

Aus  
der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie der Heinrich-  
Heine- Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Wolfram T. Knoefel

**Etablierung eines xenogenen Modells der warmen Leberischämie zur  
Untersuchung hepatisch-vaskulärer Adhäsion und Extravasation  
humaner CD133<sup>+</sup> Knochenmarkstammzellen unter dem Einfluss von  
Thrombozyten**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Iryna Pinchuk

2020

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. Schulte am Esch

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. med. Bode

Meinen Eltern, Igor und Elena

Meinem Bruder, Vladimir

## I. Zusammenfassung

**Hintergrund:** Klinische Erfahrungen und experimentellen Daten konnten durch die Applikation von hämatopoetischen CD133<sup>+</sup> Knochenmarkstammzellen (CD133<sup>+</sup> KMSZ) in die Blutbahn einen positiven Effekt auf das Regenerationspotential der Leber nach einer Leberteilerresektion zeigen. Die Hypothese dahinter besteht in der Annahme einer beschleunigten physiologischen Mobilisierung der KMSZ mit anschließender Ansiedlung in einer geschädigten Leber. Zusätzlich konnten mehrere Forschungsgruppen einen positiven Effekt von Thrombozyten auf die Mobilisation und Adhäsion von Entzündungs- und Stammzellen im Körperkreislauf demonstrieren.

**Ziele:** Um den Einfluss von Thrombozyten auf das *Homing* von humanen CD133<sup>+</sup> KMSZ beurteilen zu können, sollte zuerst ein Xenomodell einer isoliert perfundierten Rattenleber in Kombination mit *In situ Imaging* etabliert werden. Dies ist die Voraussetzung, um sowohl die Ansiedlung als auch die Extravasation der Stammzellen allein und nach der Inkubation mit Thrombozyten beurteilen zu können.

**Methoden:** Die Gewinnung der humanen CD133<sup>+</sup> KMSZ erfolgte durch Aufreinigung von Spenderknochenmark mittels *Magnetic-activated cell sorting (MACS)*. Währenddessen erfolgte gleichzeitig die Fluoreszenzmarkierung der KMSZ mit PKH67 Green, so dass diese während des Versuchs mittels *In situ Imaging* detektiert werden konnten. Die Thrombozyten wurden entsprechend dem Knochenmark vom gleichen Spender entnommen. Das Modell der isoliert perfundierten Rattenleber wurde als *Singel Pass System* an freipräparierten und *in situ* belassenen Lebern von männlichen Wista Ratten aufgebaut. Die 70%-Lebeteilerresektion wurde durch eine Ligatur der zuführenden Venen zum mittleren und linken Leberlappen imitiert. Der zeitliche Ablauf bestand aus einer 30-minütigen warmen Ischämie, zweistündiger Reperfusion und anschließender Injektion der KMSZ unter *In situ Imaging*. Anhand der Videoaufnahmen wurde die Position und Menge der KMSZ (intravasal oder parenchymal) dreimal alle 15 Minuten nach der Injektion evaluiert. Diese Beobachtungen erfolgten mit unbehandelten KMSZ und mit KMSZ, die mit Thrombozyten inkubiert wurden. Zusätzlich erfolgte die Beobachtung von unbehandelten KMSZ, die erst nach einer Injektion von Thrombozyten injiziert wurden. Nach den Perfusionsversuchen wurden die Rattenlebern kryokonserviert, um mittels Immunfluoreszenzfärbung und Konfokalmikroskopie CD133<sup>+</sup> KMSZ im Organ nachzuweisen.

**Ergebnisse:** Innerhalb der ersten 15 Minuten *post injectionem* konnten CD133<sup>+</sup> KMSZ sowohl intravasal als auch parenchymal nachgewiesen werden. Bezüglich der intravasalen Akkumulation der KMSZ zeigten sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Versuchsgruppen. Im Rahmen der CD133<sup>+</sup> KMSZ Extravasation konnte gezeigt werden, dass diese unter Thrombozyten-Vorlauf ( $p < 0,042$ ) und insbesondere Thrombozyten-Inkubation ( $p < 0,031$ ) signifikant erhöht war. Eine längere Perfusion über 15 Minuten veränderte die Extravasation nicht maßgeblich.

**Schlussfolgerung:** Sowohl ein Vorlauf, insbesondere aber die Inkubation mit Thrombozyten fördern in einem Xenomodelleiner isoliert perfundierten Rattenleber die frühe Extravasation von CD133<sup>+</sup> KMSZ. Mit Hilfe dieser Daten könnte die Anwendung von Thrombozyten gezielt zur Optimierung von therapeutischen Maßnahmen im Rahmen der Leberregeneration nach Leberteilresektionen eingesetzt werden.

## **Establishment of a xenogeneic model of warm hepatic ischaemia for the investigation of hepatic–vascular adhesion and extravasation of human CD133<sup>+</sup> bone marrow stem cells under the influence of platelets**

**Background:** Clinical experience and experimental data have shown that hepatic partial resection and haematopoietic CD133<sup>+</sup> bone marrow stem cell (CD133<sup>+</sup> BMSC) application to the bloodstream have a positive effect on liver regeneration. An accelerated physiological mobilisation of BMSCs with subsequent colonisation in a damaged liver is assumed to cause this effect. In addition, several research groups have shown a positive effect of platelets on the mobilisation and adhesion of inflammatory and stem cells in the systemic circulation.

**Aims:** To evaluate the impact of platelets on hepatic homing of human CD133<sup>+</sup> BMSCs, a xenogeneic model of an isolated perfused rat liver in combination with *in situ* imaging must be established. This is a prerequisite for the assessment of colonisation as well as extravasation of stem cells alone and after incubation with platelets.

**Methods:** Human CD133<sup>+</sup> BMSCs were purified from the donor bone marrow utilising magnetically activated cell sorting. During this process, fluorescence labelling of BMSCs with PKH67 Green was simultaneously performed; thus, BMSCs could be detected during the experiment via *in situ* imaging. Platelets and bone marrow were obtained from the same donor. The model of the isolated perfused rat liver was developed as a single-pass system on free prepared and *in situ* left livers of male Wistar rats; 70% partial resection was characterised by ligating the afferent veins to the middle and left lobes of the liver. The time course comprised 30-min warm ischaemia, 2-h reperfusion and subsequent injection of BMSCs using *in situ* imaging. Based on the video recordings, the position and amount of BMSCs (intravascular or parenchymal) were evaluated thrice every 15 min after the injection. These observations were made with untreated BMSCs and BMSCs incubated with platelets. Furthermore, untreated BMSCs, which were used after the injection of platelets, were assessed. After the perfusion experiments, the rat livers were cryopreserved for detecting CD133<sup>+</sup> BMSCs in the organ using immunofluorescent staining and confocal microscopy.

**Results:** Within the first 15 min of the injection, CD133<sup>+</sup> BMSCs could be detected in the intravascular space and parenchymal tissue. Regarding the intravascular accumulation of BMSCs, no significant differences were found among the experimental groups. The extravasation of CD133<sup>+</sup> BMSCs significantly increased in experiments with platelet forerun ( $p < 0.042$ ), particularly with platelet incubation ( $p < 0.031$ ). Prolonged perfusion for  $>15$  min did not significantly alter the extravasation.

**Conclusion:** Platelet forerun and, particularly, incubation with platelets promote early extravasation of CD133<sup>+</sup> BMSCs in a xenogeneic model of an isolated perfused rat liver. Using these data, thrombocytes could be targeted for use in the optimisation of therapeutic measures in the context of liver regeneration after liver resections.

## II. Abkürzungsverzeichnis

<b>%</b>	Prozent-Zeichen für Signifikanz $p \leq 0,05$
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>µm</b>	Mikrometer
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ACI</b>	Arteria carotis interna
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>AFP</b>	Alpha-1-Fetoprotein
<b>AK</b>	Antikörper
<b>aPTT</b>	partielle Thromboplastinzeit
<b>Aqua. dest</b>	destilliertes Wasser
<b>CA</b>	Karzinom
<b>chron.</b>	chronisch
<b>CK-18</b>	Cytokeratin-18
<b>CK-19</b>	Cytokeratin-19
<b>CRP</b>	C-reaktive Protein
<b>CXCR4</b>	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
<b>dl</b>	Deciliter
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EGF</b>	epidermal growth factor
<b>FBS</b>	<i>fetal bovine serum</i>
<b>FGF</b>	<i>fibroblast growth factor</i>
<b>g</b>	Gramm

<b>G-CSF</b>	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
<b>GF</b>	Gesichtsfeld
<b>GOT</b>	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
<b>GPT</b>	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
<b>HAV</b>	Hepatitis-A-Virus
<b>Hb</b>	Hämoglobin
<b>HGF</b>	<i>hepatozyt growth factor</i>
<b>HIF-1</b>	<i>hypoxia-inducible factor-1</i>
<b>Hkt</b>	Hämatokrit
<b>HMEC-1</b>	<i>human micro vasculature endothelial cells</i>
<b>hRL</b>	hinterer rechter Leberlappen
<b>HSZ</b>	hämatopoetische Stammzellen
<b>ICD</b>	Implantierbarer-Kardioverter-Defibrillator
<b>IL-6</b>	Interleukin-6
<b>INR</b>	<i>International Normalized Ratio</i>
<b>IPRL</b>	Isoliert perfundierte Rattenleber
<b>KHK</b>	koronare Herzkrankheit
<b>KHP</b>	Krebs-Henseleit Puffer
<b>KMSZ</b>	Knochenmarkstammzellen
<b>l</b>	Liter
<b>LL</b>	linker Leberlappen
<b>LPZ</b>	Leberprogenitorzellen
<b>LSEC</b>	<i>liver sinusoidal endothelial cells</i>

<b>mg</b>	Milligramm
<b>min</b>	Minuten
<b>MITTLW</b>	Mittelwert
<b>ML</b>	mittlerer Leberlappen
<b>mmHg</b>	Millimeter-Quecksilbersäule
<b>MMP</b>	Matrixmetalloprotease
<b>MSZ</b>	mesenchymale Stammzellen
<b>N</b>	Versuchsnummer
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	Ammoniumchlorid
<b>oOL</b>	oberer omentaler Leberlappen
<b>p</b>	Signifikanzniveau
<b>PAR-1</b>	Protease-aktivierter Rezeptor-1
<b>pAVK</b>	periphere arterielle Verschlusskrankheit
<b>PBS</b>	<i>phosphate-buffered saline</i>
<b>pCO<sub>2</sub></b>	Kohlendioxidpartialdruck
<b>PDGF</b>	<i>platelet-derived growth factor</i>
<b>PECAM-1</b>	<i>platelet and endothelial cell adhesion molecule 1</i>
<b>PMP</b>	<i>platelet-derived microparticles</i>
<b>pO<sub>2</sub></b>	Sauerstoffpartialdruck
<b>PP</b>	Perfusionsdruck
<b>PRP</b>	<i>platelet-rich plasma</i>
<b>PTAFR</b>	<i>platelet activating factor receptor</i>

<b>Q</b>	Quotient
<b>rez.</b>	rezidivierend
<b>s</b>	Sekunde
<b>s.</b>	siehe
<b>SCF</b>	<i>stem cell factor</i>
<b>SDF-1</b>	<i>stroma cell-derived factor-1</i>
<b>StABW</b>	Standardabweichung
<b>T</b>	Temperatur
<b>t</b>	Zeitpunkt
<b>Tbl.</b>	Tabelle
<b>TGF</b>	<i>transforming growth factor</i>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>transforming growth factor-beta</i>
<b>TNF</b>	<i>tumor necrosis factor</i>
<b>U</b>	Enzymaktivität
<b>uOL</b>	unterer omentaler Leberlappen
<b>VCI</b>	Vena cava inferior
<b>VEGF R2</b>	<i>vascular endothelial growth factor receptor 2</i>
<b>VEGF</b>	<i>vascular endothelial growth factor</i>
<b>VG</b>	Versuchsgruppe
<b>vRL</b>	vorderer rechter Leberlappen
<b>Z.n.</b>	Zustand nach
<b><math>\gamma</math>-GT</b>	gamma Glutamyl-transferase

### III. Inhaltsverzeichnis

I.	Zusammenfassung .....	I
II.	Abkürzungsverzeichnis.....	IV
III.	Inhaltsverzeichnis .....	VIII
IV.	Abbildungsverzeichnis.....	XII
V.	Tabellenverzeichnis .....	XIV
1	Einleitung .....	1
1.1	Klinische Grundlagen.....	1
1.2	Leber .....	2
1.2.1	Makroskopische Anatomie .....	2
1.2.2	Mikroskopische Anatomie .....	3
1.3	Regenerationspotential der Leber .....	4
1.3.1	Hepatozyten .....	5
1.3.2	Stammzellen der Leber .....	5
1.4	Stammzellen.....	6
1.4.1	Hämatopoetische Stammzellen.....	7
1.4.1.1	CD34 .....	8
1.4.1.2	CD45 .....	9
1.4.1.3	CD133 .....	9
1.5	Leberregeneration durch Knochenmarkstammzellen .....	10
1.6	<i>Homing</i> von extrahepatischen Stammzellen .....	11
1.6.1	Mobilisierung hämatopoetischer Knochenmarkstammzellen zur Leber ..	12
1.6.2	Interaktion von Knochenmarkstammzellen und Endothel.....	12
1.7	Thrombozyten .....	13
1.7.1	Thrombozytenaktivierung.....	14
1.7.2	Einfluss der Thrombozyten auf die Leberregeneration .....	15
1.8	Interaktion Stammzellen und Thrombozyten.....	16

1.9	Makroskopie der Rattenleber .....	17
2	Ziel der Arbeit .....	18
3	Material.....	19
3.1	Verbrauchsmaterial .....	19
3.2	Chemikalien und Fertigpuffer .....	20
3.3	Lactatherstellung für Krebs-Henseleit Puffer .....	22
3.4	Herstellung von Krebs-Henseleit Puffer .....	22
3.5	Kits und Reagenzien .....	23
3.6	Antikörper (FACS-Analyse) .....	23
3.7	Antikörper (Immunfluoreszenzfärbungen) .....	24
3.8	Medikamente.....	24
3.9	Präparationsbesteck.....	25
3.10	Geräte .....	25
3.11	PC-Programme .....	26
3.12	Versuchstiere.....	27
3.13	Genehmigung des Tierversuchsprojektes .....	27
3.14	Patientenkollektiv.....	27
4	Methoden.....	30
4.1	Isolierung von CD133 <sup>+</sup> KMSZ und Fluoreszenzmarkierung mit PKH67 Green .....	30
4.1.1	Phasentrennung des Knochenmarkaspirats.....	31
4.1.2	Lyse der Erythrozyten.....	31
4.1.3	Zellzählung .....	31
4.1.4	Fluoreszenzmarkierung mit PKH67 Green.....	32
4.1.5	Magnetisches Labeling .....	32
4.1.6	Magnetische Zellseparation .....	33
4.2	Fluorescence Activated Cell Sorting.....	33

4.2.1	Grundprinzip .....	34
4.2.2	Prinzip des <i>Cellsorting</i> .....	35
4.2.3	FACS-Färbung.....	36
4.3	Isolierung von humanem plättchenreichem Plasma (PRP).....	37
4.4	Bestimmung der Thrombozytenanzahl des PRP .....	37
4.5	Xenomodell der isoliert perfundierten Rattenleber.....	38
4.5.1	Versuchsvorbereitungen und Sensorkalibrierung.....	38
4.5.2	Versuchsaufbau des <i>Single Pass Systems</i> .....	39
4.5.3	Zeitlicher Ablauf der Versuche.....	41
4.5.4	Festlegung der Versuchsgruppen.....	42
4.5.5	Rattenpräparation.....	43
4.5.6	In situ Imaging .....	47
4.6	Detektion von CD133 <sup>+</sup> KMSZ in der explantierten Rattenleber .....	48
4.6.1	Gewebeentnahme mit Kryokonservierung und Herstellung der Kryoschnitte .....	48
4.6.2	Immunfluoreszenzfärbung mit CD45 und DAPI.....	49
4.6.3	Immunfluoreszenzfärbung mit NTCP 22, CD45 und RECA 1 .....	50
4.6.4	Konfokalmikroskopie .....	51
4.7	Statistische Auswertung .....	51
5	Ergebnisse.....	52
5.1	Laborparameter der CD133 <sup>+</sup> KMSZ-Spender.....	52
5.1.1	Patientenalter .....	52
5.1.2	CRP, Kreatinin, GFR und Harnstoff.....	52
5.1.3	GOT, GPT, $\gamma$ -GT und Thrombozyten.....	53
5.1.4	Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin und Hämatokrit. ....	53
5.1.5	Quick, aPTT, INR.....	54
5.2	FACS-Analyse .....	54

5.3	Analyse der Perfusionsparameter.....	56
5.3.1	pH-Wert .....	56
5.3.2	pO <sub>2</sub> .....	57
5.3.3	pCO <sub>2</sub> .....	58
5.3.4	Perfusionsdruck .....	59
5.3.5	Temperatur.....	60
5.4	Messung des Gallenflusses .....	61
5.5	Analyse der <i>In situ Imaging</i> Daten.....	61
5.5.1	Bestimmung der Menge und Position von CD133 <sup>+</sup> KMSZ .....	62
5.5.2	Bestimmung der Akkumulation von CD133 <sup>+</sup> KMSZ.....	64
5.5.3	Bestimmung der Zeitpunkt-, Versuchs- und relativen Extravasationsquotienten.....	66
5.5.4	Bestimmung der absoluten parenchymalen Anzahl der CD133 <sup>+</sup> KMSZ .	72
5.6	Detektion von CD133 <sup>+</sup> KMSZ nach dem Perfusionsversuch .....	75
6	Diskussion .....	77
6.1	Etablierung eines funktionierenden IPRL Modells.....	77
6.2	Nachweis von CD133 <sup>+</sup> KMSZ in einer geschädigten Rattenleber .....	83
6.3	Thrombozyten fördern die Akkumulation von CD133 <sup>+</sup> KMSZ in einer geschädigten Rattenleber .....	86
6.4	Thrombozyten fördern die Extravasation von CD133 <sup>+</sup> KMSZ in einer geschädigten Rattenleber .....	90
7	Schlussfolgerung und Ausblick.....	95
VI.	Literaturverzeichnis .....	96
VII.	Danksagung .....	107

## IV. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des Leberparenchyms. ....	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Hämatopoese.....	8
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Rattenleber. ....	17
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Durchflusszytometrie und durchflusszytometrischen Zellsortierung.....	35
Abbildung 5: Versuchsaufbau des IPRL-Modells. ....	40
Abbildung 6: Zeitlicher Versuchsablauf.....	42
Abbildung 7: Xenomodell der IPRL.....	45
Abbildung 8: Nahaufnahme der perfundierten Rattenleber.....	46
Abbildung 9: Schematische Darstellung der 70 % Ligatur der Rattenleber.....	47
Abbildung 10: Darstellung des Ziellappens für die Kameraaufnahmen.....	48
Abbildung 11: Ungefärbte Probe.....	55
Abbildung 12: Gefärbte Probe. ....	55
Abbildung 13: Isotypenkontrolle.....	56
Abbildung 14: pH-Parameter.....	57
Abbildung 15: pO <sub>2</sub> -Parameter.. ....	58
Abbildung 16: pCO <sub>2</sub> -Parameter.....	59
Abbildung 17: Perfusionsdruck. ....	60
Abbildung 18: Temperatur.....	60
Abbildung 19: In situ Imaging einer beispielhaften GF-Aufnahme. ....	62
Abbildung 20: Gesamtzellmenge der VG 1.....	63
Abbildung 21: Gesamtzellmenge der VG 2.....	63
Abbildung 22: Gesamtzellmenge der VG 3.....	64
Abbildung 23: Bestimmung der durchschnittlichen Gesamtzellmenge.. ....	66
Abbildung 24: Durchschnittlicher relativer Extravasationsquotient der VG 1.....	68
Abbildung 25: Durchschnittlicher relativer Extravasationsquotient der VG 2.....	69
Abbildung 26: Vergleich der relativen Extravasationsquotienten.. ....	69
Abbildung 27: Durchschnittlicher relativer Extravasationsquotient der VG 3.....	70
Abbildung 28: Durchschnittliche relative Extravasationsquotienten. ....	70
Abbildung 29: Durchschnittliche relative Extravasationsquotienten.. ....	71
Abbildung 30: Vergleich der mittleren Versuchsquotienten der VG. ....	72
Abbildung 31: Absolute parenchymale Zellanzahl der VG 1.....	73

Abbildung 32: Absolute parenchymale Zellanzahl der VG 2.....	73
Abbildung 33: Vergleich der absoluten parenchymalen Zellanzahl der VG 1 und 2.....	74
Abbildung 34: Absolute parenchymale Zellanzahl der VG 3.....	74
Abbildung 35: Vergleich der absoluten parenchymalen Zellanzahl der VG 1 und 3.....	75
Abbildung 36: Konfokalmikroskopie der Rattenleber nach Doppelimmunfluoreszenzfärbung. ....	76
Abbildung 37: GF-Aufnahme von KMSZ im Leberparenchym.. ....	84
Abbildung 38: Relative Extravasationsquotienten der drei Versuchsgruppen.. ....	91
Abbildung 39: Absolute parenchymale CD133 <sup>+</sup> KMSZ-Anzahl zum Zeitpunkt t15.....	91

## V. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien der Stammlösung.....	22
Tabelle 2: Primärantikörper.....	24
Tabelle 3: Sekundärantikörper.....	24
Tabelle 4: Zusammenstellung von klinischen und operativen Daten von Knochenmarkspendern.....	29
Tabelle 5: FACS Antikörper.....	36
Tabelle 6: FACS Isotyp-Antikörper.....	36
Tabelle 7: Thrombozytenanzahl der jeweiligen Versuchsnummer.....	38
Tabelle 8: Darstellung der Primär- und Sekundärantikörper.....	50
Tabelle 9: Patientenalter.....	52
Tabelle 10: CRP, Kreatinin, GFR und Harnstoff.....	52
Tabelle 11: GOT, GPT, $\gamma$ -GT, Thrombozyten.....	53
Tabelle 12: Leukozyten, Erythrozyten, Hb, Hkt.....	53
Tabelle 13: Quick, aPTT, INR.....	54
Tabelle 14: Gallenmenge.....	61
Tabelle 15: Zeitpunkt- und Versuchsquotient.....	67
Tabelle 16: Relativer Extravasationsquotient.....	68
Tabelle 17: Analyse der Versuchsquotienten.....	71

## 1 Einleitung

### 1.1 Klinische Grundlagen

Die Forschungsgruppen Schule am Esch et al. sowie Furst et al. konnten im Rahmen ihrer klinischen Studien zeigen, dass das Regenerationspotential der Leber nach einer Rechtsresektion durch die Kombination aus portal-venöser Embolisation und Applikation von autologen CD 133<sup>+</sup> Knochenmarkstammzellen (CD133<sup>+</sup> KMSZ) effektiv gefördert werden kann und somit zur Steigerung der Proliferation von verbliebenem Lebergewebe führt. Diese Methode ist insbesondere für Patienten, mit bestehender Leberinsuffizienz und hieraus resultierender Inoperabilität, von großer Bedeutung und könnte in Zukunft die kurativen Ansätze bei Leberteilesektionen erweitern.

Die häufigsten Indikationen für eine Leberteilesektion sind primäre und sekundäre Tumore der Leber. Während bei den primären Tumoren das hepatozelluläre Karzinom (HCC) mit 80% den größten Anteil ausmacht, handelt es sich bei den sekundären Tumoren am häufigsten um Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms. Nach den S3-Leitlinien von Mai 2013 zur „Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms“ sind chronische Infektionen mit Hepatitis B, C sowie Alkoholkonsum und nicht-alkoholische Lebererkrankung bei metabolischem Syndrom und Diabetes mellitus dafür verantwortlich, dass die Inzidenz für das HCC steigt. Somit werden mögliche Behandlungsalternativen in der Zukunft von großer Bedeutung sein (Federmann, 2013).

Bisherige Therapieempfehlungen der S3-Leitlinie bestehen in einer R0-Resektion des Karzinoms. Zu den Kriterien einer Nicht-Resektabilität zählen nicht-resektabel extrahepatische Tumormanifestation, Tumorbefall aller drei Lebervenen, das Fehlen funktioneller Reserven und allgemeine Inoperabilität bedingt durch Vorerkrankungen des Patienten. Bei Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms wird eine Leberteilesektion und bei anfänglich bestehender Nicht-Operabilität eine neoadjuvante Therapie empfohlen. Häufig stellt sich der leitliniengerechten Tumorentfernung die Problematik einer späten Diagnose entgegen, die eine erweiterte Leberresektion notwendig macht. Hierbei besteht die Gefahr, dass Patienten wegen nicht ausreichender funktioneller Reserven als nicht operabel gelten. Der verbleibende Leberanteil, auch als FVLR (*future liver remnant volume*) genannt sollte 25% des ursprünglichen Lebervolumens (Truant et al., 2007) oder mindestens 0,5% des Körpergewichts (Schindl et al., 2005) betragen. Um

das Lebervolumen zu erhöhen wurde eine Methode des zweizeitigen Vorgehens etabliert, bei der eine portale Venenembolisation (PVE) der Resektion vorausgeht. Durch den Verschluss der später zu resezierenden Segmente kommt es zu einem Wachstumsstimulus in dem nach der Resektion weiterhin perfundiertem Leberrestgewebe. Nach Broering et al. beträgt der Zeitraum zwischen PVE und dem Erreichen eines ausreichenden Lebervolumens ca. 150 Tage. Dieser Zeitabstand könnte bei schnell wachsenden und aggressiven Tumoren dennoch nicht ausreichend sein, um anschließend den kurativ chirurgischen Eingriff durchführen zu können (Broering et al., 2002).

## 1.2 Leber

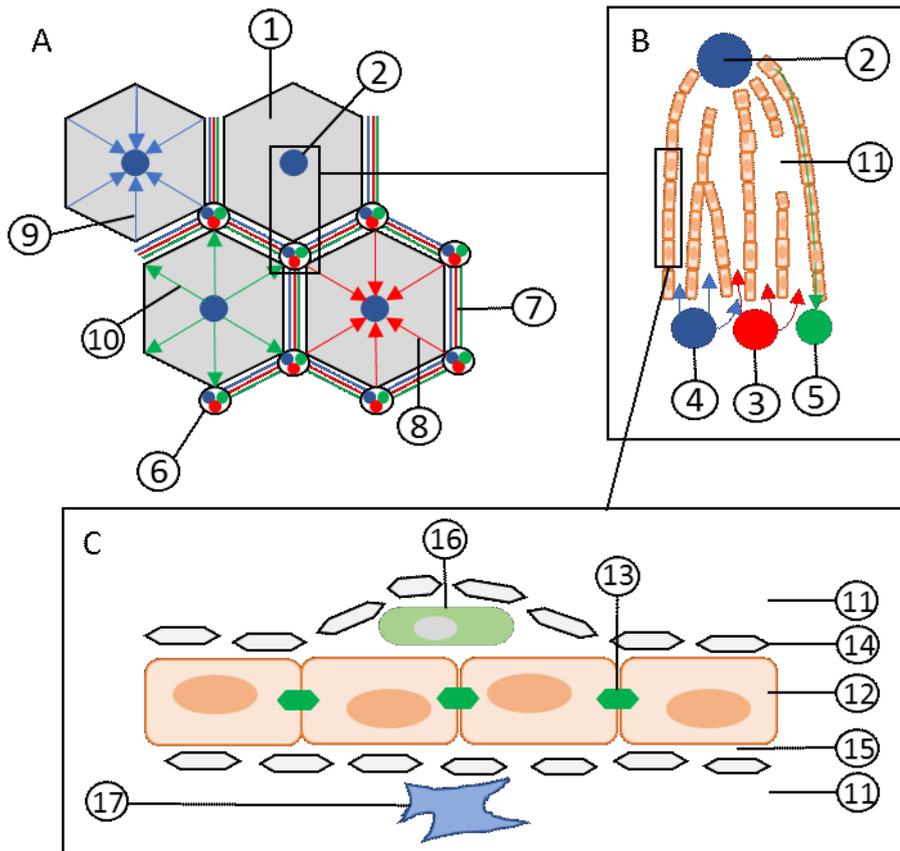
### 1.2.1 Makroskopische Anatomie

Die Leber ist mit ca. 1500 g die größte Drüse des menschlichen Körpers. Als zentrales Stoffwechselorgan verarbeitet sie die vom Verdauungstrakt aufgenommenen Nährstoffe weiter und spielt eine entscheidende Rolle bei der Entgiftung. Durch ihre Synthese- und Metabolisierungsfunktion hat sie einen großen Einfluss auf den Kohlenhydrat-, Protein- und Lipidstoffwechsel. Zusätzlich ist sie für die Synthese von Gerinnungsfaktoren, Albumin, Gallensäure und diversen Plasmaproteinen der humoralen Immunabwehr verantwortlich. Die Leber befindet sich im rechten Oberbauch unterhalb des Zwerchfells und ist atemverschieblich. Die Blutversorgung erfolgt über zwei Zugänge: einerseits über die Arteria hepatica propria (Vasa privata) die aus dem Truncus coeliacus entspringt und sauerstoffreiches Blut transportiert und andererseits über die Vena portae (Vasa publica), die nährstoffreiches Blut aus dem Magen-Darm-Trakt transportiert. Obwohl die Angaben über die genauen Anteile der Blutversorgung in der Literatur schwanken, ist allen gemein, dass die Vena portae den größten Anteil mit ca. 60-85 % übernimmt. Der venöse Abfluss erfolgt über die drei Lebervenen - Vena hepatica dextra, media und sinistra, die in die Vena cava inferior münden (Aumüller et al., 2017). Die Aufteilung der Leber in einen rechten und linken Leberlappen erfolgt über eine gedachte Linie von Rex-Cantlie, die an der Rückseite der Leber zwischen der Gallenblase und der Vena cava inferior verläuft. Die innere Gliederung wurde 1957 von Couinad veröffentlicht und teilt das Organ in 8 Lebersegmente. Diese Einteilung ist charakterisiert durch die separate Versorgung jedes Lebersegments durch jeweils eine Leitungsbahn-Trias bestehend aus einem Ast der Arteria hepatica propria, der Vena portae und einem Gallengang. Die Segmente I-IV

bilden den linken und die Segmente V-VIII den rechten Leberlappen. Das Verhältnis des rechten zum linken Leberlappen beträgt ca. 1,5-2 zu 1 (Aumüller et al., 2017).

### **1.2.2 Mikroskopische Anatomie**

Das Parenchym der Leber wird in ca. 1-1,5 Millionen Lobuli hepatici (Leberläppchen) unterteilt (Abbildung (Abb.) 1 A). Ein Leberläppchen hat die Form einer sechseckigen Säule und besteht aus Hepatozyten, *liver sinusoidal endothelial cells* (LSEC), Ito-, Kupffer- und dendritischen Zellen. Da Hepatozyten für die Stoffwechselfunktion der Leber verantwortlich sind, bilden sie mit ca. 80% den größten Zellanteil. Im Randbereich der Lobuli befinden sich die Periportalfelder, die aus jeweils einem Endast der A. hepatica, V. portae und intrahepatischem Gallengang bestehen und als Glisson'sche Trias bezeichnet werden. Jedes Leberläppchen wird von speichenförmigen Sinusoiden durchzogen, die anschließend in der mittig gelegenen Zentralvene (V. centralis) münden. In den Sinusoiden (Abb. 1 B) vermischt sich das Blut aus den Ästen der A. hepatica und V. portae. Die LSEC (Abb. 1 C) kleiden die Sinusoide aus und unterscheiden sich von anderen Endothelzellen durch das Fehlen einer Basalmembran. Somit entsteht eine permeable Barriere mit einer Porengröße von ca. 100nm (Wisse et al., 1985). Auf diese Weise wird die Diffusion von Plasmabestandteilen, jedoch nicht von Blutzellen, in den Disse-Raum zwischen Hepatozyten und Endothel ermöglicht, so dass ein Austausch zwischen Blut und Hepatozyten stattfinden kann. In den Sinusoiden befinden sich noch weitere Zellen wie z.B. Kupfferzellen, die als Makrophagen dem Phagozyten-System angehören, und Ito-Zellen, die als Fett- und Vitamin-A-Speicherzellen fungieren. Die im Leberläppchen von innen nach außen transportierte Gallenflüssigkeit mündet in den Kanal von Hering, der als Zwischenstück die Gallenkanälchen mit den interlobulären Gallengängen (Ducti biliferi interlobulares) verbindet (Lüllmann-Rauch, 2006; Welsch, 2006).



**Abbildung 1: Aufbau des Leberparenchyms (mod. nach Lüllmann-Rauch, 2006).** (A) und (B) zeigen die Darstellung eines Leberläppchens (1), Zentralvene (2), Endast der Arteria hepatica (3), Vena portae (4), interlobulärer Gallengang (5), Glisson'sche Trias (6), periportale Felder (7). Während das arterielle (8) und venöse (9) Blut in den Sinusoiden (11) zur Zentralvene fließt, verläuft der Gallenfluss (10) von der Zentralvene in die Läppchenperipherie. (C) zeigt die Anordnung der Hepatozyten (12) in den Sinusoiden (11). Gallenkanälchen (13). Endothel (14) Disse-Raum (15), Ito-Zellen (16), Kupffer-Zellen (17).

### 1.3 Regenerationspotential der Leber

Die Leber ist ein Organ mit ausgeprägtem Regenerationspotential, um auf unterschiedliche Arten von Schädigungen, die zellulären Untergang erzeugen, zu reagieren. Dieser Prozess ist mehrdimensional und wird durch humorale Interaktion der beteiligten intrahepatischen Zellen modelliert (Brulport et al., 2007), sowie durch unterschiedliche Mediatoren wie Zytokine, Hormone und Wachstumsfaktoren beeinflusst (Borowiak et al., 2004; Fausto et al., 2006). Riehle et al. berichten, dass die Leber diverse geweberegeneratorische Zellpopulationen, z.B. Hepatozyten und intrahepatische Leberprogenitorzellen (LPZ) besitzt.

---

### 1.3.1 Hepatozyten

Adulte Hepatozyten befinden sich normalerweise im Ruhezustand der Zellteilung (G<sub>0</sub>-Phase) und proliferieren überwiegend zur physiologischen Gewebeerneuerung. Bei Auftreten von geringem Gewebeschaden durch Toxine, virale Infektionen oder chirurgische Eingriffe beginnen die Hepatozyten vermehrt zu proliferieren, um den Gewebeverlust zu regenerieren (Riehle et al., 2011). Auch im häufig genutzten Leberschädigungs-Modell nach 2/3 Leberteilresektion ist eine Mehrzahl an unterschiedlichen Mediatoren und Signalkaskaden der Leberregenerationsprozesse entdeckt worden. Dabei beinhaltet der multimodale Prozess der Regeneration zwei Hauptschritte (Fausto and Campbell, 2003). Der erste Schritt, das *Priming*, ist ein Vorgang bei dem Hepatozyten für Wachstumsstimuli sensibilisiert und Transkriptionssignalwege initiiert werden. Dies erfolgt z.B. durch den *tumor necrosis factor* (TNF) (Yamada et al., 1997) oder Interleukin-6 (IL-6) (Cressman et al., 1995). Der zweite Schritt ist die Überführung der Hepatozyten in die G<sub>1</sub>-Phase zur Proliferation. Dies erfolgt durch Wachstumsfaktoren wie z.B. *epidermal growth factor* (EGF) (Francavilla et al., 1986; Raper et al., 1987) oder den *hepatozyt growth factor* (HGF), der die Proliferationsfähigkeit der Hepatozyten erhöht (Borowiak et al., 2004). EGF und HGF besitzen unter anderem das Potential, sich gegenseitig im Falle eines Faktorverlust zu kompensieren (Factor et al., 2010). Somit kann man adulte Hepatozyten als unipotente Stammzellen bezeichnen, die als erstes auf den Schaden reagieren (Riehle et al., 2011; Zhang et al., 2003).

### 1.3.2 Stammzellen der Leber

Ist die Proliferation durch Hepatozyten nicht ausreichen gewährleistet, kommt es zusätzlich zur Aktivierung von intrahepatischen Progenitorzellen (LPZ). Auf Grund von deutlich unterschiedlicher Anatomie bezeichnet man diese Zellen im murinen System als *oval cells* und im humanen System als *liver progenitor cells* (Roskams et al., 2004). Diese Zellpopulation befindet sich im Ruhezustand im Kanal von Hering oder in direktem Kontakt zu diesem, wo sie für regulatorische Signale zur Regeneration zugänglich sind (Sawitza et al., 2009). Die Vorläuferzellen werden als bipotente Stammzellen bezeichnet, weil sie das Potential zur Differenzierung in zwei unterschiedliche hepatische Zelllinien besitzen, die entweder Expressionsmarker von Cholangiozyten besitzen oder sich zu Albumin- und Alpha-feto-Protein- (AFP) produzierenden Hepatozyten entwickeln (Wang et al., 2003; Wang, 2003). Zusätzlich gibt es weitere Zelltypen und potenzielle

---

Stammzellnischen, die an der Leberregeneration beteiligt sind: peribiliäre Hepatozyten, intralobuläre Gallenwege und periduktuläre mononukleäre Zellen (Kuwahara et al., 2008). Weitere Forschungsarbeiten präsentierten hepatische Sternzellen als mögliche LPZ, die im Disse-Raum lokalisiert sind. Sie exprimieren den Stammzellmarker CD133 und den parakrinen Stammzell-Lockstoff *stroma-cell-derived-factor-1* (SDF-1) (Sawitza et al., 2009). Yang et al. stellten fest, dass durch einen Leberschaden aktivierte Sternzellen zu *oval cells* differenzierten und anschließend an der Proliferation des intrahepatischen Gangsystems beteiligen (Yang et al., 2008). Die Stammzellnischen beinhalten neben den LPZ weitere Zellgruppen wie Angioblasten, CD133<sup>+</sup> und CD117<sup>+</sup> Zellen, die gleichzeitig *vascular endothelial growth factor receptor 2* (VEGF R2) exprimieren. Sie sorgen dafür das LPZ ihr Regenerationspotential im Ruhezustand beibehalten oder stimulieren sie zur Proliferation. Weitere Zellarten, wie endotheliale und hepatische Sternzellen, unterstützen die Differenzierung der LPZ nicht nur in Hepatozyten, sondern auch in Zelllinien des biliären Systems (Wang et al., 2010). Eine Mehrzahl von autokrinen und parakrinen Mediatoren sorgen für die Steuerung und Aktivierung der LPZ wie z.B. IL-6, TNF $\alpha$ , SDF-1, die unter anderem auch adulte Hepatozyten zur Proliferation stimulieren. Einige dieser parakrinen Faktoren, wie HGF, *fibroblasten growth factor* (FGF) oder *transforming growth factor* (TGF), werden von benachbarten mesenchymalen Zellen freigesetzt (Duncan et al., 2009; Erker and Grompe, 2007). Diese Erkenntnisse verdeutlichen, dass die Zellumgebung und extrazelluläre Matrix für die Funktionsfähigkeit der LPZ wichtig sind (Van Hul et al., 2009).

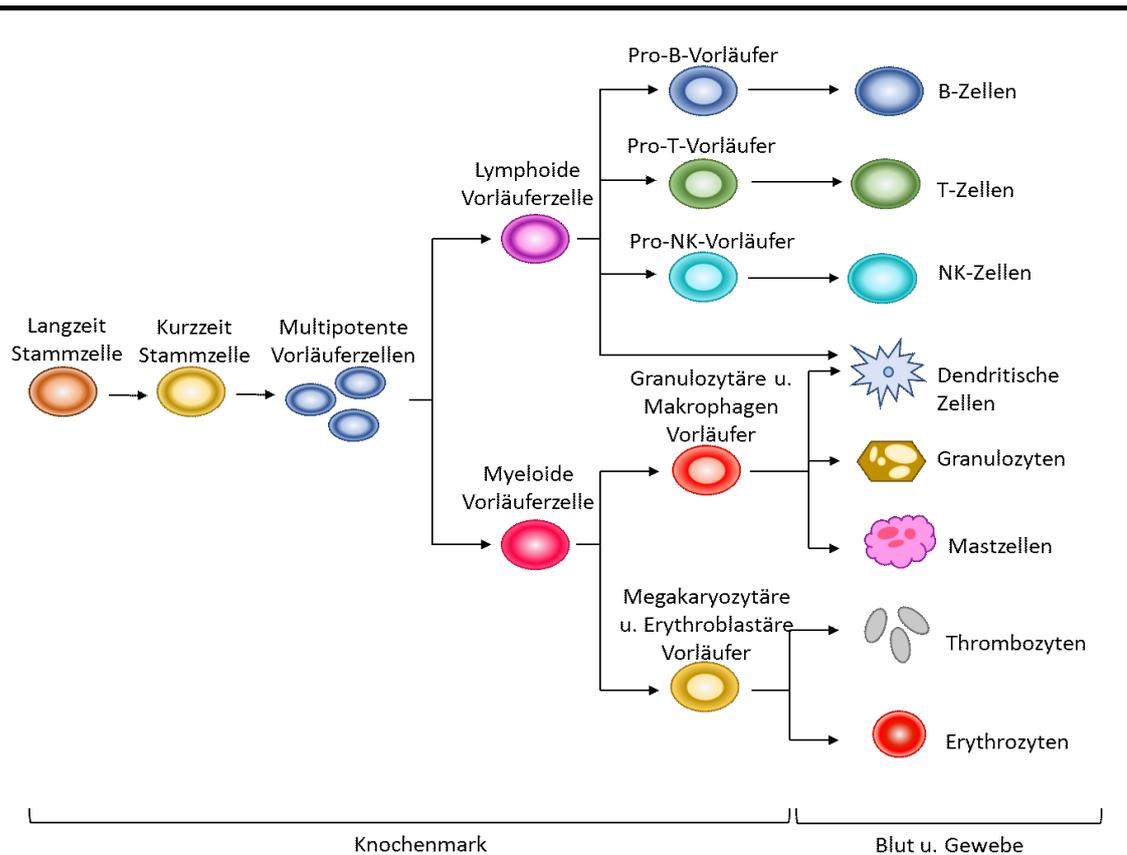
### 1.4 Stammzellen

Stammzellen sind Körperzellen die *clon*-bildend sind und somit das Potenzial haben zur Selbsterneuerung (*self-renewal*). Sie zeigen ein langes Proliferationsverhalten und sind in der Lage sich in unterschiedliche Zelllinien zu differenzieren. Bei der mitotischen Zellteilung einer Stammzelle gehen zwei Tochterzellen hervor, die ungleich sind. Dieser Vorgang wird als asymmetrische Teilung bezeichnet. Eine Tochterzelle behält alle Eigenschaften der Mutterzelle und die andere Tochterzelle (Progenitorzelle) verliert, die Selbsterneuerungsfähigkeit und kann sich weiterdifferenzieren. Stammzellen werden nach ihrem ontogenetischen Alter und ihrem Differenzierungspotential eingeteilt. Totipotente Stammzellen besitzen das Potential, sich in alle Gewebearten zu

differenzieren und finden sich in der befruchteten Eizelle bis zum Achtzellstadium. Ab dem Blastozystenstadium gelten die Stammzellen als pluripotent und werden als embryonale Stammzellen bezeichnet, die das Potenzial besitzen sich zu primitiven Keimstammzellen sowie somatischen Stamm- und Progenitorzellen zu differenzieren. Adulte Stammzellen lassen sich postnatal in nahezu allen Geweben des Organismus nachweisen. Sie können sich zu verschiedenen Zelltypen einer Zelllinie differenzieren und werden somit als multipotent bezeichnet. Adulte Stammzellen werden in hämatopoetische, mesenchymale, epitheliale und endotheliale Stammzellen unterteilt (Lüllmann-Rauch, 2006).

