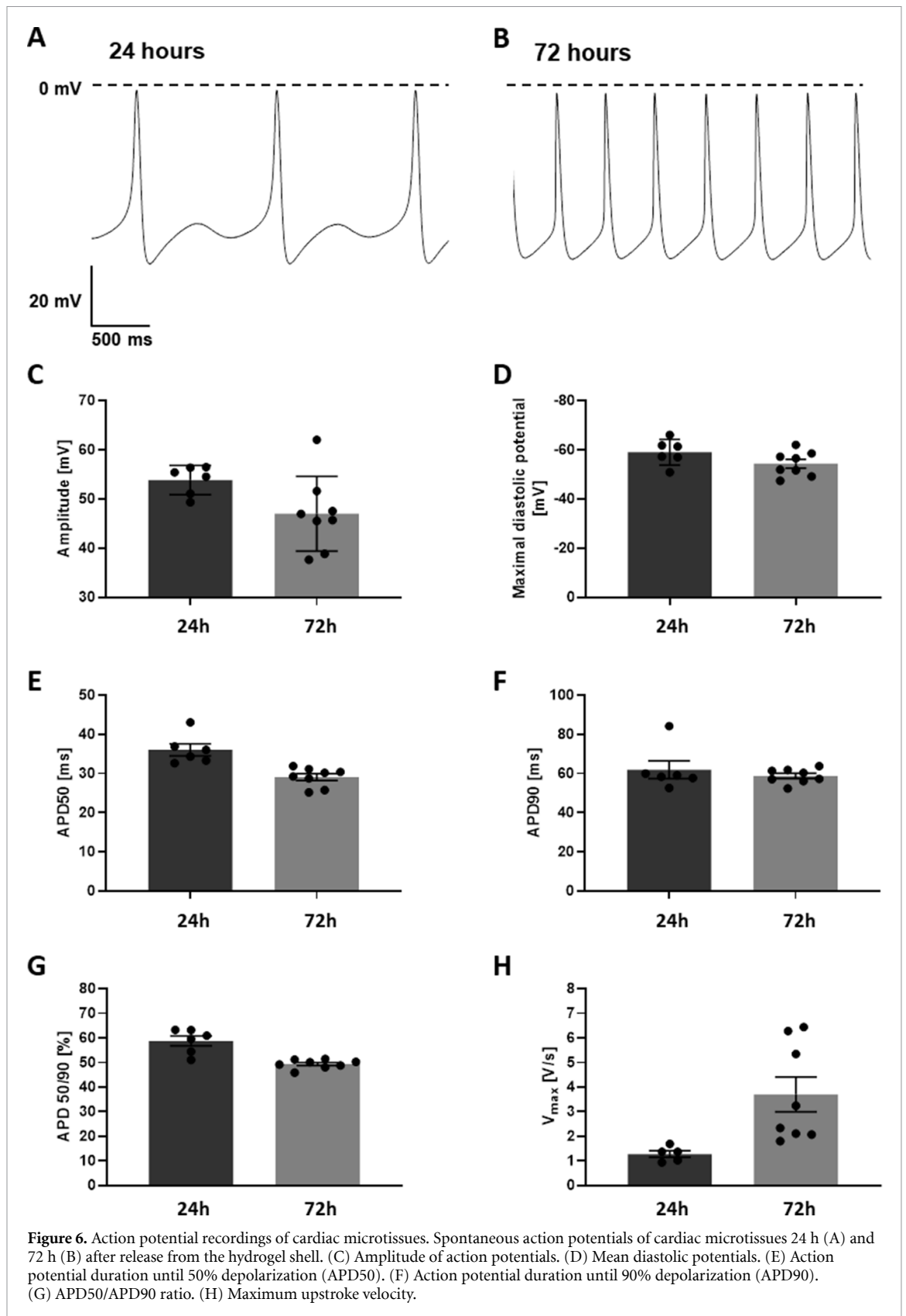


Figure 5. Confocal imaging of cardiac microtissues. (A)–(D) Cardiac microtissue shortly after release from the hydrogel shell. (E) Higher power magnification of cardiac microtissue shortly after release from the shell. (F) Cardiac microtissue cultured for one additional day after release. (G) Cardiac microtissue cultured for two additional days after release. (H) Cardiac microtissue directly after release from the hydrogel shell. Three-dimensional surface rendering after confocal z-stacking. Blue: Hoechst dye, green: sarcomeric α -actinin, red: CD29. Scale bare 500 μm for (A)–(D), and 50 μm for (E)–(H).

then further incubated under continuous agitation to prevent adhesion of the microtissues to each other. After 24 and 48 h of shaker culture, the microtissues still exhibited a round shape. The surface appeared smoothened. After 24 h the clusters' diameter was reduced to $(309 \pm 25) \mu\text{m}$ ($n = 12$). This is significantly ($p = 0.007$) less than at the time of release from the hydrogel. Aggregates that were incubated on a shaker for 48 h had a diameter of $(341 \pm 21) \mu\text{m}$ ($n = 10$), which does

not differ significantly ($p = 0.94$) from the diameter at the time of release from the hydrogel. The clusters which had been released from the hydrogel and further incubated on a shaker were fixed and stained with antibodies against α -actinin and CD29 and examined by confocal microscopy. CMs at day 15 showed improved striation (figure 5(F)). miPSC-CMs at day 16 showed further signs of the sarcomeric organization (figure 5(G)), indicating an ongoing process of sarcomere maturation. Confocal z-stacking



was conducted on microtissues after removal of the hydrogel shell and planar projections were generated (figure 5(H)). The surface projection supports the conclusion that the microtissues exhibit rough surfaces right after removal of PNIPAAm.

3.6. Electrophysiological characterization of cardiac microtissues

Sharp electrode AP measurements in miPSC-CMs/MSC microtissues (figure 6) were performed to analyze electrophysiological properties after 48 h

(24 h + 24 h (24 h in the PNIPAAm shell + 24 h in culture post PNIPAAm washout), $n = 6$), 96 h (24 h + 72 h, $n = 8$), 8 days ($n = 11$) and 15 days ($n = 6$). Hanging drop clusters generated from equal cell numbers as found per PNIPAAm capsule were measured after 48 h (24 h + 24 h, $n = 7$) and 72 h (24 h + 48 h, $n = 3$).

In PNIPAAm capsule-derived microtissues, CMs showed typically cardiac AP-shape of young, unmaturing CMs. Analyses of AP properties showed significant differences between 48 h, 96 h, 8 days and 15 days in in amplitude (48 h: 53.8 ± 1.2 mV; 96 h: 48.26 ± 2.69 mV; 8 days: 58.14 ± 1.7 mV; 15 days: 37.46 ± 5.06 mV, $p < 0.001$) AP duration at 50% of repolarization (APD50; 48 h: 36.05 ± 1.55 ms; 96 h: 28.70 ± 0.86 ms; 8 days: 20.32 ± 0.34 ms; 15 days: 19.17 ± 4.94 ms; $p < 0.001$), AP duration at 90% of repolarization (APD90; 48 h: 61.98 ± 4.57 ms; 96 h: 58.25 ± 1.31 ms; 8 days: 54.45 ± 1.96 ms; 15 days: 45.00 ± 9.93 ms; $p < 0.001$) the ration of AP duration at 50% of repolarization and the AP duration of 90% of repolarization (APD 50/90; 48 h: $58.79 \pm 2.02\%$; 96 h: $49.2 \pm 0.65\%$; 8 days: $37.50 \pm 0.94\%$; 15 days: $42.97 \pm 5.66\%$, $p < 0.001$), the upstroke velocity (V_{\max} ; 48 h 1.28 ± 0.14 V s⁻¹; 96 h: 3.7 ± 0.7 V s⁻¹; 8 days: 13.52 ± 2.6 V s⁻¹; 15 days: 4.18 ± 0.81 V s⁻¹, $p < 0.001$) and spontaneous contraction frequency (48 h: 0.6 ± 0.2 Hz; 96 h: 3.4 ± 0.2 Hz; 8 days: 4.78 ± 0.18 Hz; 15 days: 5.87 ± 0.81 Hz, $p < 0.001$). Comparison of AP properties revealed no significant differences between 48 h, 96 h, 8 days and 15 days old microtissues in the maximal diastolic potential (MDP; 96 h: -59.08 ± 2.13 mV; 96 h: -55.89 ± 1.78 mV; day 8: -57.31 ± 0.83 mV; day 15: -51.38 ± 6.95 , $p = 2.476$; table 1).

Analyses of AP properties in hanging drop cluster (supplementary figure 3 and table 2) revealed significant differences between 48 h and 72 h cluster in amplitude (48 h: 41.59 ± 4.29 mV; 72 h: 23.90 ± 3.3 mV, $p = 0.037$), MDP (48 h: -48.03 ± 2.76 mV; 72 h: -37.3 ± 1.97 mV, $p = 0.045$), APD50 (48 h: 33.04 ± 3.04 ms; 72 h: 40.54 ± 2.6 ms, $p = 0.013$) and APD90 (48 h: 60.63 ± 3.04 ms; 72 h: 78.69 ± 5.43 ms, $p = 0.014$). Comparison of AP properties revealed no significant differences between 48 h and 72 h in APD50/90 (48 h: $54.75 \pm 0.97\%$; 72 h: $51.55 \pm 0.36\%$, $p = 0.074$), V_{\max} (48 h: 2.94 ± 0.56 V s⁻¹; 72 h: 1.04 ± 0.26 V s⁻¹) and frequency (48 h: 3.3 ± 0.48 Hz; 72 h: 2.4 ± 0.2 Hz, $p = 0.201$).

During the analysis of the AP recording, it was noticeable that the success rate of AP measurements in hanging drop and PNIPAAm capsule-derived microtissues dropped at the latest time points analyzed. The success rate is defined as the ratio between successful and unsuccessful AP recording attempts. In PNIPAAm capsule-derived microtissues the success rate of AP measurements was 60% (48 h: 6 out of 10 attempts were successful) at 48 h, 61.5% at 96 h (8 out of 13 attempts were successful), 73.3% at 8 days

(11 out of 15 attempts were successful) and 20.1% at 15 days (6 out of 29 attempts were successful). In hanging drop clusters the success rate of AP measurements was 63.6% (7 out of 11 attempts were successful) at 48 h and 27.3% (3 out of 11 attempts were successful) at 72 h. Increasing amount of dead cells inside the older cell clusters might led to the higher unsuccessful attempts of AP measurements.

