

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II
Nephrologie und Allgemeine Innere Medizin
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Th. Benzing

Zellersatztherapie nach Ischämie-/Reperfusionsschaden an der Niere.
Überleben, Inkorporation, Distribution und funktioneller Beitrag
systemisch applizierter hämatopoetischer Knochenmarkstammzellen.

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

vorgelegt von
Florian Pütsch
aus Bergisch Gladbach

promoviert am 08. Februar 2012

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h.c. Th. Krieg

1. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. Th. Benzing

2. Berichterstatter: Professor Dr. rer. nat. A. Sachinidis

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 der Herstellung des Manuskripts habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung 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.

Ludwigshafen, den 01.08.2011

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind von mir mit Unterstützung von Herrn Dr. Volker Burst und den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Ruth Herzog und Frau Petra Heid durchgeführt worden.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir mein Studium und die Vollendung meiner Promotion ermöglichten:

Herrn Prof. Dr. med. Thomas Benzing danke ich für die Möglichkeit, in seinem Arbeitskreis meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen.

Herrn Dr. Volker Burst danke ich für das anspruchsvolle und interessante Promotionsthema, seine stete Hilfsbereitschaft und die kameradschaftliche Atmosphäre in seiner Arbeitsgruppe.

Frau Ruth Herzog und Frau Petra Heid danke ich für ihre unermüdliche Unterstützung in der Zellkultur und bei der PCR, ohne die diese Arbeit kaum möglich gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Fischer und seinem Team danke ich für die Bereitstellung der Operationsräume und die Unterstützung bei den Tierversuchen.

Für die Durchsicht dieser Arbeit danke ich meiner Familie, Freunden und Kollegen.

Ganz besonders danke ich natürlich meinen Eltern, die mir das Studium erst ermöglichten und mich jederzeit unterstützten, sowie meiner Freundin Andrea Hollenberg, die meiner Arbeit viel Verständnis und Geduld entgegenbrachte.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich dem Forschungspool Köln Fortune.

Für meine Familie

und

meine Freundin Andrea

Inhaltsverzeichnis

0.1	Abkürzungsverzeichnis	1
1	Einleitung	4
1.1	Das akute Nierenversagen	4
1.2	Stammzellen	7
1.2.1	Hämatopoetische Stammzellen	8
1.3	Einsatz von Stammzellen beim akuten Nierenversagen	9
1.4	Zielsetzung	11
2	Materialien	12
3	Methoden	19
3.1	Studiendesign	19
3.2	Versuchstiere	20
3.2.1	Versuchsgenehmigung	20
3.2.2	Haltung	20
3.2.3	Gruppeneinteilung	21
3.3	Gewinnung der Stammzellen	22
3.3.1	MACS-Separation	22
3.3.2	FACS-Analyse	26
3.3.3	Vitalitätsfärbung mit Trypanblau	27
3.3.4	PKH-26-Färbung	27
3.4	Operation der Versuchstiere	28
3.4.1	Narkose	28
3.4.2	Operation	28
3.5	Postoperative Probengewinnung	30
3.5.1	Blutentnahme	30
3.5.2	Organentnahme	30
3.6	Analyse der Organproben	31
3.6.1	Histologische Analyse der Organschädigung	31
3.6.2	Fluoreszenzanalyse der renalen Zellverteilung	32

3.6.3	DNA-Isolation	32
3.6.4	Quantifizierung der Spenderzellen durch Realtime-PCR	33
3.7	Ausschluss- und Tötungskriterien	38
3.7.1	Ausschlusskriterien	38
3.7.2	Tötungskriterien	39
3.8	Statistische Auswertung	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Charakterisierung der wichtigsten Zellpopulationen	40
4.2	Postoperative Blutanalysen	49
4.2.1	Kreatinin	49
4.2.2	Harnstoff	51
4.3	Histologische Analysen	53
4.4	Quantitative Analysen	55
5	Diskussion	60
5.1	Überleben und Verteilung transplantierte Stammzellen in der geschädigten Niere und dem Empfängerorganismus	61
5.2	Effekt transplantierte Stammzellen auf die Nierenfunktion nach Ischämie-/ Reperfusionsschaden	64
5.3	Zukünftige Einsatzmöglichkeiten der Zelltherapie beim akuten Nierenversagen	65
6	Zusammenfassung	67
7	Literaturverzeichnis	68
8	Anhang	80
8.1	Abbildungsverzeichnis	80
8.2	Tabellenverzeichnis	82
9	Lebenslauf	83

0.1 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ADQI	Acute Dialysis Quality Initiative
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ANV	Akutes Nierenversagen
APC	Allophycocyanin
ASC	Adult Stem Cells
BMSC	Bone Marrow Stem Cells
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
CT	Threshold Cycle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Ery	Erythrozyt
ESC	Embryonale Stammzellen
evtl.	eventuell
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FET	Fluoreszenz-Energie-Transfer
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum

FSC	Forward Scatter
G	Gauge
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GM-CSF	Granulocyte / Monocyte Colony Stimulating Factor
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
ITGAM	Integrin Alpha M
ITGAX	Integrin Alpha X
i.a.	intraarteriell
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
I/R	Ischämie / Reperfusion
KG	Körpergewicht
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarkstransplantation
lin	Lineage
Lsg	Lösung
MACS	Magnetic Cell Sorting
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MGB	Minor Groove Binder
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
µg	Mikroliter
mm	Millimeter

MPC	Multiple Progenitorzellen
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NK	Natürliche Killerzellen
OPN	Osteopontin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
Pen	Penicillin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex
PTPRC	Protein Tyrosin Phosphatase Rezeptor Typ C
Q	Quadrant
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SEM	Standardfehler
SRY	Sex Determing Region of Y
SSC	Sideward Scatter
Strep	Streptomycin
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquatus
Thy	Thymogen Differentiation Antigen
u.a.	unter anderem
z.B.	zum Beispiel
z.Z.	zur Zeit

1 Einleitung

1.1 Das akute Nierenversagen

Unter einem akuten Nierenversagen (ANV) versteht man eine rasche, akut einsetzende Verschlechterung der Nierenfunktion. Die Ursachen werden entsprechend dem Ort der Schädigung in prärenal, intrarenal und postrenal eingeteilt. Die prärenale Schädigungsursache ist in erster Linie eine Minderperfusion durch Hypotonie oder Hypovolämie (z.B. im Rahmen einer Blutung oder durch Dehydratation). Intrarenale Schädigungen können tubulointerstitielle Nierenerkrankungen, akute Glomerulonephritiden sowie toxische Arzneimittelnebenwirkungen sein. Postrenal liegt der Auslöser im ableitenden Harntrakt, z.B. durch einen Harnverhalt im Rahmen einer Prostatahyperplasie.

Die Folgen des ANV sind Regulationsprobleme des Flüssigkeits-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalts sowie die Akkumulation harnpflichtiger Stoffwechselprodukte im Blutkreislauf, im schlimmsten Fall bis hin zur Urämie.

In Abhängigkeit von der Ursache kann eine intensivmedizinische Behandlung mit frühzeitiger vorübergehender Dialyse notwendig werden. Auch wenn die Prognose für die Wiederherstellung der Nierenfunktion gut ist, kann das akute Nierenversagen im Rahmen einer Sepsis oder durch Sekundärerkrankungen begünstigt in ein oft tödliches Multiorganversagen münden. Bei einer Sepsis sind die Ursachen des ANV vor allem intrarenal, verstärkt durch prärenale Faktoren wie Hypovolämie [36]. Pathophysiologisch kommt es zu einer eingeschränkten Glomerulären Filtrationsrate (GFR) durch Schäden im Bereich des proximalen Tubulus, gefolgt von Tubulusnekrose, Apoptose, Störung der Filtrationsbarriere und einer inflammatorischen Reaktion mit interstitieller Schwellung und Aktivierung proteolytischer Enzyme [120, 127, 70, 76, 98, 99]. Insbesondere bei intensivpflichtigen Patienten ist die Regenerationsfähigkeit der nekrotischen Tubulusanteile gestört.

Da das ANV heute kaum mehr als singuläres Organversagen auftritt, sondern oftmals als Teil eines Multiorganversagens im Rahmen einer generalisierten inflammatorischen Reaktion des Organismus [27, 36], stellt es vor allem in der Intensivmedizin ein Problem dar. Hier entwickelt sich das schwere akute Nierenversagen häufig im Rahmen einer Sepsis, eines Traumas oder nach großen operativen Eingriffen, einhergehend mit kardiogenem Schock und/oder einem „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) und konsekutiver Hypovolämie. In den letzten Jahren beschäftigten sich viele Untersuchungen mit der Inzidenz des ANV auf Intensivstationen [92, 51, 48, 53, 54, 94, 128] und beobachteten, dass zwischen 36% [92] und 67% [50] der intensivpflichtigen Patienten ein akutes Nierenversagen entwickelten, die Mortalität betrug bis zu 60% [124]. Uchino et al stellten

in diesem Rahmen an 29.000 Intensivpatienten in 23 Ländern [124] die Sepsis mit 50% als die wichtigste Ursache für das ANV heraus. Die hier genannten Studien stellen mit Untersuchungsgruppen von 5.000 [50] bis 42.000 [92] Patienten die umfangreichsten aus einer großen Gruppe von epidemiologischen Untersuchungen zum akuten Nierenversagen dar.

Die Ursachen für die insgesamt eher heterogenen Studienergebnisse liegen vor allem in der bisher uneinheitlichen Klassifikation des ANV. Bislang wurden mehr als 30 unterschiedliche Definitionen des ANV publiziert, die sich alle auf absolute oder relative Änderungen des Serumkreatinins beziehen. Keine dieser Definitionen war im Hinblick auf die Prognose der Patienten ausreichend validiert, ein Umstand, der die Vergleichbarkeit aller Outcome- und Interventionsstudien auf diesem Gebiet massiv beeinträchtigte. Aus diesem Grund wurden 2004 die RIFLE-Kriterien für das akute Nierenversagen entwickelt [17]. Diese neue Konsensusdefinition der Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) beruht nicht nur auf einem Anstieg des „klassischen“ Markers Serumkreatinin, sondern zusätzlich auf der Reduktion des Harnzeitvolumens, einem sensitiverem Parameter für das Ausmaß der Nierendysfunktion. Auf Basis dieser beiden Kriterien wird eine akute Nierenfunktionseinschränkung in die Gruppen „Risk“, „Injury“ und „Failure“ eingeteilt. Zusätzlich wurden zwei weitere Klassen, „Loss“ und „Endstage Renal Disease“, eingeführt, welche durch die Dauer der Abhängigkeit von einer Nierenersatztherapie charakterisiert sind (über vier Wochen bzw. über drei Monate). 2007 wurde im Rahmen einer weiteren Konsensuskonferenz zur Optimierung dieser Klassifikation der Oberbegriff „akuter Nierenschaden“ vorgeschlagen, der sich mittlerweile vor allem in der englischsprachigen Literatur als „Acute Kidney Injury“ (AKI) durchgesetzt hat [82]. Die RIFLE-Kriterien wurden als Werkzeug zur frühen einheitlichen Diagnose und stadiengerechten Therapieeinleitung des AKI in vielen Studien validiert und haben sich mittlerweile im klinischen Alltag etabliert [9, 10, 52, 62, 63, 102, 126]. Wie sich gezeigt hat, korreliert die Prognose der Patienten stark mit dem Stadium des Nierenschadens [50, 92]. Patienten im Stadium „Risk“ weisen demnach eine 2,4-fache Mortalität auf, bei „Injury“ liegt der Faktor bei 4,15 und Patienten mit einem „Failure“, also einem Nierenversagen im engeren Sinne, haben bereits ein mehr als sechsfach höheres Mortalitätsrisiko gegenüber Patienten ohne Nierenschaden [101].

Stadium	Serumkreatinin	Harnzeitvolumen
R	Anstieg um $\geq 0,3$ mg/dl oder Anstieg auf 150-200%	$< 0,5$ ml/kg/h für ≥ 6 Stunden
I	Anstieg auf 200-300%	$< 0,5$ ml/kg/h für ≥ 12 Stunden
F	Anstieg auf $>300\%$ oder über 4 mg/dl	$< 0,3$ ml/kg/h für ≥ 24 Stunden oder Anurie für ≥ 12 Stunden
L	AKI für > 4 Wochen	
E	AKI für > 3 Monate	

Tabelle 1: Modifizierte RIFLE-Klassifikation nach AKIN [82]

Während sich bei Patienten mit solitärem ANV der Schaden in 95% der Fälle *ad integrum* zurückbildet, ist diese Zahl bei vorerkrankten, alten oder intensivpflichtigen Patienten weitaus geringer, denn die Prognose des ANV korreliert stark mit der Morbidität und den Begleiterkrankungen der Patienten [123]. Dies erklärt die hohe Mortalität des ANV bei intensivpflichtigen Patienten [48, 49]. In vielen Fällen heilt das ANV nicht vollständig aus, sondern führt zu Organverlust oder chronischer Niereninsuffizienz. Die 5-Jahres-Überlebensrate von den Patienten, die nach dialysepflichtiger akuter Nierenschädigung das Krankenhaus verlassen, liegt bei 50-70% [85]. Durchschnittlich 30% dieser Patienten bleiben in ihrer Nierenfunktion eingeschränkt, 10% sogar dialysepflichtig. Bei diesen Patienten beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate lediglich 30-50%.

Die therapeutischen Optionen beim ANV sind bis heute sehr begrenzt. Neue therapeutische Ansätze, beispielsweise zur Prävention tubulo-vaskulärer Schäden oder zur Unterstützung der Organregeneration, haben sich bisher noch nicht in der Klinik etabliert. Ist ein Nierenversagen eingetreten, so ist der Einsatz von Nierenersatzverfahren wie Hämodialyse oder -filtration in Kombination mit supportiven Maßnahmen erforderlich [103, 122]. Neben der Prävention des akuten Nierenversagens bei Risikopatienten [8] liegt der Schwerpunkt bei der Behandlung des ANV also auf der Vermeidung systemischer Komplikationen durch geeignete konservative Therapiemaßnahmen und Durchführung einer adäquaten und effizienten Nierenersatztherapie, mit der die Zeit bis zur Erholung der Nierenfunktion überbrückt werden kann. Allerdings birgt auch die Dialyse Risiken und kann Langzeitschäden nach sich ziehen. Dieser Umstand und die unverändert hohe Mortalität des ANV bei Intensivpatienten [124] machen daher neue Therapieansätze dringend erforderlich. Im Bereich der Forschung richtet sich der Fokus hierbei immer mehr auf einen therapeutischen Stammzelleinsatz.

1.2 Stammzellen

Als Stammzellen werden Körperzellen bezeichnet, die in verschiedene Zelltypen oder Gewebe ausdifferenzieren können. Je nach Art der Stammzellen haben sie das Potential, sich zu jeglichen Geweben (embryonale Stammzellen, ESC) oder zu bestimmten, festgelegten Gewebetypen (adulte Stammzellen, ASC) zu entwickeln. Stammzellen werden vor allem durch ihr ontogenetisches Alter und ihr Differenzierungspotenzial unterschieden: die ontogenetisch frühesten Stammzellen sind die pluripotenten embryonalen Stammzellen, aus denen später andere Stamm- und Progenitorzellen hervorgehen.

Die Verwendung von menschlichen embryonalen Stammzellen in der Forschung und Medizin stellt ein ethisches Problem dar, da zu ihrer Gewinnung die Zerstörung von frühen menschlichen Embryonen erforderlich ist. Daher erfolgt ein Großteil der Stammzellforschung in Deutschland mit adulten Stammzellen. ASC wurden bislang in vielen verschiedenen Organsystemen identifiziert. Einige Beispiele umfassen das System im Knochenmark ansässiger hämatopoetischer Stammzellen mit der daraus resultierenden Regeneration der Blutzellen [111] oder ependymale neurale Stammzellen mit der Fähigkeit, Astrozyten, Gliazellen und Neuronen [89] zu bilden sowie hepatische Stammzellen zur Regeneration der Leber [3]. Das therapeutische Potential adulter Stammzellen liegt in ihrer Fähigkeit, nach Einbringung in ihre spezifische Umgebung, ihrer sogenannten Nische, in das entsprechende Gewebe auszudifferenzieren. Auch in der Niere ist die Präsenz adulter Stammzellen zur endogenen Gewebeerneuerung bekannt [4, 22, 58]. Beobachtungen zeigen, dass eine Transdifferenzierung in organfremde Zellen möglich ist. Galt die Restriktion der Differenzierung auf eine Zelllinie oder zumindest auf eine beschränkte Anzahl verschiedener Zelltypen lange als ein grundlegendes und definierendes Merkmal adulter Stammzellen, so vollzog sich hier in den letzten Jahren ein grundlegender Paradigmenwechsel. Vor allem bei Knochenmarkstammzellen konnte gezeigt werden, dass ihr Differenzierungspotential nicht allein auf die Regeneration hämatopoetischer Zellen beschränkt ist, sondern dass im Rahmen von Reparaturvorgängen auch andere Gewebearten generiert werden können. Die Möglichkeiten eines therapeutischen Nutzens adulter Stammzellen sind Gegenstand momentaner Forschung [4, 79]. ASC kommen in jedem Individuum vor, sind gut zu isolieren und spielen daher eine wichtige Rolle in der heutigen Stammzelltherapie. Darüber hinaus gibt es bei ihrer Gewinnung und dem therapeutischen Einsatz kaum ethische Konflikte in dem Ausmaß, wie sie die Verwendung embryonaler Stammzellen limitieren.

Knochenmarkstammzellen (BMSC) nehmen in der aktuellen Forschung eine herausragende Rolle ein, da sie gegenüber den organspezifischen ASC gut erforscht und leicht zu isolieren sind. Das Knochenmark gilt als einer der größten Speicher des Körpers für

adulte Stammzellen. BMSC teilen sich in zwei Hauptgruppen auf: Multipotente Mesenchymale Stromazellen (Mesenchymal Stem Cells, MSC) und hämatopoetische Stammzellen (Hematopoietic Stem Cells, HSC). Mesenchymale Stammzellen sind die Stromazellen des Knochenmarks, bilden eine Art Stützapparat für die Zellen des Knochenmarks und können zu verschiedenen Gewebearten wie Fett, Knorpel oder Knochen ausdifferenzieren. Hämatopoetische Stammzellen haben die Fähigkeit, über verschiedene Differenzierungsstufen Blutzellen aller drei Linien zu bilden, also Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten. Daneben gibt es noch kleinere Zellpopulationen im Knochenmark, beispielsweise die endothelialen Vorläuferzellen (Endothelial Progenitor Cells, EPC), die in den letzten Jahren in den Fokus der Wissenschaft gerückt sind [56, 131].

1.2.1 Hämatopoetische Stammzellen

Hämatopoetische Stammzellen waren die ersten multipotenten Stammzellen, die im Rahmen biologischer Forschungen entdeckt wurden. Sie gelten bis heute als die am besten untersuchten Stammzellen und dienen insofern als Prototyp der adulten Stammzelle.

Bereits 1868 beschrieb Ernst Neumann die postembryonal existierende pluripotente Blutstammzelle im Knochenmark [90]. Dies geschah vorwiegend anhand von zytologischen Präparaten mit sekundärer histologischer Diagnosesicherung. Seine Ergebnisse fanden zu dieser Zeit noch wenig Beachtung. 1906 wurde das Thema erneut von Alexander Maximow aufgegriffen [80], diesmal mit breiterer Resonanz. In den folgenden Jahrzehnten wuchs das Interesse an dieser vielversprechenden Zellart und ihrem potenziellen therapeutischen Nutzen, nicht zuletzt durch die Folgen der amerikanischen Atombombeneinsätze in Hiroshima und Nagasaki im Jahre 1945 und der atomaren Bedrohung während des kalten Krieges. Viele Strahlenopfer starben infolge eines zerstörten hämatopoetischen Systems an Infektionen und Hämorrhagien. In den 50er Jahren beobachteten amerikanische Forscher in Tierversuchen die regenerativen Fähigkeiten von Knochenmarklösungen nach atomarer Bestrahlung [40, 78]. Ein amerikanisches Komitee entwickelte daraufhin die heute noch gängige Nomenklatur hämatopoetischer Vorläuferzellen [1, 2]. 1957 gelang Thomas et al erstmals die Transfusion von Knochenmarkzellen am Menschen [119], gefolgt von den ersten therapeutischen Knochenmarktransplantationen (KMT) im Jahre 1968 [6, 18]. Dies schuf den Grundstein der modernen Knochenmarks- und Stammzelltherapie. Die Isolation und Anreicherung von HSC aus Knochenmark anhand phänotypischer Marker [111, 16] ermöglichte seit Anfang der 90er Jahre eine differenziertere und effizientere Zellapplikation. Durch Stammzellmobilisation mittels Wachstumsfaktoren wie G-CSF oder GM-CSF [13, 97] gelang schließlich sogar die Stammzellgewinnung aus peripherem Blut. Daraus ergaben sich Kontroversen über die möglichen Vor- und Nachteile beider Therapieverfahren, der Gewinnung aus Knochenmark oder peripherem Blut [5, 64], doch hat sich mittlerweile die zweite und schonendere Variante im klinischen Alltag etabliert, vor allem aufgrund der geringeren Komplikationen für den Stammzellspender und des geringeren

Aufwands der Zellgewinnung. Da die Hämatopoese beim Fetus noch zu einem großen Teil in der Leber stattfindet, zirkulieren beim Neugeborenen und somit auch im Nabelschnurblut noch in großer Zahl hämatopoetische Stammzellen, die mittlerweile auch von dort gewonnen werden können.

Seit Beginn des neuen Jahrtausends wurde und wird zunehmend das Dogma des rein blutbildenden Potentials hämatopoetischer Stammzellen widerlegt. Zahlreiche Studien haben mittlerweile ausreichend belegt, dass hämatopoetische Stammzellen die Fähigkeit zur Differenzierung in diverse adulte Gewebetypen, eventuell sogar in jede reife Gewebeform, haben. Der Grad dieser Fähigkeit wird als „Plastizität“ der Stammzellen bezeichnet. Ferrari et al beschrieben 1998 die Ausdifferenzierung isolierter Knochenmarkstammzellen zu Skelettmuskelzellen [38], gefolgt von weiteren Untersuchungen zu Myo- und Hepatozyten [43, 93, 117]. War es anfangs noch nicht möglich, genau zu sagen, welche der Stammzellpopulationen im Knochenmark Ausgangspunkt dieser Differenzierung sind, zeigten Krause et al 2001, dass die hämatopoetischen Stammzellen diese Fähigkeiten besitzen [66]. Mittlerweile gelten HSC als potenzielle Vorläufer von Gastrointestinal-, Haut-, Herzmuskel-, Leber-, Lungen-, Nerven-, Nieren- und Skelettmuskelzellen [104, 65, 45, 125, 133] und eignen sich damit insbesondere für die Erforschung eines möglichen therapeutischen Einsatzes.

1.3 Einsatz von Stammzellen beim akuten Nierenversagen

Seit der Entdeckung der Plastizität adulter Stammzellen beschäftigen sich Forschungsgruppen aus allen klinischen Bereichen mit den daraus resultierenden therapeutischen Möglichkeiten. Im Vordergrund stehen auch hier die Zellen des Knochenmarks. Eine spezielle Rolle hämatopoetischer Stammzellen in Bezug auf die Niere wird aufgrund der engen ontogenetischen Verknüpfung beider Systeme vermutet. Die in der frühen Embryogenese angelegte Urniere (Mesonephros) stellt einen gemeinsamen Ausgangspunkt für die Entstehung der Nieren sowie des hämatopoetischen Systems dar. Weitere Berührungspunkte beider Systeme stellen die in der Niere stattfindende Erythropoetinsynthese sowie die Fähigkeit der adulten Niere zur Hämatopoese unter Hypoxiebedingungen dar [7].

Forschungen im Bereich der Leber- [95, 71], Lungen- [77, 67, 109], Nerven- [30, 28] und Muskelerkrankungen [29, 86] zeigen Möglichkeiten, adulte Stammzellen therapeutisch einzusetzen. In kardiologischen Untersuchungen bewiesen Stammzellen vor allem bei ischämie- und ischämie-/reperusionsbedingten Zellschäden ein hohes regeneratives Potential [21, 91], was dazu führte, dass nach vorausgegangenen Tierversuchen [12, 11] mittlerweile erste klinische Studien am Menschen bei Herzinfarkt und koronarer Herzkrankheit durchgeführt werden [61, 132, 19, 107, 106].

Damit ergibt sich als neue Therapieform beim akuten Nierenversagen die Möglichkeit der Organregeneration oder -neubildung [39, 84], bei der das Potential der Stammzellen einge-

setzt wird, um eine schnellere Wiederherstellung der Organfunktionen zu erreichen [44]. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Studien veröffentlicht, die sich vor allem mit dem Potential adulter Knochenmarkstammzellen beschäftigten [74]. Anfangs betrachtete man die Knochenmarkstammzellen (Bone Marrow Stem Cells, BMSC) in ihrer Gesamtheit, ohne die einzelnen Populationen getrennt zu untersuchen [59]. Vor allem die Arbeiten von Kale und Poulos zeigten eindeutig einen positiven Effekt adulter Knochenmarkstammzellen auf das akute Nierenversagen [60, 96]. Daraus ergab sich aber die Notwendigkeit einer genaueren Differenzierung, um die verantwortliche Stammzellpopulation im Knochenmark zu identifizieren. 2003 erschienen die ersten Veröffentlichungen, einerseits zu HSC [75] als auch zu MSC [46, 88], die zeigten, dass beide Stammzellpopulationen regeneratives Potential in der Niere haben. In den letzten Jahren konzentrierten sich die Forschungen auf die Population der mesenchymalen Stammzellen, vor allem aufgrund ihrer hohen Verfügbarkeit sowie einfachen Isolierung und Multiplikation durch Kolonisation.

