

Aus dem Institut für Tierpathologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin  
und der  
Interdisziplinären Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation  
des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

---

**Autologe mesenchymale Stromazellen im  
Ischämie/Reperfusion-induzierten akuten  
Nierenversagen im Schweinmodell**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Janna Boche  
Tierärztin aus Hamburg

Berlin 2011

Journal-Nr.: 3555

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Achim Gruber  
Zweiter Gutachter: PD Dr. Claudia Lange  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

stem cells, renal failure, pigs, animal models, ischaemia, mixed lymphocyte  
reaction, glomerular filtration rate

Tag der Promotion: 31.01.2013

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen  
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über  
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-269-4

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2011**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder  
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in  
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,  
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch  
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der  
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von  
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written  
authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

Für meinen Vater

## Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>15</b>
<b>1.1</b>	<b>Stammzelle</b>	<b>15</b>
1.1.1	Charakterisierung der Stammzelle	15
1.1.2	Die mesenchymale Stromazelle	17
1.1.3	Medizinische Bedeutung der mesenchymalen Stromazelle	21
<b>1.2</b>	<b>Akutes Nierenversagen</b>	<b>23</b>
1.2.1	Definition	23
1.2.2	Pathophysiologie	25
1.2.3	Therapie	27
1.2.4	Prognose	30
1.2.5	Mesenchymale Stromazellen als Therapiemöglichkeit im akuten Nierenversagen	31
<b>1.3</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>32</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methode</b>	<b>35</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>35</b>
2.1.1	Gebrauchschemikalien	35
2.1.2	Gebrauchslösungen	36
2.1.2.1	Lösungen für die adipogene Differenzierung	36

2.1.2.2	Lösungen für die chondrogene Differenzierung	37
2.1.2.3	Lösungen für die osteogene Differenzierung	38
2.1.3	Geräte	38
2.1.4	Medikamente	39
2.1.5	Verbrauchsmaterialien	39
2.1.6	Antikörper	41
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>42</b>
2.2.1	Isolation und Kultivierung porciner mesenchymaler Stromazellen	42
2.2.2	Einfrieren porciner mesenchymaler Stromazellen	43
2.2.3	Charakterisierung porciner mesenchymaler Stromazellen	44
2.2.3.1	Proliferation von porcinen MSC in vitro	44
2.2.3.2	Phenotypisierung über Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung	44
2.2.3.3	Differenzierung porciner mesenchymaler Stromazellen	45
2.2.3.3.1	Adipogene Differenzierung	45
2.2.3.3.2	Chondrogene Differenzierung	46
2.2.3.3.3	Osteogene Differenzierung	48
2.2.4	Gemischte Lymphozytenreaktion (Mixed-Lymphocyte-Reaction/MLR)	48
2.2.5	Operative Methode	51
2.2.5.1	Versuchsaufbau	51
2.2.5.2	Entnahme von Knochenmark	58
2.2.5.3	Anästhesie für die Operation	59
2.2.5.4	Einleitung der Operation	60
2.2.5.5	Narkoseausleitung	61
2.2.5.6	Notfallmedikation	61
2.2.5.7	Anästhesie und perioperative Versorgung der Schweine	62

2.2.5.8	Chirurgisches Vorgehen zur Induktion des akuten Nierenversagens und Transplantation der mesenchymalen autologen Stromazellen	64
2.2.5.9	Legen des zentralen Venenkatheters (ZVK)	68
2.2.5.10	Legen des Blasenkatheters	68
2.2.5.11	Postoperative Versorgung, Blut- und Urinentnahme	69
2.2.6	Postmortale Diagnostik	70
2.2.6.1	Euthanasie, Sektion und Probenentnahme	70
2.2.6.2	Einbettung und Histologie der Proben	71
2.2.6.3	Untersuchung der Fehldifferenzierung von mesenchymalen Stromazellen	72
2.3	Statistik (statistische Berechnungen)	73
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>74</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung von mesenchymalen Stromazellen</b>	<b>74</b>
3.1.1	Wachstumskurven	74
3.1.2	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS: fluorescence activated cell sorting)	76
3.1.3	Differenzierung	80
3.1.4	Untersuchung der T-Zell-Suppression durch MSC in vitro	83
<b>3.2</b>	<b>Operative Methode</b>	<b>85</b>
3.2.1	Überlebensrate und Tierverluste	85
3.2.2	Etablierung der Methode	86
3.2.2.1	Bestimmung der optimalen Abklemmzeit zur Induktion des akuten Nierenversagens	86

3.2.2.2	Der Anstieg des Serumkreatininwertes nach Induktion des akuten Nierenversagens beim männlichen und weiblichen Schwein	88
3.2.3	Serumwerte	90
3.2.3.1	Kreatinin	90
3.2.3.2	Harnstoff	92
3.2.3.3	Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)	94
3.2.3.4	Elektrolyte	97
3.2.3.4.1	Natrium	97
3.2.3.4.2	Kalium	98
3.2.4	Urinwerte	100
3.2.5	Vergleich eingefrorene und frisch transplantierte mesenchymale Stromazellen	101
<b>3.3</b>	<b>Postmortale Ergebnisse</b>	<b>103</b>
3.3.1	Fehldifferenzierung der mesenchymalen Stromazellen	103
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>105</b>
<b>4.1</b>	<b>Schwein als Versuchstier</b>	<b>105</b>
<b>4.2</b>	<b>Methodik der Infarktsetzung</b>	<b>107</b>
<b>4.3</b>	<b>Narkose</b>	<b>109</b>
<b>4.4</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>111</b>
4.4.1	Überlebensrate	111
4.4.2	Charakterisierung der mesenchymalen Stromazellen	111
4.4.3	Serum- und Urinwerte	113

4.4.4	Gemischte Lymphozytenreaktion (MLR)	115
4.4.5	Histologie	116
4.4.6	Fehldifferenzierung	127
<b>4.5</b>	<b>Schlussfolgerung und Ausblick</b>	<b>128</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>130</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>132</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>134</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>139</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>140</b>
<b>10</b>	<b>Publikationsverzeichnis</b>	<b>159</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung</b>	<b>160</b>
<b>12</b>	<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>161</b>

## **I Abkürzungsverzeichnis**

- A. Arterie (lat. arteria)
- a.d. aqua dest (destilliertes Wasser)
- Aa. Arterien (lat. arteriae)
- abs. absteigend
- ACE Angiotensin konvertierendes Enzym (engl. Angiotensin Converting Enzyme)
- AK Antikörper
- ANA antinukleäre Antikörper
- ANCA Anti-Neutrophilen-Cytoplasmatische Antikörper
- ANV Akutes Nierenversagen
- ATP Adenosintriphosphat
- Autol. Autolog
- BB Blutbild
- Bcl-2 B-Zell Lymphom (engl. B-cell lymphoma 2)
- BD Becton Dickinson
- bFGF basic Fibroblast Growth Factor
- CaCl<sub>2</sub> Calciumchlorid
- CAVH kontinuierliche arteriovenöse Hämofiltration
- CAVHD kontinuierliche arteriovenöse Hämodialyse
- CD Unterscheidungsgruppen (engl. Cluster of Differentiation)
- CFU-F Colony-Forming Unit Fibroblast
- CK Creatinkinase
- Crea Creatinin

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

- CVVH kontinuierliche venovenöse Hämofiltration
- CVVHD kontinuierliche venovenöse Hämodialyse
- DMEM Dulbeccos` s Modified Eagle Medium
- DMSO Dimethyl Sulfoxide
- EAE Experimentelle Allergische Enzephalomyelitis oder autoimmune Enzephalomyelitis
- EDTA Ethylendiamintetraacetat
- EGF Epidermalwachstumsfaktor (engl. Epidermal Growth Factor)
- EKG Elektrokardiogramm
- et al. et alii (und andere)
- EZR Extrazellularraum
- F Glomeruläre Filtrationsfläche
- FACS Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (engl. Fluorescence Activated Cell Sorting)
- FCS fötales Kälberserum (engl. Fetal Calf Serum)
- FITC Fluoresceinisothiocyanat
- FSC Vorwärtsstreulicht (engl. Forward Scatter)
- g Gramm od. Erschwerebeschleunigung
- G-CSF Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (engl. Granulocyte-Colony Stimulating Factor)
- GFR Glomeruläre Filtrationsrate
- GmbH Gesellschaft mit beschränkter Haftung
- GN Glomerulonephritis
- GvHD Transplantat-Wirt Reaktion (engl. Graft-versus-Host Disease)
- Gy Gray

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

- H<sub>2</sub>O Wasser
- HE Hämaun-Eosin
- HGF blutbildener Wachstumsfaktor (engl. Hematopoetic Growth Factor)
- hMSC menschliche mesenchymale Stromazelle (engl. human Mesenchymal Stromal Cell)
- HUS hämolytisch-urämisches Syndrom
- I.E. Internationale Einheit
- i.m. intramuskulär
- Ig Immunglobulin
- IGF insulinähnlicher Wachstumsfaktor (engl. Insulin-like Growth Factor)
- IL Interleukin
- ISCT **I**nternational **S**ociety for **C**ellular **T**herapy
- IU Internationale Einheit (engl. International Unit)
- IZR Intrazellularraum
- k Wasserdurchlässigkeit
- K Kalium
- KDOQI Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
- Kf Filtrationskoeffizient
- KGW Körpergewicht
- Ki Proliferationsmarker (Ki steht für Kiel und weist auf das Institut für Pathologie der Universitätsklinik Kiel hin)
- KIM Nierenverletzungs-Molekül (engl. Kidney Injury Molecule)
- Kontr. Kontrolle
- Konz. Konzentration
- Krea Kreatinin

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

- LBP Lipopolysaccharid-Bindungsprotein
- LDH Lactatdehydrogenase
- M molar
- m männlich
- M. Muskel (lat. musculus)
- MG Molekulargewicht
- MgCl<sub>2</sub> Magnesiumchlorid
- MHC Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. Major Histocompatibility Complex)
- MLR Mixed-Lymphocyte-Reaction
- mM Millimolar
- mmol Millimol
- mOsm Milliosmol
- MSC Mesenchymale Stromazelle (engl. Mesenchymal Stromal Cell)
- N. Nerv (lat. nervus)
- NaCl Natriumchlorid
- NGAL Neutrophil-Gelatinase-assoziierte Lipocalin (engl. neutrophil gelatinease-associated lipocalin)
- OP Operation
- p Signifikanzwert
- PAS Perjodsäure-Schiff-Reagens
- PBMC mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl. Peripheral Blood Mononuclear Cells)
- PBow Druck in der Bowman-Kapsel

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

- PBS           phosphatgepufferte Salzlösung (engl. Phosphate Buffered Saline)
- Peff           effektiver Filtrationsdruck
- pH            pondus Hydrogenii (Potenz und Maß für Wasserstoffionenkonzentration)
- PHA           Phytohämagglutinin
- Pkap          Blutdruck in den Glomeruluskapillaren
- pMSC         schweinishche mesenchymale Stromazelle (engl. porcine Mesenchymale Stromal Cell)
- PMT          Photomultiplier tubes (Lichtdetektoren)
- SSC          Seitwärtsstreulicht (engl. Side Scatter)
- TGF          transformierender Wachstumsfaktor (engl. Transforming Growth Factor)
- TTP          thrombotisch-thrombopenische Purpura
- UKE          Universitätsklinikum Eppendorf
- USP          engl. United States Pharmacopeia (Maß für die Fadenstärke)
- V.            Vene (lat. vena)
- VEGF         vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (engl. Vascular Endothelial Growth Factor)
- w            weiblich
- ZVK          Zentraler Venenkatheter



# **1 Einleitung**

## **1.1 Stammzelle**

### **1.1.1 Charakterisierung der Stammzelle**

Als Stammzellen werden Zellen in einem undifferenzierten Entwicklungsstatus bezeichnet. Sie können sich durch Zellteilung unbegrenzt replizieren und eine Mischung von Nachkommen bilden, und zwar sowohl Tochterzellen, die wie ihre Elternzellen undifferenziert bleiben, als auch Tochterzellen, die sich differenzieren.

Die definierten Eigenschaften einer Stammzelle sind:

1. Sie ist selbst nicht endgültig differenziert.
2. Sie kann sich unbegrenzt teilen.
3. Wenn sie sich teilt, kommt für jede Tochterzelle die Entscheidung: Sie kann entweder Stammzelle bleiben oder einen Weg einschlagen, der sie zur endgültigen Differenzierung in reife Gewebszellen vorbestimmt. (Alberts et al., 2003)

Eine Möglichkeit zur Einteilung von Stammzellen stellt ihr Differenzierungspotential dar. Dabei unterscheidet man totipotente, pluripotente und multipotente Stammzellen.

Totipotente Stammzellen können komplette Organismen bilden.

Pluripotente Stammzellen sind fähig, Gewebe aller drei Keimblätter, multipotente hingegen, verschiedene Zelltypen einer bestimmten Linie zu bilden.

Als Totipotenz wird die Fähigkeit verstanden, sowohl die der Plazenta zugehörige Trophoblastenhülle als auch einen Embryo generieren zu können. Die befruchtete Eizelle hat die Differenzierung in die verschiedenen Keimblätter noch nicht durchlaufen und ist somit totipotent (Filip et al., 2003; Majka et al., 2005).

Die embryonale Stammzelle stammt aus der inneren Zellmasse der Blastozyste und ist bereits auf die einzelnen Keimblätter determiniert und somit pluripotent.

Die adulte Stammzelle kommt in fast allen Geweben und verschiedenen Differenzierungsstufen vor und ist multipotent (Guan et al., 2006; Kawase et al., 2004; Kucia et al., 2004; Stepp et al., 2005).

Eine adulte Stammzelle soll sich in Zellen des Gewebes, aus dem sie stammt, differenzieren können und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen, solange der Organismus lebt. Es wurde ebenfalls postuliert, dass sich adulte Stammzellen auch in Zellen anderer Gewebe differenzieren können (Bjornson et al., 1999; Brazelton et al., 2000), diese Eigenschaft wird als Plastizität bezeichnet. In der Literatur werden vier alternative Wege beschrieben, die diese Plastizität erklären könnten (Martin-Rendon and Watt, 2003).

Bei der Transdetermination wird eine Stamm- bzw. Vorläuferzelle zu einer anderen Stammzelle umprogrammiert, die die Fähigkeit zur Bildung anderer Vorläuferzellen annimmt. Die Transdifferenzierung beschreibt, dass eine schon differenzierte Zelle den Phänotyp einer anderen differenzierten Zelle erhalten kann.

Bei der Dedifferenzierung verliert eine Vorläuferzelle ihren eigentlichen Differenzierungsstatus und differenziert sich in eine andere Vorläuferzelle.

Bei der Zellfusion fusioniert eine Stammzelle mit einer ausdifferenzierten Zelle, woraus ebenfalls differenzierte Zelltypen entstehen können, aber mit verändertem Karyotyp.

Die adulte Stammzelle befindet sich als Vorläuferzelle in den meisten Gewebearten ausgewachsener Organismen (Jiang et al., 2002). Sie kommt z. B. als hämatopoetische (Weissman I.L., 2000), gastrointestinale (Potten C.S., 1998), epidermale (Watt F.M., 1998), neuronale (Gage F.H., 2000), hepatische (Alison M., Sarraf C., 1998) oder mesenchymale (Caplan A.I., 1991; Caplan A.I., 1994) Stammzelle vor.

Es kommt während der verschiedenen Differenzierungsstadien der Zellen zum Verlust bzw. zur Expression unterschiedlicher Oberflächenantigene (CD-cluster of differentiation), anhand derer man die jeweiligen Zelllinien unterscheiden kann (Hagemann et al., 1997).

Die hämatopoetische Stammzelle stellt die Vorläuferzelle für die korpuskulären Bestandteile und Zellen des peripheren Blutes wie Erythrozyten, Thrombozyten, Lymphozyten, Granulozyten sowie Makrophagen dar (Junqueira et al., 2005). Die Blutzellen werden während des gesamten Lebens eines Tieres gebildet. Wird ein Tier mit einer hohen Röntgenstrahlendosis bestrahlt, wird es sterben, da es keine neuen Blutzellen mehr bilden kann. Diesem Tier kann man Knochenmark eines immunologisch verträglichen Spendertieres verabreichen und es erholt sich das gesamte Blutsystem. Beim Menschen wird dies bei Leukämiepatienten eingesetzt (Alberts et al., 2003).

Die mesenchymale Stammzelle bzw. die mesenchymale Stromazelle wurde in dieser Arbeit verwendet, um die Funktion und den Nutzen dieser Zelle genauer zu untersuchen. Es konnte im Rattenmodell gezeigt werden, dass mesenchymale Stromazellen ein therapeutisches Potential im akuten Nierenversagen besitzen (Tögel et al., 2005). Dieses therapeutische Potential soll nun im Schweinmodell näher untersucht werden. Daher wird zunächst die mesenchymale Stromazelle genauer erklärt.

### **1.1.2 Die mesenchymale Stromazelle**

Friedenstein entdeckte 1968 erstmals multipotente mesenchymale Vorläuferzellen. Er beschreibt die aus Knochenmark isolierten Zellen, die in Monolayer-Kulturen eine spindelförmige Erscheinung aufweisen, als CFU-F (colony-forming unit fibroblast).

Friedensteins Beobachtungen bildeten die Grundlage für weitere Studien, die zeigten, dass die abgeleiteten Knochenmark-Stromazellen die gemeinsamen Vorfahren von mesenchyalem Gewebe sind.

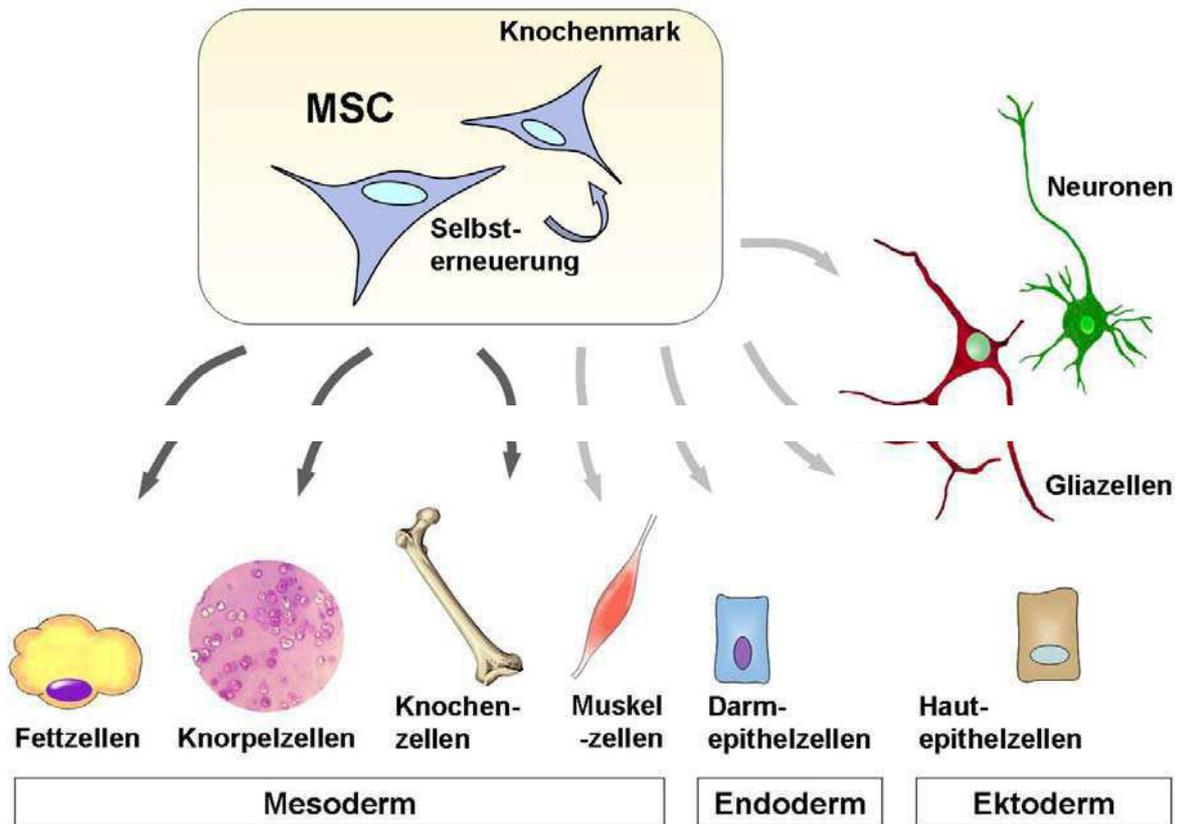
Pittenger et al. wiesen 1999 nach, dass sie sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten differenzieren. Da es keine spezifischen Marker zur Unterscheidung der mesenchymalen Stromazellen von anderen Stammzellen gibt, sind einige Merkmale notwendig. Sie haben eine fibroblasten-ähnliche Morphologie, sie wachsen plastikadhärent, sie lassen sich in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten differenzieren und sie sind für verschiedene Oberflächenantigene positiv bzw. negativ (Pittenger et al., 1999).

Der ursprünglich verwendete Begriff „mesenchymale Stammzellen“ wurde von der International Society for Cellular Therapy (ISCT) in „multipotente mesenchymale Stromazellen“ geändert (Dominici et al., 2006). Die Abkürzung MSC soll aber weiterhin Bestand haben (Horwitz et al., 2005). Diese Entscheidung traf die ISCT, da MSC zwar die Eigenschaften der Selbsterneuerung, der Differenzierung und der Regenerationsfähigkeit besitzen, aber keine Experimente wie bei den hämatopoetischen Stammzellen vorliegen, die zum Anforderungskatalog der Definition „Stammzelle“ gehören.

Mesenchymale Stromazellen konnten nicht nur aus dem Knochenmark isoliert werden, sondern auch aus Nabelschnurblut (Lee et al., 2003), Periost, Fettgewebe, Synovia (De Bari et al., 2001), Skelettmuskulatur (Sakaguchi et al., 2005), Plazenta (Fukuchi et al., 2004; Miao et al., 2006), Thymus (Mouiseddine et al., 2007) und fetaler Lunge, Leber und Milz (in 't Anker et al., 2003) sowie von Zahnpulpa (Shi et al., 2003), Zahnligament (Seo et al., 2004) oder Zahnfollikeln (Morszeck et al., 2005).

Da spezifische Marker für MSC fehlen, hat die ISCT die Minimalkriterien festgehalten, die multipotente mesenchymale Stromazellen erfüllen müssen. Sie müssen plastikadhärent sein, ein charakteristisches Oberflächenexpressionsmuster von Proteinen aufweisen und sich in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten differenzieren lassen. Dominici et al. beschrieben die adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierung der MSC *in vitro* (Dominici et al., 2006).

In verschiedenen Berichten wurde diskutiert, dass MSC sich nicht nur in Zellen und Geweben des mesodermalen Ursprungs differenzieren, sondern auch in Zellen des Endoderms, z. B. Muskelzellen, und Ektoderms, z. B. Neuronen. Diese Transdifferenzierung der MSC ist noch umstritten und wird in Abbildung 1 gezeigt.



**Abbildung 1: Plastizität der MSC**

Die Abbildung zeigt die Fähigkeit der Selbsterneuerung der MSC im Knochenmark und die Differenzierung in verschiedene Zellen und Gewebe der mesodermalen Linie (schwarze Pfeile). Es zeigt außerdem die postulierte Transdifferenzierung in Gewebe des Endo- bzw. Ektoderms (hellgraue Pfeile). Dies ist in der Literatur beschrieben, wird jedoch kontrovers diskutiert (Vaegler, 2009).

Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Vaegler, Klinik für Urologie, Tübingen

Es wurde beobachtet, dass MSC zur Regeneration geschädigter Gewebe beitragen, allerdings ist noch nicht genau geklärt, wie sie dieses tun. Einige Studien erklären die Regeneration durch Transdifferenzierung der MSC (Morigi et al., 2004; Orlic et al., 2001; Herrera et al., 2004).

Andere Studien gehen nicht von der Transdifferenzierung aus, sondern von einer spontanen Zellfusion als Übernahme des jeweiligen Phänotyps der Zellen von Spender bzw. Empfänger (Terada et al., 2002; Ying et al., 2002).

Außerdem wird von einem parakrinen Effekt durch die MSC ausgegangen. Die MSC bewirken in den degenerativen Geweben die Expression von Wachstumsfaktoren und die Regulation von pro- und anti-inflammatorischen Chemokinen und Zytokinen (Tögel et al., 2005; Lee et al., 2006; Gerdoni et al., 2007).

Diese parakrin wirkenden Faktoren können von den MSC selbst ausgeschüttet werden oder Zellen in der Umgebung werden dazu angeregt, Faktoren freizusetzen. Sie können durch diese Möglichkeiten z. B. angiogene, antiapoptotische und mitotische Effekte ausüben und dadurch ihre protektive Wirkung entfalten.

Solche Faktoren sind bei Myokardinfarkten, Leber- und Nierenerkrankungen beschrieben worden.

Beim akuten Niereninfarkt im Rattenmodell beobachteten Tögel et al., 2007, dass vor allem VEGF (Vascular endothelial growth factor) einen positiven regenerativen Effekt erzielt. Da dieser Wachstumsfaktor stark pro-angiogen wirkt, fördert er im ischämischen Gebiet die Vaskularisierung. Außerdem wurden Faktoren wie TGF- $\beta$ 1 (Transforming growth factor), bFGF (Basic fibroblast growth factor) und HGF freigesetzt, die zur Verbesserung der Nierenfunktion geführt haben.

MSC sollen auf die Proliferation von T-Zellen inhibierend wirken (Tse WT et al., 2003; Di Nicola et al., 2002). Die Inhibition ist reversibel, wenn die MSC wieder entzogen werden (Krampera et al., 2003). Über die Hemmung von zytotoxischen T-Lymphozyten wird kontro-

vers diskutiert. Rasmusson et al. beschrieben, dass durch MSC die Bildung gehemmt wird, aber nicht die Aktivität, während Potian et al. publizierten, dass die zytotoxischen Eigenschaften gehemmt werden (Rasmusson et al., 2003; Potian et al., 2003).

### **1.1.3 Medizinische Bedeutung der mesenchymalen Stromazelle**

MSC konnten im akuten Nierenversagen bei der Ratte vermutlich durch parakrine Effekte die Nierenfunktion verbessern (Tögel et al., 2005). In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass MSC bei Lungenfibrose entzündungshemmend wirken und die Kollagenablagerung reduziert wird (Ortiz et al., 2003).

Außerdem wurden MSC erfolgreich bei Autoimmunerkrankungen eingesetzt.

In einem Mausmodell mit diabetischen Mäusen stieg nach Applikation von MSC die Zahl der pankreatischen Inseln und insulinproduzierenden Zellen (Lee et al., 2006). Es konnten in weiteren Tiermodellen positive Effekte bei Rheumatoider Arthritis, systemischem Lupus Erythematoses und Multipler Sklerose gezeigt werden (Deng et al., 2005; Augello et al., 2007; Djouad et al., 2005; Zappia et al., 2005).

Bei der sogenannten Graft-versus-host disease (GvHD) konnten MSC durch ihre immunsuppressiven Eigenschaften eine Milderung schaffen. Die GvHD wird im Zusammenhang mit allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantationen beobachtet, es kommt zu Immunreaktionen insbesondere in Leber, Lunge, Haut und Darm (Nauta et al., 2007).

In einem Mausmodell für die induzierbare experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), eine Autoimmunerkrankung des Zentralen Nervensystems und vergleichbar mit der Multiplen Sklerose beim Menschen, konnten MSC eine Minderung der Krankheit erreichen (Zappia et al., 2005; Zhang et al., 2005).

Viele der tierexperimentellen Versuche lassen sich nicht einfach auf den Menschen übertragen, da sich die Spezies in ihren immunmodulatorischen Mechanismen unterscheiden. Es wurden aber schon einige Studien mit MSC am Menschen durchgeführt. Gaben von MSC bei

Brustkrebspatientinnen (Koç et al., 2000), Patienten mit metachromatischer Leukodystrophie (Koç et al., 2002), mit Osteogenesis imperfecta (Horwitz et al., 2002) oder mit GvHD (Le Blanc, 2004) zeigten keinen nachteiligen Effekt oder Nebenwirkungen. Die positiven Effekte wurden auf die Interaktionen der MSC mit dem geschädigten Gewebe zurückgeführt. Bei der Osteogenesis imperfecta zeigten sich nach der Behandlung mit MSC eine erhöhte Körperwachstumsgeschwindigkeit, eine größere Knochendichte und weniger Frakturen (Horwitz et al., 1999, 2001).

Da in dieser Arbeit die medizinische Bedeutung der MSC im akuten Nierenversagen getestet werden soll, wird diese Erkrankung im Folgenden genauer beschrieben.

## **1.2 Akutes Nierenversagen**

### **1.2.1 Definition**

Das akute Nierenversagen (ANV) ist mit einem rasanten Verlust der glomerulären Filtrationsrate und einer Retention harnpflichtiger Substanzen wie Harnstoff und Kreatinin (Azotämie) einhergehend (Heidbreder et al., 1989).

Das ANV führt zur Akkumulation von Stoffwechselendprodukten und geht mit Störungen des Wasser- und Elektrolythaushaltes und der Säuren-Basen Homöostase einher (Haller et al., 2000, Siegenthaler et al., 2006). Es ist in der Regel reversibel (Geiger et al., 2003). Das ANV wird in prärenal, intrarenal und postrenal eingeteilt.

Zu den prärenal Ursachen zählen Hypovolämie (Dehydratation, Trauma, Diarrhöen, Erbrechen, Verbrennungen, Blutungen, Diuretika), erniedrigtes effektives Plasmavolumen (Sepsis, Schock, Pankreatitis, Ileus, Leberversagen, nephrotisches Syndrom, Anästhetika, Vasodilanzien), reduzierte Herzauswurfleistung (kardiogener Schock, Herzinsuffizienz, Herzinfarkt, Perikardtamponade, massive Lungenembolie, Cor pulmonale), renovaskulärer Verschluss (Atherosklerose, arterielle oder venöse Thrombose, Embolie, Kompression, dissezierendes Aortenaneurysma, Stenose, Gefäßanomalie), Beeinflussung der renalen Mikrozirkulation (ACE-Hemmer, nicht steroidale Antiphlogistika, Ciclosporin A, Tacrolimus) und die akuten vollständigen Verschlüsse der Nierenarterien durch Embolien und Thrombose (Koch, 2000).

Beim intrarenalen Nierenversagen liegen primäre Schädigungen des Nierengewebes, d. h. der Glomeruli und/oder der Tubuli des Interstitiums vor. Man kann drei Schädigungsmechanismen unterscheiden, die Minderperfusion mit Ischämie, toxische Effekte und entzündliche Erkrankungen der Nieren (Geiger et al., 2003).

Beim postrenalen Nierenversagen liegt eine obstruktive Nephropathie vor. Es können Eiweißzylinder oder Ausfällung von Harnsäure, Oxalsäure oder Calciumphosphat zu intrarenalen Abflussbehinderungen führen. Meist handelt es sich um eine Prostatahyperplasie, gynäkologische Tumoren im kleinen Becken und die Verlegung beider Ureteren durch Steine oder Blut-

gerinnsel. Es können auch neurogene Blasenentleerungsstörungen und die retroperitoneale Fibrose vorliegen (Tabelle 1) (Geiger et al., 2003).

<b>Ursache/Lokalisation</b>	<b>Pathophysiologie</b>	<b>Beispiele</b>
<b>Prärenal</b>		
	Flüssigkeitsverlust	Erbrechen, Durchfall, Blutung, Diuretika
	Lebererkrankung	Hepatorenales Syndrom
<b>Intrarenal</b>		
1. Akute Tubulusnekrose	a, Ischämie b, exogene Toxine c, endogene Toxine	a, Blutdruckabfall, Schock b, Kontrastmittel, Medikamente c, Rhabdomyolyse, Hämolyse, Tumorlyse
2. Gefäßerkrankungen	a, große Gefäße b, kleine Gefäße	a, Nierenarterien-/venenthrombose, arterielle Embolien b, Vaskulitis, HUS/TTP, maligne Hypertonie
3. Glomerulonephritis	Immunologische Prozesse	rasch progrediente Glomerulonephritis, Goodpasture-Syndrom

**Tabelle 1: Einteilung und Ursachen des akuten Nierenversagens**

4. Tubulointerstitielle Erkrankungen	a, Allergie b, Infektion	a, interstitielle Nephritis b, Pyelonephritis
5. Geänderte Hämodynamik	renale Minderperfusion	nichtsteroidale Antiphlogistika, ACE-Hemmer
<b>Postrenal</b>		
Niere		Harnsäure, Oxalsäure, Calciumphosphat
Ureteren		Steine, Papillennekrosen, Blutgerinnsel, gynäkologische Neoplasien, retroperitoneale Fibrose
Harnblase		Karzinom, Prostataprozesse
Urethra		entzündliche Prozesse

**Tabelle 1 (fortgeführt): Einteilung und Ursachen des akuten Nierenversagens**

HUS= hämolytisch-urämisches Syndrom;

TTP= thrombotisch-thrombopenische Purpura

(Geiger et al., 2003)

Mit freundlicher Genehmigung des Verlages Schattauer

### 1.2.2 Pathophysiologie

Die exakten pathophysiologischen Zusammenhänge, die zur Entstehung eines ANV führen, sind bislang noch nicht vollständig geklärt und sehr komplex (Lawin et al., 1994; Siegenthaler et al., 2006).

In der Schädigungsphase kommt es zu einer Minderperfusion der Niere, die durch eine Widerstandserhöhung der afferenten Arteriolen und/oder Tonusminderung der efferenten Arteriole

verursacht werden kann (Geiger et al., 2003). Sowohl neuronale als auch humorale Mechanismen (Renin-Angiotensin-System, Vasopressin, Endothelin, Thromboxan A<sub>2</sub>) sind dabei beteiligt. Die Minderperfusion führt zum Abfall der glomerulären Filtrationsrate und zur Hypoxie. Da die Niere einen sehr hohen Sauerstoffbedarf aufweist, reagiert sie sehr empfindlich auf die Hypoxie, vor allem in der äußeren Medulla, wo die Tubuluszellen aufgrund ihrer hohen Resorptionsarbeit einen hohen Sauerstoffbedarf haben (Koch, 2000). Im Weiteren kommt es durch Blockierung des transmembranösen Calciumtransportes zum Einstrom von Calcium, welches zur Zellschädigung führt, da es durch Aktivierung von Proteasen und Phospholipasen Strukturen des Zytoskeletts zerstört (Yin et al., 1979). Es wird ATP verbraucht und damit kommt es zum Verlust von ATP-abhängigen Elektrolyttransportsystemen der Tubuluszellen (Brezis et al., 1984; Epstein et al., 1989). Es reichert sich Natrium intrazellulär an, da die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase defekt ist, was zu einem Flüssigkeitseinstrom führt und schließlich zum Zelloedem und Zelltod (Mason et al., 1981). Aufgrund der Tubulusschädigung kommt es zum Verlust des Bürstensaums und der Polarität der Zellen, sowie der Zerstörung der tight junctions, einer wichtigen Zell-Zell-Verbindung zwischen den Zellen. Durch geschädigte Tubulusepithelzellen kommt es zur Rückdiffusion („back leak“) von Ultrafiltrat (Koch, 2000). Während der Ischämiephase kommt es zum Überschuss der Xanthinoxidase, in der Reperfusionphase führt dies dann zur Synthese von freien Radikalen, die eine tubulotoxische Wirkung haben (Koch, 2000; Geiger et al., 2003). Es werden Verbindungen, die die Zellen schützen (z. B. Gluthathion) aufgrund der Ischämie vermindert gebildet (Bonventre et al., 1993).

Der Serumkreatininwert und der Harnstoffwert zeigen das Ausmaß der Nierenfunktionseinschränkung an. Allerdings ist der Harnstoffwert auch von der Diurese abhängig, so dass die Erhöhung des Harnstoffwertes auch extrarenaler Genese sein kann (Geiger et al., 2003).

In der Reparationsphase können sich die vitalen Tubuluszellen wieder auf der Basalmembran zu einem Ersatzepithel ausbilden, welches sich unter Wachstumsfaktoren („insulin-like

growth factor“ IGF, „epidermal growth factor“ EGF) wieder zu einem differenzierten Tubulusepithel mit seinen Eigenschaften ausbilden kann.

Pathophysiologisch liegt beim prärenalen Nierenversagen eine funktionelle Störung von hormonellen Regelkreisen vor, wie die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, vermehrte Ausschüttung von antidiuretischem Hormon und Katecholaminen, was zur Vasokonstriktion und Natriumretention führt.

Beim intrarenalen Nierenversagen liegt die Ursache in einer Schädigung der renalen Strukturen. Man kann drei Schädigungsmechanismen unterscheiden: Minderperfusion mit Ischämie, toxische Effekte und entzündliche Erkrankung der Niere.