3.7. Cell distribution and apoptosis

In order to identify potential segregation of the cells during longer culture of cardiac microtissues, stainings for vimentin as a marker for MSCs and cardiac α -actinin were performed. The staining was combined with a TUNEL assay to test for increased apoptosis rates. It was found that there is no segregation of CMs and MSCs in microtissues cultured for 96 or 168 h after PNIPAAm removal. After 96 h few apoptotic cells were observed while after 168 h DNA fragmentation was found widespread throughout the microtissues (figure 7). In hanging drop derived microtissues massive apoptosis was detected at early timepoints (supplementary figure 3).

3.8. Washout of PNIPAAm-co-rhodamin

In order to detect residues of PNIPAAm inside the microtissue we generated a rhodamine labeled PNIPAAm variant. Encapsulation of the cells with PNIPAAm-co-rhodamine resulted in bright red fluorescent capsules (not shown). MSCs were encapsulated and after 24 h the PNIPAAm-co-rhodamin shell was removed by washing at room temperature. After further culture for another 24 h at 37 °C the microtissues were sliced and analyzed for PNIPAAm residues. Fluorescent microscopy revealed inclusions of PNIPAAm-rhodamin entrapped inside the microtissues (figure 8).

3.9. PNIPAAm thermo-shrinkage confines cells to small volumes

When counting the numbers of droplets generated in the microfluidic system, we estimated a production rate of 28 droplets per minute at a flow rate of 25 μ l min⁻¹ resulting in an average volume of 0.89 μ l per droplet, equivalent to a sphere with a diameter $d = 1.19$ mm. To calculate the size of the droplet, the formula for sphere volumes was applied and resolved for the radius:

$$V = \left(\frac{4}{3}\right) \pi \times r^3 = 0.89 \times 10^{-6} \text{ l}$$

$$r^3 = \frac{0.89 \times 10^{-6}}{\left(\frac{4}{3}\right) \pi} = 2125 \times 10^{-7}.$$

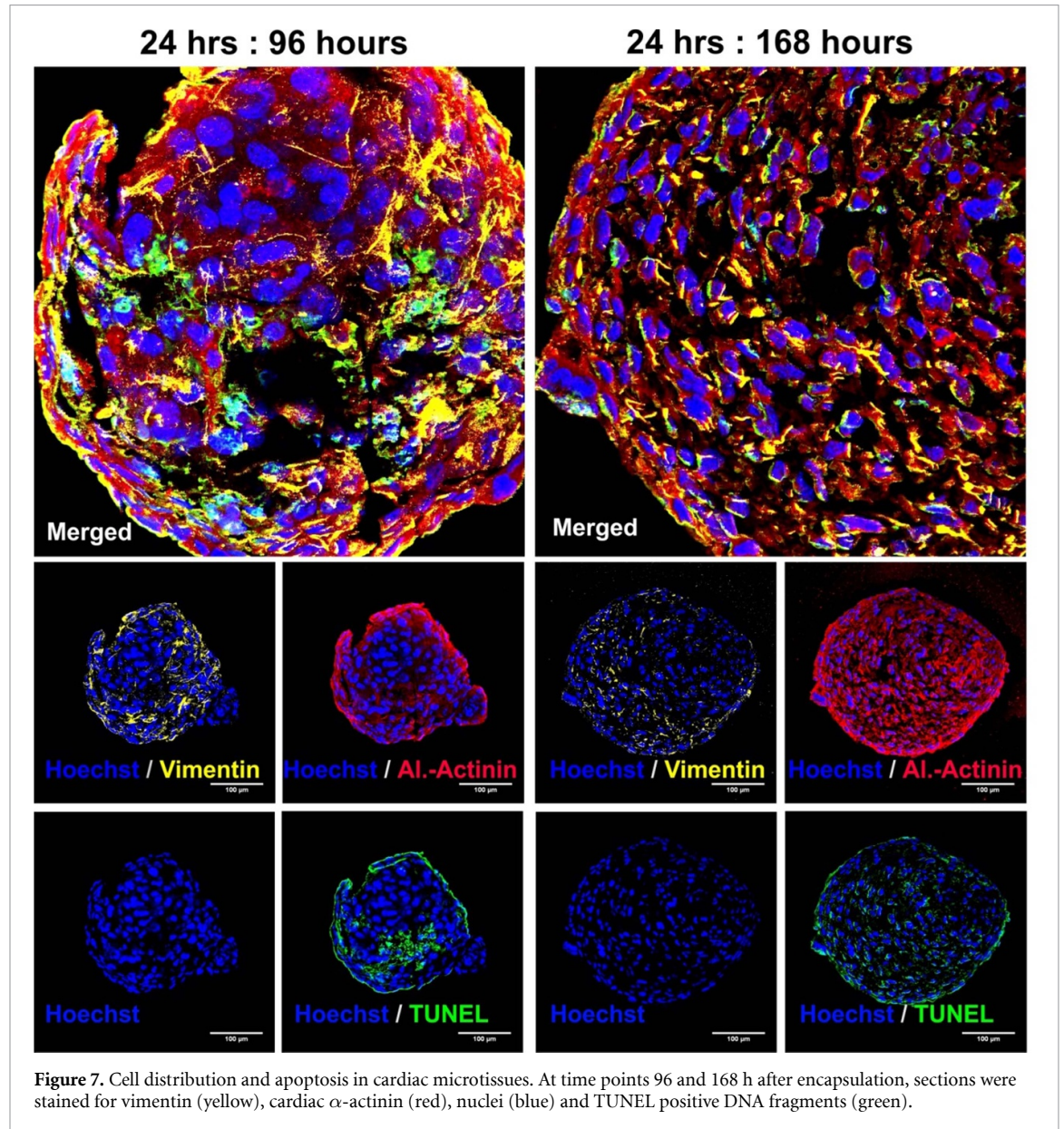
The calculation results in a radius of 0.00597 dm. This corresponds well with the channel diameter

Table 1. Electrophysiological parameters of cardiac microtissues generated in PNIPAAm capsules.

| Age of microtissue | Amplitude (mV) | MDP (mV) | APD50 (ms) | APD90 (ms) | APD 50/90 (%) | V_{max} ($V s^{-1}$) | Frequency (Hz) |
|-------------------------------------|----------------|---------------|--------------|---------------|---------------|--------------------------|----------------|
| 24 h + 24 h | 53.88 ± 1.21 | -59.08 ± 2.13 | 36.05 ± 1.55 | 61.98 ± 4.57 | 58.79 ± 2.02 | 1.28 ± 0.14 | 0.6 ± 0.2 |
| 24 h + 72 h | 48.26 ± 2.69 | -55.89 ± 1.78 | 28.70 ± 0.86 | 58.25 ± 1.31 | 49.20 ± 0.65 | 3.7 ± 0.7 | 3.4 ± 0.2 |
| 8 days (pacemaker like APs) | 16.92 ± 2.3 | -44.74 ± 3.36 | 55.69 ± 8.9 | 114.68 ± 17.5 | 48.34 ± 0.52 | 1.07 ± 0.31 | 4.33 ± 0.81 |
| 8 days (non-pacemaker-like APs) | 58.14 ± 1.70 | -57.31 ± 0.83 | 20.32 ± 0.34 | 54.45 ± 1.96 | 37.50 ± 0.94 | 10.63 ± 0.48 | 4.78 ± 0.18 |
| 15 days | 37.46 ± 5.06 | -51.38 ± 6.95 | 19.17 ± 4.94 | 45.00 ± 9.93 | 42.97 ± 5.66 | 4.18 ± 0.81 | 5.87 ± 0.81 |
| <i>p</i> -value | Amplitude | MDP | APD50 | APD90 | APD 50/90 | V_{max} | Frequency |
| 48 h vs 96 h | 0.060 | 0.111 | 0.001 | 0.463 | <0.001 | 0.022 | <0.001 |
| 8 days—pacemaker vs 8 days other CM | 0.001 | 0.006 | 0.001 | 0.001 | <0.001 | 0.006 | 0.490 |
| 8 days vs 15 days | <0.001 | 0.058 | 0.156 | 0.007 | 0.031 | 0.003 | 0.133 |

Table 2. Electrophysiological parameters of cardiac microtissues generated in hanging drops.

| Age of hanging drop microtissues | Amplitude (mV) | MDP (mV) | APD50 (ms) | APD90 (ms) | APD 50/90 (%) | V_{\max} ($V s^{-1}$) | Frequency (Hz) |
|----------------------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|---------------------------|----------------|
| 24 h + 24 h | 23.90 ± 3.3 | -37.3 ± 1.97 | 40.54 ± 2.6 | 78.69 ± 5.43 | 51.55 ± 0.36 | 1.04 ± 0.26 | 2.4 ± 0.2 |
| 24 h + 48 h | 41.59 ± 4.29 | -48.03 ± 2.76 | 33.04 ± 3.04 | 60.63 ± 3.04 | 54.75 ± 0.97 | 2.94 ± 0.56 | 3.3 ± 0.48 |
| <i>p</i> -value | Amplitude | MDP | APD50 | APD90 | APD 50/90 | V_{\max} | Frequency |
| — | 0.037 | 0.045 | 0.013 | 0.014 | 0.074 | 0.068 | 0.201 |



of the microfluidics chip (1.3 mm). When injecting PNIPAAm solution without cells into the microfluidics chip and heating above the LCST, spheroids were generated and size of the spheroids was estimated. Most of the spheroids fall within the range of 695–740 μm . With a mean diameter of 718 μm , the volume of the spheroids was calculated as 0.194 μl . After 4 h the PNIPAAm spheroids

shrank to 490–549 μm , corresponding to a volume of 0.062–0.087 μl . It can be concluded that the volume was reduced by about 2.7-fold during the shrinking process. When this volume change is extrapolated to the density of cell suspensions in experiments where cells are encapsulated, the cell density increases from 1×10^7 cells ml^{-1} to about 2.7×10^7 cells ml^{-1} .