### **1.4.1 Hämatopoetische Stammzellen**

Da reife Blutzellen nur eine begrenzte Lebensdauer von ein paar Tagen bis Monaten besitzen, müssen sie ständig neu gebildet werden. Dieser Vorgang wird als Hämatopoese bezeichnet und hat ihren Ursprung in der Zellpopulation von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Die erste Blutzellbildung beginnt im Embryonalstadium im Dottersack und Körperstiel (mesoblastische Phase), wird von der Leber und Milz (hepatolienale Phase) übernommen und erfolgt anschließend im Knochenmark (medulläre Phase). Beim Erwachsenen erfolgt die Hämatopoese im roten Knochenmark von bestimmten Knochen z.B. Wirbel, Rippen, Ileum oder Sternum. Die weitere Ausreifung der Blutzellen findet sowohl im Knochenmark, als auch im Falle der Lymphozyten in der Milz und Thymus statt. In der multipotenten Stammzellpopulation (Abb. 2) wird unterschieden zwischen Kurzzeit- und Langzeitstammzellen. Während die Langzeitstammzellen in der  $G_0$ -Phase verweilen, differenzieren sich die Kurzzeitstammzellen zu multipotenten Progenitorzellen. Diese oligopotente Progenitorzellen unterteilt man in myeloischen und lymphatischen Vorläuferzellen, aus denen sich in weiteren Ausreifungsschritten alle Zellreihen entwickeln: myeloische und lymphatische Hämatopoese. Die folgende Differenzierung im Gewebe und Blut führt schließlich zur Bildung von Erythrozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, Thrombozyten sowie T-, B- und NK-Zellen des lymphatischen Systems (Lüllmann-Rauch, 2006).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Hämatopoese (mod. nach Lüllmann-Rauch, 2006).** Dargestellt ist ein vereinfachtes Modell der Hämatopoese: ausgehend von Langzeitstammzelle (links) differenzieren sich schrittweise unterschiedliche Blutzellen (rechts). Dieser Prozess beginnt im Knochenmark und endet im Blut oder den peripheren Geweben (z.B. lymphatisches Gewebe).

Stamm- und Vorläuferzellen lassen sich an Hand von verschiedenen Zelloberflächenmolekülen voneinander unterscheiden. Diese sind im Cluster of Differentiation (CD) aufgelistet und nach funktionellen und biochemischen Kriterien geordnet (Lüllmann-Rauch, 2006).

Diese Arbeit befasst sich insbesondere mit hämatopoetischen Stammzellen, die durch folgende Oberflächenmarker charakterisiert werden: CD34, CD45, CD133.

#### 1.4.1.1 CD34

CD34 wurde erstmals 1981 auf der Zelloberfläche humaner hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen nachgewiesen. Es handelt sich hierbei um ein membranständiges Glykoprotein vom Typ 1 mit einem Gewicht von ca. 105kDa (Civin et al., 1981). Die Expression des Oberflächenmarkers hängt von dem Differenzierungsgrad ab. Es wurde festgestellt, dass unreife Stammzellen eine sehr geringe, wohingegen reife Stamm- und Vorläuferzellen eine stark positive Markerexprimierung aufweisen (Krause et al., 1994). Je weiter sich Stammzellen wiederum differenzieren, umso mehr nimmt die

---

Markerexpression ab und ist auf reifen hämatopoetischen Zellen nicht mehr nachweisbar. Obwohl manche Forschungsgruppen davon ausgehen, dass das Antigen eine signifikante Rolle in der Zellmigration und -adhäsion spielt (Sutherland and Keating, 1992), ist seine genaue Funktion weiterhin unbekannt.

### **1.4.1.2 CD45**

CD45, auch als *leucozyte common antigen* bezeichnet, ist ein transmembranes Typ-1 Glykoprotein, das die Funktion einer Protein-Tyrosinphosphatase erfüllt. Es wird auf allen kernhaltigen Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert und ist damit auf allen Leukozyten, unreifen Erythrozyten und Thrombozyten nachweisbar (Holmes, 2006). Das Substrat der Tyrosinphosphatase sind zytosolische Kinasen der Src-Familie, die eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Transduktion von T- und B-Zellrezeptoren spielen, sowie die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen beeinflussen (Irie-Sasaki et al., 2001).

### **1.4.1.3 CD133**

CD133 ist ein Membranglykoprotein bestehend aus 5 transmembranösen Domänen mit einem Gewicht von 120kDA (Miraglia et al., 1997). Es wird im murinen System unter anderem als Promini-1 bezeichnet (Snippert et al., 2009) und wurde zum ersten Mal 1997 auf einer Teilpopulation von CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen des humanen Knochenmarks nachgewiesen (Yin et al., 1997). Das CD133 Antigen wird nicht nur von hämatopoetischen Zellen exprimiert, sondern lässt sich auch auf diversen anderen Gewebearten wie z.B. der fetalen Leber (Chen et al., 2013), dem adulten Pankreas (Lardon et al., 2008) oder adulten Nieren (Bussolati et al., 2005) nachweisen. Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass nicht nur benigne Zellen, sondern auch eine Reihe von Malignomen wie das hepatozelluläre Karzinom, das Kolorektale Karzinom oder neuronale Tumore das Antigen exprimieren (Mizrak et al., 2008). Somit ist die Aussage über die Dignität einer Zelle durch die alleinige Expression von CD133 nicht eindeutig möglich (Shmelkov et al., 2005). Das Antigen ist ein verlässlicher Marker bei der Isolation von hämatopoetischen und endothelialen Vorläuferzellen (Shmelkov et al., 2005), seine genaue Funktion bleibt weiterhin unbekannt.

---

## 1.5 Leberregeneration durch Knochenmarkstammzellen

Die im Knochenmark lokalisierten hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen sind in erster Linie für die Erhaltung der Zellpopulationen im hämatopoetischen System verantwortlich. Dennoch haben Untersuchungen gezeigt, dass Knochenmarkstammzellen das Potential besitzen sich sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* in andere Zelllinien zu differenzieren, wie z.B. Herzmuskelzellen (Orlic et al., 2003), Skelettmuskulatur (LaBarge and Blau, 2002) oder endokrine Zellen des Pankreas (Lee and Stoffel, 2003).

Bereits im pränatalen Zustand ist die Leber an der Hämatopoese beteiligt, so dass es naheliegend war, zu vermuten, dass auch adulte hämatopoetische Stammzellen in der Lage sind, sich in hepatische Zelllinien wie Hepatozyten oder Cholangiozyten zu differenzieren. Die ersten Ergebnisse hierzu zeigten unter anderem die Forschungsgruppe um Theise et al.: nach einer Myeloablation bei weiblichen Mäusen erfolgte anschließend eine Knochenmarkapplikation von männlichen Mäusespendern. Im Nachhinein konnten Y-Chromosomen-positive Hepatozyten in den weiblichen Mäusen nachgewiesen werden (Theise et al., 2000). Andere Arbeitsgruppen konnten im Schafmodell pluripotente somatische Stammzellen aus Nabelschnurblut entnehmen und anschließend zu Albuminproduzierenden hepatischen Zellen differenzieren (Sensken et al., 2007). Der Nachweis von Y-Chromosomen-positiven Hepatozyten konnte auch im humanen Modell bzw. bei Frauen, die einen gegengeschlechtliche Knochenmarkspende erhalten haben erfolgen (Alison et al., 2000). Lagasse et al. konnte im Tierexperiment die Ansiedlung hämatopoetischer Knochenmarkstammzellen in der Leber mit anschließender Transdifferenzierung in Hepatozyten und zusätzlich einen proliferativen Effekt dieser Zellen auf Hepatozyten nachweisen (Lagasse et al., 2000). In den Folgejahren rückte die Mobilisation der hämatopoetischen Knochenmarkstammzellen in den wissenschaftlichen Focus. Auf Basis der Erkenntnis, dass CD34<sup>+</sup> Knochenmarkstammzellen an der Leberregeneration beteiligt sind, konnte eine vermehrte Mobilisation dieser Zellpopulation insbesondere nach Leberresektion und ohne externe Stimuli sowohl im Tierexperiment (Fujii et al., 2002) als auch am Menschen (De Silvestro et al., 2004) nachgewiesen werden. Eine signifikant erhöhte Mobilisation der CD133<sup>+</sup> Knochenmarkstammzellen zeigte sich nach Leberresektionen von gesunden Leberteilspendern (Gehling et al., 2005). Auch bei Subpopulationen von CD133<sup>+</sup> Knochenmarkstammzellen wie z.B. der CD39<sup>+</sup> Subpopulation konnte eine erhöhte Mobilisation nach Leberteilresektion bei Maus und Mensch nachgewiesen werden

---

(Schmelzle et al., 2013b). Die Mobilisationsrate von hämatopoetischen Stammzellen ist bei keinem anderen abdominell chirurgischem Eingriff beobachtet worden (Gehling et al., 2005). Die Forschungsgruppe um Schulte am Esch zeigte, dass nach einer Leberteilektomie eine portale Applikation von CD133<sup>+</sup> Knochenmarkstammzellen die Wachstumsrate von Leberrestgewebe im Vergleich zu unbehandeltem Lebergewebe signifikant erhöht werden kann (Schulte am Esch et al., 2012).

Nach diesen Erkenntnissen stellt sich die Frage, durch welchen Mechanismus die Knochenmarkstammzellen an der Leberregeneration beteiligen sind. Hierbei konnten sich die folgenden Hypothesen durchsetzen:

- 1.) Damit eine Differenzierung von hämatopoetischen Knochenmarkstammzellen in Hepatozyten erfolgt, muss vorher eine Zell-Zell-Fusion zwischen beiden stattfinden, die anschließend zur vermehrten Zellteilung der fusionierten Zelle führt (Grompe, 2003; Terada et al., 2002; Vassilopoulos et al., 2003).
- 2.) Der Kontakt zwischen hämatopoetischen Knochenmarkstammzellen und Hepatozyten ist ausreichend, um eine Differenzierung der hämatopoetischen Knochenmarkstammzellen in Hepatozyten oder *hepatocyt like cells* zu erzeugen (Almeida-Porada et al., 2004; Jang et al., 2004).
- 3.) Extrahepatische Stammzellen führen nach Ansiedlung in der Leber zu Aktivierung von lokalen Regenerationsprozessen durch humorales *Signaling* und interzelluläre Kontakte. Hierbei sollte die Modifikation der inflammatorischen Reaktionen der sich regenerierenden Leber mitbedacht werden (Schmelzle et al., 2013b).

### **1.6 *Homing* von extrahepatischen Stammzellen**

Der Begriff *Homing* bezeichnet eine Migration der hämatopoetischen Stammzellen entlang der Blutbahn und durch vaskuläres Endothel zu den unterschiedlichen Organen und Stammzellnischen. Es ist ein physiologischer Prozess der Hämostase, der für die Abwehr und Regeneration eines Organismus wichtig ist. Dabei handelt es sich zuerst um eine stress-induzierte Mobilisierung von Leukozyten oder Stammzellen aus dem Knochenmark durch das geschädigte Gewebe. Das *Homing* selbst besteht aus mehrstufig koordinierten Abläufen. Die Extravasation der Stammzellen in das Gewebe beginnt mit dem Gleiten der Zellen entlang der Endothelwand, dieses wird als *Rolling* bezeichnet,

---

gefolgt von einer stabilen Adhäsion und transendothelialen Migration durch die Endothelmatrix, um anschließend ihr Zielgewebe zu erreichen (Lapidot, 2005).

### **1.6.1 Mobilisierung hämatopoetischer Knochenmarkstammzellen zur Leber**

Damit hämatopoetische Stammzellen ihre Funktion in der Leberregeneration erfüllen können, müssen sie das geschädigte Gewebe rechtzeitig erreichen. Die Menge der mobilisierten Stammzellen in der frühen postoperativen Phase korreliert positiv mit dem Wachstums- und Regenerationspotential der Leber (Lehwald et al., 2013). Obwohl der genaue Mobilisationsmechanismus weiterhin nicht eindeutig geklärt ist, so wird von diversen Zytokinen und Wachstumsfaktoren berichtet, die hierbei eine Rolle spielen und für die Anlockung von hämatopoetischen Stammzellen verantwortlich sind. So konnte nachgewiesen werden, dass *stroma-derived factor 1* (SDF-1) (Cottler-Fox et al., 2003a), *stem cell factor* (SCF) (Krieg et al., 2006) und *hepatocyt growth factor* (HGF) (Tajima et al., 2010) nach großen Leberresektionen postoperativ im Serum erhöht sind. HGF und SDF-1 mobilisieren ganz spezifisch CD 133<sup>+</sup> und CD 34<sup>+</sup> hämatopoetische Stammzellen (Lehwald et al., 2013). Diese Daten unterstützen die Theorie, dass hämatopoetische Knochenmarkstammzellen an der Leberregeneration beteiligt sind.

### **1.6.2 Interaktion von Knochenmarkstammzellen und Endothel**

Während des *Homings* finden die Extravasation und die transendotheliale Migration zwischen den Stammzellen und dem Endothel statt. Die meisten Untersuchungen dieses Vorganges erfolgten am Knochenmarkendothel, da dieses insbesondere im hämatologisch-onkologischem Fachbereich für Stammzelltransplantationen von Bedeutung ist. Mohle et al. konnte zeigen, dass CD 34<sup>+</sup> Vorläuferzellen am Knochenmarkendothel adhären und transmigrieren können (Möhle et al., 1997). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass das Chemokin SDF-1 nicht nur für die Rekrutierung von hämatopoetischen Knochenmarkstammzellen zuständig, sondern auch für ihre transendotheliale Migration (Peled et al., 2000) unter Aktivierung von Oberflächenintegrinen und der stabilen Adhäsion unter Scherkräften des Blutflusses verantwortlich ist (Peled et al., 1999). Die Interaktion zwischen SDF-1 und dem SDF-1 Chemokinrezeptor CXCR4 ist ein wichtiger Regulationsweg für die Mobilisation und Migration der Stammzellen (Cottler-Fox et al., 2003b). Nicht nur für CD34<sup>+</sup> auch für CD133<sup>+</sup> Stammzellen ist die Interaktion von großer Relevanz. Lewald et al. konnte demonstrieren, dass besonders bei Patienten mit großen Leberteileresektionen eine

---

signifikant erhöhte Mobilisation von CD133<sup>+</sup> Stammzellen entlang des HGF und SDF-1 Konzentrationsgradienten gemessen wurde, sowie eine anschließend erhöhte AFP-Konzentration, ein Charakteristikum für die Leberregeneration (Lehwald et al., 2013). Auch auf der Oberfläche von CD133<sup>+</sup> Stammzellen konnte zwei Adhäsionsmoleküle, die auch bei Thrombozyten vorhanden sind, nachgewiesen werden: *Platelet and endothelial cell adhesion molecule 1* (PECAM-1) und *Platelet activating factor receptor* (PTAFR) (Rastogi et al., 2008). Ihre Beteiligung an der Adhäsion der Stammzellen lässt vermuten, dass Thrombozyten eine nicht unerhebliche Rolle in diesem Vorgang spielen könnten. Dennoch sind die Interaktionen zwischen Stammzellen, Endothel und Thrombozyten weitestgehend unverstanden.

### 1.7 Thrombozyten

Thrombozyten erfüllen wichtige Aufgaben bei der Hämostase, der Wundheilung und sind bei weiteren physiologischen Prozessen wie Entzündungsreaktionen, vaskuläre Regeneration aber auch Tumormetastasierung beteiligt. Sie entstehen durch Differenzierung von ihren Vorläuferzellen, den Megakaryozyten, die im Knochenmark lokalisiert sind. Sie sind scheibenartig flach, ca. 1-3µm groß und am Ende der Ausreifung kernlos, somit besitzen sie keine Fähigkeit zur eigenen Proteinbiosynthese. Beim Menschen beträgt die Thrombozytenzahl ca.  $1,5 - 3 \times 10^5/\mu\text{l}$  (Welsch, 2006). Sie sind charakterisiert durch die Oberflächenmarker CD31 und CD62p. CD31 ist auch als PECAM-1 bekannt. Es ist ein membranständiges Glykoprotein mit einem Gewicht von 130 kDa und ist sowohl an Thrombozyten als auch an Leukozyten und gefäßständigem Endothel zu finden. PECAM reguliert die Leukozytenmigration, Angiogenese und Thrombozytenaggregation (Woodfin et al., 2007). CD62p oder P-Selektin ist ein Transmembranprotein mit einem Gewicht von 140 kDa. Es wird sowohl in Weibel-Palade Körperchen unstimulierter Endothelzellen (Bonfanti et al., 1989) als auch in den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten gespeichert (Stenberg et al., 1985). Bei einer Thrombozytenstimulierung werden Zelloberflächenrezeptoren exprimiert (Weyrich et al., 1996), so dass ein Anbinden und Rollen der Thrombozyten an der Oberfläche aktivierter Endothelzellen möglich ist (Frenette et al., 2000). Thrombozyten können in drei morphologisch und funktionell distinkte Zonen unterteilt werden:

---

Die periphere Zone setzt sich aus einer doppelschichtigen Membran und Submembranraum zusammen. Hier befinden sich Glykoproteine, Mucopolysaccharide und Enzyme die vor allem der Adhäsion dienen.

Die Sol-Gel-Zone wird vom Zytoplasma gebildet und enthält kontraktile Elemente wie ringförmige Mikrotubuli, Mikrofilamente und Submembranfilamente. Durch diese Bestandteile wird bei Aktivierung eine rasche Verformbarkeit der Thrombozyten, sowie die Ausbildung von Pseudopodien ermöglicht.

Die Organellenzone wird von Mitochondrien, Glykogenspeicher und Speichergranula gebildet. Hierbei werden drei Sorten von Speichergranula unterschieden: dichte Granula, Lysosomen und  $\alpha$ -Granula. Die dichten Granula enthalten Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP), Serotonin, Calcium, welche für die Aggregation der Thrombozyten notwendig sind. Die lysosomale Granula enthalten hydrolytische Enzyme wie Kollagenasen und Elastasen. Den größten Anteil an Speichergranula bilden die  $\alpha$ -Granula. Sie enthalten adhäsive Proteine (z.B. Fibrinogen, von Willebrand Faktor), Wachstumsfaktoren (*platelet-derived growth factor*, *hepatozyt growth factor*), zytokinähnliche Proteine (*platelet factor 4*) und Koagulationsfaktoren (Plasminogen).

Des Weiteren beinhalten Thrombozyten ein offenes, kanalikuläres und ein dichtes tubuläres Membransystem. Das kanalikuläre System reicht bis in das Zellinnere und ermöglicht durch Vergrößerung der Zelloberfläche einen regen Substanz Austausch zwischen dem Intra- und Extrazellulärraum. Das tubuläre System ist ein Speicherort des intrazellulären Kalziums und ist wichtig für die Thrombozytenaktivierung und -aggregation (Buss et al., n.d.).

### **1.7.1 Thrombozytenaktivierung**

Die Aktivierung der Thrombozyten erfolgt durch diverse Stimuli. Hierbei unterscheidet man zwischen membranständigen Proteinen und löslichen Molekülen.

Bei Schädigung von Endothelzellen kommt es zur Freilegung von subendothelialer Matrix, so dass Thrombozyten mit den subendothelial-lokalisierten prothrombotischen Proteinen in Kontakt kommen. Die Wechselwirkung zwischen Kollagen und von-Willebrand-Faktor (vWF) ist wichtig zur Bildung einer Brücke zwischen Endothel und Thrombozyten. Lösliche Moleküle werden sowohl vom geschädigten Endothel als auch von bereits aktivierten Thrombozyten freigesetzt. Hierzu zählen Thrombin, ADP und

---

Thromboxan A<sub>2</sub>. Die Interaktion an den Membranrezeptoren führt auf der zytoplasmatischen Seite zur Aktivierung von G-Proteinen, wodurch die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöht wird und eine Kettenreaktion ausgelöst wird. Die Stärke des Aktivierungsreizes korreliert mit der Kalziumkonzentration. Die intrazellulären Folgereaktionen führen zu beträchtlichen Formveränderungen, die zu Aktinfilament-Umlagerungen mit Pseudopodienbildung führen. Dieser Prozess erzeugt eine Oberflächenvergrößerung (*shape change*), sowie nach weiteren Schritten eine potentiell reversible Endothelaggregation. Bei fortbestehender intensiver Aktivierung kommt es zur Sekretion (Degranulation) von Granula in der folgenden Reihenfolge: dichte Granula,  $\alpha$ -Granula und Lysosomen, so dass die Aggregation in einen irreversiblen Zustand übergeht. Neben den bereits erwähnten Mediatoren setzen aktivierte Thrombozyten kleine vesikelförmige Partikel frei, die auch als *platelet-derived microparticels* (PMP) bezeichnet werden. Hohe Scherkräfte des Gefäßsystems fördern im Vorgang der Thrombozytenaktivierung die Abschnürung von PMP (Barry and FitzGerald, 1999). Bei diesen Partikeln handelt es sich um submikroskopische (<0,5  $\mu$ m) Membranvesikel, die auf ihrer Oberfläche diverse Membranrezeptoren der Thrombozyten wie CD62 (P-Selektin), CD41 (GPIIb/IIIa), CXCR4 oder Protease-aktivierter Rezeptor-1 (PAR-1) tragen und für die Endotheladhäsion relevant sind (Barry and FitzGerald, 1999; Horstman and Ahn, 1999).

### **1.7.2 Einfluss der Thrombozyten auf die Leberregeneration**

Sowohl bei Nagern (Murata et al., 2007) als auch bei Menschen (Starlinger et al., 2016) konnten Arbeitsgruppen in der Frühphase der Leberregeneration eine deutliche Akkumulation an Thrombozyten in der Leber beobachten. Ein direkter Zell-Zell-Kontakt führt zu Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie HGF, IGF-1 und VEGF die einen proliferierenden Effekt auf die Hepatozyten ausüben (Matsuo et al., 2008). Zusätzlich interagieren Thrombozyten mit Kupffer-Zellen, sinusoidalem Endothel und hepatische Sternzellen (Kurokawa and Ohkohchi, 2017). Eine Thrombozytopenie, gestörte Thrombozytenaggregation oder ein Mangel an Tryptophanhydroxylase-1, einem wichtigen Enzym der Serotoninsynthese, erschweren die Leberregeneration, so dass die Substitution von Serotonin-Agonisten diese wiederum steigern kann (Lesurtel, 2006). Dieser Einfluss konnte sowohl nach großen Leberteilresektionen, bis hin zu 90% des Parenchyms (Myronovych et al., 2008), als auch bei entzündlichen Lebererkrankungen wie der Leberzirrhose beobachtet werden (Kurokawa and Ohkohchi, 2017). Ein

---

alternativer Mechanismus die Leberproliferation zu unterstützen besteht darin, dass Thrombozyten das Potenzial besitzen, eine Translation der hepatozytären mRNA zu beeinflussen und somit die Proliferation anzuregen (Lisman and Porte, 2016). Zusätzlich fördern Thrombozyten eine immunologische Antwort, in Form von Anlockung immunkompetenter Zellen, die für den Leberregenerationsprozess relevant sind (Jenne and Kubes, 2015).

### 1.8 Interaktion Stammzellen und Thrombozyten

Die genauen Mechanismen, der Interaktion von Stammzellen und Thrombozyten zur Beeinflussung der Leberregeneration sind nicht vollständig verstanden. Dennoch ist bekannt, dass durch die Aktivierung adhärenter Thrombozyten SDF-1 freigesetzt wird. Dieses fördert sowohl Mobilisation von CD34<sup>+</sup> (Kollet et al., 2003) und CD133<sup>+</sup> Stammzellen (Lehwald et al., 2013) aus dem Knochenmark, als auch die Adhäsion am Gefäßendothel (Stellos et al., 2007). Die Stammzellen benutzen Thrombozyten als eine potentielle Ankerplattform, da sie selbst nicht in der Lage sind bei hohen Scherkräften an der subendothelialen Matrix haften zu bleiben (Stellos et al., 2008). Massberg et al. demonstrierten in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, dass CD34<sup>+</sup> Stammzellen mit thrombozytärem P-Selektin interagieren und eine feste Stammzell-Thrombozyten Bindung entsteht (de Boer, 2006), was zusätzlich die Bindungsfähigkeit der hämatopoetischen Stammzellen am endotheliale Monolayer erhöht (Massberg, 2006).

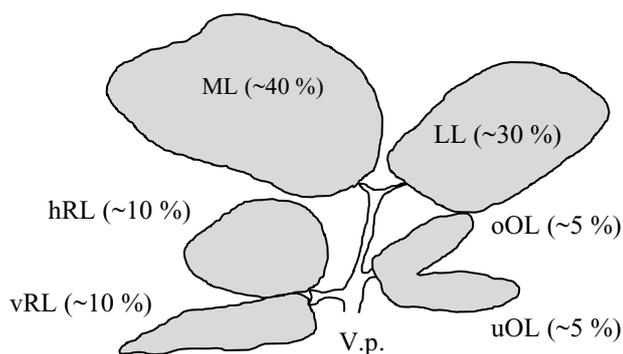
Bei der kindlichen akuten myeloischen und lymphatischen Leukämie ist eine erhöhte Effektivität der Stammzelltransplantation festgestellt worden, wenn CD34<sup>+</sup> Stammzellen mit *platelet-derived microparticels* vorinkubiert werden (Liu et al., 2003). Janowska-Wieczorek et al. konnten demonstrieren, dass humane CD34<sup>+</sup> Stammzellen Oberflächenrezeptoren wie CD41, CXCR4, CD62, PAR-1, P-Selektin und Integrin Mac-1, die zur Thrombozytenaktivierung und Membrananbindung notwendig sind, besitzen. Nach einer Inkubation mit Thrombozyten konnte eine erhöhte Genexpression der genannten Oberflächenrezeptoren nachgewiesen werden, so dass eine Interaktion von CD34<sup>+</sup> Stammzellen mit und über PMP wahrscheinlich ist. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass PMP-bedeckte CD34<sup>+</sup> KMSZ signifikant besser an Endothelzellen und immobilem SDF-1 haften bleiben. Diese Erkenntnisse verdeutlichen, dass PMP durch

---

einen CXCR4-Transfer und die somit aktivierte SDF-1/CXCR4-Achse potentiell am *homing*-Prozess von Stammzellen beteiligt ist (Janowska-Wieczorek et al., 2001).

## 1.9 Makroskopie der Rattenleber

In dieser Arbeit wurden für das Xenomodell Rattenlebern verwendet, so dass für die korrekte Präparation genaue Kenntnisse der anatomischen Strukturen wichtig waren. Das Gewicht der Rattenleber betrug ca. 4 % des gesamten Körpergewichts. In der Abbildung 3 ist der Aufbau der Rattenleber schematisch dargestellt. Man erkennt, dass die Rattenleber aus mehreren voneinander abgrenzbaren Leberlappen besteht. Die Blutzufuhr zu den einzelnen Lappen erfolgt über die Portalvene (V.p.). Beim Eröffnen der Bauchhöhle erkennt man den mittleren (ML) und linken (LL) Lappen, die gemeinsam eine Volumenmenge von ca. 70 % der Leber ausmachen. Klappt man diese Lappen nach oben, kommen vier kleine Leberlappen zum Vorschein. Rechts von der Portalvene befindet sich der caudal gelegene vordere rechte Lappen (vRL) und der darüberliegende hintere rechte Lappen (hRL). Beide bilden jeweils ca. 10 % des Lebervolumens. Links von der Portalvene verbindet eine Gewebebrücke zwei omentale Lappen: unterer (uOL) und oberer (oOL) omentaler Leberlappen. Zusammen messen sie ca. 10 % des Lebervolumens. Unterhalb von vRL und hRL befindet sich die VCI, die auf Höhe des Zwerchfells die Abflussbahn der Lebervenen darstellt und das Blut zum Herzen zuführt (Gäbelein, 2008).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Rattenleber (mod. nach Gäbelein 2008).** Dargestellt sind sechs Leberlappen mit ihrem prozentualen Anteil (%) am gesamten Lebervolumen: vorderer rechter Lappen (vRL), hinterer rechter Lappen (hRL), mittlerer (ML) und linker (LL) Lappen, unterer (uOL) und oberer (oOL) omentaler Leberlappen. Die Blutzufuhr erfolgt über die Portalvene (V.p.).

---

## 2 Ziel der Arbeit

Um die Lebergeneration und das *Homing* von CD133<sup>+</sup> KMSZ besser zu verstehen, sind folgende Ziele für die vorliegende Arbeit definiert worden:

1. Etablierung eines *Singel Pass* Systems als Xenomodell von isoliert perfundierten Rattenlebern (IPRL). Es handelt sich hierbei um ein nicht zirkulierendes Perfusionssystem, das eine gezielte Applikation von CD133<sup>+</sup> KMSZ, als auch das Monitoring von Versuchsbedingungen ermöglicht. Zusätzlich wird mit Hilfe von *In situ Imaging* die Lokalisation der Stammzellen (intravasal vs. parenchymal) bestimmt.
2. Konfokalmikroskopischer Nachweis von CD133<sup>+</sup> KMSZ im IPRL.
3. Evaluation des Thrombozyteneffekts auf das *Homing* von CD133<sup>+</sup> Knochenmarkstammzellen in der ischämischen Rattenleber durch den Vergleich von Stammzellakkumulation und -extravasation bei Applikation von:
  - Unbehandelten KMSZ
  - KMSZ, die mit Thrombozyten präinkubiert wurden
  - Unbehandelten KMSZ, die nach einer Thrombozytenvorinjektion appliziert wurden
4. Beurteilung der Akkumulations- und Extravasationsrate innerhalb von 45 Minuten nach Applikation von CD133<sup>+</sup> KMSZ mit Hilfe von *In situ Imaging*.

Diese Untersuchungen sollen zum Verständnis und zur Verbesserung eines Behandlungskonzeptes mit CD133<sup>+</sup> KMSZ sowohl nach einer Leberteileresektion, als auch in anderen Szenarien von akuter und chronischer Leberschädigung beitragen.

---

### 3 Material

#### 3.1 Verbrauchsmaterial

Blasenfalle+Montage am OP-Tisch	HSE/ March-Hugstetten, Deutschland
Blood Cell Counter	Beckmann Coulter/ Krefeld, Germany
Blutdruckmessschlauch (15cm)	Smiths Medical/ Lancashire, England
Carbogenflasche (5%CO <sub>2</sub> /95%O <sub>2</sub> )	Linde/ Zentralapotheke UKD, Deutschland
Deckgläser (24x24 mm)	Menzel-Gläser/ Braunschweig, Deutschland
Deckgläser (rund, ∅13 mm)	VWR International/ Langenfeld, Deutschland
Einkanalpipette	Eppendorf/ Hamburg, Deutschland
Falcon (50 ml, 15 ml)	Greiner Bio-One/ Frickenhausen, Deutschland
Färbeküvette + Gestell	VWR/ Langenfeld, Deutschland
Filter 100 µm	Becton Dickinson/ Franklin Lakes, USA
Filter 30 µm	Miltenyi Biotec/ Gladbach, Deutschland
Garnfaden (Stärke 15)	Anchor Artiste, Mercer Crochet/ West Yorkshire, England
Glasflaschen (1/2/5 Liter)	VWR/ Langenfeld, Deutschland
Große Blasenfalle	HSE/ March-Hugstetten, Deutschland
MACS Säule (Größen M/L)	Miltenyi Biotec/ Gladbach, Deutschland
Magnetrührer	Ikamag/ Staufen, Deutschland
Millex-GS (0,22 µm)	Merck Millipore/ Carrigtwohill, Ireland
Multiple Sample Luer Adapter	BD Vacutainer/ Franklin Lakes, USA
Objektträger 76x26x1 mm	Marienfeld-Superior/ Lauda-Königshofen, Deutschland

## Material

---

Pasteurpipette	Greiner Bio-One/ Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitze	Starlab/ Ocala, USA
Plus Blood Collection Tubes	BD Vacutainer/ Franklin Lakes, USA
Safe-Lock Tubes	Eppendorf/ Hamburg, Deutschland
Schlauch T-Stück	HSE/ March-Hugstetten, Deutschland
Schlauchnippel	HSE/ March-Hugstetten, Deutschland
Schlauchverbinder	HSE/ March-Hugstetten, Deutschland
Serologische Pipette	Corning Incorporation/ Corning, USA
Silicon Tubing Platinum L/S 25	Masterflex/ Vernon Hills, USA
Super Frost Plus Objektträger	VWR/ Leuven, Belgien
Superior Zählkammer	Marienfeld/ Lauda-Königshofen, Deutschland
Tissue-Tek	Sakura/ Alphen aan van Rijn, Niederlande
Tygon Schlauch	Ismatec/ Wertheim-Mondfeld, Deutschland
Venenkanüle Luer 21G	Braun/ Melsungen, Deutschland
Wasserbadschläuche	Metronic/ Minneapolis, USA
Y-Schlauchverbinder	HSE/ March-Hugstetten, Deutschland
Zap-Cap-S Acetat Filter (0,2 µm)	Whatman/ Florham Park, USA

### 3.2 Chemikalien und Fertigpuffer

Aceton ( $\geq 99,8\%$ )	VWR/ Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Ammoniumchlorid (pH 7,4)	Zentralapotheke/ Universitätsklinikum Düsseldorf
Aqua dest. / Demi-Water	Fischar/ Saarbrücken, Deutschland
BSA/Albumin Fraktion V	Roth/ Karlsruhe, Deutschland

## Material

---

Calciumchlorid	Merck/ Darmstadt, Deutschland
EDTA (0,5M)	Sigma Aldrich/ Steinheim, Deutschland
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco/ Darmstadt, Germany
Ficol-Paque Plus	GE Healthcare/ Uppsala, Schweden
Goat Serum	Sigma Aldrich/ Steinheim, Deutschland
Hydrophober Stift/ Dako Pen	Dako/ Hamburg, Deutschland
Isotone NaCl (0,9 %)	Braun/ Melsungen, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck/ Darmstadt, Deutschland
Lactat (Pulver)	Sigma Aldrich/ Steinheim, Deutschland
MACS Puffer	Miltenyi Biotec/ Gladbach, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck/ Darmstadt, Deutschland
Methanol ( $\geq 99,8\%$ )	VWR/ Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck/ Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck/ Darmstadt, Deutschland
Natriumphosphat-Dihydrat	Merck/ Darmstadt, Deutschland
Natriumsulfat	Merck/ Darmstadt, Deutschland
Paraffin (highly liquid)	Merck/ Darmstadt, Deutschland
PBS (pH 7,4)	Gibco/ Manchester, Vereinigtes Königreich
PBS Dulbecco	Biochrom AG/ Berlin, Deutschland
Prolong Gold	Invitrogen/ Darmstadt, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Pufferlösung (pH7)	Sigma Aldrich/ Steinheim, Deutschland
Tris-EDTA-Pufferlösung (pH8)	Sigma Aldrich/ Steinheim, Deutschland
Pyruvat	Merck/ Darmstadt, Deutschland

## Material

---

Trypan blue stain (0,4 %)	Gibco/ Manchester, Vereinigtes Königreich
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories/ Burlingame, USA
Zero Oxygen Calibration Solution (0,01pH)	Aurical Company/ San Francisco, USA

Alle Chemikalien und Fertigpuffer wurden entsprechend der Herstellerempfehlungen gelagert und verwendet. Unsteril gelagerte Chemikalien wurden vor der Verwendung steril filtriert.

### 3.3 Lactatherstellung für Krebs-Henseleit Puffer

Zur Herstellung von 100 ml Lactat mit einer Konzentration von 1 M und einem pH-Wert von 7,74-7,77, benötigte man eine Lactatmenge von 11,206 g. Diese Menge wurde eingewogen und in 90 ml Aqua dest. gelöst. Die pH-Einstellung erfolgte unter Zugabe von HCl. Bei Erreichen des entsprechenden pH-Wertes, wurde mit Aqua dest. bis auf 100 ml aufgefüllt und der pH-Wert erneut kontrolliert. Das fertige Lactat wurde anschließend durch den Millex-GS filtriert und bei 4 °C max. 2 Wochen gelagert.

### 3.4 Herstellung von Krebs-Henseleit Puffer

Als physiologisches Nährmedium für die Rattenleberperfusion wurde Krebs-Henseleit Puffer (KHP) verwendet, der für jeden Versuch frisch angesetzt wurde. Die Chemikalien für die Herstellung von je 1 l der benötigten Stammlösungen ist in Tabelle 1 dargestellt.

Stammlösung	Chemikalie	Konzentration [mM]	Menge [g]
1	NaCl	2300	134,4
2	NaHCO <sub>3</sub>	500	42
3	KCL	118	8,8
	MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	23,6	4,8
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	24,6	3,4
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4	3,4
4	CaCl <sub>2</sub>	25	3,7

Tabelle 1: Chemikalien der Stammlösung.

## Material

Zur Herstellung von 3 l KHP wurden jeweils 150 ml der Stammlösungen 1, 2, 3 auf ca. 2 l mit Aqua dest. aufgefüllt, um ein Ausfällen von CaSO<sub>4</sub> bei weiterer Gabe von 150 ml der Stammlösung 4 zu vermeiden. Danach wurden 99 mg Pyruvat (0,3 mM) und 6,3 ml vom angefertigten Lactat hinzugefügt. Anschließend wurde alles auf 3 l Aqua dest. aufgefüllt, mit einem Magnetrührer gut vermischt und mittels Vakuumpumpe durch einen Zap Cap-S Cellulose Acetat Filter entgast.

### 3.5 Kits und Reagenzien

Bezeichnung	Reagenz	Hersteller
CD133 MicroBeads Kit human	FcR-Blocking Reagenz	Miltenyi,
	MicroBeads Reagenz	Biotec MACS/Gladbach Deutschland
PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit	Diluent C	Sigma Aldrich/Steinheim
	PKH67 Linker	Schweiz

### 3.6 Antikörper (FACS-Analyse)

Antikörper	Hersteller
PE-Cy7 mouse anti-human CD45	Biosciences/ Heidelberg, Deutschland
CD133/2-PE (293C3) antibodies human	Miltenyi Biotec/ Gladbach, Deutschland
FITC anti-human CD39	Hölzel Diagnostika/ Köln, Deutschland
APC mouse anti-human CD34	Biosciences/ Heidelberg, Deutschland
ISO-CD45-PE-Cy7	Biosciences/ Heidelberg, Deutschland
ISO-CD133-PE	Miltenyi Biotec/ Gladbach, Deutschland
ISO-CD39-FITC	Biosciences/ Heidelberg, Deutschland
ISO-CD34-APC	Biosciences/ Heidelberg, Deutschland

### 3.7 Antikörper (Immunfluoreszenzfärbungen)

Primärantikörper	Klon	Spezies/Isotyp	Bezugsquelle	Verdünnung
Anti-CD45	35-Z6	<i>mouse mono-clonal/</i> IgG	Santa Cruz	1:50
Anti-CD45	EP322Y	<i>rabbit mono-clonal/</i> IgG	Novus Biological	1:1000
Anti-NTCP 22	Klon 4	<i>rabbit poly-clonal</i>	Santa Cruz	1:200
Anti-RECA-1	RECA-1	<i>mouse mono-clonal/</i> IgG1	Santa Cruz	1:200

**Tabelle 2: Primärantikörper.**

Sekundärantikörper	Spezies/Isotyp	Klon	Bezugsquelle
Alexa Fluor 488 <i>goat anti-mouse</i>	<i>goat/IgG2b</i>	MPC-11	Biologend, USA
Alexa Fluor 488 <i>goat anti-rabbit</i>	<i>goat/IgG</i>	<i>poly-clonal</i>	Life Technologies, Deutschland
Alexa Fluor 488 <i>goat anti-mouse</i>	<i>goat/IgG</i>	<i>poly-clonal</i>	Life Technologies, Deutschland
Alexa Fluor 546 <i>goat anti-mouse</i>	<i>goat/IgG(H+L)</i>	<i>poly-clonal</i>	Life Technologies, Deutschland
Alexa Fluor 546 <i>goat anti-rabbit</i>	<i>goat/IgG(H+L)</i>	<i>poly-clonal</i>	Life Technologies, Deutschland

**Tabelle 3: Sekundärantikörper.**

### 3.8 Medikamente

Heparin-Natrium-250000	Ratiopharm/ Ulm, Deutschland
Ketavet (100 mg/ml)	Pfizer/ Berlin, Deutschland
Rompun (2 %)	Bayer/ Leverkusen, Deutschland

---

### 3.9 Präparationsbesteck

Anatomische Pinzette	Aesculap, Braun/ Melsungen, Deutschland
Chirurgische Pinzette/BD553R	Aesculap, Braun/ Melsungen, Deutschland
Chirurgische Schere/BC424R	Aesculap, Braun/ Melsungen, Deutschland
Einmal-Spritze (5 ml,20 ml)	Braun/ Melsungen, Deutschland
Mikroschere/OC498R	Aesculap, Braun/ Melsungen, Deutschland
Omnifix Spritze (1 ml)	Braun/ Bad Arolsen, Deutschland
Spitze Pinzette/OC21	Aesculap, Braun/ Melsungen, Deutschland
Spitze Schere/BC110R	Aesculap, Braun/ Melsungen, Deutschland
Spritzenkanüle (26Gx <sup>1</sup> / <sub>2</sub> "	Braun/ Melsungen, Deutschland
Stumpfe Schere/BC165R	Aesculap, Braun/ Melsungen, Deutschland
Vicryl 5-0	Ethicon/ St. Stevens Woluwe, Belgien

### 3.10 Geräte

3CCD Colour Video Kamera	Sony/ Shinagawa, Japan
Abboath-T I.V. 16G	Hospira Venisystem/ Sligo, Ireland
Advalytix AdvaWash	Implen GmbH/ München, Germany
Advalytix Slide Booster SB450	Implen GmbH/ München, Germany
Axioplan 2 Mikroskop	Zeiss/ Köln,Germany
Cryostat CM1900	Leica Instruments/ Nußloch, Deutschland
Ecoline Staredition003 Wasserbad	Lauda/ Böckenberg, Deutschland
FACSCanto Flow Cytometer BD	Biosciences/ Heidelberg, Deutschland
Heidelberger Verlängerung	Braun/ Melsungen, Deutschland

## Material

---

Hemofilter D150/Fiber Oxygenator	HSE/ March-Hugstetten, Deutschland
Hemothermic Blanket Control Unit	Harvard Apparatus/ Holliston, USA
Mikroprozessor pH-Meter	Hanna instruments/ Kehl am Rhein, Deutschland
Mikroskop BH2-RFCA	Olympus/ Tokyo, Japan
Mikroskop Wilovert A	Hund/ Wetzlar, Deutschland
Minimax Magnetsäulenhalter	Mylytenyi Biotec/ Gladbach, Deutschland
Multifuge X1R	Thermo Scientific/ Osterode, Deutschland
Netzgerät+Elektroden (pH,CO <sub>2</sub> ,O <sub>2</sub> )	HSE/ March-Hugstetten, Deutschland
Objektiv(x10) DPlan Apo10UV	Olympus/ Tokyo, Japan
OP-Tisch	HSE/ March-Hugstetten, Deutschland
Original Perfusor Leitung	Braun/ Melsungen, Deutschland
Pipetboy	Integra/ Zizers, Schweiz
Port für Druckmessung	HSE/ March-Hugstetten, Deutschland
Pumpe 11 Elite	Harvard Apparatus/ Holliston, USA
Rollerpumpe	Ismatec/ Wertheim-Mondfeld, Deutschland
Sicherheitswerkbank	Labotect/ Göttingen, Deutschland
Voyager Pro Feinwaage	Ohaus/ Pine Brook, USA
Waage	Kern/ Balingen, Deutschland

### 3.11 PC-Programme

AMCap 9.2 (Demo Version)	Microsoft Windows Media Technologies
Basic Data Acquisition Software (Version:73-3330)	HSE/ March-Hugstetten, Deutschland

FACSDiva™ Software	Biosciences/ Heidelberg, Deutschland
MetaSystems iris	MetaSystem GmbH/ Heidelberg, Deutschland
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA

### 3.12 Versuchstiere

Für das Xenomodel der isoliert perfundierten Rattenleber (IPRL) wurden männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 120-160 g verwendet. Die Tiere wurden über die Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bezogen und dort am Versuchstag abgeholt. Für die artgerechte Haltung bis zum Versuchstag sorgt die Tierversuchsanstalt.