Beim postrenalen Nierenversagen führt der Rückstau des Urins durch die Verlegung der Harnwege zur Schädigung der Niere. Durch den erhöhten Druck kommt es zur Abnahme der Nierendurchblutung. Es sind vasoaktive Hormone wie Angiotensin II, Prostaglandine und das Kallikrein-Kinin- System involviert (Geiger et al., 2003).

Histologisch zeigt sich beim akuten Nierenversagen zunächst der Verlust des Bürstensaums der Tubuluszellen, dann Nekrose und Apoptose einzelner Tubuluszellen. Es lösen sich zahlreiche Zellen von der Basalmembran, die Zylinder bilden und die Tubuli verstopfen. Anschließend dehnen sich Zellen auf der Basalmembran aus, welches als Abflachung des Epithels und Ausweitung des Tubuluslumens sichtbar wird. In der Reparationsphase proliferieren Tubuluszellen und bilden einen Bürstensaum aus.

### **1.2.3 Therapie**

Bei der Therapie des akuten Nierenversagens wird zwischen der konservativen und der maschinellen Therapie unterschieden.

Bei der konservativen Therapie ist die Regulierung der Störungen des Flüssigkeits-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushaltes von Bedeutung.

Eine Hyperkaliämie muss kontrolliert und normalisiert werden. Es eignet sich dafür Calciumgluconat. Bei einer metabolischen Azidose führt die Alkalisierung mit Natriumbicarbonat, Insulin und Beta-2-Mimetika zu einem Kaliumtransfer in die Zelle. Um die intestinale Resorption von Kalium zu hemmen, können Ionenaustauschharze Verwendung finden. Um die Ausscheidung von Kalium über die Nieren zu steigern, eignen sich Schleifendiuretika und Kochsalzinfusionen.

Bei einer Anurie muss die Gabe von Diuretika unterbunden werden.

In der polyurischen Phase kann eine Hypokaliämie auftreten, die entsprechend korrigiert werden muss.

Eine Hyponatriämie entsteht bei einer vermehrten Zufuhr von freiem Wasser, was durch osmotische Diuretika korrigiert wird.

Bei der Therapie des postrenalen Nierenversagens ist häufig ein chirurgisches Vorgehen notwendig (Lawin et al., 1994; Siegenthaler et al., 1987; Siegenthaler et al., 1982).

Es sollte auch immer rechtzeitig ein Antibiotikum aufgrund des erhöhten Infektionsdrucks verabreicht werden. In der Tabelle 2 werden übersichtlich die Therapiemaßnahmen bei den jeweiligen Erkrankungen des akuten Nierenversagens aufgelistet.

Bei der maschinellen Nierenersatztherapie unterscheidet man:

- intermittierende Hämodialyse
- kontinuierliche Hämofiltrations- und Hämodialyseverfahren
  - venovenös- CVVH und CVVHD
  - arteriovenös- CAVH und CAVHD
- akute Peritonealdialyse

(Geiger et al., 2003)

Die Indikationen zur Einleitung einer Nierenersatztherapie sind:

- nach Volumensubstitution und Diuretikagabe länger als 12 Stunden persistierende Oligurie
- auf Diuretika nicht ansprechendes Lungenödem

- schwere Hyperkaliämie (>6,5 mmol/l)
  - schwere metabolische Azidose (pH<7,2)
  - urämische Perikarditis
  - urämische Enzephalopathie
  - urämische Komplikationen (intestinale Blutung, Gastroenteritis) wahrscheinlich bei Harnstoff >30 mmol/l; Kreatinin >1000 µmol/l
  - schwere Elektrolytstörungen (Hypernatriämie, Hyperkalzämie)
- (Koch, 2000)

Es sollte aufgrund besserer hämodynamischer Verträglichkeit und adäquaterer Kontrolle des Flüssigkeitshaushaltes den kontinuierlichen Nierenersatztherapien gegenüber den intermittierenden Verfahren der Vorzug gegeben werden (Ronco et al., 1999; Bellomo et al., 1999).

<b>Ätiologie</b>	<b>Krankheit</b>	<b>Pathophysiologie</b>	<b>Diagnostik</b>	<b>Therapie</b>
<b>Prärenal</b>	Schock	Blutdruckabfall	Kreislaufparameter	Flüssigkeitssubstitution
	Blutung	Flüssigkeitsverlust	Hydratationszustand	Kreislaufstabilisierung
	Diarrhoe/E			
<b>Intra-renal</b>	Akute Tubulusnekrose	Ischämie	Urindiagnostik	Corticoide
	Gefäßkrankung	Immunolog. Prozesse	Natriumexkretion	Immunsuppressiva

**Tabelle 2: Ätiologie, Ursache, Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie des akuten Nierenversagens**

	Glomerulo- Nephritis	Toxine	Sediment	Plasmapherese
	Tubulointer- stitielle Erkrankung	Blutdiagnostik	Komplement	Überbrückende Hämodialyse
			ANA	
			ANCA	
			BB,CK,LDH	
			Nierenbiopsie	
<b>Post- renal</b>	Prostata- Hyperplasie	Harnstauung	Sonographie	Harnableitung
	Neoplasie im kleinen Becken			Urologische Interven- tion
	Steine			

**Tabelle 2 (fortgeführt): Ätiologie, Ursache, Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie des akuten Nierenversagens**

(Geiger et al., 2003)

Mit freundlicher Genehmigung des Verlages Schattauer

#### **1.2.4 Prognose**

Die Prognose des prärenalen Nierenversagens ist als günstig einzustufen, wenn die zugrunde liegenden Ursachen schnell behoben werden können. Bei strukturellen Schäden der Glomeruli liegt eine schlechtere Prognose vor.

Die Prognose des intrarenalen Nierenversagens hängt von der Grunderkrankung ab. Für die interstitielle Fibrosierung gibt es keine kausale Therapie. Die Mortalität des intrarenalen Nierenversagens beträgt durchschnittlich 50%.

Beim postrenalen Nierenversagen ist die Prognose als günstig einzustufen, wenn die Ursache schnell zu beheben ist (Geiger et al., 2003).

Eine schlechte Prognose liegt bei Anurie/Oligurie, schnellem Anstieg des Serumkreatinins, hohem Alter und Multiorganversagen vor.

### **1.2.5 Mesenchymale Stromazellen als Therapiemöglichkeit im akuten Nierenversagen**

Aufgrund der schwierigen Behandlung des akuten Nierenversagens stellt die Behandlung mit mesenchymalen Stromazellen ein vielversprechendes Therapiekonzept dar, welches pathophysiologisch an mehreren Prozessen gleichzeitig ansetzt und dadurch eine potentielle kurative Option besitzen kann.

Akutes Nierenversagen tritt durch Minderperfusion (zirkulatorisch- ischämisches akutes Nierenversagen) durch Hypovolämie, Hypotonie und Dehydratation infolge von Blutverlusten (Polytrauma, gastrointestinale oder postpartale Blutung, großen operativen Eingriffen an Herz, Gefäßen, Abdomen oder Prostata), durch Schock (Myokardinfarkt, Embolie), schwere Infektionen (Sepsis, Peritonitis, Cholezystitis) oder Wasser- und Elektrolytverluste ein. Akutes Nierenversagen ist mit einer hohen Mortalität verbunden. Nierenzellen, insbesondere Tubulusepithelien, besitzen ein starkes endogenes Regenerationspotential, das jedoch in der klinischen Situation häufig nicht ausreicht, um eine adäquate Nierenfunktion wiederherzustellen. Neben der Nierentransplantation oder unterstützenden Maßnahmen gibt es keine spezifische Behandlung und neue Behandlungsoptionen werden dringend benötigt.

Aufgrund der Ergebnisse der Behandlung des akuten Nierenversagens der Ratte, die sich nicht unmittelbar auf den Menschen übertragen lassen, sollen an einem dem Menschen anatomisch und physiologisch vergleichbaren Organismus (siehe Tabelle 3), dem Schwein, die

Untersuchungen durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob sich die in der Ratte erzielten Ergebnisse reproduzieren lassen.

<b>Nephrologische Parameter</b>	<b>Mensch</b>	<b>Schwein</b>
Nierendurchblutung <sup>c</sup>	17 ml/min/kg	24 ml/min/kg
Glomeruläre Filtrationsrate <sup>c</sup>	1,8 ml/min/kg	2,4 ml/min/kg
Urinzeitvolumen <sup>c</sup>	14,3 µl/min/kg	50 µl/min/kg
pH <sup>b</sup>	Sauer	Alkalisch
Maximale Konzentrationsfähigkeit <sup>a</sup>	1160 mOsm/l	1080 mOsm/l
Primärharn <sup>b</sup>	180l/24 Std.	140l/24 Std.
Harnsäure <sup>b</sup>	20,8-116,0 µmol/l	505,6 µmol/l
Serumkreatinin <sup>b</sup>	1,2-1,4 mg/dl	1,1-1,3 mg/dl

**Tabelle 3: Vergleich ausgewählter nephrologischer Daten von Mensch und Schwein**

(Douglas, 1972<sup>a</sup>, Rick et al., 1977<sup>b</sup>, Hannon et al., 1990<sup>c</sup>, Kolb et al., 1989<sup>d</sup>)

### 1.3 Ziele der Arbeit

Beim ANV zeigte der Einsatz mesenchymaler Stromazellen im Rattenmodell einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf (Lange et al., 2005). Bei den mit mesenchymalen Stromazellen behandelten Tieren erholten sich die Serum-Creatinin- und Harnstoffwerte nach Induktion des akuten Nierenversagens bereits nach zwei Tagen, während bei den nicht behandelten Tieren diese Werte weiter anstiegen (Lange et al., 2005). Histologisch wurden eine geringere Zerstörung der tubulären Zellen einhergehend mit einem verringerten apoptotischen Index und Verletzungsgrad sowie erhöhtem Proliferationsindex gezeigt. Die unterstützende Wir-

kung von MSC ist vermutlich nicht auf eine Transdifferenzierung der MSC in Nierengewebe zurückzuführen, sondern beruht auf parakrinen Effekten. Die Expression unterschiedlicher Faktoren in der Niere nach MSC-Transplantation zeigte eine deutliche Hochregulierung von antiapoptotischen, antiinflammatorischen und wachstumsfördernden Zytokinen (Wirkstoffe gegen den programmierten Zelltod, entzündungshemmend und wachstumsfördernd) wie z. B. Bcl-2, TGF-alpha, IL-10, VEGF, IGF, HGF und eine Runterregulierung von entzündungsfördernden Zytokinen wie IFN-gamma, TNF-alpha und IL1-beta (Tögel et al., 2005). Diese Verbesserung der Nierenfunktion konnte nur mit MSC und nicht mit anderen Stammzellen beobachtet werden, denn die Mobilisierung hämatopoietischer Stamm- und Vorläuferzellen mittels G-CSF dagegen hat keine Wirksamkeit in der Verringerung des ischämischen Nierenschadens, sondern verschlechtert sogar die Krankheitssituation durch konkominante Mobilisierung von Granulozyten (Tögel et al., 2004).

Es ist davon auszugehen, dass die funktionelle Regeneration hauptsächlich auf parakrine Mechanismen, zum Beispiel auf die Sekretion von Wachstumsfaktoren, zurückgeführt werden kann.

Die Gabe von MSC kann mögliche Risiken bergen. Es wurde eine Fehldifferenzierung der intraglomerulären MSC in Adipozyten beschrieben (Kunter et al., 2007). Eine solche potentielle Fehldifferenzierung wurde in unseren Experimenten in Tieren untersucht, die wir neun Wochen (anstelle von vier Wochen) nach der Zelltherapie untersucht haben.

Mehrere Mechanismen werden diskutiert, wie die Zellen ins Zielgewebe gelangen und dort agieren. Transplantierte Zellen gelangen über eine spontane Freisetzung nach der Verletzung in die Infarktregion (Tomita et al., 2002), über eine Mobilisierung durch Zytokine (Tse HF et al., 2003) oder durch lokale Injektion. Darüber hinaus wurde z. B. beim Herzinfarkt beschrieben, dass Knochenmarkstammzellen, die ins Zielgewebe eingewandert waren, dort proliferierten und sich in Myozyten, glatte Muskelzellen und Endothelzellen differenzierten, was in ei-

ner partiellen Regeneration des verletzten Myokards resultierte (Penn et al., 2004; Tse HF et al., 2003; Forrest et al., 2003; Kocher et al., 2001).

Die mesenchymale Subpopulation (MSC) des Knochenmarks besitzt eine Kombination von Eigenschaften, die für die Aufgabe der Wiederherstellung von Struktur und Funktion des Nierengewebes in einzigartiger Weise geeignet erscheint. Erstens eliminiert die Behandlung eines Patienten mit Zellen, die seinem eigenen Knochenmark entstammen, die Schwierigkeit, dass das Gewebe abgestoßen werden könnte (ein kardinales Problem bei embryonalen Stammzellen). Zweitens ist die Verwendung adulter Stammzellen ethisch unproblematisch. Drittens ist die Gewinnung von Knochenmark beim Erwachsenen ein Routineeingriff und die mesenchymale Subpopulation einfach zu isolieren, einfach zu expandieren und problemlos in einer autologen Transplantationsstrategie einsetzbar. Viertens können MSCs Toleranz induzieren und damit verantwortlich sein für die Reduktion von Abstoßungsreaktionen und die Modulation der Entzündungsreaktion (Murry et al., 2004; Balsam et al., 2004; Nygren et al., 2004).

Ziel der Arbeit „Autologe mesenchymale Stromazellen im Ischämie/Reperfusion-induzierten akuten Nierenversagen im Schweinmodell“ ist die Übertragung der im Rattenmodell gewonnenen Ergebnisse auf ein präklinisches Tiermodell im Schwein der zelltherapeutischen Behandlung des akuten Nierenversagens, um vorbereitende Daten für zukünftige klinische Studien an Patienten zu gewinnen. Basierend auf der Ähnlichkeit zwischen Schwein und Mensch in Bezug auf seine Ähnlichkeit der Anatomie, Physiologie und der Toleranz gegenüber Ischämie, wurde das Schwein untersucht, da es relevante Daten für die Behandlung menschlicher Nierenerkrankungen liefern kann. Dementsprechend wurde die Wirkung von MSC in dem großen Säugetiermodell untersucht in der Hoffnung, dass die Ergebnisse aus dem Schweinmodell auf den Menschen übertragbar sind.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Gebrauchschemikalien**

- Alcian-Blau, Alcian-Blue 8 GX, Sigma-Aldrich , München,
- Alginatlösung, Alginic acid low viscosity, Sigma-Aldrich, München,
- Ascorbinsäure, Ascorbic acid, Sigma-Aldrich, München,
- Aquatex, Merck, Darmstadt,
- Biocoll, Biochrom AG, Berlin,
- CaCl<sub>2</sub>-Lösung, Merck, Darmstadt,
- Dexamethasone, Fluka, Sigma-Aldrich, München,
- Dimethyl Sulfoxide, DMSO, Sigma-Aldrich, München,
- Dulbeccos` s Modified Eagle Medium/1000mg/L Glucose, DMEM, Invitrogen GmbH, Karlsruhe,
- Entellan, Merck, Darmstadt,
- Essigsäure, Merck, Darmstadt,
- Ethanol, Merck, Darmstadt,
- FACS-Puffer, Gibco/Invitrogen GmbH, Karlsruhe,
- FCS (fötale Kälberserum), BioWhittaker, Apen,
- Formalin, Merck, Darmstadt,
- $\beta$ -Glycerolphosphat, Sigma-Aldrich, München,
- Hämalaun, Merck, Darmstadt,
- Indomethacin, Fluka, Sigma-Aldrich, München,
- Insulin (bovine pancreas;  $\geq 27$  Units/mg), Sigma-Aldrich, München,
- Intra Stain Lösung A, Dako Deutschland GmbH, Hamburg,

- Intra Stain Lösung B, Dako Deutschland GmbH, Hamburg,
- Isobutylmethylxanthine, Fluka, Sigma-Aldrich, München,
- Isopropanol, Merck, Darmstadt,
- Magnesiumchlorid, Fluka, München,
- Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich, München,
- NaCl, Merck, Darmstadt,
- Na-Pyruvat, Sigma-Aldrich, München,
- PHA , Sigma-Aldrich, München,
- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung PBS- Invitrogen GmbH, Karlsruhe,
- Penicillin (5000 U/ml) /Streptomycin (5000 µg/ml)- Gibco/Invitrogen GmbH, Karlsruhe,
- Silbernitrat, Merck, Darmstadt,
- Sudan-Rot B, Sigma-Aldrich, München,
- Trypsin-EDTA- Gibco/Invitrogen GmbH, Karlsruhe,
- X-vivo Medium, Lonza cologne GmbH, Köln,
- Xylol, Merck, Darmstadt

### **2.1.2 Gebrauchslösungen**

#### **2.1.2.1 Lösungen für die adipogene Differenzierung**

100 µM Dexamethasone – MG 392,47

50 mg in 1ml 100% Ethanol auflösen + 11,739 ml DMEM= $10^{-2}$  M als Stammlösung; daraus  $10^{-4}$  M Stammlösung durch 1:100 Verdünnung mit Medium herstellen

10 mM Isobutylmethylxanthine – MG 222,25, 222,3 mg in 100 ml DMEM unter Erhitzen lösen. Vor der Verwendung darauf achten, dass die Lösung klar ist.

50 mM Indomethacin- MG 357,81

178,9 mg auf 10 ml 100% Ethanol= 50 mM

10 mg/ml Insulin in DMEM lösen

10% Formalin- 10 ml der 37%igen Lösung auf 27 ml PBS

Sudan-Rot B, 0,25 g in 100 ml 70% heißem Ethanol lösen, gut schütteln, 24 Stunden bei 60°C, danach erkalten lassen und filtrieren

### **2.1.2.2 Lösungen für die chondrogene Differenzierung**

2%ige Alginat Lösung 1g Natriumalginat in 50 ml 0,15 M NaCl unter starkem Schütteln bei 37°C auflösen, sterilisieren durch Autoklavieren für 20 min. bei 121°C oder filtrieren durch 0,22 µm-Filter; regelmäßig frisch ansetzen

0,1 M CaCl<sub>2</sub> MG 147,02, 1,47 g CaCl<sub>2</sub> auf 100 ml H<sub>2</sub>O., steril filtrieren)

Alcian-Blau-Färbung

10% Formalin (10 ml der 37%igen Lösung auf 27 ml PBS)

a, 50 mg Alcian-Blau 8GX in 50 ml 0,15 M NaCl plus 6 ml konz. Essigsäure, pH 1,5

b, 4 g MgCl<sub>2</sub> in 50 ml 0,15 M NaCl

a und b zu gleichen Teilen mischen; 3 Tage stehen lassen und vor Gebrauch durch einen 0,45 µm-Filter filtrieren

2% Essigsäure (2ml konz. Essigsäure mit 98 ml H<sub>2</sub>O mischen)

Ethanolische Lösung

30% Ethanol: 30 ml abs. Ethanol + 70 ml a.d.

50% Ethanol: 50 ml abs. Ethanol + 50 ml a.d.

70% Ethanol: 70 ml abs. Ethanol + 30 ml a.d.

90% Ethanol: 90 ml abs. Ethanol + 10 ml a.d.

### 2.2.2.3 Lösungen für die osteogene Differenzierung

100  $\mu$ M Dexamethasone MG 392,47

50 mg in 1ml 100% Ethanol auflösen, +11,739 ml DMEM = $10^{-2}$  M als Stammlösung; daraus

$10^{-4}$  M Stammlösung durch 1:100 Verdünnung mit Medium herstellen

5 mM L-Ascorbic acid 2-phosphate MG 289,5

1,448 g auf 10 ml a.d.=500 mM, 1:100 Verdünnung in DMEM=5 mM

1 M  $\beta$ -Glycerolphosphate MG 216

2,16 g auf 10 ml a.d.=1 M

4% Formaldehyd (4 ml der 37%-igen Lösung auf 33 ml PBS)

6% Silbernitrat (6 g auf 100 ml a.d., immer frisch ansetzen)

### 2.1.3 Geräte

- Gamma-bestrahlungsgerät- Biobeam 2000- Gamma Service Medical GmbH, Leipzig,
- Brutschrank- Hera cell 240, Heraeus, Hanau,
- Durchflusszytometer-FACScan- Becton Dickinson (BD), Heidelberg, , ausgestattet mit der Software Cellquest, Heidelberg,
- Mikroskop- CKX41, Olympus, Hamburg,
- Narkosegerät- Romulus 800V, Ventilog mit Verdampfer Forane, Drägerwerk AG/ Lübeck,
- Narkoseüberwachungsgeräte- Eagle 4000: Model Marquette Electronics, Datex-Ohmeda Dräger Vapor 19,1, Dräger Medizintechnik GmbH, Lübeck,
- Pipettboy- pipetus-aktiv, Hirschmann, Eberstadt,
- Röntgendurchleuchtung- C-Bogen, Arcadis Varic, Siemens, München,
- Sterile Werkband- Hera safe, Heraeus, Hanau,
- Ultraschallgerät- Logiq 9, GE Medical Systems, München,
- UV-Licht, 366nm, Camag,Berlin,

- Zentrifuge- Rotina 46 R, Hettich, Tuttlingen

#### **2.1.4 Medikamente**

- Atropinsulfat- Atropinsulfat-100mg, Atropinsulfat-Lösung 1%, Dr. F. Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein,
- Benzathin-benzylpenicillin, Benzylpenicillin-Procaïn, Dihydrostreptomycinsulfat - Veracïn compositum Albrecht GmbH, Aulendorf,
- Dobutamin- Carinopharm GmbH, Gronau/Leine,
- Heparin- Heparin-Natrium-25000-ratiopharm, Ratiopharm GmbH, Ulm,
- Imeron 350, Bracco Atlana Pharma GmbH, Konstanz,
- Isoflurane- Baxter GmbH, Unterschleißheim,
- Ketamin- Ketamin Gräub/aniMedica GmbH, Senden/Bösensell, Mitvertrieb: Albrecht GmbH, Aulendorf,
- Lidocain- Xylocain 1%, Astra Zeneca GmbH, Wedel,
- Meloxicam- Metacam, Boehringer Ingelheim, Ingelheim Rhein,
- Metamizol- Novaminsulfon-ratiopharm 2,5, Ratiopharm, Ulm,
- Pentobarbital- Narcoren, Merial GmbH, Hallbergmoos,
- Xylazin- Sedaxylan, WDT, Garbsen

#### **2.1.5 Verbrauchsmaterialien**

- Abdecktuch, Lochtuch , Barrier, Göteborg, Schweden,
- Ballonkatheter- PTCA Dilatations Catheter, 5,00mm X 12,00 mm, Quantum Maverick, Maple Grove/ USA,
- Braunüle, Ecoflo-Int, Dispomed, Gelnhausen,
- Cool-Down-Behälter, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark,

- Cryotubes, 1 ml, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark,
- Eppendorfröhrchen, 1 ml, Eppendorf AG, Hamburg,
- Fäden- Vicryl 2-0 USP, Johnson & Johnson/ St.-Stevens-Woluwe, Belgien,
- Fieberthermometer, microlife, Widnau, Schweiz,
- Führungsdraht- Intro Guide F, Angiokard Medizintechnik/ Friedeburg,
- Kanüle, 1,5x50 mm, Terumo, Leuven, Belgien,
- Klammern- Appose ULC 35 W, Tyco Health Care, Gosport, United Kingdom,
- Koronar-Führungsdraht- Galeo F, 0,36mm, Biotronik GmbH & Co., KG, Berlin,
- Leibbandage- ABE-Leibbandage, Karl Beese GmbH & Co., Barsbüttel
- Leukoplast, BSN medical GmbH, Hamburg,
- Neubauer Zählkammer, LO, Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf,
- Monovette, Sarstedt AG+Co, Nümbrecht,
- Objektträger, Microscope Slides, Henry Schein, Melville, USA,
- Pumpe- Everest 30 Medotronik, Galway, Irland,
- Rasierer, TMP-Premium, Tüshaus-Medical Produkte GmbH, Velen-Ramsdorf,
- Schleuse- Radifocus Introducer II, Terumo Corporation/ Tokio Spritzen- BD, Heidelberg,
- Skalpell, Cutfix Einmalskalpell, B. Braun Melsungen AG, Melsungen,
- Spritzen, 10 ml, 20 ml, Becton Dickinson, Heidelberg,
- Sterile Röhrchen, 15 ml, 50 ml, Becton Dickinson, Heidelberg,
- Trachealtuben- Co-Contour Murphy Mallinckrodt Medical, Athlone, Irland, der Größe 5,5-6,5 mm,
- Urinkatheter- Cystofix Minipaed, B. Braun Melsungen AG, Melsungen,
- 24-well Platten, Becton Dickinson, Heidelberg,
- 6-well Platten, Becton dickinson Heidelberg,

- Wundpflaster, Hansaplast, Beiderstorf AG, Hamburg,
- Zellkulturflaschen mit 3 Ebenen und 500 cm<sup>2</sup> Kultivierungsfläche, Triple Flask,
- Zellkulturflaschen mit 25 oder 75 cm<sup>2</sup> Kultivierungsfläche (T25, T75), Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg,
- zentraler Venenkatheter- Cava fix Certo 355, B. Braun Melsungen AG, Melsungen

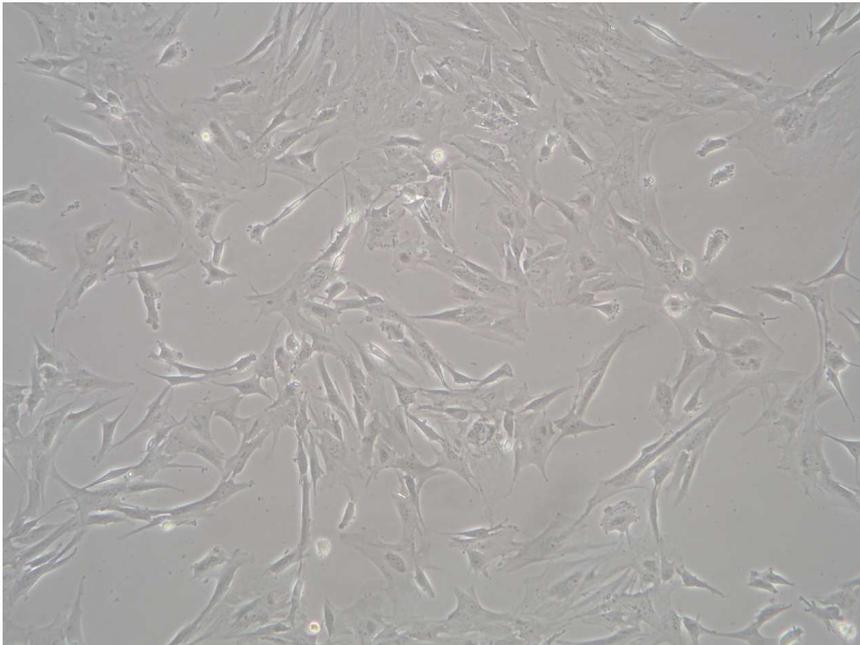
### 2.1.6 Antikörper

- FITC-markierter Ki67 AK- Dako Cytomation, Hamburg,
- Mouse-anti-porcine CD45-FITC AK -Klon 252-1E4; IgG1; AbD Serotec, Oxford, United Kingdom,
- Mouse-anti-porcine MHC-I-FITC AK -Klon JM1E3; IgG1; AbD Serotec, Oxford, United Kingdom,
- Mouse-anti-porcine CD90-FITC AK -Klon 5E10; IgG1- $\kappa$ ; Becton-Dickinson, Heidelberg,
- Mouse-anti-human CD14-FITC AK -Klon TüK4; IgG2a; AbD Serotec, Oxford, United Kingdom,
- Mouse-anti-human CD105 AK -Klon MEM-229; IgG2a; Biozol, Eching, 2. AK Goat-anti-mouse FITC IgG Biozol, Eching,
- Mouse IgG 1 FITC AK -Klon W3/25; AbD Serotec, Oxford, United Kingdom,
- Mouse IgG 2a FITC AK -Klon MRX OX-34; AbD Serotec, Oxford, United Kingdom,
- Mouse IgG 2b -Klon TEN/O; AbD, Serotec, Oxford, United Kingdom,
- PE-markierter CD3 AK United States Biological, Swamscott, MA, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Isolation und Kultivierung porciner mesenchymaler Stromazellen

In T75 Zellkulturflaschen wurden 15 ml Kulturmedium (DMEM/low Glucose, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin) und 1 ml heparinisiertes Knochenmark vorgelegt, vorsichtig vermischt und unter hypoxischen (5 % O<sub>2</sub>; 5 % CO<sub>2</sub>) oder normoxischen (21 % O<sub>2</sub>; 5 % CO<sub>2</sub>) Bedingungen bei 37°C inkubiert. Nach drei Tagen wurde das Medium vorsichtig abgenommen, die nicht adhärenen Zellen mit PBS abgespült und frisches Medium zugegeben. Die adhärenen Zellen wurden weiter inkubiert, bis sie ca. 80-90 % konfluent waren (ca. eine Woche); diese Passage wurde mit P0 bezeichnet. In dieser Zeit wurde alle 2-3 Tage das Medium gewechselt. Um die Zellen auf eine größere Oberfläche zu verteilen, müssen sie mit Trypsin-EDTA abgelöst werden. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellschicht zur Entfernung von Trypsin-Inhibitoren aus dem FCS einmal mit PBS gewaschen und die Zellen mit 2-3 ml 0,25 % Trypsin-EDTA für ca. 3 min. bei 37°C inkubiert. Wenn sich mikroskopisch sichtbar die Zellen von der Oberfläche gelöst hatten, wurde die Suspension in ein steriles 50 ml Röhrchen überführt, mit 20ml Kulturmedium versetzt und zentrifugiert (5 min bei 500 x g). Der Überstand wurde vorsichtig abgesogen, die Zellen in einem definierten Volumen Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 500 Zellen/cm<sup>2</sup> auf Triple Flask ausgesät, diese Phase wurde P1 benannt. Bei Konfluenz wurden diese Zellen erneut trypsiniert und weiter expandiert, bis eine für die Transplantation ausreichende Zellzahl zur Verfügung stand. Die Zellen wurden in der P2-P3 Phase zur Transplantation verwendet. In Abbildung 2 ist die Morphologie der MSC mikroskopisch dargestellt. Am Tag der Transplantation (14. Tag) wurden die Zellen trypsiniert, in Medium aufgenommen und gezählt. Für die Transplantation wurden 2x10<sup>6</sup> Zellen/kg KGW (Körpergewicht) in 30 ml Medium (DMEM) aufgenommen.



**Abbildung 2: Morphologie der porcinen mesenchymalen Stromazellen**

Morphologie der pMSC in der 2. Passage. Sie dehnen sich mit der typischen fibroblastoiden Morphologie aus. Aufnahme: Phasenkontrast, Vergrößerung: x 100,

Foto: Brunswig-Spickenheier

### **2.2.2 Einfrieren porciner mesenchymaler Stromazellen**

Da in der Klinik häufig keine frischen MSC zur Verfügung stehen, sollte in dieser Studie untersucht werden, ob sich frische oder gefrorene MSC in der Wirkung unterscheiden.

Die wie unter 2.2.1 kultivierten Zellen wurden bei Erreichen der für die Transplantation erforderlichen Zellzahl in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$ /ml Einfriermedium suspendiert (90 % FCS, 10 % DMSO), in Cryotubes verteilt und in einem mit Isopropanol befüllten Cool-Down-Behälter bei  $-80^\circ\text{C}$  abgekühlt. Der Cool-Down-Behälter bewirkt dabei ein Herunterkühlen der Zellsuspension um ca.  $1^\circ\text{C}/\text{Minute}$ , so dass Schädigungen der Zelle durch Eiskristallbildung unterbunden werden. Zur längerfristigen Lagerung wurden die Zellen am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff ( $-196^\circ\text{C}$ ) überführt. Direkt vor der Transplantation wurde die erforderliche Zellmenge ( $2 \times 10^6$ /kg KGW) schnell aufgetaut und in 30 ml DMEM resuspendiert.

## **2.2.3 Charakterisierung porciner mesenchymaler Stromazellen**

### **2.2.3.1 Proliferation von porcinen MSC in vitro**

Um optimale Wachstumsbedingungen für MSC zu etablieren und damit zu gewährleisten, dass ausreichende Zellzahlen für die Transplantation zur Verfügung standen, wurden die Zellverdoppelungsraten unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen verglichen.

In einer T25 Kulturflasche wurden 500 MSC/cm<sup>2</sup> in 5 ml Kulturmedium ausplattiert und unter hypoxischen bzw. normoxischen Bedingungen bei 37° C mit 2-3 Mediumwechseln pro Woche inkubiert. Wenn eine 80 %ige Konfluenz der Zellen erreicht wurde, wurden sie trypsiniert, gezählt und erneut mit 500 MSC/cm<sup>2</sup> ausgesät. Dieser Vorgang wurde über 5-6 Passagen wiederholt und aus den jeweiligen Zellzahlen wurden die kumulative Zellzahl sowie die Verdoppelungsraten mit einem Excel-Programm berechnet.

### **2.2.3.2 Phenotypisierung über Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung**

Die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS: fluorescence activated cell sorting) weist Oberflächenepitope auf Zellen nach, indem Zellen mittels mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Antikörper markiert und durch einen Laser detektiert werden.

Außerdem können durch das Streulicht, welches die Zellen produzieren, wenn sie den Laserstrahl passieren, Aussagen über Granularität und Größe der Zellen getroffen werden.

Es werden Vorwärtsstreulicht (FSC, Forward Scatter), welches ein Maß für die Größe der Zelle ist, und Seitwärtsstreulicht (SSC, Side scatter), welches eine Aussage über die innere Struktur und Granularität der Zellen gibt, gemessen.

Durch den Laserstrahl werden die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes in ein höheres Energieniveau gehoben und fallen unter Abgabe von Energie wieder auf ein niedrigeres Energieniveau ab. Diese emittierte Energie kann gemessen werden und ihre Höhe ist ein Charakteristikum für die an den Antigenen gebundenen Antikörper.

Für die Durchführung der FACS-Analyse wurden die Zellen trypsiniert und in einem FACS-Puffer aufgenommen ( $5 \times 10^5$  Zellen in 50  $\mu$ l FACS-Puffer). Bei Einsatz von Antikörpern, die direkt mit FITC markiert waren, wurden die jeweiligen Antikörper mit der vorgegebenen Volumeneinheit (1  $\mu$ g/ $10^6$  Zellen) zu den Zellen pipettiert und 20 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Dann wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und bei 400 x g 5 min. zentrifugiert, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen. Zuletzt wurden die Zellen in 500  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer-FACScan gemessen. Die Anregung erfolgte bei 488 nm und die Detektion bei 518 nm.

Nicht Fluorochrom-gelabelte Antikörper wurden ebenfalls nach einem für den jeweiligen Antikörper entsprechenden Volumenmaß dazu pipettiert (1  $\mu$ g/ $10^6$  Zellen) und 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Zellen einmal mit FACS-Puffer gewaschen und mit 400 x g 5 min. zentrifugiert. Der FACS-Puffer wurde abgossen, der 2. FITC-gelabelte Antikörper zugefügt. und bei 20 min. Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, in 500  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer-FACScan gemessen. Die Daten im FACScan wurden mit dem Cell-Quest Software Programm analysiert.

### **2.2.3.3 Differenzierung porciner mesenchymaler Stromazellen**

Mesenchymale Stromazellen werden per definitionem als multipotente Zellen charakterisiert, d. h. sie müssen in der Lage sein, sich in mindestens drei mesodermale Zelllinien differenzieren zu lassen (Dominici et al., 2006).

#### **2.2.3.3.1 Adipogene Differenzierung**

Die adipogene Differenzierung wurde nach Pittenger et al. durchgeführt. Die konfluenten mesenchymalen Stromazell-Kulturen (80-90 %) wurden mit komplettem Medium (Kulturmedium), 1  $\mu$ M Dexamethasone, 0,5  $\mu$ M Isobutylmethylxanthine, 100  $\mu$ M Indomethacin und 10

$\mu\text{M}$  Insulin für drei Tage auf 24 well-Platten inkubiert. Dieser Vorgang wird Induktion genannt.

Anschließend wurde ein kompletter Mediumwechsel durchgeführt. Nach diesem Mediumwechsel wurden die Zellen für 24 Stunden in Kulturmedium mit  $10\mu\text{M}$  Insulin inkubiert. Dieser Vorgang wird Erhaltung genannt.

Der Wechsel zwischen Induktion und Erhaltung wurde bis zur ausreichenden Bildung von Fettvakuolen in den Zellen durchgeführt, dies dauert ca. sechs Zyklen.

