

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE
PROF. DR. MED. HANS J. SCHLITT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**PROTEKTIVER EINFLUSS VON MESENCHYMALEN STAMMZELLEN IN
EINEM MAUSMODELL DER LEBERISCHÄMIE**

INAUGURAL – DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MEDIZIN

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VORGELEGT VON
MELANIE STAHL

2014

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE
PROF. DR. MED. HANS J. SCHLITT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**PROTEKTIVER EINFLUSS VON MESENCHYMALEN STAMMZELLEN IN
EINEM MAUSMODELL DER LEBERISCHÄMIE**

INAUGURAL – DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MEDIZIN

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VORGELEGT VON
MELANIE STAHL

2014

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Marc H. Dahlke, Ph.D.

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Melter

Tag der mündlichen Prüfung: 17. April 2015

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	- 1 -
1.1. Mangel an geeigneten Spenderlebern in Deutschland	- 1 -
1.2. Das Problem des Ischämie-Reperfusionsschadens	- 2 -
1.2.1. Aktueller Wissensstand zum Ischämie-Reperfusionsschaden	- 2 -
1.2.2. Therapieansätze des Ischämie-Reperfusionsschadens bei der Lebertransplantation	- 4 -
1.3. Mesenchymale Stammzellen.....	- 6 -
1.3.1. Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen	- 8 -
1.3.2. MSC in der Organtransplantation	- 10 -
1.4. Fragestellung dieser Arbeit.....	- 12 -
2. Material	- 13 -
2.1. Verbrauchsmaterialien	- 13 -
2.2. Chemikalien und Reagenzien.....	- 14 -
2.3. Lösungen für die Serum ALT Bestimmung.....	- 15 -
2.4. Lösungen für den Tunel Assay	- 15 -
2.5. Mäuseanästhetikum	- 16 -
2.6. Antikörper.....	- 17 -
2.7. Instrumente und sonstige Materialien	- 17 -
2.8. Geräte	- 17 -
2.9. Programme	- 18 -
3. Methoden	- 19 -
3.1. Tiere und Tierhaltung	- 19 -

3.2. Anästhesie und Narkotika.....	- 19 -
3.3. IRI Operation.....	- 19 -
3.4. Tiermodell und Gruppendesign.....	- 21 -
3.4.1. Die Kontrollgruppe	- 21 -
3.4.2. Die Sham-Gruppe	- 22 -
3.4.3. Die IRI Gruppe	- 22 -
3.4.4. Die IRI + MSC _{allo} Gruppe.....	- 22 -
3.4.5. Die IRI + MSC _{syn} Gruppe.....	- 22 -
3.4.6. Zeitlicher Ablauf der Versuchsreihen.....	- 23 -
3.5. Gewinnung und Kultur von mesenchymalen Stammzellen	- 23 -
3.6. Zelltransplantation.....	- 24 -
3.7. Gewinnung von Serumproben.....	- 25 -
3.7.1. Blutentnahme.....	- 25 -
3.7.2. Aufbereitung des Bluts und Lagerung der Serumproben	- 25 -
3.8. Alanin-Aminotransferase Bestimmung im Serum.....	- 25 -
3.8.1. Prinzip der ALT Bestimmung durch einen optisch-enzymatischen Test.....	- 25 -
3.8.2. Versuchsablauf der ALT Bestimmung	- 26 -
3.9. Gewinnung von Gewebeproben	- 26 -
3.10. Analyse histologischer Proben	- 27 -
3.10.1. Herstellung von Kryoschnitten	- 27 -
3.10.2. Hämatoxylin-Eosin Färbung.....	- 27 -
3.10.3. Immunhistologische Färbungen	- 27 -
3.10.4. Nachweis apoptotischer Zellen - Tunel Assay.....	- 29 -
3.11. Lichtmikroskopische Auswertung.....	- 31 -
4. Ergebnisse	- 32 -
4.1. Warme Ischämie induziert einen Leberschaden	- 32 -

4.2. Immunzellen sind bei frühem IRI beteiligt	- 36 -
4.3. MSC reduzieren den IRI Schaden.....	- 37 -
4.3.1. Quantitativer Vergleich des IRI Schadens mittels ALT-Bestimmung im Serum	- 38 -
4.3.2. Histologischer Vergleich des IRI Schadens mittels Hämatoxylin-Eosin Färbung	- 39 -
4.4. Einfluss von MSC auf Immunzellen.....	- 40 -
4.4.1. Einfluss auf CD4 positive Zellen	- 40 -
4.4.2. Einfluss auf GR1 positive Zellen	- 42 -
4.5. MSC _{syn} und MSC _{allo} beeinflussen Adhäsionsmarker	- 44 -
5. Diskussion	- 46 -
5.1. Beurteilung des verwendeten IRI Schädigungsmodell	- 46 -
5.2. MSC reduzieren die IRI Schädigung	- 47 -
5.3. MSC reduzieren Einwanderung von Immunzellen	- 48 -
5.4. MSC reduzieren Expression von ICAM 1	- 49 -
5.5. Fazit.....	- 50 -
5.6. Ausblick.....	- 51 -
6. Zusammenfassung.....	- 52 -
7. Literaturverzeichnis.....	- 54 -
8. Danksagung.....	- 59 -
9. Erklärung.....	- 60 -

Abkürzungen

27 G	Kanüle mit einem Durchmesser von „27 Gauge“
A.	Arterie
Abb.	Abbildung
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosin Triphosphat
Balb/c	Maus: Balb/c AnNCrI
BSA	„Bovine Serum Albumin“
C57BL/6J	Maus: C57BL/6J
CD	„cluster of differentiation“
Corp.	„Corporation“
ctr.	„control“
DAMPs	„danger-associated molecular patterns“
Dapi	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Desoxyribonukleinsäure („deoxyribonucleic acid“)
DNase	„Bovine Serum Albumin“
DZ	Dendritische Zellen
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fetales Kälberserum („Fetal Calf Serum“)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde - „Society for Laboratory Animal Science“
HBSS	„Hank's Balanced Salt Solution“
HLA	„human leukocyte antigen“
HMGB1	„high mobility group protein 1“
i.v.	intravenös
ICAM	„Intercellular Adhesion Molecule“
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Inc.	„Incorporation“
INF	Interferon
IRI	Ischämie-Reperfusionsschaden („ischämia reperfusion injury“)

Abkürzungen

IU	Internationale Einheiten („international units“)
Lig.	Ligamentum
M	Mol
MEM	„Minimum Essential Medium Eagle“
MHC	„Major Histocompatibility Complex“
MiSOT	“Mesenchymal Stem Cells in Solid Organ Transplantation”
MSC/MSCs	mesenchymale Stammzelle/n („mesenchymal stem cell/s“)
MSC _{allo}	allogene mesenchymale Stammzellen
MSC _{syn}	syngene mesenchymale Stammzellen
NAC	N-Acetylcystein
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBS	„Phosphate-Buffered Saline“
PE	Phycoerythrin
RNA	Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies („reaktive oxygen species“)
rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
Tab.	Tabelle
Th-Zellen	T-Helferzellen
TLR	Toll like Rezeptoren
TNF	Tumornekrosefaktor
T-reg	regulatorische T-Zellen
V.	Vene

1. Einleitung

1.1. Mangel an geeigneten Spenderlebern in Deutschland

Im Jahr 2011 standen 2119 Menschen in Deutschland auf der Warteliste von Eurotransplant, die auf eine Spenderleber warteten. 459 von diesen Menschen überlebten die Wartezeit für eine neue Leber nicht und der Zustand von 92 weiteren Menschen verschlechterte sich so stark, dass sie zu schwach für eine Transplantation waren. Nur 1199 Menschen und damit rund 57 % konnten in diesem Jahr Leber transplantiert werden.²

In Deutschland besteht ein gravierendes Missverhältnis zwischen Empfängern auf der Warteliste und geeigneten Spenderlebern. Dennoch ist die Lebertransplantation für Menschen mit terminalem Leberversagen mit über 85 % 1-Jahres und 70 % 5-Jahres Überleben³ die einzige wirklich erfolgversprechende Therapieoption. Bisher gibt es keine geeignete Organersatztherapie für die Leber, wie etwa die Dialyse für Menschen mit terminalem Nierenversagen.⁴ Um eine größere Anzahl an Menschen erfolgreich transplantieren zu können, wurden neue Operationstechniken entwickelt, wie unter anderem die Durchführung von Leberlebendspenden oder die Transplantation von sogenannten Split-Lebern.⁵ Hierbei wird beispielsweise der rechte Leberlappen einer Spenderleber einem Erwachsenen transplantiert und der kleinere linke Lappen verbleibt für ein Kind.⁶

Ein anderer Ansatz, um die Sterblichkeit auf der Warteliste zu verringern, ist der Einsatz sogenannter „marginaler Organe“. Dies sind Organe, von denen man annimmt, dass sie aufgrund bestimmter Kriterien des Organspenders zu einer beeinträchtigten Transplantatfunktion oder zu geringerem Empfänger- oder Transplantatüberleben führen.⁷ Eine einheitliche Definition dieser Spenderkriterien, auch erweiterte Spenderkriterien genannt, fehlt. Die deutsche Bundesärztekammer zählte dazu im Jahr 2012 Organe eines Spenders, für den mindestens eines der folgenden Merkmale zutrifft: ein Alter über 65 Jahre, eine Intensivtherapie einschließlich Beatmung länger als 7 Tage, ein Body Mass Index über 30 kg/m², eine histologisch gesicherte Steatosis hepatis, ein Serum AST oder Serum ALT Wert über dem Dreifachen der Norm, ein Serumbilirubin über 3 mg/dl oder ein Serumnatrium über 165 mmol/l.⁸ Transplantiert man Organe nach diesen Kriterien, sinkt die

Wartelistenmortalität aufgrund der größeren Organanzahl zwar, allerdings steigt auch das potentielle Risiko der Mortalität des Empfängers oder eines Transplantatversagens.⁸ Der Langzeiterfolg einer Lebertransplantation hängt unter anderem von zwei wichtigen Faktoren ab: zum einen von einer möglichen Abstoßungsreaktion und zum anderen von der Funktion des vor allem durch Ischämie-Reperfusionsschaden (kurz IRI Schaden oder IRI) geschädigten Spenderorgans. Dieser IRI Schaden entsteht während der Organentnahme, Konservierung des Spenderorgans, Organtransplantation und anschließenden Reperfusion und wird als eine Hauptursache für die akute Abstoßungsreaktion oder die fehlende Funktionsaufnahme des Spenderorgans angesehen.⁹ Der genaue Schädigungsmechanismus des Ischämie-Reperfusionsschadens ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die vorher beschriebenen marginalen Organe in besonderem Maße diesbezüglich empfindlich sind.^{9,10}

1.2. Das Problem des Ischämie-Reperfusionsschadens

Der Ischämie-Reperfusionsschaden ist ein vielfältiges Problem. Immer wenn die Blutzufuhr eines Organs oder eines Gewebes für einen begrenzten Zeitraum unterbrochen und anschließend wiederhergestellt wird, kann diese Pathologie festgestellt werden. Beispiele hierfür sind Traumata, Herz-Kreislauf Stillstände, Schlaganfälle und Herzinfarkte. Aber auch bei großen Eingriffen in der Herzthorax-, Gefäß- und Viszeralchirurgie und vor allem auf dem Gebiet der Organtransplantationen mit einer unvermeidbaren Ischämiephase des Spenderorgans stellt der Ischämie-Reperfusionsschaden eine große Herausforderung dar.¹¹

1.2.1. Aktueller Wissensstand zum Ischämie-Reperfusionsschaden

Der Ischämie-Reperfusionsschaden ist ein Prozess mit zwei ineinander übergreifenden Phasen, dem Organschaden durch die Ischämie und dem darauf folgenden Reperfusionsschaden, der durch Entzündungsreaktionen des Immunsystems ausgelöst wird.⁹ Man unterscheidet zwei Formen des Ischämie-Reperfusionsschadens, den sogenannten „warmen“ IRI Schaden und den „kalten“ IRI Schaden. Der „warme“ entsteht *in situ* vor allem an Hepatozyten während der Organentnahme und darauffolgenden Organtransplantationsoperation, durch Schockzustände oder Traumen des Spenders. Der „kalte“ wird *ex vivo* durch einen Mikrozirkulationsstopp während der Konservierung des

Organs in einer Eisbox verursacht. Hierbei entsteht vor allem ein Epithelschaden an den Sinusoiden.⁹

Während der Ischämie kommt es durch Glycogenverbrauch, Sauerstoffmangel und ATP Depletion zu einem metabolischen Stress der Zellen. Dieser verursacht ein Absterben der Zellen durch Apoptose, Nekrose und Autophagozytose (Abb. 1).¹¹

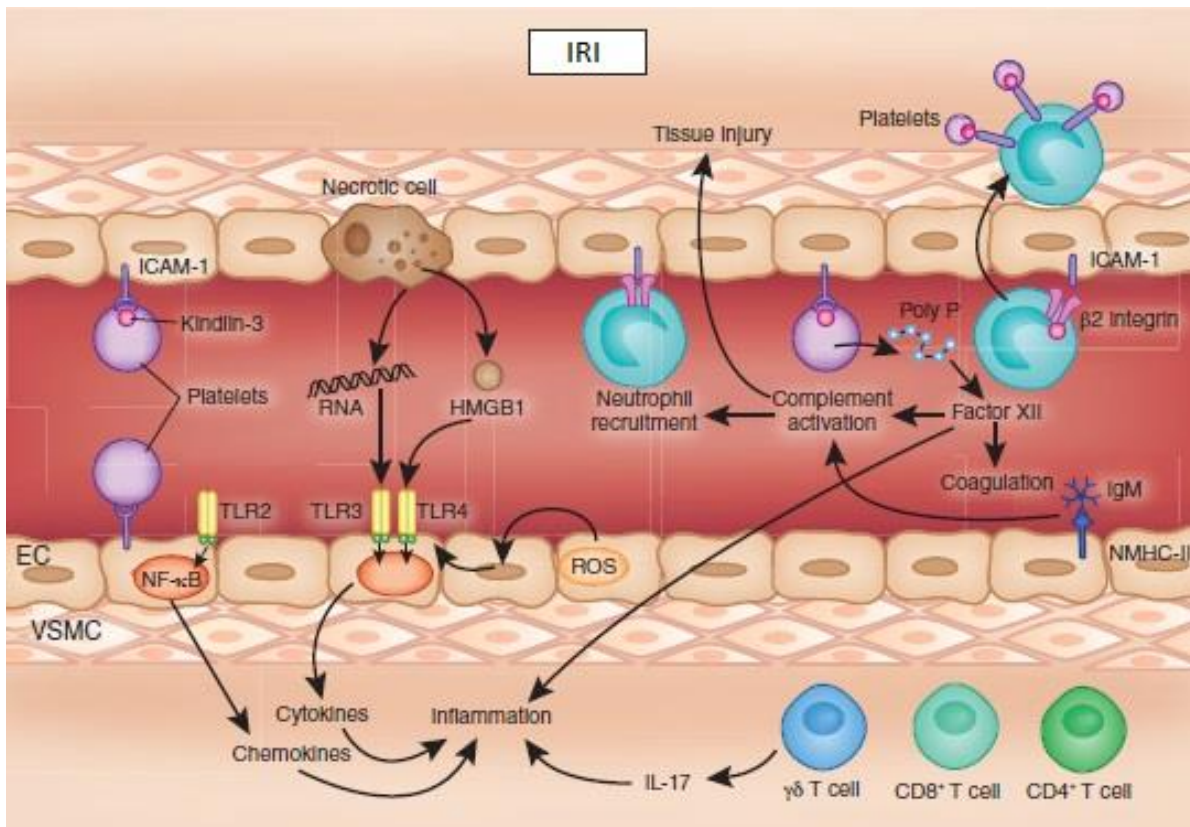


Abb. 1.: Schematische Darstellung des Mechanismus des Ischämie-Reperfusionsschadens im Überblick; Grafik aus *nature medicine* abgewandelt nach Eltzschig et al. 2011¹¹

Durch die abgetöteten Zellen werden unter anderem neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen und Kupferzellen aktiviert. Vermittelt wird diese Aktivierung durch Komplementaktivierung, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und sogenannte „danger-associated molecular patterns“ (DAMPs).^{5,7} DAMPs sind endogene intrazelluläre (z.B. DNA, RNA, „high mobility group protein 1“, HMGB1) und extrazelluläre (z.B. ATP) Moleküle, die in Umgebung von abgetöteten Zellen freigesetzt werden und die Eigenschaft besitzen, Zellen des angeborenen Immunsystems auch in Abwesenheit von Mikroorganismen über sogenannte Toll like Rezeptoren (TLR), insbesondere TLR 2, 3, 4 und 9, zu aktivieren.^{9,12}

Somit wird eine Immunkaskade in Gang gesetzt, Proteasen, Zytokine und Chemokine werden ausgeschüttet und Adhäsionsmoleküle wie z.B. ICAM 1 hochreguliert.⁹ Dadurch wird auch das erworbene Immunsystem getriggert.⁹ Sowohl CD4⁺ -, CD8⁺- als auch $\gamma\delta$ - T-Zellen sind am IRI Schaden beteiligt. Allerdings bleibt bisher ungeklärt, wie genau diese Zellen in der vorherrschenden sterilen Umgebung aktiviert werden.^{11,13} Zusammenfassend kommt es durch positive Feed back Loops zu immer stärkeren Immunaktivierung und dadurch zu neuem Absterben der Zellen und Endothelschäden.

Auch wenn die Pathophysiologie des Ischämie-Reperfusionsschadens noch nicht vollständig geklärt ist, ist dessen Einfluss auf den Erfolg oder Misserfolg einer Lebertransplantation anzunehmen. Als nicht allogener Faktor beeinflusst der IRI Schaden maßgeblich die Funktion des transplantierten Organs und eine mögliche sofortige Abstoßungsreaktion. Das wiederum führt zu erhöhter Empfängermortalität und Retransplantationen, was gerade bei dem derzeit vorherrschenden Organmangel ein gravierendes Problem darstellt.¹⁴ Es ist auch bekannt, dass der IRI Schaden langfristig mitverantwortlich für chronische Transplantatdysfunktion ist.^{14,15} Aus diesem Grund wird intensiv nach therapeutischen Ansätzen gesucht, um den IRI Schaden und den daraus resultierenden Komplikationen entgegenwirken zu können.