Bis heute ist noch nicht eindeutig geklärt, an welchem Punkt Stammzellen im Regenerationsprozess eingreifen und was ihr genauer Wirkmechanismus ist. Im Bereich der MSC-Forschung gab es in den letzten Jahren vielversprechende Erklärungsmodelle. Klassisches Modell ist die Differenzierung der Stammzellen zu neuem Nierengewebe und damit ein direkter Ersatz untergegangenen Parenchyms. Unzureichend geklärt ist, in welche Zellformen sie ausdifferenzieren, da nicht nur Tubuluszellen, sondern beispielsweise auch Endothelzellen der peritubulären Kapillaren [15, 14] beim ANV stark geschädigt werden. Dass MSC das Potential besitzen, beide genannten Zelltypen zu bilden, wurde bereits mehrfach demonstriert [75, 32, 37].

Als alternatives Erklärungsmodell in der Wirkweise der Stammzellen wird im Rahmen von Untersuchungen an Leber und Lunge die Fusion von Knochenmarkstammzellen mit geschädigten Organzellen diskutiert [42, 81]. Auch hier stellt sich die Frage, ob und in welchem Maße dieser Mechanismus zur Regeneration der Nieren beiträgt [73].

Die dritte Hypothese setzt an der Beeinflussung der begleitenden Entzündungsreaktion des betroffenen Organs an. Parakrine, antiinflammatorische Mechanismen, ausgelöst durch die Stammzellen, erscheinen hier als maßgebliche Faktoren der beschleunigten Organregeneration [114, 72].

Unabhängig vom Wirkmechanismus sind für einen nennenswerten Effekt zwei wichtige Voraussetzungen nötig: Einerseits müssen die Zellen organotrop sein, also eine Affinität zu dem erkrankten Gewebe haben, um sich nach systemischer Administration im Zielorgan anzureichern. Andererseits muss die Überlebenszeit der Zellen ausreichend lang sein, um eine Regeneration beeinflussen zu können.

Weitere Untersuchungen sollten also vor allem das Überleben und die Zelladministration im Zielorganismus erforschen. Die externe Stammzellapplikation ist in diesem Zusammenhang einer Mobilisierung körpereigener Zellen überlegen [112, 24].

Da Minderperfusion das pathophysiologische Korrelat eines sepsisassoziierten ANV darstellt [36], sollten weitere Untersuchungen anhand dieses Pathomechanismus stattfinden. Als etabliertes Tiermodell spiegelt dabei das Ischämie/Reperusionsmodell die Verhältnisse adäquat wider. Besonders interessant erscheinen in diesem Rahmen weitere Erkenntnisse zu dem Wirken und therapeutischen Potential hämatopoetischer Stammzellen

1.4 Zielsetzung

In dieser Dissertation soll die Rolle transplanteder hämatopoetischer Stammzellen beim akuten ischämischen Nierenversagen im Rattenmodell untersucht werden.

In den bisherigen Arbeiten zu diesem Thema wurden hauptsächlich qualitative Eigenschaften der hämatopoetischen Stammzellen beschrieben, vor allem bezüglich ihres Differenzierungspotentials. Quantitative Untersuchungen zu Wirkung, Tropismus und Distribution hämatopoetischer Stammzellen im Empfängerorganismus liegen bislang nicht vor.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

1. Wie ist das Überleben und die Organverteilung der transplanteden Stammzellen im Empfängerorganismus?
2. Kommt es zu einer Anreicherung und Inkorporation der transplanteden Stammzellen in der Niere?
3. Welchen Effekt haben transplantede hämatopoetische Stammzellen auf die Nierenfunktion nach Ischämie-/Reperusionschaden?

2 Materialien

Versuchstiere

Alleinfuttermittel	Sniff Spezialdiäten
Lewis-Ratten	Charles River Lab.

Verbrauchsmaterialien

Butterfly-Kanülen, diverse Größen	Sarstedt
Citratröhrchen	Sarstedt
Einmalskalpelle	Feather
Eppendorf-Gefäße, diverse Größen	Eppendorf
Falcon Tubes, diverse Größen	BD Biosciences
Filterspitzen, diverse Größen	Star Lab
Kanülen, diverse Größen	Sarstedt
Microtiterplatten für die PCR	Peglab
Micropipetten-Spitzen, diverse Größen	Eppendorf
Nahtset Ethilon, Gr. 3.0	Ethicon
Nitril 3000 Einmalhandschuhe	Meditrade
Optische Folie für Microtiterplatten	Peglab
Pasteur-Pipetten	Sarstedt
Spritzen, diverse Größen	Braun
Sterile Kompressen	Hartmann
Sterilfilter, 0,2 µm	BD Biosciences
Zellkulturschalen, 20 cm ²	BD Biosciences

Chemikalien

BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich
Cutasept	Bode
Eukitt	Sigma-Aldrich
FKS (Fötales Kälberserum)	Gibco
Fluoreszenzfarbstoffe	BD Biosciences
• Fluoreszinoisothiocyanat (FITC)	
• Phycoerythrin (PE)	
Formalin	Sigma-Aldrich
Histoacryl-Kleber	Braun
Hot Star Taq DNA Polymerase	Qiagen
MgCl ₂ , 25 mM	Qiagen
Proteinase K	Qiagen
SYBR-Green	Sigma-Aldrich
Tissue Tek	Qiagen
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Xylol	Merck

Lösungen und Puffer

Biocoll Separationslösung	Biochrom
Dulbecco's PBS-Puffer	Gibco
Isotonische Kochsalzlösung	Braun
Lysepuffer	Qiagen
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Gibco
Trypsin-EDTA-Lösung	Gibco
Hämatoxylin-Färbelösung	Sigma-Aldrich

- PKH-26 Cell Linker
- Diluent C

Zusammensetzungen

FACS-Färbepuffer

- 100 ml PBS
- 10 ml 5% BSA
- 5 ml FKS

FACS-Fixierpuffer

- 35 ml FACS-Puffer
- 2 ml 37% Formalin

FACS-Puffer

- 500 ml PBS
- 10 ml FKS

MACS-Puffer

- 500 ml PBS
- 50 ml 5% BSA
- 2 ml 0,5 M EDTA

Trypsin/EDTA-Lösung

- 50 ml PBS
- 5 ml 2,5% Trypsin
- 500 µl 3% EDTA

Antikörper

Monoklonale Mouse Anti-Rat-Antikörper

BD Biosciences

Typ	Klon	Isotyp
Biotin-gekoppelte Erythroid Cells	HIS49	IgM, κ
PE-gekoppelte CD3	IF4	IgM, κ
PE-gekoppelte CD11-b/c	OX-42	IgG _{2a} , κ
PE-gekoppelte CD45-R	HIS24	IgG _{2b} , κ
PerCP-gekoppelte CD90 (Thy-1)	OX-7	IgG ₁ , κ

Microbeads

Anti-Biotin Microbeads

Miltenyi Biotec

Anti-PE Microbeads

Miltenyi Biotec

Anti-PerCP Microbeads

Miltenyi Biotec

Kits

DNeasy Tissue Kit 250

Qiagen

- DNeasy Mini Spinsäulen
- Handbuch
- Proteinase K
- Puffer-Lösungen (ATL, AL, AW1, AW2, AE)
- Reaktionsgefäße (2 ml)

Mini-&MidiMACS™ Starting Kit

Miltenyi Biotec

- Handbuch

- LS Säulen
- MiniMACS™ Separation Unit
- MidiMACS™ Separation Unit
- MACS® MultiStand
- MS Säulen

Oligonucleotid-Sequenzen

dNTP-Trinukleotide	Promega
MGB-Sonde OPN	Applied Biosystems
MGB-Sonde SRY	Applied Biosystems
Primer	MWG

- OPN anti-sense 20 bp
- Primer OPN sense 20 bp
- Primer SRY anti-sense 19 bp
- Primer SRY sense 20 bp

Pharmaka

Buprenorphin (Temgesic)	Essex Pharma
Isofluran (Forene)	Abbott
Ketamin (Ketavet)	Curamed
Xylazin (Rompun)	Sigma Aldrich

Operationsbesteck

1 ml Hamilton-Spritze	Harvard Apparatus
Bulldog-Gefäßklemmen	Harvard Apparatus
Federschere	Aesculap

Gefäßklemmen-Applikator	Harvard Apparatus
Nadelhalter	Aesculap
Pinzette	Aesculap
Präparierschere	Aesculap

Geräte

Durchflusszytometer "FACSCanto"	BD Biosciences
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr
Gefrierschrank -80 °C	Liebherr
Kauter	Erbe
Micropipetten, diverse Größen	Eppendorf
Neubauer-Zellzählkammer	Brand
Operationsmikroskop	Leica
Pipettierhilfe "Pipetus"	Hirschmann
Restrainer für Ratten	Harvard Apparatus
RT-PCR-Gerät "iQ icycler"	Bio-Rad
Schergerät für Kleintiere	Harvard Apparatus
Sterilwerkbank	Heraeus
Tischmikroskop	Olympus
Vortex-Mixer	Scientific Industries
Waage	Sartorius
Zentrifugen	Heraeus

Analysesoftware

Cyfloric FACS-Software	Cyflo Ltd
Icycler PCR-Software	Bio-Rad
Jabref Referenz-Manager	Thompson-ISI Research Soft
Lyx 1.6 Textverarbeitungsprogramm	Free Software Foundation
Office 2007	Microsoft
SPSS 12.0.1	SPSS GmbH Software

3 Methoden

3.1 Studiendesign

Zur Untersuchung der Zelltherapie bei akutem Nierenversagen wurde die Induktion eines renalen Ischämie-/Reperfusionsschadens (I/R) am Rattenmodell gewählt. Dieses Versuchsmodell ist eine etablierte und anerkannte Methode zur Untersuchung verschiedenster Therapieansätze [130, 75]. Das Gewicht der Tiere wurde auf 150 - 200 Gramm festgelegt [130]. Die Tiere kamen aus einem Inzuchtstamm, um eine syngene Stammzelltransplantation zu ermöglichen. Im Rahmen der Projektplanung wurde in Vorversuchen eine geeignete Ischämiezeit bestimmt, um einen maximalen Effekt zu erzielen ohne für die Versuchstiere letal zu verlaufen. Dafür erwiesen sich 70 Minuten warmer Ischämie als optimal. Eine einseitige Nephrektomie führte zu einer Aggravierung der Nierenfunktionseinschränkung und damit zu einer Maximierung der messbaren laborchemischen Veränderungen [75]. Es erfolgte die organnahe intraarterielle Applikation der Stammzellen auf Höhe der Nierenarterienabgänge zur Minimierung des postinterventionellen Zellverlustes über den Blutkreislauf. Dadurch wurde die höchstmögliche Zellzahl im Bereich der geschädigten Niere erreicht, ohne diese durch eine direkte intrarenale Gabe zusätzlich zu traumatisieren.

Die Stammzellen wurden aus dem Knochenmark extrahiert, danach per MACS- Zells separation aufgereinigt und mittels FACS-Analyse charakterisiert.

Zur postoperativen Identifikation der injizierten Zellen erfolgte ein geschlechtsspezifisches Mismatching (gender mismatch), männliche Tiere wurden als Stammzellspender und weibliche Tiere als Empfänger verwendet. Das Y-Chromosom diente in der anschließenden PCR-Analyse der Identifikation männlicher Spenderzellen. Quantitative Analysen erfolgten mittels Real-Time-PCR nach vorheriger Etablierung und Validierung des Verfahrens. Untersucht wurden dabei Niere, Leber, Milz, Lunge, Herz, Gehirn, Skelettmuskulatur und Knochenmark auf Distribution und Überleben der applizierten Stammzellen.

Die regionale Verteilung der Spenderzellen in der Niere wurde anhand einer Fluoreszenzfärbung mikroskopisch analysiert.

Um die Regeneration unter funktionellen Aspekten zu beurteilen, wurden Serumkreatinin und -harnstoff im zeitlichen Verlauf bestimmt, ein histologischer „Damage Score“ diente zur Objektivierung der strukturellen Nierenregeneration.

3.2 Versuchstiere

3.2.1 Versuchsgenehmigung

Der Versuch mit der Kennnummer 50.203.2-K7, 22/04 wurde durch die Bezirksregierung Köln genehmigt und gemäß den Richtlinien des Tierschutzgesetzes unter Aufsicht des Tierschutzbeauftragten der medizinischen Fakultät der Universität zu Köln durchgeführt.

3.2.2 Haltung

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte präoperativ zu zweit und postoperativ zunächst einzeln in Kunststoffkäfigen mit Metallabdeckungen unter konstanten Umweltbedingungen innerhalb eines klimatisierten Tierstalls:

- Temperatur 21 °C
- Luftfeuchtigkeit 60%
- Tag-/ Nachtzyklus 12 Stunden (8:00 h/ 20:00 h)

Futter und Trinkwasser standen frei zur Verfügung. Das Tierfutter bestand aus speziellen Nährpellets mit einem Proteinanteil von 19% und einem NaCl- Gehalt von 0,25%. Das Trinkwasser wurde zur Entkalkung und Entkeimung vorbehandelt.

Die Versuchstiere wurden nach Lieferung und vor Beginn der Untersuchungen zur Gewöhnung für eine Woche unter diesen Umgebungsbedingungen gehalten.

3.2.3 Gruppeneinteilung

Die Versuchstiere wurden in 2 Gruppen eingeteilt. Alle Tiere wurden einseitig nephrektomiert und die verbleibende Niere einer Ischämie unterzogen. In der Verumgruppe wurde danach eine Zelllösung und in der Kontrollgruppe eine Vehikellösung appliziert.

Den Tieren aus Gruppe I wurde im zeitlichen Verlauf postoperativ Blut zur Bestimmung der Retentionsparameter Kreatinin und Harnstoff abgenommen. Zu definierten Zeitpunkten nach der Operation wurden den Tieren der Gruppe II die Organe zur weiteren Analyse entnommen.

Insgesamt wurden 70 weibliche Tiere operiert und 35 männliche Tiere für die Knochenmarkgewinnung benötigt.

Folgende Gruppeneinteilung wurde für die Versuche ausgewählt:

Gruppe für Organentnahme		
Organentnahme (post OP)	intraarterielle Applikation	
	Zellen	Vehikel
2 Stunden	7 Tiere	7 Tiere
1 Tag	7 Tiere	7 Tiere
2 Tage	7 Tiere	7 Tiere
7 Tage	7 Tiere	7 Tiere

Tabelle 2: Einteilung der Untersuchungsgruppe I. Die Organentnahmen erfolgten zu definierten Zeitpunkten nach I/R-Schaden.

Gruppe für Laboruntersuchungen		
intraarterielle Applikation	Zellen	Vehikel
	7 Tiere	7 Tiere
Blutentnahme (post OP)	2 Stunden	
	1 Tag	
	2 Tage	
	3 Tage	
	5 Tage	
	7 Tage	

Tabelle 3: Einteilung der Untersuchungsgruppe II. Die Blutentnahmen erfolgten täglich nach I/R-Schaden.

3.3 Gewinnung der Stammzellen

3.3.1 MACS-Separation

Prinzip

Zur Auftrennung der Zellpopulationen wurde das MACS-System der Firma Miltenyi-Biotec verwendet. Magnetic Cell Separation (MACS) wurde in den 90er Jahren zur Sortierung von Zellgemischen und der Separation von bestimmten Zellen aus einem Gemisch entwickelt. Eingesetzt werden ungefähr 50 Nanometer große MicroBeads, an die spezifische Antikörper gebunden sind. Die Auftrennung erfolgt anhand der Oberflächenantigene (Cluster of Differentiation = CD). Durchfließt das Zellgemisch eine Säule, die von einem Magnetfeld umgeben ist, werden die mit den MicroBeads markierten Zellen zurückgehalten. Auf diese Weise erhält man beim Spülen der Säule nur die unmarkierten Zellen (Depletion), die markierte Zellpopulation wird durch die Magneten aus dem ursprünglichen Zellgemisch zurückgehalten. Wird das Magnetfeld entfernt, kann die markierte Zellpopulation aus der Säule gespült und für weitere Versuche verwendet werden (Elution). Durch wiederholte Behandlung eines Zellgemisches mit MicroBeads an verschiedenen Antikörpern ist eine fraktionierte Auftrennung der Zellpopulationen möglich [83].

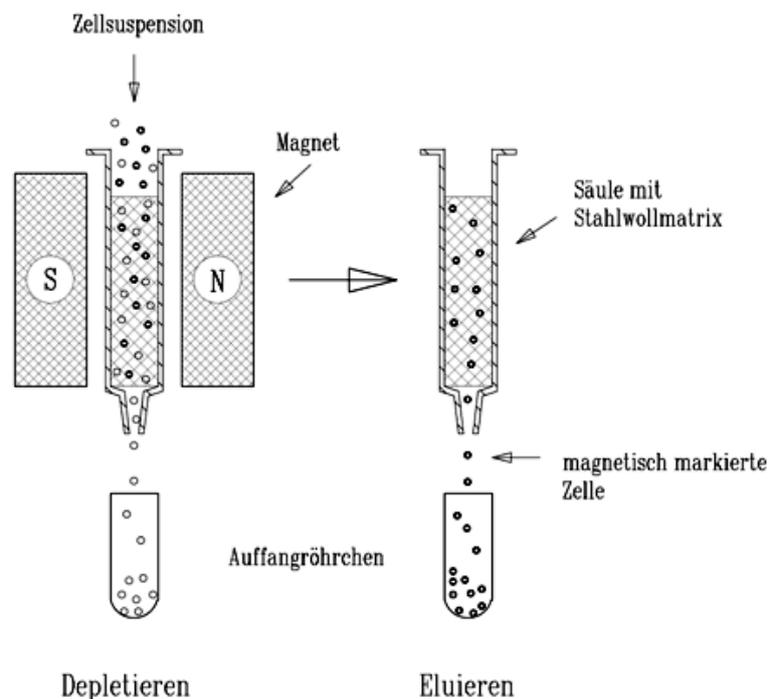


Abbildung 1: Prinzip der MACS-Separation. Nach Depletion unerwünschter Zellen kann die separierte Zellpopulation eluiert werden.

Negativselektion Die Negativselektion der Linienmarker-positiven Zellen (lineage-positive, lin^+), also der Ausschluss aller Zellen mit Differenzierungsmerkmalen, erfolgte anhand der etablierten Oberflächenmarker CD3, CD11, CD45 und HIS49 [111].

<i>Antigen</i>	<i>Alternativer Name</i>	<i>Vorkommen</i>
CD3		T-Lymphozyten
CD11	Integrin Alpha ITGA	NK-Zellen Makrophagen Monozyten Granulozyten Dendritische Zellen Makrophagen Monozyten Granulozyten
CD45	Protein Tyrosin Phosphatase Receptor Type C PTPRC	Lymphozyten
HIS49	Erythrozytenspezifischer Antikörper ESA	Erythrozyten

Tabelle 4: Antigene für die Negativselektion lin^+ -Zellen im Knochenmark.

Positivselektion Die lin^- -Zellen konnten mit einer Positivselektion weiter aufgereinigt werden, die Antikörper waren gegen den im Rattenmodell zur Isolation von hämatopoetischen Vorläuferzellen gängigen Oberflächenantikörper CD90 gerichtet [41, 118, 111].

<i>Antigen</i>	<i>Alternativer Name</i>
CD90	Thymogen Differentiation Antigen 1 Thy1

Tabelle 5: Antigene für die Positivselektion lin^- -Zellen im Knochenmark.

Nach diesen beiden Selektionsschritten war ein Großteil der differenzierten Nachfolger hämatopoetischer Vorläuferzellen sowie weitere Zellpopulationen aus der Zelllösung eliminiert.

Die verwendeten Antikörper im Rattenmodell erlaubten die Aufkonzentration eines Gemisches hämatopoetischer Vorläuferzellen mit hohem Stammzellanteil. Im Weiteren wird dieses Zellgemisch synonym mit hämatopoetischen Stammzellen (HSC) verwendet.

Durchführung

Isolation von Knochenmark Das stammzellreiche rote Knochenmark wurde aus den großen Röhrenknochen Femur, Tibia und Humerus von männlichen Ratten gewonnen. Zur Explantation wurden die Tiere nach initialer Inhalationsnarkose mit Isofluran durch Genickbruch getötet.

Die Tiere wurden mit Kanülen auf einer mit Alufolie bezogenen Styroporarbeitsplatte fixiert, sorgfältig rasiert und desinfiziert. Nach initialem Hautschnitt am Ansatz aller vier Extremitäten wurde der darunter liegende Weichteilmantel durchtrennt und die Knochen mit Pinzette, Schere und Skalpell sauber freipräpariert und exartikuliert. Nach Desinfektion mit 70% Ethanol wurden die herausgelösten Knochen in PBS auf Eis gekühlt. Bei der Präparation beschädigte Knochen wurden aus Kontaminationsgründen nicht zur Zellgewinnung benutzt.

Alle weiteren Schritte erfolgten steril und mit gekühlten Reagenzien. Als Puffer wurde MACS-Puffer verwendet. Zum Ausspülen der Knochen diente eine 20 ml Spritze mit einer 21 G Kanüle. Nach sauberer Abtrennung der proximalen und distalen Knochenepiphysen wurde das Knochenmark aus den Röhrenknochen in eine Petrischale gespült. Durch zwei- bis dreimaliges Durchspülen der Knochen konnte das Knochenmark komplett extrahiert werden. Noch vorhandene Zellverbände wurden aufgelöst, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Abschließend wurde die Zellsuspension filtriert und in ein 50 ml Falcon Tube gefüllt. Ausgangsmaterial für die weiteren Schritte war der „Buffy-Coat“, ein Konzentrat an Leukozyten und Blutplättchen, welches man nach dem Abzentrifugieren von Knochenmark erhält und in dem sich unter anderem die hämatopoetischen Stammzellen befinden. Um den Buffy-Coat vom restlichen Mark zu trennen, wurde die Zellsuspension mit Ficoll-Lösung unterspült und durch Zentrifugieren aufgetrennt. Danach wurde der Buffy-Coat an der Grenzschicht abpipettiert und zweimal mit PBS gewaschen. Eine Probe der Zellsuspension wurde nach Färbung mit Trypan-Blau zur Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Zell-Labeling

CD3/CD11/CD45 Pro 10^8 Zellen wurden je 25 μ l PE-gelabelte Antikörper gegen CD3, CD11, CD45 hinzugefügt und 20 Minuten bei 4 °C zur Bindung der Antikörper an die Zellen inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und resuspendiert. Pro 10^8 Zellen wurden 200 μ l Anti-PE-MicroBeads hinzugegeben, für 20 Minuten im Kühlschrank inkubiert und danach gewaschen.

His49 Pro 10^8 Zellen wurden 25 μ l Biotin-gelabelter Antikörper gegen His49 hinzugefügt und 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und resuspendiert. Pro 10^8 Zellen wurden 200 μ l Anti-Biotin-MicroBeads hinzugegeben, für 20 Minuten im Kühlschrank inkubiert und danach gewaschen. Die Fluoreszenzfärbung der Zellen folgte der ersten Inkubation mit FITC-gekoppeltem Streptavidin nach gleichem Schema .

CD90 Pro 10^8 Zellen wurden 25 μ l PerCP-gelabelter Antikörper gegen CD90 hinzugefügt und 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und resuspendiert. Pro 10^8 Zellen wurden 100 μ l Anti-PerCP-MicroBeads hinzugegeben, für 20 Minuten im Kühlschrank inkubiert und danach gewaschen.

Negativ- Selektion

Nachdem Säule und Filter mit Puffer durchgespült und am Magneten befestigt worden waren, wurde die lin⁺-gelabelte Zellsuspension auf die Säule gegeben. Die nicht gebundenen Zellen wurden in zwei Waschschrritten aus der Säule gespült und ausgezählt.

Positiv- Selektion

Die so erhaltene Zellsuspension wurde nach CD90-Labelung auf die Säule gegeben und mit 5 ml MACS-Puffer nachgespült, die dabei aufgefangene Lösung verworfen.

Nach Entnahme aus dem Magneten wurden die gebundenen Zellen mit MACS-Puffer unter Druck aus der Säule herausgepresst. Die Zellsuspension wurde aufgefangen, zweimal in PBS gewaschen und dann resuspendiert. Danach erfolgte die Zellzählung und Einstellung auf 1×10^6 Zellen pro 250 μ l PBS.

Pro männlichem Spendertier konnten durchschnittlich 1×10^6 Zellen gewonnen werden.

3.3.2 FACS-Analyse

Prinzip

Zur genauen Identifizierung der separierten Zellpopulationen dient die Durchflusszytometrie (FACS = fluorescence activated cell sorting). Die Analysen wurden an einem FACS-Canto Gerät durchgeführt und mit Hilfe der Cyflogic Analysesoftware ausgewertet.

Das FACS-Prinzip beruht auf der Emission von optischen Signalen einer Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Die Zelloffnung wird durch eine Düse gepresst, die bewirkt, dass die Zellen einzeln einen Laserstrahl passieren und einen Teil des Lichtes streuen, welches dann mittels Detektoren nachgewiesen wird. Die Menge des gestreuten Lichtes korreliert mit Größe und Struktur der Zelle. So ist eine Identifikation und Gewichtung der in der Lösung enthaltenen Zellpopulationen möglich.