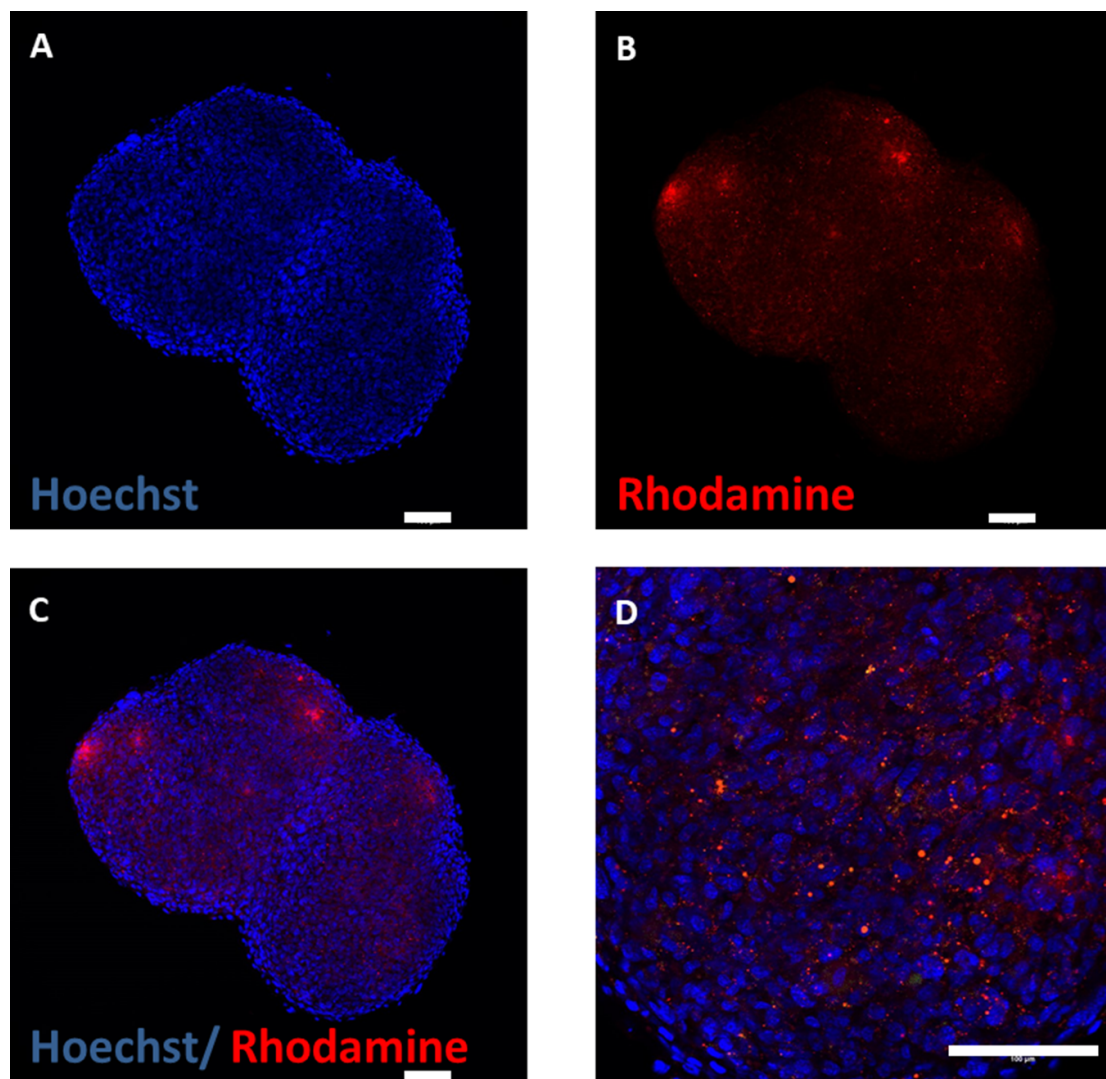


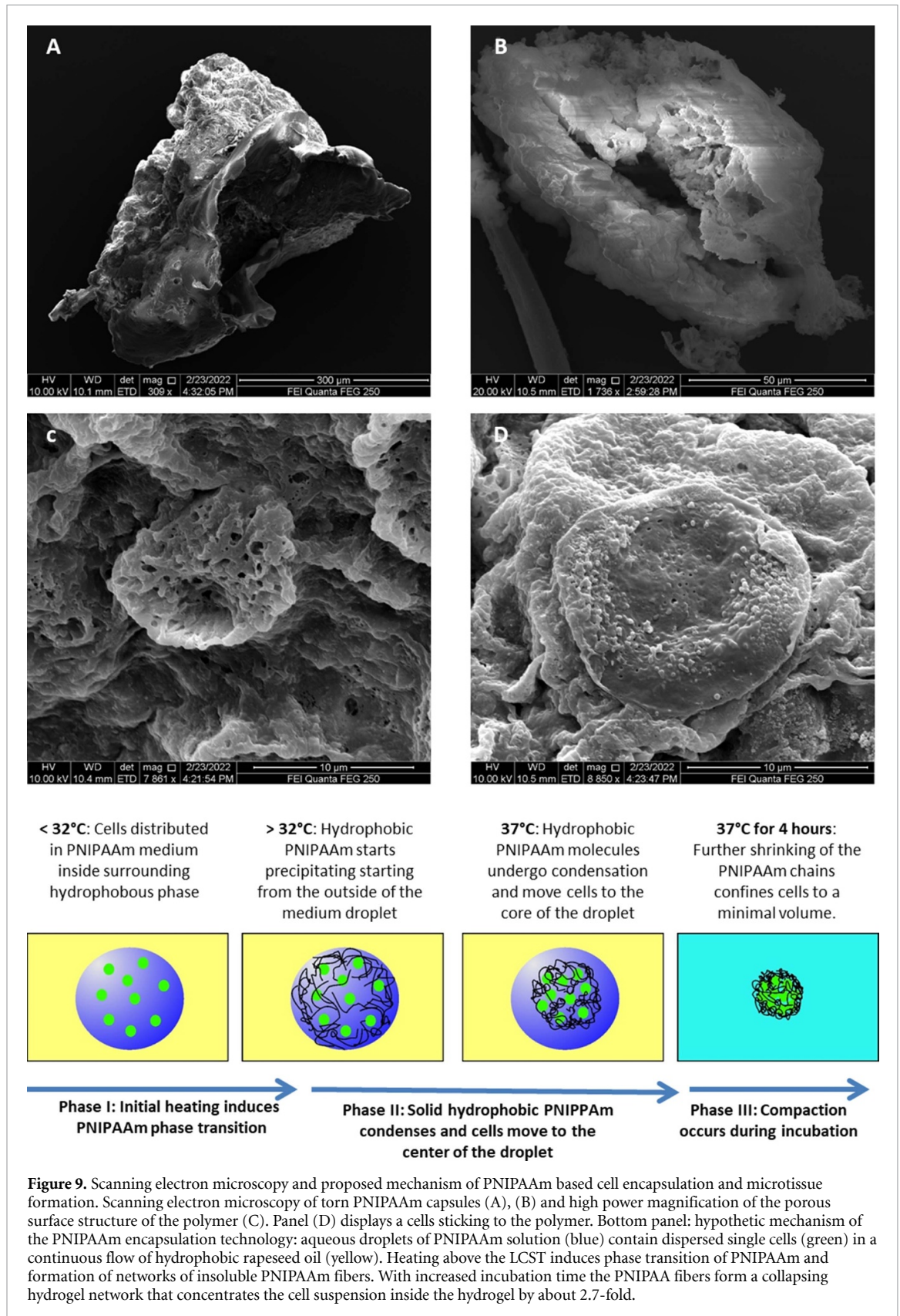
Figure 8. Microtissues were generated from MSCs by encapsulation in PNIPAAm-co-rhodamine. The PNIPAAm shell was washed off for 10 min at room temperature. After 24 h additional culture at 37 °C microtissues were analyzed for residues of PNIPAAm (red fluorescent). Nuclei were stained with Hoechst dye (blue). Scale bar 100 μm .

4. Discussion

In the present study, we demonstrate a novel technology for scalable generation of (cardiac) microtissues within 24 h. The polymer PNIPAAm was used to reversibly entrap cells in a shrinking shell of polymer. Changes in the temperature within a physiological range allowed for packing and unloading of the cells, respectively. As a proof-of-concept, single-cell suspensions of mesenchymal cells and miPSC-CMs were combined into functional cardiac microtissues that showed autonomous contractions, regular APs and progressing sarcomere organization. The novel technology markedly improves current methods of cardiac microtissue generation commonly relying on either small volume cultures (hanging drops) or specialized multiwell plates such as V-bottom plates.

The microfluidics setup employed in this study generated homogenous PNIPAAm spheroids either in the presence or absence of cells. It could be

estimated that the diameter of the PNIPAAm spheroids that form during heating of aqueous droplets of PNIPAAm solution above the LCST is significantly smaller than the diameter of aqueous droplets. After 4 h of maturation, the volume of the PNIPAAm spheroids was reduced 2.7-fold as compared to the initial droplet volume. We assume that PNIPAAm starts to precipitate starting at the water-oil interface in the microfluidics system (figure 9 panel (A)), resulting in an interwoven mesh of solid PNIPAAm fibers. While the temperature gradient in the droplet causes more and more PNIPAAm to convert into the insoluble form, the mesh starts shrinking from the outside of the droplet. This is explained by the expulsion of water from the hydrophobic polymer network. When cells are added to the system, the collapsing polymer network acts as a fishing net and condenses the cell suspension. It was found that 24 h of encapsulation are compatible with cell viability as indicated by the stable cell count of MSCs



and miPSC-CMs, calcein staining and low frequency of dead nuclei. Moreover, substantial expansion of encapsulated renal carcinoma cells was documented. Longer incubations in the polymer shell resulted in a significant reduction of viable cell counts and

can be explained by the space limitations inside the capsule or impaired nutrient and oxygen supply or both. It is advisable to test the optimal encapsulation period (also below 24 h) for individual experimental settings.

The proposed mechanism (figure 9, bottom panel) shows a potential explanation why PNIPAAm encapsulation generates homogenous and spherically shaped microtissues in short time intervals, while alginate-based methods fail to produce comparable effects. Although cell encapsulation has been widely applied using alginate, there is no comparable report of rapid cardiac microtissue generation available. A potential explanation is the lack of volume reduction during encapsulation when alginate is employed. Alginate capsules confine cells to isolated entities without altering the cell density. As a result, cells tend to aggregate into sub-capsule size cell clumps, but fail to form a single compact aggregate.

Electrophysiologically, PNIPAAm derived microtissues showed typical AP properties of immature fetal CMs with clear signs of maturation between 48 h and 14 days. Murine embryonic CMs show a decrease in APD50 and APD90 between embryonic day 8–10 and two weeks postpartum [30]. In our study APD50 and APD90 in PNIPAAm cluster decreased steadily from 48 h to 15 days cluster (table 1). Quality of CMs in PNIPAAm cluster seemed to degrade on day 15. Amplitude and upstroke velocity dropped between day 8 and day 15 strongly. Simultaneously, the standard error increased for most parameters, indicating higher variability in cell healthiness. Furthermore, successful AP measurements attempts dropped from 73.3% on day 8 to only 20.1% in 15 days old clusters. Taken together 15 days of incubation seem to be too long to ensure a high quality of CMs within the microtissues.