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, für 10 Minuten mit 10 % Formalin fixiert und mit 50 % Ethanol gewaschen. Die folgende Färbung mit Sudan-Rot B wurde 15-30 Minuten durchgeführt. Es folgte eine Waschung mit 50 % Ethanol und eine Gegenfärbung für 5 Minuten mit Hämalaun. Anschließend wurde für eine Minute mit Leitungswasser gewässert und dreimal mit a.d. gewaschen. Die Lipidvakuolen erschienen unter dem Mikroskop rot.

Zur Differenzierungskultur wurde eine Kontrollkultur in Kulturmedium ohne Zusätze angelegt. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch und durch fotografische Darstellung. Die Negativkontrolle wurde ohne Induktion (nur mit Kulturmedium) durchgeführt.

### **2.2.3.3.2 Chondrogene Differenzierung**

In einem Eppendorfröhrchen wurden  $1,5 \times 10^5$  MSC bei  $500 \times g$  für 5 Minuten zentrifugiert und nach möglichst vollständigem Entfernen des Mediums in  $10 \mu\text{l}$  PBS resuspendiert. Nach Vermischen mit  $90 \mu\text{l}$  Alginatlösung wurden die Zellen luftblasenfrei mit einer Pipette in  $2 \text{ ml}$   $\text{CaCl}_2$ -Lösung getropft. Die sich bildenden Alginat-Kugeln wurden vorsichtig dreimal mit  $0,15 \text{ M}$  NaCl und zweimal mit Medium gewaschen und in 6-well-Platten in Medium für 7 Tage bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert.

Die Proteoglykane wurden mit Alcian-Blau gefärbt. Die Proteoglykane sind charakteristisch für Chondrozyten.

Um die nicht gelösten Bestandteile aus der Färbelösung zu entfernen, musste diese vor Verwendung 2-3 Mal filtriert werden. Nun wurde das Medium vorsichtig aus den Wells abgesogen und die Kügelchen einmal mit PBS gewaschen. Die Kügelchen wurden in toto mit Hilfe eines Spatels in ein Röhrchen überführt und mit Formalin (10 %) für eine Stunde bei Raumtemperatur fixiert. Das Formalin wurde vorsichtig aus dem Röhrchen abgesogen und die Kügelchen für 5 Minuten in 2 % Essigsäure gewaschen. Die Essigsäure wurde nun vorsichtig abgesogen und die Kügelchen im filtrierten Alcian-Blau für 24 Stunden bei Raumtemperatur gefärbt.

Am zweiten Tag wurde das Alcian-Blau vorsichtig aus dem Röhrchen abgesogen und die Kügelchen 3 Mal mit a.d. gewaschen. Falls die Kugeln zu blau gefärbt waren, konnten sie mit 2 % Essigsäure bis zur gewünschten Farbintensität gebleicht werden.

Im anschließenden Schritt wurden die Kügelchen in einer aufsteigenden Alkoholreihe jeweils 10 Minuten dehydriert (30 %→50 %→70 %→90 %→100 %) und anschließend für 5-10 Minuten in Xylol entwässert.

Die Kügelchen wurden mit Hilfe von Entellan eingebettet. Es wurde mit Hilfe eines Glasstabes etwas Entellan auf einen Objektträger gegeben. Ein Kügelchen wurde mittig in die Eindecklösung platziert. Ein Deckgläschen wurde langsam an der einen Seite beginnend über die Kugel abgesenkt und unter leichtem Druck, so dass die Kugel flach wurde, aber nicht zerriss, fixiert. An die Ränder des Deckgläschens wurde Entellan gegeben, um ein Eindringen von Luftbläschen zu verhindern.

Die Auswertung erfolgte mikroskopisch und durch fotografische Darstellung.

Die Negativkontrolle wurde in Alginat eingebettet, gewaschen und ohne die siebentägige Inkubation sofort gefärbt.

### **2.2.3.3.3 Osteogene Differenzierung**

Die osteogene Differenzierung wurde nach Jaiswal et al. (1997) durchgeführt. Die konfluenten MSC-Kulturen (80-90 %) wurden mit Kulturmedium,  $10^{-7}$  M Dexamethasone, 50  $\mu$ M Ascorbic acid und 10 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Es musste nach 3-4 Tagen ein kompletter Mediumwechsel erfolgen. Dieses wurde 2-3 Wochen durchgeführt, bis sich Mineralablagerungen in den Zellen bildeten. Nun wurden die Zellen gefärbt. Dafür mussten sie zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit Formalin 4 % für 10 Minuten fixiert werden. Nach der Fixierung erfolgte eine einmalige Waschung mit PBS und eine zweimalige mit a.d.. Nach dem letzten Waschvorgang wurde die Flüssigkeit möglichst vollständig abgesogen, damit die Oberfläche an der Luft trocknen konnte. Die luftgetrocknete Oberfläche wurde mit 6 % Silbernitrat unter UV-Licht (366 nm, Camag/Berlin) für 10 Minuten gefärbt (von Kossa Färbung) und anschließend 2-3 Mal mit a.d. gewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte für 5 Minuten mit Hämalaun. Es musste mit Leitungswasser eine Minute gewässert und zweimal mit a.d. gewaschen werden. Die Einbettung erfolgte mit wässriger Eindecklösung Aquatex oder Paraffinöl in 24-well-Platten.

Die Auswertung erfolgte mikroskopisch und durch fotografische Darstellung.

Die Negativkontrolle erfolgte ohne die Induktion.

### **2.2.4 Gemischte Lymphozytenreaktion (Mixed-Lymphocyte-Reaction, MLR)**

Eine der herausragenden Eigenschaft der MSC ist ihre immunsuppressive Wirkung. Das ischämische Nierenversagen geht mit inflammatorischen Prozessen einher, wie Infiltration und Proliferation von T-Lymphozyten. Die immunsuppressive Wirkung der MSC kann *in vitro* mit einer MLR getestet werden. MLR wird vor allem in der Transplantationsimmunologie eingesetzt, um die Gewebsunverträglichkeit von Spender und Empfänger festzustellen. Neben der Testung von Gewebsunverträglichkeit kann man mit einer MLR auch eine Reihe von fundamentalen Prinzipien der Immunologie testen.

Wenn MSC zusammen mit proliferationsstimulierten Lymphozyten in einer MLR co-kultiviert werden, sollten T-Zell proliferations-inhibierende Effekte beobachtbar werden (Maitra et al., 2004; Djouad et al., 2003).

### Isolierung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC)

50 ml heparinisiertes Schweineblut (25 IU/ml) wurden mit 50 ml PBS verdünnt. Je 25 ml wurden in einem Falcon-Röhrchen vorsichtig auf 15 ml Biocoll (Dichte 1,077g/cm<sup>3</sup>) geschichtet und bei Raumtemperatur mit 400 x g ohne Bremse für 20 Minuten zentrifugiert. Die PBMC (peripheral blood mononuclear cells) bildeten einen Ring an der Grenzschicht zwischen dem Biocoll und dem Blutplasma. Mit einer Pipette wurde dieser Ring abgesaugt und mit dem 10-15fachen Volumen PBS verdünnt. Nach 5 min. Zentrifugation bei 400 x g wurde das Zellpellet in 10 ml PBS aufgenommen. Zur Zellzählung wurden die Zellen 1:10 (oder 1:100) in 3 %iger Essigsäure verdünnt, um Erythrozyten zu lysieren. Nach Berechnung der Zellzahl wurde mit Medium die gewünschte Zielkonzentration eingestellt.

### Durchführung der MLR

Um die Proliferationsfähigkeit der zur Stimulation eingesetzten PBMC (Aktivator, Tier A) zu unterbinden, wurden diese Zellen mit 25 Gy bestrahlt.

Je 10<sup>6</sup> PBMC von 7 individuellen Tieren (als Effektoren: E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7) wurden mit 10<sup>6</sup> bestrahlten PBMC des Tieres A in 2 ml X-VIVO Medium mit 0,1 % Mercaptoethanol und 1 mM Na-pyruvat für 4 Tage in 24 well-Platten kultiviert. Als Positivkontrolle der maximal erreichbaren Proliferationsrate wurden die PBMC mit 2 µg/ml PHA stimuliert. Als Negativkontrolle wurden die PBMC ohne Aktivatorzellen oder Zusatz von PHA mitgeführt.

Um die modulierende Wirkung der MSC auf die Proliferation der PBMC zu untersuchen, wurden MSC eines weiteren Tieres (I) in verschiedenen Konzentrationen (0,125 x 10<sup>6</sup> - 10<sup>6</sup>) in DMEM/10% FCS in 24 well-Platten ausgesät.

Nach 24 Stunden Inkubation wurde das Medium abgenommen und die Effektor und Aktivator PBMC wurden in X-VIVO Medium in den oben aufgeführten Konzentrationen auf den Zellrasen pipettiert und für weitere 4 Tage inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension in ein Röhrchen überführt, abzentrifugiert (300 x g, 5 min.) und das Zellpellet in 50 µl PBS aufgenommen und für Ki67 und CD3 gefärbt. Das Ki67 Antigen ist ein nukleärer Proliferationsmarker, der auf allen proliferierenden Zellen während der G<sub>1</sub>, S, M und G<sub>2</sub> Phasen, nicht jedoch während der G<sub>0</sub> Phase des Zellzyklus zu finden ist. Das CD3 Antigen ist als Bestandteil des T-Zellrezeptors ein Marker für die T-Zellen.

Als weiteres Kontrollexperiment zu Untersuchung der immunmodulierenden und T-Zell proliferationsinhibierenden Eigenschaften der pMSC wurden Kreuzreaktionen mit humanen Zellen durchgeführt. Als Standardgruppe wurden die Proliferation von Inhibition PHA-stimulierter humaner Effektorzellen durch Koinkubation mit hMSC untersucht. Ein identischer Ansatz durch Koinkubation humaner Effektorzellen mit pMSC wurde durchgeführt. In Parallelansätzen wurde porcine Effektoren PHA stimuliert und die proliferationsinhibierenden Eigenschaften von hMSC (menschliche MSC) gemessen.

### Färbung

#### -CD-3 Markierung

Zu der Suspension wurden 2 µl PE-markierter CD3 Antikörper bzw. 10 µl Isotypkontrolle-PE (mouse IgG1-PE) gegeben und 15-30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert. Dazu wurde zu der Lösung 100 µl Intra Stain Lösung A vorsichtig dazugegeben und bei Raumtemperatur im Dunkeln für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 2 ml PBS hinzugefügt, mit den Zellen gemischt und 5 Minuten mit 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesogen bis auf 50 µl. Die Zellen wurden gut resuspendiert.

-Permeabilisierung und Markierung mit Ki67-FITC

Es wurde 100 µl Intra Stain B und 10 µl FITC-markierter Ki67 bzw. 10 µl IgG1 mouse Isotypkontrolle-FITC dazugegeben, gut gemischt und bei Raumtemperatur im Dunkeln für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 2ml PBS zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 300 x g wurde der Überstand abgesogen und das Pellet in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert.

Anschließend wurde die FACS-Messung durchgeführt.

### **2.2.5 Operative Methode**

#### **2.2.5.1 Versuchsaufbau**

Es wurden 25 männliche und weibliche deutsche Hybridschweine mit einem Gewicht zwischen 30-45 kg Körpergewicht (mittleres Gewicht 34 kg), einem Alter von ca. drei Monaten und einem physisch und psychisch einwandfreien Zustand in die Untersuchung einbezogen. Nach der Anlieferung der Tiere wurden sie zwei Wochen prophylaktisch mit Antibiose vorbehandelt und hatten ausreichend Zeit zur Akklimatisierung.

Die Tiere wurden in drei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe (Gruppe I) bestand aus 10 Tieren (6 männliche und 4 weibliche Tiere) zur Etablierung des Ischämie/Reperfusion-induzierten akuten Nierenversagens im Schwein, die zweite Gruppe (Gruppe II) mit 8 weiblichen Tieren bekam nach ANV autologe mesenchymale Stromazellen transplantiert und die dritte Gruppe (Gruppe III) mit 7 weiblichen Tieren war die Kontrollgruppe, bei der nach Induktion eines ischämischen Nierenschadens anstelle der Stammzellen nur Medium appliziert wurde. In Abbildung 3 werden die drei Gruppen aufgelistet mit dem zeitlichen Ablauf der Behandlung der Tiere.

Es verstarben 5 Tiere (drei weibliche und zwei männliche Tiere), die nicht in den Gruppen aufgelistet sind, die Ursachen werden im Diskussionsteil näher erläutert.

Die Ballonkatheterisierung wurde als neue und in der Ratte nicht anwendbare Methode etabliert, so dass im ersten Schritt eine Gruppe I genutzt wurde, um die Verschlusszeiten durch den Ballonkatheter festzulegen, die erforderlich waren, um einen deutlichen Anstieg des Serumkreatininspiegels über 4 mg/dl zu erreichen.

Bei der zweiten Gruppe II musste, um autologe mesenchymale Stromazellen für die Transplantation zu gewinnen, zwei Wochen vor der Operation Knochenmark entnommen werden. Außerdem wurde die Gruppe II wie folgt unterteilt: Vier Tiere erhielten frische Zellen und vier Tiere eingefrorene Zellen. Die eingefrorenen Zellen wurden aufgetaut und bis zu einem Volumen von 30 ml mit DMEM aufgefüllt, ohne das DMSO und FCS auszuwaschen.

Dieser Tierversuch wurde von der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg mit der Nummer 47/07 genehmigt.

Gruppe I: Nierenversagen/10 Tiere + Zellkulturmedium (=Etablierungsgruppe)

Behandlungstag	Behandlung	Prozedur	Anzahl der Tiere	Narkose
Tag 0	Kulturmedium	1.Induktion der Nierenischämie mit Ballonkatheter 2.Implantation des Kulturmediums in suprarenale Arterie 3.Setzen eines ZVK in Vena jugularis und eines Urinkatheters, Blutentnahme, Serumgewinnung	10	1. Narkose
Tag 1		Blutentnahme 5ml über ZVK, Serumgewinnung		
Tag 2		Blutentnahme 5ml über ZVK, Serumgewinnung		
Tag 3		Blutentnahme 5ml über ZVK, Serumgewinnung		
Tag 4		Blutentnahme 5ml über ZVK, Serumgewinnung		
Tag 5		Blutentnahme 5ml über ZVK, Serumgewinnung		
Tag 6		Blutentnahme 5ml über ZVK, Serumgewinnung		
Tag 7		Blutentnahme 5ml über ZVK, Serumgewinnung		

Behandlungstag	Behandlung	Prozedur	Anzahl der Tiere	Narkose
Tag 14		Blutentnahme 5 ml aus V. auricularis magna, Serumgewinnung		Sedation
Tag 28		1. Blutentnahme 5ml, Serumgewinnung 2. Tötung der Tiere und Organentnahme 3. Analysen: Histologie/ Osteopathologie		2. Narkose

**Abbildung 3: Induktion und Behandlung des ischämischen Nierenversagens der drei verschiedenen Gruppen**

Gruppe II: Nierenversagen/8 Tiere + MSC

Behandlungstag	Zellart	Prozedur	Anzahl der Tiere	Narkose
Tag -14		1. Knochenmarkentnahme 2. Aufbereitung der Zellen und Kultivierung	8	1. Narkose
Tag 0	MSC	1. Induktion der Nierenischämie mit Ballonkatheter 2. Implantation der Zellen in suprarenale Arterie 3. Setzen eines ZVK in Vena jugularis, Blutentnahme, Serumgewinnung		2. Narkose
Tag 1		Blutentnahme 5ml über ZVK, Serumgewinnung		
Tag 2		Blutentnahme 5ml über ZVK, Serumgewinnung		
Tag 3		Blutentnahme 5ml über ZVK, Serumgewinnung		
Tag 4		Blutentnahme 5ml über ZVK, Serumgewinnung		
Tag 5		Blutentnahme 5ml über ZVK, Serumgewinnung		
Tag 6		Blutentnahme 5ml über ZVK, Serumgewinnung		

Behandlungstag	Zellart	Prozedur	Anzahl der Tiere	Narkose
Tag 7		Blutentnahme 5ml über ZVK, Serumgewinnung		
Tag 14		Blutentnahme 5 ml aus V. auricularis magna, Serumgewinnung		Sedation
Tag 28		1. Blutentnahme 5ml, Serum- gewinnung 2. Tötung der Tiere und Or- ganentnahme 3. Analysen: Histogie/ Osteopathologie		3. Nar- kose

**Abbildung 3 (fortgeführt): Induktion und Behandlung des ischämischen Nierenversagens der drei verschiedenen Gruppen**

Gruppe III: Nierenversagen/7Tiere + Zellkulturmedium (=Kontrollgruppe)

Behandlungstag	Zellart	Prozedur	Anzahl der Tiere	Narkose
Tag 0	Kulturmedium	1.Induktion der Nierenischämie mit Ballonkatheter 2.Implantation des Kulturmediums in suprarenale Arterie 3.setzen eines ZVK in Vena jugularis, Blutentnahme, Serumgewinnung	7	1. Narkose
Tag 1		Blutentnahme 5ml über ZVK, Serumgewinnung		
Tag 2		Blutentnahme 5ml über ZVK, Serumgewinnung		
Tag 3		Blutentnahme 5ml über ZVK, Serumgewinnung		
Tag 4		Blutentnahme 5ml über ZVK, Serumgewinnung		
Tag 5		Blutentnahme 5ml über ZVK, Serumgewinnung		
Tag 6		Blutentnahme 5ml über ZVK, Serumgewinnung		
Tag 7		Blutentnahme 5ml über ZVK, Serumgewinnung		

Behandlungstag	Zellart	Prozedur	Anzahl der Tiere	Narkose
Tag 14		Blutentnahme 5 ml aus V. auricularis magna, Serumgewinnung		Sedation
Tag 28		1. Blutentnahme 5ml, Serumgewinnung 2. Tötung der Tiere und Organentnahme 3. Analysen: Histologie/ Osteopathologie		2. Narkose

**Abbildung 3 (fortgeführt): Induktion und Behandlung des ischämischen Nierenversagens der drei verschiedenen Gruppen**

Gruppe I bestand aus 10 Tieren zur Etablierung der Methode, Gruppe II mit 8 Tieren bekam eine autologe mesenchymale Stromazelltransplantation und Gruppe III mit 7 Tieren war die Kontrollgruppe.

**2.2.5.2 Entnahme von Knochenmark**

Zwei Wochen bevor die Tiere der Gruppe II, die autologe mesenchymale Stromazellen erhalten sollten, operiert wurden, wurde ihnen Knochenmark entnommen.

Dafür wurden die Tiere im Stall intramuskulär mit 20 mg /kg KGW Ketamin, 2 mg/kg KGW Xylazin und 10 mg/Tier Atropinsulfat in die laterale Halsmuskulatur sediert. Anschließend wurden sie in den Operationssaal transportiert, intubiert und an das Narkosegerät geschlossen. Bei Spontanatmung mit 2-3 Vol.% Isofluran + 0,8 l/min (35 %) Sauerstoff + 1,0 l/min Luft wurde die Narkose aufrechterhalten.

Es wurde ein ca. 2 cm langer Hautschnitt auf Höhe der Regio tuberis coxae (Hüftböckerregion) durchgeführt.

Unter Röntgendurchleuchtung wurde aus dem Beckenkamm mittels einer Biopsienadel mit einer mit 5000 I.E. Heparin gefüllten, sterilen 25 ml-Spritze 20 ml Knochenmark aspiriert. Dieses Knochenmark wurde dann nach 2.2.1. im Labor aufgearbeitet, um die mesenchymalen Stromazellen zu gewinnen.

Anschließend wurde die Haut mit Klammern verschlossen und die Wunde mit einem Wundpflaster eingesprüht. Die Tiere erhielten einmalig eine Gabe von Antibiotikum (Veracin compositum) und Schmerzmittel (Metacam) intramuskulär.

Die Narkose wurde ausgeleitet und nach Einsetzen des Schluckreflexes extubiert. Das Tier wurde in den Stall verbracht.

### **2.2.5.3 Anästhesie für die Operation**

- 10 mg/Tier Atropin
- Ketamin 20 mg/kg KGW
- Xylazin 2 mg/kg KGW

wurden in einer Mischspritze aufgezogen und intramuskulär in die laterale Nackenmuskulatur appliziert, siehe in Abbildung 4 ein Dosierungsschema nach Gewicht.

- Intubation mit Trachealtuben
- Die Tiere wurden rasiert und gewaschen. Eine Temperaturkontrolle fand mit einem handelsüblichen Digitalthermometer rektal statt.
- Ein venöser Zugang mit einer Braunüle lag in der Vena auricularis magna.

Gewicht	Ketamin (i.m.) 0,2 ml/kg KGW	Xylazin (i.m.) 0,1 ml/kg KGW + 1 ml*
20 kg	4,0 ml	3,0 ml
25 kg	5,0 ml	3,5 ml
30 kg	6,0 ml	4,0 ml
35 kg	7,0 ml	4,5 ml
40 kg	8,0 ml	5,0 ml
45 kg	9,0 ml	5,5 ml
50 kg	10,0 ml	6,0 ml
55 kg	11,0 ml	6,5 ml
60 kg	12,0 ml	7,0 ml
65 kg	13,0 ml	7,5 ml
70 kg	14,0 ml	8,0 ml

**Abbildung 4: Dosierungsschema nach Gewicht zur Einleitung der Anästhesie bei Schweinen**

\*Dosierung Xylazin: 1 ml Xylazin+ 0,1 ml Xylazin/kg KGW

#### 2.2.5.4 Einleitung der Operation

- Beatmung mit Hilfe eines Narkosegerätes
- 2-3 Vol.% Isofluran + 0,8 l/min (35%) Sauerstoff + 1,0 l/min Luft
- Zur Schmerzlinderung erhielten die Tiere intravenös Meloxicam 0,4 mg/kg KGW und nach Bedarf Metamizol 25-50 mg/kg KGW.

- Antibiose Benzathin-Benzylpenicillin (80.000 I.E./ml), Benzylpenicillin-Procaïn (120.000 I.E./ml), Dihydrostreptomycinsulfat (2000.000 I.E./ml), Procainhydrochlorid (20 mg/ml) 3 ml/50 kg KGW intramuskulär
- Anästhesieprotokoll: Sauerstoffsättigung des Blutes, Pulsfrequenz, expiratorische CO<sub>2</sub> Konzentration, EKG und Temperatur; die Überwachungsdaten wurden alle 15 min aufgezeichnet

### 2.2.5.5 Narkoseausleitung

- Isofluranzufuhr senken
- Beatmungsfrequenz senken bis zur Spontanatmung
- Extubation bei Einsetzen des Schluckreflexes
- Zur Schmerzlinderung erhalten die Tiere weiterhin für drei Tage Meloxicam in den zentralen Venenkatheter.
- Zur prophylaktischen Antibiose erhalten die Tiere zwei weitere Male im Abstand von 48 Stunden Benzathin-benzylpenicillin, Benzylpenicillin-Procaïn, Dihydrostreptomycinsulfat, Procainhydrochlorid (Veracin compositum) intramuskulär.

### 2.2.5.6 Notfallmedikation

- Bei Hyperthermie: 50 mg/kg KGW Metamizol, gekühlte Infusion (12°C), kalte Umschläge
- Bradykardie (Herzfrequenz unter 75/min): 10 mg Dobutamin/1000 ml isoton. Kochsalzlg., 5-20 mg/Tier Atropinsulfat
- Tachykardie (Herzfrequenz über 150/min): 2 ml Lidocain 1%/ Tier

### **2.2.5.7 Anästhesie und perioperative Versorgung der Schweine**

Das jeweilige Versuchstier wurde zwölf Stunden vor dem Versuch nüchtern gestellt, am selben Morgen von den anderen Tieren getrennt und erhielt lediglich Wasser ad libitum zu trinken.

Das Tier wurde im Stall durch eine intramuskuläre Injektion mit 20 mg /kg KGW Ketamin, 2 mg/kg KGW Xylazin und 10 mg/kg KGW Atropinsulfat sediert. Die Applikation erfolgte über eine Kanüle mit Infusionsschlauch in die laterale Nackenmuskulatur.

Das sedierte Tier wurde in den Operationssaal verbracht. Dort wurde in die Vena auricularis magna ein Venenverweilkatheter gelegt. Über diesen erfolgten die erste Blutentnahme und die Flüssigkeitszufuhr. Anschließend wurde das Tier intubiert, gewaschen, rasiert und desinfiziert.

Das Schwein wurde in Rückenlage ausgebunden, an ein Narkosegerät geschlossen und mit 2-3 Vol. % Isofluran + 0,8 l/min (35 %) Sauerstoff + 1,0 l/min beatmet.

Die Sauerstoffsättigung des Blutes, der Puls, das EKG, die expiratorische CO<sub>2</sub> Konzentration und die Körpertemperatur wurden überwacht und alle 15 Minuten in einem Narkoseprotokoll festgehalten (Abbildung 5).

## OP-Narkosebericht

**Datum:** \_\_\_\_\_ **Arzt** \_\_\_\_\_

**Tier:** \_\_\_\_\_ **Geschlecht:** m / w \_\_\_\_\_ **Gewicht:** \_\_\_\_\_ kg

**OP:** \_\_\_\_\_

**Medikation:**

Ketamin: \_\_\_\_\_ Metacam: \_\_\_\_\_

Xylazin: \_\_\_\_\_ Veracin: \_\_\_\_\_

Atropin: \_\_\_\_\_ Dobutamin: \_\_\_\_\_

Uhrzeit	O <sub>2</sub> -Sättigung (%)	CO <sub>2</sub>	Puls / min	Temperatur (°C)

**Abbildung 5: Operationsprotokoll**

In dem abgebildeten OP-Narkosebericht wurden alle 15 Minuten die Daten wie O<sub>2</sub>-Sättigung, CO<sub>2</sub>-Gehalt, der Puls und die Temperatur der Schweine eingetragen.

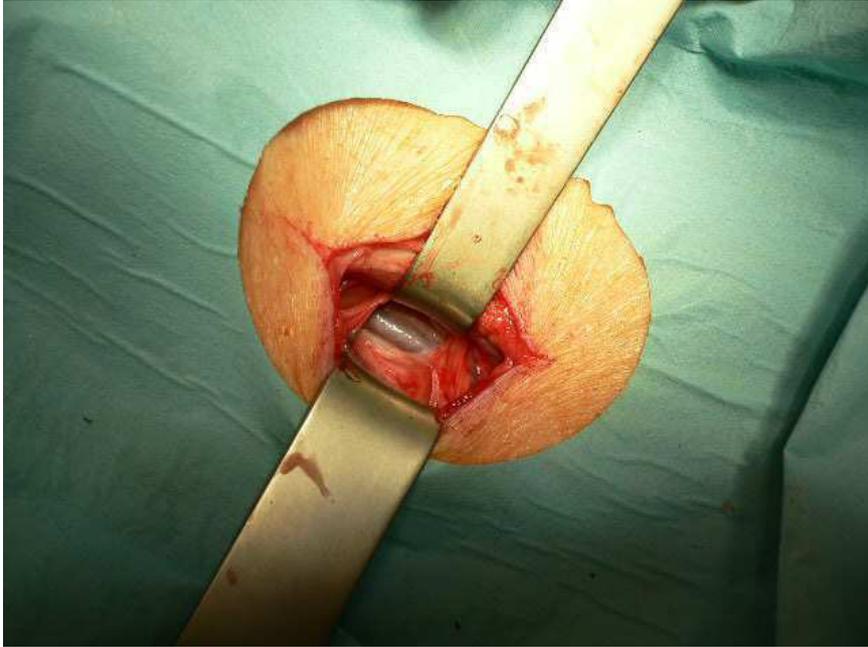
Die Tiere erhielten während der Operationszeit zur Flüssigkeitszufuhr ca. 50 ml/kg KGW isotonische Kochsalzlösung (NaCl). Nachdem die Schleusen gelegt wurden, erhielten die Tiere isotonische Kochsalzlösung (NaCl) mit Heparin (5000 I.E./ml) versetzt.

Zur Prophylaxe von Schmerzen bekam das Schwein am Tag der Operation und an drei weiteren Tagen Meloxicam. Zur Vermeidung von Infektionen erhielt es Benzathinbenzylpenicillin, Benzylpenicillin-Procaïn, Dihydrostreptomycinsulfat (Veracin compositum) am Tag der Operation und noch drei weitere Injektionen im Abstand von 48 Stunden.

Bei Beginn der subkutanen Naht wurde die Isofluranzufuhr abgestellt, nach ca. 3-5 Minuten wurde die Beatmungsfrequenz herabgesetzt bis zum Einsetzen der Spontanatmung. Die Extubation erfolgte, wenn der Schluckreflex einsetzte. Der Venenverweilkatheter wurde entfernt und die Tiere in Einzelboxen unter einer Rotlichtlampe untergebracht.

### **2.2.5.8 Chirurgisches Vorgehen zur Induktion des akuten Nierenversagens und Transplantation der mesenchymalen autologen Stromazellen**

Nachdem die Inguinalregionen desinfiziert und mit sterilen Abdecktüchern abgeklebt waren, wurde mit einem Einmalskalpell jeweils ein Hautschnitt von ca. 5 cm Länge gemacht. Es wurden die Muskelbäuche des M. sartorius und M. gracilis dargestellt, zwischen ihnen stumpf in die Tiefe präpariert und mit Roux Haken aufgehalten. Die A., die V. und der N. femoralis lagen frei wie in Abbildung 6 zu sehen. Die A. femoralis wurde freipräpariert und zwei Fäden (Vicryl 2-0 USP) um das Gefäß gelegt. Mit einem der beiden Fäden wurde das Gefäß distal ligiert. Mit einer Mikulicz-Klemme, die unter das Gefäß hindurch geführt wurde, und einem zweiten Faden wurde das Gefäß fixiert. Nun wurde das Gefäß mit einem kleinen Schnitt eröffnet. Durch diese Öffnung wurde eine Schleuse mit einem Führungsdraht kontrolliert herzwärts eingeführt und mit dem zweiten Faden fixiert. Anschließend wurde die Luft aus der Schleuse abgesogen und 5000 I.E. Heparin instilliert.

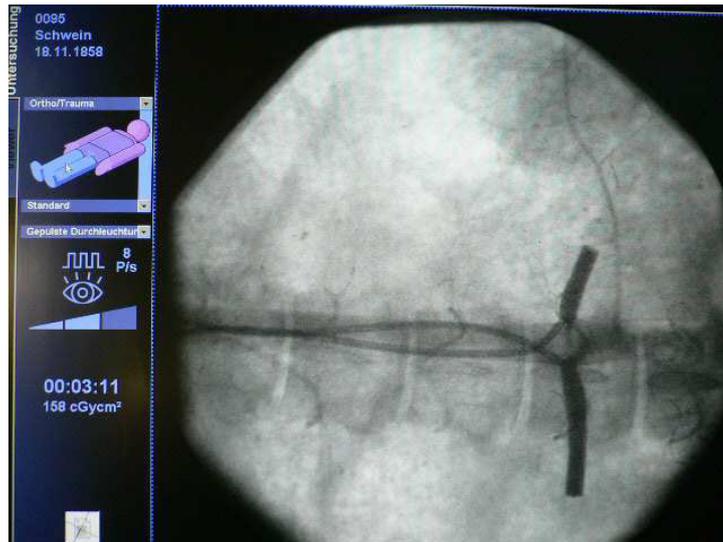


**Abbildung 6: Darstellung der Vena femoralis und Arteria femoralis**

Die Muskelbäuche des M. sartorius und M. gracilis werden durch Roux Haken aufgehoben, so dass sich die Vena femoralis und Arteria femoralis darstellen

Foto: Boche

Über die Schleuse wurde ein Führungsdraht eingeführt. Über diesen Führungsdraht wurde ein Führungskatheter vorgeschoben. Die Platzierung des Führungskatheters in der A. renalis erfolgte unter Röntgendurchleuchtung und Kontrastmittelapplikation. Wenn der Führungskatheter in der A. renalis platziert war, wurde der Führungsdraht entfernt und ein Koronar-Führungsdraht vorgeschoben. Über diesen gelangte der Ballonkatheter in die A. renalis. Auf die gleiche Weise wurde der Ballonkatheter in die andere Niere vorgeschoben. Dann wurde an den Ballonkatheter eine Pumpe angebracht und mit Kontrastmittel gefüllt. Nun wurde der Ballonkatheter mit Hilfe der Pumpe aufgeblasen (8-12 mbar) und unter Kontrastmittelapplikation und Röntgendurchleuchtung die Durchgängigkeit der A. renalis überprüft. Wenn nach Aufdehnung des Katheters keine Durchgängigkeit mehr vorhanden war (siehe Abbildung 7), wurde die Ischämie in der Niere für 110 Minuten induziert.

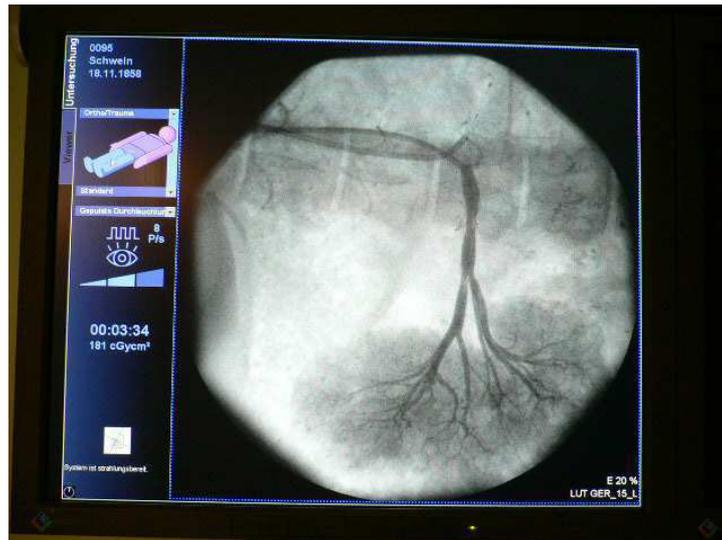


**Abbildung 7: Ballonkatheterisierung der Aa. renales im C-Bogen Bild dargestellt**

Die beiden Ballonkatheter sind in den Aa. renales platziert, aufgeblasen (mit Kontrastmittel gefüllt) und durch den C-Bogen dargestellt, so dass die Induktion des akuten Nierenversagens beim Schwein erfolgt.

Foto: Brunswig-Spickenheier

Nach 110 Minuten wurde der Druck der Ballonkatheter wieder abgelassen, beide Ballonkatheter entfernt und die Durchgängigkeit der Aa. renales mit Kontrastmittelgabe und Röntgendurchleuchtung überprüft (siehe Abbildung 8).



**Abbildung 8: Reperfusion der Aa. renales mit Kontrastmittel im C-Bogen Bild dargestellt**

Nach Induktion des akuten Nierenversagens beim Schwein wurde nach Ablassen der Ballonkatheter die Reperfusion der Aa. renales durch Kontrastmittel mit Hilfe des C-Bogens dargestellt.

Foto: Brunswig-Spickenheier

Ein Führungskatheter wurde belassen, der andere wurde entfernt. Unter Röntgendurchleuchtung und Kontrastmittelgabe wurde der Führungskatheter ca. 10 cm in die suprarenale Aorta vorgeschoben. Zehn Minuten nach Ablassen der Ballonkatheter wurden die autologen mesenchymalen Stromazellen ( $2 \times 10^6$  Zellen/kg KGW) bzw. für die Kontroll- und Etablierungsgruppe das Medium (DMEM) langsam appliziert. Der Führungskatheter wurde anschließend entfernt.

Die Schleusen wurden aus den Aa. femorales entfernt und sofort mit einem um das Gefäß geschlungenen Faden (Vicryl 2-0 USP) ligiert. Die Muskeln mit der dazugehörigen Faszie sowie das subkutane Gewebe wurden jeweils mit Einzelheften (Vicryl 2-0 USP) adaptiert. Die Haut wurde mit Klammern verschlossen. Anschließend wurden mit einem Wundpflaster die Wunden eingesprüht.