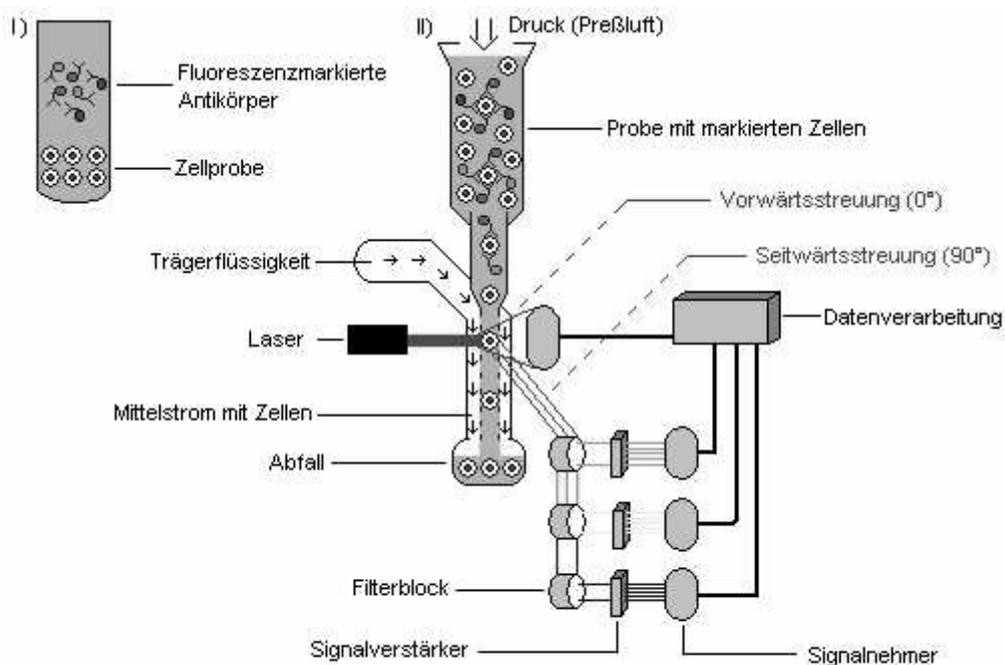


Abbildung 2: Prinzip der FACS-Analyse. Nach Fluoreszenzfärbung mit antigenspezifischen Antikörpern erfolgt die Aufteilung der Zellen je nach ihrer Streuung eines Laserstrahls.

3.3.3 Vitalitätsfärbung mit Trypanblau

Die Trypanblaufärbung wurde zur Vitalitätsbestimmung der Zellen verwendet. Da vitale Zellen eine intakte, für Trypanblau unpassierbare Zellmembran haben, kann die Farbe nur in geschädigte Zellen eindringen.

Um den Anteil der lebenden Zellen zu bestimmen, wurde nach der FACS-Bestimmung eine Probe von 50 µl entnommen, mit 5 µl Trypanblau versetzt und unter der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Alle nicht angefärbten Zellen galten als vital.

3.3.4 PKH-26-Färbung

Bei dem Fluoreszenzfarbstoff PKH-26 handelt es sich um eine in die Zellmembran integrierende, lipophile Substanz mit einer Halbwertszeit von über 100 Tagen.

Für die Zellfärbung wurden die Zellen in serumfreiem Medium resuspendiert, zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipettiert und das entstandene Zellpellet in 1 ml Diluent C vollständig resuspendiert. 1 ml PKH-26 mit Diluent C (im Verhältnis 4:1000 gemischt), wurde zu den Zellen gegeben und sorgfältig miteinander vermischt, um eine möglichst homogene Anfärbung der Zellen zu erzielen. Die Inkubation erfolgte 5 Minuten lang bei Raumtemperatur. Nach Stoppen der Färbereaktion durch die Zugabe von 2 ml FKS-haltigem Medium und 4 ml serumfreiem Medium, wurden die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen, um sie vollständig von der Färbelösung zu befreien. Die Einstellung erfolgte auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen pro 250 µl PBS. Eine ausreichende und homogene Färbung der Zellen wurde fluoreszenzmikroskopisch kontrolliert.

3.4 Operation der Versuchstiere

3.4.1 Narkose

Prinzip

Die Narkose der Tiere erfolgte mit einer initialen Inhalationsnarkose mit Isofluran, um den Tieren dann intraperitoneal das Narkotikum (Ketamin) und das Muskelrelaxans (Xylazin) injizieren zu können.

Durchführung

Für die Inhalationsnarkose wurden ca 10 ml Isofluran in ein verschließbares Glasgefäß gegeben und einige Minuten gewartet, bis das Narkotikum verdampft war. Für die intraperitoneale Injektionsnarkose wurden Ketamin und Xylazin in einem Mischungsverhältnis 4:1 in einer 1 ml Spritze aufgezogen und eine 25 G-Kanüle auf die Spritze aufgesetzt. Die Menge des Narkosegemisches betrug 1 mg pro Kilogramm Körpergewicht des Tieres.

Das Versuchstier wurde in die Isofluran-gefüllte Glasglocke gesetzt. Sobald das Tier narkotisiert war, wurde es aus der Glocke genommen und gewogen. Die Ratte wurde am Rücken gefasst und das Narkosegemisch in einem 30°-Winkel durch die gestraffte Bauchhaut in den Intraperitonealraum gespritzt. Bis zum kompletten Wirkeintritt wurde das Tier wieder in den Käfig gelegt.

3.4.2 Operation

Prinzip

Ziel der Operation war, ein akutes ischämisches Nierenversagen zu induzieren und danach Stammzellen so organnah wie möglich zu applizieren. Um den Effekt auf die laborchemisch bestimmten Retentionsparameter zu maximieren, wurden die Tiere rechtsseitig nephrektomiert und die verbleibende Niere dann für 70 Minuten mit Gefäßklemmen von ihrer arteriellen Versorgung getrennt. Die Aorta wurde auf der gesamten Länge freipräpariert und die Stammzellen nach einer Reperfusionsphase von 15 Minuten auf Höhe der Niere injiziert.

Durchführung

Nach sorgfältiger Rasur, Desinfektion und steriler Abdeckung erfolgte die mediane Inzision der Bauchhaut und schichtweise Freiräparation bis zur Muskulatur. Diese wurde entlang der Linea alba längs eröffnet und mit zwei Wundhaken offen gehalten. Die Dünndarmschlingen wurden auf eine feuchte Kompresse ausgelagert. Magen, Milz und Leber wurden mit stoffüberzogenen Haken aus dem Operationsbereich herausgehalten.

Es erfolgte die Darstellung der Aorta abdominalis auf ihrer kompletten Länge. Dazu wurde das Gefäß von der Vena Cava freipräpariert, die bindegewebige Umscheidung entfernt und kleinere Gefäßabgänge dargestellt und je nach Größe verödet oder ligiert. Nach Freipräparation des Nierenhilus, des proximalen Ureters und der versorgenden Gefäße der rechten Niere erfolgte die Nephrektomie. Hierzu wurden die Gefäße und der Ureter separat ligiert, durchtrennt und danach die Niere in toto entfernt.

Zur Darstellung der linken Niere wurde die Gerota-Faszie und die Capsula adiposa stumpf abpräpariert und die Capsula fibrosa mit einer feinen Pinzette entfernt. Dann wurden alle hilären Strukturen sorgfältig freipräpariert und von Bindegewebe befreit. Größere akzesorische Nierengefäße wurden ligiert, kleine Gefäße verödet.

Danach erfolgte das Anbringen der Bulldog-Klemme an der Arteria renalis zur Einleitung der Ischämiephase. Der Erfolg wurde durch die Verfärbung des Nierengewebes kontrolliert. Die Darmschlingen wurden zurück in den Situs gelegt und dieser gegen Austrocknung mit einer angefeuchteten Kompresse abgedeckt. Die Körpertemperatur des Tieres wurde mit einer Infrarotlampe konstant gehalten.

Nach 70-minütiger Ischämie wurde die Bulldog-Klemme entfernt und die komplette Reperfusion des Organs durch die Parenchymverfärbung bestätigt. Der Situs wurde für die 15-minütige Reperusionsphase wieder abgedeckt. Danach erfolgte die Injektion der Zell- bzw. Vehikellösung mit einer 1 ml Hamilton-Spritze in die Aorta. Der Blutfluss wurde kranial zwischen Nierenarterienabgängen und Truncus coeliacus und kaudal vor der Aufzweigung in die Iliakalgefäße mit Bulldog-Klemmen temporär unterbunden und die Zellen mit aufgesetzter Kanüle direkt unterhalb der Nierenarterienabgänge injiziert. Bei den Tieren der Zellgruppe waren es 1×10^6 Zellen HSC-Konzentrat in 250 μ l PBS, bei der Kontrollgruppe äquivalente Volumina PBS ohne Zellösung. Danach erfolgte der sofortige Verschluss der Einstichstelle mit Histoacrylkleber und das Entfernen der Aortenklappen nach Überprüfung der Dichtigkeit.

Zum Ausgleich des intraoperativen Flüssigkeitsverlustes wurden die Tiere vor und nach der Operation gewogen und die Differenz durch intraperitoneale NaCl-Gabe ausgeglichen. Es folgte der schichtweise Wundverschluss mit fortlaufenden Nähten (Ethilon 3.0) und die Tiere wurden einzeln in ihre Käfige zurückgesetzt. Zur postoperativen Analgesie erfolgte eine Bolusgabe von 0,1 ml Buprenorphin subkutan. Die Tiere wurden bis zum Aufwachen überwacht.

3.5 Postoperative Probengewinnung

3.5.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme zur Bestimmung der renalen Retentionsparameter Kreatinin und Harnstoff erfolgte mittels 23 G Flügelkanülen. Das Versuchstier wurde in einem Restraîner platziert, einer größenverstellbaren Plexiglasröhrenvorrichtung zur Fixierung des Tieres. Zur leichteren Blutgewinnung wurde der Schwanz für einige Sekunden in warmes Wasser getaucht und somit die Schwanzvenen dilatiert. Danach wurde eine der Schwanzvenen distal punktiert und 0,5 ml Blut aufgefangen. Durch manuelle Kompression wurde eine rasche Blutstillung erreicht. Nach zehnmütiger Zentrifugation der Proben bei 5.000 g wurde das gewonnene Serum bei -80 °C gelagert.

Die Bestimmung der Kreatinin- und Harnstoffwerte erfolgte nach standardisierten Verfahren durch das Institut für klinische Chemie der Uniklinik Köln. Dabei wurde die Harnstoffkonzentration mittels eines kinetischen UV-Tests und die Kreatininkonzentration mittels eines enzymatischen Tests am Roche 917 Analyzer (Roche Diagnostics) bestimmt.

3.5.2 Organentnahme

Zur Bestimmung der Stammzellzahl in den einzelnen Organen wurden den Tieren zu festgelegten Zeitpunkten nach der Operation Organe entnommen. Die Ratten wurden nach initialer Inhalationsnarkose durch Genickbruch getötet.

Nach Desinfektion von Thorax und Abdomen wurde das Abdomen entlang der Operationsnarbe eröffnet und Niere, Leber und Milz entfernt. Danach erfolgte die Entfernung beider Lungenflügel und des Herzens durch sternale Thorakotomie. Zur Entnahme des Großhirns wurde der Schädel durch das Foramen magnum längs gespalten. Als repräsentativer Teil der Skelettmuskulatur wurden die Mm. Iliopsoas und Quadriceps Femoris, zur Beurteilung des Knochenmarks die großen Röhrenknochen (Femur, Tibia und Humerus beider Seiten) entnommen. Alle Organe wurden nach Entnahme gewogen und das Gewicht dokumentiert.

Die Niere wurde als wichtigstes Organ zuerst asserviert und in drei Teile aufgeteilt. Der Oberpol wurde für die histologischen Analysen separiert und in 10% Formalinlösung eingelegt. Der Unterpol wurde für die fluoreszenzmikroskopischen Analysen im Kryomedium Tissue-Tek eingebettet. Die mittleren 500 mg der Niere sowie jeweils ca. 500 mg der anderen Organe und Gewebe (Milz ca. 200 mg) wurden mit einem Skalpell in Würfel (Kantenlänge 1 mm) zerkleinert und schockgefroren. Aus den langen Röhrenknochen wurde das Knochenmark mit PBS herausgespült, auf 1 ml eingestellt und die Zellzahl nach Trypan-Blau-Färbung mikroskopisch bestimmt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die formalinfixierten Nierenoberpole bei 4 °C und alle anderen Proben bei -80 °C gelagert.

3.6 Analyse der Organproben

3.6.1 Histologische Analyse der Organschädigung

Die formalinfixierten Nierenoberpole wurden, nach Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%-100%), gefolgt von Xylol und flüssigem Paraffin, in einen Paraffinblock eingebettet.

<i>Substanz</i>	<i>Zeit</i>
Ethanol 70 %	12 h
Ethanol 70 %	30 min
Ethanol 80 %	30 min
Ethanol 90 %	30 min
Ethanol 100 %	30 min
Ethanol 100 %	30 min
Xylol	30 min
Xylol	30 min
Paraffin	30 min
Paraffin	30 min

Tabelle 6: Die Arbeitsschritte zur Fixierung der Organproben. Die entnommenen Präparate werden dehydriert und anschließend in Paraffin eingebettet.

Zur weiteren Beurteilung wurden Schnitte von 5 µm Schichtdicke angefertigt, diese dann rehydriert und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Danach wiederholte sich die Entwässerung des Präparats, abschließend wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckt.

<i>Substanz</i>	<i>Zeit</i>
Xylol	5 min
Ethanol 100 %	5 min
Ethanol 90 %	5 min
Ethanol 80 %	5 min
Ethanol 70 %	5 min
Aqua dest.	5 min
Aqua dest.	5 min
Saures Hämatoxylin	5-10 min
Leitungswasser	10-15 min
Eosin	1-2 min
Aqua dest.	5-10 sec

Tabelle 7: Die Arbeitsschritte zur Färbung der Gewebsschnitte. Nach Rehydrierung erfolgt die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin.

Nach der fertigen Vorbereitung wurden die Tubulusschäden semiquantitativ anhand eines von Chatterjee et al etablierten Damage-Scores [26] beurteilt.

Hierzu wurden pro Niere 100 zufällig gewählte Gesichtsfelder in 20-facher Vergrößerung auf Zellschäden der Tubuli untersucht. Anhand der histologischen Merkmale wurden für jedes Gesichtsfeld 0 bis 3 Punkte vergeben, die in der Summe für jede Niere einen "damage score" mit einem Maximum von 300 ergaben.

<i>Score-Wert</i>	<i>Histologie</i>
0	Normalbefund
1	Zelluläre Schwellung Verlust des Bürstensaums Kernverlust bei $\leq 1/3$ der Zellen
2	Zelluläre Schwellung Verlust des Bürstensaums Kernverlust bei $\leq 2/3$ der Zellen
3	Zelluläre Schwellung Verlust des Bürstensaums Kernverlust bei $> 2/3$ der Zellen

Tabelle 8: Die Bestimmung der Damage Scores. Je nach histologischem Zustand der Tubuluszellen wurden 0-3 Punkte pro Gesichtsfeld vergeben.

3.6.2 Fluoreszenzanalyse der renalen Zellverteilung

Zur fluoreszenzmikroskopischen Probenauswertung wurden aus dem in Tissue-Tek eingebetteten und schockgefrorenen Nierengewebe mit einem Kryotom 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Auswertung wurde bei einem Anregungsspektrum von 551 nm und einem Emissionsspektrum von 567 nm an einem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt.

3.6.3 DNA-Isolation

Die Organauflösung und DNA-Isolation wurde mit Hilfe des DNeasy-Tissue-Kit durchgeführt. Die Organe wurden als Teilproben analysiert und die Zellzahl im Anschluss auf das Gesamtgewicht umgerechnet. Ausnahmen bildeten das Knochenmark und die Skelettmuskulatur, da diese Organsysteme nicht in toto entnommen werden konnten und die erhaltenen Werte lediglich repräsentative Näherungswerte darstellen.

Pro 10 mg Gewebe wurden 90 µl ATL-Puffer und 10 µl Proteinase K hinzugegeben und sorgfältig vermischt. Die Suspension wurde über Nacht auf einem Schüttler bei 50 °C ins Wasserbad gestellt, bis das Gewebe vollständig aufgelöst war.

Zur weiteren DNA-Extraktion wurden 200 µl des Lysates weiterverwendet und mit 200 µl AL-Puffer bei 70°C für 10 Minuten inkubiert. Mit 200 µl reinem Ethanol wurde die enthaltene DNA ausgefällt. Diese Lösung wurde auf die DNA-Extraktionssäule gegeben, in einem 2 ml Mikrogefäß platziert und für 1 Minute bei 8.000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wiederholte sich zweimal nach gleichem Schema, zunächst nach Zugabe von 500 µl AW1-Puffer, dann nach Zugabe von 500 µl AW2-Puffer, um die Membran der Säule vollständig von der Lösung zu befreien und sicherzustellen, dass keine Ethanolreste mehr vorhanden waren.

Die Säule wurde dann in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß platziert und mit 50 µl des AE-Puffers für 1 Minute inkubiert und danach bei 8.000 rpm abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Das endgültige Lysat hatte ein Volumen von 100 µl.

3.6.4 Quantifizierung der Spenderzellen durch Realtime-PCR

Prinzip

Die quantitative Bestimmung der überlebenden Stammzellen im zeitlichen Verlauf sowie in Abhängigkeit von der Anzahl zuvor applizierter Zellen erfolgte durch die Real-Time-PCR. Der Vorteil dieses Verfahrens besteht in einer Echtzeitanalyse der PCR-Produkte nach jedem Amplifikationszyklus, also der Vervielfältigung und simultanen Bestimmung der Menge des PCR-Produktes in einem Ansatz. Grundsätzlich erfolgt die Messung der initialen DNA-Menge in einer Probe über die Fluoreszenz-Intensität einer zweifach farbstoffmarkierten Sonde. Die herkömmliche TaqMan®-Sonde trägt am 5'-Ende einen Reporter- und am 3'-Ende einen Quencherfarbstoff. Bei Anregung des Reporters durch Licht wird seine Fluoreszenzenergie auf den Quencher übertragen und man erhält ausschließlich dessen Signal. Er schluckt im ungebundenen, intakten Zustand der Sonde die Fluoreszenz des Reporters, ein Vorgang der als Fluoreszenz-Energie-Transfer (FET) bezeichnet wird. Nach der Anlagerung von Sonde und Primer an den Matrizen-Strang hydrolysiert die Taq-Polymerase durch ihre 5'-Exonuklease die Sonde, wodurch der freigesetzte Reporterfarbstoff aus dem Einflussbereich des Quenchers gelangt und der FET unterbrochen wird. Das Fluoreszenzsignal des Reporters wird frei und kann gemessen werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten MGB-Sonden unterscheiden sich in zwei wesentlichen Eigenschaften von den TaqMan®-Sonden. Anstelle des anregbaren Quenchers besitzen sie einen Non-Fluorescent Quencher (NFQ), der statt eines Fluoreszenzsignals Wärmeenergie abgibt. Durch das somit wegfallende Hintergrundsignal kann das Signal des Reporters noch genauer detektiert werden. Außerdem sind die MGB-Sonden am 3'Ende mit einem minor groove binder (MGB) konjugiert, der sich in die DNA-Doppelhelix einlagert und die Stabilität der Hybridisierung zwischen Sonde und DNA-Zielsequenz steigert. Die dadurch erhöhte Schmelztemperatur erlaubt die Verwendung kürzerer Sonden und damit

einen optimalen Fluoreszenztransfer. Außerdem wird durch eine bessere Differenzierung zwischen „Match“- bzw. „Mismatch“-Sequenzen eine höhere Spezifität erreicht [68, 69].

Da nicht-hybridisierte Sondenstücke durch die Polymerase nicht hydrolysiert werden, entsteht messbare Fluoreszenz nur, wenn die Polymerase tatsächlich einen DNA-Strang verdoppelt hat, wobei jedes freigesetzte Farbstoffmolekül einem neu gebildeten DNA-Strang entspricht. Entsprechend der Akkumulation der PCR-Produkte steigt die Fluoreszenz des Reporters mit jedem PCR-Zyklus an.

Zu Beginn ist jedoch die Menge der Template-DNA sehr begrenzt und daher die Verdopplungswahrscheinlichkeit geringer als zu einem späteren Zeitpunkt der Amplifikation (Basislinie). Gegen Ende ist Menge der PCR-Produkte so hoch, dass es durch Hybridisierung untereinander zu einer Hemmung der Amplifikation kommen kann. Außerdem nimmt der Verbrauch der Substrate zu (Plateauphase). Also kann von einer exponentiellen und damit quantifizierbaren Amplifikation nur in der mittleren Phase der PCR ausgegangen werden (Exponentielle Phase), da hier optimale Reaktionsbedingungen vorliegen und die Effizienz nahezu 100% beträgt. Den Anfang markiert der CT-Wert (Threshold Cycle), der dem Amplifikationszyklus entspricht, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt.

Um von einem bestimmten CT-Wert auf die ursprüngliche Templatekonzentration zu schließen, werden bekannte Templatemengen parallel amplifiziert und daraus zum Vergleich eine Standardkurve erstellt.

Generierung von Standards

In Vorarbeiten wurden die PCR-Bedingungen bereits soweit optimiert, dass die DNA einer einzigen männlichen Spenderzelle in der DNA von 100.000 weiblichen Zellen zuverlässig identifiziert werden konnte, wobei abgestorbene Zellen wegen ihres schnellen Abbaus keinen Einfluss auf Ergebnisse hatten [20]. Als Template wurde das SRY-Gen (Sex Determining Region of Y-Gen) zur Quantifizierung der männlichen Spenderzellen in den weiblichen Empfängerorganen verwendet. Als Referenzgen zum relativen Mengenvergleich der Templates wurde das ubiquitär vorkommende OPN-Gen (Osteopontin) gewählt.

Eine Verdünnungsreihe wurde durch die in-vitro-Injektion männlicher HSC in Organproben von 500 mg Gewicht (Milz 200 mg) weiblicher Tiere generiert, beginnend mit 10^6 Zellen in 500 mg Gewebe, absteigend bis auf 10^1 Zellen in 500 mg Gewebe. Durch Abweichungen des Probengewichtes sowie der Effizienz der DNA-Isolierung unterschied sich jedoch der Gesamt-DNA-Gehalt dieser Standards von dem der Proben, die im eigentlichen Versuch gewonnen wurden. Um die dadurch hervorgerufene Beeinflussung der Sensitivität bezüglich der DNA-Bestimmung männlicher HSC auszugleichen, wurde als Indikator für den Gesamt-DNA-Gehalt der Proben die parallele Amplifikation des autosomalen OPN-Gens durchgeführt. Ein Standard wurde durch die in-vitro-Injektion von 10^6 HSC in Organproben

von 500 mg Gewicht (Milz 200 mg) weiblicher Tiere und die konsekutive Verdünnung mit PBS von 1:10 bis auf eine Konzentration von 10^1 Zellen auf $5 \mu\text{g}$ Gewebe generiert. In der Real-Time-PCR wurden aus diesem Standard das OPN- sowie das SRY-Gen amplifiziert und im Anschluss das Verhältnis der CT-Werte jeder Verdünnungsstufe zur Ausgangsspo-
be (10^6 HSC pro 500 mg Gewebe) sowohl für die OPN- als auch für die SRY-Amplifikation errechnet, die gegeneinander aufgetragen eine lineare Abhängigkeit zeigten. Im Experiment selbst wurde der Quotient aus dem CT-Wert der OPN-Amplifikation jeder Probe und der Verdünnungsreihe (Mittelwert) bestimmt und dieser in die Funktion der linearen Regressionsanalyse eingesetzt. Der CT-Wert der SRY-Amplifikation der Proben des Ver-
suchs konnte auf diese Weise bezüglich der Sensitivität durch die Normalisierung auf ein OPN, das 500 mg Niere entspricht, korrigiert werden. Nach der Ermittlung der Starting Quantity (absolute Zellzahl in der Probe) anhand des korrigierten CT-Wertes, wurde die-
se bezogen auf das tatsächliche Organgewicht bzw. auf das Gesamtorgan umgerechnet. Abschließend wurde die Anzahl detektierter Zellen (als Mittelwert aller Tiere zu einem Un-
tersuchungszeitpunkt) in Relation zur ursprünglich applizierten Zellzahl (1×10^6) gesetzt. Für die Quantifizierung des Knochenmarks wurden die Standards analog aus männlichen HSC und Knochenmark weiblicher Tiere generiert.

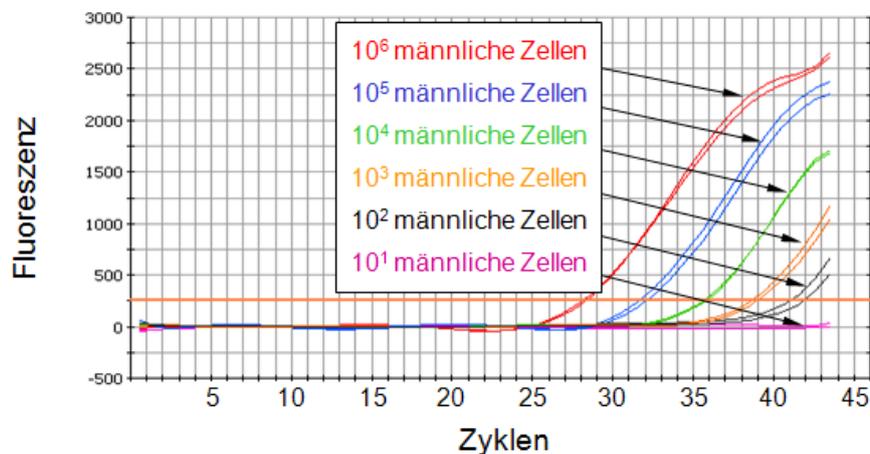


Abbildung 3: Quantifizierung männlicher HSC in weiblichen Gewebeprobe mittels Real-Time-PCR. Auftragung nach Fluoreszenzintensität abhängig von den PCR-Zyklen.