This is in line with a previous work on purified clusters of murine embryonic stem cell derived CMs [31]. These clusters lost their contractile activity with prolonged culture duration and on day 22 after onset of differentiation no organized sarcomeres were found [31]. The iPS-CMs that were used for encapsulation in the present study were on day 14 of differentiation. We found intact electrophysiology 24 and 72 h after release from the PNIPAAm capsules. This means that the cells were 14 days after start of differentiation from pluripotent cells plus 1 day in PNIPAAm plus 1–3 days in culture. This results in an age of 16–18 days counted from the day of initiation of stem cell differentiation. However, 7 days and 15 days after encapsulation cells are 22 and 30 days old. In conclusion, microtissues studied here perform better and keep their contractility longer than pure clusters of CMs. However, the size of the microtissues may be too excessive to support optimal cell survival and the occurrence of apoptotic cells supports this interpretation. Furthermore, it is known that the mechanical properties of the extracellular matrix are of key importance for long-term performance of CMs [31]. Therefore, lack of sufficient matrix support could serve as a further explanation for quality loss observed in old microtissues.

To compare PNIPAAm capsule-derived microtissues with other methods of cultivation, hanging drop cluster were produced and AP measurements were performed after 48 h and 72 h. Hanging drop cluster showed as expected AP properties of immature CMs to a large extent. However, in comparison to the PNIPAAm cluster, hanging drop cluster showed inferiority of AP quality already after 48 h. AP measurements revealed lower amplitude ($p = 0.026$) and MDP ($p = 0.01$) and AP shape showed higher variability without classification into defined AP subtypes (pacemaker, atria or ventricular like). Notably, after 72 h hanging drop cluster showed signs of degradation comparable to PNIPAAm cluster after 15 days. The success rate of AP measurements rapidly decreased from 63.5% at 48 h cluster to 27% in 72 h cluster. Most likely, this result is caused by the high number of cells used per hanging drop as the cell number was adapted to the number of cells in PNIPAAm capsule-derived microtissues. In conclusion, the PNIPAAm method provides scientists with more freedom to increase the starting cell number in microtissues while hanging drop based methods are more limited in this respect.

A potential advantage of the PNIPAAm based method compared to other strategies is the surface structure of the microtissues: shortly after release from the PNIPAAm shell the surface of the microtissue appears rugged. This can be explained by the formation of dense polymer networks (see figure 9(B)) that prevent formation of a surface tension-driven smooth surface of the microtissues. We speculate that the rugged surface structure results in improved microtissue-microtissue and microtissue-native tissue interactions in some applications such as 3D printing or transplantation.

Cardiac microtissues generated in this study not only show rhythmically autonomous contractions, but also further demonstrate a nascent sarcomere structure of immature CMs that show signs of increasing sarcomeres structural organization within only two days in culture. A trend to CM maturation of our encapsulated cardiac micro tissue is in line with the electrophysiological data that demonstrates a significant increase in upstroke velocity within two days of microtissue culture.

As a limitation of the study we found that PNIPAAm is not rapidly removed from the microtissues by a short washing period at room temperature. While the capsules dissolved within seconds, residues of PNIPAAm remained inside the microtissues. This problem can be addressed in the future by two strategies: firstly, the washing period at low temperature can be prolonged and microtissues can be washed under continuous agitation. Secondly, modifications of PNIPAAm engineered for better biocompatibility and biodegradability can be used [32, 33]. A further limitation is the limited scalability of the

process in its present form because cells show a tendency to sediment with gravity in the reservoir prior to encapsulation. Moreover, the setup does not allow oxygen supply to the cell reservoir. Engineering of a stirred and oxygen supplied cell reservoir could solve this problem in the future.

Altogether, we demonstrate, for the first time, an innovative method based on microfluidic PNIPAAm encapsulation. The method is robust and sufficient to generate viable and functional cardiac microtissues with physiological CMs function and a tendency toward earlier CMs maturation. The microfluidics-based PNIPAAm encapsulation introduced in this study allow for combining iPSC-CMs and MSCs; in general, the cellular composition of the microtissues is freely variable and only depends on the researcher's requirements. Therefore, the technology will be easily extended to include endothelial cells and further cell types as well. Notably, our approach is not only restricted to the cells that have been used in this study, but can be applied to any cell type(s) of choice.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available upon reasonable request from the authors.

Acknowledgments

We thankfully acknowledge financial support by the European Fund for Regional Development and the State of North Rhine-Westphalia grant no. EFRE-0801775, the Marga and Walter Boll Stiftung (Kerpen, Germany) and the German Research Foundation. We thank Dr Marek Molcanyi for help with the design of figure 1(F). The microfluidics part was designed and produced at the central workshop of the medical faculty, Cologne by Oliver Feierabend, Hans-Josef Reimer, Robert Schumacher, Cedric Wolff and Kristina Triller.

ORCID iD

Kurt Pfannkuche  <https://orcid.org/0000-0002-4284-774X>

References

- [1] Kurosawa H 2007 Methods for inducing embryoid body formation: *in vitro* differentiation system of embryonic stem cells *J. Biosci. Bioeng.* **103** 389–98
- [2] Kolosov E *et al* 2006 Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium *J. Exp. Med.* **203** 2315–27
- [3] Hamad S, Derichsweiler D, Papadopoulos S, Nguemo F, Saric T, Sachinidis A, Brockmeier K, Hescheler J, Boukens B J and Pfannkuche K 2019 Generation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in 2D monolayer and scalable 3D suspension bioreactor cultures with reduced batch-to-batch variations *Theranostics* **9** 7222–38
- [4] Kattman S J, Witty A D, Gagliardi M, Dubois N C, Niapour M, Hotta A, Ellis J and Keller G 2011 Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines *Cell Stem Cell* **8** 228–40
- [5] Lian X, Hsiao C, Wilson G, Zhu K, Hazeltine L B, Azarin S M, Raval K K, Zhang J, Kamp T J and Palecek S P 2012 Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109** E1848–57
- [6] Lian X, Zhang J, Azarin S M, Zhu K, Hazeltine L B, Bao X, Hsiao C, Kamp T J and Palecek S P 2013 Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/beta-catenin signaling under fully defined conditions *Nat. Protocols* **8** 162–75
- [7] Kempf H, Kropp C, Olmer R, Martin U and Zweigerdt R 2015 Cardiac differentiation of human pluripotent stem cells in scalable suspension culture *Nat. Protocols* **10** 1345–61
- [8] Sahito R G A *et al* 2019 *In vitro* grown micro-tissues for cardiac cell replacement therapy *in vivo* *Cell. Physiol. Biochem.* **52** 1309–24
- [9] Rubach M *et al* 2014 Mesenchymal stem cells and their conditioned medium improve integration of purified induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte clusters into myocardial tissue *Stem Cells Dev.* **23** 643–53
- [10] Monsanto M M *et al* 2020 Enhancing myocardial repair with CardioClusters *Nat. Commun.* **11** 3955
- [11] Giacomelli E *et al* 2020 Human-iPSC-derived cardiac stromal cells enhance maturation in 3D cardiac microtissues and reveal non-cardiomyocyte contributions to heart disease *Cell Stem Cell* **26** 862–79 e11
- [12] Daly A C, Davidson M D and Burdick J A 2021 3D bioprinting of high cell-density heterogeneous tissue models through spheroid fusion within self-healing hydrogels *Nat. Commun.* **12** 753
- [13] Liu J, Miller K, Ma X, Dewan S, Lawrence N, Whang G, Chung P, McCulloch A D and Chen S 2020 Direct 3D bioprinting of cardiac micro-tissues mimicking native myocardium *Biomaterials* **256** 120204
- [14] Burdis R and Kelly D J 2021 Biofabrication and bioprinting using cellular aggregates, microtissues and organoids for the engineering of musculoskeletal tissues *Acta Biomater.* **126** 1–14
- [15] Pfannkuche K *et al* 2010 Fibroblasts facilitate the engraftment of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes on three-dimensional collagen matrices and aggregation in hanging drops *Stem Cells Dev.* **19** 1589–99
- [16] Polonchuk L, Chabria M, Badi L, Hofflack J C, Figtree G, Davies M J and Gentile C 2017 Cardiac spheroids as promising *in vitro* models to study the human heart microenvironment *Sci. Rep.* **7** 7005
- [17] Figtree G A, Bubbs K J, Tang O, Kizana E and Gentile C 2017 Vascularized cardiac spheroids as novel 3D *in vitro* models to study cardiac fibrosis *Cells Tissues Organs* **204** 191–8
- [18] Antonchuk J 2013 Formation of embryoid bodies from human pluripotent stem cells using AggreWell plates *Methods Mol. Biol.* **946** 523–33
- [19] Thavandiran N *et al* 2013 Design and formulation of functional pluripotent stem cell-derived cardiac microtissues *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110** E4698–707
- [20] Goldfracht I *et al* 2019 Engineered heart tissue models from hiPSC-derived cardiomyocytes and cardiac ECM for disease modeling and drug testing applications *Acta Biomater.* **92** 145–59
- [21] Riegler J *et al* 2015 Human engineered heart muscles engraft and survive long term in a rodent myocardial infarction model *Circ. Res.* **117** 720–30
- [22] Tiruvannamalai Annamalai R, Rioja A Y, Putnam A J and Stegemann J P 2016 Vascular network formation by human microvascular endothelial cells in modular fibrin microtissues *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2** 1914–25

- [23] Dhamecha D, Movsas R, Sano U and Menon J U 2019 Applications of alginate microspheres in therapeutics delivery and cell culture: past, present and future *Int. J. Pharm.* **569** 118627
- [24] Chayosumrit M, Tuch B and Sidhu K 2010 Alginate microcapsule for propagation and directed differentiation of hESCs to definitive endoderm *Biomaterials* **31** 505–14
- [25] Bai X P, Zheng H X, Fang R, Wang T R, Hou X L, Li Y, Chen X B and Tian W M 2011 Fabrication of engineered heart tissue grafts from alginate/collagen barium composite microbeads *Biomed. Mater.* **6** 045002
- [26] Abecasis B, Canhao P G M, Almeida H V, Calmeiro T, Fortunato E, Gomes-Alves P, Serra M and Alves P M 2020 Toward a microencapsulated 3D hiPSC-derived *in vitro* cardiac microtissue for recapitulation of human heart microenvironment features *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8** 580744
- [27] Otake K, Inomata H, Konno M and Saito S 1990 Thermal-analysis of the volume phase-transition with N-isopropylacrylamide gels *Macromolecules* **23** 283–9
- [28] Semmler J, Lehmann M, Pfannkuche K, Reppel M, Hescheler J and Nguemo F 2014 Functional expression and regulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels (HCN) in mouse iPS cell-derived cardiomyocytes after UTF1-neo selection *Cell. Physiol. Biochem.* **34** 1199–215
- [29] Halbach M, Pillekamp F, Brockmeier K, Hescheler J, Muller-Ehmsen J and Reppel M 2006 Ventricular slices of adult mouse hearts—a new multicellular *in vitro* model for electrophysiological studies *Cell. Physiol. Biochem.* **18** 1–8
- [30] Peinkofer G, Burkert K, Urban K, Krausgrill B, Hescheler J, Saric T and Halbach M 2016 From early embryonic to adult stage: comparative study of action potentials of native and pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes *Stem Cells Dev.* **25** 1397–406
- [31] Heras-Bautista C O *et al* 2014 The influence of physiological matrix conditions on permanent culture of induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes *Biomaterials* **35** 7374–85
- [32] Gan J Q, Guan X X, Zheng J, Guo H L, Wu K, Liang L Y and Lu M G 2016 Biodegradable, thermoresponsive PNIPAM-based hydrogel scaffolds for the sustained release of levofloxacin *RSC Adv.* **6** 32967–78
- [33] Wang F, Li Z, Khan M, Tamama K, Kuppusamy P, Wagner W R, Sen C K and Guan J 2010 Injectable, rapid gelling and highly flexible hydrogel composites as growth factor and cell carriers *Acta Biomater.* **6** 1978–91