### **2.2.5.9 Legen des zentralen Venenkatheters (ZVK)**

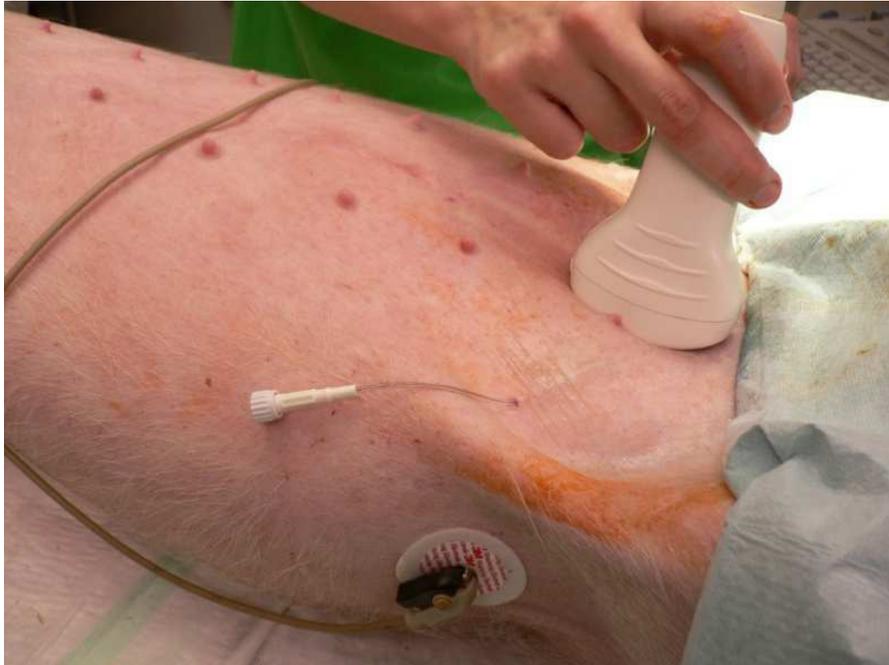
Das Tier lag in Rückenlage, die ventrale und linke laterale Halsregion wurden rasiert, gewaschen und desinfiziert. Nachdem die Region mit sterilen Abdecktüchern abgeklebt war, wurde ein ca. 8-10 cm langer Hautschnitt eine handbreit caudal des Kehlkopfes mit einem sterilen Einmalskalpell durchgeführt.

Die Vena jugularis stellte sich am Vorderrand des Musculus sternocleidomastoideus dar. Das Gefäß wurde doppelt angeschlungen und nach cranial ligiert. Mit einem sterilen Skalpell wurde ein ca. 1 cm langer Schnitt an der linken seitlichen Halsseite in die Haut gesetzt. Der auf der linken Halsseite einmündende zentrale Venenkatheter wurde mit Hilfe einer Kornzange subkutan Richtung ventrale Halsseite geführt. Mit einer Gefäßschere wurde ein kleiner Schnitt in die Vena jugularis externa plaziert und der zentrale Venenkatheter herzwärts ca. 10 cm vorgeschoben. Anschließend erfolgte die 2. Blutentnahme und es wurde 1 ml einer Heparinverdünnung instilliert. Um das Ende des zentralen Venenkatheters an der linken Halsseite zu befestigen, wurden Leukoplaststreifen um das Ende des ZVK befestigt, die mit einem Faden durch die Haut fixiert wurden. Das Tier bekam eine Leibbandage umgelegt, um das Ende des zentralen Venenkatheters zu schützen. Auf diese Weise konnte am stehenden Schwein im Wachzustand Blut abgenommen werden. Es war auch möglich, über diesen Zugang NaCl-Infusionen oder Medikamente zu geben.

### **2.2.5.10 Legen des Blasenkatheters**

Es wurde unter Ultraschallkontrolle in Rückenlage ein Blasenkatheter in der Regio pubica in der Blase platziert. Zunächst wurde die spaltbare Braunüle (Splittocan) seitlich der Regio pubica subkutan bis zur Medianen geführt und dann senkrecht unter Ultraschallkontrolle in die Blase injiziert. Dann wurde der Katheter (Certon-Katheter) mit Mandrin über die spaltbare Braunüle in die Harnblase vorgeführt. Anschließend wurden der Mandrin und die spaltbare Braunüle entfernt (Abbildung 9). Mit Hilfe von Leukoplaststreifen, die am Ende des Kathe-

ters befestigt wurden, wurde der Katheter an der Haut festgenäht. Der Katheter wurde durch eine Leibbandage geschützt. Trotz dieser Maßnahmen gelang es den meisten Tieren innerhalb der ersten Tage den Katheter zu ziehen oder durchzubeißen.



**Abbildung 9: Platzierung des Blasenkatheters unter Ultraschallkontrolle**

Mit Hilfe des Ultraschalls wird die Blase dargestellt, punktiert und der Katheter platziert. Anschließend wird der Katheter mit Hilfe von Leukoplaststreifen an der Haut fixiert und eine Leibbandage als Schutz umgelegt.

Foto: Boche

### **2.2.5.11 Postoperatives Versorgung, Blut- und Urinentnahme**

Die Tiere wurden jeden Tag nach der Operation auf ihr Allgemeinbefinden untersucht. Wenn der Gesundheitszustand der Tiere schlecht war, wurden die Tiere dementsprechend behandelt, z. B. mit Infusionen, Antibiotika oder Schmerzmitteln.

Wie oben beschrieben, erfolgte vor der Operation eine Blutentnahme aus dem Venenverweilkatheter und nach der Operation aus dem zentralen Venenkatheter mit einer Monovette und

einem Adapter. In den folgenden 7 Tagen wurden den Tieren täglich jeweils 5-7 ml Blut aus dem zentralen Venenkatheter entnommen, danach wurde dieser gezogen. Am 14. Tag nach der Operation wurde das Tier durch eine intramuskuläre Injektion mit Xylazin und Ketamin sediert und Blut mit einer Kanüle aus der V. auricularis magna entnommen. Am 28. Tag nach der Operation wurden die Tiere getötet, zuvor wurde ebenfalls aus der V. auricularis magna Blut entnommen. Anschließend wurde das Blut in einer Zentrifuge bei 1500 x g für 10 Minuten zentrifugiert, das Serum in sterile Röhrchen überführt und bei -20°C eingefroren.

Anschließend wurde das Serum im Zentrallabor des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf auf die Parameter Natrium, Kalium, Chlorid, Harnstoff, Kreatinin, Eiweiß und Albumin untersucht.

Natrium, Kalium und Chlorid wurden durch indirekte Messungen mit ionenselektiven Elektroden gemessen (Potentiometrie). Harnstoff wurde mit Hilfe der Photometrie und Kreatinin durch die Jaffé-Methode bestimmt. Der Gesamt-Eiweißgehalt wurde ebenfalls durch die Photometrie (Biuretreaktion) bestimmt. Durch eine Farbstoffbindungstechnik mit Bromkresolgrün und der bichromatischen Bestimmung bei 630 nm und 405 nm wurde das Albumin ermittelt.

Ebenfalls wurde über den Urinkatheter mit Hilfe einer Spritze Harn gewonnen und im Zentrallabor des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf auf die Parameter Natrium, Kalium, Chlorid, Harnstoff, Kreatinin und Albumin untersucht.

### **2.2.6 Postmortale Diagnostik**

#### **2.2.6.1 Euthanasie, Sektion und Probenentnahme**

Die Versuchstiere wurden 28 Tage nach der Operation im Stall mit einer intramuskulären Injektion sediert und in den Operationssaal verbracht. Dort wurde ihnen ein Venenverweilkatheter in die Vena auricularis magna gelegt. Über diesen Venenverweilkatheter wurde Blut

abgenommen und das Tier mit Pentobarbital (Narcofen 1 ml/kg KGW) euthanasiert und anschließend obduziert. Ein Tier wurde erst 9 Wochen nach der Operation euthanasiert.

Das Hauptaugenmerk bei der Sektion lag dabei auf der Untersuchung der Nieren. Sämtliche makropathologischen Veränderungen wurden dokumentiert.

Für die histologische Untersuchung wurden im Anschluss an die Sektion Gewebeprobe von Niere (Cortex und Medulla), Lunge, Leber, Herz, Milz und Knochenmark entnommen. Dabei handelte es sich um 1 cm x 1 cm große Würfel, die in 4%iges, gepuffertes Formalin eingelegt wurden. Gleichartige Proben wurden einzeln in Probenröhrchen und in flüssigem Stickstoff bei -196° C schockgefroren. Nach der vollständigen Kryokonservierung wurden diese Röhrchen bei -80° C gelagert.

### **2.2.6.2 Einbettung und Histologie der Proben**

Die Proben wurden 48 Stunden in Formalin fixiert, anschließend in PBS bei 4° C aufbewahrt, dann in einen Einbettkasten gelegt und für mindestens 6 Stunden unter fließendem Wasser gewässert.

Die Proben wurden in einem Einbettautomaten in der Abteilung für hepatobiliäre Chirurgie des Universitätsklinikum Eppendorf weiterbearbeitet. Die Gewebeprobe wurden dehydriert, in Paraffin eingebettet und in Serien geschnitten, die auf einen Objektträger aufgebracht, entparaffiniert und gefärbt wurden.

Es wurden die Proben mit Hämalaun-Eosin (H.E.), PAS (Perjodsäure-Schiff-Reagens) und Azan-Färbungen beurteilt. Die Färbungen wurden mit Routineprotokollen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte am Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin durch Prof. Guber in einer verblindeten, semiquantitativen Analyse mit einer Gradeinteilung verschiedener Parameter wie:

- Lymphozyten: Grad 1, nur minimale Infiltrate, kaum mehr als im gesunden Tier; Grad 5, höchstbedenkbarer Grad, wie man ihn bei typischen Niereninfektionen sieht (Leptospirose etc.)
- Fibrosen: Grad 1, zwischen 0 und 20% des Interstitiums fibrosiert; Grad 5, 80-100 % des Interstitiums fibrosiert (beurteilt im Azan-gefärbten Schnitt)
- Degeneration: Grad 1, in den fibrotischen Herden dezente, gerade erkennbare Degenerationen; Grad 5, maximal denkbare Degeneration in den fibrotischen Bereichen
- Regeneration: siehe Degeneration
- Glomerulonephritis, membranöse Glomerulonephritis: Grad 1, etwa 0-20 % der Glomeruli betroffen; Grad 5, 80-100 % der Glomeruli betroffen (beurteilt im PAS-gefärbten Schnitt)
- Proteinzyylinder in den harnabführenden Wegen: Grad 1, nur ganz vereinzelt, bis 20 % der distalen Sammelrohre; Grad 5, 80-100 % der Sammelrohre betroffen.

Alle Zwischengrade sind als lineare Regressionen zu interpretieren.

### **2.2.6.3 Untersuchung der Fehldifferenzierung von mesenchymalen Stromazellen**

Ein Tier wurde erst 9 Wochen nach Setzen des akuten Nierenversagens getötet. Es wurden Kryoschnitte des Nierengewebes mit Sudan Rot gefärbt (wie in 2.2.3.3.1 beschrieben), um zu untersuchen, ob die MSC eine adipogene Differenzierung durchgemacht hatten.

Um eine osteogene Differenzierung der MSC im Nierengewebe auszuschließen, wurden von vier Tieren der Gruppe II je die Hälfte einer Niere in der Osteopathologie des Universitätsklinikum Eppendorf mit Hilfe der Makroradiologie analysiert.

### **2.3 Statistik (statistische Berechnungen)**

Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Für die statistische Analyse wurde der zweiseitige Student'sche t-Test Typ 2 durchgeführt.

Ergebnisse mit einem Signifikanzwert  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant definiert.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Charakterisierung von mesenchymalen Stromazellen**

#### **3.1.1 Wachstumskurven**

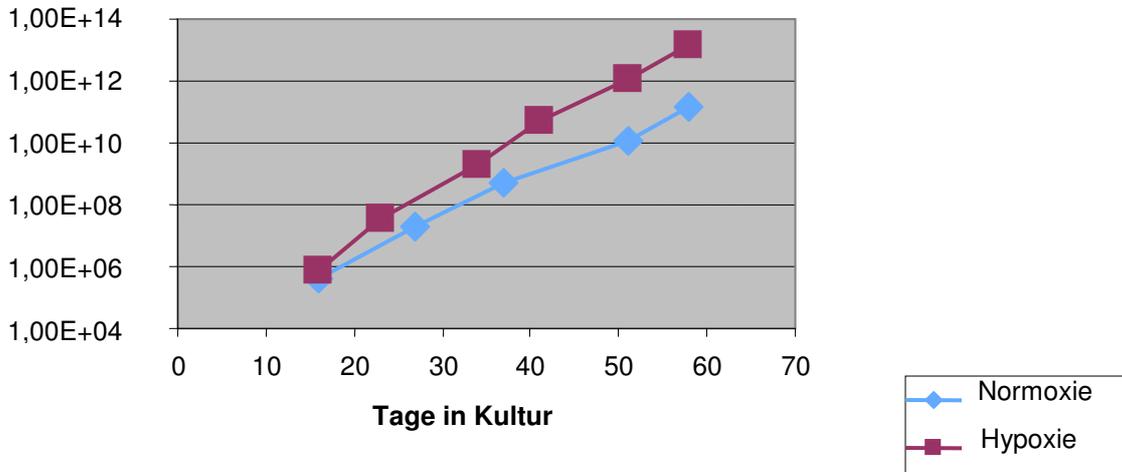
Um zu gewährleisten, dass in dem begrenzten Zeitraum von 14 Tagen zwischen Knochenmarkentnahme und Transplantation eine ausreichende Menge an MSC zur Verfügung gestellt werden konnten, mussten die optimalen Kulturbedingungen für das Zellwachstum definiert werden. Dazu wurden Wachstumskurven erstellt, aus denen durch wiederholtes Trypsinieren der Zellen bei einer identischen Zelldichte und erneuten Aussaat in einer festgelegten Konzentration die kumulative Zellzahl sowie die Verdopplungsraten unter unterschiedlichen Kulturbedingungen ermittelt werden konnten.

Die kumulative anwachsende Zellzahl und die Verdoppelungsrate ließen sich durch ein Excel-Programm errechnen. Es zeigte sich, dass unter hypoxischen Bedingungen die kumulative Zellzahl der MSC von beiden Schweinen schneller anstieg als unter normoxischen Bedingungen. Am Ende der 58-tägigen Kulturdauer lag die kumulative Zellzahl unter hypoxischen Bedingungen bei  $1,53 \times 10^{13}$  und unter normoxischen Bedingungen bei  $1,49 \times 10^{11}$  bei Schwein 1. Bei Schwein 2 war ebenfalls ein schnellerer Anstieg der kumulativen Zellzahl zu sehen, nach 36 Tagen in Kultur lag sie bei  $1,27 \times 10^{12}$  unter hypoxischen Bedingungen und unter normoxischen Bedingungen bei  $4,75 \times 10^{10}$  (siehe Abbildungen 10, 11).

Die Verdoppelungsrate bei Schwein 1 lag unter Normoxie bei 18,37 und unter Hypoxie bei 24,28. Bei Schwein 2 lag sie bei 16,48 unter Normoxie und 26,98 unter Hypoxie (siehe Abbildung 12).

**Wachstumskurve der MSC Schwein 1, Normoxie vs. Hypoxie**

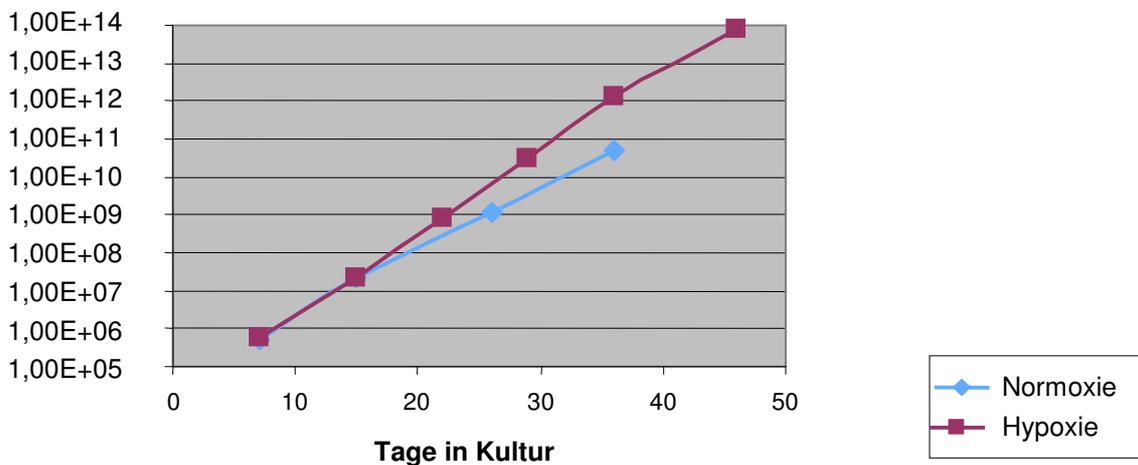
Kumulative Zellzahl



**Abbildung 10: Wachstumskurve der MSC bei Schwein 1 unter Normoxie und Hypoxie**

**Wachstumskurve der MSC Schwein 2, Normoxie vs. Hypoxie**

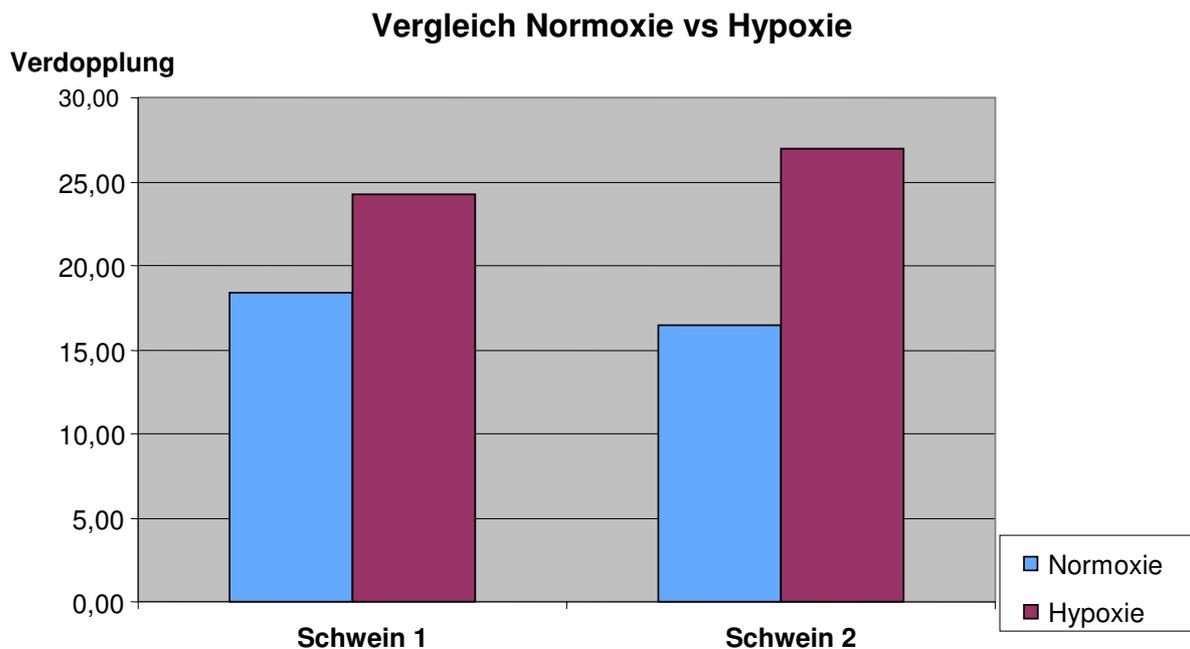
Kumulative Zellzahl



**Abbildung 11: Wachstumskurve der MSC bei Schwein 2 unter Normoxie und Hypoxie**

In diesen beiden Abbildungen stellen sich die Wachstumskurven der MSC unter Normoxie und Hypoxie dar. Auf der Abszisse ist die Kulturdauer und auf der Ordinate die kumulative Zellzahl aufgetragen. Sowohl bei Schwein 1 als auch bei Schwein 2 war

der Anstieg unter Hypoxie größer. Bei Schwein 2 wurde die Kultur der MSC nach 40 Tagen unter Normoxie abgebrochen, da es zu phänotypischen Veränderungen der Zellen kam.



**Abbildung 12: Verdopplungsrate der MSC unter Normoxie und Hypoxie bei Schwein 1 und 2**

In dieser Abbildung zeigt sich die Verdopplungsrate der MSC unter Hypoxie und Normoxie. Sowohl bei Schwein 1 als auch bei Schwein 2 war die Verdopplungsrate unter Hypoxie größer.

### 3.1.2 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS: fluorescence activated cell sorting)

Zur Charakterisierung der MSC und um eine Verunreinigung mit hämatopoietischen Zellen auszuschließen, wurden deren Oberflächenepitope in einer FACS-Analyse untersucht.

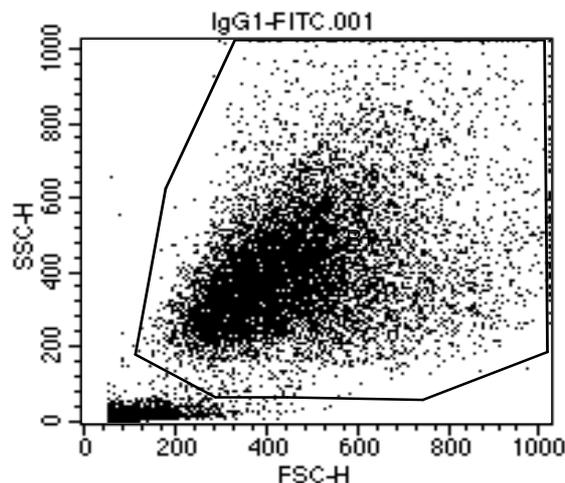
Die Oberflächenantigene CD45, CD14, CD90, CD105 und MHC I wurden mit Hilfe von FITC-gekoppelten Antikörpern gemessen.

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des FACS Calibur-Gerätes von Becton Dickinson mit der FACS-Calibur Software ausgewertet (Abbildung 13).

Zur Kontrolle unspezifischer Bindungen und zum Erstellen der Parameter am Durchflusszytometer dienten Isotypkontrollen. Hierbei kamen Antikörper des gleichen Ig-Isotyps zum Einsatz, die kein spezifisches Epitop erkennen und mit demselben Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind.

Die jeweiligen Isotypkontrollen sind in grün dargestellt (Abbildungen 14 a-e).

Es wurden nur die Zellen verwendet, die in der FACS Analyse CD90, CD105 und MHCI positiv sind und CD14 und CD45 negativ sind. CD90, CD105 und MHCI gehören zu den nicht-hämatopoetischen Antigenen und CD14 und CD45 zu den hämatopoetischen Antigenen (Abbildungen 14 a-e). In den folgenden Abbildungen ist gezeigt, welches Muster die Zellen haben müssen, um diese Kriterien zu erfüllen.



**Abbildung 13: Analyse der Zellen in der Durchflusszytometrie (FACS Analyse)**

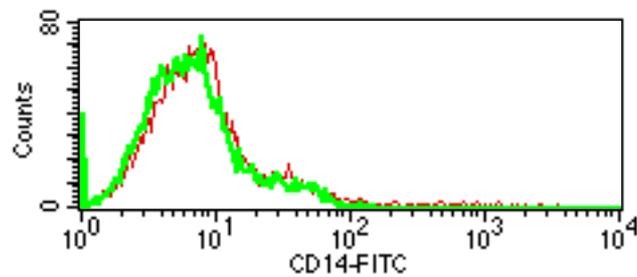
Zunächst erfolgte eine Eingrenzung der Zellen (gating) nach Größe (dargestellt auf der Abzisse) und Granularität (Ordinate). Für die Analyse der Zellen wurden nur diejenigen, die sich in der markierten Region befanden, einbezogen. Außerhalb dieser markierten Region befinden sich Erythrozyten, Zelltrümmer und tote Zellen.

**Hämatopoietische Antigene**

**Abbildungen 14 a-e: Charakterisierung der Oberflächenepitope der MSC in der FACS-Analyse**

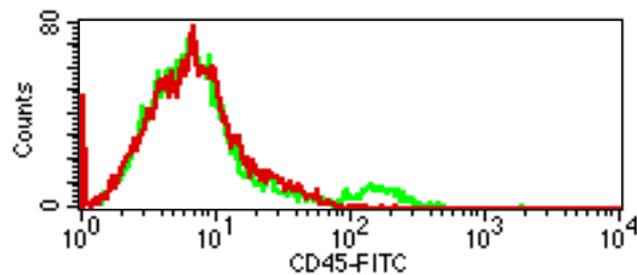
In diesen Abbildungen wird die Expression von MHC I, CD90 und CD105 und das Fehlen von CD45 und CD14 gezeigt, damit sind die ISCT Kriterien für MSC erfüllt.

Die grüne Linie zeigt die Isotypkontrolle



**Abbildung 14 a: Charakterisierung der Oberflächenepitope der MSC in der FACS-Analyse; CD14**

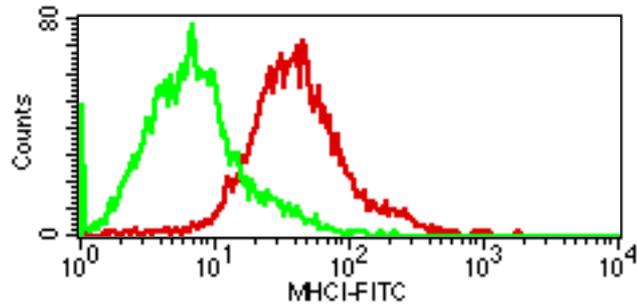
Grüne Line: Isotypkontrolle, Rote Line: CD14



**Abbildung 14 b: Charakterisierung der Oberflächenepitope der MSC in der FACS-Analyse; CD45**

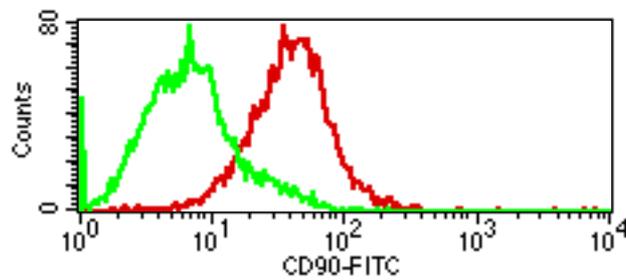
Grüne Line: Isotypkontrolle, Rote Line: CD45

**Nicht-hämatopoietische Antigene**



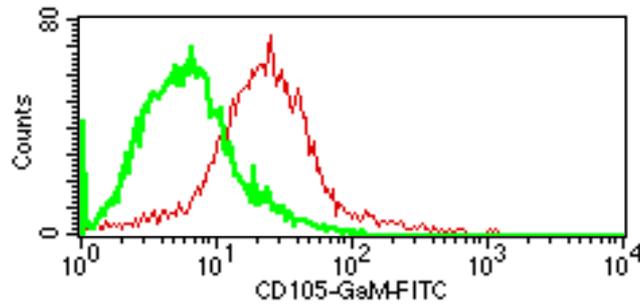
**Abbildung 14 c: Charakterisierung der Oberflächenepitope der MSC in der FACS-Analyse; MHC I**

Grüne Line: Isotypkontrolle, Rote Line: MHC I



**Abbildung 14 d: Charakterisierung der Oberflächenepitope der MSC in der FACS-Analyse; CD90**

Grüne Line: Isotypkontrolle, Rote Line: CD90

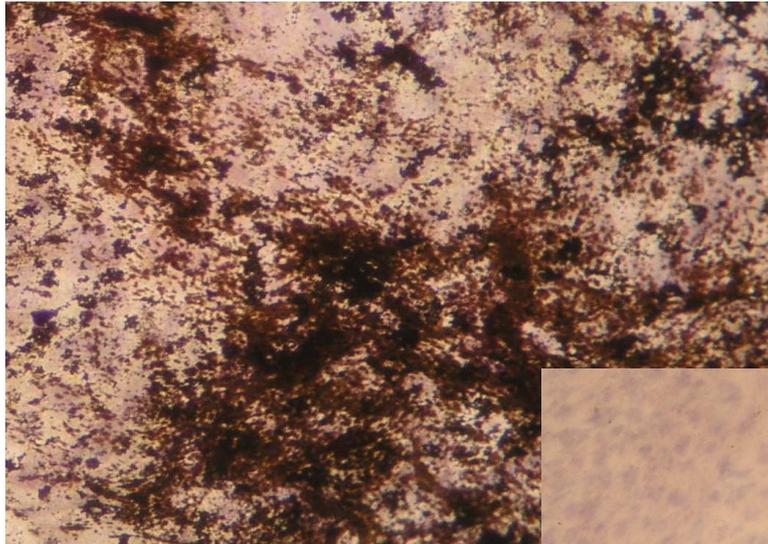


**Abbildung 14 e: Charakterisierung der Oberflächenepitope der MSC in der FACS-Analyse; CD105**

Grüne Line: Isotypkontrolle, Rote Line: CD105

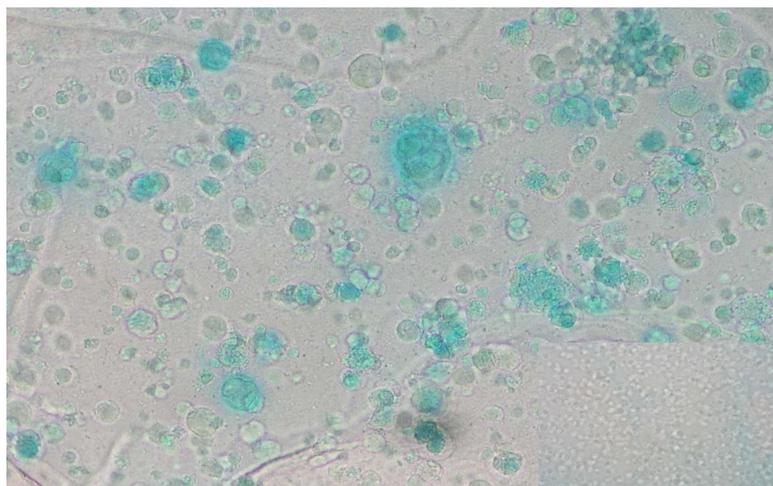
### 3.1.3 Differenzierung

Zum Nachweis der Multipotenz der isolierten Zellen wurden sie nach den in 2.2.3.3.1-2.2.3.3.3 beschriebenen Protokollen zu Adipozyten, Chondroblasten und Osteoblasten differenziert. Mit der von Kossa Färbung konnte die von den Osteoblasten synthetisierte Kalziummatrix (Abbildung 15) sichtbar gemacht werden, mit der Alcian Blau Färbung stellten sich Glukosoaminoglykane der Chondrozyten (Abbildung 16) dar und mit der Sudan Rot B Färbung ließen sich die Fettvakuolen der Adipozyten nachweisen (Abbildung 17). Die aus dem Knochenmark isolierten Zellen müssen multipotent sein und nur, wenn sie diese Kriterien erfüllen, können sie für die Studie Verwendung finden. In den folgenden Abbildungen 15-17 zeigen sich die Differenzierungen.



**Abbildung 15: Osteogene Differenzierung der aus dem Knochenmark der Schweine isolierten Zellen**

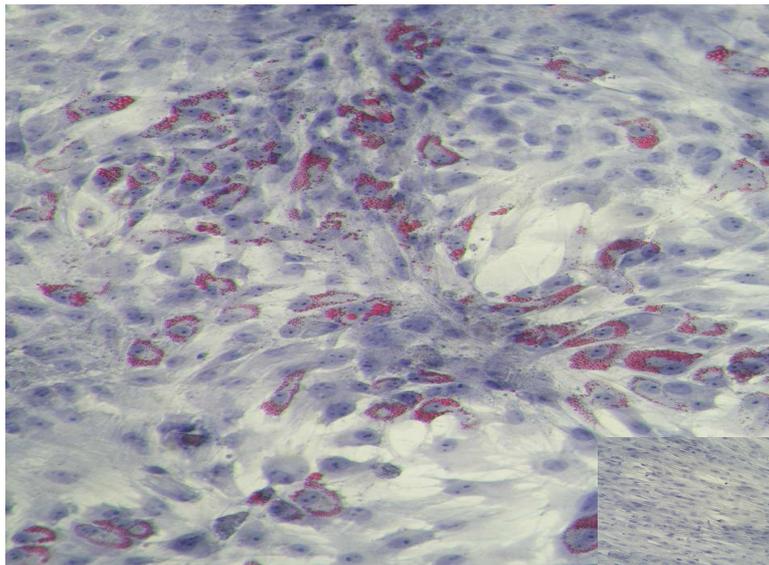
In dieser Abbildung zeigt sich die osteogene Differenzierung der aus dem Knochenmark der Schweine isolierten Zellen mittels von Kossa Färbung. Das Kalzium der Osteoblasten wird sichtbar. In dem kleinen Feld ist die Negativkontrolle zu sehen. von Kossa Färbung, Durchlicht-Mikroskop, Vergrößerung x100, Foto: Brunswig-Spickenheier



**Abbdilung 16: Chondrogene Differenzierung der aus dem Knochenmark der Schweine isolierten Zellen**

Diese Abbildung zeigt die chondrogene Differenzierung, in der sich die Proteoglycane auf der Zelloberfläche der Chondroblasten mittels Alcian-Blau Färbung darstellen. In dem kleinen Feld ist die Negativkontrolle zu sehen.

Alcian-Blau Färbung, Durchlicht-Mikroskop, Vergrößerung x100, Foto: Brunswig-Spickenheier



**Abbildung 17: Adipogene Differenzierung der aus dem Knochenmark der Schweine isolierten Zellen**

In dieser Abbildung stellen sich die Fettvakulolen mittels Sudan-Rot Färbung in rot dar und sie zeigt somit die adipogene Differenzierung. Das kleine Fenster zeigt die Negativkontrolle.

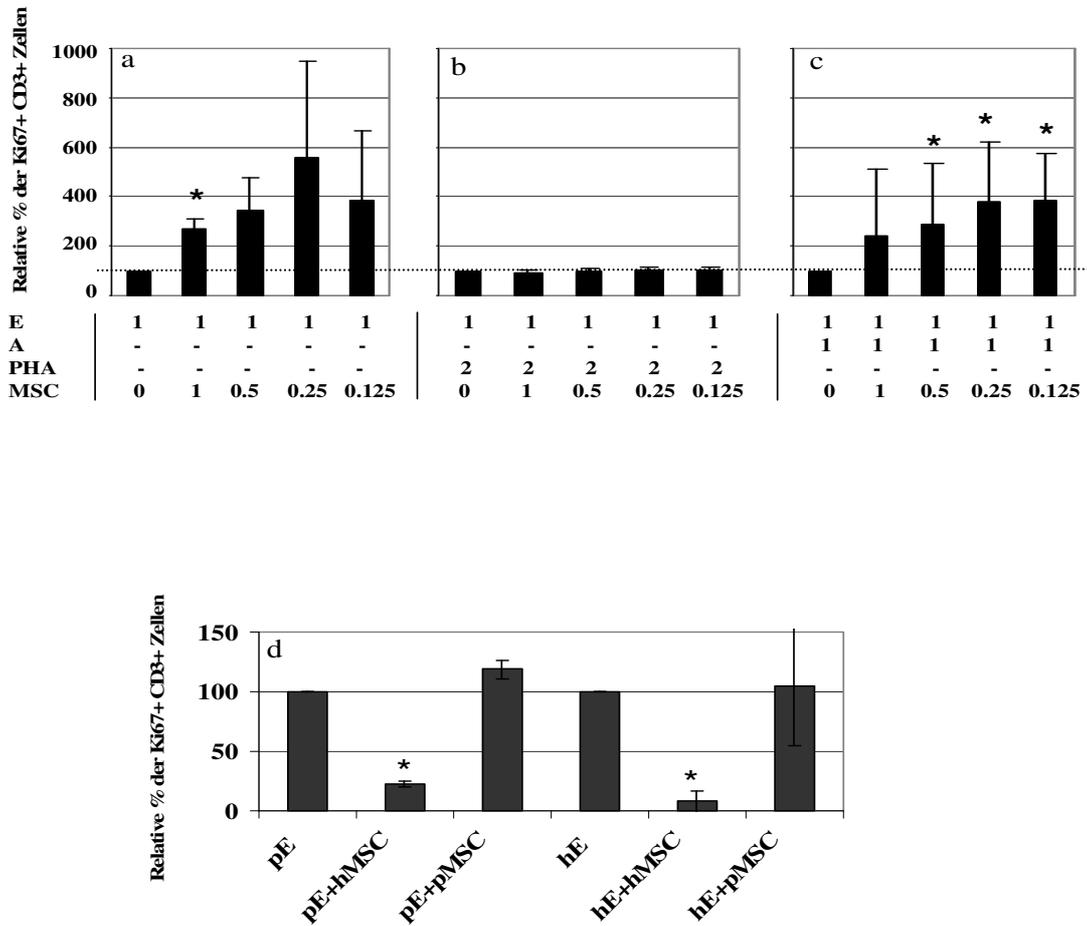
Sudan-Rot Färbung, Durchlicht-Mikroskop, Vergrößerung x100, Foto: Brunswig-Spickenheier

### 3.1.4 Untersuchung der T-Zell-Suppression durch MSC in vitro

Um die immunmodulierenden Effekte der pMSC (mesenchymale Stromazellen des Schweines) zu ermitteln, wurden die Zellen mit Hilfe der MLR (mixed-lymphocyte reaction) untersucht. Es wurde dafür die one-way MLR benutzt. Die Kokultivierung der pMSC mit isolierten PBMC zeigte eine signifikante Aktivierung von CD3<sup>+</sup> Zellen, welches durch einen Anstieg der Ki67<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> Zellen von 0,1% auf 4,7% verdeutlicht wird (Abbildung 18 a). In relativer Zahl bedeutet dies ein Anstieg von 100% auf 470%, welches nicht bei MSC anderer Spezies nachzuweisen ist. Die Zugabe von PHA (Phytohämagglutinin) zum Effektor PBMC ergab eine maximale Stimulation von CD3<sup>+</sup> Zellen auf 91% (Abbildung 18 b) diese Aktivierung konnte nicht durch die pMSC inhibiert werden.