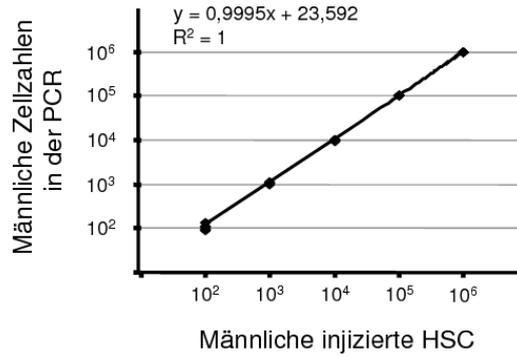


Abbildung 4: Lineare Regressionsanalyse zur Korrektur der CT-Werte in Abhängigkeit der jeweiligen Standards.

Folgende Verdünnungsreihen und Standards wurden verwendet

1. Verdünnungsreihen: Absteigende Zellzahl in Proben weiblicher Organe gleich bleibenden Gewichts beginnend mit 10⁶ Zellen auf 500 mg Gewebe bis 10¹ Zellen auf 500 mg Gewebe.
2. Standards: 10⁶ männliche Stammzellen in Proben weiblicher Organe von 500 mg Gewicht, konsekutive Verdünnung von 1:10 bis auf eine Konzentration von 10¹ männlichen Zellen auf 5 µg Gewebe.

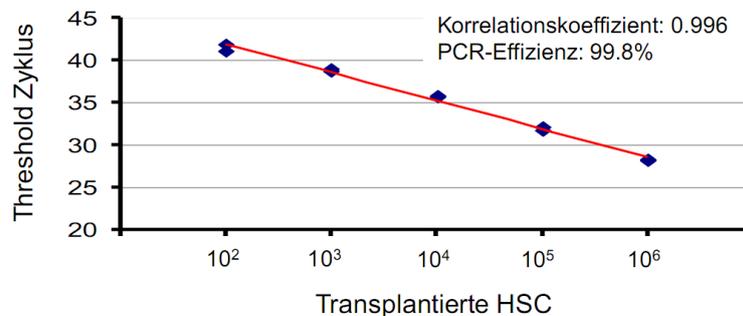


Abbildung 5: Standard-Effizienz-Kurve einer Verdünnungsreihe von 10⁶ männlichen Spenderzellen in 500 mg weiblichen Gewebes.

Durchführung

Nach photometrischer Bestimmung der DNA-Konzentration wurden pro PCR-Ansatz jeweils 5 µl (entsprechend 1 µg DNA) des nach der DNA-Isolation erhaltenen Lysats verwendet. 45 µl des PCR-Ansatzes wurden mit 5 µl dieser Template-DNA-Lösung gemischt, also ein Endvolumen von 50 µl pro PCR-Tube verwendet. Die PCR-Tubes wurden im icycler platziert und das Programm gestartet. Die Temperaturen, die die einzelnen Phasen eines Amplifikationszyklus kennzeichneten, sowie die Sequenzen der verwendeten Primer

und Sonden sowie ihre Anlagerungstemperatur sind weiter unten aufgeführt. Alle Messungen erfolgten als Dreifachbestimmungen.

Verwendete Primersequenzen und Sonden

<i>Primer</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Anlagerungstemperatur</i>
SRY-Sense	5'-GGAGAGAGGCACAAGTTGG-3'	60 °C
SRY-Antisense	5'-TCCCAGCTGCTTGCTGATC-3'	60 °C
SRY-Sonde	6FAM-CAACAGAATCCCAGCATG	60 °C
OPN-Sense	5'-CACCAGCAGCAGGACTGAAG-3'	60 °C
OPN-Antisense	5'-ATGCTTGCCGCAGGAGACT-3'	60 °C
OPN-Sonde	6FAM-AGCTAAGCCTCAGCATC	60 °C

Tabelle 9: Die Primerpaare und Sonden für die Durchführung der PCR mit Anlagerungstemperatur. Zielsequenzen sind das OPN- und das SRY-Gen

Ablauf eines Amplifikationszyklus

<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>	<i>Aktivität</i>
95 °C	15 Minuten	Aktivierung der Taq-Polymerase
94 °C	1 Minute	Aufspaltung der DNA-Doppelhelix
60 °C	1 Minute	Anlagerung der Primer und Sonden
72 °C	1 Minute	Extension durch Taq-Polymerase
72 °C	1 Minute	Endgültige Extension

Tabelle 10: Der Ablauf eines Amplifikationszyklus mit Temperatur, Dauer und ablaufender Reaktion.

Inhaltsstoffe eines PCR-Ansatzes

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>	
Template-DNA	5l	µl
10x PCR-Puffer	5	µl
25 mM MgCl ₂	5	µl
dNTP	1	µl
Primer A (sense)	0,1	µl
Primer B (antisense)	0,1	µl
Taq-Polymerase	0,15	µl
MGB-Sonde	0,08	µl
Aqua dest.	33,57	µl
Summe	50	µl

Tabelle 11: Die Inhaltsstoffe, die pro PCR-Ansatz benötigt wurden

3.7 Ausschluss- und Tötungskriterien

3.7.1 Ausschlusskriterien

Die Versuchstiere wurden in die Versuchsauswertung aufgenommen, wenn im gesamten Verlauf bis zum Datum der Organentnahme keinerlei Komplikationen aufgetreten waren und die Tiere nicht aus unten genannten Gründen aus der Versuchsgruppe ausgeschlossen werden mussten. Nach der Operation wurde der Zustand der Tiere täglich überprüft.

Folgende Befunde galten als Ausschlußkriterien

Präoperativ

- Tier zu schwer oder zu leicht (Sollgewicht 150-200 g)
- Unzureichendes Ansprechen auf die intraperitoneale Narkose

Intraoperativ

- Verletzung der Nieren oder andere Organe (z.B. Darmischämie)
- Starke intraoperative Blutverluste
- Herzstillstand bzw. Z.n. intraoperativer Reanimation
- Inkomplette Ischämie der Niere
- Fehlerhafte Stammzellapplikation

Postoperativ

- Urämie bis hin zum Koma
- Sichtbare Wundinfektionen
- Apathie
- Aggressivität
- Fehlende Futter-/ Wasseraufnahme
- Zittern am ganzen Körper
- Struppiges, ungepflegtes Fell

- „Rote Tränen“
(Ein Sekret der Harderschen Drüse, das von gesunden Tieren weggeputzt wird, von kranken jedoch nicht)

3.7.2 Tötungskriterien

Fielen bei den täglichen Kontrollen eine oder mehrere der genannten Befunde an einem Versuchstier auf und half auch eine adäquate Schmerztherapie nicht, wurde der Entschluß zur vorzeitigen Euthanasie getroffen, um dem Tier unnötiges Leiden zu ersparen. Die Tiere wurden mittels CO₂-Insufflation getötet und von der Versuchsauswertung ausgeschlossen.

Außerdem galten als Tötungskriterien die diesbezüglichen Empfehlungen des Tierschutzbeauftragten der Universität zu Köln. Zur Qualitätssicherung wurden alle Tiere, die unter oben genannte Tötungskriterien fielen bzw. unter unklaren Bedingungen verstorben waren, seziert.

3.8 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden als Mittelwert \pm SEM (Standard-Error of the Mean = Standardfehler des Mittelwerts) dargestellt. Tabellarisch wurden die Daten mit der Hilfe von Microsoft Excel (Redmond, USA) zusammengestellt, statistische Analysen wurden mit SPSS 12.0.1 (Chicago, USA) durchgeführt. Dem statistischen Vergleich der Laborwerte sowie der Ergebnisse der quantitativen PCR der einzelnen Gruppen diente der Student's t-Test für unpaare Stichproben. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der wichtigsten Zellpopulationen

Im ersten Schritt wurden die Zellen nach Größe (Forward Scatter) und Granularität (Side-ward Scatter) aufgeteilt und von toten Zellen abgegrenzt (Gating). In den weiteren Schritten wurden die Zellen dann nach Färbung dargestellt und in Quadranten (Q_{a-d}) unterteilt.

Durchgeführte FACS-Analysen

1. Knochenmark alle Färbungen
 - (a) Nativ (prä-MACS)
2. Negativselektion His49-FITC
 - (a) Nativ (prä-MACS)
 - (b) Nach Selektion (post-MACS)
3. Negativselektion CD3-PE
 - (a) Nativ (prä-MACS)
 - (b) Nach Selektion (post-MACS)
4. Negativselektion CD45-PE
 - (a) Nativ (prä-MACS)
 - (b) Nach Selektion (post-MACS)
5. Negativselektion CD11b/c-PE
 - (a) Nativ (prä-MACS)
 - (b) Nach Selektion (post-MACS)
6. Knochenmark alle Färbungen
 - (a) Nach Negativselektion (post-MACS)
7. Positivselektion CD90-PerCP
 - (a) Nativ (prä-MACS)
 - (b) Nach Selektion (post-MACS)

Wie im Methodenteil bereits erwähnt, exprimieren nicht nur hämatopoetische Stammzellen, sondern auch weitere Zellen der hämatopoetischen Reihe CD90. Ein Großteil dieser Zellen sollte durch eine Negativselektion entfernt werden. Dazu wurden die zelltypischen Oberflächenmarker verwendet. Im folgenden Teil sind die Analysen der einzelnen Separationsschritte dargestellt. Die einzelnen Negativselektionen sind anfangs zur Qualitätssicherung und Erfolgskontrolle separat durchgeführt worden, intraoperativ liefen diese simultan ab. Die depletierte Zelllösung wurde dann für die Positivselektion verwendet.

Schritt 1 Vor Aufreinigung des Zellgemisches zeigen sich in dem zellreichen Buffy-Coat, der aus den Röhrenknochen extrahiert wurde, 22,6% der Zellen CD90⁺ (Abb.5, Q_{b,d}). Der Hauptteil dieser Population ist jedoch nicht ausschließlich CD90⁺, sondern weist ebenfalls lin⁺-Zellmarker auf. Von den insgesamt 78,1% lin⁺-Zellen in der Analyse (Abb.5, Q_{a,b}) exprimieren allein 20,2% ebenfalls CD90 (Abb.5, Q_b). Der Anteil CD90⁺/lin⁻-Zellen, also der für die Versuche benötigten Zielpopulation, beträgt im nativen Knochenmark lediglich 2,4% (Abb.5, Q_d). In den folgenden Aufreinigungsschritten sollen die lin⁺-Zellen aus der Suspension eliminiert werden.

Schritt 2-5 Entsprechend der ausgewählten Oberflächenmarker erfolgen die jeweiligen Negativselektionen. Hier ist eine Reduktion der Subpopulationen auf bis zu 2,1% der Gesamtzellzahl in der Lösung möglich. Somit ist eine nahezu vollständige Entfernung antigentragender Zellen für His49 (3,1%), CD3 (2,5%), CD45R (2,1%) und CD11b/c (2,2%) aus der Knochenmarklösung möglich.

Schritt 6 Nach Aufreinigung des Zellgemisches erfolgt eine erneute Analyse nach gleichem Schema wie in Schritt 1. Es zeigen sich lediglich noch 0,23% lin⁺-Zellen (Abb.10, Q_{a,b}), 0,15% der Zellen sind CD90⁺/lin⁺ (Abb.10, Q_b). Die Anzahl CD90⁺/lin⁻-Zellen liegt bei 6,73% (Abb.10, Q_d).

Schritt 7 Danach erfolgt die Positivselektion der CD90⁺-Zellen. In der abschließenden Untersuchung sind 95,5% der Zellen CD90⁺/lin⁻ (Abb.11, Q_d) und entsprechen damit der Zielpopulation, lediglich 3,3% der restlichen Zellen weisen lin⁺-Zellmarker auf (Abb.11, Q_b), insgesamt sind 4,5% der applizierten Zelllösung nicht CD90⁺/lin⁻ (Abb.11, Q_{a,b,c}).

Die Vitalität der Zellen wurde mit der Trypanblaufärbung stichprobenartig gesichert. Hier lag das Zellüberleben bei über 90%. Bei der Separation der hämatopoetischen Stammzellen handelt es sich um eine effiziente Zellanreicherung, eine komplette Isolation der Zielpopulation ist jedoch nicht möglich.

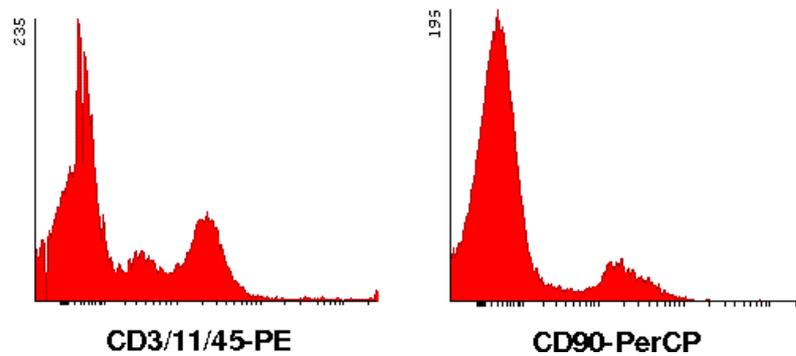
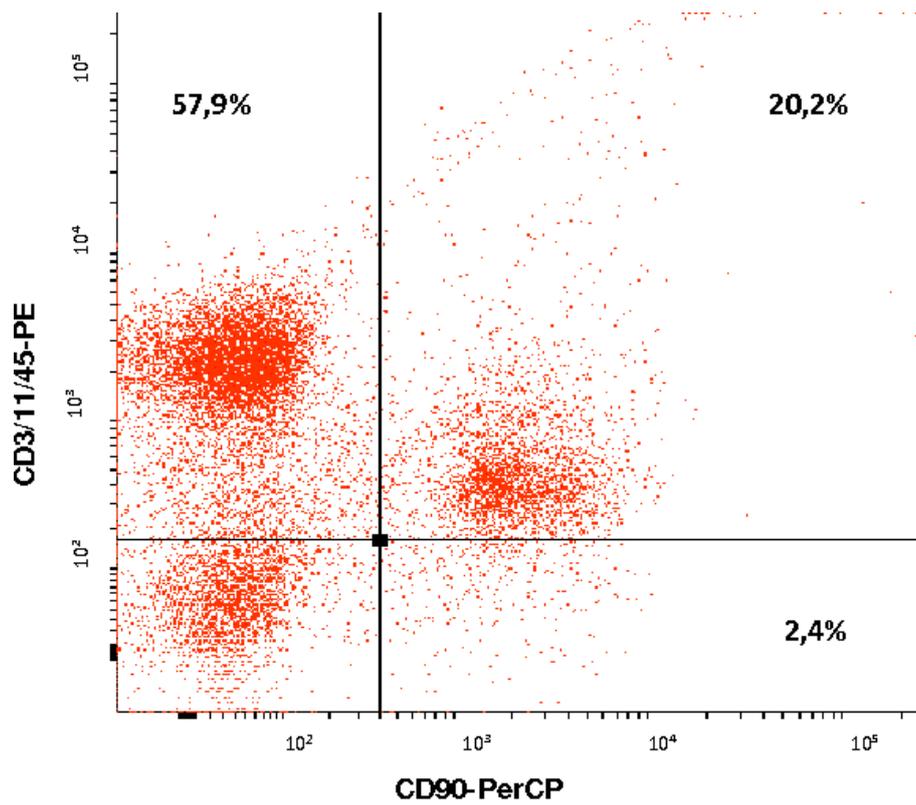


Abbildung 6: Dot Plot und Histogramm der nativen Knochenmarklösung vor MACS-Separation, aufgeteilt nach CD3/CD11/CD45 (y-Achse) und CD90 (x-Achse). Vor weiterer Aufreinigung der Zelllösung beträgt der Anteil CD90⁺-Zellen 22,6% und lin⁺-Zellen 78,1%, lediglich 2,4% sind CD90⁺/lin⁻.

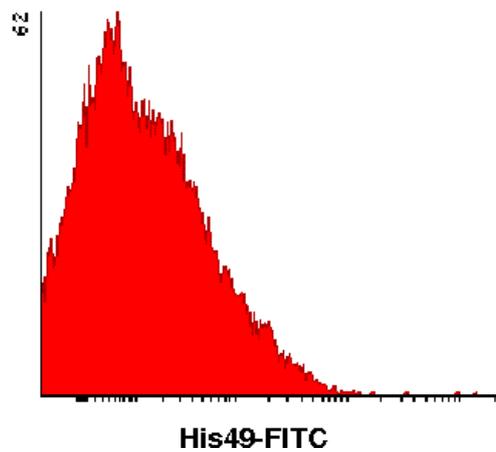
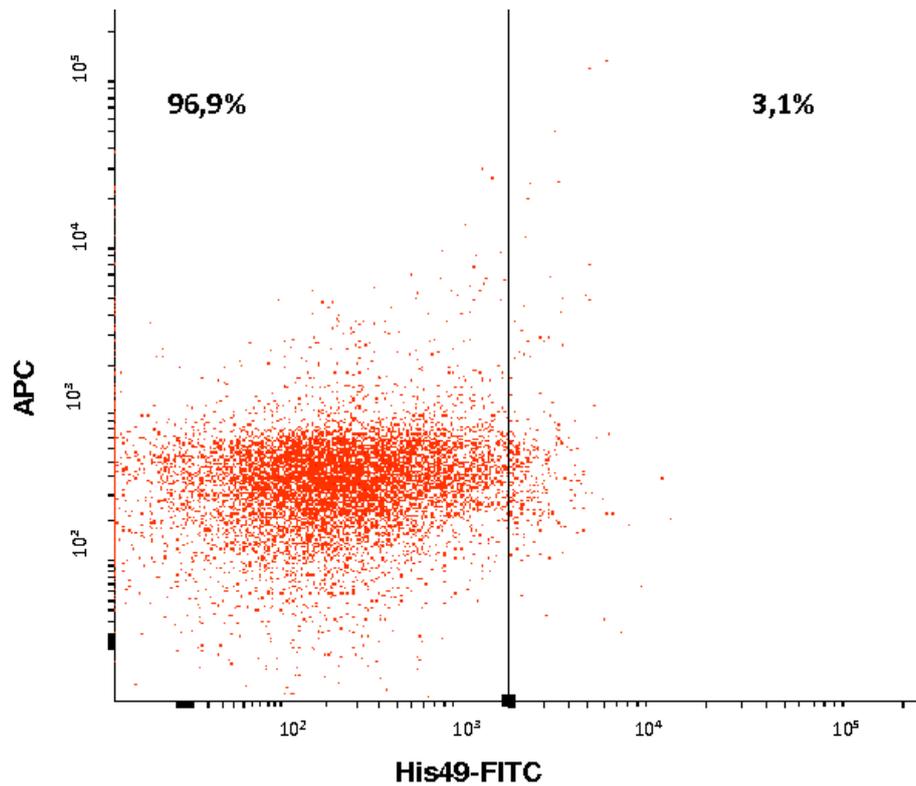


Abbildung 7: Dot Plot und Histogramm nach Depletion His49-positiver Zellen aus dem Knochenmark. Zur Aufreinigung der Zelllösung wurden Erythrozyten mit His49-Oberflächen-Markern per MACS separiert. Nach der Separation finden sich lediglich 3,1% His49⁺-Zellen in der Lösung, 96,9% sind His49⁻.

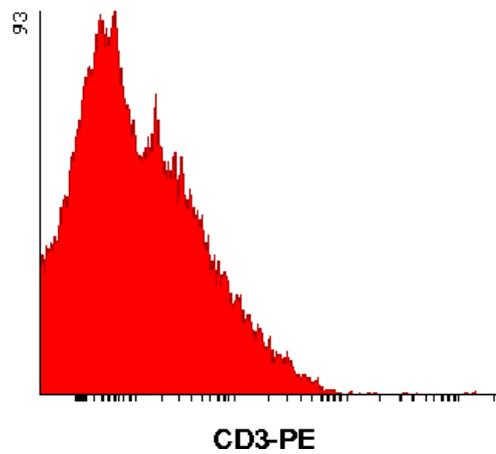
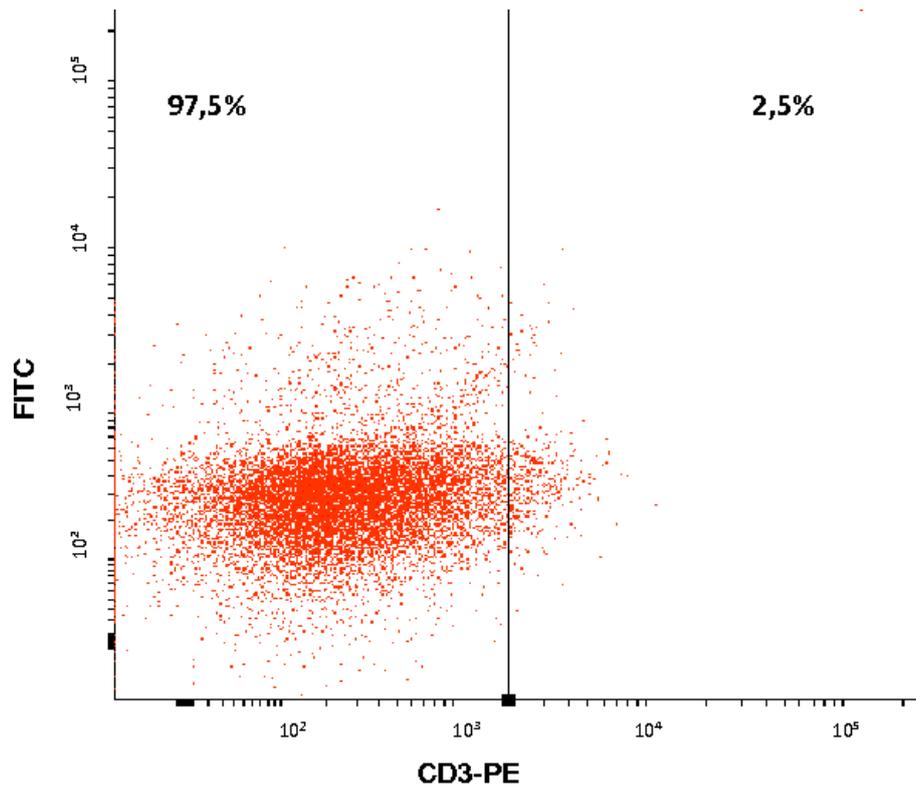


Abbildung 8: Dot Plot und Histogramm nach Depletion CD3-positiver Zellen aus dem Knochenmark. Zur Aufreinigung der Zelllösung wurden Lymphozyten mit CD3-Oberflächen-Markern per MACS separiert. Nach der Separation finden sich lediglich 2,5% CD3⁺-Zellen in der Lösung, 97,5% sind CD3⁻.

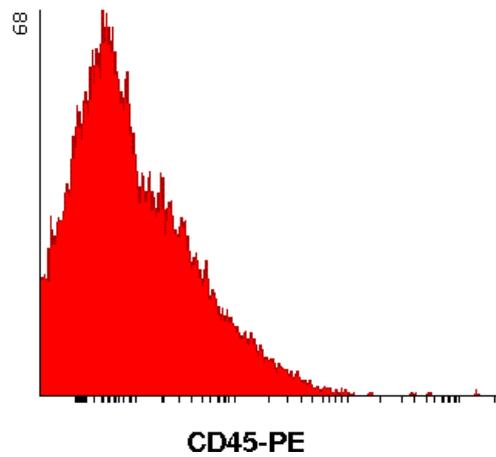
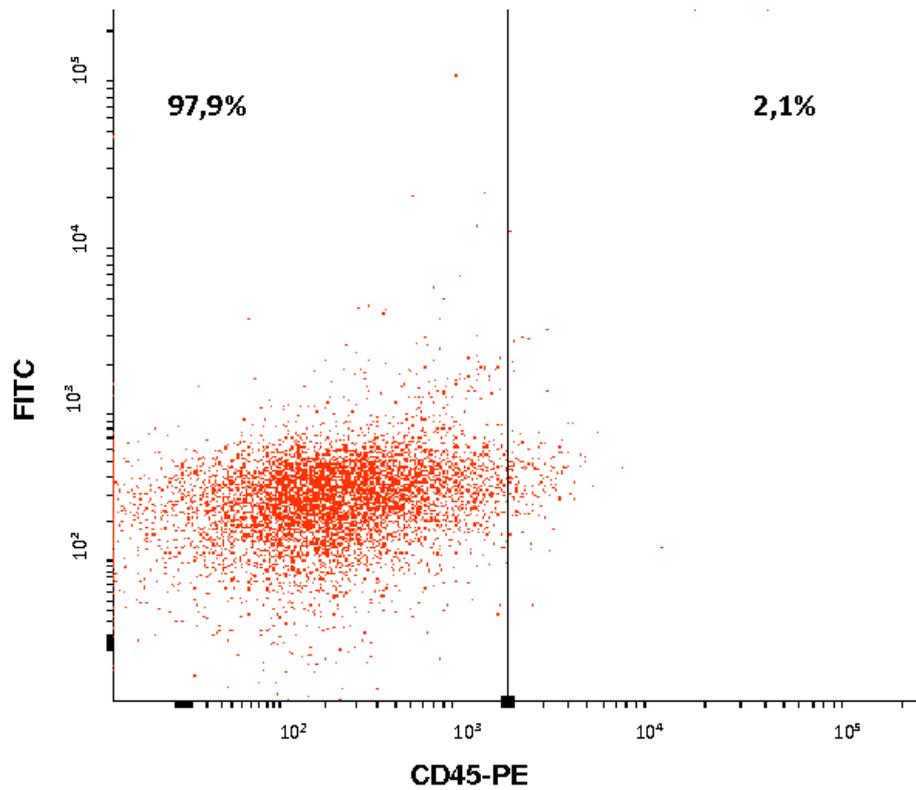


Abbildung 9: Dot Plot und Histogramm nach Depletion CD45-positiver Zellen aus dem Knochenmark. Zur Aufreinigung der Zelllösung wurden Lymphozyten mit CD45-Oberflächen-Markern per MACS separiert. Nach der Separation finden sich lediglich 2,1% CD45⁺-Zellen in der Lösung, 97,9% sind CD45⁻.