### 3.13 Genehmigung des Tierversuchsprojektes

Die Genehmigung für die Experimente und die Organentnahme erfolgte nach Anzeige des Tierversuchsvorhabens durch die Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität unter dem Aktenkennzeichen 8.87-51.05.30.10.066. Die Tiere erhalten unter Vollnarkose eine mediale Laparotomie. Die Tötung der Versuchstiere erfolgt durch einen Herzschnitt und durch Ausbluten nach der Eröffnung der supra- und infrahepatischen Vena cava. Der erforderliche versuchstierkundliche Übungsschein gemäß §9 des geltenden Tierschutzgesetzes wurde vorab erworben.

### 3.14 Patientenkollektiv

Für die Gewinnung von Knochenmarkstammzellen und Thrombozyten sind 16 Patienten (Tbl. 4) im Rahmen eines großen operativen Eingriffs an der Universitätsklinik Düsseldorf präoperativ aufgeklärt worden und haben der Entnahme schriftlich zugestimmt. Die Erlaubnis für die Experimente wurde von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität (IRBs #2852, #2853) genehmigt.

Nr.	Alter	Geschlecht	Diagnose	OP	Vorerkrankungen
57	55	W	Neubildung unbekanntes Verhaltens:	Laparoskopische Exploration	Endometriose, Follikelzyste des Ovars, Cervicitis,

## Material

			Binde- und Weichteilgewebe		
58	39	W	Chron. Oberbauch- schmerzen	Explorative Laparatomie, Bursa Eröffnung, Appendektomie, Alkoholinstitution in Truncus Coeliacus	HNPCC-Trägerin Z.n. Post-ERCP Pancreatitis, Z.n. Herpes Zoster Z.n. Cholezystektomie Z.n. Tonsillektomie Z.n. Pankreasschwanz Resektion bei Pankreasadenom, Warthin-Tumor Z.n. Lymphknotenextirpation, Z.n. Milzvenenthrombose
59	65	M	Ösophagus-CA	En bloc Ösophagusresektion, Magenhochzug, Lymphadenektomie, Cholezystektomie	Z.n. neoadjuvanter Chemotherapie arterieller Hypertonus COPD Polyarthrose
60	66	M	Adeno-CA der Cardia	En bloc Ösophagusresektion	Barrett-Ösophagus Chronische Cholezystitis Chronische Niereninsuffizienz (St.3), Diabetes Mellitus Typ II, Hyperlipidämie
61	76	M	Pankreas- und Gallengang-CA	Explorative Laparatomie, Cholezytektomie, Operation nach Whipplel	Chronische Pankreatitis, KHK, pAVK I°, arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie
63	71	M	Rektales Adeno- CA Rezidiv	Explorative Relaparatomie	Rektum-CA arterielle Hypertonie, Diabetes Mellitus Typ II
74	61	M	Chronischer Abszess im Lebersegment VIII	Zentrale Leberresektion der Segmente IVa/VIII	Z.n. adjuvanter Chemo- Therapie Z.n. Hemihepatektomie links und Cholezystektomie bei hepatisch metastasiertem Adeno-CA Z.n. Hemikolektomie rechts Arterielle Hypertonie
75	45	M	Adeno-CA der Cardia	Explorative Laparatomie, Cholezystektomie, Gastrektomie nach Y-Roux	Arterielle Hypertonie, Diabetes Mellitus Typ II, Adipositas per magna, Schlaf-Apnoe-Syndrom
77	65	M	Intrahepatische Cholestase, Perforation Ductus hepaticus	Explorative Laparatomie	Reflusösophagitis Grad 3 Pangastritis, Prostatahyperplasie, Z.n. HAV-Infektion
78	51	M	Lungenmetasta- sen	Thorakotomie rechts, Keilresektion, Lymphadenektomie	Z.n. Ablatio testis Z.n. 4 Zyklen PE Z.n. Portimplantation Z.n. rechtsseitiger Residualtumorresektion

## Material

80A	66	M	Zystischer Pankreasschwanztumor	Explorative Laparatomie, distale Pankreatikosplenektomie, retroperitoneal Lymphadenektomie	Leberhämangiom in Segment IV
80B	69	M	Adeno-CA des Pankreas	Operation nach Whipple	Refluxösophagitis Grad IV, Z.n. Myokardinfarkt, vaskuläre Encephalopathie, Z.n. Thrombektomie ACI rechts, pAVK, Diabetes mellitus Typ II, Vorhofflimmern mit Z.n. ICD-Implantation
81	58	W	Pankreas-CA	Pyloruserhaltende totale Pankreatektomie	pAVK, Restless-Leg-Syndrom
82	64	M	rez. Pankreas-CA	Resektion Konglomerattumor bei biliodigestiver Anastomose, Resektion Lymphknotentumor im Mesenterium	Z.n. Whippel'schen Operation, arterielle Hypertonie
83	29	W	Neuroendokrine Pankreasneoplasie	Operation nach Whipple	MEN1-Syndrom, Z.n. Parathyreoidektomie wegen primärem Hyperparathyreoidismus, Osteopenie, rez. Nephrolitiasis, chron. Antrumgastritis, Z.n. Myelitis
87	69	M	Adeno-CA Metastasen des distal. Gallengangs	Atypische Leberresektion	Pneumonie Z.n. Clostridium defficile Colitis Z.n. Whipple-Operation bei Adenocarcinom Z.n. hochmalignem Non-Hodgkin-Lymphom Chronische Niereninsuffizienz

**Tabelle 4: Zusammenstellung von klinischen und operativen Daten von Knochenmarkspendern.** Die Nummerierung (Nr.) steht sowohl für die Knochenmarkspende als auch für das Versuchsexperiment in dem die KMSZ eingesetzt wurden. Nicht aufgeführte Spendennummern 1-87 konnten wegen Verunreinigung oder mangelnder Zellzahl nicht für Versuche verwendet werden.

---

## 4 Methoden

In dieser Arbeit waren die methodischen Eckpfeiler:

1. Aufreinigung von Knochenmarkspenden und Patientenblut für die Gewinnung von CD133<sup>+</sup> KMSZ und autologen Thrombozyten.
2. Etablierung eines *Singel Pass* Systems als Xenomodell der IPRL. Nach Anschluss der Rattenleber an ein Perfusionssystem erfolgte eine zeitlich festgelegte Ischämie und Reperfusion mit anschließenden Injektionen der KMSZ.
3. Beobachtung der Ansiedlung von fluoreszenzmarkierten CD133<sup>+</sup> KMSZ in der ischämischen Rattenleber mit Hilfe von *In situ Imaging*.
4. Beurteilung der CD133<sup>+</sup> KMSZ-Ansiedlung und -Extravasation unter Thrombozyteneinfluss s.u.
5. Entnahme und Färbung der Rattenleber im Anschluss an die Perfusion zur Eruierung enthaltener CD133<sup>+</sup> KMSZ mittels Konfokalmikroskopie.

Um anschließend den Einfluss der Thrombozyten auf die Ansiedlung der CD133<sup>+</sup> KMSZ zu evaluieren, sind drei Versuchsgruppen (n=5) festgelegt worden:

- Injektion von CD133<sup>+</sup> KMSZ ohne Thrombozyten.
- Injektion von CD133<sup>+</sup> KMSZ nach der Injektion thrombozyten-reichem Plasma (PRP).
- Injektion von CD133<sup>+</sup> KMSZ, die vorher mit PRP Inkubiert wurden.

Die Ansiedlung der KMSZ wurde während eines Versuchs durch *In situ Imaging* festgehalten, um anschließend statistisch analysiert werden zu können.

Nach der Perfusion wurde Lebergewebe entnommen und mit unterschiedlichen Immunfluoreszenz-Farbstoffen behandelt, um mit Hilfe von Konfokalmikroskopie im Gewebe enthaltene CD133<sup>+</sup> KMSZ aufspüren zu können.

### 4.1 Isolierung von CD133<sup>+</sup> KMSZ und Fluoreszenzmarkierung mit PKH67 Green

Für die Gewinnung von CD133<sup>+</sup> KMSZ wurden ca. 30-60 ml Knochenmark aus dem Beckenkamm von Patienten durch Aspiration mittels Knochenmarkskanüle entnommen.

---

Um möglichst wenig KMSZ im Anschluss an das *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS) zu verlieren, ist der Prozess der Fluoreszenzmarkierung mit PKH67 Green in den Sortingprozess integriert worden. Die Aufreinigung durch das *MACS* erfolgte nach Angaben des Herstellers.

### **4.1.1 Phasentrennung des Knochenmarkspirats**

Das Knochenmark wurde direkt nach der Entnahme in einem Verhältnis von 7:1 mit PBS+2 mM EDTA (500 ml PBS-Flaschen, 2 ml 2 mM EDTA) verdünnt und in 50 ml Falcons überführt. Die Probe wurde durch einen sterilen 100 µm Filter filtriert, um Zellklumpungen zu entfernen. In ein neues 50 ml Falcon wurden 15 ml Ficoll (20°C) vorgelegt, so dass die gefilterte Probe über das Ficoll aufgeschichtet werden konnte. Bei Proben über 35 ml Volumen, wurden diese auf zwei oder mehr Falcons aufgeteilt. Anschließend wurde die geschichtete Probe 35 min bei 445 g, 20 °C und ohne Bremse zentrifugiert, um eine Phasenbildung zu erreichen. Erythrozyten und Granulozyten sedimentierten aufgrund ihres hohen Gewichtes als Pellet am Boden und wurden durch Ficoll von einem feinen Ring von mononukleären Zellen (MNC) und dem darauf befindlichen Plasma getrennt. Aus der trüben Inter-Phase wurden die mononukleären Zellen mittels einer Pasteurpipette entnommen und in eine neues 50 ml Falcon überführt. Die Zellen wurden mit 40 ml PBS+2 mM EDTA gewaschen und 10 min bei 20 °C und 300 g mit Bremse zentrifugiert, der Überstand wurde hiernach verworfen.

### **4.1.2 Lyse der Erythrozyten**

Um das Zellpellet von verbliebenen Erythrozyten zu befreien, wurde das Pellet mit 5 ml NH<sub>4</sub>Cl resuspendiert und für 5 min bei 4 °C inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Zellsuspension kräftig aufgeschüttelt und 10 min bei 20 °C und 300 g ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde hiernach verworfen und das Zellpellet mit 40 ml PBS+2 mM EDTA gewaschen, sowie 10 min bei 20 °C und 300 g mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 50 ml PBS+2 mM EDTA resuspendiert, um anschließend die Zellzahl mittels Neubauerkammer zu bestimmen.

### **4.1.3 Zellzählung**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der resuspendierten, mononukleären Zellen mit 10 µl 0,2 %iger Trypanblau-Lösung vermischt und auf die Neubauerkammer aufgetragen. Nach dem lichtmikroskopischen Auszählen der angefärbten Zellen, wurde

---

der Mittelwert aus allen acht Werten der Eckfelder gebildet und die Gesamtzellzahl mit folgenden Formeln berechnet:

$$\text{Mittelwert} \times \text{Verdünnungsfaktor (hier 2)} \times \text{Kammervolumen (10}^4\text{)} = \text{Zellanzahl/ml}$$

$$\text{Zellanzahl/ml} \times \text{PBS 2 ml EDTA-Menge ml} = \text{Gesamtzellzahl}$$

Als Vorbereitung für die anschließende Fluoreszenzmarkierung erfolgte eine Zentrifugation der Probe für 10 min bei 20 °C und 300 g mit Bremse. Der Überstand wurde verworfen.

### 4.1.4 Fluoreszenzmarkierung mit PKH67 Green

Um humane CD133<sup>+</sup> KMSZ in der Rattenleber mittels *In situ Imaging* detektieren zu können, wurden diese mittels PKH67 Green Farbstoff markiert. Hierfür wurde das Zellpellet in 1-2 ml PBS gewaschen, um danach 5 min bei 20 °C und 400 g mit Bremse zentrifugiert zu werden. Der Überstand wurde verworfen. Die folgenden Volumenangaben für Diluent C, FCS und PKH67 Green beziehen sich auf die Zellanzahl von  $2 \times 10^7$ , so dass bei abweichender Zellmenge die Volumina angepasst werden mussten. Die Färbelösung wurde in einem 15 ml Falcon aus 4 µl PKH67 + 1 ml Diluent C vorbereitet. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 1 ml Diluent C durch pipettieren resuspendiert und zügig zur 5-minütigen Inkubation in die vorbereitete Färbelösung hinzugefügt. Zwischendurch wurde die Probe vorsichtig durch Pipettieren gemischt. Um den Färbevorgang zu stoppen wurden 2 ml FCS zur Probe hinzugefügt. Nach 1 min wurde die Probe für 10 min bei 20 °C und 400 g mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml MACS-Puffer resuspendiert und in ein neues 15 ml Falcon überführt, da Farbreste an den Falconwänden die Zellen zerstören können. Die Probe wurde dann für 5 min und 20 °C bei 400 g mit Bremse zentrifugiert. Dieser Wachvorgang mit MACS-Puffer wurde zwei Mal wiederholt. Nach der letzten Resuspension mit MACS-Puffer erfolgte die Zellzählung mit Hilfe der Neubauerkammer, um anschließend mit der Inkubation für das *MACS* fortfahren zu können.

### 4.1.5 Magnetisches Labeling

Um CD133<sup>+</sup> KMSZ zu separieren, müssen diese vorher magnetisch markiert werden. Die folgenden Volumenangaben beziehen sich auf eine Gesamtzellzahl bis ca.  $10^8$  Zellen, bei größerer Anzahl mussten die Volumina angepasst werden. Das Pellet wurde in 300 µl MACS-Puffer resuspendiert. Danach wurden zuerst 100 µl FcR-Blocking-Reagenz, zur

---

Blockierung unspezifischer Rezeptoren, und anschließend 100  $\mu$ l CD133 MicroBeads Reagenz einpipettiert. Die Probe wurde 30 min bei 2-8 °C inkubiert, anschließend mit 1-2 ml MACS-Puffer gewaschen und für 10 min bei 20 °C und 300 g mit Bremse zentrifugiert.

### **4.1.6 Magnetische Zellseparation**

Solange die Zentrifugation erfolgte wurde die MACS-Vorrichtung vorbereitet. Für die Isolierung der CD133<sup>+</sup> KMSZ wurden MACS-Säulen der Größe MS bei Gesamtzellzahl bis  $2 \times 10^8$  (oder LS bei Zellzahl bis  $2 \times 10^9$ ) verwendet. Auf die MS-Säule wurde ein 30  $\mu$ m Filter aufgesetzt und dieser mit 500  $\mu$ l MACS-Puffer (bei LS-Säule mit 3 ml) angefeuchtet. Unter der Säule wurde ein Abfallbehälter platziert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abpipettiert, das Zellpellet in 500  $\mu$ l (bei Zellanzahl bis  $10^8$ ) resuspendiert und auf die Säule bzw. den Filter aufgetragen. Durch die spezifische Mikrobeads-Markierung der CD133<sup>+</sup> KMSZ, wurden sie magnetisch in der Säule festgehalten und so von den restlichen Zellen, die die Säule in den Abfallbehälter durchlaufen, separiert. Die MS-Säule inklusive Filter wurden insgesamt drei Mal mit 500  $\mu$ l (bei LS mit 3 ml) gewaschen. Beim ersten Waschschrift spülte man das Falcon mit den 500  $\mu$ l, um zurückgebliebene Zellen aufzusammeln. Am Ende wurde die Säule vom Magnethalter entnommen und der Filter verworfen. Die selektierten CD33<sup>+</sup> KMSZ wurden mit 1 ml MACS-Puffer von der MS-Säule (mit 5 ml von der LS-Säule) durch festes und zügiges Pressen des Plungers in ein 1,5 ml Tube eluiert. Die selektierte Zellzahl wurde erneut mittels Neubauerkammer erfasst.

Für die Durchführung der IPRL-Versuche wurde eine Zellanzahl von  $2 \times 10^5$  CD33<sup>+</sup> KMSZ benötigt. Sollte diese nicht erreicht werden, konnten CD133<sup>+</sup> KMSZ von zwei unterschiedlichen Knochenmerkspenden zusammengelegt werden.

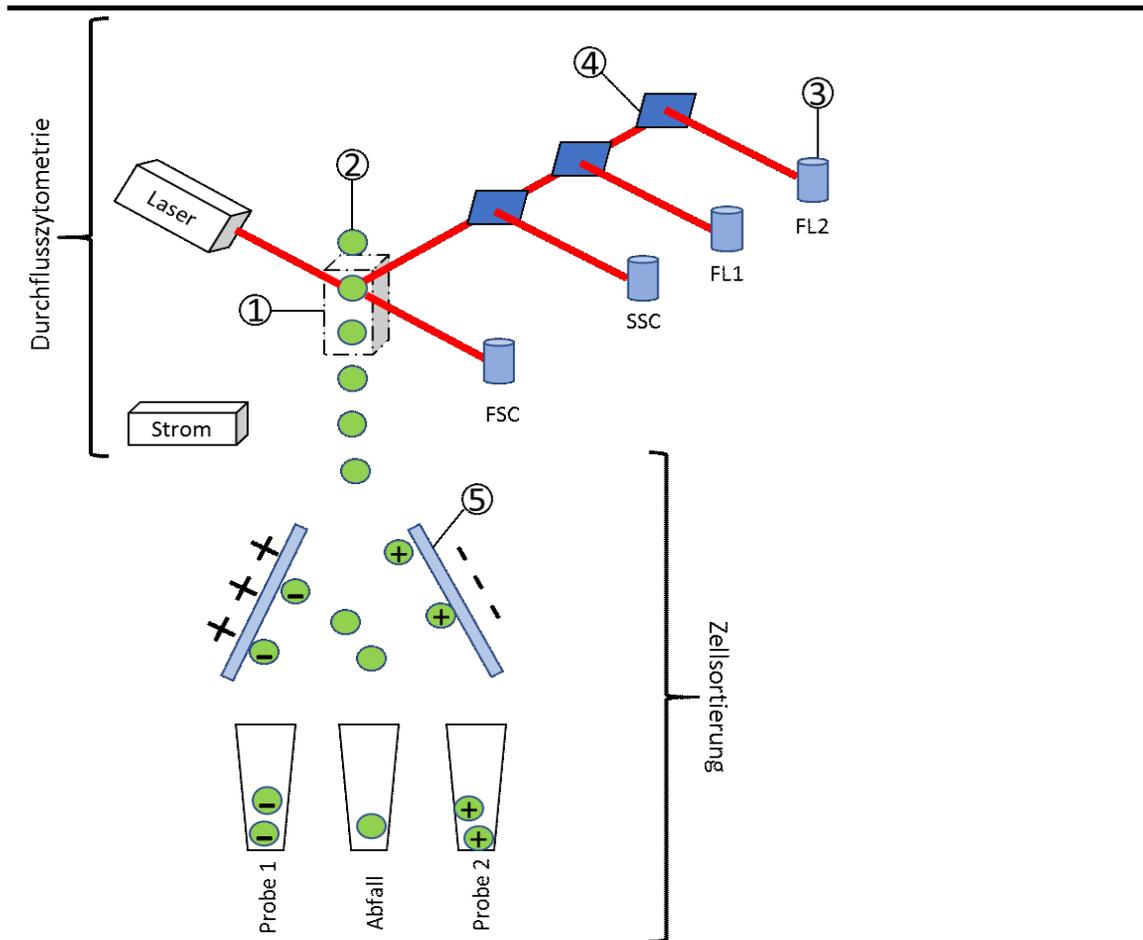
## **4.2 Fluorescence Activated Cell Sorting**

Die Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) -Analyse sowie die durchflusszytometrische Zellsortierung sind zur Qualitätssicherung nach der Isolierung von CD133<sup>+</sup> KMSZ durchgeführt worden, um sicher zu gehen, dass es sich bei den gewonnenen Zellen, um die für den Versuch notwendigen KMSZ handelt.

---

### 4.2.1 Grundprinzip

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, das auf dem Prinzip des erzeugten Streulichts und Fluoreszenzsignalen der Zellen basiert (Abb. 4). Die Zellen durchlaufen nacheinander („Gänsemarsch“) eine Messkammer, die zusätzlich von einem Laser einer monochromatischen Lichtquelle bestrahlt wird. Trifft der Laser auf eine Zelle, entsteht ein Streulicht, das von Detektoren gemessen wird. In Abhängigkeit des Winkels der Detektorenposition, erhält man unterschiedliche Informationen. Das Vorwärtsstreulicht (engl. Forward Scatter/ FSC) misst die Lichtbrechung in einem flachen Winkel und ist von der Zellgröße abgänglich. Das Seitwärtsstreulicht (engl. Side Scatter/ SSC) detektiert die Lichtstreuung im 90° Winkel und hängt von der Granularität der Zelle ab. Durch diese zwei Parameter lassen sich die Zellen dennoch nicht zweifelsfrei charakterisieren, so dass zusätzlich fluoreszenzmarkierte Antikörper eingesetzt werden. Durch ihre spezifische Bindung an Oberflächen- und intrazelluläre Antigene ermöglichen die Antikörper eine selektive Zellanalyse. Die Antikörper gekoppelten Fluorophore besitzen ein spezifisches Absorptionsspektrum. Dieses wird durch den Laser angeregt und die Lichtemission durch Detektoren (FL1, FL2...) gemessen. Farbteilerspigel sorgen hierbei für eine optische Trennung der unterschiedlichen Emissionsspektren. Somit ermöglicht diese multiparametrische Analyse von Streulicht und Fluorophoren eine quantitative Vermessung und molekulare Charakterisierung von Zellen (Rothe, 2007).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Durchflusszytometrie und durchflusszytometrischen Zellsortierung (mod. nach Rothe, 2007; mod. nach Kirchner, 2016).** Die Zellen (2) durchlaufen nacheinander die Messkammer (1) und kreuzen dabei den Laserstrahl. Das entstandene Streulicht wird von Detektoren (3) registriert. Die Farbspiegel (4) sorgen für unterschiedliche Emissionsspektren. Für die Zellsortierung werden die Zellen durch eine Stromquelle elektrisch aufgeladen. Durch nachgeschaltete elektrische Platten (5) entsteht ein Spannungsfeld indem die Zellen durch ihre subfraktioniert werden. Abkürzungen: FSC: Forward Scatter, SSC: Side Scatter, FL1-2: nummerierte Detektoren.

#### 4.2.2 Prinzip des *Cellsorting*

Das *Cellsorting* beruht auf dem gleichen Prinzip wie die Durchflusszytometrie. So können anhand bereits erprobter Parameter in der Durchflusszytometrie die Zellen subfraktionieren werden. Unmittelbar hinter der Flusskammer befindet sich eine Stromquelle, die ein Spannungsfeld erzeugt. Nach der Analyse sind die jeweiligen Zellsuspensionen positiv oder negativ geladen und können beim Durchlaufen des Spannungsfeldes, entsprechend ihrer Ladung, getrennt werden. Auf diese Weise können die Zellen in drei Populationen getrennt werden. Hierbei sind zwei genau definiert und eine dritte enthält den nicht zuzuordnenden Abfall.

### 4.2.3 FACS-Färbung

Die FACS-Färbung erfolgte nach dem *MACS* und benötigt pro Färbung/Analyseröhrchen  $1 \times 10^5$  Zellen. Die Zellen wurden zuerst in 100  $\mu$ l PBS resuspendiert. Anschließend erfolgten zwei Färbungen. Die erste Färbung beinhaltete folgende Antikörper:

- Anti-CD133 als hämatopoetischer Stammzellmarker
- Anti-CD34 als hämatopoetischer Stammzellmarker
- Anti-CD45, auch als *leucozyte common antigen* bekannt und von allen hämatopoetischen Zellen, außer reifen Erythrozyten und Thrombozyten exprimiert

Antigen	Konjugat	Spezifität	Konzentration	Menge $\mu$ l/ $10^5$ Zellen
CD133	2-PE (293C3)	Human	33 $\mu$ g/ml	10
CD34	APC	Human	100 $\mu$ g/ml	5
CD45	PE-C7	Human	50 $\mu$ g/ml	2

**Tabelle 5: FACS Antikörper.**

Bei der zweiten Färbung handelte es sich um eine Isotypkontrolle. Sie diene als Negativkontrolle und zeigte das Ausmaß unspezifischer Bindungen. Es handelt sich hierbei um einen Antikörper, der in der gleichen Spezies generiert wurde und den gleichen Subtyp aufweist wie der markierende Antikörper. Allerdings bindet er nicht spezifisch an die Zielzellen und kann somit keine Zellpopulation markieren.

Antigen	Isotyp	Spezifität	Konzentration	Menge $\mu$ l/ $10^5$ Zellen
CD133	Mouse IgG2b	Human	11 $\mu$ g/ml	10
CD34	Mouse BALB/c IgA, $\kappa$	Human	500 $\mu$ g/ml	5
CD45	Mouse IgG1, $\kappa$	Human	50 $\mu$ g/ml	2

**Tabelle 6: FACS Isotyp-Antikörper**

Die in den o.g. Tabellen angegebenen Antikörpermengen wurden entsprechend der Färbung zu den Zellen pipettiert und für 10 min in Dunkelheit bei ca. 2-8 °C inkubiert. Hiernach erfolgte ein Waschschriff mit 2 ml PBS und anschließender 10-minütiger Zentrifugation mit 600 g. Der Überstand wurde verworfen, so dass nicht gebundene Antikörper entfernt und die Hintergrundsignale während der Auswertung reduziert wurden. Die Zellen wurden in 500  $\mu$ l PBS aufgenommen und analysiert. Zusätzlich wurde

auch eine ungefärbte Zellprobe (Negativkontrolle) analysiert. Für die IPRL-Versuche sollte der Anteil an CD133<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> KMSZ über 50 % betragen.

### 4.3 Isolierung von humanem plättchenreichem Plasma (PRP)

Für jeweils zwei Versuchsgruppen wurden Thrombozyten in Form von PRP benötigt: für die Inkubation von CD133<sup>+</sup> KMSZ und für die Injektion vor der CD133<sup>+</sup> KMSZ-Applikation. Hierfür benötigte man 10-12 ml Citratröhrchen frischen Blutes. Um immunologische Reaktionen zwischen PRP und CD133<sup>+</sup> KMSZ zu vermeiden, wurde das Blut postoperativ vom gleichen Patienten entnommen, der bereits auch das Knochenmark für die CD133<sup>+</sup> KMSZ Gewinnung gespendet hatte. Die bluthaltigen Citratröhrchen wurden 10 min bei 20 °C und 180 g ohne Bremse zentrifugiert, um das Plasma von Erythrozyten und Leukozyten zu trennen. Es entstanden zwei Phasen. Unten setzten sich die schweren Bestandteile wie Erythrozyten und Leukozyten ab, während sich oben das Plasma mit leichten Thrombozyten als trübe Phase darstellte. Das PRP wurde mittels Pasteurpipette vorsichtig in ein 15 ml Falcon abpipettiert.

### 4.4 Bestimmung der Thrombozytenanzahl des PRP

Vor der Verwendung des gewonnenen PRPs für einen Versuch, wurde die Thrombozytenanzahl der Probe (Tbl. 7) mit Hilfe eines Blood Cell Counter gemessen. Hierfür wurde 1 ml PRP analysiert. Beim Menschen beträgt die normale Thrombozytenzahl ca. 150 - 300 x 10<sup>3</sup>/μl. Die Thrombozytenmengen sind in Tabelle 7 dargestellt. Hierbei zeigten sich bei den Versuchsnummern 59, 74, 82, 87 erniedrigte Werte. Im Fall von Versuchsnummer 80, bei der die Stammzellen aus zwei unterschiedlichen Knochenmarkspenden zusammgelegt worden sind, wurden Thrombozyten von dem Spender (Versuchsnummer 80A) entnommen, dessen CD133<sup>+</sup> KMSZ Anteil größer war.

Nr./Spender	Thrombozyten [10 <sup>3</sup> /μl]
57	202
59	88
63	220

74	128
75	214
80A	338
81	226
82	139
83	211
87	139

**Tabelle 7:Thrombozytenanzahl der jeweiligen Versuchsnummer.**

## **4.5 Xenomodell der isoliert perfundierten Rattenleber**

In diesem Abschnitt werden der Versuchsaufbau, die Versuchsgruppen, Rattenpräparation, der zeitliche Ablauf der Versuche, Rattenpräparation und Evaluation der KMSZ Ansiedlung erläutert.

### **4.5.1 Versuchsvorbereitungen und Sensorkalibrierung**

Vor Versuchsbeginn musste das Netzgerät nach Angaben des Herstellers kalibriert werden. Dies ist für Vergleichbarkeit notwendig.

Hierfür wurde zuerst die Rollerpumpe angeschaltet, die die Kalibrierungsflüssigkeiten mit einer Geschwindigkeit von 0,2 ml/min zu den pH-, CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Sensoren beförderte. Um während des Versuchs die pH-, CO<sub>2</sub>-, O<sub>2</sub>-, Temperatur- und Druckwerte zu dokumentieren, wurde die Basic Data Acquisition Software (BDAS) am Computer parallel gestartet. Somit konnte während der Versuche eine optimale Überwachung der Leber sowie normierte Versuchsbedingungen gewährleistet werden.

Durch den zuführenden Silikonschlauch wurde der pH-Wert mit Pufferlösungen (pH 7 für den unteren Sollwert und pH 8 für den oberen Sollwert) nacheinander kalibriert. Während die Pufferlösungen den Sensor 1-2 min umspülten, gab die Netzgerätanzeige im *pH-Measurement modul* den entsprechenden pH-Wert der Pufferlösung wieder, so dass pH 7 als *Lower Calibration Point* und pH 8 als *Higher Calibration Point* im BDAS Programm bestätigt wurden.

Für die Kalibrierung des Sauerstoffs wurde für den unteren Sollwert von 0 der O<sub>2</sub> Sensor mit *Zero Oxygen Solution* 1-2 min gespült. Für den oberen Sollwert von 668 wurde das Carbogenventil geöffnet, so dass in den Silikonschlauch die Gasmischung aus 95 % O<sub>2</sub>

---

und 5 % CO<sub>2</sub> einströmen konnte. Sobald die Sollwerte entsprechend der Zielwerte eingestellt waren, wurden die *Elektronic Voltage* Werte für die anschließende Kalibrierung von CO<sub>2</sub> notiert, sowie die Sauerstoffwerte im BDAS Programm bestätigt.

Zur Festlegung der Sollwerte für CO<sub>2</sub> wurde im *Electrometer modul* der *Measure*-Schalter auf *Simulate1* umgelegt, der oben notierte *Elektronic Voltage* Wert für den *Lower Calibration Point* eingestellt und im BDAS-Programm bestätigt. Das gleiche Vorgehen ist auch für den *Higher Calibration Point* unter *Simulate 2* durchgeführt worden.

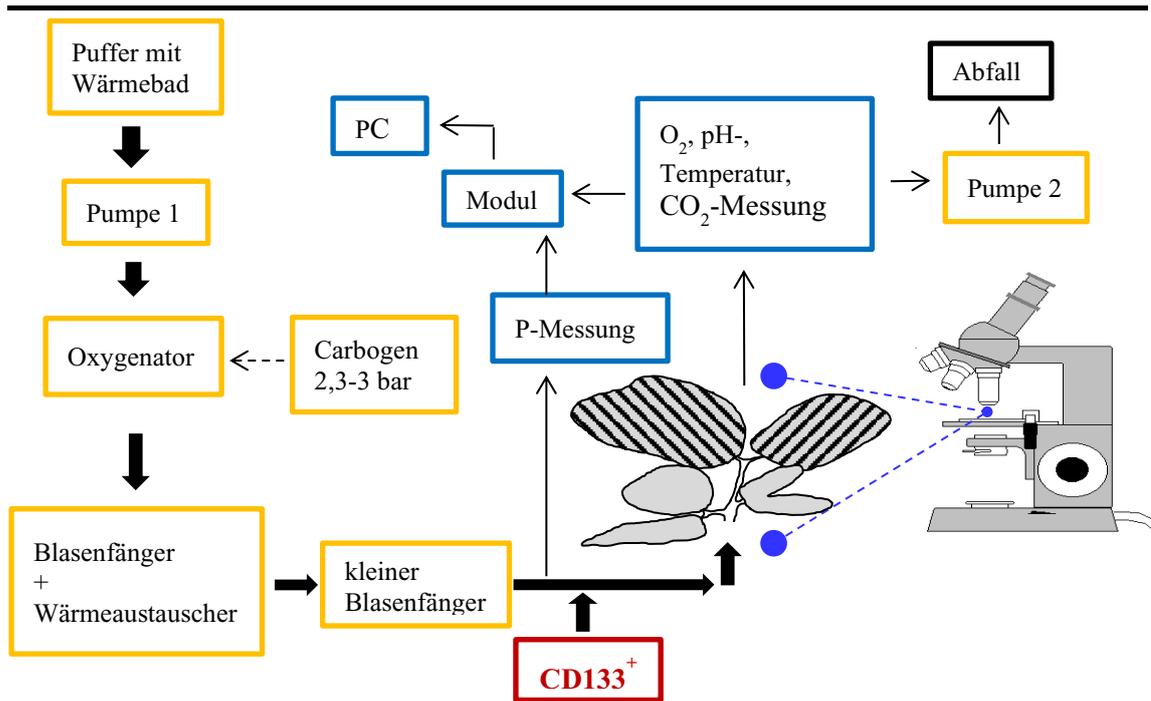
Um die Drucksollwerte speichern zu können, musste zuerst der zum Druck-Port führende Silikonschlauch blasenfrei mit Aqua dest. gespült werden. Die Flussgeschwindigkeit wurde auf ca. 20 ml/min gestellt, die gleichzeitig die Durchschnittsflussgeschwindigkeit für die Versuche darstellte. Für den *Lower Calibration Point* wurde die Flussgeschwindigkeit gestoppt, die zuführende Kanüle zur Tierleber in Höhe des OP-Tisches gehalten und der Auto-Schalter umgelegt. Sobald die rote Lampe über dem Schalter erlosch, wurde die Flussgeschwindigkeit gestartet. Bei Umlegen des *Measure*-Schalters auf *OFF* wurde der *Lower Calibration Point* und bei Umschalten auf *Call* der *Higher Calibration Point* festgelegt.

Nach dem Einschalten des beheizten OP-Tisches wurde der Temperatursensor auf diesem platziert, um die eingestellte Temperatur von 36-37 °C konstant zu halten, und im BDAS-Programm bestätigt.

Parallel zur Kalibrierung wurde der Oxygenator mit Aqua.dest mindestens 30 min blasenfrei durchgespült.

### **4.5.2 Versuchsaufbau des *Single Pass Systems***

Für das Xenomodell einer isoliert perfundierten Rattenleber ist der in Abbildung 5 dargestellte Versuchsaufbau etabliert worden. Es handelte sich hierbei um ein *Single Pass System*, also ein nicht zirkulierendes Perfusionssystem. In diesem Abschnitt wird die Flussrichtung des KHP, der als physiologischer Puffer für die Ratteneber dient, vor und nach der Leberperfusion erläutert.



**Abbildung 5: Versuchsaufbau des IPRL-Modells.** Die Pfeilrichtung stellt die Flussrichtung des KHP im *Single Pass* System dar. Geräte im gelben Rahmen sind für eine adäquate und blasenfreie Perfusion zuständig. Die dicken Pfeile repräsentieren den Flussweg vom Puffer im Wärmebad, über Pumpe 1, Oxygenator, Blasenfänger bis in die Rattenleber, die dünnen Pfeile repräsentieren die Flussrichtung zu den Sensoren (blauer Rahmen) und anschließend zum Abfallbehälter (schwarzer Rahmen). Der schraffierte Pfeil repräsentiert die CO<sub>2</sub>-Zufuhr in den Oxygenator. Die schraffierte Abbildung der Leberlappen stellt die 70% Ligatur der Leber dar. Die perfundierte Rattenleber wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop platziert, um die CD133<sup>+</sup>KMSZ beobachten zu können.

Der KPH wurde in eine 1 l und eine 2 l Glasflasche aufgeteilt. Beide wurden in Wasserbädern auf 36-37° C erwärmt, für das Perfusionssystem wurde der Puffer aus der 1 l Flasche bezogen, die aus der 2 l Flasche nachgefüllt wurde. Für die pufferführenden Schläuche und Verbindungsstücke wurden Tygon®-Schläuche und Silikonschläuche verwendet, da diese sauerstoffundurchlässig sind. Der KHP wurde folgendermaßen aus der Glasflasche in die Leber befördert: über eine serologische Pipette, die über einen Silikonschlauch an zwei Tygon-Schläuche der Rollerpumpe angeschlossen war, konnte der Puffer mit einer bestimmten Flussgeschwindigkeit aufgezogen werden. Über einen weiteren Silikonschlauch wurde der KHP in einen Hämofilter-Oxygenator gepumpt. Hier wurde der Puffer mit Sauerstoff angereichert, da der Oxygenator von einer Carbogenflasche (5 % CO<sub>2</sub>/ 95 % O<sub>2</sub>) mit einem Druck von 3 bar versorgt wurde. Vom Oxygenator gelangte der Puffer über den nächsten Silikonschlauch in eine große Blasenfalle, die zusätzlich über Schläuche vom Ecoline Wasserbad als Wärmeaustauscher fungierte. Auf diese Weise wurden die aus dem Oxygenator kommenden Luftblasen aufgefangen, um eine Luftembolie im Lebergewebe zu verhindern. Zusätzlich wurde die Puffertemperatur bei 36-37 °C konstant gehalten. Bevor

---

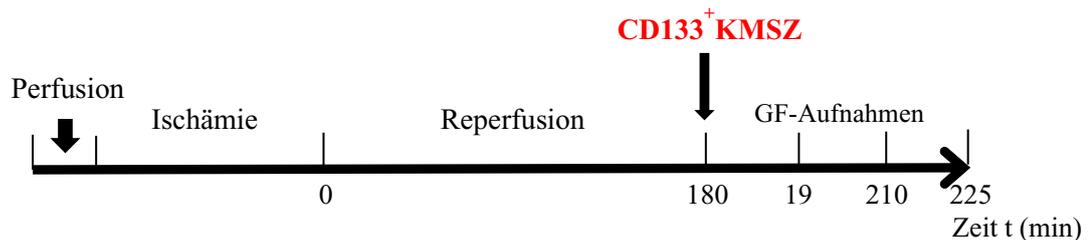
der Puffer die Rattenleber erreichte durchlief dieser eine kleinere Blasenfalle, die über eine Montage am OP-Tisch befestigt wurde. Von dieser Blasenfalle wurde der Puffer in zwei Richtungen geleitet: jeweils über einen Silikonschlauch zum Port der Druckmessvorrichtung des Netzgerätes und andererseits zur Rattenleber. Für die Kanülierung der Rattenleber wurde ein Abbocath G16 verwendet. Die Kanüle wurde zur Hälfte gekürzt und in den Silikonschlauch so eingesetzt, dass das zur Kanülierung verwendete Ende in die Portalvene eingeführt werden konnte. Nach der Leberpassage wurde der Puffer über die gleiche Vorrichtung aus Abbocath G16 mit Silikonschlauch aus der Vena cava superior herausbefördert. Durch ein eingebautes T-Verbindungsstück entstanden zwei Flussrichtungen. Die eine führte den Puffer direkt zum Abfallbehälter. Durch die zweite Flussrichtung wurde der Puffer von einer Rollerpumpe mit einer Geschwindigkeit von 0,2 ml/min zu drei Sensoren geführt. Diese registrierten jeweils den pH-, O<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Gehalt und leiteten die Daten über das Netzwerk zum Computer weiter.