1.2.2. Therapieansätze des Ischämie-Reperfusionsschadens bei der Lebertransplantation

Bisher gibt es erst einige wenige klinische Studien mit Therapieansätzen zur Verringerung des IRI Schadens bei Lebertransplantationen, die im Folgenden kurz vorgestellt werden (Tab. 1).⁹ Ein solcher Therapieansatz ist der Versuch die Perfusion zu verbessern und dadurch der Ischämie vorzubeugen. Dies wurde 1999 von Klein et al. durch systemische Bolusgabe von Epoprostenol, einem Prostaglandin, versucht und dadurch konnten auch der Serum AST und ALT Anstieg nach der Lebertransplantation verringert werden.¹⁶ Ein anderer Ansatz ist, die Hepatozyten durch Gabe von Antioxidantien vor Sauerstoffradikalen zu schützen. Hierzu gibt es bisher zwei klinische Studien (Khan et al. 2005 und Hilmi et al. 2010), die jeweils N-Acetylcystein als Antioxidantien eingesetzt haben.^{17,18} Allerdings konnte bei beiden keine Verbesserung des IRI Schadens nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden in einer Studie von Basklin-Bey et al. 2007 die Apoptose und der Leberzellschaden durch Hemmung der pan-caspase mit dem pan-caspase Inhibitor IDN-66556 verringert¹⁹ und auch die Unterdrückung der endogenen NO Produktion durch NO Inhalation während der

Lebertransplantation zeigte positive Effekte gegen den IRI Schaden (Lang et al. 2007).²⁰ Busuttil et al. 2007 verfolgten einen anderen Therapieansatz. Sie konnten zeigen, dass sich die Blockade der Leukozytenadhäsionskaskade durch Gabe von Selektin-Antagonist rPSGL-Ig positiv auf den IRI Schaden auswirkt.²¹ Aber auch der Versuch, die Immunantwort zu unterdrücken, ist aufgrund der bekannten Pathophysiologie des IRI Schadens naheliegend. Bisher gibt es drei klinische Studien mit diesem Ansatz. Dazu wurde zum einen die Gabe von Thymoglobulin (Bogetti et al. 2005)²² eingesetzt und zum anderen der Spender mit Methylprednisolon (Kotsch et al. 2008)²³ vorbehandelt. Beide Studien konnten unter anderem einen verringerten Serum AST Anstieg verzeichnen. Der Versuch von Kristo et al. 2011 die Immunantwort durch Perfusion des Spenderorgans mit Tacrolimus zu unterdrücken, konnte aber neben einer verringerten Immunantwort keinen positiven Effekt auf frühe Abstoßungsreaktionen nachweisen.²⁴

Tab. 1: Übersicht über aktuelle randomisierter klinischer Studien zum IRI Schaden; Tabelle verändert nach Zhai et al. 2012⁹

Studie	Pharmakologische Intervention	Mechanismus	Patienten (Placebo/ Behandlung)	Ergebnisse der behandelten Gruppe (postoperativ) im Vergleich zu Placebogruppe
Klein et al. (1999) ¹⁶	Gabe von Epoprostenol (i.v. plus von 500 µg) vor dem Abklemmen	Verbesserung der sinusoidalen Perfusion	53/53	↓ AST ↓ ALT
Bogetti et al. (2005) ²²	Gabe von Thymoglobulin (1,5 mg/kg) während der antihepatischen Phase und nochmals 2 Dosen postoperativ	Unterdrückung der Immunantwort	11/11	↓ AST ↓ Bilirubin
Khan et al. (2005) ¹⁷	Gabe von NAC i.v. und Perfusion der Spenderleber mit NAC	Protektion der Hepatozyten mit Antioxidantien	9/9	Kein positiver Effekt auf die Leber oder akute Abstoßungsreaktion
Basklin-Bey et al. (2007) ¹⁹	Zugabe von IDN-6556 in die Organkonservierungslösung und Behandlung des Empfängers	Hemmung der Pan-Caspase (Apoptose)	23/26	↓ Apoptose ↓ Leberschaden
Lang et al. (2007) ²⁰	Inhalation von NO (80 ppm) während der Lebertransplantation	Herabregulierung der endogenen NO Produktion	10/10	↓AST ↓Apoptose ↑Leberfunktion
Kotsch et al. (2008) ²³	Behandlung des Spenders mit Methylprednisolon i.v.	Unterdrückung der Immunantwort	50/50	↓AST ↓Zytokine im Serum ↓akute Abstoßung
Hilmi et al. (2010) ¹⁸	Verabreichung von NAC (12 Dosen) dem Empfänger	Protektion der Hepatozyten mit Antioxidantien	50/50	Kein positiver Effekt auf die Leber oder akute Abstoßungsreaktion
Kristo et al. (2011) ²⁴	Intraportale Perfusion des Spenderorgans mit Tacrolimus	Unterdrückung der Immunantwort	13/13	Kein positiver Effekt auf die akute Abstoßungsreaktion ↓Immunantwort
Busuttil et al. (2011) ²¹	Behandlung des Spenderorgans und des Empfängers mit rPSGL-Ig	Blockade der Leukozytenadhäsionskaskade	24/23	↓AST

Es gibt also verschiedene Versuche das Problem des IRI Schadens zu lösen, allerdings gelang mit den bisherigen Studien noch kein Durchbruch. Auf vielen anderen Gebieten heutiger Forschung gibt die Therapie mit adulten Stammzellen einen Anlass zu hoffen. Adulte Stammzellen können aus vielen menschlichen Geweben und Organen isoliert werden. Somit ist deren Einsatz im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen mit weit weniger ethischen Bedenken verbunden.²⁵ Beispielsweise hat der Einsatz hämatopoetischer Stammzellen in der Therapie maligner Erkrankungen wie Leukämien bereits einen großen Stellenwert.²⁵ In letzter Zeit erregte allerdings eine andere Art von adulten Stammzellen große Aufmerksamkeit, die mesenchymalen Stammzellen (MSCs). Obwohl die Entdeckung dieser Zellen schon über 30 Jahre zurückliegt,²⁶ wurde erst in den letzten Jahren bekannt, welchen Einfluss MSC auf das Immunsystem haben können.²⁷

1.3. Mesenchymale Stammzellen

Erstmals beschrieben wurden Mesenchymale Stammzellen (MSCs) von Friedenstein et al. in den 60er und 70er Jahren als Gruppe multipotenter, nicht hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark, die Plastik adhärent und Fibroblasten ähnlich sind und sogenannte „colony-forming units fibroblastic“ bilden. Außerdem sind sie in der Lage, sich unter bestimmten Bedingungen in mesodermale Gewebe wie Knochen, Knorpel, Muskel, Bindegewebe und Fettgewebe zu differenzieren (Abb. 2).^{26,28,29}

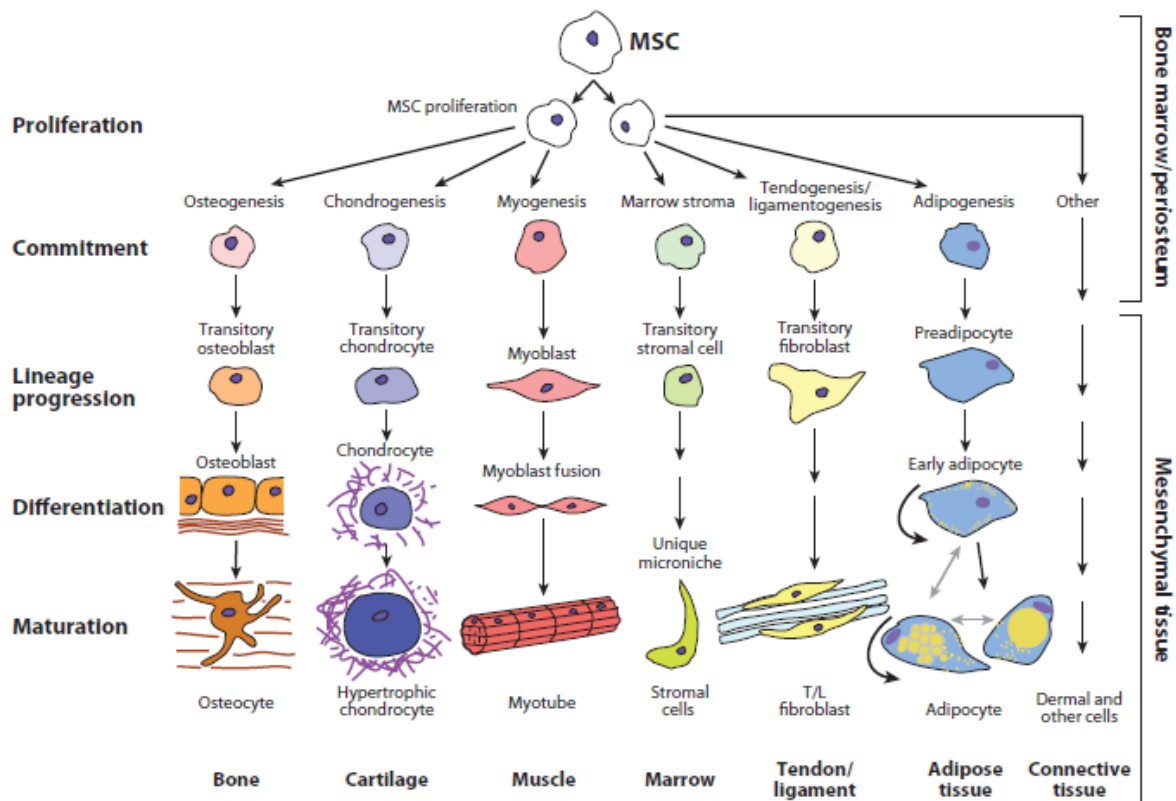


Abb. 2: MSCs können sich unter bestimmten Bedingungen in verschiedene Gewebe differenzieren; Grafik aus *The Journal of Pathologie* nach Caplan et al. 2009³⁰ und Singer et al. 2011³⁰

Heute ist bekannt, dass MSCs, auch mesenchymale Stroma Zellen genannt, nicht nur im Knochenmark zu finden sind, sondern in einer Vielzahl von anderen Geweben, wie beispielsweise im Fett-, Leber-, Muskel-, Plazentagewebe und im Nabelschnurblut.³¹⁻³⁵ Am besten charakterisiert sind bisher allerdings MSC, die aus dem Knochenmark isoliert wurden.³⁶ In *in vivo* und *in vitro* Studien konnte nachgewiesen werden, dass sich MSCs neben mesodermalem Gewebe auch in ektodermalem (z.B. Nerven³⁷, Haut³⁸) und endodermalem Gewebe (z.B. Leber^{37,39}) differenzieren können. Bisher gibt es noch keine MSC spezifische Oberflächenmarker.¹ Deshalb formulierte erstmals die internationale Vereinigung für Zelltherapie („International Society for Cellular Therapy“) eine einheitliche Definition für MSC: MSC sind eine heterogene, Fibroblasten ähnliche, Plastik adhärenente Population, die in Kultur Kolonien bilden. Außerdem zeichnen sie sich phänotypisch durch die Expression von CD44, CD49b, CD90, CD73, CD105, MHC Klasse I und das Fehlen der Oberflächenmoleküle CD45, CD34, CD14, CD11b, CD19 oder CD79α und HLA-DR. Funktionell

sollten sie dazu in der Lage sein, sich zu Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten zu differenzieren.^{40,41}

1.3.1. Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen

MSC tragen einerseits durch proangiogenetische und antifibrotischen Eigenschaften und Ausschüttung von Wachstumshormonen zur Reparatur von Geweben bei.³⁰ Andererseits wirken sie immunsuppressiv und immunmodulierend (Abb. 3).^{42,43} Sie können ihre Umgebung wahrnehmen und darauf reagieren.^{44,45} Durch proinflammatorische Zytokine (z.B. INF- γ , TNF- α) aktivierte MSC^{27,46} können die T-Zell Proliferation und Aktivierung unterdrücken.^{47,48} In Anwesenheit von MSC verändert sich auch die Zusammensetzung der CD4⁺ - T-Zell Unterklassen.⁴⁹ So nimmt die Anzahl von Th1 und sogenannter regulatoriver T-Zellen (T-reg) zu, die Immuntoleranz vermitteln.⁵⁰ Gleichzeitig nimmt die Anzahl Th2 und Th17 T-Zellen ab.⁴⁹ Außerdem wird die Proliferation von CD8⁺ - T-Zellen⁵¹ und $\gamma\delta$ - T-Zellen⁵² gehemmt. Neben T-Zellen können MSC auch mit B-Zellen interagieren, sie unterdrücken die B-Zell Proliferation, Differenzierung und die Sekretion von IgM und IgG₁.⁵³ Bei der Aktivierung von T-Zellen und B-Zellen spielen Dendritische Zellen (DZ) mittels Antigenpräsentation eine wichtige Rolle. MSC inhibieren die Reifung und Differenzierung von DZ aus Monozyten.^{54,36} In der Anwesenheit von MSC verändert sich auch der Phänotyp der DZ, sie werden zu sogenannten regulatorischen DZ.⁵⁵ Regulatorische DZ zeichnen sich durch ein verändertes Zytokinprofil aus, sie schütten weniger proinflammatorische Zytokine und gleichzeitig mehr antiinflammatorische Zytokine wie z.B. IL-10 aus.⁵⁵ Auch ihre Oberflächenmerkmale verändern sich mit einer verminderten Expression von kostimulatorischen Molekülen wie CD80, CD86 und CD40.⁵⁵ MSC können auch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) beeinflussen.⁵⁶ NK-Zellen schütten bei Aktivierung INF- γ und TNF- α aus und haben somit ein starkes zytolytisches Potential.^{36,57} MSC wiederum können die Aktivierung und Proliferation dieser Zellen hemmen und somit die Produktion von der proinflammatorischen Zytokine INF- γ und TNF- α verringern.⁵⁶ Außerdem haben MSC auch indirekt Einfluss auf die Migration von Neutrophilen. Die Anwesenheit von MSC verändert die Zytokinfreisetzung von Gewebsmakrophagen, diese schütten vermehrt IL-10 aus, was die Infiltration durch Neutrophile limitiert.⁵⁸ Somit wirken MSC auf vielfältige Weise modulierend und supprimierend auf das angeborene und erworbene Immunsystem ein, was therapeutischen Nutzen verspricht.

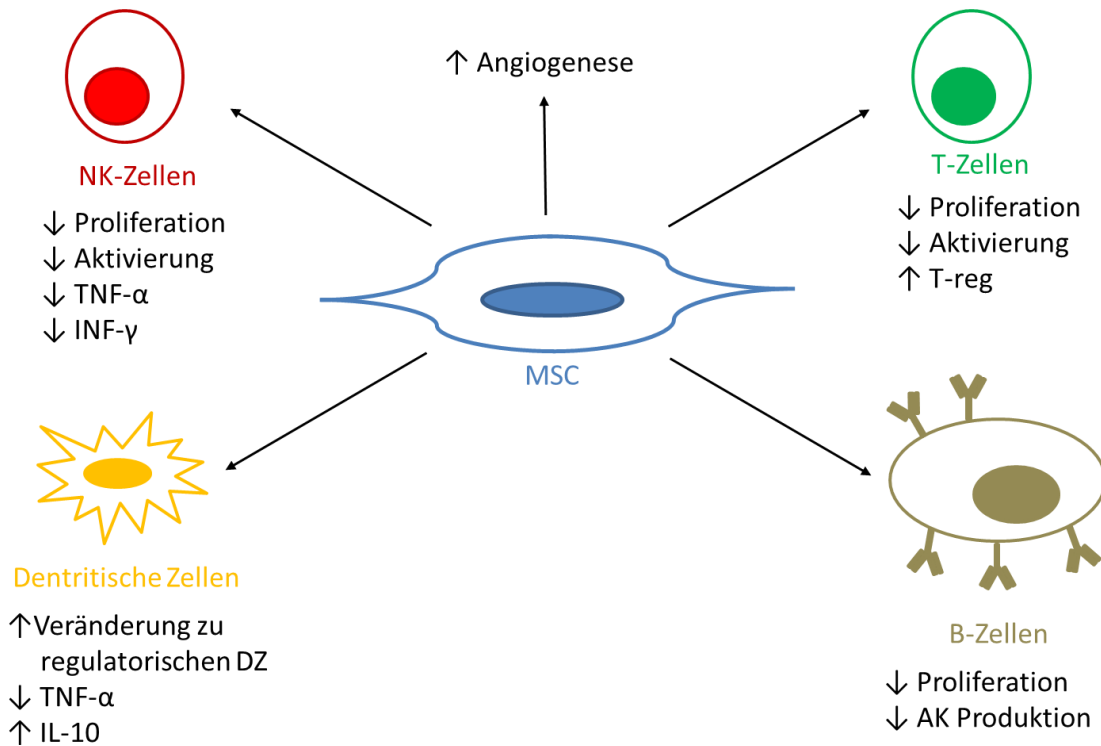


Abb. 3: MSC beeinflussen Zellen des Immunsystems

In klinischen Studien zur „Graf versus host disease“, Multiplen Sklerose, Osteogenitis imperfecta, Morbus Parkinson, Morbus Crohn und vielen anderen Erkrankungen konnten bereits sehr positive Ergebnisse erzielt werden.³⁰ Auch wenn es im europäischen Raum noch keine zugelassenen Produkte auf Basis mesenchymaler Stammzellen gibt, findet man seit 2011 in Süd Korea mit *Cartistem*[®] und *HeartiCellgram*[®] zwei zugelassene Produkte auf MSC Basis und seit 2012 gibt es auch in Kanada mit *Prochymal*[®] (Osiris Therapeutics Inc.) das erste marktreife MSC Produkt.⁵⁹ Es ist damit vielleicht bloß noch eine Frage der Zeit, bis auch in Deutschland das erste auf MSC basierende Medikament zugelassen wird.

1.3.2. MSC in der Organtransplantation

Aufgrund ihrer immunmodulierenden und regenerativen Eigenschaften erscheint der Einsatz von MSC als neuartige Zelltherapie im Rahmen von Organtransplantationen vielversprechend. Gerade im Hinblick auf Abstoßungsreaktionen, die Problematik des Ischämie-Reperfusionsschaden und die schwerwiegenden Langzeitfolgen einer unspezifischen, pharmakologischen Immunsuppression,¹ wie Neuro- und Nephrotoxizität^{58,59} oder erhöhtes Risiko für Neoplasien und opportunistischer Infektionen⁶⁰⁻⁶² erhofft man sich neue therapeutische Optionen (Abb. 4).

In präklinischen Studien, am Beispiel von Haut- und Herztransplantationen, konnte gezeigt werden, dass durch intravenöse Injektion von MSC das Transplantatüberleben verlängert werden kann.^{42,63,64} Auch ein synergetischer Effekt zwischen MSC und immunsupprimierenden Medikamenten konnte festgestellt werden, vor allem zwischen MSC und Mycophenolat-Mofetil.⁶⁵ Des Weiteren wurde in einigen weiteren präklinischen Studien der regenerative Effekt der MSC bei Organschäden beschrieben.¹ Zudem konnte durch MSC Therapie im Tiermodell die „Graft versus host disease“ kontrolliert werden.⁶⁶ Diese und weitere positive, präklinische Ergebnisse der MSC Therapie eröffneten den Weg für den klinischen Einsatz mesenchymaler Stammzellen in der

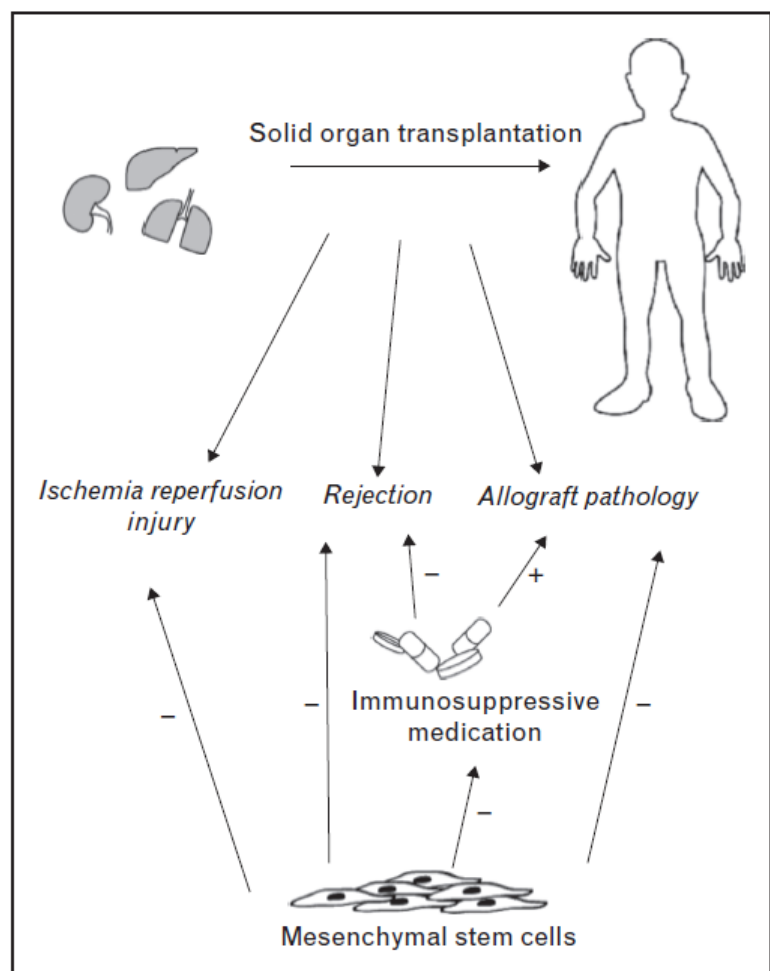


Abb. 4: Hauptprobleme der Organtransplantation und potenzieller therapeutischer Nutzen durch MSC; Grafik aus *Current opinion in Organ Transplantation* verändert nach van-Roemling et al. 2012¹

den Weg für den klinischen Einsatz mesenchymaler Stammzellen in der

Organtransplantation. Die ersten Phase I und Phase II Studien mit dem Einsatz von MSC in Organtransplantationen wurden mit positiven Ergebnissen beendet (www.clinicaltrials.gov). Beispielsweise konnte in einer Phase II Studie mit nierentransplantierten Patienten nachgewiesen werden, dass es durch die Behandlung mit autologen MSC anstelle mit IL-2 Rezeptorantikörpern zu einer geringeren Zahl an akuten Abstoßungsreaktionen gekommen ist.⁶⁷ Um den Informationsaustausch zwischen internationalen Forschungsgruppen, die sich auf dem Gebiet der Therapie mit MSC in Organtransplantationen spezialisiert haben, zu erleichtern, wurde die MiSOT („Mesenchymal Stem Cells in Solid Organ Transplantation“) Vereinigung ins Leben gerufen.⁶⁸⁻⁷⁰ Auch die Arbeitsgruppe, in welcher die vorliegende Dissertationsschrift erstellt wurde, ist Teil dieser Studiengruppe und bereitet derzeit eine Phase I Studie (MiSOT I) mit dem Einsatz von MSC bei Organtransplantationen vor. In dieser Studie soll der vielversprechende Einsatz von MSC in Kombination mit niedrig dosierten pharmazeutischen Immunsuppressiva mit dem alleinigen Einsatz von pharmazeutischen Immunsuppressiva nach Lebertransplantationen verglichen werden.⁷¹

Selbst wenn die genaue Wirkungsweise der MSC noch Klärung bedarf, erwies sich der Einsatz von MSC in Zusammenhang mit Organtransplantationen bisher als vielversprechend. Hinweise auf Nebenwirkungen durch die MSC Therapie gibt es bislang nicht.^{30,69} Aufgrund dieser Erkenntnisse und dem bereits erfolgreichen Einsatz von mesenchymalen Stammzellen gegen Transplantatabstoßung und in Kombination mit Immunsuppressiva ist es naheliegend, die Wirkung mesenchymaler Stammzellen auch im Hinblick auf den Ischämie-Reperfusionsschaden zu untersuchen. Verschiedene Tiermodelle des IRI Schadens der Niere, Herz und Lunge zeigten den Erfolg der MSC Therapie gegen „warme“ und „kalte“ Ischämie bei verschiedenen Phasen des Ischämie-Reperfusionsschadens.¹⁴ In dieser Arbeit soll der Nutzen des therapeutischen Einsatzes von mesenchymalen Stammzellen auf den Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber am Mausmodell untersucht werden.