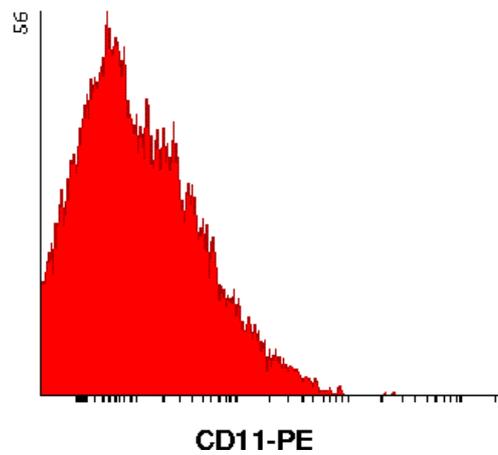
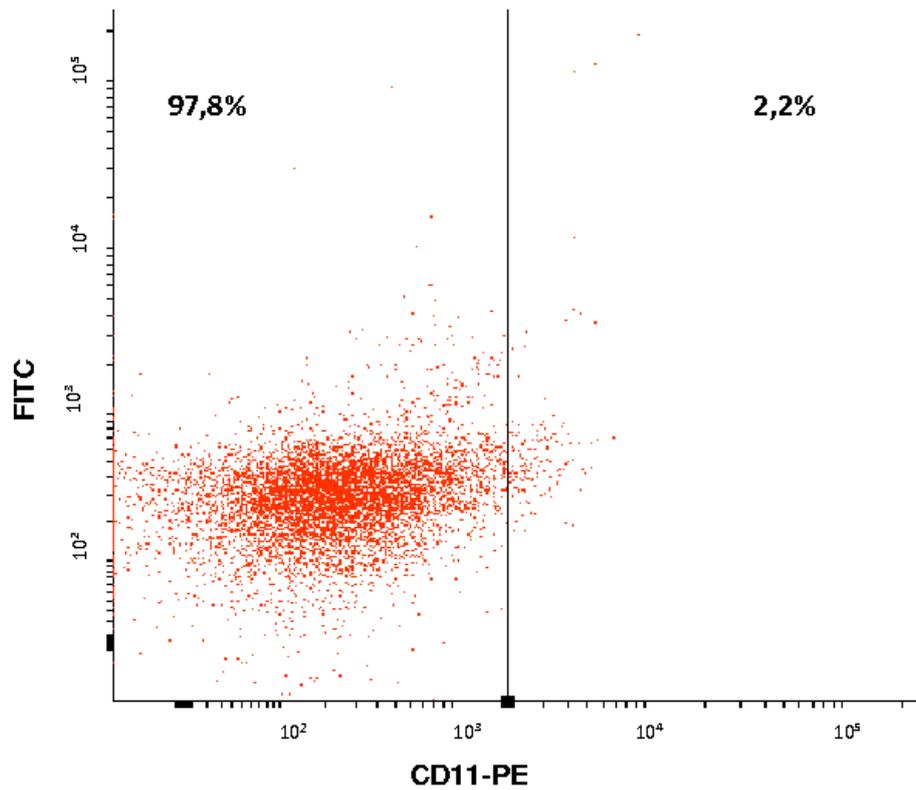


Abbildung 10: Dot Plot und Histogramm nach Depletion CD11-positiver Zellen aus dem Knochenmark. Zur Aufreinigung der Zelllösung wurden Leukozyten mit CD11-Oberflächen-Markern per MACS separiert. Nach der Separation finden sich lediglich 2,2% CD11⁺-Zellen in der Lösung, 97,8% sind CD11⁻.

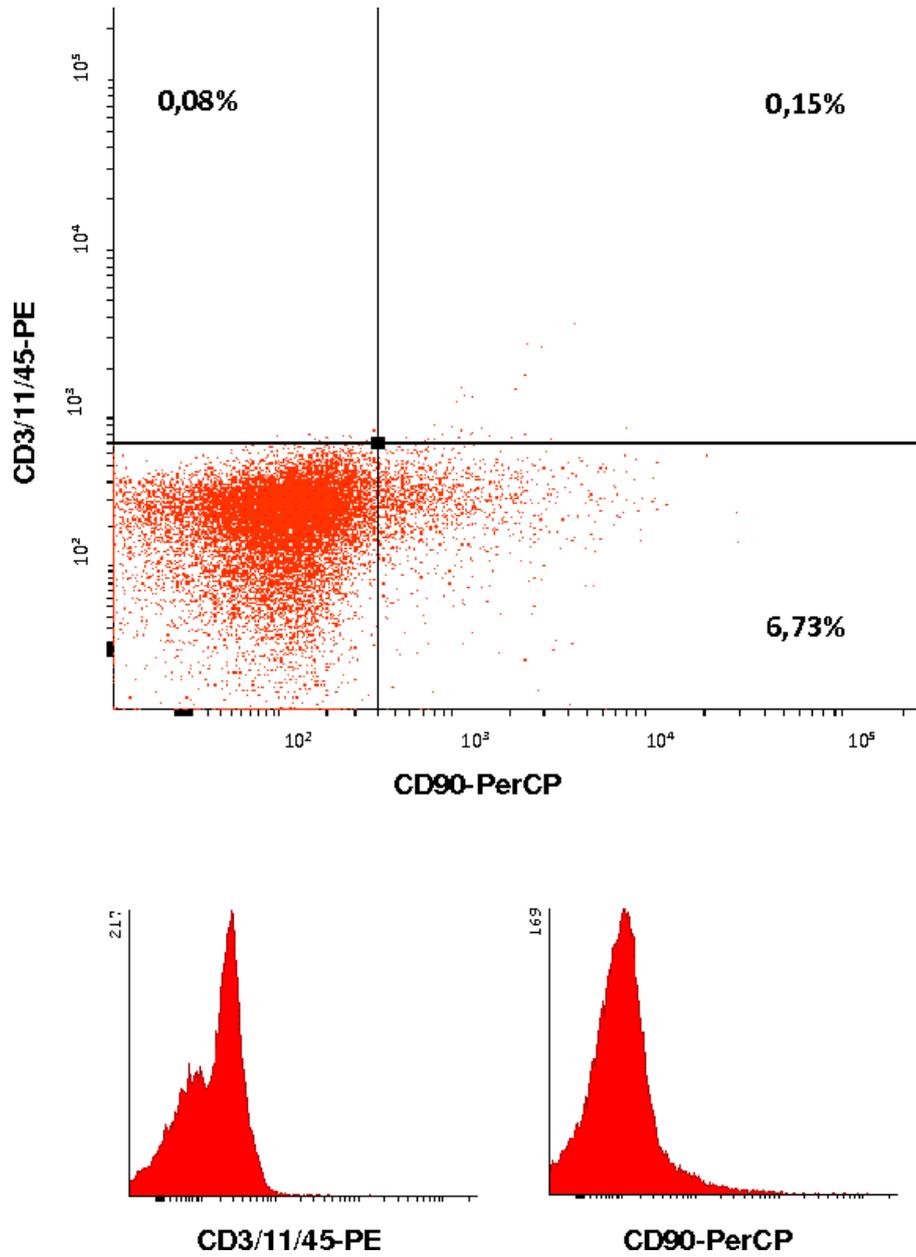


Abbildung 11: Dot Plot und Histogramm der aufgereinigten Knochenmarklösung nach MACS-Separation, aufgeteilt nach CD3/CD11/CD45 (y-Achse) und CD90 (x-Achse). Nach Aufreinigung beträgt der Anteil CD90⁺-Zellen 6,88% und lin⁺-Zellen 0,23%, 6,73% sind CD90⁺/lin⁻.

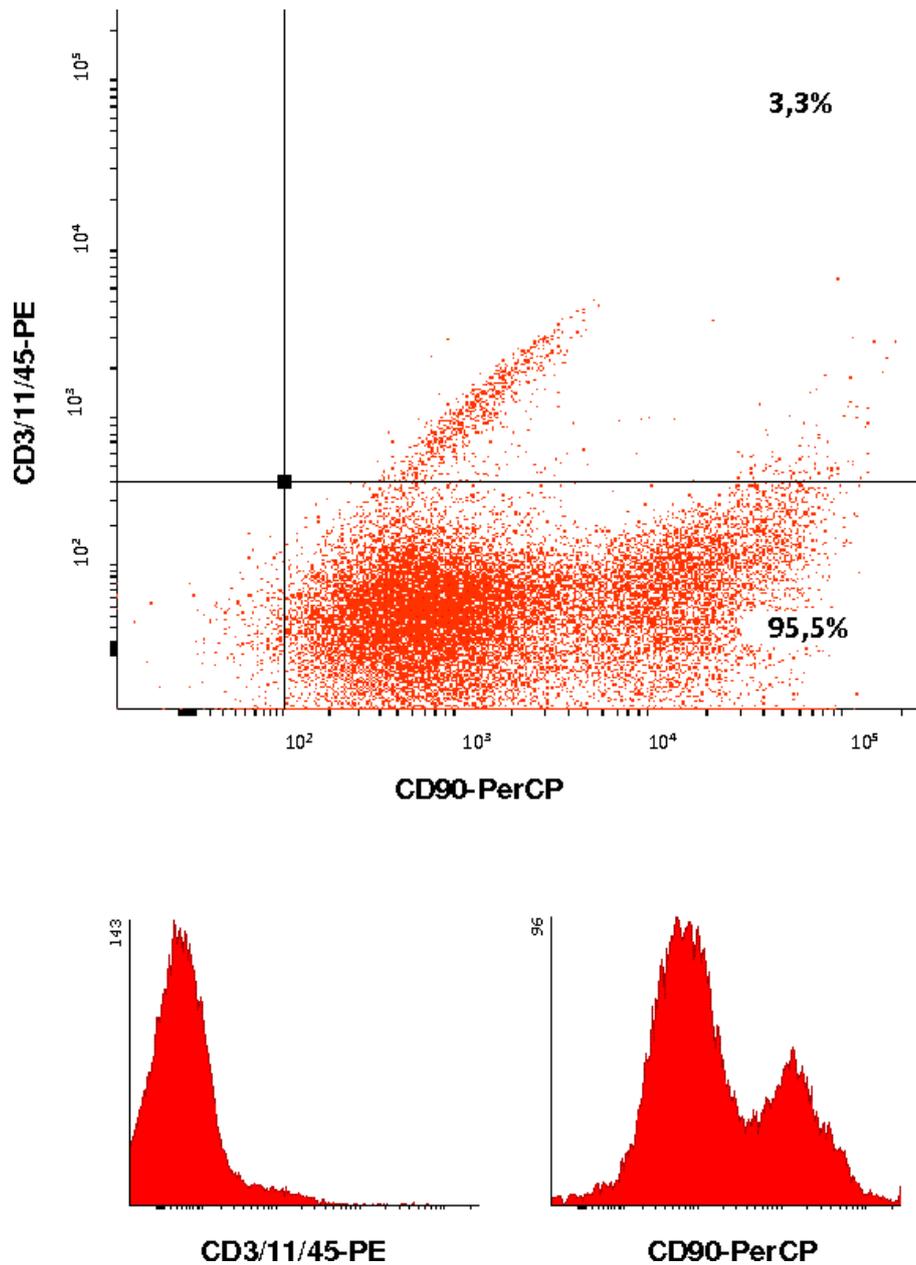


Abbildung 12: Dot Plot und Histogramm des Eluats nach Positivselektion CD90-positiver Zellen aus dem Knochenmark, aufgeteilt nach CD3/CD11/CD45 (y-Achse) und CD90 (x-Achse). Zur Aufreinigung der Zelllösung wurden die Zellen mit CD90-Oberflächenmarkern per MACS separiert. In dem Eluat beträgt der Anteil CD90⁺-Zellen 98,8% und lin⁺-Zellen 3,3%, 95,5% sind CD90⁺/lin⁻.

4.2 Postoperative Blutanalysen

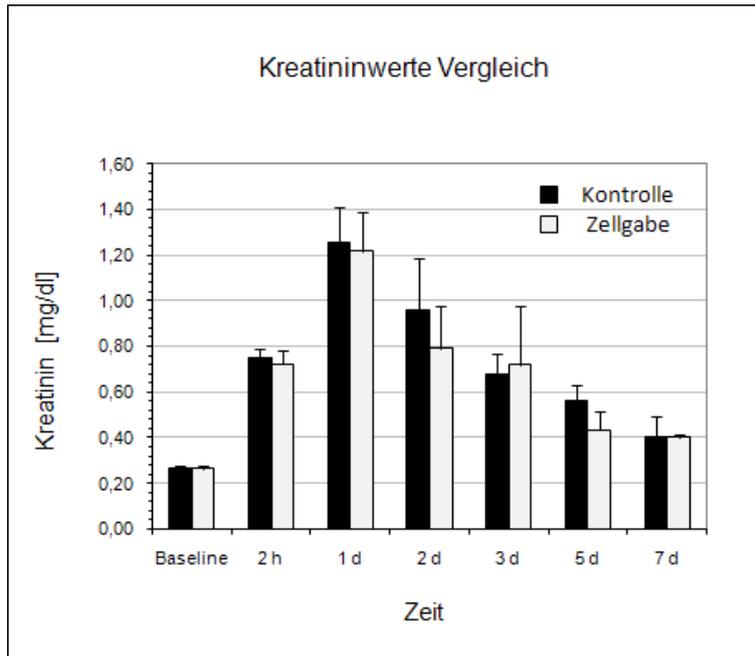
Sowohl bei der Kontrollgruppe (intraoperative PBS-Injektion), als auch bei der Verumgruppe (intraoperative Stammzellgabe), erfolgte einen Tag präoperativ die Bestimmung der Kreatinin- und Harnstoff-Baseline als Ausgangspunkt der Analysen. In den Versuchsreihen wurde ein durchschnittlicher Kreatininwert von $0,27 \pm 0,01$ mg/dl und ein Harnstoffwert von $36,33 \pm 4,33$ mg/dl im Serum gesunder Weibchen der gleichen Gewichtsklasse ermittelt. Diese dienten als Referenzwert für die weiteren Untersuchungen. Die postoperativen Blutabnahmen erfolgten sowohl 2 Stunden sowie 1, 2, 3, 5 und 7 Tage nach dem Eingriff.

4.2.1 Kreatinin

Sowohl die Kontroll- als auch die Verumgruppe zeigen einen signifikanten postoperativen Kreatininanstieg. Schon am Tag der Operation bieten beide Gruppen einen Anstieg auf mehr als das Doppelte des Ausgangswertes (Faktor 2,8 in der Kontrollgruppe bzw. 2,7 in der Verumgruppe). Das Maximum der Kreatininkurve liegt an Tag 1 mit $1,25 \pm 0,16$ mg/dl bzw. $1,22 \pm 0,17$ mg/dl. Ab diesem Punkt fallen beide Gruppen kontinuierlich ab. Am Ende der Beobachtungszeit (Tag 7) sind die Werte nahezu auf den gleichen Wert bei 0,4 mg/dl gesunken.

Die Dynamik des akuten Nierenversagens in Bezug auf die Kreatininwerte verläuft in beiden Gruppen nahezu identisch. Nach einem initialen Anstieg innerhalb des ersten postoperativen Tages als Ausdruck eines erfolgreich induzierten Nierenversagens mit einer Kreatininerhöhung auf das nahezu Fünffache, findet ab dem zweiten Tag eine kontinuierliche Erholung mit Absinken der Werte bis zum doppelten des Ausgangskreatinins eine Woche nach der Operation statt. Ein vollständiger Rückgang wird während der Beobachtungsphase nicht erreicht.

Die Differenzen im Vergleich der Kreatininverläufe beider Gruppen sind gering, es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren mit Stammzellbehandlung und ohne Zellgabe (nach Durchführung des Student t-Tests mit zweiseitiger Fragestellung zeigt sich an allen Tagen $t < t_{f\alpha}$).



Kreatininwerte Vergleich

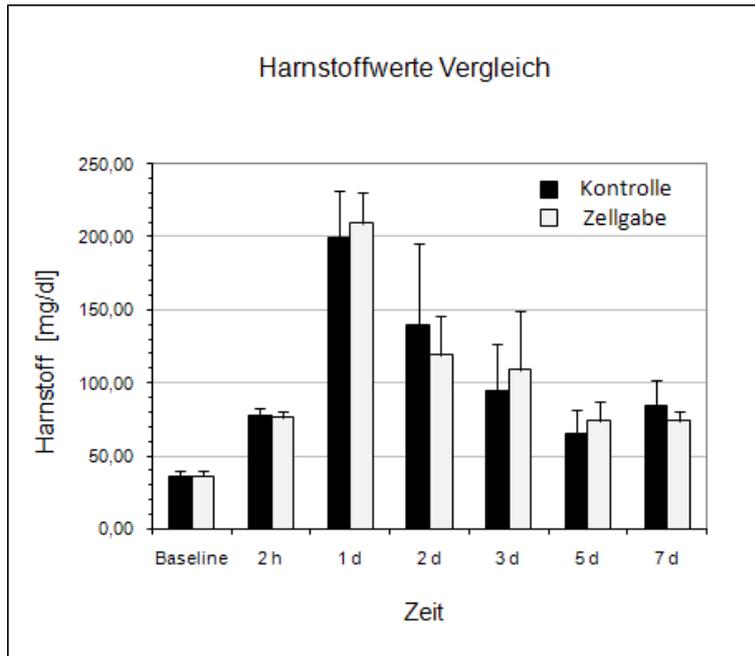
<i>Zeit</i>	<i>Kontrolle [mg/dl]</i>	<i>SEM</i>	<i>Zellgabe [mg/dl]</i>	<i>SEM</i>	<i>Differenz [mg/dl]</i>	<i>t</i>
2 h	0,75	0,04	0,72	0,06	0,03	0,73
1 d	1,25	0,16	1,22	0,17	0,03	0,93
2 d	0,96	0,23	0,79	0,19	0,17	0,59
3 d	0,68	0,09	0,72	0,26	0,04	0,90
5 d	0,56	0,07	0,44	0,08	0,12	0,29
7 d	0,40	0,09	0,41	0,01	0,01	0,98

Abbildung 13: Serumkreatininwerte nach Ischämie-/ Reperfusionsschaden der Niere und kontralateraler Nephrektomie zu verschiedenen Zeitpunkten. Vergleich von Vehikelgabe und intraarterieller Zellapplikation. Mittelwert des Serumkreatinins (mg/dl) \pm SEM und Differenzen zwischen den beiden Gruppen mit entsprechenden t-Werten; $p < 0,05$.

4.2.2 Harnstoff

Analog zu den Kreatininwerten steigen die postoperativen Serumharnstoff-Konzentrationen direkt nach der Operation signifikant an ($77,8 \pm 5,48$ mg/dl bzw. $76,2 \pm 5,09$ mg/dl gegen die Baseline von 36 mg/dl) und erreichen ein Maximum an Tag 1 mit $199,80 \pm 32,29$ mg/dl in der Kontrollgruppe bzw. $209,57 \pm 20,98$ mg/dl in der Verumgruppe. Danach fallen die Werte in beiden Gruppen ab, auf $0,96 \pm 0,23$ mg/dl in der Kontroll- und $0,79 \pm 0,19$ mg/dl in der Zellgruppe, um sich dann der Baseline anzunähern. Auch hier ist diese am siebten postoperativen Tag noch nicht vollständig erreicht, mit $85 \pm 17,85$ mg/dl bzw. $74,5 \pm 5,95$ mg/dl liegen die Werte noch über dem Doppelten des Ausgangswertes.

Die Verläufe beider Gruppen weisen kaum Unterschiede auf. Nach Durchführung des Student t-Testes mit zweiseitiger Fragestellung zeigt sich auch hier an allen Tagen $t < t_{f\alpha}$. Somit bestehen keine signifikanten Abweichungen in den Verläufen der Serumharnstoffkonzentrationen, egal ob nach Stammzell- oder PBS-Gabe.



Harnstoffwerte Vergleich

Zeit	Kontrolle [mg/dl]	SEM	Zellgabe [mg/dl]	SEM	Differenz [mg/dl]	t
2 h	77,80	5,48	76,20	5,09	1,6	0,84
1 d	199,80	32,29	209,57	20,98	9,77	0,83
2 d	139,75	55,60	119,56	26,87	20,19	0,76
3 d	94,25	32,32	109,00	40,61	14,75	0,79
5 d	65,75	15,88	74,25	13,37	8,5	0,70
7 d	85,00	17,58	74,50	5,95	10,5	0,60

Abbildung 14: Serumharnstoffwerte nach Ischämie-/ Reperfusionsschaden der Niere und kontralateraler Nephrektomie zu verschiedenen Zeitpunkten. Vergleich von Vehikelgabe und intraarterieller Zellapplikation. Mittelwert des Serumharnstoffs (mg/dl) \pm SEM und Differenzen zwischen den beiden Gruppen mit entsprechenden t-Werten; $p < 0,05$.

4.3 Histologische Analysen

Damage Scores Die Analysen der histologischen Zellschäden nach akutem Nierenversagen anhand des Damage Score wurden erst ab Tag 1 durchgeführt, da zwei Stunden nach Operation noch keine histologisch sichtbaren Schäden zu erwarten waren. Betrachtet man die Ergebnisse, so finden sich in den ersten Untersuchungen postoperativ (d1) in beiden Untersuchungsgruppen histologisch nachweisbare Schäden an den Tubuluszellen. Diese sind im Gruppenvergleich ähnlich stark ausgeprägt (102 ± 11 in der Zellgruppe und 111 ± 8 in der Kontrollgruppe), es gibt keine signifikanten Unterschiede. Allerdings weisen trotz ausgeprägter laborchemischer Veränderungen kaum mehr als ein Drittel der Tubuluszellen morphologische Schäden auf. In der darauffolgenden Untersuchung einen Tag später (d2) sind die Schäden in beiden Gruppen kaum mehr nachweisbar (22 ± 7 in der Zellgruppe vs 16 ± 4 in der Kontrollgruppe). Dies spricht für eine schnelle Regeneration der strukturellen Schäden des Parenchyms und erklärt die parallel beobachteten sinkenden Serummarker. Bei den histologischen Nierenschäden bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Von weiteren Untersuchungen an Tag 7 wurde aufgrund kaum mehr nachweisbarer histologischer Schäden abgesehen.

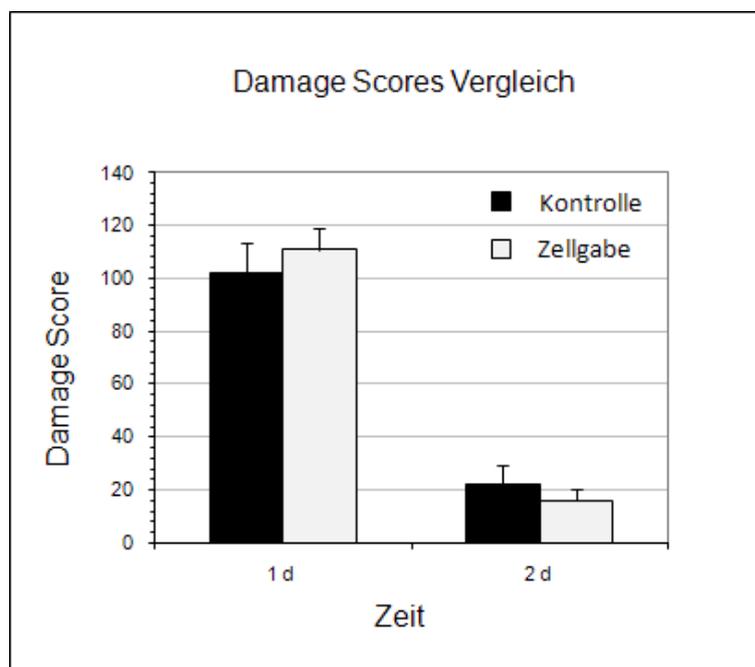


Abbildung 15: Histologische Damage Scores nach Ischämie-/ Reperfusionsschaden der Niere und kontralateraler Nephrektomie zu verschiedenen Zeitpunkten. Vergleich von Vehikelgabe und intraarterieller Zellapplikation. Damage-Score-Werte \pm SEM; $p < 0,05$.

Fluoreszenzanalysen Die Untersuchung fluoreszenzmarkierter Zellen in der Niere erfolgte zu den oben genannten Untersuchungszeitpunkten. Es fiel schwer, signifikante Mengen markierter Zellen im Nierengewebe nachzuweisen. Vereinzelt Zellen befanden sich am ersten postoperativen Tag vor allem im Interstitium, im Bereich des Tubulusepithels gab es allerdings nur wenige PKH-26-positive Zellen. An Tag 2 konnten in den untersuchten Präparaten keine der fluoreszenzmarkierten Spenderzellen mehr nachgewiesen werden.



Abbildung 16: Fluoreszenzmikroskopie, 20-fache Vergrößerung. Intraarteriell applizierte HSC fanden sich am ersten Tag nach der Injektion teilweise in Verbänden im Bereich des Interstitiums (Bild 1), selten vereinzelt in den Tubuli (Bild 2).

4.4 Quantitative Analysen

Die quantitativen Analysen zum Zellüberleben im Empfängerorganismus wurden mittels Real-Time-PCR durchgeführt. Die Organe der Versuchstiere wurden an den Tagen 0, 1, 2 und 7 nach der Operation entnommen. Die ersten Tage stellen die Akutphase des Nierenversagens dar, die Organentnahme an Tag 7 soll einen Einblick in das Überleben und die längerfristige Verteilung der Zellen im Körper geben. Untersucht wurden alle größeren Organsysteme (Niere, Lunge, Leber, Milz, Herz, Hirn, Muskulatur und Knochenmark), vor allem aber solche, bei denen ein Differenzierungspotential hämatopoetischer Stammzellen beschrieben wurde (1.2.1).