Für die Applikation der CD133<sup>+</sup> KMSZ in die Tierleber wurde in den zur Portalvene zuführenden Silikonschlauch ein dickerer Gummischlauch eingesetzt. Dieser diente als Injektionsstelle und konnte mehrfach benutzt werden, ohne das Perfusionssystem zu behindern. Damit Druckschwankungen die Qualität der Kameraaufnahmen beim *In situ Imaging* nicht störten, wurde eine Perfusorpumpe 11 Elite verwendet. Somit konnten die in eine 1 ml Spritze aufgezogenen Zellen mit einer gleichbleibenden Flussgeschwindigkeit von 250 µl/min in die Tierleber injiziert werden.

### **4.5.3 Zeitlicher Ablauf der Versuche**

Ein genauer zeitlicher Ablauf (Abb. 6) ist festgelegt worden, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleisten zu können. In den jeweiligen Zeitabschnitten erfolgte gleichzeitig die Dokumentation der Perfusionsparameter mittels BDAS. Die Zeitmessung beginnt mit der Kanülierung der Rattenleber.

In den ersten 10 min wurde die Rattenleber durch die Präparation und Kanülierung an das Perfusionssystem angeschlossen, um eine gleichmäßige Leberperfusion zu gewährleisten. Dieser Zeitraum wurde als „basal“ bezeichnet. Die anschließende 30-minütige Leberischämie wurde durch einen Perfusionsstopp erzeugt. Nach 180-minütiger Reperfusion erfolgte die Injektion der CD133<sup>+</sup> KMSZ entsprechend den festgelegten Bedingungen der Versuchsgruppen (t0 bis t180). Im Rahmen des *In situ Imaging* wurden in den folgenden 15 min, 30 min und 45 min jeweils 10 Gesichtsfeldaufnahmen (GF) mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops durchgeführt (t180 bis t225).



**Abbildung 6: Zeitlicher Versuchsablauf.** Der Versuchsablauf beginnt mit einer 10-minütigen Organperfusion, anschließender 30-minütiger Ischämie, sowie erneuter 180-minütiger Reperfusion. Die Zeitangabe (t) beginnt ab der Organreperfusion. Die Injektion der CD133<sup>+</sup> KMSZ erfolgt nach der Reperfusion zum Zeitpunkt t 180. In den drei folgenden 15-minütigen Zeitabschnitten, jeweils bezeichnet t 15/30/45 min, erfolgen die Gesichtsfeldaufnahmen.

### 4.5.4 Festlegung der Versuchsgruppen

Um den Einfluss der Thrombozyten auf das *Homing* der CD133<sup>+</sup> KMSZ untersuchen zu können, wurden drei Versuchsgruppen mit je fünf Rattenversuchen durchgeführt. Hierfür wurden  $2 \times 10^5$  CD133<sup>+</sup> KMSZ für 10 min bei 20 °C und 300 g ohne Bremse zentrifugiert und der MACS-Pufferüberstand verworfen. Es erfolgte eine Resuspension mit 1ml KHP, so dass die Zellen zur Injektion in eine 1 ml Spritze aufgezogen werden konnten. Folgende Versuchsgruppen wurden festgelegt:

- 1.) CD133<sup>+</sup> KMSZ Injektion ohne PRP:  $2 \times 10^5$  CD133<sup>+</sup> KMSZ wurden in KHP resuspendiert und in die IPRL injiziert.
- 2.) CD133<sup>+</sup> KMSZ Injektion nach PRP: zuerst wurden 3 ml PRP in die Rattenleber injiziert und anschließend  $2 \times 10^5$  CD133<sup>+</sup> KMSZ in KHP appliziert.
- 3.) CD133<sup>+</sup> KMSZ Injektion mit PRP:  $2 \times 10^5$  CD133<sup>+</sup> KMSZ wurden in 1 ml RPR 15 min inkubiert und anschließend über eine 1 ml Spritze in die Tierleber injiziert.

---

#### 4.5.5 Rattenpräparation

Für das Xenomodell verwendete man gezielt Ratten, um immunologische Interaktionen zwischen den CD133<sup>+</sup> KMSZ und humanem Gewebe- und Blutbestandteilen zu vermeiden. Aus dem gleichen Grund wurde für die Rattenperfusion der Krebs-Henseleit-Puffer verwendet, der außer einem Grundbedarf an Elektrolyten und Energielieferanten für die Leber keine weiteren Blutbestandteile beinhaltet. Nach der genauen Gewichtbestimmung der Ratte wurde das Gewicht der Tierleber bestimmt. Die Perfusionsgeschwindigkeit wurde entsprechend dem Gewicht der Tierleber angepasst und mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Perfusionsgeschwindigkeit} = \text{Lebergewicht (in g)} \times 3,75$$

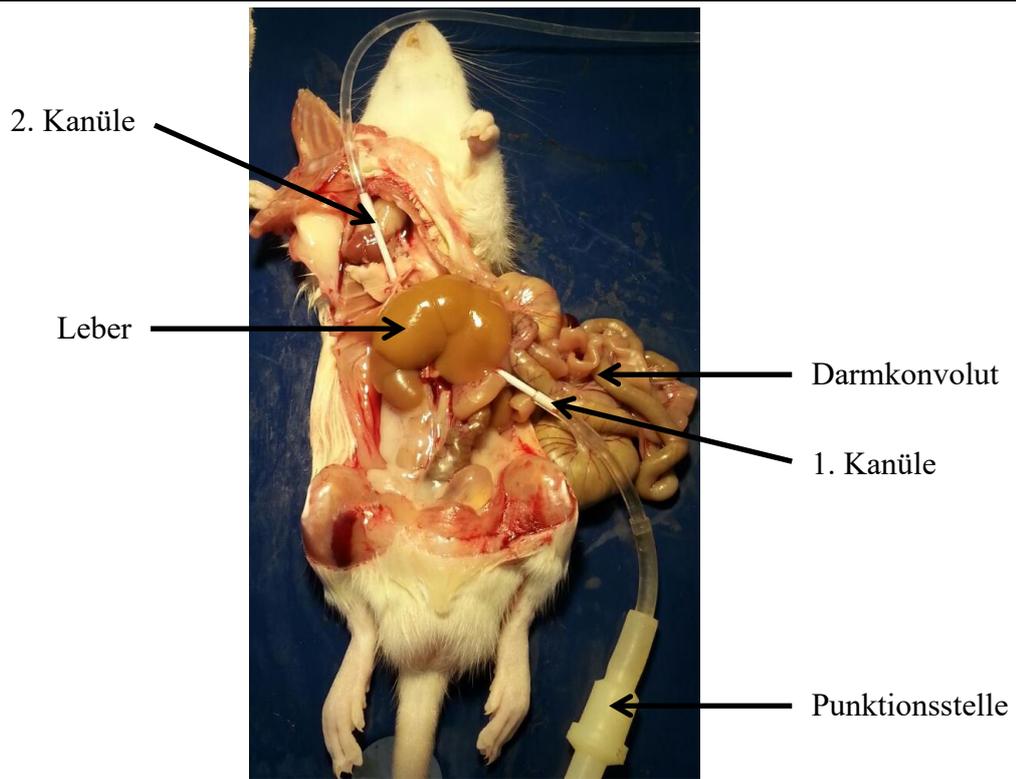
Damit das Tier während des Versuchs nicht auskühlt, wurde es für die Präparation und die gesamte Versuchsdauer auf einem elektrisch beheizten OP-Tisch platziert.

Für die Narkose der Ratte wurden 0,2 ml Ketavet und 0,04 ml Rompun in eine 1 ml Spritze aufgezogen und subcutan in die Flanke gespritzt.

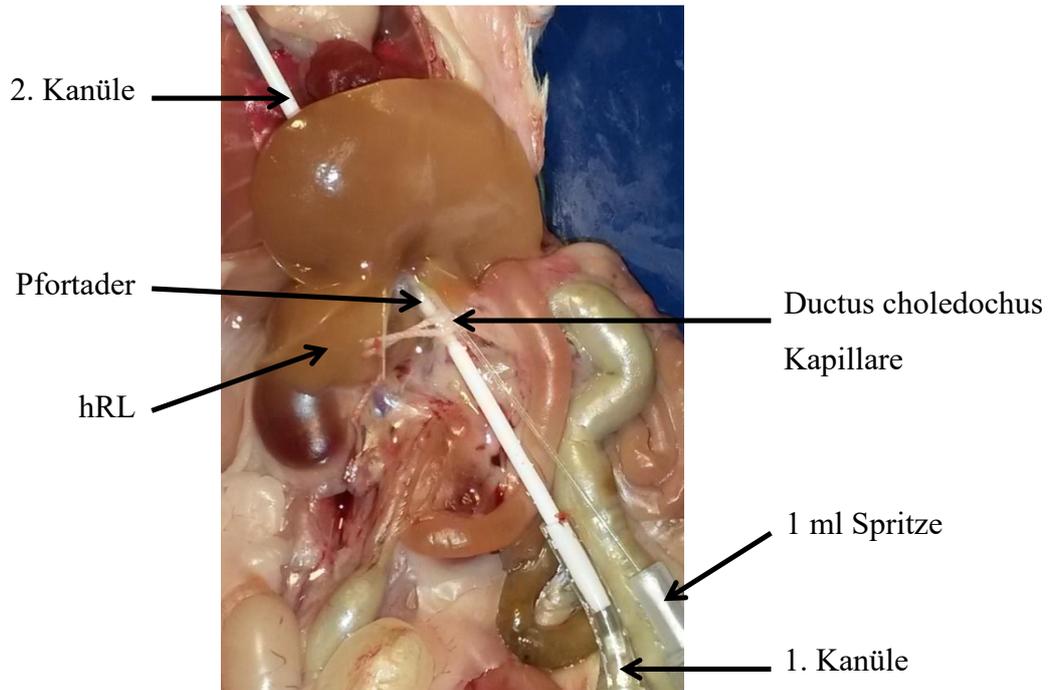
Für die Präparation wurde zuerst sichergestellt, dass das Tier durch die Narkose tief narkotisiert war. Damit bei der Präparation keine Fellhaare in den Situs gelangen konnten, wurden der Bauch und die Brust des Tieres mit Paraffin eingerieben. Mit einer chirurgischen Pinzette wurde die Haut im rechten Flankenbereich hochgezogen und vorsichtig mit einer stumpfen Schere abgeschnitten, so dass man darunter die Vena femoralis erkennen konnte. 10 ml Heparin-Natrium-25000 wurden in einem Verhältnis von 1:5 mit 0,9 % NaCl verdünnt, so dass die Heparinkonzentration 1000 IE/ml betrug. Von dem vorbereiteten Heparin wurden 0,1-0,2 ml in die Vena femoralis injiziert, um im Verlauf die Blutgerinnung in den Gefäßen und Organen zu vermeiden. Danach wurden die Kutis, Subkutis und subkutanes Fettgewebe vom Beckenknochenrand bis in die Abdominalhöhle mit einer stumpfen Schere vorsichtig aufgeschnitten. Von dieser Stelle wurde der Schnitt U-förmig zu beiden Seiten nach lateral vergrößert und die Abdominalhöhle bis zum Brustkorb eröffnet, ohne dabei die Thoraxhöhle zu verletzen. Der abgeschnittene Hautlappen wurde nach oben auf den Brustbereich geklappt. Um die Portalvene und die Vena cava inferior (VCI) freizulegen, wurden Magen und Gastrointestinaltrakt vorsichtig zur linken Seite der Ratte aus der Bauchhöhle verlagert. Damit die Rattenleber an das Perfusionssystem angeschlossen werden konnte, wurde

---

zuerst die Portalvene kanüliert. Mit einer spitzgebogenen Pinzette wurden zwei Garnligaturen um die Portalvene und eine Ligatur um die VCI gelegt, aber die Knoten noch nicht festgezogen. Die Pufferflussgeschwindigkeit wurde auf 5-10 ml/min herabgesetzt, damit die Kanüle beim Einführen in die Vene nicht durch den Perfusionsdruck herausrutscht. Die Portalvene wurde mit einer anatomischen Pinzette fixiert und durch eine Mikroschere angeschnitten, so dass anschließend die pufferzuführende Kanüle in die Vene eingeschoben werden konnte. Zum Befestigen der Perfusionskanüle wurden jetzt in der Ligatur Doppelknoten geknüpft. Zum Ausbluten der Ratte wurde die VCI unterhalb der Ligatur aufgeschnitten, das Zwerchfell mit einer spitzen Schere aufgeschnitten und das Tier durch einen Schnitt ins Herz euthanasiert. Das Blut konnte jetzt ohne eine Gefäßstauung frei austreten. Somit konnte die Perfusionsgeschwindigkeit auf den für die Leber errechneten Wert erhöht werden. Die VCI wurde mit einem Doppelknoten der Ligatur verschlossen und das Programm zur Überwachung der Leberparameter gestartet. In einem Zeitraum von 10 min erfolgte der Anschluss der Rattenleber an das Perfusionssystem, sowie die Stabilisierung der Perfusionsparameter. Nach dem Eröffnen des Zwerchfells wurde der Brustkorb an den Seiten vorsichtig mit einer Schere bis zum Kinn aufgeschnitten und abpräpariert. Um die freigelegte Vena cava superior (VCS) wurden zwei Garnligaturen mit nicht vollständig geknüpften Knoten gelegt. Das Herz wurde mit einer Pinzette angehoben, um die VCS mit einer Mikroschere anzuschneiden und die abführende Perfusionskanüle einzuführen. Zur Fixierung der Kanüle wurden jeweils Doppelknoten in den Ligaturen geknüpft und die errechnete Perfusionsgeschwindigkeit für die Tierleber eingestellt. Nachdem die Rattenleber an das Perfusionssystem angeschlossen wurde (Abb. 7), präparierte man mit einer spitzen Pinzette den Gallengang im Pankreasgewebe. Mit der anatomischen Pinzette wurde der Gallengang festgehalten und mit der Mikroschere angeschnitten, um eine 24G Kanüle einzuführen. Anschließend wurde auf die Kanüle eine 1 ml Spritze aufgesetzt, um die produzierte Gallenmenge während des gesamten Versuchs messen zu können (Abb. 8). Für die weitere Perfusionsdauer wurde sichergestellt, dass die Leber sich in ihrer ursprünglichen Situsposition befindet.

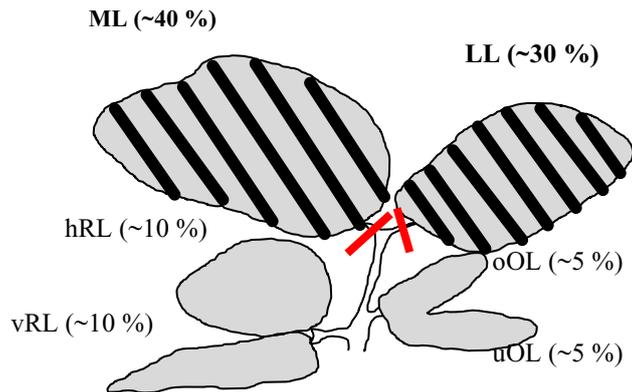


**Abbildung 7: Xenomodell der IPRL.** Dargestellt ist eine bereits für den Versuch präparierte Ratte. Die 1. Kanüle wurde in der Pfortader positioniert. Die Punktionsstelle an der 1. Kanüle ermöglicht die Injektion von CD133<sup>+</sup>KMSZ in den Pufferfluss. Der Leberabfluss wurde gewährleistet durch die 2. Kanüle, die nach dem Eröffnen des Thorax in der V. cava superior positioniert wurde.



**Abbildung 8: Nahaufnahme der perfundierten Rattenleber.** Die Abbildung zeigt in einer Nahaufnahme die 1. Kanüle, die den KHP-Puffer über die Pfortader in die Tierleber hineinpumpt. Daneben ist der kanülierte Ductus choledochus sowie eine 1 ml Spritze zum Auffangen von Gallenflüssigkeit. Sichtbar ist der hRL, der gezielt in den Versuchsgruppen untersucht wurde.

Die eröffnete Körperhöhle wurde mit Frischhaltefolie abgedeckt, um ein Austrocknen der Organe zu vermeiden. Das Tier wurde anschließend in der gewünschten Lage fixiert. Um die Temperatur im Tiersitus überwachen zu können, wurden die Temperatursensoren unterhalb der Leber vorsichtig, ohne das Organ zu verletzen, platziert und fixiert. Im Zeitraum von 85-100 min nach Versuchsbeginn wird eine 70 % Ligatur der Rattenleber durchgeführt, um das Perfusionsgebiet für die anschließende CD133<sup>+</sup> KMSZ Injektion einzugrenzen und um die Wahrscheinlichkeit für die Einzelereignisse der Zellenansiedlung zu erhöhen. Dies erfolgte durch eine Ligatur der zuführenden Gefäße vom mittleren und linken Leberlappen mittels Vicryl 0-5 (s. Abb. 9). Entsprechend dem reduzierten Perfusionsgebiet von ca. 30 % wird auch die Perfusionsgeschwindigkeit auf durchschnittliche 3,5 ml/min herabgesetzt.



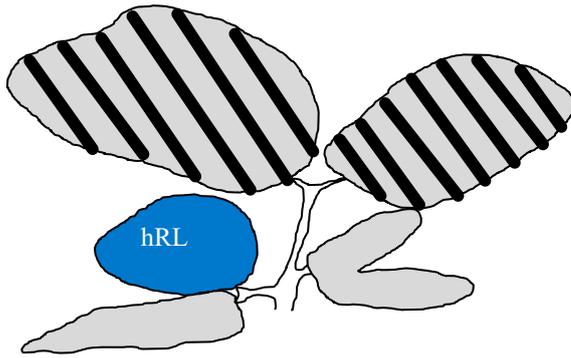
**Abbildung 9: Schematische Darstellung der 70 % Ligatur der Rattenleber.** Hierfür wurden zwei Ligaturen aus Vicryl 0-5 verwendet. Es wurde jeweils eine Ligatur für den mittleren Lappen (ML) und eine für den linken Lappen (LL) verwendet. Dargestellt sind weiterhin der hintere rechte Leberlappen (hRL), der vordere rechte Leberlappen (vRL), sowie der obere und untere omentale Leberlappen (oOL, uOL) mit ihren prozentualen Volumina an der Rattenleber.

Nach der 70% Ligatur erfolgte zum Zeitpunkt  $t$  240 die Injektion der  $CD133^+$  KMSZ entsprechend den Versuchsgruppen, sowie das folgende In situ Imaging zur Detektion der KMSZ in der Rattenleber. Die Rattenleber wurde während des ganzen Versuchs *in Situ* belassen, um eine Schädigung des Organs und eine Änderung seiner natürlichen Lage möglichst gering zu halten.

#### 4.5.6 In situ Imaging

Um die Ansiedlung von fluoreszenzmarkierten  $CD133^+$  KMSZ in Echtzeit in der IPRL nachverfolgen zu können, wurde eine 3CCD Colour Video Kamera auf das Olympus Fluoreszenzmikroskop montiert. Diese stand in Verbindung mit einem Computer durch ein ApCam-Programm, das für die Aufnahmen sowie ihre Speicherung zuständig war.

Bevor die Injektion der markierten KMSZ oder Thrombozyten stattfinden konnte, wurde das Versuchstier mit dem OP-Tisch unter dem Fluoreszenzmikroskop platziert. Wegen der geringen Form- und Lagevariabilität ist entschieden worden die Aufnahmen vom hRL der Tierleber aufzuzeichnen (Abb. 8 und 10).



**Abbildung 10: Darstellung des Ziellappens für die Kameraaufnahmen.** Die schraffierte Fläche stellt die 70 % Ligatur dar. Mit blau ist der hintere rechte Leberlappen (hRL) markiert.

Hierfür wurde auf der ventralen Seite des hRL ein Deckgläschen so positioniert, dass eine möglichst große Gewebefläche für die Aufnahmen dargestellt werden konnte. Die Gesichtsfeldeinstellung wurde mit einem 10x Objektiv eines Fluoreszenzmikroskops gewährleistet. Die Injektion der CD133<sup>+</sup> KMSZ in die Tierleber erfolgte mit einer gleichmäßigen Flussgeschwindigkeit von 250  $\mu$ l/min. Auf diese Weise wurden Druckschwankungen innerhalb des Organs vermieden. Genau 15, 30 und 45 min nach der Injektion von CD133<sup>+</sup> KMSZ wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops und dem AMCap 9.2 Computerprogramm jeweils 10 Videoaufnahmen von zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern (GF) der Leber aufgenommen. Mit Hilfe dieser Kameraaufnahmen konnte einerseits die Anzahl der im Gesichtsfeld eingefangenen CD133<sup>+</sup> KMSZ bestimmt werden und andererseits konnte man zwischen den Zellpositionen im Gefäßsystem oder Parenchym der Leber differenzieren. Wenn alle Aufnahmen entsprechend der Zeitpunkte erfolgt sind, wurde der Versuch beendet und es folgte die Entnahme von Lebergewebe zum Nachweis von CD133<sup>+</sup> KMSZ durch Konfokalmikroskopie. Hiernach wurde der Kadaver im Kühlschrank tiefgefroren gelagert und zur Entsorgung in die Tierversuchsanstalt zurückgebracht.

## **4.6 Detektion von CD133<sup>+</sup> KMSZ in der explantierten Rattenleber**

### **4.6.1 Gewebeentnahme mit Kryokonservierung und Herstellung der Kryoschnitte**

Nach dem abgeschlossenen *In situ Imaging* wurde bei laufender Perfusion der hintere rechte Leberlappen (hRL) entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Schnittherstellung erfolgte die Lagerung bei -80 °C. Bei einer Kammertemperatur von -20 °C und einer Objekttemperatur von -15 °C wurden mit Hilfe eines Cryostats 3  $\mu$ m

---

Kryoschnitte vom hRL hergestellt. Die Schnitte wurden anschließend bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet und bis zur Immunfluoreszenzfärbung für die Konfokalmikroskopie bei -80 °C eingelagert.

### **4.6.2 Immunfluoreszenzfärbung mit CD45 und DAPI**

Zur Darstellung von CD133<sup>+</sup> KMSZ im Lebergewebe des hRL, wurden die Kryoschnitte mit dem Primärantikörper Anti-CD45, Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG und DAPI (Anfärbung kernhaltiger Zellen) inkubiert.

Zuerst wurden die Kryoschnitte aufgetaut und in -10 °C Aceton für 10 min fixiert. Nach der Waschung der Objektträger (3-mal für 3 min in PBS [7,4 pH]) wurden die zu färbenden Areale mit einem Fettstift umrandet. Hiernach erfolgte für 45 min bei Raumtemperatur das Blocken von unspezifischen Bindungsstellen an der Zelloberfläche. Dafür wurde ein 20 % Blockier-Puffer verwendet, der aus PBS (pH 7,4) und *goat serum* in einem Verhältnis von 4:1 vorbereitet wurde. Anschließend wurden 4 µg/ml Primärantikörper 1:50 in 10 % Blockier-Puffer verdünnt und auf die Kryoschnitte pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei Raumtemperatur wurden die Objektträger 3-mal für 3 min in PBS (pH 7,4) gewaschen. 4 µg/ml des Sekundärantikörpers wurden in ein Verhältnis von 1:500 mit 10 % Blocking Puffer verdünnt und nach dem Waschvorgang auf die Kryoschnitte pipettiert. Dieser Inkubationsvorgang dauerte bei Raumtemperatur 1 Stunde. Es folgte ein 3-maliger Waschvorgang der Objektträger für 3 min in PBS (pH 7,4). Als letztes erfolgte die Gegenfärbung aller Zellen für 2 min mit DAPI. Die Kryoschnitte wurden mit Vectashield und einem Deckglas abgedeckt und bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

### 4.6.3 Immunfluoreszenzfärbung mit NTCP 22, CD45 und RECA 1

Für die Konfokalmikroskopie wurden die Kryoschnitte entsprechend der Tabelle 8 angefärbt.

Struktur	Primärantikörper (Verdünnung)	Sekundärantikörper (Verdünnung)
Hepatozyten	Anti-NTCP 22 (1:200)	Alexa Fluor 546 <i>anti-rabbit</i> (1:500)
Endothelzellen	Anti-RECA-1 (1:200)	Alexa Fluor 546 <i>anti-mouse</i> (1:500)
CD133 <sup>+</sup> KMSZ	Anti-CD45 <i>mouse</i> (1:50)	Alexa Fluor 488 <i>anti-mouse</i> (1:500)
	Anti-CD45 <i>rabbit</i> (1:50)	Alexa Fluor 488 <i>anti-rabbit</i> (1:500)

**Tabelle 8: Darstellung der Primär- und Sekundärantikörper.** Für die gezielte Darstellung einer Gewebestruktur wurden die entsprechenden Antikörper verwendet und mit 2 % BSA/PBS in die richtige Konzentration verdünnt.

Zuerst erfolgte die Fixierung der Kryoschnitte. Hierfür wurden die Objektträger in -20 °C vorgekühltem Methanol für 5 min inkubiert und anschließend für 5 s. mittels Zentrifugation getrocknet. Mit einem Dako Pen wurde der Gewebeschnitt mit einer dünnen Linie umkreist, die einen Abstand von ca. 1-1,5 mm zum Gewebe hatte. Hiernach wurden die Objektträger im Waschautomat Advalytix AdvaWash mit PBS für 15 min. gewaschen. Die anschließende Blockierung der unspezifischen Bindungen erfolgte mit 2 % BSA/PBS bei Raumtemperatur für 15 min. Nach dem Trocknen der Objektträger mittels Zentrifugation wurde der Primärantikörper auf die Kryoschnitte aufgetragen. Die Inkubation erfolgte mit Advalytix Slide Booster SB450 bei 28 °C mit einer Pulse/Pause Ratio von 5:5 für 2 Stunden. Anschließend erfolgte ein erneuter Waschschrift der Objektträger im Waschautomaten mit PBS für 15 min sowie Trocknung mittels 3 s Zentrifugation. Nun wurden die Schnitte mit den Sekundärantikörpern bei 37 °C mit einer Pulse/Pause Ratio von 5:5 für eine Dauer von 30 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Kryoschnitte erneut für 15 min mit PBS gewaschen, kurz in Aqua dest. getaucht und durch Ethanol getrocknet. Nachdem sie nochmals mittels Zentrifugation getrocknet worden sind, erfolgte das Abdecken der Kryoschnitte mit 30 µl Prolong Gold

---

Eindeckmedium. Die fertiggefärbten Kryoschnitte wurden im Dunkeln waagrecht bei 4 °C gelagert.

#### **4.6.4 Konfokalmikroskopie**

Nach den durchgeführten Fluoreszenzfärbungen wurde mit Hilfe des Axioplan2 Imaging Konfokalmikroskops nach CD133<sup>+</sup> positiven Signalen im Lebergewebe gesucht und mit Hilfe des MetaSystem iris PC-Programms fotografisch festgehalten. Die konfokalmikroskopischen Darstellungen der Abbildung 36 (C-F) wurden freundlicherweise von der Forschungsabteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Uniklinik Düsseldorf aufgenommen und anschließend von uns ausgewertet.

#### **4.7 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte computergestützt mit dem BDAS-Programm und Microsoft Excel 2010. Alle Ergebnisse sind angegeben als arithmetische Mittelwerte mit Standardabweichung (StABW = *standard deviation*). Die statistische Signifikanz der Versuchsergebnisse wurde mit Hilfe des Student'schen t-Tests, sowie des Zweistichproben-t-Tests für abhängige Stichproben hinsichtlich ihrer Signifikanz überprüft. Ein Signifikanzniveau < 5% gilt als signifikant. Signifikanzwerte von 0,1-1% werden als hoch signifikant und unterhalb von 0,1% als höchst signifikant bezeichnet.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Laborparameter der CD133+ KMSZ-Spender

#### 5.1.1 Patientenalter

Tabelle 9 zeigt das durchschnittliche Alter der Knochenmarkspender.

VG 1	59,4 ± 14,47 Jahre
VG 2	57,8 ± 17,24 Jahre
VG 3	58,8 ± 8,29 Jahre

**Tabelle 9: Patientenalter.** Die Tabelle zeigt das durchschnittliche Patientenalter der Versuchsgruppen zum Zeitpunkt der KMSZ-Entnahme angegeben in Jahren.

#### 5.1.2 CRP, Kreatinin, GFR und Harnstoff.

Vor der Knochenmarkentnahme lagen die durchschnittlichen Werte für das C-reaktive Protein (CRP) im Bereich von 0,4-1,68 mg/dl. Nach der Knochenmarkentnahme bzw. dem operativen Eingriff stieg der Wert in den Bereich von 5,44-8,14 mg/dl. Der Kreatininspiegel zeigte in allen drei VG einen postoperativen Anstieg. Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) zeigte nach der KM-Entnahme in der VG 1 einen Werteanstieg, wohingegen in den VG 2 und 3 ein Werteabfall registriert wurde. Der Harnstoff zeigte nach der KM-Entnahme in den VG 1 und VG 3 einen Werteanstieg, wohingegen in der VG 2 ein Werteabfall registriert wurde (Tab. 10).

		VG 1	VG 2	VG 3
CRP [mg/dl]	Prä	1,68 ± 1,7	0,4 ± 0,2	1,02 ± 0,65
	Post	8,14 ± 3,37	5,44 ± 1,28	6,78 ± 6,23
Kreatinin [mg/dl]	Prä	0,92 ± 0,24	0,92 ± 0,29	0,83 ± 0,1
	Post	0,82 ± 0,22	1,06 ± 0,33	0,88 ± 0,22
GFR [ml/min]	Prä	84,4 ± 18,64	78,8 ± 20,81	89,6 ± 89,6
	Post	100 ± 33,68	73,2 ± 23,77	85,8 ± 16,02
Harnstoff [mg/dl]	Prä	25,2 ± 6,06	40,4 ± 17,04	24,6 ± 4,56
	Post	27,8 ± 9,07	40,2 ± 24,4	29,6 ± 9,4

**Tabelle 10: CRP, Kreatinin, GFR und Harnstoff.** Die durchschnittlichen CRP-, Kreatinin-, und Harnstoff-Werte (mg/dl), sowie GFR-Werte (ml/min) sind in den jeweiligen drei Versuchsgruppen (VG 1, VG 2, VG 3) berechnet worden. Prä = Laborwerte vor der Entnahme; Post = Laborwerte nach der Knochenmarkentnahme.

### 5.1.3 GOT, GPT, $\gamma$ -GT und Thrombozyten.

Die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) zeigte nach der KM-Entnahme in der VG 1 einen Abfall, wohingegen in den VG 2 und VG 3 ein Anstieg der Werte. Die Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) zeigte nach der KM-Entnahme in allen drei VG einen Werteanstieg. Sowohl die Gamma-Glutamyl-Transferase ( $\gamma$ -GT), als auch die Thrombozyten zeigten nach der KM-Entnahme in allen drei VG erniedrigte Laborwerte (Tab. 11).

		VG 1	VG 2	VG 3
GOT [U/l]	Prä	57,6 ± 77,32	24,2 ± 12,13	63 ± 87,8
	Post	54,8 ± 26,51	177,25 ± 125,31	102 ± 64,95
GPT [U/l]	Prä	35,4 ± 38,44	26,6 ± 21,97	23,4 ± 17,34
	Post	44,4 ± 37,29	161,5 ± 118,48	51,5 ± 45,3
$\gamma$ -GT [U/l]	Prä	371,2 ± 443,1	73,6 ± 91,33	53,6 ± 43,4
	Post	109,33 ± 142,02	57,25 ± 67,35	29,25 ± 24,1
Thrombozyten [x1000 l/ $\mu$ ]	Prä	249 ± 87,73	299,8 ± 82,16	223 ± 72,11
	Post	152,8 ± 71,91	197 ± 44,46	190,2 ± 74

**Tabelle 11: GOT, GPT,  $\gamma$ -GT, Thrombozyten.** Die durchschnittlichen GOT, GPT und  $\gamma$ -GT(U/l), sowie die Thrombozytenmengen (x1000 l/ $\mu$ ), sind in den jeweiligen drei Versuchsgruppen (VG 1, VG 2, VG 3) berechnet worden. Prä = Laborwerte vor der Entnahme; Post = Laborwerte nach der Knochenmarkentnahme.

### 5.1.4 Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin und Hämatokrit.

Bei allen VG wurden nach der KM-Entnahme erhöhte Leukozyten-Werte gemessen. Im Vergleich dazu waren die Werte für die Menge der Erythrozyten, Hämoglobin (Hb) und Hämatokrit (Hkt) nach der KM-Entnahme erniedrigt (Tab. 12).

		VG 1	VG 2	VG 3
Leukozyten [x1000l/ $\mu$ ]	Prä	6,4 ± 1,15	7,82 ± 1,68	7,62 ± 2,07
	Post	7,8 ± 4,01	10,34 ± 2,14	10,98 ± 3,51
Erythrozyten [x1000l/ $\mu$ ]	Prä	4,26 ± 0,82	4,26 ± 0,49	3,87 ± 0,6
	Post	3,73 ± 0,62	3,01 ± 0,43	3,288 ± 0,58
Hb [g/dl]	Prä	11,62 ± 1,16	12,72 ± 1,74	12 ± 2,01
	Post	10,14 ± 1,11	8,96 ± 0,97	10,12 ± 1,74
Hkt [%]	Prä	34,68 ± 3,06	38,94 ± 4,51	35,78 ± 5,72
	Post	30,8 ± 3,16	27,24 ± 3,37	30,08 ± 5,25

**Tabelle 12: Leukozyten, Erythrozyten, Hb, Hkt.** Die durchschnittlichen Mengen der Leukozyten und Erythrozyten [ x1000l/ $\mu$ ], das Hämoglobin [g/dl] und der Hämatokrit [%] sind in den jeweiligen drei

## Ergebnisse

Versuchsgruppen (VG 1, VG 2, VG 3) berechnet worden. Prä = Laborwerte vor der Entnahme; Post = Laborwerte nach der Knochenmarkentnahme.

### 5.1.5 Quick, aPTT, INR.

Beim Vergleich der Gerinnungsparameter zeigten sich in allen Versuchsgruppen nach der KM-Entnahme ein Abfall der durchschnittlichen absoluten Quick-Werte um ca. 20 %. Analog dazu gab es einen Anstieg der *International Normalized Ratio* (INR) und der partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) (Tab. 13).

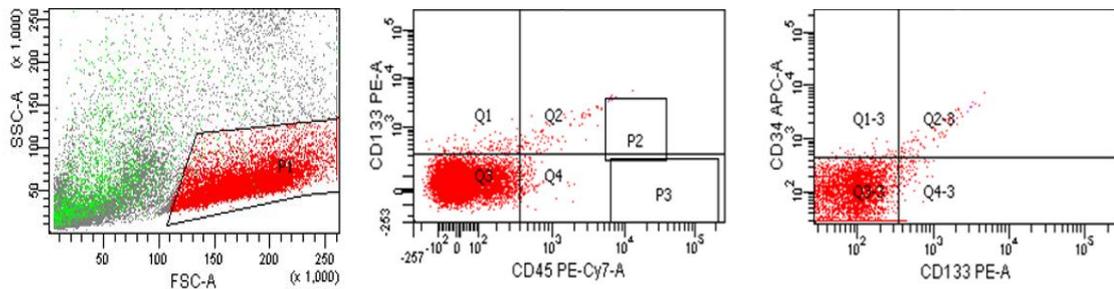
		VG 1	VG 2	VG 3
Quick [%]	Prä	95,6 ± 6,88	95 ± 10,54	96 ± 17,03
	Post	79,4 ± 7,99	73,2 ± 9,65	73,8 ± 7,16
aPTT [s]	Prä	29 ± 2,35	29 ± 2,92	28,5 ± 5,32
	Post	33,8 ± 2,28	31,6 ± 3,58	31,6 ± 4,16
INR	Prä	1,06 ± 0,05	1,04 ± 0,09	1,05 ± 0,13
	Post	1,16 ± 0,05	1,2 ± 0,12	1,22 ± 0,08

**Tabelle 13: Quick, aPTT, INR.** Die durchschnittlichen Quick-Werte [%], die aPTT-Werte [s] und die INR sind in den jeweiligen drei Versuchsgruppen (VG 1, VG 2, VG 3) berechnet worden. Prä = Laborwerte vor der Entnahme; Post = Laborwerte nach der Knochenmarkentnahme.

## 5.2 FACS-Analyse

Nach dem MACS mit PKH67 Green Fluoreszenzmarkierung wurden  $2 \times 10^5$  CD133<sup>+</sup> KMSZ, der größte Anteil der Zellen, für den IPRL-Versuch verwendet. Die restliche Zellmenge wurde für die FACS-Analyse verwendet. Bedauerlicherweise erreichte in keiner VG die restliche Zellmenge die notwendige Zellmenge von  $3 \times 10^5$ , so dass hier nur eine beispielhaft durchgeführte FACS-Analyse gezeigt wird, die eine Zellcharakterisierung nach Knochenmarkaufreinigung darstellt.

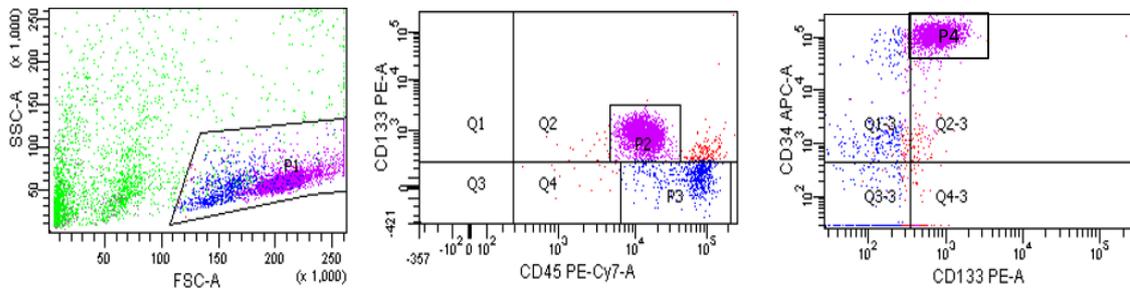
In der ungefärbten Probe (Abb. 11) konnten keine Zellen mit den Oberflächenmarkern CD45, CD133, CD34 nachgewiesen werden.



**Abbildung 11: Ungefärbte Probe.** Dargestellt sind 3 Dot Plots einer ungefärbten Probe. Im ersten Dot Plot (links) ist FSC gegen SSC aufgetragen und zeigt im festgelegten Gate P1 die Lymphozytenpopulation. Im zweiten Dot Plot (mitte) ist CD45 gegen CD133 aufgetragen. Im dritten Dot Plot (rechts) ist CD133 gegen CD34 aufgetragen. In den umrandeten Gates P2 und P3 sind keine Zellen nachweisbar.

In der gefärbten Probe (Abb. 12) wurde mittels SSC und FSC ein Gate um die Population (P1) der Lymphozyten gelegt. In der weiteren Analyse der P1-Population wurden zwei weitere Gates festgelegt: eines repräsentiert die Oberflächenmarker CD133<sup>+</sup> und CD45<sup>+</sup> Zellen (P2) und eines repräsentiert der Oberflächenmarker CD45<sup>+</sup> Zellen (P3). Zusätzlich wurden die CD133<sup>+</sup> Zellen nach Vorhandensein von CD34 analysiert (P4). Die CD133<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> Zellen entsprechen der in den IPR-L-Versuchen eingesetzten Population.

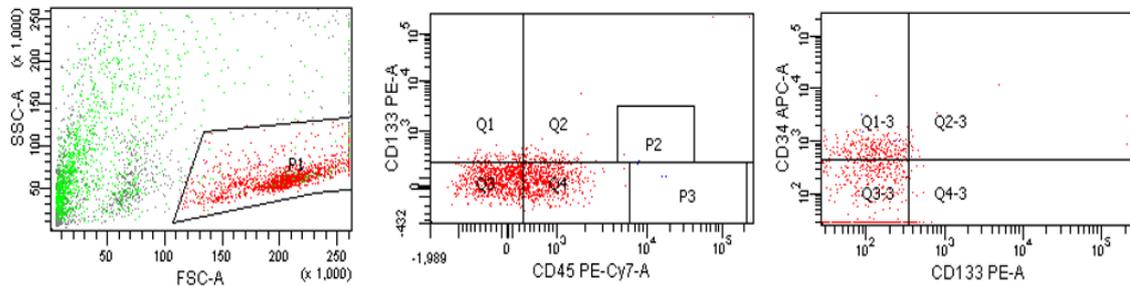
Die FACS-Analyse zeigte, dass die Zellsuspension einen Anteil von 44,5% Lymphozyten



**Abbildung 12: Gefärbte Probe.** Dargestellt sind 3 Dot Plots einer gefärbten Probe. Im ersten Dot Plot (links) ist FSC gegen SSC aufgetragen. Das hier festgelegte Gate P1 repräsentiert die Lymphozytenpopulation des aufgereinigten KM. Im zweiten Dot Plot (mitte) ist CD45 gegen CD133 aufgetragen, sowie die Populationen P2, welche die CD133<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> Zellen zeigt. Im dritten Dot Plot (rechts) ist die Population P4 der CD133<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> Zellen dargestellt.

enthält. Die P1-Population der Lymphozyten wurde anschließend auf ihre Subpopulationen untersucht. Die für CD133<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> Subpopulation-P2 hatte einen Anteil von 73,1%. Die CD 45<sup>+</sup> Subpopulation-P3 hatte einen Anteil von 21,1%. Weiterhin erkennt man, dass die farblich markierte Subpopulation-P2 für den Oberflächenmarker CD34 positiv ist (s. Abb. 12 rechts).

Die Isotypenkontrolle (Abb. 13) zeigt für alle vier Oberflächenmarker eine unspezifische Reaktion.