1.4. Fragestellung dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit hat folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Ist das warme hepatische Ischämie-Reperfusionss Mausmodell zur Untersuchung eines möglichen Einflusses von mesenchymalen Stammzellen auf den Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber geeignet?
2. Haben mesenchymale Stammzellen Einfluss auf den in diesem Modell induzierten Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber?
3. Interagieren MSC im vorliegendem Modell mit Immunzellen, die am Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber beteiligt sind?
4. Können MSC die vermehrte Expression von Adhäsionsmarker, welche durch den IRI Schaden im vorliegenden Modell induziert werden, verringern?

2. Material

2.1. Verbrauchsmaterialien

Bepanthen Augen- und Nasensalbe:	Bayer, Leverkusen
Cryo-Tubes:	Corning Inc., USA
Deckgläser:	VWR International, Belgien
Einmal-Injektions-Kanülen (27 G):	Becton Dickson, USA
Einmalskalpell:	Feather, Japan
Eppendorf Cups (1,5 ml ; 2 ml) :	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen:	Sarstedt, Nümbrecht
Fettstift (Dako Pen®):	Dako, Dänemark
Fixierpflaster:	3M, Neuss
Fluorescence Mounting Medium:	Dako, Dänemark
Gentle MACS C Tubes:	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Glaskapillaren:	Sarstedt, Nümbrecht
Kompressen:	Hartmann, Heidenheim
Kryo-Einbettform:	Sakura, Japan
Mikrotiterplatten (96-well, Flachboden):	Corning Inc., USA
Nahtmaterial (6.0 Polysorb):	Tyco, USA
Objektträger:	Menzel, Saarbrücken
Pipetten (2 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml):	Greiner, Frichenhausen
Pipetten (5 ml):	Becton Dickson, USA
Spritzen (3 ml, 5 ml, 10 ml):	Sarstedt, Nümbrecht
Tissue-Tek:	Sakura, Japan
Wattestäbchen:	Hartmann, Heidenheim
Zellkulturflaschen (75 cm ² , 175 cm ²):	Corning Inc., USA
Zellsieb (100 µl):	Becton Dickson, USA
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml):	Greiner Bio-One, Frichenhausen

2.2 Chemikalien und Reagenzien

2,4-Dinitrophenylhydrazin	Sigma-Aldrich, USA
4,6-Diamidino-2phenylindoldihydrochlorid (Dapi)	Merck, Darmstadt
Aceton	Merck, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
DL-Alanin	Sigma-Aldrich, USA
DNase I	Roche, Mannheim
Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Eukitt	Sigma-Aldrich, USA
FCS	Biochrom AG, Berlin
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, USA
Glucose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Hämalaun	Merck, Darmstadt
HBSS Medium	Biochrom AG, Berlin
Hepes	Sigma-Aldrich, USA
Ketamin 10 %	WDT, Garbsen
Minimum Essential Medium Eagle (MEM)	Sigma-Aldrich, USA
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid 0,9 %	Braun, Meslungen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Gibco, USA
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Phosphate Buffered Saline Dulbecco (PBS)	Sigma-Aldrich, USA
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Tris Puffer	USB Affymetrix, USA
Triton-X100	Sigma-Aldrich, USA
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich, USA

Tryptanblau	Biochrom AG, Berlin
Xylazinhydrochlorid 2 % (Xylazyin)	Serumwerk, Bernburg
Xylol	Merck, Darmstadt
Ziegenserum	PromoCell, Heidelberg
α -Ketoglutarat	Sigma-Aldrich, USA

2.3. Lösungen für die Serum ALT Bestimmung

- Colour reagent: 20 mg / 100 mL 2, 4-dinitophenylhydrazine
1 M HCl
- Substrate: 0,2 M DL-alanine (pH 7.5)
1,8 mM α -Ketoglutaric acid (pH 7.5)
in PBS
- NaOH: 0,4 M
- Standard: 1,5 mM Sodium pyruvate (pH 7.5)
in PBS
- Aqua bidest

2.4. Lösungen für den Tunel Assay

Für den Tunel Assay wurde das gebrauchsfertige Kit "In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red" der Firma Roche Applied Science, Mannheim, verwendet.

dieses Kit enthält:

- Enzyme Solution: Terminale Deoxynucleotidtransferase
hergestellt aus Kalbsthymus (EC 2.7.7.31),
rekombinant in E.coli, in Pufferlösung
- Label Solution: Nucleotid Mix in Reaktionspuffer

2.6. Antikörper

Tab. 2: Antikörper und deren Herkunft

Antikörper	Spezies	Hersteller
Alexa Fluor 546	Ziege	invitrogen
Alexa Fluor 594	Hamster	invitrogen
CD 11b FITC	Ratte	ebioscience
CD 4 APC	Ratte	BD biosciences
CD 54 PE (ICAM 1)	Hamster	BD biosciences
Gr1 FITC (Ly-6G und Ly-6C)	Ratte	BD biosciences

2.7. Instrumente und sonstige Materialien

Aneurysma Clip-Anlegezange (für Yasargil Clips):	Aeskulap, Tuttlingen
Aneurysma Clips (Yasargil 5,0 mm):	Aeskulap, Tuttlingen
Färbekammer:	Simport, Kanada
Nadelhalter:	Aeskulap, Tuttlingen
Neubauer-Zählkammer:	Sarstedt, Nümbrecht
Pinzette, anatomisch:	Aeskulap, Tuttlingen
Pinzette, chirurgisch:	Aeskulap, Tuttlingen
Präparierschere:	Aeskulap, Tuttlingen
Rasierer:	Moser, Berlin
Restrainer (Apparatur zur Mäusefixation):	Eigenbau
Wundspreizer:	Moria, Frankreich

2.8. Geräte

Analysewaage (LC210):	Labor Center, Nürnberg
Durchlichtlampe (Power Supply 232):	EPLAX GmbH, Bremen
Farbdigitalkamera für Mikroskop (Axio Cam ICc3):	Zeiss, Jena

Material

Fluoreszenzlampe (HXP 120C):	Kübler, Jena
Kaltlichtlampe (KL 2500 LCD):	Schott, Mainz
Mikroskop (Axio Observer Z1):	Zeiss, Jena
Mikrotom (CM 1900):	Leica, USA
OP Mikroskop:	Zeiss, Jena
Photometer (Emax):	Molecular Devices, USA
Pipetten (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl):	Eppendorf, Hamburg
Rüttler (Vortex-Genie 2):	Scientific Industries, USA
Schwarz-weiß Digitalkamera für Mikroskop (Axio Cam MRm):	Zeiss, Jena
Thermomixer compact:	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge (5415D):	Eppendorf, Hamburg
Wärmeplatte (Thermal Pad, 712):	Shor-line, USA
Wasserbad (SW-20C):	Julabo, Seelbach
Zentrifuge (Megafuge 1.0R):	Heraeus, Hanau

2.9. Programme

Acrobat Reader X	Adobe
Axio Vision Rel. 4.8.	Zeiss
Endnote X5	Thomson ResearchSoft.
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc.
Microsoft Exel 2007 und 2010	Microsoft Corp.
Microsoft Power Point 2007 und 2010	Microsoft Corp.
Microsoft Word 2007 und 2010	Microsoft Corp.
WSoftMax	Molecular Devises

3. Methoden

3.1. Tiere und Tierhaltung

Für die Versuche wurden männliche Mäuse des Stammes C57bl6 (Haplotyp H2Kb MHC *wild type*, Charles River Inc. Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Zusätzlich wurden zur Gewinnung allogener mesenchymaler Stammzellen männliche Mäuse des Stammes Balb/-c eingesetzt (Haplotyp H2Kd MHC *wild type*, Charles River Inc. Sulzfeld, Deutschland). Alle Tiere wurden unter Standardbedingungen im Tierhaus der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg artgerecht gehalten, gemäß den Empfehlungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS).⁷² Sie hatten zu jedem Zeitpunkt freien Zugang zu Wasser und Futter. Zu Versuchsbeginn wogen die Mäuse zwischen 20 g und 24 g und waren zwischen 8-12 Wochen alt.

3.2. Anästhesie und Narkotika

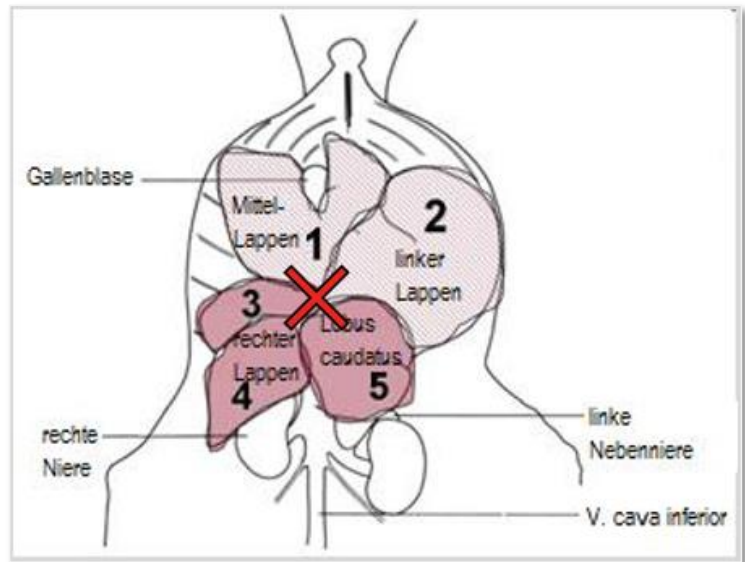
Um für die Durchführung operativer Eingriffe Schmerzfreiheit und Relaxation zu erreichen, wurde den Mäusen 15 min vor Operationsbeginn intraperitoneal mittels einer 27 Gauge Nadel 0,07 ml einer Ketamin/Xylazin Mischung (siehe Abschnitt 2.5.) in den rechten oder linken unteren Quadranten gespritzt. Eine ausreichende Narkosetiefe wurde durch fehlende Bewegungen, abgeflachte Atmung und ausbleibende Reaktion auf einen Schmerzreiz festgestellt.

3.3. IRI Operation

Zur Erzeugung eines Ischämie-Reperfusionsschadens der Leber wurde das von Abe et al. 2009⁷³ erstmals vorgestellte Maus Operationsmodell angewandt, das im Folgenden beschrieben wird. Hierbei wurde durch Abklemmen der A. hepatica und der Pfortader zwischen den Leberlappen eine 45 minütige warme, partielle Ischämie von 70 % der Mausleber erzeugt (Abb. 5).

Sobald durch die Ketamin/Xylazin Mischung ausreichende Anästhesie erreicht wurde, werden die Augen der Mäuse durch Auftragen einer Augensalbe vor Austrocknung

geschützt, das Abdomen rasiert und die Maus auf einer Wärmeplatte an Armen und Beinen mit Pflasterstreifen fixiert. Anschließend wird das Abdomen mit 70 % Alkohol desinfiziert und nach erneuter Überprüfung der Narkosetiefe mittels Längslaparotomie eröffnet (Abb. 6, 1) und mit Hilfe eines



Wundspreizers offen gehalten (Abb. 6, 2). Unter dem Operationsmikroskop werden mit Hilfe physiologischer Natriumchlorid Lösung befeuchteter Wattestäbchens die

einzelnen Leberlappen dargestellt und sowohl Mittellappen als auch linker Lappen nach oben geklappt. Dabei stellt sich die V. portae, die A. hepatica und der Gallengang dar (Abb. 6, 3). Mittels eines atraumatischen Aneurysma Klipps wird das Gefäßbündel an dieser Stelle für 45 min abgeklemmt und somit eine warme Ischämie erzeugt (Abb. 6, 4). Dadurch werden Mittellappen und linker Lappen ischäm, was man deutlich makroskopisch durch Entfärben dieser Leberlappen erkennen kann. Die restlichen Leberlappen bleiben unverändert. Das Abklemmen der Gefäße an der beschriebenen Stelle verursacht ca. 70 % partielle Leberischämie.⁷³ Während dieser Zeit wird die Maus durch eine Wärmeplatte vor dem Auskühlen und durch eine befeuchtete Kompresse vor dem Austrocknen geschützt. Der Klipp wird nach 45 min entfernt und die Bauchdecke durch eine Faszien- und eine Hautnaht verschlossen.

Abb. 5: Schematische Darstellung der IRI OP: Abklemmen der Portalvene und der A. hepatica induziert Ischämie des linken Leberlappens und Mittellappens (1-2: rosa Areale), übrige Leberlappen werden nicht ischäm (3-5: pinke Areale), rotes Kreuz kennzeichnet die Lokalisation des gesetzten Klipps

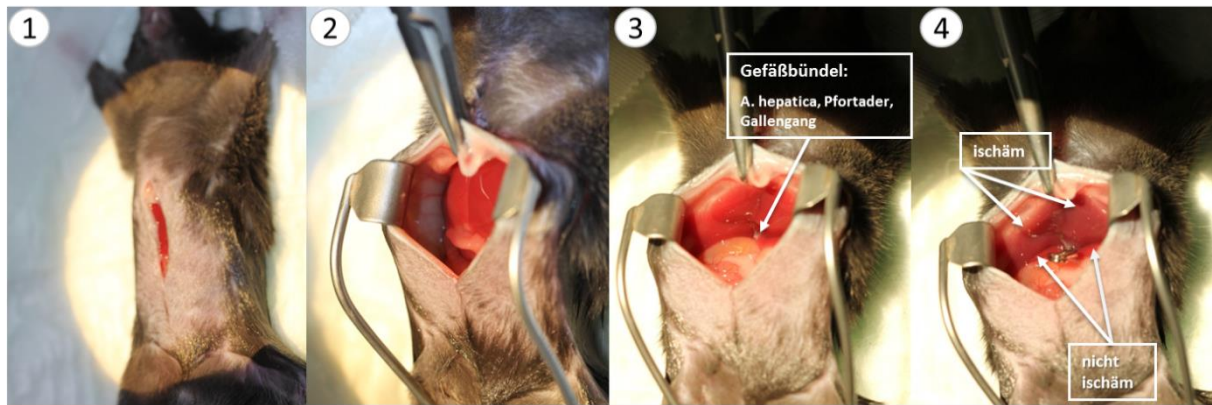


Abb. 6 : IRI Operation

1. Längslaparotomie, 2. Eröffnetes Abdomen, 3. Sicht auf das Lig. hepatoduodenale (Gefäßbündel aus A. hepatica, Pfortader, Gallengang), 4. Leber nach Abklemmen des Gefäßbündels mit ischäm linken und Mittellappen, Rest der Leber nicht ischäm

3.4. Tiermodell und Gruppendesign

Um die Wirkung mesenchymaler Stammzellen auf den Ischämie-Reperfusionsschaden genauer zu untersuchen, wurden 5 verschiedene Versuchsgruppen etabliert. (Tab. 3)

Tab. 3: Versuchsgruppen und deren Behandlung

Gruppe	N	Behandlung
1	15	---
2	15	Sham OP
3	15	IRI
4	15	IRI+MSC _{allo}
5	15	IRI+MSC _{syn}

3.4.1. Die Kontrollgruppe

In der Gruppe 1 handelte es sich um Tiere, die keinerlei Behandlung erhielten und unter Standardbedingungen gehalten wurden, folgend Kontrollgruppe oder control (ctr) genannt. Sie diente dazu physiologische Serumwerte und histologische Proben zu erhalten und jeglichen, unbeabsichtigten Einfluss von außen auf die Versuchsreihen auszuschließen. Insgesamt wurden 15 Kontrollmäuse in die Versuchsreihe aufgenommen.

3.4.2. Die Sham-Gruppe

Um die möglichen Auswirkung der Narkose, der Längslaparotomie, gegebenenfalls der mechanischen Schädigung der Leber durch die Darstellung der Gefäße und des durch die Operation erzeugten Stresses auf die Tiere zu ermitteln, wurde die Gruppe 2, die Sham-Gruppe, etabliert. Tiere dieser Gruppe wurden genauso behandelt wie die IRI Gruppe, lediglich das Abklemmen des Gefäßbündels aus A. hepatica, Pfortader und Gallengänge wurde unterlassen und somit kein Ischämie-Reperfusionsschaden erzeugt.

Ansonsten erhielten die Tiere die gleiche Narkose, ihnen wurde auf gleiche Weise das Abdomen mittels Längslaparotomie eröffnet, die Gefäße von Interesse dargestellt, das eröffnete Abdomen mit befeuchteten Tüchern abgedeckt und nach 45 min wieder zugenäht, (Sham-Operation). Es wurden insgesamt 15 Tiere auf diese Weise behandelt.

3.4.3. Die IRI Gruppe

15 weitere Tiere stellten die IRI Gruppe dar (Gruppe 3). Mit diesen Tieren wurde gemäß der oben beschriebenen IRI Operation verfahren. Anhand dieser Gruppe wurde der durch die IRI Operation erzeugt Ischämie-Reperfusionsschaden ermittelt.

3.4.4. Die IRI + MSC_{allo} Gruppe

Die Gruppe 4, die IRI + MSC_{allo} Gruppe ist eine der beiden mit MSC behandelten Gruppen, im Folgenden auch Treatment Gruppen genannt. Die 15 Tiere dieser Gruppe wurden ebenfalls wie die IRI Gruppe unter gleichen Bedingungen operiert. Ihnen wurden allerdings 30 min vor Operationsbeginn $0,5 \times 10^6$ allogene mesenchymale Stammzellen intravenös in die Schwanzvene appliziert. Die allogenen MSCs stammten aus dem Knochenmark von männlichen Mäusen des Stammes Balb/-c. Anhand dieser Tiere konnte der Einfluss allogener MSCs auf den erzeugten 45-minütigen warmen Ischämie-Reperfusionsschaden erforscht werden.

3.4.5. Die IRI + MSC_{syn} Gruppe

Die zweite Treatment Gruppe wurde ebenfalls mit der IRI Operation behandelt. Ihnen wurden jedoch 30 min vor Operationsbeginn $0,5 \times 10^6$ syngene mesenchymale Stammzellen intravenös in die Schwanzvene appliziert. Diese syngenen MSCs stammten aus dem

Knochenmark männlicher Mäuse des Stammes C57bl6. Die so behandelten 15 Tiere zeigten ebenfalls den Einfluss mesenchymaler Stammzellen auf den Ischämie-Reperfusionsschaden. Außerdem konnte mit Hilfe dieser Gruppe auch der mögliche Unterschied zwischen syngenen und allogenen MSCs untersucht werden.