Die Untersuchungen zur Zellverteilung im Knochenmark und in der Skelettmuskulatur konnten aufgrund der Komplexität der Organsysteme lediglich semiquantitativ an repräsentativen Stichproben durchgeführt werden. Die Ergebnisse zeigen einen Trend, lassen jedoch keine exakten Zellzahlen für die kompletten Organsysteme zu. Daher erscheinen diese Werte lediglich in unten aufgeführtem Übersichtsdiagramm, von einer weitergehenden Analyse wurde abgesehen.

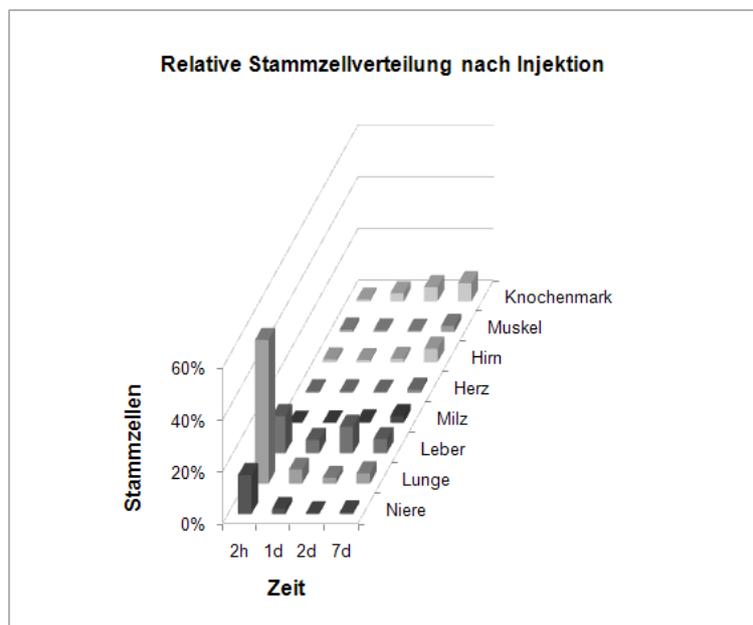
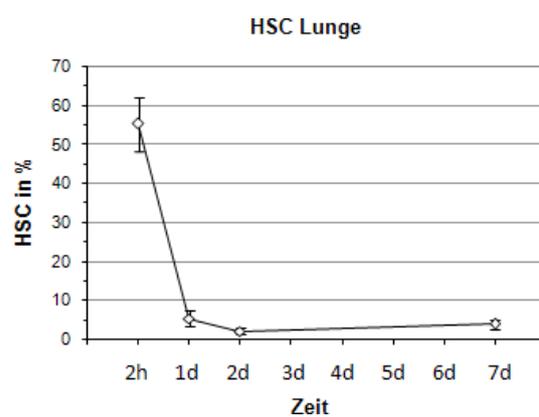
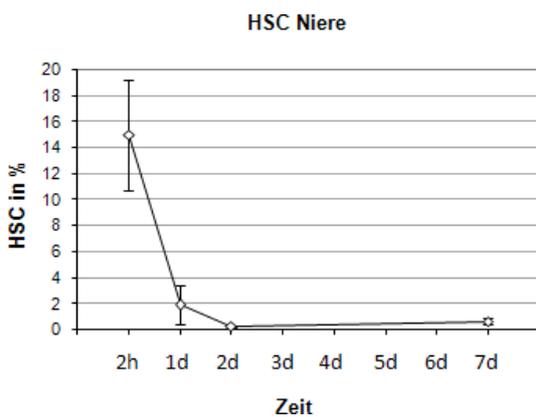


Abbildung 17: Relative Verteilung der hämatopoetischen Stammzelllösung in den Organen nach Injektion zu verschiedenen Zeitpunkten, gemessen an der intraoperativ injizierten Menge von 1×10^6 Zellen.

Niere In der Niere sind die Zellzahlen zwei Stunden nach Injektion am höchsten, $15,01 \pm 4,24\%$ der applizierten Zellen (1×10^6) befinden sich hier noch im Organ. Dies entspricht einer absoluten Zellzahl von $1,5 \times 10^5$ HSC. Jedoch beobachtet man danach einen rapiden Abfall der Zellzahlen, am ersten Tag nach der Operation sind es lediglich noch knapp 2%, an Tag 2 $0,29 \pm 0,07\%$. Gegen Ende der Beobachtungsphase zeigt sich wieder ein leichter Anstieg der Spenderzellen auf $0,67 \pm 0,22\%$, das entspricht einer absoluten Zahl von ca. 6.700 Zellen und ist nicht signifikant. Zusammenfassend findet in der Niere ein kontinuierlicher Abfall der injizierten HSC statt.

Lunge In der Lunge finden sich nach Stammzellapplikation die meisten Zellen, verglichen mit den anderen untersuchten Organen. Nach der Operation sind es mit $55,39 \pm 6,88\%$ der größte Teil der HSC. Jedoch zeigt sich eine ähnliche Dynamik wie in der Niere, bereits am ersten postoperativen Tag findet man nur noch ein Zehntel ($5,42 \pm 2,15\%$) der Ausgangsmenge, die Werte sinken dann weiter auf $2,22 \pm 0,69\%$ und an Tag 7 findet ein geringer Anstieg auf $3,94 \pm 1,22\%$ statt, dieser ist statistisch jedoch nicht signifikant.



HSC in der Niere

Zeit	Absolut		Relativ [%]	
	MW	SEM	MW	SEM
2 h	150130	42430	15,01	4,24
1 d	19352	15374	1,94	1,54
2 d	2944	704	0,29	0,07
7 d	6728	2235	0,67	0,22

HSC in der Lunge

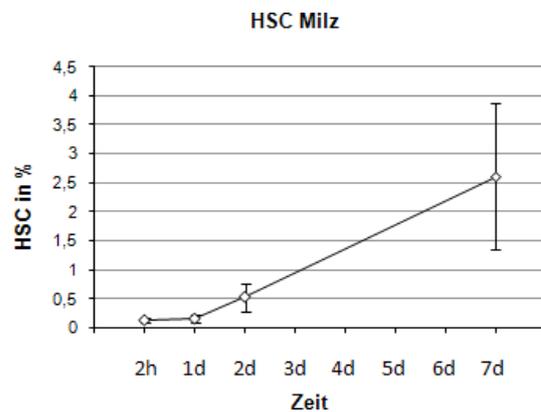
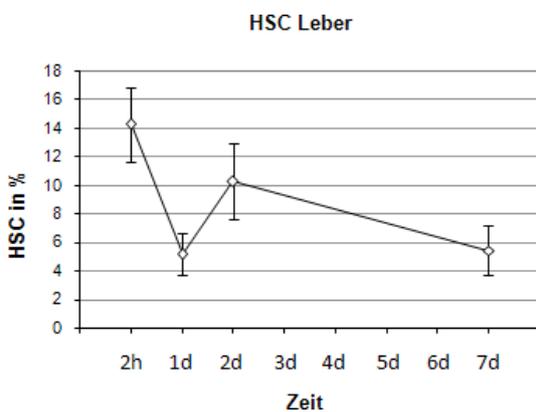
Zeit	Absolut		Relativ [%]	
	MW	SEM	MW	SEM
2 h	553929	68815	55,39	6,88
1 d	54198	21488	5,42	2,15
2 d	22197	6948	2,22	0,69
7 d	39375	12176	3,94	1,22

Abbildung 18: Quantitatives Zellüberleben in der Niere nach renalem Ischämie-/ Reperfusionsschaden und intraarterieller Zellapplikation zu verschiedenen Zeitpunkten.

Abbildung 19: Quantitatives Zellüberleben in der Lunge nach renalem Ischämie-/ Reperfusionsschaden und intraarterieller Zellapplikation zu verschiedenen Zeitpunkten.

Leber In der Leber zeigt sich ebenfalls ein Maximum der männlichen Spenderzellen am Tag der Operation, hier findet man $14,28 \pm 2,59\%$, zum ersten postoperativen Tag sinken diese auf $5,13 \pm 1,47\%$ ab. Im Gegensatz zur kontinuierlichen Zellabnahme in Niere und Lunge nach Induktion des renalen Ischämie-/Reperfusionsschadens, steigen die Zellzahlen in der Leber an Tag 2 auf $10,27 \pm 2,64\%$ an, fallen dann aber zum Ende der Beobachtungszeit auf $5,44 \pm 1,79\%$ ab. Verglichen mit den anderen untersuchten Organsystemen besitzt die Leber an Tag 7 die meisten der injizierten Zellen.

Milz Die Zellverteilung in der Milz weist eine völlig andere Dynamik auf als die bisher beschriebenen Organsysteme. Es findet eine Zellanreicherung über die gesamte Beobachtungsperiode statt. Machen die HSC innerhalb der ersten zwei Beobachtungstage noch unter 1% aus, jedoch ansteigend ($0,14 \pm 0,04\%$ an d0; $0,16 \pm 0,07\%$ an d1; $0,53 \pm 0,25\%$ an d2), so sind es an Tag 7 nur noch $2,62 \pm 1,25\%$.



HSC in der Leber

Zeit	Absolut		Relativ [%]	
	MW	SEM	MW	SEM
2 h	142810	25952	14,28	2,59
1 d	51334	14658	5,13	1,47
2 d	102685	26428	10,27	2,64
7 d	54355	17868	5,44	1,79

HSC in der Milz

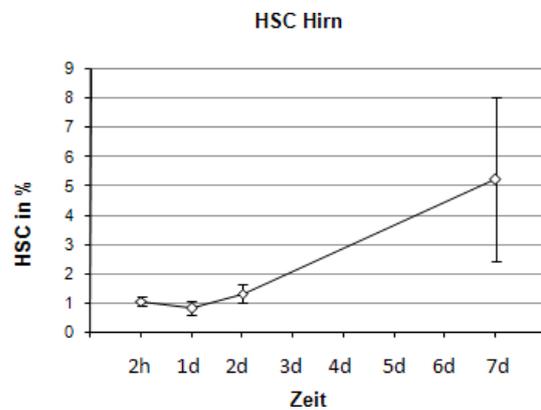
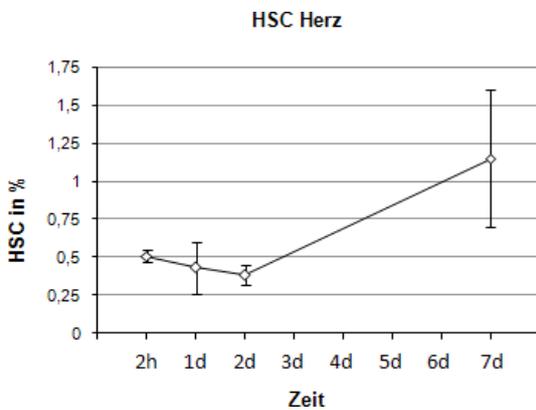
Zeit	Absolut		Relativ [%]	
	MW	SEM	MW	SEM
2 h	1372	398	0,14	0,04
1 d	1590	668	0,16	0,07
2 d	5334	2450	0,53	0,25
7 d	26187	12505	2,62	1,25

Abbildung 20: Quantitatives Zellüberleben in der Leber nach renalem Ischämie-/ Reperfusionsschaden und intraarterieller Zellapplikation zu verschiedenen Zeitpunkten.

Abbildung 21: Quantitatives Zellüberleben in der Milz nach renalem Ischämie-/ Reperfusionsschaden und intraarterieller Zellapplikation zu verschiedenen Zeitpunkten.

Herz In der Herzmuskulatur sind im postoperativen Verlauf die geringsten Mengen an SRY-tragenden Zellen angesiedelt. Es findet eine geringe Zellanreicherung über die Beobachtungszeit statt, diese ist nicht signifikant, die Werte steigen kaum über 1% an. An den ersten beiden Tagen nach der Operation kann man lediglich zwischen 0,4 und 0,5% der applizierten Zellen nachweisen, selbst am siebten postoperativen Tag sind es mit $1,15 \pm 0,45\%$ nur ca. 11.500 Zellen.

Hirn In den untersuchten Gehirnen der Tiere zeigt sich, ähnlich wie in der Milz, ein Anstieg der Zellzahlen gegen Ende der Beobachtungszeit. An den ersten beiden postoperativen Tagen liegen die Werte im Bereich um 1% ($1,06 \pm 0,17\%$ an d0; $0,82 \pm 0,22\%$ an d1; $1,31 \pm 0,32\%$ an d2). Mit $5,23 \pm 2,80\%$ der injizierten Zellen weist das Gehirn am siebten Tag nach der Operation zusammen mit der Leber die meisten überlebenden Zellen auf.



HSC im Herz

Zeit	Absolut		Relativ [%]	
	MW	SEM	MW	SEM
2 h	5088	414	0,51	0,04
1 d	4326	1694	0,43	0,17
2 d	3856	675	0,39	0,07
7 d	11530	4500	1,15	0,45

HSC im Hirn

Zeit	Absolut		Relativ [%]	
	MW	SEM	MW	SEM
2 h	10571	1702	1,06	0,17
1 d	8230	2204	0,82	0,22
2 d	13129	3222	1,31	0,32
7 d	52268	27992	5,23	2,80

Abbildung 22: Quantitatives Zellüberleben im Herz nach renalem Ischämie-/ Reperfusionsschaden und intraarterieller Zellapplikation zu verschiedenen Zeitpunkten.

Abbildung 23: Quantitatives Zellüberleben im Hirn nach renalem Ischämie-/ Reperfusionsschaden und intraarterieller Zellapplikation zu verschiedenen Zeitpunkten.

Zusammenfassung In Niere, Leber und Lunge finden sich direkt nach Injektion die meisten Stammzellen wieder. Eine herausragende Rolle nimmt dabei die Lunge mit $55,39 \pm 6,88\%$ der injizierten Zellen ein. Zusammen mit der Niere ($15,01 \pm 4,24\%$) und der Leber ($14,28 \pm 2,59\%$) ergibt sich somit eine Summe von knapp 85% aller SRY-tragender Spenderzellen in diesen drei Organsystemen. Die Zellen in den anderen Organen liegen zu diesem Zeitpunkt maximal bei 1%.

Am ersten postoperativen Tag fallen die Zellzahlen in Lunge, Niere und Leber rapide ab. In der Niere finden sich nur noch $1,94 \pm 1,54\%$, in der Lunge $5,42 \pm 2,15\%$ der Zellen. Dieser Trend setzt sich am nächsten Tag fort ($0,29 \pm 0,07\%$ und $2,22 \pm 0,69\%$), an Tag 7 gibt es wieder einen leichten Anstieg ($0,67 \pm 0,22\%$ und $3,94 \pm 1,22\%$). Ein ähnlicher Verlauf lässt sich in der Leber beobachten, hier sinken die Zellzahlen an Tag 1 auf $5,13 \pm 1,47\%$ ab, allerdings steigen sie an Tag 2 wieder auf $10,27 \pm 2,64\%$, also das Doppelte, an. An Tag 7 liegen sie jedoch wieder bei $5,44 \pm 1,79\%$. Also befinden sich am Ende der Beobachtungszeit von den anfangs fast 85% nur noch ca. 10% der Zellen in diesen drei Organsystemen, die meisten davon in der Leber.

Anders stellen sich die Verläufe in den weiteren Organen dar. Hier nimmt die Menge HSC im Verlauf der Tage zu, so dass an Tag 7 über 9% der injizierten Zellen in Milz ($2,62 \pm 1,25\%$), Herz ($1,15 \pm 0,45\%$), Hirn ($5,23 \pm 2,80\%$) zu finden sind.

Betrachtet man die semiquantitativen Ergebnisse aus Skelettmuskulatur und Knochenmark zeigt sich dort ein ähnliches Bild, es ist also davon auszugehen, dass am Ende der Beobachtungszeit ein signifikanter Teil der applizierten Stammzellen in diesen Organsystemen angesiedelt ist.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass nur ein geringer Anteil der applizierten Stammzellen im Empfängerorganismus überlebt, der Zellverlust ab dem ersten Tag ist groß. Die Zellen unterliegen einer ausgedehnten Verteilung im Körper der Empfängertiere und reichern sich zu keinem Zeitpunkt nach Injektion im Zielorgan Niere an.

5 Diskussion

Das akute Nierenversagen ist ein Krankheitsbild mit hoher Morbidität und Mortalität [124]. Insbesondere bei septischen oder multimorbiden Patienten gilt das akute Nierenversagen als eine der Haupttodesursachen und erfordert effiziente und gezielte Therapieoptionen. Trotz intensiver Bemühungen sind diese bis heute jedoch begrenzt und beschränken sich im Wesentlichen auf extrakorporale Nierenersatzverfahren und symptomorientierte Supportivtherapien. Daneben haben sich im klinischen Alltag bisher keine kausal wirksamen Behandlungen etabliert [122].

Die Stammzellforschung beschäftigte sich in den letzten Jahren mit dem therapeutischen Potential adulter Stammzellen, auch in Bezug auf das akute Nierenversagen. Einige Autoren demonstrierten zunächst anhand von Transplantationsexperimenten im Tiermodell die Rolle endogener Knochenmarkstammzellen für die Regeneration geschädigter renaler Strukturen [57, 59, 23]. Die dadurch gewonnene Erkenntnis, dass endogene Knochenmarkstammzellen am normalen Zellumsatz der Niere in geringem Ausmaß beteiligt sind, im Falle einer Schädigung aber durch bisher noch weitgehend unbekannt Mechanismen in größerem Umfang aus dem Knochenmark rekrutiert werden und an den Ort des Schadens migrieren, führte schnell zur weiteren Erforschung des therapeutischen Einsatzes allogener Stammzellen bei akuter Nierenschädigung. Dabei wurde eine außergewöhnlich hohe Plastizität dieser Zellen festgestellt [45, 47, 65, 115]. Eine Transdifferenzierung und der Ersatz untergegangener Zellen in geschädigtem Gewebe erschien als möglicher Mechanismus für eine therapeutische Anwendung plausibel.

In neueren Untersuchungen wird diese Hypothese, zumindest als maßgebliche Wirkweise, in Frage gestellt. In Tierversuchen konnte anhand von Genexpressionsanalysen die Fähigkeit zu regulatorischen parakrinen Mechanismen gezeigt werden, was eine alternative Möglichkeit regenerativen Potentials darstellt [114]. In diesem Fall würde eine antiinflammatorische Wirkung der Stammzellen anstelle eines direkten Zellersatzes im Vordergrund stehen.

Diese Ergebnisse beziehen sich hauptsächlich auf MSC oder BMSC, aussagekräftige Daten zu hämatopoetischen Stammzellen liegen bisher noch nicht vor. Es wurden bereits transdifferenzierte HSC nach Zellapplikation im ANV in den Nierentubuli nachgewiesen [75, 37]. Genauere Aussagen über deren Quantität und den Einfluss auf den Krankheitsverlauf sowie einen möglichen klinischen Einsatz stehen jedoch noch aus.

Vor diesem Hintergrund war es Ziel dieser Arbeit, die Rolle therapeutisch applizierter hämatopoetischer Stammzellen nach akutem ischämischem Nierenversagen klarer zu definieren. Anhand quantitativer Analysen sowie histologischer und laborchemischer Untersuchungen wurde das Überleben und die Distribution, der Organotropismus, sowie der funktionelle Beitrag der applizierten Zellen in der geschädigten Niere beurteilt.

5.1 Überleben und Verteilung transplantierte Stammzellen in der geschädigten Niere und dem Empfängerorganismus

In vorausgegangenen Arbeiten zur Stammzelltherapie nach akutem Nierenversagen [46, 88, 113, 60, 75] wurde ein selektiver Tropismus für geschädigtes Gewebe als wichtige Eigenschaft zirkulierender Stammzellen herausgearbeitet. Dieser gilt als notwendige Voraussetzung für einen therapeutischen Einsatz [46]. Ein quantitativer Nachweis dieser Fähigkeit steht für hämatopoetische Stammzellen im Hinblick auf die ischämisch geschädigte Niere noch aus. Bisher lag der Fokus auf qualitativen oder lediglich semiquantitativen Analysen des lokalen Geschehens in der Niere [75, 60]. Mögliche Auswirkungen auf den Gesamtorganismus und die Zellverteilung nach Applikation waren bislang noch unbekannt.

In dieser Arbeit wurde die Distribution transplantierte hämatopoetischer Stammzellen im Spenderorganismus im Verlauf des Nierenversagens untersucht. Dazu diente die Real-Time-PCR-gestützte Quantifizierung der Spenderzellen innerhalb einzelner Organe. Durch „gender mismatch“, die Gabe männlicher Spenderzellen an weibliche Empfängertiere zur späteren Identifikation anhand des Y-Chromosoms [88], war eine genaue quantitative Bestimmung der Zellzahlen in den Organen möglich. Mit Niere, Lunge, Leber, Milz, Herz, Hirn, Skelettmuskulatur und Knochenmark wurden alle relevanten Organsysteme bezüglich ihrer Zelldynamik im zeitlichen Verlauf des Nierenversagens untersucht. Vor Applikation konnte durch MACS-Separation eine größtmögliche Anreicherung hämatopoetischer Stammzellen in der Zelllösung erreicht werden. Diese Methode wurde erstmals 1988 von Spangrude et al [111] beschrieben und stellt mittlerweile ein etabliertes Verfahren zur HSC-Anreicherung dar. Die Zielpopulation waren gering differenzierte hämatopoetische Vorläuferzellen ($lin^{-}/CD90^{+}$).

Anhand der präoperativen FACS-Analysen zeigte sich, dass beinahe alle ausdifferenzierten lin^{+} -Zellen aus dem Zellgemisch extrahiert werden konnten. Die danach verbliebenen wenig differenzierten $lin^{-}/CD90^{+}$ Zellen waren auf über 95% aufkonzentriert. Somit standen schon wenige Stunden nach Entnahme des Knochenmarks hoch aufgereinigte Lösungen $lin^{-}/CD90^{+}$ - Zellen mit einem großen Anteil hämatopoetischer Stammzellen für die Operationen zur Verfügung. Sie wurden durch die Freipräparation der Aorta abdominalis mit temporärer Unterbindung des Blutflusses cranial und caudal der Nierenarterien so organnah wie möglich injiziert.

Trotzdem zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit keine signifikante Anreicherung transplantierte hämatopoetischer Stammzellen im Spenderorganismus. Vor allem in der geschädigten Niere fallen die Zellzahlen nach Injektion kontinuierlich ab. Lediglich am Tag der Applikation zeigen sich vermehrt Stammzellen in den untersuchten Organen. Kurz nach der Operation der Tiere fand man in der Niere 15% der injizierten Zellen, diese sinken am ersten postoperativen Tag auf unter 2% und waren an Tag 7 kaum mehr nachweisbar. In den anderen untersuchten Organen beobachtet man ähnliche Verläufe, zusammenfas-

send ist das Zellüberleben über den gewählten Beobachtungszeitraum nur sehr gering. Es ergeben sich keine Hinweise dafür, dass diese Zellen in der Niere in quantitativ signifikanter Weise proliferieren.

Die histologischen Untersuchungen unterstützen diese Ergebnisse. Selbst einen Tag nach Injektion der Zellen war es schwierig, PKH-26-markierte männliche Spenderzellen in der Niere nachzuweisen. Im Interstitium und den Tubuli fanden sich vereinzelte Zellverbände, jedoch waren bereits einen Tag später fluoreszenzmikroskopisch keine der injizierten Zellen mehr sichtbar. Eine Anreicherung oder Inkorporation der Zellen in die geschädigten Organstrukturen konnte nicht beobachtet werden.

Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den Ergebnissen von Kale et al [60]. Hier wurde anhand histologischer Methoden eine Inkorporation applizierter Knochenmarkstammzellen in die Nierentubuli beobachtet. Es handelte sich bei den applizierten Zellen um eine Mischung aus lin^+ und $lin^-/CD90^+$ -Zellen, die nach initialer Knochenmarksablation durch Radiatio transplantiert wurden. 16 Wochen danach erfolgte eine Operation mit I/R-Schaden. In den postoperativen Untersuchungen konnte sowohl ein funktioneller als auch ein morphologischer Effekt durch die applizierten Stammzellen, vor allem die $lin^-/CD90^+$ -Population, nachgewiesen werden.

Im Vergleich zu unseren Untersuchungen spielt hierbei jedoch die vorausgegangene Knochenmarksablation eine entscheidende Rolle. Betrachtet man die Vergleichsgruppe ohne Bestrahlung und ohne Stammzellgabe, so zeigen sich nach der Ischämie vergleichbare Verläufe wie bei den Tieren mit Bestrahlung und mit Stammzellgabe. Maßgeblich für die beschleunigte Regeneration war also nicht die Stammzellgabe per se, sondern vielmehr ein intaktes Knochenmark. Über 16 Wochen hatten sich die Spenderzellen im Knochenmark der bestrahlten Tiere angereichert und so die fehlenden Stammzellen ersetzt. Zum Zeitpunkt des Ischämieschadens verfügten die Tiere also wieder über ein funktionierendes Stammzellsystem im Knochenmark. Die beobachteten Effekte sind vergleichbar mit der bereits beschriebenen Wirkung endogener HSC nach stattgehabtem Nierenversagen [100, 25, 87].

Ähnlich stellt sich der Vergleich mit der Arbeit von Lin et al dar [75]. Die Stammzellen wurden zwar direkt nach I/R-Schaden injiziert, es erfolgte jedoch auch hier eine vorausgehende Bestrahlung der Empfängertiere. Die Organentnahme fand 4 Wochen nach der Operation statt, also weit nach der Akutphase des ANV.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen direkt nach dem eingetretenen Schaden und somit zusätzlich zum intakten Stammzellsystem des Empfängers verabreicht. Betrachtet man die Dynamik des akuten Nierenversagens anhand der vorliegenden Ergebnisse, zeigt sich, dass langfristige Resultate hinsichtlich der Zellinkorporation wenig Aussagekraft über den therapeutischen Nutzen im Akutgeschehen haben.