4. Diskussion

In dieser Arbeit ist es gelungen, homogene MTs aus murinen iPSC-CMs und MSCs mit einer Inkubationszeit von nur 24 Stunden herzustellen. Als Ausgangsmaterial dienten Suspensionen vereinzelter Zellen muriner MSCs und iPSC-CMs mit einer Konzentration von 10×10^6 Zellen/mL. Die Zellen wurden mithilfe eines Mikrofluidiksystems im thermoresponsiven Polymer PNIPAAm verkapselt. Nach 24 Stunden Inkubationszeit bei 37°C konnte das Polymer ausgewaschen und die entstandenen MTs gesammelt werden. Diese MTs waren kompakt und wiesen reproduzierbar eine sphärische Form auf. Sie zeigten initial typische Aktionspotenziale (APs) unreifer Kardiomyozyten. Über die weitere Inkubationszeit zeigten die gemessenen APs von Tag 2 bis Tag 15 klare Zeichen der Reifung. Auch die Sarkomerorganisation verbesserte sich innerhalb von nur 48 Stunden Inkubation.

Insgesamt präsentiert die Arbeit eine neue und potenziell skalierbare Methode, um uniforme und viable kardiale Mikrogewebe zu produzieren.

Im Vergleich mit bisherigen Methoden zur Herstellung (kardialer) MTs ergeben sich durch die präsentierte Art der Mikrogewebegenerierung neue Vorteile.

Im Gegensatz zur Kultur im hängenden Tropfen bietet die polymerbasierte Technik die Möglichkeit, die Produktion uniformer Mikrogewebe in Zukunft in einem kontinuierlichen Workflow zu skalieren.

Mit dieser Skalierung wären ohne gesteigerten Aufwand größere Stückzahlen kardialer Mikrogewebe zu erreichen. Die Relevanz dieser Perspektive liegt darin begründet, dass Testreihen am Großtiermodell oder am Menschen eine große Zahl an Zellen beziehungsweise Zellclustern benötigen. Um diese mit der herkömmlichen Kulturmethode im hängenden Tropfen zu erreichen, wären spezialisierte Pipettierroboter nötig.

Um im konkreten Fall die Qualität der Cluster aus der PNIPAAm-basierten Kulturmethode mit jenen aus der Kultur im hängenden Tropfen zu vergleichen, wurden die APs beurteilt. Die APs von CMs aus den Clustern, die im hängenden Tropfen kultiviert wurden, zeigten nach 24 Stunden Inkubation zumeist Eigenschaften von APs unreifer Kardiomyozyten. Doch schon zu diesem frühen Zeitpunkt waren sie im Vergleich zu den APs der Cluster aus der PNIPAAm-Verkapselung unreifer und in ihrer Form heterogener. Das zeigte sich durch geringere Amplituden der APs, ein reduziertes maximales Potenzial in der Diastole und eine insgesamt größere Variabilität der APs, ohne dass eine Unterteilung in bestimmte AP-Typen möglich wäre. Nach 48 Stunden Inkubation sank die Rate der erfolgreichen AP-Messungen an den Clustern aus der Kultur im hängenden Tropfen von 67% auf 27%. Dies ist vergleichbar mit dem Rückgang der erfolgreichen Messungen an den PNIPAAm-Clustern über einen

Zeitraum von 15 Tagen und deutet auf eine relevante Reduktion der CM-Viabilität in den Clustern hin.

Eine andere viel genutzte Methode zur Herstellung von MTs bedient sich sogenannter V-Boden-Platten. Diese Platten weisen kleine konische Vertiefungen auf. Wird eine Zellsuspension in diese Vertiefungen gegeben, sinken die enthaltenen Zellen an den tiefsten Punkt hinab und wachsen dort zu sphärischen Clustern zusammen⁷⁷. Durch Zentrifugation kann dieser Prozess noch beschleunigt werden¹⁰⁵. Spezielle Formen der Vertiefungen oder Materialien, die eine Adhäsion der Zellen an die Gefäßwand erschweren, versprechen eine weiter gesteigerte Effizienz dieser Methode¹⁰⁶. Mit V-Boden-Platten lassen sich insgesamt in einem einfachen Prozess uniforme sphärische MTs mit einer gut steuerbaren Zellzahl produzieren. Die Nachteile der Methode liegen im großen Aufwand beim Befüllen der Vertiefungen sowie der Abhängigkeit von den spezialisierten Platten.

Vergleicht man die in dieser Arbeit präsentierte Technik mit der Mikrogewebegenerierung in V-Boden-Platten, so ist die bessere Skalierbarkeit zu betonen. Darüber hinaus sind alle Teile des Mikrofluidiksystems sterilisierbar und wiederverwendbar. Durch die dichte und unregelmäßige Struktur des Polymers wird außerdem die Ausbildung einer glatten Oberfläche der Zellaggregate verhindert. Möglicherweise wird durch die größere und unregelmäßigere Oberfläche das Anwachsen von MTs an natives Gewebe bei der Transplantation oder die Interaktion mehrerer MTs (bspw. beim 3D-Druck) verbessert.

Auch gegenüber Methoden, die Mikrogewebe durch Verkapselung generieren, ergeben sich Vorteile:

Finklea et al. zeigten bereits einen mikrofluidikbasierten und somit grundsätzlich skalierbaren Ansatz zur Generierung sphärischer MTs. Diese wurden durch die Verkapselung und anschließende kardiale Differenzierung humaner iPSCs in einer PEG-Fibrinogen-Matrix erzeugt. Zwar zeigten die CMs eine gute Funktionalität, im Vergleich zur hier präsentierten Methode fehlt jedoch die Möglichkeit, weitere Zelltypen in die MTs einzubringen.¹⁰⁷

Im Gegensatz zur Zellverkapselung mit Alginate erlaubt die Wahl von PNIPAAm den Zellen, in der Polymerhülle ein einzelnes Aggregat zu formen. Dies führen wir vor allem auf den Umstand zurück, dass PNIPAAm im Rahmen seines Phasenübergangs eingeschlossenes Wasser verdrängt¹⁰⁸. Zwar weisen die Daten aus der Experimentreihe mit Karzinomzellen auch auf eine Zellproliferation in den PNIPAAm-Sphäroiden hin, der entscheidende Vorgang dürfte jedoch das Zusammenbringen der Zellen durch das Schrumpfen der Sphäroide sein: Im Tropfen im Mikrofluidikchip liegen die PNIPAAm-Moleküle zunächst gut durchmischt mit den Zellen vor. Wenn sich das Polymer durch das Erwärmen über seine LCST im

Phasenübergang befindet, wird innerhalb der Tropfen Wasser nach außen verdrängt. Zeitgleich lagern sich die Moleküle des Polymers aufgrund hydrophober Wechselwirkungen zusammen. Dieser Prozess setzt mit dem Überschreiten der LCST an der Grenzfläche der wässrigen Phase ein und schreitet dann in den PNIPAAm-haltigen Zellsuspensionstropfen gerichtet von außen nach innen fort. Dabei werden die vom Polymer umschlossenen Zellen vermutlich im Zentrum der Sphäroide konzentriert.

Bereits im Mikrofluidiksystem lässt sich eine Reduktion des Sphäroiddurchmessers durch den Phasenübergang beobachten. Zusätzlich stützt das nachgewiesene Schrumpfen der Polymersphäroide in den ersten vier Stunden der Inkubation die Hypothese, dass das Polymer die Zellen aufeinander zu bewegt. Das Volumen der Sphäroide reduzierte sich ungefähr um den Faktor 2,7. Entsprechend wird die Konzentration der Zellen rechnerisch von 10^7 Zellen/mL auf $2,7 \times 10^7$ Zellen/mL erhöht. Die größere Nähe zwischen den Zellen könnte das Ausbilden neuer Zell-Zell-Kontakte während der weiteren Inkubation vereinfachen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass durch eine Steigerung der PNIPAAm-Konzentration bereits nach vier Stunden reine MSC-Zellaggregate entstehen können. Der früheste Zeitpunkt für tiefergehende Analysen von Clustern aus CMs und MSCs lag jedoch bei 24 Stunden nach der Verkapselung.

In diesen Analysen war zu beobachten, dass die Zellzahlen in Aggregaten aus CMs und MSCs mit längerer Inkubationszeit sanken. Das deutet auf negative Effekte einer längeren Inkubationszeit im Polymer hin. Diese könnten durch mechanischen Stress oder mangelhafte Diffusion von Sauerstoff und / oder Nährstoffen im Polymer begründet sein.

Durch eine verkürzte Zeit in der Polymerkapsel lassen sich die Zellen bei unverändert gutem Zusammenwachsen möglicherweise schonen. Daher sollten neue Experimente geplant werden, in denen CMs und MSCs gemeinsam in PNIPAAm-Lösungen mit einer Konzentration zwischen 1,8% und 3,6% verkapselt werden. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten im Polymer sollten nach dem Auswaschen des PNIPAAms dann Tests zur Beurteilung der Clustermorphologie und Zellviabilität folgen.

Auch wenn eine kürzere Zeit im Polymer die Zellen möglicherweise schonen kann, zeigten die stabile Zellzahl, die Calcein-Färbung und die geringe Anzahl toter Nuclei nach einer Inkubation von 24 Stunden im Polymer in den bisherigen Analysen eine zufriedenstellend hohe Viabilität der verkapselten Zellen. CMs in den Aggregaten zeigten nach dem Lösen aus dem Polymer rhythmische, autonome Kontraktionen. Ihre Sarkomerorganisation war noch unreif.