3.4.6. Zeitlicher Ablauf der Versuchsreihen

Um den zeitlichen Verlauf (Abb. 7) des Ischämie-Reperfusionsschadens besser nachvollziehen zu können, wurden 3 verschiedene Zeitpunkte zur Organentnahme und Gewinnung histologischer Proben gewählt: jeweils 5 Tiere jeder Gruppe wurden nach 3 h, 24 h und 72 h analysiert. Mit 3 h wurde ein Zeitraum gewählt, an dem der frühe IRI Schaden untersucht werden sollte und mit 72 h sollten die langfristigen Auswirkungen der IRI Operation geklärt werden. Serumproben wurden für alle Gruppen 0 h, 3 h, 24 h, 48 h und 72 h postoperativ gewonnen.

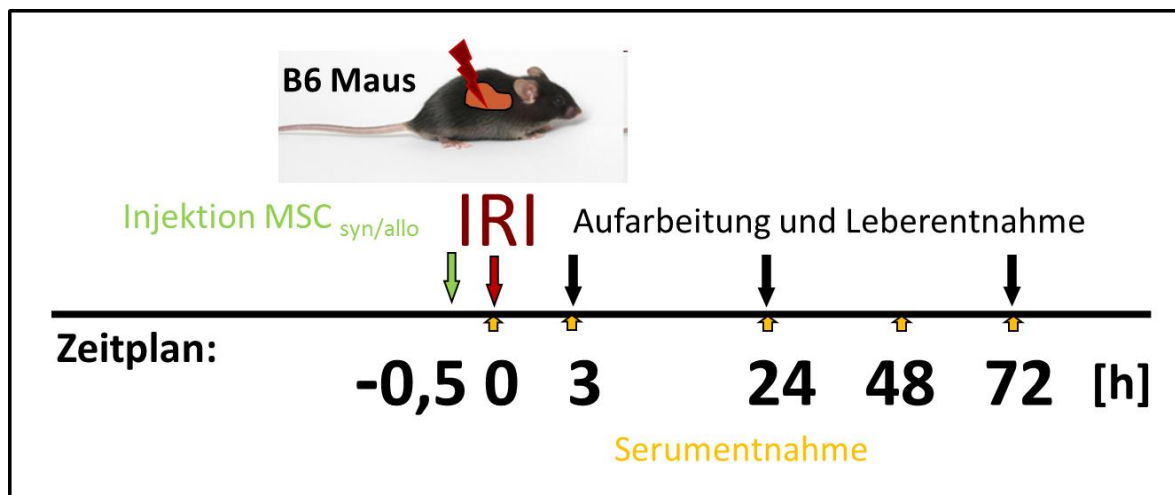


Abb. 7: zeitlicher Ablauf der Versuchsreihen:

IRI OP erfolgte zum Zeitpunkt 0 h; Serumentnahme zum Zeitpunkt 0, 3, 24, 48, 72 h; MSC Injektion der Treatment Gruppen erfolgte 30 min vor OP Beginn; Aufarbeitung der Tiere und Leberentnahme erfolgte entweder nach 3, 24 oder 72 h

3.5. Gewinnung und Kultur von mesenchymalen Stammzellen

Die im Versuch verwendeten mesenchymalen Stammzellen wurden aus dem Knochenmark von Mäusen des Stammes C57bl6 (syngene MSC) und Mäusen des Stammes Balb/-c (allogene MSC) gewonnen. Hierfür wurden die Tiere mit CO₂ und anschließender zervikaler

Dislokation getötet und anschließend Femur, Tibia und Humerus entnommen und in HBSS-Medium gelegt. Die Epiphysen dieser Knochen wurden aufgebrochen, der Markraum mit einer 5 ml-Spritze gespült und das so gewonnene Knochenmark resuspendiert und in Zellkulturflaschen die Minimum Essential Medium Eagle (mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamine) enthalten ausplattiert. Nicht plastikadhärente Zellen wurden nach 24, 48 und 72 Stunden mittels Mediumwechsel aus der Kultur entfernt. Die auf diese Art gewonnenen mesenchymalen Stammzellen wurden zwei Wochen nach Kulturbeginn mit Hilfe von 0,5 % Trypsin-EDTA abgelöst und in neuen Zellkulturflaschen mit Minimum Essential Medium Eagle mit einem Glucosegehalt von 4500 mg/l und Glutamin erneut kultiviert. Sobald die Zellkultur eine 80 %-ige Konfluenz erreicht hat, wurden sie wiederum mit 0,5 % Trypsin-EDTA abgelöst und im Verhältnis 1:3 passagiert. Es wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die für diese Arbeit verwendeten MSC aus der Routineproduktion der AG Dahlke entnommen und nicht selbst produziert wurden. Auch die Qualitätskontrollen (Differenzierung in Osteoblasten und Adipozyten sowie durchflusszytometrische Oberflächenmarkeranalyse) wurden im Rahmen der MSC Routineproduktion durchgeführt und nicht eigenständig.⁷⁴

3.6. Zelltransplantation

Für die Transplantation der mesenchymalen Stammzellen wurde ein intravenöser Injektionsweg gewählt. Für jedes Versuchstier wurden $0,5 \times 10^6$ mesenchymale Stammzellen gewonnen, in PBS resuspendiert und auf eine Konzentration von 1×10^6 MSC/ml verdünnt. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und Trypanblaufärbung wurde lichtmikroskopisch die genaue Zellzahl bestimmt. Anschließend wurde den Mäusen unter Zuhilfenahme eines Mäuse Restrainers fixiert. Dieser besteht aus einer Plexiglaskammer, in die die Maus platziert wird, und einer Aussparung für den Mäuseschwanz, so dass dieser für eine Injektion zugänglich ist. Den so fixierten Mäusen wurde jeweils $0,5 \times 10^6$ MSC Zellen langsam in die Schwanzvene mit einer 27 Gauge Nadel appliziert.

3.7. Gewinnung von Serumproben

3.7.1. Blutentnahme

Zur Gewinnung von Serumproben wurde eine retrobulbäre Blutentnahme durchgeführt, die gemäß der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) als tierschutzgerecht empfundenen wird.⁷⁵ Hierfür wird eine Kapillare von 0,3 mm Außendurchmesser in den inneren Augenwinkel der Maus eingeführt und durch leichte Drehbewegungen der retrobulbäre Venenplexus punktiert. Auf diese Weise konnte täglich circa 0,3 ml Blut entnommen werden.

3.7.2. Aufbereitung des Bluts und Lagerung der Serumproben

Die so gewonnenen Blutproben wurden anschließend für 10 min bei 6000 rpm zentrifugiert und der Serumüberstand ab pipettiert. Um noch reinere Serumproben zu erhalten, wurde der Überstand nochmals für 3 min bei 6000 rpm zentrifugiert und wiederum ab pipettiert. Das erhaltene Serum wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -20 °C aufbewahrt.

3.8. Alanin-Aminotransferase Bestimmung im Serum

Zum quantitativen Nachweis des Leberzellschadens im Serum wurde die leberspezifische Alanin-Aminotransferase herangezogen. Als Messmethode wurde ein optisch-enzymatischer Test mit folgendem Prinzip angewandt.

3.8.1. Prinzip der ALT Bestimmung durch einen optisch-enzymatischen Test

Durch die Umwandlung der Substrate L-Alanin und α -Ketoglutarat zu Pyruvat und L-Glutamat wird die Enzymaktivität der Alanin-Aminotransferase bestimmt. Um die Enzymaktivität quantitativ bestimmen zu können, wird eine Indikatorreaktion angeschlossen. Hierfür wird zu Pyruvat 2,4 Dinitrophenylhydrazon zugegeben, das im Sauren unter Abspaltung von Wasser zu 2,4 Dinitrophenylhydrazon wird. Diese Reaktion dient zum Nachweis von Carbonylgruppen. Nach 20 min wird die Reaktion durch Zugabe der Base Natriumhydroxid abgestoppt.

3.8.2. Versuchsablauf der ALT Bestimmung

Die ALT Bestimmung erfolgte nach folgendem Protokoll: Es werden 25 µl 20 %-iger Serumprobe mit 100 µl Substrat (enthält L-Alanin und α-Ketoglutarat) in ein 1,5 ml Eppendorf Cup pipettiert und für eine Stunde bei 37 °C unter leichtem Schütteln (500 rpm) in einem Heizblock inkubiert. Anschließend werden 100 µl des Colour Reagent (enthält 2,4 Dinitrophenylhydrazin) dazugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur gelagert, um die Indikatorreaktion zu starten. Zum Stopp der Indikatorreaktion werden 1 ml 0,4 molare Natriumhydroxid Lösung dazugegeben und wiederum 5 min bei Raumtemperatur belassen. Zur Auswertung der Probe werden 200 µl in eine 96-well Platte pipettiert und anschließend zusammen mit den Standardkonzentrationen in einem Photometer analysiert. Um größere Genauigkeit zu erhalten, werden jeweils 3 Proben vermessen.

Zur Herstellung der Standardkonzentrationen werden je 0, 10, 20, 30, 40 µl des Standards (enthält Natriumpyruvat) ebenfalls in ein 1,5 ml Eppendorf Cup pipettiert mit PBS auf ein Volumen von 100 µl gebracht und nochmals 20 µl destilliertes Wasser dazugegeben. Diesen Mischungen werden 100 µl es Colour Reagent zugegeben, vermischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird jeweils 1 ml 0,4 molare Natriumhydroxidlösung zugegeben und wiederum 5min bei Raumtemperatur belassen. Die Standardkonzentrationen werden ebenso in 3-facher Ausführung in die 96-well-Platte pipettiert. Alle Lösungen werden gemeinsam bei 490 nm in einem Photometer vermessen und mit Hilfe einer Standardkurve die ALT Werte berechnet.

3.9. Gewinnung von Gewebsproben

Am Versuchsende wurden die Versuchstiere nach der letzten Blutentnahme unter CO₂ Narkose durch zervikale Dislokationen getötet. Anschließend wurden die Tiere erneut längs laparotomiert und die Leber entnommen. Die entnommenen Organe wurden in einer Matrix (Tissue Tek®) eingebettet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C für weitere Versuche gelagert.

3.10. Analyse histologischer Proben

3.10.1. Herstellung von Kryoschnitten

Mit Hilfe eines Kryostaten wurde von den schockgefrorenen Leberproben anschließend Schnitte von 4 - 5 µm Schichtdicke hergestellt. Diese wurden mit Hilfe eines Pinsels auf Objektträger aufgenommen und für 24 h bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Im Anschluss wurden sie entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -20 °C konserviert.

3.10.2. Hämatoxylin-Eosin Färbung

Zur morphologischen Beurteilung der Gewebsschnitte wurden Hämatoxylin-Eosin Färbungen durchgeführt. Hierbei werden basophile Zellbestandteile wie z.B. die DNA im Zellkern oder Ribosomen durch Hämalaun blau angefärbt und acidophile Zellbestandteile wie z.B. einige Zellplasmaproteine durch Eosin rot angefärbt. Es wurde folgendes Färbeprotokoll angewandt:

Die Kryoschnitte werden 5 min in Aceton fixiert, kurz unter dem Abzug getrocknet und anschließend für 3 - 5 min einer Färbekammer in filtriertem Hämalaun gefärbt. Danach werden sie unter fließendem Leitungswasser für 1 - 2 min gespült, durch den höheren pH-Wertes des Leitungswasser verfärben sich die Präparate blau (sog. Bläuen). Darauf folgend werden die Präparate für 30 s – 2 min in Eosin gefärbt und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Hierfür werden die Präparate für 1 min in 70 % Alkohol und jeweils für 2 min in 96 % und 100 % Alkohol gelegt. Zum Fixieren werden sie für 1 min in Xylol getaucht und darauf folgend mit Kunstharz (Eukitt®) eingedeckt und zum Abdampfen unter einen Abzug gelegt. Gelagert werden die Präparate bei Zimmertemperatur.

3.10.3. Immunhistologische Färbungen

3.10.3.1. Prinzip der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ermöglicht durch das Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion den Nachweis definierter Antigene auf histologischen Schnittpräparaten, zum Beispiel Oberflächenmerkmale. Mit Hilfe monoklonaler Antikörper, die an nur ein spezifisches Antigen binden, können Zellmerkmale auch im Gewebeverband sichtbar gemacht werden. (Abb. 4) Dazu wird zuerst ein Primärantikörper auf das Schnittpräparat gegeben, der spezifisch das nachzuweisende Antigen bindet. Anschließend wird das Präparat mit einem

Sekundärantikörper inkubiert, an dem ein fluoreszierender Farbstoff gekoppelt ist. Der Sekundärantikörper bindet wiederum spezifisch an dem Primärantikörper und kann mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht werden.

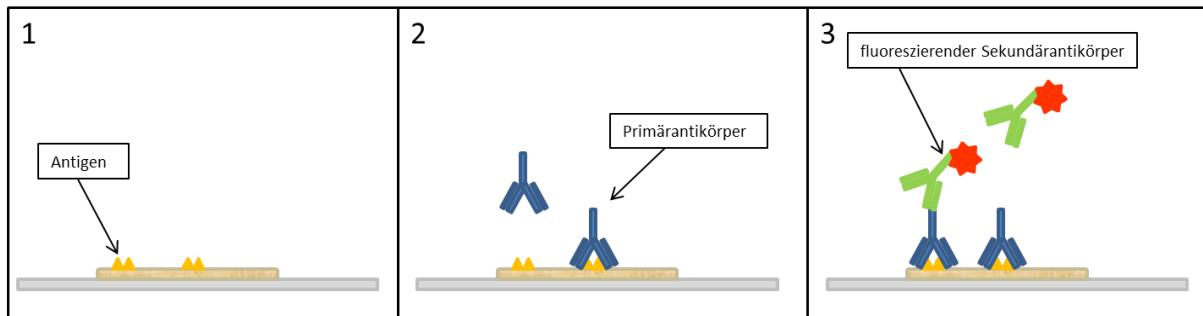


Abb. 8: Prinzip der Immunhistochemie: 1: Gewebe mit gesuchtem Antigen; 2: monoklonaler Primärantikörper bindet daran; 3: fluoreszierender Sekundärantikörper bindet an Primärantikörper und ermöglicht Antigennachweis

3.10.3.2. Verwendete Primärantikörper

Tabelle 4 fasst die für diese Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörper zusammen. Das Vorkommen und die Merkmale des nachzuweisenden Antigens können ebenfalls entnommen werden.

Tab. 4: Verwendete Primärantikörper; Vorkommen und Merkmale des nachzuweisenden Oberflächenantigens⁷⁶⁻⁷⁹

Antikörper	Nachweis von Oberflächenmerkmal	Vorkommen und Merkmale des Oberflächenmerkmals
Anti-CD 4	CD 4	<ul style="list-style-type: none"> • T-Helferzellen • Makrophagen • Monozyten
Anti-CD 11b	CD 11b	<ul style="list-style-type: none"> • Leukozyten (v.a. Neutrophile, Monozyten) • vermittelt Leukozyten Migration
Anti-CD 54	CD 54 (ICAM 1)	<ul style="list-style-type: none"> • basale Expression als Adhäsionsmarker auf Endothelzellen, Immunzellen • proinflammatorische Zytokine wie z.B. IL-1, TNFα, IFN-μ bewirken verstärkte ICAM1 Expression • interagiert mit CD11a/b, CD18 • vermittelt Leukozyten Migration
Anti-Gr1	GR 1 (Ly-6G und Ly-6C)	<ul style="list-style-type: none"> • aktivierte Granulozyten

3.10.3.3. Verwendetes Färbeprotokoll

4 - 5 µm dicke Kryoschnitte werden für 5 min in einer Färbewanne mit Aceton fixiert. Dadurch haftet das Gewebe auf dem Objektträger. Anschließend werden sie für 60 min an der Luft getrocknet und danach die Präparate mit einem Fettstift (z.B. Dako Pen®) umrandet. Um Reste des Acetons und des Einbettmediums abzuwaschen, werden die Schnitte zweimal für 5 min in einer Färbewanne mit PBS gewaschen. Alle folgenden Schritte werden in einer befeuchteten Färbekammer bei Zimmertemperatur durchgeführt. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungsstellen und Reaktionen des Primärantikörpers und zur Verringerung unspezifischer Hintergrundfärbung werden die Präparate mit Serum der Spezies, die zur Herstellung des Sekundärantikörpers verwendet wurde, abgesättigt. Hierfür wurden für die vorliegende Arbeit die Schnitte jeweils mit 50 - 100 µl Ziegenserum in einer Verdünnung von 1:10 für 60 min inkubiert. Im Anschluss wird das heterologe Serum wiederum 5 min in einer PBS gefüllten Färbewanne abgewaschen. Die nachfolgenden Arbeitsschritte sollten nach Möglichkeit unter Abdunkelung vollzogen werden. Danach werden die Präparate für 30 min mit 50 - 100 µl verdünnten, primären Antikörper inkubiert. Alle verwendeten Primärantikörper waren stets monoklonale Antikörper und wurden 1:100 verdünnt. Die Präparate sollten stets vollständig mit der Antikörperverdünnung bedeckt sein. Nach der Inkubation werden die nicht gebundenen Primärantikörper durch 2 Waschschrte PBS entfernt. Zuerst werden die Schnitte vorsichtig mit Hilfe einer großen Pipette mit PBS abgespült und anschließend nochmals für 5 min in eine Färbewanne mit PBS gestellt. Danach erfolgt die Inkubation mit 1:200 verdünnten Sekundärantikörper für 60 min. Der Sekundärantikörperlösung wird zur Zellkernfärbung 0,5 µl 1:10.000 verdünntes 4,6-Diamidino-2phenylindoldihydrochlorid (Dapi) hinzugefügt. Überschüssiger Sekundärantikörper wird auf die gleiche Weise wie der Primärantikörper mit PBS abgewaschen. Die Präparate werden mit Eindeckmedium eingedeckt. Hierfür wurde Fluorescent Mounting Medium® verwendet, und wenn nötig kurzfristig abgedunkelt im Kühlschrank aufbewahrt.

3.10.4. Nachweis apoptotischer Zellen - Tunel Assay

Zum Nachweis apoptotischer Zellen wurde ein Tunel Assay angewandt. Dies ist ein Verfahren, das DNA Doppelstrangbrüche mittels fluoreszierenden Farbstoffs nachweist.

3.10.4.1. Prinzip des Tunel Assay

Für diese Arbeit wurde das „In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red“ der Firma Roche® verwendet. Es weist apoptotische Zellen nach folgendem Prinzip nach:

1. Durch Zugabe „TMR red“ markierter Nukleotide und terminaler Desoxynukleotid Transferase, welches die Polymerisation Nukleotide an freien 3'-OH Enden katalysiert, können die terminalen Enden von DNA Doppelstrangbrüchen nachgewiesen werden (TUNEL-Reaktion).
2. Die „TMR red“ markierten Nukleotide können anschließend mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops nachgewiesen werden.

3.10.4.2. Verwendetes Färbeprotokoll

Für diese Arbeit wurde ein Färbeprotokoll vorschriftsgemäß nach Angaben des Herstellers verwendet.

Hierfür werden zuerst die benötigten Lösungen vgl. Abschnitt 2.4. hergestellt. Anschließend werden die zu färbenden Kryoschnitte mit jeweils 100 µl der vorbereiteten Fixationslösung für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Schnitte mit PBS gespült und anschließend für 30 min in einer PBS gefüllten Färbewanne gewaschen. Um die Schnitte vor übermäßiger Belichtung und vor Austrocknung zu schützen, wurden alle folgenden Arbeitsschritte bei Abdunkelung und in einer befeuchteten Färbekammer durchgeführt. Die auf dem Objektträger fixierten Schnitte werden danach mit jeweils 100 µl Permeabilisierungslösung benetzt und für 2 min im Kühlschrank inkubiert. Dieser Schritt dient dazu, die Zellwände für die Desoxynukleotid Transferase und die markierten Nukleotide durchlässig zu machen. Nach der Permeabilisierung werden die Schnitte zweimal mit PBS gewaschen. Danach wird die Positivkontrolle hergestellt. Hierfür werden die entsprechenden Schnitte mit jeweils 100 µl Positivkontrolllösung, die DNase I enthält und somit freie 3'-OH-Enden produziert, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, im Anschluss mit PBS gewaschen und danach mit jeweils 50 µl Tunel Reaction mix für 60 min bei 37 °C inkubiert. Der Tunel Reaction mix enthält sowohl Desoxynukleotid Transferase als auch markierte Nukleotide. Nach der Positivkontrolle wird die Negativkontrolle hergestellt. Hierfür werden die dafür vorgesehenen Schnitte mit 50 µl der vorbereiteten Lösung für die Negativkontrolle benetzt. Diese enthält lediglich die markierten Nukleotide und keine Desoxynukleotid Transferase. Anschließend wird die Negativkontrolle ebenfalls 60 min bei

37 °C inkubiert. Die Negativkontrolle schließt mögliche unerwünschte Farbreaktionen der markierten Nukleotide aus. Die Kryoschnitte, bei denen apoptotische Zellen nachgewiesen werden sollen, werden mit jeweils 50 µl Tunel Reaction mix auch für 60 min bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit kann die zugegebene Desoxynukleotid Transferase an möglichen freien 3'-OH Enden apoptotischer Zellen die zugegebenen farbig markierten Nukleotide katalysieren. Nach 60 min Inkubationszeit werden alle Schnitte nochmals dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Hilfe des Eindeckmediums eingedeckt. Mit einem Fluoreszenzmikroskop können die gefärbten Schnitte im Anschluss ausgewertet werden.