**Abbildung 13: Isotypenkontrolle.** Dargestellt sind 3 Dot Plots einer Isotypenkontrolle. Im ersten Dot Plot (links) ist FSC gegen SSC aufgetragen. Hier ist die Lymphozytenpopulation P1 dargestellt. Im zweiten Dot Plot (mitte) ist CD45 gegen CD133 aufgetragen. Im dritten Dot Plot (rechts) ist CD133 gegen CD34 aufgetragen. In den umrandeten Gates P2 und P3 sind keine Zellen nachweisbar.

Somit konnte festgestellt werden, dass die Population positiv auf die Oberflächenmarker CD133, CD45 und CD34 getestet wurde und die CD133/CD45 positiven Subpopulation von 73,1% für einen IPRL-Versuch geeignet war.

### 5.3 Analyse der Perfusionsparameter

In den folgenden Abschnitten sind die Kurvenverläufe der einzelnen Perfusionsparameter in den jeweiligen drei Versuchsgruppen dargestellt:

VG 1. CD133<sup>+</sup> KMSZ Injektion ohne thrombozytenreichem Plasma

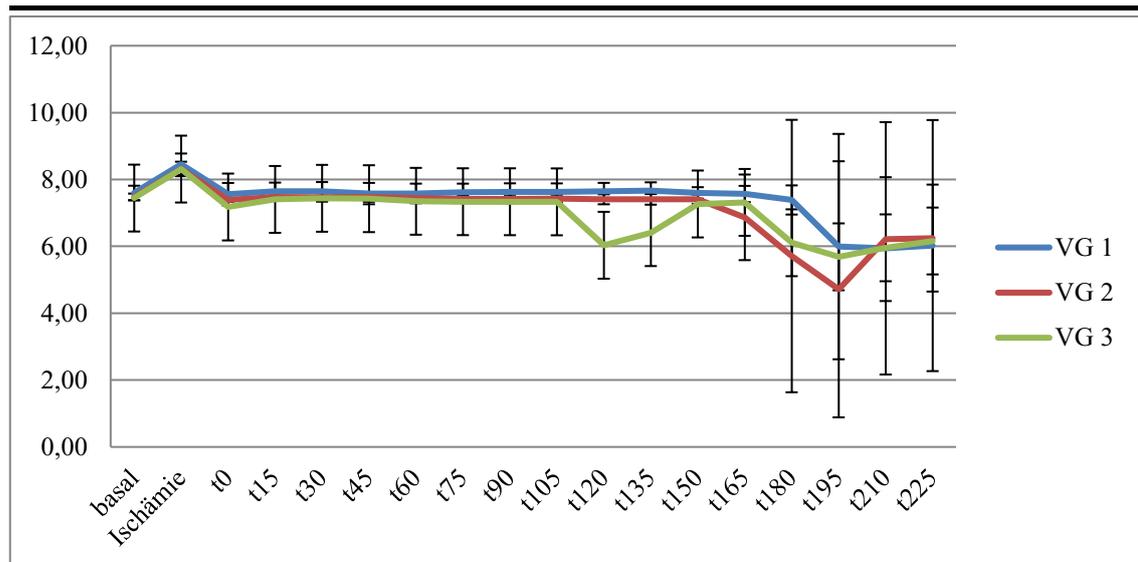
VG 2. CD133<sup>+</sup> KMSZ Injektion nach thrombozytenreichem Plasma

VG 3. CD133<sup>+</sup> KMSZ Injektion mit thrombozytenreichem Plasma

#### 5.3.1 pH-Wert

Der graphische Vergleich der pH-Werte (Abb. 14) der drei VG zeigt bis auf die Abweichungen zum Zeitpunkt t120 und t135, dass die Werte einen nahezu identischen Verlauf hatten: beginnend mit pH-Werten im Bereich von 7,44 ( $\pm 0,13$ ) bis 7,6 ( $\pm 0,22$ ) stiegen diese im Laufe der Ischämie bis zu Werten von 8,31 ( $\pm 0,25$ ) bis 8,46 ( $\pm 0,31$ ). Im weiteren Verlauf bis t165 befand sich der pH-Wert im Bereich von 6,87 ( $\pm 1,28$ ) bis 7,66 ( $\pm 0,25$ ), bis auf Abweichungen der VG 3 bei t120 und t135. Ab dem Zeitpunkt t165 sank der pH-Wert in allen drei VG in den Bereich von 4,72 ( $\pm 3,83$ ) bis 7,39 ( $\pm 0,44$ ) und stabilisierte sich anschließend zu Zeitpunkt t225 zwischen 6,02 ( $\pm 3,76$ ) bis 6,25 ( $\pm 1,6$ ).

## Ergebnisse

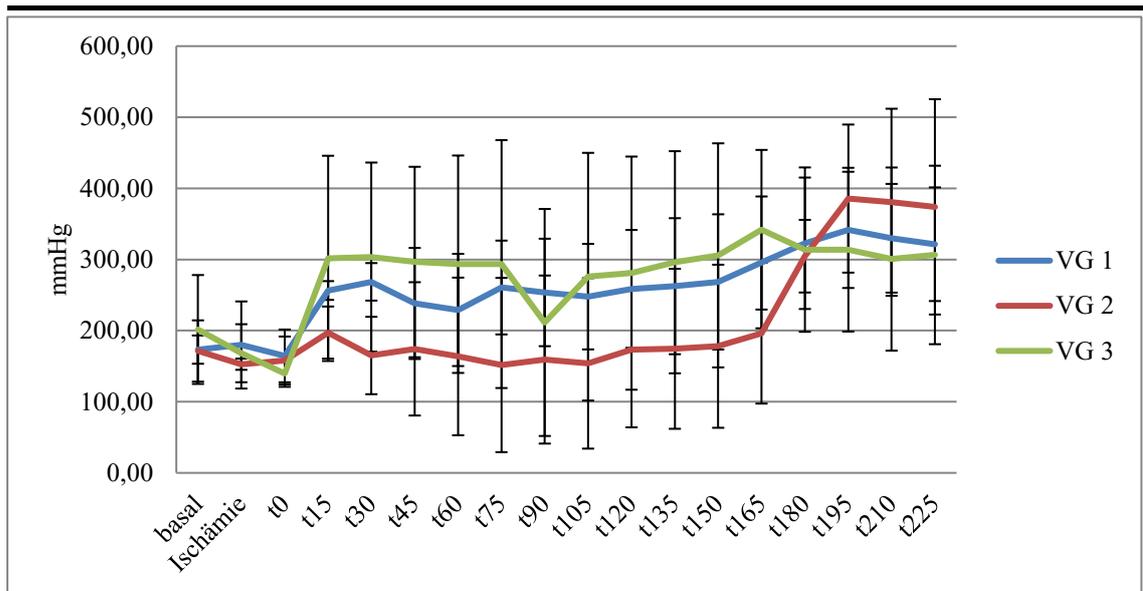


**Abbildung 14: pH-Parameter.** Dargestellt sind die pH-Mittelwerte  $\pm$  StABW der drei Versuchsgruppen (VG 1, 2, 3) in den festgelegten Zeiträumen (basal, Ischämie, t0 – t225). Man sieht einen nahezu identischen Verlauf und beachte pH-Abfall der VG 3 zum t120 und VG 2 zum t195

### 5.3.2 pO<sub>2</sub>

Bei allen drei VG lagen bis zum Beginn der Reperfusion (t0) die Sauerstoffpartialdrücke (Abb. 15) in einem Druckbereich von 152,77 ( $\pm$  7,87) bis 201,59 ( $\pm$  76,54) mmHg. Während in den VG 1 und 3 die pO<sub>2</sub>-Werte im Bereich von 229,04 ( $\pm$  78,87) bis 341,87 ( $\pm$  112,22) mmHg anstiegen, lagen die Werte der VG 2 bis t180 bei 153,93 ( $\pm$  119,82) bis 197 ( $\pm$  36,65) mmHg und erhöhten sich hiernach bis auf 385,63 ( $\pm$  104,13) mmHg.

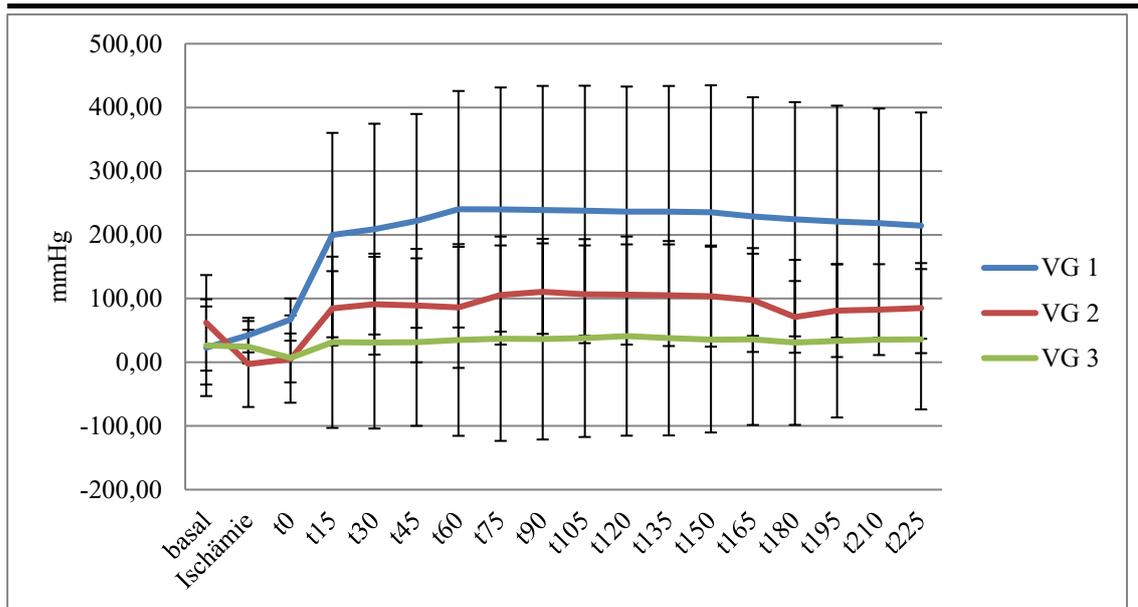
## Ergebnisse



**Abbildung 15: pO<sub>2</sub>-Parameter.** Dargestellt sind die pO<sub>2</sub> [mmHg] Mittelwerte  $\pm$  StABW der drei Versuchsgruppen (VG 1, 2, 3) in den festgelegten Zeiträumen (basal, Ischämie, t0 – t225). Zu Beginn haben alle drei VG einen nahezu identischen Verlauf. Ab dem Zeitpunkt t0 hat die VG 2 einen niedrigeren Verlaufswerte als VG 1 und 3. Ab t165 steigt der Verlauf der VG 2 an und liegt über den Verläufen von VG 1 und 3.

### 5.3.3 pCO<sub>2</sub>

Die pCO<sub>2</sub>-Werte (Abb. 16) in der VG 3 lagen, bis auf den Zeitpunkt t0 nach Ischämie mit 6,75 ( $\pm$  38,42) mmHg, in einem Bereich von 24,55 ( $\pm$  26,29) bis 41,02 ( $\pm$  156,33) mmHg. In den VG 1 und 2 zeigten die pCO<sub>2</sub>-Werte zu Anfang Drücke im Bereich von 4,97 ( $\pm$  68,55) bis 61,80 ( $\pm$  75,06) mmHg. Mit dem Beginn der Reperfusion erfolgte ein Druckanstieg: in VG 1 im Bereich von 199,63 ( $\pm$  160,43) bis 240,14 ( $\pm$  185,65) mmHg und in VG 2 bei 84,65 ( $\pm$  58,29) bis 110,58 ( $\pm$  76,05) mmHg. In allen drei Versuchsgruppen blieb der jeweilige pCO<sub>2</sub> bis t225 nahezu konstant.

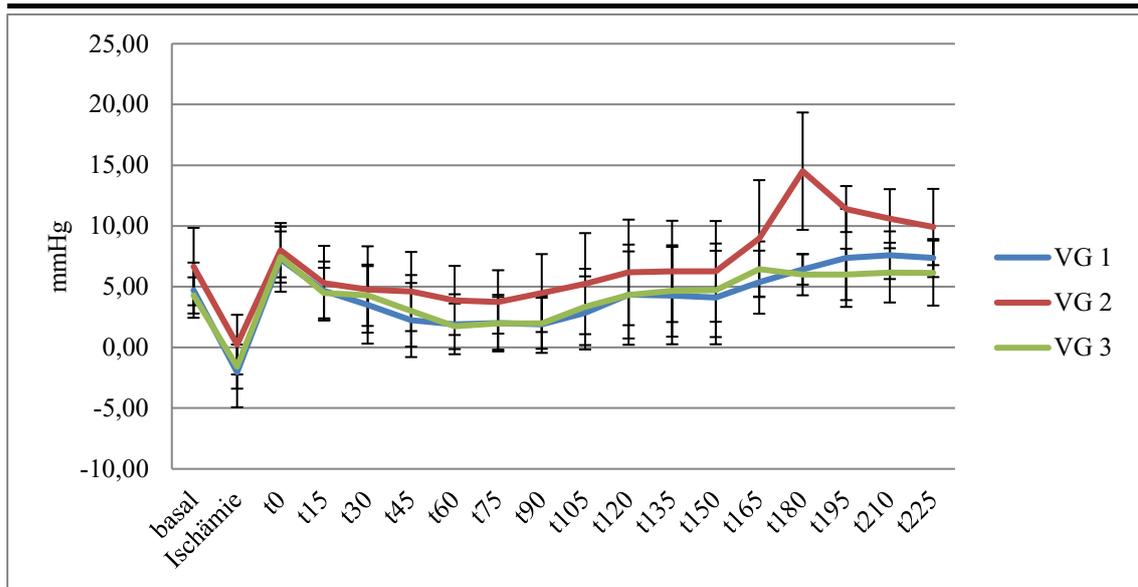


**Abbildung 16: pCO<sub>2</sub>-Parameter.** Dargestellt sind die pCO<sub>2</sub> [mmHg] Mittelwerte ± StABW der drei Versuchsgruppen (VG1, 2, 3) in den festgelegten Zeiträumen (basal, Ischämie, t0 – t225). Zu Beginn haben alle drei VG einen nahezu gleichen Verlauf. Ab dem Zeitpunkt t 0 liegt der Verlauf der VG 1 insgesamt höher als die Verläufe von VG 2 und 3.

### 5.3.4 Perfusionsdruck

Der Perfusionsdruck (PP) zeigt in allen Versuchsgruppen einen ähnlichen Verlauf (Abb. 17). Beginnend im Bereich von 4,28 (± 1,49) bis 6,65 (± 3,19) mmHg sank der PP während der Ischämie in den Bereich von ca. -1,5 (± 1,82) bis 0,23 (± 2,45) mmHg und lag zu Beginn der Reperfusion wieder höher im Bereich von 7,26 (± 2,68) bis 8 (± 2,24) mmHg. Bei allen drei VG zeigte sich im Zeitraum von t60 bis t90 ein Drucktief im Bereich von 1,74 (± 1,88) bis 4,47 (± 3,21) mmHg. Im weiteren Verlauf stiegen die Druckwerte bis t225 in den Bereich von 6,16 (± 2,46) bis 7,36 (± 1,57) mmHg, wobei in der VG 2 zum t180 ein Anstieg auf 14,51 (± 4,83) mmHg registriert wurde, der bis t225 weiter abnahm.

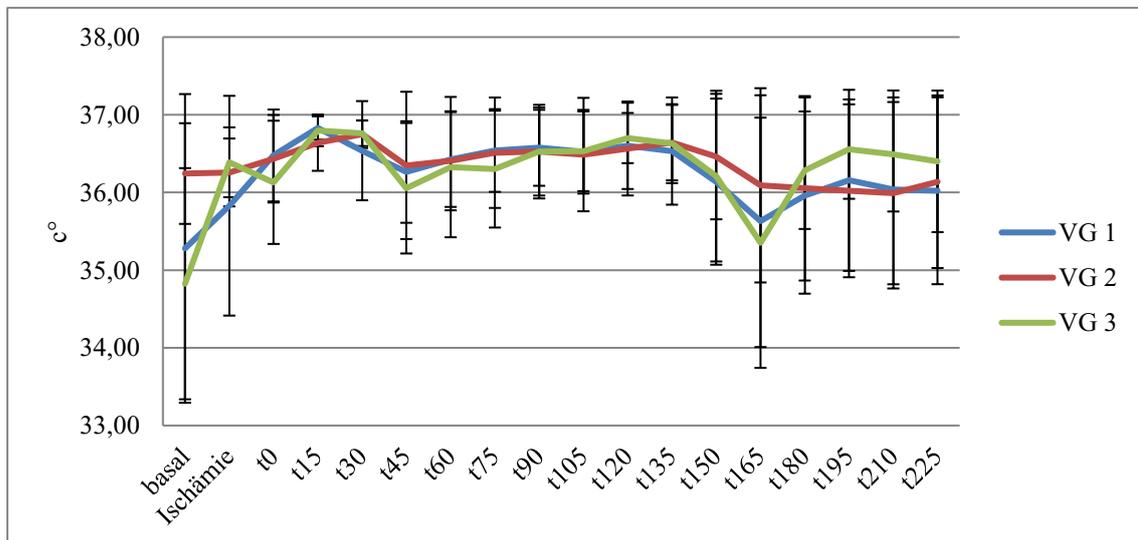
## Ergebnisse



**Abbildung 17: Perfusionsdruck.** Dargestellt sind die PP [mmHg] Mittelwerte  $\pm$  StABW der drei Versuchsgruppen (VG1, 2, 3) in den festgelegten Zeiträumen (basal, Ischämie, t0 – t225). Die drei VG haben einen nahezu identischen Verlauf, bis auf den Ausreißer der VG 2 zum Zeitpunkt t180.

### 5.3.5 Temperatur

Beim Vergleich der Versuchsgruppen zeigen sich im zeitlichen Verlauf ähnliche Temperaturverläufe (Abb. 18). Insgesamt liegen die Temperaturwerte im Bereich von  $34,83 (\pm 1,49)$  bis  $36,8 (\pm 0,2)$  °C. Bei allen drei VG zeigte sich zum Zeitpunkt t45 und t165 eine Temperatursenkung.



**Abbildung 18: Temperatur.** Dargestellt sind die Temperatur [°C] Mittelwerte  $\pm$  StABW der drei Versuchsgruppen (VG1, 2, 3) in den festgelegten Zeiträumen (basal, Ischämie, t0 – t225). Es zeigte sich ein nahezu identischer Temperaturverlauf der drei VG.

## 5.4 Messung des Gallenflusses

Die Ergebnisse, dargestellt in Tabelle 14, zeigen das Maß der gesammelten Gallenflüssigkeit nach Kanülierung des Ductus choledochus während des Untersuchungszeitraumes.

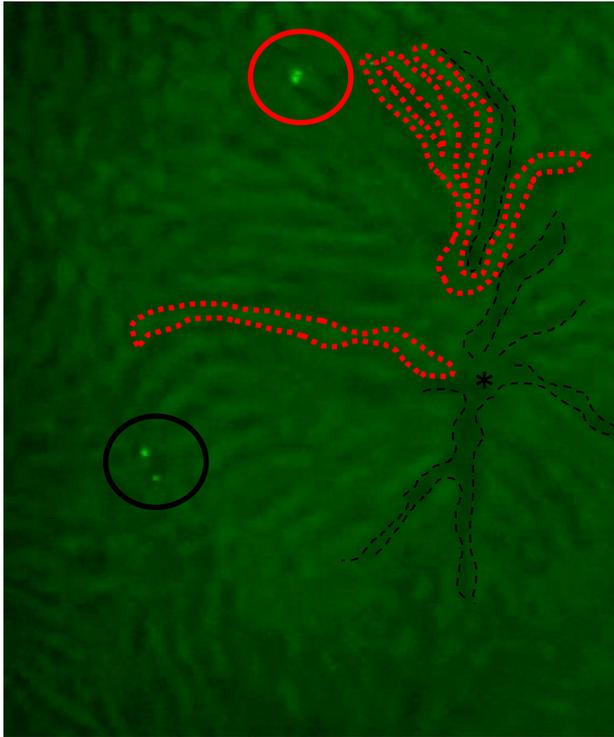
	Gallenmenge [ml]	StABW
VG 1	0,098	0,11
VG 2	0,12	0,02
VG 3	0,185	0,05

**Tabelle 14: Gallenmenge.** Dargestellt sind VG 1-3 mit ihren durchschnittlichen Gallenmengen (ml)  $\pm$  Standardabweichung (StABW).

In der Versuchsgruppe 1 wurde eine durchschnittliche Gallenmenge von 0,098 ml ( $\pm$  0,11) gesammelt, in der Versuchsgruppe 2 ein durchschnittliches Volumen von 0,12 ml ( $\pm$  0,02) und in der Versuchsgruppe 3 ein Volumen von 0,185 ml ( $\pm$  0,05).

## 5.5 Analyse der *In situ Imaging* Daten

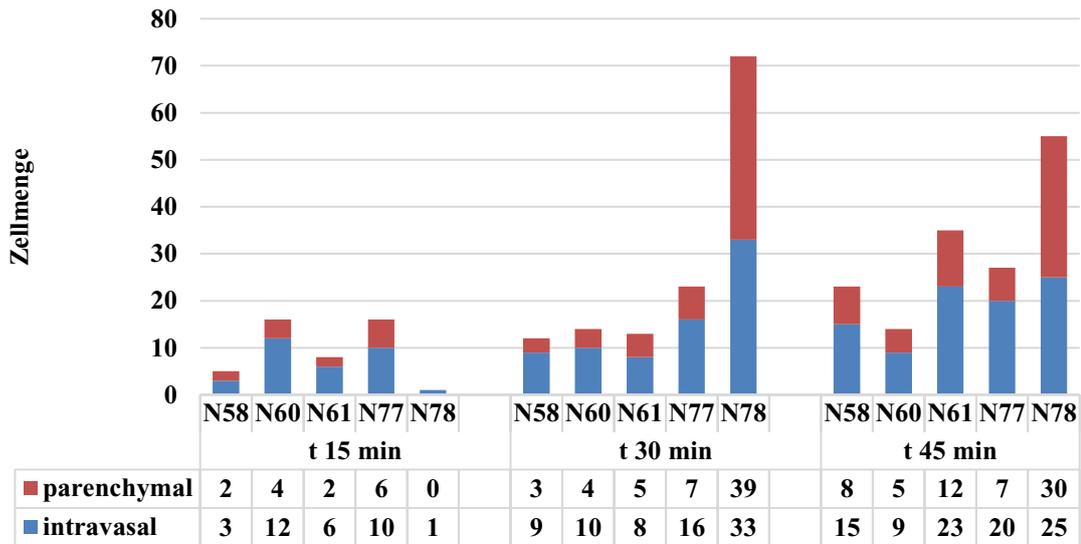
Mit Hilfe des *In situ Imaging* wurden in den aufgenommenen GF (exemplarisch Abb. 19) die Position und Menge der CD133<sup>+</sup> KMSZ ermittelt. Entsprechend der schematischen Darstellung eines Leberläppchens (Abb. 1B) konnten die einzelnen Strukturen wie die Zentralvene, die Hepatozytenreihen und die sich dazwischen befindenden Gefäßgänge identifiziert werden.



**Abbildung 19: In situ Imaging einer beispielhaften GF-Aufnahme.** Dargestellt sind CD133<sup>+</sup> KMSZ nach PKH 67 Green Markierung in der Rattenleber. Dargestellt sind eine Zentralvene (Sternchen), Hepatozytenreihen (rot gepunktete Umrandung) und Gefäßgänge (schwarz gestrichelte Linie). Somit konnte zusätzlich bestimmt werden, ob sich die KMSZ im Gefäß (intravasal, schwarzer Kreis) oder innerhalb der Hepatozytenreihen (parenchymal, roter Kreis) befanden.

### 5.5.1 Bestimmung der Menge und Position von CD133<sup>+</sup> KMSZ

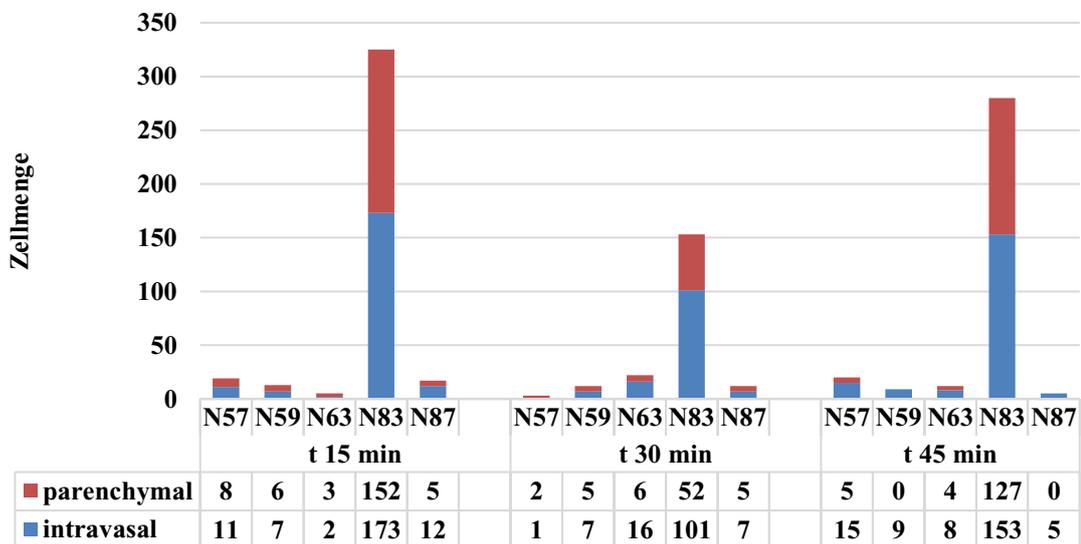
Als erstes erfolgte die Auszählung der CD133<sup>+</sup> KMSZ in den jeweiligen Versuchsgruppen. Die evaluierten Zellmengen sind in den Abbildung 20, 21 und 22 dargestellt.



**Abbildung 20: Gesamtzellmenge der VG 1.** Dargestellt ist die Gesamtzellmenge der CD133<sup>+</sup>KMSZ zu den jeweiligen Messzeitpunkten t (min) des jeweiligen Versuches N der VG 1. Die Position der KMSZ im Lebergewebe war entweder im Gefäßsystem (intravasal) oder in Hepatozytenreihen (parenchymal). Die gesamte Zellmenge errechnete sich je aus der Summe beider Positionen.

Die durchschnittlichen Gesamtzellmengen der VG 1 aus den fünf Versuchen zu allen drei Zeitpunkten t und entsprechend ihrer Zellposition betragen:

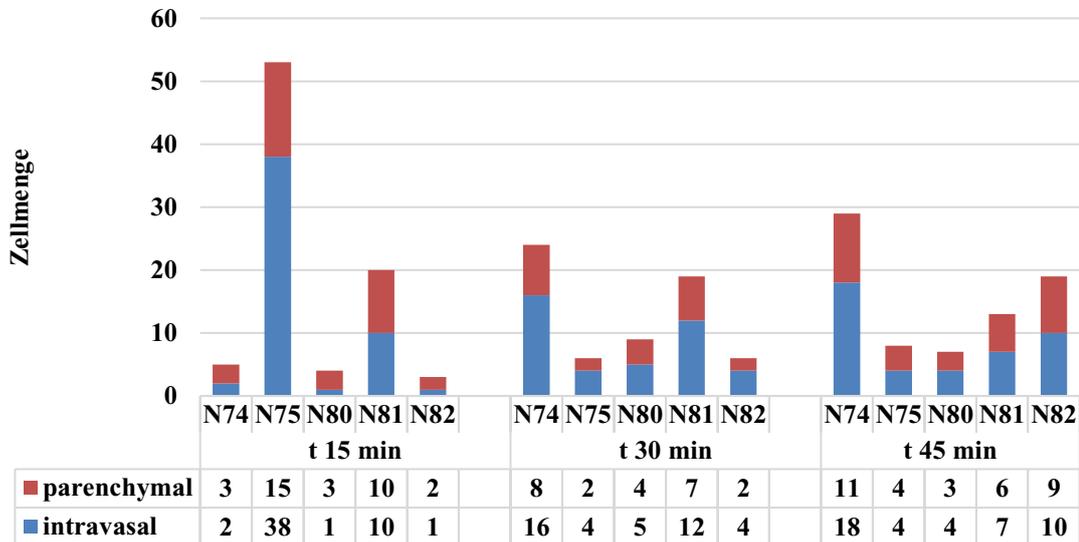
- t15: intravasal – 6,4 ± 4,6 Zellen, parenchymal – 2,8 ± 2,2 Zellen
- t30: intravasal – 15,2 ± 10,4 Zellen, parenchymal – 11 ± 15,4 Zellen
- t45: intravasal – 18,4 ± 6,5 Zellen, parenchymal – 12,4 ± 10,2 Zellen



**Abbildung 21: Gesamtzellmenge der VG 2.** Dargestellt sind die CD133<sup>+</sup>KMSZ zu den jeweiligen Messzeitpunkten t (min) des jeweiligen Versuches N der VG 2. Die Position der KMSZ im Lebergewebe war entweder im Gefäßsystem (intravasal) oder in Hepatozytenreihen (parenchymal). Die gesamte Zellmenge errechnete sich je aus der Summe beider Positionen.

Die durchschnittlichen Gesamtzellmengen der VG 2 aus den fünf Versuchen zu den drei Zeitpunkten entsprechend ihrer Zellposition betragen:

- t15 min: intravasal –  $41 \pm 73,9$  Zellen, parenchymal –  $34,8 \pm 65,5$  Zellen
- t30 min: intravasal –  $26,4 \pm 42$  Zellen, parenchymal –  $14 \pm 21,3$  Zellen
- t45 min: intravasal –  $38 \pm 64,4$  Zellen, parenchymal –  $27,2 \pm 55,8$  Zellen



**Abbildung 22: Gesamtzellmenge der VG 3.** Dargestellt sind die CD133<sup>+</sup> KMSZ zu den jeweiligen Messzeitpunkten t (min) des jeweiligen Versuches N der VG 3 analog zu den Abbildungen 20 und 21.

Die durchschnittlichen Gesamtzellmengen der VG 3 aus den fünf Versuchen zu drei Zeitpunkten und entsprechend ihrer Zellposition betragen:

- t15: intravasal –  $10,4 \pm 15,9$  Zellen, parenchymal –  $6,6 \pm 5,7$  Zellen
- t30: intravasal –  $8,2 \pm 5,5$  Zellen, parenchymal –  $4,6 \pm 2,8$  Zellen
- t45: intravasal –  $8,6 \pm 5,8$  Zellen, parenchymal –  $6,6 \pm 3,4$  Zellen

### 5.5.2 Bestimmung der Akkumulation von CD133<sup>+</sup> KMSZ

Aus den in der Abbildung 20, 21 und 22 dargestellten Gesamtzellmengen wurde durch Addition der intravasal und parenchymal registrierten Zellen die gesamte Zellmenge zu jedem Zeitpunkt t und jedem Experiment der drei VG berechnet. Aus den entsprechenden Summen wurde zu jedem Zeitpunkt t und für jede VG ein Mittelwert mit Standardabweichung ( $\pm$ StABW) berechnet (Abb. 23).

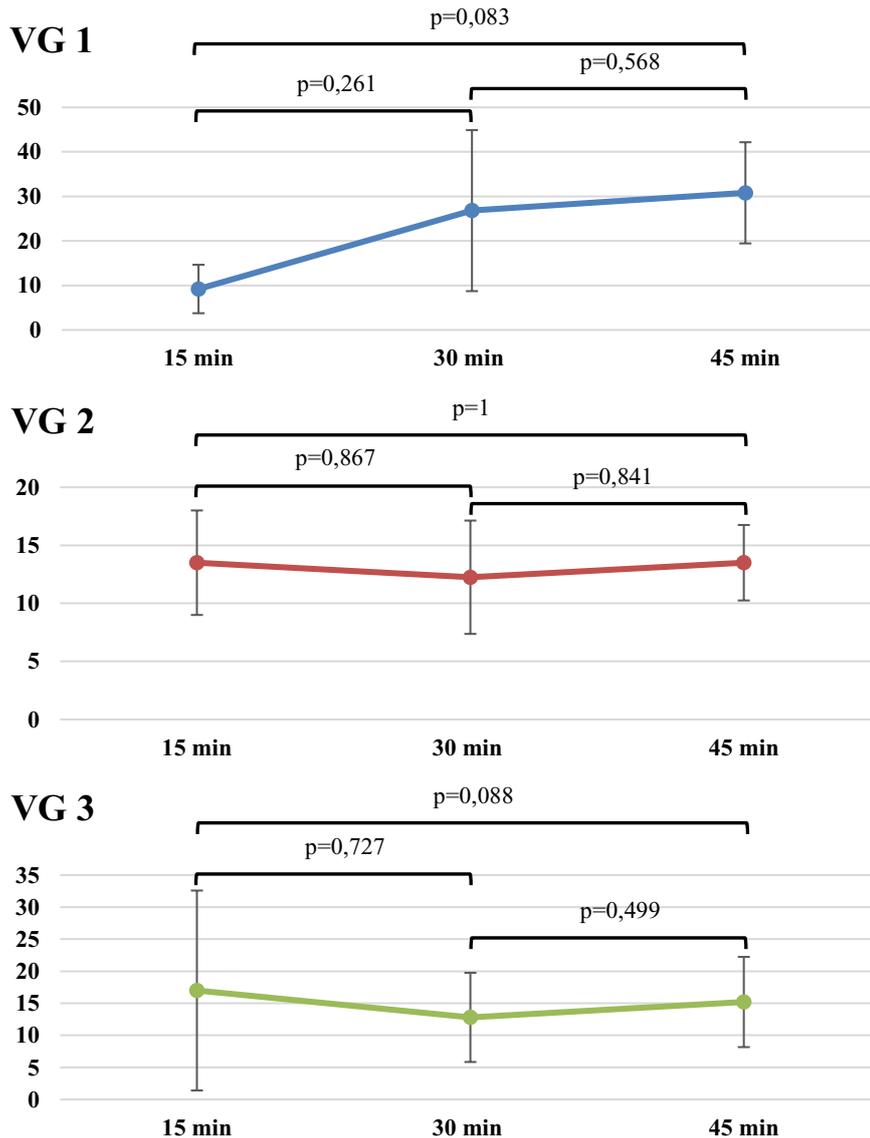
In der VG 1 betrug die durchschnittliche Gesamtzellmenge zum Zeitpunkt t15 min  $9,2 (\pm 5,44)$ , zum t30 min  $26,8 (\pm 18,08)$ , sowie zum t45 min  $30,8 (\pm 11,36)$ . Beim Vergleich zwischen t15 und t30, sowie t30 und t45 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,261$ ;  $p=0,568$ ). Lediglich beim Vergleich der Zeitpunkte t15min und t45 zeigte sich eine Tendenz zur Signifikanz ( $p=0,083$ ).

## Ergebnisse

---

In der VG 2 wurden die deutlich erhöhten Gesamtzellmengen des Versuchs N83 nicht mit einberechnet, um eine vermehrte Streuung der Werte zu vermeiden. Die durchschnittliche Gesamtzellmenge betrug zum Zeitpunkt t15 min 13,5 ( $\pm$  4,5), zum t30 min 12,25 ( $\pm$  4,88), sowie zum t45 min 13,5 ( $\pm$  3,25). Beim Vergleich der Zeitpunkte zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,867$ ;  $p=0,841$ ;  $p=1$ ).

In der VG 3 betrug die durchschnittliche Gesamtzellmenge zum Zeitpunkt t15 min 17 ( $\pm$  15,6), zum t30 min 12,8 ( $\pm$  6,96), sowie zum t45 min 15,2 ( $\pm$  7,04). Beim Vergleich zwischen t15 und t30, sowie t30 und t45 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,727$ ;  $p=0,499$ ). Lediglich beim Vergleich der Zeitpunkte t15min und t45 zeigte sich eine Tendenz zur Signifikanz ( $p=0,088$ ).



**Abbildung 23: Bestimmung der durchschnittlichen Gesamtzellmenge.** Dargestellt ist die durchschnittliche Gesamtzellmenge für alle drei Zeitpunkte (t15, t30, t45) für jede Versuchsgruppe (VG 1-3) mit Signifikanzniveau ( $p=0,05$ ).

### 5.5.3 Bestimmung der Zeitpunkt-, Versuchs- und relativen Extravasationsquotienten

Um die Versuchsgruppen unter dem Aspekt der relativen Extravasation von CD133<sup>+</sup> KMSZ vergleichen zu können, wurde zuerst der Zeitpunkt- und Versuchsquotient bestimmt (Tab. 15).

In jeder Versuchsgruppe wurde in jedem Versuch zu jedem Zeitpunkt ein Verhältnis von parenchymal- zu intravasal-gezählten Zellen nach der folgenden Formel bestimmt und als **Zeitpunktquotient** bezeichnet:

## Ergebnisse

$$\text{Zeitpunktquotient} = \frac{\text{Zellzahl parenchymal (zum Zeitpunkt t15/30/45)}}{\text{Zellzahl intravasal (zum Zeitpunkt t15/30/45)}}$$

z.B. in der VG 1, Versuch N 58 zum Zeitpunkt t15 betrug der Zeitpunktquotient:

$$\frac{2 \text{ Zellen parenchymal}}{3 \text{ Zellen intravasal}} = 0,66666667 \approx 0,67$$

Die Bestimmung der einzelnen **Versuchsquotienten** der jeweiligen Versuche erfolgte nach der folgenden Formel:

$$\text{Versuchsquotient} = \frac{(\text{Zeitpunktquotient t15} + \text{Zeitpunktquotient t30} + \text{Zeitpunktquotient t45})}{3 (\text{Zeitpunktanzahl})}$$

z.B. in der VG 1, Versuch N 58 betrug der Versuchsquotient:

$$\frac{(0,67 + 0,33 + 0,53)}{3} = 0,51$$

	Versuchs-Nr.	Zeitpunktquotient zum Zeitpunkt			Versuchsquotient
		t15	t30	t45	
<b>VG 1</b>	58	0,67	0,33	0,53	0,51
	60	0,33	0,4	0,56	0,43
	61	0,33	0,63	0,52	0,49
	77	0,6	0,44	0,35	0,46
	78	0	1,18	1,2	0,79
<b>VG 2</b>	57	0,73	2	0,3	1,02
	59	0,86	0,71	0	0,52
	63	1,5	0,38	0,5	0,79
	83	0,88	0,51	0,83	0,74
	87	0,42	0,71	1,6	0,91
<b>VG 3</b>	74	1,5	0,5	0,61	0,87
	75	0,39	0,5	1	0,63
	80	3	0,8	0,75	1,52
	81	1	0,58	0,86	0,81
	82	2	0,5	0,9	1,13

**Tabelle 15: Zeitpunkt- und Versuchsquotient.** Dargestellt sind in jeder VG zu jedem Versuch drei Zeitpunktquotienten entsprechend den Zeitpunkten (t 15/30/45 min). Zusätzlich ist zu jedem Versuch ein Versuchsquotient aus den entsprechenden drei Zeitpunktquotienten berechnet worden.

Anschließend erfolgte die Bestimmung des **relativen Extravasationsquotienten** zu jedem Zeitpunkt in der jeweiligen Versuchsgruppe (Tab. 16) nach der folgenden Formel:

$$\text{Relativer Extravasationsquotient} = \frac{\text{Summe der Zeitpunktquotienten aller Versuche}}{\text{Versuchszahl}}$$

z.B. in der VG 1 betrug der relative Extravasationsquotient zum Zeitpunkt t15:

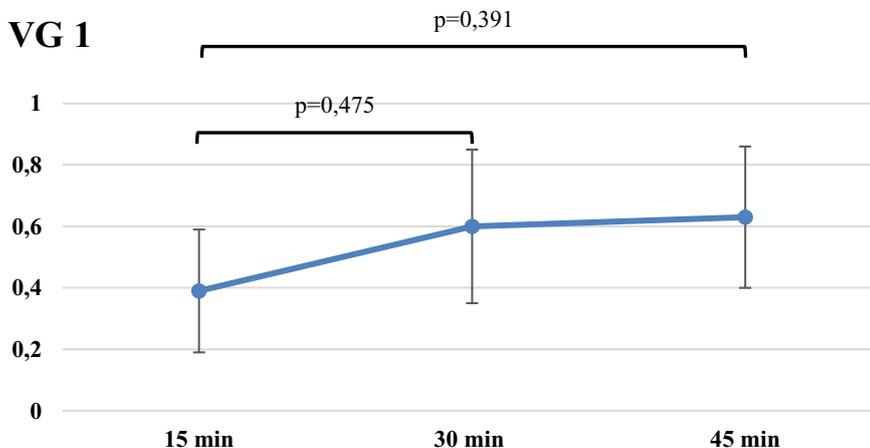
## Ergebnisse

$$\frac{0,67 + 0,33 + 0,33 + 0,6 + 0}{5} = 0,39$$

	Zeitpunkt [min]	Versuchsnummer					Relativer Extravasationsquotient
		N 58	N 60	N 61	N 77	N 78	
VG 1	t15	0,67	0,33	0,33	0,60	0	0,39
	t30	0,33	0,4	0,63	0,44	1,18	0,6
	t45	0,53	0,56	0,52	0,35	1,2	0,63
VG 2		N 57	N 59	N 63	N 83	N 87	
	t15	0,73	0,86	1,5	0,88	0,42	0,88
	t30	2	0,71	0,38	0,51	0,71	0,95
	t45	0,33	0	0,5	0,83	1,6	0,61
VG 3		N 74	N 75	N 80	N 81	N 82	
	t15	1,5	0,39	3	1	2	1,58
	t30	0,5	0,5	0,8	0,58	0,5	0,58
	t45	0,61	1	0,75	0,86	0,9	0,82

**Tabelle 16: Relativer Extravasationsquotient.** Dargestellt sind die Zeitpunktquotienten zu jedem Versuch in jeder VG. Der relative Extravasationsquotient wurde aus fünf Zeitpunktquotienten des jeweiligen Zeitpunkts (t15/30/45) berechnet.