Die Koinkubation des Effektors (E) mit bestrahlten Zellen (Aktivator, bezeichnet mit A) erbrachte eine Proliferation von CD3<sup>+</sup> Zellen. Der Anteil variierte zwischen 2% und 4,1%. Auch hier ergab die Zugabe von pMSC keine Reduktion der T-Zell-Aktivierung, sondern eine Stimulation (Abbildung 18 c). Wurde die allo-Stimulation auf 100% gesetzt, erreichte die Aktivierung durch MSC bis zu 450%.

Im Gegensatz zu den MSC des Schweines zeigten die MSC des Menschen (hMSC) eine schnelle Herunterregulierung der Proliferation von mitogen-stimulierten Effektor-Zellen des Schweines (Abbildung 18 d), was für das Fehlen der immunmodulierenden Eigenschaften der MSC vom Schwein spricht.



**Abbildung 18 a-d Gemischte Lympozytenreaktion (Mixed lymphocyte reactions MLR)**

Die T-Zell-Aktivierung in einer *in vitro* MLR wird nicht durch MSC des Schweines (pMSC) unterdrückt. Die porcinen Effektorzellen ( $10^6$ ) wurden a, im Verhältnis von 1:1 bis 1:0,125 mit porcinen MSC (pMSC) kokultiviert, b in Anwesenheit von 2  $\mu\text{g/ml}$  PHA als Aktivator und pMSC in fallenden Konzentrationen inkubiert oder c, mit bestrahlten allogenen Schweine-PBMC ( $10^6$ ) als Aktivatorzellen und pMSC in sinkender Anzahl kultiviert. In d wurden die mit PHA-stimulierten porcinen (pE) oder humanen (hE) Effektorzellen im Verhältnis von 1:1 entweder mit porcinen MSC (pMSC) oder mit humanen MSC (hMSC) kultiviert.

Nach 96 Stunden wurden die proliferierenden Ki67<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> T Zellen in einer FACS-Analyse quantifiziert. Die Anzahl der Ki67<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> Zellen in Abwesenheit von MSC wurde als 100% gesetzt und ist in Abb. a, b und c durch eine gestrichelte Linie markiert. Bei allen folgenden Untersuchungsergebnissen mit abnehmender Anzahl von MSC wurden an diesem Prozentsatz Bezug genommen. Die Säulen stellen die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dar. Signifikante Veränderungen ( $p < 0,05$ ) bezogen auf die Gruppe ohne MSC sind mit einem Stern markiert (\*). In d, wurde die Fähigkeit der MSC des Schweines oder des Menschen die mitogen stimulierten Effektorzellen des Schweines oder des Menschen (hE oder pE) zu inhibieren in einer Kreuzreaktion getestet. Nur die hMSC konnten die mitogen stimulierten Effektorzellen des Schweines und des Menschen inhibieren, eine Inkubation mit pMSC war ohne Effekt.

E=Effektor-Zelle; A=Aktivator-Zelle

## **3.2 Operative Methode**

### **3.2.1 Überlebensrate und Tierverluste**

In diesem Versuch wurden 25 Tiere in die Auswertung einbezogen. 5 Tiere verstarben zu verschiedenen Zeitpunkten während der Versuchsreihe.

Schwein 5746 wurde vier Tage nach der Operation in seiner Box tot aufgefunden. Die Operation war ohne Komplikationen verlaufen. Dem Tier wurde nur Medium als Kontrolltier injiziert. Es hatte nach der Operation ein schlechtes Allgemeinbefinden und zeigte Apathie. Der Serum-Kreatininwert am Tag des Todes lag bei 16,6mg /dl und der Kaliumwert bei >10mmol/l. Unter Umständen war die Nippeltränke in der Box dieses Schweines defekt.

Schwein 7169 ist nach Extubation verstorben. Das Tier war vor der Operation gefüttert worden und zeigte zum Ende der Operation eine extreme Aufgasung des Abdomens.

Schwein 7811 musste aufgrund starken Durchfalls, Apathie und Appetitlosigkeit zehn Tage nach der Operation eingeschläfert werden. Es wurden Salmonellen im Kot nachgewiesen. Die

durchgeführte Behandlung mit Antibiotika, Infusion und Buscopan zeigte keine Wirkung. Das Tier gehörte zur Etablierungsgruppe mit 60 Minuten Abklemmzeit der Nierenarterien und zeigte am Tag der Euthanasie einen Serum-Kreatininwert von 1,6mg/dl.

Schwein 208 verstarb am Ende der Operation, noch nicht extubiert, nach einer intravenösen Gabe von Novalgin.

Schwein 295 verstarb während der Operation an einer Hyperthermie, zusätzlich hatte das Schwein einen größeren Blutverlust, da sich die Arterienschleuse gelöst hatte.

Die anderen 25 Schweine überlebten bis zum Ende der Versuchsreihe. Einige Tiere benötigten meist auf Grund von Pneumonien eine zusätzliche Antibiose. Wenn Fieber zusätzlich vorlag, erfolgte auch eine Gabe von Novalgin. Bei schlechtem Allgemeinbefinden und sehr hohen Kreatininwerten erhielten die Tiere eine Kochsalz-Infusion. Die fünf verstorbenen Tiere wurden nicht mit in die Auswertungen einbezogen. Somit ergibt sich eine Ausfallsrate von 16,6%.

### **3.2.2 Etablierung der Methode**

#### **3.2.2.1 Bestimmung der optimalen Abklemmzeit zur Induktion des akuten Nierenversagens**

Zunächst musste die Aufblaszeit der Ballonkatheter in den Aa. renales ermittelt werden, die erforderlich war, um eine reversible Ischämie zu induzieren. Das Ziel war es, einen Serum-Kreatinin Anstieg auf wenigstens 4mg/dl post operationem zu erreichen. Im Rattenmodell (Lange et al, 2005) zeigte sich, dass eine beidseitige Abklemmzeit der Aa. renales von 40 Minuten ausreichend war, um ein akutes Nierenversagen zu verursachen.

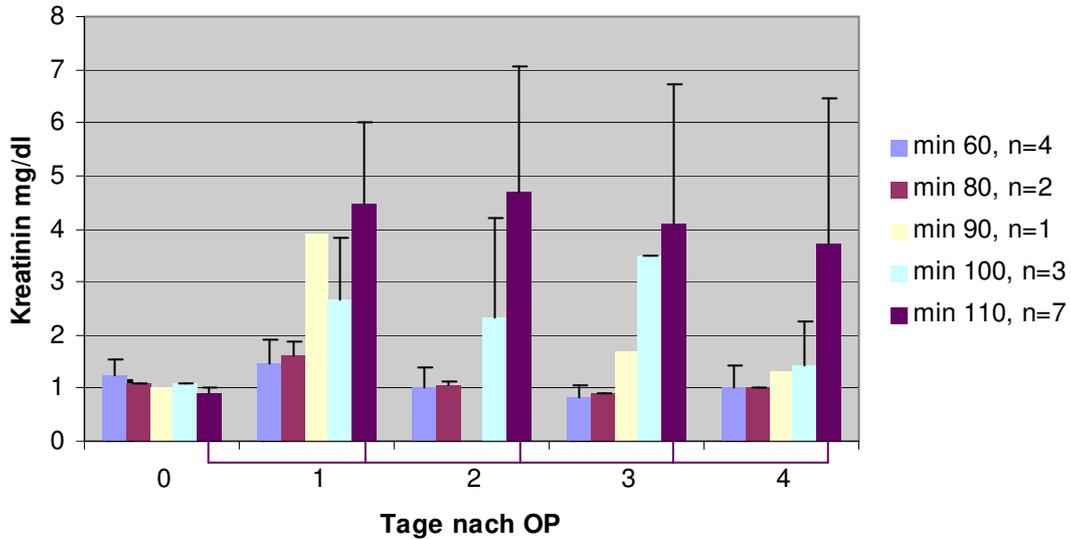
Bei einer Abklemmzeit von 60 Minuten zeigte sich bei vier männlichen Tieren am Tag der Operation ein Serum-Kreatinin im Mittel von  $1,2 \pm 0,3$  mg/dl, am 1. Tag nach der Operation ein Serum-Kreatinin von  $1,5 \pm 0,4$ mg/dl, am 2. Tag von  $1,0 \pm 0,4$  mg/dl und am 3. Tag von  $0,8 \pm 0,2$  mg/dl, d. h. alle Kreatinin-Werte verändern sich nicht signifikant. Nach einer Ver-

schlusszeit von 80 Minuten zeigte sich bei zwei weiblichen Tieren am Tag der Operation ein Kreatinin von  $1,1 \pm 0$  mg/dl, am darauf folgenden Tag ein Kreatinin von  $1,6 \pm 0,3$  mg/dl, am 2. Tag von  $1,05 \pm 0,1$  mg/dl und am 3. Tag von  $0,9 \pm 0$  mg/dl. Auch in diesem Fall waren die Veränderungen des Kreatinins nicht signifikant.

Auch bei einer Abklemmzeit von 90 Minuten zeigte sich bei einem männlichen Tier nur ein Anstieg auf 3,9mg/dl am 1. Tag nach der Operation.

Erst bei einer Abklemmzeit von 100 Minuten zeigte ein männliches Tier einen Anstieg auf 4,5 mg/dl Serum-Kreatinin am 2. Tag nach der Operation, allerdings die beiden weiblichen Tiere zeigten am ersten Tag nach der Operation einen Serum-Kreatinin von  $2 \pm 0,3$  mg/dl und am 2. Tag von  $1,25 \pm 0,1$  mg/dl. Ebenfalls in dieser Gruppe waren die Kreatinin-Veränderungen nicht signifikant. Erst bei einer Verschlusszeit von 110 Minuten zeigten sieben weibliche Tiere eine signifikante Veränderung des Kreatinins über vier Tage nach der Operation: am 1. Tag einen Serum-Kreatinin von  $4,4 \pm 1,5$  mg/dl, am 2. Tag von  $4,6 \pm 2,4$ mg/dl und am 3. Tag von  $4,1 \pm 2,6$ mg/dl. Hier lassen sich die großen Abweichungen erkennen (Abbildung 19). Fast alle der sieben weiblichen Tiere waren nach sieben Tagen wieder auf dem Anfangswert. Ein Anstieg des Serum-Kreatinins auf mindestens 4mg/dl wurde nur in der Gruppe mit 110 Minuten Abklemmzeit erreicht.

**Abklemmzeit vs. Kreatinin**



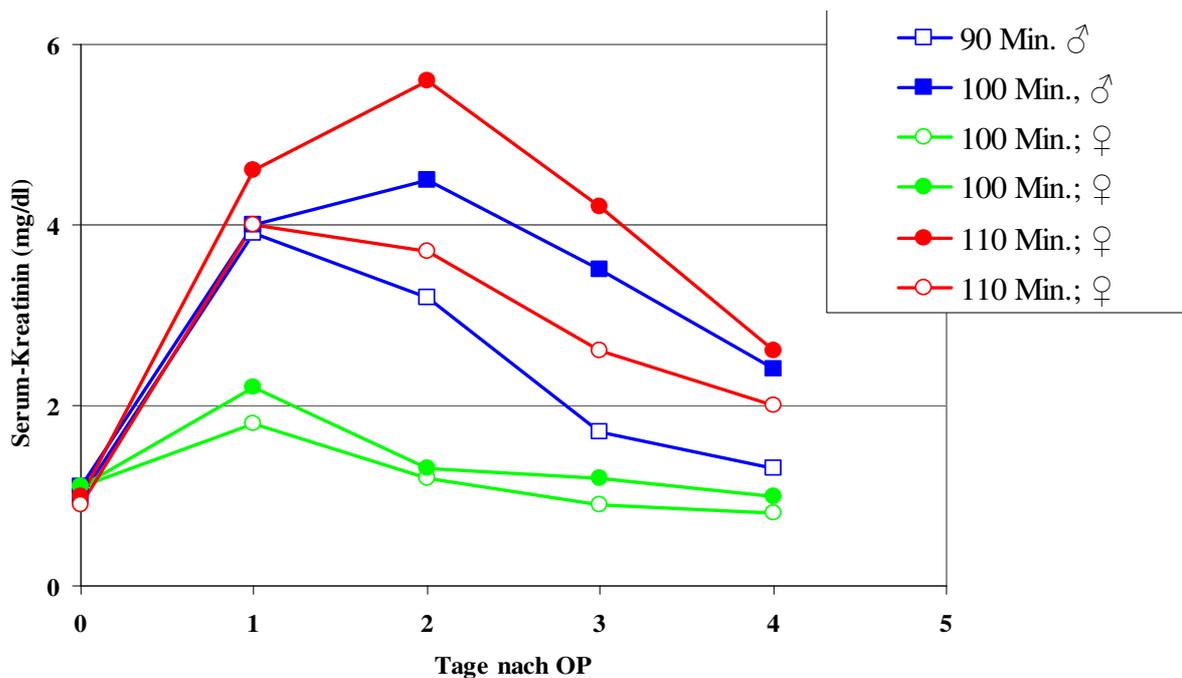
**Abbildung 19: Serumkreatinin-Anstieg nach Induktion des akuten Nierenversagens mit unterschiedlichen Abklemmzeiten der Aa. renales**

In dieser Säulengraphik stellen sich die unterschiedlichen Abklemmzeiten in verschiedenen Farben dar. Auf der Vertikalen ist der Kreatinin in mg/dl aufgetragen und auf der Horizontalen die Tage nach der Operation. Es ist zu erkennen, dass erst bei einer Abklemmzeit von 110min. die Kreatininwerte über 4mg/dl ansteigen und über einen Zeitraum von vier Tagen signifikant erhöht bleiben im Vergleich zum Tag 0. Die Klammern, die unter den Säulen sind, stellen dar, was signifikant ist. Werte < 0,05 sind signifikant. n=Anzahl der Tiere

**3.2.2.2 Der Anstieg des Serumkreatininwertes nach Induktion des akuten Nierenversagens beim männlichen und weiblichen Schwein**

Wir haben den Anstieg des Serum-Kreatinins mit unterschiedlichen Abklemmzeiten zwischen weiblichen und männlichen Schweinen verglichen. Bei 90 Minuten Abklemmzeit zeigte das männliche Schwein am Tag 1 post operationem einen Anstieg auf 3,9mg/dl und fiel dann wieder mit den Werten ab. Das männliche Schwein mit 100 Minuten Abklemmzeit zeigte

einen Serum-Kreatinin von 4,0mg/dl am Tag 1 und von 4,5 mg/dl am Tag 2. Während die weiblichen Schweine bei 100 Minuten Abklemmzeit einen Anstieg des Serum-Kreatinins am Tag 1 von 2,2 und 1,8mg/dl und am Tag 2 von 1,2 und 1,3mg/dl zeigten. Erst bei einer Abklemmzeit von 110 Minuten zeigten die weiblichen Tiere einen Serum-Kreatinin Anstieg am Tag 1 von 4,0 und 6,5mg/dl und am Tag 2 von 3,7 und 7,0mg/dl wie in der Abbildung 20 zu sehen. Da in dieser Versuchsreihe ebenso eine Transplantation mit allogenen Stromazellen vorgenommen werden sollte, wurden ausschließlich weibliche Tiere in die Studie einbezogen. Die beiden weiblichen Tiere mit einer Abklemmzeit von 110 Minuten sind in die Studie als Kontrolltiere miteinbezogen worden.



**Abbildung 20: Anstieg des Serumkreatininwertes nach Induktion des ANV beim männlichen und weiblichen Schwein mit unterschiedlichen Abklemmzeiten der Aa. renales**

In dieser Abbildung zeigen sich nach Induktion des ANV die Anstiege der Serumkreatininwerte von weiblichen und männlichen Schweinen.

Es ist zu erkennen, dass bei einer Abklemmzeit von 100 Minuten die weiblichen Schweine einen sehr geringen Anstieg der Kreatininwerte nach der OP zeigen, während das männliche Schwein schon bei 90 Minuten einen Anstieg und bei 100 Minuten einen starken Anstieg zeigt. Erst bei 110 Minuten zeigen die weiblichen Tiere einen starken Anstieg der Serumkreatininwerte.

### **3.2.3 Serumwerte**

#### **3.2.3.1 Kreatinin**

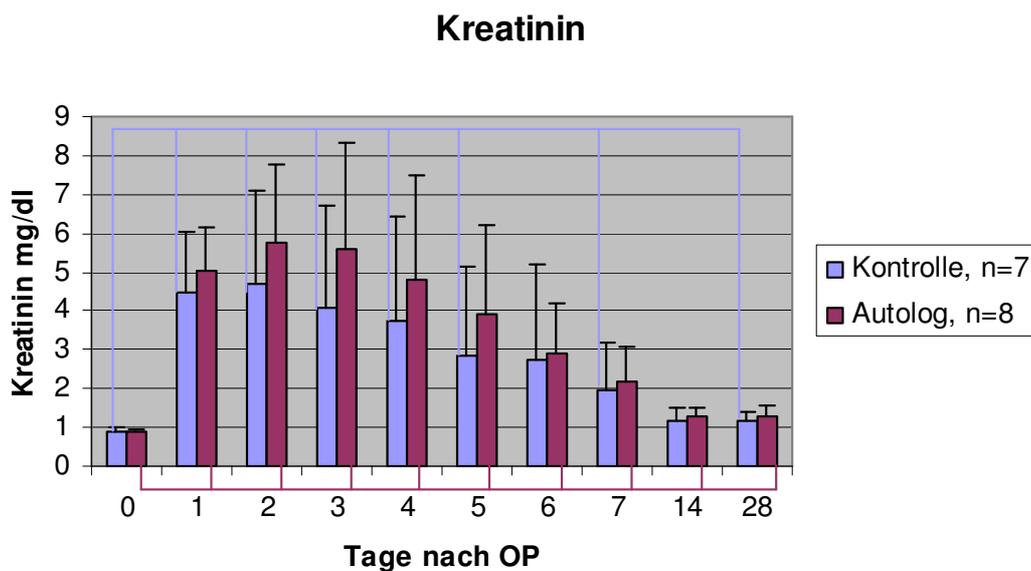
Der Kreatinin ist ein Indikator, um eine eingeschränkte glomeruläre Filtrationsrate z. B. bei akutem Nierenversagen zu erfassen und somit ein Parameter zur Bestimmung der Nierenfunktion. Selbst bei einer Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate von etwa 50% bleibt der Serum-Kreatinin jedoch im Normbereich. Kreatinin entsteht im Muskel aus Kreatin und Kreatinphosphat. In der Leber, der Bauchspeicheldrüse und den Nieren wird Kreatin gebildet und über die Blutbahn an die Muskulatur abgegeben, in der durch die Kreatinkinase die Phosphorylierung zu Kreatinphosphat erfolgt. Bei der Spaltung von Kreatinphosphat wird chemische Energie in mechanische umgesetzt. Beim Abbau von Kreatin und Kreatinphosphat entsteht Kreatinin, welches in den Körperflüssigkeiten verteilt wird. Wenn die GFR auf 50% sich mindert, dann wird der korrespondierende Serumkreatininwert in 20 Stunden erreicht, bei einer GFR-Verminderung auf 20%, dauert es etwa 60 Stunden (Thomas, 1992).

Im Folgenden wurden die Serum-Kreatinin Konzentrationen der Kontrollgruppe mit der Gruppe, die autologe mesenchymale Stromazellen injiziert bekommen hat, verglichen.

Die Werte wurden am Tag der Operation (unmittelbar vor und nach dem Eingriff), die ersten sieben Tage nach der Operation, am 14. Tag nach der Operation und am 28. Tag nach der Operation erhoben.

Nach dem Setzen des ANV stieg der Kreatininwert in der Kontrollgruppe in den nächsten Tagen im Mittel auf das ca. 3-4 fache und in der Gruppe der transplantierten Tieren auf das

ca. 4-5 fache an und fiel nach dem 4. Tag langsam wieder ab. Nach 14 bzw. 28 Tagen waren nahezu wieder die Ausgangswerte erreicht. Auffällig waren hierbei die starken individuellen Schwankungen, was sich in der Graphik (Abbildung 21) in den großen Fehlerbalken wieder spiegelt. Der deutlichste Anstieg war bei einem Tier mit autolog transplantierten MSC (Nr.0095) zu verzeichnen, bei dem am Tag 3 post operationem ein Serumkreatininwert von 10,1 mg/dl zu messen war, bei einem Kontrolltier Nr.5819 war hingegen nur ein marginaler Kreatininanstieg auf 2,2mg/dl am Tag 1 zu beobachten. Bei diesem Tier war der Kreatininwert schon nach 5 Tagen wieder im Normalbereich. In beiden Gruppen wurde ein signifikanter Anstieg beobachtet, aber zwischen den Gruppen gab es keinen signifikanten Unterschied.



**Abbildung 21: Säulengraphik: Vergleich der Serumkreatininwerte der Gruppen mit und ohne Behandlung mit MSC nach Induktion des ANV**

In der Säulengraphik wird deutlich, dass der Kreatininwert ab Tag 1 nach ANV-Induktion signifikant ansteigt. Tendenziell ist dieser Anstieg in der Gruppe mit den autologen MSC behandelten Tieren stärker, jedoch nicht signifikant unterschiedlich von den Kontrolltieren ( $p > 0,3$ ). Am Tag 14 und 28 nähern sich die Kreatininwerte dem Ausgangswert an. Die Standardabweichungen sind in beiden Gruppen sehr groß. Die

Signifikanzen sind durch die Klammern ober- und unterhalb der Säulen dargestellt. Die blauen Klammern zeigen die signifikante Erhöhung des Serum-Kreatinins der Tage nach der Operation im Vergleich zum Tag 0 der Kontrollgruppe, die lila Klammern, die der autolog transplantierten Gruppe. Werte mit  $p < 0,05$  sind signifikant. n=Anzahl der Tiere

### 3.2.3.2 Harnstoff

Harnstoff ist ein Produkt, welches in der Leber gebildet wird. Es entsteht beim Eiweißabbau. Die Elimination erfolgt hauptsächlich über die Niere durch glomeruläre Filtration. 40-60% des filtrierte Harnstoffs diffundieren im proximalen Tubulus zurück, die Rückdiffusion im distalen Tubulus ist abhängig von dem Urinfluss und dem antidiuretischen Hormon. Bei Diurese diffundieren etwa 40% zurück, bei Antidiurese steigt dieser Wert auf 70% an.

Der Harnstoff-Serum Wert ist wenig spezifisch und steigt erst bei einer Abnahme der glomerulären Filtration um 75% an.

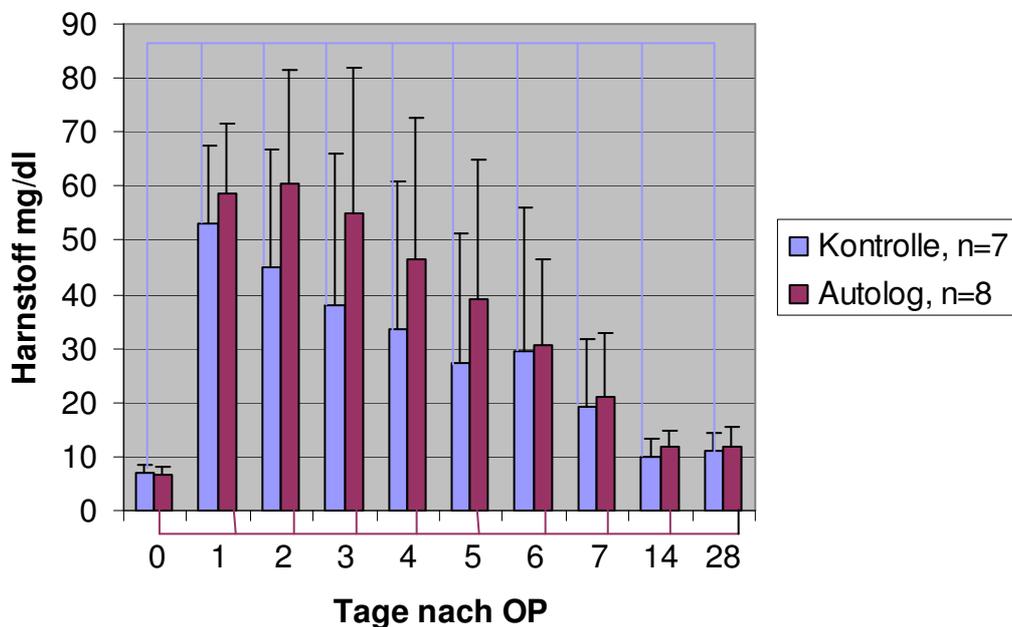
Die Harnstoffbildung im Blut ist von drei Faktoren abhängig. Erstens von dem Urin-Zeit-Volumen und damit der Menge des zugeführten und ausgeschiedenen Wassers, zweitens von der Harnstoff-Bildungsrate, die von der täglichen Eiweißzufuhr abhängt und drittens von der Größe des Glomerulumfiltrats, d.h., wenn eine dauerhafte Erhöhung des Harnstoffs im Serum vorliegt, spricht dies für eine wesentliche Einschränkung der GFR (Thomas, 1992).

Die Harnstoffwerte wurden ebenfalls am Tag der Operation, die ersten sieben Tage nach der Operation, am 14. Tag nach der Operation und am 28. Tag nach der Operation gemessen.

In der Kontrollgruppe mit 7 Tieren zeigte sich nach Induktion des ANV ein Anstieg der Serumharnstoff in den ersten 4 Tagen nach der Operation um das ca. 5-7 fache des Ausgangswertes. Bei der Gruppe, der autolog transplantierten Tiere, um das ca. 8-9 fache des Ausgangswertes. Es waren starke individuelle Schwankungen, in der Graphik (Abbildung 22) durch die großen Fehlerbalken sichtbar, zu verzeichnen. Das Tier Nr.0095 (mit MSC behan-

delt) zeigte den höchsten Harnstoffwert am 3. Tag nach der Operation mit 104mg/dl. Das Tier Nr. 5819 (ohne MSC behandelt) zeigte den geringsten Anstieg und hatte am Tag 3 einen Wert von 14mg/dl. Am 14. Tag nach der Operation näherten sich die Werte dem Normbereich. Die Harnstoffwerte stiegen über den gesamten Zeitraum in beiden Gruppen im Vergleich zum Tag 0 signifikant an. Zwischen beiden Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede.

### Harnstoff



**Abbildung 22: Säulengraphik: Vergleich der Serumharnstoffwerte der Gruppen mit und ohne Behandlung mit MSC nach Induktion des ANV**

Sowohl in der Kurven- als auch in der Säulengraphik wird deutlich, dass der Harnstoffwert in der Gruppe mit den autolog transplantierten Zellen tendenziell stärker, jedoch nicht signifikant ansteigt. Am Tag 14 und 28 nähern sich die Harnstoffwerte dem Ausgangswert an. Die Standardabweichungen sind in beiden Gruppen sehr groß. Die Signifikanzen sind durch die Klammern ober- und unterhalb der Säulen dargestellt. Die blauen Klammern zeigen die signifikante Erhöhung des Serum-Harnstoffs der Ta-

ge nach der Operation im Vergleich zum Tag 0 der Kontrollgruppe, die lila Klammern, die der autolog transplantierten Gruppe. Zwischen den Gruppen gibt es keinen signifikanten Unterschied. Werte  $p < 0,05$  sind signifikant.  $n$ =Anzahl der Tiere

### 3.2.3.3 Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

Der Transfer von Flüssigkeiten und gelösten Substanzen aus den glomerulären Kapillaren entlang einem Druckgefälle in die Bowmansche Kapsel wird als glomeruläre Filtration beschrieben. Die glomeruläre Filtrationsrate beschreibt das Flüssigkeitsvolumen, das von allen Glomeruli pro Zeiteinheit filtriert wird. Sie beträgt normalerweise rund  $10\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$  Körperoberfläche oder ca.  $180\text{l}/\text{Tag}$  beim Menschen.  $99\%$  der ca.  $180\text{l}$  GFR/Tag finden sich im EZR durch tubuläre Resorption wieder, d.h. die fraktionelle Ausscheidung von  $\text{H}_2\text{O}$  beträgt im Mittel ca.  $1\%$  der GFR, die absolute Ausscheidung ca.  $1\text{-}2\text{l}/\text{Tag}$ .

Der effektive Filtrationsdruck ergibt sich aus dem Blutdruck in den Glomeruluskapillaren, abzüglich des Druckes in der Bowman-Kapsel und des onkotischen Druckes im Plasma. ( $P_{\text{eff}} = P_{\text{kap}} - P_{\text{Bow}} - P_{\text{kap}}$ ).

Die GFR ist das Produkt aus  $P_{\text{eff}}$ , der glomerulären Filtrationsfläche  $F$  und der Wasserdurchlässigkeit  $k$  des glomerulären Filters:

$$F \times k = K_f$$

$$\text{GFR} = P_{\text{eff}} \times K_f$$

Zur Messung der GFR muss das Blut eine Indikatorsubstanz mit folgenden Eigenschaften enthalten. Sie muß frei filtrierbar sein, ihre einmal filtrierte Menge im Tubulus darf sich weder durch Resorption noch durch Sekretion ändern, sie darf in der Niere nicht verstoffwechselt werden und sie darf die Nierenfunktion nicht ändern. Diese Bedingungen erfüllt das Inulin und auch mit gewissen Einschränkungen das endogene Kreatinin.

$$\text{GFR} = \frac{\text{Urinvolumen}/\text{Zeit} \times \text{Indikatorkonzentration im Urin (ml/Min)}}{\text{Plasmakonzentration des Indikators}}$$

Durch die Bestimmung der Kreatinin-Clearance kann die GFR nicht genau gemessen werden, aber eine approximative Größenordnung kann angegeben werden, da bei steigendem Kreatinin die GFR steigt. Sie errechnet sich durch folgende Formel:

$$\text{Urinkonzentration Kreatinin} \times \text{Harnvolumen} / \text{Plasmakonzentration Kreatinin} \times \text{Zeit}$$

Die Korrektur der Werte wird wie folgt durchgenommen:

$$\text{Kreatininclearance} \times 1,73 / \text{Körperoberfläche}$$

Man kann auch bei Menschen eine Schätzformel für die Kreatinin-Clearance zu Hilfe nehmen:

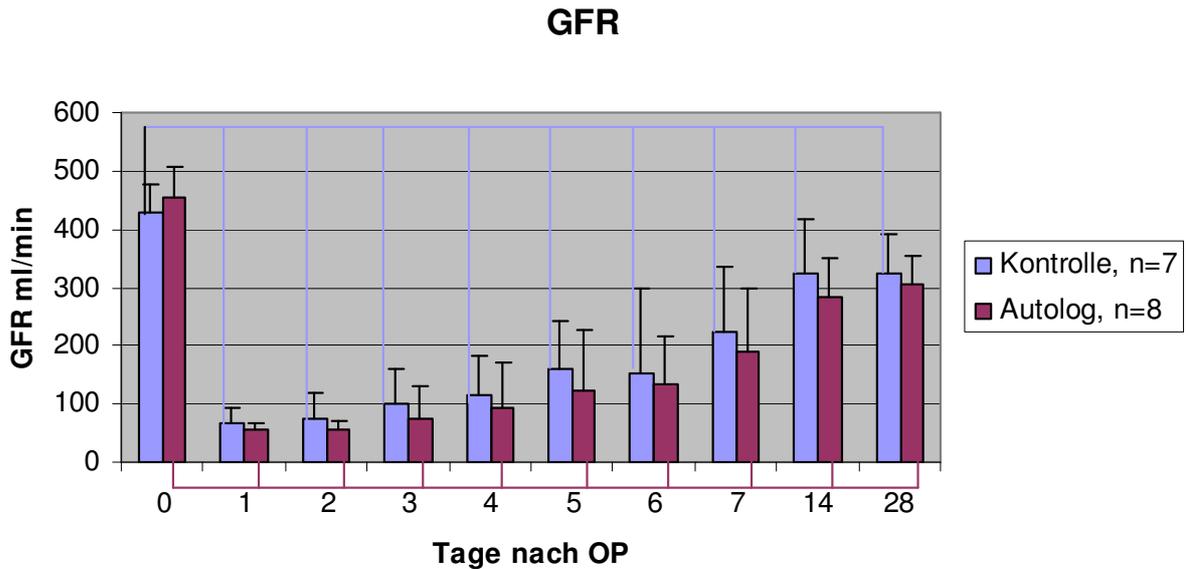
$$(150 - \text{Alter}) \times \text{Gewicht} / \text{Serum-Kreatinin} \quad (-10\% \text{ bei Frauen; } +10\% \text{ bei Männern})$$

(Silbernagel et al, 2001; Thomas, 1992).

Da für Schweine eine derartige Abschätzung der GFR nicht zur Verfügung steht, habe ich hilfsweise ein Programm verwendet, mit der beim Menschen die GFR errechnet werden kann. Dieses Kalkulationsprogramm ist über das Internet verfügbar. Die für das Schwein geschätzte glomeruläre Filtrationsrate habe ich mit Hilfe eines Rechenprogramms ermittelt (<http://www.nierenrechner.de/nierenrechner/GFR-Rechner.htm>).

Die GFR wurde am Tag der Operation berechnet, an den sieben darauffolgenden Tagen und am 14. und 28. Tag post operationem.

Aus der Abbildung 24 geht hervor, dass die GFR nach Induktion des ANV deutlich absank, in der Kontrollgruppe bis zum 3. Tag nach der Operation um ca. 4-6 fache und in der Gruppe mit Behandlung von MSC um ca. das 6-8 fache. Dies geht auch deutlich aus der Graphik (Abbildung 23) hervor, außerdem zeigte die GFR auch bis zur Tötung der transplantierten Tiere einen niedrigeren Wert. In beiden Gruppen wurde ein signifikanter Abfall der GFR beobachtet, aber zwischen den beiden Gruppen gab es keinen signifikanten Unterschied. Beide Gruppen erreichten bis zur Tötung nicht den Ausgangswert der GFR.



**Abbildung 23: Vergleich der GFR der Gruppen mit und ohne Behandlung mit MSC nach Induktion des ANV**

Die GFR wurde mit KDOQI Kriterien kalkuliert. Es zeigt sich, dass die GFR der Tiere mit autolog transplantierten Zellen in den folgenden Tagen nach Induktion des ANV tendenziell, jedoch nicht signifikant stärker absinken und auch bis zum 28. Tag nach der Operation nicht wieder den Ausgangswert erreichen. Auch die Gruppe ohne MSC erreicht nicht den Ausgangswert. Die blauen Klammern zeigen den signifikanten Abfall der GFR der Tage nach der Operation im Vergleich zum Tag 0 der Kontrollgruppe, die lila Klammern, die der autolog transplantierten Gruppe. Zwischen den Gruppen gibt es keinen signifikanten Unterschied. Werte  $p < 0,05$  sind signifikant. n=Anzahl der Tiere

### **3.2.3.4 Elektrolyte**

#### **3.2.3.4.1 Natrium**

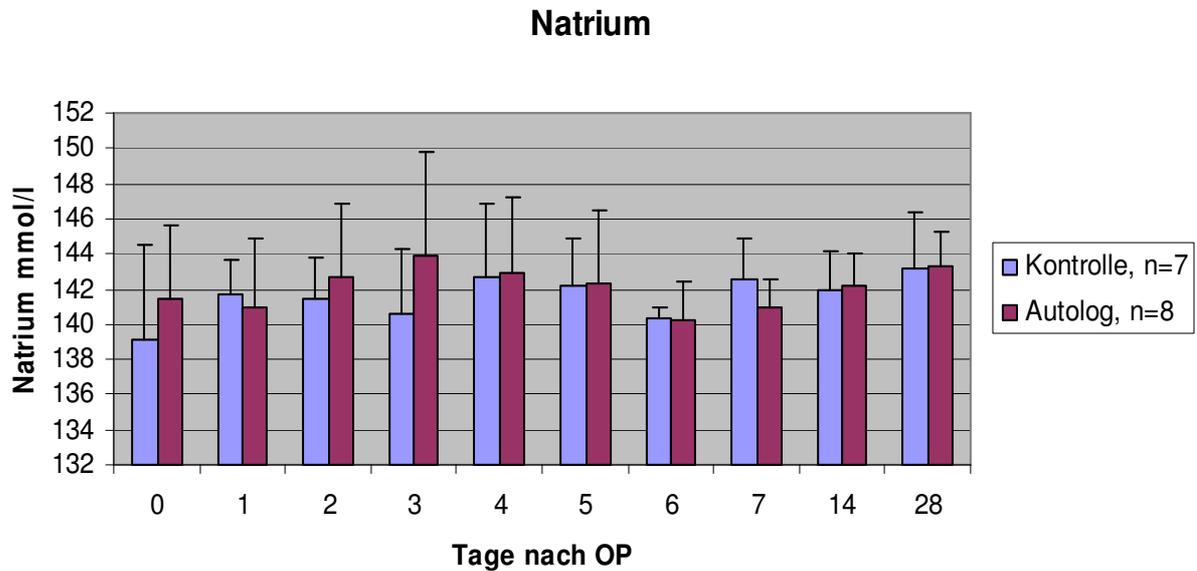
Natrium liegt zu 98% extrazellulär vor. Durch die Natrium-Kalium stimulierbare ATPase werden Natriumionen gegen Kaliumionen ausgetauscht. Die Ausscheidung des Natriums erfolgt zu 95% über die Niere. (Thomas, 1992)

Das filtrierte Natrium wird zu 65% im proximalen Tubulus, zu 25% in der Henle Schleife und einwenig im distalen Tubulus und Sammelrohr resorbiert. Im Sammelrohr erfolgt durch Aldosteron, ADH, Prostaglandine und ANP die Feineinstellung der Natriumausscheidung (Silbernagel et al, 2001).