3.11. Lichtmikroskopische Auswertung

Im Anschluss an die spezifischen histologischen Färbungen wurden die Präparate von mindestens zwei geschulten, unabhängigen Beobachtern am Lichtmikroskop oder Fluoreszenzmikroskopie beurteilt und mit einer Kamera abfotografiert.

Alle Präparate, die gegen CD54/ICAM 1 gefärbt wurden, wurden unter gleichen Bedingungen gefärbt und am selben Tag mit derselben Kamera und Belichtungsintensität fotografiert. Für die semiquantitative Auszählung der Präparate wurden jeweils 5 zufällige Gesichtsfeldausschnitte pro Tier hinsichtlich positiver Zellen ausgezählt.

4. Ergebnisse

4.1. Warme Ischämie induziert einen Leberschaden

Um neue Erkenntnisse zum Ischämie-Reperfusionsschaden zu gewinnen, wurde ein Maus Modell verwendet, welches 45-minütige warme Ischämie erzeugt. Das ausführlich beschriebene Operationsprotokoll ist im Methodenteil in Abschnitt 3.3. zu finden. Einführend wird das Prinzip dieses Operationsmodells kurz erklärt. Man eröffnet durch mediane Längslaparotomie das Abdomen einer tief narkotisierten, männlichen C57bl6 Maus. Unter dem Operationsmikroskop werden die einzelnen Leberlappen dargestellt und die V. portae, die A. hepatica und der Gallengang freigelegt. Mit Hilfe eines atraumatischen Klipps wird das Gefäßbündel aus V. portae, A. hepatica und der Gallengang zwischen den oberen Leberlappen (Mittel- und linker Lappen) und den darunter liegenden Leberlappen für 45 min abgeklemmt und somit eine warme Ischämie erzeugt (vgl. Abb. 5 im Abschnitt 3.3.). Dadurch wird die Blutzufuhr zu Mittellappen und linkem Lappen unterbunden und die beiden Lappen werden ischäm. Die restlichen, unteren Leberlappen bleiben unverändert. Den Erfolg des Abklemmens kann man sehr einfach makroskopisch durch Entfärbung der entsprechenden Leberlappen erkennen. Das Abklemmen der Gefäße an der beschriebenen Stelle verursacht circa 70 % partielle Leberischämie.⁷³

Im Folgenden wurde untersucht, ob durch Verwendung dieses Operationsmodells ein Ischämie-Reperfusionsschaden nachgewiesen werden kann. Außerdem sollte mit Hilfe der sham Gruppe (vgl. Behandlungsgruppen im Abschnitt 3.4.) geklärt werden, ob es im Vergleich zur unbehandelten control Gruppe Hinweise auf klinische Auswirkung durch Stress, Narkose, Längslaparotomie beziehungsweise mechanische Schädigung der Leber durch die Darstellung der Gefäße gibt. Anhand klinischer Parameter wurde der entstandene Leberschaden validiert und quantifiziert. Hierfür wurde die Bestimmung des weitgehend leberspezifischen Serumparameters Alanin-Aminotransferase (ALT) herangezogen. Die Alanin-Aminotransferase kommt vor allem im Zytoplasma von Hepatozyten vor und der Anstieg dieses Enzyms im Serum kennzeichnet einen Hepatozytenschaden. Mittels optisch-enzymatischer Tests wurde in Serumproben der Versuchsgruppen control, sham und IRI jeweils 3 h und 24 h nach Reperfusion die Alanin-Aminotransferase bestimmt (Abb. 9).

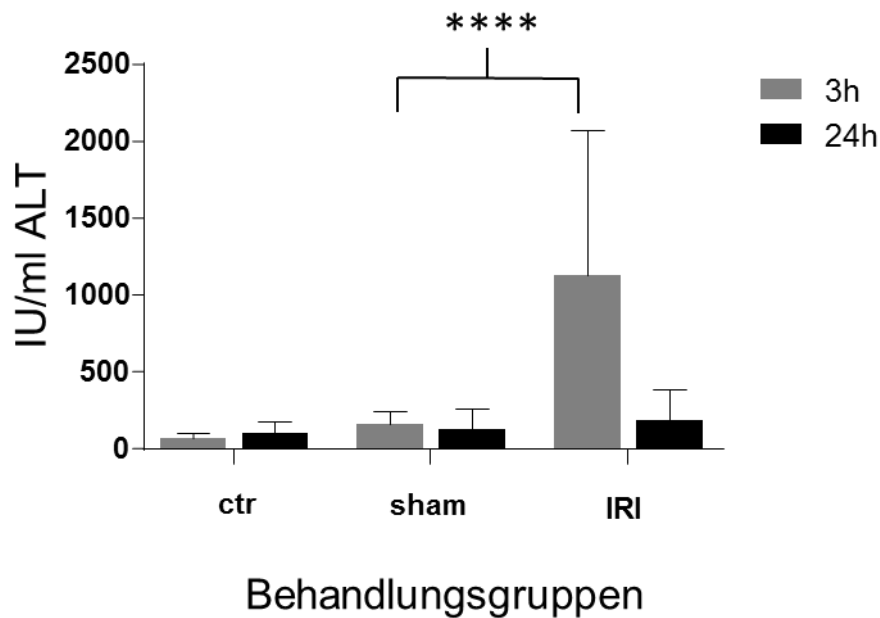


Abb. 9 Klinische Schädigung der verschiedenen Versuchsgruppen im Vergleich: Serumanalyse der Versuchsgruppen control, sham und IRI nach 3 h und 24 h zur Bestimmung der Lebertransferase ALT mittels optisch-enzymatischen Tests; $p < 0,001$

Dabei zeigte sich, dass in der Gruppe control ALT Werte mit durchschnittlich 200 IU/ml bestimmt werden konnten. Dieser Wert wurde als Basalwert angenommen. In der sham Gruppe konnte mit im Mittel 220 IU/ml kein signifikanter Unterschied zur control Gruppe festgestellt werden. Bei beiden Gruppen spielte der postoperative Zeitraum der Messung keine Rolle. Im Gegensatz dazu wurden in der Gruppe IRI 3 h postoperativ 5-10-fach erhöhte Werte bestimmt und damit im Vergleich zum Basalwert ein signifikanter ALT Anstieg ($p < 0,001$) festgestellt. 24 h nach der Reperfusion fiel auch bei dieser Gruppe der ALT Wert deutlich ab und erreichte mit durchschnittlich 300 IU/ml im Vergleich zum Basalwert nur noch leicht erhöhte Werte.

Um auch den zeitlichen Verlauf des Transferasen-Anstiegs nachvollziehen zu können, wurden wiederum Serum ALT Werte der Versuchsgruppen control, sham und IRI zum Zeitpunkt 0 h, 3 h, 24 h, 48 h und 72 h nach Reperfusion analysiert (Abb. 10).

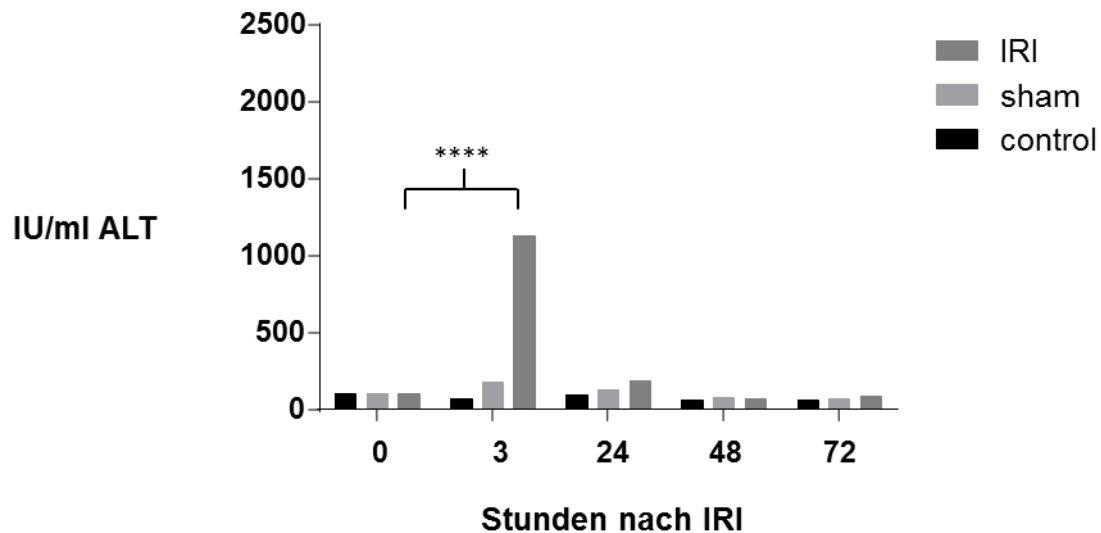


Abb. 10 zeitlicher Verlauf der Schädigung:

Serumanalyse der Versuchsgruppen control, sham und IRI nach 3 h und 24 h zur Bestimmung der Lebertransferase ALT mittels optische-enzymatischen Tests; $p < 0,001$

Dabei wurden zum Zeitpunkt 3 h in der Gruppe IRI im Vergleich zur control Gruppe beziehungsweise sham Gruppe signifikant erhöhte Werte gefunden ($p < 0,001$). Zum Zeitpunkt 24 h ist ein Transferasen Anstieg noch leicht zu erkennen, aber 48 h und 72 h postoperativ erreichte diese Versuchsgruppe wieder Werte auf basalem Niveau. Zum Zeitpunkt 48 h, 72 h postoperativ sind die Serum ALT Werte aller drei Gruppen auf basalem Level. In der sham Gruppe konnte im Vergleich zur control Gruppe wiederum kein signifikanter Unterschied gemessen werden.

Neben der Serumanalyse wurde eine klinische Schädigung durch die IRI Operation auch histologisch festgestellt. Wie bereits bekannt ist, sind sowohl Nekrose als auch Apoptose maßgeblich am Ischämie-Reperfusionsschaden beteiligt. Durch metabolischen Stress der Zellen kommt es während der Ischämie aufgrund Glycogenverbrauchs, Sauerstoffmangel und ATP Depletion zum Zelltod.¹¹ Zum Nachweis abgetöteter Zellen wurden von Lebergewebsproben eines IRI Tieres 24 h nach der Reperfusion histologische Schnittpräparate hergestellt und mittels verschiedener histologischer Färbemethoden ischämie und apoptotische Areale nachgewiesen (Abb. 11).

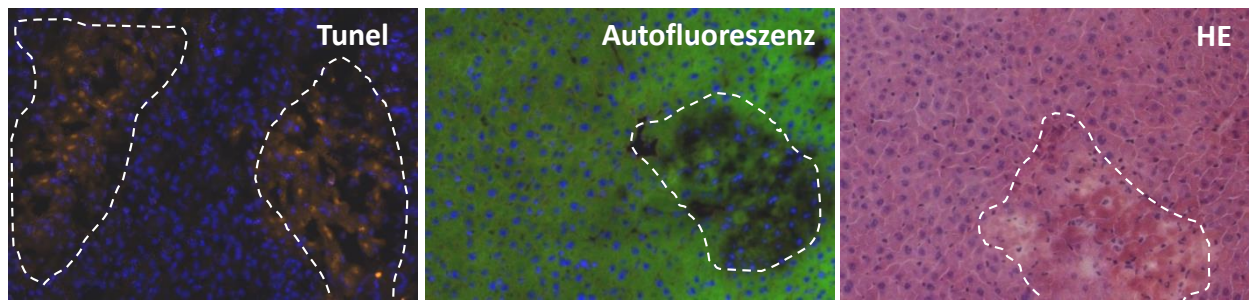


Abb. 11 Darstellung der Schädigung anhand histologischer Schnittpräparate an einem IRI 24 h Tier, ischämie und apoptotische Areale sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet (200x Vergrößerung)

Links: Verfahren zur Darstellung apoptotischer Zellen (Tunel Assay), apoptotische Zellen fluoreszieren rot

Mitte: Darstellung der grünen Autofluoreszenz der Hepatozyten, dunkle Areale weisen auf abgetötete, nicht mehr fluoreszierende Hepatozyten hin

Rechts: HE Färbung, Areale mit abgetöteten Hepatozyten an Zellkernuntergängen, undeutliche Zellabgrenzungen und erhöhter Vakuolisierung erkennbar

Zum einen wurde ein sogenannter Tunel Assay angewandt, ein Verfahren zur Darstellung apoptotischer Zellen. Bei diesem werden terminale Enden von DNA Fragmentationen, welche typischerweise bei apoptotischen Zellen vorzufinden sind, mit rot fluoreszierendem Farbstoff angefärbt. (Abb. 11, links) Im histologischen Präparat konnten exemplarisch für ein IRI 24 h Tier große Apoptose Areale (rot gefärbte Areale im Schnittbild) gefunden werden.

Des Weiteren konnten auch mit Hilfe der Autofluoreszenz der Hepatozyten geschädigte Leberzellareale dargestellt werden. Aufgrund der Größe der Hepatozyten und dem hohen Gehalt an Zytoplasma verfügen Hepatozyten über eine hohe Autofluoreszenz. Abgetötete Hepatozyten verlieren diese Eigenschaft und erscheinen als dunkle Areale im ansonsten grünfluoreszierenden Präparat. (Abb. 11, Mitte)

Auch in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung kann durch Ischämie erzeugte Zellschädigung nachgewiesen werden. (Abb. 11, rechts) Hellere, schaumige Areale, Zellkernuntergänge, fehlende Zellabgrenzung und erhöhte Vakuolisierung deuten auf abgestorbene Hepatozyten hin.

4.2. Immunzellen sind bei frühem IRI beteiligt

Neben verschiedenen Zelltodmechanismen ist auch die Beteiligung des angeborenen und erworbenen Immunsystems am IRI Schaden bekannt.⁸⁰ Um zu analysieren, ob und welche Immunzellen bei dem hier verwendeten Schädigungsmodell beteiligt sind, wurden Schnittpräparate exemplarisch für ein IRI 24 h Tier angefertigt und mit verschiedenen immunhistologischen Antikörpern gefärbt. (Abb. 12)

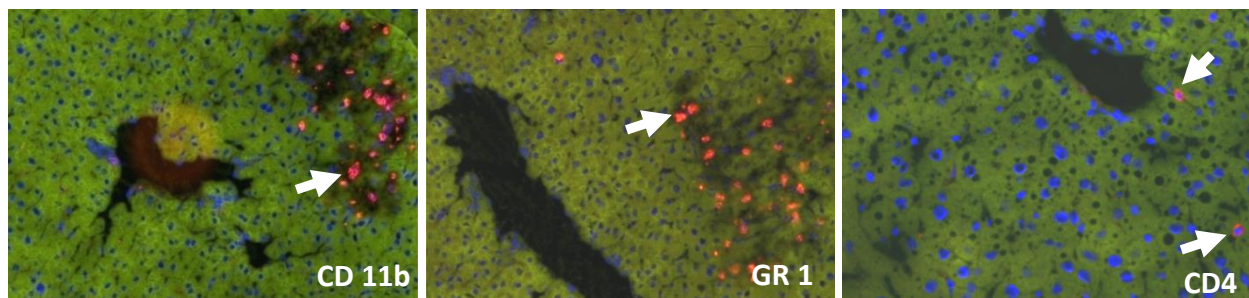


Abb. 12 Beteiligung verschiedener Immunzellen am IRI Schaden; verschiedene Immunhistologische Färbungen eines IRI 24 h Tieres, weiße Pfeile kennzeichnen gefärbte Zellen (200x Vergrößerung)

Links: CD11b Färbung: rot fluoreszierende Zellen tragen Oberflächenmarker CD11b

Mitte: GR 1 Färbung: rot fluoreszierende Zellen sind GR1 positiv

Rechts: CD 4 Färbung: rot fluoreszierende Zellen tragen CD4

Zunächst wurde das Augenmerk auf Leukozyten gelegt. Einige Untergruppen der Leukozyten, z.B. Neutrophile, werden beim Ischämie-Reperfusionsschaden trotz der sterilen Umgebung aktiviert.^{9,12} Vermittelt wird diese Aktivierung über Toll like Rezeptoren und durch Komplementaktivierung, reaktive oxygen Species (ROS) und von den abgetöteten Zellen ausgeschütteten endogenen und exogenen danger-associated molecular patterns (DAMPs).^{9,11} Die aktivierten Leukozyten wandern in geschädigtes Gewebe ein. Vermittelt wird diese Leukozyten Migration unter anderem durch das Oberflächenmolekül CD11b. Neutrophile, Monozyten, NK-Zellen und einige Untergruppen der Lymphozyten können CD11b exprimieren.^{77,81} CD11b dient der Endotheladhäsion und ermöglicht das Einwandern der Leukozyten in geschädigtes Gewebe.^{77,81} Zum Nachweis CD11b exprimierender Zellen wurden histologische Schnittpräparate eines IRI Tieres 24 h nach der Reperfusion mit rot fluoreszierenden Antikörper gegen CD11b angefärbt (Abb.12, links). Es konnten CD11b

positive Zellen in Arealen stark geschädigter, nicht mehr autofluoreszierender Hepatozyten angefärbt werden.

Zur Differenzierung der Leukozyten wurde das Oberflächenmolekül GR1 (Ly-6C und Ly-6G) herangezogen. Das Oberflächenprotein GR1 dient zur Differenzierung von Granulozyten und wird vor allem auf aktivierten Granulozyten exprimiert.⁷⁹ Um diesen Zelltyp nachzuweisen wurden Präparate mit Anti-GR 1 gefärbt. (Abb. 12 Mitte) Der hierbei verwendete Antikörper fluoresziert ebenfalls rot. GR 1 positive Zellen konnten vereinzelt im Gewebe und gehäuft in stark geschädigten Leberarealen nachgewiesen werden.

Neben dem angeborenen Immunsystem ist auch das erworbene Immunsystem am IRI Schaden beteiligt. Auch wenn der genaue Aktivierungsmechanismus in der vorherrschenden sterilen Umgebung noch nicht geklärt ist, ist doch bekannt, dass sowohl CD4⁺-, CD8⁺-, als auch $\gamma\delta$ -T-Zellen am IRI Schaden beteiligt sind.^{11,13} Im Folgenden sollten CD4 positive Zellen in den Schnittpräparaten nachgewiesen werden (Abb. 12 rechts). Auch hierfür wurde ein rotfluoreszierender Antikörper verwendet. Das Glykoprotein CD4 wird von verschiedenen Zellen des Immunsystems exprimiert: neben T-Zellen können auch Makrophagen und Monozyten CD4 exprimieren.⁷⁷ Es wurden histologische Schnitte mit rot fluoreszierendem Antikörper gegen CD4 gefärbt. Auf diese Weise konnten CD4 positive Zellen in geringer Anzahl verstreut im Gewebe gefunden werden. Größere Ansammlung CD4 positiver Zellen konnten nicht nachgewiesen werden.

4.3. MSC reduzieren den IRI Schaden

Nachdem der Nachweis erbracht wurde, dass das angewendete IRI Operationsmodell geeignet ist, um erheblichen Ischämie-Reperfusionsschaden hervorzurufen und dass verschiedene Immunzellen daran beteiligt sind, wird nun versucht, durch verschiedene Treatment Gruppen diesen Schaden zu verringern.