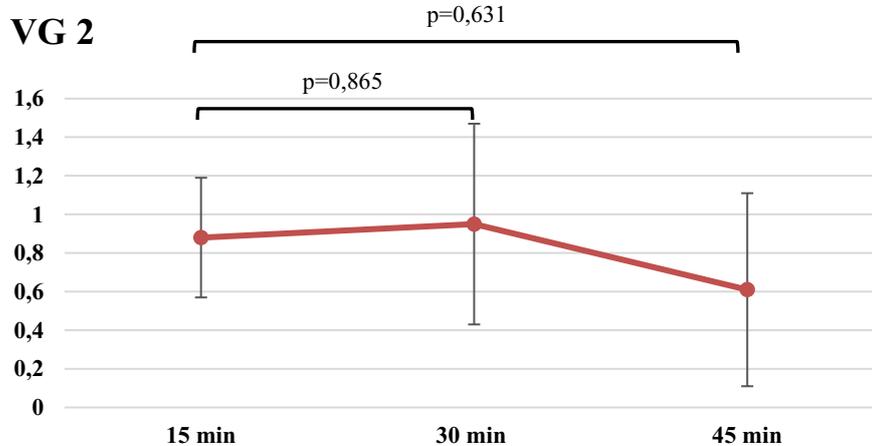
In der VG 1 (Abb. 24) zeigte sich zum Zeitpunkt t15 ein relativer Extravasationsquotient von 0,39 ( $\pm 0,2$ ), bei t30 ein Quotient von 0,60 ( $\pm 0,25$ ) und bei t45 von 0,63 ( $\pm 0,23$ ). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Zeitpunkten ( $p=0,475$ ;  $p=0,391$ ).



**Abbildung 24: Durchschnittlicher relativer Extravasationsquotient der VG 1.** Dargestellt sind die durchschnittlichen Quotienten mit Standardabweichung in Abhängigkeit der drei Zeitpunkte (t15, t30, t45). Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

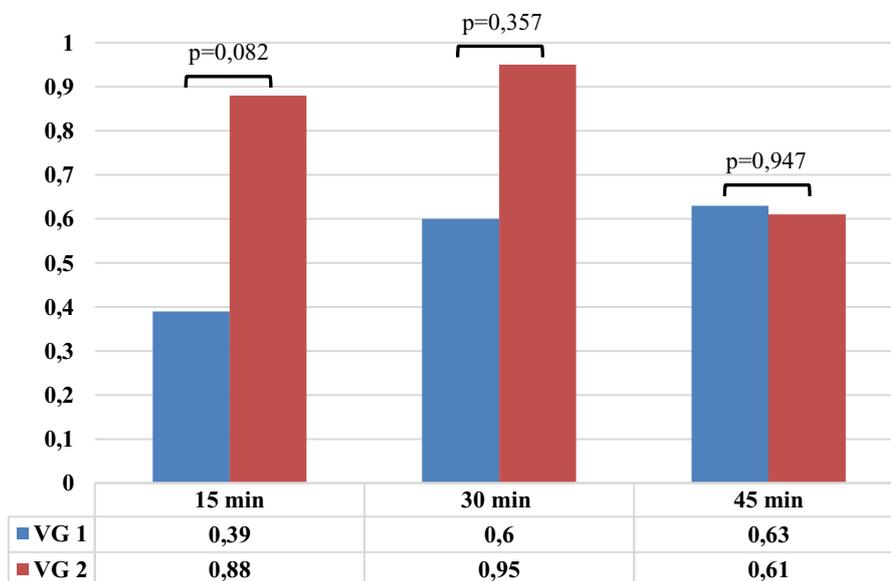
Wie Abbildung 25 zeigt, wurden für die VG 2 folgenden relativen Extravasationsquotienten berechnet: Zeitpunkt t15 mit 0,88 ( $\pm 0,31$ ), t30 mit 0,95 ( $\pm 0,52$ ) und zu t45 0,61 ( $\pm 0,5$ ). Die Daten des Versuchs N83 wurden nicht mit einberechnet. Es

zeigte sich auch hier keine statistische Signifikanz zwischen den Zeitpunkten ( $p=0,865$  und  $p=0,631$ ).



**Abbildung 25: Durchschnittlicher relativer Extravasationsquotient der VG 2.** Dargestellt sind die durchschnittlichen Quotienten mit Standardabweichung in Abhängigkeit der drei Zeitpunkte (t15, t30, t45). Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

Im Vergleich der KMSZ-Extravasation der Versuchsgruppen untereinander (Abb. 26) zeigte sich zu t15 eine Tendenz zur signifikanten Extravasation der KMSZ nach einer Vorinjektion mit Thrombozyten ( $p=0,082$ ). Zu den anderen zwei Zeitpunkten bestand zwischen den VG kein signifikanter Unterschied ( $p=0,357$  und  $0,947$ ).

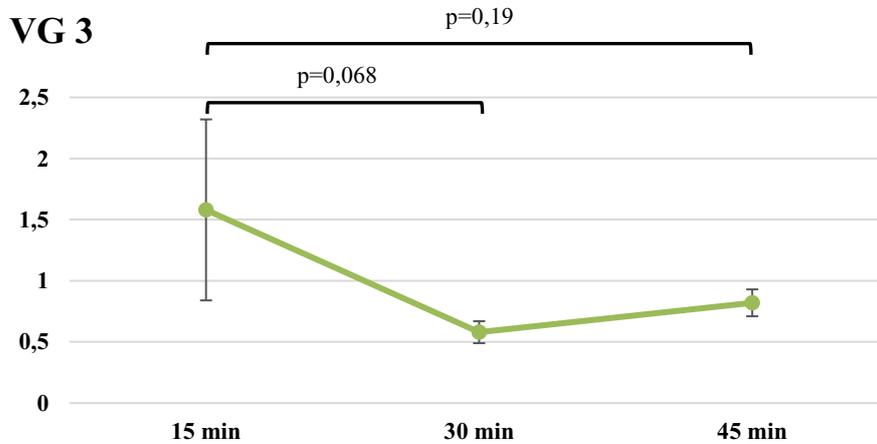


**Abbildung 26: Vergleich der relativen Extravasationsquotienten.** Dargestellt ist der Vergleich der der relativen Extravasationsquotienten zwischen den VG 1 und 2 zu den einzelnen Zeitpunkten (t15, t30, t45). Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

Für die Versuchsgruppe 3 wurden folgende Mittelwerte der Extravasationsquotienten berechnet (Abb. 27): Zeitpunkt t15 1,58 ( $\pm 0,74$ ), t30 0,58 ( $\pm 0,09$ ) und t45 0,82 ( $\pm 0,11$ ).

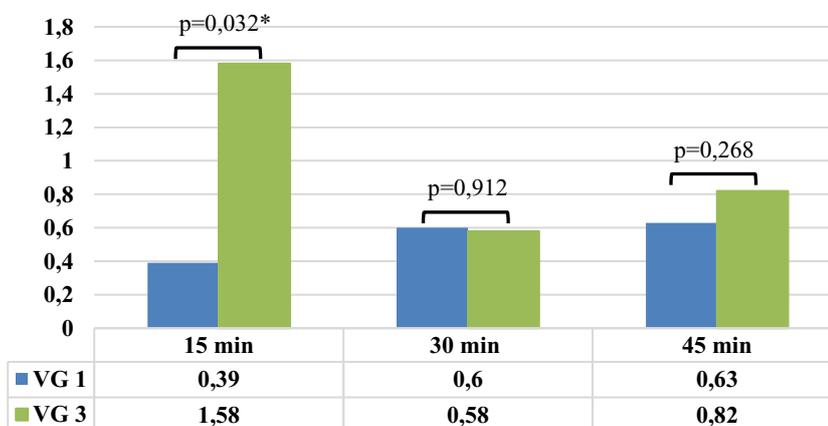
## Ergebnisse

Im Vergleich zwischen t15 und t 30 betrug  $p=0,068$ . Beim Vergleich der Zeitpunkte t15 und t45 bestand kein Unterschied bezüglich der Extravasation ( $p=0,19$ ).



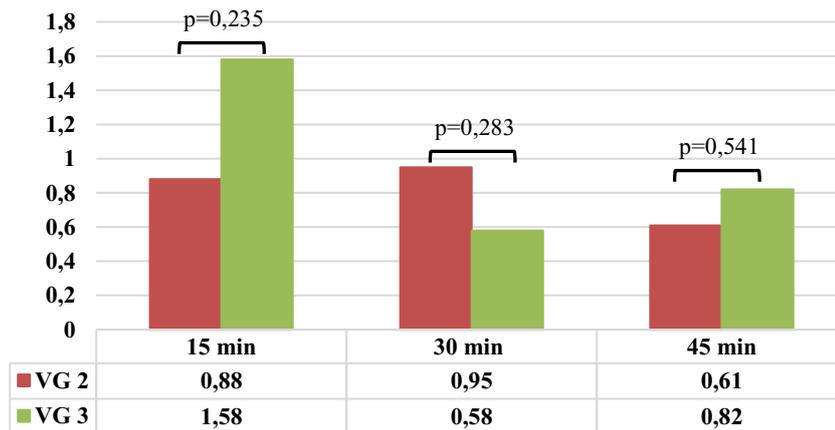
**Abbildung 27: Durchschnittlicher relativer Extravasationsquotient der VG 3.** Dargestellt sind die durchschnittlichen Quotienten mit Standardabweichung in Abhängigkeit der drei Zeitpunkte (t15, t30, t45). Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

Beim Vergleich der relativen Extravasationsquotienten von VG 3 mit VG 1 (Abb. 28) zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $p=0,032^*$  ( $p \leq 0,05$ )) zum Zeitpunkt t15. Beim Vergleich der weiteren zwei Zeitpunkten zeigte sich kein Unterschied zwischen den VG ( $p=0,912$ ;  $p=0,268$ ).



**Abbildung 28: Durchschnittliche relative Extravasationsquotienten.** Dargestellt ist der Vergleich der relativen Extravasationsquotienten der VG 1 und 3 zu den drei Zeitpunkten (t15, t30, t45). Ein statistisch signifikanter Unterschied bestand zum Zeitpunkt t 15.

Beim Vergleich der relativen Extravasationsquotienten zwischen VG 3 und VG 2 (Abb. 29) zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied ( $p=0,235$ ;  $p=0,283$ ;  $p=0,541$ ).



**Abbildung 29: Durchschnittliche relative Extravasationsquotienten.** Dargestellt ist der Vergleich der relativen Extravasationsquotienten der VG 2 und 3 zu den drei Zeitpunkten (t15, t30, t45) Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

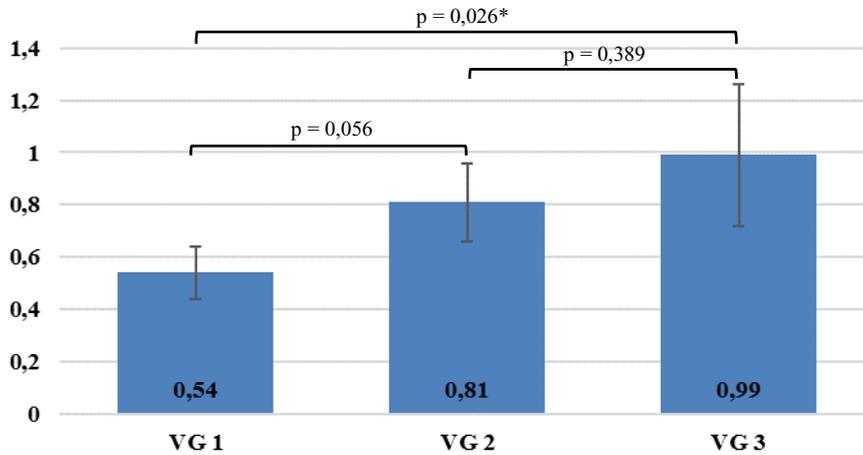
Für eine allgemeine Beurteilung der CD133<sup>+</sup> KMSZ-Extravasation wurden die Versuchsquotienten aus der Tabelle 15 in der Tabelle 17 zusammengefasst und weiter analysiert, sowie die Ergebnisse in Abbildung 30 dargestellt.

Versuchsanzahl	VG 1	VG 2	VG 3
1	0,51	1,02	0,87
2	0,43	0,52	0,63
3	0,49	0,79	1,52
4	0,46		0,81
5	0,79	0,91	1,13
MTTLW	0,54	0,81	0,99
StABW	0,10	0,15	0,27
pTtest vs VG 1		0,056	0,026*
pTtest vs VG 2			0,389

**Tabelle 17: Analyse der Versuchsquotienten.** In dieser Tabelle wurden aus den Versuchsquotienten der VG ein Durchschnittswert (MTTLW) und die entsprechende Standardabweichung ( $\pm$  StABW) berechnet und miteinander verglichen (pTtest vs VG 1, VG 2).

Der durchschnittliche Versuchsquotient (Abb. 30) der VG 1 betrug 0,54 ( $\pm$  0,1), der VG 2 betrug 0,81 ( $\pm$  0,15) und der VG 3 betrug 0,99 ( $\pm$  0,27). Im Vergleich zwischen VG 1 und VG 2 ( $p=0,056$ ) ( $p \leq 0,1$ ) bestand eine Tendenz zur signifikant unterschiedlichen Extravasation und zwischen VG 1 und VG 3 ( $p=0,026$ ) bestand eine signifikant unterschiedlich Extravasation der CD133<sup>+</sup> KMSZ. Beim Vergleich der VG 2 und VG 3

(p=0,389) bestand kein signifikanter Unterschied in der Extravasation der CD133<sup>+</sup> KMSZ.



**Abbildung 30: Vergleich der mittleren Versuchsquotienten der VG.** Dargestellt sind die mittleren Versuchsquotienten der VG. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den VG 1 und VG 3.

#### 5.5.4 Bestimmung der absoluten parenchymalen Anzahl der CD133<sup>+</sup> KMSZ

Um die Extravasation von CD133<sup>+</sup> KMSZ unter dem Einfluss von Thrombozyten besser beurteilen zu können, wurde die absolute CD133<sup>+</sup> KMSZ-Anzahl im Parenchym bestimmt (Abb. 31, 32, 34). Hierfür benötigte man die berechneten Zeitpunktquotienten (Tbl. 15) und die Gesamtzellzahl der CD133<sup>+</sup> KMSZ pro durchgeführten Versuch (Abb. 20, 21, 22), sowie die folgende mathematische Formel zur Berechnung:

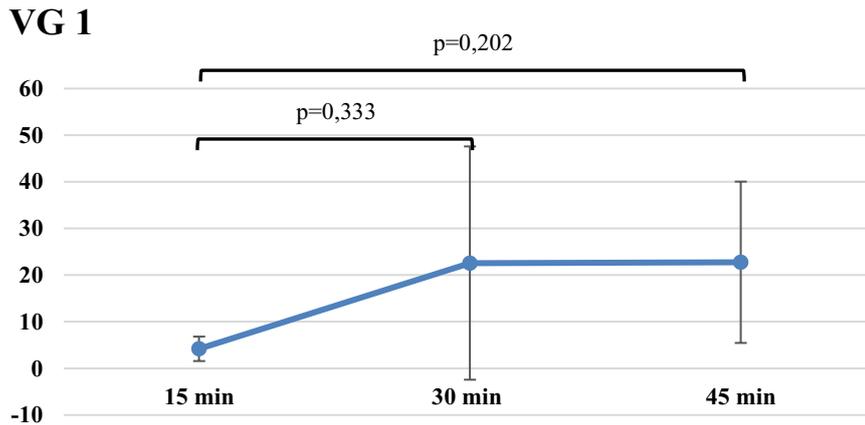
*Absolute parenchymale Anzahl =*

$$\frac{\sum \text{Zeitpunktquotienten} \times \text{Gesamtzellmenge (pro Zeitpunkt des jeweiligen Versuches)}}{5 \text{ (Versuchsanzahl)}}$$

z.B. VG 1 (Versuche N58+60+61+77+78) zum Zeitpunkt t15:

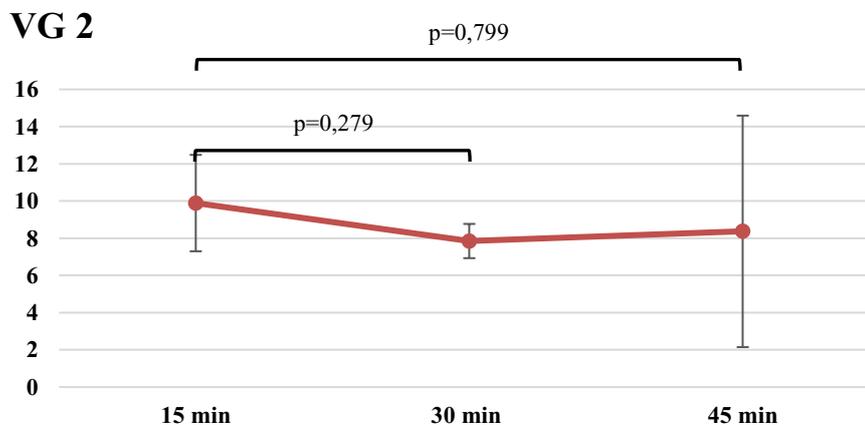
$$\frac{[0,67 \times 5 + 0,33 \times 16 + 0,33 \times 8 + 0,6 \times 16 + 0 \times 1]}{5} = 4,18654$$

In der VG 1 betrug die durchschnittliche absolute parenchymale Anzahl der CD133<sup>+</sup> KMSZ zum Zeitpunkt t15 4,19 ( $\pm$  2,62), zu t30 22,58 ( $\pm$  25,01) und zu t45 22,75 ( $\pm$  17,3) (Abb. 31). Beim Vergleich der Zeitpunkte t30 und t45 mit t15 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (p=0,333, p=0,202).



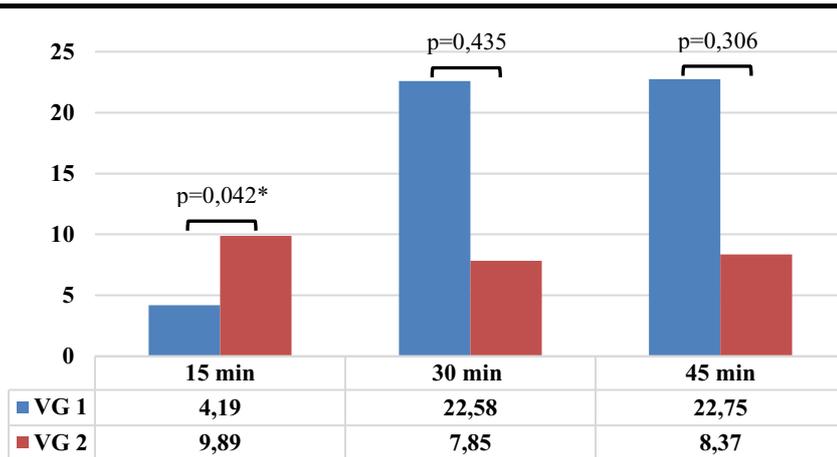
**Abbildung 31: Absolute parenchymale Zellanzahl der VG 1.** Dargestellt ist der Vergleich (eckige Klammer) der absoluten parenchymalen Zellanzahl der einzelnen Zeitpunkte (t15, t30, t45). Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

Die absolute parenchymale Zellmenge der Versuchsgruppe 2 (Abb. 32) betrug zum Zeitpunkt t15 9,89 ( $\pm 2,59$ ), t30 7,85 ( $\pm 0,92$ ), t45 8,37 ( $\pm 6,22$ ). Die Daten des Versuchs N83 wurden hier ebenfalls nicht mit einberechnet. Beim Vergleich der Zeitpunkte t30 und t45 mit t15 bestand keine signifikanten Zunahmen der KMSZ im Parenchym ( $p=0,279$ ,  $p=0,799$ ).



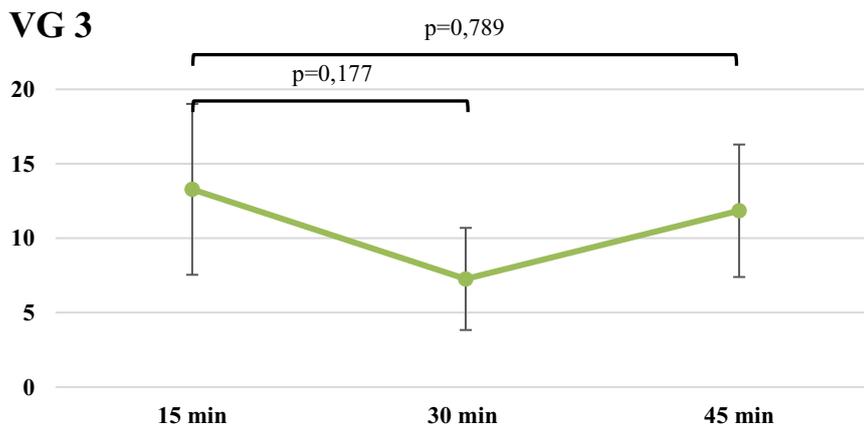
**Abbildung 32: Absolute parenchymale Zellanzahl der VG 2.** Dargestellt ist der Vergleich (eckige Klammer) der absoluten parenchymalen Zellanzahl der einzelnen Zeitpunkte (t15, t30, t45). Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

Zum Zeitpunkt t15 bestand ein signifikanter Unterschied in der absoluten parenchymalen CD133<sup>+</sup> KMSZ-Anzahl ( $p=0,042$ ) zwischen VG 1 und VG 2 (Abb. 33). Zum Zeitpunkt t30 und t45 bestand kein signifikanter Unterschied ( $p=0,435$ ,  $p=0,306$ ).



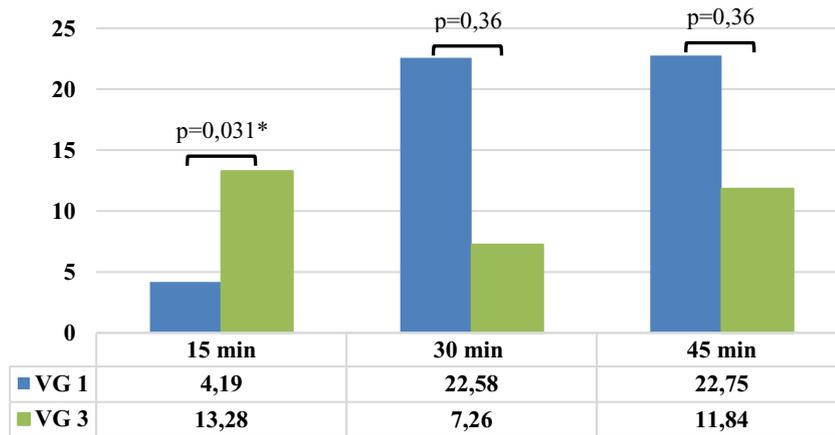
**Abbildung 33: Vergleich der absoluten parenchymalen Zellanzahl der VG 1 und 2.** Dargestellt ist der Vergleich (eckige Klammer) der drei Zeitpunkte zwischen der VG 1 und 2. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zum Zeitpunkt t15.

In der Abbildung 34 betragen die Mittelwerte für die absolute parenchymale Zellmenge der Versuchsgruppe 3: Zeitpunkt t15 13,28 ( $\pm$  5,74), t30 7,26 ( $\pm$  3,43), t45 11,84 ( $\pm$  4,45). Beim Vergleich der Zeitpunkte t30 und t45 mit t15 zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der absoluten parenchymalen KMSZ-Anzahl ( $p=0,177$ ,  $p=0,789$ ).



**Abbildung 34: Absolute parenchymale Zellanzahl der VG 3.** Dargestellt ist der Vergleich (eckige Klammer) der absoluten parenchymalen Zellanzahl der einzelnen Zeitpunkte (t15, t30, t45). Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

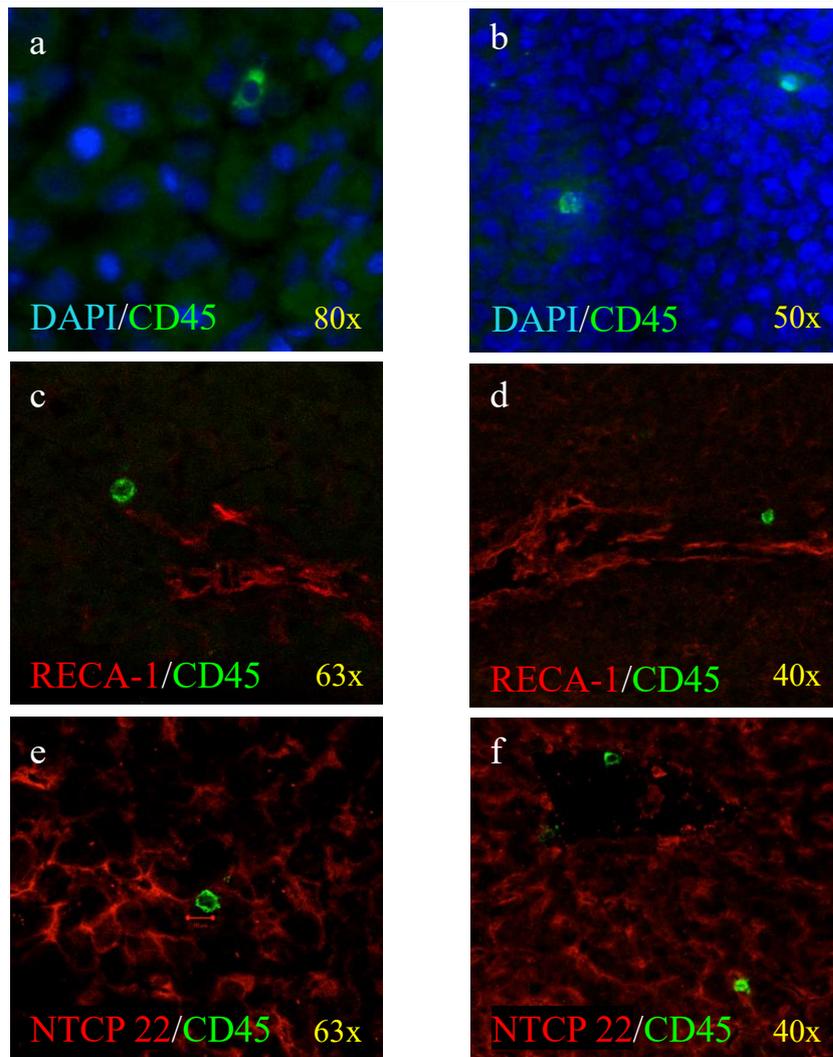
Analog zu Versuchsgruppe 2 wurden die absolute Extravasation zu allen drei Zeitpunkten zwischen den VG 3 und VG 1 analysiert (Abb. 35). Nach einer Inkubation mit Thrombozyten zeigte sich zum Zeitpunkt t15 ein signifikanter Unterschied ( $p=0,031$ ) der absoluten parenchymalen CD133<sup>+</sup> KMSZ zwischen VG 1 und 3. Zu den anderen zwei Zeitpunkten war die Extravasation nicht signifikant unterschiedlich ( $p = 0,36$ ).



**Abbildung 35: Vergleich der absoluten parenchymalen Zellanzahl der VG 1 und 3.** Dargestellt ist der Vergleich (eckige Klammer) der drei Zeitpunkte zwischen der VG 1 und 3. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zum Zeitpunkt t15.

## 5.6 Detektion von CD133+ KMSZ nach dem Perfusionsversuch

Nach den Perfusionsversuchen waren positive Signale von CD45 und DAPI (Abb. 36 a und b) in den kryokonservierten, geschnittenen und immunfluoreszenzmarkierten Rattenlebern detektierbar. In den weiteren Immunfluoreszenzfärbungen bestand eine räumliche Nähe zwischen positiven Signalen sowohl der RECA-1 Rezeptoren des Gefäßendothels (intravasal in der Lebervene) (Abb. 36 d), als auch der NTCP 22 positiven Hepatozytenreihen (Abb. 36 f) mit CD45 positiven Signalen.



**Abbildung 36: Konfokalmikroskopie der Rattenleber nach Doppelimmunfluoreszenzfärbung.** In den Aufnahmen a und b sind positive DAPI-Signale der Zellkerne und membranständige CD45 Signale zu erkennen. In den Aufnahmen c und d erkennt man CD45 positive Signale innerhalb von positivem, RECA-1 gefärbtem Gefäßendothel. Die Aufnahmen e und f zeigen positive CD45 Signale innerhalb von positiven NTCP Signalen der Hepatozyten.

---

## 6 Diskussion

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, können Knochenmarkstammzellen nicht nur die Zellpopulationen im hämatopoetischen System erhalten, sondern sie besitzen auch das Potential, sich sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* in andere Zelllinien differenzieren zu können. Dennoch sind die genauen Mechanismen, dieser Prozesse nicht vollständig geklärt. In Bezug auf die Leber konnte beobachtet werden, dass eine erhöhte Mobilisation von extrahepatischen CD133<sup>+</sup> KMSZ nach großen Leberteilresektionen sowohl in experimentellen (Schmelzle et al., 2013a), als auch klinischen Versuchen auftritt (am Esch et al., 2012; Fürst et al., 2007) und zur anschließenden Steigerung der Proliferation und Regeneration von verbliebenem Lebergewebe führt. Die einzelnen Vorgänge zwischen Mobilisation und Proliferation sind noch weitgehend unerforscht. Die in der Einleitung bereits erläuterten Theorien gehen davon aus, dass eine Adhärenz am Endothel eine Voraussetzung für die nachfolgende Transmigration von KMSZ in das Lebergewebe ist (Jang et al., 2004; Schmelzle et al., 2013b; Terada et al., 2002). In diesen Prozessen spielen Thrombozyten eine bereits o.g. erhebliche Rolle (Murata et al., 2008).

Basierend auf diesen Erkenntnissen sollte in dieser Arbeit der Einfluss von Thrombozyten auf das *Homing* von CD133<sup>+</sup> KMSZ untersucht werden. Hierfür wurde ein Xenomodell der isoliert perfundierten Rattenleber etabliert und zur Visualisierung der KMSZ-Position im Leberparenchym mit Fluoreszenzmikroskopie und *In situ Imaging* kombiniert.

### 6.1 Etablierung eines funktionierenden IPRL Modells

Das erste Leberperfusionsmodell wurde 1855 von Claude Bernard durchgeführt. Seit diesem Zeitpunkt wurden unterschiedliche Modelle entwickelt (Bessemis et al., 2006). In diesem Abschnitt erfolgt die kritische Auseinandersetzung mit dem hier etablierten IPRL-Model als *Single Pass* System im Vergleich zu anderen Modellen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Wistar-Ratten gehören zur Spezies *Rattus norvegicus* und stellen aktuell die am häufigsten im Labor gebrauchten Ratten dar. Diese Spezies wurde am Wistar Institut 1906 zur Verwendung in biologischer und medizinischer Forschung entwickelt und wird von vielen Forschungsgruppen für Versuche mit isoliert perfundierter Rattenleber verwendet (Macher, 2014; Miller et al., 1951).

---

Um einen Gewebeschaden zu erzeugen, wurde in dieser Arbeit eine 30-minütige Ischämie herbeigeführt. Der dabei ablaufende Mechanismus hing von der Art der Ischämie ab. Bei einer kalten Ischämie wird der Zellstoffwechsel verlangsamt, um den Gewebeschaden möglichst gering zu halten. Somit können Hepatozyten bis zu 72 h Stunden nahezu unbeschadet überstehen, wohingegen *liver sinusoidal endothelial cells* (LSEC) bereits nach 6 Stunden eine Dysregulation aufweisen. Es folgt eine Endothelschädigung, Thrombozytenaktivierung, Abnahme der Mikrozirkulation, Expression von Adhäsionsmolekülen des Endothels, eine Kupfferzellaktivierung sowie Infiltration von neutrophilen Granulozyten und bei fortbestehender Ischämie, eine Organnekrose (Gracia-Sancho et al., 2015). Eine warme Ischämie affiziert insbesondere Hepatozyten und Kupfferzellen. Der Organschaden wird zusätzlich durch die Reduktion von Cardiolipin in Mitochondrien verstärkt, verbunden mit erhöhtem oxidativem Stress und Gewebeschaden (Gracia-Sancho et al., 2015). Der Vorteil der in dieser Arbeit gewählten warmen Ischämie besteht in der Imitation einer physiologischen Organtemperatur. Diese wurde durch das Wärmebad für den KHP, einen Wärmeaustauscher und einen elektrisch beheizten OP-Tisch bei einer konstanten Temperatur von 36-37 °C gewährleistet. Eine 30-minütiger Ischämie erzeugt einen Gewebeschaden, der durch eine Reperfusion potentiell reversibel ist (Chien et al., 1977). Wohingegen eine Ischämie von 120-180 Minuten, trotz einer 24-stündigen Reperfusion, zu irreversiblen nekrotischen Arealen führen kann (Mendes-Braz et al., 2012). Somit war der hiesige Hepatozytenschaden nach einer 30-minütigen Ischämie nicht nur schnell, sondern in seinem Ausmaß am ehesten noch ausreichend reversibel, um ein effektives *Homing* von CD133<sup>+</sup> KMSZ zu ermöglichen.

Das hier gewählte *in-vitro* Leberperfuisionsmodell hat den Vorteil, dass Perfusionsparameter und -bedingungen besser kontrolliert und standardisiert werden konnten. Hormonelle oder neuronale Signale (Meijer et al., 1981) veränderten damit den Versuchsablauf nicht. Im Gegensatz zu *in-vivo* Modellen, die am lebendem Organismus über Wochen und Monate durchgeführt werden (Theise et al., 2000), sind *in-vitro* Perfusionsmodelle zeitlich begrenzt auf max. 6-8 Stunden und imitieren nicht die vollständige Physiologie des Organismus (Meijer et al., 1981). Im Rahmen einer isolierten Leberperfusion unterscheidet man weiter zwischen einem zirkulierenden System und einem nichtzirkulierendem (*Single Pass*) System (Meijer et al., 1981). Das hier gewählte *Single Pass* System hat den Vorteil, dass bei einmaliger Substanzinjektion

---

die Auswirkungen auf das Organ direkt beobachtet werden können. Um einen artifiziellen Organismus nachzuahmen, ist bei Perfusionsversuchen grundsätzlich ein temperaturkontrolliertes System, eine Apparatur zur Messung von Parametern wie pH-Wert,  $pO_2$  und  $pCO_2$ , einen Oxygenator als Lungenersatz, eine Perfusionslösung für das Organ und eine konstante Perfusionseinrichtung (Abb. 5) notwendig. Im Vergleich zu einem *Single Pass* System ist die Perfusionsapparatur in einem zirkulierenden System aufwändiger. Häufig wird eine Filtrationseinrichtung benötigt, um verklumpende Partikel wie z.B. Blutzellen oder fibrotisches Material abzufangen und eine Verstopfung des Gefäßsystems vom Organ zu verhindern (Meijer et al., 1981). Bei der Perfusionseinrichtung unterscheidet man zwischen einem druck- oder flussgeschwindigkeitsgesteuerten System. In einem druckgesteuerten Modell passt sich die Flussgeschwindigkeit umgekehrt proportional an den intravaskulären Druck an. Dies gewährleistet ein geringes Risiko für Endothelschäden, birgt aber gleichzeitig die Gefahr einer inkompletten Leberperfusion (Bessems et al., 2006). Um die Organperfusion möglichst kontinuierlich zu gewährleisten und eine physiologische Hämostase zu imitieren, wurde in dieser Arbeit ein flussgeschwindigkeitsgesteuertes System verwendet. Die Perfusionsgeschwindigkeit wurde nach Empfehlung der Literatur in einem Bereich zwischen 3-5 ml/min/g Lebergewicht festgelegt (Sherrill and Dietschy, n.d.). In diesem System bestand das Risiko eines Leberdruckanstiegs, so dass der hieraus resultierende erhöhte intravasale Widerstand zu Endothelschäden geführt haben könnte (Gores et al., 1986). Möglicherweise ist dies die Erklärung für die kontinuierlich steigenden  $pO_2$ - und  $pCO_2$ -Werte in allen drei Versuchsgruppen (Abb. 23) ab t45-t60 im Verlauf der Reperfusion. Ein weiterer Vorteil des *Single Pass* System liegt in der fehlenden Notwendigkeit einer Antibiotikagabe nach der Organpräparation. In einem zirkulierenden System können bakterielle Besiedlungen mit Beeinflussung der Untersuchung auftreten (Meijer et al., 1981). Die Wahl eines *Single Pass* Systems verhindert auch die Zirkulation von entstehenden Metaboliten wie Milchsäure oder Ammonium, die den pH-Wert oder andere Perfusionsparameter beeinflussen könnten und somit die Parametersteuerung verkomplizieren würden (Meijer et al., 1981).

Die Organpräparationen erfolgten entsprechend der Beschreibung der Forschungsgruppe Meijer *et al.* Im Vergleich zur dort beschriebenen Explantation der Leber im Rahmen einer *ex-vivo* Perfusion (Meijer et al., 1981), wurde für diese Arbeit entschieden, das Organ möglichst wenig mechanisch zu belasten und eine *in-vivo* Perfusion in seiner

---

physiologischen Position durchzuführen. Der präparationsbedingte Gewebeschaden wurde durch die fehlende Explanatoren möglichst geringgehalten. Der Nachteil bestand in der resultierenden Immobilität des Organs. Die Leber war nicht allseits einsehbar, so dass eine Perfusionsleckage oder eine Gewebsverletzung bei der Präparation oder Ligatur nicht direkt hätte identifiziert werden können. Zusätzlich wurde eine genaue Positionierung des hinteren Leberlappens unter dem Fluoreszenzmikroskop durch umliegendes Gewebe erschwert. Beim Anschluss des Organs an das Perfusionssystem sollte die Perfusionspause nicht länger als 2 Minuten und max. 4 Minuten betragen, um eine Sauerstoffunterversorgung des Organs und den damit erzeugten Gewebeschaden zu vermeiden (Meijer et al., 1981). Leider ist dieser Zeitraum in dieser Arbeit nicht explizit dokumentiert worden. Es wird von einem Zeitraum von 10 Minuten ausgegangen. Dies führte möglicherweise zu den entstehenden Parameterschwankungen des  $pO_2$ ,  $pCO_2$ , Perfusionsdruckes und pH-Wertes im basalen Zeitraum (Abb. 14, 15, 16, 17). Während pH-Wert, Temperatur und Perfusionsdruck nach der Ischämie nahezu den gleichen Ursprungswert wie vor der Ischämie erreichten (Abb. 14, 17, 18), zeigten sich beim  $pO_2$  und  $pCO_2$  deutlich erhöhte Werte im Vergleich zu basalem Zeitraum (Abb. 15,16). Während der Reperfusion blieben die Werte für  $pO_2$  und  $pCO_2$  nahezu stabil. Der Werteanstieg ist möglicherweise methodisch durch die Wahl eines *Single Pass* System bedingt, bei dem die Parametermessung erst erfolgt kann, wenn die Perfusionslösung die Leber verlassen hat. Wenn für den Anschluss der Rattenleber aber ein längerer Zeitraum benötigt wurde bzw. der basale Zeitraum hierfür vollständig aufgebraucht und in die Ischämie direkt übergegangen wurde (keine Perfusion), ist nicht davon auszugehen, dass eine Stabilisierung des Systems erfolgen und stabile Parameter gemessen werden konnten. Dies würde auch die großen Schwankungen für  $pO_2$  und  $pCO_2$  innerhalb der Versuchsgruppen erklären. Deshalb sollte bei Folgeversuchen der Anschluss des Organs an das Perfusionssystem möglichst schnell und standardisiert erfolgen. Es bedarf noch weiterer Versuche, die Perfusion weiter zu optimieren.

In dieser Arbeit wurde der Krebs Henseleit Puffer verwendet, um eine blutähnliche Elektrolytzusammensetzung mit einem Energielieferanten in Form von Lactat für die Versorgung der Rattenleber zu gewährleisten. Im Vergleich zu einer Perfusionslösung aus Nagerblut imitiert der KHP kein physiologisches Milieu. Dies hat den Vorteil, dass es erstens keine immunologischen Abstoßungsreaktionen im Xenomodell zwischen Nagerblut und den humanen CD133<sup>+</sup> KMSZ (Linke et al., 1998) geben kann und zweitens

---

keine störenden hämatologischen Metaboliten oder Hämolyse auftreten, die eine Ansiedlung der KMSZ beeinflussen könnten (Meijer et al., 1981). Zusätzlich wurde die Leber vor dem vollständigen Anschluss an das Perfusionssystem mit KHP blutleer gespült. Hiermit war das Organ potentiell leukozytenfrei, um eine vermehrte leukozytäre Infiltration des Lebergewebes aus den Blutgefäßen bei der Reperfusion (Coito, 2011), sowie eine irreversible Nekrose und Funktionsverlust der Hepatozyten zu unterbinden (Jaeschke et al., 1990). Somit bestand die Möglichkeit einer ungestörten Untersuchung der Interaktion zwischen CD133<sup>+</sup> KMSZ und Thrombozyten. Andere Forschungsgruppen fügten dem KHP bovines Albumin bei, um eine Ansammlung fibrotischen Materials und dadurch einen ansteigenden Perfusionsdruck zu vermeiden (Meijer et al., 1981). Möglicherweise hätte man durch die Albuminzugabe den in dieser Arbeit registrierten Druckanstieg ab ca. t45 – t60 min bei allen drei Versuchsreihen (Abb. 23) vermeiden können.

Bei der Erforschung von *Homing* mononukleärer Zellen oder KMSZ in Bezug auf ihr Regenerationspotential werden sowohl autologe als auch xenogene Versuchsmodelle verwendet. So konnte zum Beispiel die Arbeitsgruppe um Mohamed *et al.* eine Parenchymregeneration einer durch induzierte Fibrose geschädigten Rattenlebernachweisen durch autologe MSZ nachweisen (Mohamed et al., 2016). Als Beispiel für ein xenogenes Modell konnte die Arbeitsgruppe um Chen *et al.* zeigen, dass die Behandlung von strahlungsgeschädigten Mäusen mit CD34<sup>+</sup> SZ aus der humanen fetalen Leber sowie Nabelschnurblut zur Regeneration von *hepatozyt like cells* führt (Chen et al., 2013). Der Vorteil eines autologen Versuchsmodells besteht in der geringen Abstoßungsreaktion, wohingegen die Beschaffung einer ausreichend großen Menge von KMSZ einen größeren Verbrauch an Tieren mit sich bringen würde. Somit waren in dieser Arbeit die humanen CD133<sup>+</sup> KMSZ-Mengen durch Knochenmarkspenden einfacher bzw. kostengünstiger zu beschaffen.