Bei Hyponatriämie wird Wasser in die Zelle transportiert, bei einer Hypernatriämie wird der IZR kleiner.

Der Serumnatriumwert wurde an den gleichen Tagen wie der Serumkreatininwert (3.2.3.1) gemessen.

In der Graphik (Abbildung 24) wird deutlich, dass der Serumnatriumwert der beiden Gruppen auch Tage nach der Operation relativ konstant blieb und die Standardabweichungen gering sind. Es gab in beiden Gruppen keinen signifikanten Anstieg oder Abfall des Serum-Natriums und auch keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen.



**Abbildung 24: Vergleich des Serumnatriumwertes der Gruppen mit und ohne Behandlung mit MSC nach Induktion des ANV**

In beiden Gruppen ist nur ein geringer Anstieg des Natriums im Serum nachzuweisen, die Standardabweichungen sind in beiden Gruppen groß. In beiden Gruppen gibt es keinen signifikanten Anstieg oder Abfall des Serum-Natriums und auch keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

n=Anzahl der Tiere

### 3.2.3.4.2 Kalium

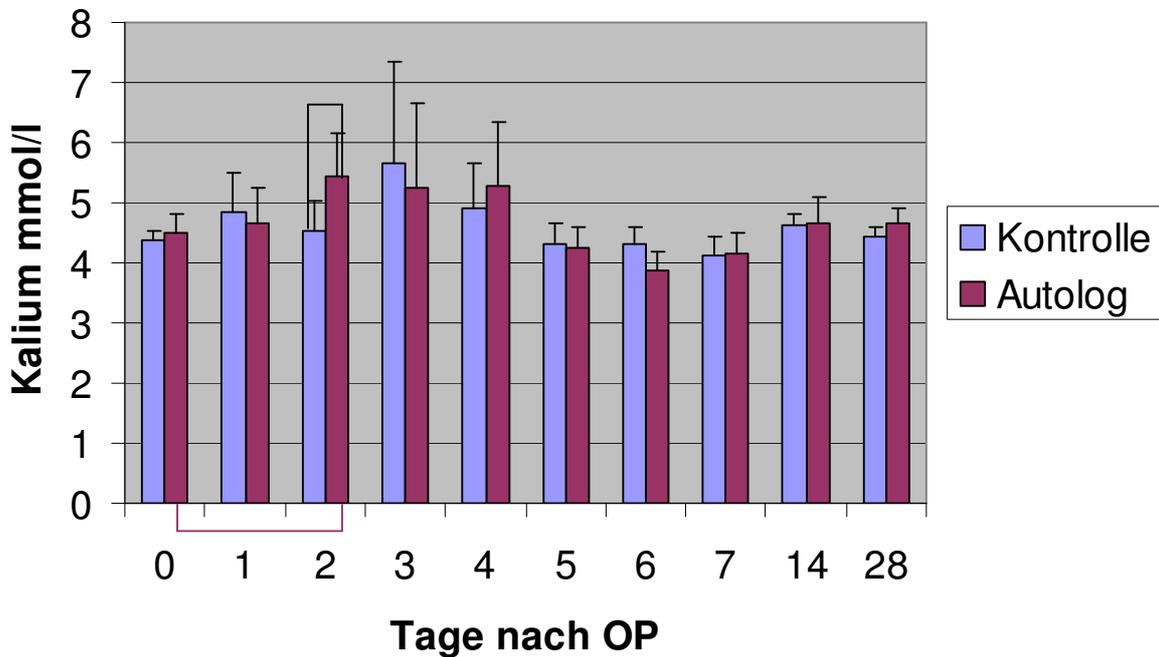
Kalium liegt zum Hauptteil im IZR vor. Bei einem Erwachsenen befindet sich ca. 98% des Kaliums im IZR und ca. 2% im EZR. Die Natrium-Kalium stimulierbare ATPase der Zellmembran sorgt für diesen Konzentrationsgradienten. Die Kaliumkonzentration im EZR wird durch die Niere in den distalen Tubuli und Sammelrohren reguliert. Die Kaliumkonzentration im IZR wird durch den aktuellen Säure-Basen-Status, durch Insulin, die  $\beta$ -adrenerge Wirkung der Katecholamine und die Aldosteronkonzentration bestimmt. Kaliumionen haben einen Effekt auf das Membranpotential der Muskelzelle, da sie gut permeabel sind. Bei einer Hyperka-

liämie sinkt das Verhältnis des intrazellulären Kaliums zum extrazellulären Kalium und es kommt zu einer Depolarisation mit Überregbarkeit der Muskelzelle. Sowohl Hyper- als auch Hypokaliämien können zu Paralysen führen. Bei der Hyperkaliämie kann es zu Herzstillstand, Extrasystolen und Kammerflimmern kommen (Thomas, 1992).

Der Serumkaliumwert wurde an den gleichen Tagen wie der Serumkreatininwert (3.2.3.1) gemessen.

Bei beiden Gruppen stieg der Kaliumwert im Serum nach der Operation leicht an. Lediglich der Anstieg des Serum-Kaliums der autolog transplantierten Tiere von Tag 0 auf Tag 2 nach der Operation war signifikant. Am Tag 2 hatte die Gruppe der autolog transplantierten Tiere einen signifikanten Anstieg des Serum-Kaliums im Unterschied zu den Tieren der Kontrollgruppe. Am 3. Tag nach der Operation war in beiden Gruppen die Standardabweichung am größten (Abbildung 25).

## Kalium



**Abbildung 25: Vergleich des Serumkaliumwertes der Gruppen mit und ohne Behandlung mit MSC nach Induktion des ANV**

Aus der Graphik geht hervor, dass der Serumkaliumwert der beiden Gruppen gering ansteigt. Der Anstieg der autologen transplantierten Tiere von Tag 0 auf Tag 2 nach der Operation ist signifikant (lila Klammer) und der Anstieg des Serumkaliums der autolog transplantierten Tiere am Tag 2 ist signifikant höher als in der Kontrollgruppe (schwarze Klammer). Am 3. Tag nach der Operation sind die Standardabweichungen am größten. n=Anzahl der Tiere

### 3.2.4 Urinwerte

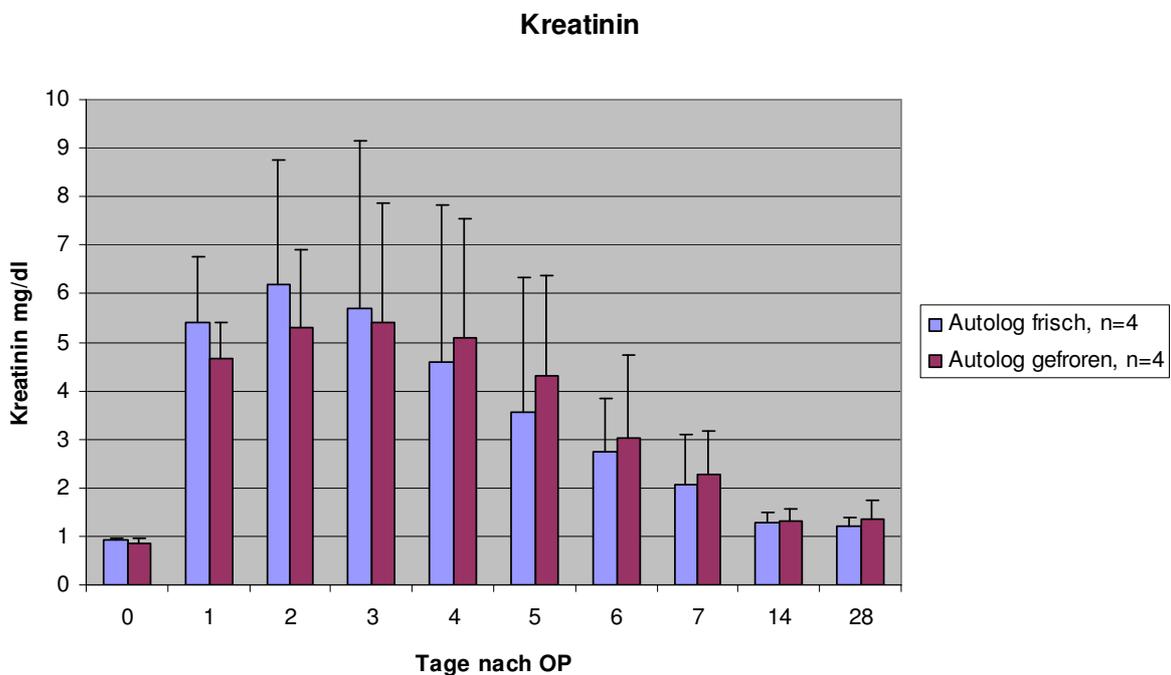
Da die Schweine den Blasenkatheter häufig schon ein Tag nach der Operation oder ein paar Tage später durchgebissen haben oder sich gezogen haben, konnten leider keine auswertbaren Daten erfasst werden.

### 3.2.5 Vergleich eingefrorene und frisch transplantierte mesenchymale Stromazellen

Wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, soll verglichen werden, wie sich frische und gefrorene Zellen auf die Nierenwerte auswirken. Von den acht Tieren, die autologe mesenchymale Stromazellen erhalten haben, wurden vier Tiere mit eingefrorenen und vier Tiere mit frischen Zellen behandelt und verglichen.

Es wurden der Serumkreatininwert gemessen und die GFR am Tag der Operation, an den darauffolgenden sieben Tagen und am 14. und 28. Tag post operationem berechnet.

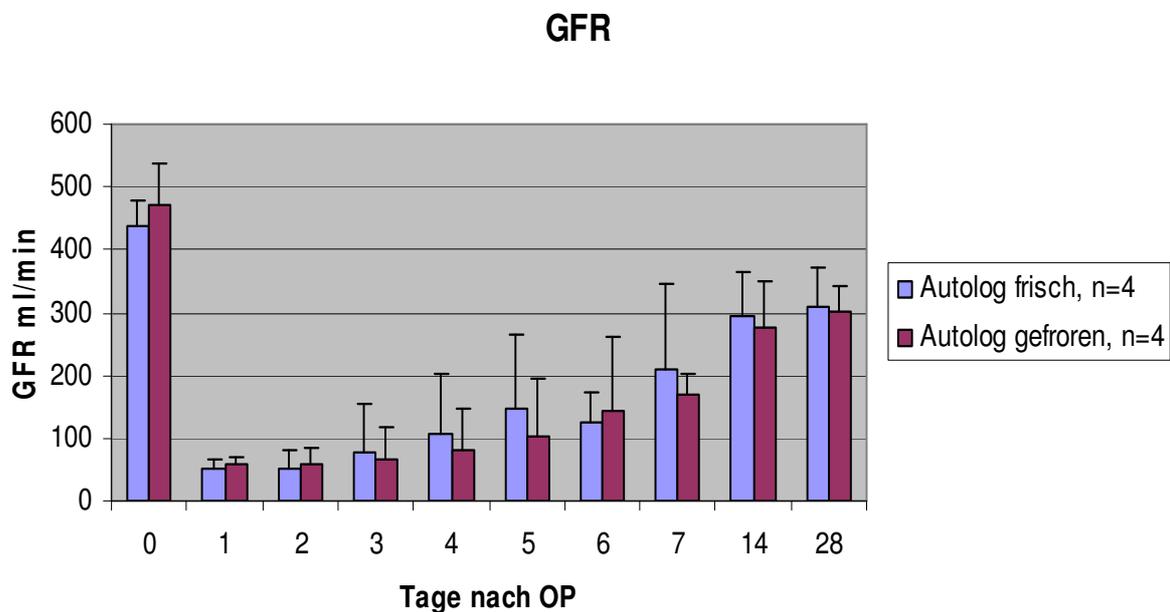
Es lässt sich auch aus der Graphik (Abbildung 26) erkennen, dass die Tiere mit den frisch transplantierten Zellen tendenziell einen höheren Anstieg des Serumkreatinins aufwiesen, aber der Unterschied zu der anderen Gruppe mit gefrorenen Zellen war nicht signifikant. Wie aus der Abbildung 27 zu entnehmen ist, sind die Standardabweichungen groß.



**Abbildung 26: Vergleich des Kreatininwertes von den Tieren mit frisch bzw. gefrorenen transplantierten MSC nach Induktion des ANV**

Bei den Tieren mit den frisch transplantierten Zellen nach Induktion des ANV steigt der Serumkreatininwert in den ersten Tagen tendenziell stärker an, aber der Unterschied zu der Gruppe mit gefrorenen transplantierten Zellen ist nicht signifikant. Die Standardabweichungen sind in beiden Gruppen groß. n=Anzahl der Tiere

Die GFR zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen der Tiere mit frisch oder gefrorenen transplantierten MSC. In der Graphik (Abbildung 27) lässt sich erkennen, dass die Standardabweichungen relativ groß waren.



**Abbildung 27: Vergleich der GFR von Tieren mit frisch bzw. gefrorenen transplantierten MSC nach Induktion des ANV**

Die GFR der Tiere mit frisch transplantierten Zellen und der Tiere mit gefrorenen transplantierten MSC zeigen keinen signifikanten Unterschied. n=Anzahl der Tiere

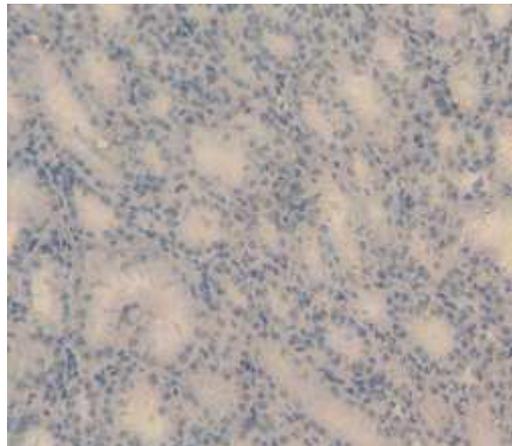
### 3.3 Postmortale Ergebnisse

#### 3.3.1 Fehldifferenzierung der mesenchymalen Stromazellen

Von den Tieren, die mit autologen MSC behandelt wurden, wurde eine Fettfärbung der Nieren mit Sudan Rot durchgeführt. Ein Tier wurde erst 9 Wochen nach der Operation getötet und die Niere auf adipogene Fehldifferenzierung untersucht.

Wie in Abbildung 28 zu sehen, war bei keinem der Tiere eine Fehldifferenzierung, d. h. angefärbte Lipidtröpfchen zu sehen.

Um eine osteogene Fehldifferenzierung festzustellen, wurden die Nieren von dem Tier, welches 9 Wochen nach der Operation getötet wurde und von weiteren drei Tieren, die vier Wochen nach der Operation getötet wurden entnommen, in 2cm große Stücke geteilt und makroradiologisch in der Osteopathologie des Universitätsklinik Hamburg Eppendorf untersucht. Es wurden keine heterotrophen Verknöcherungen, dystrophen Verkalkungen oder Kristallauflagerungen gefunden.



**Abbildung 28: Adipogene Fehldifferenzierung der MSC in den Nieren**

Die Gabe von autologen mesenchymalen Stromazellen zeigte weder in der Medulla noch in dem Cortex der Nieren 4 bzw. 9 Wochen nach Induktion des akuten Nierenversagens eine adipogene Fehldifferenzierung. Die Abbildung zeigt in der Sudan Rot Färbung den Cortex der Niere, 5µm Schnitt, des nach 9 Wochen post OP getöteten

Tieres. Es können keine eingelagerten Lipidtröpfchen nachgewiesen werden. Durchlicht-Mikroskop, Vergrößerung x100 , Foto: Brunswig-Spickenheier

## **4 Diskussion**

### **4.1 Schwein als Versuchstier**

Es wurde in einigen Nagetiermodellen gezeigt, dass MSC einen Schutz und eine schnellere Erholungsphase im ischämischen und toxischen Nierenversagen gewährleisten (Lange et al., 2005; Tögel et al., 2005 ; Morigi et al., 2004 ; Morigi et al., 2008 ; Imberti et al., 2007 ; Kunter et al., 2006 ; Kunter et al., 2007 ; Semedo et al., 2009 ; Tögel et al., 2008 ; Tögel et al., 2007).

Um einen Vergleich zum Menschen besser herstellen zu können, ist ein Tiermodell mit Hund, Schaf oder Schwein nötig, um die anatomischen und physiologischen Bedingungen besser darstellen zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Schwein für Untersuchungen zur Wirkung von autologen mesenchymale Stromazellen im Ischämie/Reperfusion-induzierten akuten Nierenversagen genutzt.

Bevor die Wirkung von MSC im ANV in klinischen Studien am Patienten überprüft wird, sollte getestet werden, ob die Ergebnisse, die im Rattenmodell gewonnen wurden, auf das Schweinmodell übertragbar sind und ob diese Behandlung eine therapeutische Anwendung am Menschen haben könnte. Im Großtiermodell lassen sich die klinischen und chirurgischen Situationen besser als im Kleintiermodell darstellen. Das Krankheitsbild des Nierenversagens lässt sich nicht in-vitro simulieren und es ist erforderlich, neue verbesserte Methoden für die klinische Betreuung erkrankter Menschen zu finden. Die kathetervermittelte Ischämieinduktion der Nieren und die Applikation der MSC lassen sich am Schwein problemlos durchführen.

Das Schwein eignet sich aufgrund seiner ähnlichen anatomischen Struktur zum Menschen sehr gut als Versuchstier in der Humanmedizin als Infarktmodell. Es hat schon in anderen Studien als Versuchstier in Infarktmodellen, vor allem Herzinfarktmodellen, aufgrund seiner

Übertragbarkeit an Bedeutung gewonnen (Krause et al., 2007; Shake et al., 2002; Amado et al., 2005). Auch für Untersuchungen zum Nierenversagen bietet sich das Schwein als Modell an, da seine Niere der des Menschen bezüglich Größe und Morphologie als multipyramidales Organ mit glatter Rinde, aber einigen Markpyramiden, die jede einzeln eine Papille bilden, ähnelt. Auch biochemische und –physikalische Parameter wie GFR, renaler Blutfluss und Konzentrationsfähigkeit sind denen beim Menschen vergleichbar (Grimm, 2003).

Da einige Blutparameter durch den Faktor Alter stark beeinflusst werden (Bauer-Pham et al., 2001; Faustini et al., 2000), wurden in den vorliegenden Versuchsreihen gleichaltrige Tiere eingesetzt, damit eine Beeinflussung durch Altersunterschiede ausgeschlossen werden konnte. In diesem Versuch wurde nach der Etablierung ausschließlich mit weiblichen Tieren gearbeitet. In den Untersuchungen wurde bei der Etablierung der Methode festgestellt, dass bei einem männlichen Schwein bei einer Abklemmzeit von 100 Minuten ein ANV ausgelöst werden konnte, während bei zwei weiblichen Schweinen kein signifikanter Anstieg zu verzeichnen war. Bei einer Abklemmzeit von 110 Minuten zeigten erst 7 weibliche Schweine einen signifikanten Anstieg des Serum-Kreatinins. Dieses ergänzt Beobachtungen in anderen Spezies, dass bei weiblichen Tieren ein größerer Schutz vor ischämischen Verletzungen der Nieren vorliegt. (Kher et al., 2005 a). Bei unseren Versuchen wurden ca. 3 Monate alte Schweine eingesetzt. Aufgrund des relativ leichten Gewichtes der Tiere war der Versuchsablauf sicherer und einfacher im Handling im Gegensatz zu erwachsenen Schweinen. Das geringe Alter der Versuchstiere könnte jedoch einen Einfluss auf die Regenerierung der Nieren haben. Junge Tiere erholen sich meist schneller nach einem derartigen Eingriff, da sie noch teilungsfähige Zellen besitzen können. Die Vergleichbarkeit aufgrund des jungen Alters der Tiere mit der Klinik fällt schwer, da dort meist ältere Menschen betroffen sind. In diesem Fall wäre das Miniaturschwein eine Alternative gewesen, welches auch im Alter nur ein geringes Gewicht erreicht.

Das Hybridschwein, wie es hier verwendet wurde, ist aufgrund seiner landwirtschaftlichen Nutzung jederzeit erhältlich. Eine spezielle Zucht, wie z. B. für das Miniaturschwein, ist damit nicht notwendig. Allerdings war der Gesundheitsstatus der Schweine häufig unsicher. Wir haben nur Tiere in den Versuch einbezogen, die unauffällige Nierenwerte aufwiesen.

Trotz aller Vergleichbarkeit in Physiologie und Anatomie zwischen Mensch und Schwein sollten die Ergebnisse jedoch nicht unkritisch auf den Menschen übertragen und in humanmedizinischen Studien überprüft werden.

## **4.2 Methodik der Infarktsetzung**

Die meisten Großtiermodelle, bei denen ein akutes Nierenversagen induziert wurde, beruhen auf dem einseitigen Abklemmen der Nierengefäße. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Niere nach einer Abklemmzeit von 90 Minuten wieder vollständig erholen kann (Lyon et al., 2007), bei einer Abklemmzeit von 120 Minuten lag ein starker Verlust der Nierenfunktion vor und es kam zu Todesfällen (Orvieto et al., 2005).

Bisher gab es keine Modelle in Bezug auf das paarige Abklemmen der Nierenarterien beim Schwein. Wir konnten beobachten, dass es beim weiblichen Tier bei einer Abklemmzeit der beiden Nieren von 110 Minuten zu einem ANV kommt und bei männlichen Tieren schon bei einer Abklemmzeit von 100 Minuten. Dies ist vermutlich damit begründet, dass geschlechtsspezifische Unterschiede in der Produktion von Cytokinen nach akuten Verletzungen in mehreren Studien nachgewiesen wurden (Kher et al., 2005 b).

Wir konnten mit der Methode der Infarktsetzung mittels Ballonkatheter eine ANV beim Schwein setzen. Diese Methode hat einen großen Vorteil: Bei einer Laparotomie und einem Abklemmen der Gefäße ist das chirurgische Trauma deutlich größer und vermutlich mit größeren Komplikationen einhergehend. Diese minimalinvasive Methode ist mit wenig Schmerzen einhergehend, da sie sich nur auf die Gefäßzugänge und einen kleinen Schnitt bezieht. Aufgrund dieser Tatsache ist nur ein geringer Einsatz von Anästhesie und Analgesie nötig,

welches das Tier weniger belastet. Da der Infarkt das Tier in den folgenden Tagen nach der Operation beeinträchtigt, ist diese Methode für das Tier deutlich schonender und die Ergebnisse werden durch Schmerzen oder einen hohen Einsatz von Analgesie, die durch die Operation bedingt sein könnten, nicht beeinflusst.

Der Nachteil dieser Operationstechnik ist der hohe Strahleneinsatz und somit auch der Einsatz von Kontrastmitteln, der wiederum die Nieren schädigen kann. Zusätzlich haben wir im Röntgen häufig Kollateralgefäße darstellen können, folglich ist es nicht immer möglich gewesen, die Nieren mit der Ballonkatheterisierung komplett zu verschließen. Da die Hauptarterie verschlossen wurde, kann man davon ausgehen, dass die Blutversorgung der Niere zumindest stark eingeschränkt ist.

Wir haben die Zellen ( $2 \times 10^6$  Zellen/kg KGW) suprarenal 10 Minuten nach Ablassen des Ballonkatheters instilliert. Erhofftes Ziel der suprarenalen Gabe der MSC war, dass der Blutstrom die Zellen zunächst in die Niere transportiert und nicht alle Zellen in die Lunge gelangen und dort gefangen werden. Der renale Blutfluss hat somit die Dosis und die Verteilung der Zellen bestimmt.

Eine direkte Gabe der Zellen in die A. renalis wurde unterlassen, da u. U. Schädigungen der Niere zu erwarten sein könnten.

Die Methodik ist auch in der Humanmedizin leicht umsetzbar, da die Gewinnung von Knochenmark beim Erwachsenen ein Routineeingriff ist und die mesenchymale Subpopulation einfach zu isolieren, einfach zu expandieren und problemlos in einer autologen Transplantationsstrategie einsetzbar ist.

Die Verabreichung der mesenchymalen Stromazellen wie in diesem Versuch ist einfach auf den Menschen übertragbar.

### 4.3. Narkose

Ziel war es, eine schonende Narkose für das Tier zu finden. Bei einer Allgemeinanästhesie müssen eine Bewusstlosigkeit (Hypnose), eine Einschränkung der Schmerzempfindung (Analgesie) und eine Muskeler schlaffung vorliegen. Im Sinne einer „Balanced Anesthesia“ werden mehrere Präparate miteinander kombiniert, wobei die erwünschten Eigenschaften sich ergänzen und die Nebenwirkungen und die Dosis sich verringern sollen (Erhardt et al., 2004). Die „Balanced Anesthesia“ stellt eine Kombination aus Injektions- und Inhalationsnarkose dar (Erhardt et al., 2004).

Wir haben zunächst eine Injektionsnarkose intramuskulär mit Atropin, Ketamin und Xylazin durchgeführt und die Narkose dann mit Isofluran aufrechterhalten. Diese Narkose eignet sich vor allem für länger andauernde Anästhesien.

Isofluran ist als leichtflüchtiges Anästhetikum durch Inhalation als Allgemeinanästhesie geeignet. Isofluran besitzt einen niedrigen Verteilungskoeffizienten im Blut/Gas, so dass die Einleitung und die Ausleitung und die Reaktion auf veränderte Isoflurankonzentrationen rasch stattfinden.

Ein großer Vorteil bei Isofluran ist, dass es von den Tieren aufgrund des anorganischen Fluorids kaum metabolisiert und fast vollständig über die Lunge ausgeschieden wird (<http://www.vetpharm.uzh.ch/tak>).

Unter Isofluran kann eine Atemdepression eintreten, die auf eine zentrale Depression respiratorischer Neurone der Medulla oblongata zurückzuführen ist und die wiederum eine verminderte Kontraktilität des Zwerchfells bewirkt (Veber et al., 1989; Stuth et al., 1992; Hikasa et al., 1997). Da wir die Tiere beatmet haben, war die Atemfrequenz stets gleichmäßig.

Während der Narkose zeigte sich, dass die Herzfrequenz unter den Ausgangswert absinkt, welches Erhardt et al. (1994) mit einer vagalen Reizung durch das Narkosegas erklärt. Einem Absinken der Herzfrequenz unter 80/Minute haben wir mit Atropin und/oder Dobutamin entgegen gewirkt.

Isofluran hat eine blutdrucksenkende Eigenschaft, da es den peripheren Gefäßwiderstand herabsetzt (Eger, 1981; Heavner, 1994; Brunson, 1997) und da die Gefäßmuskulatur reduziert auf sympathische Impulse reagiert (Stevens et al., 1971). Diese blutdrucksenkende Eigenschaft hat natürlich auch Einfluss auf die Nierenfunktion. Es kommt zu einer verminderten Filtrationsrate, einem verminderten renalen Blutfluss und einer geringeren Urinproduktion. Es kommt nach Beendigung der Narkose wieder zur besseren Diurese (Wade und Stevens, 1981; Arroyo et al., 1986; Fee und Thompson, 1997). Da Isofluran kaum metabolisiert wird, besteht keine Nephrotoxizität (Holaday et al., 1975; Eger, 1981).

Wir konnten beobachten, dass die Tiere sich sehr schnell auch von der langen Narkose erholt haben. Die Knochenmarkentnahme stellt für das Tier keinerlei Belastung dar. Beim Menschen werden Knochenmarkentnahmen nur unter örtlicher Betäubung durchgeführt. Die Induktion der Ischämie unter Narkose ist unproblematisch für die Tiere, allerdings zeigten sich in den darauf folgenden Tagen Auswirkungen auf das Allgemeinbefinden.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Tiere auch die lange Narkose gut überstanden haben und es kaum Narkosezwischenfälle gab.

## **4.4. Diskussion der Ergebnisse**

### **4.4.1 Überlebensrate**

Von den 30 operierten Tieren verstarben fünf Tiere.

Lediglich ein Tier verstarb an den Folgen der Ischämie. Es verendete vier Tage nach der Operation mit einem Kreatininwert von 16mg/dl und einem Kaliumwert >10mmol/l (vermutlich durch eine defekte Nippeltränke).

Drei Tiere verstarben am Ende der Operation. Ein Tier erlitt nach der intravenösen Gabe von Novalgin einen Herzstillstand, ein Tier zeigte eine starke Tympanie und einen plötzlichen Herzstillstand, die Ursache liegt hier vermutlich in der versehentlichen Fütterung vor der Operation, und ein Tier erlitt zunächst einen größeren Blutverlust, da sich die Schleuse löste, dann eine Hyperthermie mit Herzstillstand. Auch die sofortig eingeleiteten Notfallmaßnahmen bei diesen Tieren waren erfolglos.

Ein Tier musste euthanasiert werden, da es an einem starken Durchfall litt und ein sehr schlechtes Allgemeinbefinden zeigte. Bei diesem Tier wurden Salmonellen im Kot nachgewiesen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es trotz der langen Narkosephase wenige Komplikationen gab und die Tiere spätestens nach 7 Tagen wieder ein ungestörtes Allgemeinbefinden zeigten.

### **4.4.2 Charakterisierung der mesenchymalen Stromazellen**

Die Identifikation von mesenchymalen Stromazellen mittels eines spezifischen Markers ist noch nicht möglich, daher muss man sich andere Kriterien zu Hilfe nehmen. Mesenchymale Stromazellen müssen die Kriterien der International Society of Cellular Therapy (ISCT) erfüllen, d. h. sie müssen plastikadhärent sein, sie müssen definierte Oberflächenantigene aufweisen (z. B. MHC I, CD 105 und CD90 positiv) und negativ für hämatopoetische Antigene sein

(z. B. CD14, MHC II und CD 45), und sie müssen sich *in vitro* zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten differenzieren lassen (Dominici et al., 2006).

Die Zellen sind plastikadhärent gewachsen und haben, ähnlich wie bei menschlichen mesenchymalen Stromazellen, eine spindelförmige fibroblastische Morphologie aufgewiesen.

Es gibt eine Reihe von Oberflächenantigenmarkern, die für Stammzellen aus dem Knochenmark analysiert worden sind (Bosch et al., 2006; Dominici et al., 2006). Die Zellen zeigten in der FACS Analyse, dass sie CD 90, CD 105 und MHC I positiv und CD 45 und CD 14 negativ sind. Die Antigen-präsentierenden Zellen oder Cluster of differentiation (CD) haben unterschiedliche zelluläre Expressionen und Funktionen. CD 90, CD 105 und MHC I gehören zu den nicht-hämatopoetischen Antigenen, während CD 14 und CD 45 zu den hämatopoetischen Antigenen gehören.

CD 90 wird auf CD34-positiven, pro-Thrombozyten, Thrombozyten und T-Zellen exprimiert, CD 105 wird auf Endothelzellen, aktivierten Monozyten und Makrophagen und einer Subpopulation von Knochenmarkzellen exprimiert und ist eine regulatorische Komponente des TGF $\beta$ -Komplexes. Der MHC I (major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex) kommt auf allen kernhaltigen Zellen und Thrombozyten vor und codiert die Histokompatibilitätsantigene.

CD 14 wird auf myelomonozytischen Zellen exprimiert und ist der Rezeptor für den Lipopolysaccharid-Komplex und das Lipopolysaccharid-Bindungsprotein (LBP). CD 45 wird auf allen hämatopoetischen Zellen exprimiert, hat die Funktion der Tyrosin-Phosphatase und erhöht die Signalisierung durch Antigen-Rezeptoren von B- und T-Zellen (<http://www.immundefekt.de/cd.shtml>).

Die Differenzierungsfähigkeit der Zellen in Adipozyten, Chondroblasten und Osteoblasten wurde bereits frühzeitig nachgewiesen (Prokop et al., 1997; Pittenger et al., 1999).

Die in der Arbeit durchgeführte funktionelle und molekularbiologische Charakterisierung zeigte, dass es sich bei den aus dem Schweineknochenmark isolierten Zellen um eine homo-

gene Population mesenchymaler Stromazellen handelte und sie alle Kriterien der International Society of Cellular Therapy (ISCT) erfüllt haben.

Diese Zellen konnten somit für die Untersuchung zur Anwendung der MSC im akuten Nierenversagen eingesetzt werden.

#### **4.4.3 Serum- und Urinwerte**

In unserer Studie haben wir als Parameter zur Erkennung des akuten Nierenversagens den Serumkreatinin und den Serumharnstoff herangezogen. Da sich der Serumkreatinin erst verändert, wenn über 50 % der glomerulären Filtration eingeschränkt sind, ist dieser Wert suboptimal. Es gibt Biomarker wie NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin), Cystatin C, IL-18 (Interleukin 18) und KIM-1 (Kidney injury molecule 1), die Veränderungen in der Nierenfunktion früher anzeigen und daher geeigneter sind. Wir konnten diese Werte nicht verwenden, da die Messung mit spezie-spezifischen Bioassays erfolgt, die für das Schwein nicht zur Verfügung stehen (Nguyen et al., 2008; Vaidya et al., 2008). Des Weiteren haben wir im Serum Kalium, Natrium, Chlorid, Eiweiß und Albumin gemessen. Den Urin konnten wir leider immer nur wenige Tage auffangen, da die Tiere die Urinkatheter nicht tolerierten und keine metabolischen Käfige zur Verfügung standen. Wir haben im Urin  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , Harnstoff, Kreatinin, Eiweiß und Albumin gemessen. Es konnten aufgrund der wenigen Daten keine auswertbaren Ergebnisse erhoben werden.

Zusätzlich haben wir die GFR als sensibleren Wert für die Bestimmung der Nierenfunktion errechnet. Es zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe weder signifikante Verringerungen der Serumkreatininwerte noch der Serumharnstoffwerte nach der Gabe von autologen mesenchymalen Stromazellen. Die GFR wurde statistisch nicht signifikant verbessert durch die Gabe von autologen MSC,

Es wurde getestet, ob eine unterschiedliche Ernte der MSC (frisch geerntet oder vorher eingefroren und vor der Transplantation aufgetaut) einen Einfluss auf den Verlauf der ANV nimmt.

Es zeigte sich, dass es in den beiden Gruppen, der frisch geernteten und der gefrorenen Zellen, keinen signifikanten Unterschied sowohl bei den Serumkreatininwerten als auch bei der GFR gab. Daraus lässt sich schließen, dass eine Verwendung gefrorener Zellen durchaus möglich ist. Dieses ist von großer Bedeutung, da bei einem möglichen Einsatz in der Klinik von der Verwendung gefrorener Zellen ausgegangen werden muss.

Die Serumkreatininwerte der einzelnen Tiere wiesen starke Schwankungen auf. Um interindividuelle Schwankungen auszugleichen, haben wir den Serumkreatinin am 1. Tag nach der Operation auf 100 % gesetzt. Es zeigte sich in beiden Gruppen ein signifikanter Anstieg, aber im Vergleich der beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied, so dass die Zellen keinen Effekt auf die Beseitigung des ANV hatten, sondern die Selbstheilungsprozesse in beiden Gruppen gleich vorangeschritten sind.

Die Kreatinin- und Harnstoffwerte in der Kontrollgruppe haben sich nach einer Woche auf einem normalen Niveau reguliert. Diese Selbstheilung wurde bewusst gewählt, um kein letales ANV zu setzen.