Die Sarkomerorganisation diene ebenso wie die elektrophysiologische Beurteilung der Aktionspotenziale zur Einschätzung der weiteren Reifung der CMs im Zellverbund. Wurden die Zellaggregate nach dem Lösen aus dem Polymer weitere 48 Stunden inkubiert, zeigte sich

bereits eine verbesserte Sarkomerorganisation.

Auch die gemessenen Aktionspotenziale der PNIPAAm-Cluster zeigten über den Zeitraum von 15 Tagen eine Reifung. Typischerweise nimmt die Dauer des Aktionspotenzials bis 50% bzw. 90% Repolarisation (APD_{50} bzw. APD_{90}) bei murinen embryonalen CMs zwischen den embryonalen Tagen 8 und 10 sowie in den ersten zwei Wochen postpartum ab¹⁰⁹. Analog sanken die APD_{50} und APD_{90} der Cluster, die durch PNIPAAm-Verkapselung gewonnen wurden. Während Parameter wie die APD_{50} und APD_{90} sowie die Aufstrichgeschwindigkeit und Amplitude der APs eine Reifung bis Tag 8 nahelegen, sanken zwischen Tag 8 und Tag 15 die Amplitude und Aufstrichgeschwindigkeit wieder. Auch der wachsende Standardfehler und ein abnehmender Anteil erfolgreicher AP-Messungen an Tag 15 deuten darauf hin, dass die Viabilität der CMs zunehmend stärker variierte.

Insgesamt scheint eine Inkubationszeit von 15 Tagen zu lang, um eine zufriedenstellende Qualität der CMs in den Zellaggregaten zu gewährleisten. Das steht im Einklang mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen an Clustern aus murinen ES-CMs. Hier nahm die Frequenz der spontanen Kontraktionen mit zunehmender Dauer der Kultur ab. An Tag 20 nach Beginn der Differenzierung und damit an Tag 12 nach dem Auftreten der differenzierten CMs, waren in Aggregaten aus CMs in Suspension immunhistochemisch keine organisierten Sarkomere mehr nachweisbar¹¹⁰. Die iPSC-CMs in dieser Arbeit wurden an Tag 14 ihrer Differenzierung in PNIPAAm verkapselt, entsprechend einem Alter der CMs von 6 Tagen. Nach einem weiteren Tag wurde das PNIPAAm ausgewaschen und die Cluster bis zur AP-Messung 8 Tage lang inkubiert. So ergibt sich ein rechnerisches Alter von 23 Tagen nach Start der Differenzierung. Die hier untersuchte Methode ermöglicht es CMs also, ihre Kontraktilität in Clustern für eine längere Zeit zu halten.

Nichtsdestotrotz finden sich mit zunehmender Kulturdauer mehr apoptotische Zellen in den Clustern. Mögliche Erklärungen liegen in der fehlenden mechanischen Unterstützung durch extrazelluläre Matrix oder in der Größe der Cluster, die eine suffiziente Versorgung durch Diffusion erschwert. Für eine fehlende mechanischen Unterstützung spricht die beobachtete noch unreife Sarkomerorganisation der CMs. In einer früheren Studie der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass murine iPSC-CMs auf elastischen Polymeroberflächen in zweidimensionaler Kultur über mindestens 7 Wochen (längere Zeiten nicht untersucht) kultiviert werden können¹¹⁰.

Um einer möglichen Unterversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen vorzubeugen, ist die Untersuchung von MTs mit einem geringeren Durchmesser interessant. Die vorliegende Arbeit zeigt bereits, dass mit der erarbeiteten Methode grundsätzlich auch kleinere Cluster herstellbar sind. Während die Flussgeschwindigkeit der Zellsuspension konstant gehalten wurde, konnte

der Durchmesser der Zellsphäroide durch Variation der Flussgeschwindigkeit der hydrophoben Phase verändert werden.

Eine zweite Möglichkeit zur künftigen Anpassung der Aggregatgröße bietet sich vor allem durch eine Änderung des Kanaldurchmessers im Mikrofluidikchip.

Neben der Größe der produzierten Aggregate gibt es noch weitere Gründe für die technische Optimierung des Mikrofluidiksystems.

So liegt beispielsweise die Effizienz der Verkapselung aktuell bei nur 50,39%: Bei einer Konzentration von 10×10^6 Zellen/mL wären in einem Tropfen mit einem Volumen von $0,89 \mu\text{L}$ 8900 Zellen zu erwarten. Die nach 24 Stunden Inkubation vermessenen Zellaggregate bestanden im Mittel jedoch aus 4485 Zellen. Ein Teil dieser Diskrepanz ist mit dem unvollständigen Umschließen und Zusammenführen der Zellen durch das Polymer erklärbar. In der Konstruktion des Mikrofluidiksystems gibt es jedoch auch noch Stellen, an denen Zellen wegen der geringen Flussgeschwindigkeit absinken können. So setzten sich beispielsweise in der Aufweitung der Luer/Lock-Verbindung zwischen dem Zuführschlauch und der Kanüle des Chips Zellen auf dem Boden ab.

Dieses Sedimentationsproblem zeigt sich im Fertigungsprozess der Zellaggregate auch an einer weiteren Stelle: Wenn der mittlere Zuführschlauch mit der Zellsuspension und der PNIPAAm-Lösung beschickt wurde, begannen die Zellen abzusinken. Je mehr Zeit also zwischen dem Beschicken des mittleren Zuführschlauchs und der letzten Verkapselung in einem Fertigungsdurchgang vergeht, desto unterschiedlicher ist die Zahl der Zellen pro Polymerkapsel. Um diesem Phänomen entgegenzuwirken, wurde mit Volumina von $200 \mu\text{L}$ pro Fertigungsdurchgang gearbeitet. Die daraus resultierende Stückzahl an Sphäroiden pro Fertigungsdurchgang ist noch gering und den Zahlen unterlegen, die beispielsweise mit einem Pipettierroboter und V-Boden-Platten erreichbar wären.

Die zugrundeliegende Technik ermöglicht jedoch grundsätzlich eine skalierbare MT-Produktion: Anstatt die Zellsuspensionen wie bisher in Spritzen umzufüllen, könnten beispielsweise an die Zufuhrschläuche großvolumige Behälter mit den entsprechenden Lösungen angeschlossen werden. Wenn diese für eine gute Durchmischung kontinuierlich gerührt werden und eine ausreichende Sauerstoffzufuhr sichergestellt ist, kann mit Hilfe automatischer Ventile der Fluss der Zellsuspension / PNIPAAm-Lösung und des Öls sehr genau gesteuert werden¹¹¹.

Weitere Optimierung ist auch in Hinsicht auf das in den Aggregaten verbleibende Polymer notwendig. Zwar löste sich die eigentliche PNIPAAm-Kapsel während des Waschens bei Raumtemperatur schnell auf, die Versuche mit dem rhodamingekoppelten PNIPAAm zeigten jedoch noch Polymerrückstände im Kern der Zellaggregate. Um diese Rückstände zu

entfernen, könnte das Auswaschen bei Raumtemperatur über einen längeren Zeitraum und unter anhaltender Bewegung erfolgen. Eine andere Möglichkeit ist die Konjugation von PNIPAAm, um einen biologischen Abbau des Polymers zu ermöglichen^{96,112}.

Auch ohne die beschriebenen Umbauten können mit der präsentierten Technik ohne großen Aufwand weitere Versuchsreihen mit kardialen MTs vorbereitet werden. So ist zum Beispiel interessant, welche Zellzahl und welches Mengenverhältnis zwischen MSCs und iPSC-CMs die größten Synergieeffekte in der Cokultur bietet.

Bisher wurden Aggregate aus Zellen eines humanen Nierenzellkarzinoms, aus murinen MSCs sowie Zellaggregate aus murinen MSCs mit murinen iPSC-CMs hergestellt. Auch wenn der Beweis noch aussteht, lässt sich vermuten, dass die präsentierten Cluster um weitere Zelltypen ergänzt, beziehungsweise die Technik auf andere Zelltypen übertragen werden kann.

Zunächst könnten beispielsweise neben den MSCs und CMs noch endotheliale (Progenitor-) Zellen in die Zellaggregate integriert werden. Weiterhin sollte die Verkapselung humaner Zellen, die Relevanz für das kardiale Tissue Engineering besitzen, erprobt werden.

Vieles spricht dafür, dass mithilfe der beschriebenen Methode „maßgeschneiderte“ MTs herstellbar sein könnten. Die Möglichkeit der Skalierung macht Testreihen zur Transplantation von kardialen 3D-MTs an Großtiermodellen denkbar. Da dreidimensionale Mikrogewebe auch als Ausgangsmaterial zum 3D-Druck⁷⁵ und zur Erprobung neuer Medikamente¹¹³ immer populärer werden, könnte diese robuste und gegebenenfalls skalierbare Methode in diesen Feldern den Fortschritt beschleunigen.

4.1. Fazit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methode zur zuverlässigen Produktion kardialer MTs in großer Stückzahl zu entwickeln.

In diesem Rahmen wurde erstmals ein Mikrofluidiksystem zur Verkapselung von Zellen in PNIPAAm genutzt. Mit dieser Technik konnten homogene 3D-Cluster aus murinen MSCs und iPSC-CMs produziert werden. Diese kardialen MTs zeigten eine hohe Zellviabilität, eine gute Funktion der CMs und Hinweise auf eine schnellere Reifung der CMs.

Der modulare Aufbau des Mikrofluidiksystems und die Verwendung einer Zellsuspension als Ausgangsstoff erlauben eine einfache Modifikation der Gewebeeigenschaften. In Zukunft können also die Zusammensetzung und die Größe der Zellaggregate an die jeweilige Forschungsfrage angepasst werden.