Für die Durchführung der IPRL-Versuche konnte eine ausreichende Menge von  $2 \times 10^5$  CD133<sup>+</sup> KMSZ aus 30-60 ml Knochenmark gewonnen werden. Ein kritischer Punkt dieser Arbeit besteht in der quantitativen Überprüfung der CD133<sup>+</sup> KMSZ-Menge nach der Aufreinigung und Fluoreszenzmarkierung des gespendeten Knochenmarks. Das Ziel war eine 70%ige Reinheit der CD133<sup>+</sup> KMSZ für den IPRL-Versuch zu gewährleisten. Das Problem bestand darin, dass nach der Knochenmarkaufreinigung die

---

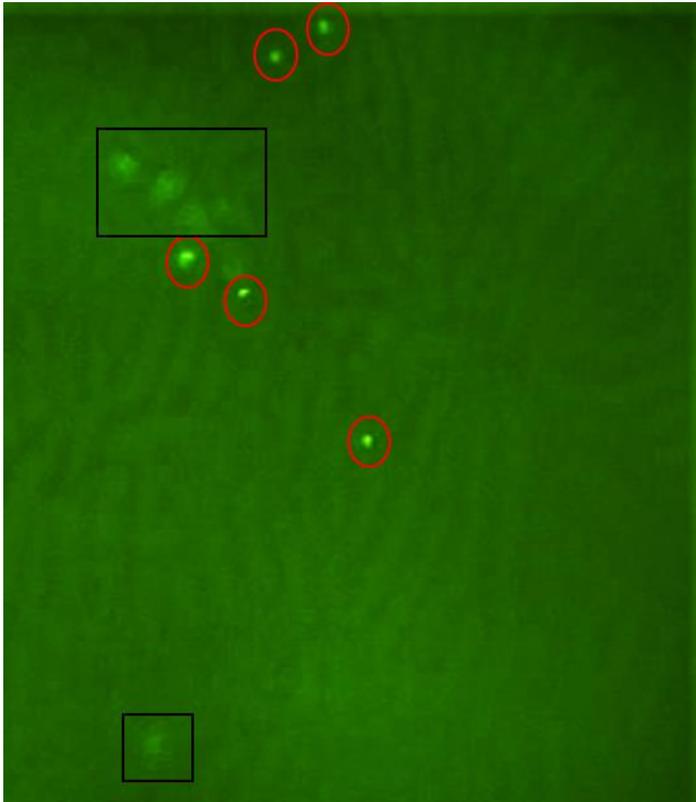
gewonnene Zellmenge sowohl für die FACS-Analyse, als auch für die IPRL (Zellmenge von  $2 \times 10^5$ ) ausreichend sein musste. Während andere Forschungsgruppen (Sgodda, 2008) vor Versuchsbeginn eine durchflusszytometrische FACS-Analyse durchführten und eine Reinheit von teilweise 99 % nachwiesen (Kim et al., 2017), konnte man in dieser Arbeit eine 70%ige Reinheit nach Aufreinigung und Fluoreszenzmarkierung nachweisen (Abschnitt 5.2.), diese aber nicht für jeden IPRL Versuch gewährleisten, da die Zellmenge nach Entnahme von  $2 \times 10^5$  KMSZ für die FACS-Analyse nicht ausreichend war. Ein nahegelegener Grund für die geringe CD133<sup>+</sup> KMSZ-Menge ist möglicherweise die zu geringe Menge der Knochenmarkspende oder der geringe Anteil von mononukleären Zellen in der Spende selbst. Eine reguläre Knochenmarkspende beträgt abhängig vom Gewicht des Spenders ca. 0,5-1,5 l (Dt. Ärzteblatt, 2014). Hierbei ist fraglich, ob in Zukunft die Menge der Knochenmarkspende erhöht werden könnte, um eine höhere Anzahl von CD133<sup>+</sup> KMSZ gewinnen zu können. Schließlich unterzieht sich der Spender gleichzeitig einer großen Operation mit hieraus resultierendem Blutverlust. Dieser wird durch Laborwerte wie geringen Erythrozyten-, Hb-, Hkt- (Tab.12) und Thrombozyten-Werten (Tab.11) verdeutlicht. Somit benötigt der Spender während des Genesungsprozesses selbst ausreichend KMSZ um den Blutverlust zu kompensieren. Diese Problematik versuchten andere Forschungsgruppen wie z.B. Isidori *et al.* zu umgehen, indem zur Gewinnung von CD133<sup>+</sup> KMSZ Patienten mit *granulocyte colony stimulating-factor* (G-CSF) täglich behandelt wurden bis eine KMSZ-Konzentration  $>20$  Zellen/ $\mu$ L im Blut erreicht werden konnte. Hiernach wurde täglich eine Leukopherese durchgeführt bis die Zielmenge von mindestens  $2 \times 10^6$  KMSZ erreicht wurde (Isidori et al., 2007). Somit wurden zwar mehrere Tage Vorbereitungszeit benötigt, es konnten aber hierdurch deutlich mehr KMSZ gewonnen werden. Eine Behandlung mit G-CSF wäre für Patienten vor großen operativen Eingriffen wie z.B. Leberteil-, Pankreas- oder Ösophagusresektionen (Tab. 4), durch eine Stärkung des Immunsystems und Reduktion von postoperativen Infektionen potentiell vorteilhaft (Schneider et al., 2004). Eine weitere Möglichkeit die KMSZ-Menge zu erhöhen besteht darin, die aufgereinigten CD133<sup>+</sup> KMSZ von zwei oder drei Spendern, wie in Versuchsnummer N. 80, zusammenzufügen (Tab. 4). Dies wurde bereits von anderen Forschungsgruppen angewendet (Ende et al., 2001; Takahashi et al., 2014). Weiterhin gibt es forschungsorientierte Firmen wie Zen-Bio Inc. oder StemExpress, aus den USA, die gepoolte CD133<sup>+</sup> KMSZ von mehreren Spendern online vermarkten.

---

## 6.2 Nachweis von CD133<sup>+</sup> KMSZ in einer geschädigten Rattenleber

Um CD133<sup>+</sup> KMSZ nicht nur in der Rattenleber nachweisen, sondern auch ihre Position im Gefäßsystem oder Leberparenchym bestimmen zu können, wurde in dieser Arbeit das Verfahren des *In situ Imaging* angewendet. Es handelt sich hierbei um eine Methode, die bereits von anderen Forschungsgruppen in einem NagermodeLL erfolgreich zur Beobachtung von *Homing* und Extravasation von Leukozyten (Honda et al., 2013; March et al., 2005) oder von hämatopoetischen Stammzellen (Kavanagh et al., 2010) nach einer warmen Leberischämie angewendet wurde. Eine Voraussetzung zur Nachverfolgung der injizierten Zellen während des *In situ Imaging* war eine GFP-Markierung der CD133<sup>+</sup> KMSZ mit PKH67 Green. Fluoreszenzmarkierung ist eine gut etablierte Methode und wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen unter anderem im Rahmen einer Leberschädigung zur Identifizierung und Nachverfolgung von KMSZ verwendet (Mohamed et al., 2016; SONG et al., 2015). Der PKH 67 Green Fluoreszenzfarbstoff wurde ursprünglich von Horan *et al.* als Werkzeug für die *In-vitro*- und *In-vivo*-Verfolgung von Zellen (z.B. Knochenmarkstammzellen) entwickelt. Er bindet irreversibel an die Zellmembran von vielen Zelltypen, ohne das Wachstum oder die Hauptfunktion der Zelle signifikant zu beeinflussen. Damit bietet sich dadurch eine Möglichkeit zur langfristigen Zellüberwachung und -identifizierung (Wallace et al., 1993). Ein Nachteil besteht in der unspezifischen Zellmembranmarkierung des Farbstoffs und der damit einhergehenden erschwerten Differenzierbarkeit zwischen CD133<sup>+</sup> KMSZ oder anderen, trotz der MACS-Aufreinigung möglicherweise verbliebenen mononukleären Zellen wie z.B. Leukozyten und Monozyten im Knochenmarkslisat. Aus diesem Grund ist die FACS-Analyse von Bedeutung, um einen möglichst hohen Anteil markierter CD133<sup>+</sup> KMSZ für die Perfusionsversuche gewährleisten zu können (s. Abschnitt 6.1.7.). Das PKH-Farbstoffe optimal für die kurzzeitige Verfolgung von KMSZ geeignet sind, wurde bereits erwähnt. Obwohl eine höhere Vergrößerung die Detektionseffizienz von Fluorochromen verbessert, verringert sie die Fläche und die Tiefe des Sichtfelds. Bei hohen Vergrößerungen ist es schwierig, Überlappungen oder Lücken zwischen den Sichtfeldern zu vermeiden, die zu einer Über- bzw. Unterschätzung der *Homing*-Effizienz führen können (Abb. 37) Somit wurde sich in dieser Arbeit bei der

Auszählung nur auf Zellen, die in der jeweiligen Fokusebene scharf dargestellt waren, konzentriert.



**Abbildung 37: GF-Aufnahme von KMSZ im Leberparenchym.** Dargestellt ist eine Fokusebene im Leberparenchym mit fluoreszierenden CD133+ KMSZ. Man erkennt die distinkte Abbildung von KMSZ in einer Fokusebene (roter Kreis) und die erahnbaren Signale anderer Immunfluoreszenzsignale in benachbarten Ebenen (schwarzes Rechteck).

Während des willkürlichen Rasters der gesamten Oberfläche des optischen Fensters wurde der Rattenleberlappen wiederholt und länger belichtet, was ein Ausbleichen der Fluorochrome in sauerstoffhaltigen physiologischen Umgebungen hervorgerufen haben könnte (Askenasy and Farkas, 2002). Obwohl die Fluoreszenzmarkierung nach Herstellerangaben stattgefunden hat, könnte ein zu geringes Maß von eingesetztem PKH-67-Farbstoff und eine zu geringe Untersuchungsvergrößerung nicht nur die Gesamtzellzahl, sondern auch das Verhältnis von parenchymal zu intravasal gemessenen KMSZ negativ beeinflusst haben. Der Erhalt einer guten Bildqualität stellte hier eine besondere Herausforderung dar. Im Vergleich zu einem *Live cell Imaging* System mit standardisierten Zellkammern und Rasteraufnahmen, ist bei jedem Tier die Position und Form des hRL ähnlich, aber nicht identisch. Dieses bedeutet, dass bei jeder natürlichen Organkrümmung einige Gewebereiche scharf und andere unscharf in der GF-Aufnahme dargestellt wurden. In dieser Arbeit versuchte man dies zu umgehen, indem man auf den Leberlappen ein Deckglaschen platzierte, um durch Kapillarkräfte eine

---

möglichst große und ebene Gewebefläche beurteilen zu können. Das Deckgläschen bedeckte nahezu vollständig den hRL und ermöglichte damit einen großen Überblick für GF-Aufnahmen. Diese GF-Aufnahmen erfolgten zufällig und subjektiv, da keine Möglichkeit zur Orientierung im Lebergewebe bestand und somit bereits fotografierte GF-Stellen nicht sicher wiederzufinden waren, wie es in einem standardisierten Bioflux Kanal eines *Live cell Imaging* System möglich wäre (Kirchner, 2016). Hierbei wäre die Verwendung eines automatischen Mikroskops mit programmierbaren Gesichtsfeldaufnahmen von Vorteil, um bereits visualisierte GF wiedererkennen zu können. Weiterhin beeinflussen Druckschwankungen im Perfusionssystem die Bildqualität. Diese sind durch schwankende Perfusionsvolumina bei KMSZ-Injektionen bedingt und führen zur Volumenzunahme (Aufblähung) oder -abnahme des Lebervolumens. Dieses führt gleichzeitig zu minimalen Hebe- oder Senkbewegungen des auf dem Organ platzierten Deckgläschen, so dass es aus der scharf eingestellten Sichtebeine am Mikroskop heraustritt und die Fokusebene verändert wird. Um diesen Vorgang weitestgehend zu vermeiden, wurde nicht nur ein Perfusionssystem mit gleichbleibender Flussgeschwindigkeit gewählt, sondern auch eine Pumpe zur KMSZ-Injektion verwendet, die eine gleichmäßige Flussgeschwindigkeit gewährleisten konnte.

Weitere Möglichkeit zur KMSZ-Detektion sind die Anwendung von anderen Färbeverfahren. Theise *et al.* konnten mit Hilfe von Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) Y-chromosomale Hepatozyten von männlichen Spendern in strahlenbehandelten, vollständig knochenmarkstransplantierten, weiblichen Mäusen nachweisen. In dieser Arbeit (s. Abschnitt 5.6.) wurde nach dem IPRL-Versuch die Rattenleber explantiert und eine Immunfluoreszenzfärbung (s. Abschnitt 5.6.) zum Nachweis von CD133<sup>+</sup> KMSZ deren Position (intravasal oder parenchymal) durchgeführt. Zur Darstellung von Hepatozyten wurde ein immunfluoreszierender NTCP 22 Rezeptorantikörper verwendet. Es handelt sich hierbei um einen membranständigen, natriumabhängigen Transportrezeptor auf der basolateralen Seite der Hepatozyten. Dieser ist als Co-Transporter zuständig für die Aufnahme von Gallensäuren aus der Blutbahn in die Hepatozyten (Döring *et al.*, 2012). Zur Darstellung von Gefäßendothel wurde ein immunfluoreszierender RECA-1 Antikörper verwendet. RECA-1 ist ein Oberflächenantigen, das von Endothelzellen der Ratten exprimiert wird. Der verwendete RECA-1 Antikörper ist sowohl *in-vitro*, als auch *in-vivo* für das Anfärben von Gefäßendothel geeignet. Er zeigt keine Reaktion auf anderen Zelltypen wie Fibroblasten,

---

Leukozyten, endotheliale Stromazellen, sowie in andere Spezies wie Maus, Hase, Ziege, Schaf und Mensch (Duijvestijn et al., 1992). Damit sind beide Immunfluoreszenzfärbungen hochspezifisch, so dass man mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgehen kann, dass in der durchgeführten Konfokalmikroskopie (Abb. 38) Gefäßverläufe und Hepatozytenreihen korrekt markiert und erkannt wurden. Der verwendete CD45 Antikörper zur Darstellung der KMSZ bindet, wie bereits oben beschrieben (Abschnitt 1.4.1) an ein membranständiges Glykoprotein aller kernhaltigen Zellen des humanen hämatopoetischen Systems. Aufgrund des vorrangegangenen *MACS* handelt es sich bei den markierten Zellen am ehesten um CD133<sup>+</sup> KMSZ. Somit konnte in dieser Arbeit durch die Immunfluoreszenzfärbung mit hoher Wahrscheinlichkeit das Vorhandensein von CD133<sup>+</sup> KMSZ intravasal und parenchymal in den explantierten Rattenlebern nachgewiesen werden.

### **6.3 Thrombozyten fördern die Akkumulation von CD133<sup>+</sup> KMSZ in einer geschädigten Rattenleber**

Ein Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung eines möglichen positiven Effektes von Thrombozyten auf die Ansiedlung von CD133<sup>+</sup> KMSZ. Dieser Effekt ist *in vitro* mit Hilfe von *Live cell Imaging* Systemen sowohl in einem rein murinen Modell mit hepatisch sinusoidalem Endothel und murinen CD133<sup>+</sup> KMSZ (Kirchner, 2016), als auch in einem humanem Modell mit *human micro vasculature endothelial cells* (HMEC-1) und humanen CD133<sup>+</sup> KMSZ (Bauchrowitz, n.d.) gezeigt worden. Somit galt es als nächsten Schritt, dieses in einem *in vitro* Xenomodell mit humanen CD133<sup>+</sup> KMSZ und einer Rattenleber zu untersuchen.

Nach induzierter Ischämie und anschließender Reperfusionszeit von 180 Minuten konnte in der vorliegenden Arbeit eine Ansiedlung von humanen CD133<sup>+</sup> KMSZ im ischämisch geschädigten Lebergewebe bereits innerhalb der ersten 15 Minuten nach der KMSZ-Injektion in allen drei VG nachgewiesen werden. In der VG 1 zeigte sich im Verlauf von 45 min nach der Injektion eine steigende durchschnittliche Gesamtzellmenge von CD133<sup>+</sup> KMSZ (Abb. 20, 23). Im Vergleich dazu zeigten VG 2 und VG 3 innerhalb der ersten 15 min eine etwas erhöhte durchschnittliche Gesamtzellmenge. Diese zeigte jedoch im weiteren Verlauf keine Zunahme, sondern blieb stabil (VG 2) oder stieg nur minimal (VG 3) zum Versuchsende an (Abb. 23). Damit zeigte sich im Vergleich der drei

---

Zeitpunkte innerhalb ihrer jeweiligen VG im *Single Pass System* keine signifikante Erhöhung der KMSZ-Akkumulation im zeitlichen Verlauf (Abb. 23).

Der Nachweis von akkumulierten CD133<sup>+</sup> KMSZ in allen VG lässt sich durch Ergebnisse von anderen Forschungsgruppen bekräftigen. Massberg *et al.* konnten eine signifikante Akkumulation von CD34<sup>+</sup> KMSZ nach einem vaskulären Schaden der Arteria carotis innerhalb von 5 Minuten nach einer Zellinjektion nachweisen (Massberg, 2006). Es handelte sich hierbei aber um ein murines *in-vivo* Modell, das neben KMSZ weitere Blutbestandteile beinhaltete, so dass im Vergleich zu unserem Modell eine Interaktion der zellulären und plasmatischen Blutbestandteile im Prozess der Akkumulation nicht ausgeschlossen werden darf. Zusätzlich wurde ein signifikanter Akkumulationspeak bei 60 Minuten nach der CD34<sup>+</sup> KMSZ-Injektion nachgewiesen. Jedoch ist eine Vergleichbarkeit aufgrund eines anderen Organsystems und starkabweichendem Untersuchungsaufbau nur äußerst eingeschränkt möglich. Kavanagh *et al.* untersuchte in einem ähnlichen *in-vivo* Lebermodell die Akkumulation von murinen hämatopoetischen SZ. Im Gegensatz zu der hier vorliegenden Arbeit erfolgte eine 90-minütige Ischämie durch eine Abklemmung der V. portae und A. hepatica gefolgt von einer 30-minütigen Reperfusion. Bevor die einmalige Zellinjektion von  $1 \times 10^6$  SZ in den linken Leberlappen erfolgte, wurde diese von dem intakten Blutkreislauf isoliert und ausschließlich mit physiologischem Bikarbonatpuffer perfundiert. In vordefinierten GF erfolgten aller 5 min Aufnahmen zur Beurteilung der Zellakkumulation. Erstens wurde eine insgesamt signifikant höhere SZ-Akkumulation nach einer Leberischämie im Vergleich zur Kontrollgruppe (ohne Ischämie) festgestellt. Zweitens war die Adhäsion und Akkumulation der hämatopoetischen SZ 30 min nach Zellinjektion signifikant erhöht (Kavanagh *et al.*, 2010). Vergleicht man das methodische Vorgehen in der hier vorliegenden Arbeit mit dem Versuchsaufbau von Kavanagh *et al.*, sind möglicherweise die zufällig und subjektiv gewählten GF und damit verbundene nichtkumulative Zellzählung der Grund für den fehlenden Akkumulationsunterschied in den jeweiligen VG. Zusätzlich gilt es in Zukunft weiter zu untersuchen, in wie weit der intakte Kreislauf, der das Zirkulieren der KMSZ ermöglicht, sowie andere Blutbestandteile die KMSZ-Akkumulation im Vergleich zu dem hier verwendeten *Single Pass System* signifikant beeinflussen bzw. erhöhen können.

---

Betrachtete man nun die Akkumulation der CD133<sup>+</sup> KMSZ in der VG 2 (Vorlauf mit thrombozytenreichem Plasma) und VG 3 (Inkubation der KMSZ mit thrombozytenreichem Plasma), zeigte sich zeitpunktunabhängig kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur VG 1. Die fehlende Signifikanz ist dennoch kritisch zu betrachten, da aus mathematischer Sicht diese sowohl durch die geringe Fallzahl, als auch durch eine hohe Streuung der Versuche N78, N83, N75 bedingt sein kann. Eine Überprüfung der Ergebnisse durch eine höhere Versuchszahl ist somit erforderlich.

Die Forschungsgruppe um Murata *et al* konnte eine signifikante Akkumulation von ausschließlich Thrombozyten in einem murinen Modell 5 min nach einer Leberteilektomie an Hand von gefärbten Lebergewebsschnitten nachweisen. Zusätzlich wurde hier elektronenmikroskopisch eine Transmigration der Thrombozyten in die Sinusoiden und den Disseiraum mit direktem Kontakt zu Hepatozyten bestätigt (Murata *et al.*, 2007). Der direkte Zell-Zell-Kontakt veranlasst die thrombozytäre Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie HGF (Matsuo *et al.*, 2008), die den PI3K/Akt-Signalweg aktiviert. Dieser ist nach Murata *et al.* ein Hauptsignalweg der Leberregeneration (Murata *et al.*, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass eine frühe Adhäsion am Endothel nicht über das bereits bekannte P-Selektin, dieses wird erst Stunden später freigesetzt (Klintman *et al.*, 2004), sondern über den GPIIb/IIIa (CD41) Rezeptor (Slaba *et al.*, 2015) erfolgt. Der erste Schritt im *Homing*-Prozess der KMSZ ist eine stabile Adhäsion am Endothel oder der freiliegenden Matrix wie Kollagen, Fibronectin, und Fibrinogen. Ein positiver Effekt von Thrombozyten auf die Adhäsion von CD34<sup>+</sup> KMSZ ist in einem murinen Modell durch Massberg *et al.* beobachtet worden. Nach vaskulärer Schädigung der Arteria carotis zeigte sich innerhalb von Sekunden eine Akkumulation von Thrombozyten, sowie nach 5 bis 10 min eine signifikante CD34<sup>+</sup> KMSZ-Akkumulation am gleichen Gewebeschaden über den Thrombozyten. Um einen maßgeblichen Einfluss von Thrombozyten auf die Akkumulation von KMSZ im geschädigten Carotismodell weiter zu bestätigen, erfolgte bei gleichem Versuchsablauf eine Blockierung der Adhäsionsrezeptoren GPIIb, GPIIb-V-IX und GPVI, die auf Thrombozyten und nicht auf CD34<sup>+</sup> KMSZ exprimiert werden, mit dem Resultat einer reduzierten Akkumulation beider Zelltypen (Massberg, 2006). Somit wäre ein Nutzen von Thrombozyten als Adhäsionsplattform durch die KMSZ nicht unwahrscheinlich. Die hierfür notwendigen Adhäsionsmoleküle sind als P-Selectin (Yadav *et al.*, n.d.), GPIIb (Stellos *et al.*, 2008), sowie  $\beta$ -1 und  $\beta$ -2 Integrine (Daub *et al.*, 2006) identifiziert worden. Eine weitere Möglichkeit die Adhäsion von

---

Knochenmarkstammzellen zu ermöglichen, besteht in der Inkubation von KMSZ mit Thrombozyten bzw. mit *platelet-derived microparticles* (PMP), die an ihrer Oberfläche Adhäsionsmoleküle wie CD41, CD61, CD62P und CXCR4 beinhalten und mit KMSZ interagieren können. Dieses Phänomen konnte durch Forschungsgruppen wie Liu *et al.* und Janowska-Wieczorek *et al.* in anderen Organsystemen beobachtet werden. Liu *et al.* inkubierte CD34<sup>+</sup> KMSZ mit PMP 15-30 min mit dem Ziel einer anschließenden Stammzelltransplantation im Rahmen kindlicher akuter Leukämien (Liu *et al.*, 2003). Sie konnten feststellen, dass CD34<sup>+</sup> KMSZ thrombozytentypische Oberflächenantigene wie CD41, CD61 und PAR-1 exprimieren, um mit und über PMP mit dem Gefäßendothel interagieren zu können. Eine erhöhte Adhäsionsfähigkeit von CD34<sup>+</sup> KMSZ und beschleunigte Knochenmarkregeneration nach Bestrahlung konnte hierdurch im murinen Modell nachgewiesen werden (Janowska-Wieczorek *et al.*, 2001).

Eine überdurchschnittlich hohe CD133<sup>+</sup> KMSZ-Akkumulation konnte in der hier vorliegenden Arbeit in den folgenden Einzelversuchen gemessen werden. In der VG 1 zeigte der Versuch N78 zum Zeitpunkt t15 nur eine KMSZ, wohingegen zum Zeitpunkt t30 72 KMSZ und zum Zeitpunkt t45 55 KMSZ verzeichnet wurden (Abb. 20). Eine mögliche Ursache für den plötzlichen Zellanstieg könnte eine Verklumpung der CD133<sup>+</sup> KMSZ zu Beginn der Injektion sein. Im weiteren Perfusionsverlauf könnte eine perfusionsdruckbedingte Auflösung verbunden mit einer vermehrten Zellverteilung stattgefunden haben. In der VG 2 (N83, Abb. 21) und in der VG 3 (N75, Abb. 22) zeigte sich zu allen drei Zeitpunkten eine überdurchschnittlich hohe CD133<sup>+</sup> KMSZ-Menge. Diese war zum Zeitpunkt t15 insgesamt höher als zu den Zeitpunkten t30 und t45. Eine mögliche Ursache könnte eine entstandene Verklumpung der Thrombozyten (VG 2) oder der mit Thrombozyten inkubierten KMSZ (VG 3), durch nicht ausreichende Resuspension der Zellen vor der Injektion sein. Auch *shear stress* bei der Injektion (Anderson *et al.*, 1978; Miyazaki *et al.*, 1996) erklärt möglicherweise diese Messergebnisse. Unter *shear stress* versteht man die tangentielle Belastung der Gefäßwand in Form von Scherkräften, die zu Aggregation von Thrombozyten führen kann. In der vorliegenden Arbeit könnte das zu Beginn zu einer hohen Akkumulation von Zellen geführt haben. Möglicherweise könnte diese im Verlauf durch fortlaufende Organperfusion aufgebrochen worden sein und zur weiteren Verteilung der KMSZ im Organ geführt haben können. Insbesondere in der VG 2 spricht der Perfusionsdruckanstieg (Abb. 17) zum Zeitpunkt t180 und damit zu Beginn der

---

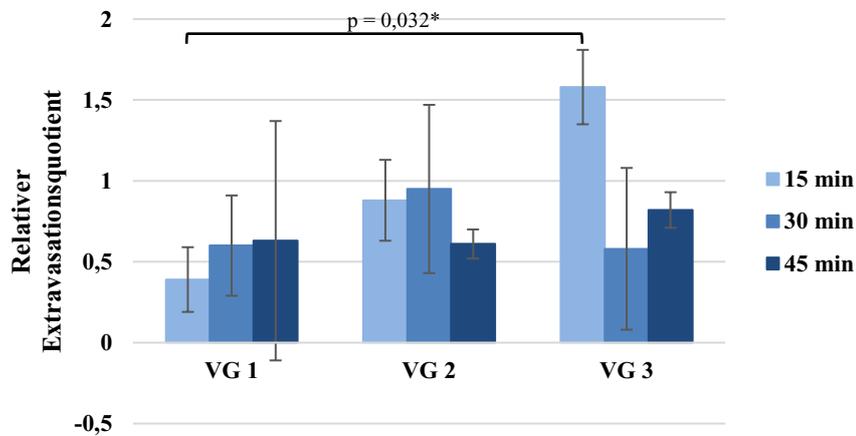
Thrombozyteninjektion für einen erhöhten Widerstand bzw. eine mögliche Barrierebildung durch Thrombozytenaggregation. Einerseits ist eine adäquate Resuspension der KMSZ und Thrombozyten vor der Injektion unumgänglich, andererseits gilt es, in weiteren Versuchen zu ermitteln, ob zum Beispiel durch geringere Injektionsgeschwindigkeiten  $<250 \mu\text{l}/\text{min}$  eine störende Aggregation verhindert werden kann. Methodisch sind die willkürlich und subjektiv gewählten GF des *In situ Imaging* von Nachteil, da sie durch eine mögliche Wiederholung von zellreichen GF zu fälschlich erhöhten Zellmengen bei der Auszählung geführt haben könnten.

Obwohl in der vorliegenden Arbeit zwischen den Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Akkumulation der  $\text{CD133}^+$  KMSZ festgestellt werden konnten, zeigte eine Forschungsgruppe um Schulte am Esch in einem BIOFLUX-System eine signifikant erhöhte  $\text{CD133}^+$  KMSZ-Adhäsion an humanem Endothel unter Co-Kultivierung mit PRP (Schulte am Esch *et al.*, under review). Somit sollte auch unter Einbezug weiterer Studien anderer Forschungsgruppen zu thrombozyteninduziertem *Homing* von Vorläuferzellen (de Boer, 2006; Massberg, 2006; Stellos et al., 2007) weiterhin an der Hypothese, eines positiven Einflusses von Thrombozyten auf die Akkumulation von  $\text{CD133}^+$  KMSZ *in vivo* und *in vitro* festgehalten werden. Hierfür bedarf es, neben den bereits erwähnten höheren Versuchszahlen, noch weiterer Untersuchungen in Bezug auf die Interaktion zwischen Thrombozyten, Endothel und  $\text{CD133}^+$  Knochenmarkstammzellen.

#### **6.4 Thrombozyten fördern die Extravasation von $\text{CD133}^+$ KMSZ in einer geschädigten Rattenleber**

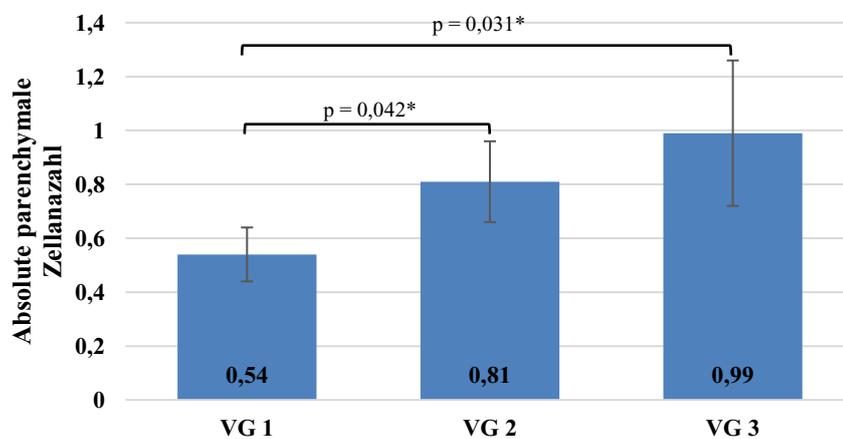
Nach der Injektion von  $\text{CD133}^+$  KMSZ in die ischämisch geschädigte Rattenleber konnte in allen drei VG sowohl eine Ansiedlung der Stammzellen intravasal, als auch bedingt durch eine Extravasation parenchymal nachgewiesen werden. Bei der Berechnung der relativen Extravasationsquotienten konnten im Vergleich der einzelnen Zeitpunkte untereinander in der jeweiligen VG keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 24,25,27). Nach der Bildung des Versuchsquotienten, konnte im Vergleich der VG ein signifikanter Unterschied ( $p=0,026$ ) in der Extravasation zwischen den unbehandelten  $\text{CD133}^+$  KMSZ (VG 1) und mit Thrombozyten vorinkubierten  $\text{CD133}^+$  KMSZ (VG 3)

gezeigt werden (Abb. 30). Ein Unterschied in der Extravasation von CD133<sup>+</sup> KMSZ konnte nur zum Zeitpunkt t15 zwischen der VG 1 und VG 3 ermittelt werden (Abb. 38).



**Abbildung 38: Relative Extravasationsquotienten der drei Versuchsgruppen.** Dargestellt sind zusammenfassend die relativen Extravasationsquotienten aus den VG 1, VG 2 und VG 3. In jeder VG sind die Quotienten zu den Zeitpunkten t15, t30 und t45 nach der CD133<sup>+</sup> KMSZ-Injektion einzeln aufgeführt. Ein signifikanter Unterschied ( $p=0,032$ ) zum Zeitpunkt t15 der VG 1 und 3 ist mit einem (\*) markiert.

Die Bestimmung der absoluten parenchymalen KMSZ-Anzahl deutet eine Bestätigung der oben genannten Ergebnisse an. Zusätzlich zeigt sich hier ein signifikant positiver Effekt des Vorlaufes von Thrombozyten (VG 2) und auch von thrombozytenreichem Plasma (VG 3) auf die Extravasation von CD133<sup>+</sup> KMSZ ( $p=0,042$ ;  $p=0,031$ , Abb. 39).



**Abbildung 39: Absolute parenchymale CD133<sup>+</sup> KMSZ-Anzahl zum Zeitpunkt t15.** Dargestellt sind die einzelnen absoluten Quotienten der drei Versuchsgruppen (VG 1, 2 und 3) zum Zeitpunkt t15. Eine bestehende Signifikanz zwischen den VG 1 und 2 ( $p = 0,042$ ) sowie VG 1 und 3 ( $p = 0,031$ ) ist mit einem (\*) markiert.

Es besteht eine Diskrepanz der Ergebnisse beim Vergleich der VG 2 mit VG 1 in Bezug auf die relativen Extravasationsquotienten zum Zeitpunkt t15 (Abb. 26) und beim Vergleich der Versuchsquotienten (Abb. 30). Es zeigte sich hier nur eine Tendenz zu einem signifikanten Unterschied ( $p=0,082$ ,  $p=0,056$ ). Wohingegen bei Vergleich der absoluten parenchymalen Zellzahl zum Zeitpunkt t15 ein signifikanter Unterschied

---

festgestellt wurde ( $p=0,042$ , Abb. 38). Möglicherweise hätte eine größere Untersuchungsanzahl den Unterschied zwischen den relativen Extravasationsquotienten sowie den Versuchsquotienten nicht nur angedeutet, sondern eine deutlichere Signifikanz gezeigt.

Auch andere Forschungsgruppen haben sich mit der Transmigration von mononukleären Zellen und Knochenmarkstammzellen beschäftigt. Die Dauer der Transmigration von Leukozyten zum Beispiel kann abhängig von der Endothelschichtung und der Basalmembranzusammensetzung sowohl unter 2-5 min, als auch über 5-15 min betragen (Coito, 2011). In einem *in vitro* Modell konnte Teo *et al.* zeigen, dass beim Ansiedeln von mesenchymalen Stammzellen (MSZ) auf Endothelplatten 90% der MSZ nach ca. 30 min die Transmigration beginnen und nur 50% nach 120 min das Endothel nach basal vollständig passieren (Teo *et al.*, 2012). Dies ist im Vergleich zu den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit ein deutlich längerer Transmigrationsprozess, wobei dieser Unterschied möglicherweise durch die fehlende Ischämie und der hieraus resultierenden geringeren SZ-Ansiedlung zu erklären wäre. Fraglich bleibt, ob innerhalb der ersten 15 min nach der KMSZ-Injektion nicht nur eine Akkumulation, sondern auch eine Extravasation stattfinden kann. Denn obwohl Kavanagh *et al.* nicht die Extravasation der KMSZ untersuchte, erfolgte eine signifikant erhöhte Akkumulation in seinen Versuchen erst nach 30 min. Eine Akkumulation ist somit eine zwingende Voraussetzung für eine Extravasation (Kavanagh *et al.*, 2010). Die Forschungsgruppe um Khandoga *et al.* zeigte in einem *in vivo* Perfusionsmodell der Mausleber, dass nach einer 90-minütigen Ischämie mit 30- und 120-minütiger Reperfusion die Leukozytenakkumulation signifikant erhöht ist. Die Leukozytentransmigration erst nach 140-minütigen Reperfusion stattfindet und bei weiterer Reperfusion von bis zu 360 min signifikant ansteigt (Khandoga *et al.*, 2005). Damit findet auch bei Khandoga *et al.* die Transmigration der Zellen zu einem späteren Zeitpunkt als in der hiesigen Arbeit statt. Zusätzlich konnte die Forschungsgruppe um Rastogi *et al.* feststellen, dass humane CD133<sup>+</sup> KMSZ zur Transmigration potentiell fähig sind. Sie untersuchten das Adhäsions- und Transmigrationsverhalten von CD133<sup>+</sup> KMSZ an Endothelplatten. Mit Hilfe von *RealTime*-PCR konnten sie intrazelluläre mRNA für diverse Liganden, Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle, wie z.B.: *platelet activating factor receptor* (PTAFR), PECAM-1 oder CXCR-4 nachweisen, die für den Transmigrationsprozess am Endothel von Neutrophilen genutzt werden. Zusätzlich konnten mittels FACS-Analyse Oberflächenrezeptoren und Adhäsionsmoleküle, wie z.B.

---

CD117, CD29, CD18, CD34, nachgewiesen werden, die von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten bei der Adhäsion und Transmigration am Endothel eingesetzt werden. Zusätzlich wurde mittels Antagonisierung des PTAFR eine reduzierte Transmigration von CD133<sup>+</sup> KMSZ beobachtet. Somit ist die Beteiligung des Rezeptors am Transmigrationsmechanismus höchstwahrscheinlich. Eine frühestmögliche Transmigration von KMSZ ins Zielgewebe könnte therapeutisch eine schnellere Wirkung bzw. Regeneration des Organgewebes bedeuten, die insbesondere schwerwiegenden Krankheitsverläufen verhindern und aufhalten könnte. Für andere Forschungsgruppen spielte daher die Langzeitwirkung des *Homing*-Prozesses eine entscheidendere Rolle. So untersuchten Kim *et al.* das *Homing* unterschiedlicher KMSZ in einem wesentlich längeren Zeitraum (von bis zu 6 Tagen). Zusätzlich wurde auch die Proliferation und Koloniebildung von KMSZ in mit Bestrahlung vorbehandeltem Knochenmark untersucht. Es wurden unter anderem auch CD133<sup>+</sup> KMSZ eingesetzt, da diese eine myeloide und endotheliale Zelllinien erzeugen konnten (Arndt *et al.*, 2013; Harris *et al.*, 2009). Sie konnten zwar eine Ansiedlung von CD133<sup>+</sup> KMSZ im Knochenmark aber weder eine Proliferation, noch eine Koloniebildung zeigen.

Im Vergleich zu den oben genannten Arbeiten, die im zeitlichen Verlauf eine zunehmende Extravasation nachweisen konnten, zeigte sich in unserer Arbeit keine stetige Zunahme der relativen oder absoluten Extravasationswerte. Eine potentielle Erklärung hierfür ist die nur einmalig, systembedingte Möglichkeit (*Single-Pass*) zur Adhäsion der KMSZ im Gegensatz zu einem zirkulierenden System oder statischen Zellsystemen. Zum Beispiel wurden bei Teo *et. al* die mesenchymalen Stammzellen *in vitro* auf Platten mit artifiziell Endothel gegeben und beobachtet. Hierbei erfolgte überhaupt keine Perfusion, so dass die Zellen nicht weggespült werden konnten und die Möglichkeit zur ungehinderten Adhäsion bestand. Bei Khandoga *et al.* konnten die Zellen in einem *in vivo* Modell durch einen intakten Kreislauf, unter Einfluss von hormonellen und hämatologischen Mediatoren, immer durch das Organ zirkulieren. Damit ist das hier etablierte IPRL Modell möglicherweise eher für eine Beobachtung einer frühen Interaktion von KMSZ in der Rattenleber als für längeren Verläufe geeignet.

In der folgenden Literatur wird der positive Effekt von Thrombozyten auf die Zell-Extravasation in unterschiedlichen *in vivo* und *in vitro* Modellen beschrieben. Wie bereits in Abschnitt 6.3. erwähnt, kann die Adhäsion von KMSZ unter Thrombozyteneinfluss

---

optimiert werden. Die genauen Transmigrationsmechanismen von Zellen unter Thrombozyteneinfluss sind nicht vollständig im Detail erforscht, dennoch gibt es erste positive Erkenntnisse über *in vitro* Migration von Monozyten (Gawaz et al., 2005), Neutrophilen (Lam et al., 2011), endothelialen Vorläuferzellen (Langer, 2006) und CD34<sup>+</sup> Stammzellen (Stellos et al., 2008) in Anwesenheit von Thrombozyten. Lam *et al.* konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* an einem murinen Modell nachweisen, dass PSGL-1 und thrombozytäres P-Selektin an der Transmigration von Neutrophilen im Rahmen einer Hornhautschädigung beteiligt sind. Dennoch sind diese nicht die einzigen relevant beteiligten Rezeptoren, da bei einer Depletion von beiden eine reduzierte Transmigration von Neutrophilen erst 12 h Stunden später eingetreten ist (Lam et al., 2011). Auch das von aktivierten Thrombozyten im Rahmen eines Gewebeschadens freigesetzte SDF-1 spielt für den Transmigrationsprozess eine wichtige Rolle. Peled *et al.* konnte an Gelplatten eine SDF-1-bedingte Förderung der Expression von Oberflächenintegrienen LFA-1 und VLA-4 an CD34<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup> Zellen zeigen. Diese Integrine können an endothelialen Liganden (ICAM-1 und VCAM-1) binden und somit die Transmigration begünstigen (Peled et al., 1999). Eine weitere Möglichkeit, wie Thrombozyten die Transmigration anderer Zellen begünstigen können, sind so genannten *endothelial gaps* (Teo et al., 2015). Es handelt sich hierbei um endotheliale Lücken, die durch Freisetzung von Sphingosin-1 Phosphat von aktivierten Thrombozyten ausgebildet werden und eine potentielle Migrationspassage für Zellen durch das Endothel bieten (Camerer et al., 2009; Wang and Dudek, 2009). In wie weit diese endotheliale Passagemöglichkeit von Zellen wie MSZ oder Leukozyten genutzt wird, ist nicht vollständig geklärt (Teo et al., 2015). Insgesamt konnte festgehalten werden, dass Thrombozyten an vielen Prozessen von der Adhäsion bis hin zur Transmigration von Leukozyten multifaktoriell beteiligt sind (Pitchford et al., 2017; Zuchtriegel et al., 2016). Ob diese Beteiligung auch für KMSZ zutrifft, gilt es noch weiter zu untersuchen, denn innerhalb der Stammzellarten zeigen sich bezüglich des Transmigrationsverhaltens im Beisein von Thrombozyten deutliche Unterschiede. Zum Beispiel nutzen CD34<sup>+</sup> SZ mit Hilfe von Thrombozyten die Transmigration über Adhäsionsmoleküle und Integrine (Peled et al., 1999). Während bei mesenchymalen Stammzellen (MSC) Thrombozyten einen positiven Effekt auf die Adhäsion zeigen, beeinflussen sie nicht die Transmigration (Teo et al., 2015), da MSC transzellulär migrieren (Karp and Leng Teo, 2009; Teo et al., 2012).