Für das Nierenversagen im klinischen Alltag ist die Dynamik in der ersten Woche nach dem

Schadenseintritt entscheidend. Die Stammzellen müssen hier direkt im Spenderorganismus wirken. Die Erkenntnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen, dass während der vulnerablen Phase des ANV innerhalb der ersten Tage keine Auswirkungen der Stammzellen auf Inkorporation, Anreicherung oder Transdifferenzierung im Zielorgan zu beobachten sind.

Die Untersuchungen von Morigi et al [88] beschäftigten sich mit der Wirkung von HSC und MSC nach intravenöser Injektion bei Cisplatin-geschädigten Nieren im Mausmodell. Hämatopoetische Stammzellen wurden einen Tag nach Nierenschädigung in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen intravenös appliziert. Es konnte kein sichtbarer Einfluss auf die histologischen Zellschäden im Rahmen der Akutphase des ANV beobachtet werden, lediglich ein geringer Teil der HSC wurde in den Tubuli nachgewiesen.

Die vorliegende Arbeit zeigt vergleichbare Ergebnisse. Trotz hoher Zellzahlen und frühzeitiger organnaher Applikation beobachtet man keine signifikanten Effekte bezüglich Engraftment und histologischer Regeneration. Anhand engmaschiger Untersuchungen wurde der Akutverlauf innerhalb der ersten Tage des ANV im Hinblick auf Zellzahl, Zelldistribution und Damage Score detailliert dargestellt. Die Analysen konkretisieren und quantifizieren die von Morigi et al beschriebenen Beobachtungen.

Bisherige Studien konzentrierten sich auf das Geschehen in der Niere, über die Verteilung der Zellen in anderen Organsystemen war wenig bekannt. In den jetzigen Untersuchungen fällt auf, dass nach initialem rapiden Zellverlust am Ende der Beobachtungszeit die Organsysteme Knochenmark, Leber und Hirn die Hauptspeicher für die im Organismus verbliebenen Stammzellen darstellen. Knochenmark und Leber gelten als wichtige Entstehungs- und Speicherorgane hämatopoetischer Stammzellen, so dass eine Anreicherung in diesen Organen zu erwarten war, auch wenn die Leber diese Rolle hauptsächlich in der embryonalen Entwicklung übernimmt. Interessant ist der Zellanteil im Hirn, immerhin über 5% der injizierten Zellen, obwohl dieses Organ nach bisherigen Erkenntnissen weder für Entstehung noch die weitere Existenz hämatopoetischer Stammzellen relevant ist.

In bisherigen Studien über die Rolle hämatopoetischer Stammzellen bei zerebralen Erkrankungen wurde die Möglichkeit der Transdifferenzierung in Mikro- und Makroglia herausgearbeitet [30, 35, 110]. Davoust [31] und Schwarting [108] postulierten in ihren Arbeiten der letzten Jahre sogar einen Tropismus der injizierten Zellen für das geschädigte Gewebe. Hier dienten allergische und postischämische Entzündungsreaktionen als Modell. Es wurden ausschließlich qualitative und funktionelle Aussagen zu Zellvorkommen und -wirkung im geschädigten Gewebe gezeigt. Die vorliegenden Ergebnisse legen mit Hilfe quantitativer Analysen nahe, dass hämatopoetische Stammzellen im Hirn angereichert werden und eventuell einen Tropismus für Strukturen des zentralen Nervensystems besitzen, wobei die beobachteten Effekte lediglich einen Trend darstellen. Um statistisch signifikante Aussagen zu diesem Phänomen zu treffen sind weitere Untersuchungen nötig.

5.2 Effekt transplanteder Stammzellen auf die Nierenfunktion nach Ischämie-/ Reperfusionsschaden

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass exogen applizierte hämatopoetische Stammzellen die funktionelle Regeneration der Niere im Akutgeschehen nach Ischämie-/ Reperfusionsschaden nicht positiv beeinflussen. Sowohl die Dynamik der Serumkreatininwerte als auch der Serumharnstoffwerte zeigen im direkten Vergleich zwischen intraarterieller Zelltransplantation und Vehikelinjektion keine signifikanten Unterschiede. Trotz hoher Konzentrationen von 1×10^6 Zellen pro Tier hatten die verabreichten hämatopoetischen Stammzellen an keinem Punkt der Untersuchungen einen messbaren Effekt auf die funktionelle Erholung des geschädigten Organs.

Initial wurde in beiden Untersuchungsgruppen ein ausgeprägtes funktionelles Nierenversagen induziert. Mit maximalen Kreatininwerten von 1,25 mg/dl zeigten die Retentionsparameter bis zum ersten postoperativen Tag einen Anstieg um das Fünffache der präoperativen Baseline von 0,27 mg/dl bei gesunden Tieren. Die Serumharnstoffwerte hatten vergleichbare Verläufe, beide Untersuchungsgruppen wiesen auch hier keine signifikanten Unterschiede auf. Die Peak-Level wurden ebenfalls an Tag 1 erreicht und lagen mit durchschnittlich 199,8 mg/dl in der Kontroll- und 209,57 mg/dl in der Zellgruppe (bei Baseline-Werten von 36 mg/dl) ähnlich hoch. Zum Vergleich lagen die Maximalwerte in den oben zitierten Arbeiten [60, 75, 88] lediglich zwischen 54 mg/dl [60] und 90,3 mg/dl [75].

Betrachtet man die Dynamik der Serummarker im zeitlichen Verlauf, so ist die Regeneration der Laborparameter in dem von uns gewählten Rattenmodell schneller als in den Mäuseversuchen der oben zitierten Arbeiten. Bereits an Tag 2 zeigt sich eine funktionelle Erholung des Organs, was mit den histologischen Beobachtungen korreliert. In den Arbeiten von Lin [75], Kale [60] und Morigi [88] wurden langsamere Verläufe mit Maxima bis zum vierten oder fünften postoperativen Tag beschrieben, allerdings kamen hier auch andere Schädigungsmodelle, meist toxisch induzierte ANV, zum Einsatz.

Zusammenfassend hat das in dieser Arbeit induzierte akute ischämische Nierenversagen einen raschen, ausgeprägten Verlauf mit einem funktionellen und histologischen Schadensmaximum am ersten postoperativen Tag. Trotz eines Anstiegs der Kreatininwerte auf ca. 450% und der Harnstoffwerte auf ca. 550%, was einem akuten Nierenversagen im Stadium F nach RIFLE-Kriterien entsprechen würde [17], erholen sich die Tiere unabhängig von der Stammzellgabe schnell wieder, erreichen innerhalb einer Woche jedoch nicht das Ausgangsniveau. Vergleiche mit bisherigen Studien legen mehrwöchige Regenerationsphasen bis zur vollständigen Erholung und Rückkehr zu den Ausgangswerten nahe. Kale et al beschreiben in ihren Versuchen [60] eine Abhängigkeit der funktionellen Nierenerholung von Ischämiezeit und maximalen Serumharnstoffwerten. Ähnliche Beobachtungen finden sich bei Lin [75], Duffield [34] und Morigi [88], bei deren Versuchstieren sich die Laborparameter nach 3 Wochen noch nicht vollständig zurückgebildet hatten.

5.3 Zukünftige Einsatzmöglichkeiten der Zelltherapie beim akuten Nierenversagen

Nahezu alle klinischen Fachrichtungen setzen große Hoffnungen in das zukünftige therapeutische Potential adulter Stammzellen. Wie eingangs beschrieben fanden bereits im Bereich der Kardiologie klinische Studien zur Stammzellapplikation nach Myokardinfarkt statt. Seit 2008 führen Tögel et al [116] die erste groß angelegte klinische Studie zur Stammzelltherapie des akuten Nierenversagens durch. Allogene mesenchymale Stammzellen werden präoperativ kardiochirurgischen Patienten mit erhöhtem ANV-Risiko appliziert. Die Injektion erfolgt intraaortal über einen femoralen Zugang und der präventive Nutzen der Stammzellen im Hinblick auf postoperative Nierenschäden wird untersucht. Dieses Projekt veranschaulicht die momentane Dynamik in der Erforschung möglicher Stammzelltherapien bei nephrologischen Krankheitsbildern.

Angesichts der vorliegenden Erkenntnisse scheinen hämatopoetische Stammzellen jedoch nicht geeignet für einen therapeutischen Einsatz beim akuten Nierenversagen. Selbst hochquantitative, aufgereinigte Zell-Lösungen zeigen keine Effekte auf den klinischen Verlauf. Ein für therapeutische Zwecke notwendiges Ansiedeln der Zellen im geschädigten Organ bleibt in relevanter Zahl ebenfalls aus. Allerdings zeigen Studien wie die von Kale et al [60], dass endogene HSC unter anderen Bedingungen den Verlauf des akuten Nierenversagens positiv beeinflussen können. Vor allem eine langfristig angelegte präventive Stammzellgabe bei Patienten ohne intaktes Knochenmarkstammzellsystem kann dieses ersetzen und scheint so zu einer besseren Organregeneration beizutragen. Dieser Effekt zeigt sich jedoch lediglich im präventiven Einsatz und hat daher nur eine begrenzte therapeutische Relevanz beim akuten Nierenversagen.

Aufgrund der Erkenntnisse bezüglich der Nebenwirkungen einer Stammzellgabe müssen weitere Therapieversuche kritisch betrachtet werden. So konnten für Knochenmarkstammzellen, insbesondere die Subpopulation der mesenchymalen Stammzellen, neben den Fibroserisiken aufgrund ihres stromalen Ursprungs [105] auch die Förderung bestehender und die Bildung neuer Malignome festgestellt werden [55, 129, 121, 33]. Wie in der hier vorliegenden Untersuchung und der parallel durchgeführten Arbeit zum Wirken mesenchymaler Stammzellen [20] gezeigt wurde, ist jedoch eine hohe applizierte Stammzellzahl für einen therapeutischen Nutzen essentiell. Diese hohen Zellzahlen, verbunden mit der ausgedehnten Verteilung der Zellen im Gesamtorganismus, führen jedoch zu einem Anstieg der zu erwartenden Nebenwirkungen und Langzeitschäden, was die Risiken eines therapeutischen Einsatzes erhöht.

Die Verwendung adulter Stammzellen für neue therapeutische Konzepte bleibt nichtsdestotrotz interessant. Allerdings ist eine Therapie zur Zeit nur mit einem hohen Aufwand und nicht zu vernachlässigenden Risiken verbunden. Diese sollten vor einem breiten Einsatz durch Langzeitstudien näher definiert und weitestmöglich ausgeschlossen werden.

Die hier untersuchte angereicherte hämatopoetische Stammzellpopulation eignet sich aufgrund des fehlenden Tropismus für erkranktes Nierengewebe, mangelndem Engraftment im geschädigten Organ und einem nicht nachweisbaren therapeutischen Effekt auf die Organerholung zum jetzigen Zeitpunkt nicht für die Therapie des akuten ischämischen Nierenversagens.

6 Zusammenfassung

Hämatopoetische Stammzellen haben sich innerhalb der letzten Jahrzehnte zu dem wichtigsten Instrument klinischer Stammzelltherapie entwickelt. Neuere Studien zeigten eindrücklich das hohe Differenzierungspotential dieser Stammzellpopulation, sogar die Möglichkeit einer Ausreifung in Nierengewebe wurde demonstriert. Bislang war jedoch unklar, inwiefern sich dieses Potential für eine klinische Anwendung im Rahmen des akuten Nierenversagens nutzen lässt, es fehlten Daten über die Dynamik der Zelldistribution und Inkorporation in den Organismus nach exogener Applikation.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen einer Applikation angereicherter hämatopoetischer Stammzellen nach Induktion eines akuten ischämischen Nierenversagens im Rattenmodell untersucht, insbesondere hinsichtlich funktioneller und histologischer Organerholung, verbunden mit der Quantifizierung des Überlebens und der Verteilung der Spenderzellen im Empfängerorganismus. Die Zellen wurden aus dem Knochenmark männlicher Spendertiere gewonnen, anhand einer MACS-Separation aufgereinigt und in FACS-Analysen klassifiziert. Nach unilateraler Nephrektomie, siebzugminütiger Ischämie und fünfzehnminütiger Reperusionsphase der Restniere erfolgte die arterielle Zellapplikation. Die quantitativen Organuntersuchungen erfolgten mittels Real-Time-PCR, hierzu wurde eigens eine neue PCR-Methode definiert, evaluiert und angewendet. Es wurden die Zellzahlen in Niere, Lunge, Leber, Milz, Herz, Hirn, Skelettmuskulatur und Knochenmark bestimmt. Als laborchemisches Korrelat der Nierenfunktion dienten die Serumkreatinin- und -harnstoffverläufe.

Trotz einer Zellanreicherung auf über 95% und einer hohen applizierten Anzahl von 1×10^6 Zellen pro Tier mit organnaher Injektion über die Aorta abdominalis ließ sich kein signifikanter Effekt auf die Regeneration der Nierenfunktion nachweisen. Unabhängig von der Zellgabe entwickelten die Tiere ausgeprägte Nierenversagen mit Anstieg der Retentionsparameter bis zum Fünffachen der Ausgangswerte.

Lediglich am Tag der Applikation ließen sich relevante Zellzahlen in der Niere nachweisen, danach sanken diese kontinuierlich ab. Ähnlich stellte sich die Distribution in den anderen untersuchten Organsystemen dar. Die Zellen waren anfangs zu 85% auf Niere, Lunge und Leber verteilt, persistierten dort nur wenige Tage und verteilten sich danach nur zu einem geringen Anteil auf andere Organsysteme um.

Zusammenfassend gibt es nach intraarterieller Applikation hämatopoetischer Stammzellen im akuten ischämischen Nierenversagen weder eine quantitative Anreicherung oder Transdifferenzierung der Zellen in der Niere, noch eine positive Wirkung auf die histologische oder funktionelle Organerholung im Akutgeschehen.

Transplantierte hämatopoetische Stammzellen stellen aufgrund eines unzureichenden Tropismus für geschädigtes Nierengewebe und fehlender regenerativer Wirkung eine ungeeignete Zellpopulation zur Akutbehandlung des ischämischen Nierenversagens dar.

7 Literaturverzeichnis

Literatur

- [1] First report of the committee for clarification of the nomenclature of cells and diseases of the blood and blood-forming organs. *Am J Clin Pathol*, 18(5):443–450, May 1948.
- [2] Third, fourth and fifth reports of the committee for clarification of the nomenclature of cells and diseases of the blood and blood-forming organs. *Am J Clin Pathol*, 20(6):562–579, Jun 1950.
- [3] M. R. Alison, R. Poulson, and S. J. Forbes. Update on hepatic stem cells. *Liver*, 21(6):367–373, Dec 2001.
- [4] Franca Anglani, Monica Ceol, Federica Mezzabotta, Rossella Torregrossa, Emilia Tiralongo, Enrica Tosetto, Dorella Del Prete, and Angela D'Angelo. The renal stem cell system in kidney repair and regeneration. *Front Biosci*, 13:6395–6405, 2008.
- [5] Sally Arai and Hans-G. Klingemann. Hematopoietic stem cell transplantation: bone marrow vs. mobilized peripheral blood. *Arch Med Res*, 34(6):545–553, 2003.
- [6] F. H. Bach, R. J. Albertini, P. Joo, J. L. Anderson, and M. M. Bortin. Bone-marrow transplantation in a patient with the wiskott-aldrich syndrome. *Lancet*, 2(7583):1364–1366, Dec 1968.
- [7] S. Bachmann and K. Ramasubbu. Immunohistochemical colocalization of the alpha-subunit of neutrophil nadph oxidase and ecto-5'-nucleotidase in kidney and liver. *Kidney Int*, 51(2):479–482, Feb 1997.
- [8] Sean M Bagshaw and Rinaldo Bellomo. The influence of volume management on outcome. *Curr Opin Crit Care*, 13(5):541–548, Oct 2007.
- [9] Sean M Bagshaw, Carol George, Rinaldo Bellomo, and A. N. Z. I. C. S. Database Management Committee. A comparison of the rifle and akin criteria for acute kidney injury in critically ill patients. *Nephrol Dial Transplant*, 23(5):1569–1574, May 2008.
- [10] Sean M Bagshaw, Carol George, Irina Dinu, and Rinaldo Bellomo. A multi-centre evaluation of the rifle criteria for early acute kidney injury in critically ill patients. *Nephrol Dial Transplant*, 23(4):1203–1210, Apr 2008.
- [11] Leora B Balsam and Robert C Robbins. Haematopoietic stem cells and repair of the ischaemic heart. *Clin Sci (Lond)*, 109(6):483–492, Dec 2005.

- [12] Leora B Balsam, Amy J Wagers, Julie L Christensen, Theo Kofidis, Irving L Weissman, and Robert C Robbins. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*, 428(6983):668–673, Apr 2004.
- [13] A. J. Barge. A review of the efficacy and tolerability of recombinant haematopoietic growth factors in bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 11 Suppl 2:1–11, 1993.
- [14] D. P. Basile. The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function. *Kidney Int*, 72(2):151–156, Jul 2007.
- [15] D. P. Basile, D. Donohoe, K. Roethe, and J. L. Osborn. Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. *Am J Physiol Renal Physiol*, 281(5):F887–F899, Nov 2001.
- [16] C. M. Baum, I. L. Weissman, A. S. Tsukamoto, A. M. Buckle, and B. Peault. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(7):2804–2808, Apr 1992.
- [17] Rinaldo Bellomo, Claudio Ronco, John A Kellum, Ravindra L Mehta, Paul Palevsky, and Acute Dialysis Quality Initiative workgroup. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the second international consensus conference of the acute dialysis quality initiative (adqi) group. *Crit Care*, 8(4):R204–R212, Aug 2004.
- [18] M. M. Bortin. A compendium of reported human bone marrow transplants. *Transplantation*, 9(6):571–587, Jun 1970.
- [19] M. Brehm, E. Darrelmann, and B. E. Strauer. [stem cell therapy in acute myocardial infarction]. *Internist (Berl)*, 49(9):1068–1078, Sep 2008.
- [20] Volker R Burst, Meyke Gillis, Florian Pütsch, Ruth Herzog, Jürgen H Fischer, Petra Heid, Jochen Müller-Ehmsen, Kerstin Schenk, Jochen W U Fries, Conrad A Baldamus, and Thomas Benzing. Poor cell survival limits the beneficial impact of mesenchymal stem cell transplantation on acute kidney injury. *Nephron Exp Nephrol*, 114(3):e107–e116, 2010.
- [21] R. Burt, W. Pearce, K. Luo, Y. Oyama, C. Davidson, N. Beohar, and M. Gheorghide. Hematopoietic stem cell transplantation for cardiac and peripheral vascular disease. *Bone Marrow Transplant*, 32 Suppl 1:S29–S31, Aug 2003.
- [22] Benedetta Bussolati, Stefania Bruno, Cristina Grange, Stefano Buttiglieri, Maria Chiara Deregibus, Dario Cantino, and Giovanni Camussi. Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *Am J Pathol*, 166(2):545–555, Feb 2005.

- [23] Benedetta Bussolati and Giovanni Camussi. Adult stem cells and renal repair. *J Nephrol*, 19(6):706–709, 2006.
- [24] Benedetta Bussolati, Ciro Tetta, and Giovanni Camussi. Contribution of stem cells to kidney repair. *Am J Nephrol*, 28(5):813–822, 2008.
- [25] Lloyd G Cantley. Adult stem cells in the repair of the injured renal tubule. *Nat Clin Pract Nephrol*, 1(1):22–32, Nov 2005.
- [26] P. K. Chatterjee, P. A. Brown, S. Cuzzocrea, K. Zacharowski, K. N. Stewart, H. Mota-Filipe, M. C. McDonald, and C. Thiemermann. Calpain inhibitor-1 reduces renal ischemia/reperfusion injury in the rat. *Kidney Int*, 59(6):2073–2083, Jun 2001.
- [27] Yung-Chang Chen, Chang-Chyi Jenq, Ya-Chung Tian, Ming-Yang Chang, Chan-Yu Lin, Chih-Cheng Chang, Horng-Chyuan Lin, Ji-Tseng Fang, Chih-Wei Yang, and Shu-Min Lin. Rifle classification for predicting in-hospital mortality in critically ill sepsis patients. *Shock*, 31(2):139–145, Feb 2009.
- [28] Christopher R Cogle, Anthony T Yachnis, Eric D Laywell, Dani S Zander, John R Wingard, Dennis A Steindler, and Edward W Scott. Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study. *Lancet*, 363(9419):1432–1437, May 2004.
- [29] Stéphane Y Corbel, Adrienne Lee, Lin Yi, Jeffrey Duenas, Timothy R Brazelton, Helen M Blau, and Fabio M V Rossi. Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle. *Nat Med*, 9(12):1528–1532, Dec 2003.
- [30] Barbara J Crain, Simon D Tran, and Eva Mezey. Transplanted human bone marrow cells generate new brain cells. *J Neurol Sci*, 233(1-2):121–123, Jun 2005.
- [31] N. Davoust, C. Vuillat, G. Cavillon, C. Domenget, E. Hatterer, A. Bernard, C. Dumontel, P. Jurdic, C. Malcus, C. Confavreux, M. F. Belin, and S. Nataf. Bone marrow cd34+/b220+ progenitors target the inflamed brain and display in vitro differentiation potential toward microglia. *FASEB J*, 20(12):2081–2092, Oct 2006.
- [32] Benjamin Dekel, Elias Shezen, Smadar Even-Tov-Friedman, Helena Katchman, Raanan Margalit, Arnon Nagler, and Yair Reisner. Transplantation of human hematopoietic stem cells into ischemic and growing kidneys suggests a role in vasculogenesis but not tubulogenesis. *Stem Cells*, 24(5):1185–1193, May 2006.
- [33] Farida Djouad, Pascale Plerce, Claire Bony, Philippe Tropel, Florence Apparailly, Jacques Sany, Danièle Noël, and Christian Jorgensen. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*, 102(10):3837–3844, Nov 2003.

- [34] Jeremy S Duffield, Kwon Moo Park, Li-Li Hsiao, Vicki R Kelley, David T Scadden, Takaharu Ichimura, and Joseph V Bonventre. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J Clin Invest*, 115(7):1743–1755, Jul 2005.
- [35] M. A. Eglitis and E. Mezey. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(8):4080–4085, Apr 1997.
- [36] T. M. El-Achkar, M. Hosein, and P. C. Dagher. Pathways of renal injury in systemic gram-negative sepsis. *Eur J Clin Invest*, 38 Suppl 2:39–44, Oct 2008.
- [37] T-C. Fang, W. R. Otto, J. Rao, R. Jeffery, T. Hunt, M. R. Alison, H. T. Cook, N. A. Wright, and R. Poulsom. Haematopoietic lineage-committed bone marrow cells, but not cloned cultured mesenchymal stem cells, contribute to regeneration of renal tubular epithelium after hgcl 2 -induced acute tubular injury. *Cell Prolif*, 41(4):575–591, Aug 2008.
- [38] G. Ferrari, G. Cusella-De Angelis, M. Coletta, E. Paolucci, A. Stornaiuolo, G. Cossu, and F. Mavilio. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, 279(5356):1528–1530, Mar 1998.
- [39] Richard L Gardner. Stem cells and regenerative medicine: principles, prospects and problems. *C R Biol*, 330(6-7):465–473, 2007.
- [40] N. GENGOZIAN, I. S. URSO, C. C. CONGDON, A. D. CONGER, and T. MAKINODAN. Thymus specificity in lethally irradiated mice treated with rat bone marrow. *Proc Soc Exp Biol Med*, 96(3):714–720, Dec 1957.
- [41] I. Goldschneider, L. K. Gordon, and R. J. Morris. Demonstration of thy-1 antigen on pluripotent hemopoietic stem cells in the rat. *J Exp Med*, 148(5):1351–1366, Nov 1978.
- [42] Markus Grompe. The role of bone marrow stem cells in liver regeneration. *Semin Liver Dis*, 23(4):363–372, Nov 2003.
- [43] E. Gussoni, Y. Soneoka, C. D. Strickland, E. A. Buzney, M. K. Khan, A. F. Flint, L. M. Kunkel, and R. C. Mulligan. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*, 401(6751):390–394, Sep 1999.
- [44] H. Haller. [regenerative therapy in nephrology. repair or construction?]. *Internist (Berl)*, 48(8):813–818, Aug 2007.
- [45] Toshio Heike and Tatsutoshi Nakahata. Stem cell plasticity in the hematopoietic system. *Int J Hematol*, 79(1):7–14, Jan 2004.

- [46] Maria Beatriz Herrera, Benedetta Bussolati, Stefania Bruno, Valentina Fonsato, Giuseppe Mauriello Romanazzi, and Giovanni Camussi. Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. *Int J Mol Med*, 14(6):1035–1041, Dec 2004.
- [47] Erica L Herzog, Li Chai, and Diane S Krause. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*, 102(10):3483–3493, Nov 2003.
- [48] E. A J Hoste and W. De Corte. Epidemiology of aki in the icu. *Acta Clin Belg Suppl*, (2):314–317, 2007.
- [49] E. A J Hoste and J. A. Kellum. Acute kidney dysfunction and the critically ill. *Minerva Anestesiol*, 72(3):133–143, Mar 2006.
- [50] Eric A J Hoste, Gilles Clermont, Alexander Kersten, Ramesh Venkataraman, Derek C Angus, Dirk De Bacquer, and John A Kellum. Rife criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis. *Crit Care*, 10(3):R73, 2006.
- [51] Eric A J Hoste and John A Kellum. Acute kidney injury: epidemiology and diagnostic criteria. *Curr Opin Crit Care*, 12(6):531–537, Dec 2006.
- [52] Eric A J Hoste and John A Kellum. Rife criteria provide robust assessment of kidney dysfunction and correlate with hospital mortality. *Crit Care Med*, 34(7):2016–2017, Jul 2006.
- [53] Eric A J Hoste and John A Kellum. Incidence, classification, and outcomes of acute kidney injury. *Contrib Nephrol*, 156:32–38, 2007.
- [54] Eric A J Hoste and Marie Schurgers. Epidemiology of acute kidney injury: how big is the problem? *Crit Care Med*, 36(4 Suppl):S146–S151, Apr 2008.
- [55] Jeanmarie Houghton, Calin Stoicov, Sachiyo Nomura, Arlin B Rogers, Jane Carlson, Hanchen Li, Xun Cai, James G Fox, James R Goldenring, and Timothy C Wang. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science*, 306(5701):1568–1571, Nov 2004.
- [56] Mihail Hristov, Wolfgang Erl, and Peter C Weber. Endothelial progenitor cells: isolation and characterization. *Trends Cardiovasc Med*, 13(5):201–206, Jul 2003.
- [57] B. D. Humphreys, J. S. Duffield, and J. V. Bonventre. Renal stem cells in recovery from acute kidney injury. *Minerva Urol Nefrol*, 58(4):329–337, Dec 2006.
- [58] Benjamin D Humphreys and Joseph V Bonventre. The contribution of adult stem cells to renal repair. *Nephrol Ther*, 3(1):3–10, Mar 2007.