5. Literaturverzeichnis

1. Vos T, Lim SS, Abbafati C, et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet* 2020; **396**(10258): 1204-22.
2. Gößwald A, Schienkiewitz A, Nowossadeck E, Busch MA. Prävalenz von Herzinfarkt und koronarer Herzkrankheit bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 2013; **56**(5-6): 650-5.
3. Schmidt M, Jacobsen JB, Lash TL, Botker HE, Sorensen HT. 25 year trends in first time hospitalisation for acute myocardial infarction, subsequent short and long term mortality, and the prognostic impact of sex and comorbidity: a Danish nationwide cohort study. *BMJ* 2012; **344**(jan25 2): e356-e.
4. Koopman C, Bots ML, Van Oeffelen AAM, et al. Population trends and inequalities in incidence and short-term outcome of acute myocardial infarction between 1998 and 2007. *International Journal of Cardiology* 2013; **168**(2): 993-8.
5. Sulo G, Igland J, Sulo E, et al. Mortality following first-time hospitalization with acute myocardial infarction in Norway, 2001-2014: Time trends, underlying causes and place of death. *Int J Cardiol* 2019; **294**: 6-12.
6. Kuch B, Heier M, Von Scheidt W, Kling B, Hoermann A, Meisinger C. 20-year trends in clinical characteristics, therapy and short-term prognosis in acute myocardial infarction according to presenting electrocardiogram: the MONICA/KORA AMI Registry (1985-2004). *Journal of Internal Medicine* 2008; **264**(3): 254-64.
7. Bahit MC, Kochar A, Granger CB. Post-Myocardial Infarction Heart Failure. *JACC: Heart Failure* 2018; **6**(3): 179-86.
8. Sulo G, Sulo E, Jørgensen T, et al. Ischemic heart failure as a complication of incident acute myocardial infarction: Timing and time trends: A national analysis including 78,814 Danish patients during 2000-2009. *Scand J Public Health* 2020; **48**(3): 294-302.
9. Cleland JGF. Epidemiology and management of heart failure and left ventricular systolic dysfunction in the aftermath of a myocardial infarction. *Heart* 2005; **91**(suppl_2): ii7-ii13.
10. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990; **81**(4): 1161-72.
11. Eschenhagen T, Bolli R, Braun T, et al. Cardiomyocyte Regeneration. *Circulation* 2017; **136**(7): 680-6.
12. Sutton MGSJ, Sharpe N. Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circulation* 2000; **101**(25): 2981-8.
13. Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory Cytokines and Postmyocardial Infarction Remodeling. *Circulation Research* 2004; **94**(12): 1543-53.
14. Francis GS, Goldsmith SR, Levine TB, Olivari MT, Cohn JN. The neurohumoral axis in congestive heart failure. *Ann Intern Med* 1984; **101**(3): 370-7.
15. Tanai E, Frantz S. Pathophysiology of Heart Failure. *Compr Physiol* 2015; **6**(1): 187-214.
16. Statistisches Bundesamt (Destatis). Tiefgegliederte Diagnosedaten der Krankenhauspatientinnen und -patienten. 03.11.2022. https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Krankenhaeuser/Publikationen/Downloads-Krankenhaeuser/tiefgegliederte-diagnosedaten-5231301217015.xlsx?__blob=publicationFile (zuletzt besucht am 18.05.2023).

17. Zugck C, Müller A, Helms TM, et al. Gesundheitsökonomische Bedeutung der Herzinsuffizienz: Analyse bundesweiter Daten. *Dtsch Med Wochenschr* 2010; **135**(13): 633-8.
18. Shah KS, Xu H, Matsouaka RA, et al. Heart Failure With Preserved, Borderline, and Reduced Ejection Fraction. *Journal of the American College of Cardiology* 2017; **70**(20): 2476-86.
19. Eurotransplant Statistics Report Library. Active heart waiting list (at year-end) in All ET, by _____ year, by _____ country. 07.02.2023. https://statistics.eurotransplant.org/index.php?search_type=&search_organ=heart&search_region=All+ET&search_period=by+year&search_characteristic=&search_text= (zuletzt besucht am 18.05.2023).
20. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal* 2021.
21. Pitt B, Remme W, Zannad F, et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003; **348**(14): 1309-21.
22. McMurray JJ. Clinical practice. Systolic heart failure. *N Engl J Med* 2010; **362**(3): 228-38.
23. Pfeffer MA, Braunwald E, Moyé LA, et al. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med* 1992; **327**(10): 669-77.
24. Lesman-Leegte I, Jaarsma T, Coyne JC, Hillege HL, Van Veldhuisen DJ, Sanderman R. Quality of life and depressive symptoms in the elderly: a comparison between patients with heart failure and age- and gender-matched community controls. *J Card Fail* 2009; **15**(1): 17-23.
25. Hobbs FDR, Kenkre JE, Roalfe AK, Davis RC, Hare R, Davies MK. Impact of heart failure and left ventricular systolic dysfunction on quality of life. A cross-sectional study comparing common chronic cardiac and medical disorders and a representative adult population. *European Heart Journal* 2002; **23**(23): 1867-76.
26. Tsao CW, Lyass A, Enserro D, et al. Temporal Trends in the Incidence of and Mortality Associated With Heart Failure With Preserved and Reduced Ejection Fraction. *JACC: Heart Failure* 2018; **6**(8): 678-85.
27. Binet JP, Carpentier A, Langlois J, Duran C, Colvez P. [Implantation of heterogenic valves in the treatment of aortic cardiopathies]. *C R Acad Hebd Seances Acad Sci D* 1965; **261**(25): 5733-4.
28. Längin M, Mayr T, Reichart B, et al. Consistent success in life-supporting porcine cardiac xenotransplantation. *Nature* 2018; **564**(7736): 430-3.
29. Cooper DK, Human PA, Lexer G, et al. Effects of cyclosporine and antibody adsorption on pig cardiac xenograft survival in the baboon. *J Heart Transplant* 1988; **7**(3): 238-46.
30. Tallacchini M. Defining an appropriate ethical, social and regulatory framework for clinical xenotransplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; **13**(2): 159-64.
31. Cengiz N, Wareham CS. Ethical considerations in xenotransplantation: a review. *Curr Opin Organ Transplant* 2020; **25**(5): 483-8.
32. Sautermeister J, Mathieu R, Bogner V. Xenotransplantation-theological-ethical considerations in an interdisciplinary symposium. *Xenotransplantation* 2015; **22**(3): 174-82.

33. Cooper DKC, Gaston R, Eckhoff D, et al. Xenotransplantation-the current status and prospects. *Br Med Bull* 2018; **125**(1): 5-14.
34. Rothblatt M. Commentary on achievement of first life-saving xenoheart transplant. *Xenotransplantation* 2022: e12746.
35. European Medicines Agency. European public assessment report (EPAR) for Spinraza. 02.02.2022. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/spinraza> (zuletzt besucht am 03.05.2022).
36. US Food and Drug Administration. Cellular & Gene Therapy Products - IMLYGIC. 09.12.2021. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/imlygic> (zuletzt besucht am 03.05.2022).
37. Pharmaceutical and Medical Devices Agency of Japan. List of Approved Products - New Regenerative Medical products. 26.03.2019. <https://www.pmda.go.jp/files/000232655.pdf> (zuletzt besucht am 03.05.2022).
38. Greenberg B, Butler J, Felker GM, et al. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in patients with cardiac disease (CUPID 2): a randomised, multinational, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *The Lancet* 2016; **387**(10024): 1178-86.
39. Hulot JS, Salem JE, Redheuil A, et al. Effect of intracoronary administration of AAV1/SERCA2a on ventricular remodelling in patients with advanced systolic heart failure: results from the AGENT-HF randomized phase 2 trial. *Eur J Heart Fail* 2017; **19**(11): 1534-41.
40. Stewart DJ, Hilton JD, Arnold JM, et al. Angiogenic gene therapy in patients with nonrevascularizable ischemic heart disease: a phase 2 randomized, controlled trial of AdVEGF(121) (AdVEGF121) versus maximum medical treatment. *Gene Ther* 2006; **13**(21): 1503-11.
41. Chung ES, Miller L, Patel AN, et al. Changes in ventricular remodelling and clinical status during the year following a single administration of stromal cell-derived factor-1 non-viral gene therapy in chronic ischaemic heart failure patients: the STOP-HF randomized Phase II trial. *Eur Heart J* 2015; **36**(33): 2228-38.
42. Bartunek J, Terzic A, Davison BA, et al. Cardiopoietic cell therapy for advanced ischemic heart failure: results at 39 weeks of the prospective, randomized, double blind, sham-controlled CHART-1 clinical trial. *European Heart Journal* 2016: ehw543.
43. Mathiasen AB, Qayyum AA, Jørgensen E, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment in patients with ischaemic heart failure: final 4-year follow-up of the MSC-HF trial. *Eur J Heart Fail* 2020; **22**(5): 884-92.
44. Menasché P, Vanneau V, Hagège A, et al. Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiovascular Progenitors for Severe Ischemic Left Ventricular Dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2018; **71**(4): 429-38.
45. Bolli R, Mitrani RD, Hare JM, et al. A Phase II study of autologous mesenchymal stromal cells and c-kit positive cardiac cells, alone or in combination, in patients with ischaemic heart failure: the CCTRNCONCERT-HF trial. *Eur J Heart Fail* 2021; **23**(4): 661-74.
46. Reinsch M, Weinberger F. Stammzellbasierte kardiale Regeneration nach Infarkt. *Herz* 2018; **43**(2): 109-14.
47. Al-Hejailan RS, Bakheet RH, Al-Saud MM, et al. Toward allogeneic xenograft: Xenogeneic cardiac scaffolds recellularized with human-induced pluripotent stem cells do not activate human naive neutrophils. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2022; **110**(3): 691-701.
48. Yildirim Y, Naito H, Didié M, et al. Development of a biological ventricular assist device: preliminary data from a small animal model. *Circulation* 2007; **116**(11 Suppl): I16-23.

49. Landa N, Miller L, Feinberg MS, et al. Effect of injectable alginate implant on cardiac remodeling and function after recent and old infarcts in rat. *Circulation* 2008; **117**(11): 1388-96.
50. Svystonyuk DA, Mewhort HEM, Hassanabad AF, et al. Acellular bioscaffolds redirect cardiac fibroblasts and promote functional tissue repair in rodents and humans with myocardial injury. *Sci Rep* 2020; **10**(1): 9459.
51. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; **282**(5391): 1145-7.
52. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; **131**(5): 861-72.
53. Hamad S, Derichsweiler D, Papadopoulos S, et al. Generation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in 2D monolayer and scalable 3D suspension bioreactor cultures with reduced batch-to-batch variations. *Theranostics* 2019; **9**(24): 7222-38.
54. Kawamura T, Miyagawa S, Fukushima S, et al. Cardiomyocytes Derived from MHC-Homozygous Induced Pluripotent Stem Cells Exhibit Reduced Allogeneic Immunogenicity in MHC-Matched Non-human Primates. *Stem Cell Reports* 2016; **6**(3): 312-20.
55. Kolossov E, Bostani T, Roell W, et al. Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. *J Exp Med* 2006; **203**(10): 2315-27.
56. Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T, et al. Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature* 2016; **538**(7625): 388-91.
57. Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nature Biotechnology* 2007; **25**(9): 1015-24.
58. Liu Y-W, Chen B, Yang X, et al. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates. *Nature Biotechnology* 2018; **36**(7): 597-605.
59. Rupert CE, Kim TY, Choi B-R, Coulombe KKL. Human Cardiac Fibroblast Number and Activation State Modulate Electromechanical Function of hiPSC-Cardiomyocytes in Engineered Myocardium. *Stem Cells International* 2020; **2020**: 9363809.
60. Park S-J, Kim RY, Park B-W, et al. Dual stem cell therapy synergistically improves cardiac function and vascular regeneration following myocardial infarction. *Nature Communications* 2019; **10**(1).
61. Yoshida S, Miyagawa S, Toyofuku T, et al. Syngeneic Mesenchymal Stem Cells Reduce Immune Rejection After Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Allogeneic Cardiomyocyte Transplantation. *Scientific Reports* 2020; **10**(1).
62. Sun X, Wu J, Qiang B, et al. Transplanted microvessels improve pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte engraftment and cardiac function after infarction in rats. *Science Translational Medicine* 2020; **12**(562): eaax2992.
63. Ottersbach A, Mykhaylyk O, Heidsieck A, et al. Improved heart repair upon myocardial infarction: Combination of magnetic nanoparticles and tailored magnets strongly increases engraftment of myocytes. *Biomaterials* 2018; **155**: 176-90.
64. Saludas L, Garbayo E, Mazo M, et al. Long-Term Engraftment of Human Cardiomyocytes Combined with Biodegradable Microparticles Induces Heart Repair. *J Pharmacol Exp Ther* 2019; **370**(3): 761-71.
65. Rubach M, Adelman R, Haustein M, et al. Mesenchymal stem cells and their conditioned medium improve integration of purified induced pluripotent stem cell-derived