Es entstand nach der Operation ein leichter Anstieg des Serum-Natriums und des Serum-Kaliums, die sich nach einigen Tagen schnell wieder erholten. Nur der Anstieg des Kaliums der autolog transplantierten Tiere von Tag 0 auf Tag 2 war signifikant. Im Vergleich der beiden Gruppen zeigte sich bei den autolog transplantierten Tieren ein signifikant höherer Anstieg der Kaliums im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Anstieg des Natriums lässt sich vermutlich durch die verringerte Wasseraufnahme der Tiere erklären und die verminderte Elimination über die Nieren. Die Hyperkaliämie liegt an der verringerten Funktion der Nieren, da 95 % des aufgenommenen Kaliums renal ausgeschieden werden und die Niere somit ein Schlüsselorgan ist (Thomas, 1992).

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Gabe von MSC im ischämischen Nierenversagen bei Schweinen die klinischen Ergebnisse nicht verbessert.

#### 4.4.4 Gemischte Lymphozytenreaktion (MLR)

Es ist leider nicht gelungen, die Daten, die im Rattenmodell mit MSC beim akuten Nierenversagen erhoben wurden, im Schweinmodell zu wiederholen. Es konnte gezeigt werden, dass die pMSC die ISCT-Bedingungen erfüllen, aber keine antiapoptotischen, antiinflammatorischen und mitogenen Effekte im Schwein zeigen.

Um das ganze immunologische System zu testen, wurden die pMSC *in vitro* in einer gemischten Lymphozytenreaktion untersucht.

Zunächst fiel dabei auf, dass die Schweine-PBMC hochempfindlich auf das Einfrieren reagierten. Dies zeigte sich durch einen schwachen Anstieg des  $\text{Ca}^{++}$  als erstes Signal für eine Zell-Proliferation und durch eine gestörte Fähigkeit der PBMC auf die Stimulation durch Alloantigene (Saalmüller et al., 1999). Aufgrund dieser Tatsache konnten wir nur frische PBMC benutzen und eine Definition von allogenen PBMC-Paaren mit optimaler Stimulation war nicht möglich.

Es zeigten sich deutlich niedrigere allogene Stimulationsraten in den MLR als in menschlichen MLR (Fang et al., 2006).

Es zeigten sich nur 2-4,1 % proliferierende T-Zellen nach allogener Stimulation, während sich in der menschlichen MLR bis zu 12 % Ki67+ und CD3+ Zellen nachweisen lassen (Fang et al., 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von PHA zu den Effektor-PBMC sich CD 3+ maximal stimulieren ließ (61,5-91 %). Die PHA-Aktivierung von humanen und murinen T-Zellen lässt sich durch MSC unterdrücken. Diese Reaktion ließ sich in der Schweine-MLR nicht auslösen. pMSC sind im Gegensatz zu hMSC nicht in der Lage, eine T-Lymphozyten Aktivierung und Proliferation *in vitro* zu unterdrücken. Schlussendlich führte eine Koinkubation von Effektoren mit bestrahlten Aktivatoren zu einer Proliferation der CD 3+ Zellen (2-4,1

%) und es kam durch die MSC eher zu einer Stimulation als zu einer Reduktion der T-Zellaktivierung.

Eine Ursache dafür könnte sein, dass wir unbekannte Haplotypen von Hausschweinen genutzt haben, während andere Autoren zum Teil aus Inzucht stammende und gut charakterisierte Miniatur-Nachkommen verwenden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in-vitro Ergebnisse übereinstimmen mit den in-vivo Ergebnissen des MSC-Einflusses im akuten Nierenversagen beim Schwein. Die MSC erfüllen zwar alle beschriebenen Charakteristika von Stromazellen, aber sie unterscheiden sich in ihrem T-Zell-Compartment, was zu einer unreifen immunologischen Reaktion führt. Dies ist vermutlich die Ursache dafür, dass pMSC im akuten Nierenversagen zu keiner Verbesserung führen. Es sind daher Studien am Menschen nötig, um die Wirkung der MSC im akuten Nierenversagens zu ermitteln.

### **4.4.5 Histologie**

Die Histologie wird im Diskussionsteil besprochen, da ich selbst nur die Organe präpariert habe und die histologische Untersuchungen nicht durchgeführt habe, sondern dies im Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin erfolgte.

Es wurden die Tiere 28 Tage nach Induktion des akuten Nierenversagens und Behandlung mit mesenchymalen Stromazellen getötet und Teile der Organe (Niere, Herz, Leber, Lunge, Milz und Knochenmark) entnommen. Ein Tier (6333) wurde erst 9 Wochen nach der Operation getötet, um eine potentielle Fehldifferenzierung der MSC zu beurteilen. Die Proben wurden entweder in Paraffin für die mikroskopische Untersuchung eingebettet oder in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert. Die Proben der Nieren wurden in der Freien Universität Berlin für Veterinärpathologie von Professor Gruber in einer verblindeten Studie ausgewertet. Es wurden der Kortex und die Medulla der Nieren in einem semiquantitativen Ver-

fahren mit abgestuften Klassifikationen untersucht. Dabei wurden folgende Eigenschaften näher betrachtet, die charakteristisch sind für Schädigung oder Regeneration der Niere:

1. Lymphozyten: Grad 1: nur minimale Infiltrate, kaum mehr als im gesunden Tier; Grad 5: höchstbedenkbarer Grad, wie man ihn bei typischen Niereninfektionen sieht (Leptospirose etc.).
2. Fibrosen: Grad 1: zwischen 0 und 20 % des Interstitiums fibrosiert; Grad 5: 80-100 % des Interstitiums fibrosiert (beurteilt im Azan-gefärbten Schnitt)
3. Degeneration: Grad 1: in den fibrotischen Herden dezente, gerade erkennbare Degenerationen; Grad 5: maximal denkbare Degenerationen in den fibrotischen Bereichen
4. Regeneration: wie Degeneration
5. Glomerulonephritis (membranöse Glomerulonephritis): Grad 1: etwa 0-20 % der Glomeruli betroffen; Grad 5: 80-100 % der Glomeruli betroffen (beurteilt im PAS-gefärbten Schnitt)
6. Proteinzyylinder in den harnabführenden Wegen: Grad 1: nur ganz vereinzelt, bis 20 % der distalen Sammelrohre; Grad 5: 80-100 % der Sammelrohre betroffen

Alle Zwischengrade sind als lineare Regressionen zu interpretieren. In den Abbildungen 32-37 sind die histologischen Einstufungen der Parameter dargestellt, wobei der Mittelwert der Einstufung der Medulla und des Cortex gebildet wurde.

Alle histologischen Schnitte wurden mit der HE-, Azan- und PAS- Färbung ausgewertet. Es lässt sich festhalten, dass die Grade der Veränderungen nicht sehr stark schwankten. Ein Tier (4787), welches autologe mesenchymale Stromazellen erhalten hat, zeigte starke Veränderungen auf. Viele der Tiere zeigten kaum Veränderungen. Ebenfalls ein Tier (3832), welches autologe Zellen erhalten hat, wies schwerwiegende Gefäßwandveränderungen an mittelgroßen und kleineren Arterien auf (Fibrosen, perivaskuläre Infiltrate mit Makrophagen und Lympho-

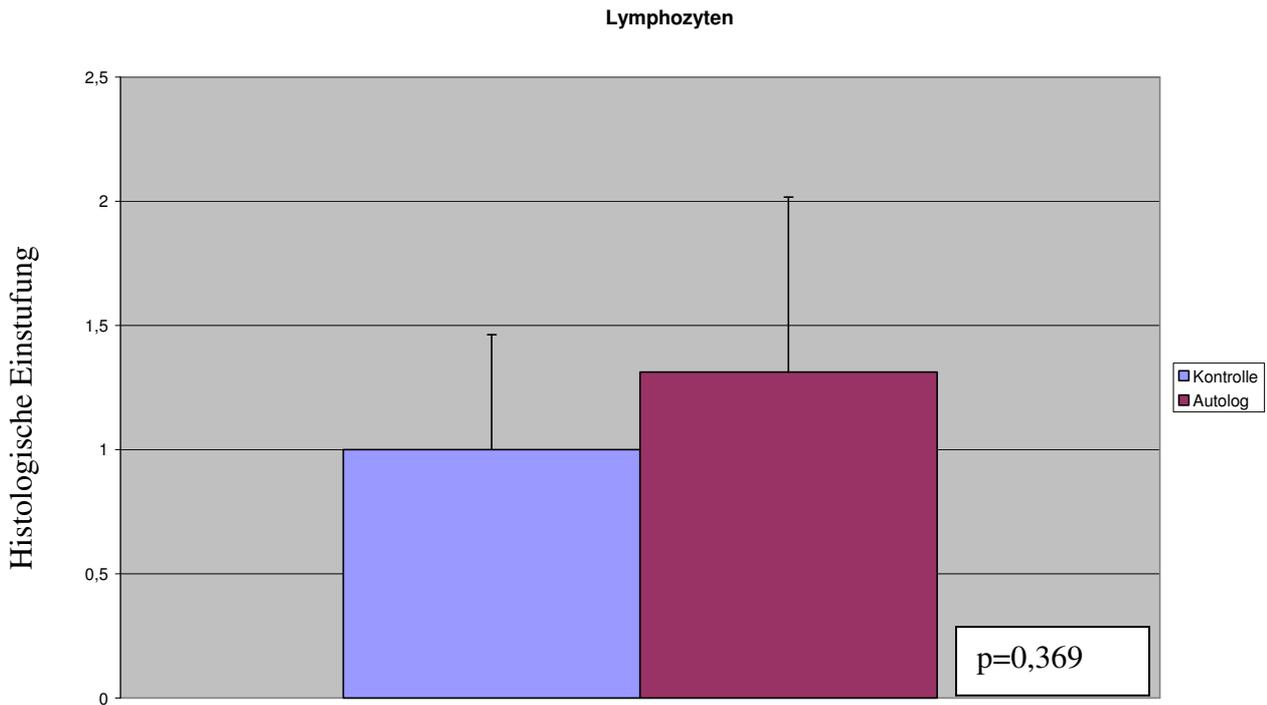
zyten, Ödeme, teils fibrinoide oder hyaline Gefäßwandschäden, teils offenbar fibrosierte Thromben). Das restliche Parenchym schien erstaunlich wenig verändert.

In den Abbildungen 35-37 sind histologische Bilder von Fibrosen, Glomerulonephritis, Proteinzyylinder und einer membranösen Glomerulonephritis dargestellt.

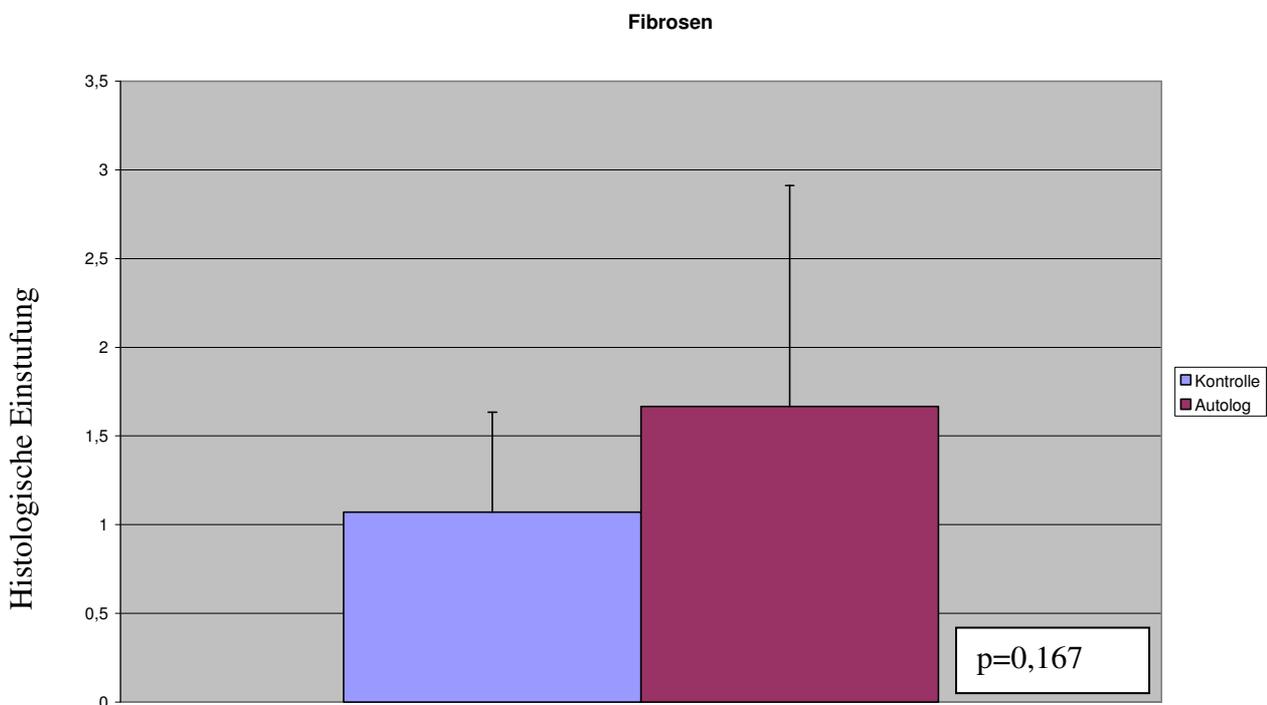
Außerdem ließ sich feststellen, dass ein Teil der Läsionen recht ungleichmäßig in den Blöcken verteilt und nur am Rand nachweisbar war, so dass angenommen werden kann, dass die Größe der Blöcke nicht unbedingt repräsentativ für die ganze Niere war. Ein Teil der Gewebelöcke schien sehr schlecht fixiert oder suboptimal eingebettet worden zu sein und war kaum oder gar nicht schneidbar. Diese Gewebe waren nur schlecht aufziehbar und damit schlecht anfärbbar (Kennzeichnung: „Artefakt“ s. Tabelle 4). Dabei wurde die Auswertung so gut wie möglich durchgeführt, schien aber an Zuverlässigkeit nicht viel eingebüßt zu haben, in den mit \* (s. Tab. 4) gekennzeichneten Proben führte das dazu, dass besonders bei den Spezialfärbungen die Schnitte abschwammen.

In den unten abgebildeten Diagrammen (Abbildungen 29-34) zeigte sich, dass es bei der Einstufung keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen gab. Bei vielen Tieren zeigten sich kaum Veränderungen, was vermutlich darauf schließen lässt, dass diese jungen Tiere ein sehr gutes Regenerationsvermögen aufweisen.

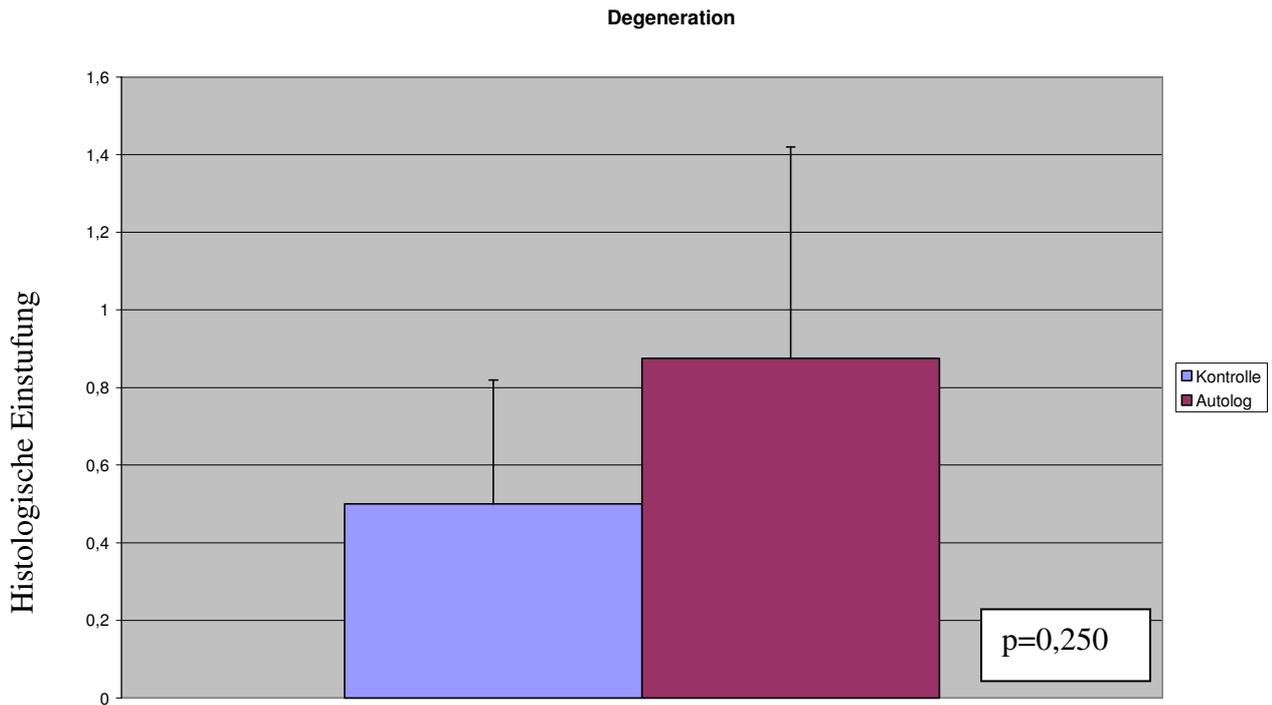
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass histologisch keine schützenden Eigenschaften der MSC gezeigt werden konnte.



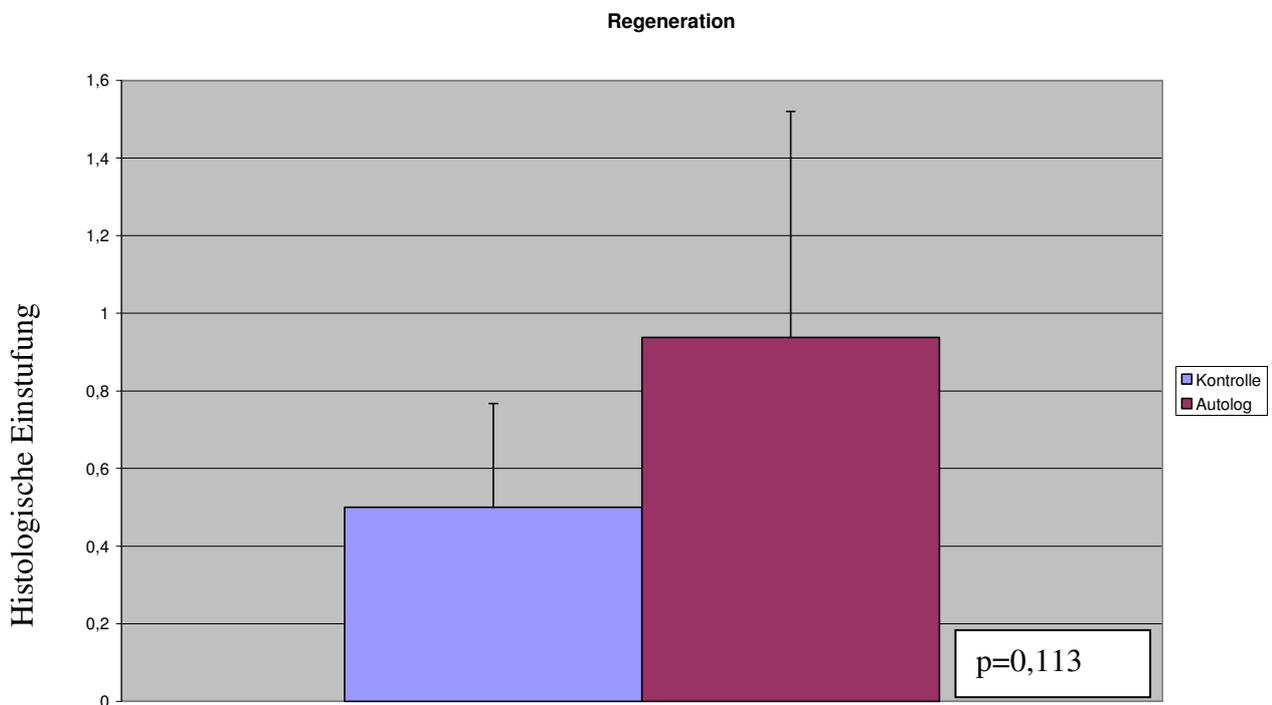
**Abbildung 29: Histologische Einstufung der Lymphozyteninfiltration in ischämischen Nieren mit und ohne Gabe von MSC**



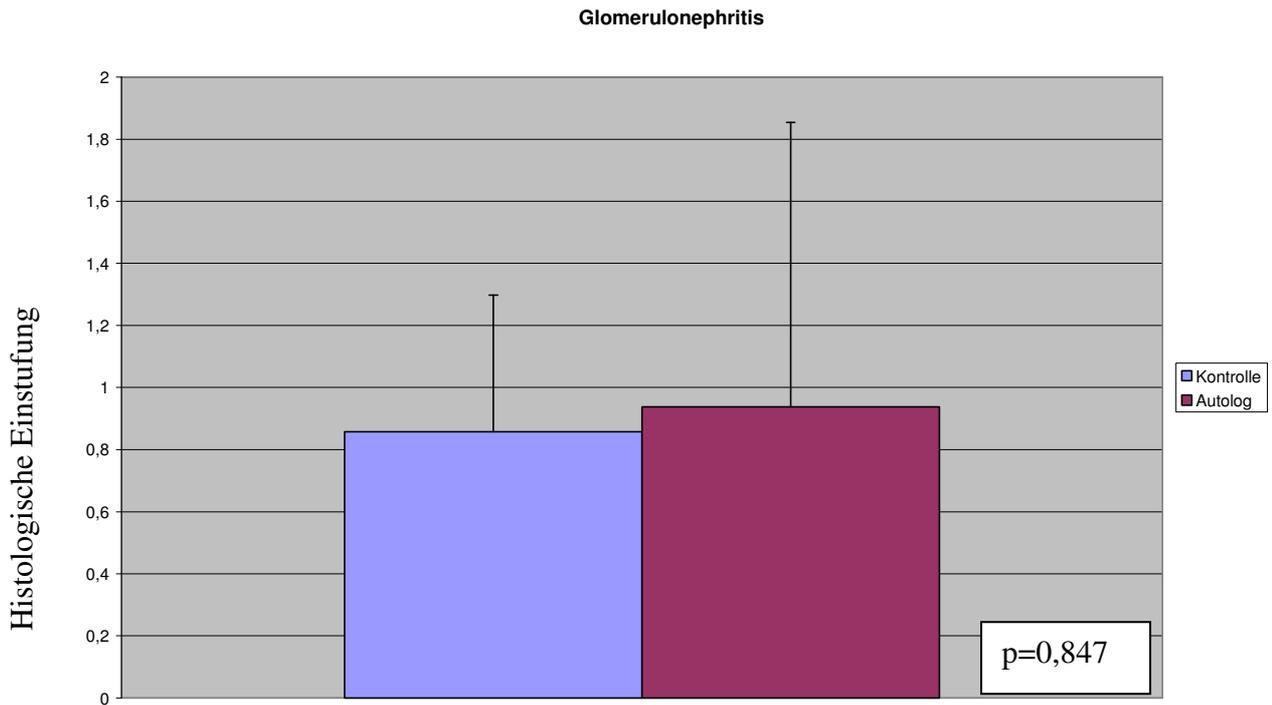
**Abbildung 30: Histologische Einstufung der Fibrosenbildung in ischämischen Nieren mit und ohne Gabe von MSC**



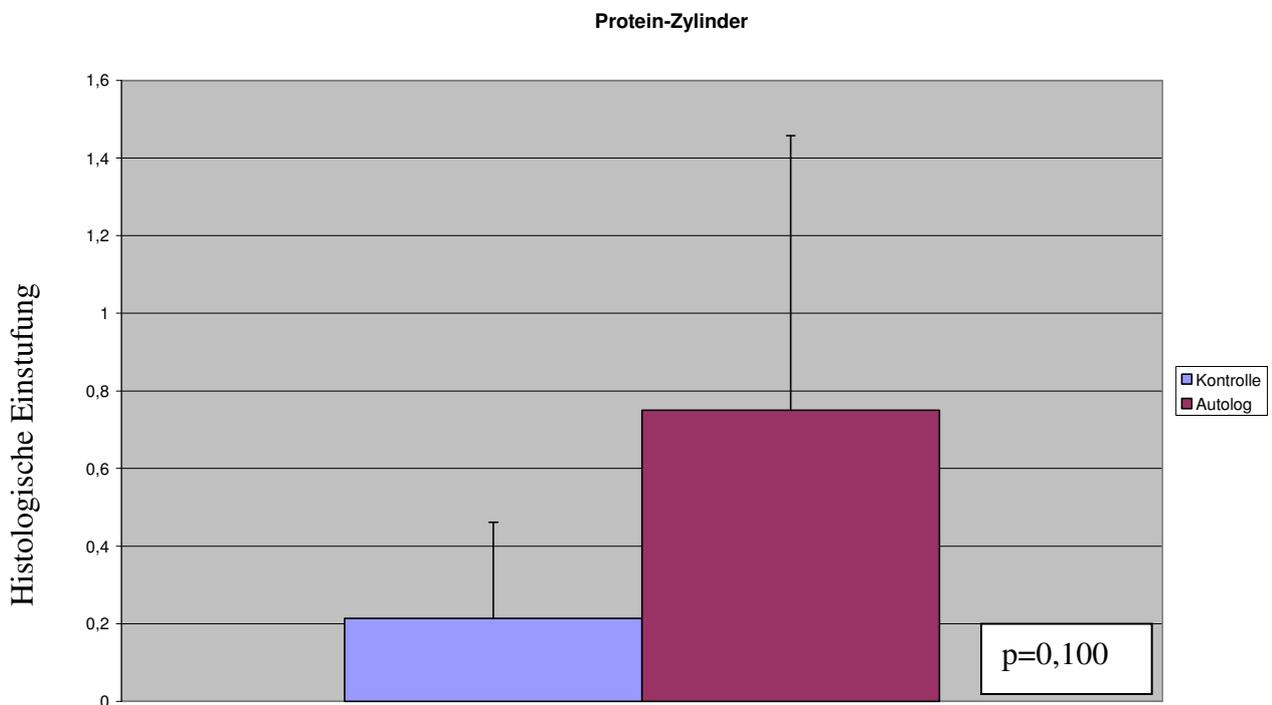
**Abbildung 31: Histologische Einstufung der Degeneration in ischämischen Nieren mit und ohne Gabe von MSC**



**Abbildung 32: Histologische Einstufung der Regeneration in ischämischen Niere mit und ohne Gabe von MSC**



**Abbildung 33: Histologische Einstufung der Glomerulonephritis in ischämischen Nieren mit und ohne Gabe von MSC**



**Abbildung 34: Histologische Einstufung der Proteinzyylinder in ischämischen Nieren mit und ohne Gabe von MSC**

Abbildungen 29-34: Histologische Einstufung der Nieren nach akutem Nierenversagen. Es wurden die Medulla und der Cortex der Niere 28 Tage (ein Tier 9 Wochen) nach Induktion des akuten Nierenversagens mit einer Kontrollgruppe und einer Gruppe, die autologe mesenchymale Stromazellen erhalten hat, mit folgenden Eigenschaften evaluiert: 1. Lymphozyten (Grad 1: nur minimale Infiltrate, kaum mehr als im gesunden Tier; Grad 5: höchstbedenkbarer Grad), 2. Fibrose (Grad 1: zwischen 0 und 20 % des Interstitiums fibrosiert; Grad 5: 80-100 % des Interstitiums fibrosiert), 3. Degeneration (Grad 1: in den fibrotischen Herden dezente, gerade erkennbare Degenerationen; Grad 5: maximal denkbare Degenerationen in den fibrotischen Bereichen), 4. Regeneration (wie Degeneration), 5. Glomerulonephritis (Grad 1: etwa 0-20 % der Glomeruli betroffen; Grad 5: 80-100 % der Glomeruli betroffen) und 6. Proteinzyylinder (Grad 1: nur ganz vereinzelt, bis 20 % der distalen Sammelrohre; Grad 5: 80-100 % der Sammelrohre betroffen). Es wurde der Mittelwert der Einstufung der Medulla und des Cortex gebildet. Auf der Vertikalen sind die Histologischen Einstufungen dargestellt. Die Signifikanz (p) ist in allen Fällen größer 0,05, d. h. es gibt keinen signifikanten Unterschied der beiden Gruppen.

DISKUSSION

Tier	Lymphozyten	Fibrosen	Degeneration	Regeneration	Glomerulonephritis	Proteinzyylinder	Zusatz
Erste Zahl: Rinde; Zweite Zahl: Mark							
Kontr. 4102	2 2	2 1	1 1	1 0	1 1	0 1	Artefakte
Kontr. 5713	1 1	2 (fehlt)	1 0	1 0	2 1	0 0	Artefakte
Kontr. 5819	1 0	1 0	1 0	1 0	0 0	0 0	
Kontr. 6207	1 1	1 0	1 0	1 0	1 0	0 0	
Kontr. 2204	1 1	1 0	0 0	0 0	1 1	0 0	
Kontr. 0561	1 1	2 1	1 1	1 1	1 1	0 1	
Kontr. 1133	1 0	1 3	1 0	1 0	2 0	1 0	

**Tabelle 4: Ergebnistabelle der histologischen Einstufung der Rinde und des Marks der Nieren der Tiere beider Gruppen in folgende Kategorien: Lymphozyteninfiltration, Fibrosenbildung, Degeneration, Regeneration, Glomerulonephritis, Proteinzyylinder**

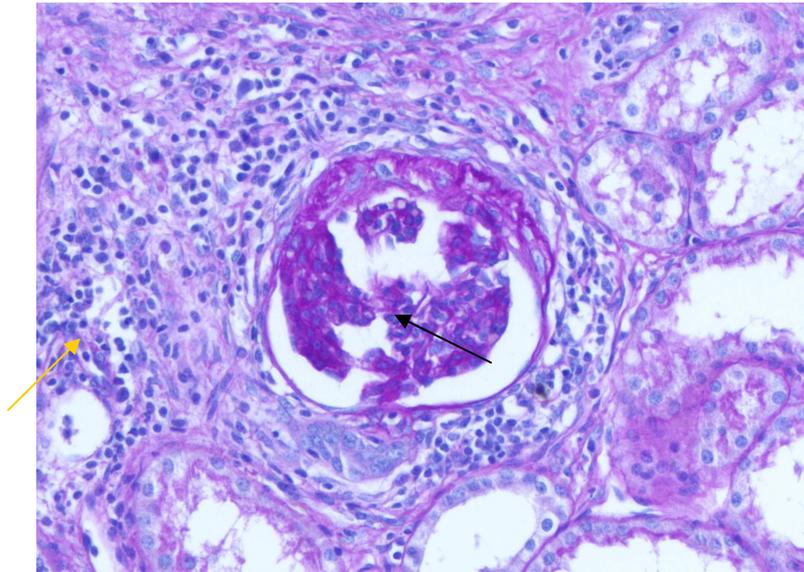
DISKUSSION

---

Autol. 4787	3 2	4 4	2 2	2 2	3 1	1 2	
Autol. 8482	2 1	2 1	0 1	0 1	0* 0	0* 0	
Autol. 6333	1 1	4 2	1 1	2 1	3 2	2 2	
Autol. 0095	0 0	1 1	1 1	1 1	1 0	0 0	Artefakte
Autol. 3832	1 1	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	Schwere Gefäßwand- schäden
Autol. 2680	3 1	4 2	2 0	2 0	2 1	1 0	
Autol. 9661	1	1	1	1	0	1	Mark-Block absol. nicht schneidbar
Autol. 7055	2 1	1* 2	0 1	0 1	1 1	0 2	Artefakte

\* musste am HE abgeschätzt werden, da Spezialfärbung auf Grund von schlechter Haftung (Artefakte) trotz wiederholter Versuche abschwamm

**Tabelle 4 (fortgeführt): Ergebnistabelle der histologischen Einstufung der Rinde und des Marks der Nieren der Tiere beider Gruppen in folgende Kategorien: Lymphozyteninfiltration, Fibrosenbildung, Degeneration, Regeneration, Glomerulonephritis, Proteinzyylinder**



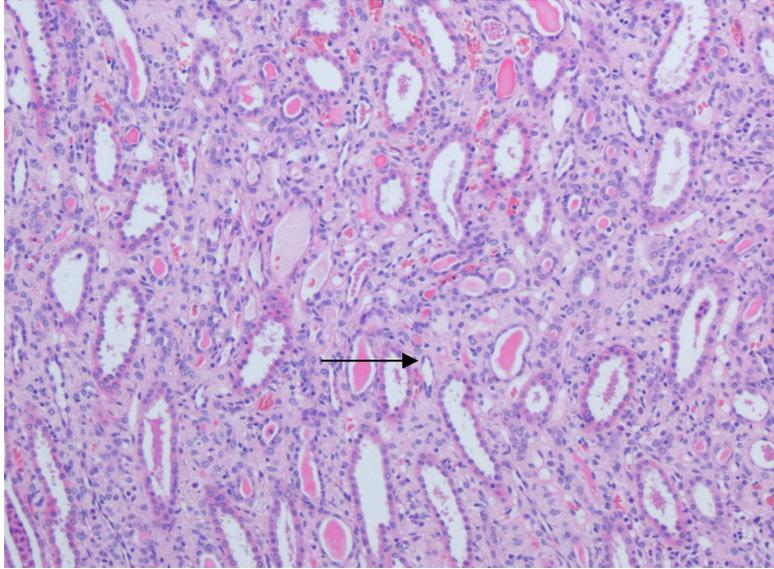
**Abbildung 35: Histologisches Bild von Fibrosen (gelber Pfeil) und Glomerulonephritis (GN, schwarzer Pfeil) im Nierencortex**

Fibrosen und Glomerulonephritis im Nierencortex eines mit MSC behandelten Tieres

(4787) 28 Tage nach Induktion eines akuten Nierenversagens

PAS, Durchlicht-Mikroskop, Vergrößerung x200

Foto: Gruber

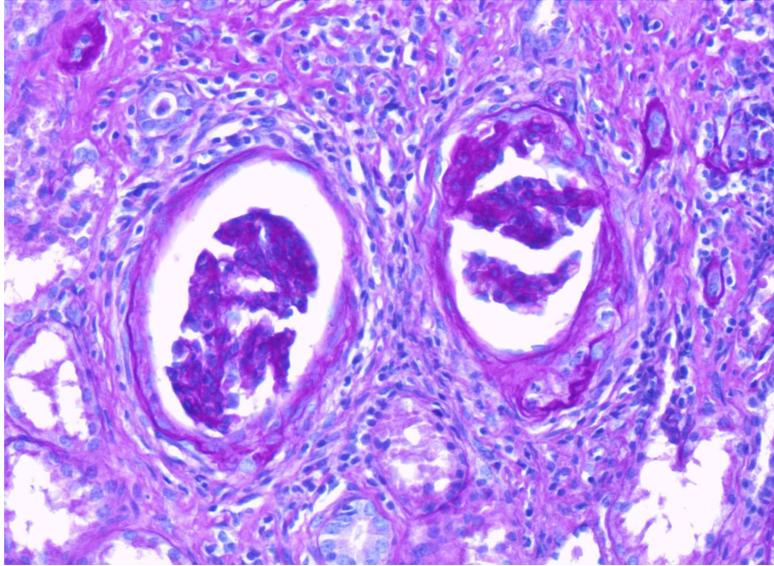


**Abbildung 36: Histologisches Bild von Fibrosen und Proteinzyclindern (schwarzer Pfeil) in der Nierenmedulla**

Fibrosen und Proteinzyclinder in der Medulla einer Niere eines mit autologen MSC behandelten Tieres (4787) 28 Tage nach Induktion eines akuten Nierenversagens

HE, Durchlicht-Mikroskop, Vergrößerung x200

Foto: Gruber



**Abbildung 37: Histologisches Bild einer membranösen Glomerulonephritis in der Nierenmedulla**

Membranöse Glomerulonephritis in der Medulla einer Niere eines mit autologen MSC behandelten Tieres (4787) 28 Tage nach Setzen eines akuten Nierenversagens

PAS, Durchlicht-Mikroskop, Vergrößerung x200

Foto: Gruber

#### **4.4.6 Fehldifferenzierung**

Es wird von einigen Autoren beschrieben, dass im akuten Nierenversagen im Nagermodell weder eine Transdifferenzierung der MSC noch eine Fusion der Gewebezellen zu einer Verbesserung der Nierenfunktion führt, sondern dass parakrine Effekte dafür verantwortlich sind. Duffield et al. zeigten im Nagermodell, dass regenerierte Zellen aus intrarenalen Zellen stammen (Duffield et al., 2005). Auch Humphreys et al. weisen darauf hin, dass der vorherrschende Mechanismus die Regeneration der überlebenden tubulären Epithelzellen im ischämischen Nierenversagen bei Säugetieren ist (Humphreys et al., 2008).