Hierfür wurde ein Treatment-Protokoll mit syngenem und allogenen mesenchymalen Stammzellen entwickelt. Den Mäusen dieser beider Treatment Gruppen wurde 30 min präoperativ jeweils $0,5 \times 10^6$ MSC Zellen syngen oder allogene intravenös in eine Schwanzvene injiziert. Anschließend wurde das IRI Operationsmodell analog der IRI Gruppe angewandt.

4.3.1. Quantitativer Vergleich des IRI Schadens mittels ALT-Bestimmung im Serum

Um den Schaden der MSC-Treatment Gruppen mit den anderen Versuchsgruppen vergleichen zu können, wurden 0 h, 3 h, 24 h, 48 h und 72 h postoperativ Serumproben entnommen und die Alanin-Aminotransferase mittels optisch-enzymatischen Tests bestimmt (Abb. 13).

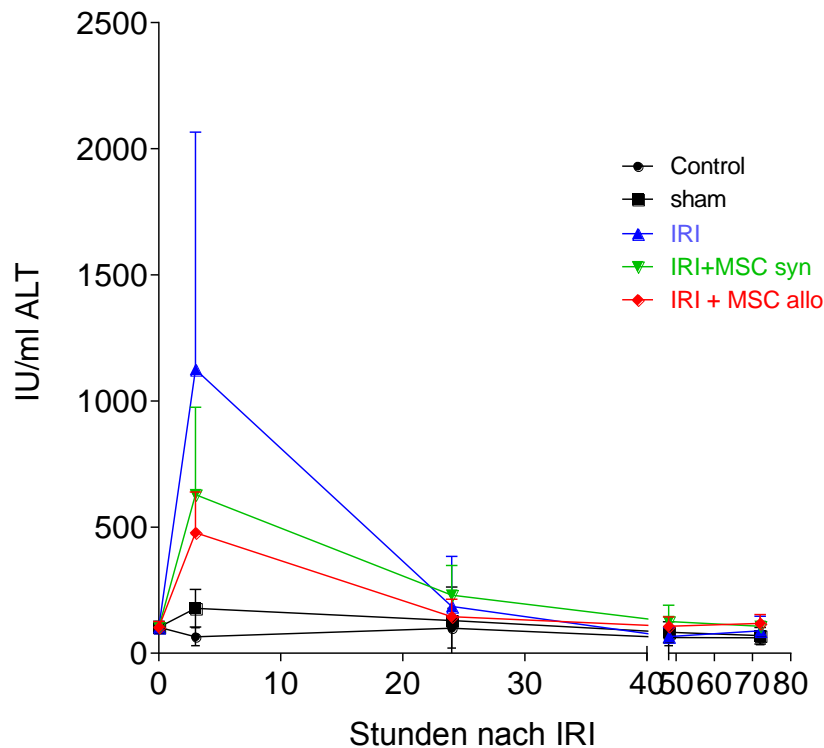


Abb. 13 Serumanalyse der verschiedenen Versuchsgruppen nach 3 h, 24 h, 48 h, 72 h; Bestimmung der Lebertransferase ALT mittels ALT ELISA im Verlauf:

schwarze Kurven: kein signifikanter ALT-Anstieg im Verlauf bei der control und Sham Gruppe; **blaue Kurve:** deutlicher ALT-Anstieg der IRI Gruppe nach 3 h, anschließend kontinuierlicher ALT-Abfall bis nach 48 h annähernd Normwerte erreicht werden; **grüne und rote Kurve:** mäßiger ALT-Anstieg der IRI + MSC_{syn} und IRI + MSC_{allo} Gruppen nach 3 h, anschließend kontinuierlicher ALT-Abfall bis nach 48 h annähernd Normwerte erreicht werden, ALT-Werte der IRI + MSC_{syn} Gruppe höher als ALT-Werte der IRI + MSC_{allo} Gruppe

Für die control Gruppe zeigt sich im Verlauf von 72 h kein Anstieg. Die Werte der control Gruppe werden als Basalwerte angenommen. Die sham Gruppe zeigt einen sehr leichten Anstieg nach 3 h, ansonsten übersteigen die Werte der sham Gruppe die Basalwerte kaum.

Im Gegensatz dazu zeigen die ALT-Werte der IRI Gruppe nach 3 h einen deutlichen Anstieg, sie übertreffen den Basalwert um das 5 - 10 fache. Nach 24 h sind die ALT-Werte bereits wieder stark abgefallen, um nach 48 h bzw. 72 h wieder auf Höhe der Basalwerte zu liegen. Die IRI Tiere, die mit allogenen MSC Zellen behandelt wurden, im folgenden IRI + MSC_{allo} genannt, zeigen dagegen einen deutlich anderen ALT-Wert-Verlauf. Ähnlich der IRI Gruppe steigt der ALT-Wert 3 h postoperativ an, allerdings im Mittel lediglich halb so stark wie die ALT-Werte der IRI Gruppe. Nach 24 h werden wieder annähernd Basalwerte erreicht, die sich nach 48 h und 72 h nicht mehr verändern. Die zweite Treatment Gruppe sind IRI Tiere, die mit syngenenen MSC Zellen behandelt wurden, im folgendem mit IRI + MSC_{syn} bezeichnet. Die für diese Gruppe gemessenen ALT-Werte steigen ebenfalls 3 h postoperativ stark an. Der 3 h ALT-Wert dieser Treatment Gruppe liegt zwischen dem der IRI und der IRI + MSC_{allo} Gruppe.

4.3.2. Histologischer Vergleich des IRI Schadens mittels Hämatoxylin-Eosin Färbung

Um herauszufinden, ob die MSC-Gruppen auch histologisch ein anderes Bild aufzeigen, wurden Leberschnitte von Tieren der verschiedenen Versuchsgruppen 24 h nach der Operation durch Hämatoxylin-Eosin-Färbung angefärbt und mikroskopiert (Abb. 14).

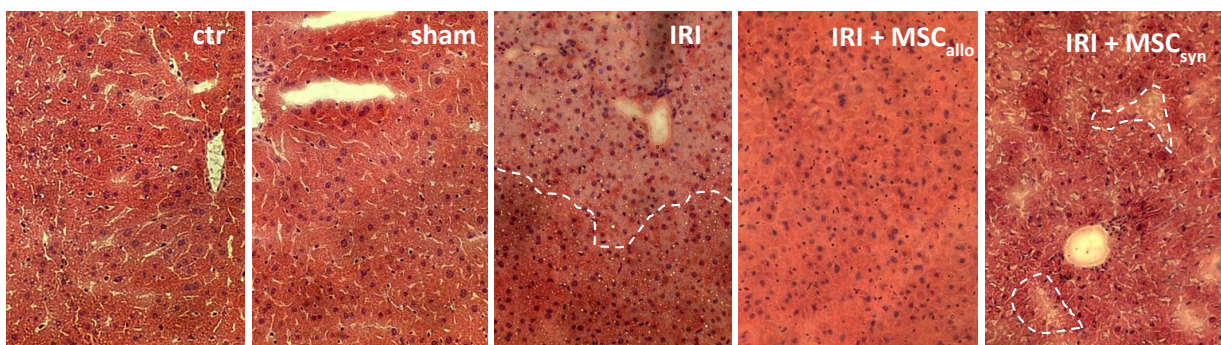


Abb. 14 HE Färbung histologischer Präparate von Tieren der verschiedenen Versuchsgruppen zum Zeitpunkt 24 h, weiße Umrandung kennzeichnet ischämie Areale (200x Vergrößerung)

Die sham Gruppe unterscheidet sich histologisch nicht von der control Gruppe. Beide zeigen das Bild einer normalen, gesunden Mausleber.

Im Gegensatz dazu sind bei dem Schnittpräparat der IRI Gruppe vor allem periportal deutliche Apoptose Areale sichtbar gemäß dem Prinzip der letzten Wiese, erkennbar an

erhöhter Vakuolen Zahl, verminderter Zellkernzahl und deutlich weniger stark angefärbtem Zytoplasma.

In der IRI + MSC_{allo} Gruppe hingegen können keine ausgeprägten Apoptose Areale festgestellt werden. Es zeigt sich ein weitgehend homogenes Bild, vergleichbar mit dem der control und sham Gruppe.

Die HE gefärbten Schnitte der IRI + MSC_{syn} Gruppe ähneln eher denen der IRI Gruppe. Die Präparate sind relativ inhomogen angefärbt und weisen einige Apoptose Areale auf, die in der Größe allerdings deutlich denen der IRI Präparaten unterliegen.

4.4. Einfluss von MSC auf Immunzellen

Histologische und klinische Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen konnten bereits nachgewiesen werden. Darum stellt sich die Frage, ob auch Unterschiede bei den beteiligten Immunzellen gefunden werden können. Hierzu wurden Leberpräparate von den verschiedenen Versuchsgruppen zum Zeitpunkt 3 h und 24 h mittels unterschiedlicher Methoden auf Unterschiede des Vorhandenseins von Immunzellen untersucht (Abb. 15, Abb. 16).

4.4.1. Einfluss auf CD4 positive Zellen

Zunächst wurde der Fokus auf CD4 positive Zellen gelegt. (Abb. 15) Es ist zum einen bekannt, dass CD4 positive T-Zellen auf bisher unbekannte Weise zu Entstehung des IRI Schadens beitragen,⁹ andererseits konnte nachgewiesen werden, dass CD4 positive T-Zellen durch MSC an der Proliferation und Aktivierung gehindert werden^{47,48} und sich gleichzeitig die Anzahl zugunsten regulatorischer T-Zellen,⁴⁹ die Immuntoleranz entwickeln,⁵⁰ verschiebt. Um zu prüfen, ob ein Einfluss von MSC auf CD4 positive Zellen nachgewiesen werden kann, wurden Präparate aller Gruppen 3 h und 24 h nach Reperfusion mit rot fluoreszierendem Antikörper gefärbt (Abb. 15A). Anschließend wurden, um das Ergebnis zu quantifizieren, pro Präparat jeweils 5 zufällige Gesichtsfelder nach gefärbten Zellen ausgezählt (Abb. 15B).

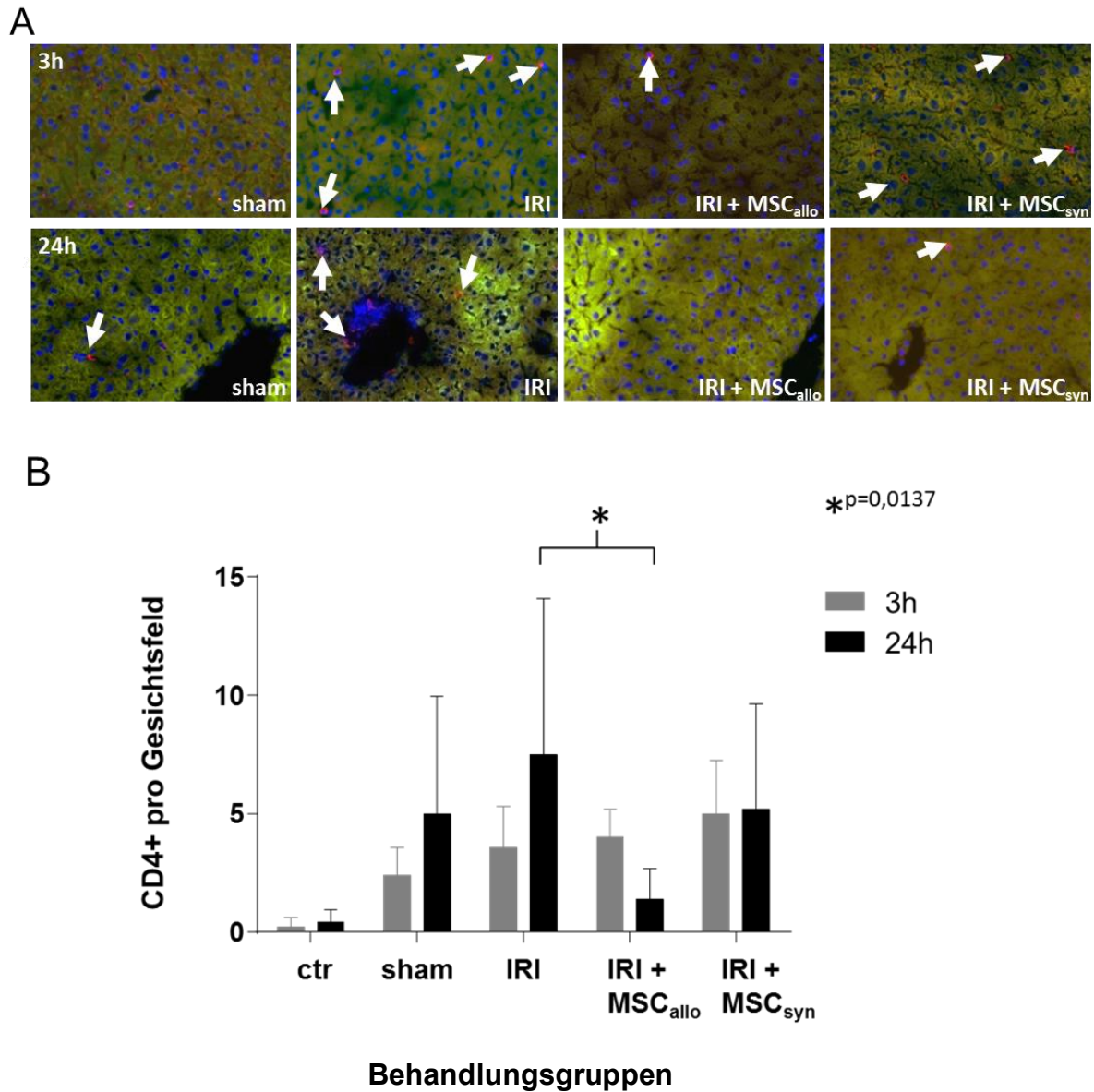


Abb. 15 Nachweis CD4 positiver Zellen in den verschiedenen Versuchsgruppen

A: Immunhistologische Färbung CD4 positiver Zellen in den jeweiligen Versuchsgruppen nach 3 h (obere Reihe) und nach 24 h (untere Reihe), weiße Pfeile kennzeichnen gefärbte Zellen (200x Vergrößerung)

B: Auszählung CD4 positiver Zellen in den einzelnen Versuchsgruppen pro Gesichtsfeld nach 3 h und 24 h (N=5 bei 200x Vergrößerung), signifikant weniger CD4 positive Zellen in der IRI + MSC_{allo} Gruppe im Vergleich zur IRI Gruppe nach 24 h (p = 0,0137)

In der control Gruppe wurden lediglich vereinzelt CD4 positive Zellen gefunden, die Präparate der sham Gruppe enthielten deutlich mehr CD4 positive Zellen, vor allem 24 h postoperativ. In der Gruppe IRI konnten die meisten CD4 positiven Zellen gezählt werden,

auch hier ebenso mehr zum Zeitpunkt 24 h. Präparate der IRI Tiere, die zuvor syngene MSCs gespritzt bekommen haben, liegen zwischen der sham und der IRI Gruppe. Davon unterschied sich deutlich das Ergebnis für die IRI + MSC_{allo} Gruppe. Der durchschnittliche Wert dieser Gruppe liegt vor allem 24 h postoperativ deutlich unter dem der sham, IRI, IRI + MSC_{syn} Gruppen. Der Unterschied der Gruppe IRI zum Zeitpunkt 24 h im Vergleich zur Gruppe IRI + MSC_{allo} erreichte Signifikanzniveau ($p=0,0137$).

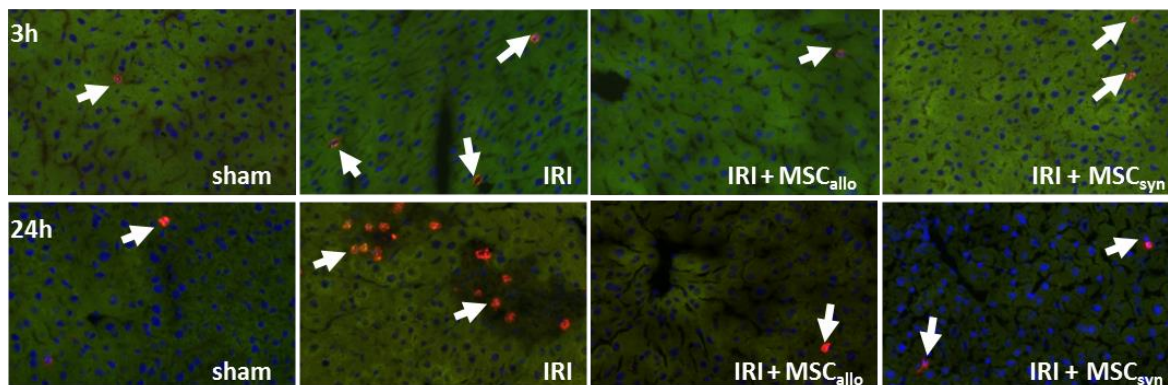
4.4.2. Einfluss auf GR1 positive Zellen

Des Weiteren wurde das Augenmerk auf Zellen, die den Oberflächenmarker GR1 tragen gelegt (Abb. 16). Dazu wurden wiederum Präparate aller Gruppen 3 h und 24 h postoperativ mit rotfluoreszierendem Antikörper gefärbt (Abb. 16A) und nach dem gleichen Prinzip wie die CD4 positiven Zellen ausgezählt (Abb. 16B).

3 h postoperativ konnten für die Gruppe sham etwas mehr GR1 positive Zellen gezählt werden als für die Gruppe control. Die Gruppen IRI + MSC_{allo} und IRI + MSC_{syn} lagen deutlich darüber. Die Gruppe IRI lag zwischen der sham und den MSC behandelten Gruppen.

Zum Zeitpunkt 24 h konnte ein anderes Ergebnis gezählt werden. Wiederum übertrifft die Gruppe IRI die Gruppe sham an GR1 positiven Zellen. 24 h postoperativ konnten allerdings in Lebern der Mäuse, denen MSC Zellen gespritzt wurden, weniger GR1 positive Zellen gefunden werden als in den Gruppen sham und IRI.

A



B

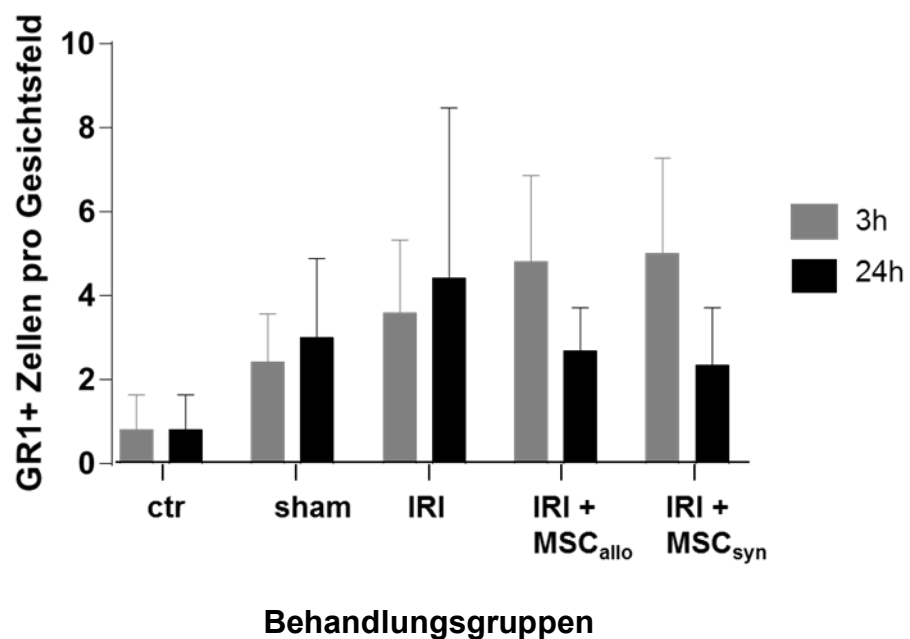


Abb. 16 Nachweis GR1 positiver Zellen in den verschiedenen Versuchsgruppen 3 h und 24 h postoperativ

A: Immunhistologische Färbung GR1 positiver Zellen in Versuchsgruppen nach 3 h (obere Reihe) und nach 24 h (untere Reihe), weiße Pfeile kennzeichnen GR1 positive, gefärbte Zellen (200x Vergrößerung)

B: Auszählung GR1 positiver Zellen in den einzelnen Versuchsgruppen pro Gesichtsfeld (N=5 bei 200x Vergrößerung) nach 3 h und 24 h postoperativ

4.5. MSC_{syn} und MSC_{allo} beeinflussen Adhäsionsmarker

Aufgrund der Ergebnisse in 4.4. ist anzunehmen, dass die Behandlung mit mesenchymalen Stammzellen Einfluss auf am Ischämie-Reperfusionsschaden beteiligte Immunzellen von IRI Tieren hat. Daher ist es auch von Interesse, ob die MSCs auch Adhäsionsmarker beeinflussen können.