---

## 7 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein kombiniertes Modell aus einer isoliert perfundierten Rattenleber und *In situ Imaging* etabliert. Das hier verwendete *in vitro* Perfusionsmodell als *Single Pass System* und der KHP ermöglichten einen unkomplizierten Untersuchungsaufbau und eine stabile Leberperfusion. Dadurch konnte die Interaktion zwischen Thrombozyten und CD133<sup>+</sup> KMSZ untersucht werden. Dennoch bedarf es größerer Versuchszahlen für aussagekräftigere Ergebnisse. Für die Gewährleistung einer ausreichenden CD133<sup>+</sup> KMSZ-Menge, sowohl für den Versuch, als auch zum quantitativen Nachweis durch die FACS-Analyse, sollte ein mögliches Pooling von CD133<sup>+</sup> KMSZ unterschiedlicher Spender in Erwägung gezogen werden. Während des *In situ Imaging* konnte gezeigt werden, dass CD133<sup>+</sup> KMSZ sich bereits sehr früh (innerhalb der ersten 15 Minuten) nach der Injektion in der ischämisch-geschädigten Rattenleber sowohl intravasal als auch im Leberparenchym nachweisen lassen. Die bisherigen Ergebnisse deuten einen positiven Einfluss von Thrombozyten auf die Extravasation von CD133<sup>+</sup> KMSZ in einem Leberschädigungsmodell an. Auf Grund der geringen Versuchszahl, Streuung und fehlender Signifikanz in Bezug auf die Akkumulation der CD133<sup>+</sup> KMSZ ist es angeraten in Zukunft eine größere Versuchsanzahl durchzuführen. Ergänzend könnte zum Beispiel die quantitative Echtzeit-PCR angewendet werden, um CD133<sup>+</sup> KMSZ spezifische Marker bzw. deren zeitlich bedingt veränderte Expression innerhalb des perfundierten Leberlappens untersuchen zu können. Zur besseren Visualisierung der Interaktion zwischen Thrombozyten mit Endothel oder KMSZ während des *In situ Imaging* könnte die Verwendung einer thrombozytenspezifischen Fluoreszenzmarkierung z.B. Carboxyfluorescein-diazetat-Succinimidylester sinnvoll sein. Das IPRL Modell könnte weiterhin eingesetzt werden, um die Akkumulation und Extravasation von vorbehandelten CD133<sup>+</sup> KMSZ in Bezug auf ihre Adhäsionsmoleküle zu untersuchen. Ähnlich den MSZ könnten diese durch Stimulation von externen Faktoren (z.B. HGF, SCF-1) oder durch Injektionen von Genplasmiden, zur vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen wie z.B. CXCR4 (De Becker and Riet, 2016), untersucht werden und anschließend mit unbehandelten KMSZ verglichen werden.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass Thrombozyten einen spannenden therapeutischen Angriffspunkt zur Optimierung bestehender klinischer Konzepte der Knochenmarkstammzellapplikation zur Förderung der Leberregeneration bieten kann.

---

## VI. Literaturverzeichnis

- Alison, M.R., Poulson, R., Jeffery, R., Dhillon, A.P., Quaglia, A., Jacob, J., Novelli, M., Prentice, G., Williamson, J., Wright, N.A., 2000. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 406, 257. <https://doi.org/10.1038/35018642>
- Almeida-Porada, G., Porada, C.D., Chamberlain, J., Torabi, A., Zanjani, E.D., 2004. Formation of human hepatocytes by human hematopoietic stem cells in sheep. *Blood* 104, 2582–2590. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0259>
- am Esch, J.S., Schmelzle, M., Fürst, G., Robson, S.C., Krieg, A., Duhme, C., Tustas, R.Y., Alexander, A., Klein, H.M., Topp, S.A., Bode, J.G., Häussinger, D., Eisenberger, C.F., Knoefel, W.T., 2012. Infusion of CD133+ bone marrow-derived stem cells after selective portal vein embolization enhances functional hepatic reserves after extended right hepatectomy: a retrospective single-center study. *Ann. Surg.* 255, 79–85. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e31823d7d08>
- Anderson, G.H., Hellums, J.D., Moake, J.L., Alfrey, C.P., 1978. Platelet lysis and aggregation in shear fields. *Blood Cells* 4, 499–511.
- Arndt, K., Grinenko, T., Mende, N., Reichert, D., Portz, M., Ripich, T., Carmeliet, P., Corbeil, D., Waskow, C., 2013. CD133 is a modifier of hematopoietic progenitor frequencies but is dispensable for the maintenance of mouse hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 5582–5587. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215438110>
- Askenasy, N., Farkas, D.L., 2002. Optical Imaging of PKH-Labeled Hematopoietic Cells in Recipient Bone Marrow In Vivo. *STEM CELLS* 20, 501–513. <https://doi.org/10.1634/stemcells.20-6-501>
- Aumüller, G., Aust, G., Doll, A., Engele, J., Kirsch, J., Mense, S., Reißig, D., Salvetter, J., Schmidt, W., Schmitz, F., Schulte, E., Spanel-Borowski, K., Wolff, W., Wurzinger, L.J., Zilch, H.-G., 2017. *Duale Reihe Anatomie*, 2. ed. Georg Thieme Verlag.
- Barry, O.P., FitzGerald, G.A., 1999. Mechanisms of cellular activation by platelet microparticles. *Thromb. Haemost.* 82, 794–800.
- Bauchowitz, E., n.d. Thrombozyten und Stroma-derived-factor-1 (SDF-1) fördern die Adhäsion von CD133+ Knochenmarkstammzellen an Mikroendothelzellen unter Einfluss von Scherkräften. HHU Düsseldorf.
- Bessems, M., 't Hart, N.A., Tolba, R., Doorschodt, B.M., Leuvenink, H.G.D., Ploeg, R.J., Minor, T., van Gulik, T.M., 2006. The isolated perfused rat liver: standardization of a time-honoured model. *Lab. Anim.* 40, 236–246. <https://doi.org/10.1258/00236770677611460>
- Bonfanti, R., Furie, B.C., Furie, B., Wagner, D.D., 1989. PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood* 73, 1109–1112.
- Borowiak, M., Garratt, A.N., Wüstefeld, T., Strehle, M., Trautwein, C., Birchmeier, C., 2004. Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10608–10613.
- Broering, D.C., Hillert, C., Krupski, G., Fischer, L., Mueller, L., Achilles, E.G., Schulte am Esch, J., Rogiers, X., 2002. Portal vein embolization vs. portal vein ligation for induction of hypertrophy of the future liver remnant. *J. Gastrointest. Surg. Off. J. Soc. Surg. Aliment. Tract* 6, 905–913; discussion 913.
- Brulport, M., Schormann, W., Bauer, A., Hermes, M., Elsner, C., Hammersen, F.J., Beerheide, W., Spitkovsky, D., Härtig, W., Nussler, A., Horn, L.C., Edelmann, J., Pelz-Ackermann, O., Petersen, J., Kamprad, M., von Mach, M., Lupp, A.,

- 
- Zulewski, H., Hengstler, J.G., 2007. Fate of extrahepatic human stem and precursor cells after transplantation into mouse livers. *Hepatology*. Baltimore, Md 46, 861–870. <https://doi.org/10.1002/hep.21745>
- Buss, S., Caesar, R., Eckhardt, T., Fischer, R., Hartung, W., Janssen, W., Lasch, H.G., Otto, H.F., Remmele, W., Schaefer, H.E., Schöndorf, T.H., Stutte, H.J., n.d. *Pathologie*. Springer.
- Bussolati, B., Bruno, S., Grange, C., Buttiglieri, S., Deregibus, M.C., Cantino, D., Camussi, G., 2005. Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *Am. J. Pathol.* 166, 545–555. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62276-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62276-6)
- Camerer, E., Regard, J.B., Cornelissen, I., Srinivasan, Y., Duong, D.N., Palmer, D., Pham, T.H., Wong, J.S., Pappu, R., Coughlin, S.R., 2009. Sphingosine-1-phosphate in the plasma compartment regulates basal and inflammation-induced vascular leak in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 1871–1879. <https://doi.org/10.1172/JCI38575>
- Chen, Q., Khoury, M., Limmon, G., Choolani, M., Chan, J.K.Y., Chen, J., 2013. Human fetal hepatic progenitor cells are distinct from, but closely related to, hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells* Dayt. Ohio 31, 1160–1169. <https://doi.org/10.1002/stem.1359>
- Chien, K.R., Abrams, J., Pfau, R.G., Farber, J.L., 1977. Prevention by Chlorpromazine of Ischemic Liver Cell Death. *Am. J. Pathol.* 88, 539–557.
- Civin, C.I., Mirro, J., Banquerigo, M.L., 1981. My-1, new myeloid-specific antigen identified by a mouse monoclonal antibody. *Blood* 57, 842–845.
- Coito, A.J., 2011. LEUKOCYTE TRANSMIGRATION ACROSS ENDOTHELIAL AND EXTRACELLULAR MATRIX PROTEIN BARRIERS IN LIVER ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 16, 34–40. <https://doi.org/10.1097/MOT.0b013e328342542e>
- Cottler-Fox, M.H., Lapidot, T., Petit, I., Kollet, O., DiPersio, J.F., Link, D., Devine, S., 2003a. Stem cell mobilization. *ASH Educ. Program Book 2003*, 419–437.
- Cottler-Fox, M.H., Lapidot, T., Petit, I., Kollet, O., DiPersio, J.F., Link, D., Devine, S., 2003b. Stem cell mobilization. *ASH Educ. Program Book 2003*, 419–437.
- Cressman, D.E., Diamond, R.H., Taub, R., 1995. Rapid activation of the Stat3 transcription complex in liver regeneration. *Hepatology*. Baltimore, Md 21, 1443–1449.
- Daub, K., Langer, H., Seizer, P., Stellos, K., May, A.E., Goyal, P., Bigalke, B., Schönberger, T., Geisler, T., Siegel-Axel, D., Oostendorp, R.A.J., Lindemann, S., Gawaz, M., 2006. Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 20, 2559–2561. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6265fje>
- De Becker, A., Riet, I.V., 2016. Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? *World J. Stem Cells* 8, 73–87. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v8.i3.73>
- de Boer, H.C., 2006. Fibrin and Activated Platelets Cooperatively Guide Stem Cells to a Vascular Injury and Promote Differentiation Towards an Endothelial Cell Phenotype. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1653–1659. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000222982.55731.f1>
- De Silvestro, G., Vicarioto, M., Donadel, C., Menegazzo, M., Marson, P., Corsini, A., 2004. Mobilization of peripheral blood hematopoietic stem cells following liver resection surgery. *Hepatogastroenterology.* 51, 805–810.
- Döring, B., Lütteke, T., Geyer, J., Petzinger, E., 2012. Chapter Four - The SLC10 Carrier Family: Transport Functions and Molecular Structure, in: Bevenssee,

- 
- M.O. (Ed.), *Current Topics in Membranes, Co-Transport Systems*. Academic Press, pp. 105–168. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394316-3.00004-1>
- Dt. Ärzteblatt, 2014. Richtlinie zur Herstellung und Anwendung von hämatopoetischen Stammzellzubereitungen. [https://doi.org/10.3238/arztebl.2014.rl\\_haematop\\_sz01](https://doi.org/10.3238/arztebl.2014.rl_haematop_sz01)
- Duijvestijn, A.M., van Goor, H., Klatter, F., Majoor, G.D., van Bussel, E., van Breda Vriesman, P.J., 1992. Antibodies defining rat endothelial cells: RECA-1, a pan-endothelial cell-specific monoclonal antibody. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 66, 459–466.
- Duncan, A.W., Dorrell, C., Grompe, M., 2009. Stem Cells and Liver Regeneration. *Gastroenterology* 137, 466–481. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.05.044>
- Ende, N., Lu, S., Alcid, M.G., Chen, R., Mack, R., 2001. Pooled umbilical cord blood as a possible universal donor for marrow reconstitution and use in nuclear accidents. *Life Sci.* 69, 1531–1539. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01245-0](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01245-0)
- Erker, L., Grompe, M., 2007. Signaling networks in hepatic oval cell activation. *Stem Cell Res.* 1, 90–102. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2008.01.002>
- Factor, V.M., Seo, D., Ishikawa, T., Kaposi-Novak, P., Marquardt, J.U., Andersen, J.B., Conner, E.A., Thorgeirsson, S.S., 2010. Loss of c-Met Disrupts Gene Expression Program Required for G2/M Progression during Liver Regeneration in Mice. *PLoS ONE* 5, e12739. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012739>
- Fausto, N., Campbell, J.S., 2003. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech. Dev.* 120, 117–130.
- Fausto, N., Campbell, J.S., Riehle, K.J., 2006. Liver regeneration. *Hepatology* 43, S45–S53. <https://doi.org/10.1002/hep.20969>
- Federmann, J., 2013. S3-Leitlinie des hepatozellulären Karzinoms 33.
- Francavilla, A., Ove, P., Polimeno, L., Sciascia, C., Coetzee, M.L., Starzl, T.E., 1986. Epidermal growth factor and proliferation in rat hepatocytes in primary culture isolated at different times after partial hepatectomy. *Cancer Res.* 46, 1318–1323.
- Frenette, P.S., Denis, C.V., Weiss, L., Jurk, K., Subbarao, S., Kehrel, B., Hartwig, J.H., Vestweber, D., Wagner, D.D., 2000. P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet–endothelial interactions in vivo. *J. Exp. Med.* 191, 1413–1422.
- Fujii, H., Hirose, T., Oe, S., Yasuchika, K., Azuma, H., Fujikawa, T., Nagao, M., Yamaoka, Y., 2002. Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J. Hepatol.* 36, 653–659.
- Fürst, G., Schulte am Esch, J., Poll, L.W., Hosch, S.B., Fritz, L.B., Klein, M., Godehardt, E., Krieg, A., Wecker, B., Stoldt, V., Stockschräder, M., Eisenberger, C.F., Mödder, U., Knoefel, W.T., 2007. Portal vein embolization and autologous CD133+ bone marrow stem cells for liver regeneration: initial experience. *Radiology* 243, 171–179. <https://doi.org/10.1148/radiol.2431060625>
- Gäbelein, G., 2008. Untersuchung zur Effizienz von auxiliärer autologer Hepatozytentransplantation nach chirurgisch induzierter Leberinsuffizienz im Rattenmodell. <http://dx.doi.org/10.17169/refubium-8151>
- Gawaz, M., Langer, H., May, A.E., 2005. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J. Clin. Invest.* 115, 3378–3384. <https://doi.org/10.1172/JCI27196>
- Gehling, U.M., Willems, M., Dandri, M., Petersen, J., Berna, M., Thill, M., Wulf, T., Müller, L., Pollok, J.M., Schlagner, K., Faltz, C., Hossfeld, D.K., Rogiers, X., 2005. Partial hepatectomy induces mobilization of a unique population of

- 
- haematopoietic progenitor cells in human healthy liver donors. *J. Hepatol.* 43, 845–853. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.05.022>
- Gores, G.J., Kost, L.J., LaRusso, N.F., 1986. The isolated perfused rat liver: conceptual and practical considerations. *Hepatol. Baltim. Md* 6, 511–517.
- Gracia-Sancho, J., Casillas-Ramírez, A., Peralta, C., 2015. Molecular pathways in protecting the liver from ischaemia/reperfusion injury: a 2015 update. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 129, 345–362. <https://doi.org/10.1042/CS20150223>
- Grompe, M., 2003. The role of bone marrow stem cells in liver regeneration. *Semin. Liver Dis.* 23, 363–372. <https://doi.org/10.1055/s-2004-815560>
- Harris, J.R., Fisher, R., Jorgensen, M., Kaushal, S., Scott, E.W., 2009. CD133 progenitor cells from the bone marrow contribute to retinal pigment epithelium repair. *Stem Cells Dayt. Ohio* 27, 457–466. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0836>
- Holmes, N., 2006. CD45: all is not yet crystal clear. *Immunology* 117, 145–155. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02265.x>
- Honda, M., Takeichi, T., Asonuma, K., Tanaka, K., Kusunoki, M., Inomata, Y., 2013. Intravital imaging of neutrophil recruitment in hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. *Transplantation* 95, 551–558. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31827d62b5>
- Horstman, L.L., Ahn, Y.S., 1999. Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 30, 111–142.
- Irie-Sasaki, J., Sasaki, T., Matsumoto, W., Opavsky, A., Cheng, M., Welstead, G., Griffiths, E., Krawczyk, C., Richardson, C.D., Aitken, K., Iscove, N., Koretzky, G., Johnson, P., Liu, P., Rothstein, D.M., Penninger, J.M., 2001. CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature* 409, 349–354. <https://doi.org/10.1038/35053086>
- Isidori, A., Motta, M.R., Tani, M., Terragna, C., Zinzani, P., Curti, A., Rizzi, S., Taioli, S., Giudice, V., D’Addio, A., Gugliotta, G., Conte, R., Baccarani, M., Lemoli, R.M., 2007. Positive Selection and Transplantation of Autologous Highly Purified CD133+ Stem Cells in Resistant/Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia Patients Results in Rapid Hematopoietic Reconstitution without an Adequate Leukemic Cell Purging. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 13, 1224–1232. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2007.07.004>
- Jaeschke, H., Farhood, A., Smith, C.W., 1990. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. | *The FASEB Journal [WWW Document]*. URL <https://www.fasebj.org/doi/abs/10.1096/fasebj.4.15.2253850> (accessed 12.8.18).
- Jang, Y.-Y., Collector, M.I., Baylin, S.B., Diehl, A.M., Sharkis, S.J., 2004. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat. Cell Biol.* 6, 532–539. <https://doi.org/10.1038/ncb1132>
- Janowska-Wieczorek, A., Majka, M., Kijowski, J., Baj-Krzyworzeka, M., Reza, R., Turner, A.R., Ratajczak, J., Emerson, S.G., Kowalska, M.A., Ratajczak, M.Z., 2001. Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood* 98, 3143–3149.
- Jenne, C.N., Kubes, P., 2015. Platelets in inflammation and infection. *Platelets* 26, 286–292. <https://doi.org/10.3109/09537104.2015.1010441>
- Karp, J.M., Leng Teo, G.S., 2009. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell* 4, 206–216. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.02.001>

- Kavanagh et al., D.P.J., 2010. Haematopoietic stem cell recruitment to injured murine liver sinusoids depends on  $\alpha 4\beta 1$  integrin/VCAM-1 interactions | Gut [WWW Document]. URL <http://gut.bmj.com/content/59/01/79> (accessed 8.29.17).
- Khandoga, A., Kessler, J.S., Meissner, H., Hanschen, M., Corada, M., Motoike, T., Enders, G., Dejana, E., Krombach, F., 2005. Junctional adhesion molecule-A deficiency increases hepatic ischemia-reperfusion injury despite reduction of neutrophil transendothelial migration. *Blood* 106, 725–733. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-11-4416>
- Kim, S., Lin, L., Brown, G.A.J., Hosaka, K., Scott, E.W., 2017. Extended time-lapse in vivo imaging of tibia bone marrow to visualize dynamic hematopoietic stem cell engraftment. *Leukemia* 31, 1582–1592. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.354>
- Kirchner, J.P., 2016. Die Rolle der Thrombozyten für das frühe Homing CD 133+ Knochenmarkstammzellen entlang des murinen dermalen und hepatischsinusoidalen Endothels. HHU Düsseldorf.
- Klintman, D., Li, X., Thorlacius, H., 2004. Important role of p-selectin for leukocyte recruitment, hepatocellular injury, and apoptosis in endotoxemic mice. [WWW Document]. Important Role P-Sel. Leukoc. Recruit. Hepatocell. Inj. Apoptosis Endotoxemic Mice. URL <https://pdfs.semanticscholar.org/e7d8/81dd39beab8cf6cb71e175fed5891fb98f71.pdf> (accessed 9.26.17).
- Kollet, O., Shivtiel, S., Chen, Y.-Q., Suriawinata, J., Thung, S.N., Dabeva, M.D., Kahn, J., Spiegel, A., Dar, A., Samira, S., Goichberg, P., Kalinkovich, A., Arenzana-Seisdedos, F., Nagler, A., Hardan, I., Revel, M., Shafritz, D.A., Lapidot, T., 2003. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J. Clin. Invest.* 112, 160–169. <https://doi.org/10.1172/JCI17902>
- Krause, D.S., Ito, T., Fackler, M.J., Smith, O.M., Collector, M.I., Sharkis, S.J., May, W.S., 1994. Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 84, 691–701.
- Krieg, A., Schulte Am Esch, J., Schmelzle, M., Tustas, R., El-Karmi, A., Hosch, S., Knoefel, W.T., 2006. Stem cell factor levels do increase in patients subsequent to hepatectomy with the extent of parenchymal loss. *Transplant. Proc.* 38, 3556–3558. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2006.10.111>
- Kuwahara, R., Kofman, A.V., Landis, C.S., Swenson, E.S., Barendsward, E., Theise, N.D., 2008. The hepatic stem cell niche: identification by label-retaining cell assay. *Hepatology* 47, 1994–2002. <https://doi.org/10.1002/hep.22218>
- LaBarge, M.A., Blau, H.M., 2002. Biological Progression from Adult Bone Marrow to Mononucleate Muscle Stem Cell to Multinucleate Muscle Fiber in Response to Injury. *Cell* 111, 589–601. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01078-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01078-4)
- Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I.L., Grompe, M., 2000. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.* 6, 1229–1234. <https://doi.org/10.1038/81326>
- Lam, F.W., Burns, A.R., Smith, C.W., Rumbaut, R.E., 2011. Platelets enhance neutrophil transendothelial migration via P-selectin glycoprotein ligand-1. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 300, H468–H475. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00491.2010>
- Langer, H., 2006. Adherent Platelets Recruit and Induce Differentiation of Murine Embryonic Endothelial Progenitor Cells to Mature Endothelial Cells In Vitro. *Circ. Res.* 98, e2–e10. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000201285.87524.9e>

- 
- Lapidot, T., 2005. How do stem cells find their way home? *Blood* 106, 1901–1910. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1417>
- Lardon, J., Corbeil, D., Huttner, W.B., Ling, Z., Bouwens, L., 2008. Stem cell marker prominin-1/AC133 is expressed in duct cells of the adult human pancreas. *Pancreas* 36, e1-6. <https://doi.org/10.1097/mpa.0b013e318149f2dc>
- Lee, V.M., Stoffel, M., 2003. Bone marrow: An extra-pancreatic hideout for the elusive pancreatic stem cell? *J. Clin. Invest.* 111, 799–801. <https://doi.org/10.1172/JCI17063>
- Lehwald, N., Duhme, C., Wildner, M., Kuhn, S., Fürst, G., Forbes, S.J., Jonas, S., Robson, S.C., Knoefel, W.T., Schmelzle, M., Esch, J.S.A., 2013. HGF and SDF-1-mediated mobilization of CD133(+) BMSC for hepatic regeneration following extensive liver resection. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver.* <https://doi.org/10.1111/liv.12195>
- Lesurtel, M., 2006. Platelet-Derived Serotonin Mediates Liver Regeneration. *Science* 312, 104–107. <https://doi.org/10.1126/science.1123842>
- Linke, R., Diefenbeck, M., Friedrich, R., Seehofer, D., Hammer, C., 1998. Monitoring of microhemodynamic changes during ex vivo xenogeneic liver perfusion using intravital microscopy. *Transpl. Int.* 11, 259–265. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.1998.tb00967.x>
- Lisman, T., Porte, R.J., 2016. Mechanisms of platelet-mediated liver regeneration. *Blood* 128, 625–629. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-04-692665>
- Liu, B., Liao, C., Chen, J., Gu, S., Wu, S., Xu, Z., 2003. Significance of increasing adhesion of cord blood hematopoietic cells and a new method: platelet microparticles. *Am. J. Hematol.* 74, 216–217. <https://doi.org/10.1002/ajh.10412>
- Lüllmann-Rauch, R., 2006. *Histologie*, 2. ed. Thieme.
- Macher, A., 2014. Hämoglobin-Glutamer 200 reduziert den Reperfusionsschaden der Rattenleber durch HO-1 Induktion während der Organreperfusion nach kalter Ischämie [WWW Document]. URL <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=30814> (accessed 1.3.19).
- March, S., Garcia-Pagán, J.-C., Massaguer, A., Pizcueta, P., Panés, J., Engel, P., Bosch, J., 2005. P-selectin mediates leukocyte rolling in concanavalin-A-induced hepatitis. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* 25, 1053–1060. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2005.01137.x>
- Massberg, S., 2006. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1 and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J. Exp. Med.* 203, 1221–1233. <https://doi.org/10.1084/jem.20051772>
- Matsuo, R., Ohkohchi, N., Murata, S., Ikeda, O., Nakano, Y., Watanabe, M., Hisakura, K., Myronovych, A., Kubota, T., Narimatsu, H., Ozaki, M., 2008. Platelets Strongly Induce Hepatocyte Proliferation with IGF-1 and HGF In Vitro. *J. Surg. Res.* 145, 279–286. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2007.02.035>
- Meijer, D.K.F., Keulemans, K., Mulder, G.J., 1981. [11] Isolated perfused rat liver technique. *Methods Enzymol., Detoxication and Drug Metabolism: Conjugation and Related Systems* 77, 81–94. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77013-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77013-7)
- Mendes-Braz, M., Elias-Miró, M., Jiménez-Castro, M.B., Casillas-Ramírez, A., Ramalho, F.S., Peralta, C., 2012. The current state of knowledge of hepatic ischemia-reperfusion injury based on its study in experimental models. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 298657. <https://doi.org/10.1155/2012/298657>
- Miller, L.L., Bly, C.G., Watson, M.L., Bale, W.F., 1951. The dominant role of the liver in plasma protein synthesis; a direct study of the isolated perfused rat liver with the aid of lysine-epsilon-C14. *J. Exp. Med.* 94, 431–453.

- Miraglia, S., Godfrey, W., Yin, A.H., Atkins, K., Warnke, R., Holden, J.T., Bray, R.A., Waller, E.K., Buck, D.W., 1997. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 90, 5013–5021.
- Miyazaki, Y., Nomura, S., Miyake, T., Kagawa, H., Kitada, C., Taniguchi, H., Komiyama, Y., Fujimura, Y., Ikeda, Y., Fukuhara, S., 1996. High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. *Blood* 88, 3456–3464.
- Mizrak, D., Brittan, M., Alison, M.R., 2008. CD133: molecule of the moment. *J. Pathol.* 214, 3–9. <https://doi.org/10.1002/path.2283>
- Mohamed, H.E., Elswefy, S.E., Rashed, L.A., Younis, N.N., Shaheen, M.A., Ghanim, A.M., 2016. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells effectively regenerate fibrotic liver in bile duct ligation rat model. *Exp. Biol. Med.* 241, 581–591. <https://doi.org/10.1177/1535370215627219>
- Möhle, R., Moore, M.A., Nachman, R.L., Rafii, S., 1997. Transendothelial migration of CD34+ and mature hematopoietic cells: an in vitro study using a human bone marrow endothelial cell line. *Blood* 89, 72–80.
- Murata, S., Matsuo, R., Ikeda, O., Myronovych, A., Watanabe, M., Hisakura, K., Nakano, Y., Hashimoto, I., Ohkohchi, N., 2008. Platelets promote liver regeneration under conditions of Kupffer cell depletion after hepatectomy in mice. *World J. Surg.* 32, 1088–1096. <https://doi.org/10.1007/s00268-008-9493-0>
- Murata, S., Ohkohchi, N., Matsuo, R., Ikeda, O., Myronovych, A., Hoshi, R., 2007. Platelets Promote Liver Regeneration in Early Period after Hepatectomy in Mice. *World J. Surg.* 31, 808–816. <https://doi.org/10.1007/s00268-006-0772-3>
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Bodine, D.M., Leri, A., Anversa, P., 2003. Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Pediatr. Transplant.* 7 Suppl 3, 86–88.
- Peled, A., Grabovsky, V., Habler, L., Sandbank, J., Arenzana-Seisdedos, F., Petit, I., Ben-Hur, H., Lapidot, T., Alon, R., 1999. The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34+ cells on vascular endothelium under shear flow. *J. Clin. Invest.* 104, 1199–1211.
- Peled, A., Kollet, O., Ponomaryov, T., Petit, I., Franitza, S., Grabovsky, V., Slav, M.M., Nagler, A., Lider, O., Alon, R., 2000. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34+ cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* 95, 3289–3296.
- Pitchford, S., Pan, D., Welch, H.C.E., 2017. Platelets in neutrophil recruitment to sites of inflammation. *Curr. Opin. Hematol.* 24, 23–31. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000297>
- Raper, S.E., Burwen, S.J., Barker, M.E., Jones, A.L., 1987. Translocation of epidermal growth factor to the hepatocyte nucleus during rat liver regeneration. *Gastroenterology* 92, 1243–1250.
- Rastogi, P., White, M.C., Rickard, A., McHowat, J., 2008. Potential mechanism for recruitment and migration of CD133 positive cells to areas of vascular inflammation. *Thromb. Res.* 123, 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2008.03.020>
- Riehle, K.J., Dan, Y.Y., Campbell, J.S., Fausto, N., 2011. New concepts in liver regeneration: New concepts in liver regeneration. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 26, 203–212. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2010.06539.x>

- Roskams, T.A., Theise, N.D., Balabaud, C., Bhagat, G., Bhathal, P.S., Bioulac-Sage, P., Brunt, E.M., Crawford, J.M., Crosby, H.A., Desmet, V., Finegold, M.J., Geller, S.A., Gouw, A.S.H., Hytioglou, P., Knisely, A.S., Kojiro, M., Lefkowitch, J.H., Nakanuma, Y., Olynyk, J.K., Park, Y.N., Portmann, B., Saxena, R., Scheuer, P.J., Strain, A.J., Thung, S.N., Wanless, I.R., West, A.B., 2004. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology*. Baltimore, Md 39, 1739–1745.  
<https://doi.org/10.1002/hep.20130>
- Rothe, G., 2007. Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie 27–70. <https://doi.org/10.1159/000097509>
- Sawitzka, I., Kordes, C., Reister, S., Häussinger, D., 2009. The niche of stellate cells within rat liver. *Hepatology*. Baltimore, Md 50, 1617–1624.  
<https://doi.org/10.1002/hep.23184>
- Schindl, M., Wigmore, S.J., Currie, E.J., Laengle, F., Garden, O.J., 2005. Prognostic scoring in colorectal cancer liver metastases: development and validation. *Arch. Surg. Chic. Ill* 1960 140, 183–189. <https://doi.org/10.1001/archsurg.140.2.183>
- Schmelzle, M., Duhme, C., Junger, W., Salhanick, S.D., Chen, Y., Wu, Y., Toxavidis, V., Csizmadia, E., Han, L., Bian, S., Fürst, G., Nowak, M., Karp, S.J., Knoefel, W.T., Esch, J.S. am, Robson, S.C., 2013a. CD39 Modulates Hematopoietic Stem Cell Recruitment and Promotes Liver Regeneration in Mice and Humans After Partial Hepatectomy. *Ann. Surg.* 257, 693–701.  
<https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e31826c3ec2>
- Schmelzle, M., Splith, K., Andersen, L.W., Kornek, M., Schuppan, D., Jones-Bamman, C., Nowak, M., Toxavidis, V., Salhanick, S.D., Han, L., Schulte am Esch, J., Jonas, S., Donnino, M.W., Robson, S.C., 2013b. Increased plasma levels of microparticles expressing CD39 and CD133 in acute liver injury. *Transplantation* 95, 63–69. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318278d3cd>
- Schneider, C., von Aulock, S., Zedler, S., Schinkel, C., Hartung, T., Faist, E., 2004. Perioperative Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor (Filgrastim) Treatment Prevents Immunoinflammatory Dysfunction Associated With Major Surgery. *Ann. Surg.* 239, 75–81.  
<https://doi.org/10.1097/01.sla.0000103062.21049.82>
- Sensken, S., Waclawczyk, S., Knaupp, A.S., Trapp, T., Enczmann, J., Wernet, P., Kogler, G., 2007. In vitro differentiation of human cord blood-derived unrestricted somatic stem cells towards an endodermal pathway. *Cytotherapy* 9, 362–378. <https://doi.org/10.1080/14653240701320254>
- Sgodda, M., 2008. Untersuchungen zur Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen in vitro und Transplantation im akut geschädigten Lebermodell [WWW Document]. URL <http://d-nb.info/1024874184/34> (accessed 8.22.17).
- Sherrill, C., Dietschy, J.M., n.d. Characterization of the sinusoidal transport process responsible for uptake of chylomicrons by the liver. 10.
- Shmelkov, S.V., St Clair, R., Lyden, D., Rafii, S., 2005. AC133/CD133/Prominin-1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 715–719. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.08.010>
- Slaba, I., Wang, J., Kolaczowska, E., McDonald, B., Lee, W.-Y., Kubes, P., 2015. Imaging the dynamic platelet-neutrophil response in sterile liver injury and repair in mice. *Hepatology*. Baltimore, Md 62, 1593–1605.  
<https://doi.org/10.1002/hep.28003>
- Snippert, H.J., van Es, J.H., van den Born, M., Begthel, H., Stange, D.E., Barker, N., Clevers, H., 2009. Prominin-1/CD133 marks stem cells and early progenitors in

- 
- mouse small intestine. *Gastroenterology* 136, 2187-2194.e1.  
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.03.002>
- SONG, Y.-M., LIAN, C.-H., WU, C.-S., JI, A.-F., XIANG, J.-J., WANG, X.-Y., 2015. Effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells transplanted via the portal vein or tail vein on liver injury in rats with liver cirrhosis. *Exp. Ther. Med.* 9, 1292–1298. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2232>
- Stellos, K., Gnerlich, S., Kraemer, B., Lindemann, S., Gawaz, M., 2008. Platelet interaction with progenitor cells: vascular regeneration or inquiry? *Pharmacol. Rep.* PR 60, 101–108.
- Stellos, K., Langer, H., Daub, K., Schoenberger, T., Gauss, A., Geisler, T., Bigalke, B., Mueller, I., Schumm, M., Schaefer, I., Seizer, P., Kraemer, B.F., Siegel-Axel, D., May, A.E., Lindemann, S., Gawaz, M., 2007. Platelet-Derived Stromal Cell-Derived Factor-1 Regulates Adhesion and Promotes Differentiation of Human CD34+ Cells to Endothelial Progenitor Cells. *Circulation* 117, 206–215.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.714691>
- Stenberg, P.E., McEver, R.P., Shuman, M.A., Jacques, Y.V., Bainton, D.F., 1985. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J. Cell Biol.* 101, 880–886.
- Sutherland, D.R., Keating, A., 1992. The CD34 antigen: structure, biology, and potential clinical applications. *J. Hematother.* 1, 115–129.  
<https://doi.org/10.1089/scd.1.1992.1.115>
- Tajima, F., Tsuchiya, H., Nishikawa, K., Kataoka, M., Hisatome, I., Shiota, G., 2010. Hepatocyte growth factor mobilizes and recruits hematopoietic progenitor cells into liver through a stem cell factor-mediated mechanism. *Hepatol. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hepatol.* 40, 711–719. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2010.00647.x>
- Takahashi, M., Matsuoka, Y., Sumide, K., Nakatsuka, R., Fujioka, T., Kohno, H., Sasaki, Y., Matsui, K., Asano, H., Kaneko, K., Sonoda, Y., 2014. CD133 is a positive marker for a distinct class of primitive human cord blood-derived CD34-negative hematopoietic stem cells. *Leukemia* 28, 1308.  
<https://doi.org/10.1038/leu.2013.326>
- Teo, G.S.L., Ankrum, J.A., Martinelli, R., Boetto, S.E., Simms, K., Sciuto, T.E., Dvorak, A.M., Karp, J.M., Carman, C.V., 2012. Mesenchymal Stem Cells Transmigrate Between and Directly Through TNF- $\alpha$ -activated Endothelial Cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 30, 2472–2486. <https://doi.org/10.1002/stem.1198>
- Teo, G.S.L., Yang, Z., Carman, C.V., Karp, J.M., Lin, C.P., 2015. Intravital imaging of mesenchymal stem cell trafficking and association with platelets and neutrophils. *Stem Cells Dayt. Ohio* 33, 265–277.  
<https://doi.org/10.1002/stem.1848>
- Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D.M., Nakano, Y., Meyer, E.M., Morel, L., Petersen, B.E., Scott, E.W., 2002. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416, 542–545.  
<https://doi.org/10.1038/nature730>
- Theise, N.D., Badve, S., Saxena, R., Henegariu, O., Sell, S., Crawford, J.M., Krause, D.S., 2000. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatol. Baltim. Md* 31, 235–240.  
<https://doi.org/10.1002/hep.510310135>
- Truant, S., Oberlin, O., Sergent, G., Lebuffe, G., Gambiez, L., Ernst, O., Pruvot, F.-R., 2007. Remnant liver volume to body weight ratio > or =0.5%: A new cut-off to

- estimate postoperative risks after extended resection in noncirrhotic liver. *J. Am. Coll. Surg.* 204, 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2006.09.007>
- Van Hul, N.K.M., Abarca-Quinones, J., Sempoux, C., Horsmans, Y., Leclercq, I.A., 2009. Relation between liver progenitor cell expansion and extracellular matrix deposition in a CDE-induced murine model of chronic liver injury. *Hepatology* 49, 1625–1635. <https://doi.org/10.1002/hep.22820>
- Vassilopoulos, G., Wang, P.-R., Russell, D.W., 2003. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 422, 901–904. <https://doi.org/10.1038/nature01539>
- Wallace, P.K., Palmer, L.D., Perry-Lalley, D., Bolton, E.S., Alexander, R.B., Horan, P.K., Yang, J.C., Muirhead, K.A., 1993. Mechanisms of adoptive immunotherapy: improved methods for in vivo tracking of tumor-infiltrating lymphocytes and lymphokine-activated killer cells. *Cancer Res.* 53, 2358–2367.
- Wang, J., Clark, J.B., Rhee, G.-S., Fair, J.H., Reid, L.M., Gerber, D.A., 2003. Proliferation and hepatic differentiation of adult-derived progenitor cells. *Cells Tissues Organs* 173, 193–203. <https://doi.org/70375>
- Wang, L., Dudek, S.M., 2009. Regulation of Vascular Permeability by Sphingosine 1-Phosphate. *Microvasc. Res.* 77, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2008.09.005>
- Wang, X., 2003. Albumin-expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice that received transplants of highly purified human hematopoietic stem cells. *Blood* 101, 4201–4208. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-05-1338>
- Wang, Y., Yao, H.-L., Cui, C.-B., Wauthier, E., Barbier, C., Costello, M.J., Moss, N., Yamauchi, M., Sricholpech, M., Gerber, D., Lobo, E.G., Reid, L.M., 2010. Paracrine signals from mesenchymal cell populations govern the expansion and differentiation of human hepatic stem cells to adult liver fates. *Hepatology* 52, 1443–1454. <https://doi.org/10.1002/hep.23829>
- Welsch, U., 2006. *Lehrbuch Histologie*, 2nd ed. Elsevier, Urban & Fisher.
- Weyrich, A.S., Elstad, M.R., McEver, R.P., McIntyre, T.M., Moore, K.L., Morrissey, J.H., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., 1996. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J. Clin. Invest.* 97, 1525–1534. <https://doi.org/10.1172/JCI118575>
- Wisse, E., De Zanger, R.B., Charels, K., Van Der Smissen, P., McCuskey, R.S., 1985. The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatol. Baltim. Md* 5, 683–692.
- Woodfin, A., Voisin, M.-B., Nourshargh, S., 2007. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 2514–2523. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.151456>
- Yadav, S.S., Howell, D.N., Steeber, D.A., Harland, R.C., Tedder, T.F., Clavien, P.-A., n.d. P-selectin mediates reperfusion injury through neutrophil and platelet sequestration in the warm ischemic mouse liver. *Hepatology* 29, 1494–1502. <https://doi.org/10.1002/hep.510290505>
- Yamada, Y., Kirillova, I., Peschon, J.J., Fausto, N., 1997. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 1441–1446.
- Yang, L., Jung, Y., Omenetti, A., Witek, R.P., Choi, S., Vandongen, H.M., Huang, J., Alpini, G.D., Diehl, A.M., 2008. Fate-Mapping Evidence That Hepatic Stellate

- 
- Cells Are Epithelial Progenitors in Adult Mouse Livers. *Stem Cells* 26, 2104–2113. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0115>
- Yin, A.H., Miraglia, S., Zanjani, E.D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A.G., Olweus, J., Kearney, J., Buck, D.W., 1997. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90, 5002–5012.
- Zhang, Y., Bai, X.-F., Huang, C.-X., 2003. Hepatic stem cells: existence and origin. *World J. Gastroenterol.* WJG 9, 201–204.
- Zuchtriegel, G., Uhl, B., Pühr-Westerheide, D., Pörnbacher, M., Lauber, K., Krombach, F., Reichel, C.A., 2016. Platelets Guide Leukocytes to Their Sites of Extravasation. *PLoS Biol.* 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002459>

---

## **VII. Danksagung**

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Schulte am Esch, für die Bereitstellung des Themas, die engagierte Betreuung von Beginn der ersten Vorversuche bis zu den Korrekturen der vorliegenden Arbeit. Seine persönlichen und fachlichen Ratschläge waren sehr hilfreich und seine unerschütterliche Begeisterungsfähigkeit war stets eine große Motivation.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Frau Maria Wecker. Mit ihrer Freundschaft und Unterstützung, insbesondere in Zeiten von Rückschlägen, leistete sie einen großen Beitrag zum Gelingen des vorliegenden Projektes.

Frau Dr. Constanze Duhme danke ich für die kompetente Beratung in methodischen Fragen, sowie die hilfreichen Korrekturen im Rahmen des Verfassens dieser Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich sowohl bei meinen Eltern und meinem Bruder, als auch bei meinem Lebensgefährten, Dr. med. Philipp Ackermann, bedanken, die mir jederzeit unterstützend, beratend und motivierend zur Seite stehen und ohne deren Antrieb ich die Arbeit nicht fertiggestellt hätte.