Es wird aber auch in einem experimentellen Anti-Thy1.1-Glomerulonephritismodell in der Ratte beschrieben, dass sich die MSC intraglomerulär in Adipocyten begleitet mit einer glomerulären Sklerose fehldifferenzieren (Kunter et al., 2007). Um dieses in unserem Fall zu

untersuchen, haben wir ein Schwein erst 9 Wochen nach der Operation und dem Setzen und Behandeln mit autologen MSC histologisch untersucht. Es wurden Proben der Nieren entnommen, eingefroren und mit der Sudan Rot Färbung untersucht.

Auch von den anderen Tieren, die mit autologen MSC behandelt wurden, wurde eine Fettfärbung in den Nierenschnitten nach vier Wochen vorgenommen. Bei keinem der Tiere konnte eine adipogene Fehldifferenzierung festgestellt werden.

Um eine osteogene Fehldifferenzierung festzustellen, wurden die 2cm großen Nierenstücke makroradiologisch in der Osteopathologie des Universitätsklinik Hamburg Eppendorf untersucht. Es konnten keine heterotrophen Verknöcherungen, dystrophen Verkalkungen oder Kristallauflagerungen nachgewiesen werden.

Folglich kam es nicht zu einer adipogenen oder osteogenen Fehldifferenzierung der Zellen in den Nieren nach Behandlung mit autologen mesenchymalen Stromazellen. Die Applikation autologer MSC ist also sicher und hat keine adversen Nebeneffekte, was im Hinblick auf einen möglichen klinischen Einsatz essentiell ist.

#### **4.5 Schlußfolgerung und Ausblick**

Bonventure et al., 2004, zeigten, dass die Entzündung eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie beim ANV spielt. Beim Nager zeigten die MSC eine schützende Wirkung beim ANV innerhalb von 24-48 Stunden (Lange et al., 2005; Tögel et al., 2005; Tögel et al., 2007; Ittrich and Lange et al., 2007). Die schützende Wirkung der MSC beruhte nach den gezeigten Ergebnissen auf parakrinen oder sogar trophischen Mechanismen im Zusammenhang mit der Produktion von einem breiten Spektrum von Mediatoren und Wachstumsfaktoren mit immunsuppressiver, antientzündlicher, antiapoptotischer und proliferativer Wirkung (Humphreys et al., 2008).

Diese Ergebnisse beim Nagetier gaben Anlass dazu, diesen zelltherapeutischen Ansatz im Großtiermodell beim Schwein zu testen. Jedoch konnte beim Schwein keine der beim Nage-

tier schützenden Wirkungen beobachtet werden. Bei den von uns verwendeten Zellen handelte es sich um mesenchymale Stromazellen, die alle Kriterien der ISCT erfüllten. Die verabreichten MSC führten zu keiner Verringerung der Serum-Kreatinin- oder Serum-Harnstoffwerte, zu keiner Verbesserung der GFR und es zeigte sich keine verbesserte Morphologie in den ischämischen Nieren.

Folglich konnten wir in unserem Modell keinen positiven Verlauf des akuten Nierenversagens durch die Gabe von autologen MSC im Schwein erreichen. Es ist allerdings wichtig zu erwähnen, dass wir keine tödliche Form der Ischämie induziert haben. Daher könnte es sein, dass die Regenerationsfähigkeit der Tubuli ausreichend war, um den ischämischen Schaden zu normalisieren. Außerdem haben wir nur junge Tiere mit unauffälligen Nierenwerten in unserer Studie verwendet, bei denen vermutlich eine hohe Kapazität der Erneuerung vorzufinden ist.

Die MLR Daten lassen zusätzlich darauf schließen, dass die MSC der Schweine nicht in der Lage sind, in-vitro eine T-Lymphozyten-Aktivierung und Proliferation durch zelluläre oder unspezifische mitogene Stimuli zu unterdrücken. Da aber die Entzündung eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie im akuten ischämischen Nierenversagen spielt, könnte dies die Ursache dafür sein, dass die Schweine-MSK keine Verbesserung der Nierenfunktion zeigen. Humane MSC besitzen allerdings eine andere Immunantwort als die der Schweine, daher sollten klinische Studien am Menschen durchgeführt werden, um die Wirkung der MSC im akuten Nierenversagen zu testen.

## **5 Zusammenfassung**

### **Autologe mesenchymale Stromazellen im Ischämie/Reperfusion-induzierten akuten Nierenversagen im Schweinmodell**

Janna Boche

Im Rattenmodell des akuten Nierenversagens konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit mesenchymalen Stromazellen (MSC) eine schützende Wirkung auf die Nierenfunktion zeigt und den Heilungsprozess durch komplexe parakrine Mechanismen beschleunigt.

Um vorbereitende Daten für zukünftige klinische Studien am Patienten zu gewinnen, sollte in einem Schweinmodell die nierenschützende Wirkung von MSC im akuten Nierenversagen untersucht werden. Zur Induktion eines akuten Nierenversagens im Schwein wurde eine Methode etabliert, bei der durch bilaterale Ballonkatheterisierung über die Aa. femorales in die Aa. renales eine reversible Ischämie eingeleitet wurde. Nach einer Verschlusszeit von 110 Minuten zur Induktion des akuten Nierenversagens wurden acht weiblichen Schweinen autologe MSC in die suprarenale Aorta injiziert, einer Kontrollgruppe von sieben Tieren wurde nur Kulturmedium injiziert. Durch Bestimmung biochemischer Nierenparameter (z. B. Kreatinin, Harnstoff) im Blut und Urin wurde der Verlauf des Nierenschadens über vier Wochen verfolgt. Nach Tötung der Tiere wurde Gewebe entnommen und morphologisch sowie histologisch untersucht. Es zeigten sich keine akuten oder späteren Komplikationen nach Transplantation der MSC, aber es wurde nicht der vorteilhafte Effekt der MSC auf die Nierenfunktion und die Histologie wie im Nagermodell nachgewiesen. Die MSC waren plastikadhärent, differenzierten sich in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten, zeigten das charakteristische Antigenprofil (CD 90, CD 105 und MHCI positiv und CD 14 und CD 45 negativ) und erfüllten damit als homogene Population alle Kriterien von mesenchymalen Stromazellen.

Aus den Daten der gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) lässt sich schließen, dass die MSC des Schweines eine andere Immunantwort als die des Menschen besitzen. *In vitro* sind sie nicht in der Lage, eine T-Lymphozyten-Aktivierung und -Proliferation durch zelluläre oder unspezifische mitogene Stimuli zu unterdrücken. Da aber die Entzündung in der Pathophysiologie im akuten Nierenversagen eine wichtige Rolle spielt, könnte die inadäquate immunmodulierende Wirkung die Ursache dafür sein, dass die MSC des Schweines keine Verbesserung der Nierenfunktion vermitteln und eine erfolgreiche Therapie möglicherweise von der antiinflammatorischen Wirkung abhängt.

Die Konsequenz daraus ist, dass die Behandlung des akuten Nierenversagens in diesem Großtiermodell keine Information bezüglich der zugrundeliegenden Mechanismen ergab.

Es ist zu erwarten und zu hoffen, dass die Behandlung des akuten Nierenversagens beim Menschen mit MSC auf Grund ihrer immunmodulierenden Effekte ähnliche Erfolge wie im Rattenmodell hervorbringen könnte.

## **5 Summary**

### **Autologous mesenchymal stromal cells in ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury in the porcine model**

Janna Boche

It could previously be demonstrated in the rat model of acute kidney injury that treatment with mesenchymal stromal cells (MSCs) has a protective effect on kidney functioning and accelerates the healing process through complex paracrine mechanisms.

In order to obtain preparatory data for future clinical studies with human patients, the kidney protecting effect of MSC in acute kidney injury was tested in a porcine model. For the induction of acute kidney injury in pigs a method was established in which through bilateral balloon catheter technique via the Aa. femorales into the Aa. renales a reversible ischemia was induced. After an occlusion time of 110 minutes for the induction of the acute kidney injury, eight female pigs were infused with autologous MSC into the supra aorta, a control group consisting of seven animals was just infused with medium. Through the determination of biological parameters (i.e. creatinine, urea) in blood and urine the progression of the kidney injury was monitored over four weeks. After the killing of the pigs tissue was taken and examined morphologically and histologically. There were no acute or subsequent complications after the transplantation of MSC, but the beneficial effect of MSC on kidney function and histology from the rat model could not be demonstrated.

The MSC were plastic adherent, differentiated in adipocytes, chondrocytes and osteoblasts, showed the characteristic antigen profile (CD 90, CD 105 and MHCI positive and CD 14 and CD 45 negative) and therefore fulfilled all the criteria of mesenchymal stromal cells.

It can be concluded from the data of the mixed lymphocyte reaction (MLR) that porcine MSC have a different immune response than human MSC. In vitro, they are not able to suppress a

T-lymphocyte activation and proliferation through cellular or unspecific mitogen stimuli.

However, since the inflammation in the pathophysiology plays an important role in acute kidney injury, the inadequate immune-modulating effect could be the reason for the fact that the porcine MSC did not show any improvement of kidney function and a successful therapy is possibly dependent on the anti-inflammatory effect.

Consequently, the treatment of acute kidney injury in this large animal model did not provide any information in relation to the underlying mechanisms.

It can be hoped that the treatment of acute kidney injury in humans with MCS could be equally successful as in the rodent model, due to its immune-modulating effect.

## **7 Abbildungsverzeichnis**

- Abbildung 1: Plastizität der MSC
- Abbildung 2: Morphologie der porcinen mesenchymalen Stromazellen
- Abbildung 3: Induktion und Behandlung des ischämischen Nierenversagens der drei verschiedenen Gruppen
- Abbildung 4: Dosierungsschema nach Gewicht zur Einleitung der Anästhesie bei Schweinen
- Abbildung 5: Operationsprotokoll
- Abbildung 6: Darstellung der Vena femoralis und Arteria femoralis
- Abbildung 7: Ballonkatheterisierung der Aa. renales im C-Bogen Bild dargestellt
- Abbildung 8: Reperfusion der Aa. renales mit Kontrastmittel im C-Bogen Bild dargestellt
- Abbildung 9: Platzierung des Blasenkatheters unter Ultraschallkontrolle
- Abbildung 10: Wachstumskurve der MSC bei Schwein 1 unter Normoxie und Hypoxie
- Abbildung 11: Wachstumskurve der MSC bei Schwein 2 unter Normoxie und Hypoxie

- Abbildung 12: Verdopplungsrate der MSC unter Normoxie und Hypoxie bei Schwein 1 und 2
- Abbildung 13: Analyse der Zellen in der Durchflusszytometrie (FACS Analyse)
- Abbildung 14 a: Charakterisierung der Oberflächenepitope der MSC in der FACS-Analyse; CD14
- Abbildung 14 b: Charakterisierung der Oberflächenepitope der MSC in der FACS-Analyse; CD45
- Abbildung 14 c: Charakterisierung der Oberflächenepitope der MSC in der FACS-Analyse; MHC I
- Abbildung 14 d: Charakterisierung der Oberflächenepitope der MSC in der FACS-Analyse; CD90
- Abbildung 14 e: Charakterisierung der Oberflächenepitope der MSC in der FACS-Analyse; CD105
- Abbildung 15: Osteogene Differenzierung der aus dem Knochenmark der Schweine isolierten Zellen
- Abbildung 16: Chondrogene Differenzierung der aus dem Knochenmark der Schweine isolierten Zellen

- Abbildung 17: Adipogene Differenzierung der aus dem Knochenmark der Schweine isolierten Zellen
- Abbildung 18 a-d: Gemischte Lymphozytenreaktion (Mixed lymphocyte reactions MLR)
- Abbildung 19: Serumkreatinin-Anstieg nach Induktion des akuten Nierenversagen mit unterschiedlichen Abklemmzeiten der Aa. renales
- Abbildung 20: Anstieg des Serumkreatininwertes nach Induktion des ANV beim männlichen und weiblichen Schwein mit unterschiedlichen Abklemmzeiten der Aa. renales
- Abbildung 21: Säulengraphik: Vergleich der Serumkreatininwerte der Gruppen mit und ohne Behandlung mit MSC nach Induktion des ANV
- Abbildung 22: Säulengraphik: Vergleich der Serumharnstoffwerte der Gruppen mit und ohne Behandlung mit MSC nach Induktion des ANV
- Abbildung 23: Vergleich der GFR der Gruppen mit und ohne Behandlung mit MSC nach Induktion des ANV
- Abbildung 24: Vergleich des Serumnatriumwertes der Gruppen mit und ohne Behandlung mit MSC nach Induktion des ANV

- Abbildung 25: Vergleich des Serumkaliumwertes der Gruppen mit und ohne Behandlung mit MSC nach Induktion des ANV
- Abbildung 26: Vergleich des Kreatininwertes von den Tieren mit frisch bzw. gefrorenen transplantierten MSC nach Induktion des ANV
- Abbildung 27: Vergleich der GFR von Tieren mit frisch bzw. gefrorenen transplantierten MSC nach Induktion des ANV
- Abbildung 28: Adipogene Fehldifferenzierung der MSC in den Nieren
- Abbildung 29: Histologische Einstufung der Lymphozyteninfiltration in ischämischen Nieren mit und ohne Gabe von MSC
- Abbildung 30: Histologische Einstufung der Fibrosenbildung in ischämischen Nieren mit und ohne Gabe von MSC
- Abbildung 31: Histologische Einstufung der Degeneration in ischämischen Nieren mit und ohne Gabe von MSC
- Abbildung 32: Histologische Einstufung der Regeneration in ischämischen Nieren mit und ohne Gabe von MSC
- Abbildung 33: Histologische Einstufung der Glomerulonephritis in ischämischen Nieren mit und ohne Gabe von MSC

- Abbildung 34: Histologische Einstufung der Proteinzyylinder in ischämischen Nieren mit und ohne Gabe von MSC
- Abbildung 35: Histologisches Bild von Fibrosen und Glomerulonephritis (GN) im Nierencortex
- Abbildung 36: Histologisches Bild von Fibrosen und Proteinzyylinder in der Nierenmedulla
- Abbildung 37: Histologisches Bild einer membranösen Glomerulonephritis in der Nierenmedulla

## **8 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Vergleich ausgewählter nephrologischer Daten von Mensch und Schwein

Tabelle 2: Einteilung und Ursachen des akuten Nierenversagens

Tabelle 3: Ätiologie, Ursache, Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie des akuten Nierenversagens

Tabelle 4: Ergebnistabelle der histologischen Einstufung der Rinde und des Marks der Nieren der Tiere der beiden Gruppen in folgende Eigenschaften: Lymphozyten, Fibrosen, Degeneration, Regeneration, Glomerulonephritis, Proteinzyylinder

## **9 Literaturverzeichnis**

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2003) Molekularbiologie der Zelle. 4. Auflage Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim; 1472-1474, 1501-1503, 1517
- Alison M, Sarraf C (1998) Hepatic stem cells. *J Hepatol*; 29(4):676-682
- Amado LCA, Salaris AP, Schuleri KH, John MS, Xie JS, Cattaneo S, Durand DJ, Fittton T, Kuang JQ, Stewart G, Lehrke S, Baumgartner WW, Martin BJ, Heldman AW, Hare JM (2005) Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA*; 102(32), 11474–11479
- Arroyo JL, Dawson E, Reiner RP, Gonima E, Carrascosa F (1986) Effect of isoflurane and halothane on the endocrine system. In: Lawin P, Van Aken H, Puchstein C (eds): *Isoflurane*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York; 317-322
- Augello A, Tasso R, Negrini SM, Cancedda R, Pennesi G (2007) Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*; 56(4):1175-1186
- Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissmann IL, Robbins RC (2004) Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*; 428(6983):668-673

- Bauer-Pham KL, Bürgi E, Forrer R, Lutz H (2001) Bestimmung hämatologischer und blutchemischer Referenzwerte bei Mastschweinen verschiedenen Alters, Schweiz, Arch Tierheilkd; 143(2):77-83
- Bellomo R, Farmer M, Bhonagiri S, Porceddu S, Ariens M, M'Pisi D, Ronco C (1999) Changing acute renal failure treatment from intermittent hemo-dialysis to continuous hemofiltration: impact on azotemic control. Int J Artif Organs; 22(3):145-150
- Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL (1999) Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. Science; 283(5401):534-537
- Bonventre JV (1993) Mechanisms of ischemic acute renal failure [clinical conference]. Kidney Int; 43(5):1160-1178
- Bonventure JV, Zuk A (2004) Ischemic-acute renal failure: an inflammatory disease? Kidney Int; 66(2):480-485
- Bosch P, Pratt SL, Stice SL (2006) Isolation, characterization, gene modification, and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells. Biology of Reproduction; 74(1), 46-57
- Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM (2000) From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. Science; 290(5497):1775-1779
- Brezis M, Rosen S, Silva P, and Epstein FH (1984) Renal ischemia: A new perspective. Kidney Int; 26(4):375-383

- Brunson DB (1997) Pharmacology of inhalation anesthetics. In: Kohn D.F., Wixson S.K., White, W.J., Benson G.J. (eds.): Anesthesia and analgesia in laboratory animals. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto; 29-40
- Cakiroglu F (2008) Expansion von human, mesenchymalen Stammzellen in Tiereserum-freiem Medium für Transplantation und regenerative Medizin, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg
- Caplan AI (1991) Mesenchymal Stem Cells. J Orthop Res; 9(5):641-650
- Caplan AI (1994) The mesengenic process. Clin Plast Surg; 21(3):429-435
- De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP (2001) Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. Arthritis Rheum; 44(8):1928-1942
- Deng W, Han Q, Liao L, You S, Deng H, Zhao RCH (2005) Effects of Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells on T and B Lymphocytes from BXSB Mice. DNA Cell Biol; 24(7):458-463
- Dinkelaker K, (2005) Einfluss der Gunderkrankung auf die Prognose kritisch kranker Patienten mit akutem Nierenversagen, Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen, Tübingen
- Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM (2002) Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. Blood; 99(10):3838-3843

- Djouad F, Fritz V, Apparailly F, Louis-Plence P, Bony P, Sany J, Jorgensen C, Noël D (2005) Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by tumor necrosis factor alpha in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*; 52(5):1595-1603
- Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noël D, Jorgensen C (2003) Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*; 102(10):3837-3844
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*; 8(4):315-317
- Duffield JS, Park KM, Hsiao LL, Kelley VR, Scadden DT, Ichimura T, Bonventre JV (2005) Restoration of tubular epithel cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J Clin Invest*; 115(7):1743-1755
- Eger EI (1981) Isoflurane: A review. *Anesthesiology*; 55(5):559-576
- Epstein FH, Silva P, Spokes K, and Brezis M (1989) Renal medullary Na-K-ATPase and hypoxic injury in perfused rat kidneys. *Kidney Int*; 36(5):768-772
- Erhardt W, Henke J, Brill T (1994) Die Anästhesie beim Versuchstier. In: Scheuber H.P. (Hrsg.): „3R“ Handbuch, Thomas Denner Verlag, München; 1-56
- Erhardt W, Henke J, Halerstroh J, (2004) Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier. Schattauer, Stuttgart; 326-327

- Fang L, Lange C, Engel M, Zander AR, Fehse B (2006) Sensitive balance of suppressing and activating effects of mesenchymal stem cells on T-cell proliferation. *Transplantation*; 82(10):1370 – 1373
- Faustini M, Munari E, Colombani C, Russo V, Maffeo G, Vigo D (2000) Haematology and Plasma Biochemistry of Stamboek Prepubertal Gilts in Italy: Reference Values. *J Vet Med A*; 47(9), 525-532
- Fee JPH, Thompson GH (1997) Comparative tolerability profiles of the inhaled anaesthetics. *Drug Safety*; 16(3):157-170
- Filip S, Mokr J, Hručka I (2003) Adult stem cells and their importance in cell therapy. *Folia Biologica*; 49(1): 9-14
- Forrest JS, Price MJ, Akkar RR (2003) Stem cell repair of infarcted myocardium: an overview for clinicians. *Circulation*; 108(9):1139-1145
- Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji (2004) Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells*; 22(5):649-658
- Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science*; 287(5457):1433-1438
- Geiger, Jonas, Lenz und Kramer (2003) Nierenerkrankungen Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie. Schattauer, Stuttgart; 1-26

- Gerdoni E, Gallo B, Casazza S, Musio S, Bonanni I, Pedemonte E, Mantegazza R, Frassoni F, Mancardi G, Pedotti R, Uccelli A (2007) Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol*; 61(3):219-227
- Grimm H (2003) Xenotransplantation. Schattauer, Stuttgart; 4-10
- Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, Nolte J, Wolf F, Li M, Engel W, Hasenfuss G (2006) Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*; 440(7088):1199-1203
- Hagemann P, Kia T, Ludwig R (1997) Immunsystem und zelluläre Identität. In: Abdovahab-Emminger H (Hrsg.): *Physikum Exakt*, Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 905
- Haller M, Schelling G (2000) Acute kidney failure. *Physiopathology- clinical diagnosis- therapy. Anaesthesist*; 49(4), 349-352
- Heavner JE (1994) Physiologic effects of anesthetics and analgesics. In: Smith A.C., Swindle M.M. (eds.): *Research animal anesthesia, analgesia and surgery*. Scientists center for animal welfare, Maryland; 41-583
- Heidbreder E, Schafferhans K, Geiger H, and Bahner U (1989) Akutes Nierenversagen. *medwelt*; 40:612-615
- Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Fonsato V, Romanazzi GM, Camussi G (2004) Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. *Int J Mol Med*; 14(6):1035-1041

- Hikasa Y, Ohe N, Takase K, Ogasawara S (1997) Cardiopulmonary effects of sevoflurane in cats: comparison with isoflurane, halothane, and enflurane. *Res Vet Sci*; 63(3):205-210
- Holaday DA, Fiserova-Bergerova V, Latta IP, Zumbiel MA (1975) Resistance of isoflurane to biotransformation in man. *Anesthesiol*; 43(3):325-332
- Horwitz EM, Gordon PL, Koo WKK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T (2002) Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 99(13):8932-8937
- Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Müller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A (2005) Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*; 7(5):393-395.
- Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK (1999) Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med*; 5(3):309-313
- Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, Koo WW, Fitzpatrick LA, Neel MD, McCarville ME, Orchard PJ, Pyeritz RE, Brenner MK (2001) Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood*; 97(5):1227-1231

- Humphreys BD, Bonventre JV (2008) Mesenchymal stem cells in acute kidney injury. *Annu Rev Med*; 59:311-325
- Humphreys BD, Valerius MT, Kobayashi A, Mugford JW, Soeung S, Duffield JS, McMahon AP, Bonventre JV (2008) Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. *Cell Stem Cell*; 2(3):284-291
- Imberti B, Morigi M, Tomasoni S, Rota C, Corna D, Longaretti L, Rottoli D, Valsecchi F, Benigni A, Wang J, Abbate M, Zoja C, Remuzzi G (2007) Insulin-like growth factor-1 sustains stem cell mediated renal repair. *J Am Soc Nephrol*; 18(11):2921-2928
- in 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL, Beekhuizen W, Willemze R, Kanhai HH, Fibbe WE (2003) Mesenchymal stem cells in human secondtrimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica*; 88(8):845-852
- Ittrich H, Lange C, Tögel F, Zander AR, Dahnke H, Westenfelder C, Adam G, Nolte-Ernsting C (2007) In vivo magnetic resonance imaging of iron oxide-labeled, arterially-injected mesenchymal stem cells in kidneys of rats with acute ischemic kidney injury: detection and monitoring at 3T. *J Magn Reson Imaging*; 25(6):1179-1191
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*; 418(6893):41-49

- Junqueira LC, Carneiro J (2005) Histologie. 6. Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg; 207-220
- Kawase Y, Yanagi Y, Takato T, Fujimoto M, Okochi H (2004) Characterization of multipotent adult stem cells from the skin: transforming growth factor-beta (TGF-beta) facilitates cell growth. *Exp Cell Res*; 295(1):194-203
- Kher A, Meldrum KK, Wang M, Tsai BM, Pitcher JM, Meldrum DR (2005 a) Cellular and molecular mechanisms of sex differences in renal ischemia–reperfusion injury. *Cardiovascular Research*; 67:594-603
- Kher A, Wang M, Tsai BM, Pitcher JM, Greenbaum ES, Nagy RD, Patel KM, Wairiuko GM, Markel TA, Meldrum DR (2005 b) Sex differences in the myocardial inflammatory response to acute injury. *Shock*; 23(1):1-10
- Koç ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W (2002) Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant*; 30(4):215-222
- Koç ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, Lazarus HM (2000) Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol*; 18(2):307-316
- Koch (2000) *Klinische Nephrologie*. 1. Auflage, Urban und Fischer, München; 815-847

- Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S (2001) Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*; 7(4):430-446
- Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F (2003) Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*; 101(9):3722-3729
- Krause U, Harter C, Seckinger A, Wolf D, Reinhard A, Bea F, Dengler T, Hardt S, Ho A, Katus HA, Kuecherer H and Hansen A (2007) Intravenous Delivery of Autologous Mesenchymal Stem Cells Limits Infarct Size and Improves Left Ventricular Function in the Infarcted Porcine Heart. *Stem cells an Delvopment*; 16(1):31–37
- Krössin T (2007) Untersuchungen von Nierenfunktionsparametern zur Beschreibung des akuten Nierenversagens der extrakorporal normotherm perfundierten porcinen Schlachthausniere, Medizinische Fakultät der Charité-Universitätmedizin Berlin, Berlin
- Kucia M, Ratajczak J, Reza R, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ (2004) Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury. *Blood Cells Mol Dis*; 32(1):52-57
- Kunter U, Rong S, Boor P, Eitner F, Müller-Newen G, Djuric Z, van Roeyen CR, Konieczny A, Ostendorf T, Villa L, Milovanceva-Popovska M, Kerjaschki D, Floege J (2007) Mesenchymal stem cells prevent progressive experimental renal failure but maldifferentiate into glomerular adipocytes. *J Am Soc Nephrol*; 18(6):1754-1764

- Kunter U, Rong S, Djuric Z, Boor P, Muller-Newen G, Yu D and Floege J (2006) Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*; 17(8):2202-2212
- Lange C, Tögel F, Itrich H, Clayton F, Nolte-Ernsting C, Zander AR, Westenfelder C (2005) Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Kidney Int*; 68(4):1613-1617
- Lawin P, Brüssel Th, Prien Th (1994) *Praxis der Intensivbehandlung*. 6. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart
- Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, Ringdén O (2004) Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*; 363(9419):1439-1441
- Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH (2004) Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*; 103(5):1669-1675
- Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, Prockop DJ (2006) Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/SCID mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 103(46):17438-17443
- Lyon MB, Orvieto MA, Zorn KC, Tolhurst SR, Rapp DE, Mikhail AA, Brendler CB, Shalhav AL (2007) Effect of renal ischemia in laparoscopic acute versus chronic solitary kidney model. *Urology*; 69(2):402-406

- Maitra B, Szekely E, Gjini K, Laughlin MJ, Dennis J, Haynesworth SE, Koç ON (2004) Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant*; 33(6):597-604
- Majka M, Kucia M, Ratajczak MZ (2005) Stem cell biology- a never ending quest for understanding. *Acta Biochimica Polonica*; 52(2):353-358
- Martin-Rendon E and Watt SM (2003) Stem cell plasticity. *Br J Haematol*; 122(6), 877-891
- Mason J, Beck F, Dorge A, Rick R, and Thurau K (1981) Intracellular electrolyte composition of renal tubules following renal ischemia. *Kidney Int*; 20(1):61-70
- Miao Z, Jin J, Chen L, Zhu J, Huang W, Zhao J, Qian H, Zhang X (2006) Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int*; 30(9):681-687
- Morigi M, Imberti B, Zoja C, Corna D, Tomasoni S, Abbate M, Rottoli D, Angioletti S, Benigni A, Perico N, Alison M, Remuzzi G (2004) Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*; 15(7):1794-1804
- Morigi M, Inrona M, Imberti B, Corna D, Abbate M, Rota C, Rottoli D, Benigni A, Perico N, Zoja C, Rambaldi A, Remuzzi A, Remuzzi G (2008) Human bone marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice. *Stem Cells*; 26(8):2075-2082

- Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, Sippel C, Hoffmann KH (2005) Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol*; 24(2):155-165
- Mouiseddine M, Mathieu N, Stefani J, Demarquay C, Bertho JM (2007) Characterization and Histological Localization of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells in the Human Postnatal Thymus. *Stem Cells Dev*; 0(0):1-10
- Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JJ, Barelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA and Field LJ (2004) Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*; 428(6983):664-668
- Nauta AJ, Fibbe WE (2007) Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*; 110(10):3499-506
- Nguyen MT, Devarajan P (2008) Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Pediatr Nephrol*; 23(12):2151-2157
- Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Sawen P, Roll W, Hescheler J, Taneera J, Fleischmann BK, Jacobsen SE (2004) Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med.*; 10(5):494-501
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001) Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*; 410(6829):701-705

- Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, Phinney DG (2003) Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 100(14):8407-8411
- Orvieta MA, Tolhurst SR, Chuang MS, Lyon MB, Ritch CR, Rapp DE, Shalhav AL (2005) Defining maximal renal tolerance to warm ischemia in porcine laparoscopic and open surgery model. *Urology*; 66(5):1111-1115
- Penn MS, Zhang M, Deglurkar I, Topol EJ (2004) Role of stem cell homing in myocardial regeneration. *Int J Cardiol*; 95(1):23-25
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*; 284(5411):143-147
- Potian JA, Aviv H, Ponzio NM, Harrison JS, Rameshwar P (2003) Veto-like activity of mesenchyma stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens. *J Immunol*; 171(7):3426-3434
- Potten CS (1998) Stem Cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; 353(1370):821-830
- Prokop DJ (1997) Marrow stromal cells as stem cells für nonhematopoietic tissues. *Science*; 276(5309):71-74
- Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K (2003) Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation*; 76(8):1208-1213

- Ronco C, Bellomo R, Brendolan A, Pinna V, La Greca G (1999) Brain density changes during renal replacement in critically ill patients with acute renal failure. Continuous hemofiltration versus intermittent hemodialyses. *J Nephrol*; 12(3):173-178
- Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T (2005) Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum*; 52(8):2521-2529
- Schiele AW (2005) Untersuchungen zum Einfluss einer retardierenden Koronarverengung auf die Myokardperfusion im Modell am Miniaturschwein, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilian Universität, München
- Semedo P, Palasio CG, Oliveira CD, Feitoza CQ, Gonçalves GM, Cenedeze MA, Wang PM, Teixeira VP, Reis MA, Pacheco-Silva A, Câmara NO (2009) Early modulation of inflammation by mesenchymal stem cell after acute kidney injury. *Int Immunopharmacol*; 9(6):677-682
- Seo BM, Miura M, Gronthos S, Mark Bartold P, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S (2004) Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*; 364(9429):149-155
- Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF, Martin BJ (2002) Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg*; 73(6):1919-1926
- Shi S, Gronthos S (2003) Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*; 18(4):696-704

- Siegenthaler W, Blum HE (2006) Klinische Pathophysiologie. 9. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart; 933-940
- Silbernagel S, Despopoulos A (2001) Taschenatlas der Physiologie. 5. Auflage, Thieme, Stuttgart; 152-153
- Stepp MA, Zieske JD (2005) The corneal epithelial stem cell niche. *The Ocular Surface*; 3(1):15-26
- Stevens WC, Cromwell TH, Halsey MJ, Eger EI, Shakespeare TF, Bahlman SH (1971) The cardiovascular effects of a new inhalational anesthetic, Forane, in human volunteers at constant arterial carbon dioxide tension. *Anesthesiol*; 35(1): 8-16
- Stuth EAE, Tonkovic-Capin M, Kampine JP, Zuperku EJ (1992) Dose-dependent effects of isoflurane on the CO<sub>2</sub> responses of expiratory medullary neurons and the phrenic nerve activities in dogs. *Anesthesiol*; 76(5):763-774
- Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW (2002) Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*; 416(6880):542-545
- Thomas L (1992) Labor und Diagnose. 4. erweiterte Auflage, Behring, Marburg; 279-297, 447-466
- Tögel F, Cohen A, Zhang P, Yang Y, Hu Z, Westenfelder C (2008) Autologous and allogeneic marrow stromal cells are safe and effective for the treatment of acute kidney injury. *Stem Cells Dev*; 18(3):475-485

- Tögel F, Hu Z, Weiss K, Isaac J, Lange C, Westenfelder C (2005) Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol*; 289(1):F31-42
- Tögel F, Isaac J, Westenfelder C (2004) Hematopoietic stem cell mobilization-associated granulocytosis severely worsens acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*; 15(5):1261-1267
- Tögel F, Weiss K, Yang Y, Hu Z, Zhang P and Westenfelder C (2007) Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*; 292(5):F1626-635
- Tomita S, Mickle DA, Weisel RE, Jia ZQ, Tumiati LC, Allidina Y, Liu P, Li RK (2002) Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*; 123(6):1132-1140
- Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP (2003) Angiogenesis in ischemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet*; 361(9351):47-49
- Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC (2003) Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*; 75(3):389-397
- Vaegler, M. (2009) Plastizität humaner multipotenter mesenchymaler Stromazellen undn ihre Präparation für die regenerationsmedizinische Anwendung in der Pädiatrie, Eberhard- Karls-Universität zu Tübingen, Tübingen

- Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV (2008) Biomarkers of acute kidney injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 48:463-493
- Veber B, Dureuil B, Viïres N, Aubier M, Pariente R, Desmonts JM (1989) Effects of isoflurane on contractile properties of diaphragm. *Anesthesiol*; 70(4):684-688
- Wade JG, Stevens WC (1981) Isoflurane: An anesthetic for the eighties? *Anesth Analg*; 60(9):666-682
- Watt FM (1998) Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; 353(1370):831-837
- Weissman IL (2000) Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*; 287(5457):1442-1446
- Yin HL and Stossel TP (1979) Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium dependent regulatory protein. *Nature*; 281(5732):583-586
- Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG (2002) Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*; 416(6880):545-548
- Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, Giunti D, Cerravolo A, Cazzanti F, Frassoni F, Mancardi G, Uccelli A (2005) Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*; 106(5):1755-1761
- Zhang J, Li Y, Chen J, Cui Y, Lu M, Elias SB, Mitchell JB, Hammill L, Vanguri P, Chopp M (2005) Human bone marrow stromal cell treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. *Exp Neurol*; 195(1):16-26

- <http://www.immundefekt.de/cd.shtml> (2003) CD-Nomenklatur des Immun Defekt Centrum der Charité Berlin
- <http://www.nierenrechner.de/nierenrechner/GFR-Rechner.htm> (2006) GFR Rechner
- <http://www.vetpharm.uzh.ch/tak> (2011) Tierarzneimittel Kompendium der Schweiz

## **10 Publikationsverzeichnis**

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

### Originalartikel:

Brunswig-Spickenheier B, Boche J, Westenfelder C, Peimann F, Gruber AD, Jaquet K, Krause K, Zustin J, Zander AR, Lange C (2010)

„Limited immune-modulating activity of porcine mesenchymal stromal cells abolishes their protective efficacy in acute kidney injury”

Stem Cells and Development 19(5):719-729

In dieser Veröffentlichung stammen die Teile der Zellgewinnung, -isolation, -expansion und -charakterisierung sowie die Etablierung der Methode und der experimentelle Teil mit der Transplantation von autologen mesenchymalen Stromazellen von mir. Außerdem habe ich bei der Transplantation von allogenen mesenchymalen Stromazellen mitgearbeitet.

## **11 Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Achim D. Gruber, Ph.D., für die Überlassung des interessanten Themas und die umfassende, sachkundige Hilfe und Betreuung bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. B. Brunswig-Spickenheier bedanken für ihre unendliche Geduld, die tatkräftige und uneingeschränkte Unterstützung und die notwendigen „Denkanstöße“ in schweren Momenten.

Großer Dank gilt auch Frau Dr. C. Lange und ihrer Arbeitsgruppe für die herzliche Aufnahme in ihr Team, die tatkräftige Unterstützung vor allem in der Laborarbeit, die motivierende Betreuung und dafür, dass sie mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Bei meiner Mitdotorandin Frauke Peimann möchte ich mich für die hervorragende Zusammenarbeit während der Operationen und für den nötigen Spaß bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. Christiane Reichel-Saar und Herrn Dr. Ulrich Schmidt und dem gesamten Praxisteam bedanken, dass sie mir die nötige Zeit für die Fertigstellung dieser Doktorarbeit eingeräumt haben, mich immer tatkräftig unterstützt haben, für ihr Verständnis und ihre Geduld und für die wunderbare Zusammenarbeit in diesem Team.

Bei meiner Familie und meinen Freunden bedanke ich mich für ihr Verständnis, ihre Geduld und ihre großartige Unterstützung.

## **12 Selbständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Hamburg, den 09.12.2011

Janna Boche