Hierfür wird exemplarisch der Oberflächenrezeptor CD54 betrachtet. CD54 ist auch bekannt als Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM 1), ein Adhäsionsmarker, der auf Endothelzellen und Immunzellen exprimiert wird und mit CD11a/b und CD18 interagiert. ICAM 1 vermittelt die Leukozyten Migration ins Gewebe. Auf Leukozyten und Endothelzellen wird er immer in kleinen Konzentrationen präsentiert. Durch proinflammatorische Zytokine wie z.B. IL-1 und TNF α steigt die Konzentration des Adhäsionsmarkers sehr rasch an.⁷⁷ Bei der Entstehung des IRI Schadens wird eine Immunkaskade in Gang gesetzt, die bedingt, dass durch positive feed back loops immer größere Mengen an proinflammatorischen Zytokinen freigesetzt und somit auch Adhäsionsmoleküle wie ICAM 1 hochreguliert werden.⁹

Andererseits besitzen MSCs die Eigenschaft, durch Modulation und Unterdrückung des Immunsystems dazu beizutragen, dass weniger proinflammatorische und gleichzeitig mehr antiinflammatorische Zytokine ausgeschüttet werden.⁵⁵ Ob MSC einen Einfluss auf die ICAM 1 hat, soll sich durch Färbung von Leber Schnittpräparaten mit Antikörper gegen ICAM 1 zeigen.

Es wurden Schnittpräparate von Lebern der Versuchstieren der Gruppen sham, IRI, IRI + MSC_{allo} und IRI + MSC_{syn} zum Zeitpunkt 3 h und 24 h hergestellt und mit einem Antikörper gegen ICAM 1 gefärbt. Alle Schnitte wurden zum selben Zeitpunkt gefärbt und mit der gleichen Belichtung fotografiert (Abb. 17).

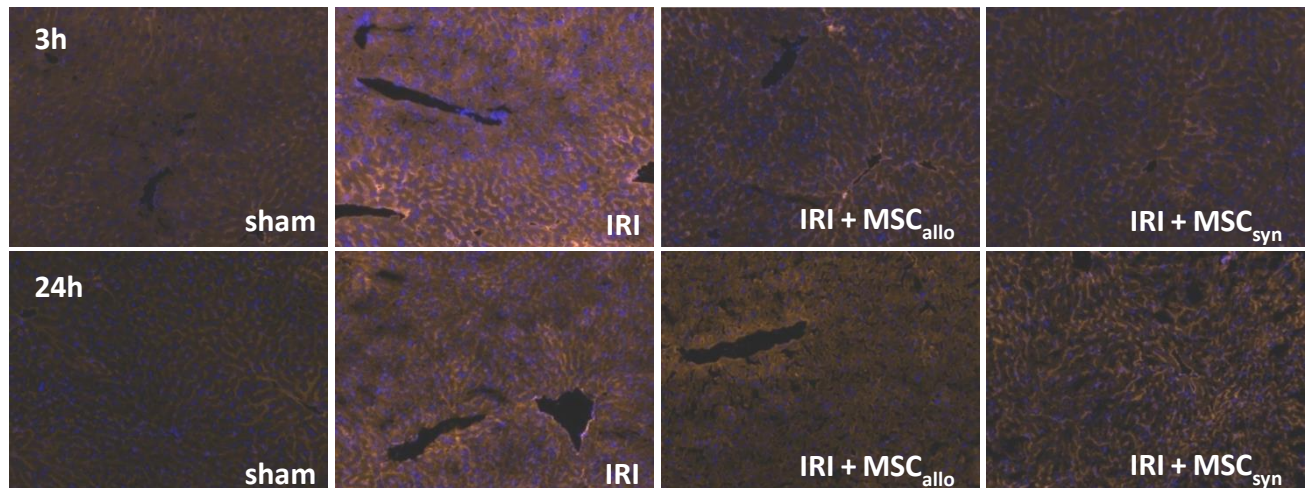


Abb. 17 ICAM 1 Färbung verschiedener Versuchsgruppen im Vergleich zeigt Expression des Adhäsionsmarkers ICAM 1 (200x Vergrößerung, alle Präparate gleichzeitig gefärbt und bei gleicher Belichtung abfotografiert, N=5)

Obere Reihe: Präparate der Gruppen sham, IRI, IRI + MSC_{allo}, IRI + MSC_{syn} zum Zeitpunkt 3 h

Untere Reihe: Präparate der Gruppen sham, IRI, IRI + MSC_{allo}, IRI + MSC_{syn} zum Zeitpunkt 24 h

Sowohl zum Zeitpunkt 3 h als auch zum Zeitpunkt 24 h sieht man in der Gruppe sham eine basale Expression des Adhäsionsmarkers ICAM 1. Die Gruppe IRI unterscheidet sich davon deutlich. An der Intensität der Färbung erkennt man, dass hier der Adhäsionsmarker hochreguliert wurde. Nach 3 h ist diese Hochregulation deutlicher ausgeprägt als nach 24 h. Im Gegensatz dazu ist sowohl bei der Gruppe IRI + MSC_{allo} als auch der Gruppe IRI + MSC_{syn} diese vermehrte Expression von ICAM 1 weder nach 3 h noch nach 24 h zu erkennen. Beide MSC Gruppen exprimieren im ICAM 1 auf basalem Niveau.

5. Diskussion

5.1. Beurteilung des verwendeten IRI Schädigungsmodell

Das für diese Arbeit verwendete Schädigungsmodell, erstmals etabliert von Abe et al. 2009,⁷³ hat sich als geeignetes Modell zur Untersuchung des Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber bestätigt. Zum einen erwies sich die IRI Operation als praktikabel und vergleichbar. Zum anderen konnte durch die IRI Operation ein am ALT-Wert gemessener, signifikanter, warmer Ischämie-Reperfusionsschaden erzeugt werden.

Genauer betrachtet erreichte der ALT Wert der IRI Gruppe drei Stunden nach Reperfusion einen maximalen und signifikanten Anstieg im Vergleich zu den beiden Vergleichsgruppen control und sham, der anschließend kontinuierlich wieder abfällt. Zum Zeitpunkt 48 h erreicht der ALT Wert der IRI Gruppe annähernd wieder basale Werte, was einen Regenerationsprozess nach diesem Zeitraum vermuten lässt. Es zeigte sich aber auch, dass dieser ALT Anstieg bei den einzelnen Tieren erhebliche schwankte. Mehrere Ursachen hierfür wären denkbar. Zum einen könnten 45 Minuten Ischämie ein zu kurz gewählter Zeitraum sein. Zum anderen stellte sich im Verlauf der Versuche heraus, dass nicht alle eingesetzten Aneurysma Klips einen gleich effektiven Gefäßverschluss hervorgerufen konnten.

Anhand der sham Gruppe konnte gezeigt werden, dass der Anstieg der Serumtransaminasen sowie die histologisch nachgewiesene Leberschädigung von der warmen Ischämie durch Abklemmen des Lig. hepatoduodenale herrührt und nicht allein durch den Stress der Prozedur für die Tiere, der Narkose oder der mechanischen Schädigung bei der Lebermobilisation. So überstiegen beispielsweise die ALT Werte der sham Tiere die basalen ALT Werte der control Tiere nicht nennenswert. Auch die histologischen Ergebnisse waren mit denen der unbeeinträchtigten control Tiere vergleichbar. Ähnliche Ergebnisse fand auch Abe et al. 2009⁷³ bei der Etablierung dieses Schädigungsmodells.

Durch verschiedene Färbemethoden konnte zudem bestätigt werden, dass es durch die hier erzeugte warme Ischämie in diesem IRI Schädigungsmodell zu verschiedenen Zelltodformen bei IRI Tieren kommt. Anhand des Tunel Assays konnten apoptotische Zellen nachgewiesen

werden. Durch verringerte Autofluoreszenz und auch in der HE Färbung waren apoptotische bzw. nekrotische Areale erkennbar.

5.2. MSC reduzieren die IRI Schädigung

Behandelt man IRI Tiere vor Operationsbeginn mit mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark, reduziert sich der Schaden an der Leber sowohl quantitativ als auch qualitativ sehr deutlich. Quantitativ konnte ein wesentlich geringerer ALT Anstieg bei mit MSC behandelten Tieren verzeichnet werden als bei IRI Tieren ohne Vorbehandlung. Alle Gruppen erreichten allerdings 48 Stunden nach Reperfusion wieder weitgehend basale ALT Werte. Dies lässt vermuten, dass vor allem die initiale Schädigung durch die IRI Operation anhand des Serum ALT Anstieges abgebildet wird. Hier kommen wahrscheinlich vor allem immunmodulierende Effekte der MSC zum Tragen. Außerdem ist es möglich, dass bei durch MSC behandelten Tieren erst gar kein derart gravierender IRI Schaden entsteht. Somit kann vermutet werden, dass die MSC die durch die Ischämie und anschließende Reperfusion ausgelöste Immunkaskade unterbinden. Inwiefern auch der regenerative Effekt der MSC eine Rolle spielt bleibt fraglich. Dieses Ergebnis bestätigt auch den durch Kanazawa et al. 2011⁸² beobachteten, abgemilderten ALT Anstieg in einem IRI Ratten Modell.

Im histologischen Vergleich konnte bei mit MSC behandelten Tieren ebenso eine deutlich geringere Schädigung festgestellt werden. IRI Tiere hatten im Vergleich zu den IRI + MSC Tieren makroskopisch einen höheren Anteil nekrotischer Areale, die zumeist auch wesentlich ausgedehnter waren. Dies wiederum bestätigt, dass es durch die MSC Behandlung wahrscheinlich zu einem wesentlich weniger ausgeprägten IRI Schaden kommt und Apoptose oder Nekrose verhindert werden kann.

Bemerkenswert ist auch, dass die Tiere vor allem von der Behandlung mit MSC allogener Herkunft profitieren. Tiere, die mit allogenen MSC behandelt wurden, hatten einen geringeren ALT Anstieg als mit syngenen MSC behandelte Tiere. Auch in der HE Färbung dieser Tiere konnten weniger nekrotische Areale als die mit syngenen MSC behandelten gefunden werden. Dieser Effekt wurde bereits bei durch MSC induzierte, verlängerte Akzeptanz bei Organtransplantationen beschrieben.^{49,63} Als Ursache hierfür kann diskutiert werden, dass MSC nicht, wie früher angenommen, immunprivilegiert sind.⁸³ MSC exprimieren nur MHC Klasse I^{low} und keine kostimulatorischen Oberflächenmoleküle. Das

lässt vermuten, dass MSC nur schwach immunogen sind.^{30,84} Vieles spricht allerdings dafür, dass allogene injizierte MSC vom Immunsystem erkannt werden und eine Immunreaktion auslösen.⁸³ Allogene injizierte MSC können beispielsweise eine T-Gedächtniszellantwort auslösen.⁸⁵ Da bekannt ist, dass MSC unter proinflammatorischer Umgebung aktiviert werden und vor allem dann immunmodulierende und immunsupprimierende Eigenschaften entwickeln, könnte die unterschiedliche Wirkung allogener MSC im Vergleich zu syngenen MSC in der durch allogene MSC ausgelösten Immunantwort begründet sein.

Diese Erkenntnis hat auch bedeutende therapeutische Konsequenz. Denn durch den Einsatz allogener MSC wäre die Herstellung spezifischer MSC Produkte für jeden einzelnen Patienten hinfällig und es könnten standardisierte, einheitliche, kostengünstigere Medikamente auf Basis allogener MSC verwendet werden, deren Erfolg besser vergleichbar wäre.

5.3. MSC reduzieren Einwanderung von Immunzellen

Durch verschiedene histologische Immunfluoreszenzfärbungen konnte die Beteiligung von Leukozyten, darunter aktivierte Granulozyten, und CD4 positiver Zellen am Ischämie-Reperfusionsschaden bestätigt werden. Trotz der vorherrschenden sterilen Umgebung kommt es zur Invasion von Immunzellen. Bei MSC behandelten Tieren konnte eine veränderte Migration von Immunzellen beobachtet werden.

Durch immunhistologische Färbung CD4 positiver Zellen in Präparaten der einzelnen Behandlungsgruppen und anschließende semiquantitative Auszählung dieser Zellen konnten Unterschiede hinsichtlich der Migration CD4 positiver Zellen nachgewiesen werden. Vergleicht man die IRI Gruppe mit der IRI + MSC_{allo} Gruppe konnten 24 Stunden nach Reperfusion signifikant weniger CD4 positive Zellen im Lebergewebe gefunden werden. Es scheint sich zu bestätigen, dass MSC in der Lage sind, auch am Ischämie-Reperfusionsschaden beteiligte CD4 positive Zellen an der Proliferation und Aktivierung zu hindern, wie bereits in anderen Situationen in der Literatur beschrieben.^{47,48} Als mögliche Ursache werden zum einen durch MSC ausgeschüttete, lösliche Faktoren wie Prostaglandin E₂, dass die T-Zell Antwort moduliert, angesehen.⁸⁶ Andererseits haben MSC die Fähigkeit, die Nitrit Oxidase Synthetase zu stimulieren und damit die Produktion von NO anzuregen, was wiederum die T-Zell Proliferation hemmt.⁸⁷ Außerdem exprimieren durch IFN- γ stimulierte MSC das Enzym Indoleamin 2,3-dioxygenase (IDO), welches durch

Verstoffwechslung von Tryptophan die Tryptophan abhängige T-Zell Proliferation hemmt.^{88,89} Zur Klärung der hier vorliegenden Ursachen bedarf es allerdings weiterer Forschung.

Im Vergleich zu CD4 positiven Zellen konnte bei GR1 positiven Zellen, also aktivierten Granulozyten, durch die MSC Behandlung keine signifikante Veränderung an Anzahl und Einwanderung festgestellt werden. Es ist denkbar, dass MSC erst zu einem späteren Zeitpunkt der durch den IRI Schaden ausgelösten Immunkaskade eingreift. Man nimmt an, dass Granulozyten neben anderen Zellen des angeborenen Immunsystems bereits zu einem relativ frühen Zeitpunkt der Immunkaskade durch DAMPS, ROS und Komplementaktivierung, ausgelöst von nekrotischen Zellen, aktiviert werden.^{9,11} Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems wird wiederum als Trigger zur Aktivierung CD4 positiver Zellen angesehen.⁹

5.4. MSC reduzieren Expression von ICAM 1

Bemerkenswert ist, dass die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM 1 durch Behandlung mit MSC deutlich abnimmt. Es ist bekannt, dass Adhäsionsmoleküle, wie unter anderem ICAM 1, durch Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine in durch IRI Schaden betroffenen Geweben hochreguliert werden.⁹ Dies konnte auch in der IRI Gruppe im Vergleich zur sham Gruppe beobachtet werden. In den beiden MSC behandelten Gruppen ist in immunhistologischen Färbungen gleichermaßen keine Hochregulation festzustellen. Dieses Erkenntnis deutet darauf hin, dass durch MSC Immunmodulation stattfindet. Der genaue Mechanismus hierbei ist auch noch unbekannt und erfordert weitergehende Forschung. Bisher ist bekannt, dass MSC die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. INF- μ , TNF- α gehemmt und gleichzeitig die Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine begünstigt wird.⁵⁵ Zudem sind die MSC selber in der Lage, antiinflammatorische Zytokine auszuschütten, z.B. IL-10 oder TGF- β .⁶⁴ Es steht zur Diskussion, ob dies als Ursache der fehlenden Hochregulierung zu betrachten ist. ICAM 1 vermittelt die Migration von Leukozyten in geschädigtes Gewebe. Wird weniger ICAM 1 exprimiert, kann davon ausgegangen werden, dass auch die Leukozyteninfiltration gehemmt und somit die Entzündungsreaktion und Zellschädigung verringert wird.

5.5. Fazit

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit mesenchymalen Stammzellen signifikant weniger CD4 positive Zellen in durch Ischämie-Reperfusion geschädigtes Gewebe einwandern. Außerdem können weniger Nekrotische Areale bei mit MSC behandelten Tieren nachgewiesen werden und auch die durch IRI verursachte Hochregulation des Adhäsionsmarker ICAM 1 kann nach MSC Behandlung nicht mehr belegt werden. Bemerkenswert ist, dass durch allogene MSC eine positivere Wirkung auf den IRI Schaden erzeugt werden kann als durch syngene MSC. Abbildung 18 zeigt eine Zusammenfassung der Hauptergebnisse, die aus dieser Arbeit gewonnen werden können.

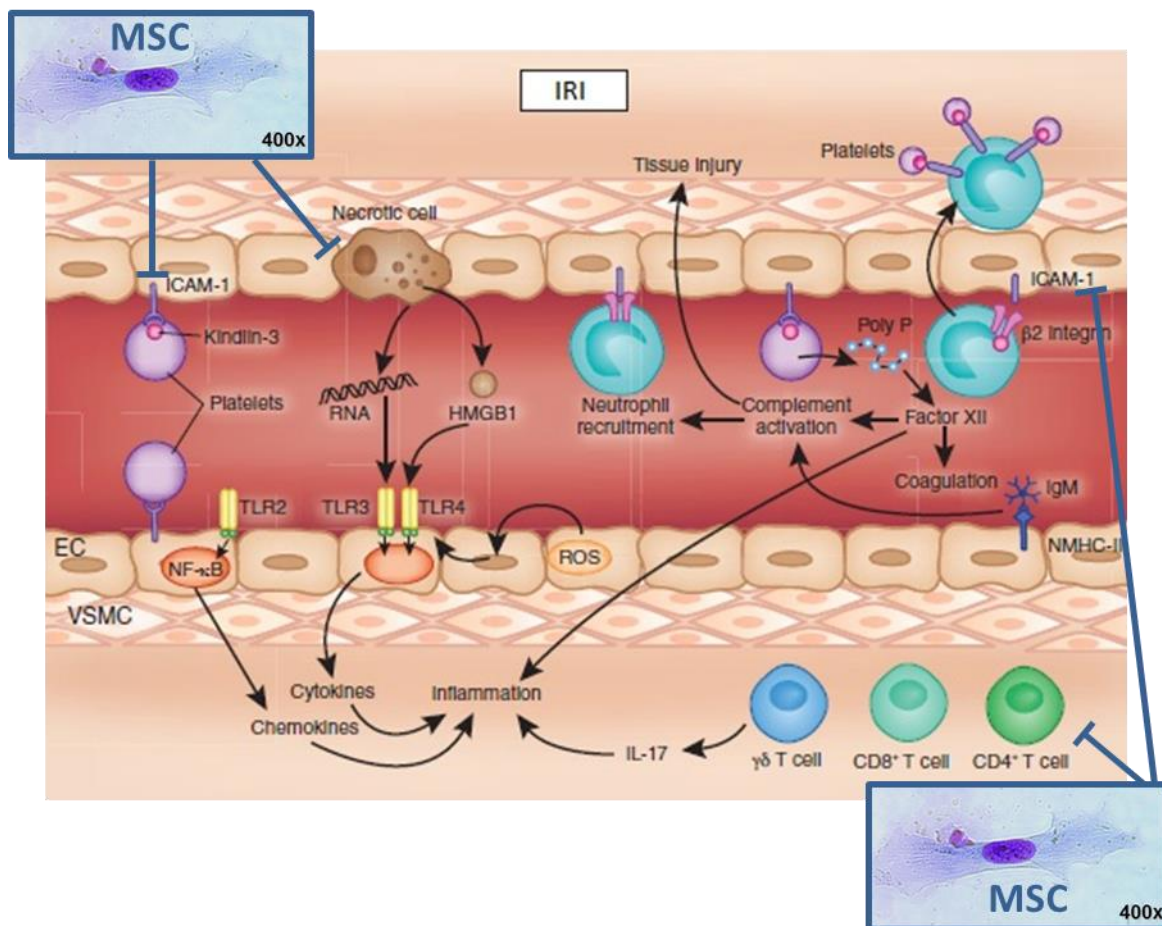


Abb. 18: MSC beeinflussen IRI Schaden: durch Behandlung mit MSC können weniger Apoptotische Areale, eingewanderte CD4 positive Zellen und geringere ICAM 1 Expression festgestellt werden; Grafik aus *nature medicine* verändert nach Eltzschig et al. 2011¹¹

Diese Ergebnisse sind vielversprechend im Hinblick auf eine therapeutische Funktion der MSC gegenüber dem Ischämie-Reperfusionsschaden. Somit könnte sich der Einsatz von MSC in mehrfacher Hinsicht positiv auf die Probleme verbunden mit Organtransplantationen auswirken: sowohl als Einsatz in Kombination mit niedrig dosierten Immunsuppressiva, was die in Kürze beginnende MiSOT I Phase I Studie am Uniklinikum Regensburg klären wird,⁷¹ als auch gleichzeitig als Mittel gegen den Ischämie-Reperfusionsschaden und den damit verbunden Problemen wie sofortige Abstoßungsreaktionen, Transplantatversagen und Retransplantationen.