- [59] Enyu Imai and Takahito Ito. Can bone marrow differentiate into renal cells? *Pediatr Nephrol*, 17(10):790–794, Oct 2002.
- [60] Sujata Kale, Anil Karihaloo, Paul R Clark, Michael Kashgarian, Diane S Krause, and Lloyd G Cantley. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *J Clin Invest*, 112(1):42–49, Jul 2003.
- [61] Alexander Kaminski and Gustav Steinhoff. Current status of intramyocardial bone marrow stem cell transplantation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 20(2):119–125, 2008.
- [62] John A Kellum, Rinaldo Bellomo, and Claudio Ronco. Classification of acute kidney injury using rifle: What's the purpose? *Crit Care Med*, 35(8):1983–1984, Aug 2007.
- [63] John A Kellum, Rinaldo Bellomo, and Claudio Ronco. The concept of acute kidney injury and the rifle criteria. *Contrib Nephrol*, 156:10–16, 2007.
- [64] Ebru Koca and Richard E Champlin. Peripheral blood progenitor cell or bone marrow transplantation: controversy remains. *Curr Opin Oncol*, 20(2):220–226, Mar 2008.
- [65] D. S. Krause. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Ther*, 9(11):754–758, Jun 2002.
- [66] D. S. Krause, N. D. Theise, M. I. Collector, O. Henegariu, S. Hwang, R. Gardner, S. Neutzel, and S. J. Sharkis. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 105(3):369–377, May 2001.
- [67] Diane S Krause. Bone marrow-derived cells and stem cells in lung repair. *Proc Am Thorac Soc*, 5(3):323–327, Apr 2008.
- [68] I. V. Kutyavin, I. A. Afonina, A. Mills, V. V. Gorn, E. A. Lukhtanov, E. S. Belousov, M. J. Singer, D. K. Walburger, S. G. Lokhov, A. A. Gall, R. Dempcy, M. W. Reed, R. B. Meyer, and J. Hedgpeth. 3'-minor groove binder-dna probes increase sequence specificity at pcr extension temperatures. *Nucleic Acids Res*, 28(2):655–661, Jan 2000.
- [69] Igor Kutyavin, Sergey Lokhov, Eugene Lukhtanov, and Michael W Reed. Chemistry of minor groove binder-oligonucleotide conjugates. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*, Chapter 8:Unit 8.4, Aug 2003.
- [70] Norbert H Lameire and Raymond Vanholder. Pathophysiology of ischaemic acute renal failure. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 18(1):21–36, Mar 2004.
- [71] N. Levicar, I. Dimarakis, C. Flores, J. Tracey, M. Y. Gordon, and N. A. Habib. Stem cells as a treatment for chronic liver disease and diabetes. *Handb Exp Pharmacol*, (180):243–262, 2007.

- [72] Lili Li, Shuo Zhang, Yao Zhang, Bo Yu, Yan Xu, and Zhenzhong Guan. Paracrine action mediate the antifibrotic effect of transplanted mesenchymal stem cells in a rat model of global heart failure. *Mol Biol Rep*, 36(4):725–731, Apr 2009.
- [73] Ling Li, Phu Truong, Peter Igarashi, and Fangming Lin. Renal and bone marrow cells fuse after renal ischemic injury. *J Am Soc Nephrol*, 18(12):3067–3077, Dec 2007.
- [74] Fangming Lin. Renal repair: role of bone marrow stem cells. *Pediatr Nephrol*, 23(6):851–861, Jun 2008.
- [75] Fangming Lin, Kimberly Cordes, Linheng Li, Leroy Hood, William G Couser, Stuart J Shankland, and Peter Igarashi. Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol*, 14(5):1188–1199, May 2003.
- [76] Kathleen D Liu and Paul R Brakeman. Renal repair and recovery. *Crit Care Med*, 36(4 Suppl):S187–S192, Apr 2008.
- [77] Michael R Loebinger and Sam M Janes. Stem cells for lung disease. *Chest*, 132(1):279–285, Jul 2007.
- [78] E. LORENZ, C. CONGDON, and D. UPHOFF. Modification of acute irradiation injury in mice and guinea-pigs by bone marrow injections. *Radiology*, 58(6):863–877, Jun 1952.
- [79] Antonia Loverre, Carmen Capobianco, Pasquale Ditunno, Michele Battaglia, Giuseppe Grandaliano, and Francesco Paolo Schena. Increase of proliferating renal progenitor cells in acute tubular necrosis underlying delayed graft function. *Transplantation*, 85(8):1112–1119, Apr 2008.
- [80] Maximow. Über experimentelle erzeugung von knochenmarkgewebe. *Anat Anz*, 28:609–612, 1906.
- [81] Alexander Medvinsky and Austin Smith. Stem cells: Fusion brings down barriers. *Nature*, 422(6934):823–825, Apr 2003.
- [82] Ravindra L Mehta, John A Kellum, Sudhir V Shah, Bruce A Molitoris, Claudio Ronco, David G Warnock, Adeera Levin, and Acute Kidney Injury Network. Acute kidney injury network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care*, 11(2):R31, 2007.
- [83] S. Miltenyi, W. Müller, W. Weichel, and A. Radbruch. High gradient magnetic cell separation with macs. *Cytometry*, 11(2):231–238, 1990.

- [84] M. Mimeault, R. Hauke, and S. K. Batra. Stem cells: a revolution in therapeutics—recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin Pharmacol Ther*, 82(3):252–264, Sep 2007.
- [85] Stanislao Morgera, Anne K Kraft, Gerda Siebert, Friedrich C Luft, and Hans-H. Neumayer. Long-term outcomes in acute renal failure patients treated with continuous renal replacement therapies. *Am J Kidney Dis*, 40(2):275–279, Aug 2002.
- [86] Jun Mori, Yasunori Ishihara, Kensuke Matsuo, Hisakazu Nakajima, Naoto Terada, Kitaro Kosaka, Zenro Kizaki, and Tohru Sugimoto. Hematopoietic contribution to skeletal muscle regeneration in acid alpha-glucosidase knockout mice. *J Histochem Cytochem*, 56(9):811–817, Sep 2008.
- [87] Marina Morigi, Ariela Benigni, Giuseppe Remuzzi, and Barbara Imberti. The regenerative potential of stem cells in acute renal failure. *Cell Transplant*, 15 Suppl 1:S111–S117, 2006.
- [88] Marina Morigi, Barbara Imberti, Carla Zoja, Daniela Corna, Susanna Tomasoni, Mauro Abbate, Daniela Rottoli, Stefania Angioletti, Ariela Benigni, Norberto Perico, Malcolm Alison, and Giuseppe Remuzzi. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 15(7):1794–1804, Jul 2004.
- [89] S. J. Morrison, P. M. White, C. Zock, and D. J. Anderson. Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell*, 96(5):737–749, Mar 1999.
- [90] Ernst Neumann. Über die bedeutung des knochenmarks für die blutbildung. *Centralblatt für die Med. Wissensch.*, 44:689, 1868.
- [91] Donald Orlic, Jan Kajstura, Stefano Chimenti, David M Bodine, Annarosa Leri, and Piero Anversa. Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Pediatr Transplant*, 7 Suppl 3:86–88, 2003.
- [92] Marlies Ostermann and René W S Chang. Acute kidney injury in the intensive care unit according to rifle. *Crit Care Med*, 35(8):1837–43; quiz 1852, Aug 2007.
- [93] B. E. Petersen, W. C. Bowen, K. D. Patrene, W. M. Mars, A. K. Sullivan, N. Murase, S. S. Boggs, J. S. Greenberger, and J. P. Goff. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, 284(5417):1168–1170, May 1999.
- [94] Roberto Pisoni, Keith M Wille, and Ashita J Tolwani. The epidemiology of severe acute kidney injury: from best to picard, in acute kidney injury: new concepts. *Nephron Clin Pract*, 109(4):c188–c191, 2008.

- [95] Felix C Popp, Pompiliu Piso, Hans J Schlitt, and Marc H Dahlke. Therapeutic potential of bone marrow stem cells for liver diseases. *Curr Stem Cell Res Ther*, 1(3):411–418, Sep 2006.
- [96] Richard Poulson, Malcolm R Alison, Terry Cook, Rosemary Jeffery, Eoin Ryan, Stuart J Forbes, Toby Hunt, Susannah Wyles, and Nicholas A Wright. Bone marrow stem cells contribute to healing of the kidney. *J Am Soc Nephrol*, 14 Suppl 1:S48–S54, Jun 2003.
- [97] I. Pusic and J. F. DiPersio. The use of growth factors in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Pharm Des*, 14(20):1950–1961, 2008.
- [98] L. C. Racusen. The histopathology of acute renal failure. *New Horiz*, 3(4):662–668, Nov 1995.
- [99] L. C. Racusen. Pathology of acute renal failure: structure/function correlations. *Adv Ren Replace Ther*, 4(2 Suppl 1):3–16, Apr 1997.
- [100] Sharon D Ricardo and James A Deane. Adult stem cells in renal injury and repair. *Nephrology (Carlton)*, 10(3):276–282, Jun 2005.
- [101] Z. Ricci, D. Cruz, and C. Ronco. The rifle criteria and mortality in acute kidney injury: A systematic review. *Kidney Int*, 73(5):538–546, Mar 2008.
- [102] Zaccaria Ricci, Dinna Cruz, and Claudio Ronco. The rifle classification for acute kidney injury definition. *Am J Surg*, Sep 2008.
- [103] Zaccaria Ricci and Claudio Ronco. Today's approach to the critically ill patient with acute kidney injury. *Blood Purif*, 27(1):127–134, 2009.
- [104] Alicia Rovó and Alois Gratwohl. Plasticity after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Chem*, 389(7):825–836, Jul 2008.
- [105] Francesco P Russo, Malcolm R Alison, Brian W Bigger, Eunice Amofah, Aikaterini Florou, Farhana Amin, George Bou-Gharios, Rosemary Jeffery, John P Iredale, and Stuart J Forbes. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology*, 130(6):1807–1821, May 2006.
- [106] V. Schächinger, B. Assmus, J. Honold, R. Lehmann, W-K. Hofmann, H. Martin, S. Dimmeler, and A. M. Zeiher. Normalization of coronary blood flow in the infarct-related artery after intracoronary progenitor cell therapy: intracoronary doppler sub-study of the topcare-ami trial. *Clin Res Cardiol*, 95(1):13–22, Jan 2006.
- [107] Volker Schächinger, Birgit Assmus, Martina B Britten, Jörg Honold, Ralf Lehmann, Claudius Teupe, Nasreddin D Abolmaali, Thomas J Vogl, Wolf-Karsten Hofmann,

- Hans Martin, Stefanie Dimmeler, and Andreas M Zeiher. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the topcare-ami trial. *J Am Coll Cardiol*, 44(8):1690–1699, Oct 2004.
- [108] Sönke Schwarting, Sara Litwak, Wenlin Hao, Mathias Bähr, Jens Weise, and Harald Neumann. Hematopoietic stem cells reduce postischemic inflammation and ameliorate ischemic brain injury. *Stroke*, 39(10):2867–2875, Oct 2008.
- [109] Vladimir B Serikov, Viatcheslav M Mikhaylov, Anna D Krasnodembskay, and Michael A Matthay. Bone marrow-derived cells participate in stromal remodeling of the lung following acute bacterial pneumonia in mice. *Lung*, 186(3):179–190, 2008.
- [110] Alain R Simard and Serge Rivest. Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *FASEB J*, 18(9):998–1000, Jun 2004.
- [111] G. J. Spangrude, S. Heimfeld, and I. L. Weissman. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*, 241(4861):58–62, Jul 1988.
- [112] Ingrid Stroo, Geurt Stokman, Gwendoline J D Teske, Sandrine Florquin, and Jaklien C Leemans. Haematopoietic stem cell migration to the ischemic damaged kidney is not altered by manipulating the sdf-1/cxcr4-axis. *Nephrol Dial Transplant*, Feb 2009.
- [113] Florian Tögel, Zhuma Hu, Kathleen Weiss, Jorge Isaac, Claudia Lange, and Christof Westenfelder. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289(1):F31–F42, Jul 2005.
- [114] Florian Tögel, Kathleen Weiss, Ying Yang, Zhuma Hu, Ping Zhang, and Christof Westenfelder. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292(5):F1626–F1635, May 2007.
- [115] Florian Tögel and Christof Westenfelder. Adult bone marrow-derived stem cells for organ regeneration and repair. *Dev Dyn*, 236(12):3321–3331, Dec 2007.
- [116] Florian E Tögel and Christof Westenfelder. Mesenchymal stem cells: a new therapeutic tool for aki. *Nat Rev Nephrol*, 6(3):179–183, Mar 2010.
- [117] N. D. Theise, S. Badve, R. Saxena, O. Henegariu, S. Sell, J. M. Crawford, and D. S. Krause. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology*, 31(1):235–240, Jan 2000.

- [118] S. Thierfelder. Haemopoietic stem cells of rats but not of mice express th-1.1 allo-antigen. *Nature*, 269(5630):691–693, Oct 1977.
- [119] E. D. THOMAS, H. L. LOCHTE, W. C. LU, and J. W. FERREBEE. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med*, 257(11):491–496, Sep 1957.
- [120] Joshua M Thurman, M. Scott Lucia, Danica Ljubanovic, and V. Michael Holers. Acute tubular necrosis is characterized by activation of the alternative pathway of complement. *Kidney Int*, 67(2):524–530, Feb 2005.
- [121] Jakub Tolar, Alma J Nauta, Mark J Osborn, Angela Panoskaltzis Mortari, Ron T McElmurry, Scott Bell, Lily Xia, Ning Zhou, Megan Riddle, Tania M Schroeder, Jennifer J Westendorf, R. Scott McIvor, Pancras C W Hogendoorn, Karoly Szuhai, Leann Oseth, Betsy Hirsch, Stephen R Yant, Mark A Kay, Alexandra Peister, Darwin J Prockop, Willem E Fibbe, and Bruce R Blazar. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 25(2):371–379, Feb 2007.
- [122] Shigehiko Uchino. Choice of therapy and renal recovery. *Crit Care Med*, 36(4 Suppl):S238–S242, Apr 2008.
- [123] Shigehiko Uchino. Outcome prediction for patients with acute kidney injury. *Nephron Clin Pract*, 109(4):c217–c223, 2008.
- [124] Shigehiko Uchino, John A Kellum, Rinaldo Bellomo, Gordon S Doig, Hiroshi Morimatsu, Stanislao Morgera, Miet Schetz, Ian Tan, Catherine Bouman, Ettiene Macedo, Noel Gibney, Ashita Tolwani, Claudio Ronco, Beginning, and Ending Supportive Therapy for the Kidney (BEST Kidney) Investigators. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA*, 294(7):813–818, Aug 2005.
- [125] V. M. Udani. The continuum of stem cell transdifferentiation: possibility of haemopoietic stem cell plasticity with concurrent cd45 expression. *Stem Cells Dev*, 15(1):1–3, Feb 2006.
- [126] Ramesh Venkataraman and John A Kellum. Defining acute renal failure: the rifle criteria. *J Intensive Care Med*, 22(4):187–193, 2007.
- [127] A. M G Versteilen, F. Di Maggio, J. R. Leemreis, A. B J Groeneveld, R. J P Musters, and P. Sipkema. Molecular mechanisms of acute renal failure following ischemia/reperfusion. *Int J Artif Organs*, 27(12):1019–1029, Dec 2004.
- [128] Sushrut S Waikar, Kathleen D Liu, and Glenn M Chertow. The incidence and prognostic significance of acute kidney injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 16(3):227–236, May 2007.

- [129] Y. Wang, D. L. Huso, J. Harrington, J. Kellner, D. K. Jeong, J. Turney, and I. K. McNiece. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human bm mesenchymal stem cell culture. *Cytotherapy*, 7(6):509–519, 2005.
- [130] Yang Wang, Feng Hu, Zhi jian Wang, Gong xian Wang, Zhong hua Zhang, Ping Xie, and Su ping Cui. Administration of bone marrow-derived stem cells suppresses cellular necrosis and apoptosis induced by reperfusion of ischaemic kidneys in rats. *Chin Med J (Engl)*, 121(3):268–271, Feb 2008.
- [131] Nikos Werner, Sonja Kosiol, Tobias Schiegl, Patrick Ahlers, Katrin Walenta, Andreas Link, Michael Böhm, and Georg Nickenig. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*, 353(10):999–1007, Sep 2005.
- [132] Kenichi Yamahara and Noritoshi Nagaya. Stem cell implantation for myocardial disorders. *Curr Drug Deliv*, 5(3):224–229, Jul 2008.
- [133] Ning Zhang, Deanna Mustin, Wade Reardon, Angela De Almeida, Paul Mozdziak, Michal Mrug, Leonard M Eisenberg, and David Sedmera. Blood-borne stem cells differentiate into vascular and cardiac lineages during normal development. *Stem Cells Dev*, 15(1):17–28, Feb 2006.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

1	Prinzip der MACS-Separation. Nach Depletion unerwünschter Zellen kann die separierte Zellpopulation eluiert werden.	22
2	Prinzip der FACS-Analyse. Nach Fluoreszenzfärbung mit antigenspezifischen Antikörpern erfolgt die Aufteilung der Zellen je nach ihrer Streuung eines Laserstrahls.	26
3	Quantifizierung männlicher HSC in weiblichen Gewebeproben mittels Real-Time-PCR. Auftragung nach Fluoreszenzintensität abhängig von den PCR-Zyklen. . . .	35
4	Lineare Regressionsanalyse zur Korrektur der CT-Werte in Abhängigkeit der jeweiligen Standards.	36
5	Standard-Effizienz-Kurve einer Verdünnungsreihe von 10^6 männlichen Spenderzellen in 500 mg weiblichen Gewebes.	36
6	Dot Plot und Histogramm der nativen Knochenmarklösung vor MACS-Separation, aufgeteilt nach CD3/CD11/CD45 (y-Achse) und CD90 (x-Achse). Vor weiterer Aufreinigung der Zelllösung beträgt der Anteil CD90 ⁺ -Zellen 22,6% und lin ⁺ -Zellen 78,1%, lediglich 2,4% sind CD90 ⁺ /lin ⁻	42
7	Dot Plot und Histogramm nach Depletion His49-postiver Zellen aus dem Knochenmark. Zur Aufreinigung der Zelllösung wurden Erythrozyten mit His49-Oberflächenmarkern per MACS separiert. Nach der Separation finden sich lediglich 3,1% His49 ⁺ -Zellen in der Lösung, 96,9% sind His49 ⁻	43
8	Dot Plot und Histogramm nach Depletion CD3-postiver Zellen aus dem Knochenmark. Zur Aufreinigung der Zelllösung wurden Lymphozyten mit CD3-Oberflächenmarkern per MACS separiert. Nach der Separation finden sich lediglich 2,5% CD3 ⁺ -Zellen in der Lösung, 97,5% sind CD3 ⁻	44
9	Dot Plot und Histogramm nach Depletion CD45-postiver Zellen aus dem Knochenmark. Zur Aufreinigung der Zelllösung wurden Lymphozyten mit CD45-Oberflächenmarkern per MACS separiert. Nach der Separation finden sich lediglich 2,1% CD45 ⁺ -Zellen in der Lösung, 97,9% sind CD45 ⁻	45
10	Dot Plot und Histogramm nach Depletion CD11-postiver Zellen aus dem Knochenmark. Zur Aufreinigung der Zelllösung wurden Leukozyten mit CD11-Oberflächenmarkern per MACS separiert. Nach der Separation finden sich lediglich 2,2% CD11 ⁺ -Zellen in der Lösung, 97,8% sind CD11 ⁻	46

11	Dot Plot und Histogramm der aufgereinigten Knochenmarklösung nach MACS-Separation, aufgeteilt nach CD3/CD11/CD45 (y-Achse) und CD90 (x-Achse). Nach Aufreinigung beträgt der Anteil CD90 ⁺ -Zellen 6,88% und lin ⁺ -Zellen 0,23%, 6,73% sind CD90 ⁺ /lin ⁻	47
12	Dot Plot und Histogramm des Eluats nach Positivselektion CD90-positiver Zellen aus dem Knochenmark, aufgeteilt nach CD3/CD11/CD45 (y-Achse) und CD90 (x-Achse). Zur Aufreinigung der Zelllösung wurden die Zellen mit CD90-Oberflächenmarkern per MACS separiert. In dem Eluat beträgt der Anteil CD90 ⁺ -Zellen 98,8% und lin ⁺ -Zellen 3,3%, 95,5% sind CD90 ⁺ /lin ⁻	48
13	Serumkreatininwerte nach Ischämie-/ Reperfusionsschaden der Niere und kontralateraler Nephrektomie zu verschiedenen Zeitpunkten. Vergleich von Vehikelgabe und intraarterieller Zellapplikation. Mittelwert des Serumkreatinins (mg/dl) ± SEM und Differenzen zwischen den beiden Gruppen mit entsprechenden t-Werten; p < 0,05.	50
14	Serumharnstoffwerte nach Ischämie-/ Reperfusionsschaden der Niere und kontralateraler Nephrektomie zu verschiedenen Zeitpunkten. Vergleich von Vehikelgabe und intraarterieller Zellapplikation. Mittelwert des Serumharnstoffs (mg/dl) ± SEM und Differenzen zwischen den beiden Gruppen mit entsprechenden t-Werten; p < 0,05.	52
15	Histologische Damage Scores nach Ischämie-/ Reperfusionsschaden der Niere und kontralateraler Nephrektomie zu verschiedenen Zeitpunkten. Vergleich von Vehikelgabe und intraarterieller Zellapplikation. Damage-Score-Werte ± SEM; p < 0,05.	53
16	Fluoreszenzmikroskopie, 20-fache Vergrößerung. Intraarteriell applizierte HSC fanden sich am ersten Tag nach der Injektion teilweise in Verbänden im Bereich des Interstitiums (Bild 1), selten vereinzelt in den Tubuli (Bild 2).	54
17	Relative Verteilung der hämatopoetischen Stammzelllösung in den Organen nach Injektion zu verschiedenen Zeitpunkten, gemessen an der intraoperativ injizierten Menge von 1x10 ⁶ Zellen.	55
18	Quantitatives Zellüberleben in der Niere nach renalem Ischämie-/ Reperfusionsschaden und intraarterieller Zellapplikation zu verschiedenen Zeitpunkten.	56
19	Quantitatives Zellüberleben in der Lunge nach renalem Ischämie-/ Reperfusionsschaden und intraarterieller Zellapplikation zu verschiedenen Zeitpunkten.	56
20	Quantitatives Zellüberleben in der Leber nach renalem Ischämie-/ Reperfusionsschaden und intraarterieller Zellapplikation zu verschiedenen Zeitpunkten.	57
21	Quantitatives Zellüberleben in der Milz nach renalem Ischämie-/ Reperfusionsschaden und intraarterieller Zellapplikation zu verschiedenen Zeitpunkten.	57

22	Quantitatives Zellüberleben im Herz nach renalem Ischämie-/ Reperfusionsschaden und intraarterieller Zellapplikation zu verschiedenen Zeitpunkten.	58
23	Quantitatives Zellüberleben im Hirn nach renalem Ischämie-/ Reperfusionsschaden und intraarterieller Zellapplikation zu verschiedenen Zeitpunkten.	58

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1	Modifizierte RIFLE-Klassifikation nach AKIN [82]	6
2	Einteilung der Untersuchungsgruppe I. Die Organentnahmen erfolgten zu definierten Zeitpunkten nach I/R-Schaden.	21
3	Einteilung der Untersuchungsgruppe II. Die Blutentnahmen erfolgten täglich nach I/R-Schaden.	21
4	Antigene für die Negativselektion lin ⁺ -Zellen im Knochenmark.	23
5	Antigene für die Positivselektion lin ⁻ -Zellen im Knochenmark.	23
6	Die Arbeitsschritte zur Fixierung der Organproben. Die entnommenen Präparate werden dehydriert und anschließend in Paraffin eingebettet.	31
7	Die Arbeitsschritte zur Färbung der Gewebsschnitte. Nach Rehydrierung erfolgt die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin.	31
8	Die Bestimmung der Damage Scores. Je nach histologischem Zustand der Tubuluszellen wurden 0-3 Punkte pro Gesichtsfeld vergeben.	32
9	Die Primerpaare und Sonden für die Durchführung der PCR mit Anlagerungstemperatur. Zielsequenzen sind das OPN- und das SRY-Gen	37
10	Der Ablauf eines Amplifikationszyklus mit Temperatur, Dauer und ablaufender Reaktion.	37
11	Die Inhaltsstoffe, die pro PCR-Ansatz benötigt wurden	37

9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.