- cardiomyocyte clusters into myocardial tissue. *Stem cells and development* 2014; **23**(6): 643-53.
66. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* 2001; **104**(9): 1046-52.
67. Uemura R, Xu M, Ahmad N, Ashraf M. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. *Circ Res* 2006; **98**(11): 1414-21.
68. Ohnishi S, Sumiyoshi H, Kitamura S, Nagaya N. Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions. *FEBS Lett* 2007; **581**(21): 3961-6.
69. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007; **110**(10): 3499-506.
70. Mirotsov M, Zhang Z, Deb A, et al. Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**(5): 1643-8.
71. Gnecci M, He H, Liang OD, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nature Medicine* 2005; **11**(4): 367-8.
72. Sahito RGA, Sheng X, Maass M, et al. In Vitro Grown Micro-Tissues for Cardiac Cell Replacement Therapy in Vivo. *Cell Physiol Biochem* 2019; **52**(6): 1309-24.
73. Monsanto MM, Wang BJ, Ehrenberg ZR, et al. Enhancing myocardial repair with CardioClusters. *Nature Communications* 2020; **11**(1).
74. Liu J, Miller K, Ma X, et al. Direct 3D bioprinting of cardiac micro-tissues mimicking native myocardium. *Biomaterials* 2020; **256**: 120204.
75. Daly AC, Davidson MD, Burdick JA. 3D bioprinting of high cell-density heterogeneous tissue models through spheroid fusion within self-healing hydrogels. *Nature Communications* 2021; **12**(1).
76. Polonchuk L, Chabria M, Badi L, et al. Cardiac spheroids as promising in vitro models to study the human heart microenvironment. *Sci Rep* 2017; **7**(1): 7005.
77. Antonchuk J. Formation of embryoid bodies from human pluripotent stem cells using AggreWell™ plates. *Methods Mol Biol* 2013; **946**: 523-33.
78. Kurosawa H. Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2007; **103**(5): 389-98.
79. King NMP, Methawasin M, Nedrud J, et al. Mouse intact cardiac myocyte mechanics: cross-bridge and titin-based stress in unactivated cells. *Journal of General Physiology* 2011; **137**(1): 81-91.
80. Rosellini E, Zhang YS, Migliori B, et al. Protein/polysaccharide-based scaffolds mimicking native extracellular matrix for cardiac tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A* 2018; **106**(3): 769-81.
81. Hata H, Bär A, Dorfman S, et al. Engineering a novel three-dimensional contractile myocardial patch with cell sheets and decellularised matrix. *Eur J Cardiothorac Surg* 2010; **38**(4): 450-5.
82. Alagarsamy KN, Yan W, Srivastava A, Desiderio V, Dhingra S. Application of injectable hydrogels for cardiac stem cell therapy and tissue engineering. *Rev Cardiovasc Med* 2019; **20**(4): 221-30.
83. Chen QZ, Harding SE, Rai R, Boccaccini AR. Myocardial tissue engineering. Elsevier; 2014: 387-413.

84. van der Valk J, Brunner D, De Smet K, et al. Optimization of chemically defined cell culture media--replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicol In Vitro* 2010; **24**(4): 1053-63.
85. Dippold D, Cai A, Hardt M, et al. Investigation of the batch-to-batch inconsistencies of Collagen in PCL-Collagen nanofibers. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2019; **95**: 217-25.
86. Shoichet MS. Polymer Scaffolds for Biomaterials Applications. *Macromolecules* 2010; **43**(2): 581-91.
87. Abecasis B, Canhão PGM, Almeida HV, et al. Toward a Microencapsulated 3D hiPSC-Derived in vitro Cardiac Microtissue for Recapitulation of Human Heart Microenvironment Features. *Front Bioeng Biotechnol* 2020; **8**: 580744-.
88. Bae YH, Okano T, Kim SW. Temperature dependence of swelling of crosslinked poly(N,N'-alkyl substituted acrylamides) in water. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 1990; **28**(6): 923-36.
89. Vihola H, Laukkanen A, Valtola L, Tenhu H, Hirvonen J. Cytotoxicity of thermosensitive polymers poly(N-isopropylacrylamide), poly(N-vinylcaprolactam) and amphiphilically modified poly(N-vinylcaprolactam). *Biomaterials* 2005; **26**(16): 3055-64.
90. Capella V, Rivero RE, Liadat AC, et al. Cytotoxicity and bioadhesive properties of poly-N-isopropylacrylamide hydrogel. *Heliyon* 2019; **5**(4): e01474.
91. Ohya S, Nakayama Y, Matsuda T. In vivo evaluation of poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)-grafted gelatin as an in situ-formable scaffold. *J Artif Organs* 2004; **7**(4): 181-6.
92. Lanzalaco S, Armelin E. Poly(N-isopropylacrylamide) and Copolymers: A Review on Recent Progresses in Biomedical Applications. *Gels* 2017; **3**(4): 36.
93. Wang F-W, Hsu C-W, Hsieh C-C. Numerical Design and Experimental Realization of a PNIPAM-Based Micro Thermosensor. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2019; **11**(8): 8591-600.
94. Zhang S, Huang Y, Ren H, et al. Facile and portable multimodal sensing platform driven by photothermal-controlled release system for biomarker detection. *Biosens Bioelectron* 2023; **235**: 115413.
95. Pu X-Q, Ju X-J, Zhang L, et al. Novel Multifunctional Stimuli-Responsive Nanoparticles for Synergetic Chemo-Photothermal Therapy of Tumors. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2021; **13**(24): 28802-17.
96. Gan J, Guan X, Zheng J, et al. Biodegradable, thermoresponsive PNIPAM-based hydrogel scaffolds for the sustained release of levofloxacin. *RSC Advances* 2016; **6**(39): 32967-78.
97. Ghalekhondabi V, Fazlali A, Soleymani M. Temperature and pH-responsive PNIPAM@PAA Nanospheres with a Core-Shell Structure for Controlled Release of Doxorubicin in Breast Cancer Treatment. *J Pharm Sci* 2023; **112**(7): 1957-66.
98. Ekerdt BL, Fuentes CM, Lei Y, et al. Thermoreversible Hyaluronic Acid-PNIPAAm Hydrogel Systems for 3D Stem Cell Culture. *Advanced Healthcare Materials* 2018; **7**(12): 1800225.
99. Engl W, Tachibana M, Panizza P, Backov R. Millifluidic as a versatile reactor to tune size and aspect ratio of large polymerized objects. *International Journal of Multiphase Flow* 2007; **33**(8): 897-903.
100. Nie Z, Seo M, Xu S, et al. Emulsification in a microfluidic flow-focusing device: effect of the viscosities of the liquids. *Microfluidics and Nanofluidics* 2008; **5**(5): 585-94.
101. Lee W, Walker LM, Anna SL. Role of geometry and fluid properties in droplet and thread formation processes in planar flow focusing. *Physics of Fluids* 2009; **21**(3): 032103.

102. Khademhosseini A, Yeh J, Eng G, et al. Cell docking inside microwells within reversibly sealed microfluidic channels for fabricating multiphenotype cell arrays. *Lab on a Chip* 2005; **5**(12): 1380.
103. Dragavon J, Molter T, Young C, et al. A cellular isolation system for real-time single-cell oxygen consumption monitoring. *Journal of The Royal Society Interface* 2008; **5**(suppl_2): S151-S9.
104. Li CY, Wood DK, Huang JH, Bhatia SN. Flow-based pipeline for systematic modulation and analysis of 3D tumor microenvironments. *Lab on a Chip* 2013; **13**(10): 1969.
105. Choy Buentello D, Koch LS, Trujillo-de Santiago G, Alvarez MM, Broersen K. Use of standard U-bottom and V-bottom well plates to generate neuroepithelial embryoid bodies. *PLoS One* 2022; **17**(5): e0262062.
106. Bresciani G, Hofland LJ, Dogan F, Giamas G, Gagliano T, Zatelli MC. Evaluation of Spheroid 3D Culture Methods to Study a Pancreatic Neuroendocrine Neoplasm Cell Line. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019; **10**: 682.
107. Finklea FB, Tian Y, Kerscher P, Seeto WJ, Ellis ME, Lipke EA. Engineered cardiac tissue microsphere production through direct differentiation of hydrogel-encapsulated human pluripotent stem cells. *Biomaterials* 2021; **274**: 120818.
108. Otake K, Inomata H, Konno M, Saito S. Thermal analysis of the volume phase transition with N-isopropylacrylamide gels. *Macromolecules* 1990; **23**(1): 283-9.
109. Peinkofer G, Burkert K, Urban K, et al. From Early Embryonic to Adult Stage: Comparative Study of Action Potentials of Native and Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cells Dev* 2016; **25**(19): 1397-406.
110. Heras-Bautista CO, Katsen-Globa A, Schloerer NE, et al. The influence of physiological matrix conditions on permanent culture of induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biomaterials* 2014; **35**(26): 7374-85.
111. Chabert M, Viovy JL. Microfluidic high-throughput encapsulation and hydrodynamic self-sorting of single cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008; **105**(9): 3191-6.
112. Wang F, Li Z, Khan M, et al. Injectable, rapid gelling and highly flexible hydrogel composites as growth factor and cell carriers. *Acta Biomater* 2010; **6**(6): 1978-91.
113. Andrysiak K, Stępniewski J, Dulak J. Human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, 3D cardiac structures, and heart-on-a-chip as tools for drug research. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 2021; **473**(7): 1061-85.