5.6. Ausblick

Diese Dissertation konnte einige Fragen in Bezug auf den protektiven Einfluss von mesenchymalen Stammzellen auf den Ischämie-Reperfusionsschaden klären. Trotzdem bleiben immer noch viele Fragen offen, die weiterer Forschung bedürfen.

- Alle vorliegenden Ergebnisse fundieren auf einem Mausmodell der hepatischen Ischämie. Wie immer bei der Verwendung eines Mausmodells ist fraglich, inwiefern sich diese Ergebnisse auch auf den menschlichen Organismus übertragen lassen. Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit ein warmer Ischämie-Reperfusionsschaden erzeugt. Aus diesem Grund wäre es von Interesse, ob MSC auch protektiv auf den kalten Ischämie-Reperfusionsschaden wirken.
- Des Weiteren bleibt offen, mit welchen genauen Mechanismen die MSC Einfluss auf CD4 positive Zellen nehmen. Es wäre auch von großem Interesse herauszufinden, um welche Zellpopulation es sich genau bei den CD4 positiven Zellen handelt, die von den MSC beeinflusst werden. Sind das nur CD4 positive T-Zellen oder auch beispielsweise CD4 positive Makrophagen?
- Warum verändern MSC die Einwanderung GR1 positiver Zellen nicht? Auch in Bezug auf diese Tatsache kann man nur Vermutungen anstellen. Des Weiteren wäre zu klären, auf welche anderen Immunzellen MSC noch modulierend wirken.
- Nehmen MSC auch Einfluss auf andere Adhäsionsmarker als ICAM1 und wie genau verändern MSC die Expression dieser Marker? Auch auf diese Frage sollten noch Antworten gefunden werden.

6. Zusammenfassung

Der gravierende Mangel an geeigneten Spenderlebern macht den Einsatz neuer, effektiver Behandlungsmethoden notwendig. Gerade der während einer Organtransplantation bisher unvermeidliche Ischämie – Reperfusionsschaden und den damit häufig verbundenen Abstoßungsreaktionen und Transplantatversagen stellt ein limitierender Faktor für erfolgreiche Lebertransplantationen dar. In vielen Forschungsgebieten hat der Einsatz mesenchymaler Stammzellen und deren immunmodulierenden und regenerativen Eigenschaften sehr hoffnungsvolle Ergebnisse erzielt, sodass die Etablierung einer Zelltherapie mit mesenchymalen Stammzellen in der Organtransplantation in den Mittelpunkt der aktuellen Forschung gerückt ist. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob mesenchymale Stammzellen einen protektiven Einfluss auf den Ischämie-Reperfusionsschaden in einem Mausmodell der Leberischämie haben.

Hierfür wurde ein Schädigungsmodell gewählt, das 45-minütige warme Ischämie von circa 70 % der Mausleber erzeugt. Dazu wurden fünf Versuchsgruppen mit jeweils 15 Mäusen etabliert, eine Kontrollgruppe, eine sham operierte Gruppe, eine Gruppe, bei denen durch 45-minütiges Abklemmen des Lig. hepatoduodenale eine warme Ischämie erzeugt wurde, und zwei Treatment Gruppen, die 30 min vor der erzeugten 45-minütigen, warmen Ischämie mit jeweils $0,5 \times 10^6$ intravenös applizierten, syngenen beziehungsweise allogenen mesenchymalen Stammzellen vorbehandelt wurden.

Anhand der Bestimmung des weitgehend leberspezifischen Serum ALT Wertes 3, 24, 48 und 72 Stunden nach Reperfusion und histologischer beziehungsweise immunhistochemischer Färbemethoden konnte gezeigt werden, dass durch das hier gewählte Schädigungsmodell eine signifikante warme Ischämie hervorgerufen wird. Des Weiteren zeigte sich eine Beteiligung von CD11b, GR1 sowie CD4 positiven Immunzellen am Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber trotz der vorherrschenden sterilen Umgebung. Durch den Einsatz mesenchymaler Stammzellen konnte eine signifikant verringerte Einwanderung CD 4 positiver Zellen in durch Ischämie und Reperfusion geschädigtes Lebergewebe sowie ein geringes Ausmaß an nekrotischen und apoptotischen Arealen festgestellt werden. Hierfür sind vermutlich die immunmodulatorischen und regenerativen Eigenschaften der mesenchymalen Stammzellen verantwortlich. Im Gegensatz dazu änderte sich das

Einwanderungsverhalten GR1 positiver Zellen durch eine Zelltherapie mit mesenchymalen Stammzellen nicht signifikant. Die Hochregulation des Adhäsionsmarkers ICAM 1 durch den Ischämie-Reperfusionsschaden war bei durch mesenchymale Stammzellen vorbehandelten Tieren im Gegensatz zu Tieren, bei denen allein ein Ischämie-Reperfusionsschaden erzeugt wurde, nicht mehr nachzuvollziehen. Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass die Behandlung mit allogenen mesenchymalen Stammzellen Vorteile gegenüber dem Einsatz syngener mesenchymaler Stammzellen aufwies. Dieser Effekt könnte sich durch eine Immunstimulation durch allogene mesenchymale Stammzellen erklären lassen, der bei syngenen mesenchymalen Stammzellen möglicherweise ausbleibt.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass der Einsatz mesenchymaler Stammzellen zur Protektion gegen den Ischämie-Reperfusionsschaden im Rahmen von Lebertransplantationen vielversprechend ist. Inwieweit die auf einem Mausmodell basierenden Erkenntnisse auf den menschlichen Organismus übertragbar sind und wie genau mesenchymale Stammzellen auf CD4 positive Zellen, auf andere Adhäsionsmarker als ICAM 1 und auf andere Bestandteile des Immunsystems Einfluss nehmen, bedarf weiterer Forschung.

7. Literaturverzeichnis

1. Roemeling-van Rhijn, M., Weimar, W. & Hoogduijn, M.J. Mesenchymal stem cells: application for solid-organ transplantation. *Current opinion in organ transplantation* **17**, 55-62 (2012).
2. Eurotransplant. Eurotransplant Statistics - 2011. (<http://www.eurotransplant.org/>, 2012).
3. Dienstag, J.L. & Cosimi, A.B. Liver Transplantation — A Vision Realized. *New England Journal of Medicine* **367**, 1483-1485 (2012).
4. Burra, P. & Freeman, R. Trends in liver transplantation 2011. *Journal of hepatology* **56**, S101-S111 (2012).
5. Shi, Z.R., Yan, L.N. & Du, C.Y. Donor safety and remnant liver volume in living donor liver transplantation. *World journal of gastroenterology : WJG* **18**, 7327-7332 (2012).
6. Emre, S. & Umman, V. Split liver transplantation: an overview. *Transplantation proceedings* **43**, 884-887 (2011).
7. Pratschke, J., Mittler, J. & Neuhaus, P. [Expanding the liver donor pool through extended-criteria donation]. *Der Chirurg; Zeitschrift fur alle Gebiete der operativen Medizin* **79**, 130-134 (2008).
8. Schrem, H., et al. [Extended donor criteria defined by the German Medical Association : study on their usefulness as prognostic model for early outcome after liver transplantation]. *Der Chirurg; Zeitschrift fur alle Gebiete der operativen Medizin* **83**, 980-988 (2012).
9. Zhai, Y., Petrowsky, H., Hong, J.C., Busuttil, R.W. & Kupiec-Weglinski, J.W. Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation—from bench to bedside. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* (2012).
10. Busuttil, R.W. & Tanaka, K. The utility of marginal donors in liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* **9**, 651-663 (2003).
11. Eltzhig, H.K. & Eckle, T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nature medicine* **17**, 1391-1401 (2011).
12. McDonald, B., et al. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science (New York, N.Y.)* **330**, 362-366 (2010).
13. Satpute, S.R., et al. The role for T cell repertoire/antigen-specific interactions in experimental kidney ischemia reperfusion injury. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **183**, 984-992 (2009).
14. Souidi, N., Stolk, M. & Seifert, M. Ischemia-reperfusion injury: beneficial effects of mesenchymal stromal cells. *Current opinion in organ transplantation* **18**, 34-43 (2013).
15. Nankivell, B.J. & Kuypers, D.R.J. Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss. *The Lancet* **378**, 1428-1437 (2011).
16. Klein, M., et al. Preconditioning of donor livers with prostaglandin I₂ before retrieval decreases hepatocellular ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* **67**, 1128-1132 (1999).
17. Khan, A.W., Fuller, B.J., Shah, S.R., Davidson, B.R. & Rolles, K. A prospective randomized trial of N-acetyl cysteine administration during cold preservation of the donor liver for transplantation. *Annals of hepatology* **4**, 121-126 (2005).
18. Hilmi, I.A., et al. N-acetylcysteine does not prevent hepatorenal ischaemia-reperfusion injury in patients undergoing orthotopic liver transplantation. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **25**, 2328-2333 (2010).
19. Baskin-Bey, E.S., et al. Clinical Trial of the Pan-Caspase Inhibitor, IDN-6556, in Human Liver Preservation Injury. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **7**, 218-225 (2007).
20. Lang, J.D., Jr., et al. Inhaled NO accelerates restoration of liver function in adults following orthotopic liver transplantation. *The Journal of clinical investigation* **117**, 2583-2591 (2007).

21. Busuttill, R.W., *et al.* rPSGL-Ig for improvement of early liver allograft function: a double-blind, placebo-controlled, single-center phase II study. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **11**, 786-797 (2011).
22. Bogetti, D., *et al.* Thymoglobulin induction protects liver allografts from ischemia/reperfusion injury. *Clinical transplantation* **19**, 507-511 (2005).
23. Kotsch, K., *et al.* Methylprednisolone therapy in deceased donors reduces inflammation in the donor liver and improves outcome after liver transplantation: a prospective randomized controlled trial. *Annals of surgery* **248**, 1042-1050 (2008).
24. Kristo, I., *et al.* Effect of intraportal infusion of tacrolimus on ischaemic reperfusion injury in orthotopic liver transplantation: a randomized controlled trial. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* **24**, 912-919 (2011).
25. Frey-Vasconcells, J., Whittlesey, K.J., Baum, E. & Feigal, E.G. Translation of stem cell research: points to consider in designing preclinical animal studies. *Stem cells translational medicine* **1**, 353-358 (2012).
26. Friedenstein, A.J., Piatetzky, S., II & Petrakova, K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of embryology and experimental morphology* **16**, 381-390 (1966).
27. Dazzi, F., Lopes, L. & Weng, L. Mesenchymal stromal cells: a key player in 'innate tolerance'? *Immunology* **137**, 206-213 (2012).
28. Friedenstein, A.J., Petrakova, K.V., Kurolesova, A.I. & Frolova, G.P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* **6**, 230-247 (1968).
29. Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F. & Kulagina, N.N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology* **4**, 267-274 (1976).
30. Singer, N.G. & Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annual review of pathology* **6**, 457-478 (2011).
31. Salem, H.K. & Thiemermann, C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells* **28**, 585-596 (2010).
32. Bianco, P. & Gehron Robey, P. Marrow stromal stem cells. *The Journal of clinical investigation* **105**, 1663-1668 (2000).
33. Beyer Nardi, N. & da Silva Meirelles, L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handbook of experimental pharmacology*, 249-282 (2006).
34. Prockop, D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science (New York, N.Y.)* **276**, 71-74 (1997).
35. Sethe, S., Scutt, A. & Stolzing, A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing research reviews* **5**, 91-116 (2006).
36. English, K., French, A. & Wood, K.J. Mesenchymal stromal cells: facilitators of successful transplantation? *Cell stem cell* **7**, 431-442 (2010).
37. Jiang, Y., *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**, 41-49 (2002).
38. Sasaki, M., *et al.* Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **180**, 2581-2587 (2008).
39. Lee, K.D., *et al.* In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* **40**, 1275-1284 (2004).
40. Horwitz, E.M., *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **7**, 393-395 (2005).
41. Dominici, M., *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315-317 (2006).
42. Bartholomew, A., *et al.* Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental hematology* **30**, 42-48 (2002).

43. Phinney, D.G. & Prockop, D.J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* **25**, 2896-2902 (2007).
44. Caplan, A.I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *The Journal of pathology* **217**, 318-324 (2009).
45. Caplan, A.I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *Journal of cellular physiology* **213**, 341-347 (2007).
46. Ren, G., *et al.* Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells* **27**, 1954-1962 (2009).
47. Di Nicola, M., *et al.* Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* **99**, 3838-3843 (2002).
48. Ding, Y., Bushnell, A. & Wood, K.J. Mesenchymal stem-cell immunosuppressive capabilities: therapeutic implications in islet transplantation. *Transplantation* **89**, 270-273 (2010).
49. Casiraghi, F., *et al.* Pretransplant infusion of mesenchymal stem cells prolongs the survival of a semiallogeneic heart transplant through the generation of regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **181**, 3933-3946 (2008).
50. Long, E. & Wood, K.J. Regulatory T cells in transplantation: transferring mouse studies to the clinic. *Transplantation* **88**, 1050-1056 (2009).
51. Rasmusson, I., Uhlin, M., Le Blanc, K. & Levitsky, V. Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes. *Journal of leukocyte biology* **82**, 887-893 (2007).
52. Prigione, I., *et al.* Reciprocal interactions between human mesenchymal stem cells and gammadelta T cells or invariant natural killer T cells. *Stem Cells* **27**, 693-702 (2009).
53. Asari, S., *et al.* Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. *Experimental hematology* **37**, 604-615 (2009).
54. Nauta, A.J., Kruisselbrink, A.B., Lurvink, E., Willemze, R. & Fibbe, W.E. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **177**, 2080-2087 (2006).
55. Zhang, B., *et al.* Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2-dependent regulatory dendritic cell population. *Blood* **113**, 46-57 (2009).
56. Spaggiari, G.M., *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* **111**, 1327-1333 (2008).
57. LaRosa, D.F., Rahman, A.H. & Turka, L.A. The innate immune system in allograft rejection and tolerance. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **178**, 7503-7509 (2007).
58. Nemeth, K., *et al.* Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature medicine* **15**, 42-49 (2009).
59. Eggenhofer, E. Mesenchymal stem cells in organ and tissue transplantation: one for all seasons? *Current opinion in organ transplantation* **18**, 22-23 (2013).
60. Kusne, S., *et al.* Infections after liver transplantation. An analysis of 101 consecutive cases. *Medicine* **67**, 132-143 (1988).
61. Kalil, A.C., Dakroub, H. & Freifeld, A.G. Sepsis and solid organ transplantation. *Current drug targets* **8**, 533-541 (2007).
62. Vajdic, C.M. & van Leeuwen, M.T. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **125**, 1747-1754 (2009).
63. Popp, F.C., *et al.* Mesenchymal stem cells can induce long-term acceptance of solid organ allografts in synergy with low-dose mycophenolate. *Transplant Immunology* **20**, 55-60 (2008).
64. Ge, W., *et al.* Infusion of mesenchymal stem cells and rapamycin synergize to attenuate alloimmune responses and promote cardiac allograft tolerance. *American journal of*

- transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **9**, 1760-1772 (2009).
65. Eggenhofer, E., *et al.* Mesenchymal stem cells together with mycophenolate mofetil inhibit antigen presenting cell and T cell infiltration into allogeneic heart grafts. *Transpl Immunol* **24**, 157-163 (2011).
 66. Yanez, R., *et al.* Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells* **24**, 2582-2591 (2006).
 67. Tan, J., *et al.* Induction therapy with autologous mesenchymal stem cells in living-related kidney transplants: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **307**, 1169-1177 (2012).
 68. Hoogduijn, M.J., *et al.* Advancement of mesenchymal stem cell therapy in solid organ transplantation (MISOT). *Transplantation* **90**, 124-126 (2010).
 69. Franquesa. Mesenchymal Stem Cells in Solid Organ Transplantation (MiSOT) 4th meeting: Lessons learned from first clinical trials. (2013).
 70. Dahlke, M.H., *et al.* Toward MSC in solid organ transplantation: 2008 position paper of the MISOT study group. *Transplantation* **88**, 614-619 (2009).
 71. Popp, F.C., *et al.* Safety and feasibility of third-party multipotent adult progenitor cells for immunomodulation therapy after liver transplantation--a phase I study (MISOT-I). *Journal of translational medicine* **9**, 124 (2011).
 72. GV-SOLAS. Tiergerechte Haltung: Labormäuse. (www.gv-solas.de, 2007).
 73. Abe, Y., *et al.* Mouse model of liver ischemia and reperfusion injury: method for studying reactive oxygen and nitrogen metabolites in vivo. *Free radical biology & medicine* **46**, 1-7 (2009).
 74. Eggenhofer, E., *et al.* Features of synergism between mesenchymal stem cells and immunosuppressive drugs in a murine heart transplantation model. *Transpl Immunol* **25**, 141-147 (2011).
 75. GV-SOLAS & TVT. Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren. (www.gv-solas.de, 2009).
 76. Tonnesen, M.G. Neutrophil-endothelial cell interactions: mechanisms of neutrophil adherence to vascular endothelium. *The Journal of investigative dermatology* **93**, 53S-58S (1989).
 77. Springer, T.A. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**, 425-434 (1990).
 78. Lawson, C. & Wolf, S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacological reports : PR* **61**, 22-32 (2009).
 79. Ward, P.A. & Marks, R.M. The acute inflammatory reaction. *Current Opinion in Immunology* **2**, 5-9 (1989).
 80. Zhai, Y., Busuttil, R.W. & Kupiec-Weglinski, J.W. Liver ischemia and reperfusion injury: new insights into mechanisms of innate-adaptive immune-mediated tissue inflammation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **11**, 1563-1569 (2011).
 81. Kawai, K., *et al.* CD11b-mediated migratory property of peripheral blood B cells. *The Journal of allergy and clinical immunology* **116**, 192-197 (2005).
 82. Kanazawa, H., *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate hepatic ischemia reperfusion injury in a rat model. *PloS one* **6**, e19195 (2011).
 83. Popp, F.C., *et al.* Mesenchymal stem cells can affect solid organ allograft survival. *Transplantation* **87**, S57-62 (2009).
 84. Hoogduijn, M.J., *et al.* The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. *International immunopharmacology* **10**, 1496-1500 (2010).
 85. Nauta, A.J., *et al.* Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood* **108**, 2114-2120 (2006).

86. Aggarwal, S. & Pittenger, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* **105**, 1815-1822 (2005).
87. Sato, K., *et al.* Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* **109**, 228-234 (2007).
88. Meisel, R., *et al.* Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* **103**, 4619-4621 (2004).
89. Fallarino, F., *et al.* The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **176**, 6752-6761 (2006).

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen ganz herzlich bedanken, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt besonders Herrn **Prof. Dr. med Marc H. Dahlke** für die Bereitstellung und ganz hervorragende Betreuung dieser Forschungsarbeit und immerwährende Unterstützung während meines Studiums.

Ganz besonders herzlich danke ich auch Frau **Dr. rer. nat Elke Eggenhofer** für die beste Betreuung, die man sich wünschen kann. Sie hat mich geduldig von Anfang an mit außerordentlichem Engagement bei dieser Arbeit fachlich und persönlich betreut und ist mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Vielen Dank dafür!

Ich danke auch allen Mitarbeitern im Labor, allen voran Frau **Teresa Mark**, Frau **My-Linh Ly** und Frau **Irina Kuçuk** für die wunderbare Unterstützung und Geduld bei der Durchführung meiner Experimente, die gute Zusammenarbeit und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Ein großer Dank geht auch an Frau **Barbara Primbs** für die abschließende sprachliche Korrektur dieser Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich **meiner Familie** und meinem **Freund Tony** ganz herzlich, dass sie immer für mich da sind und in allen Lebenslagen unterstützen.

9. Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, Oktober 2014